

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



**SYNTÉZA A STUDIUM PREKURZORŮ PRO SYNTÉZU
DINUKLEOTIDŮ SPOJENÝCH TRIAZOLOVÝM
CYKLEM**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:

Ivana Spurná

Studijní obor:

Bioorganická chemie R1407

Vedoucí bakalářské práce:

Doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

Olomouc 2012

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 25. 4. 2012

.....

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 poděkovala všem pracovníkům Katedry organické chemie PřF UP za ochotu a pomoc a v neposlední řadě mé rodině za trpělivost a podporu.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Ivana Spurná

Název práce: Syntéza a studium prekurzorů pro syntézu dinukleotidů spojených triazolovým cyklem

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra organické chemie UP v Olomouci

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

Rok obhajoby: 2012

Abstrakt:

Moje bakalářská práce je věnována přípravě a studiu prekurzorů s triazolovým kruhem pro syntézu dinukleotidů. Práce je členěna na teoretickou a experimentální část.

Teoretická část je věnována známým přípravám azidů a triazolů bází, jako je uracil a adenosin. V teoretické části se vyskytuje kapitola o biologické aktivitě těchto bází, které byly převážně studovány pro jejich antivirovou aktivitu.

Experimentální část byla zaměřena na přípravu triazol uridinu a triazol adenosinu v poloze 5' pomocí "click" reakcí. Pro přípravu těchto derivátů byl použit výchozí 5'-azidoderivát, který byl připraven z komerčně dostupných látek. V případě triazol adenosinu byla moje práce neúspěšná, nicméně se jeho přípravě budeme zabývat v blízké budoucnosti. U triazol uridinu se vyskytly některé problémy spojené s rozpustností, ale i přesto se nám podařilo tyto prekurzory připravit.

Klíčová slova: Triazoly, uridin, adenosin, "click" reakce, bioologická aktivita.

Počet stran: 40

Počet příloh: 0

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Ivana Spurná

Title: Synthesis and study of precursors for the synthesis of dinucleotides binded by triazole ring.

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science,
Palacký Univerzity Olomouc

Advisor: Doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

The year of presentation: 2012

Abstract:

The thesis is devoted to the preparation and study of the triazole ring precursors for the synthesis of dinucleotides. The work is divided into theoretical and experimental part.

The theoretical part is devoted to known preparations of azide and triazole derivatives of uracil and adenosin. This part continues by description of the biological activity of these nucleobases, which were mainly studied for their antiviral activity.

The part results and discussion was focused on the preparation of triazole uridine and triazole adenosine in position 5 ' via " click" reactions. 5'-Azidoderivatives were tried to prepare from commercially available uridine and adenosine. In the case of triazole derived from adenosine the reactions failed. The triazole derived from uridine were prepared although some problems associated with solubility had to be solved.

Keywords: Triazole, uridin, adenosin, "click" reactions, biological activity

Number of pages: 40

Number of appendixes: 0

Language: Czech

Obsah

1. Úvod	9
2. Cíl bakalářské práce	11
3. Teoretická část	13
3.1. 5'-triazol adenosin	13
3.1.1. Příprava 5'-azidoadenosinu	13
3.1.2. Tvorba triazolů pomocí "click" reakcí.....	16
3.1.3. Bioologická aktivita modifikovaných nukleotidů adenosinu.....	20
3.1.3.1. Antivirotická aktivita 5'-azidoadenosinu.....	20
3.1.3.2. Antivirotická aktivita triazol adenosinu.....	21
3.2. 5'-triazol uridin	22
3.2.1. Příprava 5'-azidouridinu.....	22
3.2.2. Příprava 5'-triazol uridinu.....	25
3.2.3. Biologická aktivita 5'-triazol uridinu.....	27
4. Výsledky a diskuze.....	28
4.1. Příprava výchozího 5'-azidoadenosinu	28
4.2. Příprava 5'-azidouridinu	31
4.3. Příprava 5'-triazol uridinu	33
5. Experimentální část	35
5.1. Metody	35
5.2. Přípravy	35
6. Závěr	38
7. Literatura	39

Seznam zkratek

HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HBV	virus hepatitidy B
HCV	virus hepatitidy C
HSV	herpes simplex vir
HMV	cytomegalovir
VZV	virus Varicella Zoster
AIDS	syndrom získaného imundeficitu
DMF	dimethylformamid
IC ₅₀	poloviční maximální koncentrace inhibice (the half maximal inhibitory concetration)
DPPA	difenylfosforylazid
DEAD	diethylazodikarboxylát
DBU	diazobicykloundekan
THF	tetrahydrofuran
SAH	S-Adenosylhomocystein hydroláza
SAM	S-Adenosylmethionin
Thr157	buněčný regulační protein
ON	přes noc (over night)
MW	mikrovlnné vlny
RT	pokojová teplota (room temperature)

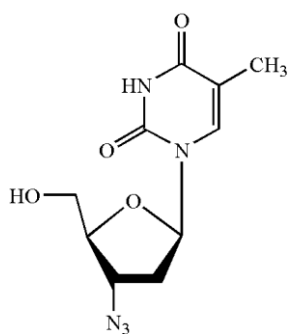
DMSO	dimethylsulfoxid
LC/MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem
NMR	nukleární magnetická resonance
HPLC	vysoko účinná kapalinová chromatografie

1.ÚVOD

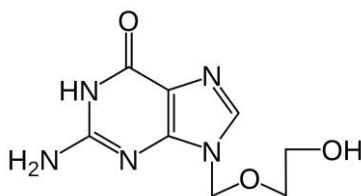
Chemická modifikace nukleových kyselin má významný vliv na změnu konformace těchto látek, což má za následek změnu jejich biologických vlastností, a to jak zvýšení či snížení exprese významných proteinů spojených se vznikem či potlačením patologických procesů v buňce a následně v organismu, tak snížení schopnosti reprodukce buněk. Na ovlivnění těchto procesů je založeno studium mnoha biologicky aktivních sloučenin vyvíjených jako léčiva proti nejrůznějším onemocněním.

Jednoduchými změnami ve struktuře přírodních nukleosidů jsou připravovány tzv. antimetabolity. Ty jsou často natolik podobné svým pravým přírodním analogům, že dochází do určitého stupně k jejich přirozené metabolizaci. Následně ale dochází k přerušení biochemických procesů, což má většinou za následek negativní ovlivnění buněčných procesů vedoucí až k vyvolání buněčné smrti.

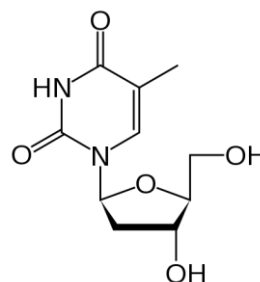
Mnoho nukleosidových analog bylo úspěšně vyvinuto pro léčbu HIV, viru hepatitidy B (HBV), viru hepatitidy C (HCV), herpes simplex viru (HSV), cytomegaloviru (CMV) nebo viru Varicella Zoster (VZV) a různých druhů nádorových onemocnění (*Obr. 1*).



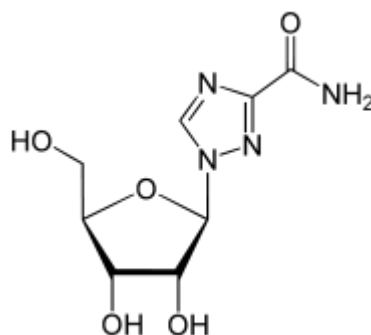
AZT, Zidovudin (HIV)



Acyclovir (HSV, VZV)



Telbivudin (HBV)



Ribavirin (HCV)

Obr. 1 Příklady nukleosidových analogů využívaných v chemoterapii

Ačkoliv existuje na trhu již celá řada léčiv založených na modifikovaných strukturách nukleosidů, jejich potenciál není zdaleka vyčerpán. Další uplatnění těchto látek je možné vidět jednak v léčení chorob, kde současná chemoterapie není dostatečně účinná, ačkoliv, jako např. v případě AIDS, významně prodlužuje život pacienta či zpomaluje rozvoj onemocnění.

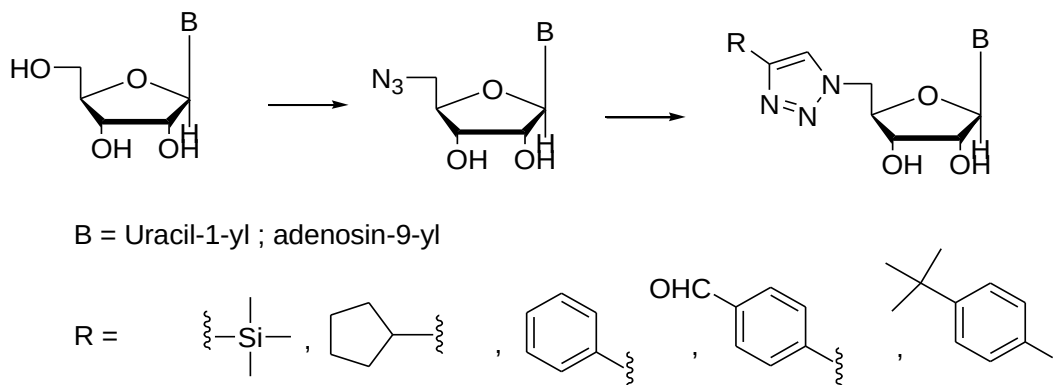
Kromě vývoje nových chemoterapeutik má modifikace přírodních nukleosidů velký význam i v oblasti diagnostiky. Značení oligonukleotidů či nukleových kyselin na přesně stanovených sekvencích pomocí chemických značek má velký význam při studiu vlivu jednotlivých genů na expresi významných proteinů, vlivu změny konformace nukleových kyselin na jejich přirozené funkce, atd. Ačkoliv řada metod pro značení těchto biomolekul je již v praxi zavedena, současná chemie je zaměřena na hledání metod s vyšší citlivostí, metod poskytujících stabilnější pozorovatelné změny a dále metod pro pozorování specifických změn funkcí nukleových kyselin.

Modifikace složek nukleových kyselin se tak pořád staví na čelní místo v současné medicíně. Přístupy vedoucí k takovýmto produktům jsou zaměřeny jak na modifikaci na části nukleobáze, tak na cukerné složce. Druhý typ modifikace se stal právě i námětem na předkládanou bakalářskou práci.

2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

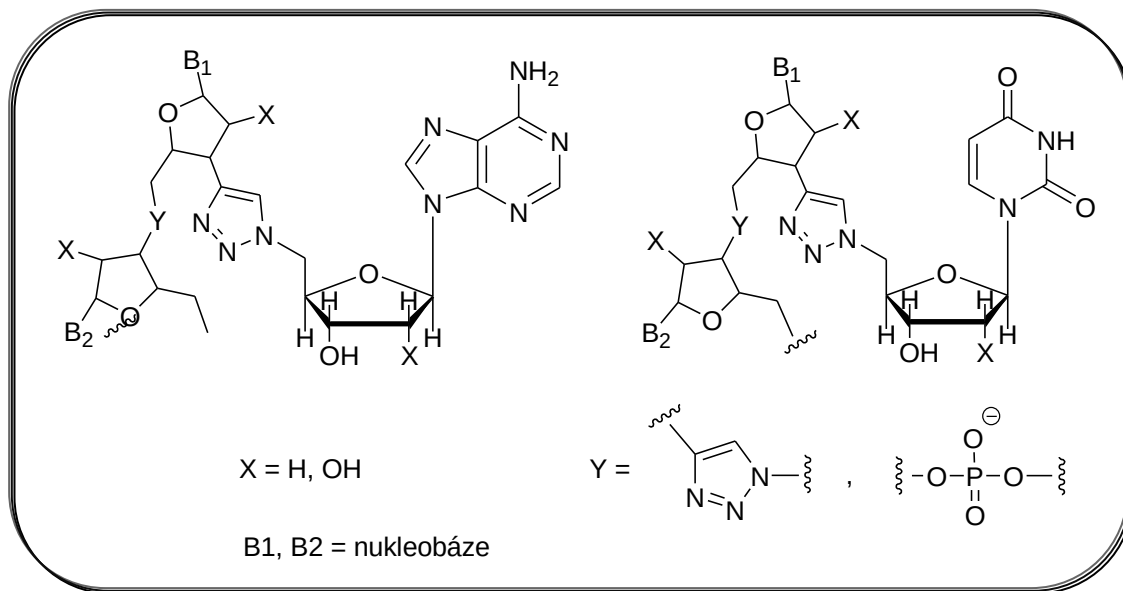
Modifikace cukerné složky uridinu a adenosinu pro studium click reakcí

Cílem bakalářské práce je ověřit vhodné syntetické metody pro přípravu 5'-azidoadenosinu a 5'-azidouridinu a metody pro jeho přeměnu na deriváty triazolu pomocí katalyzovaných click reakcí. Tyto click reakce měly být ověřeny na modelových substrátech za vzniku derivátů uvedených na *obr. 2*.



Obr. 2 Cílové sloučeniny a studované reakce bakalářské práce

Bakalářská práce je součástí širšího tématu zaměřeného na přípravu a studium biologických vlastností nepravých oligonukleotidů, kde fosfátový můstek je nahrazen jinou spojovací skupinou, v našem případě triazolovým cyklem (*Obr. 3*).



Obr. 3 Nepravé oligonukleotidy spojené triazolovým cyklem.

Click reakce na nukleosidovém konci lze rovněž využít ke značení koncových sekvencí nukleových kyselin, čímž se výzkum v této oblasti profiluje do oblasti vývoje nových diagnostik.

Bakalářská práce je zaměřena na tyto dílčí úkoly:

- Vybrat a ověřit vhodnou přípravu 5'-azidoderivátu u adenosinu a uridinu.
- Ověřit či upravit vhodné metody purifikace těchto látek a meziproduktů.
- Studium katalyzovaných click reakcí s různými alkyny.

3. Teoretická část

Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na sumarizaci poznatků z literatury a je složena ze dvou podkapitol. První podkapitola se zabývá přípravou a biologickou aktivitou 5' – triazoladenosinu a druhá podkapitola přípravou a biologickou aktivitou 5' – triazoluridinu.

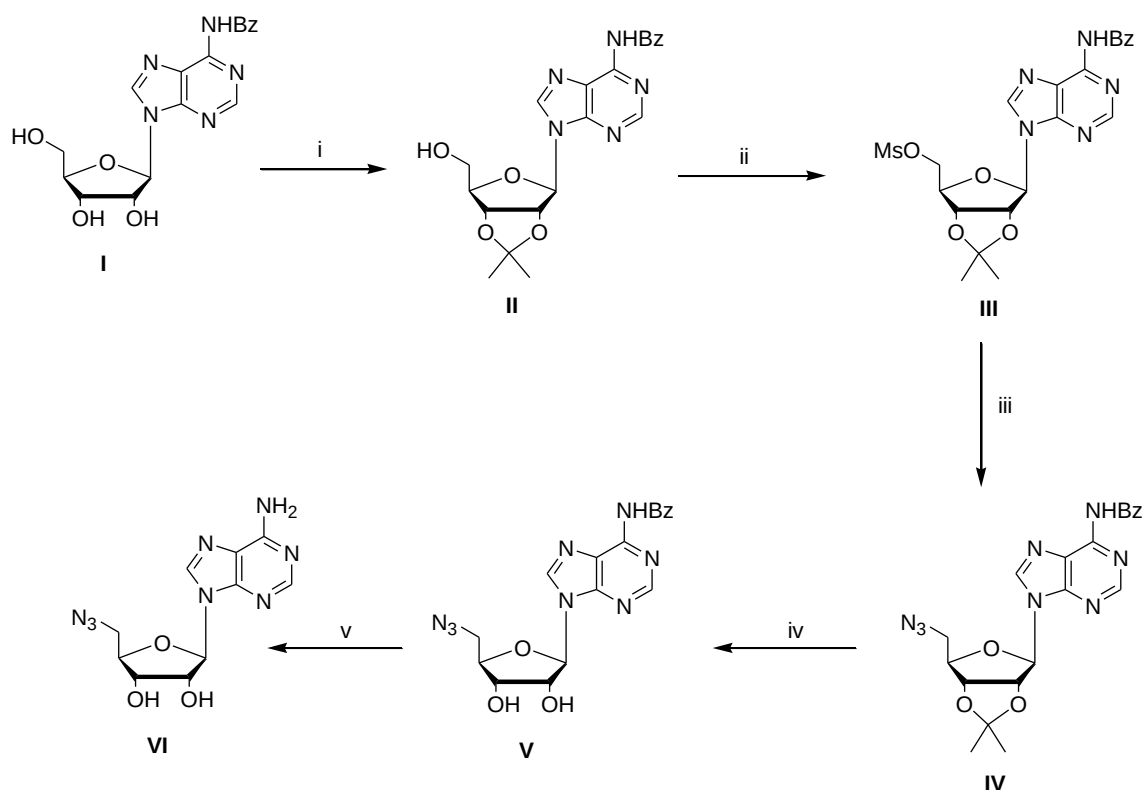
3.1. 5' - Triazol adenosin

3.1.1. Příprava 5'- azidoadenosinu

A. Příprava z N⁶ – benzoyladenosinu

Jedna z možných příprav 5'-azidoadenosinu (5'-AA) **VI** popsaných v literatuře spočívá v použití komerčně dostupného N⁶ – benzoyladenosin **I**, který byl transformován s 2,2 – dimethoxypropanem a acetonem za katalýzy kyseliny sírové za RT po dobu 30 minut na 2,3 – isopropyliden derivát **II**.¹ Poté mesylací mesyl chloridem a následnou reakcí s azidem sodným v DMF při 60°C během 3 hodin se v dobrém výtěžku podařilo připravit derivát **IV**. Produkt **IV** byl dále ochráněn vodným roztokem kyseliny trifluorooctové na sloučeninu **V** a následně methoxidem sodným na 5'-azidoadenosin **VI**.

Schéma 1. Syntéza 5' azidoadenosinu z N⁶ - benzoyladenosinu.



(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

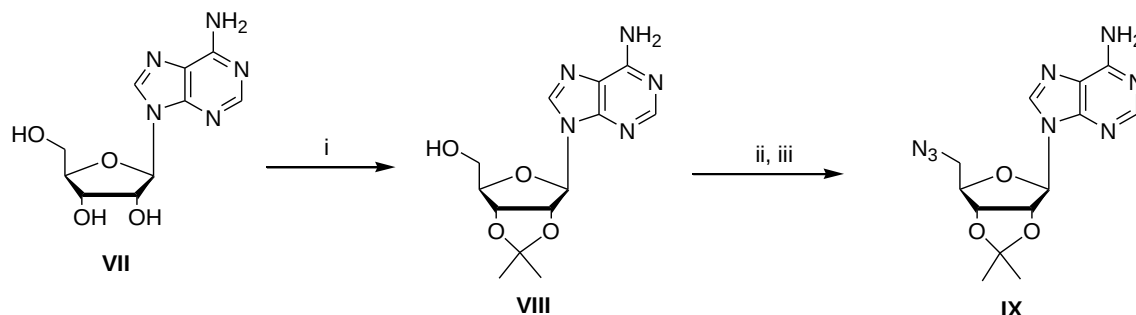
B. Příprava z adenosinu

5' – Azidoadenosin je popsán též jako meziprodukt pro přípravu chloroethylamino – 5' – deoxyadenosinu.²

Pro jeho přípravu byl použit komerčně dostupný adenosin **VII**, kde 2' - a 3' – hydroxylové skupiny byly selektivně ochráněny v kvantitativních výtěžcích pomocí příslušného acetonidu **VIII** vzniklého reakcí acetonu za katalýzy p-TsOH za RT po dobu 1h. V dalším kroku látka **IX** reagovala s potřebným difenylfosforyl azidem

(DPPA) a následně s azidem sodným a crownetherem 15 – crown – 5 při 110°C 4 hodiny na požadovaný derivát **IX**.

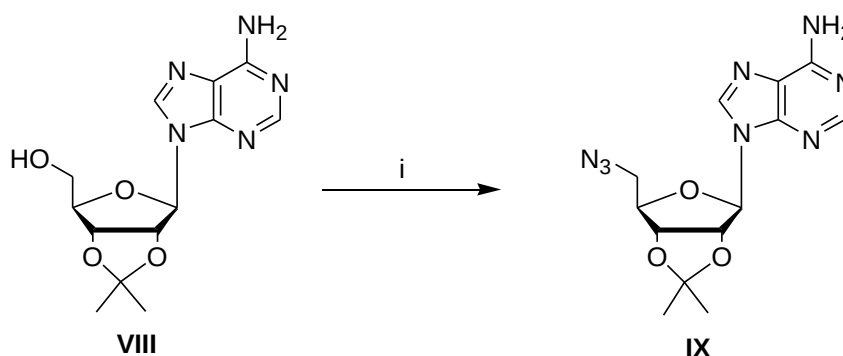
Schéma 2. Syntéza 5' – azidoadenosinu z adenosinu.



(i) Aceton, p – TsOH, rt, 1h; (ii) DPPA, DBU, rt, 16h; (iii) NaN₃, 15 – crown – 5, 110°C, 4h

Jinou metodou přípravy 5'-AA je Mitsunobova reakce.³ Výchozí 2', 3' – isopropylidenadenosin **VIII** reagoval s DPPA, trifenyfosfinem (PPh₃), diethylazodikarboxylátem (DEAD) s 73% výtěžností na derivát **9** (Schéma 3).

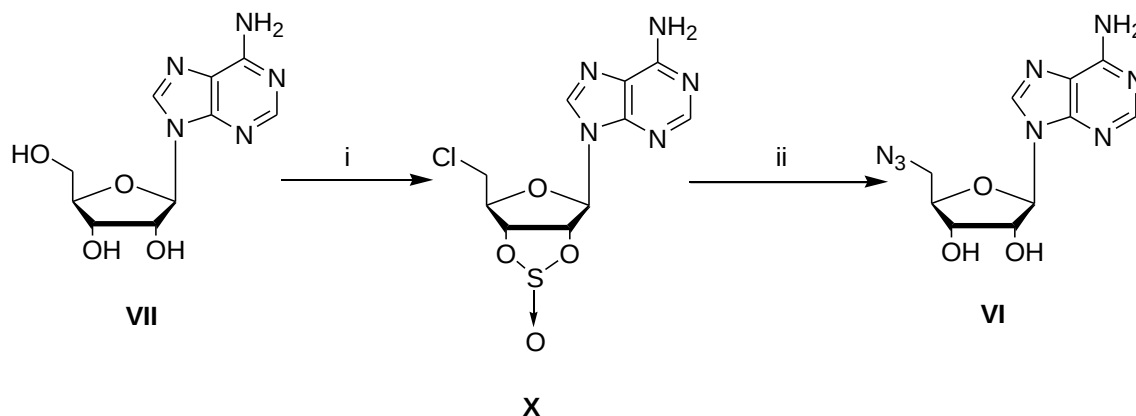
Schéma 3. Syntéza 5' – azidoadenosinu z 2', 3' – isopropylidenadenosinu



(i) DPPA, PPh₃, DEAD, THF, 36 h, 0°C

Další možnou přípravou 5'-AA z adenosinu je přes 5'-chloro-5'-deoxy-2',3'-O-sulfinyladenosin⁴, kde tato látka dále reaguje s azidem sodným v DMF tak, jak je popsáno v literatuře⁵.

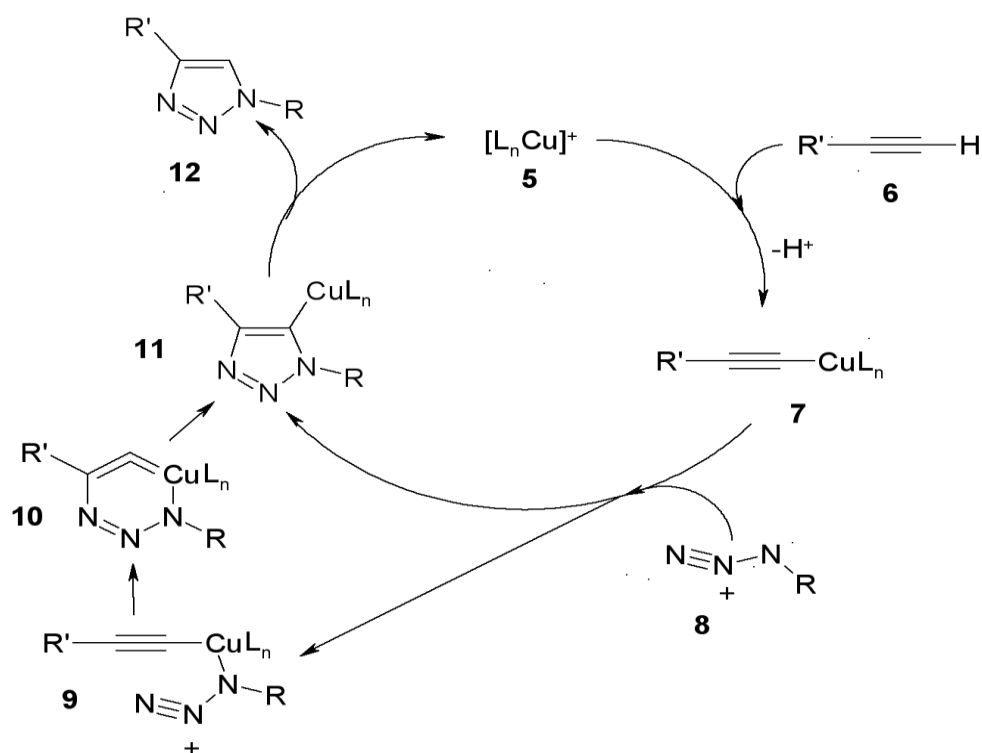
Schéma 4. Příprava 5'-AA přes chlorderivát



(i) SOCl₂, Py, CH₃CN, 0°C; (ii) NaN₃, DMF, 80°C

3.1.2. Tvorba triazolů pomocí “click“ reakcí

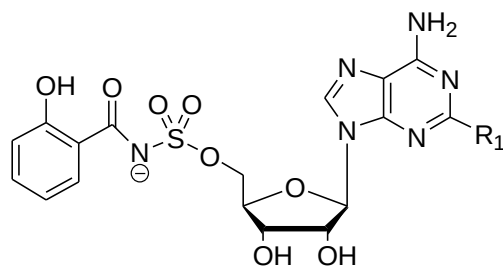
Jako první se reakci mezi alkyny a azidy zabýval americký chemik Sharpless. Tyto reakce nazval jako “click“ reakce.^{6 7} Tyto reakce se vyznačují svou stereospecifitou, modularitou, širokospektrým použitím, vysokou chemickou výtěžností a v nejlepším případě bez jakýchkoliv vedlejších produktů. Dále tyto reakce musí splňovat dvě důležité podmínky: chemikálie, materiál a činidla jsou snadno dostupná, reakce běží bez rozpouštědla nebo v rozpouštědlech, která jsou snadno odstranitelná a produkt reakce je snadno izolovatelný a jeho čištění nevyžaduje použití speciálních technik, jako je např. chromatografie, destilace, atd. Reakci je možné provádět za pomoci různých katalyzátorů. V případě click reakcí mezi azidy a acetyleny se nejčastěji využívá měďných solí, které je možné generovat in-situ např. reakcí síranu měďnatého s askorbátem sodným. Měďný kation reaguje s daným alkynem za vzniku komplexu, který dále reaguje s azidem za vzniku triazolového cyklu (Ob. 4).



Obr. 4 Mechanismus “click“ reakce s měďnatým katalyzátorem

<http://www.namereactions.org/huisgen-13-dipolar-cycloaddition>

Příprav derivátů adenosinu substituovaných triazolovým skeletem je popsáno velice málo. Jedním z příkladů je derivát adenosinu nesoucí triazol v poloze 2 purinového skeletu.^{7,8} Výchozí látkou je 5'-O-[N-(salicyl)sulfamoyl]adenosine (Sal-AMS) **XI** a jeho analog 2-Ph-Sal-AMS **XII**.

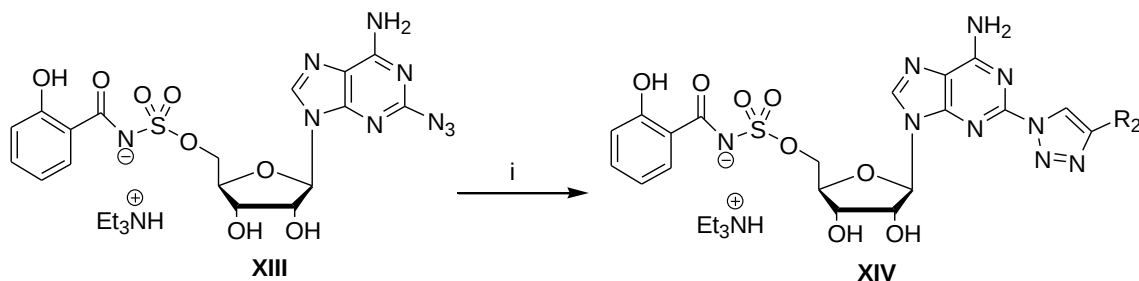


XI R1 = H
XII R1 = Ph

Obr 5. Výchozí látka 5'-O-[N-(salicyl)sulfamoyl]adenosine (Sal-AMS) a jeho analog 2-Ph-Sal-AMS

Z azidoderivátu **XIII** pomocí click reakce za katalýzy $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ a askorbátu sodného s určitým alkyem v metanolu vznikne triazolový derivát **XIV**.

Schéma 5. Syntéza 2-triazol derivátu



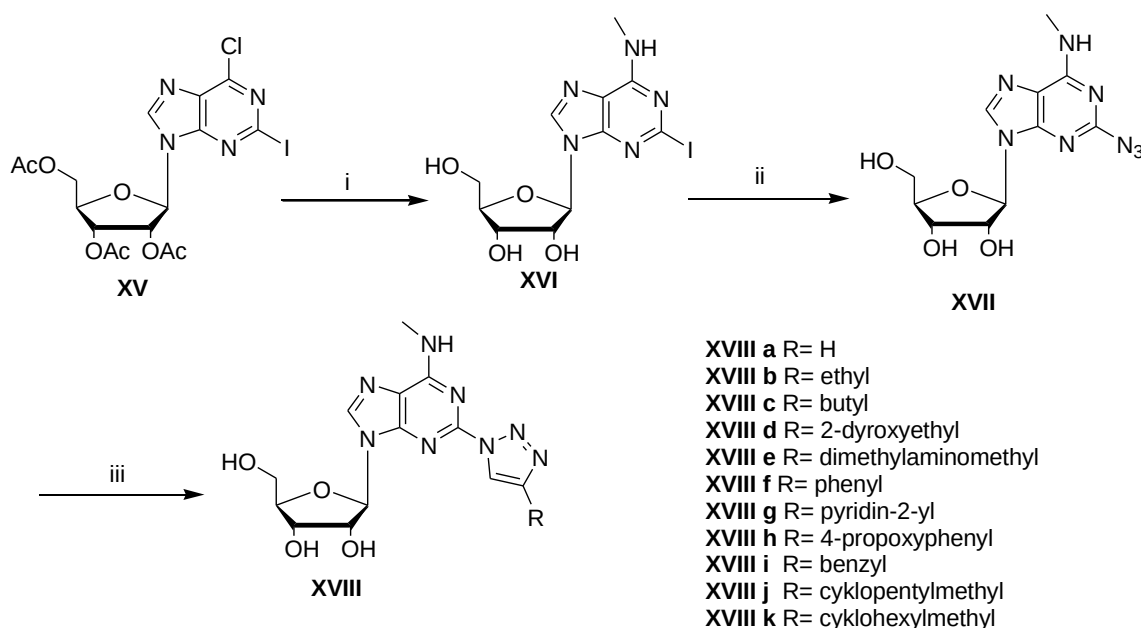
R_2 = alkyl, aryl, heteroaryl

(i) $\text{C}\equiv\text{C}-\text{R}_2$, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, Na askorbát, MeOH

Obdobné reakční podmínky byly použity pro přípravu triazolového derivátu **XVIII**⁸. Syntéza vychází z 2-jodo- N^6 -methyladenosinu, který byl připraven z příslušného 6-chlor-2-jodo-tetraacetylribosidu **XV** reakcí 2M CH_3NH_2 v THF a následně podroben reakcí azidem sodným ve směsi $\text{H}_2\text{O}/\text{BuOH}$ 1:1 za vzniku 2-azido derivátu v 66% výtěžku. Struktura azido derivát byla ověřena pomocí ^1H a ^{13}C NMR

spektroskopie přičemž se zjistilo, že 17% tvoří jeho tautomerická tetrazolová forma (spontánní cyklizace). Azido/tetrazolová tautomerie byla již popsána v článku ⁷ pro 2-azidoadenosin. Azidoderivát **XVII** reaguje s různými alkyny v rozpouštědle voda/butanol za katalýzy Cu^{2+} solí a askorbátu sodného za laboratorní teploty 4 dny s 40% výtěžností.

Schéma 6. Syntéza 1,2,3-triazol-1-yl analog N^6 -methyladenosinu

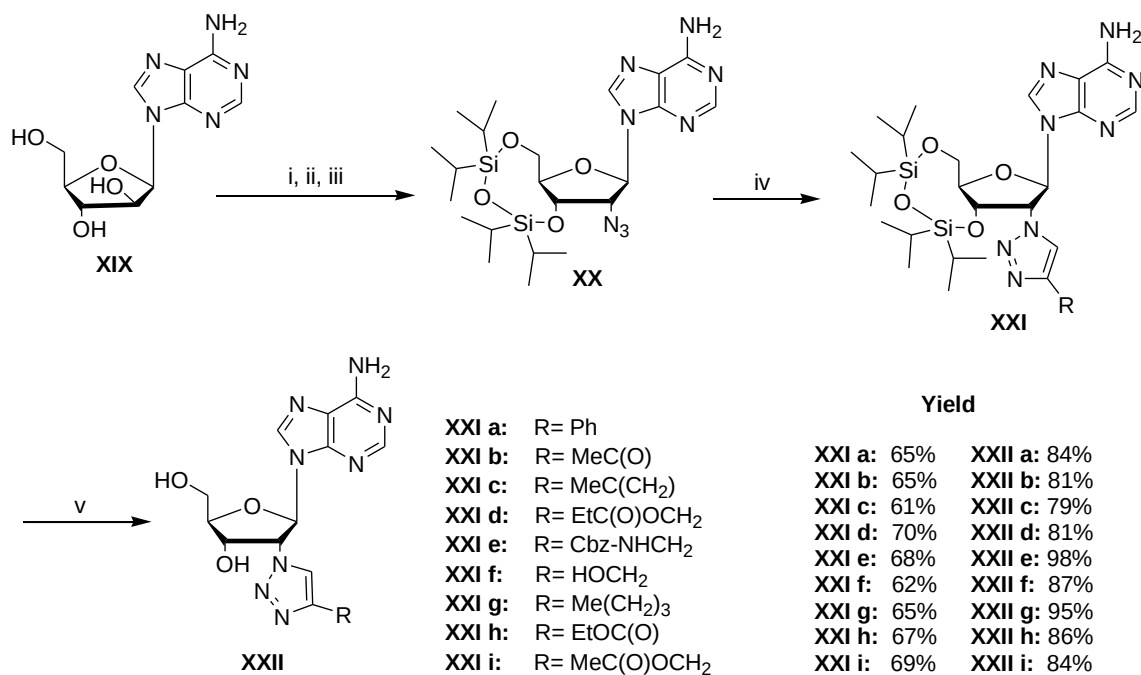


(i) 2 M CH_3NH_2 , THF, 2 dny; (ii) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, askorbát sodný, L-prolin, Na_2CO_3 , NaN_3 , voda/butanol 1:1, 60°C ; (iii) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, askorbát sodný, alkyn, $\text{H}_2\text{O}/\text{BuOH}$ 3:1, RT, 4 dny

Další popsanou metodou je vznik triazolového cyklu v poloze 2'. ⁹Autoři vycházejí z vidarabinu **XIX**. 3',5'-diprotekcí vidarabinu s tetraisopropylsiloxovou skupinou a následnou 2'-O-triflací $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ a nukleofilní substitucí azidem sodným vznikne 2'-azidoderivát **XX**. 2'-azidoderivát dále reagoval za laboratorní teploty s různými alkyny v 50% vodném roztoku t-BuOH za katalýzy askorbátu sodného a CuSO_4 na 2'-triazolderivát. Deprotekce siloxanových skupin byla provedena přes noc použitím

fluoridu amonného a metanolu. Izolace produktů byla provedena pomocí flash chromatografie v dobrých výtěžcích (Schéma 7).

Schéma 7. Syntéza 2'-([1,2,3]triazol-1-yl)-2'-deoxyadenosin derivátu

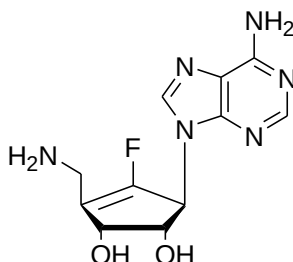


3.1.3. Biologická aktivita modifikovaných nukleotidů adenosinu

Různé modifikace na cukerné složce adenosinu vykazují biologické vlastnosti většinou spojené s inhibicí určitých enzymů. Tyto inhibice mohou zabránit replikaci viru nebo může docházet ke zničení napadených hostitelských buněk.

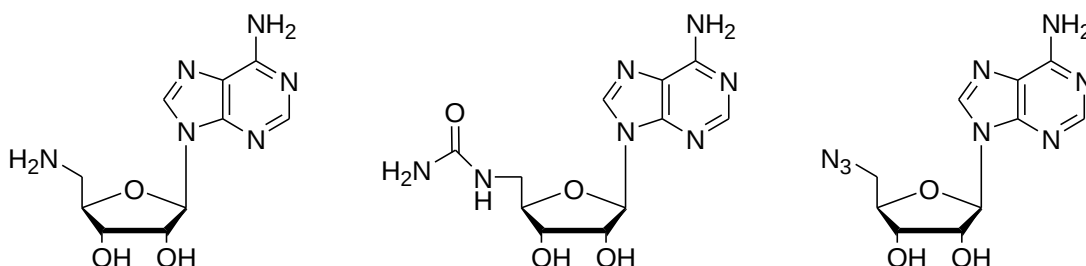
3.1.3.1. Antivirotická aktivita 5'-azidoadenosinu

5' – azido derivát byl syntetizován vedle 5' – ureido a 5' – amino derivátů jako další možný inhibitor S – adenosylhomocystein hydrolázy (SAH).¹ SAH se hromadí uvnitř buňky, kde dochází k inhibici transmethylace S–adenosylmethioninu (SAM) dependentní methyltransferázou. Jako potenciální inhibitor byl vyzkoušen 5' – amino derivát fluoro – neplanocinu A (Obr. 6), kde se 5' – amino skupina ukázala jako úctyhodným donorem vodíkových vazeb v aktivním místě SAH. Tudíž byly navrženy další obměny samotného adenosinu na uhlíku 5'.



Obr. 6 5'-aminofluoro-neplanocinu A

SAH inhibiční účinek 5'-azido-, 5'-amino- a 5'-ureido- (Obr.7) derivátu byl zjištěn použitím rekombinační lidské placentální SAH, která byla získána z E. coli JM109 s obsahem pPROKcd20 plasmidu. Ačkoliv 5'-azidoderivát nemůže být donorem vodíkových vazeb, mohl by sloužit jako jejich akceptor navázáním v aktivním místě s postraním řetězcem hydroxylové skupiny Thr157. Tímto způsobem je dosaženo významné enzymatické inhibiční aktivity ($IC_{50} = 28,94 \mu M$).



Obr. 7 5'-aminoadenosin, 5'-ureidoadenosin, 5'-azidoadenosin

3.1.3.2. Antivirotická aktivita triazol adenosinu

Rozsáhle byly studovány substituce na sloučeninách 5'-O-[N-(salicyl)sulfamoyl]adenosine (Sal-AMS) **XI** a jeho analoga 2-Ph-Sal-AMS **XII** s cílem najít nová antituberkulotická léčiva.⁷ Zajímavé je, že modifikace C2 purinu 4-substituovanými triazoly vede k submikromolární až mikromolární antituberkulotické aktivitě (MCI₉₉). Takovéto sloučeniny vykazují inhibiční konstantu adenylačního enzymu (K^{app}) v řádu subnanomolárních hodnot.

N⁶-substituované 2-(1,2,3-triazolyl)-adenosin analoga **XVIII** představují novou třídu vysoce potenciálních a selektivních nukleosidových bazí A₃AR antagonistů, částečných agonistů a agonistů.⁸ Adenosin receptory (AR) jsou G-protein vázané receptory a skládají se ze čtyř podtypů klasifikovaných jako A₁, A_{2A}, A_{2B}, a A₃. A₃AR je poslední identifikovaný receptor.

2-azido prekurzory vykazují vysokou vazebnou afinitu k A₃AR a malou selektivitu ve srovnání s A₁AR. 1,2,3-triazol-1-yl deriváty získané 1,3-dipolární cykloadicí z azidu s acetylenem, butynem a hexynem (deriváty **XVIIIa-c**, *Schéma 6*) vykazují vysokou afinitu k A₃AR a zvýšenou selektivitu. Aromatické triazoly **X** mají podobné hodnoty a dokonce i větší selektivitu. Dusíkaté nebo kyslíkaté substituenty na pozici 4 triazolového kruhu (deriváty **18d,e,g,h**, *Schéma 6*) vykazují sníženou A₃AR afinitu. Mezi zkoumanými analogy, 4-cyclopentylmethyl derivát vystavoval nejvyšší afinitu k A₃AR a 260 násobně vyšší selektivitu ve srovnání s A₁AR. Výměnou cyklopentylaminového kruhu fenylem nebo cyklohexylem byla nepříznivě ovlivněna A₃AR afinita.

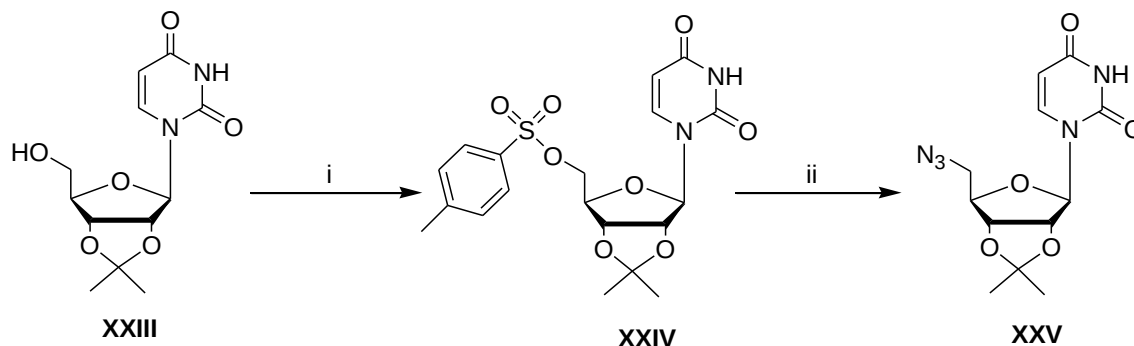
3. 2. 5' – Triazol uridin

3. 2. 1. Příprava 5'-azidouridinu

Příprava 5'-azidouridinu (5'-AU) vychází z 2',3'-isopropyliden – uridinu **23**, jehož hydroxyskupina v poloze 5' reaguje v p-toluensulfonyl esteru s p-

toluensulfonylchloridem za katalýzy pyridinem. Následnou nukleofilní substitucí azidem sodným vzniká s vysokou výtěžností azidový intermediát **XXV**.¹⁰

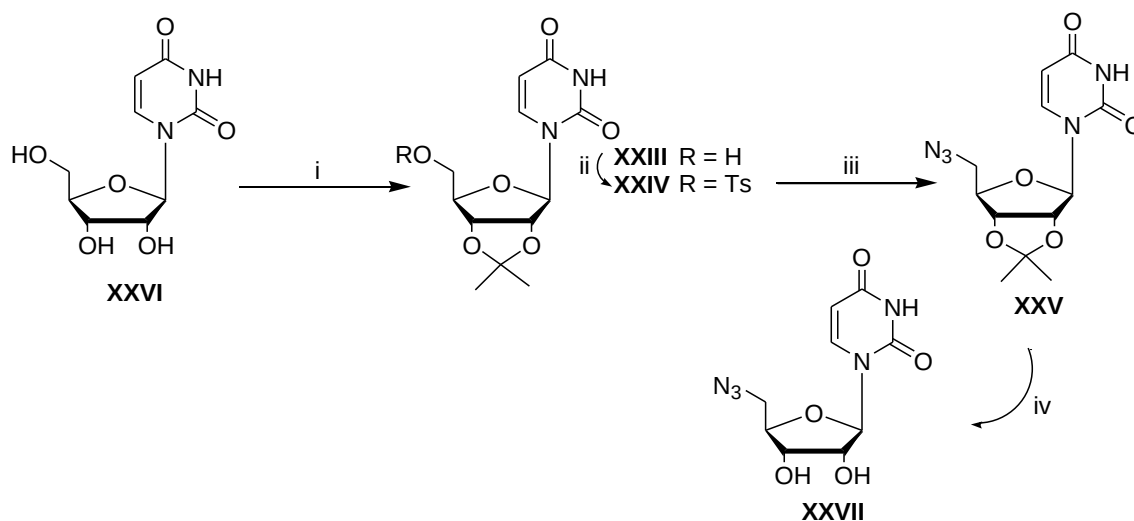
Schéma 8. Příprava 5'-azidouridinu z 2',3'-isopropyliden-uridinu



(i) TsCl, pyridin, 40°C, 3h; (ii) NaN₃, DMF, 50°C, 16h

Literatura popisuje velice podobnou metodu vycházející přímo z uridinu **XXVI**, který je zde protékán acetonem za vzniku ketalu **XXV** a ten je dále převeden pomocí TsCl za laboratorní teploty na tosylderivát **XXIV**. Tento intermediát reaguje s NaN₃ v DMF tentokrát při 80°C za vzniku azidoderivátu **XXV**, který je ochráněn použitím 90% vodným roztokem trifluorooctové kyseliny.¹¹ K přípravě azidoderivátu lze použít i jiné azidy, např. LiN₃.¹²

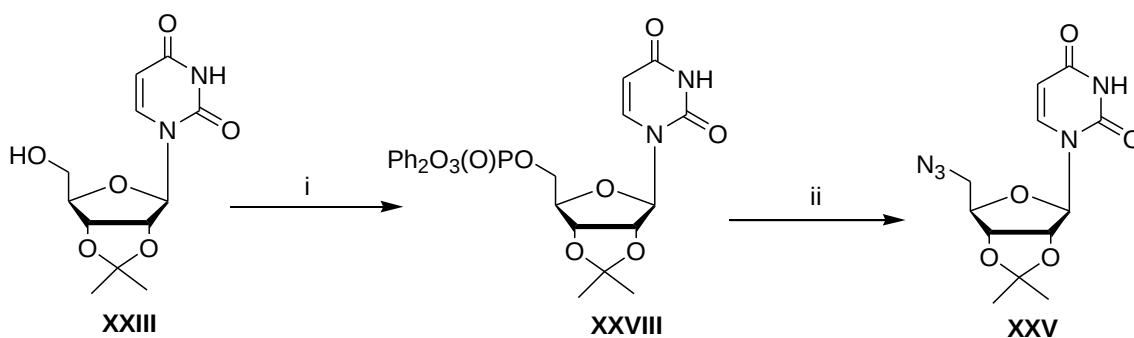
Schéma 9. Příprava 5'-AU použitím TsCl



(i) aceton, H₂SO₄, rt; (ii) TsCl, Py, rt, 91%; (iii) NaN₃, DMF, 80°C; (iv) CF₃CO₂H/H₂O, 9:1, rt

K přípravě 5'-AU se mimojině používá Mitsunobu reakce.¹³ Tento způsob přípravy využívá jako výchozí látku 2',3'- isopropylidenuridin **XXIII**, která spolu s 1,5 ekv. DPPA a 1 ekv. DBU byla suspendována ve 2 ml 1,4-dioxanu. Roztok byl míchán za laboratorní teploty přes noc. Poté byl přidán NaN₃ a 15-crown-5 éter. Tato suspenze byla dále míchána při 80°C přes noc za vzniku olejovité látky. Autoři látku izolovali pomocí kolonové chromatografie s gradientovým systémem (z 1:1 hexan/ethyl acetát do 1:5 ethanol/ethyl acetát).

Schéma 10. Příprava 5'-AU Mitsunobu reakcí



(i) DPPA, DBU, p-dioxan, 80°C, ON; (ii) NaN₃, 15-crown-5 éter, RT, ON

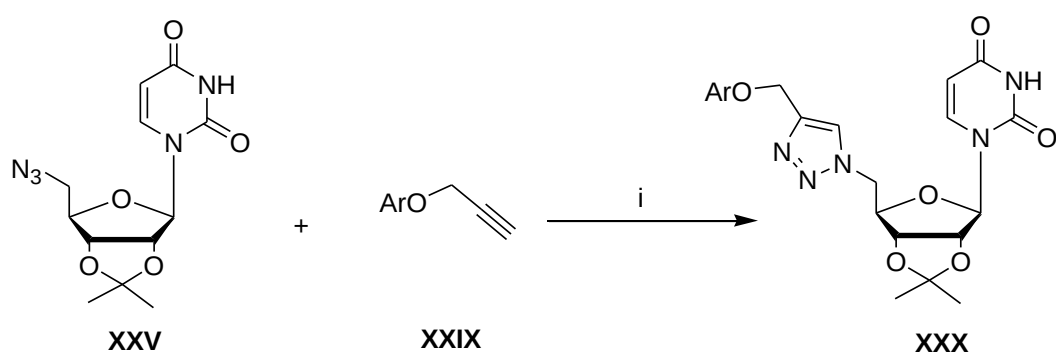
Azidouridin lze připravit i přes 5'-halogenderiváty. Tyto intermediáty byly připraveny se všemi halogeny. Chlor, jod, brom reagují většinou ve vysokých výtěžcích s použitím levných chemikálií. Chlorderivát byl připraven rozpuštěním 2',3'-O-isopropylidenuridinu v DMF s použitím PPh₃ jako báze s přidavkem CCl₄ (94%)¹⁴ nebo s přidavkem N-chlorosuccinimidu (89%).¹⁵ Autoři tohoto článku tímto postupem připravili bromderivát (79%) použitím bromosuccinimidu i jodderivát (67%) použitím jodosuccinimidu. Fluoroderivát je publikován ve více člancích, ale postup je v podstatě vždy stejný. Opět jako výchozí látka byl použit 2',3'-O-isopropylidenuridin, který v roztoku heptanu za působení mikrovlnného záření zreagoval během 10 min s N,N-

diethyl- α,α -difluoro- (m-methylbenzyl)aminem na fluoroderivát v 55% výtěžku.¹⁶⁻¹⁸ Hlavním reagentem pro přípravu jodderivátu byl methyltriphenoxyposphonium jodid, který reagoval s 2',3'-O-isopropylidenuridinem v DMF. Po 15 minutách byl přidán metanol, kdy poté vzniká čistý 5'-deoxy-5'-jodo-2',3'-O-isopropylidenuridin, který byl izolován v 96,5% výtěžku.¹⁹

3.2.2. Příprava 5'- triazoluridinu

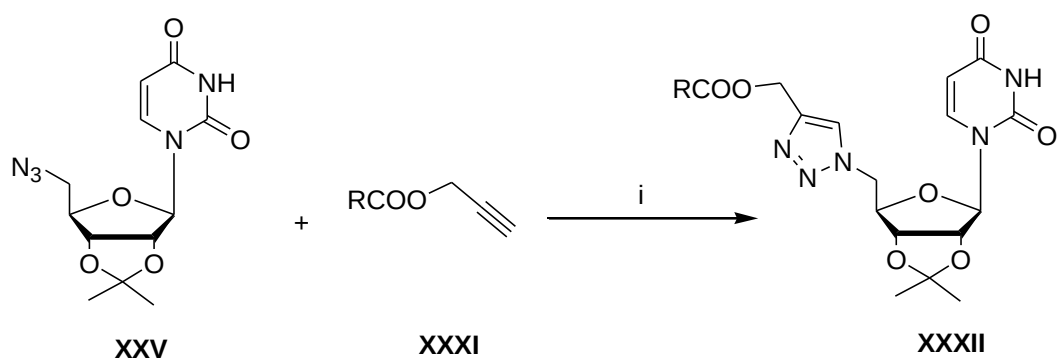
Příprava 5'-triazoluridinu je popsána použitím "click" reakce 5'-AU s propargyl deriváty fenolu a propargyl deriváty kyselin za katalýzy $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a askorbátu sodného.²⁰ Vše bylo rozpuštěno ve směsi rozpouštědel t-BuOH/voda a reagováno při 28°C.

Schéma 11. Syntéza aryl esteru 1,2,3-triazolyl uridinu



(i) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, askorbát sodný, t-BuOH/H₂O , 28°C

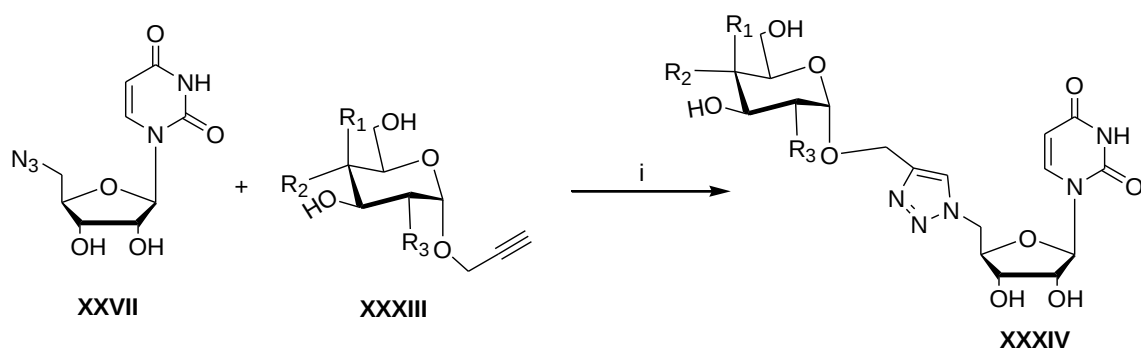
Schéma 12. Syntéza aryl etheru 1,2,3-triazolyl uridinu



(i) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, askorbát sodný, t-BuOH/ H_2O , 28°C

Literatura dále popisuje vznik triazolového skeletu reakcí mezi 5'-azido uridinu s propargyl glykosidy.¹¹ Ekvimolární množství propargyl glykosidu **XXXIII** s 5'-azido uridinem **XXVII** se nechá míchat ve směsi 1:1 t-BuOH/H₂O katalýzou 1mol% CuSO₄ · 5H₂O a 10 mol% askorbátu sodného po dobu 8-24 hodin za vzniku glyco-triazolu **XXXIV** ve velmi dobrých výtěžcích (*Schéma 13*).

Schéma 13. Příprava 5'-triazoluridinu z propargyl nukleosidu



(i) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, askorbát sodný, t-BuOH/ H_2O 1:1, RT

3.2.3. Biologická aktivita 5'-triazoluridinu

1,2,3 – triazolová jednotka může být použita jako náhrada za peptidovou vazbu.

²⁰ Tyto triazoly mají stérické a elektronické vlastnosti podobně jako v peptidové vazbě. 1,2,3-Triazolové jádro vykazuje biologické vlastnosti díky silné interakci vodíkových vazeb k dusíkovým atomům a jejich velkému dipólovému momentu. Příprava 1,2,3-triazolu je reakcí substituovaného azidu s deriváty alkynů za přítomnosti Cu(I) katalyzátoru použitím “click” chemie, která má uplatnění v biomedicínském výzkumu, kombinatoriální chemii a DNA výzkumu.

Popsána byla syntéza 1,2,3-triazol derivátů uridinu “click” reakcí mezi 5'-azidouridinem a propargyl estery nebo propargyl ethery. Výsledné deriváty triazolů byly testovány na fungální aktivitu vedle nikkomycinu a fluconazolu proti *C. neoformans*, *C. albicans* a *C. neoformans*. Aryl ethery 1,2,3 – triazolyl navázané na uridinu měli vyšší aktivitu než nikkomycin a fluconazol. Aktivity aryl esterů 1,2,3-triazolyl uridinu byly srovnatelné s nikkomycinem a fluconazolem. Dále tyto látky byly testovány na inhibici chitin syntasy. Sloučeniny inhibují chitin syntasu od 60-95%.

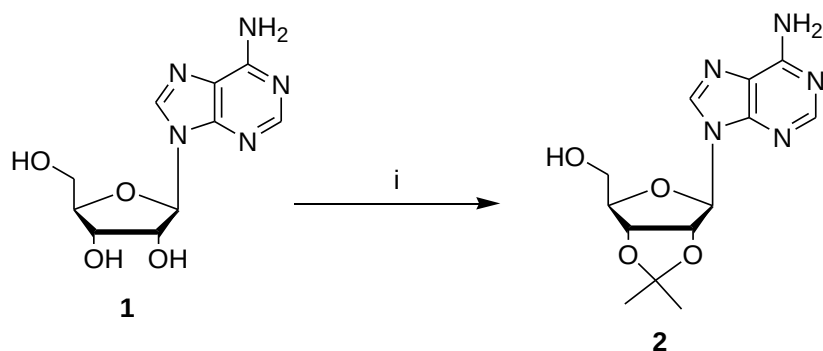
4. Výsledky a diskuze

4.1. Příprava výchozího 5' – azidoadenosinu

Výchozí látkou pro navrženou syntézu adenosinu nesoucího triazol v poloze 5' byl 5' – azidoadenosin, který měl být připraven z komerčně dostupného adenosinu **1**. Prvním krokem syntézy je konverze tohoto adenosinu na 2', 3'–isopropylidenadenosin **2**. Pro přeměnu 5'-hydroxyskupiny na azid **3** jsme chtěli využít Mitsunobu reakce.

Literatura popisuje více reakcí k výrobě meziprojektu 2', 3' – isopropylidenadenosinu **2**. Z důvodu dostupnosti chemikálii, jednoduchosti a ekonomické zátěži reakce byla vybrána reakce, kde adenosin byl rozpuštěn v acetonu za katalýzy p – TsOH po dobu 1,5 hod za laboratorní teploty (*Schéma 14*). Tato reakce probíhala naprosto bez problémů a přečištěním kapalinovou chromatografií jsme získali produkt s výtěžkem 97%.

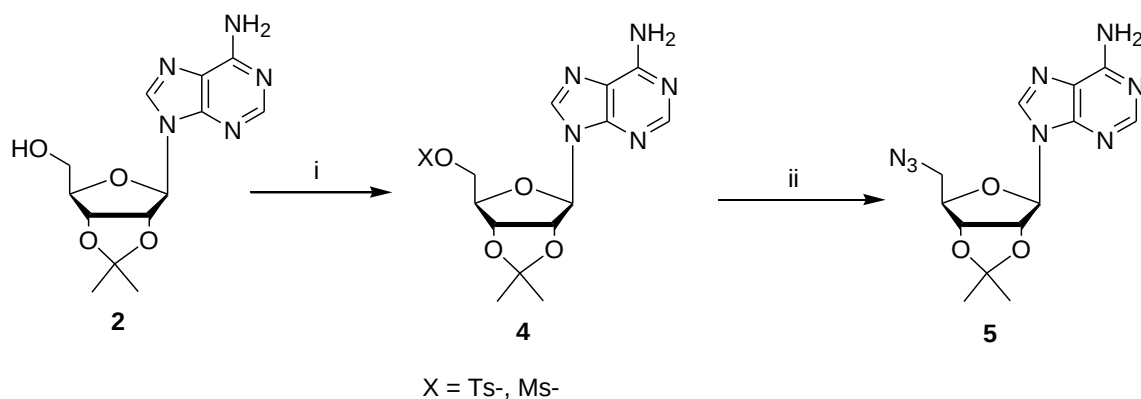
Schéma 14. Příprava 2', 3'–isopropylidenadenosinu



(i) Aceton, p-TsOH, 1,5h, RT

Pro přípravu 5'-AA jsme nejprve zvolili reakci derivátu **2** na mesylát či tosylát **4** s následnou substitucí sulfonové skupiny azidem sodným (*Schema 15*).

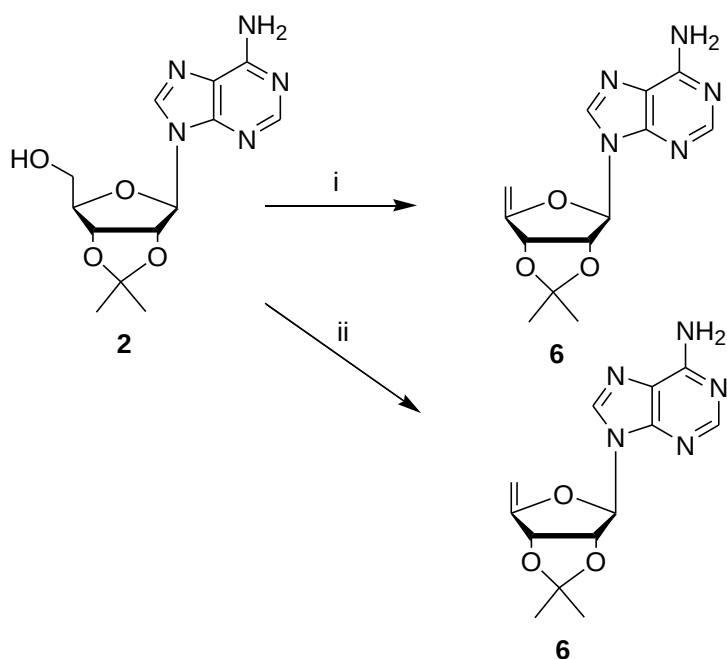
Schéma 15. Syntéza 5'-AA z 2',3'-isopropylidenadenosinu přes tosylát či mesylát



(i) Pyridin, TsCl(MsCl); (ii) NaN₃, DMF

Při prvním kroku reakce, kde jsme předpokládali vedle mesylace požadované hydroxyskupiny v poloze 5' rovněž mesylaci na aminoskupině v poloze 6 došlo k eliminaci vody za vzniku dvojné vazby mezi uhlíkem 5' a 4' za vzniku derivátu **6** (Schéma 16). Tato sloučenina byla ověřena na LC/MS.

Schéma 16. Příprava sloučeniny 6.



(i) MsCl, pyridin, rt, 72 h; (ii) TsCl, pyridin, rt, 2 h

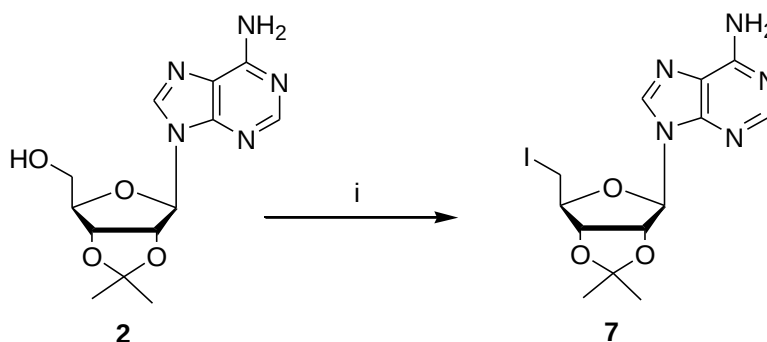
Spektra ukázali, že je látka velice znečištěna, jak bylo předpokládáno díky vysokým výtěžkům. Prozatím její čištění jsme pozastavili a věnovali se dalším sloučeninám.

Jako alternativní metodu jsme použili tosylaci derivátu **2** popsanou v literatuře²¹ za pomoci tosylchloridu. Tento způsob přípravy popisuje reakci při laboratorní teplotě nebo při -20°C. Byly vyzkoušeny oba způsoby, ale oba byly neúspěšné. Produktem syntézy prováděné za laboratorní teploty byl opět produkt eliminace **6** (*Schéma 16*), syntéza prováděná při -20°C poskytla zpět pouze výchozí látku.

Další vyzkoušenou metodou byla halogenace adenosinu thionylchloridem^{4,5}. Suspenze adenosinu **1** s acetonitrilem byla chlazená v ledové lázni při 0°C a poté byl přidán thionylchlorid s pyridinem a směs byla míchána při 0°C 3 hodiny. Následně byla směs odstavena a dále míchána při laboratorní teplotě přes noc. Výsledkem nebyl podle LC/MS popsáný 5'-chloro-5'-deoxy-2',3'-O-sulfinyladenosin, ale pouze nezreagovaná výchozí látka.

Dále jsme provedli halogenaci jodem 2', 3'-isopropylidenadenosinu **2** na příslušný jodderivát v poloze 5'²². Intermediát **2** byl rozpuštěn spolu s PPh₃, I₂ a imidazolem (báze) v suchém THF a míchán týden za laboratorní teploty. Pomocí LC/MS jsme zjistili, že v roztoku se nachází pouze nezregovaná látka.

Schéma 17. Příprava jodderivátu



(i) PPh₃, imidazol, I₂, THF, RT

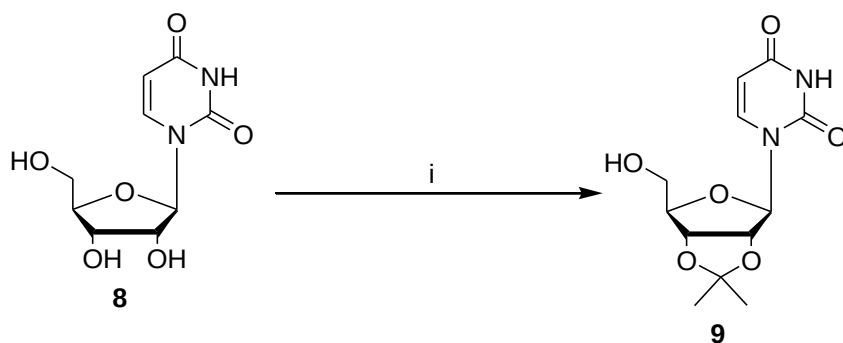
Dalšími možnými postupy k přípravě 5′ – azidoadenosinu se budeme zabývat v blízké budoucnosti.

4.2. Příprava 5′-azidouridinu

Pro přípravu 5′-azidouridinu jsme se pokusili využít přeměny příslušných 5′-halogen či 5′-tosylderivátů.

Jako výchozí látku jsme použili uridin **8**, který byl v polohách 2′ a 3′ převeden na ketal dle postupu z literatury. Uridin se rozpustil v acetonu a za katalýzy H_2SO_4 se tato směs nechala míchat po dobu 3,5 hodiny v atmosféře argonu za RT. Poté byl roztok zneutralizován přidavkem pyridinu, odpařen, promyt metanolem a opět odpařen do sucha. Produkt byl přečištěn jednoduchou kolonovou chromatografií, kde mobilní fází byla směs DCM/MeOH 12:1. Reakce proběhla ve velmi výborném výtěžku 93% (*Schéma 18*).

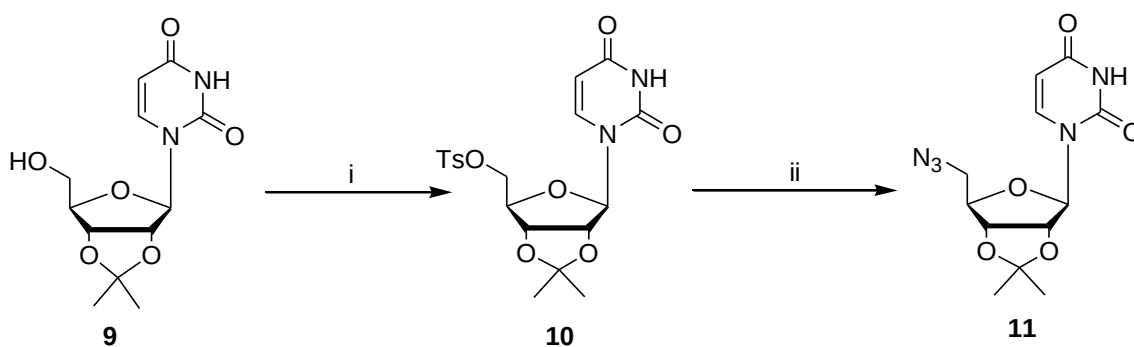
Schéma 18. Příprava 2′,3′-isopropylidenuridinu.



(i) Aceton, H_2SO_4 , Py, 3.5 hod, RT

Tento intermediát dále reagoval s TsCl v pyridinu, který slouží jako rozpouštědlo i jako báze. Reakce probíhala 3 hod za RT. Produkt byl odpařen, lyofilizován a následně přímo konvertován s azidem sodným v DMF na 5′-azidouridin **11** po dobu 2 hodin při 80°C (*Schéma 19*).

Schéma 19. Příprava 5'-azidouridinu přes tosylderivát.

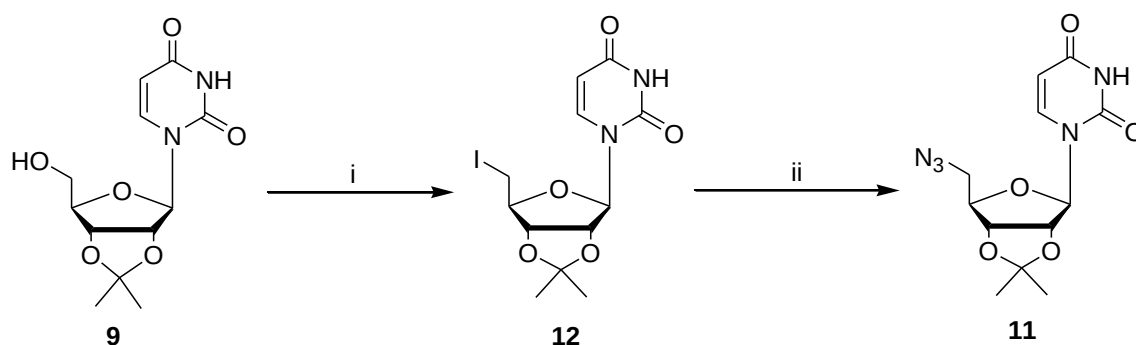


(i) TsCl, Py, 3 hod, RT; (ii) NaN₃, DMF, 80°C, 2 hod

Ačkoliv podle LC/MS i podle NMR tato reakce probíhá, výtěžky a čistota surového produktu byly příliš malé. Proto jsme vyzkoušeli další metodu přípravy 5'-azidouridinu.

Další metodou, kterou jsme zvolili byla příprava a následná přeměna jodderivátu **12**. Pro jeho přípravu jsme zvolili halogenaci jodem v poloze 5' uridinu.²² Nejprve byl připraven intermediát 2',3'- isopropylidenuridin **2**, který byl následně rozpuštěn spolu s PPh₃, I₂, imidazolem (báze) v suchém THF a míchán 1 hod za laboratorní teploty. Reakce se projevila odbarvením roztoku. Dále byla tato směs odpařena za vzniku medovité látky, která byla přečištěna pomocí kolonové chromatografie na silikagelovém nosiči v mobilní fázi tol/AcN 5:2. Tímto způsobem byla získána čistá látka **12** ve výtěžku 60 %. Čistý jodderivát byl rozpuštěn v DMF a přidáním NaN₃ míchán při 90°C po dobu 24 hod. Produkt byl lyofilizován, poté přečištěn pomocí HPLC. Struktura a čistota látky byla ověřena pomocí MNR.

Schéma 20. Příprava 5'-AU přes jodderivát.



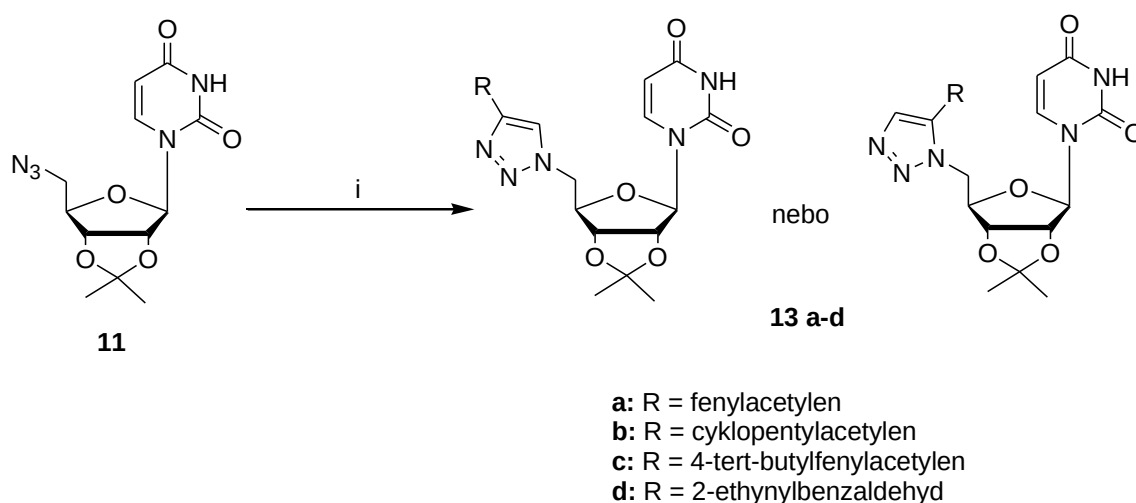
(i) PPh₃, imidazol, I₂, THF, 1 hod, RT; (ii) NaN₃, DMF, 90°C, 24 hod

4. 3. Příprava 5'-triazoluridinu

Připravený azidoderivát **11** byl využit pro přípravu triazolových derivátů za pomoci katalyzovaných click reakcí pomocí postupu uvedeného v literatuře.²³ Tyto reakce byly prováděny za použití čtyř různých acetylenů a to fenylacetylen, cyklopentylacetylen, 4-tert-butylfenylacetylen, 2-ethynylbenzaldehyd.

Reakce byla prováděna suspendováním 5'-azidouridinu ve směsi isopropanol/voda 1:1, který dále reagoval s jednotlivými alkyny za katalýzy askorbátu sodného a CuSO₄·5H₂O při 40°C po dobu 2 hodin. Produkt jsme izolovali odpařením, následným suspendováním ve vodě a odfiltrováním. Výtěžky se pohybovali od 33-46%.

Schéma 21. Příprava 5'-(4-substituovaný-1,2,3-triazol-1-yl)-uridin



(i) Askorbát sodný, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, isopropanol/voda 1:1, 40°C, 2 hod

Vznik a čistota všech triazolových derivátů **13 a-d** byla určena pomocí LC/MS. Produkt **13d** byl znečištěn neznámou látkou, proto jsme ho přečistili přes HPLC. Ostatní produkty vznikaly jako čisté látky.

Velmi zajímavý fakt na vzniku triazolových derivátů je skutečnost, že vzniká pouze jeden regioisomer, což je potvrzeno jak pomocí LC tak i pomocí NMR. Výjimku tvoří pouze derivát **13d**, který podle NMR spekter pravděpodobně obsahuje oba dva isomery plus třetí neznámou látku, která zřejmě vznikla rozkladem původního derivátu **13d**. Pro určení struktury konkrétního regioisomeru budou následně použity pokročilejší NMR experimenty.

Pro ověření, zda takto prováděné reakce splňují podmínku click reakcí, byla zvolena jednoduchá metoda izolace a naměřena NMR spektra surových produktů. Ukázalo se, že tyto jsou znečištěny výchozími acetyleny. Proto bude nutné dále podmínky reakce ještě modifikovat.

5 Experimentální část

5.1. Metody

Teploty tání byly měřeny na Boetiově bloku a nejsou korigovány. Měření NMR spekter bylo provedeno v roztoku DMSO – d_6 na Bruker AMX-300 spektrometru (300 MHz) s vnitřním standardem TMS. Hodnoty chemického posunu jsou udány v ppm jednotkách, interakční konstanty v Hz. Měření hmotnostních spekter bylo realizováno na hmotnostním spektrometru TSQ Quantum ACCES, THERMO SCIENTIFIC, USA. Silikagel použitý při kapalinové chromatografii Silicagel 60 (0.04-0.063 mm) firmy Merck. 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-5 μ m, 12 nm. TLC chromatografie byla prováděna na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 F254 značky Merck.

5.2. Přípravy

5'-**(4-fenyl-1,2,3-triazol-1-yl)-2',3'-isopropylidenuridin (13 a)**

5'-azidouridin²² (0.0962 g, 0.31 mmol) byl suspendován ve směsi isopropanol/voda 1:1 (3.33 ml). K suspenzi byl přidán askorbát sodný (0.0292 g, 0.15 mmol), CuSO₄·5H₂O (0.0166 g, 0.066 mmol), fenylacetylen (0.083 ml, 0.76 mmol) a vše bylo mícháno při 40°C po dobu 2 hod. Produkt byl odpařen, suspendován ve vodě, zfiltrován a usušen pod lampou. Výtěžek 0.0417 g (33%). M.p. 172,3-174,4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.28 (br. s., 3 H) 1.47 (br. s., 3 H) 4.43 (br. s., 1 H) 4.59 - 4.84 (m, 2 H) 4.91 (br. s., 1 H) 5.14 (d, J =5.12 Hz, 1 H) 5.60 (d, J =6.22 Hz, 1 H) 5.78 (br. s., 1 H) 7.33 (d, J =6.40 Hz, 2 H) 7.43 (t, J =6.68 Hz, 4 H) 7.61 (d, J =6.77 Hz, 1 H) 7.69 (d, J =6.95 Hz, 1 H) 7.83 (d, J =6.59 Hz, 3 H) 8.61 (br. s., 1 H) 11.49 (br. s., 1 H). MS m/z pro C₂₀H₂₁N₅O₅: 411,41, nalezeno 411.95 [M+1]⁺.

5'-(4-cyklopentyl-1,2,3-triazol-1-yl)-2',3'-isopropylidenuridin (13 b)

5'-azidouridin²² (0.1 g, 0.32 mmol) byl suspendován ve směsi isopropanol/voda 1:1 (3.33 ml). K suspenzi byl přidán askorbát sodný (0.03 g, 0.15 mmol), CuSO₄·5H₂O (0.0162 g, 0.066 mmol), cyklopentylacetylen (0.086 ml, 0.74 mmol) a vše bylo mícháno při 40°C po dobu 2 hod. Produkt byl odpařen, suspendován ve vodě, zfiltrován a usušen pod lampou. Výtěžek 0.0432 g (33%). M.p. 144,9 -149,3°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.28 (s, 4 H) 1.38 - 1.76 (m, 11 H) 1.85 - 2.05 (m, 2 H) 3.07 (br. s., 1 H) 4.37 (d, *J*=2.74 Hz, 1 H) 4.50 - 4.74 (m, 2 H) 4.81 - 4.91 (m, 1 H) 5.10 (d, *J*=5.85 Hz, 1 H) 5.62 (d, *J*=7.50 Hz, 1 H) 5.77 (s, 1 H) 7.64 (d, *J*=7.87 Hz, 1 H) 7.82 - 7.99 (m, 1 H) 11.47 (br. s., 1 H). MS *m/z* pro C₁₉H₂₅N₅O₅: 403,43, nalezeno 403,98 [M+1]⁺.

5'-(4-(4-tertbutylfenyl)-1,2,3-triazol-1-yl)-2',3'-isopropylidenuridin (13 c)

5'-azidouridin²² (0.104 g, 0.34 mmol) byl suspendován ve směsi isopropanol/voda 1:1 (3.33 ml). K suspenzi byl přidán askorbát sodný (0.03 g, 0.15 mmol), CuSO₄·5H₂O (0.0166 g, 0.066 mmol), 4-tert-butylfenylacetylen (0.135 ml, 0.75 mmol) a vše bylo mícháno při 40°C po dobu 2 hod. Produkt byl odpařen, suspendován ve vodě, zfiltrován a usušen pod lampou. Výtěžek 0.0715 g (46%). M.p. 72,3-75.4 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.19 - 1.38 (m, 52 H) 1.48 (s, 8 H) 4.09 (s, 1 H) 4.38 - 4.50 (m, 2 H) 4.61 - 4.84 (m, 4 H) 4.88 - 4.96 (m, 2 H) 5.15 (d, *J*=5.85 Hz, 2 H) 5.57 - 5.67 (m, 2 H) 5.80 (s, 2 H) 7.40 (s, 4 H) 7.46 (d, *J*=8.05 Hz, 4 H) 7.52 (s, 1 H) 7.64 - 7.80 (m, 3 H) 8.56 (s, 1 H) 11.49 (br. s., 1 H). MS *m/z* pro C₂₉H₂₉N₅O₅: 467,52, nalezeno 468,09 [M+1]⁺.

5'-(4-(2-benzaldehyd)-1,2,3-triazol-1-yl)-2',3'-isopropylidenuridin (13 d)

5'-azidouridin²² (0.060 g, 0.19 mmol) byl suspendován ve směsi isopropanol/voda 1:1. K suspenzi byl přidán askorbát sodný (0.0175 g, 0.088 mmol), CuSO₄·5H₂O (0.010 g, 0.04 mmol), 2-ethynylbenzaldehyd (0.0258 g, 0.2 mmol) a vše bylo mícháno při 40°C po dobu 2 hod. Produkt byl odpařen, suspendován ve vodě, zfiltrován a usušen pod lampou. Výtěžek 0.0385 g (45%). M.p. 82.1-85°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.17 - 1.33 (m, 4 H) 1.38 - 1.54 (m, 4 H) 4.36 - 4.52 (m, 1 H) 4.66 - 4.88 (m, 2 H) 4.89 - 4.98 (m, 1 H) 5.07 - 5.18 (m, 1 H) 5.53 - 5.66 (m, 1 H) 5.77 (br. s., 1 H) 7.32 - 7.43 (m, 1 H) 7.43 - 7.46 (m, 1 H) 7.47 - 7.49 (m, 1 H) 7.49 - 7.52 (m, 1 H) 7.53 - 7.59 (m, 1 H) 7.65 (d, *J*=4.39 Hz, 2 H) 7.71 - 7.74 (m, 1 H) 7.99 - 8.09 (m, 1 H) 8.45 - 8.53 (m, 1 H) 8.56 - 8.60 (m, 1 H) 9.01 - 9.09 (m, 1 H). MS *m/z* pro C₂₁H₂₁N₅O₆: 439,42, nalezeno 439,92 [M+1]⁺.

6 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo ověřit a připravit pomocí click reakcí 5'-azidoderiváty adenosinu a uridinu jako prekurzory pro vznik derivátů triazolů.

Na úvod předložené bakalářské práce jsem se věnovala rešerži, která shrnuje známé přípravy azidoderivátů a triazolů našich zkoumaných nukleosidů. Rešerže se dále zaměřuje na biologickou aktivitu zmíněných látek. Adenosinové deriváty se podle literatury jeví jako látky s širokým rozsahem biologické aktivity.

Experimentální část vedla v první řadě k přeměně komerčně dostupného adenosinu či uridinu na příslušný 2', 3'-isopropylidenderivát **2** a **9**, kdy tyto reakce běžely zcela bez problémů s velmi dobrými výtěžky. Takto chráněný adenosin byl dále podroben reakcím s tosylchloridem a thionylchloridem. Jak se ukázalo, tak produktem této reakce nebyl příslušný tosylát ani 5'-chloroderivát, nýbrž v závislosti na reakčních podmínkách produkt eliminace **6** či výchozí látka, ačkoliv literatura popisuje syntézy za bezproblémové. Další zkoušenou metodou a opět neúspěšnou byla halogenace jodem za pomoci trifenylofosfinu. V roztoku se nacházela pouze nezreagovaná výchozí látka. Další přípravou prekurzoru 5'-azidoadenosinu se budeme zabývat v blízké budoucnosti.

Chráněný uridin **9** byl přeměněn tosylchloridem za vzniku jen velmi malého množství 5'-tosyluridinu **10**, tudíž jsme zvolili cestu přes halogenderivát **12**, který byl připraven s dobrými výtěžky a který byl převeden na požadovaný 5'-azidouridin **11**.

Na závěr této práce jsem se věnovala samotným click reakcím mezi připraveným azidem a acetyleny. Podařilo se připravit čtyři modelové triazoly, které byly ověřeny na LC/MS a na NMR. K řešení zůstává otázka regioselektivity těchto reakcí, stabilita a případně způsob izolace vzniklých triazolů resp. úprava reakčních podmínek, tak aby splňovaly požadavky na click reakce.

7 Literatura

1. Wang, T.; Lee, H. J.; Tosh, D. K.; Kim, H. O.; Pal, S.; Choi, S.; Lee, Y.; Moon, H. R.; Zhao, L. X.; Lee, K. M.; Jeong, L. S. Design, synthesis, and molecular modeling studies of 5'-deoxy-5'-ureidoadenosine: 5'-ureido group as multiple hydrogen bonding donor in the active site of S-adenosylhomocysteine hydrolase. 17 ed.; 2007; pp 4456-4459.
2. Townsend, A. P.; Roth, S.; Williams Huw, E. L.; Stylianou, E.; Thomas, N. R. New S-adenosyl-L-methionine analogues: synthesis and reactivity studies. 11 ed.; 2009; pp 2976-2979.
3. Comstock, L. R.; Rajski, S. R. Expeditious synthesis of aziridine-based cofactor mimics. 58 ed.; 2002; pp 6019-6026.
4. Robins, M. J.; Hansske, F.; Wnuk, S. F.; Kanai, T. Nucleic acid related compounds. 66. Improved syntheses of 5'-chloro-5'-deoxy- and 5'-S-aryl(or alkyl)-5'-thionucleosides. 69 ed.; 1991; pp 1468-1474.
5. Ciuffreda, P.; Loseto, A.; Alessandrini, L.; Terraneo, G.; Santaniello, E. Adenylate deaminase (5'-adenylic acid deaminase, AMPDA)-catalyzed deamination of 5'-deoxy-5'-substituted and 5'-protected adenosines: A comparison with the catalytic activity of adenosine deaminase (ADA). 2003; pp 4748-4751.
6. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. 40 ed.; 2001; pp 2004-2021.
7. Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F. Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry. 109 ed.; 2009; pp 4207-4220.
8. Cosyn, L.; Palaniappan, K. K.; Kim, S.-K.; Duong, H. T.; Gao, Z.-G.; Jacobson, K. A.; Calenbergh, S. V. 2-Triazole-Substituted Adenosines: A New Class of Selective A3 Adenosine Receptor Agonists, Partial Agonists, and Antagonists . 49 ed.; 2006; pp 7373-7383.
9. O'Mahony, G.; Svensson, S.; Sundgren, A.; Grotli, M. Synthesis of 2'-([1,2,3]triazol-1-yl)-2'-deoxyadenosines. 27 ed.; 2008; pp 449-459.
10. Babic, A.; Gobec, S.; Gravier-Pelletier, C.; Le Merrer, Y.; Pecar, S. Synthesis of 1-C-linked diphosphate analogues of UDP-N-Ac-glucosamine and UDP-N-Ac-muramic acid. 64 ed.; 2008; pp 9093-9100.
11. Yeoh, K. K.; Butters, T. D.; Wilkinson, B. L.; Fairbanks, A. J. Probing replacement of pyrophosphate via click chemistry; synthesis of UDP-sugar analogues as potential glycosyl transferase inhibitors. 344 ed.; 2009; pp 586-591.

12. Winans, K. A.; Bertozzi, C. R. An Inhibitor of the Human UDP-GlcNAc 4-Epimerase Identified from a Uridine-Based Library: A Strategy to Inhibit O-Linked Glycosylation. 9 ed.; 2002; pp 113-129.
13. Liu, F.; Austin, D. J. A General synthesis of 5'-Azido-5'-deoxy-2',3'-O-isopropylidene Nucleosides. 66 ed.; 2001; pp 8643-8645.
14. Mikhailov, S. N.; Grishko, N. B. Acyclic analogs of nucleosides Synthesis of chiral 1,5-dihydroxy-4-methyl-3-oxa-2-pentyl derivatives of uracil. 2012.
15. Castro, B. R. Replacement of alcoholic hydroxyl groups by halogens and other nucleophiles via oxyphosphonium intermediates. 1983.
16. Hara, S.; Fukuhara, T. Method of fluorination using N,N-diethyl-a,a-difluorobenzylamines. 2004.
17. Kobayashi, S. e. a. Selective synthesis of fluorinated carbohydrates using N,N-diethyl-a,a-difluoro-(m-methylbenzyl)amine. 45 ed.; 2004; pp 1287-1289.
18. Kobayashi, S. e. a. Deoxyfluorination of alcohols using N,N-diethyl-a,a-difluoro-(m-methylbenzyl)amine. 2004.
19. Verheyden, J. P. H.; Moffatt, J. G. Halo Sugar Nucleosides. I. Iodination of the Primary Hydroxyl Groups of Nucleosides with Methyltriphenoxyphosphonium Iodide. 35 ed.; 1970; pp 2319-2325.
20. Chaudhary, P. M.; Chavan, S. R.; Shirazi, F.; Razdan, M.; Nimkar, P.; Maybhat, S. P.; Likhite, A. P.; Gonnate, R.; Hazara, B. G.; Deshpande, M. V.; Deshpande, S. R. Exploration of click reaction for the synthesis of modified nucleosides as chitin synthase inhibitors. 17 ed.; 2009; pp 2433-2440.
21. Enomoto, K.; Nagasaki, T.; Yamauchi, A.; Onoda, J.; Sakai, K.; Yoshida, T.; Maekawa, K.; Kinoshita, Y.; Nishino, I.; Kikuoka, S.; Fukunaga, T.; Kawamoto, K.; Numata, Y.; Takemoto, H.; Nagata, K. Development of high-throughput spermidine synthase activity assay using homogeneous time-resolved fluorescence. 351 ed.; 2006; pp 229-240.
22. Rondla, R.; Coats, S. J.; McBrayer, T. R.; Grier, J.; Johns, M.; Tharnish, P. M.; Whitaker, T.; Zhou, L.; Schinazi, R. F. Anti-hepatitis C virus activity of novel β -D-2'-C-methyl-4'-azido pyrimidine nucleoside phosphoramidate prodrugs. 20 ed.; 2009; pp 99-106.
23. Bhatt, B.; Thomson, R. J.; von Itzstein, M. An efficient approach to 2,5-anhydro-glucitol-based 1'-homo-N-nucleoside mimetics. 52 ed.; 2011; pp 2741-2743.

<http://www.namereactions.org/huisgen-13-dipolar-cycloaddition>