

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY
PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Katedra organické chemie



**Využití Sonogashira cross-coupling reakce k přípravě 5-
substituovaných derivátů cytosinu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:

Tereza Tichá

Studijní obor:

Bioorganická chemie B1407

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D

Olomouc 2012

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lucie Brulíkové, Ph.D. za použití literatury, která je citována a uvedena na konci bakalářské práce.

V Olomouci dne 1.8.2012

Tereza Tichá

Poděkování:

Přednostně bych ráda chtěla ze srdce poděkovat RNDr. Lucii Brulíkové, Ph.D. za ochotu, čas, cenné rady, věcné připomínky, které mi pomáhaly při vypracování jednotlivých úkolů. Následně bych chtěla poděkovat celému kolektivu Katedry organické chemie v Olomouci a mým drahým spolužákům za pomoc, ochotu a rady. A v neposlední řadě mé rodině za podporu.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Tereza Tichá

Název práce: Využití Sonogashira cross-coupling reakce k přípravě 5-substituovaných derivátů cytosinu

Typ práce: bakalářská práce

Pracoviště: Katedra organické chemie, PŘF UP

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.

Rok obhajoby: 2012

Abstrakt:

Předložená bakalářská práce je zaměřena na syntézu derivátů cytosinu modifikovaných v poloze 5 rigidním systémem zakončeným heterocyklickým zbytkem pomocí tzv. Sonogashira cross-coupling reakce. Takováto modifikace může mít zásadní vliv na stabilitu DNA duplexu a významně tak ovlivňovat celou řadu biochemických procesů.

Bakalářská práce je rozčleněna do dvou částí. První z nich je teoretická a klade si za cíl objasnit mechanismus základní reakce celé práce, tedy Sonogashira cross-coupling reakce, a rovněž vytvořit přehled o dosud známých derivátech cytosinu, jež jsou v poloze 5 modifikovány rigidním systémem. V této oblasti jsou popsány syntetické přístupy vedoucí k cílovým derivátům, možnosti jejich reaktivity a vliv modifikace cytosinu v poloze 5 na DNA.

Diskusní část bakalářské práce sumarizuje výsledky získané během experimentální činnosti. Pozornost je nejprve zaměřena na přípravu výchozího substrátu - 5-ethynylcytosinu, optimalizaci reakčních podmínek a srovnání získaných výsledků s literaturou. Připravený 5-ethynylcytosin je dále využit k reakcím s vybranými heterocyklickými sloučeninami, přičemž cílové deriváty byly izolovány, purifikovány a charakterizovány pomocí NMR.

Připravené sloučeniny budou v budoucnu inkorporovány do DNA/RNA a bude sledován vliv modifikace na stabilitu DNA/RNA duplexu.

Klíčová slova: cytosin, ethynylcytosin, rigidní, cross-coupling, DNA

Počet stran: 34

Počet příloh: 0

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Tereza Tichá

Title: Utilization of Sonogashira cross-coupling reaction for preparation of 5-substituted cytosine derivatives

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, UP

Supervisor: RNDr. Lucie Brulíková, Ph.D.

The year of presentation: 2012

Abstract:

Presented bachelor thesis is focuses on synthesis of cytosine derivatives modified at the C5 position by rigid system which is terminated by heterocyclic ring employing the Sonogashira cross-coupling reaction. This type of modification could have essential effect on stability of DNA duplex and significantly affect large scale of biochemical processes.

Bachelor thesis is divided into two parts. First part is theoretical and there is an attempt to explain the principle of basic reaction of whole work - Sonogashira cross-coupling reaction. Further, theoretical part is aimed at studies on known derivatives of cytosine which are C5 modified by rigid system. There are described synthetic methods leading to final derivatives, their reactivity and effect of modification of cytosine in C5 position on DNA.

Discussion part of this work comprises the results achieved during experimental activity. Firstly, the preparation of starting material – 5-ethynylcytosine is described. Further, the work is aimed at the optimization of reaction conditions and comparison of results described in literature. Prepared 5-ethynylcytosine is used for reactions with selected heterocyclic compounds to afford final substances that were isolated, purified and identified by NMR spectroscopy.

Prepared structures will be incorporated into DNA/RNA in the future and the effect of modifications on stability of DNA/RNA duplex will be studied.

Keywords: cytosine, ethynylcytosine, rigid, cross-coupling, DNA

Number of pages: 34

Number of appendixes: 0

Language: czech

OBSAH

1. Úvod	8
2. Cíle bakalářské práce	10
3. Teoretická část	11
3.1. Cross-coupling reakce	11
3.1.1. Sonagashira cross-coupling	13
3.2. Syntéza a reaktivita vybraných 5- substituovaných derivátů cytosinu	15
3.2.1. Příprava 5-ethynylcytosinu	15
3.2.2. Reaktivita 5-ethynylcytosinu	16
3.2.3. Syntéza derivátů odvozených od 5-ethynylcytosinu	18
3.2.4. Vliv substituce cytosinu v poloze 5 na DNA helix	19
4. Diskuze a výsledky	21
4.1. Příprava 4-amino-5-((trimethylsilyl)ethynyl)pyrimidin-2(1 <i>H</i>)-onu	22
4.1.1. Syntéza z bromcytosinu	22
4.1.2. Syntéza z jodcytosinu	24
4.2. Odstranění protektivní skupiny	24
4.2.1. Odchránění silylové skupiny pomocí TBAF	25
4.2.2. Odchránění silylové skupiny pomocí MeOH/NH ₄ OH	25
4.3. Sonogashira coupling 5-ethynylcytosinu s variabilními heterocykly	25
4.3.1. Reakce s 2-jodpyridinem	26
4.3.2. Reakce s 2-jodthiofenem	26
4.3.3. Reakce s 3-bromthiofenem	27
4.4. Syntéza derivátů cytidinu	27
4.5. Výhledy do budoucna	28
5. Experimentální část	29
6. Závěr	32
7. Literatura	33

SEZNAM ZKRATEK

DMF – dimethylformamid

DMSO – dimethylsulfoxid

TEA - triethylamin

SAR – studie srovnávající strukturu a aktivitu

TPPTS - 3,3',3''-phosphinidyntris(benzensulfonová kyselina) trisodná sůl

TBAF – tetrabutylammoniumfluorid

TBDMSCl – *tert.*butyldimethylsilyl chloride

HMDS – hexamethyldisilazan

TMS – trimethylsilan

DIPEA – diisopropylethylamin

DMAP - 4-dimethylaminopyridin

TMSOTf – trimethylsilyl trifluoromethansulfonát

1,2-DCE – 1,2-dichloroethan

TBAA – *tert.*butyl acetoacetate

DMTCl – *N,N*-dimethoxytrityl chlorid

LC-MS - kapalinová chromatografie – hmotnostní spektroskopie

TLC - thin layer chromatography - chromatografie na tenké vrstvě

NMR - nukleární magnetické resonance

HIV – Human Immunodeficiency Virus

Ekv – molární ekvivalent

Ph – fenyl

Et – ethyl

Me – methyl

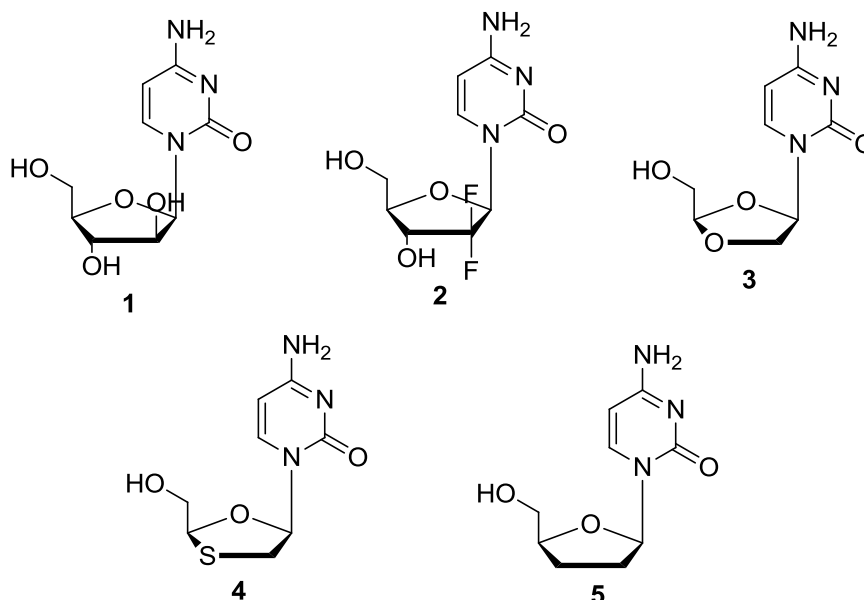
PPh₃ – triifenylfosfin

L – ligand

1. Úvod

Cytosin představuje jeden ze základních stavebních kamenů nukleových kyselin vyskytujících se ve všech živých organismech. Ve druhé polovině 20. století byly u několika derivátů cytosinu prokázány antibakteriální a cytostatické účinky, které iniciovaly další výzkum. Během posledních 50-ti let vznikly tisíce studií zaměřené na syntézu cytosinu, jeho derivátů modifikovaných v různých polohách či studie zaměřené na biologické účinky (cytostatické, antivirotické, antibakteriální, atd.).

Úspěšným výstupem těchto studií bylo uvedení několika preparátů na bázi cytosinu na trh a jejich využití v medicíně (Obr. 1). Příkladem takovýchto léčiv může být Cytarabin **1** (prodáváný pod komerčním názvem Alexan nebo Cytosar), který se používá k léčbě akutní myeloidní leukémie nebo některých lymfomů. Dále např. Gemcitabin **2** indikovaný k léčbě nemalobuněčného karcinomu plic, Troxacitabin **3** užívaný při lymfoproliferačních onemocněních. Úspěšné preparáty pro léčbu HIV pozitivních pacientů zahrnují Emtricitabin **4**, nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy, který se rovněž prodává v kombinaci s tenofovirem pod komerčním názvem Truvada. Zalcitabin **5** je rovněž nukleosidovým inhibitorem reverzní transkriptázy používaným při léčbě AIDS.



Obr. 1: Vybrané struktury léčivých derivátů cytosinu.

V některých studiích bylo zjištěno, že modifikace cytosinu v poloze 5 ethylylovým substituentem má určitý vliv na stabilitu DNA duplexu. Jeho další derivatizace např.

triazolovým cyklem pak významně ovlivňuje π - π interakce a tím přispívá k vyšší termální stabilitě takto modifikovaných látek¹.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem bude bakalářská práce zaměřena na syntézu derivátů cytosinu modifikovaných v poloze 5 rigidním systémem. Tyto deriváty budou v budoucnu studovány z hlediska jejich biologické aktivity a rovněž inkorporovány do oligodeoxynukleotidu a studován jejich vliv na termální stabilitu DNA.

2. Cíle bakalářské práce

Předložená bakalářská práce je zaměřena na přípravu derivátů cytosinu **7** modifikovaných v poloze C5 heterocyklickým systémem vázaným přes rigidní linker (Schéma 1). Tento linker může být tvořen trojnou vazbou, popřípadě trojnou vazbou v kombinaci s benzenovým jádrem. Heterocyklické zbytky jsou voleny podle dostupnosti výchozích substrátů.

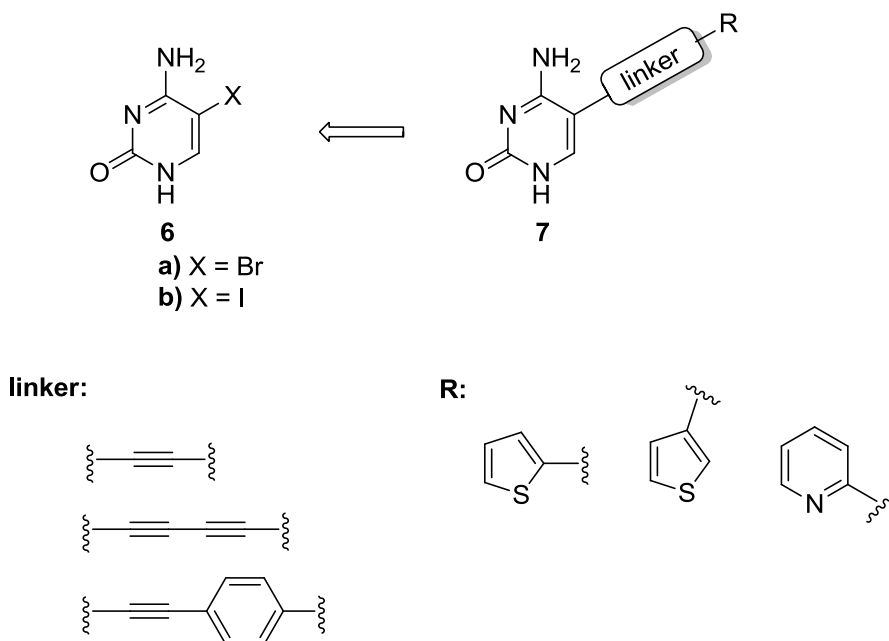


Schéma 1: Navržené cílové struktury.

Jednotlivé dílčí cíle bakalářské práce lze shrnout několika následujícími body:

- Vytvoření rešerše popisující syntézu a reaktivitu známých derivátů cytosinu modifikovaných v poloze 5 specifickým rigidním systémem.
- Syntéza výchozího substrátu a optimalizace podmínek jeho přípravy.
- Sonogashira cross-coupling reakce 5-ethynylcytosinu s variabilními substráty a evaluace jeho reaktivity.

3. Teoretická část

Teoretická část předložené bakalářské práce je rozdělena do dvou základních oblastí. V první části bude stručně popsán princip cross-coupling reakcí, konkrétně pak mechanismus základní reakce celé bakalářské práce, a to Sonogashira cross-coupling reakce. Druhá část pak bude pojednávat o vybraných derivátech cytosinu modifikovaných v poloze 5 rigidním systémem.

3.1. Cross-coupling reakce

Cross-coupling reakce jsou obecně používaným termínem pro tvorbu nových „uhlík-uhlík“ (C-C) vazeb, které zahrnují reakci organometalického reagentu **9** s organickým elektrofilem **8** za přítomnosti katalyzátoru, nejčastěji Ni nebo Pd komplexů (*Schéma 2*)²⁻⁴.

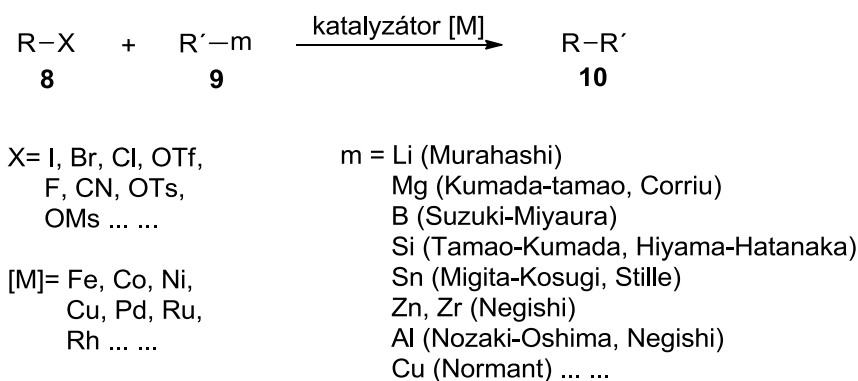


Schéma 2: Obecný popis cross-coupling reakcí.

Tyto reakce byly vyvinuty na počátku 70. let a nyní patří mezi jedny z nejpoužívanějších reakcí. O významu cross-coupling reakcí svědčí také fakt, že v roce 2010 byli Richard F. Heck, Ei-ichi Negishi a Akira Suzuki oceněni Nobelovou cenou za „palladium-katalyzované cross-coupling reakce v organické syntéze“.

Cross-coupling reakce jsou rozdělovány do dvou hlavních skupin podle jejich reakčního mechanismu^{2,5}. První z nich zahrnuje proces – oxidativní adice, transmetalace a redukční eliminace (*Schéma 3*). Druhý mechanismus je založen na oxidativní adici, inserci a redukční eliminaci (*Schéma 4*).

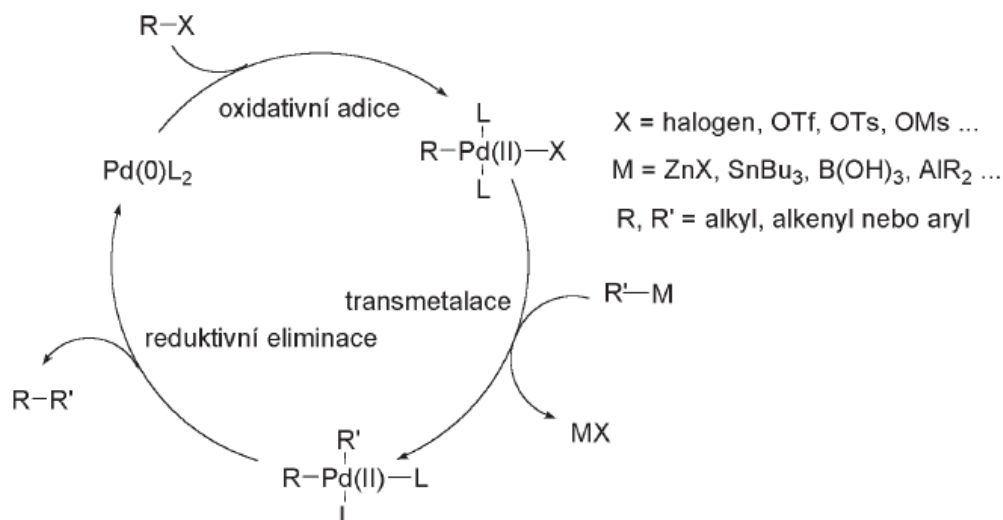


Schéma 3: Mechanismus oxidativní adice, transmetalace a reaktivní eliminace.

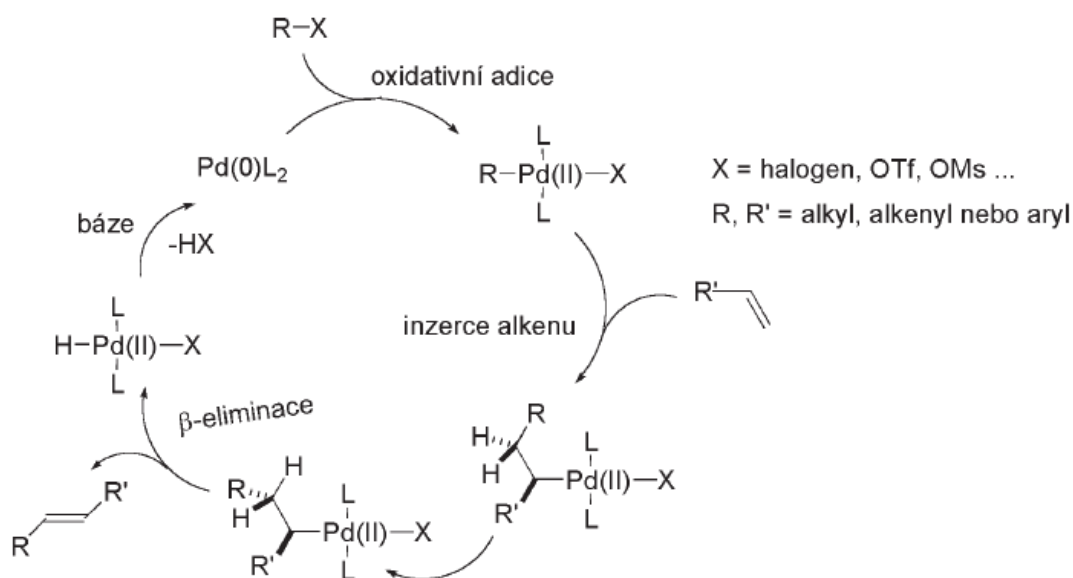
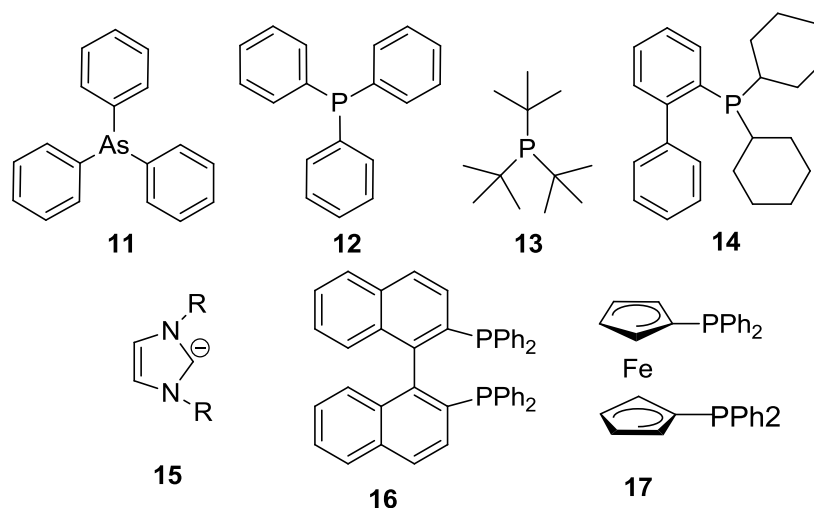


Schéma 4: Mechanismus oxidativní adice, inserce a reaktivní eliminace.

Jako katalyzátory jsou často voleny $\text{Ni}(0)$ či $\text{Pd}(0)$ komplexy⁶, $\text{Pd}(0)$ komplexy jsou však stabilnější, proto jsou využívány nejvíce, např. $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$. Není nutné vždy použít katalyzátory v nulovém mocenství, lze rovněž použít Pd(II) či Ni(II) katalyzátory, z nichž požadované $\text{Pd}(0)$ či $\text{Ni}(0)$ komplexy získáme redukcí např. přebytkem trialkylaminu. Mezi takovéto sloučeniny řadíme např. $\text{Ni}(\text{PPh}_3)_4\text{Br}_2$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4\text{Cl}_2$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ a PdCl_2 . Také není nezbytně nutné používat jako katalyzátor komplex, ale můžeme místo toho použít nanočástice palladia. Jejich nevýhodou je ovšem tendence se často shlukovat, čímž ztrácí svoji efektivnost. Tomu se dá předejít přípravou speciálními metodami.

Další velmi důležitou složkou coupling reakcí jsou ligandy, které významně ovlivňují aktivitu katalytického systému. Nejvíce používaným je trifenylofosfin (PPh_3) **12** (Obr. 2), AsPh_3 **11**, derivát **14**, $\text{P}(\text{tert-Bu})_3$ **13**, či bidentální ligandy 2,2-bis(difenylofosfanyl)-1,1-binaftalen (binap) **16** a 1,1-bis(difenylofosfanyl)ferrocen (dppf) **17**.



Obr. 2: Některé vybrané struktury ligandů.

3.1.1. Sonogashira cross-coupling

Sonogashira cross-coupling představuje reakci terminálních alkyňů s aryl či vinylhalogenidy za vzniku C-C vazeb (Schéma 5). Tato reakce byla v minulosti popsána a podrobně diskutována ve 140-ti souhrnných článcích, z nichž dva nejcitovanější pochází z roku 2007^{7,8}.

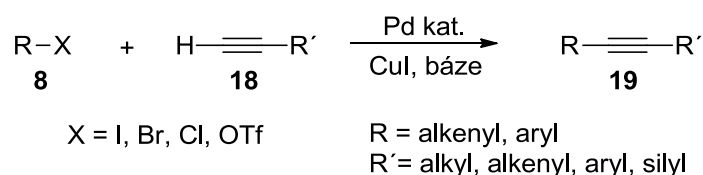


Schéma 5: Obecná Sonogashira cross-coupling reakce.

Podrobný mechanismus Sonogashira cross-coupling reakce zahrnuje 2 cykly, a to Pd cyklus a Cu (kuprátový) cyklus (Schéma 6). V prvním cyklu nejdříve komplex Pd(0) katalyzátoru a ligandu **20** reaguje s aryl či vinyl halogenidem **21** v procesu nazývaném oxidativní adice. Vzniklý komplex **22** podléhá transmetalaci s acetylidem mědným za

vzniku komplexu **23**. V posledním kroku komplex **24** podléhá reaktivní eliminaci za vzniku alkynu **25**, přičemž se regeneruje Pd katalyzátor.

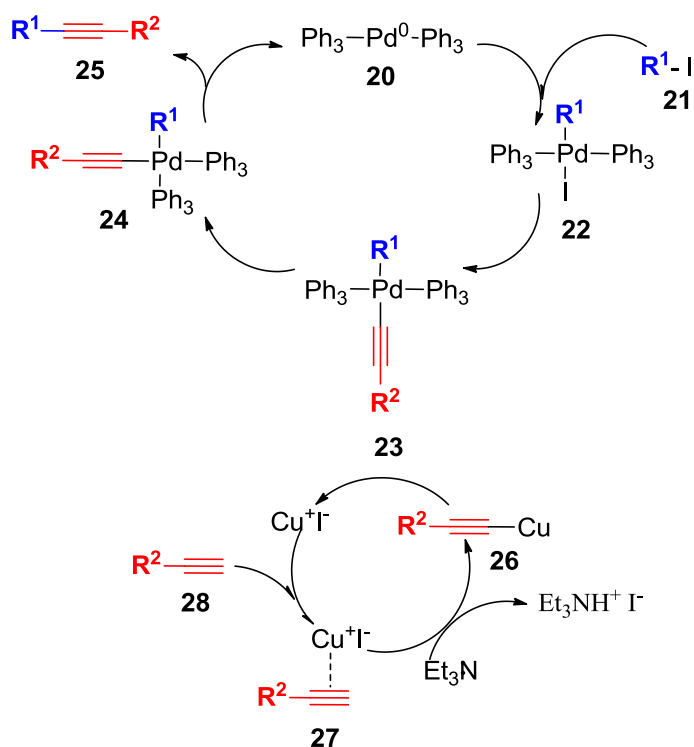


Schéma 6: Mechanismus Sonogashira cross-coupling reakce.

Nejčastěji používanými katalyzátory při Sonogashira coupling reakcích jsou běžné katalyzátory jako $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$. Výhodou prvního z nich je nulový stav vstupujícího palladia, kdežto druhý katalyzátor musí být nejdříve redukován. Naproti tomu, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ je stálejší za vyšších teplot a vůči oxidaci.

Mezi nejpoužívanější báze řadíme triethylamin, diethylamin nebo diisopropylamin. Méně často je využíván také isopropylethylamin.

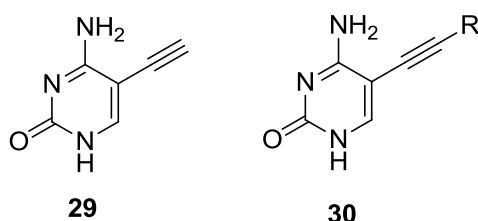
Jako rozpouštědlo se nejvíce používá bezvodý DMF, ale mohou být použita i jiná rozpouštědla jako DMSO, THF, toluen, dioxan nebo benzen. Původní Sonogashirův protokol popisuje použití samotných bází (aminů) jako reakční prostředí. V některých případech může být v reakci použito aktivující aditivum, např. TBAF nebo TBAOH.

Sonogashira cross-coupling může probíhat i bez katalýzy Cu(I) solí ale tyto reakce jsou ojedinělé.

Sonogashira cross-coupling reakce našly své uplatnění v mnoha syntetických procesech⁷. Představují rychlé a efektivní řešení např. při alkynylaci arenů a heterocyklů, syntéze enynů, enedynů, yonů, karbocyklických či heterocyklických systémů, přírodních produktů, atd.

3.2. Syntéza a reaktivita vybraných 5-substituovaných derivátů cytosinu

V této části bakalářské práce je pozornost zaměřena na syntézu a reaktivitu 5-ethynylcytosinu **29**, jakožto výchozího substrátu pro přípravu nových derivátů cytosinu. Dále pak bude popsána příprava derivátů cytosinu **30** modifikovaných v poloze 5 znázorněných na Obr. 3.

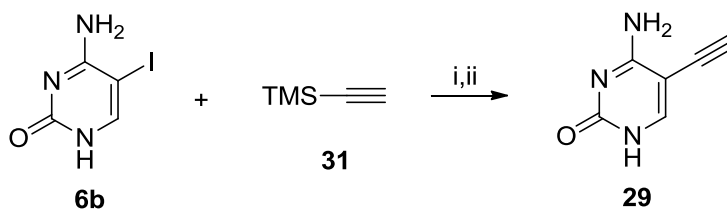


R = heterocyklus, karbocyklus, cyklus

Obr. 3: Modifikované deriváty cytosinu.

3.2.1. Příprava 5-ethynylcytosinu

V literatuře můžeme nalézt 2 způsoby přípravy 5-ethynylcytosinu⁹⁻¹¹. V novějších citacích se setkáváme s prvním ze dvou způsobů přípravy – Sonogashira cross-coupling reakce 5-jodocytosinu (Schéma 7). V prvním kroku dochází ke couplingové reakci 5-jodocytosinu **6b** s trimethylsilylacethylenem **31** v prostředí bezvodého DMF při teplotě 80°C⁹. Jako katalyzátor autoři zvolili Pd(PPh₃)₂Cl₂. Trimethylsilylový intermediát je v následné reakci s methanolickým roztokem amoniaku převeden na cílový derivát **29**. Výsledná konverze 5-jodocytosinu na 5-ethynylcytosin je 79%.

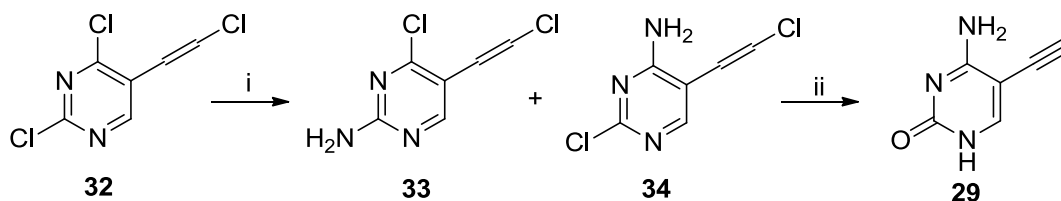


(i) CuI, TEA, Pd(PPh₃)₂Cl₂, DMF, 80°C, 1 h; (ii) NH₄OH, MeOH, RT, 48 h.

Schéma 7: Příprava 5-ethynylcytosinu z 5-jodocytosinu.

Starší práce popisují druhý způsob syntézy 5-ethynylcytosinu^{10,11}. Reakce probíhá ve dvou krocích a vychází z 5-(1-chlorvinyl)-2,4-dichlorpyrimidinu **32** (Schéma 8).

Tento substrát byl reagován s ethanolickým amoniakem při 0°C. Po 18-ti hodinách vznikla směs 2-amino-4-chloro-5-(1-chlorovinyl)pyrimidinu **33** a 4-amino-2-chloro-5-(1-chlorovinyl)pyrimidinu **34**. Separací na silikagelu byly obě látky odděleny, derivát **33** získán ve výtěžku 11%. 5-Ethynylcytosin **29** byl získán z látky **34** po jeho varu v 2M roztoku KOH ve směsi dioxan:voda (1:1) po dobu 90 minut.

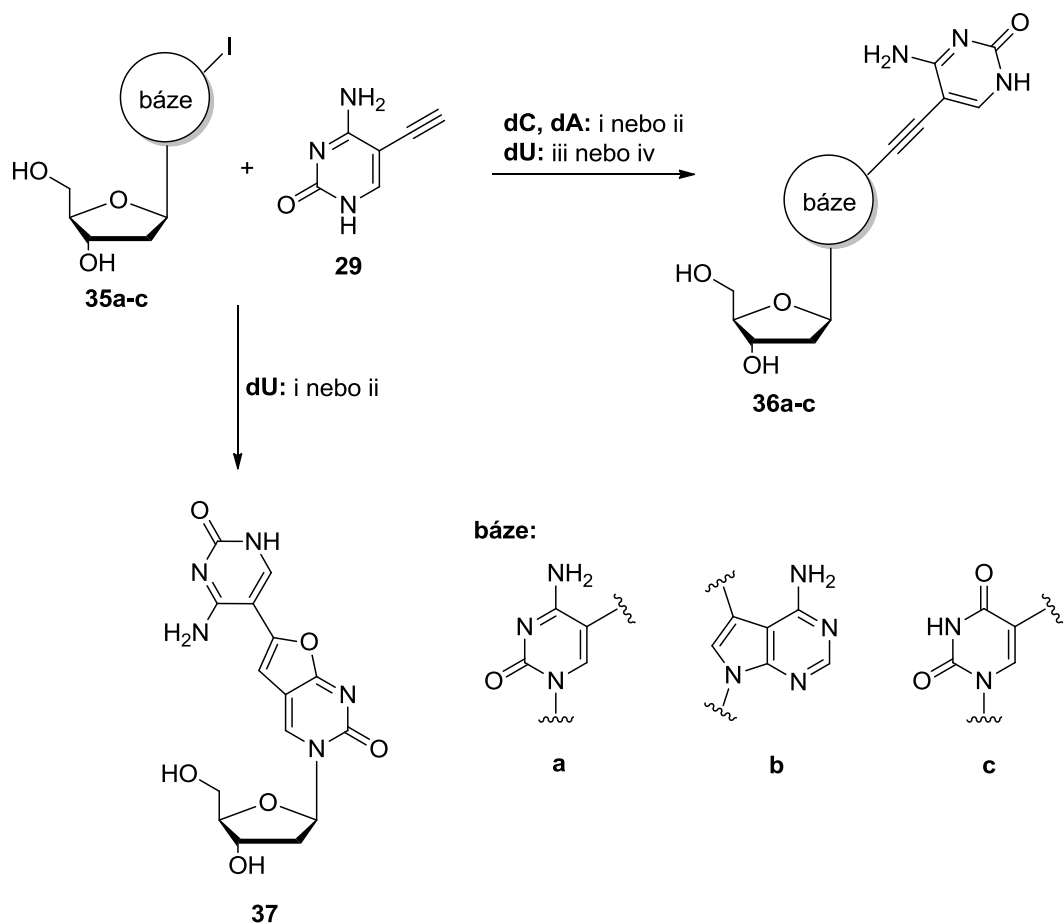


(i) MeOH/NH₃, 0°C, 18 h; (ii) 2M KOH, voda:dioxiran (1:1), var, 90 m.

Schéma 8: Příprava 5-ethynylcytosinu **29** z 5-(1-chlorovinyl)-2,4-dichloropyrimidin **32**.

3.2.2. Reaktivita 5-ethynylcytosinu

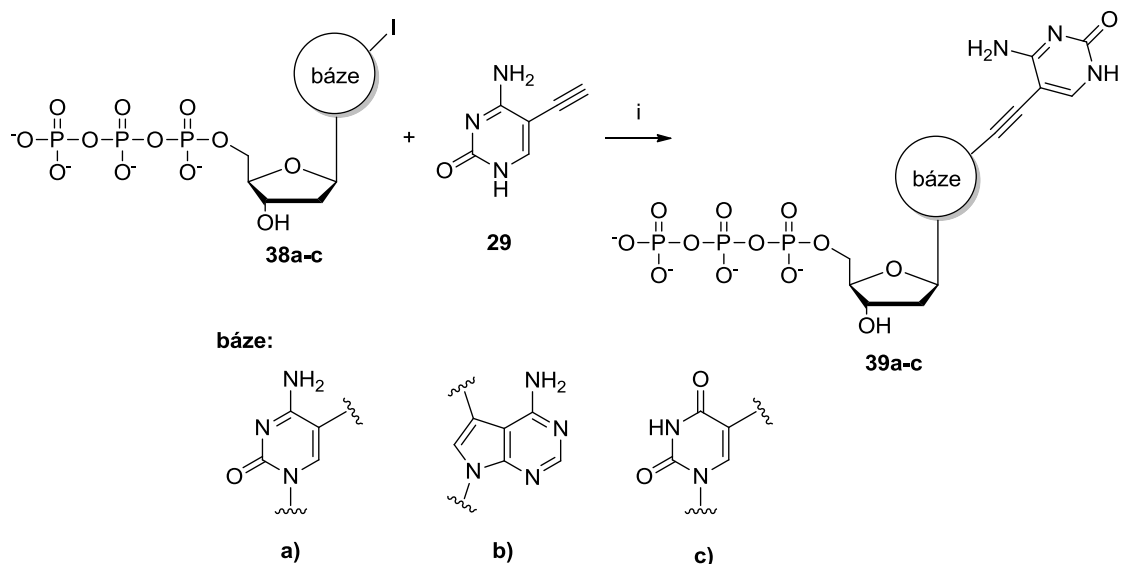
Ethynylový substituent na cytosinu v poloze 5 velmi ochotně podléhá dalším coupling reakcím s celou řadou substrátů^{9,12}. *Schéma 9* znázorňuje jednu z možností. 5-Jodo-2'-deoxynukleosidy **35** mohou reagovat s 5-ethynylcytosinem **29** za vzniku vícejaderných heterocyklických systémů **36**. Autoři popsali 4 různé reakční podmínky lišící se v teplotě reakce a použitém katalyzátoru, které vedly k syntéze cílových derivátů **36**. Zajímavou závislost na zvolených reakčních podmínkách prokázal typ zvoleného nukleosidu. Zatímco 5-jodo-2'-deoxycytidin **35a** a deoxy-7-deazaadenosin **35b** reagovali s 5-ethynylcytosinem **29** za katalýzy Pd(OAc)₂ nebo Pd(PPh₃)₂Cl₂ při teplotě 80°C po dobu 1 hodiny za vzniku derivátů **36**, 5-jodo-2'-deoxyuridin **35c** za stejných podmínek podléhal heterocyklizaci za vzniku furopyrimidinu **37**. Sloučeninu **36c** se podařilo připravit až snížením reakční teploty na 50°C. Všechny zmíněné deriváty byly připraveny ve výtěžku 30-78%.



(i) Pd(OAc)₂, TPPTS, CuI, DIPEA, H₂O-MeCN (2:1), 80°C, 1 h; (ii) Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, Et₃N, DMF, 80°C, 1 h; (iii) Pd(OAc)₂, TPPTS, CuI, Et₃N, H₂O:MeCN (2:1), 50°C, 1 h; (iv) Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, Et₃N, DMF, 50°C, 1 h.

Schéma 9: Reaktivita 5-ethynylcytosinu s nukleosidy.

Stejné reakční podmínky byly aplikovány i na 5-trifosfáty odvozené od zmíněných nukleosidů (*Schéma 10*). Citlivost trifosfátové skupiny a její náchylnost k hydrolyze vyžadovaly velmi rychlé zpracování a izolaci pomocí HPLC. Nukleotidy **39** byly následně získány ve výtěžku 35 (**39a**), 31 (**39b**) a 17% (**39c**).

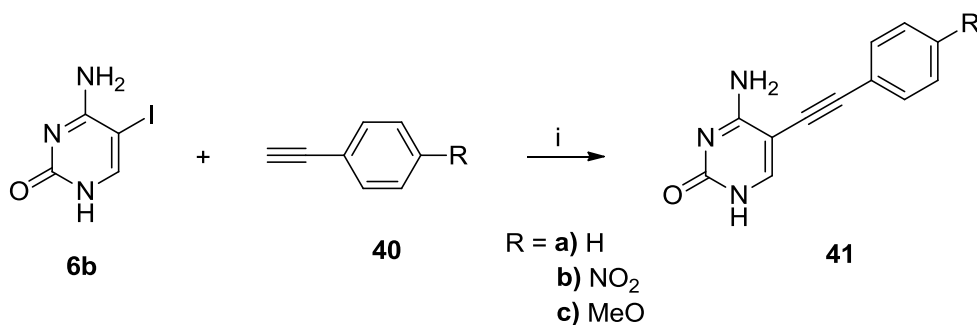


(i) Pd(OAc)₂, TPPTS, CuI, DIPEA,, H₂O:CH₃CN (2:1), 80°C, 1 h.

Schéma 10: Reakce 5-ethynylcytosinu s 5-jod-2'-deoxynukleosid trifosfáty.

3.2.3. Syntéza derivátů odvozených od 5-ethynylcytosinu

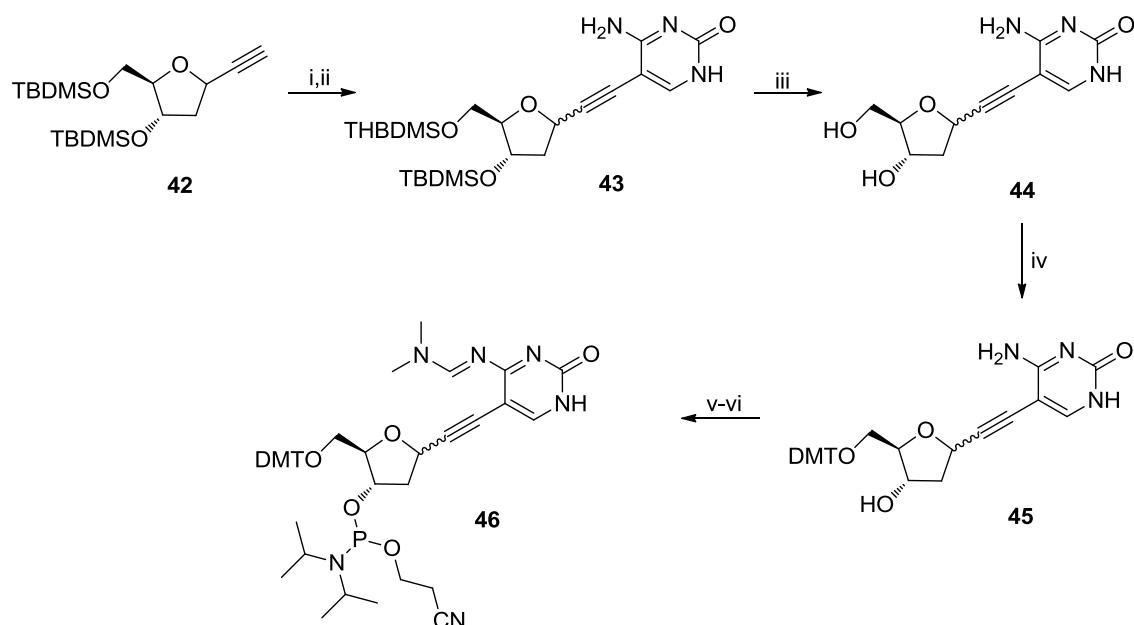
Některé z reakcí popisující přípravu 5-substituovaných derivátů cytosinu jsou již znázorněny v předchozí kapitole, avšak syntéza takovýchto derivátů není vždy založena na reaktivitě samotného 5-ethynylcytosinu. Některé z reakcí využívají opačného přístupu, tedy reakci 5-jodocytosinu s různě substituovanými acetyleny¹³⁻¹⁵. Jedním z příkladů je i syntéza znázorněná na *Schématu 11*. Hudson a *kol.* popsali Sonogashira coupling reakci 5-jodocytosinu **6b** s různě substituovanými aromatickými substráty **40** za vzniku fenyl, *p*-nitrofenyl a *p*-methoxyfenyl derivátů **41a-c** ve výtěžcích 82, 71 a 84%¹³.



(i) Pd(PPh₃)₄, CuI, TEA, CH₂Cl₂, RT, 16 h.

Schéma 11: Příprava derivátů **41**.

Další ukázkou syntézy ethynyl-substituovaných derivátů cytosinu je práce popisující přípravu fosforamidátu **46** (Schéma 12) za účelem studia vlivu modifikace v poloze 5 na stabilitu DNA¹⁴. 5-Jodocytosin je nejprve persilylovan hexamethydisilazanem. Takto ochráněný substrát podléhá Sonogashira cross-coupling reakci s 1'-ethynyl-2'-deoxyribosou **42** za vzniku nukleosidu **43** ve výtěžku 55%. Následná deprotektce chránících skupin vede k přípravě deoxyribosidu **44** s výtěžkem 73%. Požadovaný fosforamidát **46** je konečně získán po tritylaci 5'-hydroxylové skupiny, ochráněním amino skupiny cytosinu a reakcí s 2-cyanoethyl-*N,N'*-(diisopropyl)-phosphoramidochloridátem ve výtěžku 44%.



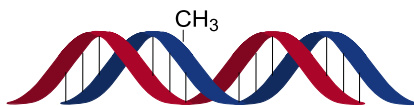
(i) 5-jodocytosin, HMDS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 127°C ; (ii) CuI , DIPEA, $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$, DMF, RT, 12 h; (iii) 80% AcOH, H_2O , 40°C , 3 dny; (iv) DMTCl, DMAP, pyridin, RT, 6 h; (v) $\text{MeO}_2\text{CHNMe}_2$, DMF, RT, 3 h; (vi) 2-cyanoethyl-*N,N'*-(diisopropyl)-phosphoramidochloridát, DIPEA, DCM, RT, 3 h.

Schéma 12: Syntéza fosforamidátu **46** odvozeného od 5-ethynylcytosinu.

3.2.4. Vliv substituce cytosinu v poloze 5 na DNA helix

Methylace cytosinu v pozici C5 se nachází přibližně u 1% všech bází savčího genomu. Tato epigenetická modifikace, která je stálou obměnou v DNA, ovlivňuje strukturu chromatinu a regulaci genové exprese. Cytosin je methylován na

dinukleotidech CpG, které se vyskytují v opakujících se sekvencích. Tyto tzv. CpG ostrůvky, vyskytující se často v oblasti promotoru, jsou u aktivních genů nemetylovány. Pokud dojde k metylaci (Obr. 4), může dojít k inaktivaci genů, a to např. umožněním vazby inhibičních komplexů nebo zabráněním vazbě transkripčních faktorů.



Obr. 4: Methylace DNA.

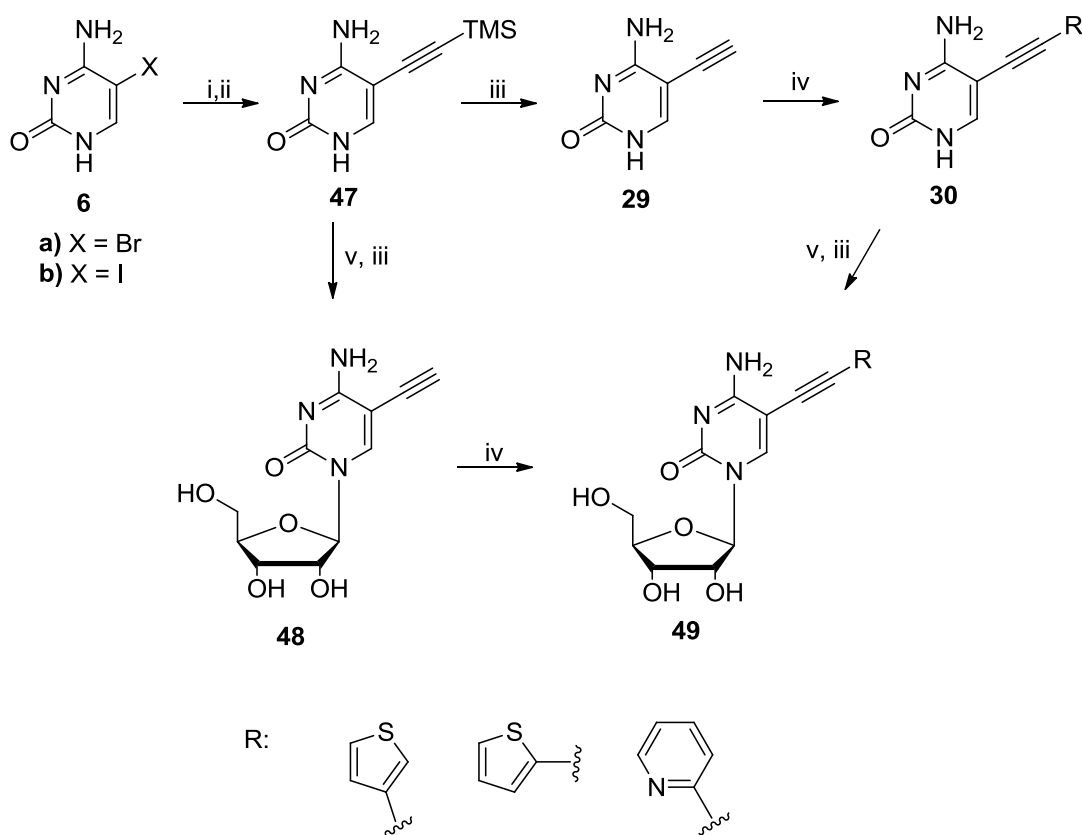
Poruchy v procesu metylace jsou často spojeny s maligními procesy. Celá řada tumorů vykazuje změny v tomto procesu, které vedou k aktivaci protoonkogenů, různým genetickým mutacím a genové nestabilitě. Např. je prokázáno, že methylované CG oblasti v kódující části tumor-supresorového genu *p53* jsou známé mutační hot-spoty (místa, kde mutace vznikají s největší frekvencí, respektive místa, která jsou náchylnější k mutacím) plicního karcinomu.

Také bylo prokázáno, že methylovaný cytosin ovlivňuje reaktivitu sousedního guaninu ke karcinogenům a DNA alkylačním látkám. Otázkou ovšem zůstává detailní mechanismus působení methylovaného cytosinu. Proto bylo navrženo několik různých substitucí C5 cytosinu, jejichž studium by přispělo k objasnění tohoto mechanismu¹⁶. Moser a kol. vypracovali podrobnou studii zaměřenou na sledování vlivu různých C5 modifikací cytosinu zahrnující např. alkylový či aromatický substituent nebo také ethynylový zbytek. Nebyl brán v potaz jen samotný cytosin, přihlíželo se k celým párovým bázím CG, tedy ovlivnění guaninu i ovlivnění celého cytosin-guaninového páru. Mezi sledované vlastnosti patří: struktura vázaného hydrogenu, elektronový efekt, atomový náboj, dále pak polarita, PA a v neposlední řadě GPB.

Autoři dospěli k závěru, že karcinogen vlivem elektronových změn modifikovaného cytosinu pravděpodobně ovlivňuje pre-kovalentní vazbu do velkého žlábků. Tyto změny v reaktivitě jsou založeny na elektronových efektech přenesených ze substituentu cytosinu přes karbonyl na amino skupinu guaninu.

4. Výsledky a diskuze

Diskusní část bakalářské práce je zaměřena na vývoj syntetických metod vedoucích k přípravě derivátů cytosinu modifikovaných v poloze C5 rigidním systémem substituovaným heterocyklickým zbytkem (Schéma 11). Jako výchozí látka byl zvolen 5-bromocytosin **6a** nebo 5-jodocytosin **6b**, které jsou reagovány s trimethylsilylacetylenem. V této části práce bude porovnána reaktivita bromo a jodocytosinu. Silylovaný derivát **47** je dále ochráněn za vzniku 5-ethynylcytosinu **29**. Tento substrát **29** je následně podroben coupling reakcím s heterocyklickými halogen deriváty za vzniku cílových struktur **30**. Silylovaný derivát **47** může být rovněž převeden na odpovídající ribosid **48** a následně modifikován za vzniku nukleosidu **49**. Jednotlivé kroky této syntézy budou podrobně diskutovány dále.

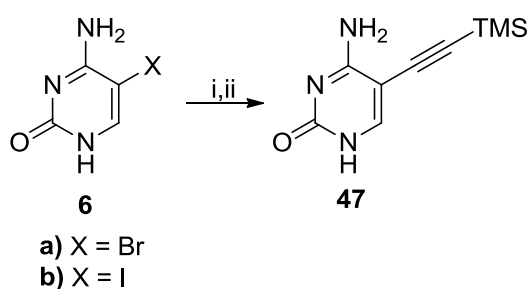


(i) HMDS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 140°C ; (ii) TMS-acetylen, CuI, TEA, $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$, DMF, RT, 16 h; (iii) NH_4OH , MeOH, RT, 16 h; (iv) CuI, TEA, $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$, DMF, R-X, rt, 16 h; (v) HMDS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 140°C , potom 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranose, TMSOTf, DCE, rt, 16 h.

Schéma 11: Navržená strategie syntézy.

4.1. Příprava 4-amino-5-((trimethylsilyl)ethynyl)pyrimidin-2(1H)-onu

K přípravě derivátu **47** (Schéma 12) byly k dispozici 2 substráty. 5-Bromocytosin **6a** a 5-jodocytosin **6b**. Nejprve byl jako výchozí substrát použit 5-bromocytosin **6a**, který je levnější než jeho jod analog **6b**. Rovněž také nebyly doposud popsány reakce, kde by brom derivát **6a** figuroval jako výchozí látka při syntézách prováděných metodou Sonogashira coupling, proto jsme chtěli zjistit jeho reaktivitu. Naproti tomu reakce 5-jodocytosinu již známe jsou⁹⁻¹².



(i) HMDS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 140°C , 3h; (ii) TMSacetylen, CuI, báze, Pd katalyzátor, DMF nebo DMSO (viz. Tabulka 1)

Schéma 12: Syntéza sloučeniny **47**.

4.1.1. Syntéza z bromocytosinu

Prvním zvoleným výchozím substrátem byl 5-bromocytosin **6a**, který byl podroben Sonogashira cross-coupling reakci s trimethylsilylacetylenem za podmínek znázorněných na Schématu 12. Brom derivát se ukázal jako velmi nereaktivní, proto bylo vyzkoušeno mnoho experimentů.

Všechny provedené experimenty jsou shrnuty v Tabulce 1. Reakce byly uskutečněny za použití 0,2 ekv CuI, 0,1 ekv $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ nebo $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ a 0,3 ekv TMS-acetylenu. Reakčním prostředím byl suchý DMF případně DMSO, jako báze byl použit TEA nebo DIPEA. Všechny reakce byly prováděny v inertní atmosféře (N_2). Charakteristickým rysem všech reakcí byla barevná změna roztoku ihned po smíchání všech reagentů z šedo-hnědé na hnědo-černou. Po ukončení reakce byla směs odpařena na rotační vakuové odparce a zbytky DMF či DMSO vysušeny pomocí lyofilizátoru.

Jednotlivé reakce byly monitorovány pomocí LC-MS a TLC vždy po první, druhé a třetí hodině a před ukončením reakce.

První dvě reakce **47a-b** popisují přímou reakci 5-bromocytosinu **1** s TMS-acetylenem. Syntéza probíhala 24 h za laboratorní teploty, bohužel se však cílový substrát nepodařilo připravit a pomocí LCMS byla identifikována pouze výchozí látka. K této syntéze byly použity dvě různé báze, TEA a DIEPA, avšak zvolená báze na průběh reakce neměla žádný vliv.

Ostatní reakce uvedené v *Tabulce 1* byly obměněny, kdy výchozí 5-bromocytosin byl nejprve silylován v HMDS při teplotě 140°C. Vizuálním pozorováním byla reakce ukončena po 3 hodinách, a to v okamžiku, kdy všechen výchozí materiál přešel do roztoku. Následně byl HMDS odpařen a takto získaný chráněný substrát byl podroben Sonogashira cross-coupling reakci s TMS-acetylenem. Reakce **47c** uskutečněná za laboratorní teploty poskytla po 24 h pouze výchozí derivát, stejně jako reakce **47d** provedená při teplotě 80°C. Jestliže byla reakční teplota zvýšena na 100°C (reakce **47e**), produkt byl patrný již po 1 hodině. Když však byla reakční směs ponechána reagovat do druhého dne, aby došlo ke kompletní konverzi výchozí látky, došlo k rozkladu jak produktu, tak výchozí látky na směs neidentifikovatelných derivátů. U reakcí **47f-g** byly zaměněny Pd katalyzátor a rozpouštědlo, avšak podle TLC tato změna nepomohla a cílový derivát se nepodařilo tímto postupem získat.

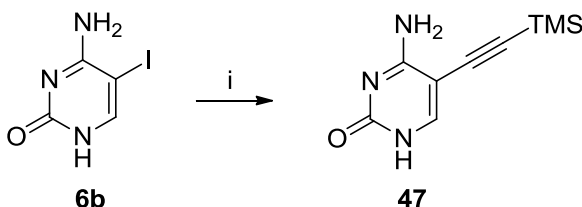
Tabulka 1: Sumarizace reakčních podmínek k přípravě derivátu **47**.

reakce	silylace	báze	Pd katalyzátor	rozpouštědlo	Čas	teplota	Výsledek (LCMS)
a	-	TEA	(PPh ₃) ₄ Pd	DMF	24 h	RT	VL
b	-	DIPEA	(PPh ₃) ₄ Pd	DMF	24 h	RT	VL
c	HMDS	DIPEA	(PPh ₃) ₄ Pd	DMF	24 h	RT	VL
d	HMDS	DIPEA	(PPh ₃) ₄ Pd	DMF	6 h	80°C	VL
e	HMDS	DIPEA	(PPh ₃) ₄ Pd	DMF	6 h	100°C	1h – 50% 2h – 50% 1d-rozloženo
f	HMDS	TEA	Pd(PPh ₃) ₂ Cl ₂	DMF	24 h	RT	VL
g	HMDS	TEA	(PPh ₃) ₄ Pd	DMSO	3 h	80°	VL

Vzhledem k tomu, že 5-bromocytosin prokázal velmi nízkou reaktivitu k provedeným cross-coupling reakcím, rozhodli jsme se dále použít komerčně dostupný 5-jodocytosin.

4.1.2. Syntéza z jodocytosinu

5-Jodocytosin **6b** reagoval ve srovnání s 5-bromocytosinem **6a** velmi ochotně za podmínek, které jsou znázorněny na *Schématu 13* a podrobně budou popsány dále.



(i) TMSacetylen, CuI, TEA, Pd katalyzátor, DMF, RT, 24 h.

Schéma 13: Syntéza **47** z 5-jodocytosinu.

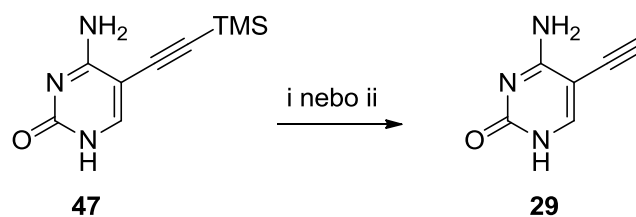
K reakci bylo použito 0,1 ekv Pd katalyzátoru ((PPh₃)₂PdCl₂ nebo (PPh₃)₄Pd), 0,2ekv CuI, TEA, DMF, 2ekv TMS-acetylenu. První z pokusů probíhal kvantitativně za laboratorní teploty pod dusíkem 16 hodin. Po ukončení reakce byla reakční směs vytřepána do ethylacetátu a vody s 10% NaCl. K organické fázi byl přidán pevný Na₂SO₄ na vysušení zbytkové vody a směs byla filtrována a filtrát byl odpařen. Tato reakce byla prováděna pouze s malým množstvím výchozí látky a proto i množství získaného produktu nepatrné.

U dalšího experimentu bylo zjištěno, že reakční doba 3 hodiny je dostačující. Proto byla reakce ukončena po této době, dále 2 hodiny odpařována na rotační vakuové odparce a nakonec vysušena na lyofilizátoru. Vysušená směs byla rozsuspendována v DCM a filtrována přes filtrační papír. Výtěžek činil 91% čisté látky.

U několika dalších experimentů byl obměněn způsob izolace, kdy byla surová směs filtrována přes filtrační papír a promyta destilovanou vodou. Takto bylo dosaženo výtěžků v rozmezí 75%-81%.

4.2. Odbourávání protektivní skupiny TMS

K přípravě 5-ethynylcytosinu **29** byla použita suchá a čistá látka **47** z předchozí reakce, kdy byly vyzkoušeny dvě různé metody popsané ve *Schématu 14*. Jako nejlepší činidlo pro odbourání TMS se osvědčil roztok vodného amoniaku a metanolu.



(i) TBAF, THF, RT nebo (ii) MeOH/NH₄OH, RT.

Schéma 14: Odstranění protektivní skupiny.

4.2.1 Odchránění silylové skupiny pomocí TBAF

Tento způsob deprotektce byl prováděn za laboratorní teploty, kdy byl k výchozí látce přidán roztok TBAF v THF. Směs byla míchána po dobu 2 hodin. Po této době byla reakční směs odpařena a purifikována pomocí kapalinové chromatografie za použití mobilní fáze chloroform:methanol v poměru 9:1. I přesto, že surová látka byla získána ve výtěžku 91%, tato reakce byla prováděna v malém množství, abychom zjistili reaktivitu výchozí látky, a po purifikačním procesu bylo získáno pouze neparné množství produktu. Konečná analýza pomocí LC-MS prokázala přítomnost nečistot i v čištěném derivátu, proto jsme tuto metodu opustili.

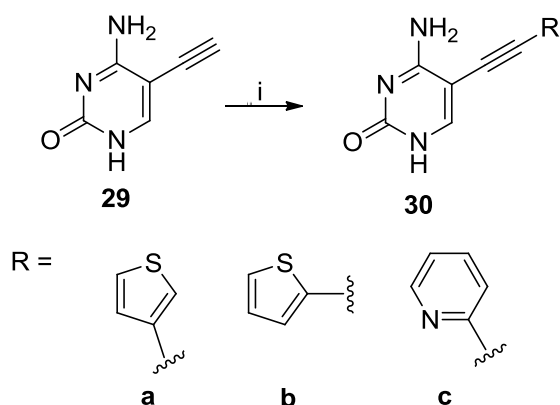
4.2.2 Odchránění silylové skupiny pomocí MeOH/NH₄OH

Použití methanolického roztoku amoniaku patří k nejběžnějším metodám využívaným k deprotektci silylových skupin, proto byla tato metoda použita i v našem případě.

K TMS-ethynylcytosinu **47** byl přidán methanolický amoniak. Tato směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 24 hodin a posléze na vakuové odparce odpařena do sucha. Výtěžek všech provedených reakcí byl 87% - 93% čisté látky bez potřeby další purifikace.

4.3 Sonogashira coupling 5-ethynylcytosinu s variabilními heterocykly

Metodou Sonogashira coupling byly v posledním kroku připraveny tři deriváty **30** zakončené heterocyklem z výchozího substrátu **29**. Jejich syntéza je znázorněna ve *Schématu 15* a příprava konkrétních derivátů je pak blíže popsána níže v jednotlivých podkapitolách.



(i) R-X, CuI, TEA, Pd - katalyzátor, DMF

Schéma 15: Syntéza cílových produktů.

4.3.1 Reakce s 2-bromopyridinem

Coupling reakce 5-ethynylcytosinu **29** s 2-bromopyridinem probíhala 16 hodin za laboratorní teploty v inertním prostředí dusíku. Reakce byla monitorována pomocí LC-MS každou hodinu po dobu 5 hodin a nakonec po ukončení reakce. Jelikož reakce zcela neproběhla a ve směsi byla metodou LC-MS detekována výchozí látka, byl proveden další experiment, ve kterém bylo zvýšeno množství bromopyridinu ze 3 ekv na 7 ekv. Po této reakci, která probíhala 16 hodin, byla směs vysušena na lyofilizátoru. Purifikace proběhla na Sepacoru za použití mobilní fáze 9:1,5 chloroform:metanol, separace poskytla produkt **30c** ve výtěžku 48%.

4.3.2 Reakce s 2-jodothiolenem

Reaktivita pětičlenných heterocyklů je ve srovnání s šestičlennými mnohem nižší, čemuž nasvědčoval i průběh coupling reakce s 2-jodothiolenem. Pokud byly aplikovány reakční podmínky z předchozí reakce s bromopyridinem, ke vzniku produktu **30b** nedošlo ani po 24 hodinách.

Posléze byla reakce provedena při teplotě 80°C po dobu 6 hodin. U této reakce byla reakční směs monitorována pomocí LC-MS, a to po hodině až do ukončení reakce. Látka byla nejprve izolována na semipreparativním HPLC, ale bohužel se směs zadržovala na předkoloně a filtru přístroje, proto byl zbytek směsi purifikován pomocí kapalinového chromatografu Sepacor. Jako mobilní fáze byl použit chloroform:metanol (9:1) a látka **30b** získána ve výtěžku 18%.

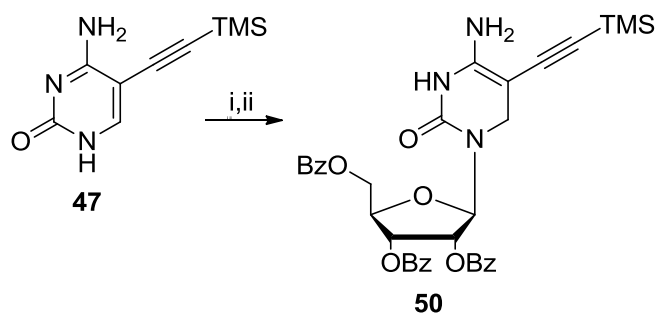
4.3.3 Reakce s 3-bromothiofenem

Cross-coupling reakce 3-bromothiofenu s 5-ethynylcytosinem byla prováděna analogicky jako předchozí reakce s 2-jodothiofenem při teplotě 80°C po dobu 6 hodin za stálého sledování metodou LC-MS po hodině. Látka **30a** byla izolována na Sepacoru v mobilní fázi chlorform:metanol (9:1) ve výtěžku 14%. Podle LCMS byla látka **30a** po purifikaci získána v 98% čistotě, avšak ^1H NMR bylo zkreslené množstvím rozpouštědel, proto bude látka znovu vysušena NMR měřeno znovu.

4.4 Syntéza derivátů cytidinu

Vedlejším cílem této práce bylo převedení získaných derivátů cytosinu na jejich nukleosidová analoga. Nejdříve byla snaha o ribosylaci výchozího substrátu **47**, která je shrnuta ve *Schématu 16*.

Chráněný derivát cytosinu **47** byl nejdříve míchán v HMDS v olejové lázni při 140°C až do rozpuštění výchozí látky. Poté byla směs odpařena, přidána 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranosa, TMSOTf a 1,2-dichlorethan a míchána za laboratorní teploty po dobu 48 hodin. Podle LCMS však bylo zjištěno, že k ribosylaci došlo pouze z 15%.

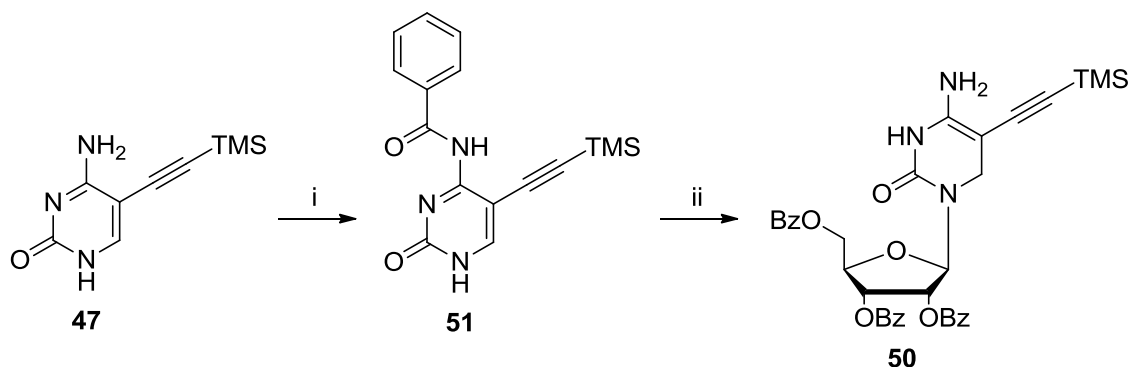


(i) HMDS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 140°C, 3h; (ii) 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranosa, TMSOTf, 1,2-DCE, RT, 48h.

Schéma 16: Syntéza derivátů cytidinu.

Druhý přístup vycházel z ochrání aminokupiny benzoylací. Reakcí silyl derivátu **47** s benzoyl chloridem vznikl po 1 hodině derivát **51**. Ten byl dále míchán v HMDS v olejové lázni při 140°C až do rozpuštění výchozí látky. Poté byla směs odpařena, přidána 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranosa, TMSOTf a 1,2-

dichlorethan a míchána za laboratorní teploty po dobu 48 hodin. LCMS analýzy však ukázaly směs produktů beze stop výchozí látky i produktu.



(i) benzoyl chlorid, TEA, CHCl_3 , DMAP, RT, 1h; (ii) HMDS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 140°C , 3h; potom 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl- β -D-ribofuranosa, TMSOTf, 1,2-DCE, RT, 48h.

Schéma 17: Syntéza derivátů cytidinu.

4.5 Výhledy do budoucna

Látky připravené v rámci této bakalářské práce budou v budoucnu převedeny na odpovídající ribosidy či deoxyribosidy, inkorporovány do DNA a studován vliv modifikace na termální stabilitu DNA (*Schéma 18*).

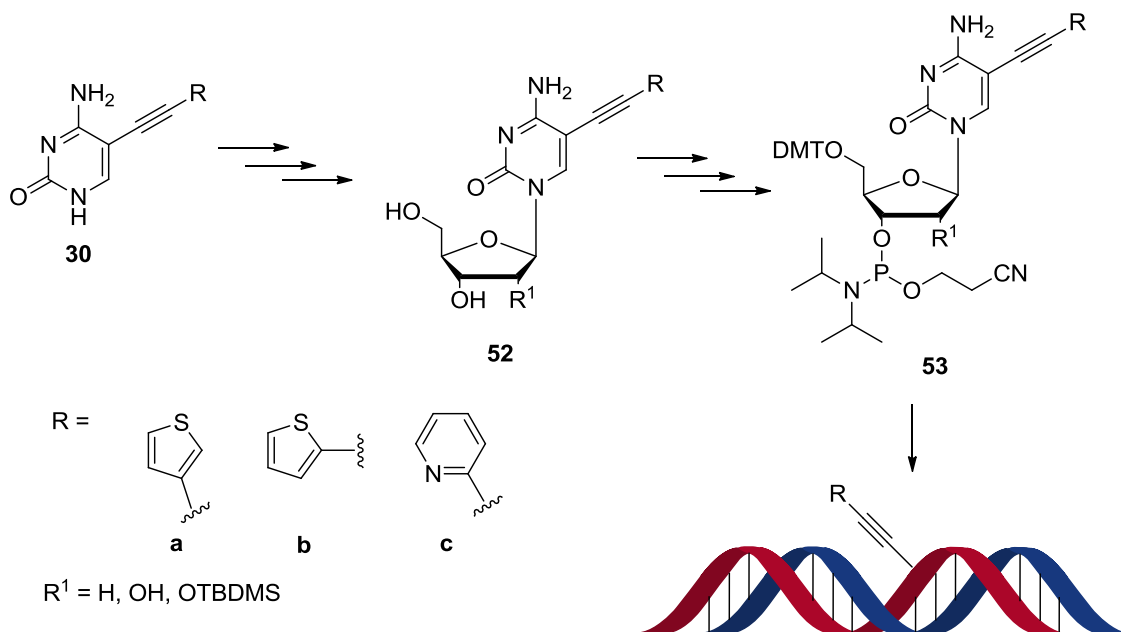


Schéma 18: Budoucí plány.

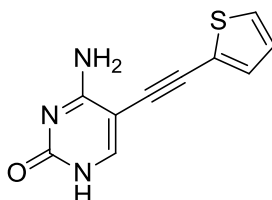
5. Experimentální část

5.1. Metody

Teploty tání byly měřeny na Boetiově bloku a nejsou korigovány. Měření NMR spekter bylo provedeno v roztoku DMSO – *d*6 na Bruker AMX-300 spektrometru (300 MHz) s vnitřním standardem TMS. Hodnoty chemického posunu jsou udány v ppm jednotkách, interakční konstanty v Hz. Měření hmotnostních spekter bylo realizováno na hmotnostním spektrometru TSQ Quantum ACCES, THERMO SCIENTIFIC, USA. Silikagel použitý při kapalinové chromatografii Silicagel 60 (0.04-0.063 mm) firmy Merck. TLC chromatografie byla prováděna na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 F254 značky Merck. Preparativní HPLC byla prováděna s využitím přístroje Agilent 1200 series a preparativní kolony YMC-Pack Pro C18 100x20 mm I.D. s-5 μ m, 12 nm. LC preparativní chromatografie byla prováděna s využitím přístroje Sepacor (Buchi).

5.2. Přípravy

4-Amino-5-(thiophen-2-ylethynyl)pyrimidin-2(1*H*)-one (30b)



Krok A:

Do baňky bylo k 5-jodocytosinu **6b** (1g, 4,22 mmol) přidáno (PPh₃)₄Pd (487.6mg, 0,42 mmol) a CuI (161mg, 0,84 mmol), baňka uzavřena septem pod dusík. Následně byl přidán suchý DMF (20 mL), TEA (14 mL) a TMS-acetylen (1,79 mL, 12,38 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty pod dusíkem 16 hodin. Po ukončení reakce byla směs přefiltrována přes filtrační papír a promyta vodou. Světle žlutá látka byla vysušena pod lampou. Výtěžek 81%.

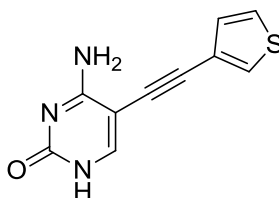
Krok B:

K derivátu **47** (400mg, 1,9 mmol) byl přidán roztok NH₄OH/MeOH (15 mL) a směs míchána za laboratorní teploty 12 hodin. Poté byl roztok odpařen na rotační vakuové odparce za vzniku světle žluté látky ve výtěžku 93%.

Krok C:

5-Ethynylcytosin **29** (100mg, 0,74 mmol) byl smíchán s $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ (128mg, 0,11 mmol), CuI (423mg, 2,22 mmol) a přidán DMF (6 mL), TEA (3,9 mL) a 2-jodthiofen (0,5 mL, 4,91 mmol). Směs byla míchána v olejové lázni na 80°C 6 hodin. Po ukončení reakce byla směs odpařena na lyofilizátoru do sucha. Surový produkt byl purifikován na kapalinovém chromatografu Sepacor s použitím MeOH v CHCl_3 (1:9) za vzniku bílo-žluté látky ve výtěžku 18%. Teplota tání $>360^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO) δ 11.03 (br. s., 1 H, NH), 7.83 (s, 1 H, H6), 7.69 (br. s., 1 H, NH_2), 7.61 (dd, $J = 1.2, 5.2$ Hz, 1 H, Ar-H), 7.40 (dd, $J = 1.2, 3.6$ Hz, 1 H, Ar-H), 7.09 (dd, $J = 3.7, 5.1$ Hz, 1 H, Ar-H), 6.93 (br. s., 1 H, NH_2). MS m/z pro $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{OS}$: 217,03, nalezeno 217,94 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4-Amino-5-(thiophen-3-ylethynyl)pyrimidin-2(1H)-one (30a)

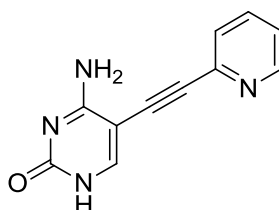


Krok A a B viz. výše

Krok C:

5-Ethynylcytosin **29** (100mg, 0,74 mmol) byl smíchán s $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ (128mg, 0,11 mmol), CuI (423mg, 2,22 mmol) a přidán DMF (6 mL), TEA (3,9 mL) a 3-bromothiophenem (0,5 mL, 5,27 mmol). Směs byla míchána v olejové lázni na 80°C 6 hodin. Po ukončení reakce byla směs odpařena na lyofilizátoru do sucha. Surový produkt byl purifikován na kapalinovém chromatografu Sepacor s použitím MeOH v CHCl_3 (1:9) za vzniku bílo-žluté látky ve výtěžku 14%. Teplota tání $>360^\circ\text{C}$. MS m/z pro $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{OS}$: 217,03, nalezeno 217,94 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4-amino-5-(pyridin-2-ylethynyl)pyrimidin-2(1H)-one (30c)



Krok A a B viz. výše

Krok C:

5-Ethynylcytosin **29** (100mg, 0,74 mmol) byl smíchán s $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}$ (128mg, 0,11 mmol), CuI (423mg, 2,22 mmol) v baňce uzavřené septem pod dusíkem. Poté byl přidán suchý DMF. Poté byl přidán suchý DMF (6 mL), TEA (3,9 mL) a 2-brompyridin (0,5 mL, 5,12 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty pod dusíkem 16 hodin. Po ukončení reakce byla směs odpařena na lyofilizátoru do sucha. Surový produkt byl purifikován na kapalinovém chromatografu Sepacor s použitím MeOH v CHCl_3 (1,5:9) za vzniku bílé látky ve výtěžku 48%. Teplota tání $> 360^\circ\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO) δ 11.08 (br. s., 1 H, NH), 8.56 (br. s., 1 H, Ar-H), 7.91 (s, 1 H, H6), 7.87 - 7.72 (m, 2 H, Ar-H), 7.66 (br. s., 1 H, NH_2), 7.42 - 7.30 (m, 1 H, Ar-H), 6.94 (br. s., 1 H, NH_2). MS m/z pro $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}$: 212,07, nalezeno 213,00 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6. Závěr

Tato bakalářská práce je zaměřena na syntézu derivátů 5-ethynyl cytosinu, studium jejich reaktivity a biologické aktivity.

První část této bakalářské práce stručně popisuje mechanismus cross-coupling reakcí, podrobněji se pak věnuje mechanismu Sonogashira cross-coupling reakci, která hraje klíčovou roli při vývoji syntetických metod pro přípravu derivátů 5-ethynyl cytosinu. Dále je zde popsána syntéza a reaktivita samotného 5-ethynylcytosinu, následně se pak teoretická část bakalářské práce věnuje syntéze vybraných derivátů 5-ethynyl cytosinu a vlivu modifikace cytosinu v poloze 5 na DNA duplex.

V experimentální části je popsána syntéza derivátů cytosinu modifikovaných v poloze C5 rigidním systémem substituovaným heterocyklickým zbytkem. K syntéze byli použity 5-bromocytosin **6a** a 5-jodocytosin **6b**, které se v první kroku nechali zreagovat pomocí Sonogashira cross-couplingu s TMS-acetylenem. 5-Bromocytosin **6a** prokázal velmi malou reaktivitu, proto byl ke všem dalším reakcím využit 5-jodocytosin **6b**. V dalším kroku byla odstraněna silylová projektivní skupina pomocí methanolického roztoku amoniaku. Tyto reakce probíhaly ve vysokém výtěžku bez nutnosti čištění.

V posledním kroku syntézy byl získaný 5-ethynylcytosin **29** reagován s 2-bromopyridinem, 2-jodthiofenem a 3-bromthiofenem a získány cílové deriváty 4-amino-5-(thiophen-3-ylethynyl)pyrimidin-2(1*H*)-one **30a**, 4-amino-5-(thiophen-2-ylethynyl)pyrimidin-2(1*H*)-one **30b** a 4-amino-5-(pyridin-2-ylethynyl)pyrimidin-2(1*H*)-one **30c**. Reakce s 2-bromopyridinem probíhala za laboratorní teploty s výtěžkem 48%, deriváty thifenu reagovaly až po zahřátí.

Vedlejším cílem bakalářské práce byla konverze připravených derivátů na jejich odpovídající nukleosidová analoga, která by byla následně inkorporována do DNA, avšak zde se vzhledem k časovým možnostem nepodařilo dosáhnout pozitivních výsledků.

V bakalářské práci se podařilo připravit 3 nové sloučeniny.

7. Literatura

1. Andersen, N. K.; Chandak, N.; Brulikova, L.; Kumar, P.; Jensen, M. D.; Jensen, F.; Sharma, P. K.; Nielsen, P. Efficient RNA-targeting by the introduction of aromatic stacking in the duplex major groove via 5-(1-phenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-2'-deoxyuridines. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (13), 4702-4710.
2. Knochel, P. Cross-coupling reactions. A practical guide edited by N. Miyaura. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345* (8), 1031.
3. Anon. Cross Coupling Reactions: A Practical Guide. Edited by N. Miyaura. *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7* (6), 1084.
4. Ley, S. V.; Thomas, A. W. Modern synthetic methods for copper-mediated C(aryl)-O, C(aryl)-N, and C(aryl)-S bond formation. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42* (44), 5400-5449.
5. Hocek, M. C-C and C-X bond formation by cross-coupling reactions catalyzed by transition metal complexes. *Chem. Listy* **2003**, *97* (12), 1145-1150.
6. Demel, J.; Cejka, J.; Stepnicka, P. Palladium nanoparticles in the catalysis of coupling reactions. *Chem. Listy* **2009**, *103* (2), 145-153.
7. Chinchilla, R.; Najera, C. The Sonogashira reaction: a booming methodology in synthetic organic chemistry. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2007**, *107* (3), 874-922.
8. Yin, L.; Liebscher, J. Carbon-carbon coupling reactions catalyzed by heterogeneous palladium catalysts. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2007**, *107* (1), 133-173.
9. Kielkowski, P.; Pohl, R.; Hocek, M. Synthesis of acetylene linked double-nucleobase nucleoside/nucleotide building blocks and polymerase construction of DNA containing cytosines in the major groove. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (9), 3457-3462.
10. Barr, P. J.; Jones, A. S.; Serafinowski, P.; Walker, R. T. The synthesis of nucleosides derived from 5-ethynyluracil and 5-ethynylcytosine. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1978**, (10), 1263-1267.
11. Jones, A. S.; Serafinowski, P.; Walker, R. T. Synthesis of 5-ethynylcytosine and 5-ethynylcytidine. *Tetrahedron Lett.* **1977**, (28), 2459-2460.
12. Kielkowski, P.; Hocek, M. Polymerase synthesis of modified DNA containing cytosine in major groove. *Collect. Symp. Ser.* **2011**, *12* (Chemistry of Nucleic Acid Components), 359-360.

13. Hudson, R. H. E.; Dambeniaks, A. K. Synthesis of N1-unsubstituted 5-alkynyl-cytosine and derivatives thereof. *Heterocycles* **2006**, *68* (7), 1325-1328.
14. Heinrich, D.; Wagner, T.; Diederichsen, U. Synthesis and DNA Incorporation of an Ethynyl-Bridged Cytosine C-Nucleoside as Guanosine Surrogate. *Org. Lett.* **2007**, *9* (25), 5311-5314.
15. Inouye, M.; Doi, Y.; Azuchi, J.; Shirato, W.; Chiba, J.; Abe, H. Hexamethyldisilazane-promoted Sonogashira reaction of poly-functionalized N-containing heterocycles. *Heterocycles* **2011**, *82* (2), 1137-1141.
16. Moser, A.; Guza, R.; Tretyakova, N.; York, D. M. Density functional study of the influence of C5 cytosine substitution in base pairs with guanine. *Theor. Chem. Acc.* **2009**, *122* (3-4), 179-188.