

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie

Charles University in Prague, Faculty of Science

Department of Organic Chemistry

Doktorský studijní program: Organická chemie

Ph.D. Study program: Organic Chemistry

Autoreferát disertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis



Syntéza nových typů *C*-nukleosidů

Synthesis of novel types of *C*-nucleosides

Mgr. Tomáš Kubelka

Školitel/Supervisor: doc. Ing. Michal Hocek CSc., DSc.

Praha, 2013

Abstract

General and modular approach for the preparation of disubstituted pyrimidine and pyridine *C*-2'-deoxyribonucleosides and benzyl homo *C*-ribonucleosides was developed. The key intermediate 2,4-dichloropyrimidine *C*-2'-deoxyribonucleoside was efficiently prepared from easily available TBS-protected deoxyribose glycal in three steps. Its mild nucleophilic substitutions or cross-coupling reactions proceeded regioselectively at position 4, while at elevated temperatures or with excess of reagent, a double substitution occurred. The 2-chloro-4-substituted intermediates underwent another substitution or coupling to afford a two-dimensional library of diverse 2,4-disubstituted pyrimidin-5-yl *C*-2'-deoxyribonucleotides. Modular methodology for the synthesis of 2,6-disubstituted pyridine *C*-2'-deoxyribonucleosides was based on the Heck coupling of bromo-chloro-iodopyridines with TBS-protected deoxyribose glycal. Obtained 2-bromo-6-chloro- and 6-bromo-2-chloropyridin-3-yl deoxyribonucleosides were used for further transformations. Some of their Pd-catalyzed cross-coupling reactions proceeded chemoselectively at the position of the bromine, whereas nucleophilic substitutions were unselective and gave mixtures of products. The mono-substituted intermediates were used for another coupling or nucleophilic substitution giving rise to a small library of 2,6-disubstituted pyridine *C*-2'-deoxyribonucleosides. Some of the disubstituted pyridine *C*-2'-deoxyribonucleosides were converted to triphosphates and will be tested for polymerase incorporation in the quest for the extension of the genetic alphabet. New 2-substituted benzyl *C*-ribonucleosides and -nucleotides were designed as carba analogues of phosphoribosylanthranilate, a key intermediate in tryptophan biosynthesis. The synthesis was based on the preparation of TBS-protected 2-bromobenzyl *C*-ribonucleoside by addition of (2-bromobenzyl)magnesium bromide to ribonolactone followed by reduction and subsequent functional group transformations. Pd-catalyzed hydrogenation, cross-couplings, amination or hydroxylation, as well as lithiation followed by reaction with CO₂ and amidations, gave a large series of 2-substituted derivatives that were deprotected to afford free homo-*C*-ribonucleosides. Some of the title nucleosides were converted to 5'-monophosphates. All final compounds did not exert any antiviral or cytostatic effects.

Abstrakt

V rámci předložené dizertační práce byla vyvinuta obecná metodika pro přípravu disubstituovaných pyrimidin a pyridin C-2'-deoxynukleosidů a také způsob přípravy benzylových homo C-ribonukleosidů. V první části práce byl ze snadno dostupného TBS-chráněného glykalu ve třech krocích syntetizován klíčový intermediát – 2,4-dichlorpyrimidin C-2'-deoxyribonukleosid. V následujících reakcích byla za použití mírných podmínek prokázána výrazná regiosektivita substituce v poloze 4. Pokud byly reakce prováděny při vyšší teplotě a byl použit nadbytek činidla, docházelo k disubstituci v polohách 2 i 4. Série derivátů nesoucích substituent v poloze 4 a chlor v poloze 2 byla použita pro syntézu 2D knihovny 2,4-disubstituovaných pyrimidin C-nukleosidů nesoucích různé substituenty. Heckova reakce brom-chlor-jodpyridinu s TBS-chráněným glykalem byla využita pro syntézu 2,6-disubstituovaných pyridin C-deoxyribonukleosidů. Pro další transformace byly připraveny dva klíčové intermediáty – 2-brom-6-chlor- a 6-brom-2-chlorpyridin-3-yl C-2'-deoxyribonukleosid. Chemoselektivní cross-coupling reakce probíhaly u těchto intermediátů přednostně s atomem bromu. Nukleofilní aromatická substituce naopak probíhala neselektivně a vznikaly směsi produktů. Připravené monosubstituované deriváty byly použity pro další cross-coupling nebo nukleofilní substituce a umožnily vznik knihovny 2,6-disubstituovaných pyridin C-2'-deoxyribonukleosidů. Z vybraných pyridin C-nukleosidů byla připravena série trifosfátů, které budou testovány jako kandidáti na nové umělé páry bazí. Série benzylových homo C-ribonukleosidů byla vytvořena jako potenciální inhibitory PriA isomerázy – klíčového enzymu v biosyntéze tryptofanu u *Mycobacterium tuberculosis*. Adice (2-brombenzyl)magnesium bromidu na TBS-chráněný ribonolakton a následná redukce poskytly klíčový intermediát 2-brombenzyl C-ribonukleosid. Atom bromu byl poté substituován a reakcemi katalyzovanými paladiem byla připravena široká série derivátů. Několik vybraných 2-substituovaných benzyl homo C-ribonukleosidů bylo převedeno na odpovídající trifosfáty. Všechny odchráněné finální sloučeniny byly testovány na antivirální a cytostatické účinky bez výrazných aktivit.

Obsah - Contents

Abstract	2
Abstrakt	3
Obsah - Contents	4
1 Introduction	5
2 Specific aims of the thesis	5
3 Results and discussion	6
3.1 Synthesis of 2,4-disubstituted pyrimidin-5-yl C-2'-deoxyribonucleosides	6
3.2 Synthesis of 2,6-disubstituted pyridin-3-yl C-2'-deoxyribonucleosides	8
3.3 Synthesis of 2,6-disubstituted pyridin-3-yl C-2'-deoxyribonucleoside triphosphates	9
3.4 Synthesis of 2-substitued benzyl homo-C-ribonucleosides and -nucleotides	10
4 Conclusion	13
5 References	14
1 Úvod	15
2 Cíle práce	15
3 Výsledky a diskuze	16
3.1 Syntéza 2,4-disubstituovaných pyrimidin-5-yl C-2'-deoxyribonukleosidů.....	16
3.2 Syntéza 2,6-disubstituovaných pyridin-3-yl C-2'-deoxyribonukleosidů.....	18
3.3 Syntéza 2,6-disubstituovaných pyridin-3-yl C-2'-deoxyribonukleosid trifosfátů .	19
3.4 Syntéza 2-substituovaných benzyl homo-C-ribonukleosidů a -nukleotidů.....	20
4 Závěr	23
5 Použitá literatura	24
Seznam publikací vztahujících se k této práci - List of publications of the author related to the thesis	25
Konferenční příspěvky - Conference contributions	25
Curriculum vitae	27

1 Introduction

Naturally occurring *N*-nucleosides are composed of the heterocyclic aglycon and carbohydrate moiety which are connected via carbon-nitrogen bond. On the other hand, in *C*-nucleosides the linkage of the heterocyclic part and sugar is replaced by carbon-carbon bond (**Figure 1**). This structural feature is giving *C*-nucleosides some unique properties and is responsible for their increased stability towards hydrolytic and enzymatic cleavage.

In recent decades, *C*-nucleosides have been extensively studied¹ and strong emphasis was placed on the development of new synthetic strategies for the preparation of unnatural *C*-nucleosides which can be used for many different purposes:

- Biologically active compounds - antiviral, antibiotic, antitumor and antibacterial^{2, 3, 4, 5}
- Extension of the genetic alphabet and artificial base pairing^{6, 7}
- Biochemical probes⁸
- Tools for structure-activity studies
- Tools for study and modifications of biological processes^{9, 10}
- Fluorescent labeling¹¹

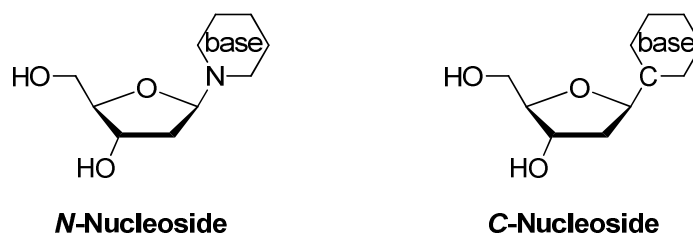


Figure 1. General structure of *N*-nucleoside and *C*-nucleoside.

2 Specific aims of the thesis

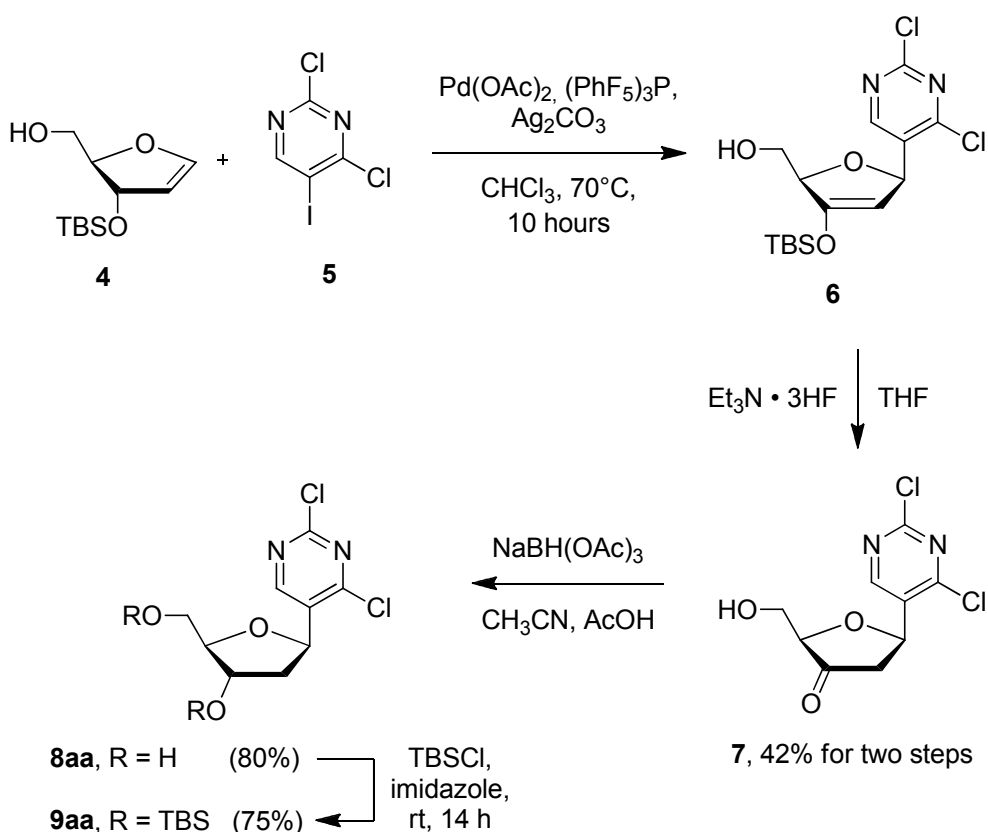
1. Development of the methodology for the synthesis of 2,4-disubstituted pyrimidin-5-yl *C*-2'-deoxyribonucleosides bearing different functional groups.

2. Development of the methodology for the preparation of 2,6-disubstituted pyridin-3-yl *C*-2'-deoxyribonucleosides with diverse substituents.
3. Synthesis of the series of nucleoside triphosphates from selected 2,6-disubstituted pyridin-3-yl *C*-2'-deoxyribonucleosides.
4. Development of the modular approach to 2-substituted benzyl homo-*C*-ribonucleosides and -nucleotides.

3 Results and discussion

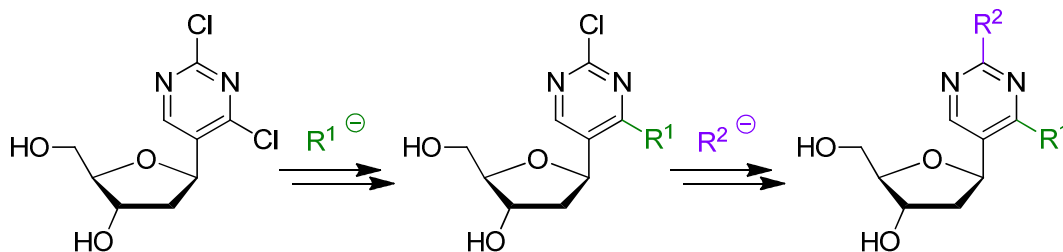
3.1 Synthesis of 2,4-disubstituted pyrimidin-5-yl *C*-2'-deoxyribonucleosides

Modular and selective approach for the synthesis of 2,4-disubstituted pyrimidin-5-yl *C*-2'-deoxyribonucleosides was developed. Heck reaction of 2,4-dichloro-5-iodopyrimidine with 3'-TBS-protected glycal followed by deprotection and reduction afforded 2,4-dichloropyrimidine *C*-2'-deoxyribonucleosides key intermediate (**Scheme 1**).



Scheme 1. Synthesis of 2,4-dichloropyrimidin-5-yl *C*-nucleoside key intermediates.

The key intermediate was then used for a synthesis of 2D library of diverse 2,4-disubstituted pyrimidine C-2'-deoxyribonucleosides via regioselective displacement of the chlorine atoms (**Scheme 2**). The chlorine at position 4 was found significantly more reactive in nucleophilic substitutions and cross-couplings than the chlorine at position 2.



Scheme 2. Sequential regioselective substitution of chlorine atoms.

Thus, the nucleophilic substitution of unprotected 2,4-dichloropyrimidine C-nucleoside with ammonia or sodium methoxide under mild conditions gave selectively 2-chloro-4-amino- or 2-chloro-4-methoxypyrimidine C-nucleosides, whereas at elevated temperatures the corresponding disubstituted derivatives were obtained. Similarly, the iron-catalyzed methylation or the Buchwald–Hartwig dimethylamination of silylated 2,4-dichloropyrimidine C-nucleoside with one equivalent of the reagent gave selectively 4-substituted 2-chloropyrimidine intermediate whereas, with excess reagent, the disubstituted products were formed. The 4-monosubstituted 2-chloropyrimidine C-nucleosides served as intermediates for the second nucleophilic

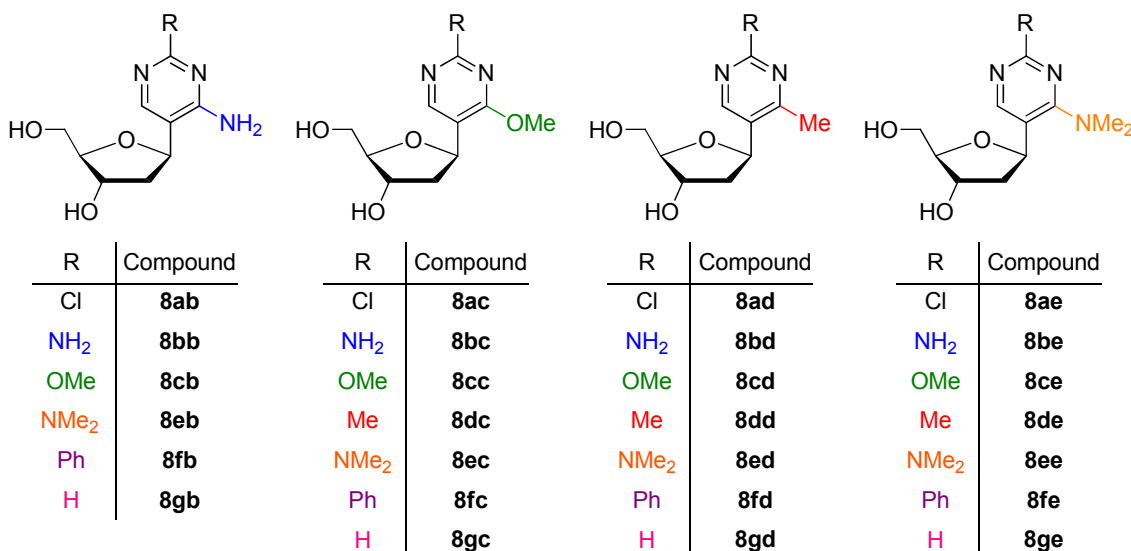
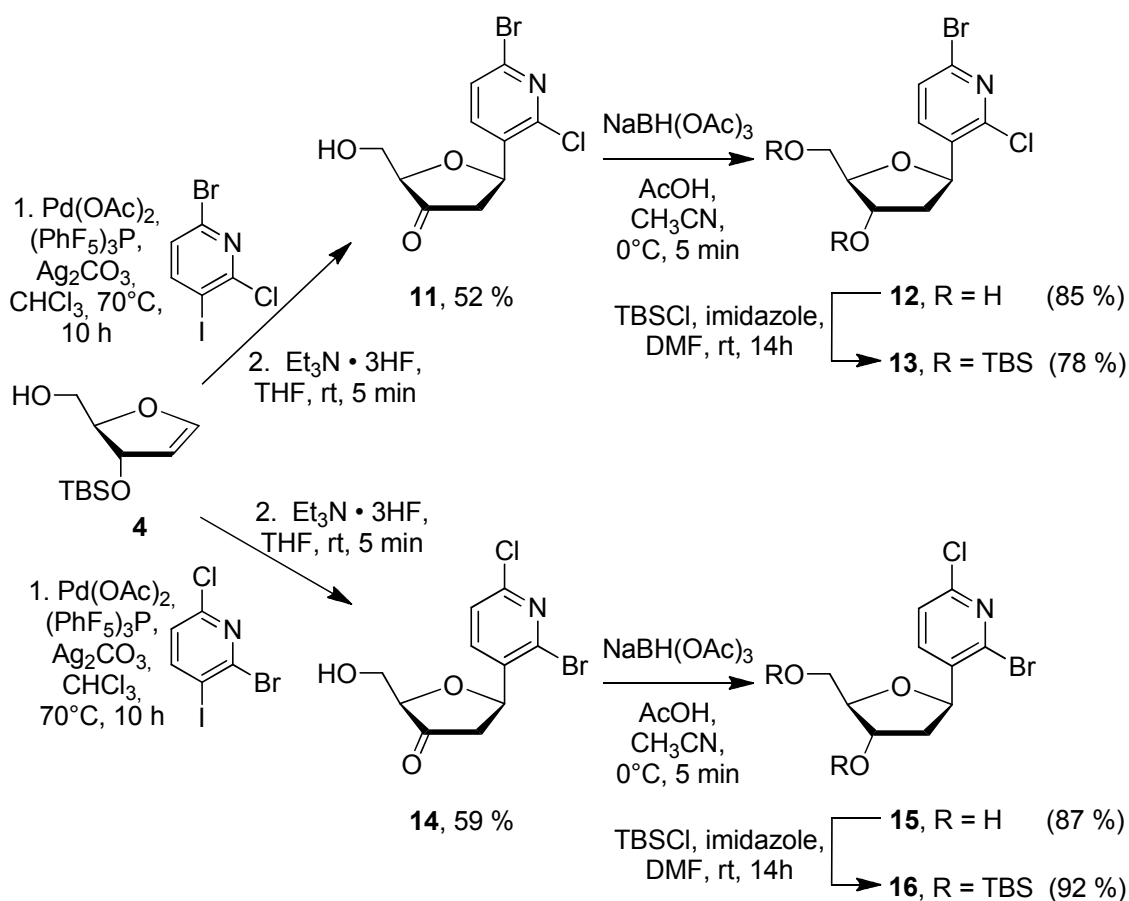


Figure 2. 2D library of 2,4-disubstituted pyrimidine C-2'-deoxyribonucleosides.

substitution or cross-coupling at position 2 (**Figure 2**). Final desilylation of protected nucleosides was readily performed by treatment with triethylamine trihydrofluoride. Some of the prepared derivatives will be tested as substrates of DNA polymerases.

3.2 Synthesis of 2,6-disubstituted pyridin-3-yl C-2'-deoxyribonucleosides

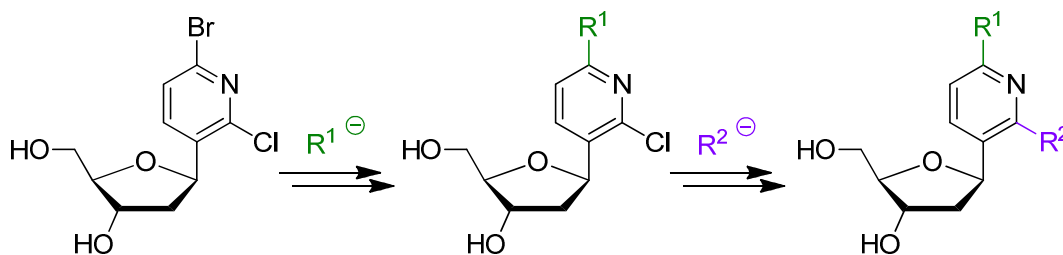
A series of 2,6-disubstituted pyridin-3-yl C-2'-deoxyribonucleosides was prepared from two regioisomeric key intermediates - 2-bromo-6-chloro- and 6-bromo-2-chloropyridin-3-yl C-2'-deoxyribonucleosides. The synthesis of key intermediates was based on Heck coupling of bromo-chloro-iodopyridines with 3'-TBS-protected glycol (**Scheme 3**).



Scheme 3. Synthesis of 2,6-dihalopyridin-3-yl C-nucleoside key intermediates.

Systematic study of the chemoselectivity of cross-coupling reactions and nucleophilic substitutions of regioisomeric 2-bromo-6-chloro- and 6-bromo-2-chloropyridin-3-yl C-2'-deoxyribonucleosides was thereafter performed. The cross-

couplings generally proceeded with good chemoselectivity at the position of the bromine but the choice of the starting compound depended on the separability of the mono-substituted products from the starting compound.



Scheme 4. Seguentia chemoselective substitution of halogen atoms.

On the other hand, nucleophilic substitution with NaSMe was unselective giving a separable mixture of both mono-substituted products, whereas the reactions with ammonia or NaOMe did not proceed or led to complex mixtures (at elevated temperature). The mono-substituted halopyridine *C*-nucleoside intermediates were used for another coupling or nucleophilic substitution (**Scheme 4**) to give a library of 2,6-disubstituted pyridin-3-yl *C*-2'-deoxyribonucleosides (**Figure 3**).

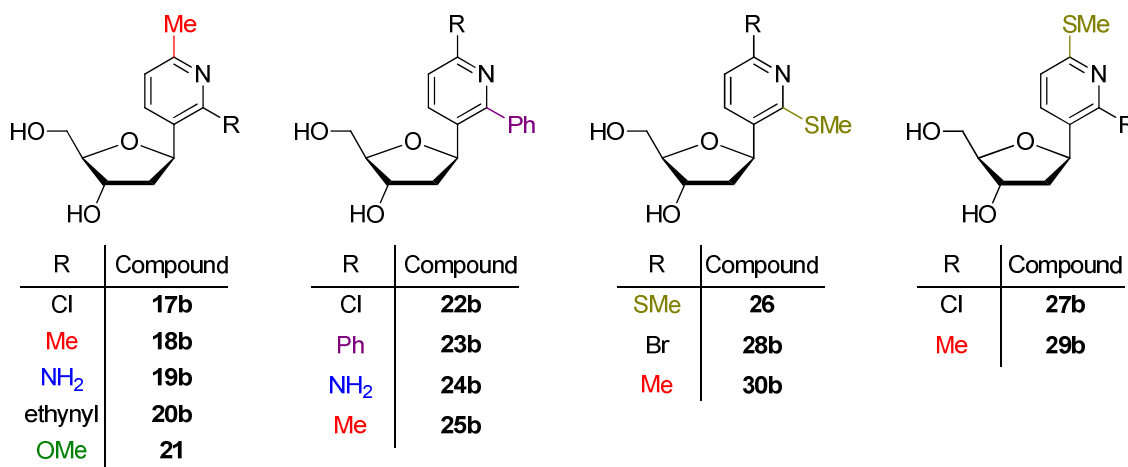
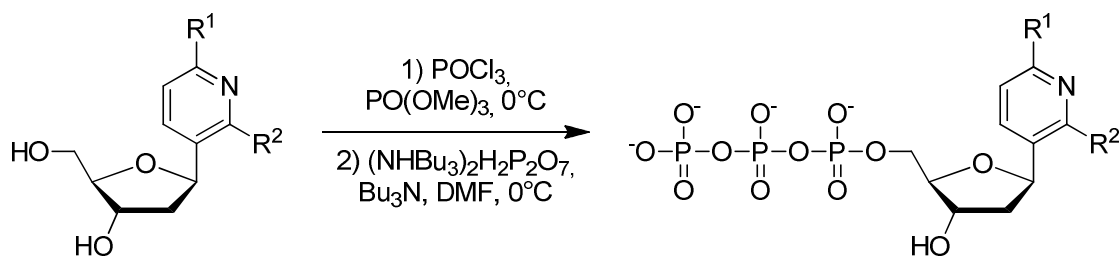


Figure 3. 2D library of 2,6-disubstituted pyridin-3-yl *C*-2'-deoxyribonucleosides.

3.3 Synthesis of 2,6-disubstituted pyridin-3-yl *C*-2'-deoxyribonucleoside triphosphates

A series of seven 2,6-disubstituted pyridine *C*-nucleosides was selected for the testing of their ability to form artificial base pairs. These essays will be done in collaborative laboratory of professor Floyd Romesberg at the Scrips Research Institute.

Group of selected derivatives was converted to corresponding triphosphates by classical triphosphorylation methodology (**Scheme 5**) and afforded series of desired triphosphates in good to excellent yields (**Table 1**).



Scheme 5. Triphosphorylation of 2,6-disubstituted pyridine C-nucleosides.

Entry	Starting compound	R ¹	R ²	Product (yield)
1	17b	Me	Cl	36 (68%)
2	18b	Me	Me	37 (17%)
3	19b	Me	NH ₂	38 (51%)
4	21	Me	OMe	39 (54%)
5	26	SMe	SMe	40 (81%)
6	28b	Br	SMe	41 (27%)
7	30b	Me	SMe	42 (85%)

Table 1. Yields of triphosphorylation of 2,6-disubstituted pyridine C-nucleosides.

3.4 Synthesis of 2-substituted benzyl homo-C-ribonucleosides and -nucleotides

Group of benzyl homo C-ribonucleosides was designed as carba-analogues of phosphoribosylanthranilate (PRA) (**Figure 4**). This part of my thesis was done in collaboration with laboratory of professor Matthias Wilmanns from European Molecular Biology Laboratory in Hamburg and benzyl homo C-ribonucleosides were prepared as potential inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*.

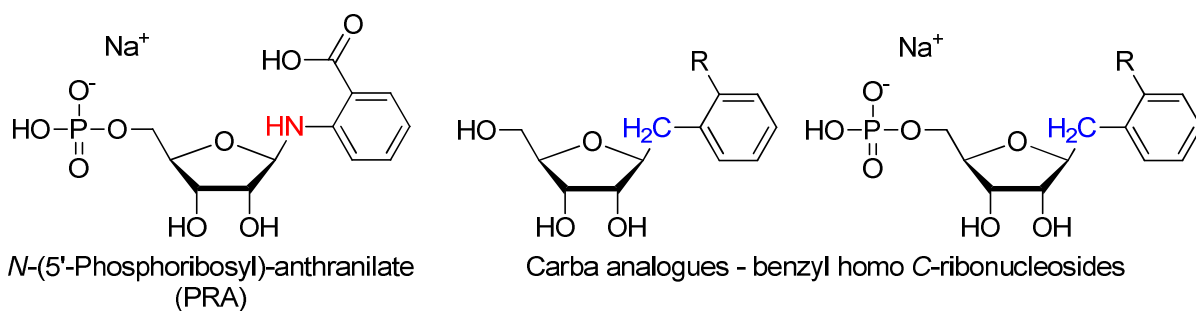
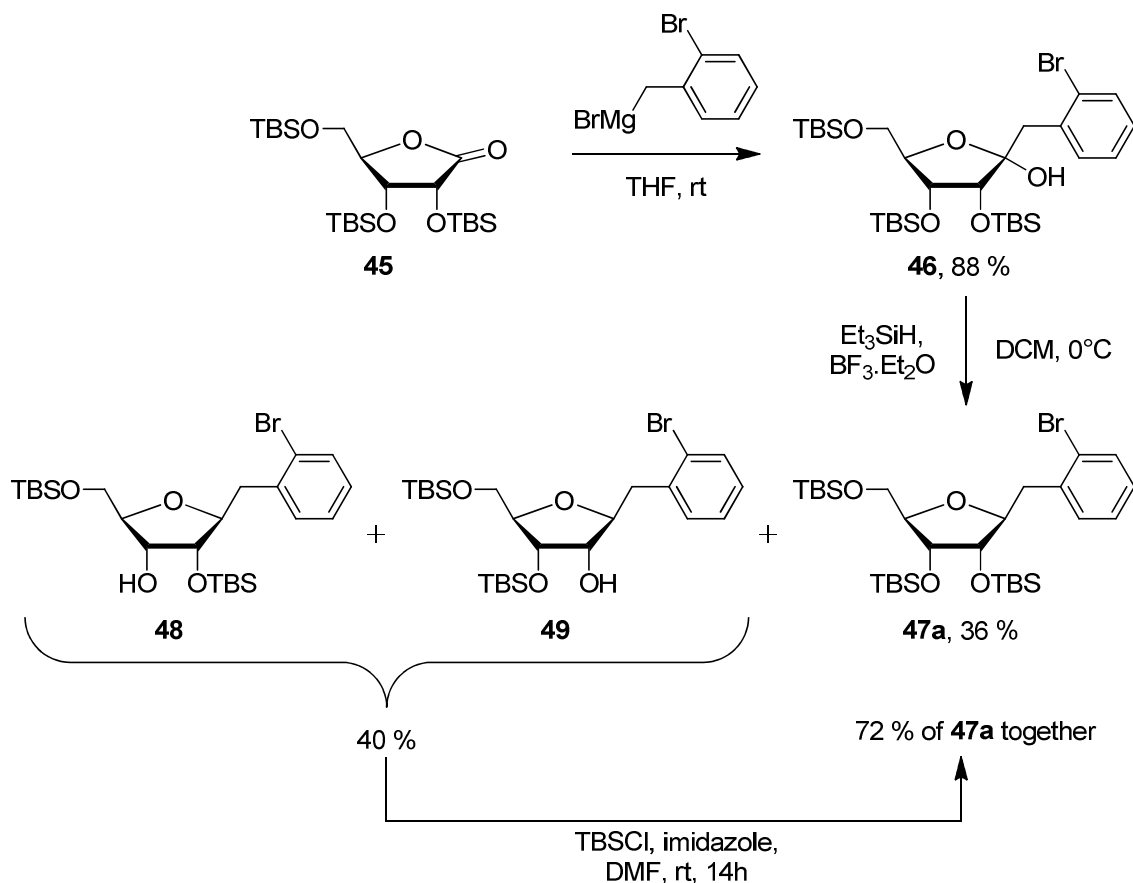


Figure 4. Structure of phosphoribosylanthranilate and design of carba analogues.

I have developed a facile approach for the synthesis of diverse 2-substituted derivatives of benzyl homo C-ribonucleosides and -nucleotides. The key intermediate was prepared by addition of (2-bromobenzyl)magnesium bromide to TBS-protected ribonolactone followed by reduction and re-silylation (**Scheme 6**). Further substitutions gave broad series of differently substituted derivatives (**Figure 5**). Pd-catalyzed hydrogenation, cross-couplings, Buchwald–Hartwig aminations and hydroxylation gave corresponding 2-unsubstituted or 2-alkyl-, 2-aryl-, 2-amino and 2-hydroxy derivatives. The Stille cross-coupling was employed for the introduction of furyl and thienyl moiety. Lithiation followed by reaction with CO₂ gave carboxylic acid, which was transformed into series of carboxamides. All protected derivatives were deprotected either with triethylamine trihydrofluoride or trifluoroacetic acid to final free nucleosides. Selected benzyl homo C-ribonucleosides were also converted to corresponding 5'-monophosphates. Series of deprotected benzyl homo C-ribonucleosides and -nucleotides was tested for the inhibition of PriA isomerase from *Mycobacterium tuberculosis* in laboratory of professor Matthias Wilmanns. None of the tested compounds showed any considerable inhibition of this enzyme at up to 0.5 mM concentrations.



Scheme 6. Synthesis of the key intermediate **47a**.

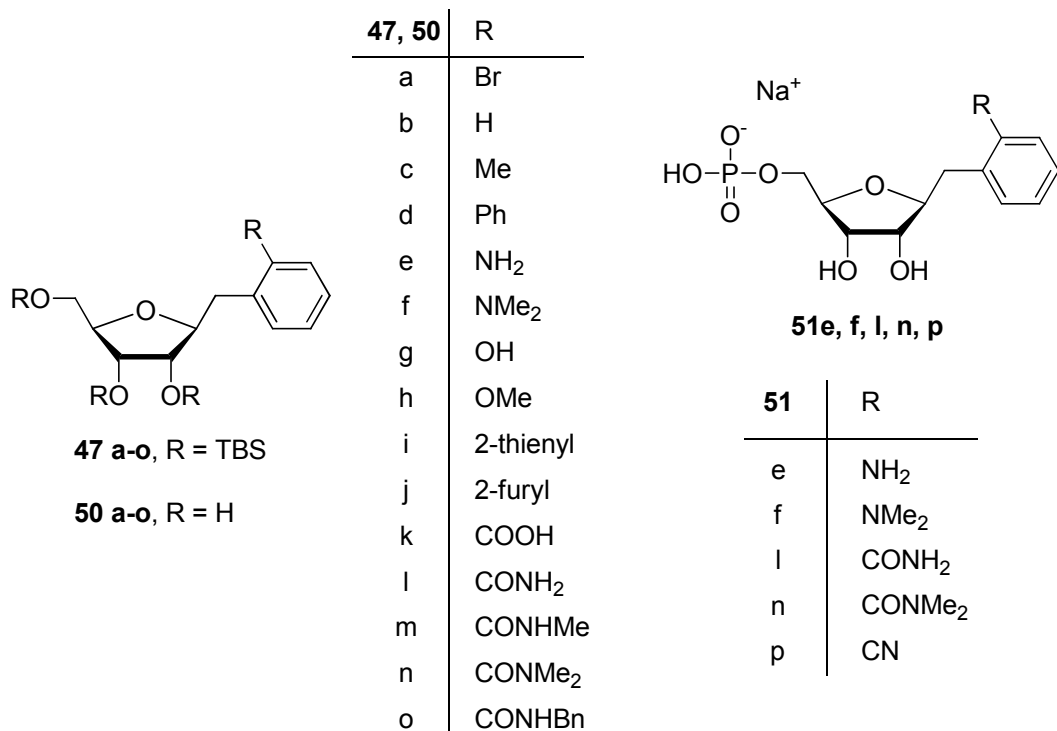


Figure 5. Series of 2-substituted benzyl *C*-ribonucleosides and 5'-monophosphates.

4 Conclusion

In first part of my thesis I successfully employed Heck reaction and prepared key dichloropyrimidine *C*-nucleoside intermediate in multigram scale. Regioselective nucleophilic substitutions and cross-coupling reactions under mild conditions afforded series of 4-monosubstituted 2-chloropyrimidine *C*-nucleosides while reactions with excess of reagent at elevated temperature gave 2,4-disubstituted pyrimidine *C*-nucleosides. Series of 4-monosubstituted 2-chloropyrimidine *C*-nucleosides was used for the synthesis of six types of disubstituted pyrimidine *C*-nucleosides bearing different substituents at positions 2 and 4. In total, 2D-library of 30 new 2,4-disubstituted pyrimidin-5-yl *C*-2'-deoxyribonucleosides was prepared.

In the second part of my thesis were prepared two key intermediates bromochloropyridine *C*-nucleoside and their protected analogs. Higher reactivity of bromine atom was confirmed by several chemoselective cross coupling reactions which gave monosubstituted chloropyridine *C*-nucleosides. Nucleophilic aromatic substitution with MeSNa afforded monosubstituted compounds in ratio 1:1. Generally nucleophilic substitution were unselective and led to the complex mixtures which were very hardly separable. Reactions with excess of reagent and at elevated temperature led to double substituted derivatives. Further derivatisation of monosubstituted compounds led to 2D-library of 21 new 2,6-disubstituted pyridin-3-yl *C*-2'-deoxyribonucleosides. The series of seven 2,6-disubstituted pyridine *C*-nucleosides triphosphates now undergoes tests for its possibility to form artificial base pairs.

In the last part of my thesis the key intermediate - 2-bromobenzyl *C*-ribonucleoside was prepared by addition of (2-bromobenzyl)magnesium bromide to ribonolactone and subsequent reduction. Pd-catalyzed hydrogenation, cross-couplings, amination or hydroxylation, as well as lithiation followed by reaction with CO₂ and amidations, gave a large series of 2-substituted derivatives that were deprotected to afford free homo-*C*-ribonucleosides. Some of the nucleosides were converted to corresponding 5'-monophosphates.

All prepared final free pyrimidine and pyridine *C*-2'-deoxyribonucleosides and benzyl homo *C*-ribonucleosides were tested for antiviral and cytostatic activity. However, none of tested compound did not exert any significant biological activities.

5 References

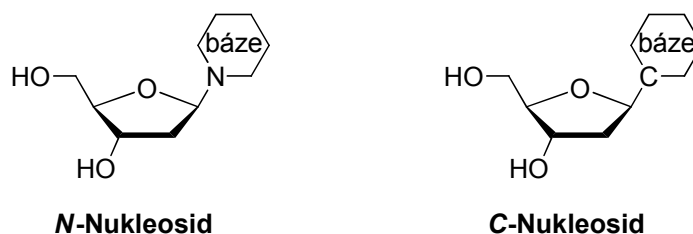
- 1 (a) Wu, Q.; Simons, C.: *Synthesis* **2004**, *10*, 1533-1553. (b) Adamo, M. F. A.; Pergoli, R.: *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 1544-1569. (c) Štambaský, J.; Hocek, M.; Kočovský, P.: *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6729-6764.
- 2 (a) Robins, R. K.; Srivastava, P. C.; Narayanan, V. L.; Plowman, J.; Paull, K. D.: *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 107-108. (b) Tricot, G.; Jayaram, H. N.; Weber, G.; Hoffman, R.: *Int. J. Cell Cloning* **1990**, *8*, 161-170. (c) Weber, G.; Prajda, N.; Aboniy, M.; Look, K. Y.; Tricot, G.: *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 3313-3322.
- 3 (a) Chen, J. J.; Drach, J. C.; Townsend, L. B.: *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4170-4178. (b) Chen, J. J.; Wei, Y.; Williams, J. D.; Drach, J. C.; Townsend, L. B.: *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids.* **2005**, *24*, 1417-1437.
- 4 (a) Miles, R. W.; Tyler, P. C.; Furneaux, R. H.; Bagdassarian, C. K.; Schramm, V. L.: *Biochemistry* **1998**, *37*, 8615-8621. (b) Kicska, G. A.; Long, L.; Hörig, H.; Fairchild, C.; Tyler, P. C.; Furneaux, R. H.; Schramm, V. L.; Kaufman, H. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 4593-4598. (c) Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Gainsford, G. J.; Hanson, J. C.; Kicska, G. A.; Sauve, A. A.; Schramm, V. L.; Tyler, P. C.: *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 155-160.
- 5 (a) Hori, M.; Ito, E.; Takita, T.; Koyama, G.; Takeuchi, T.; Umezawa, H.: *J. Antibiot.* **1964**, *17*, 96-99. (b) Hori, M.; Umezawa, H.: *J. Antibiot.* **1965**, *18*, 175-177.
- 6 Hirao, I.; Kimoto, M.: *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2012**, *88*, 345-367.
- 7 (a) Benner, S. A.; Hutter, D.; Sismour, A. M.: *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2003**, *3*, 125-126. (b) Yang, Z.; Hutter, D.; Sheng, P.; Sismour, A. M.; Benner, S. A.: *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 6095-6101.
- 8 Yang, Z.; Durante, M.; Glushakova, L. G.; Sharma, N.; Leal, N. A.; Bradley, K. M.; Chen, F.; Benner, S. A.: *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4705-4712.
- 9 Li, J-S.; Gold, B.: *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8764-8771.
- 10 (a) Li, J-S.; Fan, Y-H.; Zhang, Y.; Marky, L. A.; Gold, B.: *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2084-2093. (b) Li, J-S.; Shikiya, R.; Marky, L. A.; Gold, B.: *Biochemistry* **2004**, *43*, 1440-1448.
- 11 Ren, R. X.-F.; Chaudhuri, N. C.; Paris, P. L.; Rumney, S.; Kool, E. T.: *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7671-7678.

1 Úvod

Přírozně se vyskytující *N*-nukleosidy jsou složeny z heterocyklického aglykonu a cukerné části, jež jsou dohromady spojeny vazbou uhlík-dusík. Naproti tomu u *C*-nukleosidů je spojení cukerné a heterocyklické části nahrazeno vazbou uhlík-uhlík (**Obrázek 1**). Tento výrazný strukturální znak propůjčuje *C*-nukleosidům některé jedinečné vlastnosti, jako je třeba stabilita vůči hydrolytickému a enzymatickému štěpení.

V posledních desetiletích bylo studiu *C*-nukleosidů věnováno mnoho úsilí¹² a bylo vyvinuto mnoho různých syntetických postupů pro jejich přípravu. Tyto látky mohou být využity mnoha různými způsoby. Například:

- Biologicky aktivní látky - antivirální, antibiotické, protirakovinné a antibakteriální^{13, 14, 15, 16}
- Rozšířené genetické abecedy a umělé páry bází^{17, 18}
- Biochemické sondy¹⁹
- Nástroje pro studium vztahu struktura-aktivita
- Nástroje pro studium a modifikaci biologických procesů^{20, 21}
- Fluorescenční značení²²



Obrázek 1. Obecná struktura *N*-nukleosidu a *C*-nukleosidu.

2 Cíle práce

1. Vývoj vhodné metodiky pro syntézu 2,4-disubstituovaných pyrimidin-5-yl *C*-2'-deoxyribonukleosidů nesoucích dvě odlišné funkční skupiny.
2. Vývoj syntetické metody pro přípravu 2,6-disubstituovaných pyridin-3-yl *C*-2'-deoxyribonukleosidů s odlišnými substituenty.

3. Syntéza série nukleosid trifosfátů odvozených od vybraných 2,6-disubstituovaných pyridin-3-yl C-2'-deoxyribonukleosidů.
4. Vývoj modulárního přístupu pro syntézu 2-substituovaných benzyl homo C-ribonukleosidů a -nukleotidů.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Syntéza 2,4-disubstituovaných pyrimidin-5-yl C-2'-deoxyribonukleosidů

V této části práce byl vyvinut modulární a selektivní způsob pro přípravu 2,4-disubstituovaných pyrimidin-5-yl C-2'-deoxyribonukleosidů. Heckova reakce 2,4-dichlor-5-jodpyrimidinu s 3'-TBS chráněným glykalem, po které následovalo odchránění, a redukce vzniklého meziprojektu poskytla 2,4-dichlorpyrimidin C-2'-deoxyribonukleosid jako klíčový intermediát (**Schéma 1**).

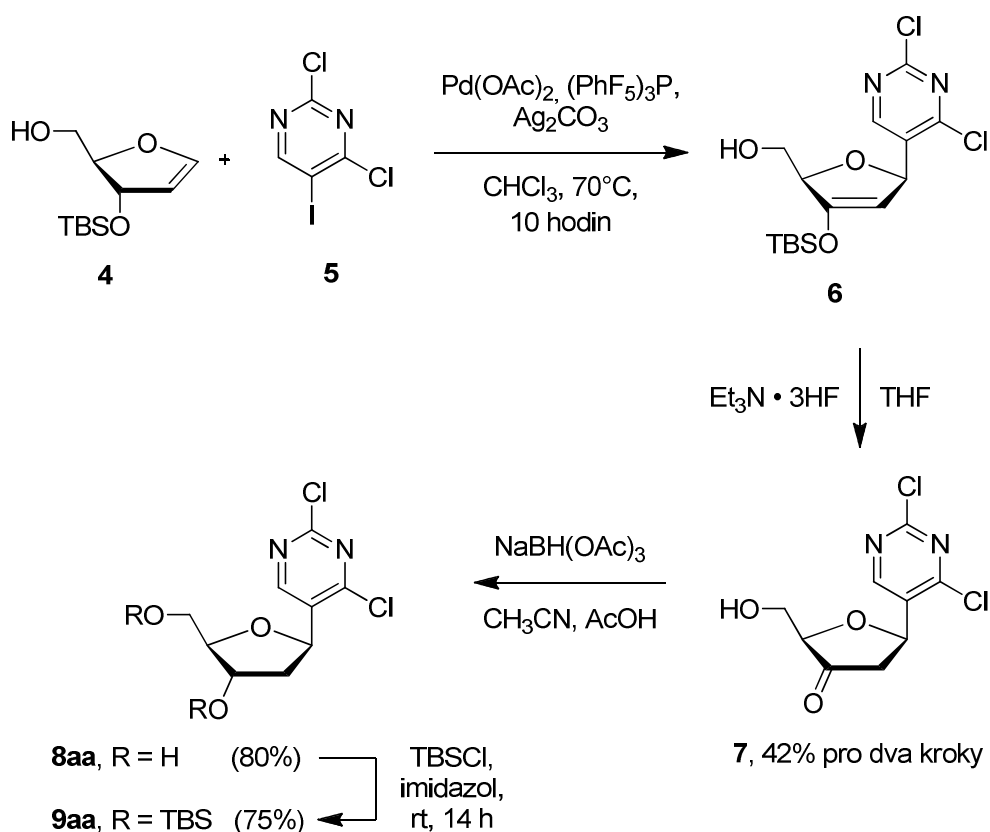


Schéma 1. Syntéza 2,4-dichlorpyrimidin C-2'-deoxyribonukleosidu - klíčového intermediátu.

Pomocí regioselektivních reakcí atomů chloru byla z klíčového intermediátu následně připravena 2D knihovna 2,4-disubstituovaných pyrimidin C-2'-deoxyribonukleosidů nesoucích odlišné substituenty (**Schéma 2**). Bylo zjištěno, že atom chloru v poloze 4 je výrazně reaktivnější než atom chloru v poloze 2, jak v nukleofilních substitucích, tak v cross-coupling reakcích.

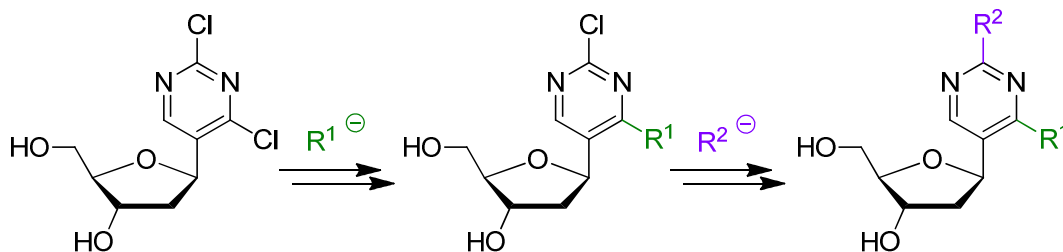
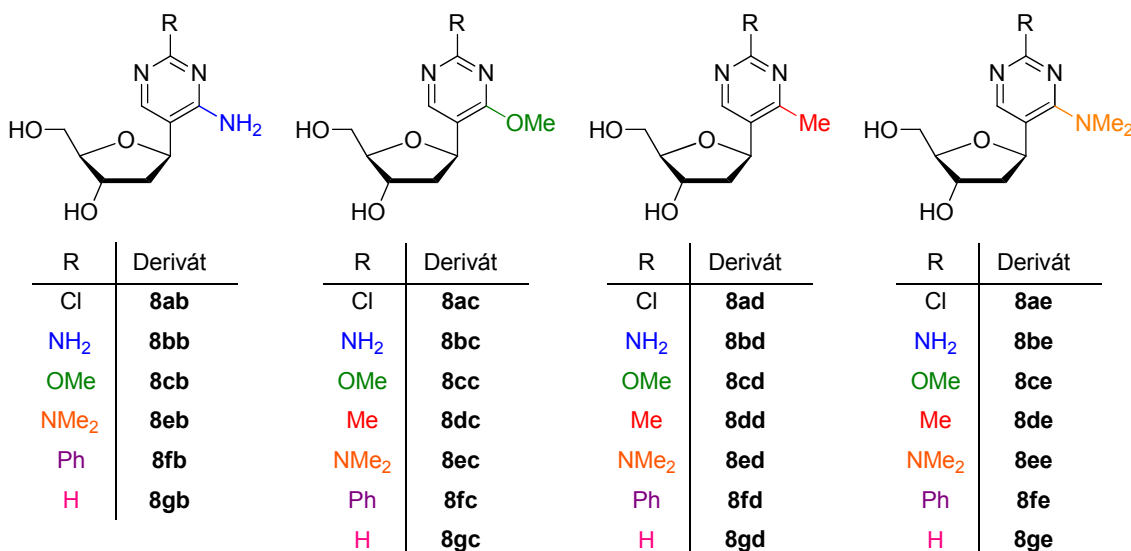


Schéma 2. Regioselektivní substituce atomů chloru .

Nukleofilní aromatická substituce ochráněného 2,4-dichloropyrimidin C-nukleosidu s methanolickým amoniakem nebo s methoxidem sodným za mírných podmínek poskytla selektivně 2-chlor-4-amino- nebo 2-chlor-4-methoxy- C-nukleosidy. Provedení reakcí za vyšších teplot mělo za následek vznik disubstituovaných produktů. Železem katalyzovaná methylace a Buchwald-Hartwigova aminace chráněného 2,4-dichloropyrimidin C-nukleosidu s jedním ekvivalentem činidla poskytly selektivně 4-substituované 2-chlor pyrimidin C-nukleosidy. Pokud byl použit nadbytek činidla, byly získány disubstituované deriváty. Sloučeniny nesoucí jeden substituent v poloze 4 a atom chloru v poloze 2 byly využity pro nukleofilní substituci nebo cross-coupling.



Obrázek 2. 2D knihovna 2,4-disubstituovaných pyrimidin C-2'-deoxyribonukleosidů.

(Obrázek 2). Konečné odchránění silylovaných nukleosidů bylo provedeno reakcí s triethylamin trihydrofluoridem. Vybrané deriváty budou testovány jako substráty pro DNA polymerázy.

3.2 Syntéza 2,6-disubstituovaných pyridin-3-yl C-2'-deoxyribonukleosidů

Série 2,6-disubstituovaných pyridin-3-yl C-2'-deoxyribonukleosidů byla připravena ze dvou regioisomerních meziproduktů – 2-brom-6-chlor- a 6-brom-2-chlorpyridin-3-yl C-2'-deoxyribonukleosidů. Pro syntézu klíčových intermediátů byl použit Heckův coupling brom-chlor-jodpyridinu s 3'-TBS chráněným glykalem (Schéma 3).

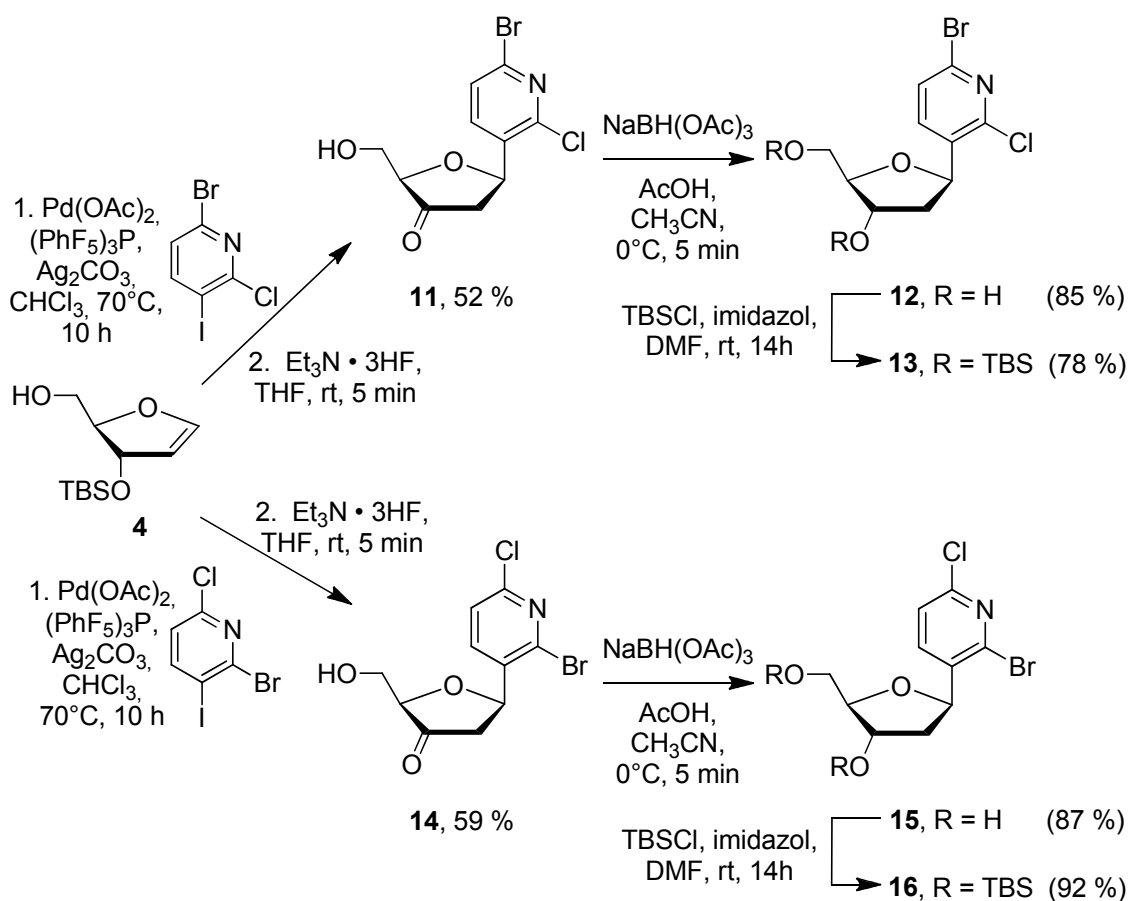


Schéma 3. Syntéza klíčových intermediátů - 2,6-dihalopyridin-3-yl C-nukleosidů.

Následně byla provedena systematická studie chemoselektivity nukleofilních substitucí a cross-couplingů pro oba regioisomerní 2-brom-6-chlor- a 6-brom-2-chlorpyridin-3-yl C-2'-deoxyribonukleosidy. Bylo zjištěno, že cross-couplingy probíhají

chemoselektivně přednostně s atomem bromu, ale velmi často záleželo na dělitelnosti monosubstituovaných produktů a výchozí sloučeniny.

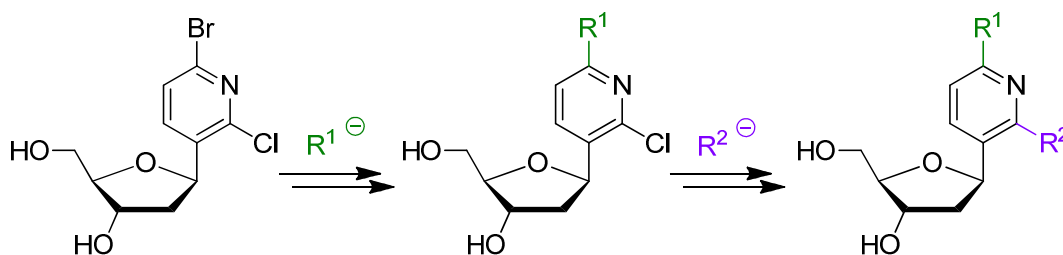
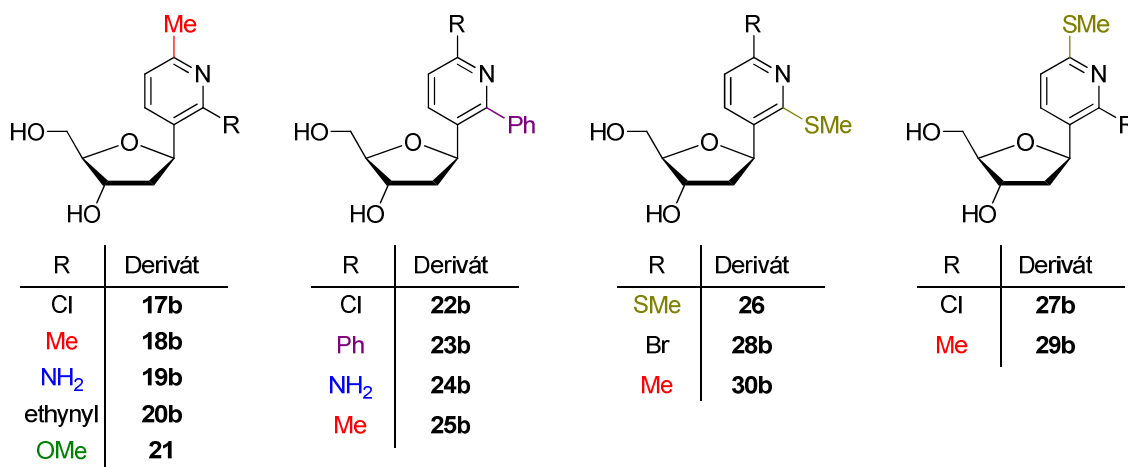


Schéma 4. Postupná chemoselektivní substituce halogenových atomů.

Na rozdíl od cross-couplingů probíhala nukleofilní substituce s NaSMe neselektivně a byla získána oddělitelná směs monosubstituovaných derivátů. Nukleofilní substituce s methanolickým amoniakem nebo s NaOMe neprobíhaly vůbec, nebo za použití vyšších teplot vedly k nedělitelným směsím. Monosubstituované halopyridin C-nukleosidy byly využity pro druhou substituci a pomocí nukleofilních substitucí a cross-couplingů (**Schéma 4**) byla připravena knihovna 2,6-disubstituovaných pyridin-3-yl C-2'-deoxyribonukleosidů (**Obrázek 3**).



Obrázek 3. 2D knihovna 2,6-disubstituovaných pyridin-3-yl C-2'-deoxyribonukleosidů.

3.3 Syntéza 2,6-disubstituovaných pyridin-3-yl C-2'-deoxyribonukleosid trifosfátů

Sedm 2,6-disubstituovaných pyridin-3-yl C-2'-deoxyribonukleosidů bylo vybráno pro otestování jejich schopnosti tvořit umělé páry bazí. Toto testování bude provedeno ve spolupracující laboratoři profesora Floyd Romesberga na Scrips

Research Institute. Skupina vybraných látek byla převedena na odpovídající trifosfáty za použití klasických podmínek (**Schéma 5**) a poskytla sérii trifosfátů v dobrých výtěžcích (**Tabulka 1**).

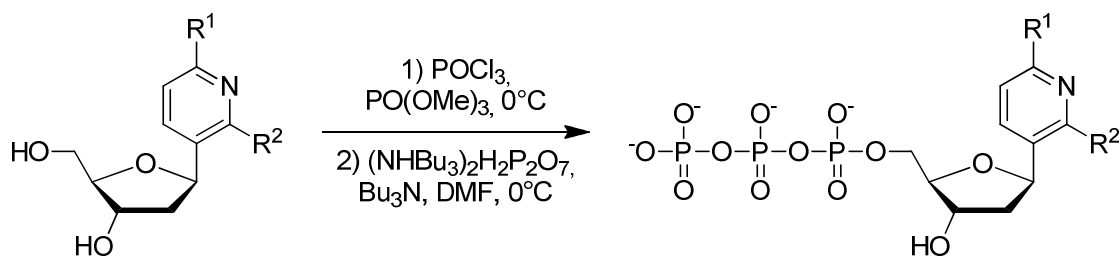


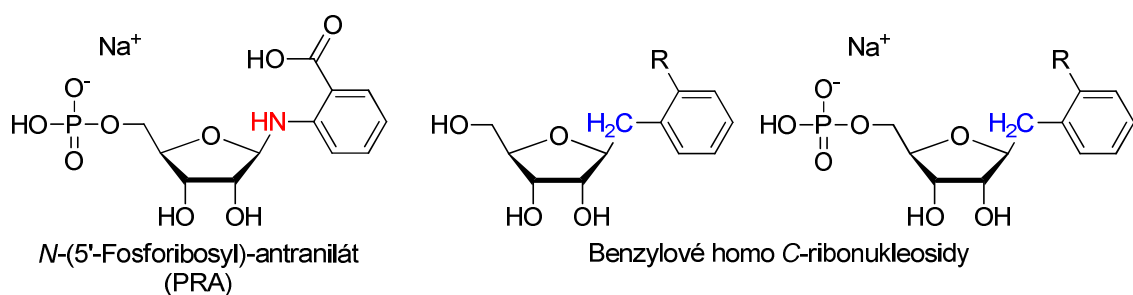
Schéma 5. Trifosforylace 2,6-disubstituovaných pyridin C-2'-deoxyribonukleosidů.

Experiment	Výchozí látka	R ¹	R ²	Produkt (výtezek)
1	17b	Me	Cl	36 (68%)
2	18b	Me	Me	37 (17%)
3	19b	Me	NH ₂	38 (51%)
4	21	Me	OMe	39 (54%)
5	26	SMe	SMe	40 (81%)
6	28b	Br	SMe	41 (27%)
7	30b	Me	SMe	42 (85%)

Tabulka 1. Výtěžky trifosforylace 2,6-disubstituovaných pyridin C-nukleosidů.

3.4 Syntéza 2-substituovaných benzyl homo-C-ribonukleosidů a -nukleotidů

Benzylové homo C-ribonukleosidy byly navrženy jako analogy fosforibosylantranilátu (PRA), které mají místo NH skupiny CH₂ skupinu (**Obrázek 4**). Tato část mého výzkumu byla provedena ve spolupráci s laboratoří profesora Matthiase Wilmannse z European Molecular Biology Laboratory v Hamburku a benzylové homo C-ribonukleosidy byly připraveny jako potenciální inhibitory *Mycobacterium tuberculosis*.



Obrázek 4. Struktura fosforibosylantranilátu a návrh potenciálních inhibitorů.

Byl vyvinut modulární postup pro syntézu 2-substituovaných derivátů benzylových homo C-ribonukleosidů a -nukleotidů. Klíčový intermediát byl připraven reakcí (2-brombenzyl)magnesium bromidu s TBS-chráněným ribonolaktonem následovanou redukcí a silylací (**Schéma 6**). Následné transformace poskytly sérii derivátů nesoucích různé substituenty (**Obrázek 5**). Paladiem katalyzované reakce poskytly sérii derivátů nesoucích v poloze 2 alkyl, aryl, amino a hydroxy skupiny. Stilleho cross-coupling byl použit pro připojení furanylu a thiofenylu. Karboxylová kyselina byla připravena lithiací a následnou reakcí s CO_2 . Všechny chráněné meziproducty byly odchráněny pomocí triethylamin trihydrofluoridu nebo trifluoroctové kyseliny. Vybrané benzylové homo C-ribonukleosidy byly převedeny na odpovídající 5'-monofosfáty. V laboratoři profesora Matthiase Wilmannse byla testována série všech připravených benzylových homo C-ribonukleosidů a -nukleotidů na inhibiční aktivity proti PriA isomeráze z *Mycobacterium tuberculosis*. Žádná z testovaných látek však nevykázala inhibici tohoto enzymu.

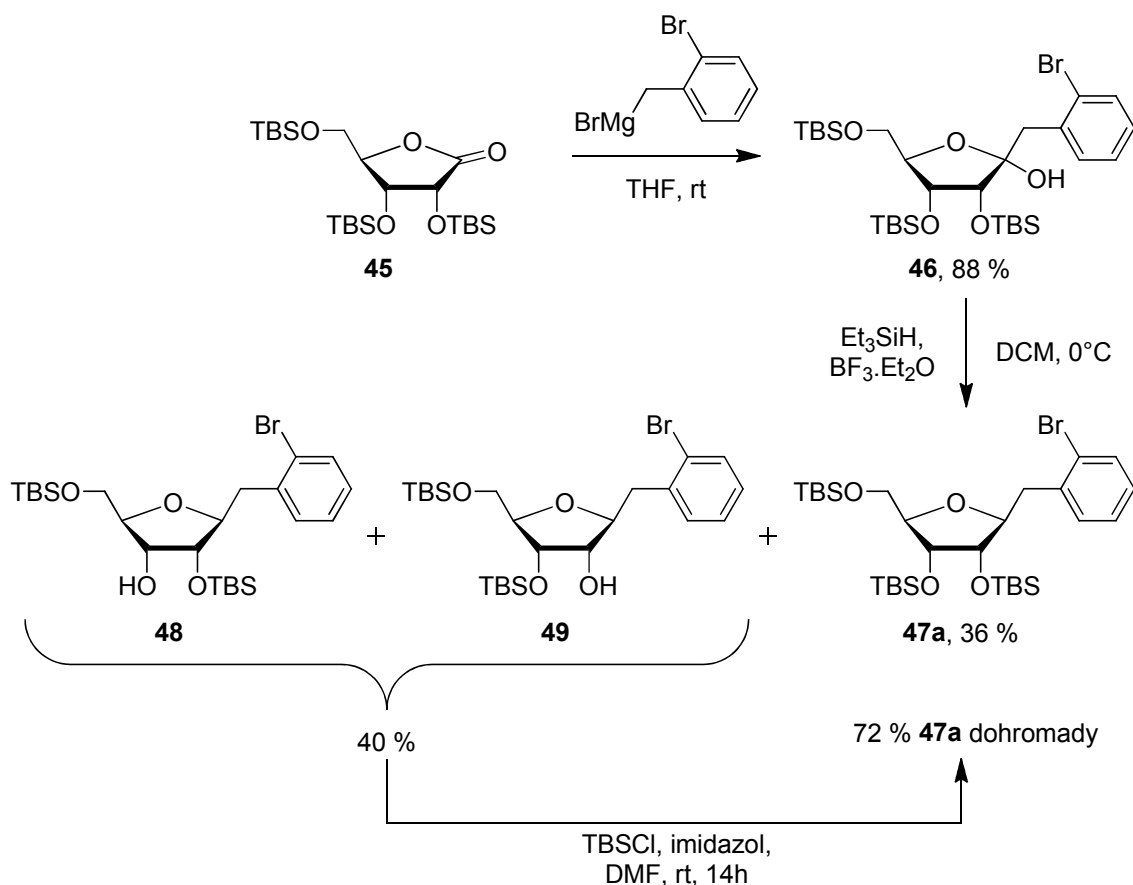
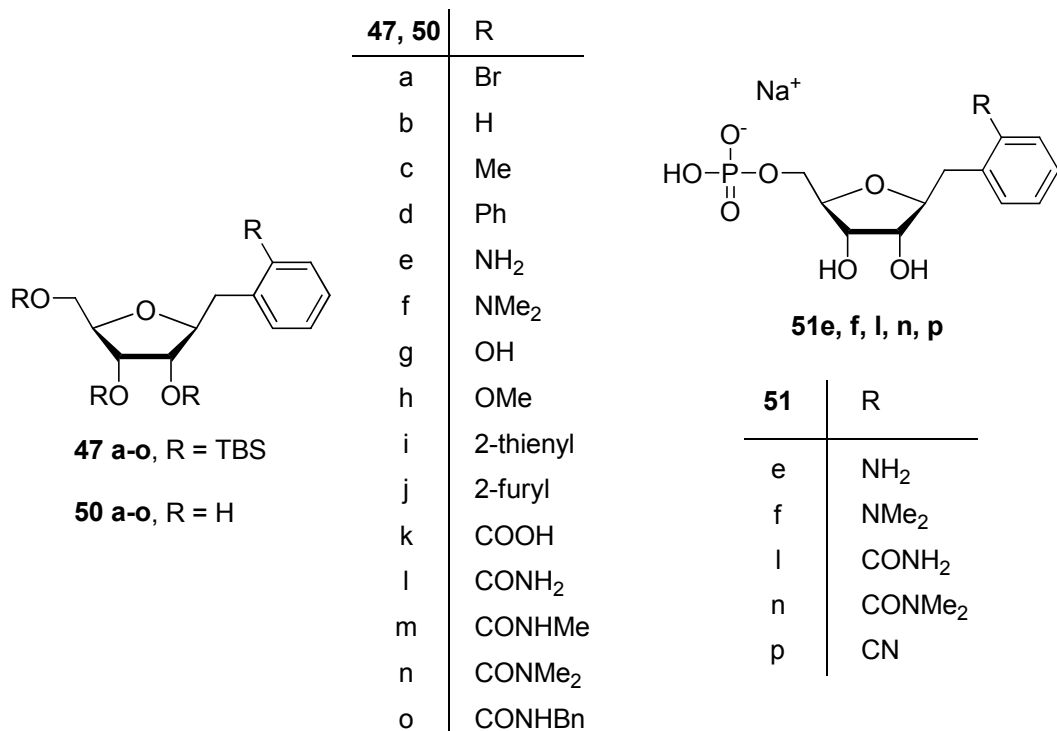


Schéma 6. Syntéza klíčového meziproduktu **47a**.



Obrázek 5. Série 2-substituovaných benzyl homo-C-ribonukleosidů a 5'-nukleotidů.

4 Závěr

V první části mé dizertační práce byla úspěšně využita Heckova reakce na přípravu klíčového meziprojektu – dichlorpyrimidin *C*-nukleosidu. Následná série regioselektivních nukleofilních substitucí a cross-couplingů za mírných podmínek poskytla 4-substituované 2-chlorpyrimidin *C*-nukleosidy. Pokud byly reakce provedeny s nadbytkem činidla a při zvýšené teplotě byly získány 2,4-disubstituované pyrimidin *C*-nukleosidy. Následně bylo z 4-substituovaných 2-chlorpyrimidin *C*-nukleosidů připraveno šest typů disubstituovaných pyrimidin *C*-nukleosidů nesoucích odlišné substituenty v poloze 2 a 4. Byla připravena 2D knihovna třiceti nových 2,4-disubstituovaných pyrimidin-5-yl *C*-2'-deoxyribonukleosidů.

V druhé části mé práce jsem připravil dva klíčové intermediáty – bromchlorpyridin *C*-nukleosidy a jejich ochráněné analogy. V několika chemoselektivních cross-coupling reakcích byla prokázána vyšší reaktivita atomu bromu a byla připravena série monosubstituovaných chlorpyridin *C*-nukleosidů. Nukleofilní aromatická substituce s MeSNa poskytla směs monosubstituovaných derivátů v poměru cca 1:1. Nukleofilní substituce byly obecně neselektivní a vedly k těžko separovatelným směsím produktů. Reakce provedené za vyšší teploty s nadbytkem činidel poskytly disubstituované produkty. Byla připravena 2D knihovna 21 nových 2,6-disubstituovaných pyridin-3-yl *C*-2'-deoxyribonukleosidů. Série sedmi trifosfátů 2,6-disubstituovaných pyridin *C*-nukleosidů bude testována na jejich schopnosti tvořit umělé páry bází.

V poslední části mé práce byl připraven klíčový intermediát – 2-bromobenzyl *C*-ribonukleosid pomocí reakce (2-bromobenzyl)magnesium bromidu s ribonolaktonem a následnou redukcí. Reakcemi katalyzovanými paladiem byla připravena série 2-substituovaných derivátů, které byly ochráněny na volné homo-*C*-ribonukleosidy. Vybrané nukleosidy byly převedeny na odpovídající 5'-monofosfáty.

Všechny připravené pyrimidin a pyridin *C*-2'-deoxyribonukleosidy a benzylové homo *C*-ribonukleosidy byly testovány na antivirální a cytostatické aktivity. Žádná z testovaných látek však nevykázala biologické aktivity.

5 Použitá literatura

- 12 (a) Wu, Q.; Simons, C.: *Synthesis* **2004**, *10*, 1533-1553. (b) Adamo, M. F. A.; Pergoli, R.: *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 1544-1569. (c) Štambaský, J.; Hocek, M.; Kočovský, P.: *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6729-6764.
- 13 (a) Robins, R. K.; Srivastava, P. C.; Narayanan, V. L.; Plowman, J.; Paull, K. D.: *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 107-108. (b) Tricot, G.; Jayaram, H. N.; Weber, G.; Hoffman, R.: *Int. J. Cell Cloning* **1990**, *8*, 161-170. (c) Weber, G.; Prajda, N.; Aboniy, M.; Look, K. Y.; Tricot, G.: *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 3313-3322.
- 14 (a) Chen, J. J.; Drach, J. C.; Townsend, L. B.: *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4170-4178. (b) Chen, J. J.; Wei, Y.; Williams, J. D.; Drach, J. C.; Townsend, L. B.: *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids.* **2005**, *24*, 1417-1437.
- 15 (a) Miles, R. W.; Tyler, P. C.; Furneaux, R. H.; Bagdassarian, C. K.; Schramm, V. L.: *Biochemistry* **1998**, *37*, 8615-8621. (b) Kicska, G. A.; Long, L.; Hörig, H.; Fairchild, C.; Tyler, P. C.; Furneaux, R. H.; Schramm, V. L.; Kaufman, H. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 4593-4598. (c) Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Gainsford, G. J.; Hanson, J. C.; Kicska, G. A.; Sauve, A. A.; Schramm, V. L.; Tyler, P. C.: *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 155-160.
- 16 (a) Hori, M.; Ito, E.; Takita, T.; Koyama, G.; Takeuchi, T.; Umezawa, H.: *J. Antibiot.* **1964**, *17*, 96-99. (b) Hori, M.; Umezawa, H.: *J. Antibiot.* **1965**, *18*, 175-177.
- 17 Hirao, I.; Kimoto, M.: *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2012**, *88*, 345-367.
- 18 (a) Benner, S. A.; Hutter, D.; Sismour, A. M.: *Nucleic Acids Res. Suppl.* **2003**, *3*, 125-126. (b) Yang, Z.; Hutter, D.; Sheng, P.; Sismour, A. M.; Benner, S. A.: *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 6095-6101.
- 19 Yang, Z.; Durante, M.; Glushakova, L. G.; Sharma, N.; Leal, N. A.; Bradley, K. M.; Chen, F.; Benner, S. A.: *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4705-4712.
- 20 Li, J-S.; Gold, B.: *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8764-8771.
- 21 (a) Li, J-S.; Fan, Y-H.; Zhang, Y.; Marky, L. A.; Gold, B.: *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2084-2093. (b) Li, J-S.; Shikiya, R.; Marky, L. A.; Gold, B.: *Biochemistry* **2004**, *43*, 1440-1448.

Seznam publikací vztahujících se k této práci - List of publications of the author related to the thesis

1. Kubelka, T.; Slavětínská, L.; Klepetářová, B.; Hocek, M.: "Synthesis of 2,4-Disubstituted Pyrimidin-5-yl C-2'-Deoxyribonucleosides by Sequential Regioselective Reactions of 2,4-Dichloropyrimidine Nucleosides" *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *14*, 2666-2669.
2. Kubelka, T.; Slavětínská, L.; Hocek, M.: "A General Regioselective Approach to 2,4-Disubstituted Pyrimidin-5-yl C-2'-Deoxyribonucleosides" *Synthesis* **2012**, *44*, 953-965.
3. Kubelka, T.; Slavětínská, L.; Hocek, M.: "Synthesis of Substituted Benzyl Homo-C-ribonucleosides and -nucleotides as Carba Analogues of Phosphoribosyl anthranilate" *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *26*, 4969-4981.
4. Kubelka, T.; Slavětínská, L.; Eigner, V.; Hocek, M.: "Synthesis of 2,6-Disubstituted Pyridine-3-yl C-2'-Deoxyribonucleosides through Chemoselective Transformations of Bromo-chloropyridine C-Nucleosides" *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4702-4718.

Konferenční příspěvky - Conference contributions

Poster presentations are marked with a "P", oral presentations with an "O".

Kubelka, T.; Hocek, M.: "Modular synthesis of 2,4-disubstituted pyrimidine-5-yl C-nucleosides (P)." 4th Nucleic Acid Chemical Biology PhD Summer School, Odense, Denmark. June 21-25, 2009.

Kubelka, T.; Hocek, M.: "Modular synthesis of 2,4-disubstituted pyrimidine-5-yl C-nucleosides (P)." ESOC 2009, Prague, Czech Republic. July 12-16, 2009.

Kubelka, T.; Hocek, M.: "Syntéza nových 2,4-disubstituovaných pyrimidin-5-yl C-nukleosidů (O)." 44. konference POKROKY V ORGANICKÉ, BIOORGANICKÉ A FARMACEUTICKÉ CHEMII – Liblice 2009. 27-29 listopad, 2009.

Kubelka, T.; Hocek, M.: "Synthesis of 2,4-disubstituted pyrimidine-5-yl C-nucleosides (P)." Balticum Organicum Syntheticum, Riga, Latvia. 27-30 June 2010.

Kubelka, T.; Hocek, M.: "Sequential Regioselective Synthesis of 2,4-Disubstituted Pyrimidin-5-yl C-2-Deoxyribonucleosides (P)." 45. konference POKROKY V ORGANICKÉ, BIOORGANICKÉ A FARMACEUTICKÉ CHEMII – Liblice 2010. 20-22 listopad, 2010.

Kubelka, T.; Hocek, M.: "Regioselektivní syntéza nových 2,4-disubstituovaných pyrimidin-5-yl C-2'-deoxyribonukleotidů (P)." XI MEZIOBOROVÉ SETKÁNÍ MLADÝCH BIOLOGŮ, BIOCHEMIKŮ A CHEMIKŮ v hotelu Jehla ve Žďáru nad Sázavou. 24-26 květen, 2011.

Kubelka, T.; Štefko, M.; Bárta, J.; Joubert, N.; Urban, M.; Chapuis, H.; Hocek, M.: "Development of a general and modular approach to C-nucleosides (O)." XV Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components, Český Krumlov, Czech Republic. 5-10 června, 2011.

Kubelka, T.; Hocek, M.: "Modular Regioselective Approach to 2,4-Disubstituted Pyrimidine-5-yl C-2-Deoxyribonucleosides (P)." 4th International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, St. Petersburg, Russia. 21-25 August, 2011.

Kubelka, T.; Hocek, M.: "A General Regioselective Approach to 2,4-Disubstituted Pyrimidine-5-yl C-2-Deoxyribonucleosides (P)." 19th International Conference on Organic Synthesis, Melbourne, Australia. 1-6 July 2012.

Kubelka, T.; Hocek, M.: "A General Regioselective Approach to 2,4-Disubstituted Pyrimidine-5-yl C-2-Deoxyribonucleosides (P)." 4th EuCheMS Chemistry Congress, Prague, Czech Republic. 26-30 August 2012.

Kubelka, T.; Hocek, M.: "Synthesis of novel types of C-nucleosides (O)." 47. konference POKROKY V ORGANICKÉ, BIOORGANICKÉ A FARMACEUTICKÉ CHEMII – Liblice 2012. 2 - 4 Listopad, 2012.

Kubelka, T.; Hocek, M.: "Synthesis of novel types of disubstituted C-nucleosides (P)." 14th Tetrahedron Symposium – Challenges in organic and bioorganic chemistry, Vienna, Austria. 25-28 June 2013.

Curriculum vitae

2003-2006 **undergraduate study**, Charles University in Prague - Faculty of Science, Bc. S. degree - specialization chemistry in natural sciences
Bachelor Thesis: Derivatization of lupane hydroxyderivatives with antiviral and cytotoxic activities. (supervisor RNDr. Jan Šarek, Ph.D.)

2004-2007 **undergraduate study**, Charles University in Prague - Faculty of Science, Bc. S. degree - specialization biology
Bachelor Thesis: Antiviral effects of lupane triterpenoids. (supervisor Doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.)

2006-2008 **undergraduate study**, Charles University in Prague - Faculty of Science, M. S. degree - specialization organic chemistry
Master Thesis: Preparation of triterpenic hemiesters with biological activity (supervisor RNDr. Jan Šarek, Ph.D.)

since 2008 **PhD study**,
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic (supervisor Doc. Ing. Michal Hocek, DSc.)
Research Topic: Synthesis of novel types of C-nucleosides