

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE



STUDIUM PŘEMĚNY 5-SUBSTITUOVANÝCH URIDINŮ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Leona Kocmanová
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

Olomouc 2013

Já, Leona Kocmanová, prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem Doc. RNDr. Jana Hlaváče, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedla na konci práce.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry Organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 30. 4. 2013

.....

Tímto bych chtěla upřímně poděkovat především Doc. RNDr. Janu Hlaváčovi, Ph.D. za jeho odbornou pomoc, cenné rady a připomínky, ochotu a trpělivost při řešení dané problematiky. Dále bych ráda poděkovala pracovníkům Katedry organické chemie za ochotu a pomoc a v neposlední řadě také rodině za podporu a trpělivost.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE:

Jméno a příjmení autora: Leona Kocmanová

Název práce: Studium přeměny 5-substituovaných uridinů

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Školitel: Doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt: Předložená bakalářská práce se zaměřuje na deriváty uridinu substituované v poloze C5. Práce je rozdělena na teoretickou a experimentální část.

V první části jsou shrnuty významné deriváty 5-substituovaných uridinů a 5-substituovaných fosfátů. Představeny jsou také jejich hlavní metody syntézy.

Druhá část se věnuje přípravě 5-alkoxymethyluridinů se zaměřením na optimalizaci metody ribosylace. Dále se zabývá ověřováním a optimalizováním metod ochrany uridinu pro přípravu fosfátů.

Klíčová slova: uridin, ribosylace, fosfát, chránící skupiny

Počet stran: 46

Počet příloh: 0

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

Author's first name and surname: Leona Kocmanová

Title: Study of conversion 5-substituted uridines

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science,
Palacky University Olomouc, Czech Republic

Supervisor: Doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D

The year of presentation: 2013

Abstract: The submitted bachelor thesis is focused on uridine derivatives substituted in position C5. This work is divided into theoretical and experimental part.

In the first part, there are summarized significant 5-substituted uridines and 5-substituted phosphate derivatives. The main methods of synthesis are also presented.

The second part devotes to preparation of 5-alkoxymethyluridines with focusing on optimisation of ribosylation method. Next the second part deals with verification and optimisation of uridine protecting methods which leads to preparation of phosphates

Keywords: uridine, ribosylation, phosphate, protecting groups

Number of pages: 46

Number of appendixes: 0

Language: Czech

SEZNAM ZKRATEK:

Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
Bu	butyl
Bz	benzoyl
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	dichlormethan
DHPD	dihydropyrimidindehydrogenasa
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
Et	ethyl
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HMDS	hexamethyldisilazan
HPLC	vysoko účinná kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie - hmotnostní spektrometrie
Me	methyl
NBS	N-bromosukcinimid
NMR	nukleární magnetická resonance
ODCasa	orotidin-5'-monophosphát dekarboxylasa
OMP	orotidin-5'-monophosphát
ON	přes noc (over night)
PTSA	kyselina paratoluensulfonová
Rf	retardační faktor
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)

RT	pokožová teplota (room temperature)
R _t	retenční čas
TBDMSCl	<i>tert</i> -butyldimethylsilylchlorid
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstevná chromatografie (thin layer chromatography)
TMSOTf	trimethylsilyltrifluoromethansulfonát
UMP	uridinmonofosfát
UTP	uridintrifosfát

OBSAH

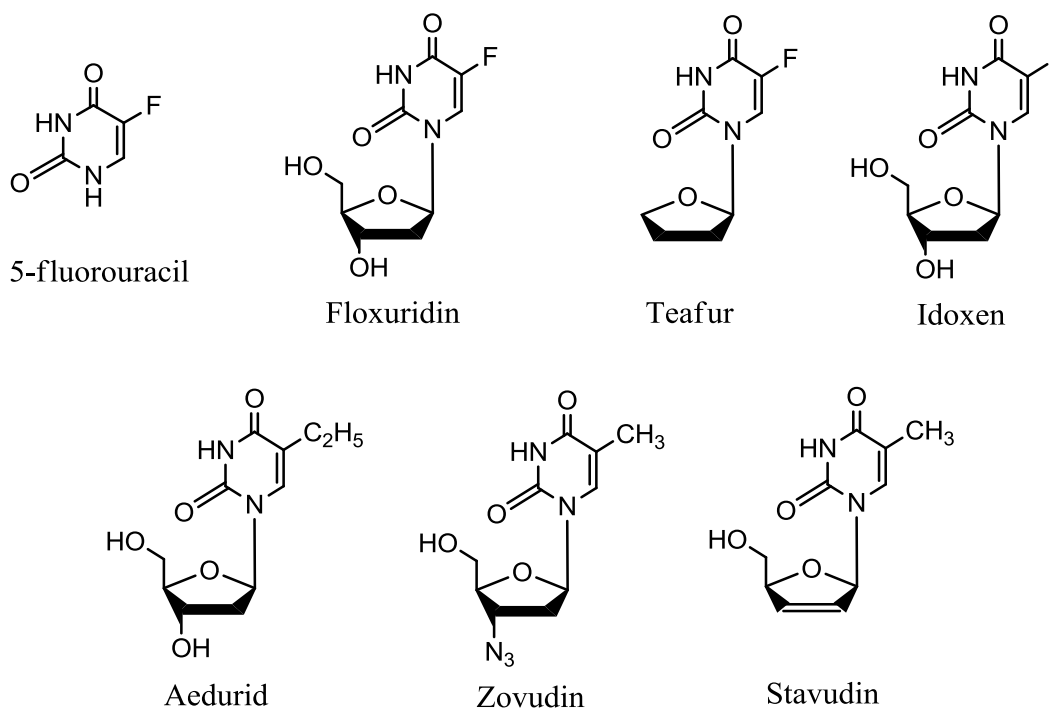
1.	ÚVOD	9
2.	CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	11
3.	TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1.	PŘEHLED VÝZNAMNÝCH DERIVÁTŮ 5-SUBSTITUOVANÝCH URIDINŮ.....	12
3.1.1.	<i>Hlavní metody přípravy 5-substituovaných uridinů</i>	<i>12</i>
3.2.	PŘEHLED VÝZNAMNÝCH 5'-FOSFÁTŮ	16
3.2.1.	<i>Hlavní metody syntézy</i>	<i>18</i>
4.	DISKUZE A VÝSLEDKY	23
4.1.	PŘÍPRAVA 5-ALKOXYDERIVÁTŮ.....	23
4.1.1.	<i>Příprava výchozích 5-alkoxymethyluracilů</i>	<i>23</i>
4.1.2.	<i>Příprava 5-alkoxymethylderivátů uridinu</i>	<i>24</i>
4.1.3.	<i>Studium stability 5-methoxymethyl-2',3',5'-O-tribenzoyluridinu</i>	<i>27</i>
4.2.	PŘÍPRAVA PREKURZORŮ K SYNTÉZE 5'-FOSFÁTŮ.....	36
4.2.1.	<i>Syntéza 2',3'-O-Isopropylidenuridinu.....</i>	<i>36</i>
4.2.2.	<i>Metody chránění N-3 uridinu</i>	<i>37</i>
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	40
5.1.	METODY	40
5.2.	PŘÍPRAVY	40
6.	ZÁVĚR	43
7.	LITERATURA	45

1. ÚVOD

Purinové a pyrimidinové nukleobáze nebo nukleosidy bývají často předmětem modifikací a substitucí. Tato analoga nukleosidů mají poměrně často protivirový, antileukemický nebo antineoplastický účinek. Svou modifikací mohou ovlivňovat četné metabolické procesy jako syntézu prekurzorů nukleových kyselin *de novo*, polymerizaci monomerů na nukleové kyseliny, biosyntézu proteinů, buněčné regulace a další.¹

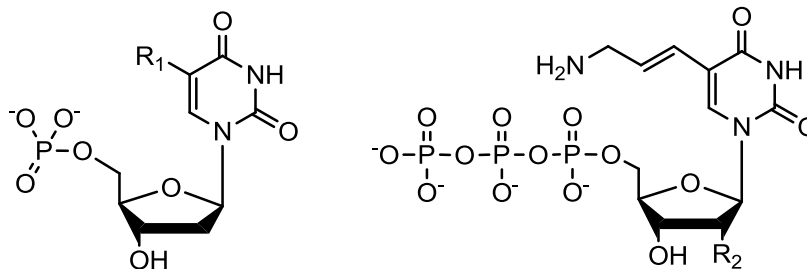
Řada z těchto derivátů se uplatnila v lékařské praxi. Značné zastoupení mají právě pyrimidinové deriváty substituované v poloze 5 (*Obr. 1*). Jedním z prvních pyrimidinových cytostatik je dodnes velmi používaný a dobře prozkoumaný 5-fluoruracil, připravený již v roce 1957 Charlesem Heidelbergerem. Pro zlepšení jeho farmakologických parametrů byla vyvinuta jeho profarmaka jako Floxuridin či Tegafur. V protivirové terapii se používají antivirotika Idoxen nebo Aedurid používaná v očním lékařství. Léčivo Zidovudin a Stavudin se zase používají jako inhibitory reverzní transkripce viru HIV.¹

Obrázek 1: Analoga uracilu využívaná v lékařské praxi



Důležitým faktorem ovlivňujícím biologickou aktivitu analog nukleosidů je jejich aktivace tvorbou 5'-trifosfátů nebo 5'-difosfátů přímo v buňce. Ty mohou inhibovat různé buněčné a virově specifické enzymy jako například orotidin-5'-monophosphát dekarboxylasu nebo thymidylátsyntasu. Problém však může nastat během třístupňového procesu transformace, kdy je nukleosid fosforylován nukleosidkinasou na nukleosid-5'-fosfát, dále nukleosidmonofosfátkinasou na nukleosid-5'-difosfát a nakonec nukleosiddifosfátkinasou na nukleosid-5'-trifosfát. V případě kdy je v hostitelské buňce hladina nukleosidkinas nízká, nemůže proběhnout fosforylace nukleosidů a tím v těchto buňkách nukleosid ztrácí svou biologickou aktivitu. K vyřešení tohoto problému jsou vyvíjena nová profarmaka fosforylovaných forem (nukleotidů), mezi které patří 5-fluoro-2'-deoxyuridin-5'-monofosfát a 5-nitro-2'-deoxyuridin-5'-monofosfát inhibující thymidylátsyntasu (Obr. 2).¹ Vedle biologické aktivity lze 5-substituované fosfáty využít například ke značení nukleových kyselin k čemuž se využívají 5-aminoallyl deriváty uridinu (Obr. 2).²

Obrázek 2: Příklady nukleosidfosfátů



$R_1 = \text{F}$; 5-fluoro-2'-deoxyuridin-5'-monofosfát

$R_1 = \text{NO}_2$; 5-nitro-2'-deoxyuridin-5'-monofosfát

$R_2 = \text{OH}$; 5-aminoallyluridin-5'-trifosfát

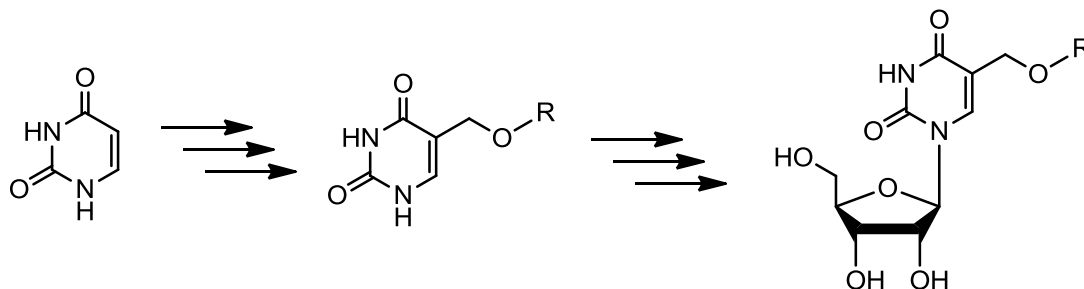
$R_2 = \text{H}$; 5-aminoallyl-2'-deoxyuridin-5'-trifosfát

Nukleosidy pyrimidinových bází poskytují mnoho možností substitucí a modifikací. Jak bylo výše zmíněno, mnohé z nich vykazují zajímavé biologické vlastnosti. Z toho důvodu se předložená bakalářská práce zabývá jak 5-substituovanými deriváty uridinu, tak jejich fosfáty.

2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

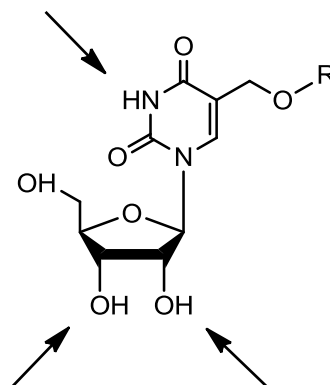
Cílem bakalářské práce je připravit deriváty uracilu substituované v poloze C5 alkoxy-methylovou skupinou a následně je přeměnit na odpovídající nukleosidy (Obr. 3).

Obrázek 3: Znázornění syntetické cesty



Poslední možnou modifikací je syntéza jejich fosfátů v poloze 5'. Před samotnou syntézou je však potřebné ochránit volné skupiny, aby se zabránilo navázání skupiny do nežádoucí polohy. Jednotlivé polohy jsou znázorněny na obrázku (Obr. 4). Tyto reakce je nejprve nutné ověřit a optimalizovat.

Obrázek 4: Místa v molekule určená k ochraně.



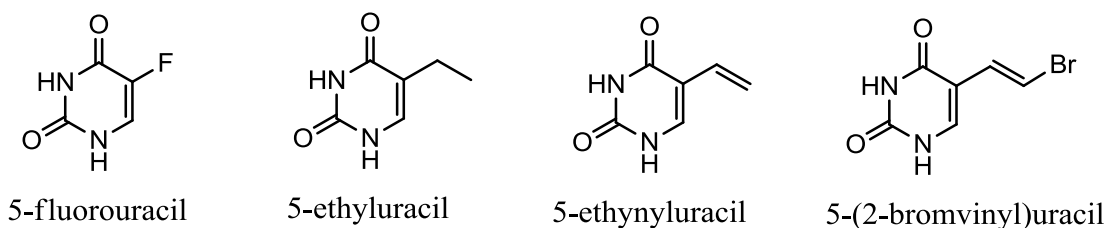
3. TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část bakalářské práce je rozdělena do dvou podkapitol. V první podkapitole jsou shrnuty významné deriváty 5-substituovaných uridinů a jejich syntéza. Ve druhé podkapitole jsou přiblíženy deriváty 5'-fosfátů a jejich hlavní metody přípravy.

3.1. Přehled významných derivátů 5-substituovaných uridinů

Mezi významné substituované deriváty pyrimidinových heterocyklických bazí patří 5-halogenované deriváty či analoga thyminu: 5-ethyl, 5-ethynyl a 5-(2-bromvinyl)uracil (Obr. 5).¹ Prvním významným derivátem uridinu je 5-fluorouridin, derivát dnes používaného cytostatika 5-fluorouracilu, který rovněž jako 5-fluorouracil vykazuje protinádorovou aktivitu.³ 5-ethynyl a 5-(2-bromvinyl)uracil jsou účinnými inhibitory enzymu dihydropyrimidindehydrogenasy (DHPD), který hraje klíčovou roli v katabolismu pyrimidinů. Díky inhibici tohoto enzymu se navíc zvyšuje využití 5-fluorouracilu a jeho profarmak neboť inhibice potlačuje jejich rozklad.¹ Následující podkapitola se zaměří na syntézu nukleosidů těchto derivátů.

Obrázek 5: Významné báze 5-substituovaných uridinů



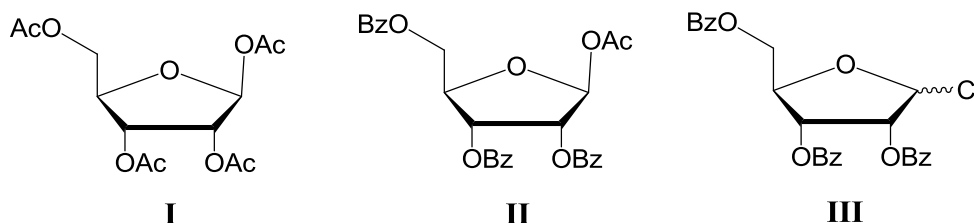
3.1.1. Hlavní metody přípravy 5-substituovaných uridinů

3.1.1.1. Ribosylace 5-substituovaných uracilů

Jedna z hlavních metod přípravy substituovaných uridinů vychází z modifikace samotného uracilu a následné ribosylace. Cukerné složky pro tvorbu ribosidů se nejčastěji používají 1,2,3,5-tetra-O-acetyl-β-D-ribofuranosa **I**, 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-β-D-ribofuranosa **II** a 1-chloro-2,3,5-tri-O-benzoyl-D-ribofuranosa **III** (Obr. 6). Dle Vorbrüggena

lze tuto syntézu rozdělit na tři typy reakcí: fúzní reakce, postup přes soli kovů a Hilbert-Johnsonova reakce.⁴

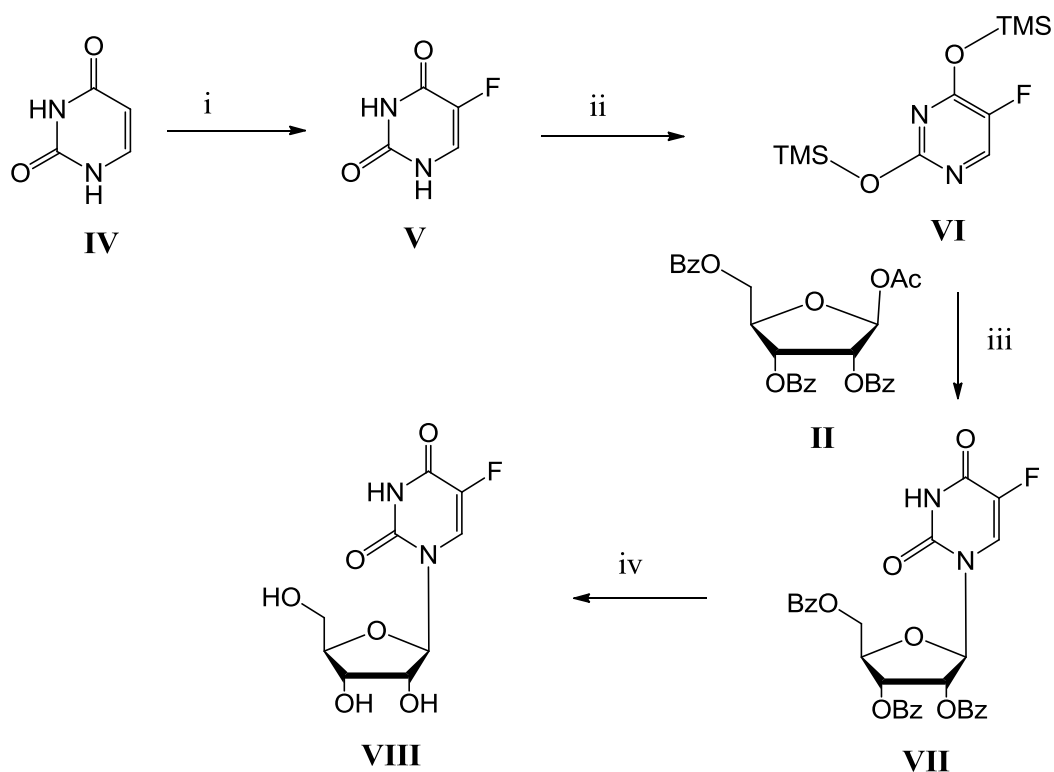
Obrázek 6: Deriváty ribofuranosy používané k ribosylaci



První metoda spočívá v tavení kyselého heterocyklu s acetylovanou ribosou **I** při 150-155°C. Přes tranzitní stav soli dojde k tvorbě ribosidu za uvolnění kyseliny octové. Reakci lze urychlit přidávkem Lewisovy kyseliny, která podporuje tvorbu elektrofilního cukerného kationtu.⁴ Ve druhé metodě spolu nejčastěji reaguje rtuťnatá sůl heterocyklu s halogenidem cukru. Třetí typ reakcí zahrnuje syntézy ribosidů z chráněných heterocyklů. V roce 1930 Hilbert a Johnson provedli ribosylaci 2,4-diethyloxypyrimidinu, kde kyslíky chránila klasická etherová skupina. Toto pojetí však mělo značné nevýhody. Tvorba chráněného derivátu byla prováděna poněkud složitě z uracilu přes mezistav 2,4-dichloropyrimidinu. Následné odchránění bylo navíc doprovázeno značnými komplikacemi. Obměnou se začalo používat chránění OH skupin uracilového kruhu trimethylsilylovou skupinou reakcí heterocyklu s hexamethyldisilazanem. Tato skupina je velmi snadno hydrolyzovatelná. Pro katalýzu samotné ribosylace je nutná Lewisova kyselina, nejčastěji popisovaný je chlorid cíničitý SnCl_4 nebo slabší a v mnohých případech výhodnější trimethylsilyltriflát TMSOTf .⁴

Posledním způsobem byl například připraven 5-fluorouridin **VIII**. Samotný 5-fluorouracil **V** je komerčně dostupný. Synteticky však byl připraven např. fluorací uracilu **IV** pomocí fluoroxytrifluormethanu.⁵ Před ribosylací byl 5-fluorouracil **V** ochráněn silylovými skupinami a následně převeden na ribosid reakcí s 1-O-acetyl-2,3,5-tri-O-benzoyl-D-ribosou **II** za katalýzy SnCl_4 . Na závěr bylo provedeno odchránění benzoylových skupin chráněného 5-fluorouridinu **VII** pomocí methanolátu sodného (*Schéma 1*).⁶

Schéma 1: Syntéza 5-fluorouridinu

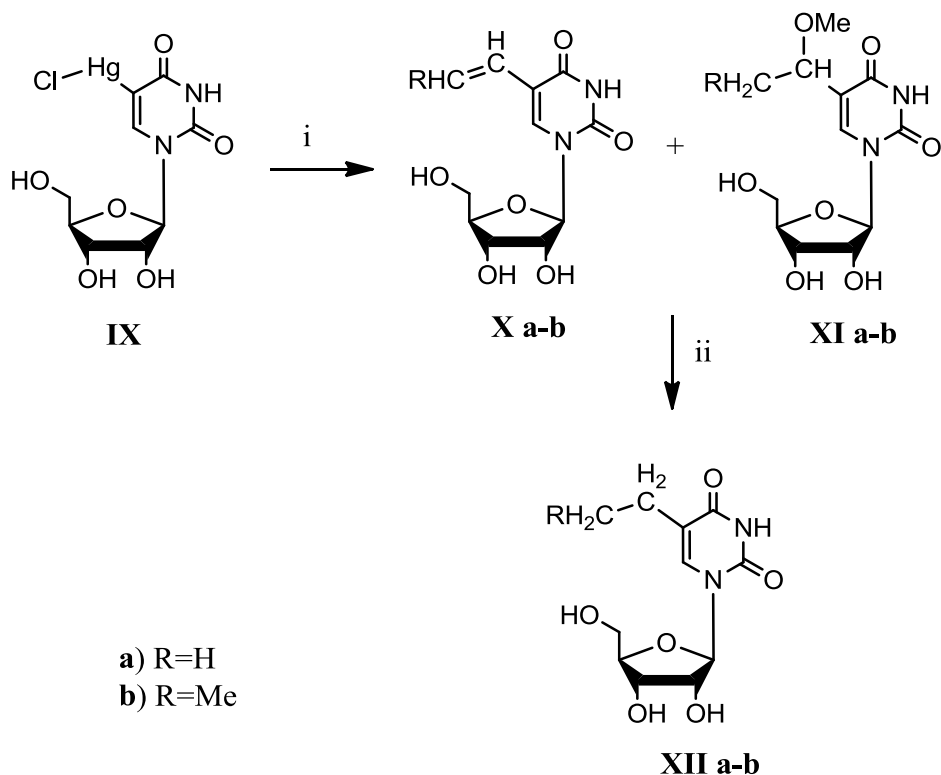


i) CF_3OF , F_3CCOOH , H_2O , -78°C , 15 h; ii) HMDS, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 140°C , 3 h; iii) SnCl_4 , MeCN, 10°C , 1 h $\rightarrow$ RT, 2 h; iv) MeONa, RT, 10 h

3.1.1.2. Modifikace 5-substituovaných uridinů

Druhá možnost, jak získat deriváty substituovaných uridinů, je přímá modifikace uridinu. Jedna skupina takto připravovaných derivátů vychází z 5-chloromerkuriuridinu **IX**. Ten lze připravit zahřátím uridinu **XXVI** s octanem rtuťnatý a následným přidáním solanky.⁷ Reakce 5-chloromerkuriuridinu **IX** s Li_2PdCl_4 a monosubstituovaným olefinem v methanolu vede ke vzniku 5-alkenyluridinů **X**. Vedlejším produktem těchto reakcí bývá C-5 α -methoxyalkyl nukleosid **XI**, ovšem v případě reakce s ethenem je 5-(1-methoxyethyl)uridin **IXa** hlavním produktem. Katalytickou hydrogenací lze směs převést na 5-alkyluridin **XII** (Schéma 2).⁸

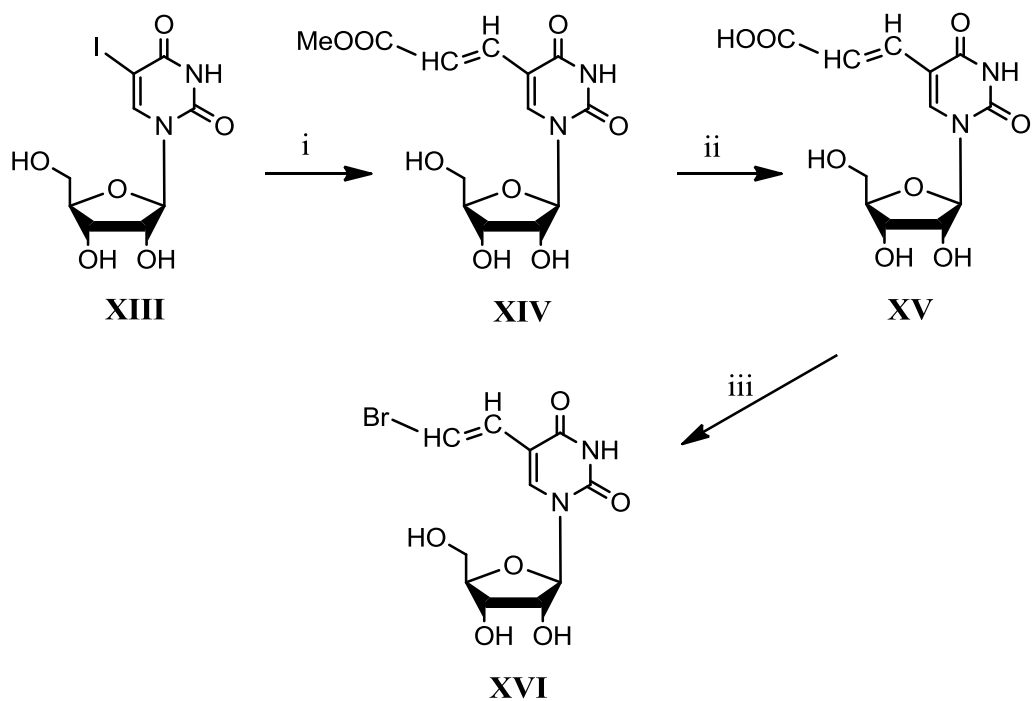
Schéma 2: Příprava 5-alkyluridinů



i) Li_2PdCl_4 , MeOH, $\text{RCH}=\text{CH}_2$; ii) H_2 , Pd/C

5-(2-bromovinyl)uridin **XVI** byl syntetizován chemickou transformací vycházející z 5-jodouridinu **XIII**. Obdobně jako v předchozí metodě reaguje 5-jodouridin **XIII** s methylakrylátem v dioxanu za přítomnosti octanu paladnatého, fenylfosfinu a triethylaminu. Varem vzniká (*E*)-5-(2-karbomethoxyvinyl)uridin **XIV**, který alkalickou hydrolýzou přechází na (*E*)-5-(2-karboxyvinyl)uridin **XV**. Reakcí s N-bromosukcinimidem v N,N-dimethylformamidu následně vzniká výsledný (*E*)-5-(2-bromovinyl)uridin **XVI** (Schéma 3).⁹

Schéma 3: Příprava 5-(2-bromvinyl)uridinu

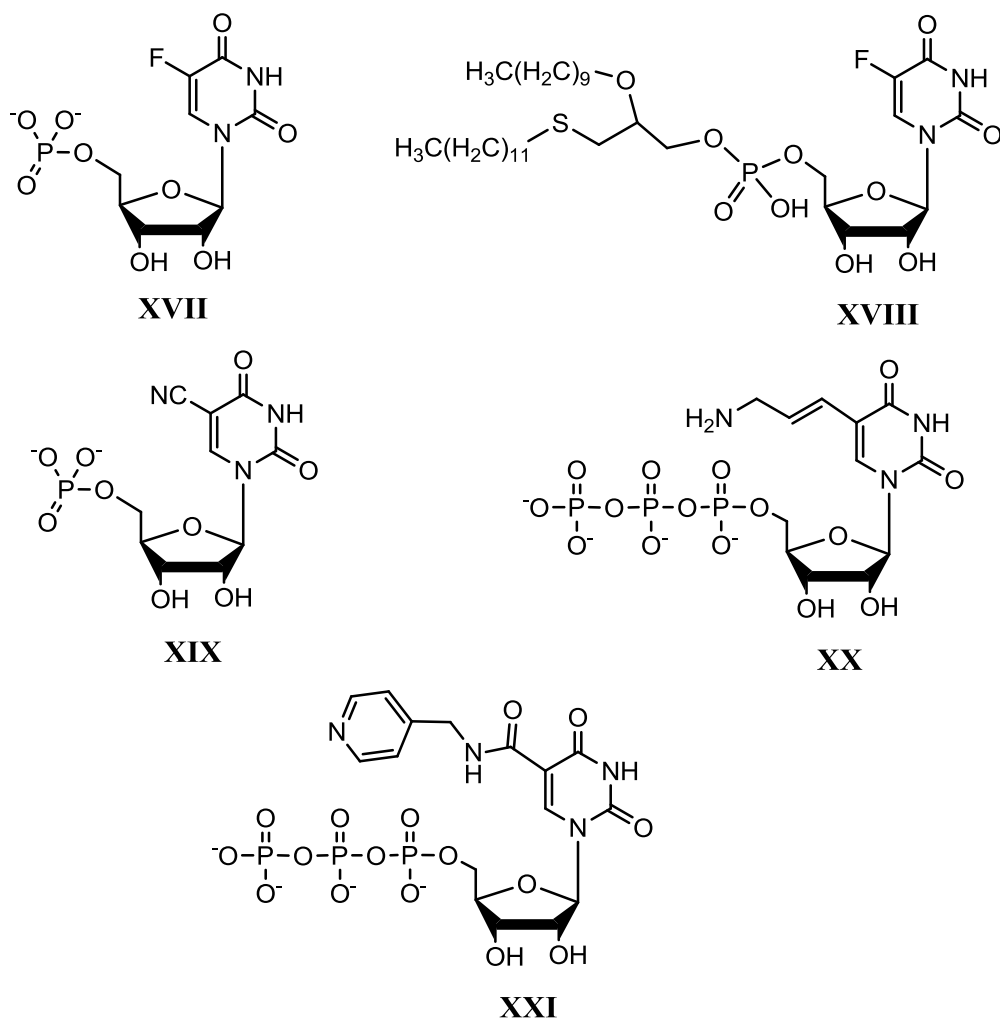


i) CH_3COOPd , TEA, PPh_3 , methylakrylát, reflux, 1 h; ii) $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}$, RT, ON; iii) NBS, DMF, K_2CO_3 , RT, 45 min

3.2. Přehled významných 5'-fosfátů

Mezi významné deriváty 5-substituovaných-5'-fosfátů bezesporu patří fluorované deriváty, dále se sem řadí deriváty obsahující ve skupině v poloze 5 dusík: 5-kyano, *E*-5-aminoallyl a 5-(4-pyridylmethyl)-karboxyimid (*Obr. 7*). Na následujících řádcích jsou jednotlivé deriváty stručně přiblíženy.

Obrázek 7: Významné 5'-fosfáty

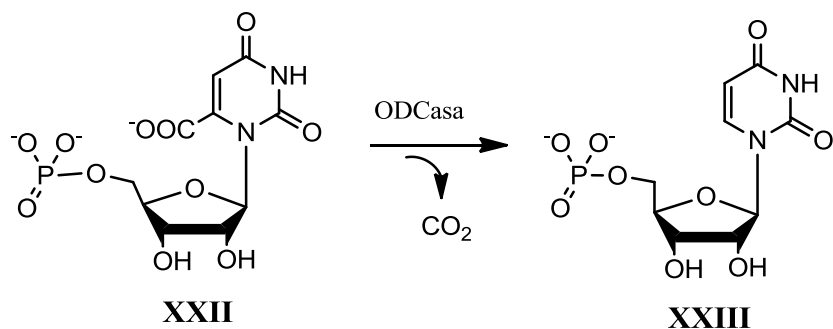


Jak již bylo výše zmíněno i tady hrají významnou roli 5'-fosfáty s halogenem v poloze C5. Nejprozkoumanějším derivátem je 5-fluorouridin-5'-monofosfát **XVII**. Spolu s jeho dalšími deriváty odvozenými od 5-fluorouracilu své uplatnění nachází při léčbě rakoviny.¹⁰ V nedávné době bylo zaměřeno použití těchto derivátů pro léčbu kožních nemocí způsobených sluncem. Patentován byl vedle 5-fluorouridin-5'-monofosfátu i Fosfuridin Tidoxil, systematicky (3-dodecylmerkpto-2-decyloxy)propylester 5-fluorouridin-5'-fosforečné kyseliny **XVIII**. Tato látka byla patentovaná k léčbě aktinické keratosisy, což je rakovinné onemocnění kůže vyvolané slunečním zářením.^{11, 12}

Dále jsou deriváty pyrimidinových bazí nukleosid-5'-monofosfátu navrhovány jako inhibitory orotidin-5'-monophosphát dekarboxylasy (ODCase). ODCasa je zodpovědná za dekarboxylaci orotidin-5'-monofosfátu (OMP) **XXII** na UMP **XXIII** v biosyntéze pyrimidinových bazí *de novo* (Schéma 4). Inhibici tohoto enzymu je možné využít při léčbě

rakovinových, virových a parazitických onemocnění. Mezi tyto deriváty patří například 5-kyanouridinmonofosfát **XIX**.¹³

Schéma 4: Dekarboxylace OMP



Další možností využití těchto derivátů lze nalézt v efektivním značení RNA. K tomuto účelu se využívá *E*-5-aminoallyluridin trifosfát **XX**. Ten se pomocí enzymu T7 RNA polymerasy inkorporuje do RNA a následně reakcí s biotinem či fluorescenčním barvivem vytvoří značenou RNA. Oproti značení radioaktivními prvky má tato metoda několik výhod, jako například je bezpečnější, stabilnější, má vyšší efektivitu značení a také nižší cenu.²

5-substituované deriváty mají i své syntetické uplatnění. Bylo prokázáno, že 5-(4-pyridylmethyl)-karboxamid UTP **XXI** po začlenění do RNA katalyzuje Diels-Alderovu reakci.¹⁴

3.2.1. Hlavní metody syntézy

Tato část je zaměřená na popis hlavních metod přípravy 5'-fosfátů. Jsou zde uvedeny klasické postupy syntézy v roztoku i rozšiřující se syntéza na pevné fázi. Jednotlivé příklady jsou uvedeny na 5-substituovaných derivátech i na samotném uridinu. Na závěr je popsána syntéza 5-substituovaného 5'-fosfátu modifikací samotného 5'fosfátu.

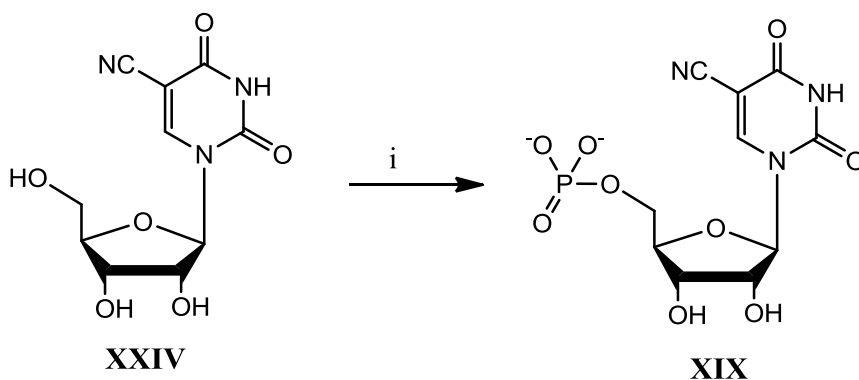
3.2.1.1. Syntéza 5'-monofosfátů

V roztokové syntéze se k fosforylaci uridinů k přípravě uridin-5'-monofosfátů používá fosforylchlorid v kombinaci s vhodným rozpouštědlem, jako například trimethylfosfátu nebo acetonitril. V případě přímé fosforylace nechráněného uridinu však vedle 5'-monofosfátu vznikají i 2'- a 3'-monofosfáty. Bylo dokázáno, že tvorbu těchto produktů lze inhibovat

přídavkem vody nebo alkoholu. I přesto však výsledné výtěžky byly nižší než v případě chráněných 2',3'-O-isopropylidenuridinů, které dosahovaly až 98 % výtěžnosti.¹⁵

Jako příklad jednoho z derivátů UMP, kdy se vycházelo z nechráněného derivátu uridinu, byla popsána příprava 5-kyanouridin-5'-monofosfátu **XIX**. Reakcí příslušného uridinu **XXIV** s fosforylchloridem v acetonitrilu za teploty 0°C, která byla následně zvýšena na teplotu laboratorní, a následnou hydrolýzou byla tato sloučenina připravena v 75 % výtěžku (*Schéma 5*).¹³

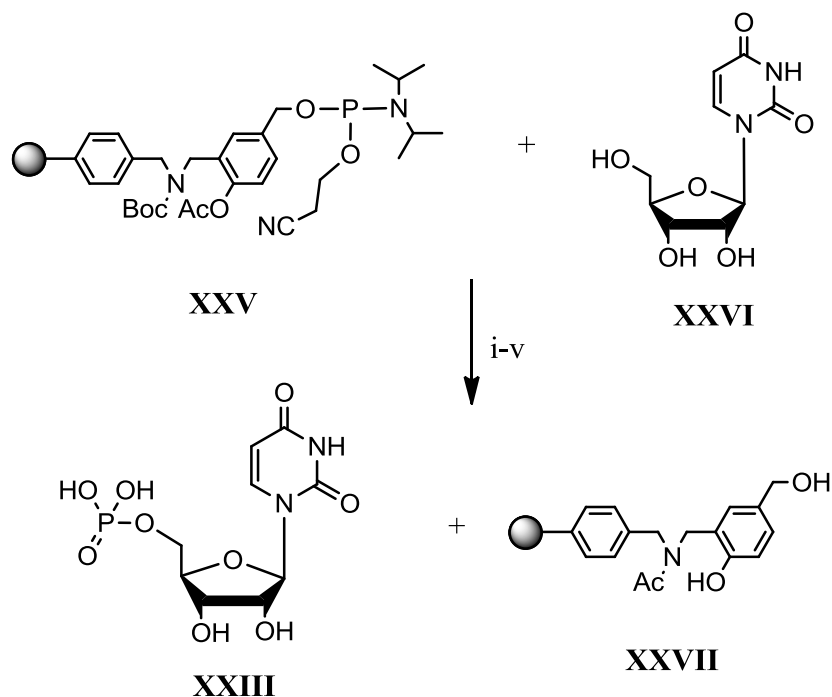
Schéma 5: Příprava 5-kyanouridin-5'-monofosfátu



i) POCl₃, Pyridine, CH₃CN, H₂O, 0°C, 3 h; RT, 2 h; ii) NH₄OH

Alternativní možností přípravy UMP **XXIII**, která nevyžaduje chránění hydroxylu, je využití syntézy na pevné fázi. Tato metoda je vhodná pro přípravu knihoven látek, jelikož nevyžaduje rozsáhlé čištění finálních produktů, jak tomu je u roztokové syntézy. V literatuře byly popsány selektivní monofosforylace nechráněných uridinů. Jeden z nich využíval linker, vázaný na aminomethylovou skupinu polystyrenové pryskyřice, na který byl napojen fosforamidit, jakožto donor fosfátu **XXV**. Následovala vazba uridinu **XXVI**, několik stupňů úprav a konečné odštěpení uridin-5'-monofosfátu **XXIII** (*Schéma 6*).¹⁶

Schéma 6: Tvorba UMP pomocí syntézy na pevné fázi

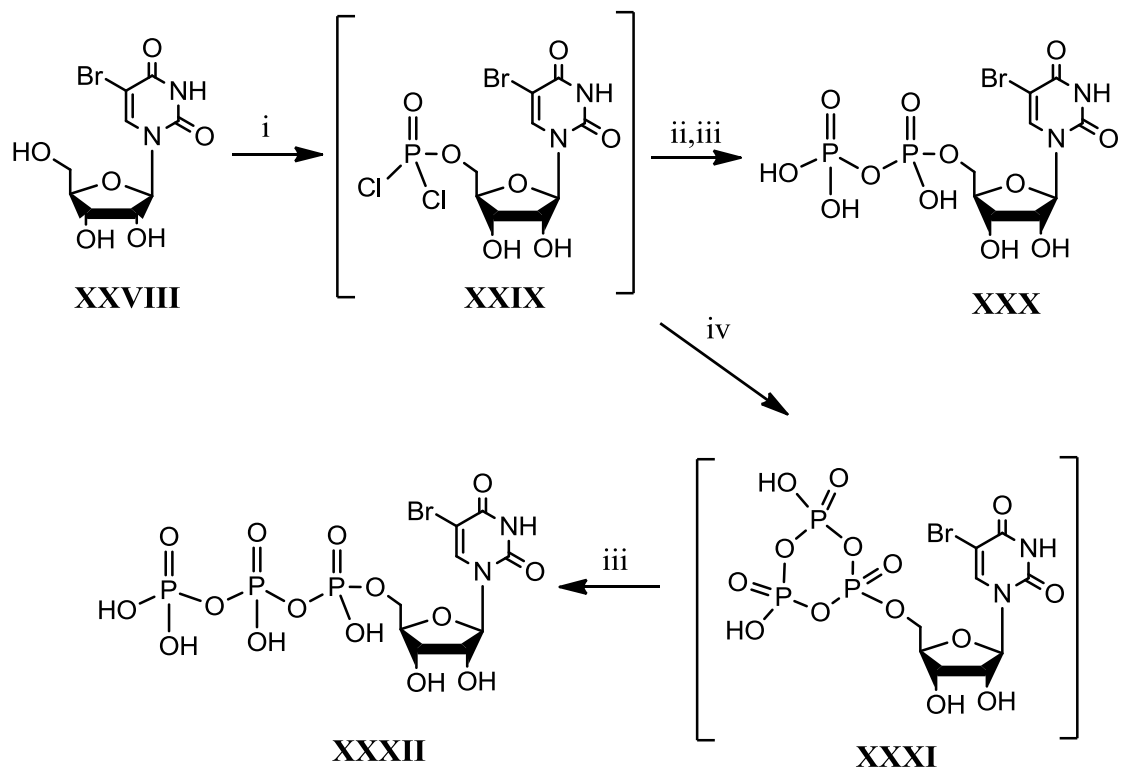


i) THF, DMSO, 1*H*-tetrazol; ii) *t*BuOOH, THF; iii) DBU, THF; iv) TFA/DCM; v) H₂O

3.2.1.2. Syntéza 5'-di a 5'-trifosfátů

Příprava 5'-di a 5'-trifosfátů může vycházet z již popsané syntézy 5'-monofosfátu. Konkrétní příklad v literatuře uvádí reakci 5-bromouridinu **XXVIII** s fosforylchloridem v trimethylfosfátu za vzniku 5-bromouridin-5'-dichlorofosfátu **XXIX**. Tento intermediát byl použit k tvorbě obou derivátů. Pro přípravu 5'-difosfátu **XXX** byla provedena reakce intermediátu **XXIX** s tri-*n*-butylammonium fosfátovým pufrem v dimethylformamidu. K syntéze 5'-trifosfátu intermediát **XXIX** reagoval s tri-*n*-butylaminem a nadbytkem bis(tri-*n*-butylammonium) pyrofosfátového pufru v dimethylformamidu. Tím vznikl cyklický intermediát **XXXI**, jehož hydrolýzou vznikl 5-bromouridin-5'-trifosfát **XXXII** (Schéma 7). V obou případech však hydrolýzou vzniká 5-bromouridin-5'-monofosfát jako vedlejší produkt.¹⁷

Schéma 7: Syntéza 5'-di a 5'-trifosfátů

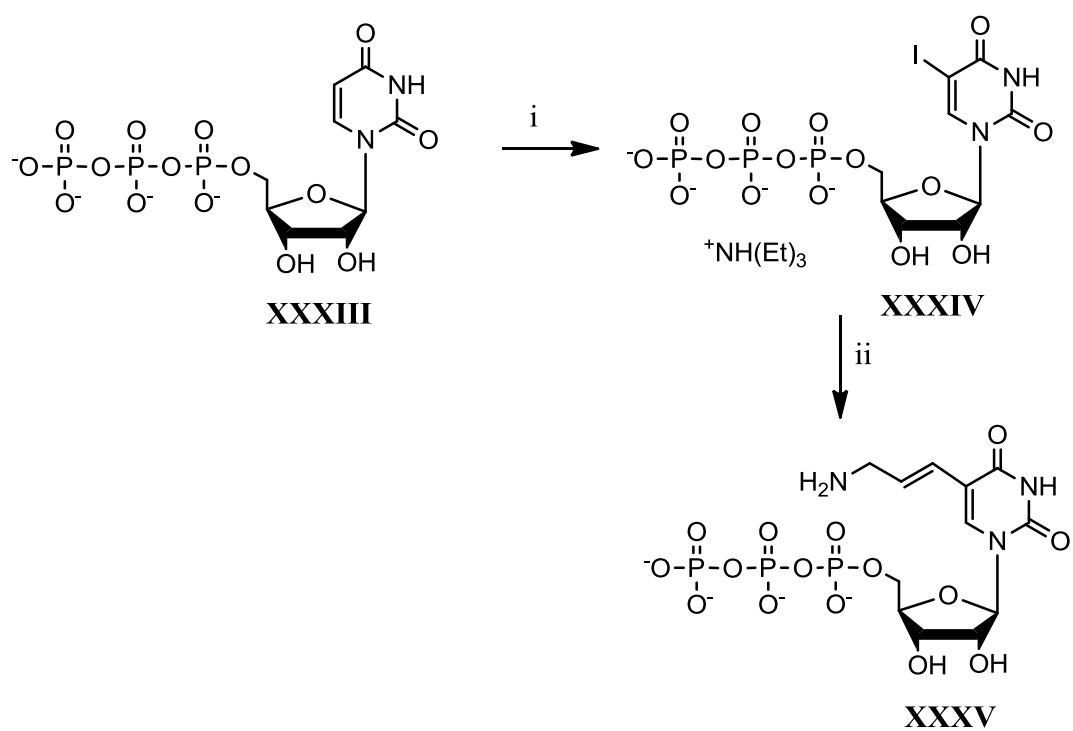


i) $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{PO}$, POCl_3 , 1,8-bis(dimethylamino)naftalen („Protonová houba“, 0°C , 5 h; ii) tri-*n*-butylammonium fosfátový pufr, DMF, 0°C , 5 min; iii) triethylamonný hydrogenuhličitanový pufr, pH 7,4-7,6, RT, 1 h; iv) bis(tri-*n*-butylammonium) pyrofosfátový pufr, DMF, 0°C , 5 min

3.2.1.3. Modifikace uridin-5'-fosfátů

Poslední možností přípravy 5-substituovaných uridin-5'-fosfátů je jejich přímá modifikace. Tímto způsobem byl syntetizován 5-aminoallyluridin-5'-trifosfát XXXV. Významnou metodou byla reakce UTP XXXIII s octanem rtuťnatým a následně s allylaminem. Vážný problém v této reakci je však použití toxického octanu rtuťnatého, proto byl vyvinut jiný způsob. Prvním krokem byla substituce UTP XXXIII jodem, druhým Heckova reakce s allylaminem za katalýzy palladiem. Výsledný 5-aminoallyluridin-5'-trifosfát XXXV byl získán v 71 % výtěžku ve vysoké čistotě (Schéma 8).²

Schéma 8: Synthéza 5-aminoallyl-UTP



i) N-jodosukcinimid, NaN_3 , H_2O , 60 C, 15 h; ii) allylamin, K_2PdCl_4 , RT, 15 h

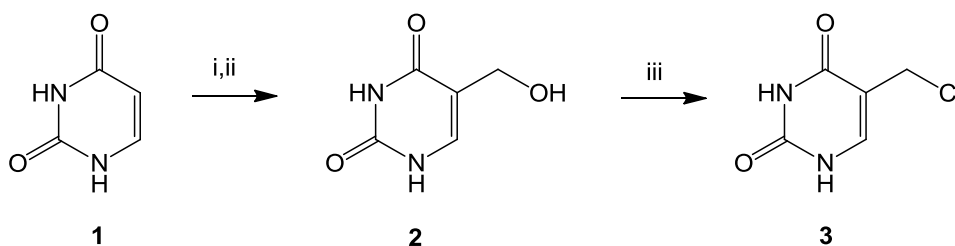
4. DISKUZE A VÝSLEDKY

4.1. Příprava 5-alkoxyderivátů

4.1.1. Příprava výchozích 5-alkoxymethyluracilů

Příprava výchozích 5-alkoxymethylderivátů uracilu **4a-d** spočívala v konverzi 5-chloromethyluracilu **3**, který bylo nejprve potřeba syntetizovat. Prvním krokem syntézy 5-chloromethyluracilu **3** byla příprava 5-hydroxymethyluracilu **2**, která vycházela z již osvědčené reakci uracilu **1** s paraformaldehydem ve vodném prostředí, jako katalyzátor byl zvolen hydroxid barnatý.¹⁸ V druhém kroku byl hydroxyderivát **2** míchán s kyselinou chlorovodíkovou¹⁹ za laboratorní teploty po dobu dvou hodin a tím byl převeden na 5-chloromethyluracil **3**. Po filtraci, promytí HCl a vysušení byl získán produkt s výtěžkem 78% (Schéma 9).

Schéma 9: Syntéza 5-chloromethyluracilu

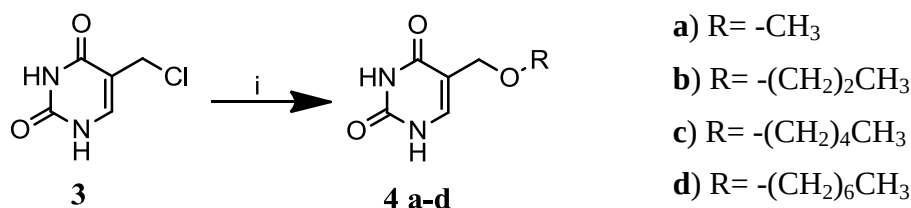


i) (HCHO)_n, Ba(OH)₂/H₂O, reflux, 5min ii) RT, 20h

iii) konc. HCl, RT, 2h

Dalším krokem byla samotná příprava 5-alkoxymethylderivátů uracilu **4**, která spočívala ve známé nukleofilní substituci 5-chloromethyluracilu **3** (Schéma 10).²⁰ 5-Chloromethyluracil byl smíchán s příslušným alkoholem a míchán při teplotě olejové lázně 100°C po dobu dvou hodin. Pro tento krok byly zvoleny alkoholy methanol, propanol, pentanol a heptanol. Po ochlazení byly jednotlivé alkoxyderiváty **4a-d** zfiltrány a promyty příslušným alkoholem a následně vysušeny. V případě potřeby přečištění byla navíc provedena rekrystalizace v toluenu. U 5-heptoxymethyluracilu **4d** byla rekrystalizace provedena automaticky pro odstranění přebytečného heptanolu, který by se samovolně zcela neodpařil. Výtěžek jednotlivých produktů se pohyboval v rozmezí 70-81%.

Schéma 10: Příprava 5-alkoxymethylderivátů uracilu

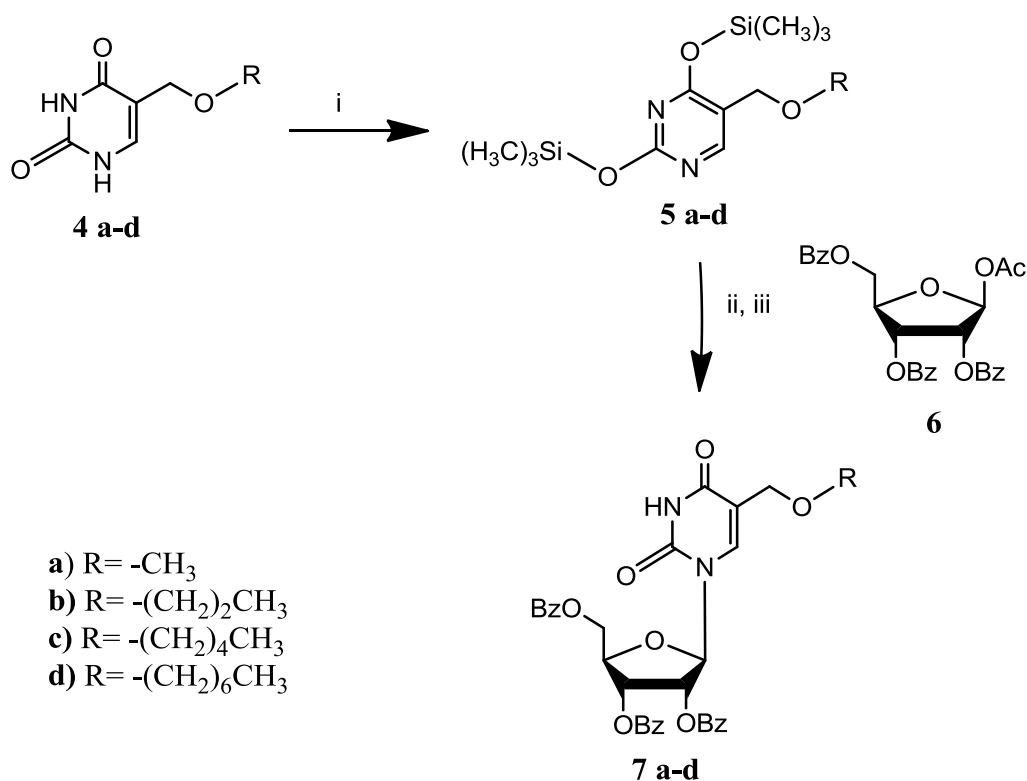


i) ROH, 100°C, 2h

4.1.2. Příprava 5-alkoxymethylderivátů uridinu

Prvním nezbytným krokem ribosylace 5-alkoxyuracilů **4a-d** byla ochrana karbonylových kyslíků silylovou skupinou.²⁰ Tento krok tzv. silylace spočíval v reakci příslušného 5-alkoxyderivátu s hexamethyldisilazanem a katalytickým množstvím síranu amonného za reakčních podmínek 140°C a 8 hodin (*Schéma 11*). Obecně lze říct, že silylace je u konce, jakmile je reakční směs rozpuštěná. Ve snaze optimalizovat podmínky reakce, a tím snížit množství použitého rozpouštědla, byly provedeny reakce s polovičním množstvím hexamethyldisilazanu než jak uvádí literatura.²⁰ Nicméně ani po desíti hodinách se 5-alkoxymethylderivát **4a-d** zcela nerozpustil. Nejprve tomu nebyl přikládán velký význam a pokračovalo se v další reakci. Izolace ochráněného intermediátu **5a-d** spočívala pouze v odpaření rozpouštědla pomocí rotační vakuové odparky. Vše muselo probíhat v suchých nádobách, jelikož by došlo k hydrolýze a zpětnému ochránění skupin. Odparek byl dále rozpuštěn v bezvodém 1,2-dichlorethanu, k této směsi byl přidán 1,1 ekvivalentu 1-O-acetyl-2',3',5'-tri-O-benzoyl-β-D-ribofuranosy **6** a trimethylsilyltrifluoromethansulfonát jako katalyzátor. Reakční směs byla míchána za pokojové teploty 24 hodin. (*Schéma 11*). Výsledným produktem této reakce byl ochráněný 5-alkoxymethyluridin **7a-d**. Pro odstranění silylových skupin se reakční směs rozmíchala ve vodě a následně se provedla extrakce do ethylacetátu. Organická vrstva byla vysušena bezvodým Na₂SO₄, přefiltrována a odpařena do sucha na rotační vakuové odparce. Pro odstranění medovité konzistence byl odparek 3× koevaporován v methanolu.

Schéma 11: Ribosylace 5-alkoxymethyluracilů



i) HMDS, (NH₄)₂SO₄, 140°C, 8h ii) TMSOTf, dichlorethan, RT, 24h iii) H₂O, ethylacetát

Tímto způsobem však vznikly komplikované směsi. Proto byla tomuto kroku věnována větší pozornost a pro další studium byl použit pouze 5-methoxymethyluracil **4a**. Pro zjištění optimálního průběhu silylace bylo vyzkoušeno několik reakcí methoxymethyluracilu **4a** s různým poměrem této látky v 1 ml hexamethyldisilazanu (24-46 mg/ml), což shrnuje *tabulka 1*. Poslední tři reakce, ve kterých bylo opakovaně použito 24 mg látky na 1 ml hexamethyldisilazanu, vedly k úspěšné silylaci, takže se ukázalo, že další optimalizace oproti výsledkům popsáným v literatuře²⁰ již nelze dosáhnout. V tomto poměru byla reakce dokončena již po čtyřech hodinách a následný ribosid **7a** byl získán jako hlavní produkt. Čistý ochráněný methoxymethyluridin **7a** byl získán purifikací za pomoci kapalinové flash chromatografie s použitou mobilní fází CHCl₃/MeCN (5:1). Obdobným způsobem pak byly připraveny deriváty **7b-7d**.

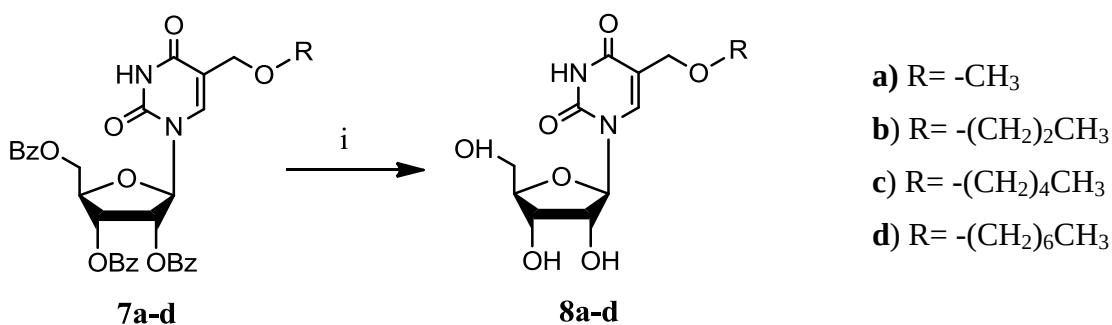
Tabulka 1: Přehled poměrů methoxymethyluracilu 4a a hexamethyldisilazanu

4a	HMDS	m(4a)/V(HMDS)
m (g)	V (ml)	(g/ml)
0,463	10	0,046
1,319	30	0,044
0,432	12	0,036
0,150	5	0,030
0,240	10	0,024
0,239	10	0,024
2,130	89	0,024

Konečným krokem syntézy 5-alkoxymethyluridinu **8a-d** byla deprotekce hydroxylových skupin (*Schéma 12*). Nejprve byl vyzkoušen alternativní postup k deprotekcí popsané v literatuře.²⁰ Tento krok byl proveden jak z přečištěného ochráněného 5-methoxymethyluridinu **7a**, tak z nepřečištěných derivátů **7a-d** kvůli možnému vyloučení jedné série čistění. Místo roztoku MeOH-NH₃ zde byl použit EtOH-NH₃, který byl smíchán s ochráněným ribosidem **7a-d**. Směs byla míchána 7 dní za pokojové teploty. Podle LC-MS analýzy za tuto dobu nedošlo k úplnému odbourání, ve směsi se nacházel značný podíl monobenzoylovaného derivátu spolu s dalšími nečistotami, podíl nečistot při použití purifikovaného i surového 5-methoxymethyl derivátu **7a** byl porovnatelný.

Jelikož se tento způsob odbourávání neosvědčil svou dlouhou reakční dobou ani kvalitou odbourání, byl vyzkoušen postup odbourávání s 1M methoxidem sodným. Tento postup již byl vyzkoušen pouze na 5-methoxymethyl derivátu uridinu **7a**, jako modelové látce. Zkrátila se reakční doba na 1 hodinu a množství vedlejších produktů se také snížilo (*Schéma 12*).

Schéma 12: metody deprotekce 5-alkoxymethyluridinů



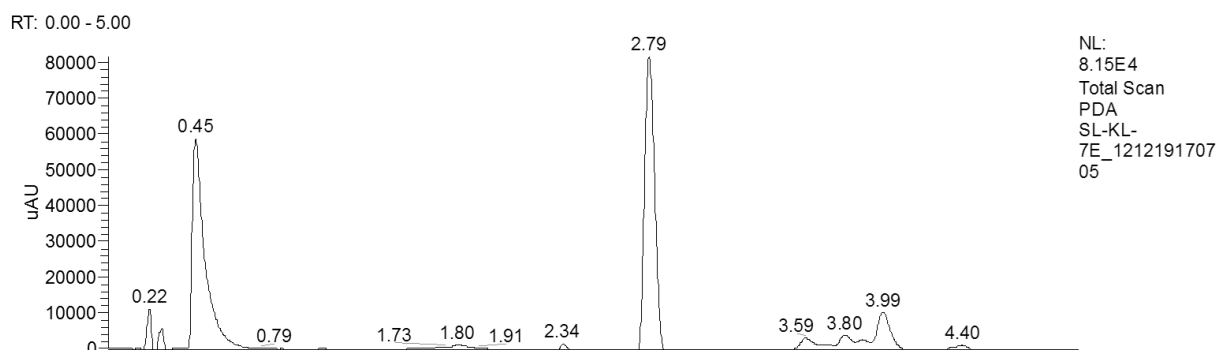
i) a) EtOH-NH₃, RT, 7 dní; b) MeONa, RT, 1h

Touto metodou vzniklý 5-methoxymethyluridin **8a** byl purifikován pomocí kapalinové flash chromatografie. Nejprve musela být vybraná vhodná mobilní fáze, to bylo provedeno pomocí analytické TLC. Bylo vyzkoušeno několik mobilních fází, jelikož problém se ukazoval ve špatné hodnotě R_f hlavní skvrny a především v nedostatečné separaci látek, které byly do sebe rozpitě. Jako vhodná kombinace byla zvolena mobilní fáze o složení $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:2), pro zaostření skvrn byla přidána kyselina mravenčí v poměru $(\text{CHCl}_3/\text{MeOH})/\text{HCOOH}$ (5:0,125). Po vyřešení optimální mobilní fáze nastal problém další. Vzorek nebyl v této mobilní fázi rozpustný. Ke směsi bylo přidáno malé množství vody, ve kterém se již vzorek rozpustil. Takto připravený vzorek nacházející se ve dvou fázích nanesen na kolonu. Přestože se píky oddělily, požadovaný 5-methoxymethyluridin **8a** byl stále částečně znečištěn. K dočištění byla využita preparativní TLC za použití stejné mobilní fáze jako v kapalinové flash chromatografii. Po vyvinutí byla hlavní skvrna seškrábána a vyextrahovaná do methanolu. Po zfiltrování a odpaření již byl získán čistý 5-methoxymethyluridin **8a**.

4.1.3. Studium stability 5-methoxymethyl-2',3',5'-O-tribenzoyluridinu

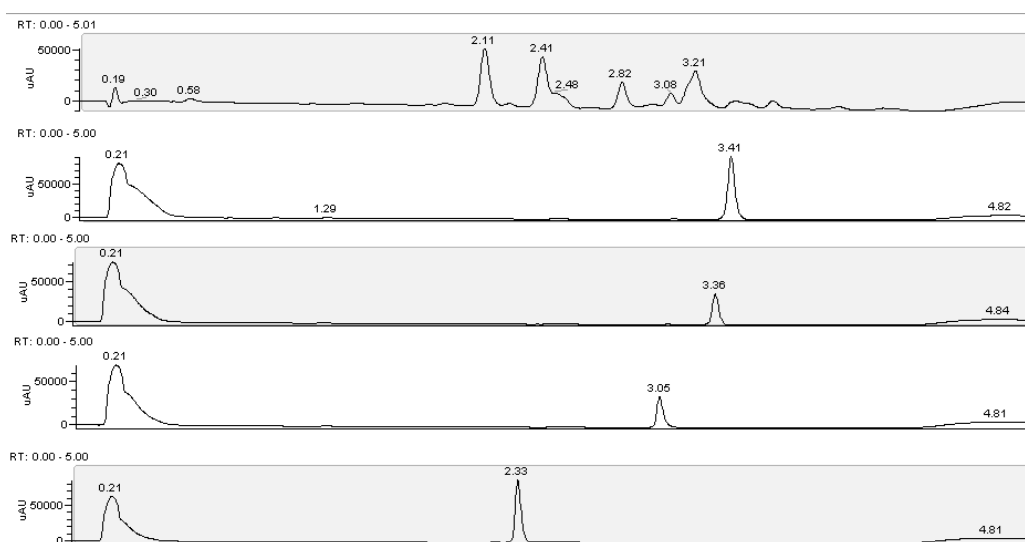
Při studiu syntézy tribenzoylovaného 5-methoxymethyluridinu **7a**, ribosylací 5-methoxymethyluracilu **4a** za katalýzy TMSOTf, byla zjištěna nestabilita surové látky na vzduchu při pokojové teplotě. Ačkoliv čerstvě připravená látka byla zcela čistá (Obr. 8), po jednom měsíci se ukázalo, že se látka zcela rozložila (Obr. 9).

Obrázek 8: Záznam z LC-MS po izolaci tribenzoylovaného 5-methoxymethyluridinu **7a**



Pomocí preparativního HPLC se podařilo rozdělit čtyři hlavní látky s retenčními časy 2.11, 2.89, 3.08 a 3.21, které jsme se pokusili identifikovat pomocí NMR spektroskopie. Komplexní směs a jednotlivé rozdělené podíly názorně zobrazuje (Obr. 9).

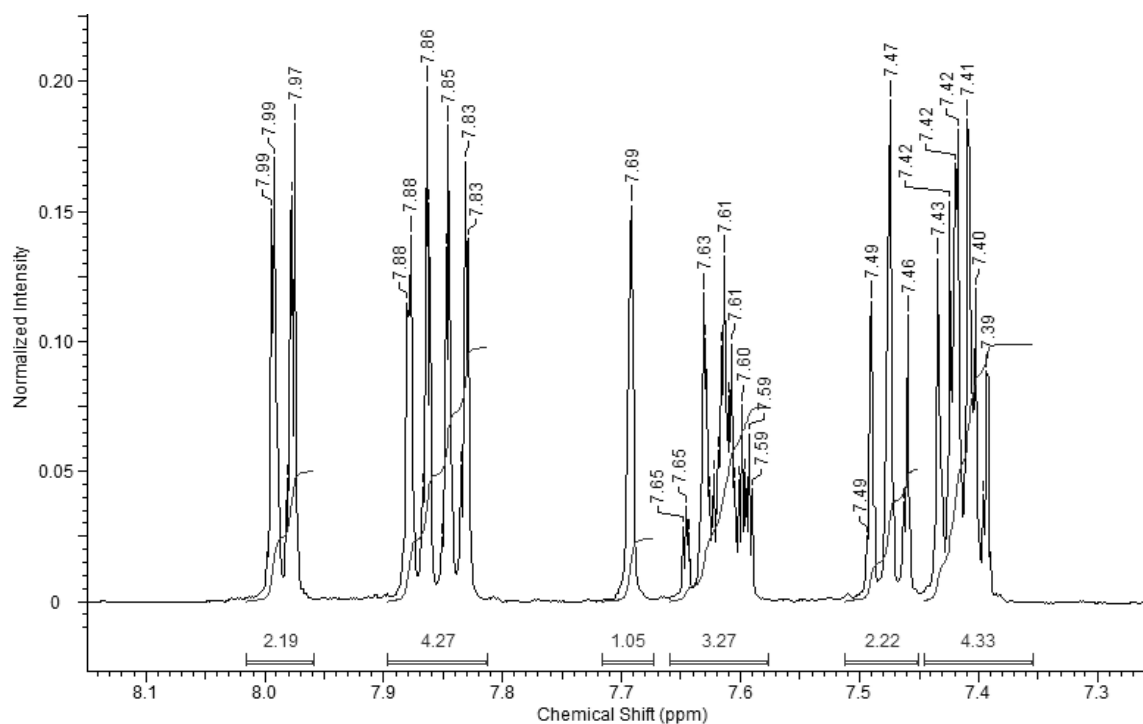
Obrázek 9: Rozdělení rozloženého methoxymethylderivátu



Jelikož množství látek, které se nám podařilo přechistit pomocí kapalinové chromatografie, bylo velmi malé, nepodařilo se naměřit ^1H a ^{13}C NMR spektrum s dostatečnou intenzitou. Výjimkou byla látka s retenčním časem 2.11, u které mohla být přesně určena struktura.

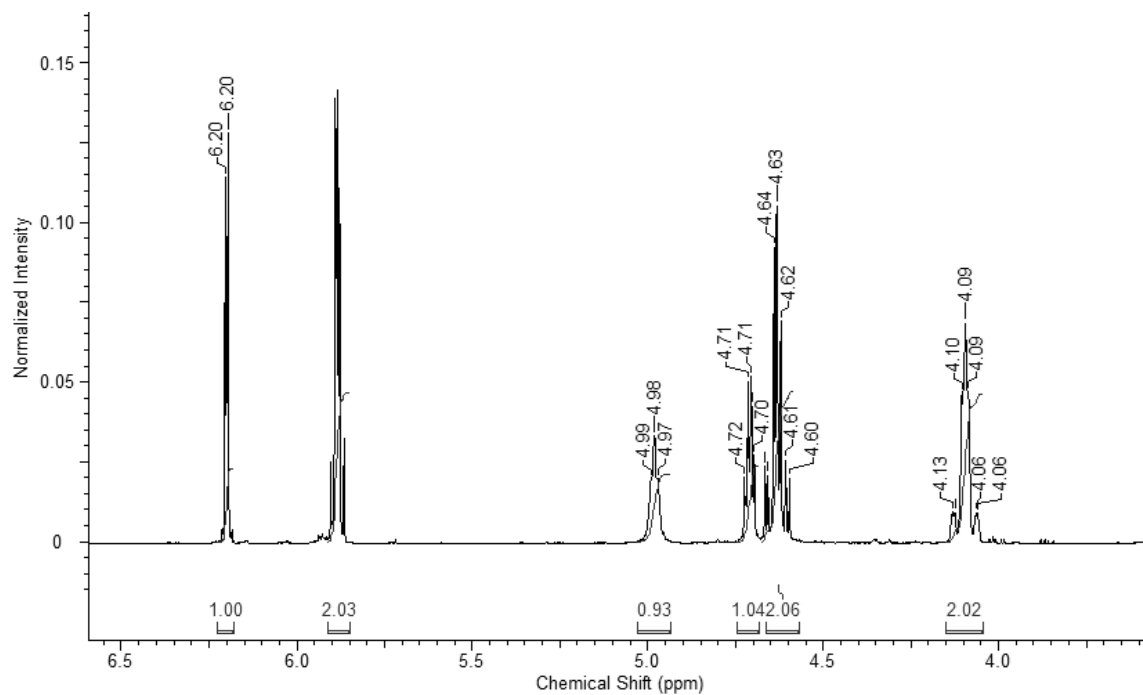
V ^1H NMR spektru je vidět devět vodíků v oblasti alifatické (4 - 6.5) a šestnáct vodíků v oblasti aromatické (7.4 – 8.0). Dále je ve spektru jeden vodík 11.31, který je širokým singletem a bezesporu patří NH skupině. Z velkého počtu aromatických vodíků lze usuzovat, že se jedná o derivát, ve kterém zůstaly všechny tři benzoylové skupiny. Poslední vodík v aromatické oblasti – singlet při 7.69 ppm pak může patřit CH vodíku pyrimidinového kruhu (Obr. 10).

Obrázek 10: Aromatická část NMR spektra látky s $R_t=2.11$



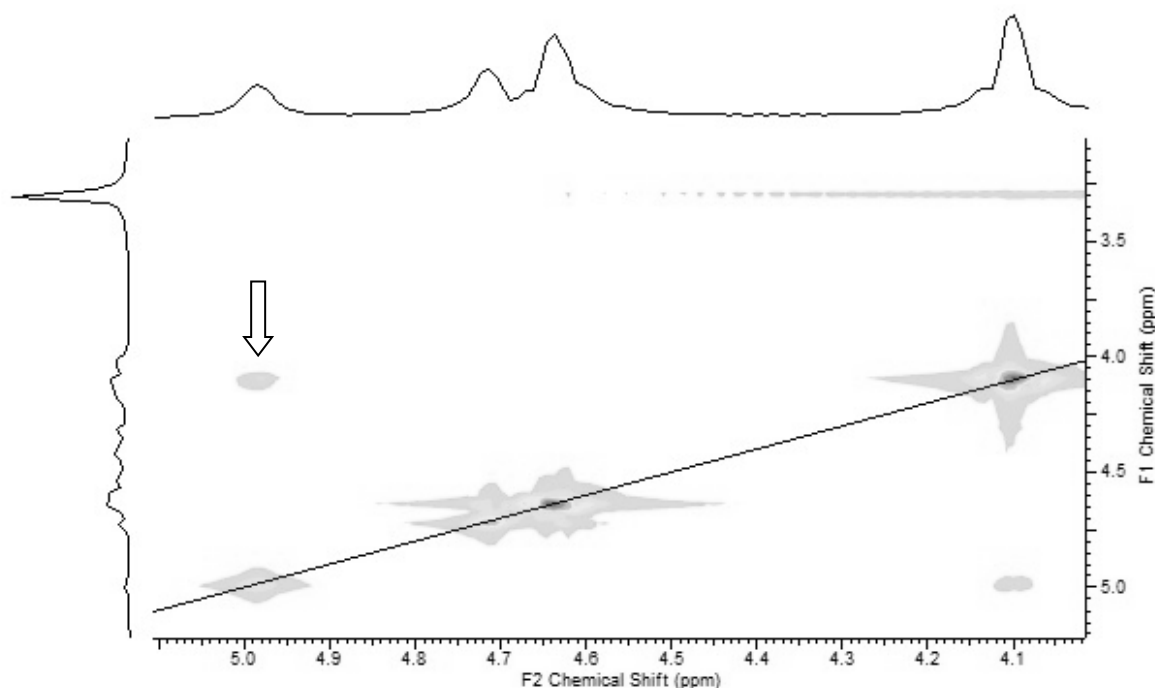
V alifatické oblasti se zmíněných devět vodíků rozdělilo do několika multipletů (Obr. 11).

Obrázek 11: Alifatická část NMR spektra látky s $R_t=2.11$



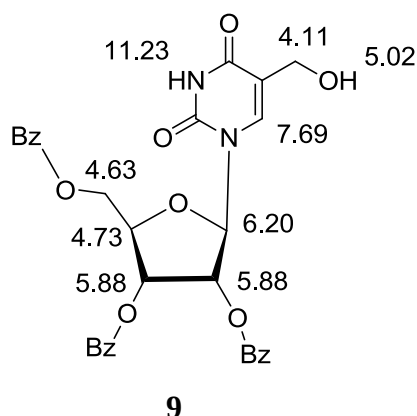
Pomocí tzv. COSY experimentu v ^1H NMR se nám podařilo prokázat interakci vodíku, který je tripletem při 4,98 ppm s vodíkem, který je multipletem při 4,08 ppm (Obr. 12). V tomto případě se musí jednat o štěpení CH_2 skupiny, která má diastereotopické vodíky s jinou skupinou, která má jen jeden vodík.

Obrázek 12: Záznam COSY experimentu v ^1H NMR látky s $R_t=2.11$



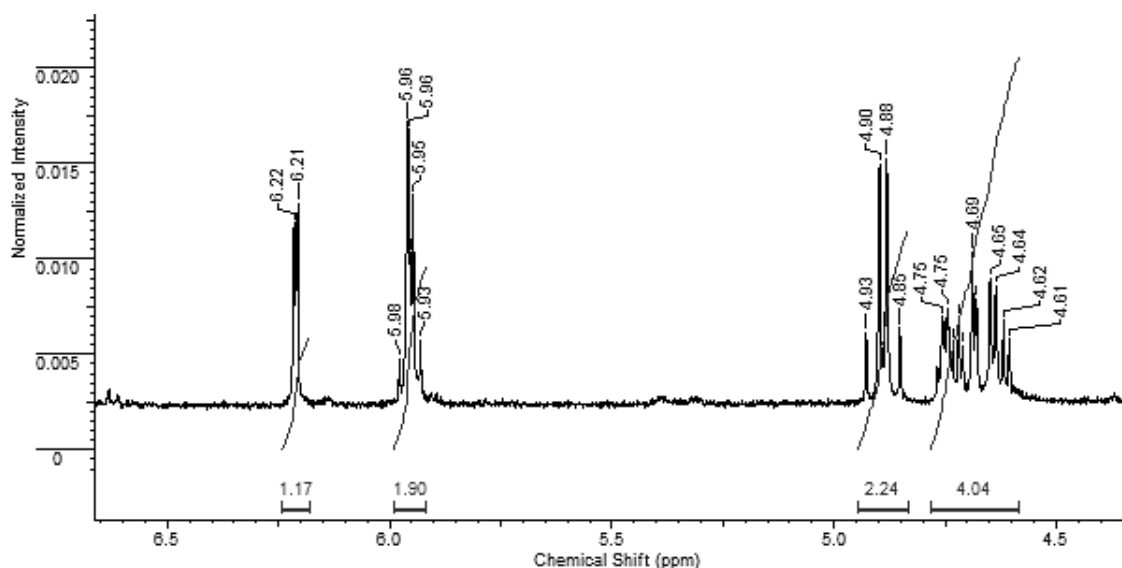
Nabízí se tedy interakce CH_2 a OH skupiny vzniklé hydrolyzou methoxyderivátu. Signály ostatních vodíků bylo možno na základě NMR experimentů přiřadit zbývajícím alifatickým CH a jedné CH_2 skupin. Získanou látkou je tedy hydroxy derivát **9**, který je uveden spolu se svými posuny alifatických vodíků a CH, vodíku pyrimidinového kruhu a NH vodíku v ^1H NMR spektru (Obr. 13). Uvedené struktře odpovídá i zjištěná molekulová hmotnost z LC/MS záznamu.

Obrázek 13: Produkt rozkladu 5-methoxymethyl derivátu



U druhé látky, kterou se podařilo izolovat a která měla retenční čas 2.89, se podařilo změřit jen ^1H NMR spektra. Z LC-MS záznamu vyplývá, že její molekulová hmotnost je 690. V alifatické oblasti ^1H NMR spektra (*Obr. 14*) je možné vidět, že ve srovnání s hydroxyderivátem **9** nedošlo téměř ke změně posunu vodíků cukerného zbytku, ale zmizel signál vodíku při 4.98 ppm odpovídající hydroxy skupině vázané na methyl v poloze 5. Zároveň došlo k posunu CH_2 methylenové skupiny k vyšším ppm (4.90), což nasvědčuje tomu, že je hydroxyskupina pokryta nějakým elektronegativním substituentem.

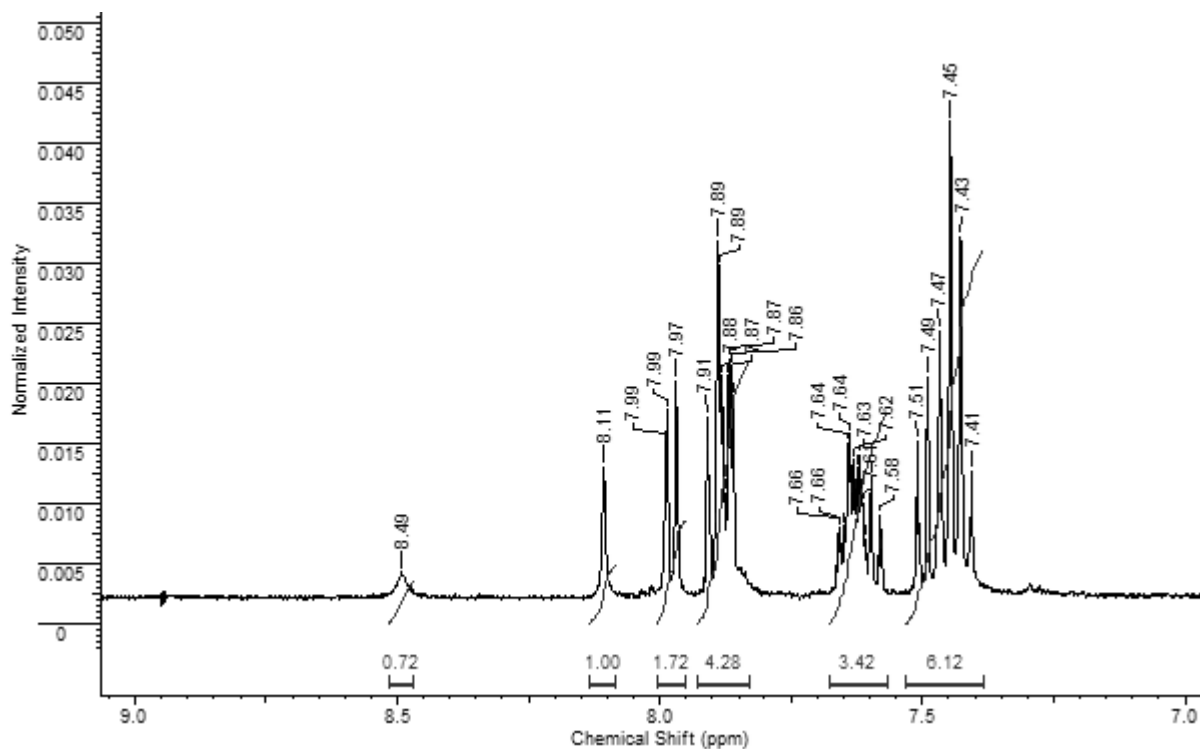
Obrázek 14: Alifatická část NMR spektra látky s $R_t=2.89$



Vliv elektronegativní skupiny se projevuje pravděpodobně i na zvýšení posunu CH vodíku pyrimidinového kruhu na hodnotu 8.11 (*Obr. 15*). Dalším rysem ^1H NMR spektra je snížení posunu NH vodíku na hodnotu 8.49 ppm, což nasvědčuje snížení jeho kyselosti.

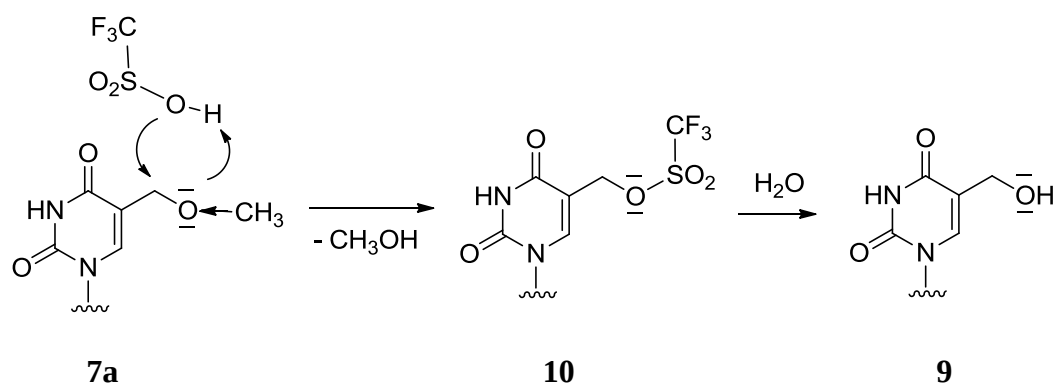
Z integrace aromatické oblasti vyplývá, že všechny benzoylové zbytky zůstaly vázané na hydroxylových skupinách (Obr. 15).

Obrázek 15: Aromatická část NMR spektra látky s $R_t=2.89$



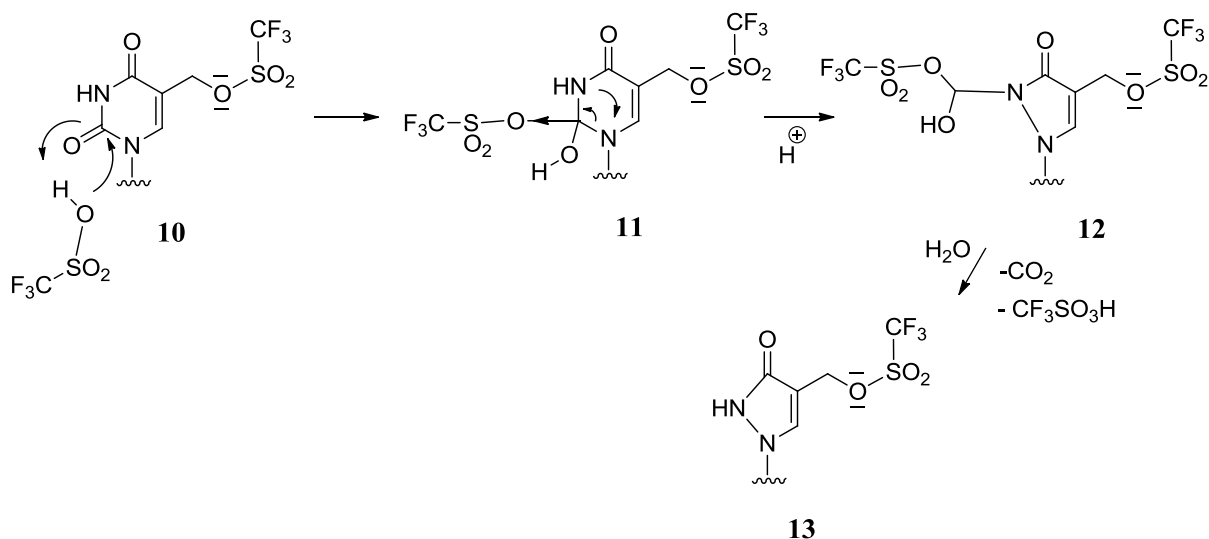
Na otázku, co může být elektronegativní skupinou vázanou na hydroxymethylenovou skupinu v poloze 5, jsme se snažili odpovědět s přihlédnutím k použitým reaktantům. Katalyzátorem pro ribosylace 5-substituovaného uracilu byl trimethylsilyl-trifluoromethansulfonát, který se při zpracování výsledného produktu zhydrolyzoval na trifluoromethansulfonovou kyselinu. Tato velmi silná kyselina, kterou se zřejmě nepodařilo zcela odstranit z výsledného produktu, pak mohla reagovat s methoxyskupinou podle uvedeného mechanismu (*Schéma 13*) za vzniku nového esteru **10**. Hydrolýza tohoto esteru může být příčinou vzniku výše zmíněného hydroxyderivátu **9** (*Schéma 13*).

Schéma 13: Reakce 5-methoxymethyl derivátu uridinu s kyselinou trifluoromethansulfonovou



Molekulová hmotnost esteru **10** je však 718 místo zjištěných 690. Rozdíl molekulových hmotností činí 28 jednotek, což může odpovídat odštěpení CO skupiny. Tento fakt by podporovalo snížení kyselosti NH vodíku (vznik amidického místo imidického vodíku). Příčinou této dekarbonylace pak může být opět reakce s triflátem (*Schéma 14*).

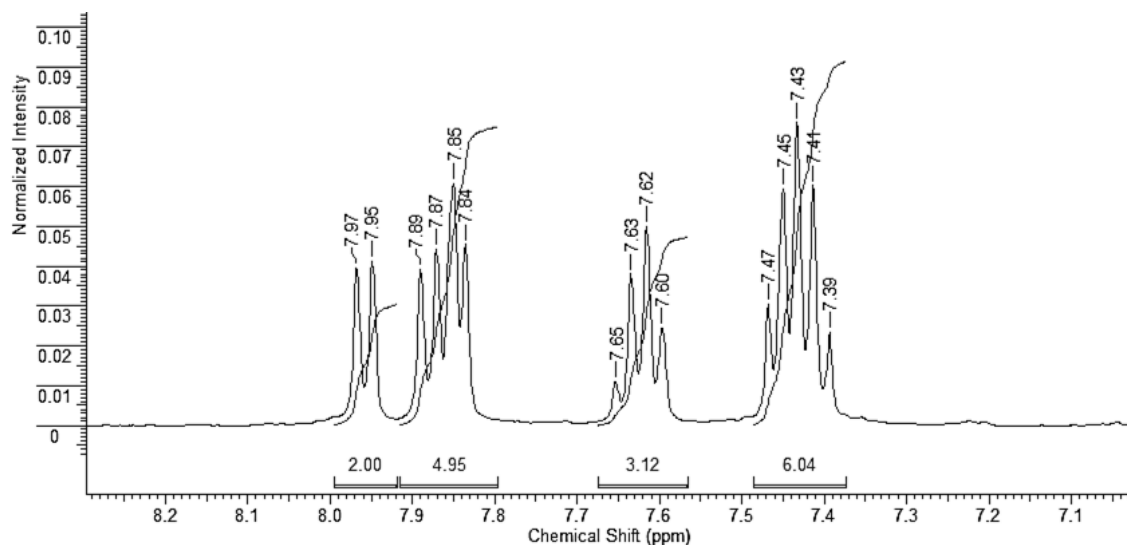
Schéma 14: Návrh reakce esteru **10** s kyselinou trifluoromethansulfonovou



V tuhle chvíli se samozřejmě jedná spíše o spekulaci. Pro jednoznačné potvrzení struktury bude muset být derivát s $R_t=2.89$ připraven ve větším množství a podroben speciálním NMR experimentům.

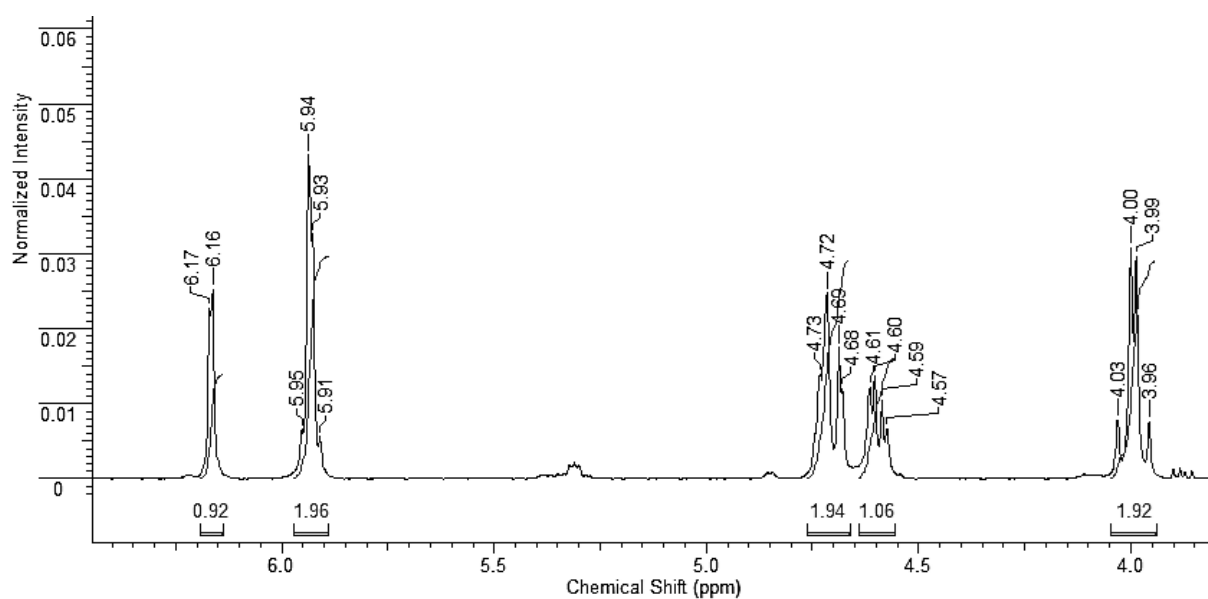
U třetí látky s retenčním časem 3.08, kterou se podařilo izolovat v čistém stavu, je velmi špatná ionizace na MS, proto lze jen stěží odhadnout její strukturu. Jediné, co je možno v tomto případě říci, je, že hydroxyskupiny ribosy zůstaly pokryté benzoyly (*Obr. 16*).

Obrázek 16: Aromatická část NMR spektra látky s Rt=3.08



Alifatické vodíky odpovídají přítomnosti ribosy (*Obr. 17*), látka dále neobsahuje hydroxymethylenovou skupinu v poloze 5 a ve spektru chybí posun NH vodíku.

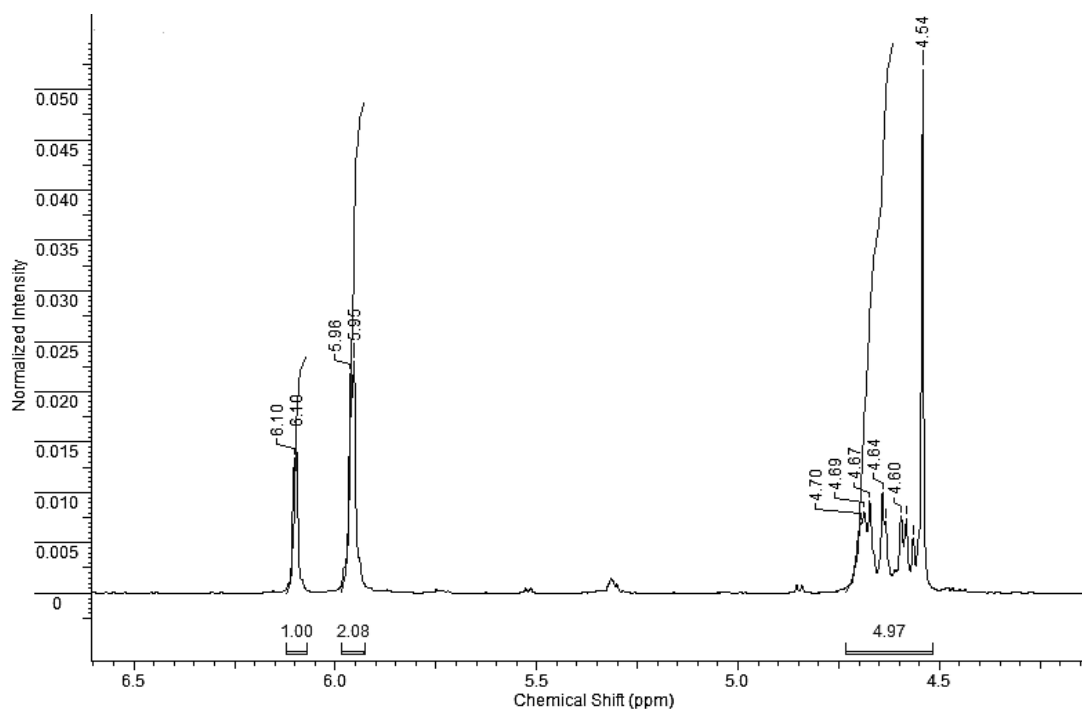
Obrázek 17: Alifatická část NMR spektra látky s Rt=3.08



Předpokládáme, že se jedná o derivát, kde je místo hydroxy skupiny v poloze 5 vázán jiný substituent. Konečnou strukturu však nemůžeme v této chvíli ani naznačit.

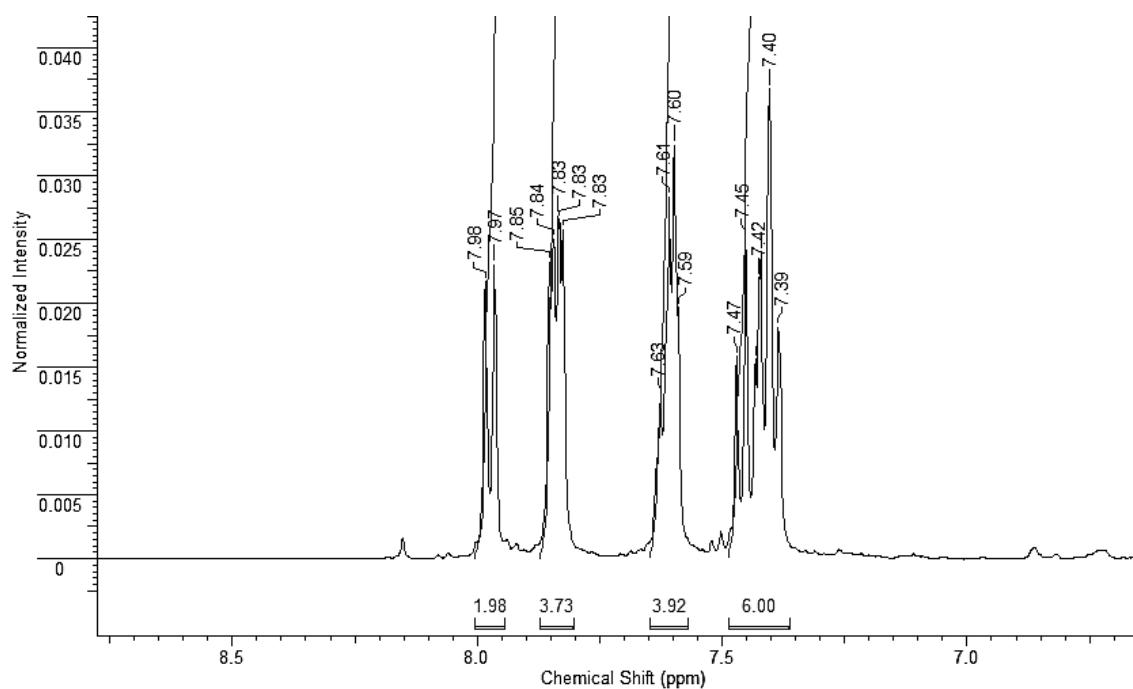
Čtvrtá látka, která byla izolována, má retenční čas 3.21. Ani v tomto případě však nebylo možné vidět ionizaci jak v kladném tak záporném módu. Z ^1H NMR spekter vyplývají obdobné závěry jako v předchozím případě. Alifatickou oblast je možné vidět na *Obr. 18*.

Obrázek 18: Alifatická část NMR spektra látky s $R_t=3.21$



Aromatická oblast opět ukazuje na přítomnost všech tří benzoxylových skupin. CH vodík pyrimidinového kruhu je pravděpodobně schován v multipletu 7.59 – 7.63 ppm.

Obrázek 19: Aromatická část NMR spektra látky s $R_t=3.21$



Každopádně je možné říci, že v žádné z izolovaných nečistot, které tvořili dominantní produkty směsi, nebyla přítomna methoxyskupina vázaná na methyl v poloze 5. Pravděpodobnou příčinou rozkladu byla přítomnost zbytkového množství trifluormethansulfonové kyseliny.

4.2. Příprava prekurzorů k syntéze 5'-fosfátů

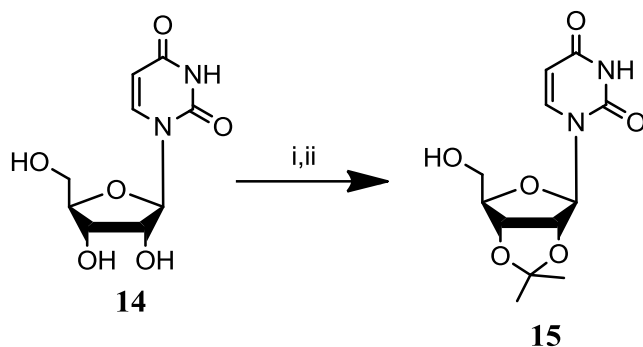
Před samotnou přípravou 5'-fosfátů je potřeba provést ochránění hydroxylových skupin a volného atomu N³. Pro ověření metod a pro ušetření nově nasyntetizovaných derivátů **8** byly reakce odzkoušeny na komerčně dostupném uridinu **14**.

4.2.1. Syntéza 2',3'-O-Isopropylidenuridinu

Prvním krokem byla ochrana hydroxylových skupin v poloze 2' a 3'. Syntéza 2',3'-O-isopropylidenuridinu **15** spočívala v kysele katalyzované tvorbě ketalu (*Schéma 15*). Uridin **14** se smíchal s nadbytkem acetonu, přidalo se katalytické množství monohydrátu kyseliny p-toluensulfonové a míchalo se 48 hodin za pokojové teploty. K neutralizaci byl použit triethylamin a následně byla směs odpařena.²¹

Pro optimalizaci postupu byla tato reakce vyzkoušena za jiných reakčních podmínek (*Schéma 15*). Byla zvýšena teplota reakce na bod varu rozpouštědla a tím byla zkrácena reakční doba ze 48 hodin na pět a půl hodiny, což bylo monitorováno pomocí LC-MS. Látka získaná po odpaření rozpouštědla se nacházela v medovité konzistenci. Pro vyzkoušení odstranění soli byla látka rozmíchána v acetonitrilu, téměř okamžitě se přeměnila na bílý prášek. K rozpuštění došlo po přivedení k varu, částičky soli však nebyly pozorovány, proto po ochlazení byl roztok odpařen. Vzniklý 2',3'-O-isopropylidenuridin **10** byl získán v 99 % výtěžku. Přítomnost soli kyseliny p-toluensulfonové jsme se rozhodli v této fázi neřešit a ušetřit tak jednu čistící operaci.

Schéma 15: Příprava 2',3'-O-isopropylidenuridinu

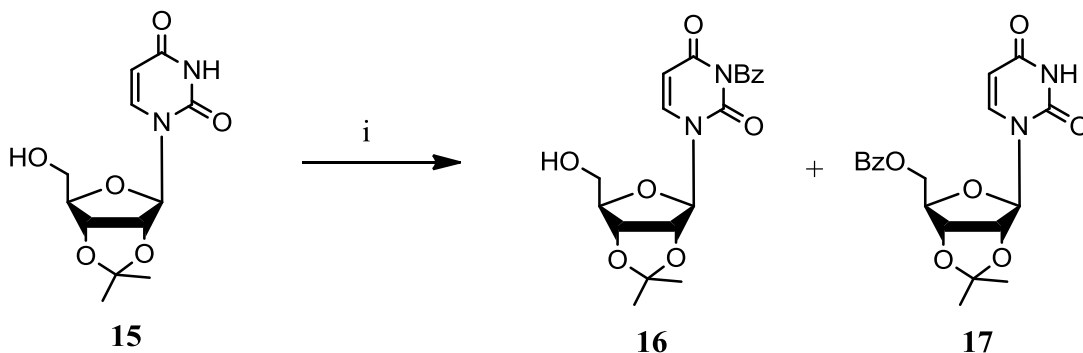


i) aceton, PTSA, a) RT, 48 h; b) reflux, 5,5 h
ii) TEA

4.2.2. Metody chránění N-3 uridinu

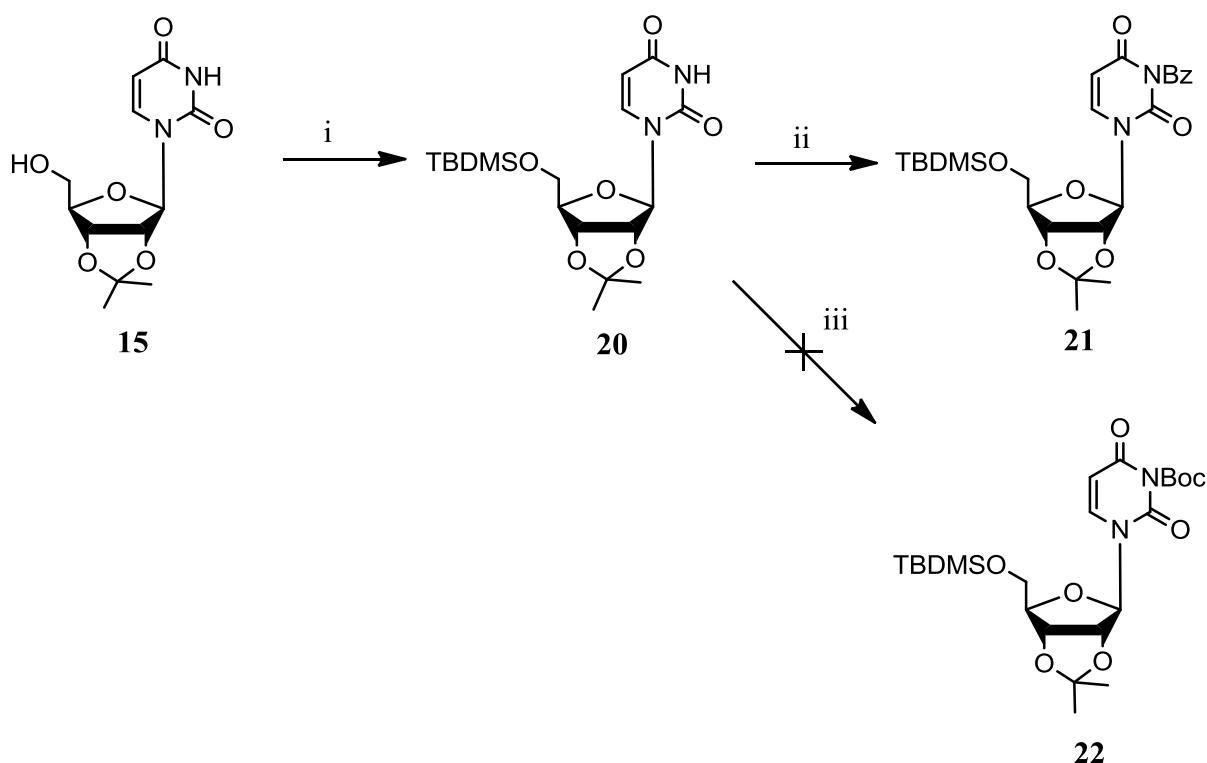
Nejprve byla vyzkoušena reakce 2',3'-O-isopropylidenuridinu **15** s benzoylchloridem v dusíkové atmosféře²² (Schéma 16). Benzoyl se však podle výsledků LC-MS kromě požadovaného N-3 navázal i na volnou hydroxylovou skupinu. Tím se ve směsi na konci reakce nacházely tři látky: N³-benzoyl-2',3'-O-isopropylidenuridinu **16** a 2',3'-O-isopropyliden-5'-benzoyluridin **17** a samotná výchozí látka 2',3'-O-isopropylidenuridinu **15**, jelikož se výchozí komponenty přidávaly pouze v mírném nadbytku. Pro kompletní ochránění se k surové směsi přidalo stejné množství reaktantů jako na počátku reakce a 2',3'-O-isopropylidenuridin **15** byl do dvou hodin zcela spotřebován. Jelikož se však oba benzoylderiváty vyskytovaly v poměru 2:3, je jasné, že bude nutné najít alternativní metodu.

Schéma 16: Benzoylace 2',3'-O-isopropylidenuridinu



i) BzCl, TEA, DCM, RT, 9h

Schéma 18: protekce N-3 s mezistupněm ochrany OH skupiny v poloze 5'



i) TBDMSO, imidazol, DMF, RT, ON ii) a) BzCl, TEA, CH₂Cl₂, RT, 19h; b) BzCl, TEA, CH₂Cl₂, RT, 9 h iii) a) (BOC)₂O, DMAP, MeCN, RT, 5 dní b) DMAP, MeCN, reflux, ON

S tímto derivátem **20** byly vyzkoušeny obě výše zmíněné metody chránění. Obě metody byly provedeny ve stejném poměru reagensů jako v případě volné OH skupiny v poloze 5'. Nejprve byla směs s benzoylchloridem míchána přes noc. Po 19 h směs obsahovala výsledný produkt **21** v poměru 2:3 k neznámé látce, která pomocí LC-MS nebyla identifikována, jelikož nevykazovala ionizaci. Proto byla reakce zopakována a míchána za laboratorní teploty pouze 9 hodin, jako v předchozím experimentu. Po této době však v reakční směsi zůstávala pouze výchozí látka a několik neidentifikovaných nečistot. Reakce chránění s di-*tert*-butyldikarbonátem za daných podmínek neproběhla a to ani při zvýšení teploty, což je důkazem nereaktivity Boc skupiny na dusíku pyrimidinového cyklu (Schéma 18). Z toho vyplývá, že reakce 2',3'-*O*-isopropylidenuridinu **15** s di-*tert*-butyldikarbonátem za katalýzy DMAP vedla ke vzniku derivátu **19** nikoliv N-3 chráněného derivátu **18**.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Metody

Měření NMR spekter bylo provedeno v roztoku DMSO – d₆ na JNM-ECA 500 (500 MHz, JEOL) nebo na přístroji 400MR (400 MHz, Varian) 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. LC preparativní chromatografie byla prováděna s využitím přístroje Sepacor (Buchi), preparativní HPLC byla prováděna s využitím přístroje Agilent 1200 series a preparativní kolony YMC-Pack Pro C18 100x20 mm I.D. s-5µm, 12nm. TLC byla prováděna na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 F254 značky Merc.

5.2. Přípravy

Příprava a následný rozklad 5-methoxymethyl-1-(2',3',5'-tri-O-benzoyl-β-D-ribofuranosyl)pyrimidin-2,4-(1H,3H)-dionu 7a

Methoxymethyluracil **4a** (0,2385 g, 1,53 mmol) byl míchán v hexamethyldisilazanu (10 ml) za přídavku katalytického množství (NH₄)₂SO₄ 5 hodin za teploty 140°C. Roztok byl zahuštěn a rozmíchán v bezvodém 1,2-dichlorethanu (20 ml). K tomuto roztoku byl přidán 1-O-acetyl-2',3',5'-tri-O-benzoyl-β-D-ribofuranosa (0,8477 g, 1,68 mmol) a trimethylsilyltrifluoromethanesulfonát (0,415 ml, 2,29 mmol). Mícháno 24 hodin za laboratorní teploty. Následně byl roztok rozmíchán ve vodě (20 ml), extrahována do ethylacetátu (3 × 60 ml) a vysušena bezvodým síranem sodným. Roztok byl zfiltrován a odpařen do sucha. Produkt stál 1 měsíc za laboratorní teploty za přístupu vzduchu. Následná směs byla rozdělena pomocí preparativní HPLC. Izolovány byly 4 podíly.

1. podíl s Rt=2.11 (5-hydroxymethy-1-(2',3',5'-tri-O-benzoyl-β-D-ribofuranosyl)-pyrimidin-2,4-(1H,3H)-dion 9):

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) 4.09 (m, 2H); 4.63 (m, 2H); 4.72 (q, *J*=5.6 Hz, 1H); 4.98 (t, *J*=4.8 Hz, 1H); 5.88 (m, 2H); 6.20 (d, *J*=4.3 Hz, 1H); 7.41 (m, 4H); 7.47 (t, *J*=7.73 Hz, 2H); 7.64 (m, 3H); 7.69 (s, 1H); 7.84 (d, *J*=6.87 Hz, 2H); 7.87 (d, *J*=7.45 Hz, 2H); 7.98 (d, *J*=7.45 Hz, 2H); 11.31 (br. s., 1H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) 56.38; 64.23; 71.04; 73.65; 79.24; 89.99; 115.35; 129.00; 129.11; 129.27; 129.29; 129.30; 129.72; 129.82; 129.86; 129.88; 134.07; 134.38; 134.47; 138.73; 150.78; 163.18; 165.15; 165.20; 166.06.

MS *m/z* pro C₃₁H₂₆N₂O₁₀: 586,55, nalezeno 585,11 [M-1].

2. podíl s Rt=2.89:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) 4.68 (m, 4H); 4.89 (m, 2H); 5.96 (m, 2H); 6.21 (d, *J*=3.5 Hz, 1H); 7.46 (m, 6H); 7.62 (m, 3H); 7.88 (m, 4H); 7.98 (m, 2H); 8.11 (s, 1H); 8.49 (br s., 1H).

MS *m/z* nalezeno 689,2 [M-1]

3. podíl s Rt=3.08:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) 3.99 (m, 2H) 4.59 (m, 1H); 4.71 (m, 2H); 5.93 (m, 2H); 6.17 (m, 1H); 7.43 (m, 6H); 7.62 (m, 3H); 7.86 (m, 5H); 7.95 (m, 2 H).

4. podíl s Rt=3.21:

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) 4.53 (m, 2H); 4.56 (dd, *J*=12.3, 4.5 Hz, 1H); 4.63 (dd, *J*=44.8, 4.5 Hz, 1H); 4.67 (q, *J*=5.3 Hz, 1H); 5.94 (m, 2H); 6.08 (d, *J*=3.2 Hz, 1H); 7.38 (m, 4H); 7.43 (t, *J*=8.6 Hz, 2H); 7.58 (m, 3H); 7.60 (m, 1 H); 7.81 (dd, *J*=8.6, 1.2 Hz, 2H); 7.83 (dd, *J*=8.6, 1.2 Hz, 2H); 7.95 (dd, *J*=8.6, 1.2 Hz, 2H); 11.49 (br s., 1H).

5-methoxymethyluridin 8a

K 5-methoxymethyl-1-(2',3',5'-tri-O-benzoyl-β-D-ribofuranosyl)pyrimidin-2,4-(1H,3H)-dionu **7a** (0,0872 g, 145,2 mmol) byl přidán roztok NaH (0,024 g, 1 mmol) v 1 ml methanolu. Směs byla míchána 30 minut za laboratorní teploty. Následně byl roztok odpařen, odparek rozpuštěn v 1,5ml acetonitrilu a roztok zfiltrován. Po odpaření byl odparek

lyofilizován. Bílý prášek byl přečištěn na chromatografické koloně a následně na preparativní TLC s použitím mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HCOOH}$ (45:10:0,625). Po odbourání byl izolován bílý prášek ve výtěžku 0,037 g (88 %).

MS m/z pro $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_7$: 288,2, nalezeno 287,3 [M-1].

2',3'-O-isopropylidenuridin 15

Uridin **9** (1,0 g, 4,095 mmol) byl rozmíchán v 30 ml acetonu, následně bylo přidáno katalytické množství PTSA. H_2O (0,080 g, 0,1 ekv). Výsledná směs byla refluxována po dobu 5,5 hodiny. Následně bylo přidáno 5 kapek triethylaminu a roztok byl odpařen. Odparek byl promíchán v 22 ml acetonitrilu, po zahřátí zfiltrován. Filtrát odpařen a lyofilizován. Vznikl bílý prášek ve výtěžku 1,16 g (99 %).

^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) 1,25 (s, 3H); 1,45 (s, 3H); 3,52-3,56 (m, 2H); 4,03 (dd, $J=4$ Hz, 1H); 4,71 (dd, $J=6.3, 3.4$ Hz, 1H); 4,86 (dd, $J=6.3, 2.3$ Hz, 1H); 5,04 (t, 1H); 5,6 (dd, $J=8, 1.7$ Hz, 1H); 5,8 (d, $J=2.8$ Hz, 1H); 7,75 (d, $J=8$ Hz, 1H), 11,33 (s, 1H). MS m/z pro $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$: 284,27, nalezeno 282,93 [M-1].

5'-O-(tert-butyldimethylsilyl)-2',3'-O-isopropylidenuridin 20

2',3'-O-isopropylidenuridinu **10** (200 mg, 0,704 mmol) bylo smícháno s TBDMSCl (0,1114 g, 1,05 ekv) a s imidazolem (0,0954 g, 2 ekv) ve 2 ml DMF. Směs byla míchána za RT přes noc. Následně bylo přidáno 2,5 ml ledové vody. Vzniklá sraženina byla zfiltrována a vysušena lyofilizací. Izolován byl bílý prášek ve výtěžku 202 mg (72 %).

^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) 0,01 (s, 6H); 0,83 (s, 9H); 1,25 (s, 3H); 1,45 (s, 3H); 3,71 (dd, $J=11.7, 5.2$ Hz, 1H); 3,76 (dd, $J=11.7, 4.7$ Hz, 1H); 4,08 (q, 1H), 4,68 (dd, $J=6.5, 3.8$ Hz, 1H), 4,88 (dd, $J=7.2, 2.1$ Hz, 1H); 5,55 (dd, $J=8.1, 1.3$ Hz, 1H), 5,76 (d, $J=2.5$ Hz, 1H); 7,67 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 11,35 (bs, 1H). MS m/z pro $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}$: 398,53, nalezeno 397,09 [M-1].

6. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na syntézu 5-alkoxymethyl derivátů uridinu a následnou syntézu 5'-fosfátů.

První část předkládala poznatky z literatury. Byly v ní shrnuty jednotlivé přehledy významných 5-substituovaných derivátů uridinu a 5-substituovaných uridin-5'-fosfátů. Ke každé skupině látek byly uvedeny základní metody syntézy.

Experimentální část popisovala jednotlivé kroky vedoucí k přípravě 5-alkoxymethyluridinů. Syntetická cesta vycházela z uracilu **1**, který byl popsány reakcemi převeden na 5-alkoxymethyluracily. Připraveny byly 5-methoxymethyluracil **4a**, 5-propoxymethyluracil **4b**, 5-pentoxymethyluracil **4c** a 5-heptoxymethyluracil **4d**. Tyto deriváty byly převedeny na příslušné tribenzoylované uridiny **7**. Na vzorovém 5-methoxymethyluracilu byly vyzkoušeny reakce k optimalizaci množství hexamethyldisilazanu potřebného k silylaci, která nutně předchází ribosylaci. Bylo zjištěno, že další optimalizace není možná a že je tudíž nutno dodržet poměr 24 mg výchozí nukleobáze **4a** na 1 ml hexamethyldisilazanu. Konečným krokem bylo odbourání benzoylových chránících skupin. Vyzkoušeny byly dvě metody. První z nich, reakce s amoniakálním roztokem ethanolu, se ukázala jako velmi neefektivní. Reakční doba byla příliš dlouhá, po jednom týdnu nebyl výchozí derivát plně odbourán. Druhá metoda spočívala v reakci s 1M methoxidem sodným. Jednalo se o účinnější metodu, kdy byl reakční čas zkrácen na 1h.

Během této syntézy byl objeven problém s nestabilitou tribenzoylovaného 5-methoxymethyluridinu **7a**. Po jednom měsíci se látka zcela rozložila. Z výsledné směsi byly izolovány 4 látky kapalinovou chromatografií. Kvůli malému množství vzorku se pomocí NMR a COSY experimentu podařilo jednoznačně identifikovat pouze první z nich, jednalo se o tribenzoylovaný 5-hydroxymethyluridin **9**.

Následně se experimentální část věnovala ověření a optimalizování chránících metod, které jsou nutné před samotnou syntézou 5'-fosfátů. Z důvodu ušetření nově nasyntetizovaných derivátů **8** byly tyto metody ověřeny na komerčně dostupné uridinu **14**. Nejprve byly ochráněny 2' a 3' hydroxylové skupiny reakcí s acetonem. Reakce byla optimalizována zvýšením teploty z laboratorní na teplotu varu acetonu, tím se zkrátila reakční doba ze dvou dnů na 5,5 hodiny. Reakce proběhla kvantitativně a čistě. Dalším krokem bylo ochránění N-3 dusíku. To se však ukázalo jako neefektivní. Nejprve byla vyzkoušena reakce s benzoylchloridem. V tomto případě se však benzoyl navázal kromě požadovaného N-3

na volnou 5'-hydroxy skupinu. Poté byla vyzkoušena reakce s di-*tert*-butyldikarbonátem. Reakce proběhla jen na jednom místě, jak se však později ukázalo, ochráněna byla pouze 5'-hydroxy skupina. K zajištění ochrany N-3, byla 5'-hydroxy skupina záměrně ochráněna *tert*-butyldimethylsilylchloridem. Reakce proběhla čistě a kvantitativně. S tímto derivátem **20** byly provedeny obě výše zmíněné reakce. Reakce s benzoylchloridem vedla k ochráněnému produktu **21**. Do budoucna však bude potřeba optimalizovat reakční dobu. Reakce s di-*tert*-butyldikarbonátem však za daných podmínek úspěšná nebyla. Samotná příprava 5'-fosfátů bude předmětem dalšího studia těchto látek.

7. LITERATURA

1. Holý, Antonín. *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, **2004**. ISBN 80-244-0855-4.
2. Kore, A. R. a Shanmugasundaram, M. Highly stereoselective palladium-catalyzed Heck coupling of 5-iodouridine-5'-triphosphates with allylamine: a new efficient method for the synthesis of (E)-5-aminoallyl-uridine-5'-triphosphates. *Tetrahedron Letters*. **2012**, 53, 2530-2532.
3. Ozaki, S. et al. 5-Fluorouracil Derivatives. XVII. Synthesis and Antitumor Activity of 5'-O-Acyl-5-fluoridines. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37 (12), 3405-3408.
4. Vorbrüggen, H. a Ruh-Pohlenz, C. *Handbook of Nucleoside Synthesis*. John Wiley & Sons, Inc., **2001**. ISBN 0-471-09383-1.
5. Hesse, R. H. et al. Convenient synthesis of 5-fluorouracil. *J. Org. Chem.* **1972**, 37 (2), 329-330.
6. Saneyoshi, M et al. Synthetic nucleosides and nucleotides. XI. Facile synthesis and antitumor activities of various 5-fluoropyrimidine nucleosides. *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, 26 (10), 2990-2997.
7. Jiang, X. et al. Nucleoside adducts of vinylporphyrins and vinylchlorins. *J. Chem. Soc.* **1996**, Perkin Trans. 1, 1607-1615.
8. Bergstrom, D. E. a Ogawa, M. K. C-5 Substituted Pyrimidine Nucleosides. 2. Synthesis via Olefin Coupling to Organopalladium Intermediates Derived from Uridine and 2'-Deoxyuridine. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 20, 8106-8112.
9. De Clercq, E. et al. Synthesis and Antiviral Activity of (E)-5-(2-Bromovinyl)uracil and (E)-5-(2-Bromovinyl) uridine. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 213-217.
10. Shoichiro, O., Yoshimasa, I. a Haruki, M. *Anticancer drugs*. JP 53029937 Japan, 20. Mar **1978**.
11. Ilowite, R. K. *Methods of treating subclinical sun damage*. US 2011/0301115 A1 United States, 8. Dec. **2011**.
12. Boehm, R et al. *Use of fosfluridine tidoxil (FT) for the treatment of intraepithelial proliferative diseases*. US7378401 (B2) USA, 27. May **2008**.

13. Meza-Avina, M. E. et al. Structural determinants for the inhibitory ligands of orotidine-5'-monophosphate decarboxylase. *Bioorg.Med.Chem.* **2010**, 18, 4032-4041.
14. Gagnon, K. et al. A role for hydrophobicity in a Diels–Alder reaction catalyzed by pyridyl-modified RNA. *Nucleic Acids Research.* **2009**, 37 (9), 3074-3082.
15. Yoshikawa, M. et al. Studies of Phosphorylation. III. Selective Phosphorylation of Unprotected Nucleosides. *Bulletin of the Chemical Society of Japan.* **1969**, 42, 3505-3508.
16. Ahmadibeni, Y. a Parang, K. Solid-Phase Reagents for Selective Monophosphorylation of Carbohydrates and Nucleosides. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1100-1103.
17. El-Tayeb, A. et al. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Uracil Nucleotide Derivatives and Analogues as Agonists at Human P2Y2, P2Y4, and P2Y6 Receptors. *J. Med. Chem.* **2006**, 46, 7076-7087.
18. Chiacchio, U. et al. Isoxazolidine analogues of pseudouridine:. *Tetrahedron.* **2003**, 59, 4733-4738.
19. Giner-Sorolla, A. et al. Synthesis and Properties of 5-Mercaptomethyluracil and Related Derivatives. *J. Med. Chem.* **1966**, 9, 97-101.
20. Brulíková, L. et al. Synthesis of various 5-alkoxymethyluracil analogues and structure–cytotoxic activity relationship study. *Carbohydrate Research.* **2011**, 346, 2136-2144.
21. Jordão, C.I.C. et al. Synthesis of [60]fullerene-glycopyranosylaminopyrimidin-4-one conjugates. *Tetrahedron.* **2008**, 64, 4427-4437.
22. Maguire, A. R. et al. New methods for the synthesis of N-benzoylated uridine and thymidine derivatives; a convenient method for N-debenzoylation. *Carbohydrate Research.* **2002**, 337, 369-372.
23. Jaime-Figueroa, S. et al. N-3-Alkylation of Uracil and Derivatives Via N-1-Boc Protection. *Synthetic Communications.* **2001**, 31 (24), 3739-3746.
24. Debarge, S. et al. Design and Synthesis of α -Carboxy Phosphononucleosides. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 105-126.