

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie

Ústav molekulární a translační medicíny



**Studium katalyzovaných a nekatalyzovaných
click reakcí u vybraných 5'-azidonukleosidů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Ivana Spurná

Studijní obor:

Bioorganická chemie N1407

Vedoucí diplomové práce:

Doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

Olomouc 2014

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením Doc. RNDr. Jana Hlaváče, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci dne 18. 5. 2014

.....
Ivana Spurná

Chtěla bych tímto upřímně poděkovat především doc. Janu Hlaváčovi, Ph.D. za obětavou pomoc, trpělivost, neutuchající motivaci a důvěru, cenné připomínky a rady při řešení a zpracování dané problematiky.

Ráda bych také poděkovala všem pracovníkům Katedry organické chemie PřF UP a ÚMTM za ochotu a pomoc při řešení této práce. Také bych chtěla poděkovat panu doktoru Motykovi za pomoc při měření fluorescence a UV-VIS spekter. A v neposlední řadě mé rodině za trpělivost a podporu.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Ivana Spurná

Název práce: Studium katalyzovaných a nekatalyzovaných click reakcí u vybraných 5'-azidonukleosidů.

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny UP v Olomouci

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

Rok obhajoby: 2014

Abstrakt:

Tato diplomová práce se zabývá studiem katalyzovaných a nekatalyzovaných click reakcí u vybraných 5'-azidonukleosidů. Práce je členěna na teoretickou a praktickou část.

Teoretická část je věnována známým přípravám triazolů nukleosidů pomocí katalyzovaných i nekatalyzovaných click reakcí. Dále pak jsou popsány biologické účinky triazol nukleosidů, které byly převážně studovány pro jejich antivirovou aktivitu.

Praktická část byla zaměřena na přípravu triazol uridinů a triazol adenosinů v poloze 5'. Katalyzovanou i nekatalyzovanou click chemií byly úspěšně připraveny příslušné deriváty triazol uridinu s ochráněnými hydroxylovými skupinami v poloze 2' a 3', nicméně se vyskytly problémy s odstraňováním chránících skupin. Derivát triazol adenosinu byl připraven pouze pomocí nekatalyzované click chemie. Tomuto kroku předcházela dlouhá cesta k přípravě azido derivátu.

Klíčová slova: Click reakce, triazoly, nukleosidy.

Počet stran: 68

Počet příloh: 0

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Ivana Spurná

Title: Study of catalyzed and non-catalyzed click reactions of selected 5'-azidonucleosides.

Type of thesis: Diploma

Department: Institute of molecular and translational medicine,
Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Advisor: Doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

The year of presentation: 2014

Abstract:

This diploma thesis deals with the study catalyzed and non-catalyzed click reactions of selected 5'-azido nucleosides. The thesis is divided into theoretical and practical parts.

The theoretical part is devoted to preparations know triazole nucleosides using catalyzed and non-catalyzed click reactions. Furthermore, the biological effects of triazole nucleosides are described, which were mainly studied for their antiviral activity. The practical part focused on preparation of triazole uridines and triazole adenosine 5'-position. Catalyzed and uncatalyzed click chemistry have been successfully prepared by the appropriate triazole derivatives of uridine with protected hydroxyl groups in position 2' and 3', but there were problem with the removal of the protecting groups. Triazole derivatives of adenosine was prepared using only non-catalyzed click chemistry. This step was preceded by a long way to prepare the azido derivative.

Keywords: Click reactions, triazoles, nucleosides.

Number of pages: 68

Number of appendixes: 0

Language: Czech

OBSAH

1. ÚVOD	11
2. CÍL PRÁCE	13
3. TEORETICKÁ ČÁST	14
3.1 Katalyzované click reakce.....	14
3.1.1. Tvorba triazol derivátů pyrimidinových bazí a jejich biologická aktivita	15
3.1.2 Tvorba triazolových derivátů purinových bazí	23
3.1.2.1 Příprava azidoderivátů purinových bazí.....	23
3.1.2.2 Příprava a biologická aktivita triazol derivátů purinových bazí.....	26
3.2 Nekatalyzované click reakce.....	29
3.2.1. Příprava cyklooktynů	30
3.2.1.1. Příprava difluorovaných cyklooktynů	30
3.2.1.2 Příprava dalších cyklooktynů	33
3.2.2 Biologická aktivita sloučenin připravených nekatalyzovanou click chemií	35
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	39
4.1 Katalyzované click reakce.....	39
4.1.1. Příprava a studium 5'-triazol-1-yl-uridinu	39
4.1.1.1. Příprava z 5'-azido-2',3'-O-isopropylidenuridinu	39
4.1.1.2. Příprava z 5'-azidouridinu.....	42
4.1.1.3. Fluorescence, logP, UV-VIS a pK derivátů 5'-triazol-1-yl-uridinu.....	43
4.1.2. Příprava a studium 5'-triazol-1-yl-adenosinu	47
4.1.2.1. Příprava z 5'-azido-2',3'-O-isopropylidenadenosinu.....	47
4.1.2.2. Příprava z adenosinu	50
4.1.2.3. Příprava 2',3'-isopropyliden-5'-azidoadenosinu.....	50
4.1.2.4. Příprava derivátů 2',3'-isopropyliden-5'-(1,2,3-triazol-1-yl)adenosinu.....	51

4.2	Nekatalyzované click reakce.....	52
4.2.1.	Příprava selendiazol cyklooktynu	52
4.2.2	Příprava triazol derivátů.....	52
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	57
5.1.	Metody	57
5.2.	Příprava vzorků a měření fluorescence	57
5.3.	Postup přípravy roztoků pro zjištění logP	57
5.4.	Postup přípravy vzorků pro změření UV-VIS spekter	58
5.5.	Postup odběru a analýzy při mikrovlnném záření	58
5.6.	Přípravy	58
6.	ZÁVĚR	64
7.	LITERATURA	66

Seznam zkratek

BaPanK	panthothenát kináza typ-III z <i>Bacillus anthracis</i>
BARAC	biaryl-aza-cyklooktynon
BCN	bicyklononan
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butylbikarbonát
BODIPY	„boro-dipyrromethene“ (4,4-difluoro-4-boro-3a,4a-diaza-s-indacen)
BPL	biotin protein ligáza
BSA	N,O-bis(trimetylsilyl)acetamid
CMV	cytomegalovirus
DBCO	dibenzocyklooktyn
DBU	1,8-diazabicykloundec-7-en
DEAD	dietyl azodikarboxylát
DIAD	diisopropyl azodikarboxylát
DIBO	dibenzocyklooktyn
DIFBO	difluorobenzocyklooktyn
DIFN	difluorcyklononyn
DIFO	difluorcyklooktyn
DMAP	4-N,N-dimethylaminopyridin
DMF	N,N-dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPA	difenylfosforyl azid
HBV	virus Hepatitis B
HCV	virus Hepatitis C

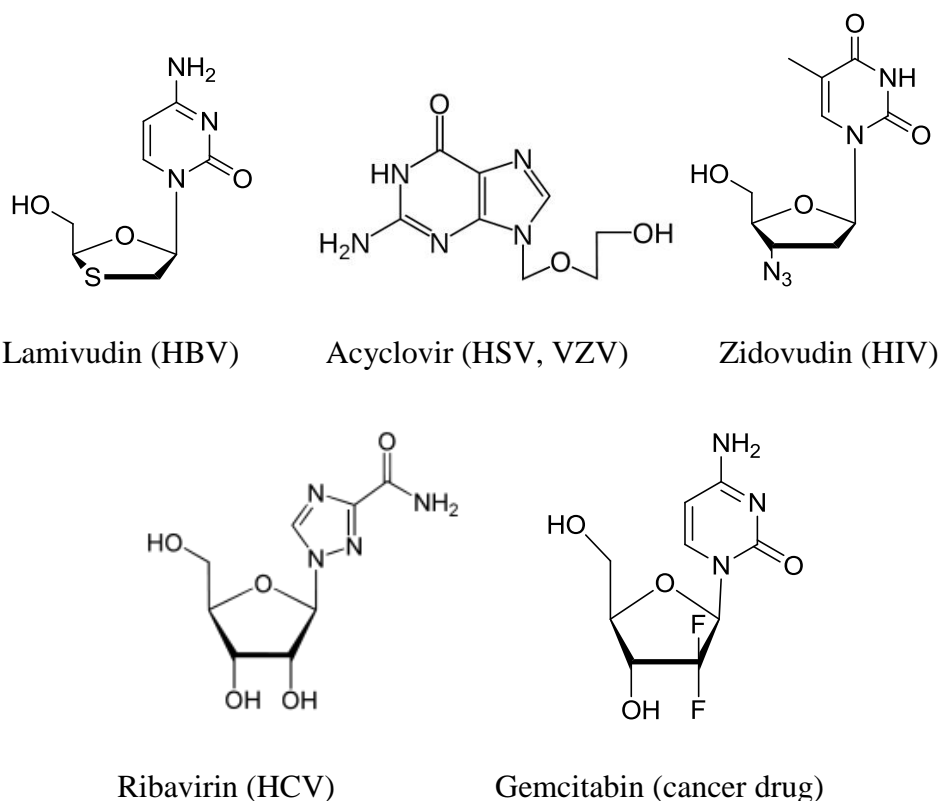
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSV	Herpes simplex virus
KHMDS	hexamethyldisilazan draselný
LCMS	kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
LDA	lithium diisopropyl amid
LHMDS	lithium bis(trimethylsilyl)amid
<i>m</i> -CPBA	<i>meta</i> -chloroperoxybenzová kyselina
MW	mikrovlnné záření
NMP	N-methylpyrrolidon
NMR	nukleární magnetická resonance
NTP	nukleosid trifosfát
OCT	cyklooktyn
ON	over night (přes noc)
PEG	polyethylenglykol
PET	positron emisní tomografie
PNA	peptid nucleic acid (peptid nukleová kyselina)
<i>p</i> -TSA	<i>para</i> -toluensulfonová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
RT	pokožová teplota (room temperature)
SaBPL	Staphylococcus aureus biotin protein ligáza
SAH	S-adenosyl-L-homocystein hydroláza
SPAAC	strain-promoted alkyne-azide cycloaddition (alkyn-azidová cykloadice podněcována pnutím)
STN	sugar-triazole-nucleoside (cukr-triazol-nukleosid)

TBAF	tetramethyl amonium fluorid
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl éter
TESCI	chlortriethylsilan
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TLC	kapalinová chromatografie na tenké vrstvě
TMDIBO	tetramethoxy dibenzocyklooktyn
TMSCHN ₂	trimethylsilyl diazomethan
TMSOTf	trimethylsilylester trifluoromethan sulfonové kyseliny
UAA	nepřirodní aminokyselina (unnatural amino-acid)
UDP	uridin difosfát
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná spektroskopie
VZV	Varicella zoster virus

1. ÚVOD

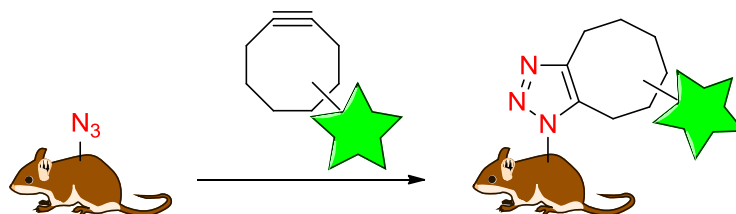
Studiem modifikovaných složek nukleových kyselin se zabývali, a zabývá, nespočet vědců, ale i přesto je toto téma stále aktuální a zatím se zdá být nevyčerpatelné pro výzkum biologicky aktivních látek, jako jsou zejména antivirotika a protinádorová léčiva. Jak je známo, modifikace, které vedou k požadované biologické aktivitě, mohou probíhat jak na bázi, tak na cukerné složce nukleové kyseliny.

Příkladem nukleosidového antivirotika je Acyclovir. Jeho primární použití je proti herpes simplex viru (HSV), a dále pak proti viru varicella zoster (VZV) a herpes zoster. Mnoho dalších nukleosidových analog bylo vyvinuto proti viru hepatitidy B (HBV), viru hepatitidy C (HCV), cytomegaloviru (CMV), pro léčbu HIV a různých nádorových onemocnění.



Obr. 1 Nukleosidové antivirotika a protinádorové léčivo

Kromě terapeutického použití mají nukleosidová analoga velký význam v oblasti diagnostiky. Značením biomolekul lze např. studovat expresi proteinů v jednotlivých částech buňky. Ačkoliv je známa celá řada způsobů značení biomolekul, jsou hledány stále nové, šetrnější, rychlejší či selektivnější přístupy k jejich vizualizaci. Jednou ze studovaných technik je značení pomocí tzv. Cu-free “click“ chemie. Copper-free click chemie je mírná, rychlá a selektivní technologie pro konjugaci oligonukleotidů bez nutnosti používání toxických měďných iontů. Vývoj této techniky se demonstruje na kultivovaných buňkách nebo živých organismech, jako je např. zebrafish, myš či *Caenorhabditis elegans*.^{1,2}

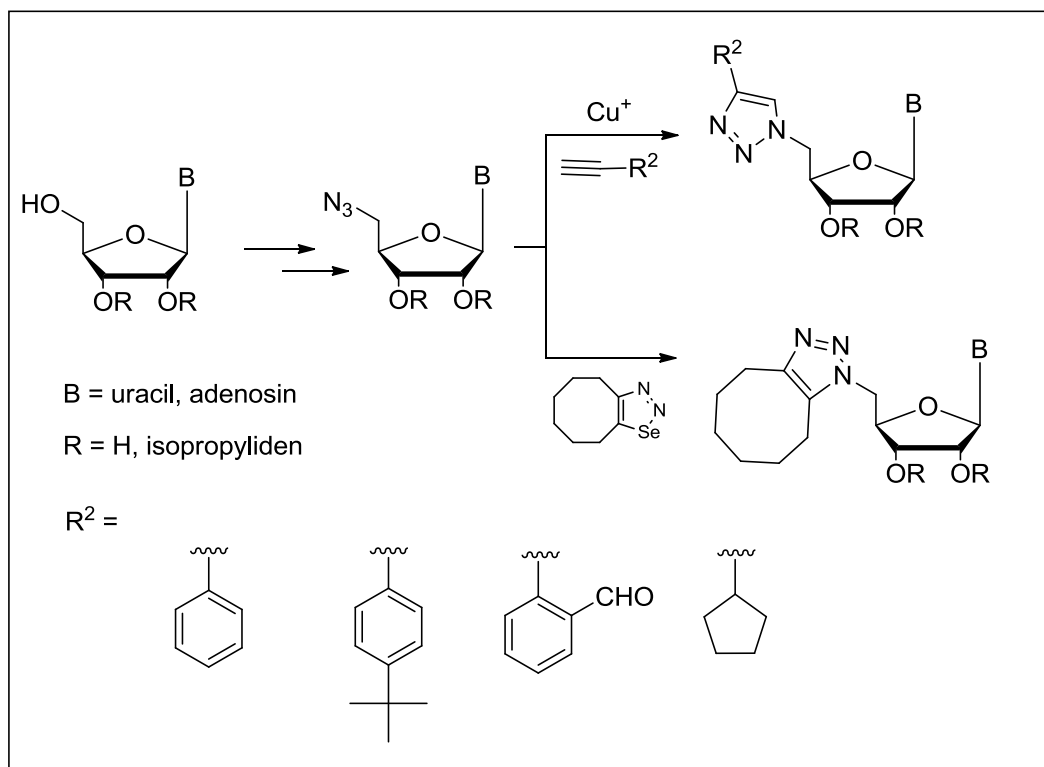


Obr. 2 Značení živých organismů pomocí Cu-free click chemie

V předložené diplomové práci se věnujeme modifikacím na cukerné složce, kde je studována konverze 5'-azidonukleosidů na příslušný 5'-triazolový derivát pomocí katalyzovaných a nekatalyzovaných click reakcí.

2. CÍL PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce je studie katalyzovaných a nekatalyzovaných click reakcí na 5'-azidouridinu, 5'-azido-2',3'-isopropylidenuridinu a 5'-azido-2',3'-isopropylidenadenosinu za vzniku příslušných triazolů (Obr. 3).



Obr. 3 Navržená syntéza triazolových derivátů

Díličními cíli práce jsou:

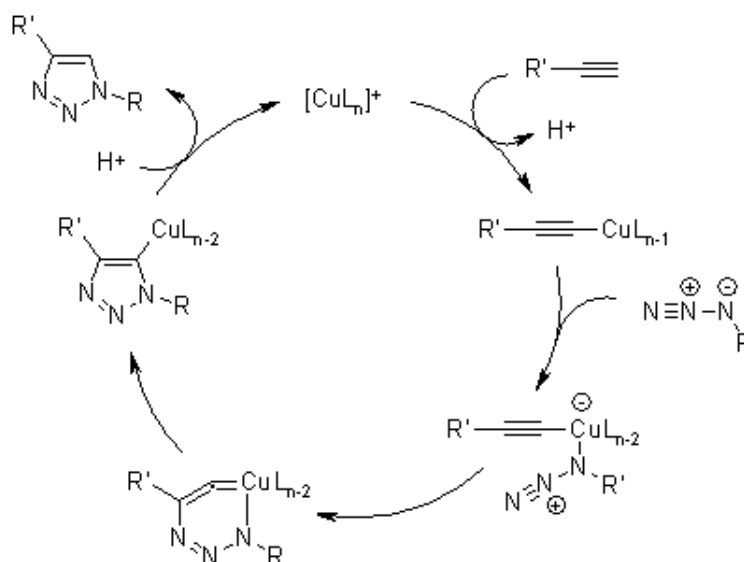
- Provéřit známou syntézu 5'-azidonukleosidů odvozených od adenosinu a uridinu
- Provéřit reaktivitu připravených 5'-azidonukleosidů za podmínek katalyzované click reakce s vybranými alkynty (Obr. 3)
- Provéřit reaktivitu připravených 5'-azidonukleosidů za podmínek nekatalyzované click reakce s cyklooktaselendiazolem. (Obr. 3)

3. TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na sumarizaci poznatků z literatury a je složena ze dvou podkapitol. První podkapitola se zabývá přípravou a biologickou aktivitou triazol nukleosidů pomocí katalyzovaných click reakcí a druhá podkapitola přípravou a biologickou aktivitou 5'-triazol nukleosidů pomocí nekatalyzovaných click reakcí.

3.1 Katalyzované click reakce

Jako první se "click" reakcemi začal zabývat americký chemik Sharpless^{3,4,5}. Click reakce se vyznačují především svou stereospecifitou, vysokou chemickou výtěžností, vysokou rychlostí reakce – bez vzniku vedlejších produktů a širokospektrým použitím nejrůznějších ligandů. Dále platí pravidla – reakce probíhá ve snadno odstranitelných rozpouštědlech, chemikálie, materiál a činidla jsou snadno dostupná, produkt reakce je jednoduše izolovatelný a jeho čištění nevyžaduje složitějších technik, např. chromatografie. Mezi takovéto reakce patří např. tvorba triazolů z azidů a terminálních alkyňů.⁶ Tyto reakce mohou být katalyzovány pomocí měďných solí. Měďný kation tvoří komplex s příslušným alkyňem, který dále reaguje s azidem za vzniku triazolového skeletu.⁷ (Obr.4)

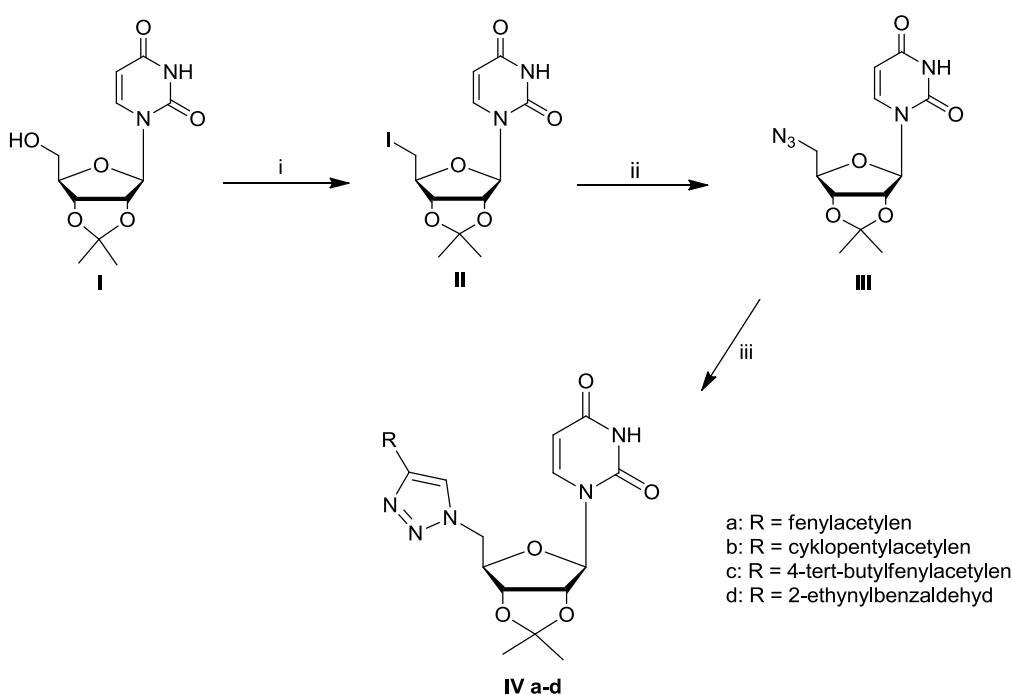


Obr. 4 Mechanismus Cu (I) click reakce

3. 1. 1. Tvorba triazol derivátů pyrimidinových bazí a jejich biologická aktivita

Příprava triazol derivátů byla již dříve zkoumána během mého bakalářského studia. Byly připraveny triazol deriváty uridinu jako prekurzory pro nepravé oligonukleotidy spojené triazolovým můstkem. Vycházelo se z komerčně dostupného 2,3'-isopropylidenuridinu **I**, který reagoval s jodem. Vzniklý jodderivát **II** dále reaguje s azidem sodným za vzniku 5'-azidouridinu **III**. Tento 5'-azidoderivát byl dále využit pro přípravu triazol derivátu pomocí click reakcí s příslušnými alkyny za katalýzy měďných iontů generovaných ze síranu měďnatého v přítomnosti askorbátu sodného. Takto byly připraveny čtyři deriváty (fenylnetriazol derivát, cyklopentyltriazol derivát, 4-*tert*-butylfenylnetriazol derivát a benzaldehydtriazol derivát) **IVa-d** ve výtěžku 33–46 % (Schéma 1).⁸

Schéma 1: Příprava 5'-triazol derivátů isopropylidenuridinu

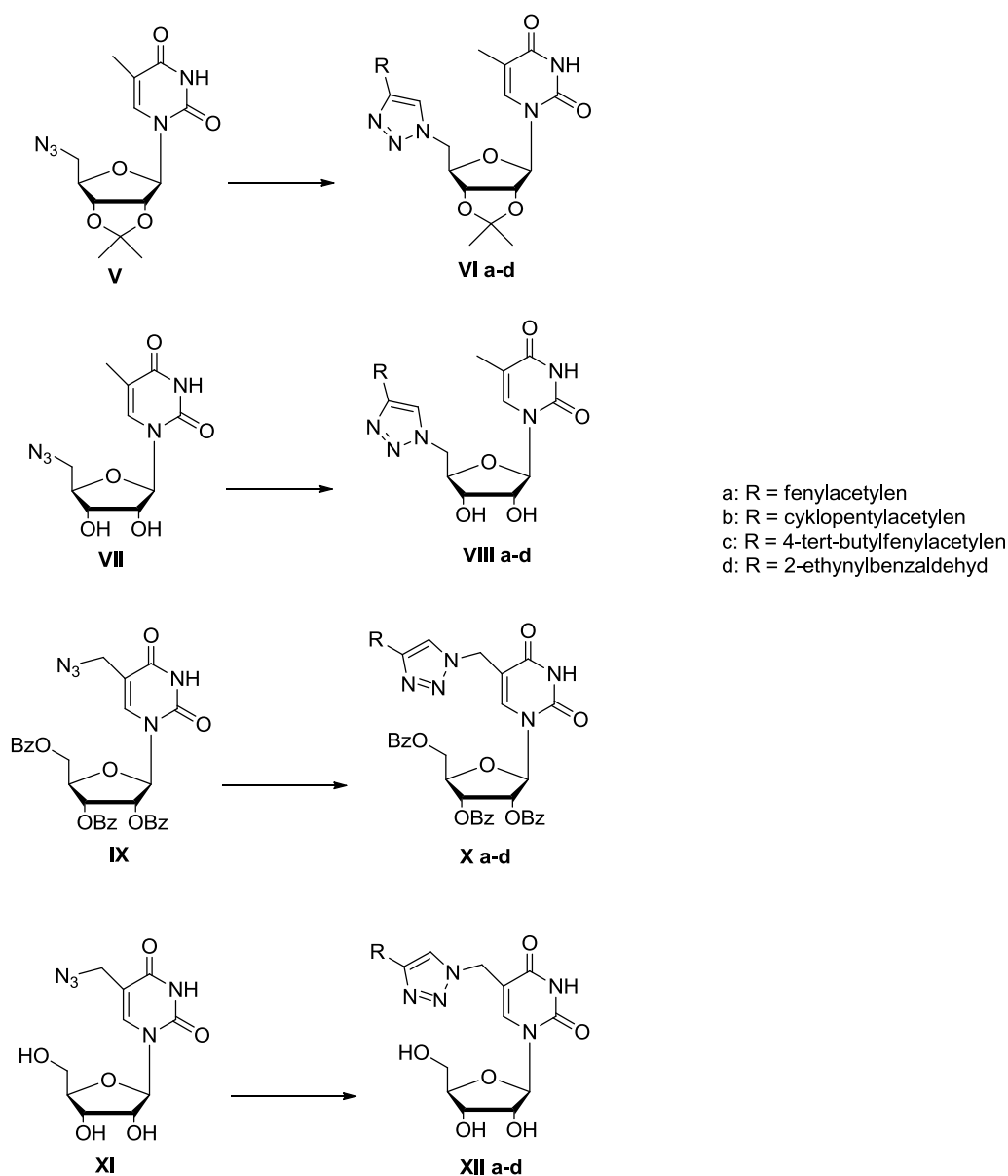


(i) PPh_3 , imidazol, I_2 , THF, RT, 1 hod; (ii) NaN_3 , DMF, 90°C , 24 hod; (iii) Askorbát sodný, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, isopropanol/voda 1:1, 40°C , 2 hod

V další práci byly popsány click reakce na derivátu 5-methyluridinu **V**.⁹ Vycházelo se z příslušných 5'-azidů připravených z iod nebo chlorderivátů. Azidy byly

připraveny reakcí azidu sodného v DMF při 90°C. Následně byly takto připravené azidy použity pro syntézu 5'-triazolových derivátů **Vla-d**, **VIIIa-d**, **Xa-d**, **XIIa-d**. Za katalýzy modré skalice, askorbátu sodného a přidavkem daného alkyne při 45°C byly připraveny tyto triazoly v 22–90 % výtěžku (Schéma 2).

Schéma 2: Příprava triazol derivátů 5-methyluridinu

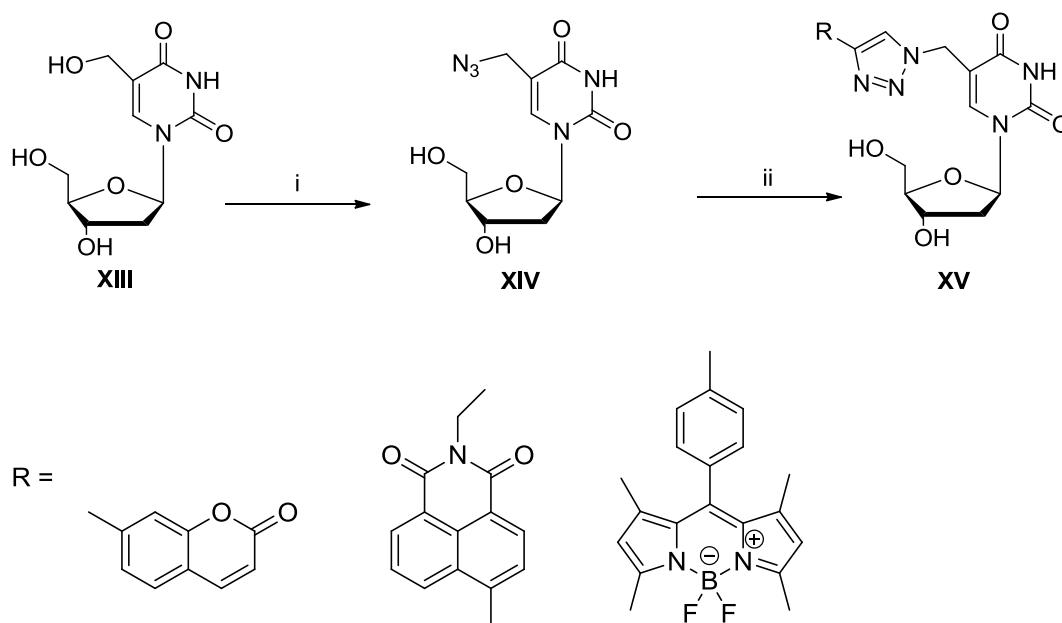


(i) CuSO_4 , askorbát sodný, isopropanol/voda 1:1, 45°C

Přípravou 5-azidometyl-2'-deoxyuridinu **XIV** jednokrokovou syntézou z 5-hydroxymetyl-2'-deoxyuridinu **XIII** a jeho detekcí pomocí click reakcí se zabývali

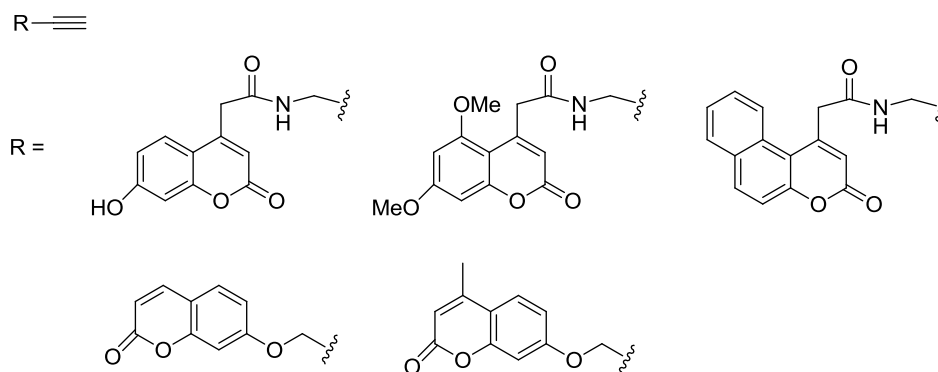
Xu a kol.¹⁰ 5-Hydroxymethyl-2'-deoxyuridin **XIII** byl rozpuštěn v TFA a následně byl pomalu přidáván azid sodný. Azidometyl-2'-deoxyuridin **XIV** byl takto připraven v 85 % výtěžku. Tento azid byl následně využit pro přípravu značeného triazolu **XV**. Jako fluorofor R byly vybrány 7-acetylen kumarin, BODIPY a anhydrid kyseliny naftalové (Schéma 3). Výtěžek click reakce činil 85 %.

Schéma 3: Příprava triazol derivátů 5-methyldeoxyuridinu



(i) TFA, NaN₃, RT; (ii) CuSO₄, askorbát sodný, RT

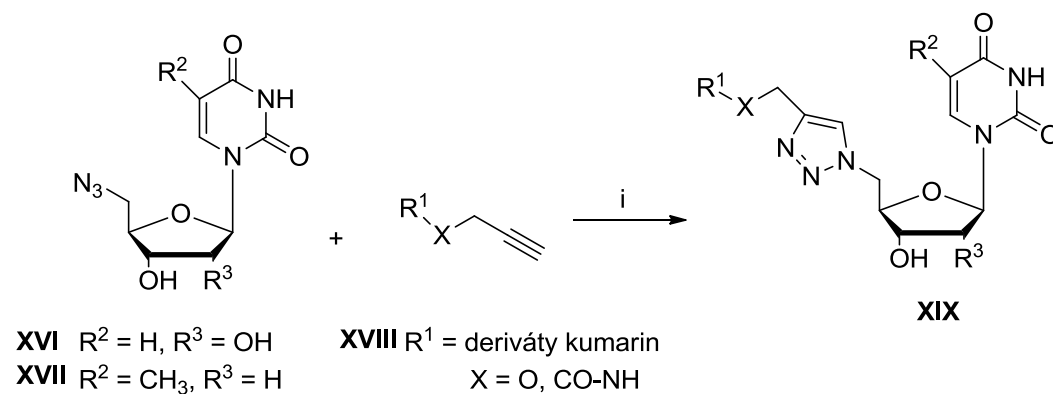
Velmi podobnou práci publikovali Kosiova a kol., kteří zkoumali fluorescenční vlastnosti derivátů kumarinu.¹¹ Klíčovými reaktanty byly azidonukleosidy a deriváty kumarinu obsahující terminální acetyleny (Obr. 5).



Obr. 5 Deriváty acetyl kumarinu používané pro přípravu triazol derivátů uridinu a thymidinu¹¹ podle schématu 4 a 5

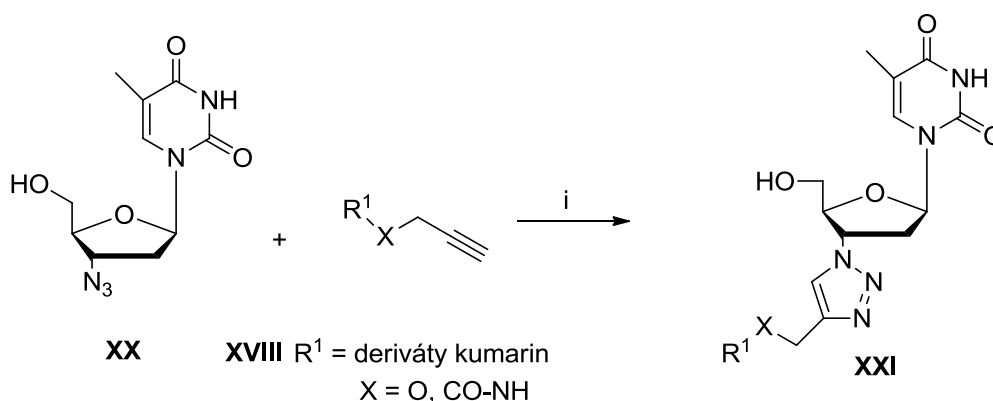
Autoři pracovali s 0,15 ekv modré skalice a s 0,30 ekv askorbátu sodného ve vodném roztoku *tert* – BuOH/voda 1:1 za vzniku příslušných triazolů **XIX** a **XXI** v 74-89 % výtěžku. Tento flexibilní přístup lze použít pro přípravu nových biokonjugátů. Kumarinové deriváty jsou široce používány jako fluorescenční sondy, značky a pigmenty. Click katalyzované reakce kombinují v tomto případě kumarin a biospecifický nukleosid za účelem tvorby nových molekul s perspektivními fluorescenčními vlastnostmi.

Schéma 4: Příprava 5'-triazol derivátů uridinu a thymidinu



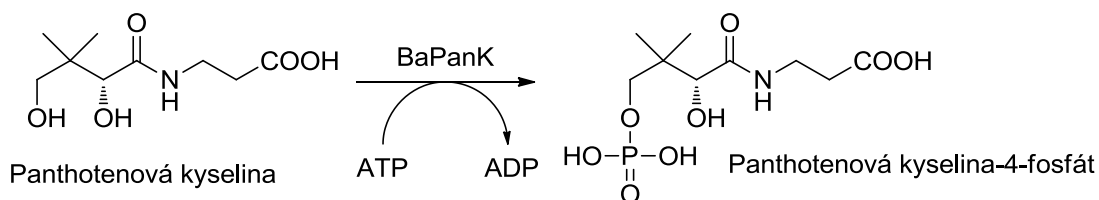
(i) CuSO₄·5H₂O, askorbát sodný, *tert*-BuOH/voda 1:1

Schéma 5: Příprava 2'-triazol derivátů thymidinu



(i) CuSO₄·5H₂O, askorbát sodný, tert-BuOH/voda 1:1

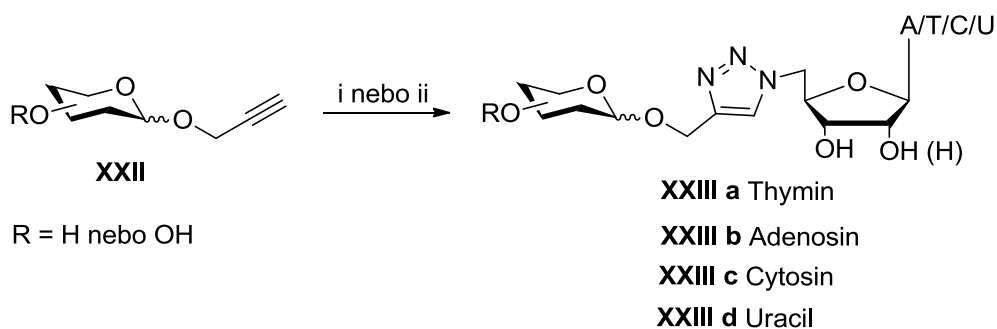
Katalyzované click reakce byly dále použity rovněž pro modifikaci nukleosid trifosfátů.¹² Nukleosid trifosfáty hrají klíčovou roli v mnoha biologických procesech v rozsahu od proteinové fosforylace a buněčné signalizace až po DNA replikaci. Hlavní výzvou pro přípravu NTP mimetik jako inhibitorů NTP-dependentních enzymů (např. kinázy, DNA/RNA polymerázy) je nahrazení tetra-aniontového trifosfátového postranního řetězce s neutrální nebo podstatně méně nabitým řetězcem. Takový motiv, který by usnadnil buněčnou permeabilitu a přitom zajistil stálou vazbu k jejich biologickým cílům se srovnatelnou nebo vyšší účinností než jeho přirozený substrát. V článku je popsána syntéza paralelní knihovny cukr-triazol-nukleosidů (STNs) jako inhibitory panhotenát kinázy typ-III z *Bacillus anthracis* (BaPanK). Panhotenát kináza katalyzuje první krok biosyntézy Coenzymu A jak je uvedeno na obr. 6.



Obr.6 První krok biosyntézy Coenzymu A

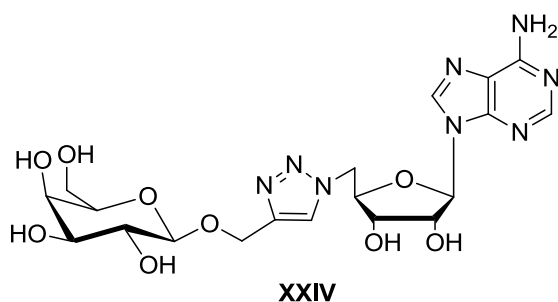
Autoři popisují přípravu thymidin STNs **XXIIIa** použitím Cu (I) katalyzované azido-alkyn cykloadice mezi propargyl glykosidy a 5'-azido-thymidinem za katalýzy modré skalice a askorbátu sodného. Deriváty adenosinu **XXIIIb**, uridinu **XXIIIc** a cytidinu **XXIIIc** byly připraveny alternativní reakcí za použití bromidu měďného a *tris*-(benzyltriazolylmethyl)aminu za působení ultrazvuku.

Schéma 6: Příprava STNs



(i) 5'-azido-thymidin, CuSO₄, askorbát sodný, MeOH/H₂O (3:1); (ii) 5'-azido-adenosin nebo 5'-azido-cytidin nebo 5'-azido-uridin, CuBr, askorbát sodný, TBTA, MeOH/H₂O/MeCN (1:1:1), rt, ultrazvuk.

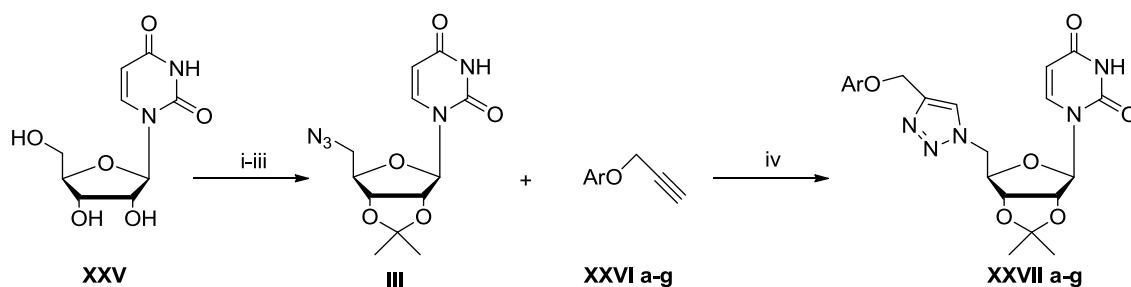
Všechny připravené NTP byly testovány proti BaPanK. β – Galacto-triazol adenosyl **XXIV** ukázal 96% inhibiční BaPanK aktivitu, přičemž detailní analýza ukázala, že tento derivát je kompetitivní inhibitor BaPanK. Dále se zjistilo, že je velmi důležitá anomerická konfigurace cukr-triazol postranního řetězce. α–Galacto-triazol adenosyl má totiž jen 3% inhibiční aktivitu. Tudiž tento STN je naprosto nepoužitelný jako inhibitor BaPanK.



Obr. 7 β – Galacto-triazol adenosyl

Syntéza substituovaných 5'-triazolových derivátů uridinu **XXVIIa-g** a **XXIXa-g** bylo dosaženo použitím Cu (I) katalyzované click chemie z 5'-azidouridinu **III** a propargyl derivátů **XXVIa-g** a propargyl derivátů kyselin **XXVIIIa-g** jak je popsáno v literatuře¹³. Výchozí 5'-azidouridin byl připraven z derivátu **XXV** v 95 % výtěžku (Schéma 7).¹⁴

Schéma 7: Příprava 5'- triazol derivátů isopropylidenuridinu



(i) dimethoxypropan/aceton, p-TSA, 28°C; (ii) p-TsCl, pyridin, 28°C; (iii) NaN₃, DMF, 60°C; (iv) CuSO₄·5H₂O, askorbát sodný, t-BuOH/voda, 28°C

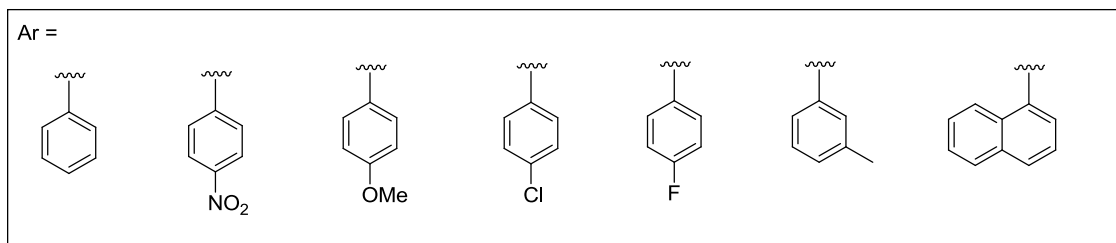
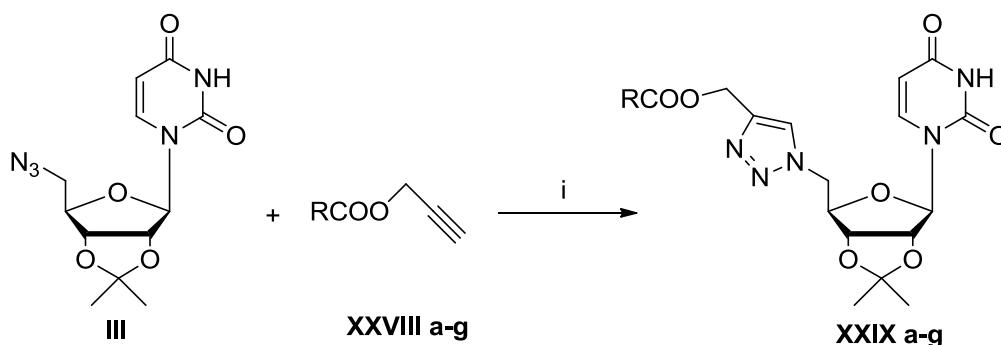
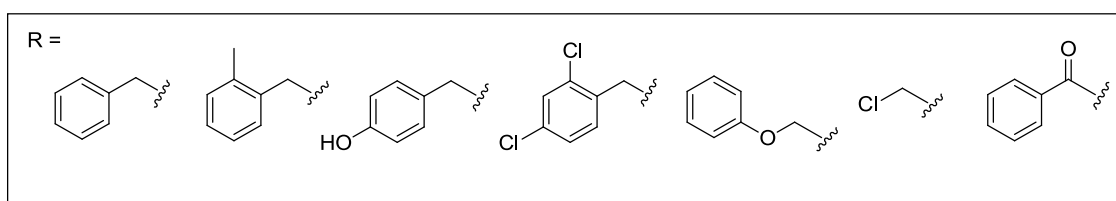


Schéma 8: Příprava 5'-kaboxytriazol derivátů isopropylidenuridinu



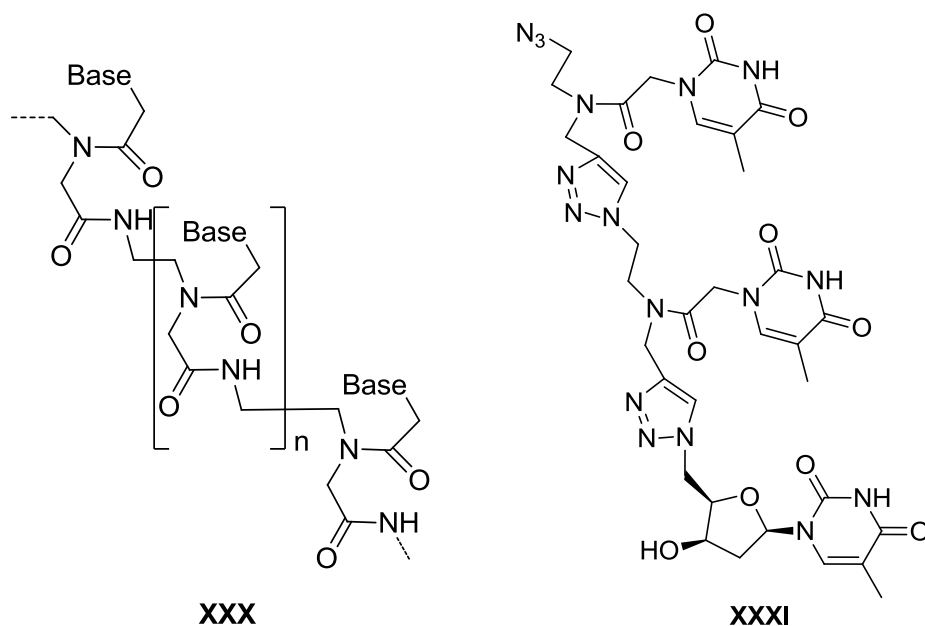
(i) CuSO₄·5H₂O, askorbát sodný, t-BuOH/voda, 28°C



Tyto modifikované nukleosidy byly testovány jako inhibitory chitin synthas. Chitin synthasa je enzym, který katalyzuje chemickou reakci UDP-N-acetyl-D-glukosaminu na UDP. Hraje velkou roli v biogenesi buněčné stěny. Přírodně se vyskytující antifungální uridin nukleosidy jako je polyoxin, neomycin Z a uridin difosfát (UDP) jsou známé jako inhibitory chitin synthasy. Zavedení 1,2,3-triazolového skeletu do molekuly, u něhož se předpokládalo mimikování peptidové vazby, mělo za cíl zvýšit afinitu k tomuto enzymu. Všechny připravené triazoly byl testovány na antifungální aktivitu. U aryl etherů byla zpozorována antifungální aktivita s MIC hodnotami 8-12 $\mu\text{g/ml}$. U aryl esterů byla zpozorována antifungální aktivita s MIC hodnoty 16-128 $\mu\text{g/ml}$. Všechny triazoly byly testovány ve srovnání se třemi standardy, a to Fluconazolem, Nikkomycinem a Amphotericinem. Sloučeniny **XXVIIa**, **XXVIIb**, **XXVIIc**, **XXVIIe**, **XXVIIg**, **XXVIIh**, **XXVIIi**, **XXVIIj**, **XXVIIk**, **XXVIIl**, **XXVIIm**, **XXVIIo**, **XXVIIp**, **XXVIIq**, **XXVIIr**, **XXVIIs**, **XXVIIt**, **XXVIIu**, **XXVIIv**, **XXVIIw**, **XXVIIx**, **XXVIIy**, **XXVIIz**, **XXVIIaa**, **XXVIIab**, **XXVIIac**, **XXVIIad**, **XXVIIae**, **XXVIIaf**, **XXVIIag**, **XXVIIah**, **XXVIIai**, **XXVIIaj**, **XXVIIak**, **XXVIIal**, **XXVIIam**, **XXVIIan**, **XXVIIao**, **XXVIIap**, **XXVIIaq**, **XXVIIar**, **XXVIIas**, **XXVIIat**, **XXVIIau**, **XXVIIav**, **XXVIIaw**, **XXVIIax**, **XXVIIay**, **XXVIIaz**, **XXVIIba**, **XXVIIbb**, **XXVIIbc**, **XXVIIbd**, **XXVIIbe**, **XXVIIbf**, **XXVIIbg**, **XXVIIbh**, **XXVIIbi**, **XXVIIbj**, **XXVIIbk**, **XXVIIbl**, **XXVIIbm**, **XXVIIbn**, **XXVIIbo**, **XXVIIbp**, **XXVIIbq**, **XXVIIbr**, **XXVIIbs**, **XXVIIbt**, **XXVIIbu**, **XXVIIbv**, **XXVIIbw**, **XXVIIbx**, **XXVIIby**, **XXVIIbz**, **XXVIIca**, **XXVIIcb**, **XXVIIcc**, **XXVIIcd**, **XXVIIce**, **XXVIIcf**, **XXVIIcg**, **XXVIIch**, **XXVIIci**, **XXVIIcj**, **XXVIIck**, **XXVIIcl**, **XXVIIcm**, **XXVIIcn**, **XXVIIco**, **XXVIIcp**, **XXVIIcq**, **XXVIIcr**, **XXVIIcs**, **XXVIIct**, **XXVIIcu**, **XXVIIcv**, **XXVIIcw**, **XXVIIcx**, **XXVIIcy**, **XXVIIcz**, **XXVIIda**, **XXVIIdb**, **XXVIIdc**, **XXVIIdd**, **XXVIIde**, **XXVIIdf**, **XXVIIdg**, **XXVIIdh**, **XXVIIdi**, **XXVIIdj**, **XXVIIdk**, **XXVIIdl**, **XXVIIdm**, **XXVIIdn**, **XXVIIdo**, **XXVIIdp**, **XXVIIdq**, **XXVIIdr**, **XXVIIds**, **XXVIIdt**, **XXVIIdu**, **XXVIIdv**, **XXVIIdw**, **XXVIIdx**, **XXVIIdy**, **XXVIIdz**, **XXVIIea**, **XXVIIeb**, **XXVIIec**, **XXVIIed**, **XXVIIee**, **XXVIIef**, **XXVIIeg**, **XXVIIeh**, **XXVIIei**, **XXVIIej**, **XXVIIek**, **XXVIIel**, **XXVIIem**, **XXVIIen**, **XXVIIeo**, **XXVIIep**, **XXVIIeq**, **XXVIIer**, **XXVIIes**, **XXVIIet**, **XXVIIeu**, **XXVIIev**, **XXVIIew**, **XXVIIex**, **XXVIIey**, **XXVIIez**, **XXVIIfa**, **XXVIIfb**, **XXVIIfc**, **XXVIIfd**, **XXVIIfe**, **XXVIIff**, **XXVIIfg**, **XXVIIfh**, **XXVIIfi**, **XXVIIfj**, **XXVIIfk**, **XXVIIfl**, **XXVIIfm**, **XXVIIfn**, **XXVIIfo**, **XXVIIfp**, **XXVIIfq**, **XXVIIfr**, **XXVIIfs**, **XXVIIft**, **XXVIIfu**, **XXVIIfv**, **XXVIIfw**, **XXVIIfx**, **XXVIIfy**, **XXVIIfz**, **XXVIIga**, **XXVIIgb**, **XXVIIgc**, **XXVIIgd**, **XXVIIge**, **XXVIIgf**, **XXVIIgg**, **XXVIIgh**, **XXVIIgi**, **XXVIIgj**, **XXVIIgk**, **XXVIIgl**, **XXVIIgm**, **XXVIIgn**, **XXVIIgo**, **XXVIIgp**, **XXVIIgq**, **XXVIIgr**, **XXVIIgs**, **XXVIIgt**, **XXVIIgu**, **XXVIIgv**, **XXVIIgw**, **XXVIIgx**, **XXVIIgy**, **XXVIIgz**, **XXVIIha**, **XXVIIhb**, **XXVIIhc**, **XXVIIhd**, **XXVIIhe**, **XXVIIhf**, **XXVIIhg**, **XXVIIhh**, **XXVIIhi**, **XXVIIhj**, **XXVIIhk**, **XXVIIhl**, **XXVIIhm**, **XXVIIhn**, **XXVIIho**, **XXVIIhp**, **XXVIIhq**, **XXVIIhr**, **XXVIIhs**, **XXVIIht**, **XXVIIhu**, **XXVIIhv**, **XXVIIhw**, **XXVIIhx**, **XXVIIhy**, **XXVIIhz**, **XXVIIia**, **XXVIIib**, **XXVIIic**, **XXVIIid**, **XXVIIie**, **XXVIIif**, **XXVIIig**, **XXVIIih**, **XXVIIii**, **XXVIIij**, **XXVIIik**, **XXVIIil**, **XXVIIim**, **XXVIIin**, **XXVIIio**, **XXVIIip**, **XXVIIiq**, **XXVIIir**, **XXVIIis**, **XXVIIit**, **XXVIIiu**, **XXVIIiv**, **XXVIIiw**, **XXVIIix**, **XXVIIiy**, **XXVIIiz**, **XXVIIja**, **XXVIIjb**, **XXVIIjc**, **XXVIIjd**, **XXVIIje**, **XXVIIjf**, **XXVIIjg**, **XXVIIjh**, **XXVIIji**, **XXVIIjj**, **XXVIIjk**, **XXVIIjl**, **XXVIIjm**, **XXVIIjn**, **XXVIIjo**, **XXVIIjp**, **XXVIIjq**, **XXVIIjr**, **XXVIIjs**, **XXVIIjt**, **XXVIIju**, **XXVIIjv**, **XXVIIjw**, **XXVIIjx**, **XXVIIjy**, **XXVIIjz**, **XXVIIka**, **XXVIIkb**, **XXVIIkc**, **XXVIIkd**, **XXVIIke**, **XXVIIkf**, **XXVIIkg**, **XXVIIkh**, **XXVIIki**, **XXVIIkj**, **XXVIIkk**, **XXVIIkl**, **XXVIIkm**, **XXVIIkn**, **XXVIIko**, **XXVIIkp**, **XXVIIkq**, **XXVIIkr**, **XXVIIks**, **XXVIIkt**, **XXVIIku**, **XXVIIkv**, **XXVIIkw**, **XXVIIkx**, **XXVIIky**, **XXVIIkz**, **XXVIIla**, **XXVIIlb**, **XXVIIlc**, **XXVIIld**, **XXVIIle**, **XXVIIlf**, **XXVIIlg**, **XXVIIlh**, **XXVIIli**, **XXVIIlj**, **XXVIIlk**, **XXVIIll**, **XXVIIlm**, **XXVIIln**, **XXVIIlo**, **XXVIIlp**, **XXVIIlq**, **XXVIIlr**, **XXVIIls**, **XXVIIlt**, **XXVIIlu**, **XXVIIlv**, **XXVIIlw**, **XXVIIlx**, **XXVIIly**, **XXVIIlz**, **XXVIIma**, **XXVIImb**, **XXVIImc**, **XXVIImd**, **XXVIIme**, **XXVIImf**, **XXVIImg**, **XXVIImh**, **XXVIImi**, **XXVIImj**, **XXVIImk**, **XXVIIml**, **XXVIImm**, **XXVIImn**, **XXVIImo**, **XXVIImp**, **XXVIImq**, **XXVIImr**, **XXVIIms**, **XXVIImt**, **XXVIImu**, **XXVIImv**, **XXVIImw**, **XXVIImx**, **XXVIImy**, **XXVIImz**, **XXVIIna**, **XXVIInb**, **XXVIInc**, **XXVIInd**, **XXVIIne**, **XXVIInf**, **XXVIIng**, **XXVIInh**, **XXVIIni**, **XXVIInj**, **XXVIInk**, **XXVIInl**, **XXVIInm**, **XXVIInn**, **XXVIIno**, **XXVIInp**, **XXVIInq**, **XXVIInr**, **XXVIIns**, **XXVIInt**, **XXVIInu**, **XXVIInv**, **XXVIInw**, **XXVIInx**, **XXVIIny**, **XXVIInz**, **XXVIIoa**, **XXVIIob**, **XXVIIoc**, **XXVIIod**, **XXVIIoe**, **XXVIIof**, **XXVIIog**, **XXVIIoh**, **XXVIIoi**, **XXVIIoj**, **XXVIIok**, **XXVIIol**, **XXVIIom**, **XXVIIon**, **XXVIIoo**, **XXVIIop**, **XXVIIoq**, **XXVIIor**, **XXVIIos**, **XXVIIot**, **XXVIIou**, **XXVIIov**, **XXVIIow**, **XXVIIox**, **XXVIIoy**, **XXVIIoz**, **XXVIIpa**, **XXVIIpb**, **XXVIIpc**, **XXVIIpd**, **XXVIIpe**, **XXVIIpf**, **XXVIIpg**, **XXVIIph**, **XXVIIpi**, **XXVIIpj**, **XXVIIpk**, **XXVIIpl**, **XXVIIpm**, **XXVIIpn**, **XXVIIpo**, **XXVIIpp**, **XXVIIpq**, **XXVIIpr**, **XXVIIps**, **XXVIIpt**, **XXVIIpu**, **XXVIIpv**, **XXVIIpw**, **XXVIIpx**, **XXVIIpy**, **XXVIIpz**, **XXVIIqa**, **XXVIIqb**, **XXVIIqc**, **XXVIIqd**, **XXVIIqe**, **XXVIIqf**, **XXVIIqg**, **XXVIIqh**, **XXVIIqi**, **XXVIIqj**, **XXVIIqk**, **XXVIIql**, **XXVIIqm**, **XXVIIqn**, **XXVIIqo**, **XXVIIqp**, **XXVIIqq**, **XXVIIqr**, **XXVIIqs**, **XXVIIqt**, **XXVIIqu**, **XXVIIqv**, **XXVIIqw**, **XXVIIqx**, **XXVIIqy**, **XXVIIqz**, **XXVIIra**, **XXVIIrb**, **XXVIIrc**, **XXVIIrd**, **XXVIIre**, **XXVIIrf**, **XXVIIrg**, **XXVIIrh**, **XXVIIri**, **XXVIIrj**, **XXVIIrk**, **XXVIIrl**, **XXVIIrm**, **XXVIIrn**, **XXVIIro**, **XXVIIrp**, **XXVIIrq**, **XXVIIrr**, **XXVIIrs**, **XXVIIrt**, **XXVIIru**, **XXVIIrv**, **XXVIIrw**, **XXVIIrx**, **XXVIIry**, **XXVIIrz**, **XXVIIsa**, **XXVIIsb**, **XXVIIsc**, **XXVIIsd**, **XXVIIse**, **XXVIIsf**, **XXVIIsg**, **XXVIIsh**, **XXVIIsi**, **XXVIIsj**, **XXVIIsk**, **XXVIIsl**, **XXVIIsm**, **XXVIIsn**, **XXVIIso**, **XXVIIsp**, **XXVIIsq**, **XXVIIsr**, **XXVIIss**, **XXVIIst**, **XXVIIsu**, **XXVIIsv**, **XXVIIsw**, **XXVIIsx**, **XXVIIsy**, **XXVIIsz**, **XXVIIta**, **XXVIItb**, **XXVIItc**, **XXVIItd**, **XXVIIte**, **XXVIItf**, **XXVIItg**, **XXVIIth**, **XXVIIti**, **XXVIItj**, **XXVIItk**, **XXVIItl**, **XXVIItm**, **XXVIItn**, **XXVIIto**, **XXVIItp**, **XXVIItq**, **XXVIItr**, **XXVIIts**, **XXVIItt**, **XXVIItu**, **XXVIItv**, **XXVIItw**, **XXVIItx**, **XXVIIty**, **XXVIItz**, **XXVIIua**, **XXVIIub**, **XXVIIuc**, **XXVIIud**, **XXVIIue**, **XXVIIuf**, **XXVIIug**, **XXVIIuh**, **XXVIIui**, **XXVIIuj**, **XXVIIuk**, **XXVIIul**, **XXVIIum**, **XXVIIun**, **XXVIIuo**, **XXVIIup**, **XXVIIuq**, **XXVIIur**, **XXVIIus**, **XXVIIut**, **XXVIIuu**, **XXVIIuv**, **XXVIIuw**, **XXVIIux**, **XXVIIuy**, **XXVIIuz**, **XXVIIva**, **XXVIIvb**, **XXVIIvc**, **XXVIIvd**, **XXVIIve**, **XXVIIvf**, **XXVIIvg**, **XXVIIvh**, **XXVIIvi**, **XXVIIvj**, **XXVIIvk**, **XXVIIvl**, **XXVIIvm**, **XXVIIvn**, **XXVIIvo**, **XXVIIvp**, **XXVIIvq**, **XXVIIvr**, **XXVIIvs**, **XXVIIvt**, **XXVIIvu**, **XXVIIvv**, **XXVIIvw**, **XXVIIvx**, **XXVIIvy**, **XXVIIvz**, **XXVIIwa**, **XXVIIwb**, **XXVIIwc**, **XXVIIwd**, **XXVIIwe**, **XXVIIwf**, **XXVIIwg**, **XXVIIwh**, **XXVIIwi**, **XXVIIwj**, **XXVIIwk**, **XXVIIwl**, **XXVIIwm**, **XXVIIwn**, **XXVIIwo**, **XXVIIwp**, **XXVIIwq**, **XXVIIwr**, **XXVIIws**, **XXVIIwt**, **XXVIIwu**, **XXVIIwv**, **XXVIIww**, **XXVIIwx**, **XXVIIwy**, **XXVIIwz**, **XXVIIxa**, **XXVIIxb**, **XXVIIxc**, **XXVIIxd**, **XXVIIxe**, **XXVIIxf**, **XXVIIxg**, **XXVIIxh**, **XXVIIxi**, **XXVIIxj**, **XXVIIxk**, **XXVIIxl**, **XXVIIxm**, **XXVIIxn**, **XXVIIxo**, **XXVIIxp**, **XXVIIxq**, **XXVIIxr**, **XXVIIxs**, **XXVIIxt**, **XXVIIxu**, **XXVIIxv**, **XXVIIxw**, **XXVIIxx**, **XXVIIxy**, **XXVIIxz**, **XXVIIya**, **XXVIIyb**, **XXVIIyc**, **XXVIIyd**, **XXVIIye**, **XXVIIyf**, **XXVIIyg**, **XXVIIyh**, **XXVIIyi**, **XXVIIyj**, **XXVIIyk**, **XXVIIyl**, **XXVIIym**, **XXVIIyn**, **XXVIIyo**, **XXVIIyp**, **XXVIIyq**, **XXVIIyr**, **XXVIIys**, **XXVIIyt**, **XXVIIyu**, **XXVIIyv**, **XXVIIyw**, **XXVIIyx**, **XXVIIyy**, **XXVIIyz**, **XXVIIza**, **XXVIIzb**, **XXVIIzc**, **XXVIIzd**, **XXVIIze**, **XXVIIzf**, **XXVIIzg**, **XXVIIzh**, **XXVIIzi**, **XXVIIzj**, **XXVIIzk**, **XXVIIzl**, **XXVIIzm**, **XXVIIzn**, **XXVIIzo**, **XXVIIzp**, **XXVIIzq**, **XXVIIzr**, **XXVIIzs**, **XXVIIzt**, **XXVIIzu**, **XXVIIzv**, **XXVIIzw**, **XXVIIzx**, **XXVIIzy**, **XXVIIzz**.

Francouzští vědci se zabývali přípravou nových analog PNA tvořených oligotriazoly **XXXI** pomocí click chemie.¹⁵ PNA **XXX** jsou nepřírodné oligonukleotidové sekvence,

ve kterých se nukleobáze vážou neutrální a achirální vazbou, jež se skládá z polyamidických pseudopeptidů v místě přirozené vazby cukr-fosfát. PNA jsou využívány v molekulární biologii, diagnostických testech i v tzv. antisense terapii.



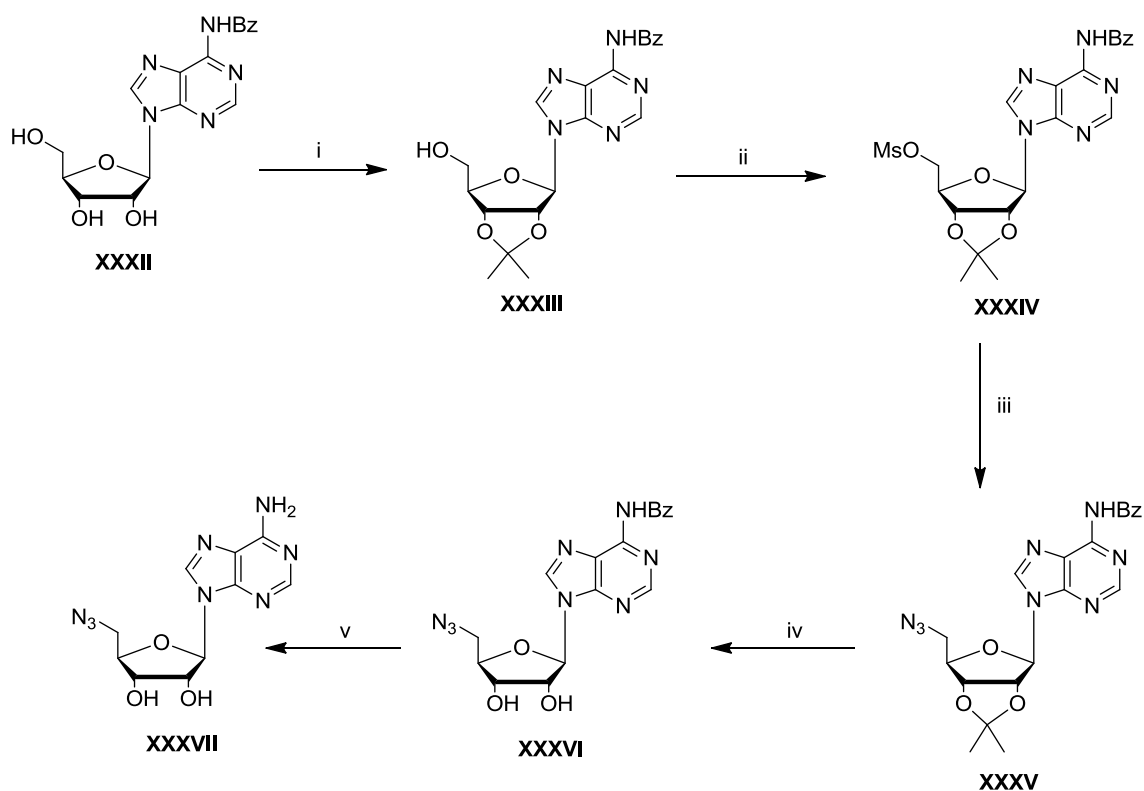
Obr. 8 Nové analogy PNA

3. 1. 2 Tvorba triazolových derivátů purinovýchází

3. 1. 2. 1 Příprava azidoderivátů purinovýchází

5'-Azidoadenosin byl připravován jako meziprodukt pro studium potencionálního inhibitoru SAH 5'-deoxy-5'-ureidoadenosinu.¹⁶ Vycházelo se z komerčně dostupného N⁶-benzoyladenosinu **XXXII**, který byl převeden na 2',3'-isopropylidenadenosin **XXXIII** pomocí 2,2-dimetoxypropanu. Sloučenina **XXXIII** byla podrobena reakci s mesylchloridem a následný mesylderivát **XXXIV** byl zahříván s azidem sodným za vzniku **XXXV**. Odstraněním isopropylidenové skupiny vodným roztokem TFA byl získán diol, který byl následně míchán s methoxidem sodným na potřebný 5'-azido-5'-deoxyadenosin **XXXVIII**.

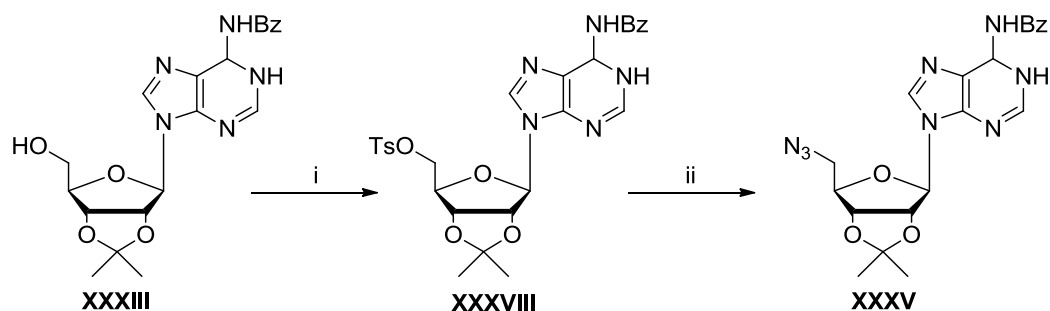
Schéma 9: Příprava 5'-azidoadenosinu



(i) 2,2 – dimethoxypropan, aceton, H₂SO₄, rt, 30 min; (ii) MsCl, pyridin, rt, 30 min; (iii) NaN₃, DMF, 60°C, 3h; (iv) 50% aq CF₃CO₂H, rt, 1 h; (v) NaOMe, MeOH, rt, 24 h

Velmi podobný postup publikovali v článku o nukleotidových analozích, kde byl azid adenosinu připravován jako prekurzor acetamidu adenosinu.¹⁷ N⁶-benzoyl-2'3'-isopropyliden adenosin **XXXIII** byl tosylován v poloze 5' a následně přeměněn na azid **XXXV** použitím NaN₃ v DMF při 80°C ve výtěžku 90%.

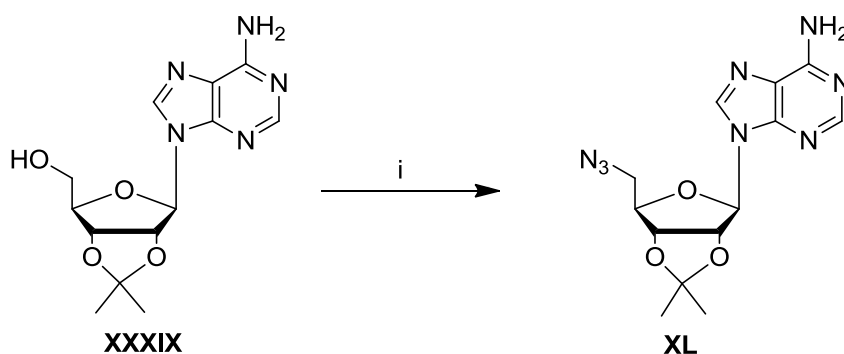
Schéma 10: Příprava N⁶-benzoyl-2'3'-isopropyliden-5'-azidoadenosin



(i) TsCl, pyridin; (ii)NaN₃, DMF, 80°C

Další možnou metodou přípravy 5'-azidoadenosinu je Mitsunobu reakce,¹⁸ která vychází z 2',3'-isopropylidenadenosinu **XXXIX** aktivovaného během reakce pomocí DEAD (Schéma 11). Výsledný produkt **XL** byl po zpracování získán ve výtěžku 73 %.

Schéma 11: Příprava 5'-azidoadenosinu Mitsunobu reakcí



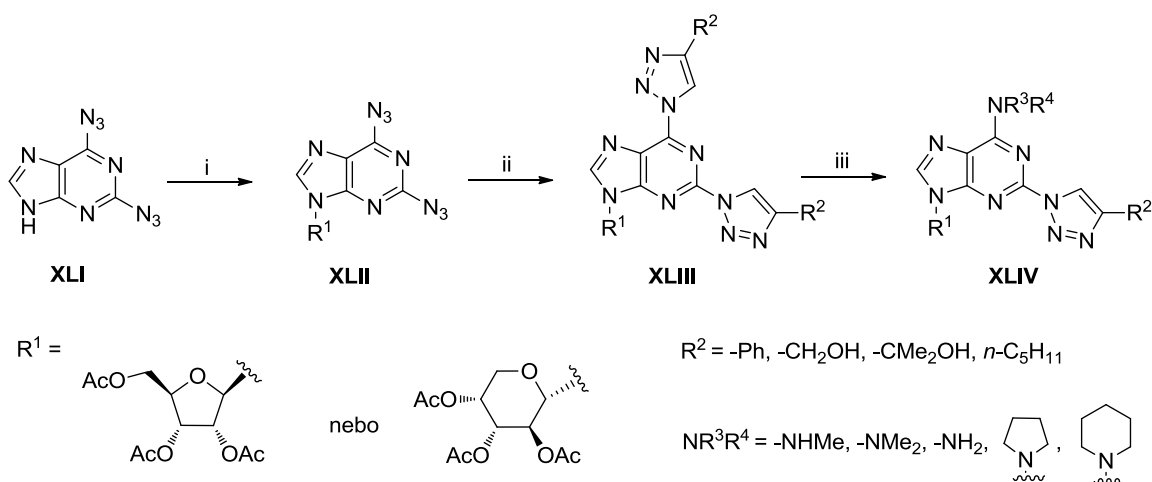
(i) DPPA, PPh₃, DEAD, THF, 0°C. 36h

V další publikované práci¹³ je pak použit s podobnými výsledky místo činidla DEAD reagent DIAD. Isopropylidenová chránicí skupina byla následně odstraněna vodným roztokem TFA.

3. 1. 2. 2 Příprava a biologická aktivita triazol derivátů purinových bází

Kovalovs, A. et al. ¹⁹ poukázali na jednu z vlastností triazolů v purinové chemii. 1,2,3-Triazol může být použit jako dobře odstupující skupina pro přípravu 6-substituovaných aminoderivátů **XLIV**. Autoři zde popisují přípravu 2,6-bis-triazolylpurinových nukleosidů **XLIII** z 2,6-diazidopurinu **XLI**, které jsou pak za velmi mírných podmínek substituovány různými aminy za vzniku finálních derivátů **XLV**.

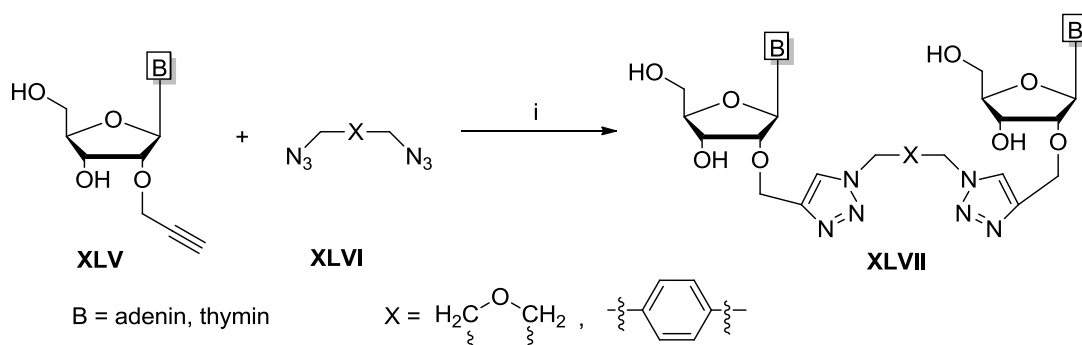
Schéma 12: Příprava 2,6-bis-triazolylpurinových nukleosidů a jejich substituce



(i) BSA, TMSOTf; (ii) CuSO₄·5H₂O, askorbát sodný; (iii) aminy, H₂O nebo H₂O/THF, rt-40°C

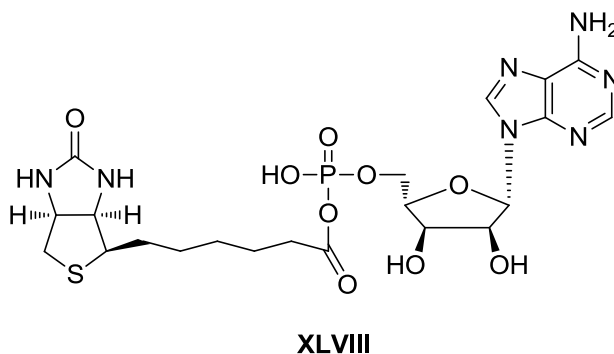
Katalyzované click reakce mohou být dále využity pro cross-linking DNA^{20,21} a následné studium procesů vedoucích k buněčné smrti neboli apoptóze. V literatuře²⁰ je popsána metoda, kde je cross-linking studován na nukleosidech a oligonukleotidech nesoucí propargyl skupinu na cukerné části **XLV**. DNA ligace byla prezentována pomocí bis-azidů **XLVI**, takzvanou bis-click chemií (Schéma 13).

Schéma 13: Příprava bis-triazol derivátů nukleosidů spojené daným linkrem



(i) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, askorbát sodný, THF/t-BuOH/Voda 3:1:1

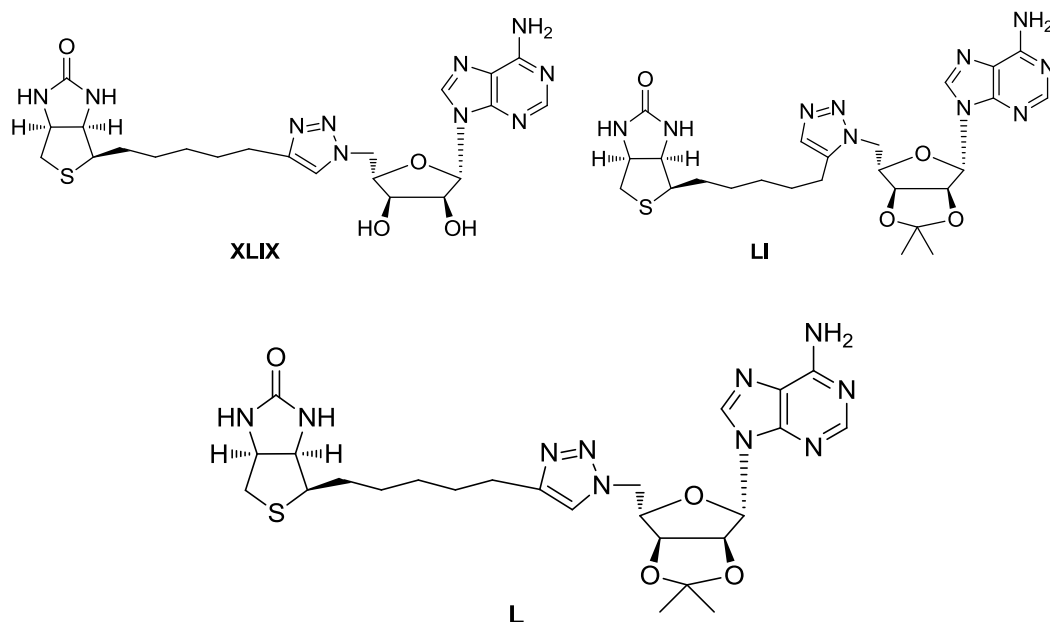
Další oblastí, kde se uplatnili triazolové deriváty na cukerné složce purinových nukleosidů je selektivní inhibice biotin protein ligázy (BPL) z *Staphylococcus aureus*,²² která byla vybrána jako potenciální cíl antibakteriálních léčiv. Pro tyto účely byly připraveny analoga biotinyl-5'-AMP **XLVIII**, kde fosfátový zbytek byl nahrazen triazolovou funkční skupinou.



Obr. 9 Biotinyl-5'-AMP

Triazol je univerzální heterocyklus s řadou žádoucích vlastností, mezi které zejména patří jeho stabilita v kyselém i v bazickém prostředí a rezistence vůči metabolickým degradacím. Jako první sloučenina obsahující triazol na purinovém nukleosidu byl připraven biotin 1,4-disubstituovaný triazol-adenosin **XLIX** (Obr. 10). Tento triazol byl

demonstrován jako kompetitivní inhibitor *Sa*BPL. Isopropyliden chráněná sloučenina **L** byla stejně účinná jako její nechráněný analog. Dále bylo pozorováno, že zkrácení či prodloužení řetězce valerové kyseliny na biotinylovém zbytku o jeden uhlík, způsobuje zrušení inhibiční aktivity. Podobně 1,5-disubstituovaný regioisomer triazol-adenosinu **LI** byl také inaktivní proti *Sa*BPL, pravděpodobně proto, že neposkytuje odpovídající geometrii ve tvaru V, která je potřebná pro aktivní vazby. Biotin triazoly **XLIX** a **L** byly následně testovány na inhibiční aktivitu proti rekombinantní *E.coli* a lidských BPL. Tyto triazolové deriváty jsou prvními sloučeninami, které vykazují významnou selektivitu vůči *Sa*BPL.

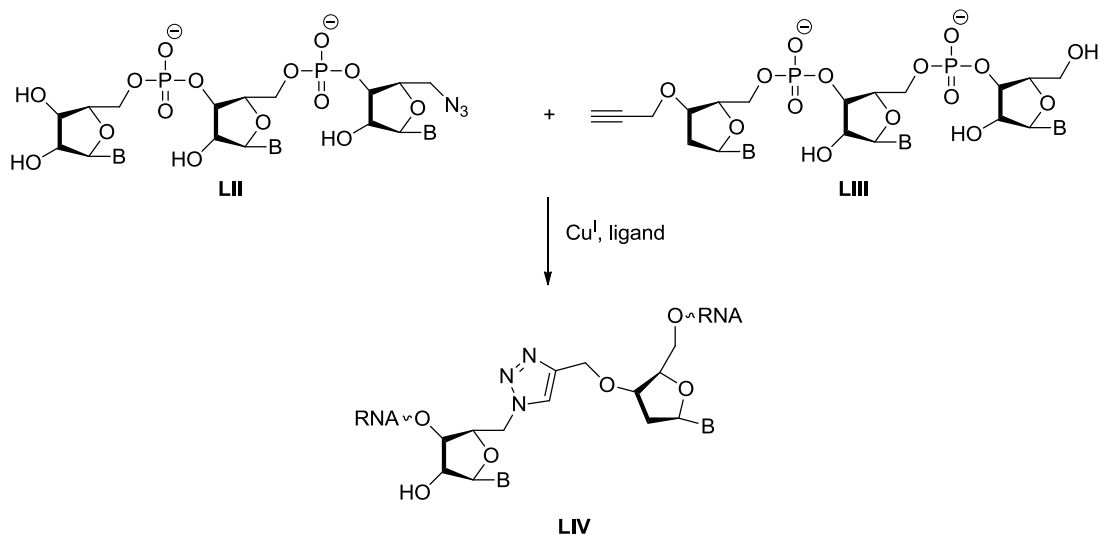


Obr. 10 Biotin triazolové deriváty adenosinu

Triazolové spojení, které se velmi podobá fosfodiesterovému, bylo vybráno pro přípravu aktivního ribozymu, tzv. hammerhead ribozyme.²³ Ribozym **LIV** byl připraven z 3'-propargylnukleotidu **LIII** a z 5'-azid RNA **LII**. Chemie popsaná v článku by mohla být použita pro syntézu důležitých RNA molekul, jako jsou

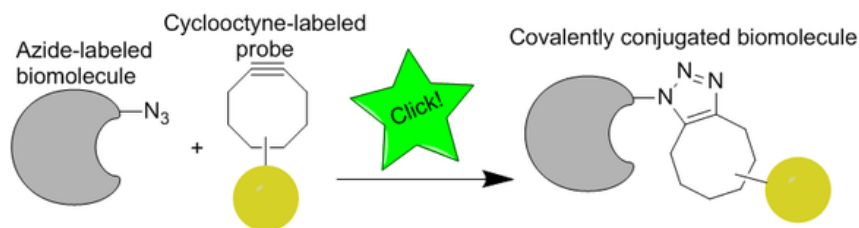
například komponenty ribozomů. A také by mohla vést ke stabilním biologicky aktivním ribozomům, což by svědčilo o biokompatibilitě triazolové spojky.

Schéma 15: Příprava ribozymu



3.2 Nekatalyzované click reakce

Nekatalyzované click reakce⁶ jsou jednou z forem bioortogonálních reakcí (http://en.wikipedia.org/wiki/Bioorthogonal_chemistry; přečteno 25.3.2014). Bioortogonální reakce umožňují studium biomolekul, jako jsou polysacharidy, proteiny a lipidy, v reálném čase v živých systémech bez buněčné toxicity.²⁴ Výzkum nekatalyzovaných click reakcí azidů s acetyleny je prováděn z důvodu toxicity měďných iontů, které se při těchto reakcích využívají. Jako reagent v Cu-free reakcích je využíváno různě substituovaných cyklooktynů. Cyklooktyny byly vybrány díky velkému pnutí kruhu. Díky tomu jsou reaktivnější a není tak potřeba katalýzy. Jejich reaktivita může být zvýšena vhodnou substitucí, např. fluorací. Nejrozšířenějším použitím copper-free click reakcí je značení biomolekul v živých buňkách, kdy biomolekula je derivatizovaná azidem a cyklooktyn nese zobrazovací prostředek nebo naopak (Obr.11).



Obr.11 Mechanismus Cu-free click chemie

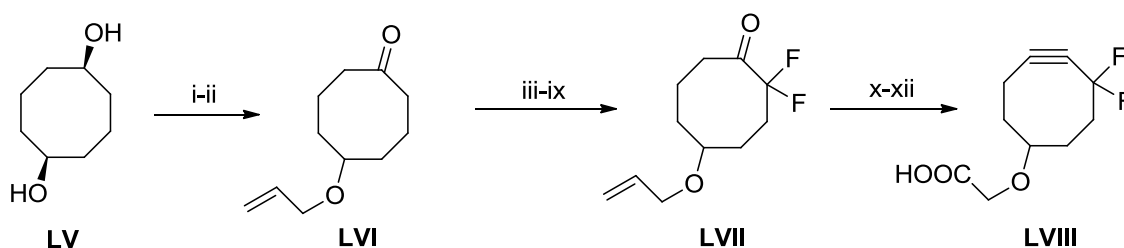
3. 2. 1. Příprava cyklooktynů

3. 2. 1. 1. Příprava difluorovaných cyklooktynů

Difluorované cyklooktyny jsou důležitým reagentem v značení azido-biomolekul v click chemii. Skupina vědců pod vedením C.R. Bertozzi použila pro svůj výzkum difluorovaný cyklooktyn (DIFO) díky své dostupnosti a inertnosti v biologických systémech²⁵ a především jeho zvýšené reaktivitě ve srovnání s nesubstituovaným cyklooktynem.

V přípravě DIFO se vychází z 1,5-dihydroxycykloheptanu **LV**, který se redukuje NaH a dále reaguje s allyl bromidem na **LVI**. Následuje sled reakcí k přípravě meziprojektu **LVII** a poté za katalýzy RuCl_3 a reakcí s KHMDS, lithium diisopropylamidem vzniká **LVIII**.

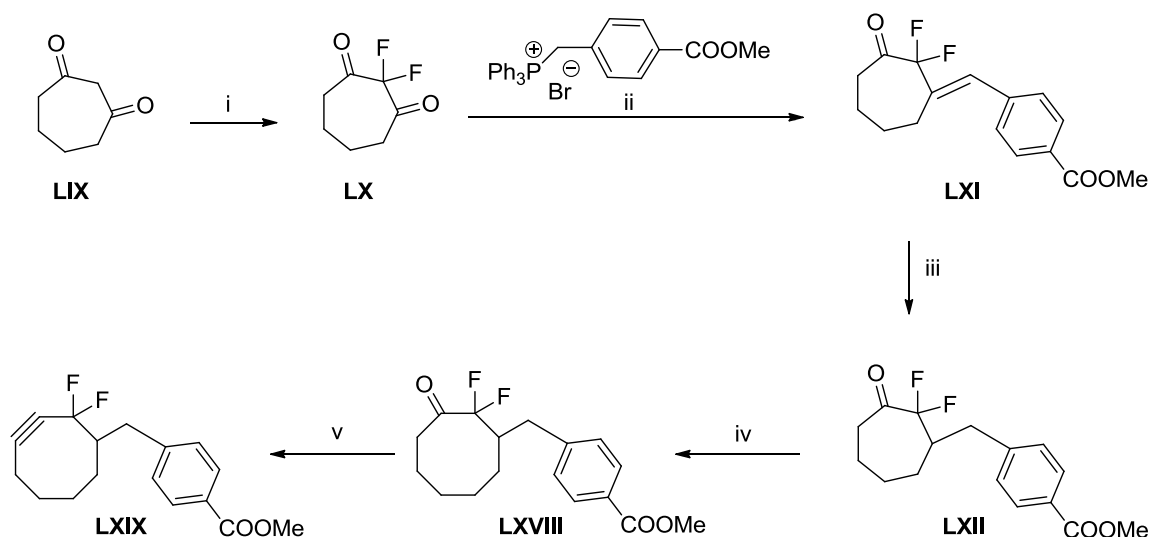
Schéma 15: Příprava DIFO



(i) NaH, allyl bromid; (ii) pyridinium chlorochromát; (iii) lithium hexametyldisilazid (LHMDS), chlorotrietylsilan (TESCl); (iv) Selectfluor; (v-vii) kat.LHMDS; (viii) hexametyldisilazid draselný (KHMDS), TESCl; (ix) Selectfluor; (x) kat. RuCl_3 , NaIO_4 ; (xi) KHMDS, N-fenylbis(trifluorometansulfonamid); (xii) lithium diisopropylamid

Příprava druhé generace difluorovaných cyklooktynů, DIFO2²⁶ vychází z 1,3-cykloheptadionu **LIX**, který reaguje za přídavku uhličitanu cesného Cs₂CO₃ a selectfluoru za vzniku 2,2-difluoro-1,3-cykloheptadionu **LX**. Tento derivát byl převeden Witigovou reakcí použitím fosfoniové soli na sloučeninu **LXI**. Poté dochází hydrogenaci na **LXII**, který je zahříván s trimethylsilyl diazomethanem za katalýzy trimethylalumiem a poté je hydrolyzován zahřátím v kyselém prostředí za vzniku derivátu **LXVIII**. Ten je pak převeden na konečný produkt **LXIX**.

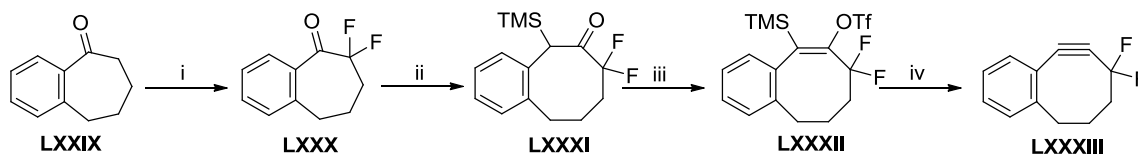
Schéma 16: Příprava DIFO2



(i) Cs₂CO₃, Selectfluor; (ii) DBU; (iii) H₂, Pd/C; (iv) TMSCHN₂, AlMe₃, HCl; (v) KHMDS, Tf₂O, LDA

Třetí generace difluorovaných cyklooktynů, DIFO3²⁷ vychází z difluorketonu **LXX**, který byl syntetizován z trifluoroetanolu. Připravený benzyl ether byl po přečištění ochráněn za vzniku alkoholu **LXXI**, který byl následně ochráněn TBS protektivní skupinou za vzniku derivátu **LXXII**. Derivát enol triflát **LXXIII** byl připraven pomocí N-(5-chloro-2-pyridyl)triflimidu. Poté dochází k eliminaci za vzniku alkyne **LXXIV** a odstranění TBS skupiny **LXXV** ve výtěžku 85%.

Schéma 19: Příprava DIFBO



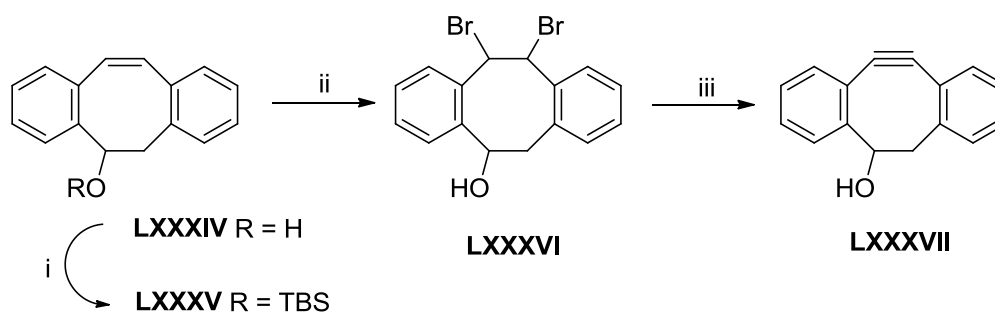
(i) hexylamin, Selectfluor, HCl; (ii) AlMe_3 , TMSCHN_2 ; (iii) KHMDS , TFA; (iv) CsF

3. 2. 1. 2 Příprava dalších cyklooktynů

Další často používané cyklooktyny v Cu-free chemii jsou OCT-cyklooktyn, DIBO-dibenzocyklooktyn²⁹, BCN-bicyklononyn²⁴ a BARAC-biaryl-aza-cyklooktyn.^{30,31}

Příprava DIBO **LXXXVII** vychází z 3-hydroxy-1,2:5,6-dibenzocyklookta-1,5,7-trienu **LXXXIV**, který se nejprve ochrání TBS skupinou za vzniku derivátu **LXXXV**.²⁹ Sloučenina je dále bromována na dibromid **LXXXVI** a následně dochází k dehydrobromaci použitím LDA v THF při 0°C v 45% výtěžku.

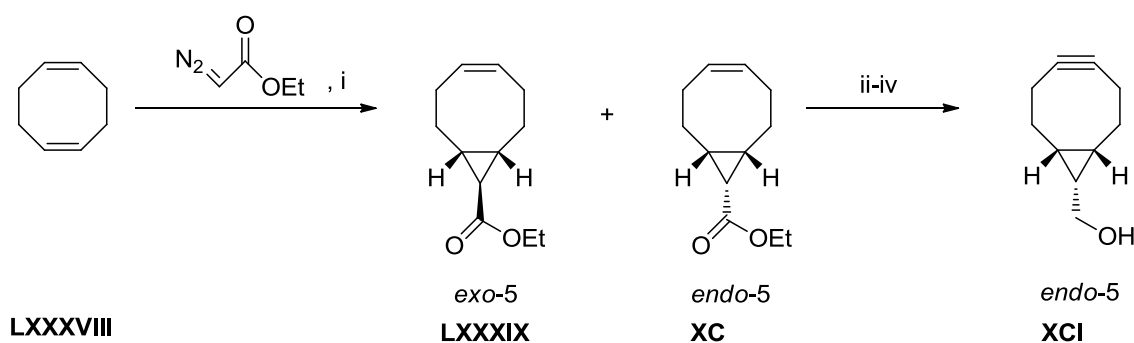
Schéma 20: Příprava DIBO



(i) TBSCl, pyridin; (ii) Br_2 , CHCl_3 ; (iii) LDA, THF

Syntéza BCN²⁴ začíná přikapáváním ethyl diazoacetátu k 1,5-cyklooktadienu **LXXXVIII** za katalýzy acetátu rhodia za vzniku směsi diastereomerů *exo*-5 **LXXXIX** a *endo*-5 **XC** v poměru 2:1. Směs byla rozdělena kapalinovou chromatografií na silikagelu pro získání *endo*-5 **XC**. Následuje tří kroková syntéza, kdy dochází k redukci esterové skupiny, bromaci a eliminaci za vzniku sloučeniny **XCI** v 61 % výtěžku.

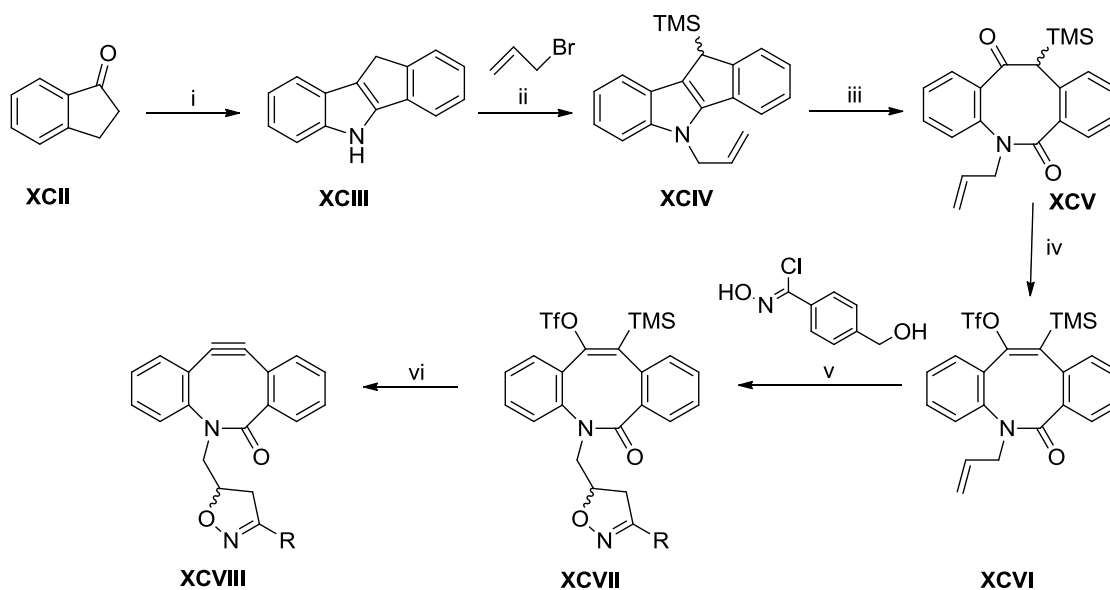
Schéma 21: Příprava BCN



(i) $\text{Rh}(\text{OAc})_2$, CH_2Cl_2 , 0°C ; (ii) LiAlH_4 , Et_2O , 0°C ; (iii) Br_2 , CH_2Cl_2 ; (iv) tBuOK , THF, 0°C -reflux

BARAC byl připraven následujícím postupem. Fischer-indolovou syntézou byl připraven indol **XCIII**. Ten byl dále alkylován a chráněn TMS chránicí skupinou za vzniku derivátu **XCIV**. Indolový derivát je oxidován *m*-CPBA za současného otevření cyklu za vzniku keto-amidu **XCV**, který reagoval s trifluorometansulfonyl anhydridem za vzniku derivátu **XCVI**. Reakcí s chloroximem a dále pak s fluoridem cesným byl získán v 18 % výtěžku daný cyklooktynový systém **XCVIII**.³¹

Schéma 22: Příprava BARAC



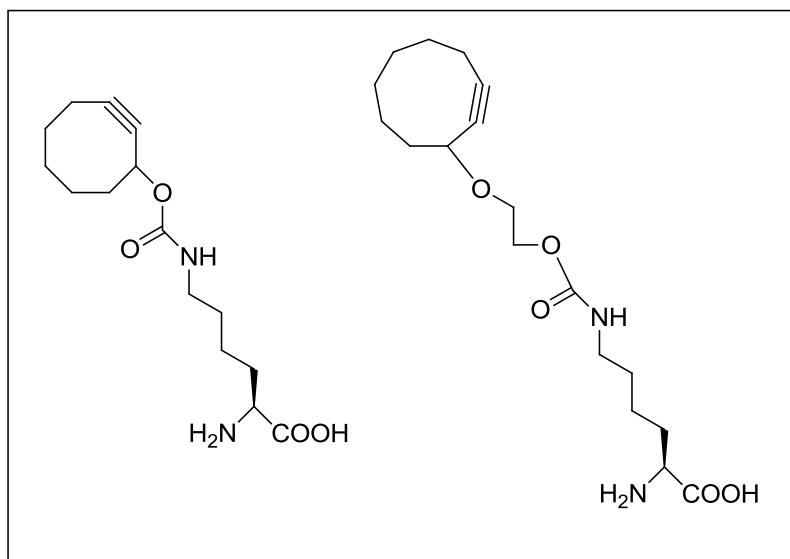
(i) PhNHNH₂, EtOH, AcOH, HCl, reflux; (ii) KOH, TBABr, H₂O, toluen, *n*-BuLi, Et₂O, TMSCl; (iii) *m*-CPBA, NaHCO₃, CH₂Cl₂; (iv) KHMDS, Tf₂O, THF; (v) Et₃N, CH₂Cl₂; (vi) CsF, CH₃CN

3. 2. 2 Biologická aktivita sloučenin připravených nekatalyzovanou click chemií

Click reakce mezi azidy a cykloalkyny snadno probíhá při použití cyklických systémů, ve kterých trojná vazby způsobuje velké pnutí a od toho tedy nazýváme tyto reakce jako strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC). Jejich vývoj je především zaměřen na značení cukrů, peptidů, nukleotidů a lipidů.

Tilman a jeho spolupracovníci³² se zabývají inkorporací nepřirozených aminokyselin (UAA) do nukleových kyselin. Cílená inkorporace UAA by měla fungovat tak, aby bylo možné pozměnit genetický kód tak, aby se produkovaly proteiny obsahující funkční skupiny cykloalkyn nebo azid. Vědci se zaměřili na genetické zakódování produkce cykloalkanových proteinů do *E.coli*. Proteiny produkované bakteriemi byly pomocí SPAAC chemie fluorescenčně vizualizovány. Tímto

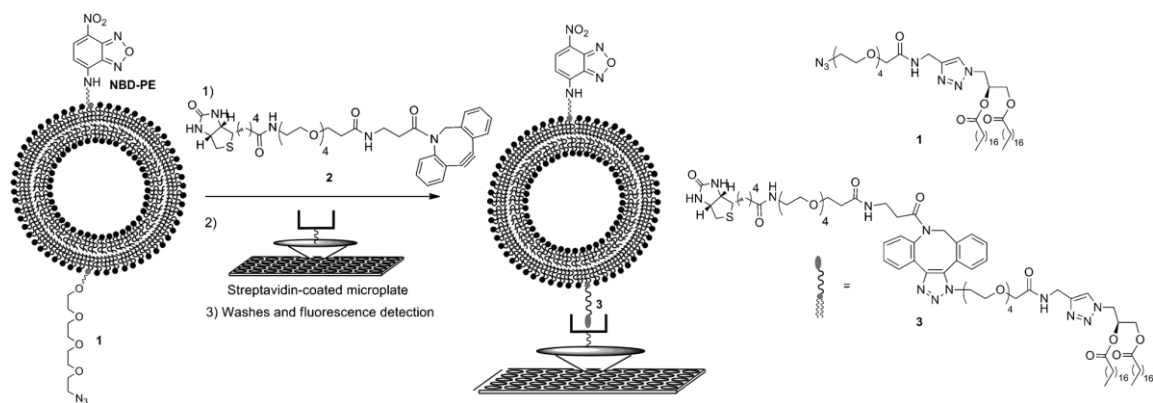
experimentem bylo zjištěno, že tato chemie může místně specificky a neinvazivně modifikovat proteiny v živých buňkách.



Obr. 12 Nepřirozené aminokyseliny

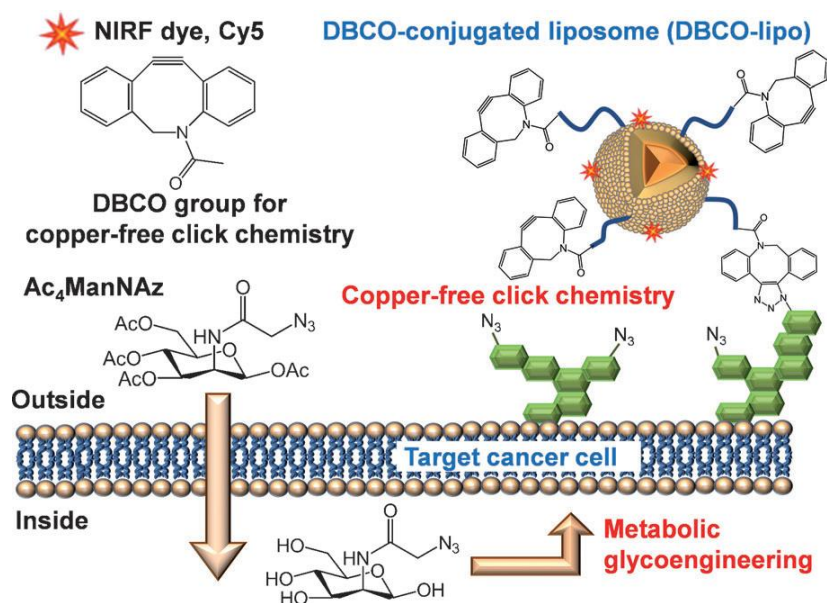
Nekatalyzované click reakce mohou být díky svým vlastnostem využívány jako značící sondy v PET zobrazovací technice.³³ PET, pozitron emisní tomografie, je rozšířenou technikou v boji proti různým chorobám, jako je Parkinsonova choroba a rakovina. Na tento výzkum se zaměřili např. Evans a spol., kteří nechali reagovat radio značený azid, [¹⁸F]-2-fluoroethylazid, s různými cyklooktyny, z nichž jako nejlepší se jevil TMDIBO. V dnešní době právě probíhá výzkum kombinace tohoto azidu s TMDIBO pro in vivo testování určitých druhů rakoviny v PET zobrazování.

Click nekatalyzovaná chemie byla využita i pro derivatizaci a imobilizaci membránové dvojvrstvy.³⁴ K vyhodnocení této derivatizace bylo použito mikrodestičky potažené streptavidinem. V článku se uvádí konverze azido-lipid konjugátu připojeného na liposom s činidly dibenzocyklooktynu. Imobilizace a derivatizace liposomu se měřila pomocí fluorescence.



Obr. 13 Schéma derivatizace a imobilizace liposomu na streptavidin potažené mikrodestičce³⁴

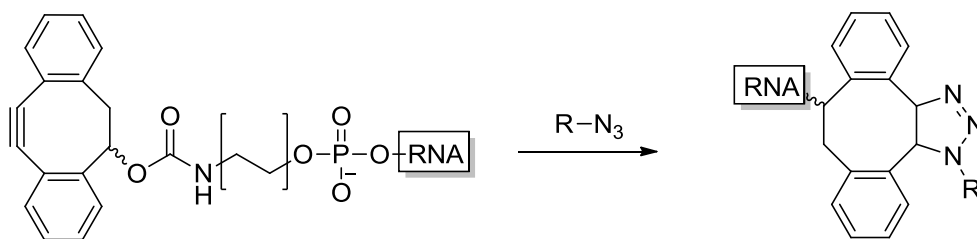
V dnešní době velmi populární věda o nanomateriálech se nevyhla ani oblasti Cu-free click reakcí. Korejští vědci prezentují úspěšné výsledky v nové in vivo strategii v cílení nanočástic použitím právě Cu-free click reakce.³⁵ Nepřirozené sialové kyseliny nesoucí azid byly vpraveny do rakovinové buňky, kde dochází k metabolickému glykoinženýrství a výsledné metabolity se agregují na povrchu buňky. Jako nanočástici nesoucí cyclooktynový systém použili PEG liposom, který je modifikován DBCO. Ke spojení obou systémů za pomoci click reakce tak dochází na buněčném povrchu kancerogenní buňky. In vivo studie byly prováděny na myších modelech. Tato studie ukazuje, že tento postup je uplatitelný pro intracelulární transport léčiv. V dalším výzkumu je možné zvýšit účinnost na základě vývoje nových bioorthogonálních skupin s vyšší reaktivitou.



Obr. 14 Ilustrace in vivo značení rakovinových buněk nanočásticemi pomocí Cu-free click chemie³⁵

Modifikace nukleových kyselin s oligonukleotidy, které nesou nějaký reportér, se může využívat v oblasti diagnostiky, např. fluorescenční značení. Click chemie se také využívá pro syntézu konjugátů oligoribonukleové kyseliny použitím cyklooktyn fosforamidátů.³⁶ 16-Mer RNA substituovaný příslušným cyklooktynem byl připraven syntézou na pevné fázi. Cykloadicí alkynu s azidem nesoucí zbytek hyaluronové kyseliny a penetratinu vznikají dané konjugáty RNA. Tyto konjugáty se mohou využívat jako značící sondy.

Schéma 23: Příprava konjugátů RNA



R = tetramer hyaluronové kyseliny, penetratin

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Jak už bylo výše psáno, věnovali jsme se přípravě 5'-azidonukleosidů, které jsme dále použili pro vznik triazol derivátů v poloze 5' pomocí katalyzované a nekatalyzované click chemie.

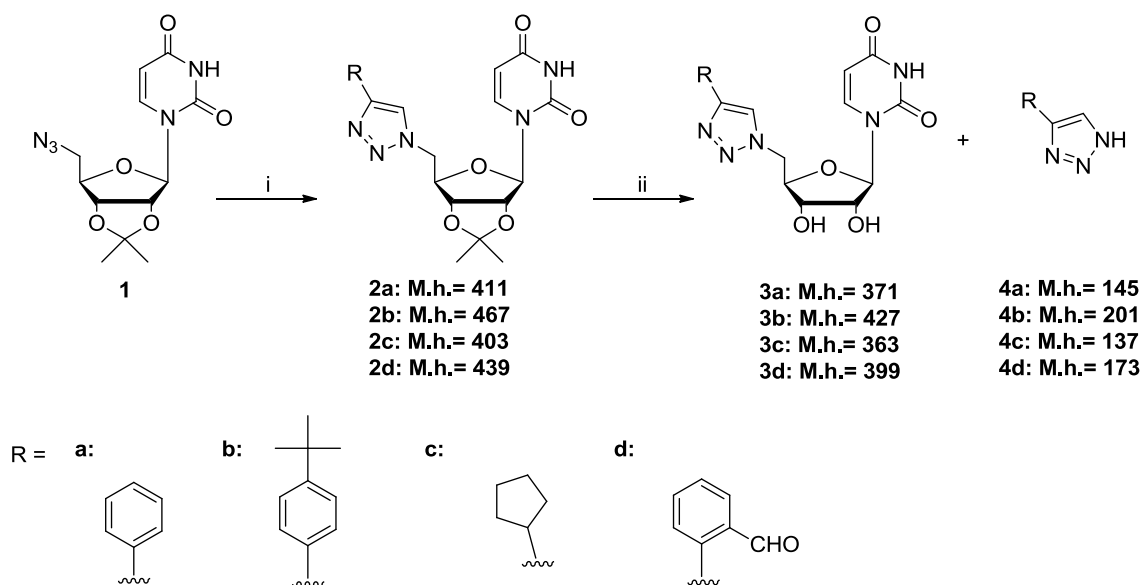
4.1 Katalyzované click reakce

4.1.1. Příprava a studium 5'-triazol-1-yl-uridinu

4.1.1.1. Příprava z 5'-azido-2',3'-O-isopropylidenuridinu

Při přípravě 5'-triazol-1-yl-uridinů **3a-d** jsme vycházeli z 5'-azidouridin ketalu **1** připraveného podle postupu uvedeného v bakalářské práci.⁸ Následně byl tento azid reagován s příslušnými acetyleny za katalýzy síranu měďnatého a askorbátu sodného při 50°C za vzniku cílových triazolderivátů. Takto vzniklé triazoly byly izolovány z reakční směsi rozmícháním s vodou, čímž došlo k odstranění anorganických solí, a následně byla provedena filtrace. Dalším krokem bylo odstranění isopropyliden protekční skupiny 70%-ním vodným roztokem trifluoroctové kyseliny za laboratorní teploty, jak je popsáno v literatuře³⁷. V tomto kroku docházelo k částečnému štěpení triazolového zbytku **4a-d**, který byl identifikován na základě LC/MS (Schéma 24).

Schéma 24: Příprava derivátů 5^c-triazoluridinu



(i) CuSO_4 , askorbát sodný, DMF, 50°C, 2h; (ii) 30% TFA, rt, ON

Naše snaha předejít tomuto štěpení, byla směřována na působení různých koncentrací roztoku TFA (Tab.1), a také na možnost použití jiných kyselin (Tab. 2).

V 30%-ním roztoku TFA vznikal triazolový derivát **4** obecně v nejmenším zastoupení. Velké rozdíly byly pozorovány v závislosti na substituci triazolu. Zatímco u sloučeniny **3c** vznikalo jen asi 2% odštěpeného triazolu **4c**, při deprotekcí sloučeniny **3d** až 47% odštěpeného triazolu **4d**. Se vzrůstající koncentrací TFA docházelo k nárůstu štěpného produktu **4** a v případě sloučenin **2c** a **2d** k neúplnému zreagování výchozí látky.

Tabulka č. 1 : Deprotekce TFA v daných koncentracích

Reakce derivátu	M.W.	Čistota podle LC/PDA			
		30% TFA	50% TFA	70% TFA	Konc. TFA
2a	370 (M-1) 3a	73%	53%	51%	42%
	144 (M-1) 4a	27%	47%	49%	58%
2b	426 (M-1) 3b	67%	55%	52%	47%
	200 (M-1) 4b	33%	45%	48%	53%
2c	362 (M-1) 3c	98%	97%	95%	75%
	136 (M-1) 4c	2%	3%	3%	8%
	402 (M-1) 2c	-	-	2%	17%
2d	398 (M+1) 3d	53%	66%	51%	52%
	414 (M+1) ?	-	26%	31%	18%
	172 (M-1) 4d	47%	5%	6%	5%
	440 (M+1) 2d	-	2%	12%	22%

Deprotekce dalšími dostupnými kyselinami byly studovány zatím jen na jediné látce **2b**, kterou jsme vybrali jako modelovou. Sloučenina **2b** byla podrobena reakci s třemi různými kyselinami o různých koncentracích přes noc. Experimenty ukázaly vznik produktu **3b**, pokaždé v nižší čistotě, současně se vznikem štěpného produktu **4b** a také vznik dvou dalších látek, jejichž molekulovou hmotnost nebylo možné odečíst z důvodu špatné ionizace (Tab. 2). Záměr posunout syntézu ku prospěchu produktu **3b** byl neúspěšný. Pro deprotekcí uridinu jsme proto zvolili původní roztok 30% TFA, kdy odštěpeného triazolu vznikalo nejméně.

Tabulka č.2: Deprotekce dalšími kyselinami

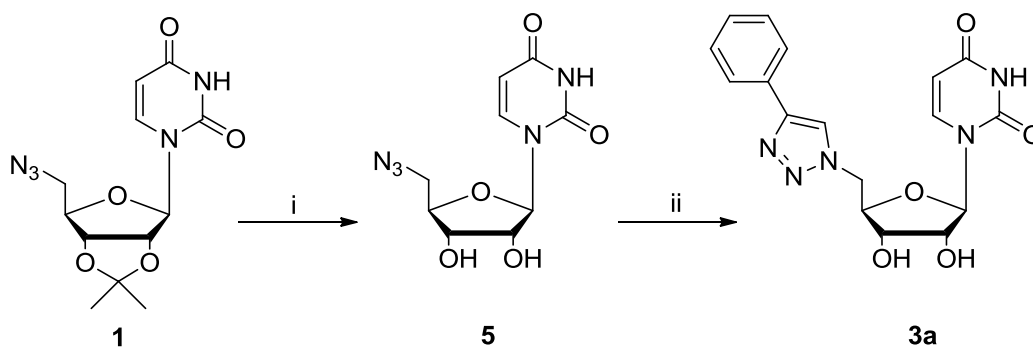
Kyselina	Čistota			
	3b	4b	?	?
HCl 1:1	35%	35%	14%	15%
H₂SO₄ 50%	52%	39%	6%	3%
H₂SO₄ 10%	27%	53%	-	20%
TFA 20%	42%	51%	7%	-
Konc. HCl	36%	35%	9%	11%

Sloučeniny **3a-d** a **4a-d** byly přečištěny na semipreparativním HPLC. U sloučenin **3a-3d** byla potvrzena struktura pomocí NMR. Podle NMR jsou látky čisté, výjimkou je derivát **3d**, který vzniká ve směsi s další látkou, která nebyla identifikována. Deriváty **4a-c** byly izolovány ve velmi malém množství, ze kterého se nepodařilo potvrdit strukturu pomocí NMR. Deriváty **3a-c** byly podrobeny studiu fluorescenčních vlastností, které by mohly naznačit jejich budoucí použití jako fluorescenčních značek. Dále jsme se pokusili u derivátů **3a-c** stanovit pK pomocí UV/VIS spektrometrie a hodnotu logP pomocí UV-VIS spektrometrie, což jsou důležité parametry pro vývoj látek směřujících ke studiu uvnitř buněčného systému. Sloučenina **4d** nebyla izolována z důvodu rozkladu směsi během přípravy vzorku na HPLC. Z časových důvodů nebylo možné reakci opakovat.

4.1.1.2. Příprava z 5'-azidouridinu

5'-azidouridin **5** jsme připravili z příslušného 5'-azido-2',3'-O-isopropyliden uridinu **1** reakcí s 30%-ním roztokem TFA za laboratorní teploty přes noc. Následně byla provedena zkušební "click" reakce v analytickém množství.⁸

Schéma 25: Příprava 5'-triazol uridinu



(i) 30% TFA, rt, ON; (ii) fenylacetylen, askorbát sodný, CuSO₄·H₂O, isopropanol/voda 1:1, 50°C, 3h

Tato reakce byla pouze zkušební. Zjistili jsme, že i na ochráněném uridinu **5** probíhají katalyzované "click" reakce ve výtěžku 93% v 70%-ní čistotě, která byla určena

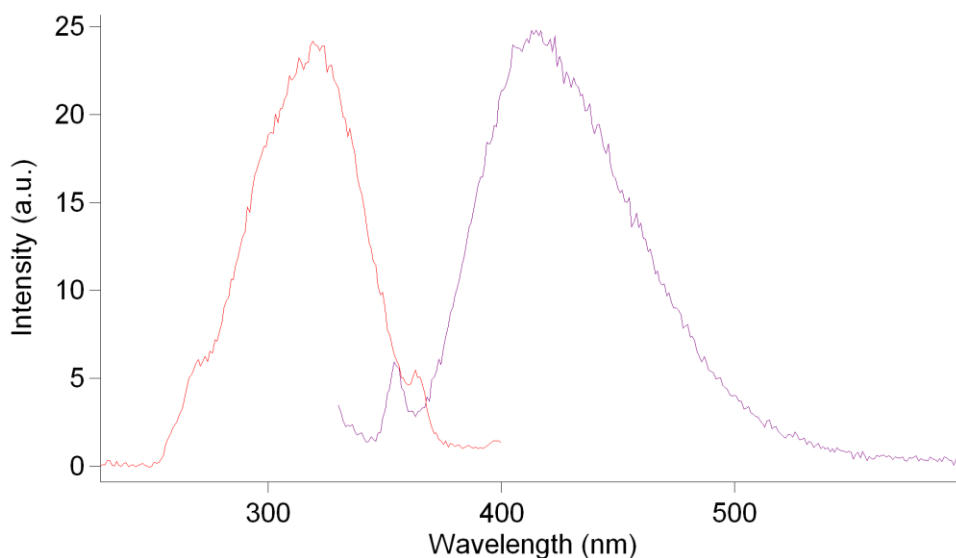
pomocí LC/MC. Jelikož zde nedochází k hydrolýze tento postup by mohl být do budoucna lepší pro přípravu látek **3**.

4.1.1.3. Fluorescence, logP, UV-VIS a pK derivátů 5'-triazol-1-yl-uridinu

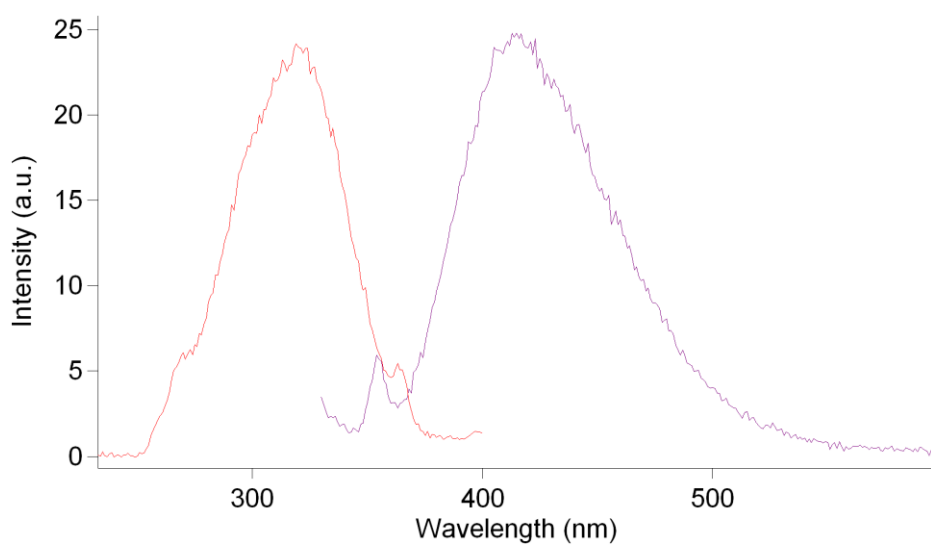
Fluorescence

Fluorescenční vlastnosti derivátů **3a-c**, byly nejprve měřeny v dimethylsulfoxidu, jako rozpouštědlo zaručující nejlepší rozpustnost těchto derivátů. Při porovnání jednotlivých derivátů se jako nejlepší látka vykazující nejvyšší intenzitu fluorescence ukázala sloučenina **3a**. Přesto i u této sloučeniny byla intenzita fluorescence příliš nízká pro relevantní stanovení kvantového výtěžku. Pro budoucí studium z toho plyne pozitivní závěr, že fluorescence triazolového derivátu bude dána pouze intenzitou fluorescenční sloučeniny použité namísto substituentu R (Schéma 23).

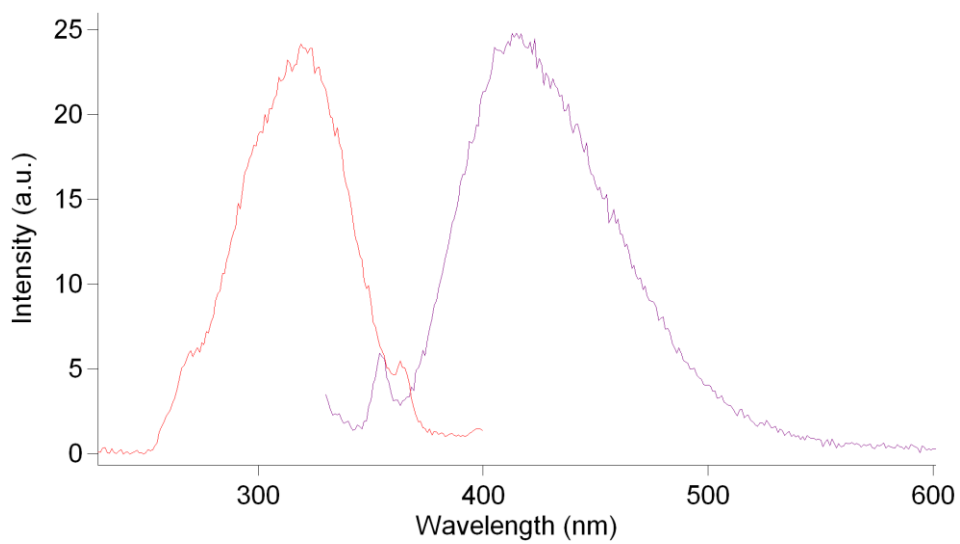
Graf 1: Fluorescence látky **3a**



Graf 2: Fluorescence látky **3b**



Graf 3: Fluorescence látky **3c**



LogP

Pro stanovení hodnoty-parametru logP jsme použili zásobní roztok látek **3a-c** v methanolu o výchozí koncentraci 1mg/1ml, který byl naředěn do 0,1M fosfátového pufru o pH 7,4 na finální koncentraci 0,5mg/1ml. Roztok byl třepán přes víkend se stejným objemem 1-octanolu. Po třepání bylo nutné provést centrifugaci, aby došlo k dokonalému rozdělení vrstev. Distribuce látek mezi jednotlivá rozpouštědla byla stanovena na základě změřených absorbancí před a po třepání z vodné vrstvy roztoku. Bohužel podle zjištěných absorbancí látky vůbec do oktanolové vrstvy nepřešly. Tento experiment nebyl prováděn u látky **3d**, jelikož není čistá. V blízké budoucnosti se tímto experimentem budeme nadále zabývat.

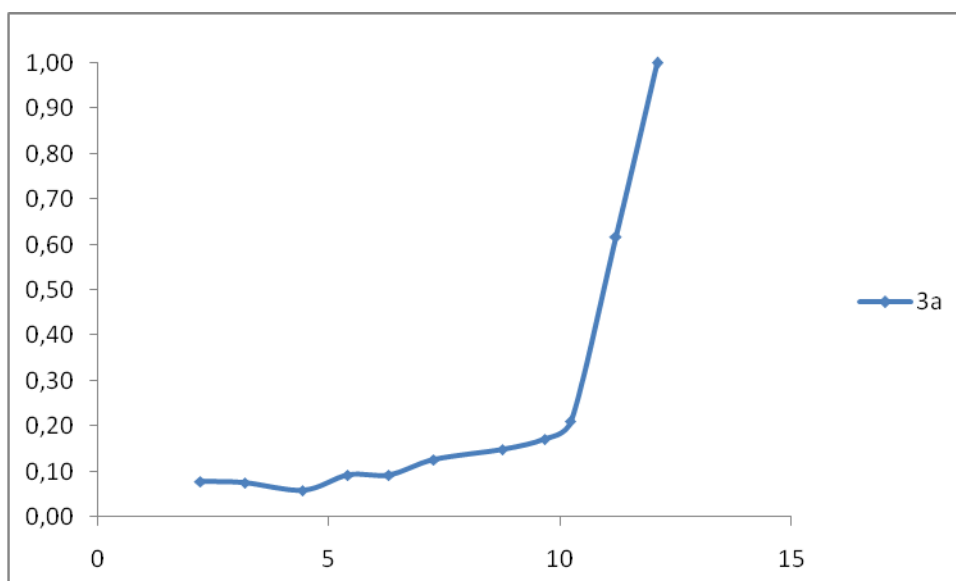
UV-VIS a pK

U sloučenin **3a-c** jsme se pokusili stanovit hodnotu pK za pomoci UV-VIS spektroskopie. UV-VIS spektra studovaných látek byla změřena při hodnotách pH 2.2, 3.2, 4.4, 5.4, 6.3, 7.3, 8.8, 9.7, 10.2, 11.2, 12.1.

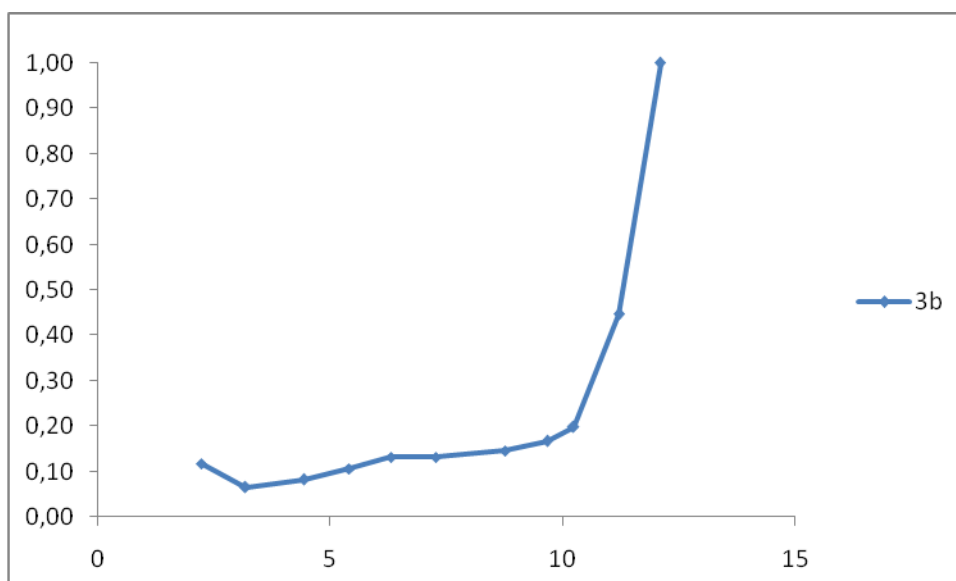
Přesnou hodnotu pK se nepodařilo z UV/VIS grafu odečíst, jelikož v alkalické oblasti nedochází k limitaci hodnoty absorbance. UV/VIS spektra je proto nutné doměřit ještě za vyšších hodnot pH.

Otázkou rovněž zůstává, zda z naměřených grafů bude možné při přesnějším měření zachytit všechny tři inflexní body kolem pH 5, 7 a 12 odpovídající hodnotám všech tří pK, tak jak je nepatrně naznačeno na grafech látek **3a** a **3c**.

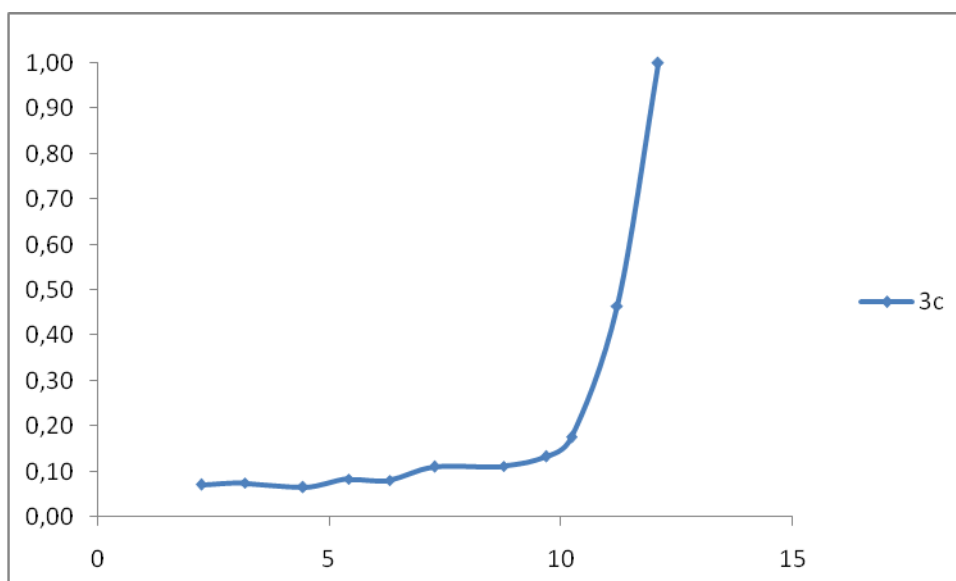
Graf 4: Graf závislosti absorpance na pH při 198nm látky **3a**



Graf 5: Graf závislosti absorpance na pH při 222nm látky **3b**



Graf 6: Graf závislosti absorpance na pH při 198nm látky **3c**



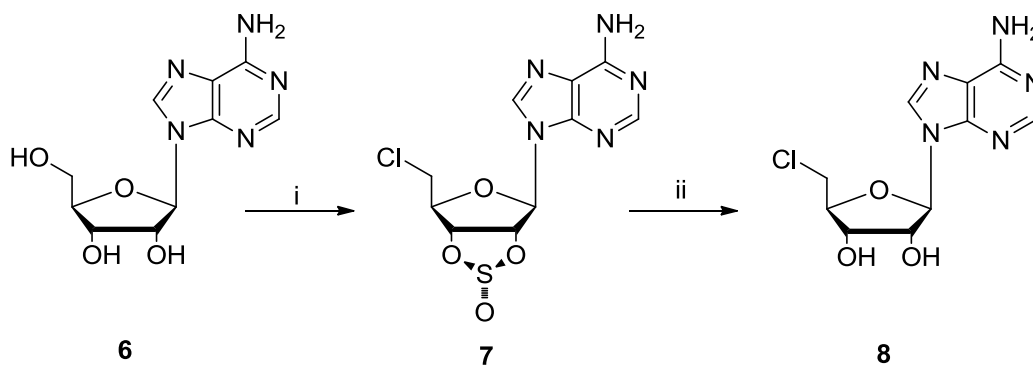
4.1.2. Příprava a studium 5'-triazol-1-yl-adenosinu

4.1.2.1. Příprava z 5'-azido-2',3'-O-isopropylidenadenosinu

Podobně jako v případě uridinového derivátu jsme se chtěli pokusit porovnat reakci isopropylidenového derivátu a nechráněného ribosidu odvozeného od adenosinu.

Byla vybrána varianta přeměny hydroxyskupiny v poloze 5' na halogenderivát, který by pak mohl reagovat s azidem sodným. Příprava 5'-chlorderivátu je v literatuře popsána přímou reakcí s thionylchloridem³⁸ (Schéma 26). Nicméně, i když touto reakcí požadovaný produkt vzniká, výtěžky jsou nízké a látka je obtížně čistitelná.

Schéma 26: Příprava 5'-chlorderivátu podle literatury



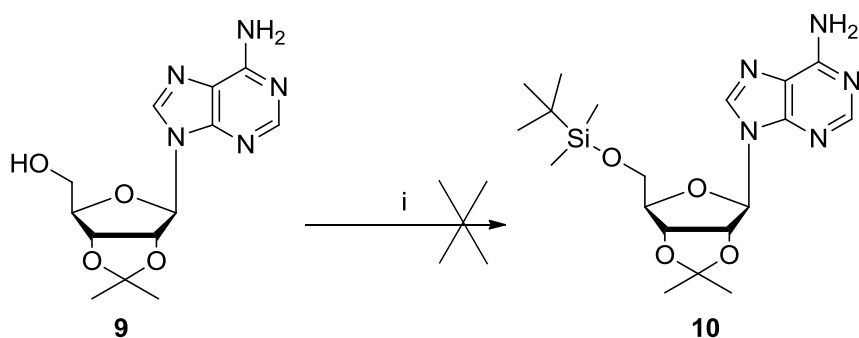
(i) SOCl₂, Py, MeCN; (ii) NH₃, H₂O, MeOH

Jelikož problém v přítomnosti nečistot byl pravděpodobně způsoben reaktivitou aminoskupiny v poloze 6, chtěli jsme porovnat reaktivitu adenosinového derivátu s ochráněnou N⁶-aminoskupinou. Jako chránící skupinu jsme chtěli použít benzoyl, benzensulfonyl a fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc).

Před zavedením chránící skupiny na dusík v poloze 6 jsme nejprve museli ochránit hydroxyl v poloze 5'.

K tomuto účelu jsme využili postupu popsaného v literatuře³⁹, kdy 2',3'-*O*-isopropylidenadenosin **9** reaguje s TBDMSCl v suchém DMF (Schéma 26). Tato reakce byla bohužel neúspěšná. Podle LCMS produkt **10** vznikal v 5% čistotě a v reakční směsi se vyskytovala převážně výchozí látka.

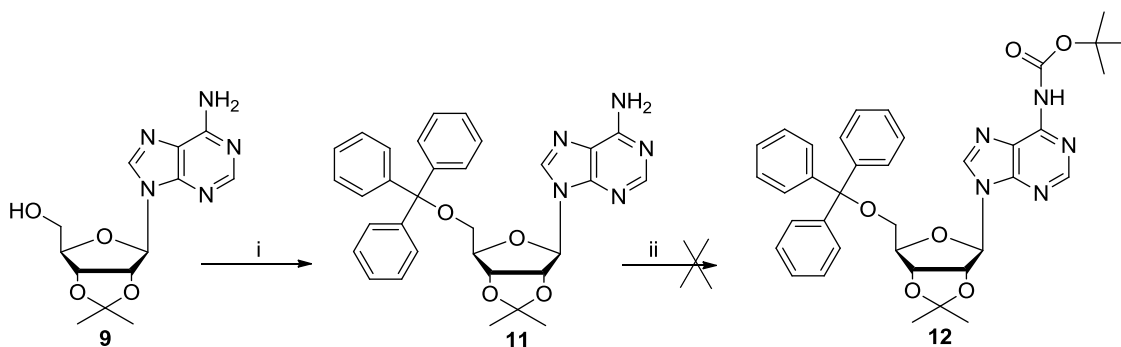
Schéma 27: Příprava 5'-*tert*-butyldimetylsilyl derivátu adenosinu



(i) 2',3'-O-isopropylidenadenosin, imidazol, TBDMSCl, dry DMF, 0°C - rt, 2 h – ON, N₂

Jelikož byla předchozí reakce neúspěšná, vyzkoušeli jsme další způsob protekce. Opět se vycházelo z adenosin ketalu **9**, který reagoval s trityl chloridem v pyridinu při laboratorní teplotě pod dusíkem. Produkt **11** vznikal podle LCMS v 48% a směs také obsahovala kation tritylu s molekulovou hmotností 243 v 28%, zbytek tvořila výchozí látka. Dále jsme zkusili reakci provést při 60°C po dobu 7 hodin⁴⁰. Po zahřátí vznikal produkt **11** v 55% čistotě. Po odpaření byl derivát **11** vystaven podmínkám popsáných v literatuře⁴⁰, kdy měl vzniknout příslušný N⁶-chráněný derivát **12** (Schéma 28).

Schéma 28: Příprava derivátu 5'-trityl-N⁶-substituovaného adenosinu



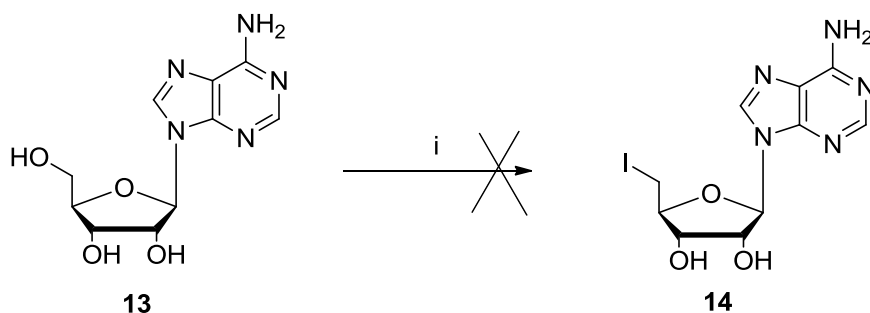
(i) 2',3'-O-isopropylidenadenosin, TrCl, pyridin, N₂, RT; (ii) Boc₂O, DMAP, Et₃N, DMF, N₂, 0°C, 4h

Bohužel pokus připravit N⁶-chráněný adenosin derivát **12** byl neúspěšný. Prozatím byl tento výzkum pozastaven.

4.1.2.2. Příprava z adenosinu

Jako prekurzor pro vznik azidoadenosinu jsme se pokusili připravit 5'-iodadenosin **14**. Vycházeli jsme z postupu uvedeném v literatuře.⁴¹ Komerčně dostupný adenosin **13** byl rozpuštěn s PPh₃, iodem a imidazolem v suchém THF. Reakce byla míchána přes noc za laboratorní teploty (Schéma 29). Podle LCMS reakční směs obsahovala 8% produktu. Množství produktu se nepodařilo zvýšit ani přidavkem iodu ani prodloužením reakční doby.

Schéma 29: Příprava 5'-iodadenosinu



(i) I₂, PPh₃, imidazol, THF, rt, 4 dny

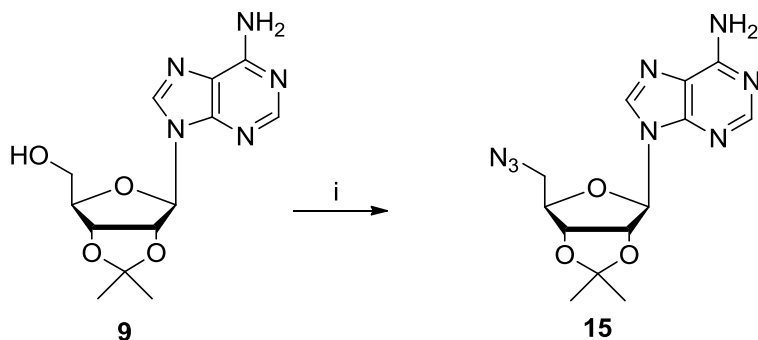
4.1.2.3. Příprava 2',3'-isopropyliden-5'-azidoadenosinu

2',3'-isopropyliden-5'-azidoadenosin **15** byl připraven Mitsunobu reakcí podle postupu popsaného v literatuře¹⁸ z 2',3'-isopropylidenadenosinu **9** s tím rozdílem, že bylo použito 2,5ekv. DPPA a byla změněna metoda purifikace (Schéma 30).

Pro čištění produktu jsme použili dle popsaného postupu mobilní fázi chloroform/metanol 12:1. V této mobilní fázi se nepodařilo produkt vyčistit od trifenyfosfin oxidu, který vzniká během reakce. Proto byly vyzkoušeny různé mobilní fáze pomocí TLC. Nejvhodnější se jevila směs chloroform/etylacetát 1:1. Tato mobilní fáze byla použita pro přečištění produktu na koloně, kde jsme se zbavili nečistot s retenčním časem 0,8-0,9, což odpovídá trifenyfosfin oxidu. Při této separaci produkt zůstává na koloně i s dalšími nečistotami, jako je výchozí nezreagovaná látka. Poté byla kolona promyta methanolem a eluát byl odpařen dosucha. K odparku byla přidána mobilní fáze chloroform/methanol 12:1, kdy docházelo k vysrážení nežádoucích látek,

kterých jsme se zbavili filtrací. Filtrát, který obsahoval převážně žádoucí produkt **15**, byl přenesen na kolonu a přečištěn v mobilní fázi chloroform/methanol 12:1. Celkový výtěžek po tomto procesu byl 49%.

Schéma 30: Příprava 5'-azido-2',3'-*O*-isopropylidenadenosinu

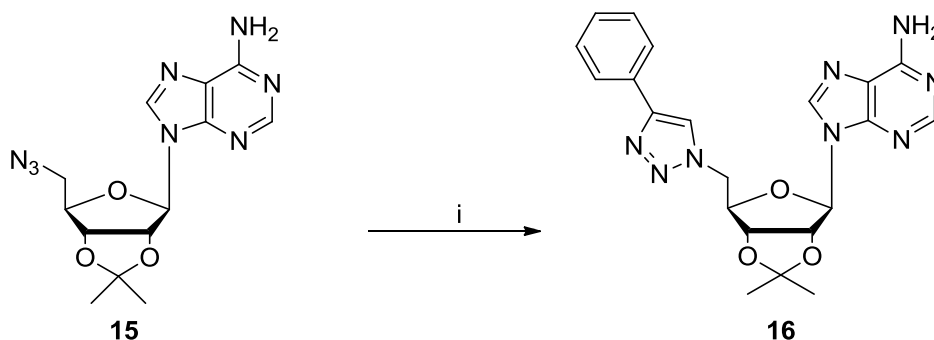


(i) DPPA, DIAD, PPh₃, THF, rt

4.1.2.4. Příprava derivátů 2',3'-isopropyliden-5'-(1,2,3-triazol-1-yl)adenosinu

Na připraveném 5'-azido adenosinu **15** byla vyzkoušena katalyzovaná “click” reakce.⁸ 5'-azidoadenosin byl rozsuspenzován v roztoku isopropanol/voda 1:1, k němuž bylo přidáno katalytické množství CuSO₄·H₂O, askorbátu sodného a fenylacetylen. Reakce probíhala při 50°C. Po hodině byla výchozí látka zcela odreagována a jako produkt byl podle LC/MS identifikován triazol **16**.

Schéma 31: Příprava substituovaného 5'-(1,2,3-triazol-1-yl)adenosinu



(i) fenylacetylen, CuSO₄·H₂O, askorbát sodný, isopropanol/voda 1:1, 50°C, 1 h

Tato reakce byla jako zkušební provedena pouze v analytickém množství. Látka proto nebyla izolována a plně charakterizována. V blízké budoucnosti se jí budeme nadále věnovat.

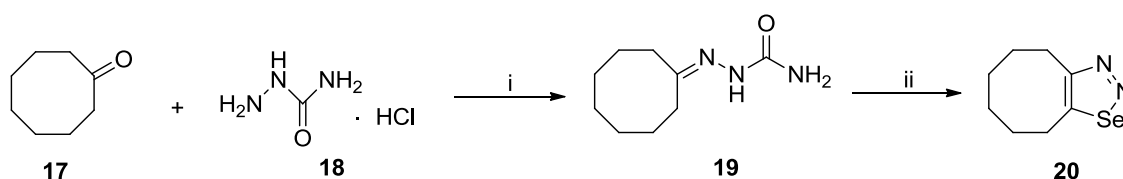
4.2 Nekatalyzované click reakce

Jako nekatalyzované click reakce jsme v této diplomové práci zkoušeli cykloadiční reakci mezi azidy a cyklooktynem generovaným in-situ z cyklooktaselenadiazolu. Tato reakce objevená nedávno⁹ byla studována za použití vysokých teplot na azidových derivátech 5-methyluridinu.

4.2.1. Příprava selendiazol cyklooktynu

Selen diazol cyklooktyn **20** byl připraven podle postupu popsáno v literatuře⁹ za vzniku semikarbazonu **19**, který dále reagoval s oxidem seleničitým při laboratorní teplotě za vzniku selendiazol cyklooktynu **20** ve výtěžku 93%.

Schéma 32: Příprava selen diazol cyklooktynu

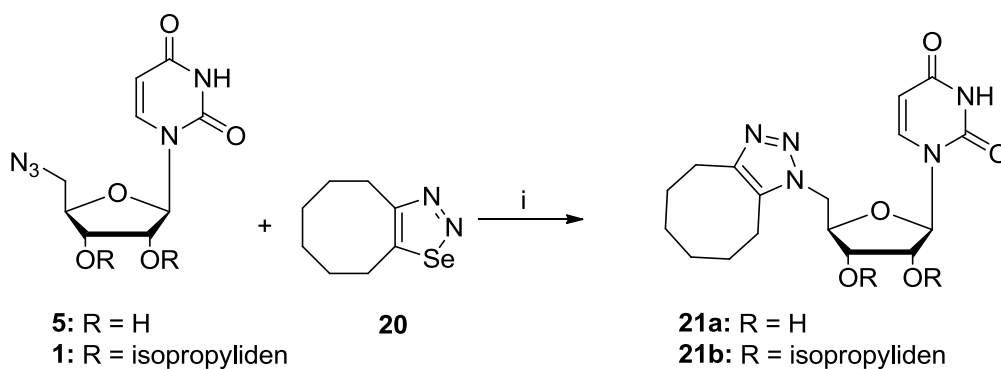


(i) octová kyselina/voda 1:1, rt, 2h; (ii) SeO₂, octová kyselina, rt, 2h

4.2.2 Příprava triazol derivátů

Nekatalyzované click-reakce s cyklooktaselendiazolem byly provedeny na 5'-azido-2',3'-isopropyliden uridinu **1**, 5'-azidouridinu **5** a 5'-azido-2',3'-isopropylidenadenosinu **15**. Byla zkoumána jejich konverze se selendiazol cyklooktynem v N-methyl-pyrolidinu (NMP) při různých teplotách a následně za pomoci mikrovlnného záření.⁹

Schéma 33: Příprava 5'-(cykloocta-1,2,3-triazol-1-yl)uridin derivátů

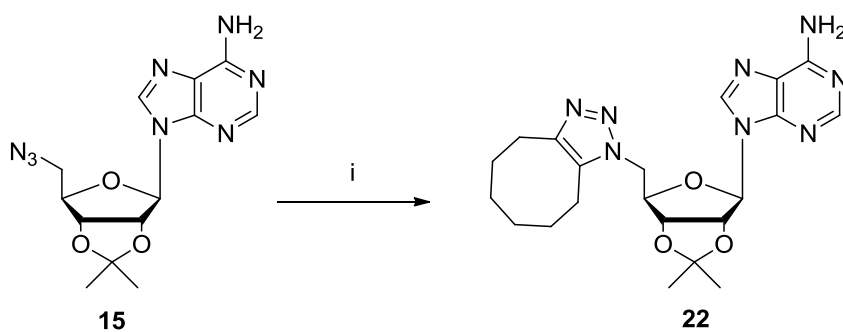


(i) selendiazol cykloooktyn, NMP, Δ t

Při 180°C byl chráněný uridin **1** přeměněn na derivát **21b** během 10 minut. Se snižováním teploty se reakční doba prodlužovala až na více než 72 hodin, což odpovídá teplotě 90°C. U ochráněného uridinu **5** byl průběh konverze téměř analogický kromě teploty 130°C, kdy reakce trvala 5 hodin (Tabulka 3).

Derivát adenosinu **15** reagoval analogicky jako ochráněný uridin, nicméně reakční doba při 130°C se prodloužila o jednu hodinu (Schéma 34).

Schéma 34: Příprava 5'-(cykloocta-1,2,3-triazol-1-yl)2',3'-*O*-isopropylidenadenosinu



(i) selendiazol cykloooktyn, NMP, Δ t

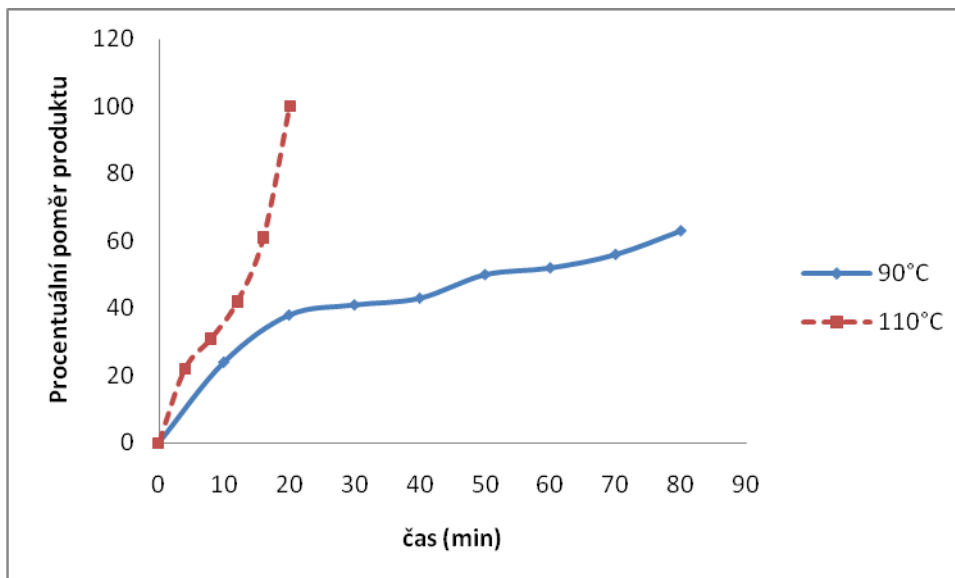
Tabulka 3: Závislost reakční doby na teplotě příslušných derivátů

Teplota	Reakční doba 100% konverze		
	21a	21b	22
90°C	>75 h	>72 h	>72 h
110°C	overnight	overnight	overnight
130°C	5 h	overnight	6h
150°C	90 min	90 min	80 min
180°C	10 min	10 min	10 min

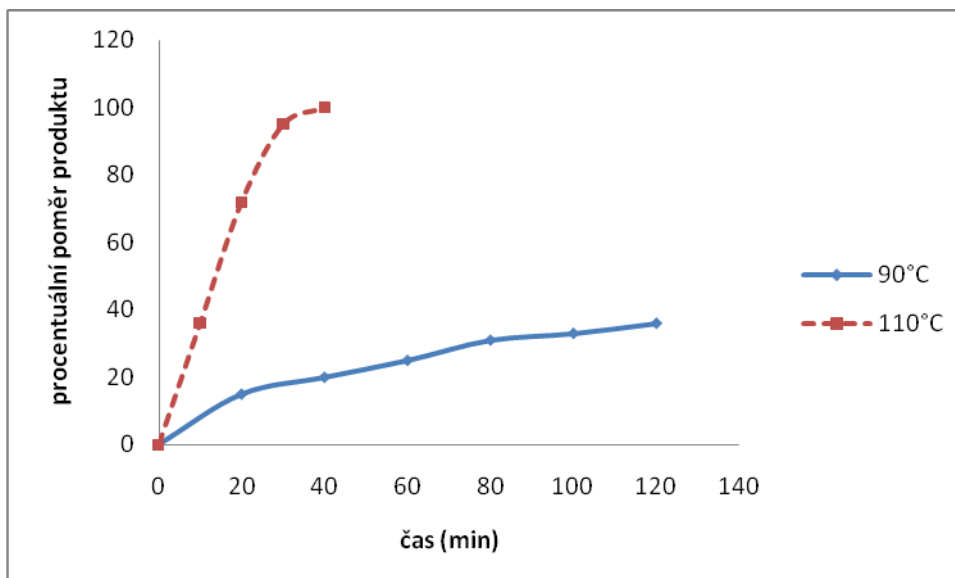
Produkty byly následně zlyofilizovány. Produkt **21b** byl přečištěn na HPLC. Odparky **21a** a **22** byly extrahovány vodou, zfiltrány a usušeny. Produkty **21a**, **21b**, **22** byly identifikovány pomocí LCMS. Produkt **21a** byl také identifikován pomocí NMR.

Z důvodu zkrácení reakční doby při nižších teplotách, jsme se rozhodli provést reakci za asistence mikrovlnného záření. Reakce probíhaly při 50 W. Chráněný azidouridin **1** byl zreagován při 110°C za 40 minut (Graf 7). Zatímco, odchráněný azidouridin **5** při téže teplotě byl zreagován za 20 minut (Graf 8), tudíž jsme se rozhodli snížit teplotu na 90°C, kdy daný azidouridin **5** byl zreagován za 50 minut (Graf 8) a chráněný azidouridin **1** byl zreagován v 64% za 80 minut (Graf 7). Derivát adenosinu **15** byl vystaven stejným podmínkám jako u předchozích derivátů uridinu. Ukázalo se, že jeho reaktivita je mnohem nižší. Při 110°C byl za 90 minut zreagován pouze z 25% a při 90°C za 120 minut pouze z 11% (Graf 9). V dalším experimentu jsme zkusili ještě snížit teplotu na 70°C, což je teplota při které dochází k rozpletení šroubovice DNA/RNA, a mohla by tudíž tato reakce být využita pro značení jednotlivých vláken DNA, ale reakce po 2 hodinách nezačala ani probíhat. Podle LCMS všechny reakčních směsi obsahovaly nerozložený selendiazol. Konec reakce se dá dobře vizualizovat, díky měnící se barvě roztoku, ze světle hnědé až na tmavě hnědou či černou.

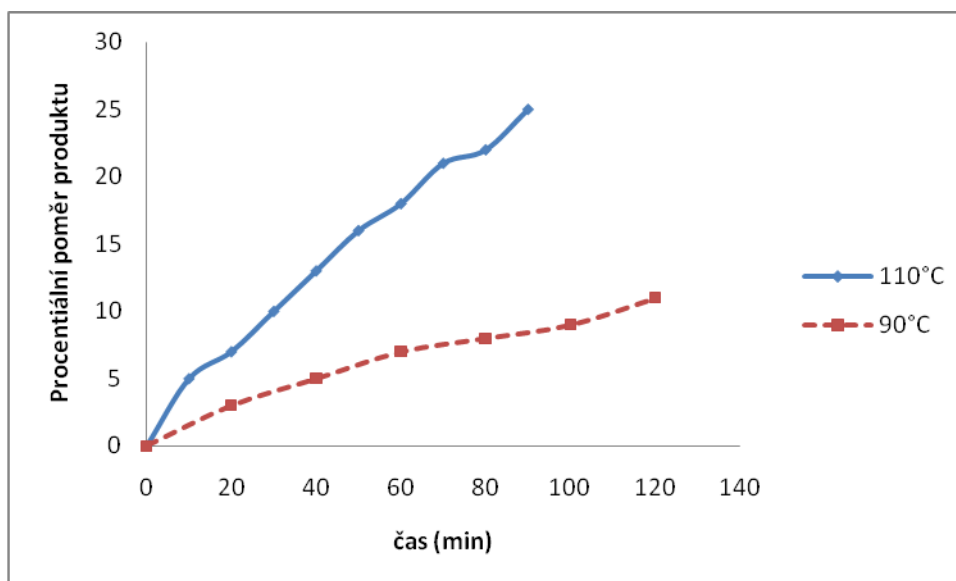
Graf 7: Závislost vznikajícího produktu **21a** na čase při 110°C a 90°C za použití mikrovlnného záření



Graf 8: Závislost vznikajícího produktu **21b** na čase při 110°C a 90°C za použití mikrovlnného záření



Graf 9: Závislost vznikajícího produktu **22** na čase při 110°C a 90°C za použití mikrovlnného záření



Z příslušných grafů je jasné, že adenosin reaguje pomaleji než deriváty uridinů. Reakci je možné urychlit, např. zvýšením výkonu mikrovlnky a tedy i možným snížením teploty. V blízké budoucnosti se tímto budeme nadále věnovat.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Metody

Měření NMR spekter bylo provedeno v roztoku DMSO – *d*6 na JEOL spektrometru (500 MHz). Hodnoty chemického posunu jsou udány v ppm jednotkách a jsou kalibrovány na zbytkový signál rozpouštědla, interakční konstanty jsou uvedeny v Hz. Měření hmotnostních spekter bylo realizováno na hmotnostním spektrometru Acquity UPLC (Waters) s PDA detektorem a kolonou X Select (HSS T3 2.5 mikronů, 3.0x50mm). Silikagel použitý při kapalinové chromatografii Silicagel 60 (0.04-0.063 mm) firmy Merck. LC preparativní chromatografie byla prováděna s využitím přístroje Sepacor (Büchi). Preparativní HPLC byla prováděna s využitím přístroje Breeze (Waters) a preparativní kolony YMC-Pack Pro C18 100x20 mm I.D. s-5 μ m, 12 nm. TLC chromatografie byla prováděna na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 F254 značky Merck. Lyofilizace byla prováděna na lyofilizátoru SCANVAC CoolSafe 110-4Pro. Fluorescenční spektra byla měřena na fluorescenčním spektrometru Cary Eclipse, Varian.

5.2. Příprava vzorků a měření fluorescence

Pro měření fluorescence jsme použili roztok látek **3a-c** v DMSO v přibližné koncentraci 4 mg/1 ml. Látky byly zředěny 10x dimethylsulfoxidem a přeneseny do fluorescenční kyvety. Poté bylo změřeno emisní a excitační spektrum látek.

5.3. Postup přípravy roztoků pro zjištění logP

Byl připraven zásobní roztok látek **3a-c** o koncentraci 1mg/1ml v ethanolu. Bylo odebráno 500 μ l a přidáno k 500 μ l fosfátového pufru o pH 7.4. 1 ml tohoto zásobního roztoku a 1 ml 1-oktanolu byly třepány 2 dny. Poté byla změřena absorbance vodné fáze před a po třepání.

5.4. Postup přípravy vzorků pro změření UV-VIS spekter

Byl připraven etanolový roztok látek **3a-c** o koncentraci 1mg/1ml. Dále byl připraven 0,01 M roztok KH_2PO_4 (základní pufr), roztok kyseliny fosforečné a roztok hydroxidu draselného. pH pufru bylo nastaveno pomocí přidavku kyseliny fosforečné či hydroxidu sodného na hodnoty 2.2, 3.2, 4.4, 5.4, 6.3, 7.3, 8.8, 9.7, 10.2, 11.2, 12.1. Následně bylo odebráno 4 μl roztoku látky a 396 μl pufru o daném pH do UV-VIS kyvety, a bylo změřeno UV-VIS záření látek při daných pH.

5.5. Postup odběru a analýzy při mikrovlnném záření

5'-Azido-deriváty **1**, **5**, **15** (10 mg) byly smíchány s cyklooktaselendiazolem **20** (30 mg; 0,1395 mmol) v NMP (5 ml). Reakční směs byla míchána za teploty 90°C a 110°C při 50 W. Z reakční směsi látek bylo odebráno 50 μl v daných časových intervalech a naředěno methanolem na objem 1 ml. Poté bylo změřeno LC/MS spektrum každého odebraného podílu a vyneseny křivky v závislosti procentuálního poměru produktu (velikost plochy píku při PDA odezvě detektoru) k reakčnímu času.

5.6. Přípravy

5'-(4-fenyl-1,2,3-triazol-1-yl)uridin (**3 a**)

- a) 5'-azido-2',3'-isopropylidenuridin **1** (103 mg, 0.33 mmol) byl suspendován ve směsi isopropanol/voda 1:1 (4 ml). K roztoku byl přidán pentahydrát síranu měďnatého (30 mg, 0.12 mmol), askorbát sodný (41 mg, 0.21 mmol) a fenylacetylen (0.1 ml, 0.83 mmol). Vše bylo mícháno 2 hodiny při 50°C. Po odpaření byla k produktu přidána voda, vzniklá sraženina byla zfiltrována a usušena. Produkt **2a** byl získán ve formě žlutého prášku. Výtěžek 67,4 mg (49%).
- b) Derivát **2a** (100 mg, 0.24 mmol) byl rozpuštěn v 5 ml 30% TFA a směs byla míchána za laboratorní teploty přes noc. Produkt byl odpařen pod dusíkem. Výtěžek surového produktu 179 mg (198%). Poté přečištěn na HPLC v gradientu acetonitril/acetátový pufr

z 20% do 50% acetonitrilu během 5 minut. Produkt byl získán ve formě světle zeleného prášku. MS m/z pro C₁₇H₁₇N₅O₅: 371.35, nalezeno 370 [M-1].

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8.44 (s, 1 H) 7.76 (d, *J*=7.4 Hz, 2 H) 7.35 - 7.46 (m, 3 H) 7.29 (t, *J*=6.3 Hz, 1 H) 5.44 - 5.73 (m, 4 H) 4.58 - 4.75 (m, 2 H) 4.17 (br. s., 1 H) 3.99 (m, 2 H)

¹³C NMR 163.82; 151.10; 147.03; 141.64; 130.80; 129.53; 128.65; 125.71; 122.74; 102.58; 89.50; 82.06; 72.64; 70.95; 51.87

5'-(4-(4-*tert*-butylfenyl)-1,2,3-triazol-1-yl)uridin (**3 b**)

a) 5'-azido-2',3'-isopropylidenuridin (111 mg, 0.36 mmol) byl suspendován ve směsi isopropanol/voda 1:1 (4 ml). K roztoku byl přidán síran měďnatý pentahydrát (41 mg, 0.16 mmol), askorbát sodný (37 mg, 0.19 mmol) a 4-*tert*-butylfenylacetylen (0.16 ml, 0.84 mmol). Vše bylo mícháno 2 hodiny při 50°C. Po odpaření byla k produktu přidána voda, vzniklá sraženina byla zfiltrována a usušena. Produkt **2b** byl získán ve formě zeleného prášku. Výtěžek 130,7 mg (78%).

b) Derivát **2b** (96.4 mg, 0.21 mmol) byl rozpuštěn v 5 ml 30% TFA a směs byla míchána za laboratorní teploty přes noc. Produkt byl odpařen pod dusíkem. Výtěžek surového produktu 114 mg (130%). Poté přečištěn na HPLC v gradientu acetonitril/acetátový pufr z 10% do 40% acetonitrilu během 6 minut. Produkt byl získán ve formě světle zeleného prášku. MS m/z pro C₂₁H₂₅N₅O₅: 427.35, nalezeno 426 [M-1].

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8.46 (s, 1 H) 7.72 (d, *J*=8.0 Hz, 2 H) 7.50 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 7.42 (d, *J*=8.0 Hz, 2 H) 5.71 (d, *J*=5.2 Hz, 1 H) 5.55 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 5.49 (d, *J*=5.2 Hz, 1 H) 5.38 (d, *J*=5.2 Hz, 1 H) 4.61 - 4.76 (m, 2 H) 4.15 - 4.21 (m, 1 H) 4.02 - 4.08 (m, 1 H) 3.94 - 4.01 (m, 1 H) 1.26 (s, 9 H)

¹³C NMR 163.52; 151.15; 150.94; 146.92; 141.66; 128.35; 126.16; 125.51; 122.31; 102.56; 89.38; 82.19; 72.60; 71.07; 51.91; 34.88; 31.59

5'-(4-cyklopentyl-1,2,3-triazol-1-yl)uridin (3 c)

- a) 5'-azido-2',3'-isopropylidenuridin (100 mg, 0.34 mmol) byl suspendován ve směsi isopropanol/voda 1:1 (4 ml). K roztoku byl přidán síran pentahydrát síranu měďnatého (56 mg, 0.22 mmol), askorbát sodný (40 mg, 0.20 mmol) a cyklopentyl acetylen (0.105 ml, 0.84 mmol). Vše bylo mícháno 2 hodiny při 50°C. Po odpaření byla k produktu přidána voda, vzniklá sraženina byla zfiltrována a usušena. Produkt **2c** byl získán ve formě oranžového prášku. Výtěžek 110,7 mg (85%).
- b) Derivát **2c** (93,8 mg, 0.23 mmol) byl rozpuštěn v 5 ml 30% TFA a byl míchán za laboratorní teploty přes noc. Produkt byl odpařen pod dusíkem. Výtěžek surového produktu 128,8 mg (153%). Poté přečištěn na HPLC v gradientu acetonitril/acetátový pufr z 30% do 60% acetonitrilu během 5 minut. Produkt byl získán ve formě světle zeleného prášku. MS m/z pro C₁₆H₂₁N₅O₅: 363, nalezeno 362 [M-1].

¹H NMR (DMSO-d₆, 500MHz): d = 7.77 (s, 1 H), 7.40 (d, *J*=8.0 Hz, 1 H), 5.69 (d, *J*=5.2 Hz, 1 H), 5.57 (d, *J*=8.0 Hz, 1 H), 4.57 (m, 2 H), 4.07 - 4.11 (m, 1 H), 3.98 (t, *J*=5.4 Hz, 1 H), 3.90 - 3.93 (m, 1 H), 3.04 (dt, *J*=15.6, 7.9 Hz, 1 H), 1.89 - 1.97 (m, 2 H), 1.53 - 1.66 ppm (m, 4 H)

Část spektra je překryta širokým píkem vody v oblasti 3.1-3.8 ppm.

5'-(4-(2-benzaldehyd)-1,2,3-triazol-1-yl)uridin (3 d)

- a) 5'-azido-2',3'-isopropylidenuridin **1** (99 mg, 0.32 mmol) byl suspendován ve směsi isopropanol/voda 1:1 (4 ml). K roztoku byl přidán síran měďnatý pentahydrát (45 mg, 0.18 mmol), askorbát sodný (37 mg, 0.19 mmol) a 2-benzaldehydacetylen (53 mg, 0.41 mmol). Vše bylo mícháno 2 hodiny při 50°C. Po odpaření byla k produktu přidána voda, vzniklá sraženina byla zfiltrována a usušena. Produkt **2d** byl získán ve formě zeleného prášku. Výtěžek 93 mg (66%).
- b) Derivát **2d** (88 mg, 0.20 mmol) byl rozpuštěn v 5 ml 30% TFA a byl míchán za laboratorní teploty přes noc. Produkt byl odpařen pod dusíkem. Výtěžek surového

produktu 178 mg (223%). Poté přečištěn na HPLC v gradientu acetonitril/acetátový pufr z 20% do 50% acetonitrilu během 6 minut. Produkt byl získán ve formě světle zeleného prášku. MS m/z pro C₁₈H₁₇N₅O₆: 399, nalezeno 400 [M+1]⁺.

¹H NMR (DMSO-d₆, 500MHz): d = 10.27 (s, 0,6 H), 8.99 (d, *J*=12.6 Hz, 0,6 H), 8.58 (s, 1H), 8.38 (d, *J*=8.0 Hz, 0,6 H), 7.99 (d, *J*=7.4 Hz, 0,6 H), 7.85 (d, *J*=7.4 Hz, 1H), 7.71 (d, *J*=4.0 Hz, 0,6 H), 7.32-7.64 (m, 7.2H), 5.68 - 5.73 (m, 2 H), 5.43- 5.59 (m, 3,2 H), 4.65-4.81 (m, 4.2), 4.15 - 4.24 (m, 2 H), 3.96-4.09(m, 3.8H)

¹³C NMR: 193.01; 163.61; 151.13; 144.38; 141.81; 134.50; 133.88; 133.37; 130.20; 129.07; 128.15; 125.89; 102.60; 89.67; 81.99; 72.62; 71.01; 51.97

4-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol (4a)

Derivát **2a** (100 mg, 0.24 mmol) byl rozpuštěn v 5 ml 30% TFA a byl míchán za laboratorní teploty přes noc. Čistota surového produktu 23% podle odezvy PDA detektoru. Produkt byl odpařen pod dusíkem a přečištěn na HPLC v gradientu acetonitril/acetátový pufr z 20% do 50% acetonitrilu během 6 minut. MS m/z pro C₈H₇N₃: 145.16, nalezeno 144 [M-1]⁻. Sloučenina byla izolována ve velmi malém množství, ze kterého se nepodařilo naměřit NMR spektra.

4-(4-(*tert*-butyl)fenyl)-1*H*-1,2,3-triazol (4b)

Derivát **2b** (96,4 mg, 0.21 mmol) byl rozpuštěn v 5 ml 30% TFA a byl míchán za laboratorní teploty přes noc. Čistota surového produktu 33% podle odezvy PDA detektoru. Produkt byl odpařen pod dusíkem a přečištěn na HPLC v gradientu acetonitril/acetátový pufr z 10% do 40% acetonitrilu během 7 minut. MS m/z pro C₁₂H₁₅N₃: 201.27, nalezeno 200 [M-1]⁻. Sloučenina byla izolována ve velmi malém množství, ze kterého se nepodařilo naměřit NMR spektra.

2-(1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)benzaldehyd (4c)

Derivát **2c** (93,8 mg, 0.23 mmol) byl rozpuštěn v 5 ml 30% TFA a byl míchán za laboratorní teploty přes noc. Čistota surového produktu 2% podle odezvy PDA detektoru. Produkt byl odpařen pod dusíkem a přečištěn na HPLC v gradientu acetonitril/acetátový pufr z 30% do 60% acetonitrilu během 6 minut. MS *m/z* pro C₇H₁₁N₃: 137.18, nalezeno 136 [M-1]⁻. Sloučenina byla izolována ve velmi malém množství, ze kterého se nepodařilo naměřit NMR spektra.

5'-azido-2',3'-*O*-isopropylidenadenosin (15)

Komerčně dostupný 2',3'-*O*-isopropylidenadenosin **9** (300 mg, 0.97 mmol) a PPh₃ (300 mg, 1.17 mmol) byly rozpuštěny v THF (9 ml). DPPA (3 ml, 2.49 mmol) a DIAD (0.375 ml, 1.92 mmol) byly smíchány v THF (6 ml). Oba roztoky byly vloženy na půl hodiny do mrazáku a poté byly spojeny do jedné reakční směsi, která byla míchána 5 hodin za laboratorní teploty. Produkt byl odpařen do medového charakteru látky. Dalším krokem byla látka rozpuštěna v mobilní fázi CHCl₃/EtOAc 1:1 (4 ml) a přečištěna kolonovou chromatografií na silikagelu. Po odpaření bylo ke směsi přidáno 25 ml mobilní fáze CHCl₃/MeOH (12:1). Vysrážená látka byla zfiltrována a promyta mobilní fází. Filtrát byl přečištěn kolonovou chromatografií a poté odpařen. Produkt jsme získali ve formě bílé krystalické látky. Výtěžek 165 mg (49%). MS *m/z* pro C₁₃H₁₆N₈O₃: 332.32, nalezeno 331 [M-1]⁻.

NMR spektru bylo identické se spektrem publikovaným v literatuře.¹⁸

1-(6-((4,5,6,7,8,9-hexahydro-1*H*-cycloocta[d][1,2,3]triazol-1-yl)methyl)uridin (21a)

5'-azidouridin **5** (60 mg, 0.22 mmol) byl rozpuštěn v NMP (5ml). K roztoku byl přidán cyklooktaselendiazol **20** (120 mg, 0.56 mmol). Směs byla míchána při teplotě 180°C po dobu 15 min. Po ochlazení byla reakční směs lyofilizována. Odparek byl suspendován ve vodě, zfiltrován a usušen. Produkt jsme získali ve formě tmavě hnědého prášku. Výtěžek 30 mg (36%). MS *m/z* pro C₁₇H₂₃N₅O₅: 377.40, nalezeno 377 [M-1]⁻.

1-(6-((4,5,6,7,8,9-hexahydro-1H-cycloocta[d][1,2,3]triazol-1-yl)methyl)-2',3'-O-isopropylidenuridin (21b)

5'-azido-2',3'-isopropylidenuridin **1** (88 mg, 0.29 mmol) byl rozpuštěn v NMP (8 ml). K roztoku byl přidán cyklooktaselendiazol **20** (153 mg, 0.71 mmol). Směs byla míchána při teplotě 180°C po dobu 15 min. Po ochlazení byla reakční směs lyofilizována. Výtěžek surového produktu byl 214 mg (178%). Odparek byl přečištěn pomocí HPLC v gradientu acetonitril/acetátový pufr z 20% acetonitrilu do 50% během 6 minuty. Produkt jsme získali ve formě světle hnědého prášku. MS m/z pro C₂₀H₂₇N₅O₅: 417.46, nalezeno 416 [M-1].

¹H NMR (500 MHz) δ ppm 7.84 (d, *J*=8 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=1.7 Hz, 1 H) 5.82 (d, *J*=8 Hz, 1 H) 5.33 (dd, *J*=5.7, 1.0 Hz, 1 H) 5.12 (dd, *J*=6.3, 4.6 Hz, 1 H) 4.64 - 4.83 (m, 2 H) 4.46 - 4.55 (m, 1 H) 2.91 - 2.99 (m, 2 H) 2.79 - 2.90 (m, 2 H) 1.72 - 1.87 (m, 4 H) 1.66 (s, 3 H) 1.42 - 1.60 (m, 7 H)

¹³C NMR 164.19; 151.20; 144.62; 144.12; 134.85; 114.24; 102.60; 94.46; 86.94; 84.39; 82.12; 49.46; 28.80; 27.60; 26.67; 26.20; 25.83; 24.97; 24.41; 21.49

1-(6-((4,5,6,7,8,9-hexahydro-1H-cycloocta[d][1,2,3]triazol-1-yl)methyl)2',3'-O-isopropylidenadenosin (21)

5'-azido-2',3'-isopropylidenadenosin **15** (40 mg, 0.12 mmol) byl rozpuštěn v NMP (3 ml). K roztoku byl přidán cyklooktaselendiazol **20** (80 mg, 0.37 mmol). Směs byla míchána při teplotě 180°C po dobu 15 min. Po ochlazení byla reakční směs lyofilizována. Odparek byl suspendován ve vodě, zfiltrován a usoušen. Produkt jsme získali ve formě černého prášku. Výtěžek 48 mg (90%). MS m/z pro C₁₈H₂₄N₈O₃: 440.50, nalezeno 440 [M-1].

6. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo porovnat průběh katalyzovaných a nekatalyzovaných click reakcí u 5'-azidouridinu a u 5'-azidoadenosinu.

V první části diplomové práce jsem se věnovala řešerži příprav známých triazol nukleosidů a jejich biologické aktivitě, které byly připraveny katalyzovanou click chemií. Dále jsem se věnovala Cu-free click reakcím, kde jsem zmínila přípravy již známých cyklooktynů používaných pro tyto účely a biologickou aktivitu triazol derivátů připravených danou metodou.

Ve vlastní části diplomové práce jsme se zaprvé zaměřili na přípravu 5'-triazol uridinů pomocí katalyzovaných click reakcí. Reakce byla prováděna u 2', 3'-nechráněných derivátů 5'-azidouridinu **1** a u jejich 2',3'-isopropylenových derivátů **5** a **15**. Zatímco příprava 5'-azidouridinů **1** a **5** proběhla podle postupu popsánoho v literatuře bez problémů, postupy vedoucí k tvorbě 5'-azidoadenosinu příliš dobře nefungovaly. Analogický 2',3'-isopropylidenový derivát adenosinu **15** se nakonec podařilo připravit pomocí Mitsunobu reakce popsané v literatuře s modifikovaným způsobem čištění produktu.

Samotná click reakce u uridinových derivátů **3a-d** probíhala velmi dobře. Problém nastal při odstraňování isopropylidenové skupiny. Zde jsme se setkali s problémem během deprotektce triazol uridinů, kdy docházelo vedle vzniku hydrolyzovaného produktu rovněž ke štěpení substituovaného triazolu. S cílem snížit produkci vznikajících triazolů byly vyzkoušeny různé koncentrace trifluoroctové kyseliny i další běžně dostupné kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková a kyselina sírová. Nejlépe probíhala reakce v 30% TFA, kdy triazol vznikal v zastoupení 2-43% u jednotlivých derivátů. Dále byla u příslušných triazol nukleosidů změřena fluorescence, UV-VIS a log P. Nejlépe fluoreskoval triazol **3a**, nicméně jeho intenzita nebyla natolik vysoká, aby bylo možné zjistit kvantový výtěžek. Z UV-VIS spekter jsme se pokusili zjistit hodnoty pK daných látek. Pro zjištění přesných hodnot bude nutné tato spektra ještě přeměřit ve větším rozsahu pH. Log P látek **3a-c** nebylo zjištěno, neboť příslušné sloučeniny neprošli do oktanolové vrstvy. Podle NMR spekter triazol derivát **3d** je znečištěn další látkou, která nebyla prozatím identifikována.

Závěrem této práce jsme se zaměřili na přípravu 5'-triazol uridinů a 5'-triazoladenosinu Cu-free click chemií. Cílem experimentu bylo zjistit možnost použití cyklooktaselenadiazolu pro tvorbu 5'-triazolů při různých teplotách. Při 180°C vznikali triazoly **21a**, **21b**, **22** během 10 minut v dobrých výtěžcích. Se snižující teplotou se reakční čas snižoval až na víc jak 3 dny. Proto byla vyzkoušena reakce v mikrovlnné troubě při 110°C a 90°C za výkonu 50W. Reakční čas se díky této metodě snížil na několik desítek minut. Prostorem pro další optimalizaci se zde jeví provedení reakce za nižší teploty a vyššího výkonu mikrovlnné pece.

V budoucnu se budeme nadále zabývat přípravou 5'-triazoladenosinu pomocí katalyzované click chemie a dalším studiem Cu-free click chemie s využitím cyklooktaselenadiazolu.

7. LITERATURA

1. Sletten, E.M.; Bertozzi, C.R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666-676.
2. Chang, P.V.; Prescher, J.A.; Sletten, E.M.; Baskin, J.M.; Miller, I.A.; Agard, N.J.; Lo, A.; Bertozzi, C.R. *PNAS* **2010**, *107*, 1821-1826.
3. Kolb, H.C.; Sharpless, K.B. *DDT* **2003**, *8*, 1128-1137.
4. Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
5. Van der Eycken, E.; Leuven, K.V.; Sharpless, K.B. *QSAR&Combi. Sci.* **2007**, *26*, 1115.
6. Fokin, V.V. *ACS Chem. Bio.* **2007**, *2*, 775-778.
7. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rastovtsev, V.V.; Noodleman, K.B.; Sharpless, K.B.; Fokin, V.V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 210-216.
8. Spurná, I.; Bakalářská práce: Syntéza a studium prekurzorů pro syntézu dinukleotidů spojených triazolovým cyklem, Olomouc **2012**
9. Smyslová, P.; Diplomová práce: Příprava a reaktivita vybraných 5 a 5'-substituovaných 5-methyluridinů, Olomouc **2012**
10. Xu, X.; Yon, S.; Hu, J.; Guo, P.; Wei, L.; Weng, X.; Zhou, X. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 9870-9874.
11. Kosiova, I.; Kovackova, S.; Kois, P. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 312-320.
12. Chaudhary, P.M.; Chavan, S.R.; Shirazi, F.; Razdan, M.; Nimkar, P.; Maybhate, S.P.; Likhite, A.P.; Gonnade, R.; Hazara, B.G.; Deshpande, M.V.; Deshpande, S.R. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2433-2440.
13. Rowan, A.S.; Nicelly, N.I.; Cachrane, N.; Wlassoff, W.A.; Claiborne, A.; Hamilton, Ch.J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4029-4036.
14. Sasaki, T.; Minamoto, K.; Suzuki, T.; Sugiura, T. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1424-1429.
15. Vergnand, J.; Faugeras, P.A.; Chaleix, V.; Champarier, Y.; Zerrouki, R. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6185-6189.
16. Wang, T.; Lee, H.J.; Tash, D.K.; Kim, H.O.; Pal, S.; Choi, S.; Yoanji, L.; Moon, H.R.; Zhao, L.X.; Lee, K.M.; Jlong, L.S. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *17*, 4456-4459.
17. Chiesa, K.; Shvoryna, A.; Bernet, B.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 668-691.
18. Homma, H.; Watanabe, Y.; Abiru, T.; Muragama, T.; Namura, Y.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2881-2890.

19. Kovalovs, A.; Novosjolova, I.; Bizdena, E.; Bižane, I.; Skardzinze, L.; Kazlauskas, K.; Jursenas, S.; Turks, M. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 850-853.
20. Pujari, S.S.; Seela, F. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4460-4465.
21. Mojibul, H.M.; Hua, P.X. *Sci. Chince. Chem.* **2014**, *57*, 215-231.
22. Soares, da Costa, T.P.; Tieu, W.; Yap, M.Y.; Pardini, N.R.; Polyak, S.W.; Pedersen, D.S.; Morona, R.; Turridge, J.D.; Wallace, J.C.; Wilce, M.C.J.; Booker, G.W.; Abell, A.D. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 17823-17832.
23. El-Sagheer, A.H.; Brown, T. *PNAS* **2014**, *107*, 15329-15334.
24. Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L.J.A.; Rutjes, F.P.J.T.; von Hest, J.C.M.; Lefeher, D.J.; Friedl, P.; von Delft, F.L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422-9425.
25. Baskin, J.M.; Prescher, J.A.; Laughlin, S.T.; Agard, N.J.; Chang, P.V.; Rowan, A.; Lo, A.; Codelli, J.A.; Bertozzi, C.R. *PNAS* **2007**, *104*, 16793-16797.
26. Sletten, E.M.; de Almeida, G.; Bertozzi, C.R. *Org. Lett.* **2014**,
27. Stöckmann, H.; Neves, A.A.; Stairs, S.; Ireland-Zecchim, H.; Brindl, K.M.; Leeper, F.J. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 932-936.
28. Sletten, E.M.; Nakamura, H.; Jursenas, S.; Bertozzi, C.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11799-11805.
29. Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M.A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253-2255.
30. Gordon, Ch.G.; Mackey, J.L.; Jewett, J.C.; Sletten, E.M.; Houk, K.N.; Bertozzi, C.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9199-9208.
31. Jewett, J.C.; Sletten, E.M.; Bertozzi, C.R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690.
32. Plass, T.; Milles, S.; Koehler, Ch.; Schultz, C.; Lemke, E.A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3878-3881.
33. Evans, H.L.; Slade, R.L.; Carroll, L.; Smith, G.; Nguyen, Q.; Idelan, L.; Kamaly, N.; Stöckmann, H.; Leeper, F.J.; Aboagye, E.O.; Spivey, A.C. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 991-993.
34. Bostic, H.E.; Smith, M.D.; Poloukhina, A.A.; Popik, V.V.; Best, M.D. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1431-1433.
35. Koo, H.; Lee, S.; Na, J.H.; Kim, S.H.; Hahn, S.K.; Choi, K.; Kwon, I.Ch.; Jeong, S.Y.; Kim, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11836-11840.

36. van Delft, D.; Meeuwenour, N. J.; Hoogendoorn, S.; Dinkelaar, J.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A.; Filippov, D. U. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5486-5489.
37. Meurillon, M.; Chaloin, L.; Rigaud, C. P.; Peyrottes, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3794-3802.
38. Robins, M. J.; Hansske, F.; Wnuk, S. F.; Kanai, T. *Can. J. Chem.* **1991**, *69*, 1468-1474.
39. Ikeuchi, H.; Meyer, M. E.; Hiratake, J.; Richards, N. G. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6641-6650.
40. Fletcher, S. *Tetr. Lett.* **2010**, *51*, 2948-2950.
41. Perrone, P.; Daverio, F.; Valente, R.; Rajyaguru, S.; Martin, J. A.; Léveque, V.; Pogam, S. L.; Najera, I.; Klumpp, K.; Smith, P. B.; McGuigan, Ch. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5463-5470.