

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra organické chemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Organic Chemistry**

Doktorský studijní program: Organická chemie
Ph.D. study program: Organic Chemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Vývoj nových glykosylačních metod pro syntézu nukleosidů
Development of new glycosylation methods for the synthesis of nucleosides

A. Michael Downey

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

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.09.2017

Podpis

Abstract

As they make up DNA and RNA, nucleosides are considered the key to life. Synthetic nucleosides also constitute many drugs that treat viral infections and cancer. As a result, more efficient methods to access these crucial molecules would have implications that extend beyond a synthetic chemist's benchtop and into medicinal chemistry and medical research. One of the most challenging steps in the synthesis of nucleosides is the glycosylation step between the acceptor heterocycle (nucleobase) and the saccharide-based donor. Often to obtain satisfactory yield of this step with good regio- and stereochemical control the extensive use of protecting groups must be employed to squelch reactivity at unwanted reactive groups. Consequently, this process of protection–glycosylation–deprotection is laborious, inefficient, and often requires the use of toxic reagents. It would be, therefore, highly welcomed if new methodology to effect this glycosylation step was designed that reduces or removes the need to use protecting groups, but would still provide nucleosides in good yield, regio- and stereoselectively. Herein, this thesis presents my efforts into achieving this end. By employing modified Mitsunobu conditions, I determined that it is possible to directly glycosylate a nucleobase with D-ribose to afford stereoselectively β -ribopyranosyl nucleosides in the complete absence of protecting groups. By then employing a 5-*O*-monoprotected ribosyl unit, I could use a two-step one-pot process to provide the more medicinally and physiologically relevant β -ribofuranosyl nucleosides, but with some shortcomings to be discussed. In our second study, I improved the reaction conditions and elucidated a plausible mechanism that proceeds through an *in situ*-formed α -1,2-anhydrosugar (termed “anhydrose”) that is then opened nucleophilically by the nucleobase stereoselectively at gram scale. This key anhydrose intermediate is stable indefinitely *in situ* and can be formed using other C5-modified ribosyl monomers as well. It can also be opened by other non-nucleobase-based substrates still perfectly stereoselectively for the β -anomer. We demonstrate that this anhydrose is a powerful electrophilic intermediate that can glycosylate a wide range of nucleobases and other nucleophiles to provide a host of β -ribosyl glycosides. This research provides the foundation for a new stereoselective reaction for medicinal chemists to add to their toolbox of reactions to aid in the design of novel drugs and therapeutics.

Abstrakt

Nukleosidy jsou jako stěžejní složka DNA a RNA považovány za základ života. Na bázi nukleosidů je také založeno množství protinádorových a protivirových léčiv. Efektivnější metody pro získání těchto důležitých molekul by proto měly dopady, které přesahují rámec práce syntetického chemika a zasahují až do medicínální chemie a lékařského výzkumu. Jedním z nejnáročnějších kroků syntézy nukleosidů je glykosylační krok mezi heterocyklickým akceptorem (nukleobáze) a donorem na bázi sacharidu. Pro zabránění nežádoucích reakcí dalších reaktivních skupin a získání uspokojivých výtěžků s dobrými regio- a stereochemickými vlastnostmi je často nutné použít chránicí skupiny. Tento proces protekce–glykosylace–deprotektce je pracný, neefektivní a často vyžaduje použití toxických činidel. Nová metoda, která by snižovala nebo odstraňovala potřebu použití protektivních skupin při glykosylaci, a přesto regio- a stereoselektivně poskytovala dostatečný výtěžek nukleosidů, by proto byla nanejvýš vítána. Tato disertační práce představuje moji snahu dosáhnout tohoto cíle. Bylo zjištěno, že za použití modifikovaných podmínek Mitsunobuovy reakce je možné bez potřeby chránění ostatních skupin přímo a stereoselektivně glykosylovat nukleobázi D-ribosou za vzniku β -ribopyranosyl nukleosidů. Použití 5-*O*-monochráněné ribosylové jednotky bylo možné postupovat tzv. „dvoustupňovém, one-pot“ procesem, který poskytoval medicínsky a fyziologicky relevantní ribofuranosyl nukleosidy. Tento proces má však určité nedostatky, které budou dále diskutovány. V naší druhé studii jsem optimalizoval reakční podmínky a objasnil pravděpodobný mechanismus reakce. Ten probíhá přes *in situ* připravený α -1,2-anhydrocukr (tzv. anhydrosa), který se nukleofilním působením nukleobáze stereoselektivně. Reakci je možné provést rovněž v gramových navážkách s velmi dobrým výtěžkem. Tento klíčový intermediát v podobě anhydrosy je stabilní *in situ* a může být vytvořen i za použití dalších C5-modifikovaných sacharidových jednotek. Při zachování stereoselektivity reakce pro β -anomer mohou otevření cyklického intermediátu zajišťovat i další substráty, které nejsou založeny na nukleobázích. Zde demonstrujeme, že tato anhydrosa je silný elektrofilní intermediát, schopný glykosylovat širokou škálu nukleobází a dalších nukleofilů za zisku řady β -ribosyl glykosidů. Tento výzkum poskytuje základ pro novou stereoselektivní reakci, kterou mohou medicínální chemici využít při návrhu nových léků a terapeutik

List of Abbreviations

Ac	acetyl acetyl
ADDP	1,1'-(azodicarbonyl)dipiperdine 1,1'-azodikarbonyl dipiperdin
Bn	benzyl benzyl
Bz	benzoyl benzoyl
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DEAD	diethyl azodicarboxylate diethylazodikarboxylát
DIAD	diisopropyl azodicarboxylate diisopropylazodikarboxylát
DMF	dimethylformamide dimethylformamid
DMT	4,4'-dimethoxytrityl 4,4'-dimethoxytrityl
DNA	deoxyribonucleic acid/ deoxyribonukleová kyselina
ekv.	ekvivalenty
equiv.	equivalents
IOCB	Institute of Organic Chemistry and Biochemistry
lab.t.	laboratorní teplota
MeCN	acetonitrile acetonitril
MMTr	4-methoxytrityl 4-methoxytrityl
NMR	nuclear magnetic resonance

	nukleární magnetická rezonance
r.t.	room temperature
RNA	ribonucleic acid ribonukleová kyselina
ROESY	rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy
TBAF	tetrabutylammonium fluoride tetrabutylamoniumfluorid
TFA	trifluoroacetic acid trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran tetrahydrofuran
TMSOTf	trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate trimethylsilyltrifluormethansulfonat
Tr	trityl (triphenylmethyl) trityl (trifenylmethyl)
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie
WHO	World Health Organization

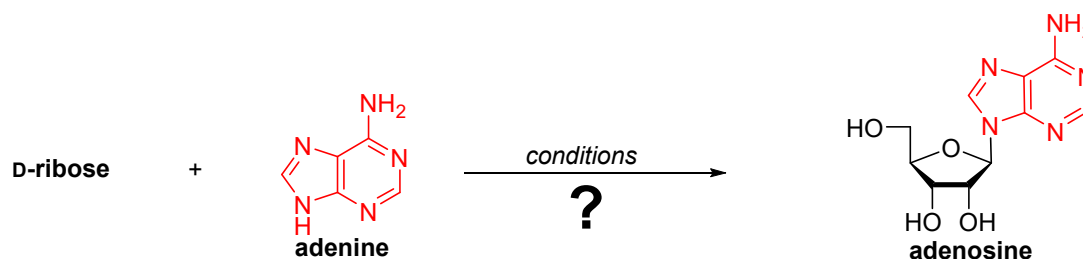
Table of Contents

Abstract	3
Abstrakt	4
List of Abbreviations.....	5
Table of Contents.....	7
1. Introduction	9
2. Specific aims of the thesis	11
3. Results and discussion.....	12
3.1 Development of a method for protecting group-free synthesis of nucleosides.....	12
3.1.1 Synthesis of β -ribopyranosyl nucleosides	13
3.1.2 Synthesis of biologically relevant β -ribofuranosyl nucleosides	14
3.1.2.1 Synthesis of β -ribofuranosyl nucleosides in a two-step one-pot process	15
3.1.3 Shortcomings	16
3.2 Mechanistic investigation.....	17
3.3 Development of an improved protocol	18
3.3.1 Synthesis and isolation of 5-O-monoprotected nucleosides	18
3.3.2 Synthesis of the free nucleoside in one-pot.	19
3.3.5 Synthesis of medicinally- or biologically-relevant nucleosides.	21
3.3.6 Synthesis of non-nucleoside ribofuranosyl glycosides.....	22
4. Conclusions.....	24
1. Úvod	26
2. Cíle práce	28
3. Výsledky a diskuse.....	28
3.1 Vývoj metody syntézy nukleosidů bez chránicích skupin.....	28

3.1.1 Syntéza β -ribopyranosylových nukleosidů	30
3.1.2 Syntéza biologicky relevantních β -ribofuranosyl nukleosidů	31
3.1.2.1 Syntéza β -furanosylových nukleosidů ve dvoustupňovém „one-pot“ procesu	31
3.1.3 Nedostatky	32
3.2 Mechanistická studie.....	33
3.3 Vypracování vylepšeného protokolu	34
3.3.1 Syntéza a izolace 5-O-mono-chráněných nukleosidů	34
3.3.2 „One-pot“ syntéza odchráněných nukleosidů.....	35
3.3.5 Syntéza medicínálně či biologicky relevantních nukleosidů.....	37
3.3.6 Syntéza nenukleosidových ribofuranosyl glykosidů.....	38
4. Shrnutí	40
9. Selected publications.....	41
10. Conference Contributions	42
11. Curriculum vitae.....	43
12. References.....	44

1. Introduction

Nucleosides are crucial to life as they constitute the fundamental components of deoxyribonucleic acids (DNA) and ribonucleic acids (RNA) in nature. Synthetic nucleosides (those not found in nature) are also extremely valuable as they are a component of many medicines, especially anticancer and antiviral agents.¹⁻³ It would be of tremendous value to medical community if the saccharide component and the nucleobase component could be coupled directly, potentially dramatically expediting access to the precious compounds (conceptually shown in Scheme 1.1).

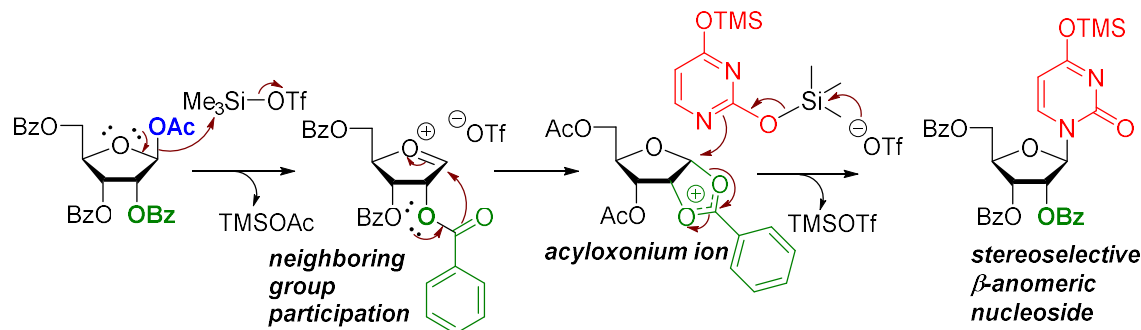


Scheme 1.1: Streamlining the approach to nucleosides by considering a direct coupling of a saccharide to a nucleobase.

Glycosylation is one of the most important chemical transformation known in nature as it is thought to be the most prevalent post-translational modification process.⁴ Glycosylation is a coupling reaction that ligates the anomeric centre (C1-OH) of a carbohydrate, called the donor, to a second molecule, called the acceptor to afford a glycoside (the product). In the chemical synthesis of glycosides the donor molecule is electrophilic. This means that typically the other potentially nucleophilic hydroxyl groups on the saccharide must be protected to prevent the donor from reacting with itself. The acceptor molecule serves as the nucleophile and very often the other reactive groups on the molecule must be blocked to prevent glycosylation at unwanted molecular sites. This results in what is very often a laborious, multistep process that can require the employment of toxic reagents and organic solvents.⁵⁻⁸

The most widely utilized chemical glycosylation strategy for the synthesis of ribosyl-based nucleosides, is the Vorbrüggen variation⁹⁻¹⁰ of the Hilbert–Johnson reaction.¹⁰⁻¹¹ The reaction is Lewis acid-promoted (typically trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf) or SnCl₄) and is highly robust as it works for a host of pyrimidines and purine nucleobases. The stereoselectivity of the reaction can be explained by the phenomenon of neighboring group participation (or anchimeric assistance) by the C2-OH acyl group. Described in Scheme 1.2 is the proposed mechanism using TMSOTf as the Lewis acid catalyst as it considered to be

milder, easier to handle, and has better regiochemical control than its most common counterpart, SnCl_4 .¹²⁻¹⁴



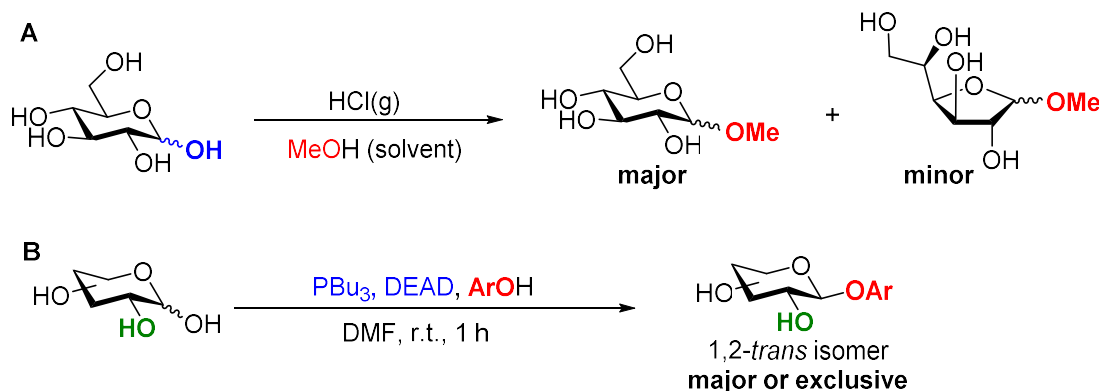
Scheme 1.2: The most commonly employed method for the synthesis of nucleosides—the Vorbrüggen reaction.

The very obvious drawback of this procedure is the extensive employment of protecting groups. As a result, it is very clear that a more streamlined approach to effect glycosylation to produce glycosides (specifically nucleosides herein) is a highly attractive area of research for synthetic chemists as these methods could find utility in applications that extend well beyond a chemical laboratory, including medicine.

Very interestingly, classical totally synthetic protecting group-free strategies date back to well over 100 years with the discovery of the Fischer glycosylation.¹⁵⁻¹⁶ In Fischer's seminal work methanol was glycosylated by D-glucose in the presence of HCl to provide the methyl glycoside. The reaction does proceed chemoselectively at the anomeric position, but suffers generally from a complete lack of regio- or stereochemical control (Scheme 1.3A).

The Mitsunobu reaction is one the key reactions used widely in organic synthesis developed within the last 50 years.¹⁷ It has such high utility in organic synthesis that it or partial variants of the procedure are now being employed in glycosylation reactions of unprotected and unactivated saccharides. One of the most attractive features of this procedure is its ability to operate in a non-pH dependent manner and the reagents are generally considered to have low toxicity. The first example utilizing the Mitsunobu reaction for glycosylation using free saccharide donors was first described in 1979 to synthesize aryl glycosides.¹⁸⁻¹⁹ In this seminal work a small series of both pentoses and hexoses were used as donors to furnish phenolic glycosides in moderate to good yield with the 1,2-*trans* diastereomer presenting in large excess or exclusively (Scheme 1.3B). Although the paper did not provide any concrete mechanistic

insight, the author did shrewdly suggest that perhaps there was a directing effect or neighboring group participation from the C2 hydroxyl group which could account for the stereochemistry.



Scheme 1.3: Known protecting group-free syntheses of glycosides. A) Fischer glycosylation, B) Mitsunobu reaction to access aryl glycosides.

We published a review on other known protecting group-free glycosylation strategies in 2017 in the *Beilstein Journal of Organic Chemistry*.²⁰

2. Specific aims of the thesis

- 1) To develop and optimize the conditions for and to synthesize nucleosides under totally protecting group-free conditions.
- 2) To devise conditions to obtain the biologically relevant furanosyl regioisomer.
- 3) To elucidate a plausible reaction mechanism by either observing key intermediates *in situ* via NMR techniques or by direct isolation of the intermediates.
- 4) To expand of substrate scope to include more-difficult-to-access nucleobase acceptors and non-nucleobase aglycones.
- 5) To demonstrate the amenability of the method to synthesize medically relevant compounds and potential building blocks for solid phase oligonucleotide chemistry.

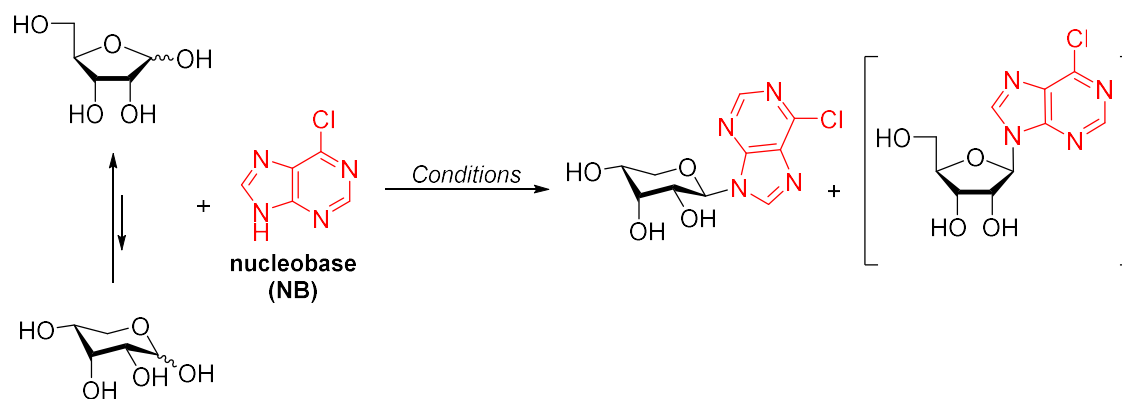
3. Results and discussion

3.1 Development of a method for protecting group-free synthesis of nucleosides

The primary goal of this work was to design a completely protecting group-free method for the synthesis of nucleosides by glycosylating nucleobases with totally unprotected and unactivated D-ribose. My initial inspiration to reach this end came from the seminal work G. Gryniewicz in his 1979 publication in the *Polish Journal of Chemistry*.¹⁸

I envisioned that perhaps these conditions could be amenable to the synthesis of nucleosides if a nucleobase was substituted for the phenolic alcohol. Furthermore, there is precedence for the synthesis of acyclic nucleosides using the Mitsunobu reaction, however, this has only been described when there is but one free hydroxyl group.²¹⁻²² For the optimization study, I used 6-chloropurine, a soluble, but still reasonably inexpensive, alternative and is still a very common precursor in nucleoside synthesis. I supposed that the five most important variables to consider in the optimization of the glycosylation would be the appropriate selection of a base to deprotonate the nucleobase acceptor, the phosphine, the electron acceptor, the solvent, and whether any glycosylation promotor would be useful. The optimization data are shown in Table 3.1. Throughout the optimization study, I was encouraged that the α -anomer was never detected by ¹H NMR analysis of the crude reaction mixture. The conditions were also optimized at a semipreparative (1 mmol) scale.

Table 3.1: Optimization study for the formation of nucleosides with a total lack of protecting groups.



Entry	Base	Conditions	Isolated yield
-------	------	------------	----------------

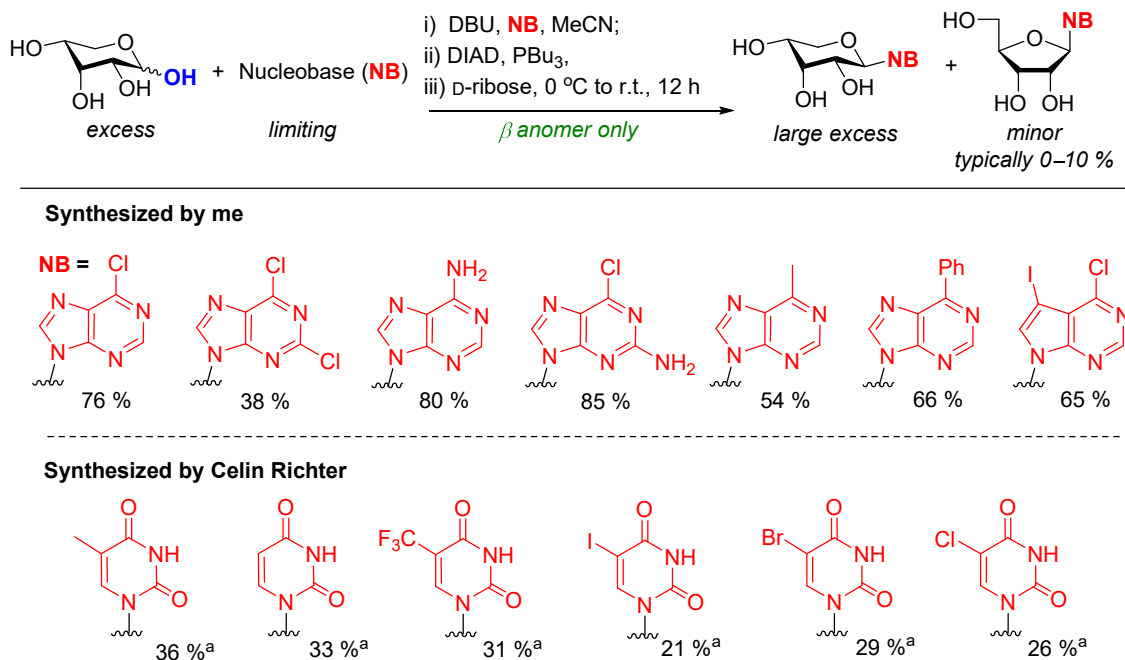
1	none	NB (1.5 equiv.), D-ribose (1.0 equiv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1.5 equiv.), DEAD (1.5 equiv.), DMF, 1 h, r.t.	22 % ^a
2	NaH	NB (1.0 equiv.), D-ribose (1.0 equiv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1.05 equiv.), CCl ₄ (10.0 equiv.), THF, 1 h, r.t.	24 % ^a
3	none	NB (1.0 equiv.), D-ribose (1.0 equiv.), PPh ₃ , (1.6 equiv.) CBr ₄ (2 equiv.), ribose (1.5 equiv.), DMF, 1 h, r.t.	27 % ^a
4	NaH	NB (1.0 equiv.), D-ribose (1.5 equiv.), PPh ₃ , (0.1 equiv.) CBr ₄ (0.1 equiv.), DMF, 1 h, r.t.	No reaction
5	NaH	NB (1.0 equiv.), D-ribose (1.0 equiv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1.2 equiv.), CCl ₄ (2 equiv.), DMF, 12 h, r.t.	26 % ^a
6	CsCO ₃	NB (1.0 equiv.), D-ribose (1.0 equiv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1.2 equiv.), CCl ₄ (2 equiv.), DMF, 12 h, r.t.	trace
7	NaH	NB (1.0 equiv.), D-ribose (1.0 equiv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1.2 equiv.), DIAD (2 equiv.), DMF, 12 h, r.t.	12
8	NaH	NB (1.0 equiv.), D-ribose (1.0 equiv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1.2 equiv.), CCl ₄ (2 equiv.), MeCN, 12 h, r.t.	33
9	NaH	NB (1.0 equiv.), D-ribose (1.0 equiv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1.2 equiv.), CCl ₄ (2 equiv.), MeCN, AgCO ₃ (1 equiv.), 12 h, r.t.	23 % ^b
10	NaH	NB (1.0 equiv.), D-ribose (2 equiv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1.2 equiv.), ADDP (2 equiv.), MeCN, 12 h, 0 °C to r.t.	trace
11	DBU	NB (1.0 equiv.), D-ribose (2 equiv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (2 equiv.), DIAD (2.1 equiv.), MeCN, 12 h, 0 °C to r.t.	52 % ^c (76 %) ^d
12	DBU	NB (1.0 equiv.), D-ribose (2 equiv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (3 equiv.), DIAD (3.1 equiv.), ribose (2 equiv.), MeCN, 12 h, 0 °C to r.t.	29 % ^a

(a) Product contaminated with phosphine oxide. (b) Furanoside was also isolated in 12%. (c) Furanoside was also isolated in 3%. (d) Yield after triturating crude reaction through Et₂O–pet. ether prior to purification.

3.1.1 Synthesis of β-ribopyranosyl nucleosides

With the conditions optimized, I was primed to examine whether these conditions could provide a series of nucleosides containing heterocycles with common synthetic precursor functional groups, alkyl or aromatic substituents, and natural occurring nucleobases at a 1 mmol scale. I must acknowledge the collaboration with C. Richter from the Mahrwald group

(Humbolt University in Berlin) for his contributions to this series. He synthesized all of the pyrimidinyl nucleosides. We synthesized a total of 13 nucleosides at this semi-preparative scale. In all cases solely the β -anomer was observed as determined by ^1H NMR analysis of the crude reaction mixture and as a general trend the reactivity of the purines was greater than that of the pyrimidines. Also, the thermodynamic pyranoside regioisomer presented in very large excess over the furanoside as we expected (Scheme 3.1).



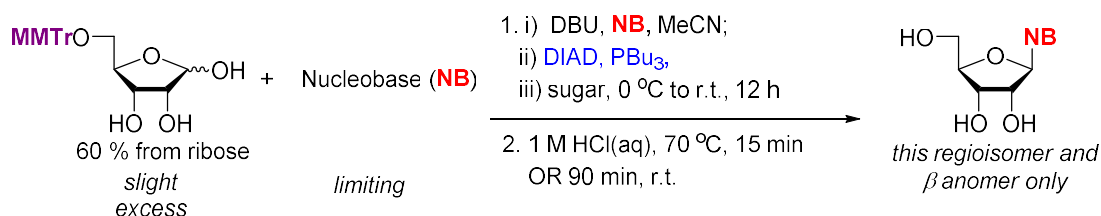
Scheme 3.1: Direct synthesis of pyranosyl nucleosides from unactivated and unprotected ribose using optimized Mitsunobu conditions. ^aAs determined by ^1H NMR. The products were inseparable from the furanoside using silica gel chromatography.

3.1.2 Synthesis of biologically relevant β -ribofuranosyl nucleosides

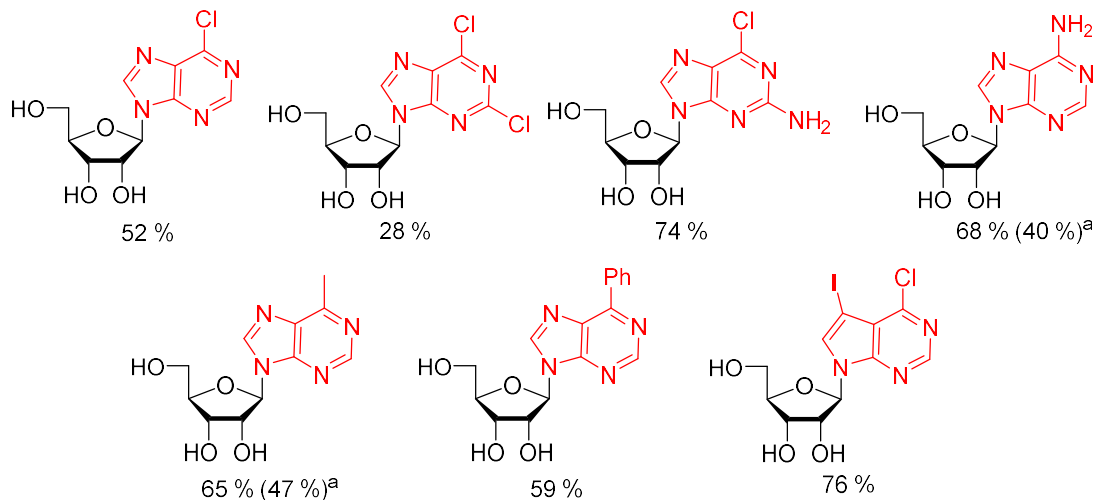
Armed with suitable stereoselective glycosylation conditions, I next strived for the best method to synthesize β -ribofuranosyl nucleosides as these are almost exclusively the biologically relevant regioisomer. Therefore, this methodology would be most likely to have the biggest impact outside of a synthetic laboratory. I postulated that the easiest way to provide the furanosyl product would be to first select a suitable protecting group that is bulky enough to react exclusively or with very great preference for primary alcohols and could be cleaved *in situ* simply using mineral acid. Thus, I selected the 4-methoxytrityl (MMTr) group for the next study.

3.1.2.1 Synthesis of β -ribofuranosyl nucleosides in a two-step one-pot process

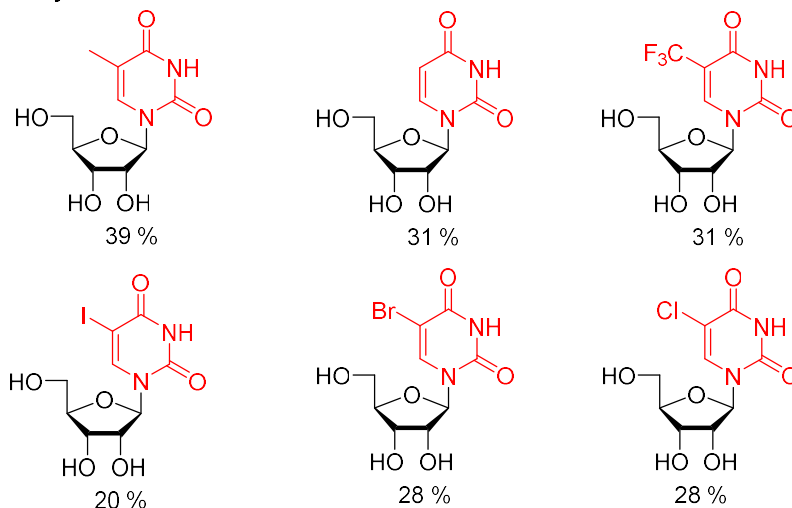
With the appropriate conditions in hand, I, with the collaborative effort of C. Richter, pursued the glycosylation of the same series of nucleobases as in the pyranoside series in a one-pot process using 1 M HCl(aq) to cleave the MMTr group *in situ*. Once again, the general trend of the purines being more reactive than the pyrimidines held true, and fortuitously, the same series was accessible with little to no complications. In most instances the yields were comparable to those of the pyranoside series, indicating once again, that the MMTr cleavage proceeded quantitatively without compromising the anomeric position at all (Scheme 3.2). Even more encouraging was that 6 of the 13 nucleosides we synthesized were provided in higher yield than ever described previously.



Synthesized by me



Synthesized by Celin Richter



Scheme 3.2: The two-step, one-pot synthesis of nucleosides in the first study. ^aYield in parentheses is after crystallization from MeOH due to trace impurities after chromatographic purification.

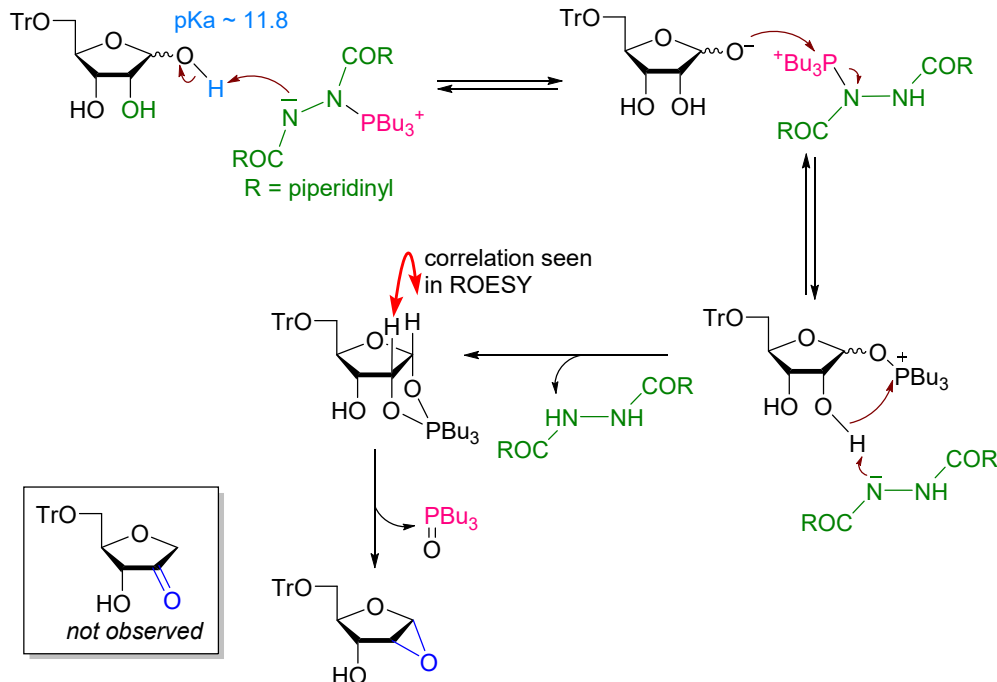
3.1.3 Shortcomings

Despite the operationally simple and conceptually novel nature of this first study, some shortcomings and blockades were encountered. They included the fact that cytosine, guanine,

and 5-fluorouracil, an anticancer drug so important it is on the World Health Organization (WHO)'s List of Essential Medicines, were also not compatible. I was also surprised to find out that 7-deazapurine moieties that are unsubstituted at position 7 were also none viable. Moreover, I was unable to find other nucleophiles that were compatible with the conditions, such as azide, cyano, thiolate, or fluoride. This necessitated improved conditions and a mechanistic study. We published this study in *Organic Letters* in 2015.²³

3.2 Mechanistic investigation

The obvious first step in the mechanistic study was to first confirm that all of the reagents were required for the reaction to take place, hence, indicating that the reaction proceeds through a Mitsunobu-like mechanism. I confirmed this. Then, in collaboration with Dr. R. Pohl (IOCB), we carried out an NMR study to determine the mechanism by which the reaction proceeds (Scheme 3.3). We showed that a 1,2 anhydro sugar is formed (termed anhydrose) via a *cis*-1,3-dioxaphospholane intermediate. In collaboration with Prof. J. Roithová a computational study at the DFT level of B3LYP-D3/6-311+G** was enacted that predicted the formation of the anhydrose via collapse of the *cis*-1,3-dioxaphospholane.



Scheme 3.3: Plausible reaction mechanism for the formation of the anhydrose.

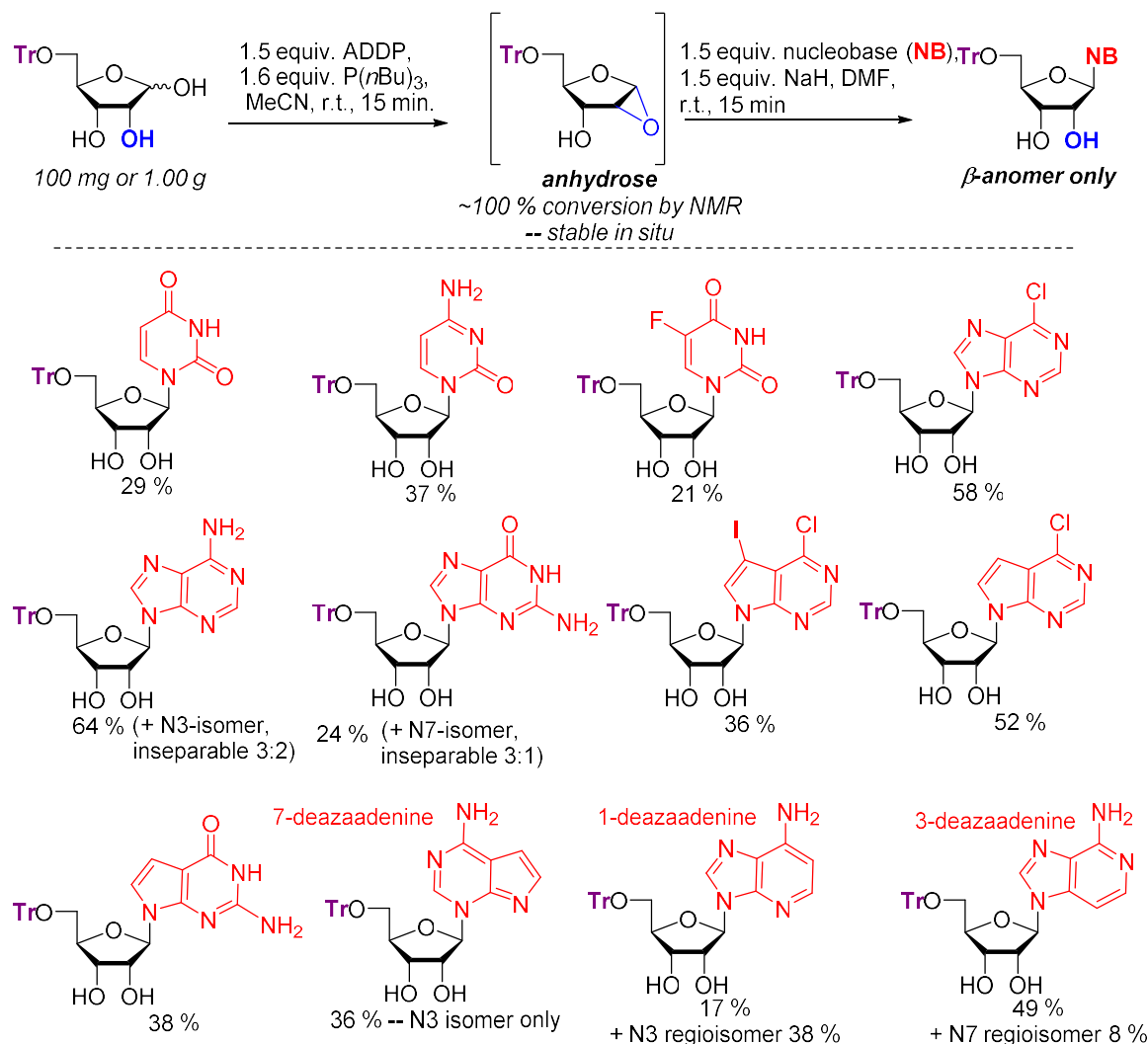
3.3 Development of an improved protocol

3.3.1 Synthesis and isolation of 5'-O-monoprotected nucleosides

Armed with a mechanism and the improved conditions I sought to expand the substrate scope to include all of nucleosides that were not available in the first study on both a semi-preparative (0.25 mmol) and preparative scale (2.5 mmol). The new conditions dictated that the anhydrose be formed first *in situ* using this time 1,1'-azodicarbonyl dipiperidine (ADDP) as the electron acceptor, then the nucleophile (nucleobase) be added after the formation was complete. One very convenient aspect of using ADDP in the Mitsunobu reaction is that ADDP is an orange solid with high solubility in MeCN and the reduced hydrazine is a white solid with low solubility so it can be easily determined when the Mitsunobu reaction-dictated conversion to the epoxide was complete.

With the epoxide forming in a separate flask, I would deprotonate the nucleobase and then add it to the epoxide to perform the glycosylation after the epoxide was formed. Despite the high boiling nature of DMF, I still determined that this solvent was best due to its increased solubilizing capacity of many of the nucleobases. I also discovered that NaH was the optimal base for deprotonation because in many cases the deprotected nucleoside was so polar separation of the desired product from DBU proved to be extremely difficult or impossible using either reverse phase or normal phase chromatography. I also wanted to demonstrate the possibility of being able to isolate both the monoprotected and deprotected nucleoside on a preparative scale (Scheme 3.4, yields shown only at 2.5 mmol scale). With the improved conditions and order of addition of the reagents in hand, I synthesized a series of nucleosides to address the shortcomings of the previous study. As in my first study, the reaction was perfectly stereoselective for the β -anomer as determined by ^1H NMR of the crude reaction mixture. Furthermore, in each case, the pyrimidines proved less reactive than the purines, consistent with the first study.

Despite the perfect stereoselectivity of the reaction, some of the nucleobases were not perfectly regioselective for the N^9 regioisomer. As shown in Scheme 3.4, these nucleobases were adenine, guanine, 7-deazaadenine, 3-deazaadenine, and 1-deazaadenine. In each case a separable or inseparable mixture of two regioisomers presented. Armed with the knowledge that the nucleosides can be isolated in 5'-O-monoprotected form, I endeavoured to find general conditions to allow for *in situ* deprotection that would not compromise the anomeric position to any extent.

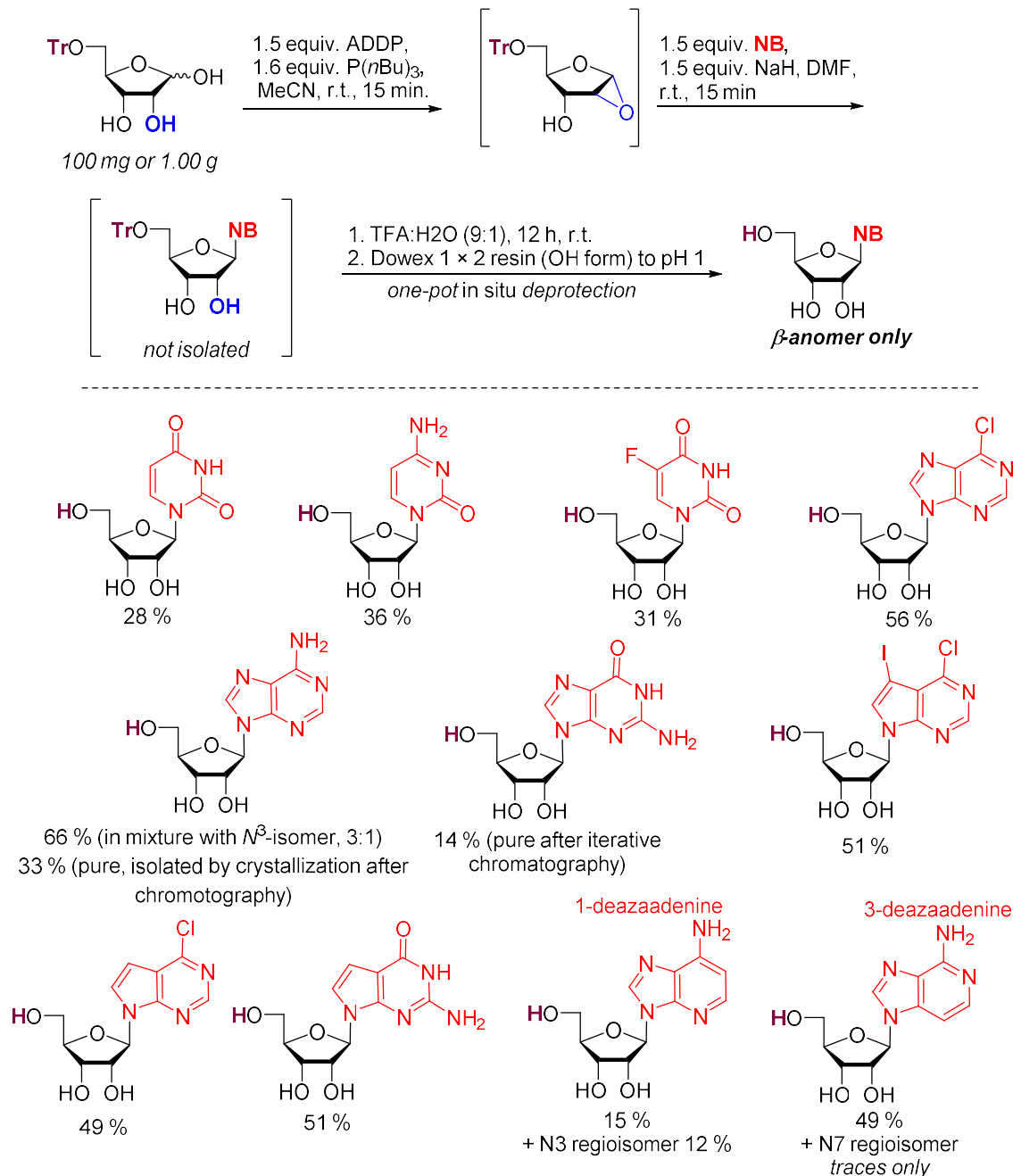


Scheme 3.4: Synthesis of ribofuranosides using a monoprotected ribosyl donor via an anhydrose intermediate.

3.3.2 Synthesis of the free nucleoside in one-pot.

Analogous to our initial work, I wanted to prove that the deprotection step could be carried out in a two-step, one pot process. Initially, I tried the duplicate conditions from our first investigation (1 M HCl(aq), pH ~1) at both room temperature or at 50 °C. Although these conditions proved to be compatible and no degradation of the anomeric centre was observed with many of the substrates, the 7-deaza-7-unsubstituted purines did show some destruction. As a result, I substituted the acid for 90 % trifluoroacetic acid (TFA) in water which solved this issue. I do note an increased length of time (12 h) at room temperature was required for

detritylation. In order to avoid any problems of contamination of the products by trifluoroacetate salts and to avoid cleavage of the nucleobase during work-up, I increased the pH of the reaction mixture using Dowex 1 × 2 resin in the ⁻OH form (to pH ~1). The reaction mixture could then be concentrated *in vacuo* under normal conditions (Scheme 3.5).

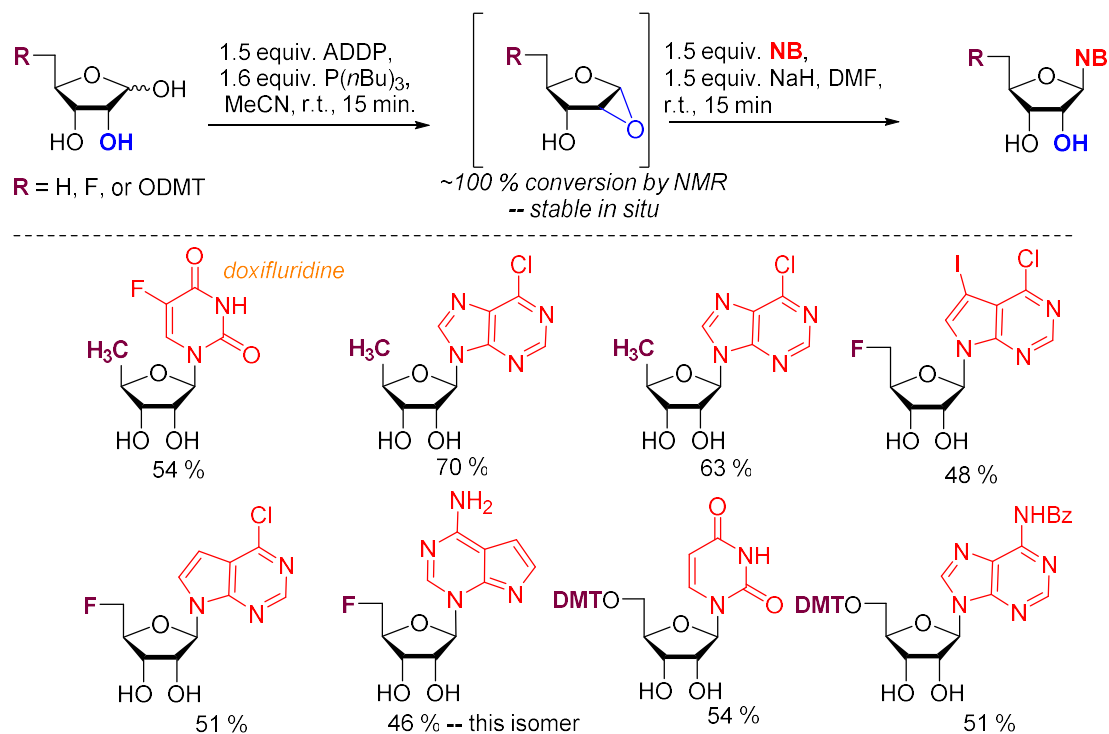


Scheme 3.5: The conditions and scope for the two-step one-pot synthesis of fully deprotected nucleosides at a preparative scale.

Fortuitously, the yield of the desired nucleosides did not dramatically decrease between the one-step and the two-step procedure with the one inexplicable example of 5-fluorouridine, suggesting that the deprotection step took place quantitatively without any destruction at the anomeric position. What was very interesting was the regioisomeric nucleosides did tend to destruct. In fact, in the case of 7-deazaadenine none of the free nucleoside was observed at all (not shown). This suggests that these undesired kinetic products are definitely less stable than the desired thermodynamic N^9 product.

3.3.5 Synthesis of medicinally- or biologically-relevant nucleosides.

To further demonstrate the utility of this methodology, I endeavored to expand the methodology to include medicinally- and biologically-relevant nucleosides. I also sought to demonstrate that this methodology could be amenable to the synthesis of building blocks for automated solid-phase phosphoramidite synthesis. Three obvious sugars to carry out this study were 5-deoxy-D-ribose, 5-deoxy-5-fluoro-D-ribose, 5-*O*-dimethoxytrityl(DMT)-D-ribose. The reasons being because the antitumor prodrug doxifluridine²⁴ and organic fluoride precursor 5'-deoxy-5'-fluoroadenosine²⁵ bear these sugar scaffolds. It is important to note that 5'-*O*-tritylated ribonucleosides in general are also useful intermediates in the synthesis of phosphoramidites for automated synthesis of oligonucleotides on solid support.²⁶ I synthesized a small series of nucleosides bearing these modifications at the C5 position using the same conditions as in the 5-*O*-tritylribose series. Once again 7-deazaadenine was glycosylated exclusively at position N^3 . Interestingly, and positively, when using N^6 -benzoyl adenine as the acceptor the reaction is perfectly regioselective for the desired N^9 position as showcased by the synthesis of the 5-*O*-DMTribosyl nucleoside bearing this group (Scheme 3.6).



Scheme 3.6: Important nucleosides bearing C5-modified ribosyl scaffolding.

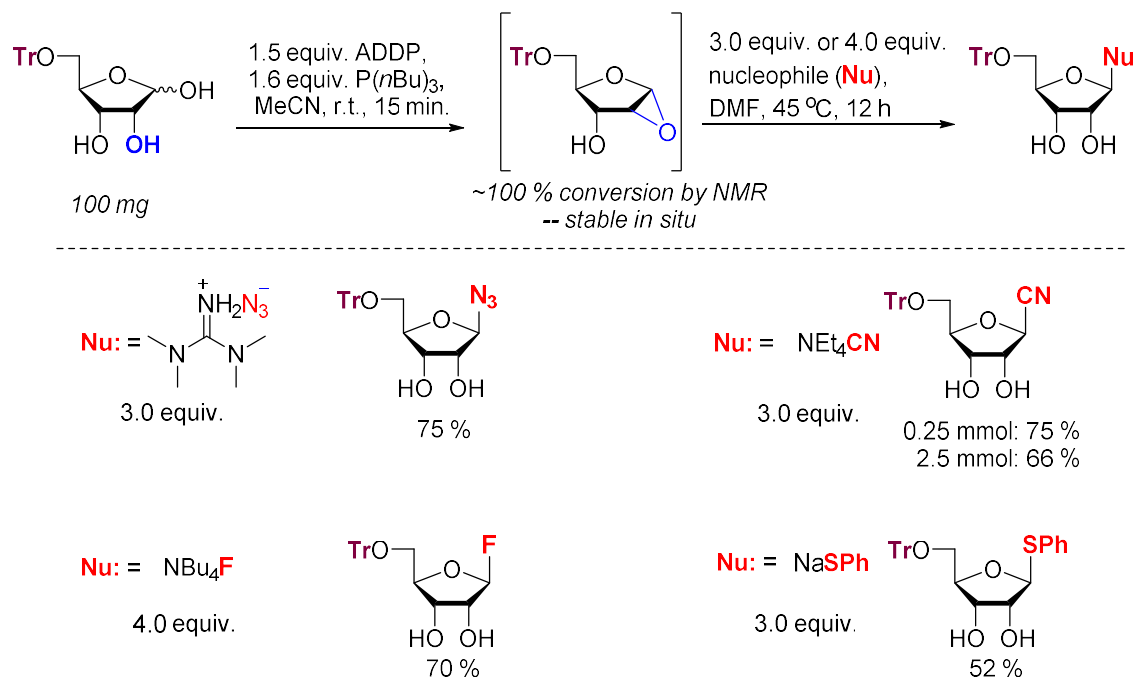
3.3.6 Synthesis of non-nucleoside ribofuranosyl glycosides.

With a robust array of nucleosides, including analogs bearing synthetic bases and saccharide components, now available under the improved conditions, I endeavoured to effect the ring opening of the anhydrose with other non-nucleobase nucleophiles that could act as precursors for other biologically relevant molecules. I envisioned, once again, forming the anhydrose *in situ*, and then adding the nucleophile, along with some DMF, to the anhydrose (Scheme 3.7). One very logical starting target was the N_3 moiety as a potential precursor for click chemistry. Utilizing the interesting nucleophile 1,1,1',1'-tetramethylguanidinium azide formed *in situ*, I could synthesize the glycosyl azide in good yield when employing mild (45 °C) heating. Also, I note very encouragingly, that despite the small size of the nucleophile, the β -anomer was still formed perfectly stereoselectively as determined by NMR analysis of the crude reaction mixture.

I focussed next on the possibility of installing a fluoride²⁷ or thiolate moiety at the anomeric position as they are known glycosyl donor moieties. Much to my delight, both were formed easily using the first nucleophile employed. I utilized *tert*-butylammonium fluoride (TBAF) as the nucleophile to provide smoothly in 70 % overall yield, the stereoselective β -glycosyl

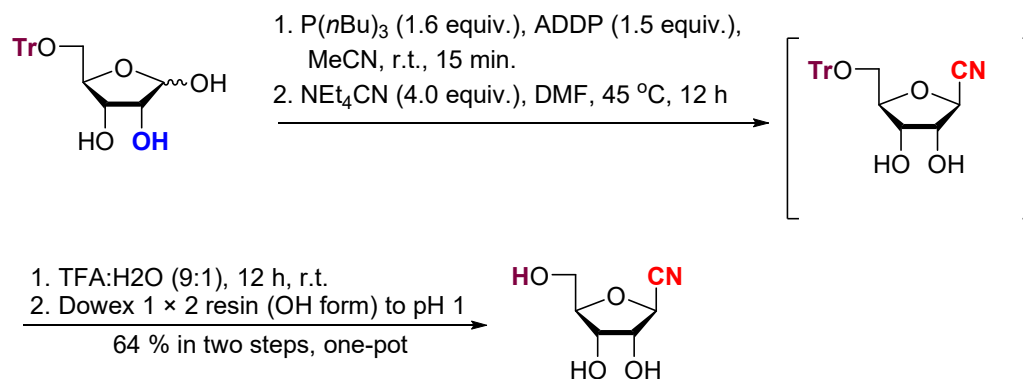
fluoride. To provide the thiolate, I utilized sodium thiophenolate as the nucleophile to smoothly form in moderate-to-good yield (52 %) stereoselectively the product.

I next sought to examine the feasibility of forming the cyano glycoside as a precursor for C-nucleosides. I tried first NaCN and KCN as the nucleophiles to open the epoxide, however, no product was formed. I supposed this was due to low solubility of the nucleophile and the incompatibility of the method with high temperatures. I was very pleased, however, to observe that if I changed the nucleophile to freshly dried tetraethylammonium cyanide I could form the anomeric cyanide in good yield and perfect stereoselectivity for the β -anomer (66 % yield).



Schem 3.7: Formation of non-nucleoside glycosyl adducts via epoxide ring opening of the anhydrose at 0.25 mmol scale unless otherwise noted.

As final proof that my deprotection strategy extends beyond nucleosides, I deprotected the cyano glycoside using the same the conditions as described in section 3.3.2 to afford the deprotected cyano sugar in 64 % overall yield (Scheme 3.8). This, once again, showed that the deprotection step proceeds quantitatively without compromising the anomeric. These experiments represented the final dataset before we published this work in *Chemistry—A European Journal* where I was again the first author of the study.²⁸



Scheme 3.8: Synthesis of deprotected potential C-nucleoside precursor in a two-step one-pot process.

4. Conclusions

In my thesis, I developed two novel methods for the stereoselective synthesis of nucleosides from either fully unprotected D-ribose or from 5-*O*-monoprotected ribose under modified Mitsunobu conditions. After extensive optimization, I determined that $P(nBu)_3$ was the ideal phosphine source and DIAD the ideal electron acceptor. I optimized the order of addition of the reagents as well and I discovered that the nucleophilicity of the heterocycle could be improved by deprotonating the N^9 nitrogen with DBU. Using these conditions, in the first study, I determined that unprotected D-ribose could be used to glycosylate a series of purine and pyrimidine nucleobases to provide in moderate-to-good yield stereoselectively β -ribopyranosyl nucleosides as the major product.

This unprecedented reactivity and methodology served as a very convenient proof-of-principal, however, for biologically study, the ribofuranosyl nucleosides are more valuable. As a result, I chose to employ a bulky protecting group (MMTr) that reacts preferentially with primary alcohols that is known to be acid-labile. Hence, when reacted with D-ribose in solution only the furanosyl conformation will react with this group, locking ribose in the furanose form. With the monoprotected ribosyl donor in hand, I demonstrated that the same conditions as in the pyranosyl series could still be used to glycosylate the same series of nucleobases. I then showed that the MMTr group could be cleaved with 1 M HCl(aq) *in situ* in a two-step one-pot glycosylation–deprotection strategy to provide β -ribofuranosyl nucleosides perfectly stereoselectively. I also demonstrated that the C2-OH group provides either a directing effect or anchimeric assistance in the reaction.

This first study demonstrated a very elegant method to synthesize this series of nucleosides, however, there were still some shortcomings. Most notably cytosine, guanine, 5-fluorouracil, 7-deazapurines unsubstituted at the 7-position, as well as other non-heterocyclic nucleophiles were incompatible. A plausible reaction mechanism was also necessitated. By modifying the electron acceptor to ADDP and removing the nucleophile (nucleobase), we could observe the quantitative conversion of the starting monoprotected ribosyl moiety to a 1,2-anhydrosugar (termed “anhydrose”) via *cis*-dioxaphospholane intermediate using NMR spectroscopy, thus confirming the neighboring group participation of the C2-OH group.

With this knowledge in hand, I improved the reaction conditions to address the shortcomings of the previous study. I was successfully able to glycosylate cytosine, guanine, 5-fluorouracil, and 7-deazapurines unsubstituted at the 7-position using 5-*O*-tritylribose as the donor. I also demonstrated that the 5'-*O*-monoprotected nucleoside could be isolated separately. Furthermore, I determined the free nucleoside could still be accessed in a two-step one-pot glycosylation-deprotection process using 90 % TFA in H₂O over 12 h without compromising the anomeric position at all. A further demonstration of the power of this methodology, was the three-step one-pot synthesis of adenosine starting from 6-chloropurine (not discussed in this thesis summary). Furthermore, I demonstrated that small nucleophiles such as N₃⁻, CN⁻, ⁻SPh, and F⁻ could all nucleophilically open the epoxide of the anhydrose perfectly stereoselectively for the β-anomer. Still, some nucleophiles failed to open the epoxide and I hope this will be addressed in the future.

The final demonstration of the power of the methodology came by synthesizing medicinally active or potentially medicinally active C5-modified sugar nucleosides, including the valuable anticancer drug doxifluridine. I also proved that my procedure may be amenable to the synthesis of the building blocks for solid phase oligonucleotide synthesis as well by synthesizing β-5-*O*-DMTribosyl nucleosides that had surprising stability.

1. Úvod

Nukleotidy mají zásadní význam pro živou přírodu. Jsou to totiž fundamentální složky deoxyribonukleových kyselin (DNA) a ribonukleových kyselin (RNA). Syntetické nukleotidy (takové, které nenalezneme v přírodě) jsou rovněž nesmírně užitečné jakožto komponenty mnoha léčiv, konkrétně protinádorová a antivirová terapeutika.¹⁻³ Přímé propojení sacharidové složky s nukleobází (konceptně znázorněno na schématu 1.1) by výrazně zrychlilo přípravu těchto sloučenin a tento postup by měl zásadní význam zejména v medicínálních oborech.

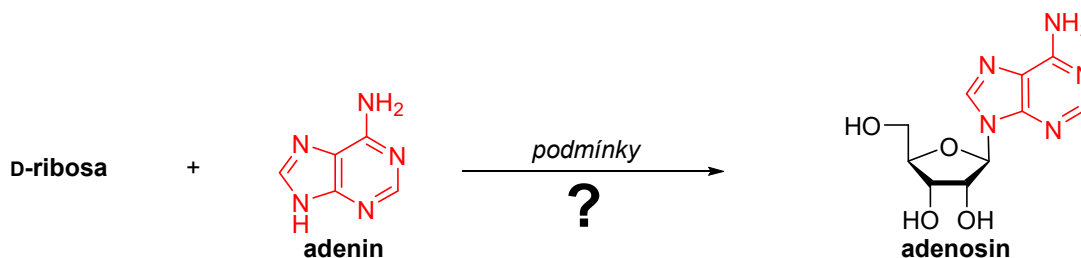


Schéma 1.1: Zjednodušená syntéza nukleosidů za předpokladu přímého propojení sacharidu a nukleobáze.

Glykosylace je jednou z nejdůležitějších chemických transformací v přírodě a je rovněž převládající posttranslační modifikací.⁴ Glykosylace je couplingová reakce, ve které dochází k vazbě anomerního centra (C1-OH) sacharidu – donoru – k druhé molekule, takzvanému akceptoru za vzniku glykosidu (produktu). V chemické syntéze glykosidů vystupuje molekula donoru elektrofil. To znamená, že ostatní nukleofilní hydroxylové skupiny na sacharidu musí být chráněny, aby zabránily donoru reagovat sám se sebou. Akceptorová molekula slouží jako nukleofil. Velmi často musí být chráněny ostatní reaktivní skupiny na molekule akceptoru, aby se zabránilo glykosylaci v nežádoucích polohách. Z toho vyplývá ukazují, že se často jedná o velmi náročný vícestupňový proces, který může vyžadovat použití toxických činidel a organických rozpouštědel.⁵⁻⁸

Nejčastěji používaná strategie chemické glykosylace pro syntézu nukleosidů na bázi ribosidů je Vorbrüggenova varianta⁹⁻¹⁰ Hilbert-Johnsonovy reakce.¹⁰⁻¹¹ Reakce je katalyzovaná Lewisovou kyselinou (typicky trimethylsilyltrifluormethansulfonátu (TMSOTf) nebo SnCl_4), je velmi robustní, a tak funguje pro celou řadu pyrimidinových a purinových nukleobází. Stereoselektivita reakce je vysvětlována participací sousední skupiny (nebo anchimerní asistencí) C2-OH acylové skupiny. Ve schématu 1.2 je popsán navrhovaný mechanismus, který používá TMSOTf jako katalyzátor. TMSOTf se považuje za mírnější, snáze manipulovatelnou variantu SnCl_4 s lepší regioselektivitou.¹²⁻¹⁴

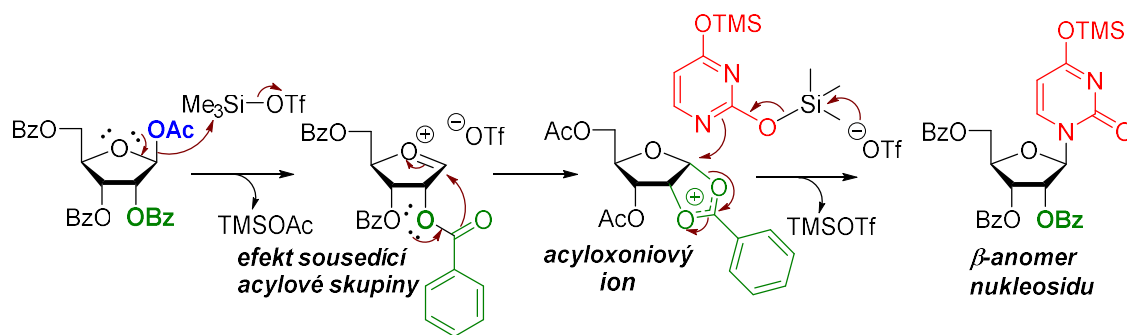


Schéma 1.2: Nejčastěji používaná metoda pro syntesu nukleosidů—Vorbrüggenova reakce.

Zřejmou nevýhodou tohoto postupu je rozsáhlé využívání chránicích skupin. Z toho vyplývá, že produkce glykosidů (zde zejména nukleosidů) za využití glykosylace je velmi atraktivní oblastí výzkumu organické syntézy. Tyto metody mohou mimo jiné najít uplatnění v aplikacích, které přesahují chemickou laboratoř, jako je například medicína.

Klasické strategie glykosylace bez chránicích skupin byly popsány již 100 let před objevem Fischerovy glykosylace.¹⁵⁻¹⁶ Ve Fisherově klíčové práci byl methanol glykosylován D-glukosou v přítomnosti HCl, čímž byl získán methylglykosid. Reakce probíhá chemoselektivně v anomerní poloze, ale obecně trpí úplným nedostatkem regio- či stereochemické kontroly (schéma 1.3A).

Mitsunobuova reakce byla vyvinuta během posledních 50 let a je jednou z klíčových reakcí používaných v organické syntéze.¹⁷ Tato reakce má natolik vysokou použitelnost v organické syntéze, že se nyní používá (ať už celá nebo jen některé její procedury) v glykosylačních reakcích nechráněných a neaktivovaných sacharidů. Jedny z nejatraktivnějších vlastností tohoto postupu jsou: jednak jeho schopnost pracovat nezávisle na pH a zároveň použité reagenty jsou obecně považovány za látky s nízkou toxicitou. První příklad použití Mitsunobuovy reakce pro glykosylaci za použití nechráněných sacharidových donorů byl poprvé popsán v roce 1979 za účelem syntézy arylových glykosidů.¹⁸⁻¹⁹ V této práci byly jako použité donory popsány malé série pentos a hexos pro přípravu fenolických glykosidů v menším až dobrém výtěžku s 1,2-*trans* diastereomerem, který převládal ve velkém nadbytku a nebo byl izolován výhradně (schéma 1.3B). Ačkoli tento článek nepřinesl žádný konkrétní mechanistický vhled, autor naznačuje, že zde možná byl přítomen efekt účasti sousední skupiny od C2 hydroxylové skupiny, která může zasahovat do stereochemie.

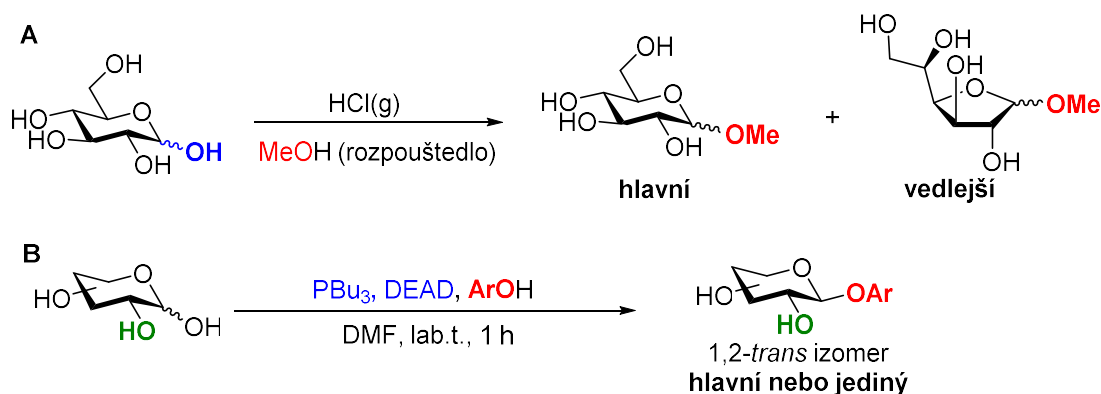


Schéma 1.3: Známé syntézy glykosidů bez chránících skupin. A) Fischerova glykosylace, B) Mitsunobuova reakce vedoucí k aryl glykosidům.

Publikovali jsme přehled o dalších známých strategiích glykosylace bez ochranné skupiny v roce 2017 v publikaci *Beilstein Journal of Organic Chemistry*.²⁰

2. Cíle práce

- 1) Vyvinout a optimalizovat podmínky pro syntézu nukleosidů zcela bez ochranných skupin.
- 2) Vytvoření podmínek pro získání biologicky relevantního furanosylového regioisomeru.
- 3) Vysvětlení přijatelného reakčního mechanismu buď pozorováním klíčových meziproduktů *in situ* pomocí NMR technik, nebo přímou izolací meziproduktů.
- 4) Rozšířit rámec substrátů tak, aby zahrnoval obtížně připravitelné akceptory nukleobází a aglykony nenukleobází.
- 5) Prokázat schopnost metody syntetizovat medicínálně relevantní sloučeniny a potenciální stavební bloky pro chemickou syntézu oligonukleotidů na pevné fázi.

3. Výsledky a diskuse

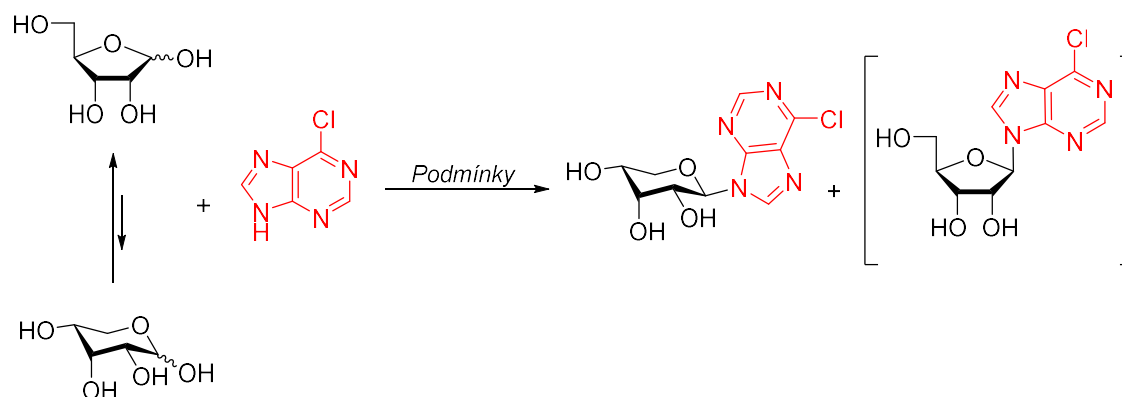
3.1 Vývoj metody syntézy nukleosidů bez chránících skupin

Primárním cílem této práce bylo navrhnout podmínky pro syntézu nukleosidů glykosylací nukleových kyselin s plně nechráněnou a neaktivovanou D-ribozou. Moje počáteční inspirace

k dosažení tohoto cíle pocházela z klíčové práce G. Grynkiewicz publikované v roce 1979 v *Polish Journal of Chemistry*.¹⁸

Předpokládal jsem, že tyto podmínky budou vhodné pro syntézu nukleosidů, pokud fenolický alkohol vyměním za nukleobázi. Mimo to existuje precedens syntézy acyklických nukleosidů za použití Mitsunobuovy reakce, nicméně toto bylo popsáno pouze v případě, kdy je volná právě jedna hydroxylová skupina²¹⁻²². Pro optimalizační studii jsem použil 6-chlorpurin, rozpustnou, ale stále přiměřeně levnou alternativu, která je častým prekursorem syntézy nukleosidů. Nejprve jsem odhadl pět nejdůležitějších proměnných, které je třeba vzít v úvahu při optimalizaci glykosylace: vhodná volba báze pro deprotonizaci akceptoru nukleobáze, fosfin, akceptor elektronů, rozpouštědla a glykosylační katalyzátor. Optimalizační údaje jsou uvedeny v tabulce 3.1. Během optimalizační studie jsem α -anomer detekoval pomocí ¹H NMR ze surové reakční směsi, kde jej přede mnou dosud nikdo neanalyzoval. Podmínky byly rovněž optimalizovány v semipreparativní (1 mmol) škále.

Tabulka 3.1: Optimalizační studie tvorby nukleosidů s úplnou absencí chránicích skupin.



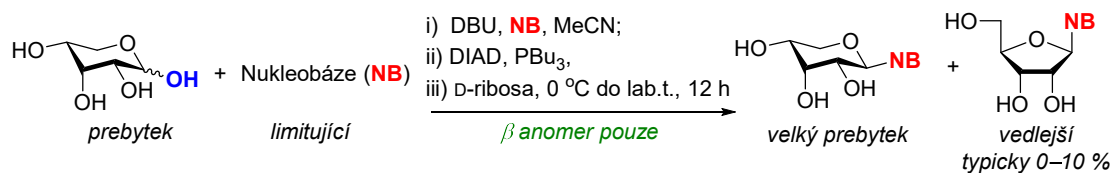
Pokus	Báze	Podmínky	Izolovaný výtěžek
1	žadná	NB (1,5 ekv.), D-ribosa (1,0 ekv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1,5 ekv.), DEAD (1,5 ekv.), DMF, 1 h, lab.t.	22 % ^a
2	NaH	NB (1,0 ekv.), D-ribosa (1,0 ekv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1,05 ekv.), CCl ₄ (10,0 ekv.), THF, 1 h, lab.t.	24 % ^a
3	žadná	NB (1,0 ekv.), D-ribosa (1,0 ekv.), PPh ₃ (1,6 ekv.) CBr ₄ (2 ekv.), ribose (1,5 ekv.), DMF, 1 h, lab.t.	27 % ^a
4	NaH	NB (1,0 ekv.), D-ribosa (1,5 ekv.), PPh ₃ (0,1 ekv.) CBr ₄ (0,1 ekv.), DMF, 1 h, lab.t.	No reaction

5	NaH	NB (1,0 ekv.), D-ribosa (1,0 ekv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1,2 ekv.), CCl ₄ (2 ekv.), DMF, 12 h, lab.t.	26 % ^a
6	CsCO ₃	NB (1,0 ekv.), D-ribosa (1,0 ekv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1,2 ekv.), CCl ₄ (2 ekv.), DMF, 12 h, lab.t.	trace
7	NaH	NB (1,0 ekv.), D-ribosa (1,0 ekv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1,2 ekv.), DIAD (2 ekv.), DMF, 12 h, lab.t.	12
8	NaH	NB (1,0 ekv.), D-ribosa (1,0 ekv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1,2 ekv.), CCl ₄ (2 ekv.), MeCN, 12 h, lab.t.	33
9	NaH	NB (1,0 ekv.), D-ribosa (1,0 ekv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1,2 ekv.), CCl ₄ (2 ekv.), MeCN, AgCO ₃ (1 ekv.), 12 h, lab.t.	23 % ^b
10	NaH	NB (1,0 ekv.), D-ribosa (2 ekv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (1,2 ekv.), ADDP (2 ekv.), MeCN, 12 h, 0 °C to lab.t.	trace
11	DBU	NB (1,0 ekv.), D-ribosa (2 ekv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (2 ekv.), DIAD (2,1 ekv.), MeCN, 12 h, 0 °C to lab.t.	52 % ^c (76 %) ^d
12	DBU	NB (1,0 ekv.), P(<i>n</i> Bu) ₃ (3 ekv.), DIAD (3,1 ekv.), D-ribosa (2 ekv.), MeCN, 12 h, 0 °C to lab.t.	29 % ^a

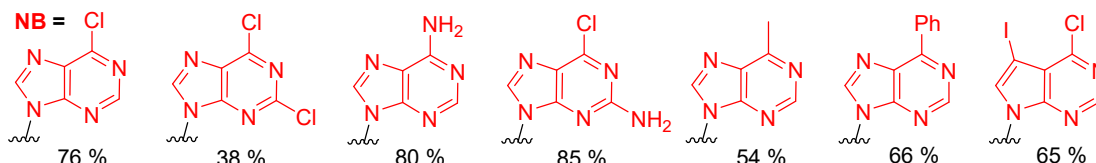
(a) Produkt kontaminován fosfinoxidem. (b) Furanosid byl rovněž izolován (12 %). (c) Furanosid byl rovněž izolován (3 %). (d) Výtěžek byl po tritraci surové reakční směsi směsí Et₂O–petrolether před purifikací.

3.1.1 Syntéza β -ribopyranosylových nukleosidů

S optimalizovanými podmínkami jsme se pokusil prověřit, zda by tyto podmínky mohly poskytnout řadu nukleosidů obsahující heterocykly s běžnými synthetickými prekursory funkčních skupin s alkylovými nebo aromatickými substituenty a přirozeně se vyskytujícími nukleovými bázemi v 1 mmol škále. Na tomto místě bych rád poděkoval za spolupráci C. Richterovi za skupiny Prof. R. Mahrwalda (Humboldtova Univerzita v Berlíně) za jeho příspěvek k této části práce. Richter připravil všechny pyrimidinyl-nukleosidy. V této semipreparativní škále jsme připavali celkem 13 nukleosidů. Ve všech případech byl pozorován výhradně β -anomer, jak bylo stanoveno analýzou surové reakční směsi pomocí ¹H NMR. Jako obecný trend byla pozorována vyšší reaktivita purinů než pyrimidinů. Jak jsme očekávali, termodynamický pyranosidový regioisomer byl přítomen ve velkém přebytku nad furanosidem (schéma 3.1).



Syntetizováno mnou



Syntetizoval Celin Richter

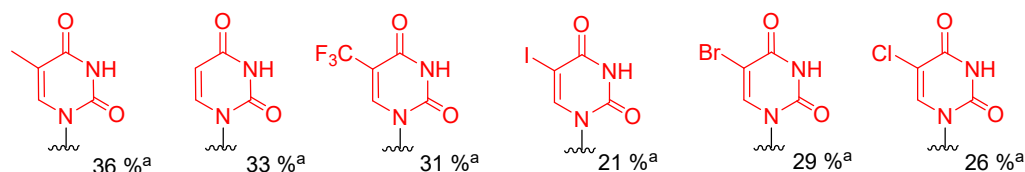


Schéma 3.1: Přímá syntéza pyranosylových nukleosidů z neaktivované a nechráněné ribosy za použití optimalizovaných podmínek pro Mitsunobuovu reakci. Produkty reakce byly neseparovatelné silikagelu a byly indentifikovány ¹H NMR spektroskopií.

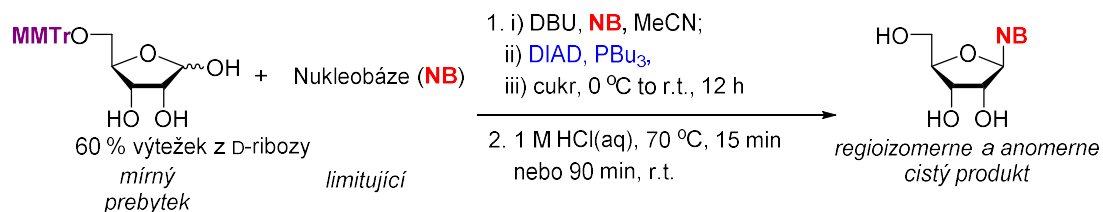
3.1.2 Syntéza biologicky relevantních β-ribofuranosyl nukleosidů

Se vhodnými stereoselektivními glykosylačními podmínkami jsem se dále snažil vyvinout nejlepší metodu syntézy β-ribofuranosyl nukleosidů, jakožto téměř výhradně biologicky relevantních regioisomerů. Tato metodika by měla největší dopad mimo syntetické laboratoře. Předpokládal jsem, že nejjednodušším způsobem jak získat furanosylový produkt je volba vhodné chránicí skupiny, která je dostatečně objemná, aby reagovala jednoduše výhradně nebo s velkou preferencí s **primárními** alkoholy a mohla být ochráněna *in situ* použitím anorganické kyseliny. Proto jsem pro další studii zvolil 4-methoxytritylovou (MMTr) skupinu.

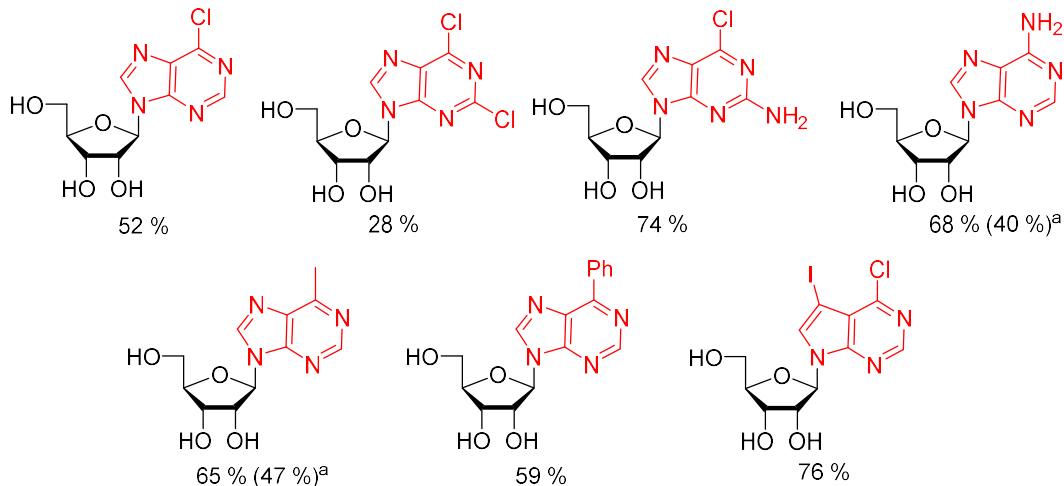
3.1.2.1 Syntéza β-furanosylových nukleosidů ve dvoustupňovém „one-pot“ procesu

S vhodnými podmínkami a se společným úsilím C. Richtera jsem glykosyloval stejné série nukleových basí jako v sérii pyranosidů, v „one-pot“ procesu za použití 1M HCl(aq) pro ochránění MMTr skupiny *in situ*. Opět platí obecný trend purinů, že jsou reaktivnější než pyrimidiny a naštěstí byla stejná série dostupná s malými komplikacemi. Ve většině případů byly výtěžky srovnatelné s výtěžky z řady pyranosidů, což ještě jednou naznačuje, že štěpení MMTr probíhá kvantitativně, aniž by došlo k narušení anomerní polohy (schéma 3.2). Šest ze

třinácti nukleosidů, které jsme připravili, bylo získáno ve vyšším výtěžku, než bylo dříve popsáno.



Syntetizováno mnou



Syntetizoval Celin Richter

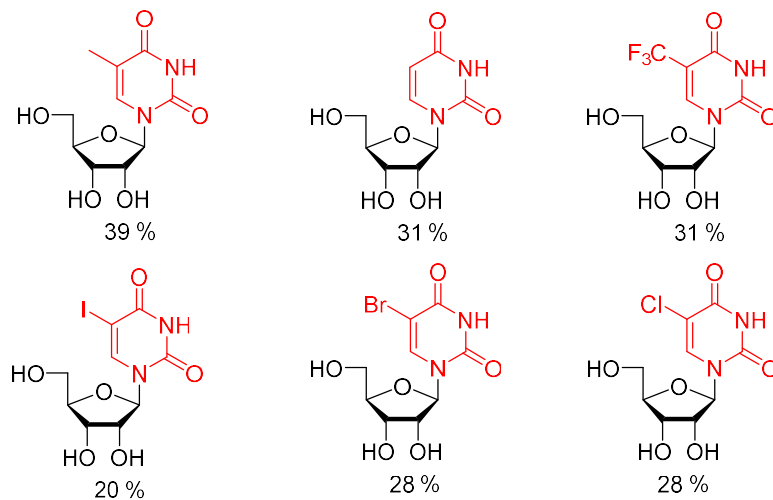


Schéma 3.2: Dvoustupňová „one-pot“ syntéza nukleosidů v jedné studii. ^aVýtěžek v závorkách je po krystalizaci z MeOH v důsledku stopových nečistot po chromatografické purifikaci.

3.1.3 Nedostatky

Navzdory jednoduché avšak koncepčně nové povaze této první studie, byly zjištěny některé překážky a nedostatky. Ty zahrnují nekompatibilitu účinných protinádorových léčiv (cytosin,

guanin a 5-fluorouracil), která jsou na seznamu základních léčivých přípravků Světové zdravotnické organizace (z angličtiny „World Health Organization“, WHO). Také jsem byl překvapen, že 7-deazapurinové báze, které jsou v pozici 7 nesubstituované, nereagovaly. Navíc jsem nebyl schopen nalézt nukleofily kompatibilní s podmínkami, jako je azido a kyano skupina, thiolát nebo fluorid. To si vyžádalo lepší podmínky a mechanistickou studii. Tuto studii jsme zveřejnili v *Organic Letters* v roce 2015.²³

3.2 Mechanistická studie

Prvním krokem v mechanistickém studiu bylo potvrdit, že všechna reakční činidla jsou nezbytná pro to, aby reakce proběhla. Tím bychom indikovali, že reakce probíhá „Mitsunobu-like“ mechanismem. Takto jsem potvrdil, že reakce vskutku probíhá tímto mechanismem. Potom jsem ve spolupráci s Dr. R. Pohlem (ÚOCHB) provedli NMR studii, kterou jsme stanovili mechanismus, jímž reakce probíhá (schéma 3.3). Ukázalo se, že se vytvoří 1,2 anhydro sacharid (nazvaný anhydrosa) přes *cis*-1,3-dioxafosfolanový intermediát. Ve spolupráci s Prof. J. Roithovou byla provedena výpočetní studie na bázi B3LYP-D3/6-311+G**, která předpovídala tvorbu anhydrosy skrze kolaps *cis*-1,3-dioxafosfolanu.

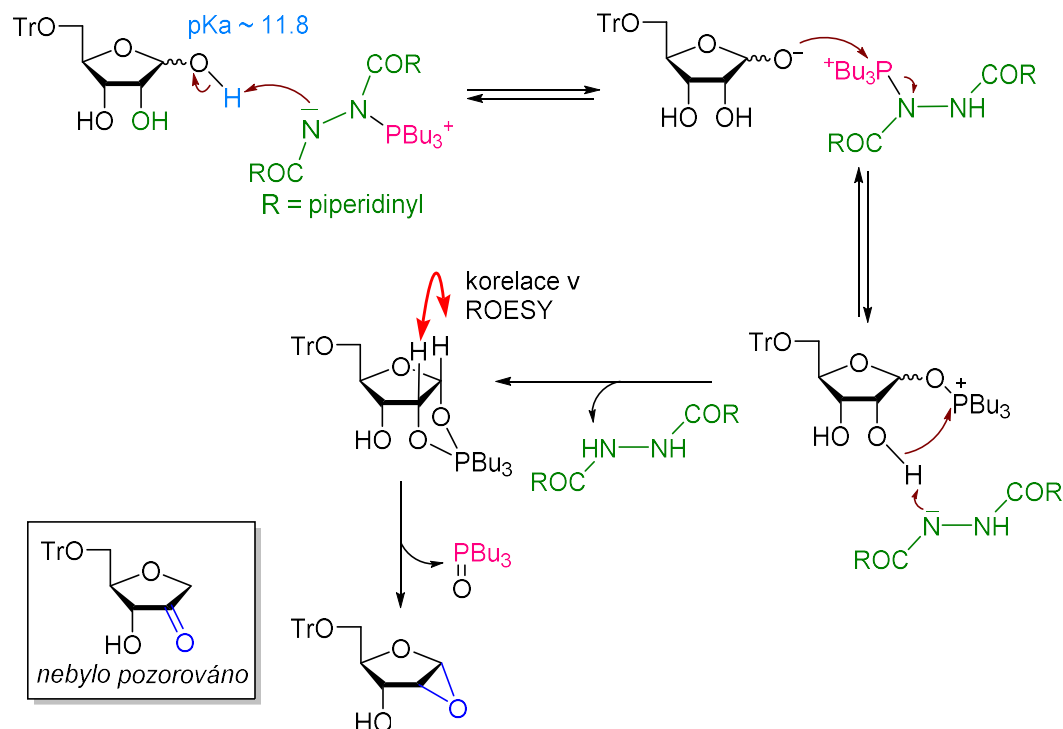


Schéma 3.3: Reakční mechanismus tvorby anhydrosy.

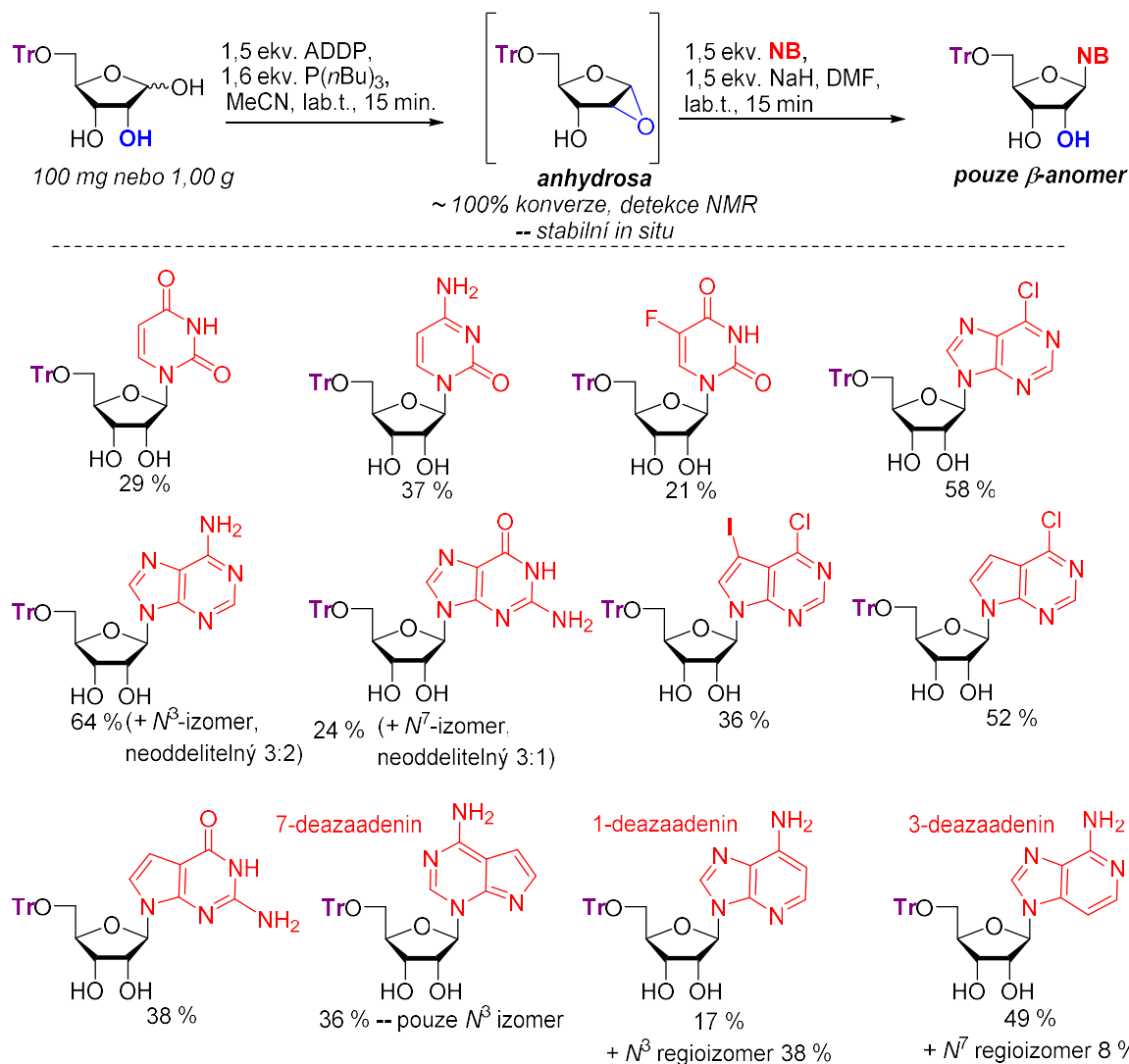
3.3 Vypracování vylepšeného protokolu

3.3.1 Syntéza a izolace 5-*O*-mono-chráněných nukleosidů

Se znalostí mechanismu a optimalizovanými podmínkami jsem se snažil rozšířit rozsah substrátů tak, aby zahrnoval všechny nukleosidy, které nebyly dostupné v první studii jak na semipreparativní (0,25 mmol), tak na preparativní škále (2,5 mmol). Nové podmínky ukazují, že anhydrosa se vytvoří nejprve *in situ* za použití 1,1'-azodikarbonyl dipiperidinu (ADDP) jako akceptoru elektronů. Pak dojde k reakci s nukleofilem (nukleobází). Použití ADDP v Mitsunobuově reakci má jeden výhodný aspekt: ADDP je pevná oranžová látka, dobře rozpustná v MeCN a redukovaný hydrazin je bílá pevná látka s nízkou rozpustností. Tudíž lze snadno sledovat tvorbu epoxidu Mitsunobuovou reakcí ji lze snadno stanovit.

Pokud bych deprotonovanou nukleobází přidal k již hotovému epoxidu, *N*-glykosidace by proběhla a v reakci by bylo méně vedlejších produktů. Navzdory vysokovroucí povaze DMF jsem zjistil, že toto rozpouštědlo bylo nejlepší díky jeho schopnosti rozpouštět mnoho nukleobází. Také jsem zjistil, že NaH je optimální bázi pro deprotonaci, protože v mnoha případech byl ochráněný nukleosid tak polární, že separace požadovaného produktu od DBU byla extrémně obtížná nebo nemožná za použití reversní fáze nebo chromatografie na normální fázi. Také jsem chtěl prokázat, že budu schopen izolovat monochráněný a ochráněný nukleosid v preparativním měřítku (schéma 3.4, výtěžky jsou uvedeny pouze ve škále 2,5 mmol). S vylepšenými podmínkami a optimalizovaným pořadím přidání činidel jsem syntetisoval řadu nukleosidů, odstranil nedostatky předchozích studií. Stejně jako v mé první studii byla reakce dokonale stereoselektivní pro β -anomer, jak je stanoveno ^1H NMR surové reakční směsi. Dále se pyrimidiny ve všech případech ukázaly být méně reaktivní než puriny, což je v souladu s první studií.

Navzdory výborné stereoselektivitě reakce, některé nukleobáze nebyly periferně selektivní pro regioisomer N⁹. Jak je ukázáno na schématu 3.4, byly tyto nukleobáze: adenin, guanin, 7-deazaadenin, 3-deazaadenin a 1-deazaadenin. V každém případě byla přítomna dělitelná a nedělitelná směs dvou regioisomerů. Vzhledem k tomu, že nukleosidy mohou být izolovány v 5'-*O*-monochráněné formě, rozhodl jsem se nalézt obecné podmínky umožňující odstranění ochrany *in situ*, které by neohrozilo anomerní polohu.



Scheme 3.4: Syntéza ribofuranosidů za použití monochráněných ribosidů přes anhydrosový meziprodukt.

3.3.2 „One-pot“ syntéza odchráněných nukleosidů

Podobně jako u naší počáteční práce jsem chtěl dokázat, že krok odstranění chránicích skupin může být proveden ve dvoustupňovém procesu v jedné reakční nádobě („one-pot“). Zpočátku jsem zkoušel duplicitní podmínky z naší první studie (1 M HCl (aq), pH ~ 1) jak při pokojové teplotě, tak při 50 °C. Přestože se tyto podmínky ukázaly být kompatibilní a u mnoha substrátů nebyla pozorována žádná degradace anomerního centra, u 7-deaza-7-nesubstituovaných purinů byl pozorován rozklad. Ve výsledku byl tento problém vyřešen použitím kyseliny triflouroctové (z angličtiny „trifluoroacetic acid“, TFA) ve vodě. Poznamenávám, že detritylace vyžadovala delší dobu (12 h) při pokojové teplotě. Aby se zabránilo kontaminaci

produktů trifluorooctanovými solemi a zároveň štěpení nukleobází během zpracovávání, odstranil jsem trifluoracetát pomocí ionexu Dowex 1 X 2 (na pH ~ 1). Reakční směs pak mohla být za normálních podmínek zahuštěna pod vakuem (schéma 3.5).

Při přechodu z jednokrokového na dvukrokový postup nedošlo k dramatickému poklesu výtěžku požadovaných nukleosidů. S jednou nevysvětlitelnou výjimkou: 5-fluoruridinu, což naznačuje, že krok odstranění chránicí skupiny probíhal kvantitativně bez jakéhokoli poškození v anomerní poloze. Povšiml jsem si, že regioisomerní nukleosidy mají sklon k dekompozici. V případě 7-deazaadeninu nebylo pozorován žádný volný nukleosid (není ukázáno). To naznačuje, že tyto nežádoucí kinetické produkty jsou méně stabilní než požadovaný termodynamický produkt N⁹.

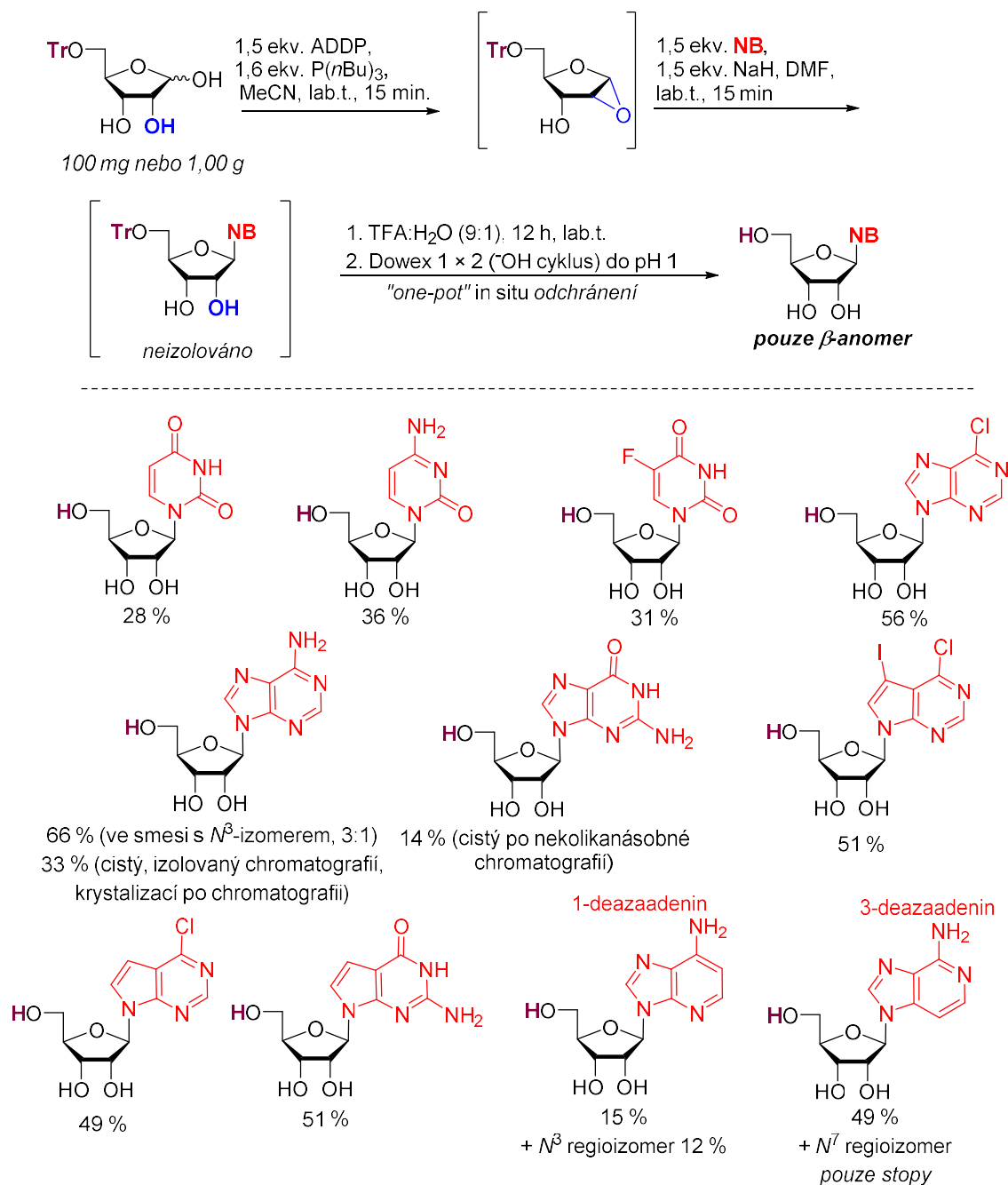


Schéma 3.5: Podmínky a rozsah dvoustupňové „one-pot“ syntézy se zcela nechráněnými nukleotidy v preparativní škále.

3.3.5 Syntéza medicíně či biologicky relevantních nukleosidů

Abychom dále prokázali užitečnost této metodiky, snažil jsem se ji rozšířit tak, aby zahrnovala nukleosidy významné pro léčebné a biologické účely. Také jsem se snažil ukázat, že tato metodika by mohla být vhodná pro syntézu stavebních bloků pro automatizovanou syntézu

fosforamiditu na pevné fázi. Pro tuto studii jsem vybral tyto sacharidy: 5-deoxy-D-ribosu, 5-deoxy-5-fluor-D-ribosu, 5-*O*-dimethoxytrityl(DMT)-D-ribosu. Důvodem byla skutečnost, že protinádorové prekursory doxifluridinu²⁴ a organické fluorované prekursory 5'-deoxy-5'-fluoradenosinu²⁵ nesou sacharidovou skupinu. Je důležité, že 5'-*O*-tritylované ribonukleosidy jsou obecně užitečné meziprodukty při syntéze fosforamiditů pro automatizovanou syntézu oligonukleotidů na pevné fázi²⁶. Připravil jsem malou sérii nukleosidů nesoucích tyto modifikace v poloze C5 za stejných podmínek jako v 5-*O*-tritylribosové řadě. Opět byl 7-deazaadenin glykosylován výhradně v poloze N³. Je zajímavé, že při použití N⁶-benzoyladeninu jako akceptoru se stane reakce dokonale regioselektivní pro požadovanou polohu N⁹. To bylo ukázáno syntésou 5-*O*-DMTribosyl nukleosidu nesoucího tuto skupinu (schéma 3.6).

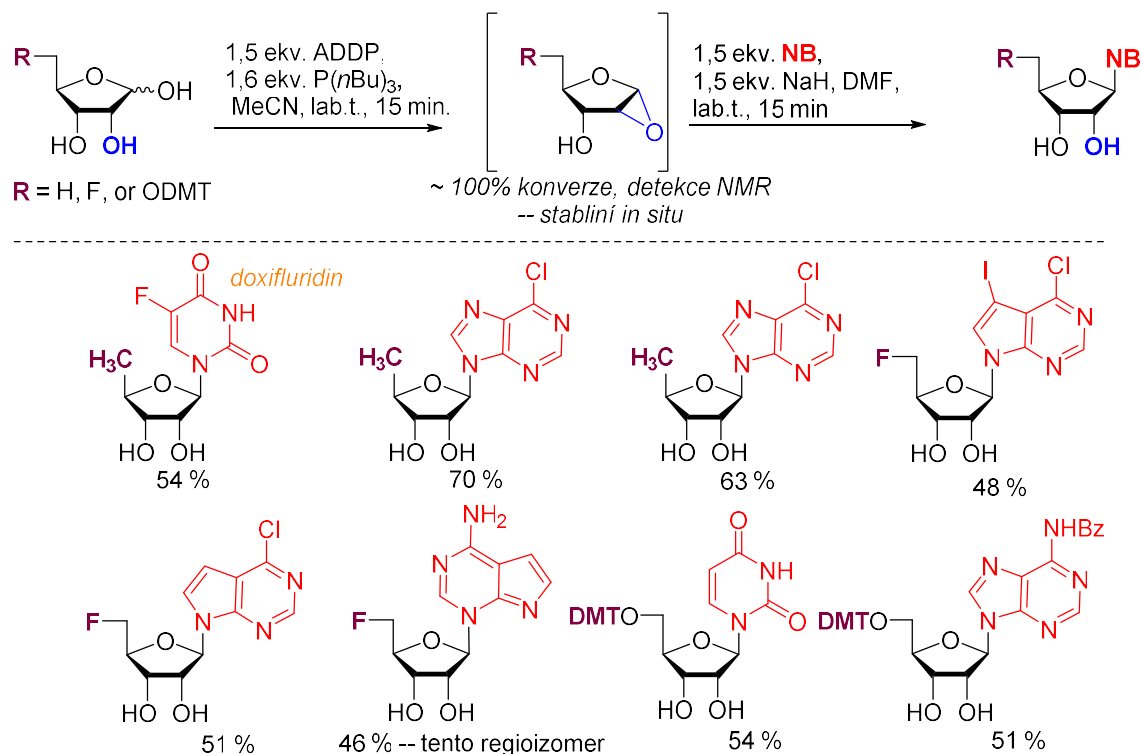


Schéma 3.6: Důležité nukleosidy nesoucí C5-modifikovaný zbytek ribosy.

3.3.6 Syntéza nenukleosidových ribofuranosyl glykosidů

S robustním souborem nukleosidů včetně analogů nesoucích syntetické báze a sacharidové složky, které již byly dostupné za vylepšených podmínek, jsem se snažil ovlivnit otevření kruhu anhydrosy s dalšími nukleofily mimo nukleobáze, které by mohly působit jako prekursory pro biologicky relevantní molekuly. Prvním návrhem byla tvorba anhydrosy *in situ* a poté přidání

rozpuštěného nukleofilu v DMF k anhydrosy (schéma 3.7). Jedním z logických výchozích cílů byla N_3^- skupina jako potenciální prekurzor „click“ chemie. Použitím nukleofilního 1,1,1',1'-tetramethylguanidinazidu, který se vytvořil *in situ*, jsem mohl nasynthetisovat glykosylazid v dobrém výtěžku za mírného zahřívání (45 °C). Navzdory malé velikosti nukleofilu byl β -anomer stále dokonale stereoselektivní, což bylo potvrzeno NMR analýzou surové reakční směsi.

Poté jsem se zaměřil na možnost zavedení fluoru nebo thiolátové skupiny do anomerní polohy, protože jsou to známé pro donorové skupiny glykosylu. Obě skupiny bylo možné snadno zavést s použitím prvního zvoleného nukleofilu. Jako nukleofil jsem použil *tert*-butylammoniumfluorid (TBAF), který poskytl stereoselektivní glykosylfluorid v 70 % celkového výtěžku. K získání thiolátu jsem jako nukleofil použil thiofenolát sodný, který vytvořil stereoselektivní produkt ve středním až dobrém výtěžku (52 %).

Dále jsem se snažil prověřit proveditelnost tvorby kyanoglykosidu jako prekursoru C-nukleosidů. Nejprve jsem jako nukleofily k otevření epoxidu vyzkoušel NaCN a KCN, ovšem nenalezl jsem žádný produkt. Předpokládal jsem, že to bylo způsobeno nízkou rozpustností nukleofilu a neslučitelností metody s vysokými teplotami. Změnou nukleofilu na čerstvě vysušený tetraethylammoniumkyanid, bylo možné vytvořit dokonale stereoselektivní β -anomerní kyanid v dobrém výtěžku (66 %).

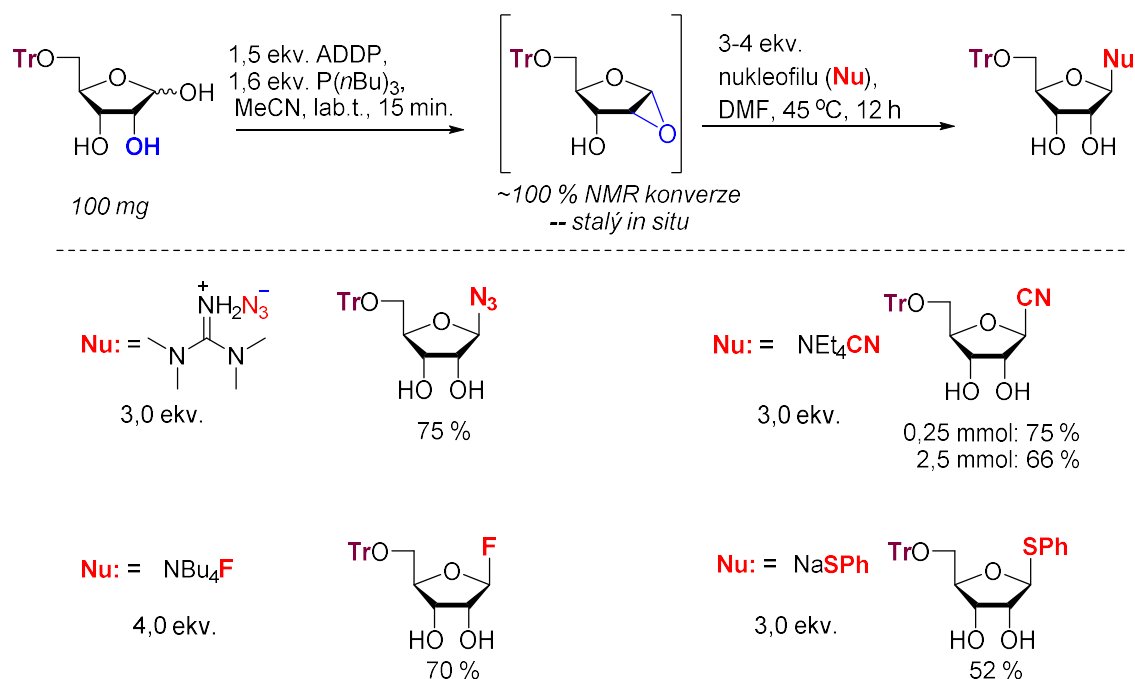
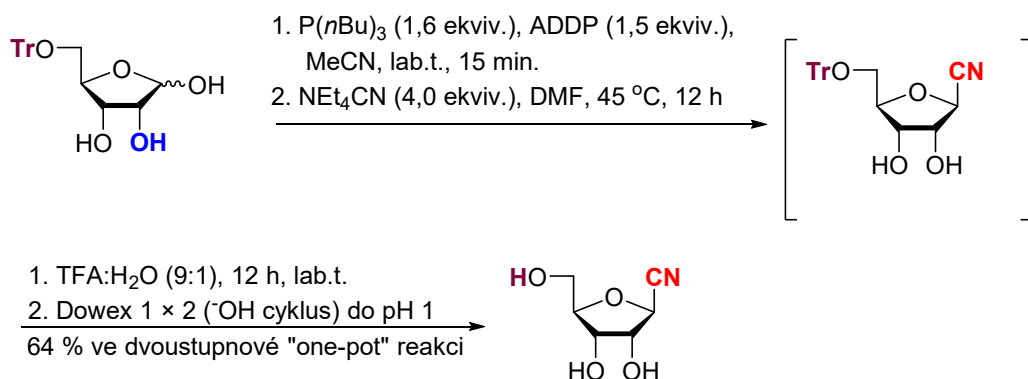


Schéma 3.7: Tvorba nenukleosidových glykosylových aduktů pomocí otevření epoxidového kruhu anhydrosy v 0,25 mmol škále, pokud není uvedeno jinak.

Jako závěrečný důkaz, že moje strategie pro odstranění chránicí skupiny přesahuje nukleosidy, jsem odchránil kyanoglykosid za použití stejných podmínek jako bylo popsáno v části 3.3.2 za účelem získání odchráněného kyanosacharidu v celkovém výtěžku 64 % (Schéma 3.8). Tento experiment opět ukázal, že krok odstranění chránicí skupiny probíhá kvantitativně bez narušení anomeru. Tyto pokusy představovaly závěrečný soubor dat, tato práce byla publikována v *Chemistry—A European Journal*, kde jsem byl opět prvním autorem studie²⁸.



Scheme 3.8: Syntéza potenciálního C-nukleosidového prekursoru, který je zbaven chránicích skupin, ve dvoustupňovém „one-pot“ procesu.

4. Shrnutí

Ve své práci jsem vyvinul dvě nové metody pro stereoselektivní syntézu nukleosidů jednak z plně nechráněné D-ribosy, a jednak z 5-*O*-monochráněné ribosy za modifikovaných podmínek Mitsunobuovy reakce. Po rozsáhlé optimalizaci jsem zjistil, že $P(nBu)_3$ je ideálním zdrojem fosfinu a DIAD ideálním akceptorem elektronů. Optimalizoval jsem i pořadí přidání činidel a zjistil jsem, že nukleofilnost hetrocyklu by se mohla zlepšit deprotonací dusíku N⁹ pomocí DBU. Za použití těchto podmínek jsem v první studii zjistil, že nechráněná D-ribosa může být použita ke glykosidaci řady purinových a pyrimidinových nukleobáze, za tvorby stereoselektivních β-ribopyranosidových nukleosidů jako hlavního produktu.

Tato nová reaktivita a metodika posloužila jako důkaz principu, avšak pro biologickou studii jsou ribofuranosylové nukleosidy cennější. V důsledku toho jsem zvolil objemnou chránicí skupinu (MMTr), která reaguje přednostně s primárními alkoholy, o kterých je známo, že jsou nestále v kyselém prostředí. Díky tomu budu v roztoku při reakci D-ribosa přítomna pouze ve své furanosové konformaci. Pomocí monochráněného ribosylovaného donoru jsem prokázal, že stejné podmínky jako v pyranosidové řadě mohou být použity i ke glykosylaci

stejně série nukleových basí. Potom jsem prokázal, že skupina MMTr může být štěpena HCl (aq) *in situ* ve dvoustupňové „one-pot“ strategii glykosylačního odchránění, abychom získali dokonale stereoselektivní β -ribofuranosid. Také jsem prokázal, že dochází při reakci k participaci sousední C2-OH skupiny.

Tato první studie demonstruje velmi elegantní metodu syntézy série nukleosidů, ale stále obsahuje nedostatky. Zejména cytosin, guanin, 5-fluoruracil, 7-deazapuriny nesubstituované v poloze 7, stejně jako ostatní neheterocyklické nukleofily nebyly s touto metodikou kompatibilní. Rovněž bylo zapotřebí zjistit možný reakční mechanismus. Modifikací akceptoru elektronů na ADDP a odstraněním nukleofilu (nukleobáze) jsem mohl pozorovat kvantitativní konverzi výchozí monochráněné ribosy na 1,2-anhydrosacharid (anhydrosu) přes *cis*-dioxafosfolanový meziprodukt za použití NMR spektroskopie, což potvrzuje účinek sousední C2-OH skupiny.

Díky těmto znalostem jsem zlepšil reakční podmínky, a tím vyřešil nedostatky předchozí studie. Nyní jsem schopen úspěšně glykosyl cytosin, guanin, 5-fluoruracil a 7-deazapuriny nesubstituované v poloze 7 za použití 5-*O*-tritylribosy jako donoru. Také jsem prokázal, že 5'-*O*-monochráněný nukleosid může být izolován odděleně. Dále jsem zjistil, že volný nukleosid by mohl být stále dostupný v dvoustupňovém „one-pot“ glykosylačním odchránovacím procesu za použití 90 % TFA ve vodě po dobu 12 h, aniž by došlo k narušení anomerní polohy. Další částí této metodiky byla třístupňová „one-pot“ syntéza adenosinu, vycházející z 6-chloropurinu (o čemž se v tomto shrnutí nezmiňuji). Dále jsem prokázal, že malé nukleofily, jako jsou N_3^- , CN^- , SPh^- a F^- mohou nukleofilně otevřít epoxid anhydrosy a tím vytvořit zcela stereoselektivní β -anomer. Některé nukleofily přesto nebyly schopné otevřít epoxid, avšak doufám, že tyto problémy budou vyřešeny v budoucnu.

Robustnost této metodiky byla demonstrována na syntéze medicínálně aktivních (nebo potenciálně medicínálně aktivních) nukleosidů s C5-modifikovaným sacharidem, včetně protinádorového léčiva doxifluridinu. Rovněž jsem prokázal, že můj postup může být vhodný pro syntézu stavebních bloků určených pro syntézu oligonukleotidů na pevné fázi i pro syntézu překvapivě stabilních β -5-*O*-DMTribosyl nukleosidů.

9. Selected publications

1. Downey, A. M.; Hocek, M., *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 1239–1279.

2. Downey, A. M.; Richter, C.; Pohl, R.; Mahrwald, R.; Hocek, M., *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4604–4607.
3. Downey, A. M.; Pohl, R.; Roithová, J.; Hocek, M., *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 3910–3917.

10. Conference Contributions

1. Downey, A. M.; Hocek, M. “Toward protecting group-free glycosylation for the synthesis of nucleosides and other biologically relevant molecules” Symposium XVII Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components, Český Krumlov (Czech Republic), 4–9 June 2017. (Oral presentation). Awarded the best oral presentation (ChemBioChem prize).
2. Downey, A. M.; Hocek, M. “Toward protecting group-free glycosylation for the synthesis of nucleosides” 21st International Conference on Organic Synthesis, Mumbai (India), 11–16 December 2016. (Poster and invited "flash presentation").
3. Downey, A. M.; Hocek, M. “Toward protecting group-free glycosylation for the synthesis of nucleosides” 51. konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii – "Liblice 2016". November 11–13, 2016, Lázně Bělohrad (poster presentation).
4. Downey, A. M.; Hocek, M. "Protection-free glycosylations for the synthesis of nucleosides" Antonin Holy Memorial Conference in Medicinal Chemistry, Prague (Czech Republic), 5 September 2016. (Short invited lecture).
5. Downey, A. M.; Hocek, M. “Toward protecting group-free glycosylation for the synthesis of nucleosides” XXII International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids Conference 2016, Paris (France), 18–22 July 2016. (Poster presentation).
6. Downey, A. M.; Hocek, M. “Protecting Group-Free Strategies for the Synthesis of Nucleosides”, 6th International Symposium on Advance in Synthetic and Medicinal Chemistry (EFMC-ASMC 2015), Rehovot (Israel), 15–19 November 2015 (Oral presentation).
7. Downey, A. M.; Hocek, M. “Protecting group-free strategies for the synthesis of nucleosides” 50. konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii – "Liblice 2015", Olomouc, 6–8 November 2015 (Oral presentation).
8. 2nd Prague Summer School -- Advances in Drug Discovery – Chemistry and Biology. Prague, 31 August–4 September 2015, Attendant. (No poster or oral presentation opportunity).

9. Downey, A. M.; Hocek, M. "Protecting group-free strategies for the synthesis of nucleosides" 49. konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii – "Liblice 2014", Olomouc, 7–9 November 2014 (poster presentation).
10. Downey, A.M.; Hocek, M. "Protecting group-free strategies for the synthesis of nucleosides", 7th Summer School Medicinal Chemistry, Regensburg (Germany), 17–19 September 2014, (Poster presentation).
11. Downey, A. M.; Hocek, M. "Protecting group-free strategies for the synthesis of nucleosides" Symposium XVII Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components, Český Krumlov (Czech Republic), 8–13 June 2014. (poster presentation).

11. Curriculum vitae

2013–present

PhD Organic Chemistry student

Charles University in Prague, Faculty of Natural Sciences/ Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences.

Dissertation research: "Protecting group-free strategies for the synthesis of nucleosides and other biologically relevant molecules" (supervisor: **Prof. Michal Hocek**).

2009–2012

MSc Chemistry study – specialization: chemical biology

University of Alberta, Faculty of Science, Department of Chemistry.

Dissertation entitled: "Design and synthesis of α -bromophosphonates as analogues of glucose-6-phosphate" (supervisor: **Assoc. Prof. Christopher W. Cairo**).

2004–2009

BSc with specialization Pharmacology, Industrial Internship Program study

University of Alberta, Faculty of Science, Department of Pharmacology/Epsilon Chemicals, Ltd.

Dissertation entitled: "Synthesis of glucose-6-phosphate derivatives" (academic supervisor: **Assoc. Prof. Christopher W. Cairo**; industrial supervisor: **Dr. Alan Jones**)

12. References

1. Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C., *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2013**, *12*, 447–464.
2. De Clercq, E., *Annu. Rev. Pharmacol.* **2011**, *51*, 1–24.
3. De Clercq, E.; Holy, A., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 928–940.
4. Khoury, G. A.; Baliban, R. C.; Floudas, C. A., *Sci. Rep.* **2011**, *1*, 90.
5. Codee, J. D. C.; Ali, A.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A., *C. R. Chim.* **2011**, *14*, 178–193.
6. Jensen, K. J., *J. Chem. Soc. Perkins Trans. 1* **2002**, 2219–2233.
7. Jacobsson, M.; Malmberg, J.; Ellervik, U., *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1266–1281.
8. Yang, Y.; Zhang, X. H.; Yu, B., *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 1331–1355.
9. Niedballa, U.; Vorbrüggen, H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 461–462.
10. Vorbrüggen Glycosylation In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Son, Inc.: 2010; Vol. 652, pp 2915–2929.
11. Johnson, T. B.; Hilbert, G. E., *Science* **1929**, *69*, 579–580.
12. Vorbrüggen, H.; Hofle, G., *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1256–1268.
13. Vorbrüggen, H.; Krolikiewicz, K., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1975**, *14*, 421–422.
14. Vorbrüggen, H.; Krolikiewicz, K.; Bennua, B., *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1234–1255.
15. Fischer, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1895**, *28*, 1145–1167.
16. Fischer, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1893**, *26*, 2400–2412.
17. Mitsunobu, O., *Synthesis* **1981**, 1–28.
18. Gryniewicz, G., *Pol. J. Chem.* **1979**, *53*, 1571–1579.
19. Gryniewicz, G., *Carbohydr. Res.* **1977**, *53*, C11–C12.
20. Downey, A. M.; Hocek, M., *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 1239–1279.
21. Lu, W. B.; Sengupta, S.; Petersen, J. L.; Akhmedov, N. G.; Shi, X. D., *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5012–5015.
22. Fletcher, S.; Shahani, V. M.; Lough, A. J.; Gunning, P. T., *Tetrahedron.* **2010**, *66*, 4621–4632.
23. Downey, A. M.; Richter, C.; Pohl, R.; Mahrwald, R.; Hocek, M., *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4604–4607.

24. Aveñdano, C.; Menéndez, J. C., *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs* **2008**, Elsevier, Amsterdam.
25. O'Hagan, D.; Schaffrath, C.; Cobb, S. L.; Hamilton, J. T. G.; Murphy, C. D., *Nature* **2002**, *416*, 279–279.
26. Wei, X., *Tetrahedron*. **2013**, *69*, 3615–3637.
27. Toshima, K., *Carbohydr. Res.* **2000**, *327*, 15–26.
28. Downey, A. M.; Pohl, R.; Roithová, J.; Hocek, M., *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 3910–3917.