

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Doktorský studijní program: Fyzikální chemie

Synopse disertační práce



Struktura a vlastnosti modifikovaných složek nukleových kyselin

RNDr. Eliška Procházková

Školitel: RNDr. Martin Dračínský, Ph.D.

Praha, 2015

OBSAH

Abstrakt.....	1
1 Úvod.....	2
2 Cíle práce	4
3 Výsledky a diskuse.....	5
3.1 Strukturní analýza – publikace I, II.....	5
3.2 Vývoj NMR metod – publikace III, IV	7
3.3 Vodíkové vazby v polysubstituovaných 5-nitrosopyrimidinech – publikace V, VI ..	9
3.4 Enzymové štěpení pozorované ³¹ P NMR spektroskopii – publikace II	11
3.5 Polymorfní formy studované NMR spektroskopii v pevné fázi – publikace VII.....	12
3.6 Stabilita 5-aminopyrimidinů v DMSO – publikace VIII	13
4 Závěry.....	16
5 Použitá literatura.....	17
<i>Curriculum vitae</i>	18
Vybrané publikace	20
Ostatní publikace	21

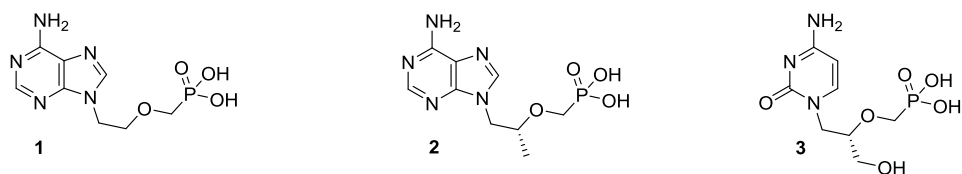
ABSTRAKT

Modifikované složky nukleových kyselin (nukleotidy/nukleosidy/nukleobáze) vykazují celou řadu biologických vlastností, jako jsou antivirové, cytostatické, antimikrobiální, fungicidní nebo antioxidantní. Velká řada z nich se běžně používá v klinické praxi, např. jako léky proti HIV nebo hepatitidě typu B. Prvním předpokladem k pochopení biologických vlastností je správné určení struktury a konformace studovaných látek. Během mé disertační práce jsem určila strukturu více než 700 nově připravených potenciálně biologicky aktivních látek a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, studovala jsem konformační změny, tautomerní rovnováhy, nekovalentní interakce, izotopové výměny, stabilitu, reaktivitu a polymorfni struktury modifikovaných složek nukleových kyselin pomocí NMR spektroskopie.

V synopsi své disertační práce velmi stručně popisuji některé své výsledky, které jsou uspořádány v šesti krátkých podkapitolách. (1) Určila jsem konfiguraci a konformaci konformačně uzamčeného nukleosidu pomocí 2D NMR experimentů (COSY a ROESY) a DFT výpočtů. Konformační analýza je založena na porovnání experimentálních a vypočtených homonukleárních (H,H) interakčních konstant. (2) Další projekt je zaměřen na vývoj NMR metod. První z nich slouží ke spolehlivějšímu přiřazení NMR signálů v purinech a spočívá v porovnání naměřených a vypočtených heteronukleárních (H,C) interakčních konstant. Na korelaci mezi naměřenými a vypočtenými hodnotami je založena i druhá metoda, kterou lze předpovědět, jaké tautomerní formy purinových derivátů jsou v roztoku preferovány. (3) Byla objevena skupina nových nitrosopyrimidinových derivátů se silnými intramolekulárními vodíkovými vazbami, díky kterým vznikají dva stabilní konformery, které se liší pouze orientací NO skupiny. V této synopsi ukazují zásadní vliv substituentů na rovnovážné složení směsi rotamerů, který velmi dobře koresponduje s Hammettovými konstantami. V některých případech bylo možné oba rotamery od sebe oddělit. Z kinetických dat bylo možné stanovit rotační bariéry nitroso skupiny, které byly porovnány s DFT výpočty. (4) V následující kapitole popisují enzymové štěpení fosforamidátového proléčiva sledované ^{31}P NMR spektroskopii přímo v NMR kyvetě. Cílem bylo zjistit, zda budou nově připravené látky fungovat jako proléčiva. Toto měření je založeno na tom, že výchozí fosforamidát má chirální centrum na atomu fosforu; tyto dva diastereomery je možné pozorovat jako dva signály v ^{31}P NMR spektru. Byla určena struktura produktů tohoto štěpení. (5) Dále jsem studovala polymorfni krystaly třech průmyslově významných látek. Připravila jsem modelové polymorfni krystaly rekrystalizací z různých rozpouštědel a výsledné struktury jsem charakterizovala pomocí ^{13}C CP-MAS NMR spektroskopie. Různé polymorfni formy vykazovaly různá NMR spektra. (6) Stabilita 5-aminopyrimidinů v DMSO byla studována NMR a UV/Vis spektroskopii a bylo potvrzeno, že se jedná o reakce následné. ^1H NMR spektra poskytla jasný důkaz o uvolnění amonného kationtu. Byl navržen mechanismus těchto přeměn a sérií chemických reakcí s alloxanem byla potvrzena struktura produktů.

1 ÚVOD

Modifikované složky nukleových kyselin (nukleotidy/nukleosidy/nukleobáze) mohou zasahovat mnoho metabolických drah, což vede k celé řadě biologických vlastností jako antivirové,^{1,2} cytostatické,³ antimikrobiální,⁴ fungicidní⁵ nebo antioxidační.⁶ Molekuly nukleot(s)idů mohou být modifikovány na purinové/pyrimidinové bázi nebo v cukerné části; nukleotidy mohou být modifikované i ve fosfátové části. Jako příklad lze uvést skupinu látek modifikovanou na cukerné i fosfátové části molekuly. Jedná se o acyklické nukleosid fosfonáty, které mají místo ribosového kruhu alifatický řetězec a O-P skupinu nahrazenou O-CH₂-P skupinou, což zvyšuje jejich metabolickou stabilitu. Některé z nich se dnes běžně používají v klinické praxi pod obchodními názvy HepseraTM, VireadTM a VistideTM (obr. 1 zleva doprava).



Obrázek 1. Struktura adefoviru (1), tenofoviru (2) a cidofoviru (3), které jsou klinicky využívané.

Strukturní rozmanitost modifikovaných složek nukleových kyselin může vést k rozdílu v celé řadě fyzikálně-chemických vlastností, jako jsou konformace, konfigurace, tautomerní rovnováhy, protonační místa, vodíkové vazby, párování bazí, stejně jako jejich různé interakce s enzymy nebo ionty kovů. Např. studium tautomerních rovnováh poskytuje důležité informace o reaktivitě studovaných derivátů; určitá tautomerní forma výchozí látky ovlivňuje regiosektivitu alkylace nebo glykosidačních reakcí. Dalším příkladem je konformace modifikovaných složek nukleových kyselin, mohou se lišit orientací báze vzhledem k ribosovému cyklu nebo konformací flexibilní cukerné složky. Konformace cukerné složky je důležitá pro rozpoznávání látky buněčnými enzymy. Např. bylo zjištěno, že deriváty uzamčené v konformaci typu N jsou efektivně vázány polymerasami,⁷ zatímco deriváty s S-konformací jsou rozeznávány thymidin kinasami.⁸ Z toho důvodu je žádoucí studovat konformaci cukerné složky u nově připravených látek. Stabilita a vlastnosti konformerů mohou být významně ovlivněny nekovalentními interakcemi, jako jsou vodíkové vazby, hydrofobní interakce nebo π - π stacking. Intramolekulární vodíkové vazby snižují polaritu molekuly, což vede k lepšímu průchodu látky přes buněčnou membránu.⁹ Hrají klíčovou roli v celé řadě biochemických procesů, např. při párování bazí v duplexech nukleových kyselin¹⁰ atd.

Elektronová distribuce v molekule ovlivňuje její chemické vlastnosti a také se odráží na chemických posunech δ , spin-spinových interakčních konstantách J a dalších NMR parametrech, čímž se NMR spektroskopie stává skvělým nástrojem pro studium struktury, reaktivity, molekulárních pohybů a mezimolekulárních interakcí, a to zejména malých molekul, jako jsou modifikované složky nukleových kyselin.¹¹⁻¹³ Tato technika je založena na tom, že atomové jádro s nenulovým spinovým kvantovým číslem má magnetický moment, a proto je aktivní v NMR spektroskopii. Přiřazení NMR signálů vedoucí ke stanovení

struktury se nejčastěji dělá kombinací 1D (^1H , ^{13}C) a 2D (COSY, HSQC, HMBC, ROESY) NMR experimentů.

Konfigurace a/nebo konformace může být vyřešena pomocí analýzy interakčních konstant J . Z hodnot interakčních konstant nJ je možné navrhnout, kolik chemických vazeb (n) je mezi interagujícími jádry. Běžně se dají pozorovat interakce přes dvě vazby 2J (geminální) a přes tři vazby 3J (vicinální). Hodnoty vicinálních konstant velmi významně závisí na torzních úhlech mezi jádry, což popisuje dobře známá Karplusova křivka^{14,15} složená z cosinových funkcí, což naznačuje, že při torzních úhlech okolo 90° budou interakční konstanty nabývat hodnot blízkých nule, zatímco u torzních úhlů blízkých 0° nebo 180° budou interakční konstanty nabývat maxima.

Dynamické procesy, jako jsou konformační změny, mohou být studovány dynamickou NMR spektroskopii (dNMR). Atomy rozdílných forem molekul (např. konformery) mají různé chemické okolí, a tudíž různé chemické posuny. V závislosti na rychlosti interkonverze mezi oběma formami lze pozorovat buď dvě sady signálů pro jednotlivé formy, nebo zprůměrované spektrum. Energetické bariéry těchto procesů mohou být získány analýzou tvaru signálů z NMR spekter měřených při různých teplotách. Simulovaná NMR spektra jsou vypočtena tak, aby tvar signálů odpovídal těm experimentálně získaným. Z těchto simulací mohou být získány rychlostní konstanty při různých teplotách, které mohou být použity jako vstupní data pro Eyringovu rovnici.¹⁶ Eyringova rovnice vychází z teorie tranzitního stavu a lze z ní vyjádřit energetickou bariéru ΔG^\ddagger daného procesu. Pomocí dNMR metody lze studovat dynamické procesy s rychlostní konstantou v rozmezí od 10^{-1} až zhruba 10^3 . Příkladem využití dNMR metody je studium tautomerních a konformačních rovnováh nebo stanovení bariér u látek se stéricky bráněnou rotací (atropisomery).

NMR parametry a další fyzikálně-chemické veličiny získané z NMR spekter mohou být doplněny DFT výpočty. Teorie funkcionálu hustoty (DFT) je založena na teorému, že energie je vlastní funkcionál elektronové hustoty. DFT metody se používají pro optimalizaci geometrie a pro predikci NMR parametrů, jako jsou stínící konstanty nebo interakční konstanty.

2 CÍLE PRÁCE

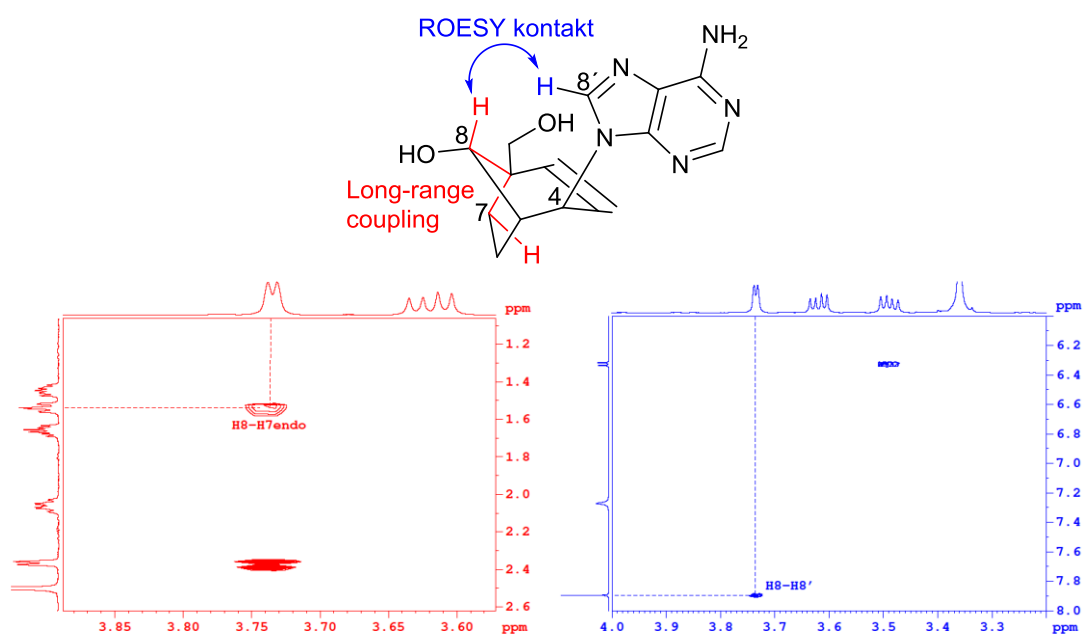
- Stanovení struktury a konformační analýza nových potenciálně biologicky aktivních modifikovaných složek nukleových kyselin.
- Vývoj NMR metod – kombinace experimentálních a vypočtených dat pro spolehlivé přiřazení signálů u purinových derivátů a pro stanovení struktury preferovaných tautomerních forem v roztoku.
- Stanovení geometrie a stability intramolekulární vodíkové vazby u derivátů 5-nitrosopyrimidinů se dvěma donory vodíkové vazby.
- Sledování enzymového štěpení proléčiva biologicky aktivního konformačně uzamčeného karbocyklického nukleotidu pomocí ^{31}P NMR spektroskopie.
- Stanovení a charakterizace polymorfních forem modelových látek (zahrnující modifikované nukleobáze) pomocí NMR spektroskopie v pevné fázi.
- Stanovení struktury produktů rozkladu 5-aminopyrimidinů skladovaných v DMSO a určení reakčního mechanismu.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 STRUKTURNÍ ANALÝZA – PUBLIKACE I, II

Chemická struktura nově připravených látek je velmi často vyřešena kombinací 1D a 2D NMR experimentů. Pokud je to nutné, je určena konfigurace a/nebo konformace studovaných látek, což je založeno většinou na analýze interakčních konstant J . Během mé doktorské práce jsem spolupracovala s kolegy z oddělení medicínální chemie na ÚOCHB AV ČR a určila jsem strukturu více než 700 látek. V této kapitole uvádím, jako příklad, stanovení konfigurace a konformace konformačně uzamčených nukleosidů **4** a **5** s potenciální antivirovou aktivitou. Tyto látky byly připraveny Michalem Šálou a Hubertem Hřebabeckým z ÚOCHB AV ČR.

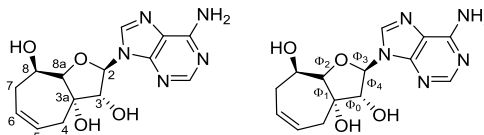
Pro určení stereochemie látky **4** byla změřena dvě homonukleární 2D NMR spektra COSY a ROESY. Krosníky v COSY spektru vyjadřují spin-spinové interakce, obvykle přes dvě až tři vazby. Pokud jsou ale protony uspořádány do tvaru W, lze pozorovat i interakce přes čtyři vazby, díky čemuž bylo možné určit konfiguraci na atomu C-8. Byl nalezen krosník mezi H8 a H7_{endo} (obr. 2 vlevo). V ROESY spektru lze pozorovat interakce přes prostor. V ROESY spektru byl nalezen krosník mezi atomy H8-H8', což prokázalo určenou relativní konfiguraci na atomech C-4 a C-8 (obr. 2 vpravo). Navíc byly v ROESY spektru nalezeny krosníky H4-H6_{endo} a 8OH-H7_{exo}, což jen potvrdilo navrženou stereochemii. Konfigurace molekuly byla potvrzena analýzou interakčních konstant a byla zjištěna shoda mezi experimentálními a vypočtenými hodnotami.



Obrázek 2. Výřez COSY (vlevo) a ROESY spektra (vpravo) studované látky **4**. Nalezený krosník H8-H8' odpovídající interakci přes 4 vazby (tvar W) jasně určuje konfiguraci na C-8. Krosníky nalezené v ROESY spektru jen potvrzují konformaci a konfiguraci molekuly.

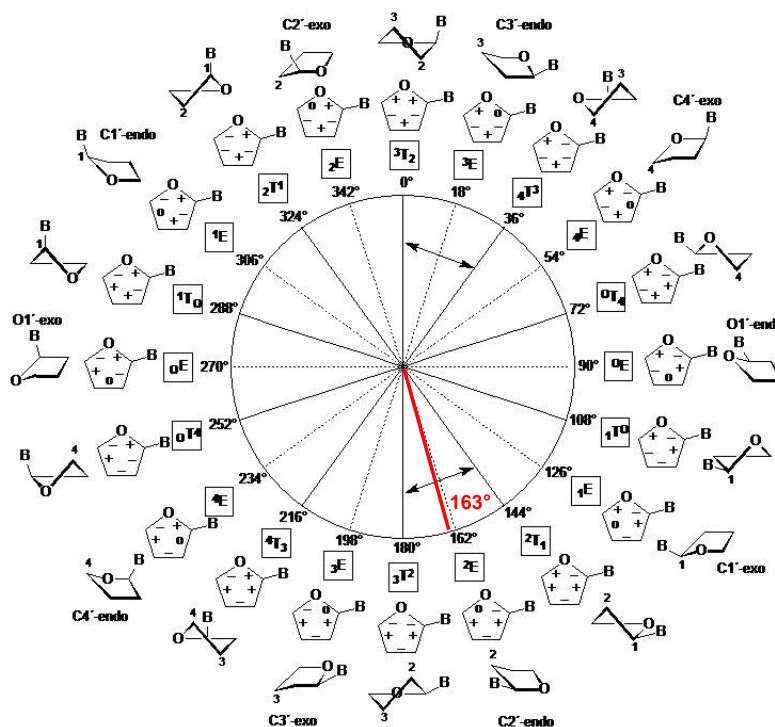
Konformace ribosového kruhu je obvykle studována na základě konceptu pseudorotace. V této teorii je konformace ribosového cyklu definována dvěma parametry, a sice fázovým úhlem P vypočteným z torzních úhlů Φ_0 - Φ_4 , který popisuje tvar molekuly (zkřížený nebo obálka), a parametrem Φ_{MAX} , který indikuje maximální vyklonění atomů z roviny.

U látky **5** je flexibilita ribosového kruhu snížena díky přítomnosti sedmičlenného kruhu (obr. 3).



Obrázek 3. Chemická struktura studované látky **5** a číslování cukerné části (vlevo). Torzní úhly cukerné části Φ_0 - Φ_4 (vpravo).

Experimentální hodnoty interakčních konstant získané z ^1H NMR spektra byly porovnány s vypočtenými hodnotami získanými dvěma přístupy. Nejprve byla DFT výpočty optimalizována geometrie molekuly látky **5**, byly vytvořeny modely čtyř různých počátečních geometrií s fázovými úhly $P = 0^\circ, 90^\circ, 180^\circ$ a 270° a $\Phi_{MAX} = 40^\circ$. Po optimalizaci geometrie těchto čtyř struktur byl nalezen jeden stabilní konformer s torzními úhly Φ_0 - Φ_4 : $-30.8^\circ, 20.5^\circ, -0.8^\circ, -19.5^\circ$ a 31.5° . Získané torzní úhly byly použity jako vstupní data pro Karplusovu rovnici, která popisuje závislost hodnot vicinálních konstant 3J na hodnotách torzních úhlů mezi interagujícími jádry. Interakční konstanty u látky s nalezenou geometrií byly také počítány kvantově-chemicky (DFT). Oba teoretické přístupy poskytly porovnatelné hodnoty, které byly v souladu s experimentálními hodnotami. Z těchto dat můžeme shrnout, že látka **5** zaujímá v roztoku Jižní konformaci s fázovým úhlem $P = 163^\circ$.

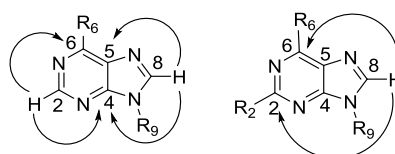


Obrázek 4. Pseudorotační cyklus furanosového kruhu. Stanovená Jižní konformace látky **5** s fázovým úhlem $P = 163^\circ$ je vyznačena červeně.

3.2 VÝVOJ NMR METOD – PUBLIKACE III, IV

V této kapitole jsou stručně popsány výsledky dvou na sobě nezávislých NMR studií, které jsou zaměřeny na vývoj NMR metod pro spolehlivější přiřazení NMR signálů a stanovení preferovaných tautomerních forem purinových derivátů.

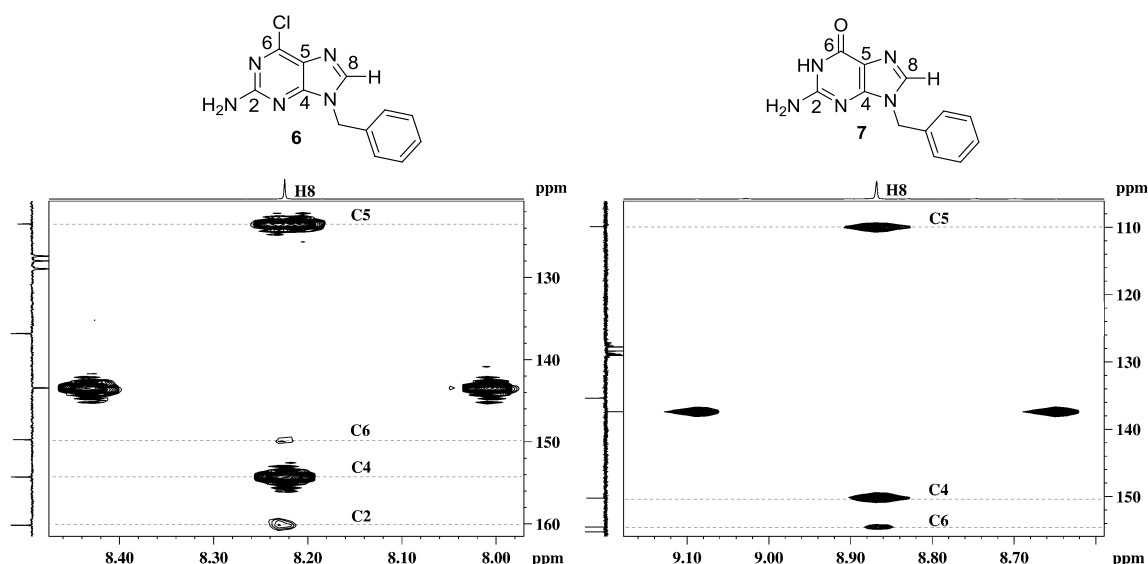
Pro přiřazení ^{13}C NMR signálů se běžně používají heteronukleární spin-spinové interakce přes tři vazby (3J), které jsou pozorovatelné jako intenzivní krosníky v H,C-HMBC spektrech (obr. 5 vlevo). Zároveň je možné v těchto spektrech pozorovat krosníky s nižší intenzitou, tedy interakce přes 4–5 vazeb (4J , 5J), mezi atomy H8 a C6 a H8-C2 (obr. 5 vpravo). V případě, že jsou obě polohy 2 a 6 substituovány, pak je přiřazení ^{13}C NMR signálů zcela odkázané na heteronukleární interakční konstanty 4J a 5J . Z HMBC spekter lze pouze kvalitativně odhadnout hodnoty těchto konstant, ale obecně se předpokládá, že konstanty přes 4 vazby budou nabývat vyšších hodnot než ty přes pět vazeb ($^4J > ^5J$).



Obrázek 5. Schematické znázornění heteronukleárních H-C spin-spinových interakcí. Interakce přes tři vazby jsou znázorněny vlevo a "long-range" interakce jsou ukázány vpravo.

Heteronukleární "long-range" interakční konstanty byly studovány na deseti purinových derivátech substituovaných různými substituenty v polohách 2 a 6, které byly připraveny na ÚOCHB AV ČR Lucií Čechovou a Petrem Jansou.

Jako příklad je na obr. 6 ukázán výřez HMBC spekter látek **6** a **7**. Různé substituenty v poloze 6 na purinovém skeletu významně ovlivňují intenzitu krosníků H8-C2 a H8-C6. Z obrázku je patrné, že u látky **6** je H8-C2 krosník více intenzivní než u látky **7**, kde chybí.

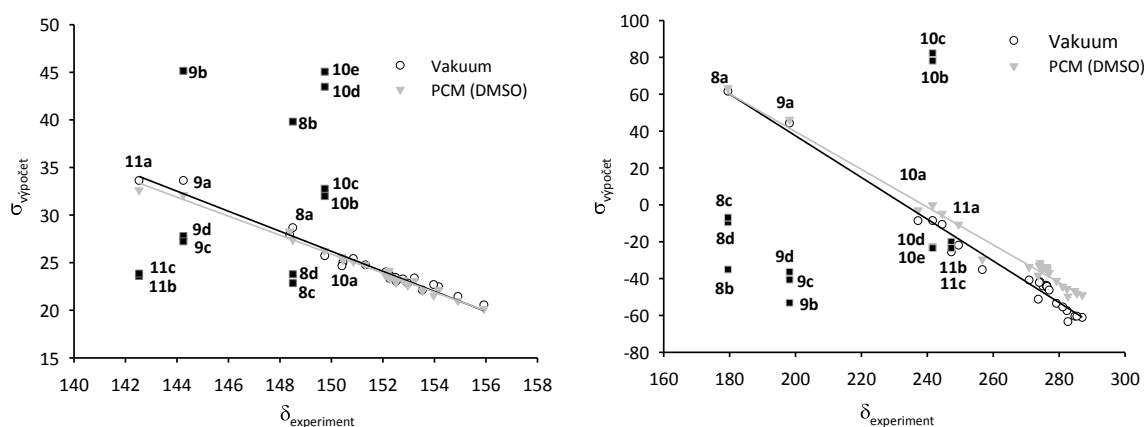


Obrázek 6. Výřezy HMBC spekter vybraných látek. Jsou patrné rozdíly mezi intenzitami krosníků H8-C2 a H8-C6. Není možné tedy s jistotou říct, že interakční konstanta H8-C6 (4J) je vždy vyšší než ta přes pět vazeb H8-C2 (5J).

Abychom podpořili toto zjištění, byly vypočteny interakční konstanty pomocí DFT a byly porovnány s experimentálními hodnotami získanými z ^{13}C NMR spekter. Např. u látky **7** byly experimentálně zjištěny konstanty $^4J = 1.2$ Hz a $^5J = 0.4$ Hz, což odpovídá vypočteným hodnotám $^4J = 0.92$ Hz a $^5J = 0.34$ Hz. Tyto výsledky také velmi dobře korespondují s tím, co bylo pozorováno v HMBC spektru, že krospektrum H8-C6 je více intenzivní než H8-C2. Na druhou stranu u látky **6** byly vypočteny interakční konstanty $^4J = 0.32$ Hz a $^5J = 0.61$ Hz. Je jasně patrné, že krospektrum H8-C6 je méně intenzivní než H8-C2.

Tautomerní formy purinových derivátů byly studovány na sérii 24 derivátů substituovaných v poloze 6, které byly připraveny Michalem Šálou a Radimem Nenckou na ÚOCHB AV ČR.

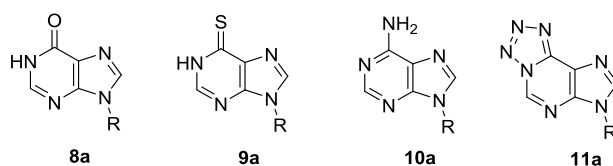
Pro každý atom purinového skeletu látek s právě jednou možnou tautomerní formou byla sestrojena korelace mezi experimentálními chemickými posuny δ a vypočtenými stínícími konstantami σ . Na obr. 7 je vynesena korelace pro atom C4 (vlevo) a N-1 (vpravo).



Obrázek 7. Korelace mezi vypočtenými stínícími konstantami σ a naměřenými chemickými posuny δ atomu uhlíku C-4 (vlevo) a atomu dusíku N-1 (vpravo). Černé čtverečky znázorňují tautomery/rotamery, které nejsou přítomny v roztoku DMSO.

Korelace sestrojené pro každý atom purinového skeletu byly lineární ($R^2 > 0.96$ kromě C-6 a N-7) a dle očekávání, "a" formy hypoxanthinu **8**, merkaptopurinu **9** a adeninu **10** (obr. 8) ležely na přímce, zatímco ostatní formy jsou zcela mimo tuto lineární závislost.

V případě 6-azidopurinu **11** se může ustavovat rovnováha mezi tetrazolem **11a** a rotamery azido-azomethinu **11b**, **11c** (obr. 7) v závislosti na externích podmínkách.¹⁷ Elektronová energie tetrazolové formy **11a** a azido-azomethinové formy **11b** v DMSO jsou velmi blízko sebe. Ze sestrojěných korelací je jasné, že na přímce leží jen forma **11a** a oba rotamery azido-azomethinového tautomeru **11b** a **11c** jsou velmi vzdálené od lineární korelace. Proto lze říct, že v roztoku se vyskytuje převážně tetrazolová forma **11a** (obr. 8).

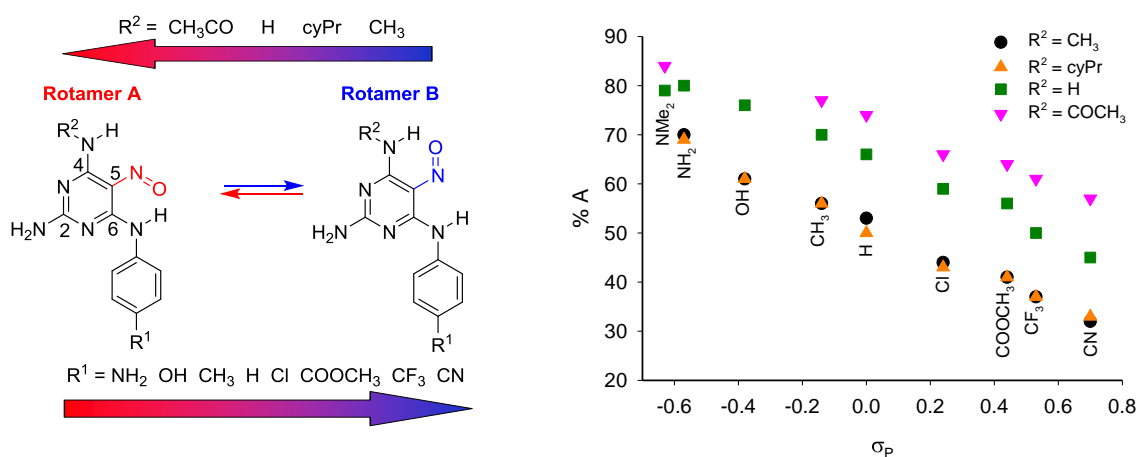


Obrázek 8. Preferované tautomerní formy stanovené ze sestrojěných korelací.

3.3 VODÍKOVÉ VAZBY V POLYSUBSTITUOVANÝCH 5-NITROSPYRIMIDINECH – PUBLIKACE V, VI

5-Nitrosopyrimidiny se přirozeně nevyskytují, ale vykazují celou řadu biologických aktivit. Nitroso skupina může tvořit intramolekulární vodíkové vazby s vhodnými donory vodíkových vazeb v sousedních polohách, např. s amino skupinami. Při tomto uspořádání mají 5-nitrosopyrimidiny podobný tvar jako purinové deriváty a mohly by je tak mimikovat. Když jsou přítomny dva donory vodíkové vazby v sousedních polohách nitroso skupiny, mohou vznikat dvě vodíkové vazby, které se liší orientací nitroso skupiny. Tyto molekuly by mohly mimikovat dva různé purinové deriváty a mohly by tak sloužit jako substráty enzymů dvou metabolických drah.

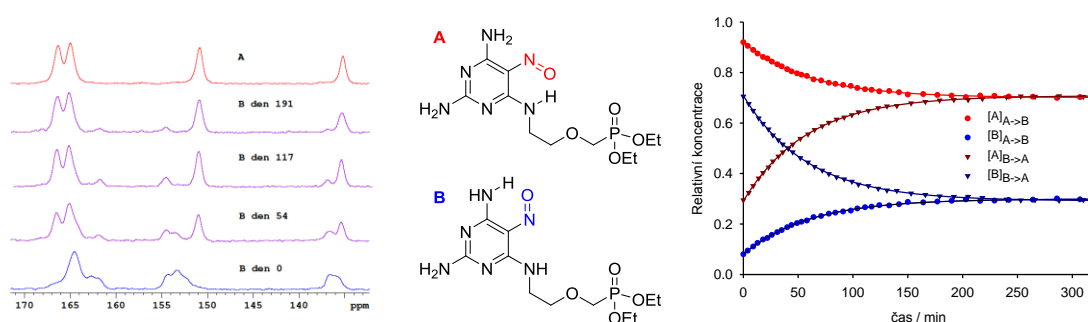
Lucie Čechová (ÚOCHB AV ČR) připravila pro tuto studii sérii 32 5-nitrosopyrimidinových derivátů se dvěma donory vodíkových vazeb (obr. 9 vlevo) pomocí nové mikrovlnné syntézy. Díky vzniku dvou vodíkových vazeb vznikly dva konformery, které se lišily pouze orientací nitroso skupiny. Oba rotamery byly při laboratorní teplotě pozorovány v NMR spektrech jako dvě sady signálů. Relativní koncentrace rotamerů se mohou pohybovat v rozmezí 32 až 84 % v závislosti na *para* substituentech fenylaminové skupiny v poloze 6 pyrimidinového skeletu (R^1). Procentuální zastoupení rotamerů v roztoku velmi dobře korelovalo s Hammettovými konstantami σ_p , jak je patrné na obr. 9 vpravo.



Obrázek 9. Schematické znázornění studovaných konformačních rovnováh (vlevo) a závislost pozorovaných koncentrací rotameru A na Hammettových konstantách σ_p *para* substituentu R^1 (vpravo).

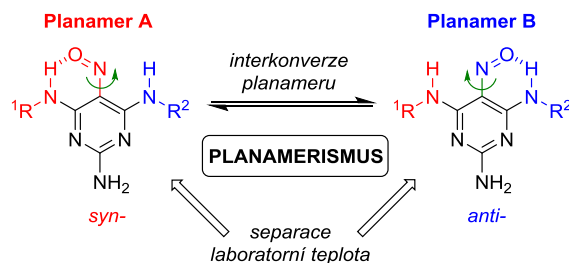
Zahřátím směsi rotamerů by měla nitroso skupina rotovat rychleji, a tak by se měla v NMR spektrech objevit pouze jedna sada signálů. Přesto ale bylo zjištěno, že vodíkové vazby stabilizují tyto rotamery a jejich interkonverze je pomalá i při zvýšení teplotě; ani při 140°C nebylo pozorováno zprůměrování NH signálů. Z těchto dat je patrné, že rotační bariéra je neobvykle vysoká. Z analýzy tvaru NMR signálů NH protonů byla odhadnuta hodnota rotační bariéry vyšší než 20 kcal/mol. Tyto bariéry byly rovněž vypočteny DFT metodami a byly zjištěny podobné hodnoty.

Byla připravena nová série 5-nitrosopyrimidinových derivátů s alifatickými aminovými zbytky v polohách 4 a 6, tyto látky připravili Lucie Čechová a Zlatko Janeba (ÚOCHB AV ČR). U těchto látek, stejně jako u těch předchozích, byla pozorována neobvykle vysoká bariéra rotace nitroso skupiny, rozhodli jsme se zkusit oba rotamery od sebe oddělit. Velmi nás překvapilo, že bylo možné oba rotamery separovat kolonovou chromatografií při laboratorní teplotě (Lucie Čechová). Po odpaření rozpouštědla z chromatografických frakcí byly získány dva stabilní rotamery. Čistota obou rotamerů byla ověřena NMR spektroskopii v pevné fázi (obr. 10 vlevo) a X-ray analýzou (Ivana Císařová, Univerzita Karlova v Praze). Navíc jsme mohli během několika měsíců pozorovat pomalou rekrystalizaci amorfního rotameru B na stabilní rotamer A v pevné fázi pomocí ^{13}C NMR spekter. Díky separaci rotamerů mohla být sledována kinetika interkonverze (obr. 10 vpravo), ze které byly stanoveny rotační bariéry.



Obrázek 10. Aromatická oblast ^{13}C CP-MAS NMR spekter planárních rotamerů **12A** a **12B** (vlevo) a časová závislost relativních koncentrací obou rotamerů látky **12** v DMSO (vpravo).

Vlastnosti těchto látek jsou velmi podobné vlastnostem atropisomerů s tím rozdílem, že k separaci atropisomerů dochází díky stericky bráněné rotaci, zatímco naše rotamery lze separovat díky pevným intramolekulárním vodíkovým vazbám. Tento zásadní rozdíl nás vedl k navržení nového termínu "planamerismus" a definovali jsme "planamery" (obr. 11) jako malé aromatické molekuly rotamerů s planární konjugovanou částí, které jsou izolovatelné jako chemická individua. Můžeme spekulovat, zda by mohly planamery hrát důležitou roli v oborech, které zahrnují studium slabých a vratných nekovalentních interakcí, nebo jako potenciální biologicky aktivní látky ve vývoji nových léčiv.

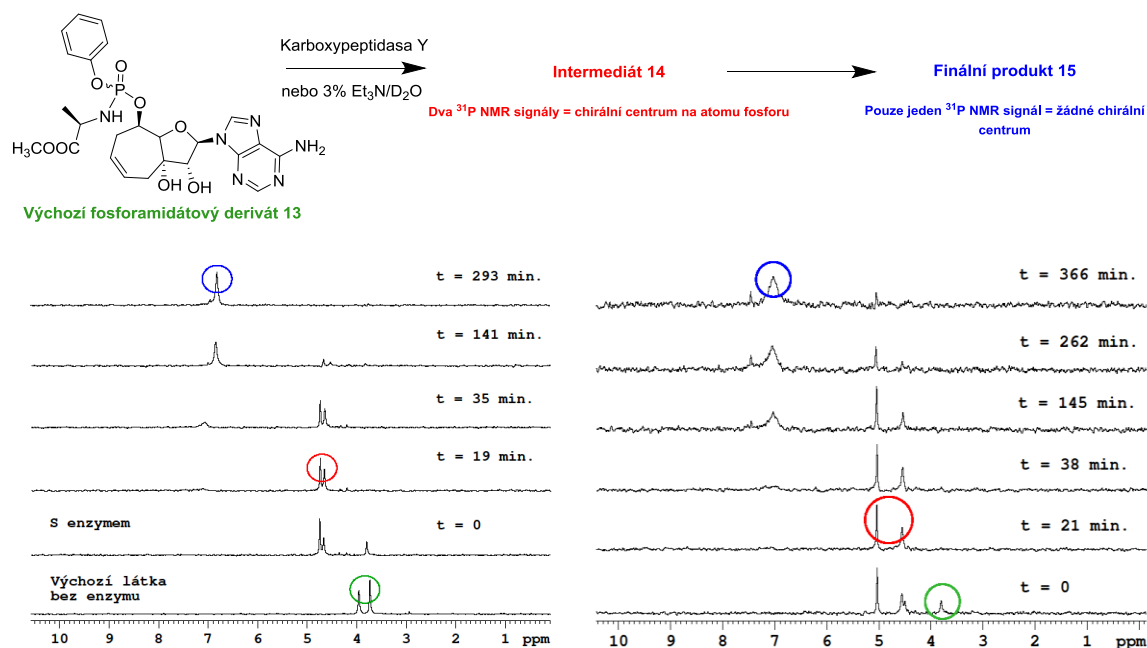


Obrázek 11. Planární rotamery byly rozděleny na kolonové chromatografii při laboratorní teplotě.

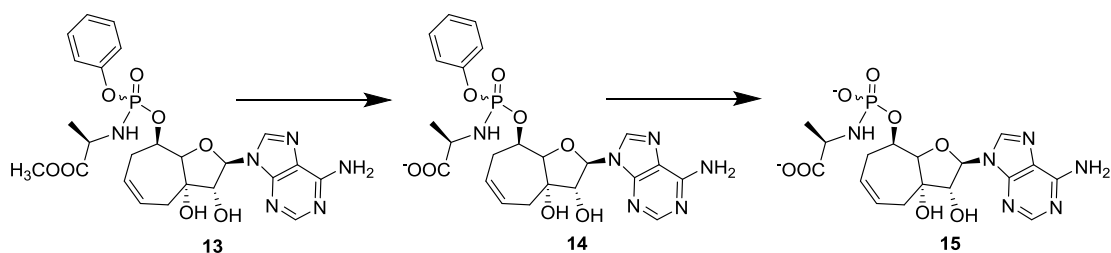
3.4 ENZYMOVÉ ŠTĚPENÍ POZOROVANÉ ^{31}P NMR SPEKTROSKOPIÍ – PUBLIKACE II

Celá řada biologicky aktivních látek je natolik polární, že není schopna projít přes buněčnou membránu, proto jsou připravovány jejich lipofilnější deriváty (proléčiva). Proléčiva modifikovaných nukleosidů obsahují velmi často fosforamidátovou část,¹⁸ která může být v buňce jednoduše odštěpena intracelulárními enzymy a uvolní se aktivovaný nukleosid (monofosfát). Enzymové štěpení lze pozorovat ^{31}P NMR spektroskopii.¹⁹

Tato studie se zabývá sledováním enzymového štěpení modifikovaných nukleosidů s aryl-fosforamidátovou částí (obr. 12). Tyto látky připravil Hubert Hřebabecký (ÚOCHB AV ČR) jako potenciální antivirotika. Pro podobné látky bylo již dříve popsáno, že aktivaci proléčiv zahajují karboxyesterasy, a sice hydrolýzou na fosforamidátové části.²⁰ Proto byla enzymová reakce v buňce simulována karboxypeptidasou Y,²¹ která vykazuje vysokou strukturální homologii s katepsinem A, který je za tuto reakci zodpovědný v lidském organismu. Tato reakce byla také provedena chemicky ve vodném triethylaminu a byly nalezeny stejné produkty (obr. 13). Zjistili jsme, že strukturální modifikace studovaného nukleosidu není tak zásadní, aby došlo k inhibici enzymu a zároveň proběhla předpokládaná enzymová reakce. Struktura vzniklých produktů byla určena *in situ* díky C-P spin-spinovým interakcím viditelným v ^{13}C NMR spektru jako štěpení signálů.



Obrázek 12. Enzymové štěpení (vlevo) a chemická hydrolýza (vpravo) výchozího fosforamidátového derivátu 13 sledované ^{31}P NMR spektroskopii.

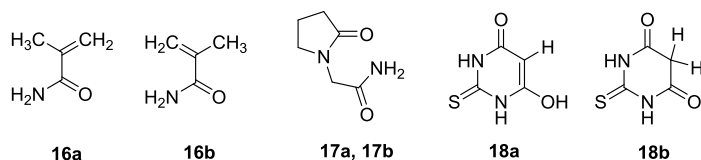


Obrázek 13. Chemická struktura produktů enzymového štěpení studovaného fosforamidátového proléčiva.

3.5 POLYMORFNÍ FORMY STUDOVANÉ NMR SPEKTROSKOPÍÍ V PEVNÉ FÁZI – PUBLIKACE VII

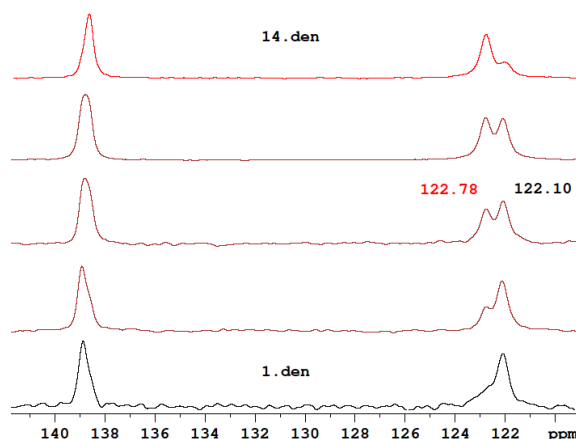
Informace o polymorfní struktuře farmaceuticky významných látek jsou klíčové pro patentové řízení. Struktura polymorfů se studuje nejčastěji difrakčními metodami, ale NMR spektroskopie v pevné fázi v kombinaci s výpočty (NMR krystalografie) může poskytnout užitečné informace v případech, kdy X-ray data nejsou k dispozici nebo jsou komplikované disordery v molekule. Např. ke stanovení počtu neekvivalentních molekul v asymetrické jednotce v krystalu lze jednoduše porovnat počet pozorovaných rezonancí s počtem neekvivalentních uhlíkových atomů studované molekuly.

V této práci jsem připravila různé polymorfní formy třech průmyslově důležitých látek (obr. 14), a sice methakrylamidu (**16**), piracetamu (**17**) a 2-thiobarbiturové kyseliny (**18**). Od těchto polymorfních krystalů byla naměřena NMR spektra v pevné fázi (^{13}C CP-MAS), což bude popsáno v této kapitole.



Obrázek 14. Struktura modelových molekul: methakrylamid (**16**), piracetam (**17**) a kyselina 2-thiobarbiturová (**18**).

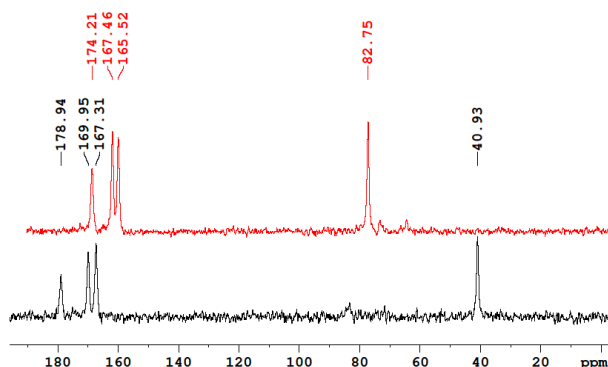
^{13}C CP-MAS NMR data potvrdila čistotu vzorků a tato metoda dobře fungovala při rozlišení různých polymorfních forem. Dokázali jsme připravit čisté polymorfní krystaly methakrylamidu, které dosud ještě nebyly publikovány. Krystalová struktura žádané orthorhombické formy **16b** byla získána velmi pomalou rekrystalizací z horkého vodného roztoku methakrylamidu a struktura krystalů byla potvrzena X-ray analýzou (Ivana Císařová, Univerzita Karlova v Praze). Pomocí ^{13}C CP-MAS NMR spekter byla pozorována zajímavá přeměna **16b**→**16a** v pevné fázi (obr. 15). Kinetická data tohoto procesu však nebyla získána, protože jeho rychlost závisela na externích podmínkách jako např. na rotaci vzorku.



Obrázek 15. Část ^{13}C CP-MAS NMR spektra polymorfní formy methakrylamidu **16b** v různých časech. Po několika dnech se orthorombická forma **16b** (černá) přeměnila na monoklinickou formu **16a** (červeně).

Geometrie molekuly v obou typech krystalů piracetamu (**17a** a **17b**) je stejná, obě formy se od sebe liší krystalovým sblením, což indukuje rozdílné stínění pozorovatelné ve ^{13}C CP-MAS NMR spektrech.

Byly připraveny dvě polymorfní formy od kyseliny thiobarbiturové, forma II (**18a**) byla připravena rekrystalizací z absolutního ethanolu a forma III (**18b**) ze suchého acetonitrilu. Tyto dva polymorfy se liší tautomerní formou (**18a**-enol a **18b**-keto) a lze je jednoznačně rozlišit pomocí ^{13}C CP-MAS NMR spektroskopie (obr. 16). sp^2 -hybridizovaný uhlíkový atom C-5 ve formě **18a** je méně stíněný (82.75 ppm) než ten sp^3 -hybridizovaný ve formě **18b** (40.93 ppm). Také ostatní signály jsou významně posunuty (1.8 – 4.7 ppm).



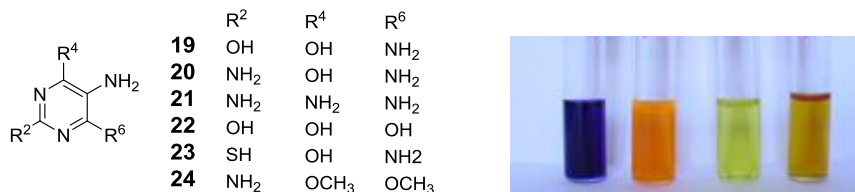
Obrázek 16. ^{13}C CP-MAS NMR spektra polymorfních krystalů kyseliny 2-thiobarbiturové rekrystalizované z ethanolu (červeně) jako forma **18a** a z acetonitrilu (černě) jako forma **18b**. Červené spektrum je posunuté asi o 5 ppm pro přehlednost. Jako standard byl použit krystalický glycin.

3.6 STABILITA 5-AMINOPYRIMIDINŮ V DMSO – PUBLIKACE VIII

Při studiu biologických vlastností jsou látky obvykle rozpuštěny v DMSO a tyto roztoky jsou velmi často skladovány v mrazáku dlouhou dobu. V naší předchozí práci,⁶ kdy jsme studovali antioxidační aktivitu 5-aminopyrimidinových derivátů (připravil Petr Jansa, ÚOCHB AV ČR), jsme po několika hodinách pozorovali barevné změny roztoků látek v

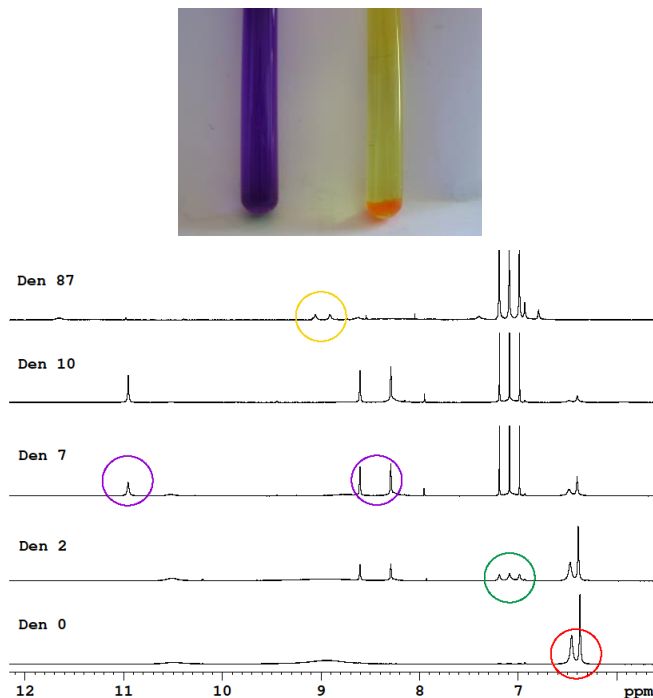
DMSO již při laboratorní teplotě (obr. 17 vlevo). Stejně procesy jsme pozorovaly i u roztoků uskladněných v mrazáku (-20°C).

V této kapitole popisují transformace těchto látek v DMSO studované sledem chemických reakcí s alloxanem, NMR a UV/Vis spektroskopií, a návrh mechanismu těchto přeměn.



Obrázek 17. Obecný vzorec studovaných látek (vlevo) a roztoky látek **20**, **21**, **19** a **23** v DMSO (vpravo) po několika hodinách od rozpuštění. Ihned po rozpuštění byly roztoky bezbarvé.

Průběh těchto přeměn byl pozorován ¹H NMR a UV/Vis spektroskopií. Pro ilustraci jsou ukázány změny v ¹H NMR spektrech látky **20** v čase (obr. 18). NMR signály výchozí látky (červeně; 6,37 ppm a 6,46 ppm) prakticky ze spektra vymizely za 7 dní. Druhý den se objevily signály fialového meziproductu **20a** (fialově; 8,30; 8,60 a 10,95 ppm). Ve stejnou dobu (dva dny) byl detekován amonný kationt (zeleně; 7,09 ppm, *J* = 51 Hz). Za několik měsíců jsme pozorovali NMR signály konečného produktu **20b** (žlutě; 8,9 a 9,0 ppm). Nízká intenzita těchto signálů je způsobena nízkou rozpustností látky **20b** v DMSO (precipitovala z roztoku). Absorpční spektra potvrdila, že se jedná o reakce následné (**20**→**20a**→**20b**), byl nalezen isosbestický bod při 365 nm.



Obrázek 18. Vývoj ¹H NMR spekter látky **20** v DMSO v čase. Výchozí látka **20** (červeně) reagovala v DMSO na meziproduct **20a** (fialově, fialový roztok v NMR kyvetě). Současně se uvolňoval amonný kationt (zeleně). Po několika měsících zreagovala látka **20a** na konečný produkt **20b** (žlutě, žlutý roztok v NMR kyvetě).

4 ZÁVĚRY

Ve své práci jsem se zaměřila na stanovení struktury modifikovaných složek nukleových kyselin, hlavně (ale nejen) na nukleosidové deriváty, které byly připraveny chemiky na ÚOCHB AV ČR, jmenovitě skupinami Radima Nencky a Zlatka Janeby za účelem nalezení nových potenciálně biologicky aktivních látek. Během mého doktorského studia jsem NMR spektroskopii vyřešila strukturu více než 700 nově připravených látek a v případě potřeby jsem také provedla konformační analýzu. Správné vyřešení struktury je nezbytné pro studium biologických účinků a strukturně-aktivitní studie.

Během mé práce byly vyvinuty dvě nové NMR metody pro přehlednější určení struktury purinových derivátů. Velmi podrobně byly studovány heteronukleární (H,C) spin-spinové intrakce, pomocí kterých lze přiřadit NMR signály kvartérních uhlíkových atomů. Druhá metoda umožňuje predikovat preferované tautomerní formy purinových derivátů v roztoku. Obě vyvinuté metody jsou založeny na korelaci mezi změřenými a vypočtenými NMR parametry.

NMR spektroskopii jsem také studovala fyzikálně-chemické vlastnosti, jako jsou intramolekulární interakce, stabilita nebo reaktivita modifikovaných nukleosidů. Jako nejvýznamnější výsledek mé disertační práce bych označila objevení 5-nitrosopyrimidinových derivátů s pevnými vodíkovými vazbami. Bylo pozorováno velmi zajímavé stereochemické chování těchto látek. Díky neobvykle pevným vodíkovým vazbám mohly vzniknout dva stabilní rotamery, které se liší pouze orientací nitroso skupiny, což bylo pozorováno v NMR spektrech jako dvě sady signálů. Poměr rotamerů v rovnovážném stavu silně závisí na povaze substituentů. Procentuální zastoupení rotameru A může nabývat široké škály hodnot (32–84 %). Vliv *p*-substituentů na relativní koncentraci rotamerů odpovídá Hammettově korelaci, kde jsou substituenty seřazeny podle elektronických vlastností (donory, akceptory). Navíc je v některých případech možné rotamery rozdělit a charakterizovat je jako chemická individua. Oba rotamery mají různé retenční časy na silikagelové chromatografické koloně a mají výrazně odlišná NMR spektra (^1H , ^{13}C , ^{15}N) v roztoku, stejně jako v pevné fázi. Díky tomuto zajímavému chování jsme je porovnali s dobře známými atropisomery, které jsou dělitelné díky stericky bráněné rotaci. Naše rotamery byly separovatelné díky pevným intramolekulárním vodíkovým vazbám. Rotační bariéry nabývají hodnot okolo 23 kcal/mol, což vysvětluje, že bylo možné izolovat čisté rotamery již při laboratorní teplotě.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- (1) De Clercq, E.; Holý, A.; Rosenberg, I.; Sakuma, T.; Balzarini, J.; Maudgal, P. C. *Nature* **1986**, *323*, 464.
- (2) Holý, A. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2567.
- (3) Kidwai, M.; Venkataramanan, R.; Mohan, R.; Sapra, P. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1209.
- (4) Kim, J. N.; Blount, K. F.; Puskarz, I.; Lim, J.; Link, K. H.; Breaker, R. R. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 915.
- (5) Pittillo, R. F.; Ray, B. J. *Appl. Microbiol.* **1969**, *17*, 773.
- (6) Procházková, E.; Jansa, P.; Dračínský, M.; Holý, A.; Mertlíková-Kaiserová, H. *Free Rad. Res.* **2012**, *46*, 61.
- (7) Marquez, V. E.; Siddiqui, M. A.; Ezzitouni, A.; Russ, P.; Wang, J.; Wagner, R. W.; Matteucci, M. D. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3739.
- (8) Marquez, V. E.; Ben-Kasus, T.; Barchi, J. J., Jr.; Green, K. M.; Nicklaus, M. C.; Agbaria, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 543.
- (9) Kuhn, B.; Mohr, P.; Stahl, M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2601.
- (10) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 737.
- (11) Marek, R.; Sklenář, V. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; Webb, A. G., Ed.; Elsevier Ltd: Oxford UK, 2005; Vol. 54, p 201.
- (12) Dračínský, M.; Pohl, R. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; Webb, A. G., Ed.; Elsevier Ltd: Oxford UK, 2014, p 59.
- (13) Standara, S.; Maliňáková, K.; Marek, R.; Marek, J.; Hocek, M.; Vaara, J.; Straka, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5126.
- (14) Gutowsky, H. S.; Karplus, M.; Grant, D. M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *31*, 1278.
- (15) Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870.
- (16) Eyring, H. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 107.
- (17) Temple, C. J.; Kussner, C. L.; Montgomery, J. A. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 2210.
- (18) McGuigan, C.; Sutton, P. W.; Cahard, D.; Turner, K.; O'Leary, G.; Wang, Y.; Gumbleton, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *Antivir. Chem. Chemother.* **1998**, *9*, 473.
- (19) Valette, G.; Pompon, A.; Girardet, J. L.; Cappellacci, L.; Franchetti, P.; Grifantini, M.; La Colla, P.; Loi, A. G.; Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1981.
- (20) Winter, H.; Maeda, Y.; Mitsuya, H.; Žemlička, J. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3300.
- (21) McGuigan, C.; Murziani, P.; Slusarczyk, M.; Gonczy, B.; Vande Voorde, J.; Liekens, S.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7247.
- (22) Taylor, E. C.; Loux, H. M.; Falco, E. A.; Hitchings, G. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2243.

CURRICULUM VITAE

Jméno: Eliška Procházková

Datum a místo narození: 6. 7. 1987, Praha

Vzdělání:

- 2011– Doktorské studium v oboru Fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze (disertační práce: *Struktura a vlastnosti modifikovaných složek nukleových kyselin* pod vedením Dr. Martina Dračínského, ÚOCHB AV ČR)
- 2014–2015 Rigorózní práce: *Antioxidační účinky modifikovaných složek nukleových kyselin*
- 2009–2011 Magisterské studium v oboru Biofyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze (diplomová práce: *Antioxidační účinky modifikovaných složek nukleových kyselin* pod vedením Dr. Heleny Mertlíkové-Kaiserové, ÚOCHB AV ČR)
- 2006–2009 Bakalářské studium v oboru Biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze (bakalářská práce: *Životní cyklus a metabolické dráhy původce malárie a návrh syntézy potenciálního inhibitoru hypoxanthin-guanin-xanthin-fosforibosyltransferasy* pod vedením Prof. Antonína Holého, ÚOCHB AV ČR)
- 2002–2006 Masarykova střední škola chemická, Praha

Zaměstnání:

- 2011– Doktorand, ÚOCHB AV ČR
- 2009–2011 Chemický technik, ÚOCHB AV ČR
- 2006–2009 Laborant, ÚOCHB AV ČR

Jazykové znalosti:

Anglický jazyk: FCE zkouška, 2014

Pedagogická činnost na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze:

2013 – Fyzikální chemie I, II (cvičení)

Semináře a kurzy:

1. Kurz "Pokročilé metody NMR" 2013, Bruker, Fällanden, Švýcarsko
2. Jarní škola "Teorie NMR" 2015, Leipzig University, Colditz, Německo

Výstavy:

- EXPO 2010: Lepší město, lepší život; Shanghai, Čína (2010)

- Členka realizačního týmu, příprava podkladů pro výstavu o antivirotikách připravených Prof. Antonínem Holým na ÚOCHB AV ČR v Praze.
- 60leté výročí ÚOCHB AV ČR (2013)
 - Členka realizačního týmu, příprava podkladů ve spolupráci s Masarykovým ústavem a Archivem AV ČR
- “Věda kontra viry”: Výstava v Národním technickém muzeu (2013)
 - Spoluautorka výstavy

Mediální výstupy:

- Interview v rádiu Český rozhlas Rádio Česko o vývoji nových látek s potenciálním antimalarickým účinkem (“Tým profesora Holého vyvíjí nové léky proti malárii”), 2010
- Interview v rádiu Český rozhlas Leonardo o původci malárie a jeho životním cyklu (program Meteor: Parazit, který člověku “pije krev”), 2010
- Medailonek v tisku Hospodářské noviny, příloha o vysokých školách (“S profesorem Holým pracovala už na střední”), 2014

Popularizační aktivity:

- Chemický jarmark v Praze (2011)
 - Spoluautorka stánku s názvem “Magnetárium” nejen o nukleární magnetické rezonanční spektroskopii
- Pražská muzejní noc ve spolupráci s Muzeem policie (2012)
 - Spoluautorka stánku o nukleární magnetické rezonanční spektroskopii
- Pražská muzejní noc ve spolupráci s Muzeem policie (2013)
 - Koordinátorka této akce za ÚOCHB

Vzdělávací aktivity:

- Exkurze po ÚOCHB pro bakalářské studenty z Belgie (Karel de Grote - University of Applied Sciences, Department Industrial Sciences and Technology, Antwerp) (2011)
- Podzimní škola pro učitele středních škol (2012)
 - Přednáška s názvem „NMR spektroskopie“

Středoškolská odborná činnost:

- Práce na téma: "Měření hodnot ORP a stanovení koncentrace aktivního chloru v bazénových vodách"
 - Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT Praha, školitel Doc. Vladimír Sýkora, 2004–2005
- Práce na téma: "Nukleosidy na HPLC koloně Supelcosil™ LC-18-S"
 - ÚOCHB AV ČR, školitel Dr. Ivan Votruba, 2005–2006

VYBRANÉ PUBLIKACE

Seznam publikací, které se vztahují k mé disertační práci.

- I. Šála, M. – Dejmek, M. – **Procházková, E.** – Hřebabecký, H. – Rybáček, J. – Dračínský, M. – Novák, P. – Rosenbergová, Š. – Fukal, J. – Sychrovský, V. – Rosenberg, I. – Nencka, R.: Synthesis of locked cyclohexene and cyclohexane nucleic acids (LCeNA and LCNA) with modified adenosine units. *Org. Biomol. Chem.* **2015**; 13, 2703–2715.
- II. Hřebabecký, H. – **Procházková, E.** – Šála, M. – Plačková, P. – Tloušťová, E. – Barauskas, O. – Lee, Y.J. – Tian, Y. – Mackman, R. – Nencka, R.: Synthesis of conformationally restricted 6- and 7- membered ring bicycloribonucleosides/tides and their recognition by kinases and polymerases. *Org. Biomol. Chem.* **2015**; submitted.
- III. **Procházková, E.** – Čechová, L. – Jansa, P. – Dračínský, M.: Long-range heteronuclear coupling constants in 2,6-disubstituted purine derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **2012**; 50, 295–298.
- IV. **Procházková, E.** – Šála, M. – Nencka, R. – Dračínský, M.: C⁶-substituted purine derivatives: an experimental and theoretical ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR study. *Magn. Reson. Chem.* **2012**; 50, 181–186.
- V. **Procházková, E.** – Čechová, L. – Janeba, Z. – Dračínský, M.: A switchable intramolecular hydrogen bond in polysubstituted 5-nitrosopyrimidines. *J. Org. Chem.* **2013**; 78, 10121–10133.
- VI. Čechová, L. – **Procházková, E.** – Císařová, I. – Dračínský, M. – Janeba, Z.: Separation of planar rotamers through intramolecular hydrogen bonding in polysubstituted 5-nitrosopyrimidines. *Chem. Commun.* **2014**; 50, 14892–14895.
- VII. Dračínský, M. – **Procházková, E.** – Kessler, J. – Šebestík, J. – Matějka, J. – Bouř, P.: Resolution of organic polymorphic crystals by Raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* **2013**; 117, 7297–7307.
- VIII. **Procházková, E.** – Jansa, P. – Březinová, A. – Čechová, L. – Mertlíková-Kaiserová, H. – Holý, A. – Dračínský, M.: Compound instability in dimethyl sulphoxide, case studies with 5-aminopyrimidines and the implications for compound storage and screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**; 22, 6405–6409.

OSTATNÍ PUBLIKACE

1. Mertlíková-Kaiserová, H. – Rumlová, M. – Tloušťová, E. – **Procházková, E.** – Holý, A. – Votruba, I.: Point mutations in human guanylate kinase account for acquired resistance to anticancer nucleotide analogue PMEG. *Biochem. Pharmacol.* **2011**; 82, 131–138.
2. **Procházková, E.** – Jansa, P. – Dračínský, M. – Holý, A. – Mertlíková-Kaiserová, H.: Determination of the antioxidative activity of substituted 5-aminopyrimidines. *Free Rad. Res.* **2012**; 46, 61–67.
3. Jansa, P. – Baszczyński, O. – **Procházková, E.** – Dračínský, M. – Janeba, Z.: Microwave-assisted hydrolysis of phosphonate diesters: an efficient protocol for the preparation of phosphonic acids. *Green Chem.* **2012**; 14, 2282–2288.
4. Dejmek, M. – Šála, M. – Plačková, P. – Hřebabecký, H. – Borreda, L.M. – Neyts, J. – Dračínský, M. – **Procházková, E.** – Jansa, P. – Leyssen, P. – Mertlíková-Kaiserová, H. – Nencka, R.: Synthesis of Novel Purine-Based Cocksackievirus Inhibitors Bearing Polycyclic Substituents at the N-9 Position. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2014**; 347, 1–8.
5. Dejmek, M. – Hřebabecký, H. – Šála, M. – Dračínský, M. – **Procházková, E.** – Leyssen, P. – Neyts, J. – Balzarini, J. – Nencka, R.: From norbornane-based nucleotide analogs locked in South conformation to novel inhibitors of feline herpes virus. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**; 22, 2974–2983.
6. Dejmek, M. – Šála, M. – Hřebabecký, H. – Dračínský, M. – **Procházková, E.** – Chalupská, D. – Klíma, M. – Plačková, P.; Hájek, M. – Andrei, G. – Naesens, L. – Leyssen, P. – Neyts, J. – Balzarini, J. – Bouřa, E. – Nencka, R.: Norbornane-based nucleoside and nucleotide analogues locked in North conformation. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**; 23, 184–191.
7. Mejdrová, I. – Chalupská, D. – Kögler, M. – Šála, M. – Plačková, P. – Baumlová, A. – Hřebabecký, H. – **Procházková, E.** – Dejmek, M. – Guillon, R. – Strunin, D. – Weber, J. – Lee, G. – Birkus, G. – Mertlíková-Kaiserová, H. – Bouřa, E. – Nencka, R.: Highly selective PI4K III β inhibitors and structural insight into their mode of action. *J. Med. Chem.* **2015**; 58, 3767–3793.
8. Šála, M. – Dejmek, M. – **Procházková, E.** – Hřebabecký, H. – Rybáček, J. – Dračínský, M. – Novák, P. – Rosenbergová, Š. – Rosenberg, I. – Nencka, R.: A new analogue of locked cyclohexane nucleic acids. *Synthesis* **2015**; DOI: 10.1055/s-0034-1380744.

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Physical and Macromolecular Chemistry

Ph.D. study program: Physical Chemistry

Synopsis of the Ph.D. Thesis



The Structure and Properties of Modified Nucleic Acid Components

RNDr. Eliška Procházková

Supervisor: RNDr. Martin Dračínský, Ph.D.

Prague, 2015

TABLE OF CONTENTS

Abstract.....	1
1 Introduction	2
2 Aims of the study	4
3 Results and discussion	5
3.1 Structure determination – papers I, II.....	5
3.2 NMR methods development – papers III, IV.....	7
3.3 Hydrogen bonds in polysubstituted 5-nitrosopyrimidines – papers V, VI	9
3.4 Enzymatic decomposition monitored by ³¹ P NMR spectroscopy – paper II	11
3.5 Study of polymorphic forms by solid-state NMR spectroscopy – paper VII	12
3.6 Stability of 5-aminopyrimidines in DMSO – paper VIII	13
4 Conclusions	16
5 References.....	17
<i>Curriculum vitae</i>	18
Selected papers	20
Other papers.....	21

ABSTRACT

Modified nucleic acid components (nucleotides/nucleosides/nucleobases) display a wide range of biological effects such as antiviral, cytostatic, antimicrobial or antioxidative. Many of them are successfully used in clinical practice, for instance as anti-HIV drugs or in Hepatitis B treatment. The first precondition for understanding biological effects is to evaluate the chemical structure as well as the conformation of the studied compounds correctly. During my Ph.D. thesis, I determined the structure of more than 700 newly prepared potentially biologically active compounds and investigated their physico-chemical properties; for instance, I studied the conformational changes, tautomeric forms, non-covalent interactions, isotopic exchanges, stability, reactivity and polymorphic structures of modified nucleic acid components using NMR spectroscopy. The synopsis of my Ph.D. thesis briefly describes: (1) the investigation of the configuration of locked nucleoside by 2D NMR experiments (COSY and ROESY). It also shows the conformational analysis of locked nucleoside exerting antiviral activity, which is based on the comparison of experimental and calculated homonuclear (H,H) *J*-coupling constants. (2) Another project focuses on NMR methods development. The first one serves for unambiguous NMR signal assignment in purines based on the measurement of heteronuclear coupling constants in combination with DFT calculations. In the second one, the same approach including correlations between experimental and calculated data was applied for the development of a new method for the prediction of preferred tautomeric forms of purine derivatives. (3) From the next project, where we studied nitrosopyrimidine derivatives with strong intramolecular H-bonds which stabilized two conformers, I show only the investigation of the composition of the rotamers mixture and the significant substituent dependence following Hammett-like correlation. In some cases, it was possible to separate both rotamers from each other. The kinetics of the rotamer interconversion was measured to determine rotational barriers around C5-NO single bond. Experimental data were supported by DFT calculations. (4) The next chapter describes the enzymatic decomposition of phosphoramidate derivatives monitored by ³¹P NMR spectroscopy directly in an NMR tube; the study examined whether newly prepared compounds could work as a prodrug. The monitoring of the reaction is based on the fact that the starting phosphoramidate has a chiral center at the phosphorus atom, so that it has two signals in proton decoupled ³¹P NMR spectra corresponding to two diastereoisomers. (5) I also measured NMR spectra in solid state, where I studied polymorphic crystals of three industrially important compounds. Model polymorphic crystals were prepared by re-crystallization from different solvents and characterized using CP-MAS NMR spectroscopy. These data were supplemented by DFT calculations. (6) The compound instability of 5-aminopyrimidine derivatives in DMSO was studied by NMR and UV/Vis spectroscopy and successive reactions were confirmed, the isosbestic point was found. ¹H NMR spectra provided clear evidence of the presence of ammonium cation and chemical reactions leading to product structure determination were performed. The mechanism of these transformations was proposed.

1 INTRODUCTION

Modified nucleic acid components (nucleotides/nucleosides/nucleobases) can target several types of metabolic pathways leading to a wide range of biological effects such as antiviral,^{1,2} cytostatic,³ antimicrobial,⁴ antifungal⁵ or antioxidative.⁶ The molecule of a nucleot(s)ide can be modified on the purine/pyrimidine skeleton or in the sugar moiety; nucleotides can also be modified in the phosphate chain. As an example, very important class of compounds modified in the phosphate chain is the group of acyclic nucleoside phosphonates, where the ribose ring is replaced by an aliphatic chain and the O-P group is changed into an O-CH₂-P group. These compounds are more stable in cells. Three of them (adefovir, tenofovir and cidofovir) are used as antiviral agents in medicinal practice under the trade marks HepsaraTM, VireadTM and VistideTM, respectively (Fig. 1).

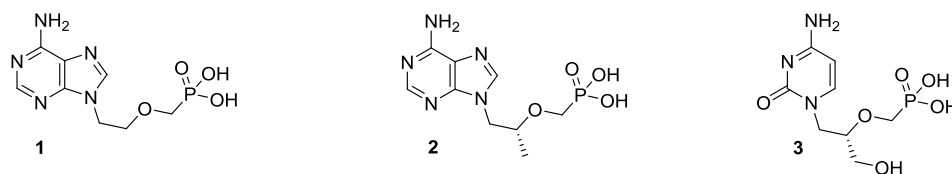


Figure 1. The structures of adefovir (1), tenofovir (2) and cidofovir (3), which are used in clinical practice.

The structural diversity of modified nucleic acid components (NACs) can lead to differences in a variety of their properties such as conformation, configuration, tautomeric equilibria, protonation sites, hydrogen-bonding, base-pairing as well as their interactions with enzymes or metal ions. For instance, a study of tautomeric equilibria provides essential information about reactivity of the studied derivative; the tautomeric form of the starting compound influences the regioselectivity of alkylation and glycosidation reactions. Another example is the conformation of modified NACs, they can differ in the orientation of the base with respect to the ribose ring or in the conformation of a flexible sugar moiety. The conformation of the ribose ring is crucial for the recognition by cellular enzymes. For instance, it has been found that North-type conformers of a locked nucleoside are effectively bound by polymerases,⁷ while their South-type counterparts are recognized by thymidine kinases.⁸ For this reason, it is desirable to study sugar conformation in newly prepared compounds. The stability and properties of conformers can be significantly influenced by non-covalent interactions, such as hydrogen bonds, hydrophobic interactions and π - π stacking. Intramolecular hydrogen bonds decrease the molecular polarity, which leads to better membrane permeability.⁹ Furthermore, they play a key role in a wide range of biochemical processes such as base-pairing in duplexes of nucleic acids.¹⁰

The electronic distribution in molecules influences chemical properties. It is reflected in chemical shifts δ , spin-spin couplings J and other NMR parameters, which makes nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy an excellent tool for investigating the structure, reactivity, molecular motions and intermolecular interactions of the studied compounds especially small molecules such as NACs.¹¹⁻¹³ NMR spectroscopy is based on the fact that atomic nuclei with a non-zero spin quantum number have a magnetic momentum,

so that these nuclei are active in NMR spectroscopy. NMR signal assignment leading to structure determination of studied compound is usually done by a combination of 1D (^1H , ^{13}C) and 2D (COSY, HSQC, HMBC, ROESY) NMR experiments.

Conformation and/or configuration can be elucidated through J -coupling analysis. From the values of nJ -coupling magnitudes, it is possible to assess how many chemical bonds (n) are between the coupled nuclei. Commonly observed interactions in ^1H spectra are across two bonds 2J and three bonds 3J (geminal and vicinal, respectively). 3J -coupling values significantly depend on the torsion angles between the coupled nuclei. The influence of the torsion angle Φ on the vicinal coupling constant 3J is described by the empirical Karplus equation,^{14,15} which contains the cosine function; it is evident that for a torsion angle close to 90° , the coupling constant 3J reaches the lowest value. On the other hand, when the torsion angle is close to 0° or 180° , the vicinal coupling constant tends to be the largest.

Dynamic processes such as conformational changes can be studied by dynamic NMR spectroscopy (dNMR). Atoms in different forms of a molecule (e.g. conformers) have different chemical shifts. Depending on the rate of interconversion between the individual forms, it is possible to observe separated sets of signals for the individual forms or an averaged spectrum. Free energy barriers of the motional processes can be extracted from the line-shape analysis of temperature-dependent NMR spectra; simulated NMR spectra are calculated to fit the shape of experimental signals. From these simulations, the rate constant is extracted and used as input for the Eyring equation.¹⁶ The Eyring equation is an expression for the rate constant in the transition-state theory, from which one can calculate the free-energy barrier ΔG^\ddagger of the processes. Using the dNMR method, one can study the dynamic processes with the rate constant k between 10^{-1} and approximately 10^3 s^{-1} . For example, the dNMR method is frequently used to investigate tautomeric or conformational equilibria or to determine the barriers in compounds with sterically hindered rotation (atropisomers).

NMR parameters and other physico-chemical quantities obtained from NMR spectra can be complemented by DFT calculations. The density functional theory (DFT) is based on the theorem that energy is a unique functional of electron density. DFT methods are used for geometry optimization and for the prediction of NMR parameters such as chemical shielding constants or J -coupling constants.

2 AIMS OF THE STUDY

- The structure determination and conformational analysis of new potentially biologically active modified nucleic acid components.
- NMR methods development - a combination of experimental and theoretical approaches for a reliable signal assignment in purine derivatives and for the determination of the structure of preferred tautomeric forms in solution.
- The determination of intramolecular hydrogen bond geometries and stabilities in 5-nitrosopyrimidine derivatives with two hydrogen-bond donors.
- The monitoring of the enzymatic decomposition of a prodrug of a biologically active locked carbocyclic nucleotide by ^{31}P NMR spectroscopy.
- The determination and characterization of polymorphic forms of model compounds (including modified nucleobases) by solid-state NMR spectroscopy.
- The structure determination of decomposition products of 5-aminopyrimidines stored in DMSO and the determination of the reaction mechanism.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 STRUCTURE DETERMINATION – PAPERS I, II

The chemical structure of newly prepared compounds are often determined by a combination of 1D and 2D NMR experiments. If necessary, the conformation and/or configuration of the studied compound may be investigated mainly by *J*-coupling analysis. During my doctoral studies I collaborated with synthetic chemists at the IOCB AS CR and determined the structure of more than 700 compounds. In this chapter, investigation of the configuration and conformation of conformationally constrained (locked) nucleosides **4** and **5** with potential antiviral activity will be shown as an example. These compounds have been prepared by Michal Šála and Hubert Hřebabeký at the IOCB AS CR.

For the stereochemistry determination of compound **4**, two homonuclear 2D NMR spectra, COSY and ROESY, have been measured. Crosspeaks in the COSY spectra usually correspond to spin-spin interactions across two and three bonds. When hydrogen atoms are in a W-like arrangement, it is possible to observe long-range couplings. Consequently, it was possible to confirm the stereochemistry at C-8, because W-like long range coupling between H-8 and H-7_{endo} was found (Fig. 2 left). In the ROESY spectra, through-space interactions are observable. A ROESY crosspeak corresponding to H8-H8' interaction in compound **4** (Fig. 2 right) confirmed the relative configuration at carbon atoms C-8 and C-4. Furthermore, crosspeaks corresponding to H4-H6_{endo} and 8OH-H7_{exo} were found in ROESY, which further confirmed the stereochemical assignment. This configuration was confirmed by *J*-coupling analysis, where the experimental *J*-coupling values were in agreement with DFT calculations.

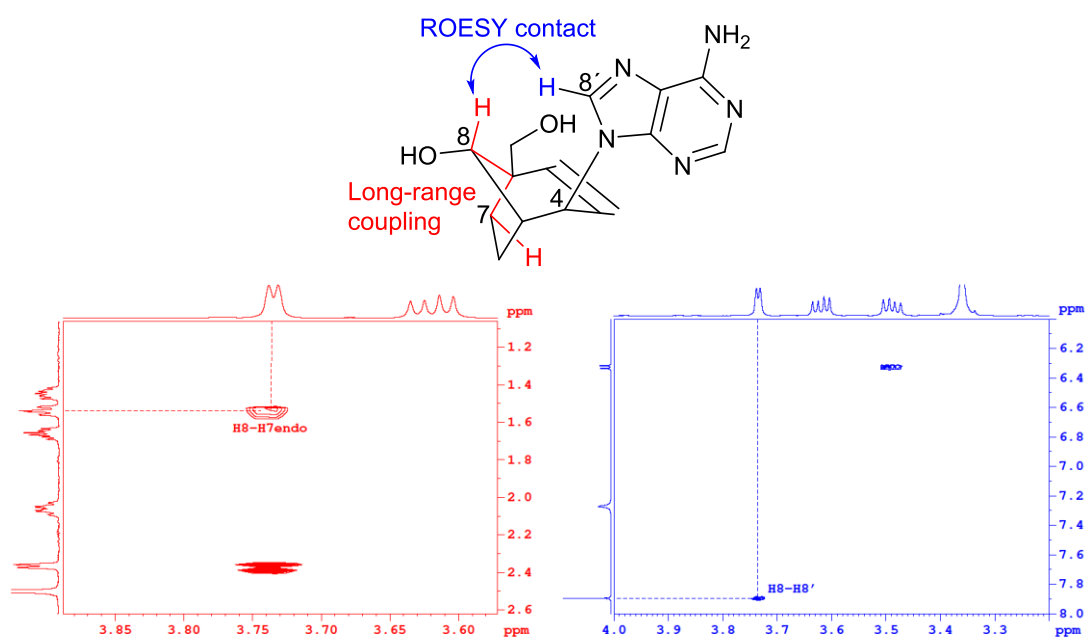


Figure 2. A part of the COSY (left) and ROESY (right) spectra of compound **4**. The W-like shaped long-range interaction between H8 and H7-*endo* has clearly determined the configuration at carbon C-8. The through-space interaction H8-H8' has confirmed the configuration at carbon C-4.

The conformation of the ribose ring is usually investigated using the concept of pseudorotation. In this theory, the conformation of the ribose ring is defined by two parameters called phase angle P and maximum puckering amplitude Φ_{MAX} . The phase angle is calculated from torsion angles $\Phi_0-\Phi_4$ and describes the shape of the molecule (twist or envelope). The second parameter Φ_{MAX} indicates the maximum atom displacement.

In compound **5** (Fig. 3), the flexibility of the ribose ring is reduced due to the seven-membered ring formation.

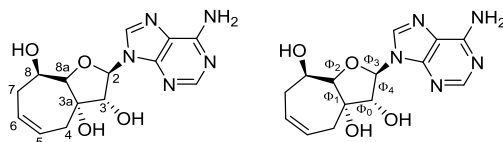


Figure 3. The chemical structure of compound **5** and the numbering of the pseudosugar part of the molecule (left). Torsion angles $\Phi_0-\Phi_4$ (right).

The experimental J -coupling values obtained from the ^1H NMR spectrum were compared with the values calculated by two different approaches. First, the geometry of compound **5** was optimized at the DFT level starting from four initial conformations with phase angles $P = 0^\circ, 90^\circ, 180^\circ$ and 270° and $\Phi_{MAX} = 40^\circ$. After the geometry optimization of all four initial geometries, only one conformer was found with the torsion angles $\Phi_0-\Phi_4$ being $-30.8^\circ, 20.5^\circ, -0.8^\circ, -19.5^\circ$ and 31.5° , respectively. The obtained torsion angles were used as input for the J -couplings calculated by a Karplus-like equation, which describes the dependence of the vicinal J -coupling values on the torsion angle between the coupled nuclei. J -couplings in the found geometry were also calculated by the DFT method. Both theoretical approaches provided similar values, which fit well with the experimentally obtained J -couplings. It can be concluded from the obtained torsion angles that compound **5** is present in a solution in the South conformation (${}^2\text{E}$) with the phase angle $P = 163^\circ$.

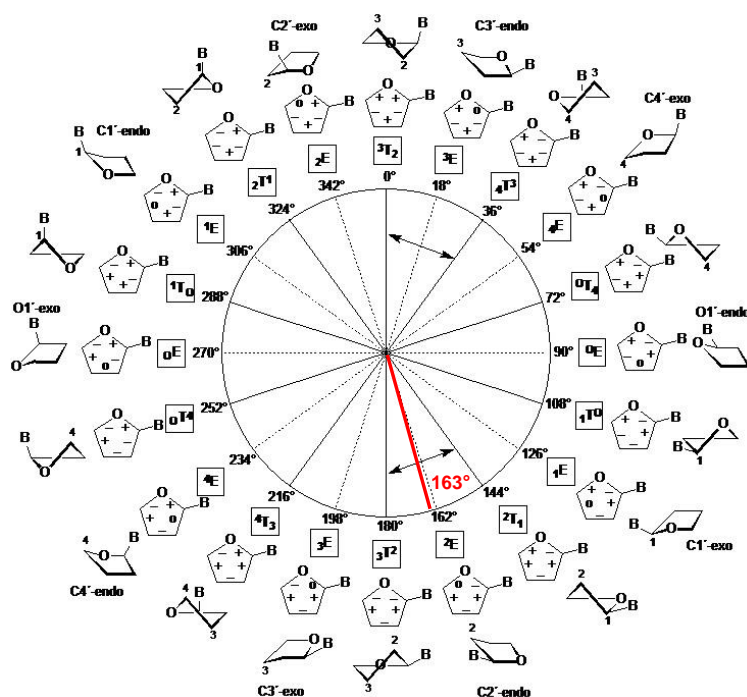


Figure 4. The pseudorotation cycle of the furanose ring. The determined South conformation of compound **5** with the phase angle $P = 163^\circ$ (in red).

3.2 NMR METHODS DEVELOPMENT – PAPERS III, IV

This chapter briefly describes the results of two independent studies, which focused on the development of NMR methods for more reliable signal assignment and the determination of the preferred tautomeric forms of purine derivatives.

For the ^{13}C NMR signal assignment of purine derivatives, the three-bond heteronuclear couplings visible in H,C-HMBC spectra as high-intensive crosspeaks are commonly used (Fig. 5 left). Simultaneously, there are sometimes two crosspeaks with lower intensity corresponding to the four- and five-bond coupling constants (long-range coupling constants) H8-C6 and H8-C2, respectively (Fig. 5 right). From HMBC, one can only qualitatively estimate J -couplings from crosspeak intensities, but it is generally expected that the four-bond H8-C6 crosspeak is always stronger than the five-bond one, specifically $^4J > ^5J$. If the purine skeleton is substituted in both positions 2 and 6, C-2 and C-6 ^{13}C NMR signals are assigned using these heteronuclear long-range coupling constants 4J and 5J .

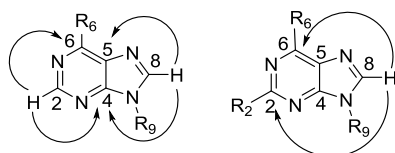


Figure 5. A schematic representation of heteronuclear H-C spin-spin interactions. Three-bond correlations (left) and long-range couplings (right) visible as crosspeaks in HMBC spectra.

Heteronuclear long-range coupling constants were studied on ten purine derivatives (prepared by Lucie Čechová and Petr Jansa at the IOCB AS CR) substituted with various substituents in positions 2 and 6.

As an example, Fig. 6 shows the H-8 regions of the HMBC spectra of compounds **6** and **7**. Based on different substituents in position 6 of the purine skeleton, the intensities of crosspeaks H8-C2 and H8-C6 differ significantly. In compound **6**, the H8-C2 crosspeak is more intensive than H8-C6; in compound **7**, the H8-C2 crosspeak is missing in the spectrum.

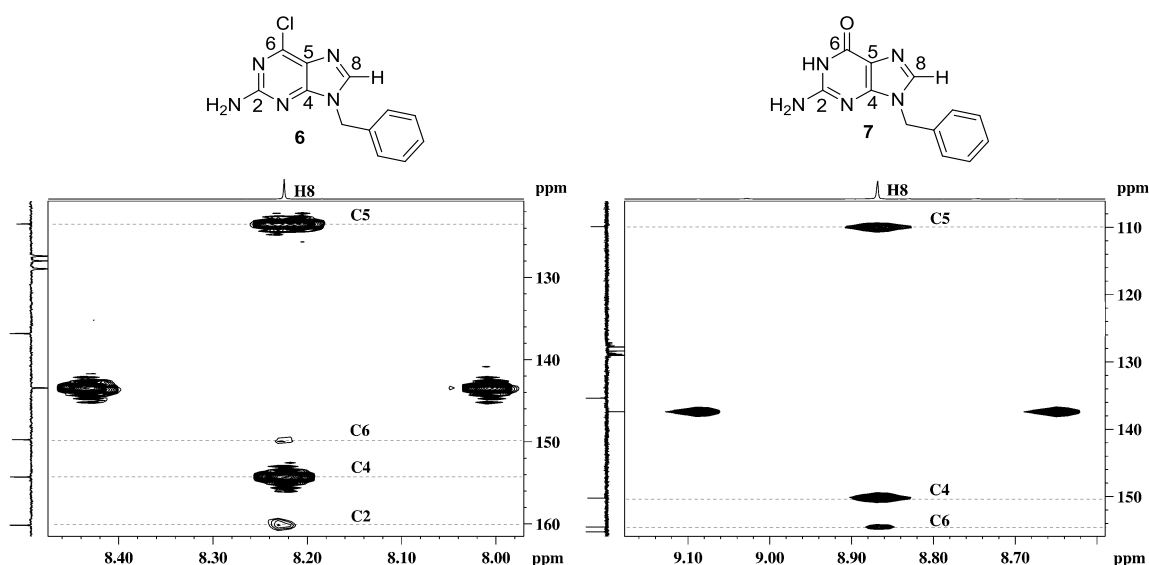


Figure 6. The H-8 region of the HMBC spectra of selected compounds. There are significant differences between the intensities of crosspeaks H8-C2 and H8-C6. The H8-C6 (4J) is not always stronger than the H8-C2 (5J).

To corroborate this finding, long-range coupling constants were calculated using the DFT method and compared with the values obtained from hydrogen-coupled ^{13}C NMR spectra. The experimental values in compound **7**, for instance, are as follows: $^4J = 1.2$ Hz and $^5J = 0.4$ Hz; they are in agreement with the calculated values: $^4J = 0.92$ Hz and $^5J = 0.34$ Hz. These results correspond to the fact that the H8-C6 crosspeak in HMBC is more intensive than H8-C2. On the other hand, in compound **6**, the calculated long-range coupling constants were: $^4J = 0.32$ Hz and $^5J = 0.61$ Hz. This is evident in HMBC, where the H8-C6 crosspeak is less intensive than the H8-C2 one.

The tautomeric forms of purine derivatives were studied on a series of 24 6-substituted purines prepared by Michal Šála and Radim Nencka at the IOCB AS CR.

For every atom of the purine skeleton of compounds with one possible tautomeric form only, the correlation between experimentally obtained chemical shifts δ and calculated shielding constants σ was constructed. As an example, the correlations of the carbon atom C-4 and the nitrogen atom N-1 are shown in Fig. 7.

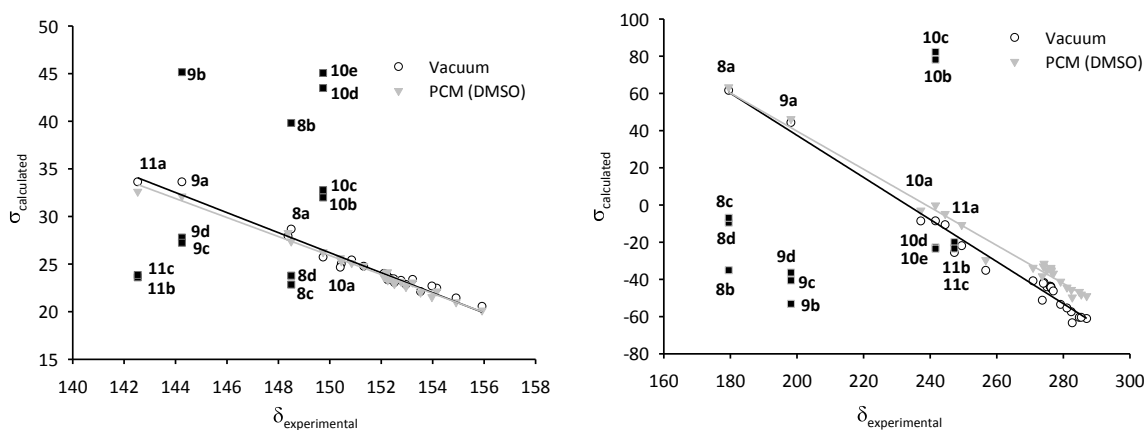


Figure 7. The correlations between the calculated shielding constants σ and the measured chemical shifts δ of the carbon atom C-4 (left) and the nitrogen atom N-1 (right). The black squares represent the tautomers/rotamers, which are not present in DMSO solution.

The correlations constructed for every atom of purine skeleton were linear ($R^2 > 0.96$ except C-6 and N-7). As expected, the “a” forms of compounds **8–10** (Fig. 8) fit well with the correlation, whereas the other forms are far from the linear correlation. 6-Azidopurine (**11**) can exist in equilibrium between tetrazole **11a** and azido-azomethine forms **11b** and **11c** (Fig. 7) depending on external conditions.¹⁷ In DMSO, the electronic energies of tetrazole form **11a** and azido-azomethine form **11b** are close to each other. From the constructed correlations, it is evident that both azido-azomethine forms **11b** and **11c** are very far from the linear correlation (see, e.g. carbon C-4 in Fig. 7). It is clear that the tetrazole form **11a** is highly predominant in the DMSO solution (Fig. 8).

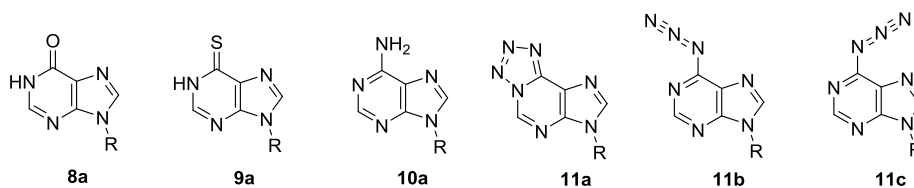


Figure 8. The “a” forms are preferred in the DMSO solution.

3.3 HYDROGEN BONDS IN POLYSUBSTITUTED 5-NITROSOPYRIMIDINES – PAPERS V, VI

5-Nitrosopyrimidines are not naturally occurring but they display a wide range of biological activities. The nitroso group can form intramolecular hydrogen bonds (H-bonds) with suitable H-bond donors in the neighboring positions e.g. amino groups. In this arrangement, the shape of 5-nitrosopyrimidines is similar to purine derivatives and they might work as purine mimics. When two H-bond donors are attached to both carbon atoms in the neighboring positions, two H-bonds can be formed differing in the geometry of the NO group. Therefore, these molecules mimic two different purine derivatives and might be substrates for enzymes of two metabolic pathways.

For this work, a series of 32 5-nitrosopyrimidine derivatives with two competing H-bond donors has been prepared (Fig. 9 left) by Lucie Čechová at the IOCB AS CR using a new microwave-assisted synthesis. The two possible H-bonding arrangements give rise to the two conformers differing only in the nitroso group orientation (rotamers) were observed in the NMR spectra as two sets of signals at room temperature. The relative concentration of rotamer A ranged from 32 to 84 % strongly depending on the *para* substituent R^1 of the phenylamino group at position 6; the percentage correlated well with Hammett coefficients σ_p , see Fig. 9 right).

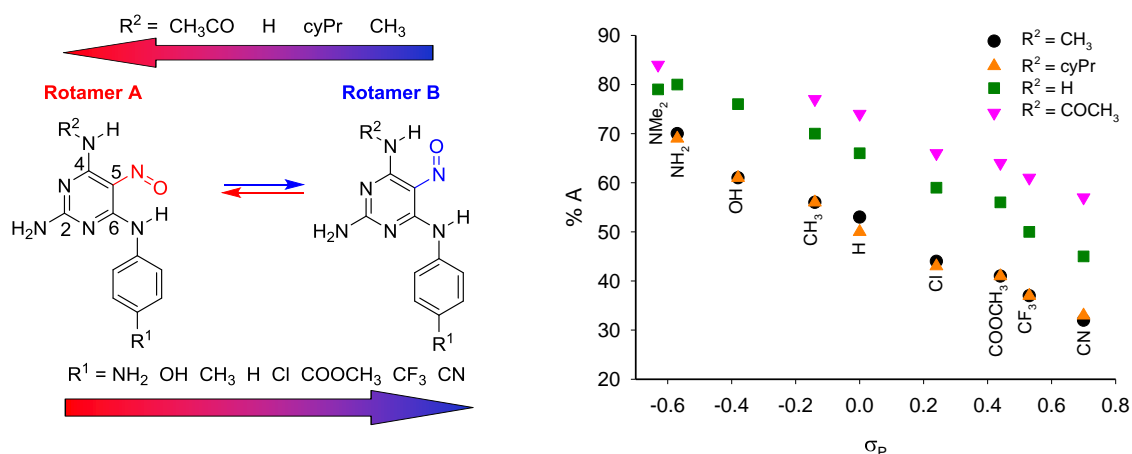


Figure 9. A schematic representation of the studied conformational equilibria (left) and the dependence of the observed rotamer ratio of the studied compounds on the Hammett constant σ_p for the substituent in the *para* position of the phenylamino group R^1 (right).

After the rotamers mixture heating, the nitroso group should rotate faster and only one set of signals should be observed in the NMR spectra. However, the intramolecular H-bonds stabilize the two rotamers and their interconversion is slow even at elevated temperatures. No NH signal averaging was detected even at 140 °C. It is clear from these data that the rotational barrier is unusually high. It was determined from the NMR line-shape analysis of the NH protons that the rotational barrier is higher than 20 kcal/mol. The rotational barriers of the nitroso group were also calculated by DFT methods and similar values (higher than 20 kcal/mol) were found.

A new series of 5-nitrosopyrimidine derivatives with aliphatic amine residues in positions 4 and 6 was prepared by Lucie Čechová and Zlatko Janeba at the IOCB AS CR. In these compounds, like in previously described derivatives, the rotational barrier of the nitroso group was unusually high. We thus tried to separate the two rotamers from each other. Also here, there were two H-bond donors, two H-bonds were formed and the two stable rotamers were present in solution; the rotamer ratio was significantly substituent-dependent. To our surprise, it was possible to separate the two rotamers using column chromatography at room temperature. After the solvent evaporation from the chromatographic fractions, the two stable rotamers were obtained. The purity of both rotamers was confirmed by solid-state NMR spectroscopy (Fig. 10 left) and by X-ray analysis (Ivana Císařová). Furthermore, we could observe slow re-crystallization of amorphous rotamer B into the stable rotamer A in solid-state ^{13}C NMR spectra within several months. Rotamer separation made it possible to measure the kinetics of their interconversion (Fig. 10 right) and to determine rotational barriers.

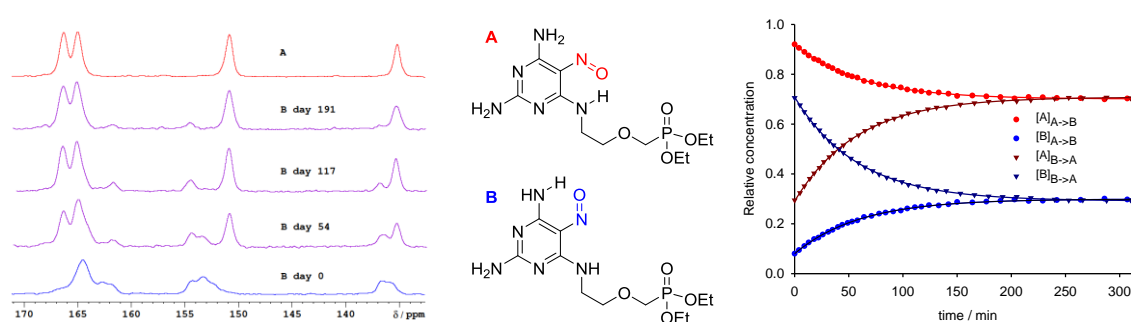


Figure 10. The aromatic region of the ^{13}C CP-MAS NMR spectra of planar rotamers **12A** and **12B** (left) and the time dependence of the relative concentrations of both rotamers of compound **12** in DMSO (right).

The properties of these compounds are close to atropisomers; the main difference is that atropisomer separation is mediated by sterically hindered rotation in contrast to our rotamers, which are separable through strong intramolecular hydrogen bonding. Therefore, we distinguished them from relatively common atropisomers. We have suggested the term “planamerism”, defining “planamers” as small aromatic molecule rotamers with a planar conjugated moiety that are isolable as chemical species. It may be speculated that planamers might play an important role in disciplines involving the study of weak and reversible non-covalent interactions or as potential biologically active compounds in the development of novel drug-like molecules.

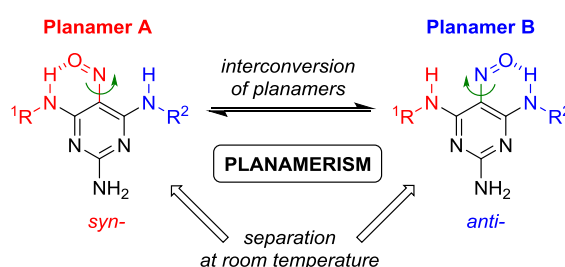


Figure 11. Planar rotamers have been separated by column chromatography at room temperature.

3.4 ENZYMATIC DECOMPOSITION MONITORED BY ^{31}P NMR SPECTROSCOPY – PAPER II

Many biologically active compounds are too polar to pass across the cell membrane, therefore, more lipophilic derivatives (prodrugs) are often prepared. Frequently used prodrugs of modified nucleosides contain a phosphoramidate moiety,¹⁸ which can be easily cleaved by cellular enzymes, while activated nucleoside (monophosphate) is released. The enzymatic cleavage can be monitored by ^{31}P NMR spectroscopy.¹⁹

This study deals with the monitoring of the enzymatic decomposition of modified nucleosides with an aryl phosphoramidate moiety (Fig. 12), which have been prepared by Hubert Hřebabecký at the IOCB AS CR as potential antiviral agents. It has been described for similar compounds that prodrug activation is initiated by the carboxylesterase-mediated hydrolysis of the phosphoramidate group.²⁰ Thus, the enzymatic degradation was simulated using carboxypeptidase Y,²¹ which possesses high structural homology to cathepsin A, an enzyme responsible for this conversion in humans. Chemical hydrolysis of the studied compounds in aqueous triethylamine solutions was also studied to confirm the chemical structure of intermediates and final products (Fig. 13). It was found that the structural modification of the studied nucleoside derivatives is not significant enough to inhibit the enzyme and that the supposed metabolic reaction works well. The structure of the products was determined *in situ* due to C-P spin-spin interactions visible in ^{13}C NMR spectra as a line splitting.

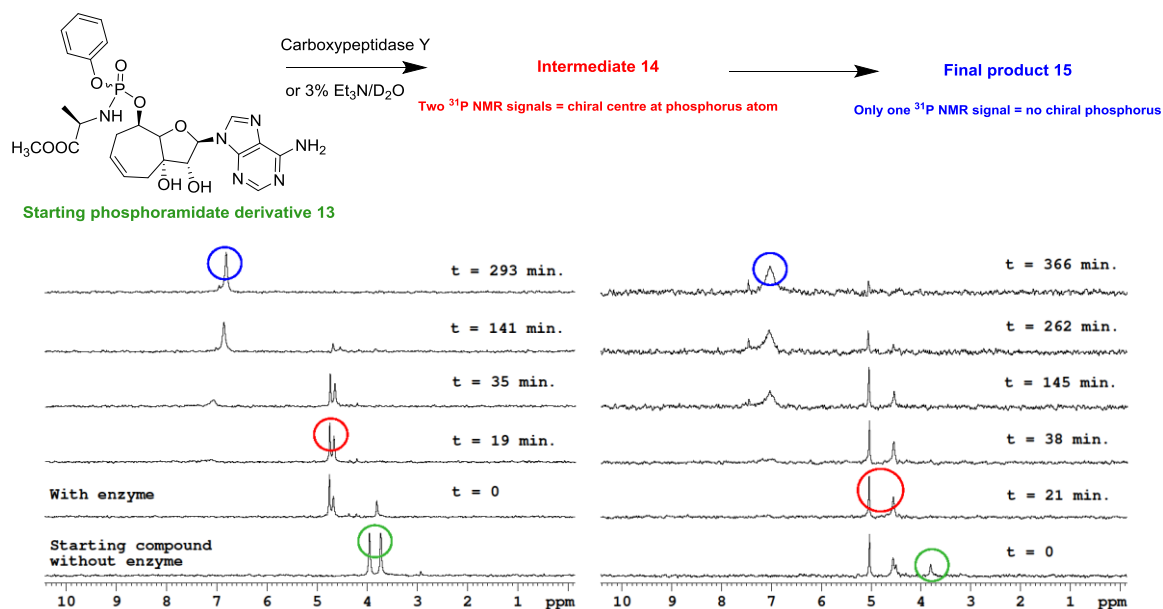


Figure 12. The enzymatic decomposition (left) and chemical hydrolysis (right) of the starting phosphoramidate derivative **13** monitored by ^{31}P NMR spectroscopy.

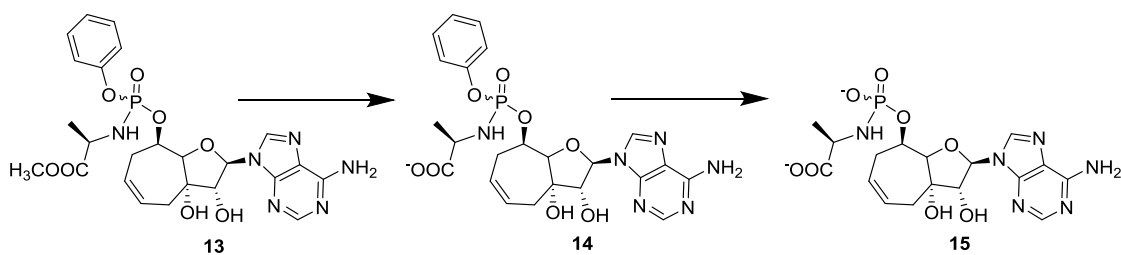


Figure 13. The proposed pathway of the enzymatic decomposition of the studied phosphoramidate prodrug.

3.5 STUDY OF POLYMORPHIC FORMS BY SOLID-STATE NMR SPECTROSCOPY – PAPER VII

The information about the polymorphic structure of pharmaceutically important compounds is crucial for granting licenses obtained from regulatory authorities. The structure of polymorphs is usually studied by diffraction methods, but solid-state NMR spectroscopy in combination with calculations (NMR crystallography) can provide very useful information in the cases, where X-ray data are not available or where they are complicated by a disorder in the molecule. For example, to determine the number of non-equivalent molecules in asymmetric units in crystal, it is sufficient simply to compare the number of observed resonances with the number of non-equivalent carbon atoms of the studied molecule.

In this work, different polymorphic forms of three industrially important compounds (Fig. 14) were prepared, including methacrylamide (**16**), piracetam (**17**) and 2-thiobarbituric acid (**18**). From these polymorphic crystals, NMR spectra in solid state (^{13}C CP-MAS) were recorded. The polymorphic structure differences visible in the NMR spectra of the studied compounds will be shown.

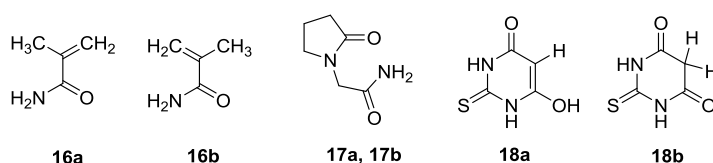


Figure 14. The chemical structure of model molecules: methacrylamide (**16**), piracetam (**17**) and 2-thiobarbituric acid (**18**).

The CP-MAS NMR data confirmed sample purity and the good performance of the technique in polymorphic discrimination. Pure polymorphic crystals of methacrylamide, which had not been published, were prepared. The crystal structure of the desired orthorhombic form **16b** obtained from very slow re-crystallization from warm aqueous methacrylamide solution was confirmed by X-ray analysis done by Ivana Císařová at Charles University in Prague. An interesting **16b**→**16a** transformation in solid state was detected using CP-MAS NMR spectra (Fig. 15). The kinetic data of this process were not obtained, because the rate of this transformation depended on external conditions such as sample spinning.

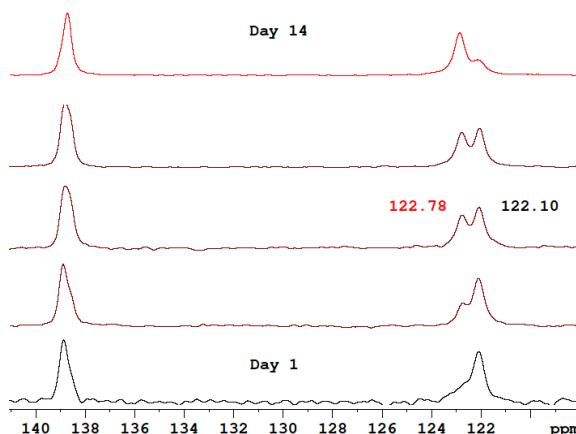


Figure 15. A part of the ^{13}C CP-MAS NMR spectra of methacrylamide polymorphic form **16b** at various times. After several days, the orthorhombic form **16b** (in black) was transformed into the monoclinic form **16a** (in red).

The molecular geometry in both types of piracetam crystals (**17a** and **17b**) is the same, but the crystal packing is different, which induces different shielding as visible in ^{13}C CP-MAS NMR spectra. Two polymorphic forms, II (**18a**) and III (**18b**), of 2-thiobarbituric acid have been prepared by re-crystallization from absolute ethanol and dry acetonitrile, respectively. These two polymorphs contain two different tautomeric forms (**18a**-enol and **18b**-keto) and they are unambiguously distinguishable in ^{13}C CP-NMR spectra (Fig. 16). The sp^2 -hybridized carbon atom C-5 in form **18a** is less shielded (82.75 ppm) than the sp^3 -hybridized carbon C-5 in form **18b** (40.93 ppm). Also other signals are significantly shifted (1.8–4.7 ppm).

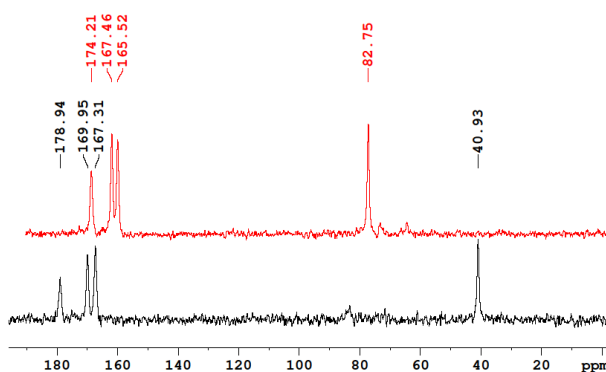


Figure 16. The solid-state ^{13}C NMR spectra of polymorphic crystals of 2-thiobarbituric acid re-crystallized from ethanol (red) as form **18a** and from acetonitrile (black) as form **18b**. The red spectrum is offset by ~ 5 ppm for clarity. Crystalline glycine was used as a standard.

3.6 STABILITY OF 5-AMINOPYRIMIDINES IN DMSO – PAPER VIII

For biological activity investigation, studied compounds are usually dissolved in DMSO and these solutions are very often stored in a freezer for a long time. In our previous work,⁶ studying antioxidative activities in a series of 5-aminopyrimidines prepared by Petr Jansa at the IOCB AS CR (Fig. 17 left), color changes in DMSO solutions were observed after several hours at room temperature (Fig. 17 right) as well as in a freezer.

This chapter will describe the chemical transformation of these compounds in DMSO studied by a series of chemical reactions with alloxan, and by NMR spectroscopy, and the proposed mechanism.

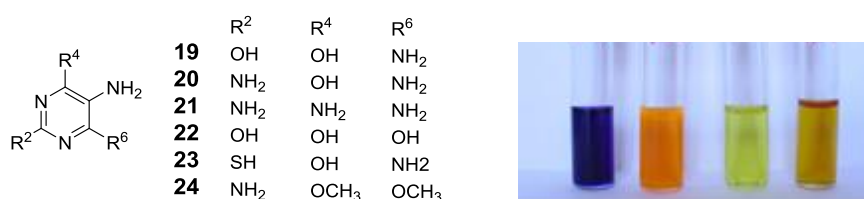


Figure 17. The general formula of studied compounds (left) and the DMSO solutions of compounds **20**, **21**, **19**, **23** several hours after preparation (right). The solutions were colorless immediately after dissolution.

The kinetics of these transformations was monitored by ¹H NMR spectroscopy and by UV/Vis spectrometry. For illustration, the time-response changes in the ¹H NMR spectra of compound **20** are displayed in Fig. 18. The NMR signals of the starting compound (in red; 6.37 and 6.46 ppm) practically disappeared from the reaction mixture by day 7. The signals of the purple intermediate product **20a** (in purple; 8.30, 8.60 and 10.95 ppm) appeared within only one day of incubation. On day 2, the signal of an ammonium cation was detected (in green; 7.09 ppm, *J* = 51 Hz). In several months, it was possible to observe the NMR signals of the final product **20b** (in yellow, 8.9 and 9.0 ppm). The low intensity of these signals was caused by the low solubility of compound **20b** in DMSO (it precipitated from the solution). The absorption spectra confirmed the successive reactions (**20**→**20a**→**20b**), the isosbestic point at 365 nm was found.

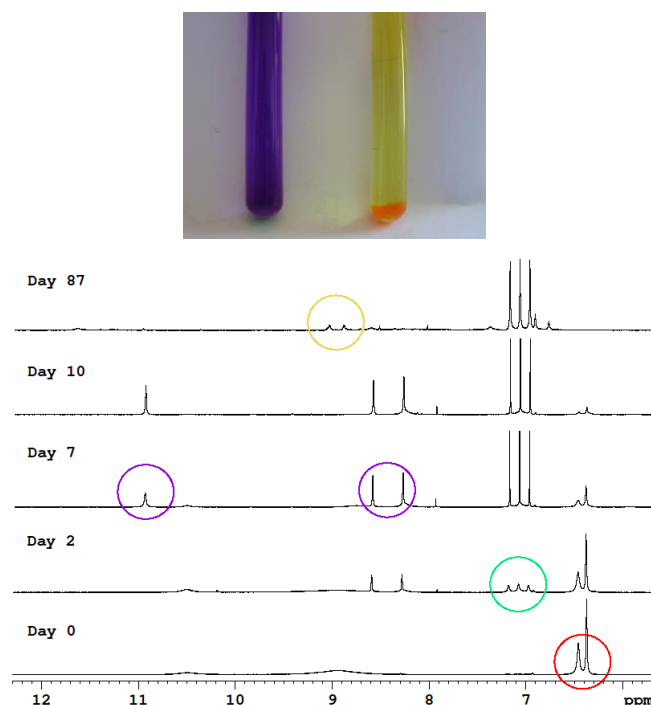


Figure 18. The time evolution of the ¹H NMR spectra of compound **20** in DMSO. The starting compound **20** (in red) reacted in DMSO to generate the intermediate product **20a** (in purple, the purple solution in the NMR tube). Simultaneously, the ammonium cation escaped (in green). Consequently, several months later, compound **20a** was converted into the final product **20b** (in yellow, the yellow solution in the NMR tube).

^1H NMR spectra have provided clear evidence that an ammonium cation is present in the solution after the first reaction ($20 \rightarrow 20\text{a}$) and the following mechanism has been proposed (Fig. 19). The starting compound **20** is oxidized by DMSO to pyrimidine-quinone-imine, while an ammonium cation is released. Subsequently, this unstable intermediate condenses with the 5-amino group of another molecule and purple intermediate **20a** arises. For comparison, 2,6-diamino-4-oxo-pyrimidine (compound **20** without the 5-amino group) was dissolved in DMSO and no changes were observed. Obviously, the 5-amino group is crucial for the oxidation reactions. Several months later, the less soluble final product **20b** was obtained.

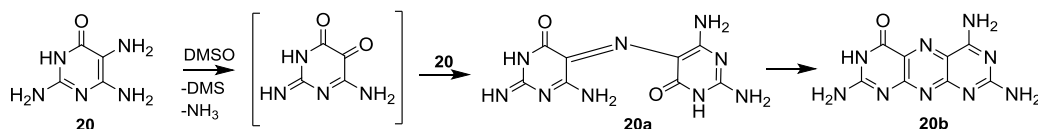


Figure 19. The proposed mechanism of the transformations of compound **20** in DMSO.

A series of chemical reactions was used to confirm the structure of the products (Fig. 20). The “close-forms” **20e** and **21e**, obtained from the reaction with alloxan and the subsequent spontaneous intramolecular condensation, were transformed into **19b** by a reaction with NaNO_2 in HCl. In the same way, the “close-forms” **20b** and **21b**, obtained from DMSO oxidation and subsequent condensation, were also converted into **19b**. The UV/Vis spectra of the final product **19b** obtained in different ways were in agreement with previously published data.²²

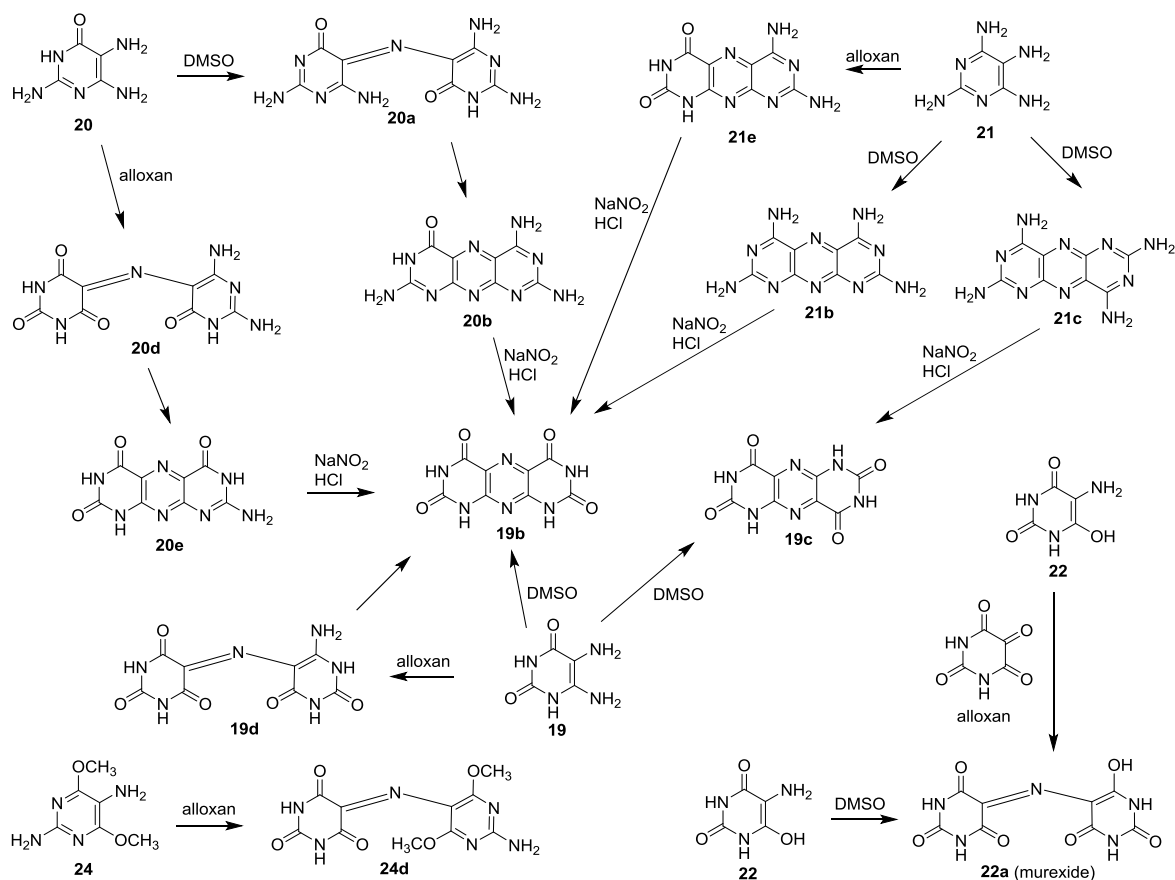


Figure 20. A series of the oxidation-condensation reactions of 5-aminopyrimidines with alloxan and with DMSO.

4 CONCLUSIONS

This work has focused on the structure determination of modified nucleic acid components, mainly (but not only) nucleoside derivatives, which have been prepared by synthetic chemists from the IOCB AS CR, namely the groups of Radim Nencka and Zlatko Janeba, with the aim to find novel potentially biologically active compounds. During my Ph.D. studies, I solved the chemical structure of more than 700 newly prepared compounds by using NMR spectroscopy and, if necessary, complemented with conformational analysis. The correct structure assignment is a crucial step for the study of biological effects and structure-activity relationship.

In this work, two new NMR methods have been developed to help with the structure determination of purine derivatives; quaternary carbon atom NMR signal assignment by heteronuclear (C-H) long-range coupling constants as well as preferred tautomeric forms have been studied in detail. These methods are based on the correlation between measured and DFT-calculated NMR parameters.

Using NMR spectroscopy, physico-chemical properties such as the intramolecular interactions, isotopic exchanges, stability or reactivity of modified nucleosides were studied. The most significant result published in this work is the discovery of 5-nitrosopyrimidine derivatives with strong intramolecular hydrogen bonds. In these compounds, interesting stereochemical behavior was observed. Thanks to unusually strong intramolecular H-bonds, two stable rotamers differing in nitroso group orientation were found and observed as two sets of NMR signals. The rotamer ratio in equilibrium strongly depends on the nature of substituents; the percentage of one rotamer can be tuned in a wide range of values (32–84 %). The influence of *p*-substituents on relative rotamer concentration corresponds to Hammett correlation, where the substituents are aligned according to their electronic properties (donors, acceptors). Furthermore, in some cases, it was possible to separate the rotamers from each other and characterize them as individual chemical species. They exhibited different retention factors in silica-gel chromatography and significantly different NMR spectra (^1H , ^{13}C , ^{15}N) in solution as well as in solid state. Because of their interesting stereochemical behavior, they were compared with well-known atropisomers, which are separable *via* sterically hindered rotation. Our rotamers are stabilized by the strong intramolecular hydrogen bond. The rotational barriers are around 23 kcal/mol, which explains that pure rotamers can be isolated at room temperature.

5 REFERENCES

- (1) De Clercq, E.; Holý, A.; Rosenberg, I.; Sakuma, T.; Balzarini, J.; Maudgal, P. C. *Nature* **1986**, *323*, 464.
- (2) Holý, A. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2567.
- (3) Kidwai, M.; Venkataramanan, R.; Mohan, R.; Sapra, P. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1209.
- (4) Kim, J. N.; Blount, K. F.; Puskarz, I.; Lim, J.; Link, K. H.; Breaker, R. R. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 915.
- (5) Pittillo, R. F.; Ray, B. J. *Appl. Microbiol.* **1969**, *17*, 773.
- (6) Procházková, E.; Jansa, P.; Dračínský, M.; Holý, A.; Mertlíková-Kaiserová, H. *Free Rad. Res.* **2012**, *46*, 61.
- (7) Marquez, V. E.; Siddiqui, M. A.; Ezzitouni, A.; Russ, P.; Wang, J.; Wagner, R. W.; Matteucci, M. D. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3739.
- (8) Marquez, V. E.; Ben-Kasus, T.; Barchi, J. J., Jr.; Green, K. M.; Nicklaus, M. C.; Agbaria, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 543.
- (9) Kuhn, B.; Mohr, P.; Stahl, M. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2601.
- (10) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 737.
- (11) Marek, R.; Sklenář, V. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; Webb, A. G., Ed.; Elsevier Ltd: Oxford UK, 2005; Vol. 54, p 201.
- (12) Dračínský, M.; Pohl, R. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; Webb, A. G., Ed.; Elsevier Ltd: Oxford UK, 2014, p 59.
- (13) Standara, S.; Maliňáková, K.; Marek, R.; Marek, J.; Hocek, M.; Vaara, J.; Straka, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5126.
- (14) Gutowsky, H. S.; Karplus, M.; Grant, D. M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *31*, 1278.
- (15) Karplus, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870.
- (16) Eyring, H. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 107.
- (17) Temple, C. J.; Kussner, C. L.; Montgomery, J. A. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 2210.
- (18) McGuigan, C.; Sutton, P. W.; Cahard, D.; Turner, K.; O'Leary, G.; Wang, Y.; Gumbleton, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *Antivir. Chem. Chemother.* **1998**, *9*, 473.
- (19) Valette, G.; Pompon, A.; Girardet, J. L.; Cappellacci, L.; Franchetti, P.; Grifantini, M.; La Colla, P.; Loi, A. G.; Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1981.
- (20) Winter, H.; Maeda, Y.; Mitsuya, H.; Žemlička, J. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3300.
- (21) McGuigan, C.; Murziani, P.; Slusarczyk, M.; Gonczy, B.; Vande Voorde, J.; Liekens, S.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7247.
- (22) Taylor, E. C.; Loux, H. M.; Falco, E. A.; Hitchings, G. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 2243.

CURRICULUM VITAE

Name: Eliška Procházková
Date and place of birth: July 6, 1987, Prague

Education:

2011– Ph.D. study of Physical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague (Ph.D. thesis: *The Structure and Properties of Modified Nucleic Acid Components* under the supervision of Dr. Martin Dračinský, IOCB AS CR).
2014–2015 Rigorousum Thesis: *Antioxidative Effects of the Analogues of Nucleic Acid Components*.
2009–2011 Master study of Biophysical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague (Diploma thesis: *Antioxidative Effects of the Analogues of Nucleic Acid Components* under the supervision of Dr. Helena Mertlíková-Kaiserová, IOCB AS CR).
2006–2009 Bachelor study of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague (Bachelor thesis: *The Life Cycle and Metabolic Pathways of the Etiological Agent of Malaria and the Design of a Potential Inhibitor of Hypoxanthin-Guanin-Xanthin- Phosphoribosyltransferase* under the supervision of Prof. Antonín Holý, IOCB AS CR).
2002–2006 Masaryk Secondary School of Chemistry, Prague

Employment:

2011– Ph.D. student, IOCB AS CR
2009–2011 Research assistant, IOCB AS CR
2006–2009 Laboratory assistant, IOCB AS CR

Language Skills:

English: FCE exam, 2014

Teaching at Faculty of Science, Charles University in Prague:

2013– Physical Chemistry I, II (Exercises)

Seminars and Courses:

1. Training Course “Advanced NMR Methods” 2013, Bruker, Fällanden, Switzerland
2. Spring School on “Theory of NMR” 2015, Leipzig University, Colditz, Germany

Exhibitions:

- EXPO 2010: Better City, Better Life; Shanghai, China (2010)

- a member of the implementation team; preparation of the documentation for the exposition about antivirals prepared by Prof. Antonín Holý at the IOCB AS CR in Prague.
- 60-year anniversary of the IOCB AS CR (2013)
 - a member of the implementation team, preparation of documentation in collaboration with the Masaryk Institute and Archive of the Academy of Sciences of the Czech Republic
- “Science versus Viruses”: Exposition in the National Technical Museum (2013)
 - a co-author of the exposition

Interviews in Media:

- An interview in the radio Český rozhlas Rádio Česko about malaria and drugs development (“Tým profesora Holého vyvíjí nové léky proti malárii”), 2010
- An interview in the radio Český rozhlas Leonardo about etiological agents causing malaria and their lifecycle (the program Meteor: Parazit, který člověku “pije krev”), 2010
- A profile in the newspaper Hospodářské noviny, the section about universities (“S profesorem Holým pracovala už na střední”), 2014

Popularization activities:

- The Chemistry Fun Fair in Prague (2011)
 - a co-author of the stand called “Magnetarium” about Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy
- The Prague Museum Night in collaboration with the Museum of Police (2012)
 - a co-author of the stand about Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy
- The Prague Museum Night in collaboration with the Museum of Police (2013)
 - the coordinator of this event

Educational activities:

- Excursion at the IOCB AS CR for bachelor students from Karel de Grote - University of Applied Sciences, Department of Industrial Sciences and Technology, Antwerp, Belgium (2011)
- The autumn school for secondary-school teachers, Prague (2012)
 - a presentation entitled “NMR Spectroscopy”

Secondary-school research activities:

- The thesis entitled: “*Measurement of ORP Values and Determination of Active Chlorine Concentration in Swimming-Pool Water*”
 - University of Chemistry and Technology, Prague, under the supervision of Doc. Vladimír Sýkora, 2004–2005.
- The thesis entitled: “*Nucleosides on HPLC Column Supelcosil™ LC-18-S*”
 - IOCB AS CR, under the supervision of Dr. Ivan Votruba, 2005–2006.

SELECTED PAPERS

The list of papers related to my Ph.D. thesis.

- I. Šála, M. – Dejmek, M. – **Procházková, E.** – Hřebabecký, H. – Rybáček, J. – Dračínský, M. – Novák, P. – Rosenbergová, Š. – Fukal, J. – Sychrovský, V. – Rosenberg, I. – Nencka, R.: Synthesis of locked cyclohexene and cyclohexane nucleic acids (LCeNA and LCNA) with modified adenosine units. *Org. Biomol. Chem.* **2015**; 13, 2703–2715.
- II. Hřebabecký, H. – **Procházková, E.** – Šála, M. – Plačková, P. – Tloušťová, E. – Barauskas, O. – Lee, Y.J. – Tian, Y. – Mackman, R. – Nencka, R.: Synthesis of conformationally restricted 6- and 7- membered ring bicycloribonucleosides/tides and their recognition by kinases and polymerases. *Org. Biomol. Chem.* **2015**; submitted.
- III. **Procházková, E.** – Čechová, L. – Jansa, P. – Dračínský, M.: Long-range heteronuclear coupling constants in 2,6-disubstituted purine derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **2012**; 50, 295–298.
- IV. **Procházková, E.** – Šála, M. – Nencka, R. – Dračínský, M.: C⁶-substituted purine derivatives: an experimental and theoretical ¹H, ¹³C and ¹⁵N NMR study. *Magn. Reson. Chem.* **2012**; 50, 181–186.
- V. **Procházková, E.** – Čechová, L. – Janeba, Z. – Dračínský, M.: A switchable intramolecular hydrogen bond in polysubstituted 5-nitrosopyrimidines. *J. Org. Chem.* **2013**; 78, 10121–10133.
- VI. Čechová, L. – **Procházková, E.** – Císařová, I. – Dračínský, M. – Janeba, Z.: Separation of planar rotamers through intramolecular hydrogen bonding in polysubstituted 5-nitrosopyrimidines. *Chem. Commun.* **2014**; 50, 14892–14895.
- VII. Dračínský, M. – **Procházková, E.** – Kessler, J. – Šebestík, J. – Matějka, J. – Bouř, P.: Resolution of organic polymorphic crystals by Raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* **2013**; 117, 7297–7307.
- VIII. **Procházková, E.** – Jansa, P. – Březinová, A. – Čechová, L. – Mertlíková-Kaiserová, H. – Holý, A. – Dračínský, M.: Compound instability in dimethyl sulphoxide, case studies with 5-aminopyrimidines and the implications for compound storage and screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**; 22, 6405–6409.

OTHER PAPERS

1. Mertlíková-Kaiserová, H. – Rumlová, M. – Tloušťová, E. – **Procházková, E.** – Holý, A. – Votruba, I.: Point mutations in human guanylate kinase account for acquired resistance to anticancer nucleotide analogue PMEG. *Biochem. Pharmacol.* **2011**; 82, 131–138.
2. **Procházková, E.** – Jansa, P. – Dračínský, M. – Holý, A. – Mertlíková-Kaiserová, H.: Determination of the antioxidative activity of substituted 5-aminopyrimidines. *Free Rad. Res.* **2012**; 46, 61–67.
3. Jansa, P. – Baszczyński, O. – **Procházková, E.** – Dračínský, M. – Janeba, Z.: Microwave-assisted hydrolysis of phosphonate diesters: an efficient protocol for the preparation of phosphonic acids. *Green Chem.* **2012**; 14, 2282–2288.
4. Dejmek, M. – Šála, M. – Plačková, P. – Hřebabecký, H. – Borreda, L.M. – Neyts, J. – Dračínský, M. – **Procházková, E.** – Jansa, P. – Leyssen, P. – Mertlíková-Kaiserová, H. – Nencka, R.: Synthesis of Novel Purine-Based Coxsackievirus Inhibitors Bearing Polycyclic Substituents at the N-9 Position. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2014**; 347, 1–8.
5. Dejmek, M. – Hřebabecký, H. – Šála, M. – Dračínský, M. – **Procházková, E.** – Leyssen, P. – Neyts, J. – Balzarini, J. – Nencka, R.: From norbornane-based nucleotide analogs locked in South conformation to novel inhibitors of feline herpes virus. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**; 22, 2974–2983.
6. Dejmek, M. – Šála, M. – Hřebabecký, H. – Dračínský, M. – **Procházková, E.** – Chalupská, D. – Klíma, M. – Plačková, P.; Hájek, M. – Andrei, G. – Naesens, L. – Leyssen, P. – Neyts, J. – Balzarini, J. – Bouřa, E. – Nencka, R.: Norbornane-based nucleoside and nucleotide analogues locked in North conformation. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**; 23, 184–191.
7. Mejdrová, I. – Chalupská, D. – Kögler, M. – Šála, M. – Plačková, P. – Baumlová, A. – Hřebabecký, H. – **Procházková, E.** – Dejmek, M. – Guillon, R. – Strunin, D. – Weber, J. – Lee, G. – Birkus, G. – Mertlíková-Kaiserová, H. – Bouřa, E. – Nencka, R.: Highly selective PI4K III β inhibitors and structural insight into their mode of action. *J. Med. Chem.* **2015**; 58, 3767–3793.
8. Šála, M. – Dejmek, M. – **Procházková, E.** – Hřebabecký, H. – Rybáček, J. – Dračínský, M. – Novák, P. – Rosenbergová, Š. – Rosenberg, I. – Nencka, R.: A new analogue of locked cyclohexane nucleic acids. *Synthesis* **2015**; DOI: 10.1055/s-0034-1380744.