

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



KATEŘINA NOVOTNÁ

**SYNTÉZA PROLÉČIV GLUTAMINOVÉHO ANTIMETABOLITU
6-DIAZO-5-OXO-L-NORLEUCINU**

**SYNTHESIS OF PRODRUGS OF GLUTAMINE ANTIMETABOLITE
6-DIAZO-5-OXO-L-NORLEUCINE**

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Pavel Majer, CSc.

Praha, 2018

Prohlášení

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

V Praze 25. 5. 2018

.....
Kateřina Novotná

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Pavlu Majerovi, CSc., za možnost podílet se na tomto projektu a jeho cenné rady při řešení syntetických problémů. Děkuji RNDr. Lukáši Tenorovi, PhD. za čas strávený konzultacemi při vypracování této práce i morální podporu. Velké díky patří také Mgr. Andreji Jančaříkovi, PhD. za nekonečnou trpělivost v začátcích mé laboratorní praxe a jeho nápady, bez kterých by tato práce nevznikla. Děkuji všem kolegům z ÚOCHB AV ČR za přátelskou atmosféru a každodenní pomoc v laboratoři. Poděkování patří v neposlední řadě také mé rodině za finanční i psychickou podporu po celou dobu studia.

Abstrakt

Známý glutaminový antimetabolit 6-diazo-5-oxo-L-norleucin (DON) vykázal slibnou protinádorovou aktivitu v řadě preklinických i klinických testů. Problémem však byla jeho toxicita a od ní se odvíjející nežádoucí vedlejší účinky. Cílem této bakalářské práce bylo připravit nová proléčiva odvozená od struktury této látky, která by mohla mít podobné protirakovinné účinky a zároveň menší negativní dopad na lidský organismus. Navazující biochemické a biologické testy byly provedeny ve spolupráci s kolegy z Johns Hopkins University v Baltimore (USA).

Klíčová slova: *6-diazo-5-oxo-L-norleucin (DON), proléčiva, antimetabolit, ProTide*

Abstract

The 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) is a glutamine antimetabolite, which has shown promising antitumor activity in preclinical and several clinical studies. However, its high toxicity leading to gastrointestinal side effects prevented its further development. The aim of this Bachelor thesis was to prepare DON prodrugs with similar anticancer activity but less side effects. Biochemical and biological tests of synthesized prodrugs were performed at Johns Hopkins University in Baltimore (USA).

Key words: *6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), prodrugs, antimetabolite, ProTide*

Použité zkratky

| | |
|--------------------|--|
| Asn | asparagin |
| Asp | kyselina asparagová |
| <i>t</i> -Boc | <i>t</i> -butyloxykarbonyl |
| bs | široký singlet |
| <i>n</i> -BuLi | <i>n</i> -butyllithium |
| CI | chemická ionizace |
| CO ₂ Et | ethoxykarbonyl |
| CSF | mozkomíšní mok (cerebrospinal fluid) |
| Cys | cystein |
| d, dd, ddd | dublet, dublet dubletu, dublet dubletu dubletu |
| DBU | 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en |
| DCM | dichlormethan |
| DEA | <i>N,N</i> -diethylamin |
| DIEA | <i>N,N</i> -diisopropylethylamin |
| DMF | <i>N,N</i> -dimethylformamid |
| DON | 6-diazo-5-oxo-L-norleucin |
| dq, dt | dublet kvartetu, dublet tripletu |
| ESI MS | hmotnostní spektrometrie v kombinaci s ionizací elektrosprejem |
| Et | ethyl |
| Et ₂ O | diethylether |
| EtOAc | ethyl-acetát |
| EtOH | ethanol |
| FADH ₂ | redukovaný flavinadenindinukleotid |
| FDA | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv |

| | |
|-----------|---|
| Fmoc | 9-fluorenylmethyloxykarbonyl |
| Fmoc-Cl | 9-fluorenylmethyloxykarbonyl chlorid |
| FT | Fourierova transformace |
| GBM | multiformní glioblastom |
| Gln | glutamin |
| Glu | kyselina glutamová |
| HAND | neurokognitivní poruchy spojené s HIV |
| hept | heptet |
| HIV | lidský virus imunitní nedostatečnosti |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| HR ESI MS | hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením v kombinaci s ionizací elektrosprejem |
| IČ | infračervená spektroskopie |
| lab. tep. | laboratorní teplota |
| LiHMDS | lithium hexamethyldisilazan, lithium bis(trimethylsilyl)amid |
| LC-MS | hmotnostní spektrometrie v kombinaci s kapalinovou chromatografií |
| LTMSD | lithium(trimethylsilyl)diazomethan |
| Lys | lysin |
| m | multiplet |
| MeOH | methanol |
| NADH | redukovaný nikotinamidadeninukleotid |
| NADPH | redukovaný nikotinamidadeninukleotid-fosfát |
| NaOMe | methoxid sodný, methanolát sodný |
| NMR | nukleární magnetická rezonance |
| PMA | kyselina fosfomolybdenová |
| POM | pivaloyloxymethyl |

| | |
|----------------|---|
| <i>i</i> -Pr | isopropyl |
| <i>i</i> -PrOH | 2-propanol |
| q | kvartet |
| RVO | rotační vakuová odparka |
| s | singlet |
| t, td | triplet, triplet dubletu |
| TEA | <i>N,N,N</i> -triethylamin |
| TFA | kyselina trifluoroctová |
| THF | tetrahydrofuran |
| Thr | threonin |
| TLC | tenkovrstvá chromatografie |
| TMG | 1,1,3,3-tetramethylguanidin |
| TMS | tetramethylsilan |
| TMS-Cl | trimethylsilyl chlorid |
| TMSD | (trimethylsilyl)diazomethan |
| TPPS | 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonátofenyl)porfyrin |
| Tyr | tyrosin |

Obsah

| | |
|---|----|
| Prohlášení..... | 2 |
| Poděkování..... | 3 |
| Abstrakt..... | 4 |
| Abstract..... | 4 |
| Použité zkratky | 5 |
| 1. Úvod..... | 9 |
| 2. Cíle práce | 10 |
| 3. Literární část | 11 |
| 3.1 Chemické a fyzikální vlastnosti 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu | 11 |
| 3.2 Syntetické přístupy k DONu | 14 |
| 3.3 Biologická aktivita DONu..... | 18 |
| 3.3.1 Metabolismus zdravé a rakovinné buňky | 18 |
| 3.3.2 Klinická studie využívající DON | 22 |
| 3.4 Analogy DONu | 24 |
| 4. Výsledky a diskuse | 29 |
| 4.1 ProTide přístup..... | 29 |
| 4.2 Příprava isopropylesteru 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu..... | 31 |
| 4.3 Cyklizace isopropylesteru 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu | 34 |
| 4.4 Syntéza derivátů isopropylesteru 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu | 35 |
| 5. Experimentální část..... | 43 |
| 5.1 Obecné metody a použité chemikálie | 43 |
| 5.2 Pracovní postupy | 44 |
| 6. Závěr | 55 |
| 7. Literatura..... | 57 |

1. Úvod

6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (DON, **1**) je přírodní látka izolovaná z půdních bakterií *Streptomyces* nalezených ve vzorku peruánské půdy⁽¹⁾ již v padesátých letech minulého století. Její protirakovinné účinky byly prokázány v buněčných kulturách, na zvířatech i v klinickém testu na lidech.⁽²⁾ Zároveň však byly pozorovány nepříznivé vedlejší účinky, zejména v oblasti gastrointestinálního traktu, vzhledem k nimž nelze látku samotnou použít jako léčivo.

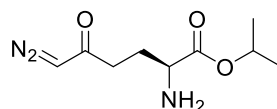
DON je antimetabolit L-glutaminu. Zasahuje do biochemických drah jako je biosyntéza purinových a pyrimidinových bazí či biosyntéza aminokyselin, kde je L-glutamin využíván jako zdroj dusíku. DON působí jako sebevražedný substrát (z angl. suicide substrate), tedy ireverzibilně inhibuje enzymy, které dané reakce katalyzují. Příklady těchto enzymů jsou karbamoylfosfát syntetáza či mitochondriální glutamináza.

Po zablokování funkcí enzymů nemá buňka možnost se dále dělit, což vede k apoptóze. Tímto jsou však ovlivněny nejen rakovinné buňky, jejichž hlavním zájmem je pouze nekontrolovatelné dělení, ale také tkáň, která je vystavena agresivnímu prostředí a musí se obměňovat. Proto byly při klinické studii pozorovány nežádoucí účinky v oblasti zažívacího traktu.

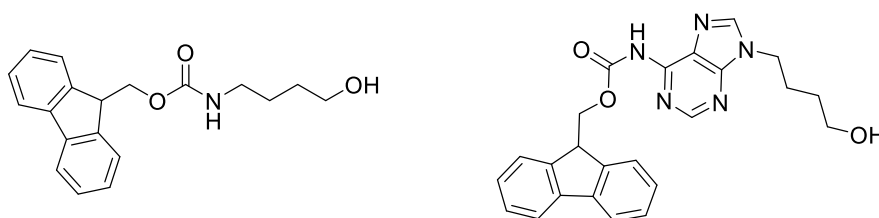
Na základě těchto poznatků vznikl ve spolupráci s Johns Hopkins University (Baltimore, USA) projekt, který se zaměřuje na přípravu nových prolečiv DONu. Jeho cílem je modifikace struktury prolečiva tak, aby bylo přednostně metabolizováno v rakovinných buňkách a k uvolňování DONu ve zdravých buňkách docházelo co nejméně. Dalšími faktory, které je třeba vyřešit, je distribuce látky do místa výskytu nádoru a její dostatečná stabilita během cesty na místo určení.

2. Cíle práce

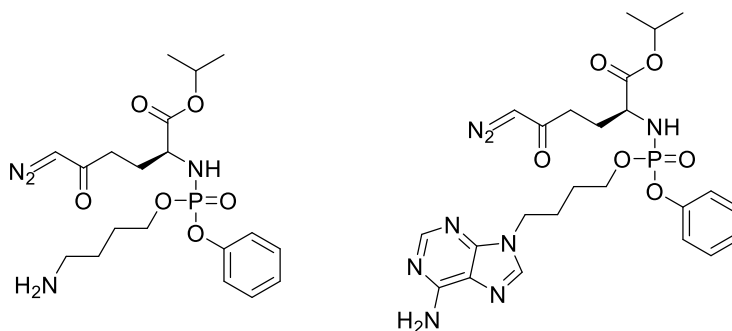
- a. Příprava klíčového intermediátu isopropyl (*S*)-2-amino-6-diazo-5-oxohexanoátu pomocí metodiky vyvinuté a optimalizované na našem pracovišti.



- b. Příprava dvou intermediátů obsahujících chráněný 4-substituovaný butan-1-ol: (*9H*-fluoren-9-yl)methyl(4-hydroxybutyl)karbamátu a (*9H*-fluoren-9-yl)methyl-9-(4-hydroxybutyl)-9*H*-purin-6-yl)karbamátu.



- c. Syntéza dvou fosfonátů – isopropyl (*2S*)-2-(((4-aminobutoxy)(fenoxy)fosforyl)amino)-6-diazo-5-oxohexanoátu a isopropyl (*2S*)-2-(((4-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)butoxy)(fenoxy)fosforyl)amino)-6-diazo-5-oxohexanoátu. Nalezení syntetické cesty, optimalizace podmínek a příprava dostatečného množství obou derivátů (cca 50 mg) pro následné biologické testování.



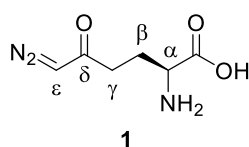
- d. Charakterizace všech připravených derivátů pomocí obvyklých spektrálních metod (^1H , ^{31}P , ^{13}C NMR, IČ, MS, HR(MS), teploty tání, optické rotace) po izolaci produktů z reakčních směsí v dostatečné čistotě (>95%).
- e. Navržení reakčních mechanismů provedených reakcí.

3. Literární část

3.1 Chemické a fyzikální vlastnosti 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu

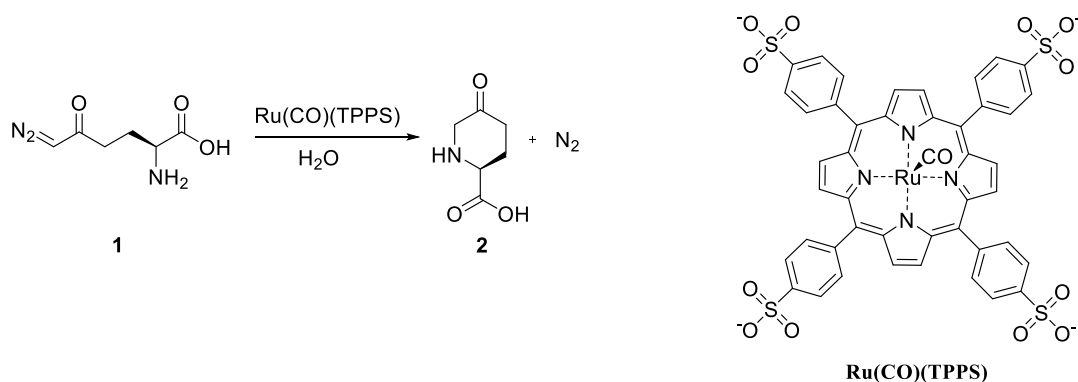
6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (DON, **1**) je světle žlutá až nazelenalá krystalická látka, která byla poprvé izolována v krystalické formě v roce 1956 ze *Streptomyces* ze vzorku peruánské půdy Henry W. Dionem.⁽¹⁾ V této publikaci byla také poprvé charakterizována.

Tato látka je nestabilní při vyšších teplotách a v silně bazickém a kyselém prostředí. Optimální pH pro jeho stabilitu je 4,5-6,5. DON je dobře rozpustný ve vodě, vodných roztocích alkoholů (MeOH, EtOH) a acetonu. Naopak v absolutních alkoholech je rozpustný velmi špatně. Specifická optická rotace byla stanovena na $[\alpha]^{26}_D +21^\circ$ (5,4% ve vodě). Infračervené spektrum vykazuje silné signály v oblastech 3135, 3012, 2646, 2146 (diazoketon), 1629, 1587, 1517 a 1393 cm^{-1} . Díky volné aminoskupině na α -uhlíku ve struktuře DONu lze využít důkazové reakce s ninhydrinem za vzniku hnědého zbarvení.



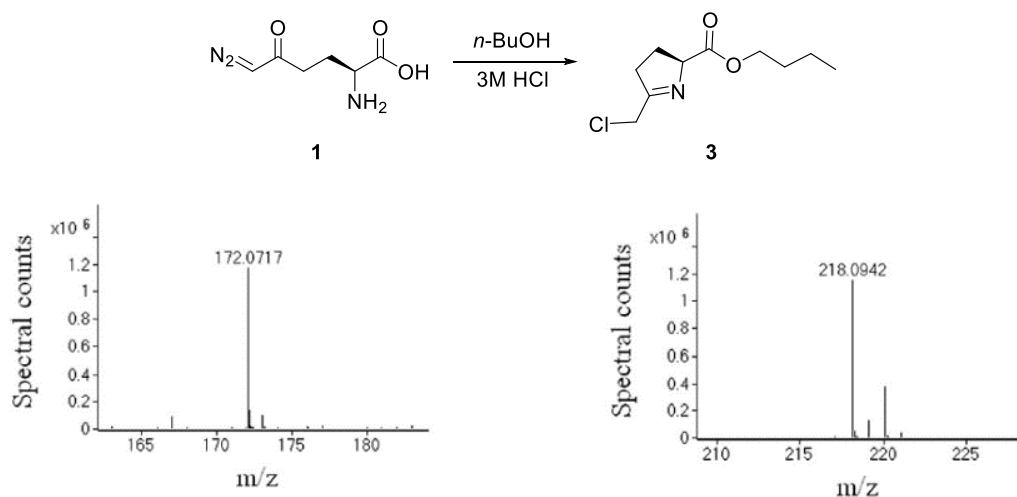
Maux⁽³⁾ studoval chování *O*- a *N*-chráněného DONu za katalýzy metaloporfyriny (Ru, Fe), které představovaly model hemových enzymů, aby tak docílil lepšího pochopení chování DONu *in vivo*. Pomocí těchto katalyzátorů se podařilo uskutečnit intermolekulární reakce jako je dimerizace či cyklopropanace. Chování samotného DONu bez chránících skupin bylo sledováno při reakci s Ru(CO)(TPPS) ve vodě za vzniku kyseliny 5-keto-L-pipekolové **2**.

Schéma 1: Reaktivita DONu za katalýzy metaloporfyriny.⁽³⁾



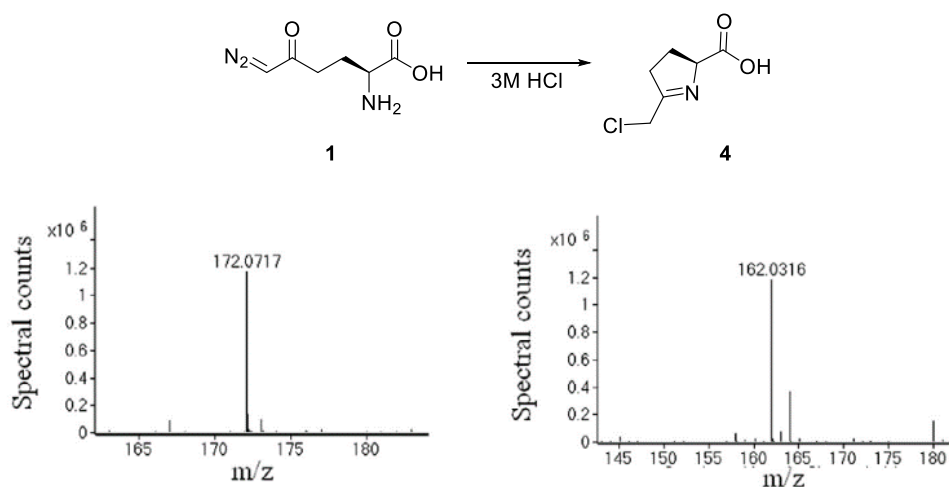
Pomocí LC-MS analýzy⁽⁴⁾ bylo sledováno chování DONu v prostředí 3M HCl. V přítomnosti *n*-butanolu došlo k esterifikaci DONu za vzniku stabilního chlorovaného produktu, jehož molekulový vzorec byl ze získaného hmotnostního spektra stanoven na C₁₀H₁₆ClNO₂ s navrženou strukturou **3**. Začlenění chlorového atomu do struktury produktu bylo zřejmé z naměřených hodnot v hmotnostním spektru, kdy molekulový pík [M] (m/z 218,0942) a [M+2] ion (m/z 220,0912) byly v charakteristickém isotopickém poměru 3:1.

Schéma 2: Reaktivita DONu v kyselém prostředí v přítomnosti *n*-butanolu s naměřenými hmotnostními spektry.⁽⁴⁾



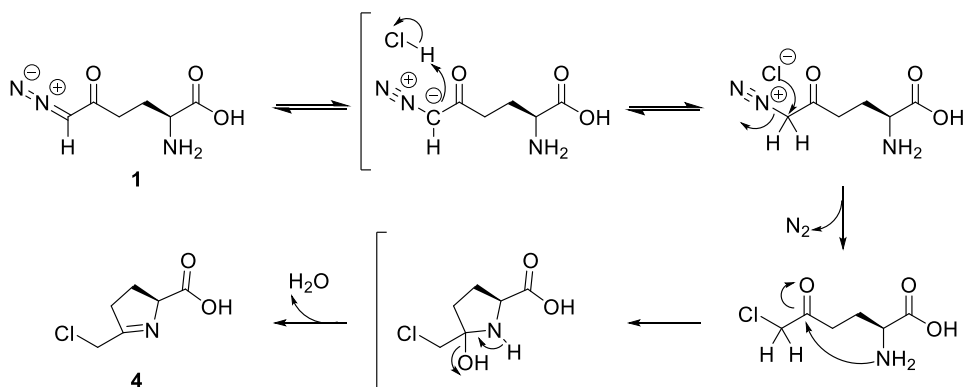
Stabilita DONu byla dále studována pomocí LC-MS v kyselém vodném prostředí bez přítomnosti *n*-butanolu. V naměřeném hmotnostním spektru byla odečtena hodnota m/z 162,0316, která odpovídá molekulovému vzorci C₆H₈ClNO₂. Navrženou strukturu **4** potvrzuje hodnota m/z, která zároveň odpovídá molekulové hmotě látky **3** bez butylu.

Schéma 3: Derivatizační reakce DONu v kyselém prostředí bez přítomnosti *n*-butanolu s naměřenými hmotnostními spektry.⁽⁴⁾



Reaktivní aminoskupina látky **1** intramolekulárně nukleofilně atakuje karbonyl diazoketoskupiny a dochází k ireverzibilnímu vytvoření cyklického iminu **4** za současného odstoupení molekuly vody. Mechanismus této přeměny je popsán ve Schématu 4.

Schéma 4: Navržený mechanismus derivatizační reakce DONu s 3M HCl bez přítomnosti *n*-butanolu.⁽⁴⁾

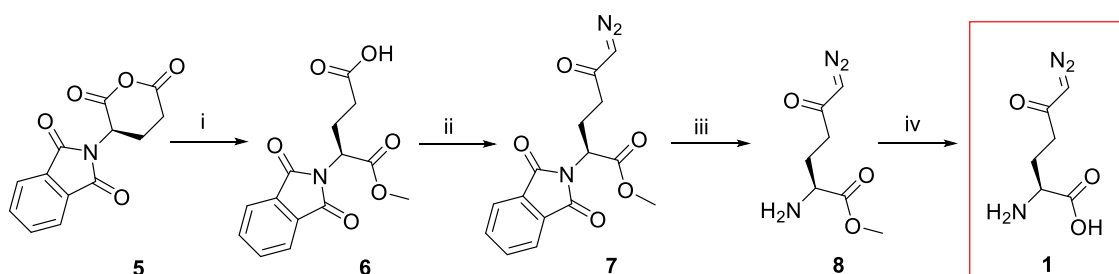


3.2 Syntetické přístupy k DONu

V odborné literatuře bylo publikováno několik různých přístupů⁽⁵⁻⁸⁾ vedoucích k syntéze 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu. V následujících odstavcích je popsáno několik z nich včetně publikace, která se stala předlohou pro přípravu základního skeletu **41** v mé práci. Největším problémem, se kterým se snažilo mnoho syntetických skupin zejména v počátcích vypořádat, byly nízké výtěžky.

DeWald a Moore⁽⁵⁾ vycházeli ve své práci z anhydridu kyseliny *N,N*-ftaloyl-L-glutamové **5**.

Schéma 5: Syntéza DONu podle DeWalda a Moora s výchozí látkou **5**.^{a, (5)}

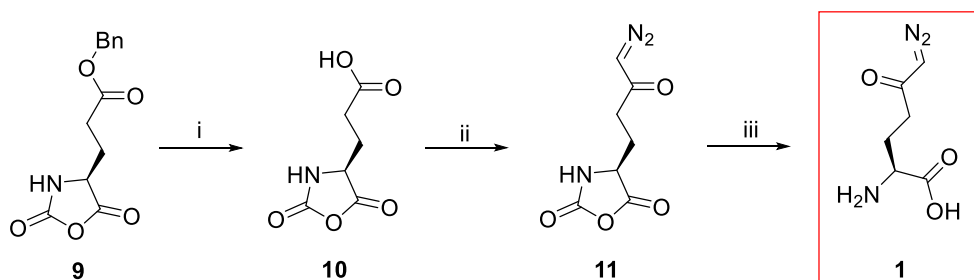


^a**Reakční podmínky:** (i) NaOMe, MeOH, 56%; (ii) a) PCl₅, Et₂O; b) CH₂N₂; (iii) N₂H₄, DCM; (iv) a) NaOH, MeOH, 0 °C; b) HCl, 4%.

Látka **5** byla převedena na methylester kyseliny *N,N*-ftaloyl-L-glutamové **6** esterifikací methoxidem sodným v methanolu. Sloučenina **6** byla dále převedena reakcí s PCl₅ na chlorid kyseliny a následně na diazoketon **7** reakcí s diazomethanem. Ftaloylová skupina byla z látky **7** odstraněna reakcí s hydrazinem v DCM. Vzniklý methylester **8** byl převeden na sodnou sůl hydrolyzou ve vodném methanolu obsahujícím NaOH. Následným okyselením pomocí HCl na pH 6,5 byl získán DON **1** ve výtěžku 4 %.

Jiná DeWaldova a Moorova metoda⁽⁵⁾ vychází z benzylesteru kyseliny 2,5-dioxo-4-oxazolidinpropionové **9**.

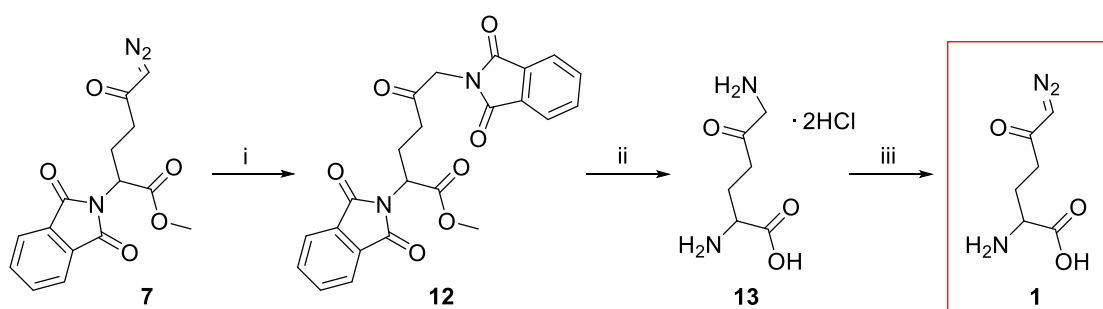
Schéma 6: Syntéza DONu podle DeWalda a Moora s výchozí látkou **9**.^{b, (5)}



^bReakční podmínky: (i) H₂, Pd-C; (ii) a SOCl₂; b CH₂N₂; (iii) H₂O, NaOH, 5%.

Benzylester **9** je hydrogenací za použití Pd/C debenzylován a poskytuje kyselinu 2,5-dioxo-4-oxazolidinopropionovou **10**. Ta je dále převedena pomocí SOCl₂ na chlorid kyseliny a následně reakcí s diazomethanem na diazoketon **11**. Oxazolidinový kruh látky **11** je v posledním kroku bazicky otevřen reakcí s vodným NaOH za zisku DONu **1** ve výtěžku 5%.

Schéma 7: Syntéza DONu podle DeWalda a Moora s výchozí látkou **7**.^{c, (5)}



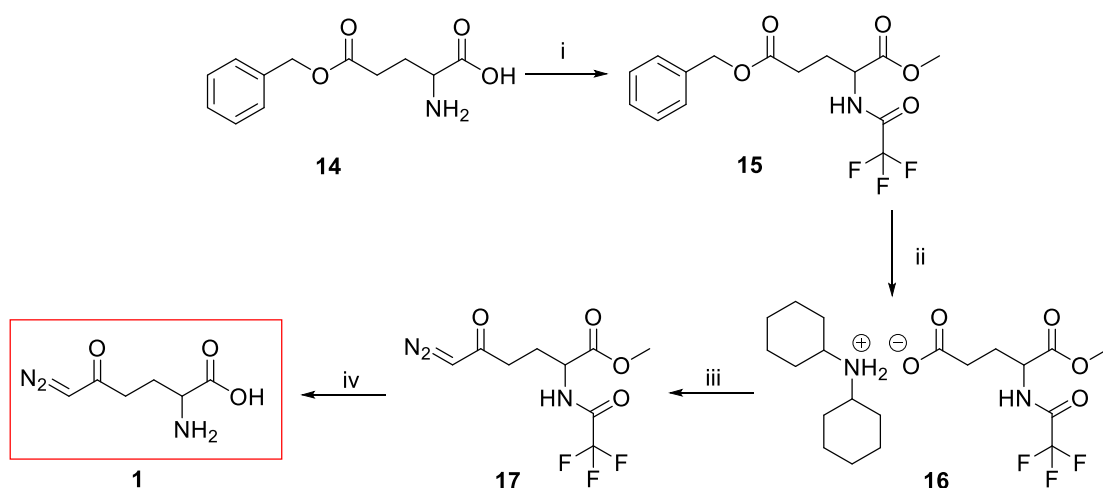
^cReakční podmínky: (i) HCl; ftalimid draselný; (ii) HCl, H₂O; (iii) NaOH, NaNO₂, H₂O, 8%.

DeWald a Moore publikovali⁽⁵⁾ také přípravu racemické směsi DONu. Pro tento účel byla aplikována první z výše uvedených metod, kdy použitou výchozí látkou byl methylester kyseliny *N,N*-ftaloyl-DL-glutamové **6** připravený z DL- formy anhydridu **5**. DON **1** byl také syntetizován kyselou hydrolyzou methylesteru kyseliny 5-oxo-DL-diftalimidohexanové **12** za vzniku 2,6-diamino-5-oxohexanové kyseliny **13**. Následnou diazotací koncové aminoskupiny byla připravena látka **1** ve výtěžku 8%.

Pettit a Nelson⁽⁶⁾ popsali postup přípravy DONu vycházející z komerčně dostupného benzylesteru kyseliny glutamové **14** (viz Schéma 8). Volná α -aminoskupina

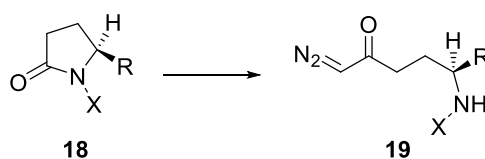
látky **14** byla nejprve ochráněna pomocí methylesteru kyseliny trifluoroctové a reakcí s tetramethylguanidinem byla karboxylová skupina převedena na methylester **15**. Hydrogenací benzylesteru látky **15** katalyzovanou Pd/C došlo k deprotekcí karboxylové funkční skupiny, a následným přidavkem dicyklohexylaminu byla vytvořena dicyklohexylamoniová sůl **16**. Ta byla působením s oxalylchloridu převedena na chlorid kyseliny, který následně reakcí s diazomethanem vytvořil diazoketon **17**. Posledním krokem této syntézy byla deprotekcce α -aminoskupiny a odstranění methylesteru v bazickém prostředí, následným okyselením směsi vznikl produkt **1**.

Schéma 8: Syntéza DONu podle Pettita a Nelsona.^{d, (6)}



^d**Reakční podmínky:** (i) **a** methylester kys. trifluoroctové, TMG, 0 °C; **b** CH₂N₂, Et₂O, 0 °C, 90%; (ii) **a** H₂, Pd/C, EtOH; **b** dicyklohexylamin, Et₂O, 95%; (iii) oxalylchlorid, DCM, CH₂N₂, 0 °C, 16%; (iv) **a** NaOH, MeOH, 0 °C; **b** HCl, 88%.

Coutts a Saint⁽⁷⁾ optimalizovali podmínky přípravy DONu z výchozí látky strukturního typu **18**. Jejich snahou bylo nalézt co nejvhodnější chránící skupinu X pro α -aminoskupinu, tedy takovou, která je odstranitelná za podmínek, které budou kompatibilní se zachováním diazo a ketoskupiny.



Bylo využito chránících skupin *t*-Boc a Fmoc v kombinaci s různými substituenty R. Pyrrolidinonový kruh látky **18** byl vždy otevřen pomocí lithné soli TMSD v THF při nízkých teplotách kolem -100 °C za vzniku odpovídající látky **19**. Výtěžky těchto reakcí byly velmi dobré, většina překročila 60%. Přehled použitých substituentů a dosažených výtěžků je uveden v Tabulce 1.

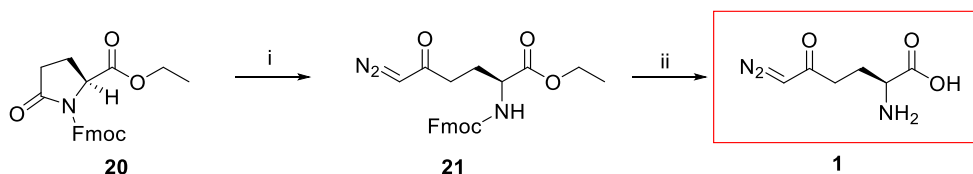
Tabulka 1: Použité substituenty a chránící skupiny při syntéze derivátů DONu.^{e, (7)}

| R | H | H | CO ₂ Et | CO ₂ CH ₂ Ph | CO ₂ <i>t</i> -Bu | CO ₂ Et | CO ₂ CH ₂ Ph |
|-------------|---------------|------|--------------------|------------------------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------------|
| X | <i>t</i> -Boc | Fmoc | <i>t</i> -Boc | <i>t</i> -Boc | <i>t</i> -Boc | Fmoc | Fmoc |
| Výtěžek (%) | 60 | 69 | 66 | 71 | 75 | 72 | 61 |

^eVýtěžky jsou uvedeny po kapalinové chromatografii.

Následná deprotektce aminoskupiny probíhala nejlépe pro látku **19** s navázanou chránící skupinou Fmoc, kdy substituent R představoval CO₂Et. Reakcí s piperidinem byl připraven DON **1** ve vysokém výtěžku 81%.

Schéma 9: Syntéza DONu podle Couttse a Santa za využití optimalizovaných podmínek.^{f, (7)}



^fReakční podmínky: (i) TMSD, BuLi, THF, -100 °C; (ii) a) piperidin; b) H₂O.

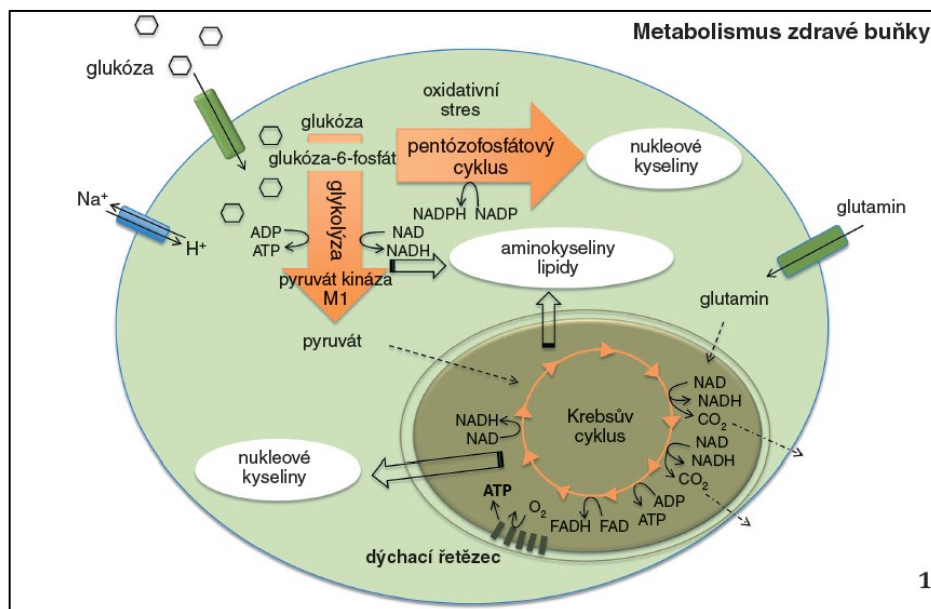
Walker⁽⁸⁾ připravil DON a jeho analogy, které byly dále testovány jako možné inhibitory glukosamin syntetázy (L-glutamin:D-fruktóza-6-fosfát amidotransferázy). Vycházel z γ -*t*-butylesteru kyseliny *N*-Fmoc-glutamové **22**. Volná α -karboxylová skupina byla diazomethanem převedena na methylester **23**. V dalším kroku byla *tert*-butylová skupina odstraněna v kyselém prostředí TFA za vzniku látky **24**. Reakcí této látky s isopropenyl-chlorformiátem v přítomnosti báze *N*-methylmorfolinu byl vytvořen příslušný chlorid kyseliny, který byl bez izolace okamžitě dále převeden reakcí s diazomethanem na diazoketon **25**. Ten po deprotektci α -aminoskupiny a odstranění methylesteru pomocí 4M NaOH poskytl DON **1**.

kde dochází k vytvoření NADPH, důležitého pro tvorbu mastných kyselin, a glukóza-5-fosfátu, který je využit pro syntézu nukleotidů.

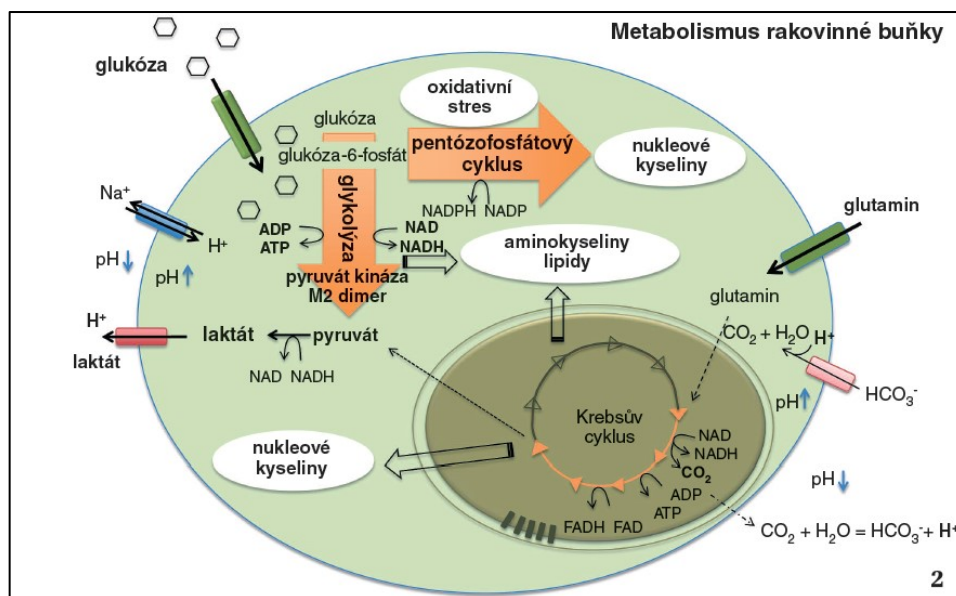
Glutamin je v mitochondrii přeměněn přes glutamát na α -ketoglutarát, což je jeden z meziproductů Krebsova cyklu. Je také zdrojem dusíku při syntéze aminokyselin a nukleotidů.

Zdravé buňky tvoří energii právě spřažením glykolýzy, Krebsova cyklu a hlavně dýchacího řetězce, ve kterém je vytvořena většina molekul ATP. U rakovinných buněk je tomu ale jinak. Jejich spotřeba glukózy i glutaminu je několikanásobně vyšší ve srovnání se zdravou buňkou, kdy až 60% ATP vytváří anaerobní glykolýzou, zatímco činnost Krebsova cyklu a dýchacího řetězce je téměř potlačena. Aktivuje se tedy mechanismus anaerobní glykolýzy i přesto, že rakovinné buňky mají dostatek kyslíku. Ač se tato varianta může zdát z počátku energeticky nevýhodná, je třeba vzít v úvahu, že rychlost glykolýzy odprážené od Krebsova cyklu je až stonásobně vyšší, proto i zisk ATP je ve výsledku větší. K tomu je však potřeba již zmíněný vysoký příjem glukózy. Častější využití pentózofosfátového cyklu má také výhodu v tom, že se tvoří více NADPH, které je nutné pro činnost glutathionu chránícího rakovinnou buňku před velkým množstvím uvolňujících se radikálů.

Obrázek 1: Schéma metabolismu zdravé buňky.⁽¹⁰⁾



Obrázek 2: Schéma metabolismu rakovinné buňky.⁽¹⁰⁾

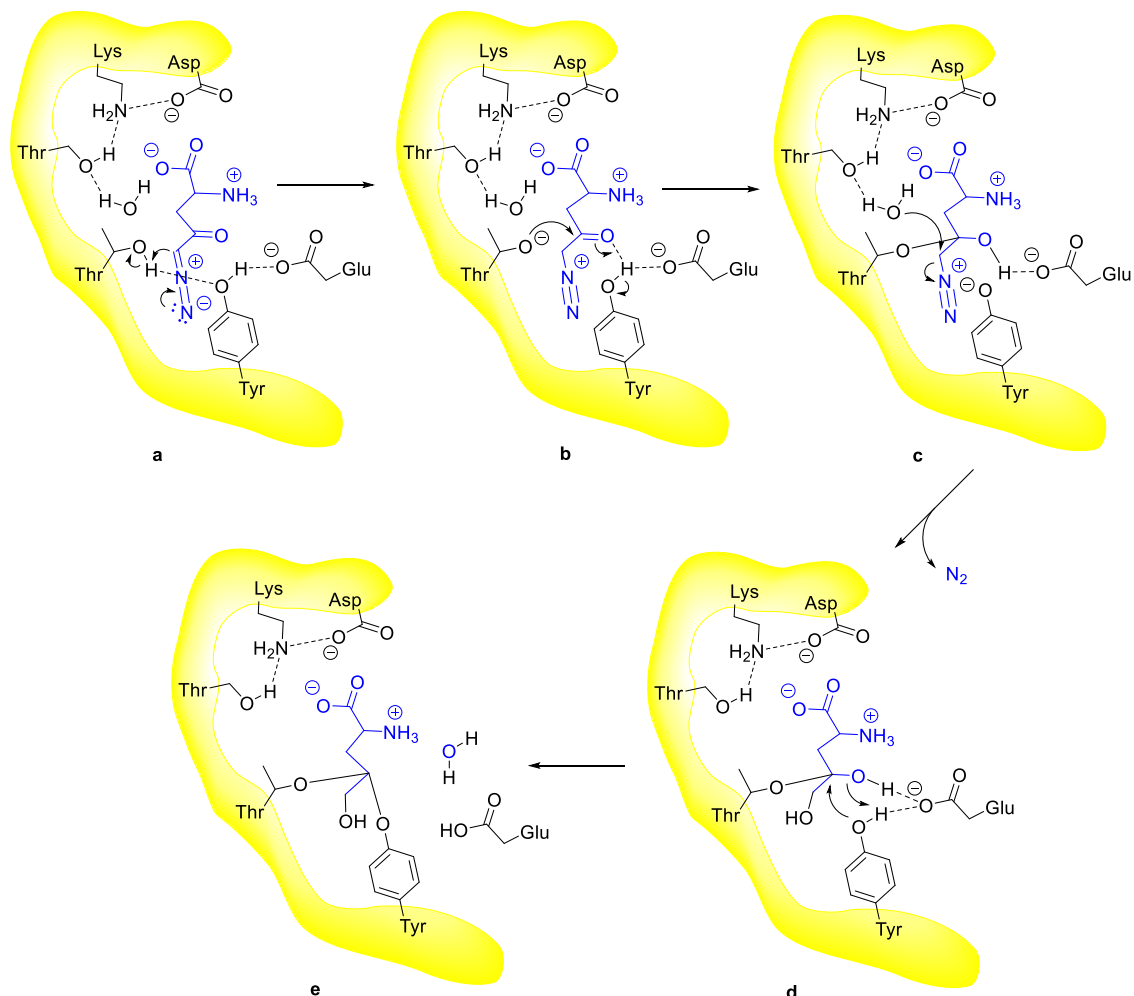


Glutamin potřebuje rakovinná buňka nejen pro syntézu aminokyselin a nukleotidů, ale také pro udržení alespoň částečného využívání Krebsova cyklu, neboť nemá přísun pyruvátu z glykolýzy. α -Ketoglutarát může být přeměněn na citrát a ten pak na acetyl-CoA nutný pro syntézu lipidů. Zároveň si také zajistí přísun NADH a $FADH_2$ nutných pro mitochondriální respiraci.

DON v organismu působí mimo jiné jako inhibitor enzymů s glutaminázovou aktivitou.⁽¹¹⁾ Tyto enzymy patří do třídy amidohydroláz a katalyzují hydrolýzu glutaminu (Gln) na kyselinu glutamovou (Glu) a amoniak. Struktura aktivních míst glutaminázových domén se liší u jednotlivých typů enzymů.

Jedním z příkladů je glutamináza z bakterií *Pseudomonas*. Předpokládaný mechanismus navázání substrátu enzymem je zobrazen v Obrázku 3. Aktivní místo této glutaminázy je tvořeno kyselinou asparagovou, lysinem (Lys), dvěma threoniny (Thr) a tyrosinem (Tyr). Asp a Lys udržují tvar aktivního místa, naproti tomu Thr a Tyr se přímo účastní reakce se substrátem. Thr nejprve aktivuje diazoketon donací protonu ze své hydroxylové skupiny za tvorby diazoniového iontu (**b**) a následně nukleofilně atakuje karbonyl takto aktivované látky **1** za vzniku tetraedrického intermediátu (**c**). Vzápětí voda nukleofilně substituue α -uhlík za odstoupení molekuly dusíku ve formě plynu. Inhibitor tak zůstane kovalentně navázan na enzymu (**d,e**).

Obrázek 3: Předpokládaný mechanismus inhibice glutaminázy z bakterií *Pseudomonas* látkou **1**.⁽¹¹⁾



Jiným příkladem je glutamin-dependentní NAD^+ syntetáza,⁽¹²⁾ která obsahuje celkem 8 glutaminázových domén. V aktivním místě každé z těchto domén (viz Obrázek 4) je mimo jiných aminokyselin připojen také cystein (Cys176), který nukleofilně atakuje diazoketon **1** za odstoupení molekuly dusíku. Tím vzniká kovalentní vazba mezi atomem síry cysteinu a uhlíkovým atomem DONu a enzym je tak DONem ireverzibilně inhibován. Reakční mechanismus této ireverzibilní inhibice je uveden ve Schématu 11.

Obrázek 4: Aktivní místo glutaminázové domény glutamin-dependentní NAD^+ syntetázy.⁽¹²⁾

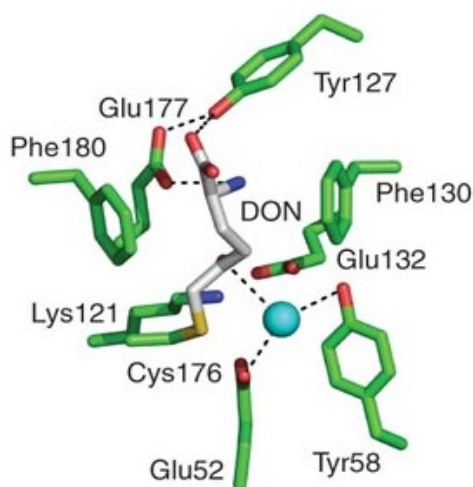
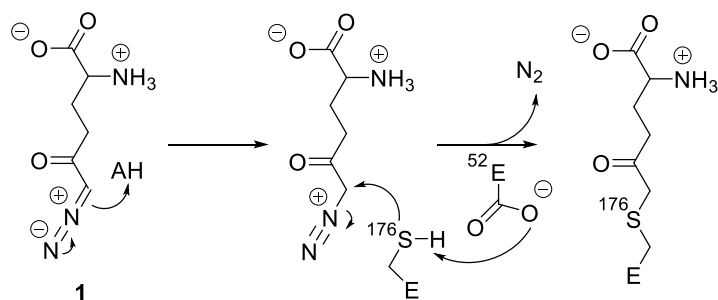


Schéma 11: Mechanismus ireverzibilní inhibice glutamin-dependentní NAD^+ syntetázy DONem.⁽¹²⁾



3.3.2 Klinická studie využívající DON

Nejstarší klinická studie provedená na DONu byla publikována⁽²⁾ v roce 1957. Pacienti byli lidé s různými druhy neodoperovatelných nádorů či dosud neléčitelných forem rakoviny v různě pokročilém stádiu nemoci a v různých věkových kategoriích (17-70 let). Zkoumaný vzorek populace byl tvořen 28 ženami a 35 muži, celkem tedy 63 pacienti. Látka byla pacientům podávána intravenózně ve fyziologickém roztoku v koncentraci 5 nebo 10 mg/ml, nebo orálně v kapslích plněných laktózou obsahujících 5 či 10 mg DONu. Pacienti byli schopni tolerovat dlouhodobě dávky mezi 0,1-0,3 mg/kg denně.

Tabulka 2: Výsledky klinické studie využívající DON.⁽²⁾

| Diagnóza | Počet pacientů | Počet pacientů s terapií delší než 2 týdny | Počet pacientů s regresí nádoru* | Počet pacientů s žádnou regresí ani progresí nádoru* | Počet pacientů s hyperkalcemií* |
|-----------------------------|----------------|--|----------------------------------|--|---------------------------------|
| Rakovina prsu | 18 | 14 | 2 | 10 | 2 |
| Bronchogenní karcinom | 12 | 9 | 2 | 7 | 0 |
| Nádory trávicího traktu | 7 | 6 | 1 | 5 | 0 |
| Nádory reprodukčních orgánů | 8 | 5 | 1 | 4 | 0 |
| Melanom | 5 | 4 | 0 | 4 | 0 |
| Ostatní nádory | 6 | 4 | 0 | 2 | 2 |
| Hodgkingův lymfom | 5 | 4 | 1 | 3 | 0 |
| Leukémie | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Celkem | 63 | 47 | 7 | 36 | 4 |

*Součty jsou uvažovány z počtu pacientů s terapií delší než 2 týdny.

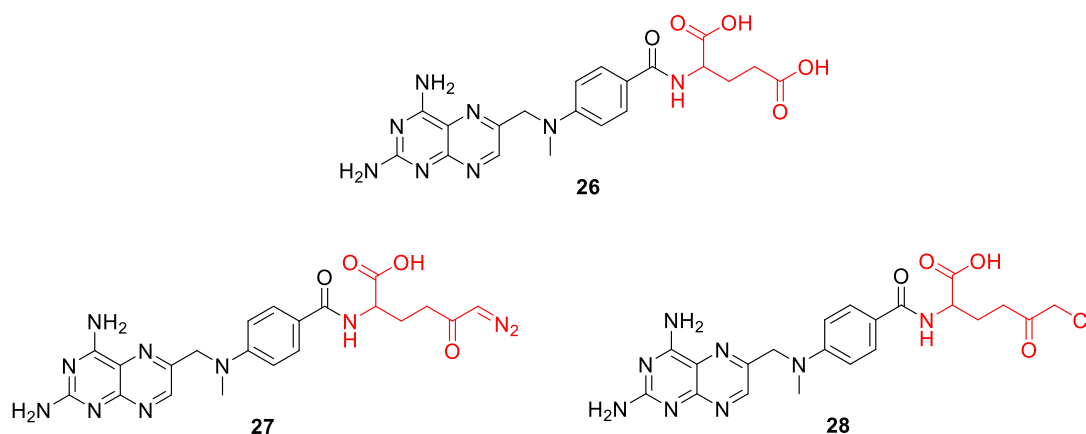
Tabulka 2 demonstruje výsledky této studie. Z celkového počtu 63 pacientů jich bylo testováno pouze 47 po dobu delší než dva týdny. Zbylých 16 respondentů pak ukončilo užívání DONu dříve vzhledem k velmi pokročilému stádiu nemoci. U sedmi jedinců bylo pozorováno značné snížení velikosti nádoru. U skupiny 36 pacientů pak nebyla prokázána žádná regrese nemoci, ale ani její další vývoj.

Během terapie DONem však byly pozorovány také nežádoucí vedlejší účinky. Toxicita DONu se projevila nejvýrazněji ve formě poškození sliznice dutiny ústní, a to v 83% případů. Dalšími častými vedlejšími účinky byly průjem (48%), žaludeční nevolnosti a zvracení (30%) a krvácení do zažívacího traktu (16%). U čtyř pacientů (6%) se projevila také hyperkalcemie. Dalšími studiemi bylo prokázáno, že adenin potlačuje orální toxicitu DONu, zatímco u ostatních vedlejších účinků toto tvrzení prokázáno nebylo. Na základě této studie nebylo možné říci, že je DON vzhledem k jeho toxicitě ideálním klinickým kandidátem pro léčbu rakoviny. Na druhou stranu však byla jasně potvrzena jeho antitumorová aktivita u lidí. Proto byly vypracovány

další studie, kde je DON využit v kombinaci s jinými látkami, které by měly potlačit jeho vedlejší účinky.⁽¹³⁻¹⁴⁾

3.4 Analogy DONu

DON našel své uplatnění zejména v kombinaci s jinými látkami. Methotrexát **26** je známé chemoterapeutikum.⁽¹⁵⁻¹⁶⁾ Působí jako inhibitor dihydrofolát reduktázy, která se podílí na tvorbě kyseliny tetrahydrofolové. Ta je zodpovědná za tvorbu purinových bází, tedy v širším pohledu dochází k inhibici tvorby DNA. Gangjee⁽¹⁷⁾ hledal analogy methotrexátu, které budou vykazovat vyšší selektivitu a odolnost. Jakákoli modifikace v α -poloze vedla pouze ke snížení biologické aktivity daného derivátu vůči samotnému methotrexátu. Pozitivní výsledky však vykazovala substituce γ -karboxylu za diazoketon či chlormethylketon. Byly popsány dva deriváty methotrexátu, a to 4-amino-4-deoxy- N^{10} -methylpteroyl-(6-diazo-5-oxo)-L-norleucin **27** a 4-amino-4-deoxy- N^{10} -methylpteroyl-(6-chlor-5-oxo)-L-norleucin **28**. U obou připravených látek byla zjištěna značná antifolátová aktivita. Látky **27** a **28** inhibovaly růst leukemických buněk L-1210 v kultuře z 50% v koncentraci 0,4 μ M (**27**) a 0,2 μ M (**28**). Tyto dvě látky byly také identifikovány jako efektivní inhibitory syntézy thymidylátu v L-1210 buňkách *in vitro*.



Jiné deriváty DONu připravil Walker.⁽⁸⁾ Tyto látky se ukázaly být vhodnými inhibitory glukosamin syntetázy u *Escherichia Coli*. Glukosamin syntetáza patří mezi aminotransferázy, které mají v aktivním místě nukleofilní cystein. Na něj může být připojen DON. Walker hledal elektrofilní analogy glutaminu, které by byly vhodnějšími

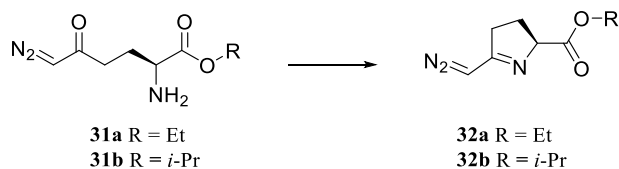
inhibitory tohoto enzymu. Nejnadějnějším derivátem byla γ -dimethylsulfoniová sůl glutaminu **29**, která se kovalentně váže na enzym. Lepší výsledky než samotný DON vykazoval také brommethyl keton **30**.



Ve snaze o snížení toxicity DONu a zlepšení distribuce sloučeniny v organismu byly v naší skupině různými modifikacemi připraveny nové deriváty, tzv. proléčiva DONu.⁽¹⁸⁾ Nejvíce reaktivní funkční skupinou této látky je diazoketon, který ovšem není pro modifikaci vhodný, neboť vede k nestabilním látkám (ketaly) či k látkám, které se nepřemění na DON (cyklický diazo-imin). Proto byly prováděny strukturální modifikace zbylých dvou funkčních skupin, tedy aminoskupině a karboxylu.

Nejprve byly připraveny jednoduché estery (ethyl **31a**, isopropyl **31b**) DONu, které ovšem vykazovaly značnou nestabilitu a ireverzibilně přecházely (viz Schéma 12) na cyklickou diazo-iminovou formu.

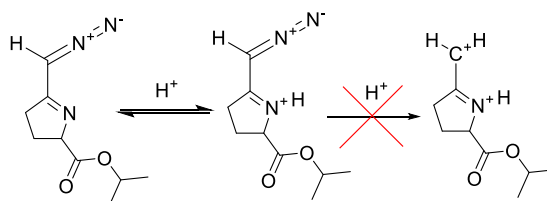
Schéma 12: Cyklizace ethylesteru DONu na diazo-imin.^{h, (18)}



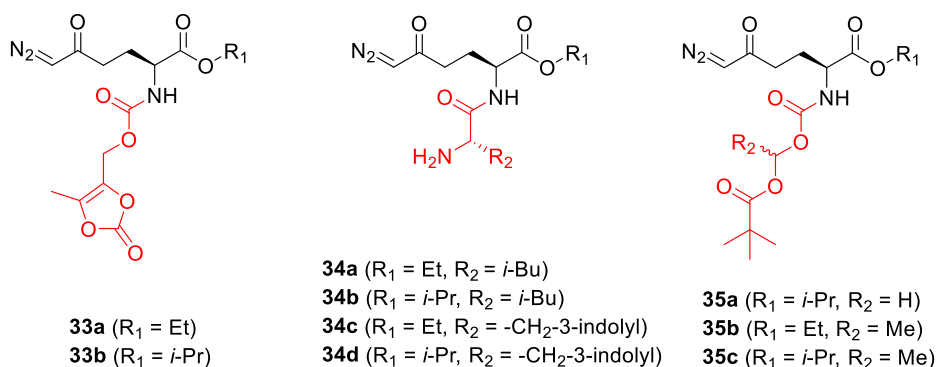
^hReakční podmínky: CH₃CN, 60 °C, 2 h, 50%.

U Schiffových bází je tato přeměna v kyselém prostředí reverzibilní. V tomto případě je tomu ale jinak, neboť Schiffovy báze **32a-b** jsou stabilizovány nejen vytvořeným pětičlenným cyklem, ale také připojenou diazorskupinou. K odštěpení molekuly N₂ dochází až v extrémně kyselém prostředí 1M HCl.

Schéma 13: Stabilita Schiffových bází s připojenou diazokupinou.

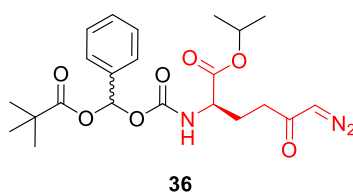


Z důvodu zjištěné nestability byla tudíž maskována kromě karboxylu i aminoskupina. Primárně byly použity tři série substituentů - (oxodioxolenyl)methyl karbamáty (**33a-b**), dipeptidy (**34a-d**) a *N*-(pivaloyloxy)alkoxy-karboonyly (POM) (**35a-c**). Zatímco všechny tyto látky byly nestabilní v myší plazmě, kde byly zcela metabolizovány během 60 minut, v opičí a lidské plazmě byla zkoumaná proléčiva mnohem stabilnější, zejména pak látky **35b** a **35c**, které po 60 minutách inkubační doby zůstaly v nezměněné podobě v opičí plazmě z 60-75% a v lidské plazmě z 80-90%. Tyto látky jsou tedy možnými klinickými kandidáty pro léčbu pacientů s multifórním glioblastomem (GBM) a jsou dále testovány.

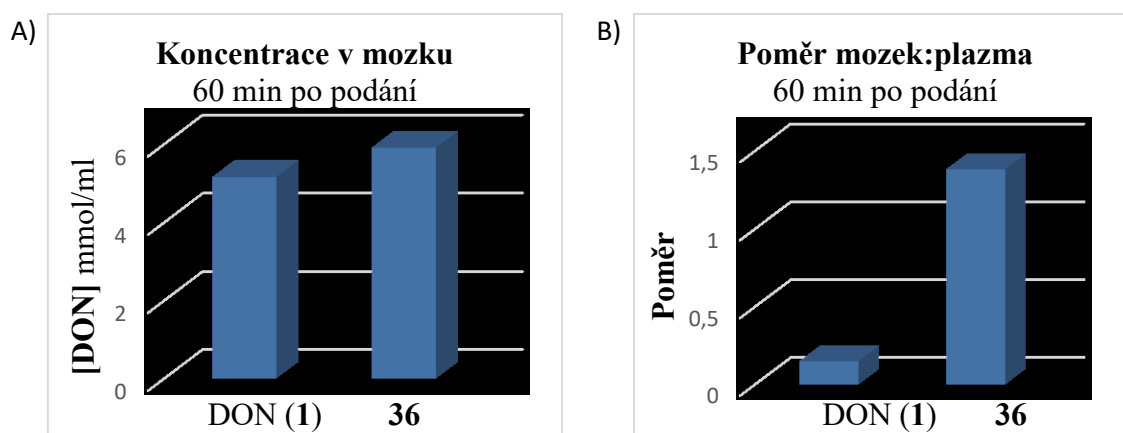


Vývoj dalších sérií proléčiv byl zaměřen na neurokognitivní poruchy spojené s HIV (HAND, HIV-associated neurocognitive disorders)⁽¹⁹⁻²⁰⁾. Jedná se o neurologické poruchy různého charakteru projevující se například poruchami řeči či motorickými problémy. Dochází k poškození mozkových buněk virem HIV v důsledku nadprodukce glutamátu. DON snižuje syntézu glutamátu v buňkách postižených HIV díky své schopnosti inhibice glutaminázy a je tedy potenciálním lékem. Díky své toxicitě však není samostatně využíván.

Pro účely možné léčby bylo navrženo a syntetizováno několik *N*-(pivaloyloxy)alkoxy-karbonyl substituovaných derivátů, které by se neměly rozpadat na DON už v plazmě, ale k samotné biotransformaci by mělo dojít až v mozku. Nejlepší výsledky vykazoval isopropyl 6-diazo-5-oxo-2-(((fenyl(pivaloyloxy)methoxy)-karbonyl)amino)hexanoát **36**, který byl stabilní v prasečí i lidské plazmě a v prasečím mozkovém homogenátu byl snadno biotransformován na DON **1**. V provedených finálních studiích na prasatech byl při přibližně stejné koncentraci látek **36** a **1** v mozku poměr mozek:plazma u látky **36** 9,3krát vyšší než u látky **1**. To jednoznačně vypovídá o pomalejším uvolňování látky **36** do plazmy.



Graf 1: A) Koncentrace látek **1** a **36** v mozku prasete 60 min po podání; B) Poměr mozek:plazma látek **1** a **36** 60 min po podání.



Tabulka 3: Koncentrace látek **1** a **35** v mozku, plasmě a CSF prasete 60 min po podání (ekvivalent 1,6 mg/kg).

| Látka | Mozek (nmol/g) | | Plazma (nmol/ml) | | CSF (nmol/ml) |
|-----------|----------------|---------------|------------------|-------------|---------------|
| | Celkem | volný | celkem | volný | celkem |
| 1 | 5,15 ± 1,40 | 0,464 ± 0,126 | 41,2 ± 12,2 | 32,5 ± 9,64 | 0,252 |
| 36 | 5,90 ± 0,590 | 0,531 ± 0,053 | 4,88 ± 1,50 | 3,86 ± 1,19 | 1,10 |

Tabulka 4: Poměry mozek:plazma u látek 1 a 35 v praseti 60 min po podání (ekvivalent 1,6 mg/kg).

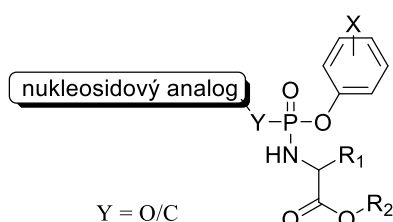
| Látka | Mozek:plazma | |
|-----------|----------------------|---------------|
| | celkem:celkem | volný:volný |
| 1 | 0,148 ± 0,078 | 0,017 ± 0,001 |
| 36 | 1,38 ± 0,544 | 0,157 ± 0,062 |

4. Výsledky a diskuse

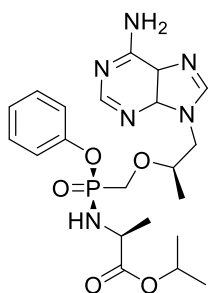
4.1 ProTide přístup

Pro objasnění volby přípravy nových proléčiv je třeba na začátek vysvětlit očekávaný metabolismus těchto látek v organismu.

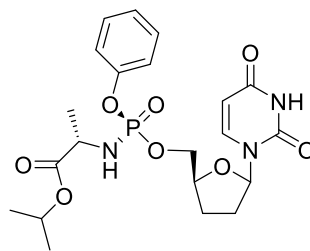
Proléčiva označovaná jako ProTide⁽²¹⁾ jsou nukleosidové analogy monofosfátů a monofosfonátů. Hydroxyly jejich monofosfátových či monofosfonátových skupin jsou maskovány aromatickým substituentem a esterem aminokyseliny, který je pak v buňce enzymaticky štěpen za uvolnění nukleosid monofosfátu, resp. nukleosid monofosfonátu.



Koncept struktury a metabolismu ProTide proléčiv poprvé publikoval prof. McGuinan.⁽²²⁾ Příkladem látek založených na tomto principu jsou antivirové ProTidy Tenofovir Alafenamid (Tenofovir je látka připravená českým vědcem prof. Holým a jeho vědeckou skupinou)⁽²¹⁾ a Sofosbuvir, které byly úspěšně schváleny FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) a uvedena na trh.



Tenofovir Alafenamid

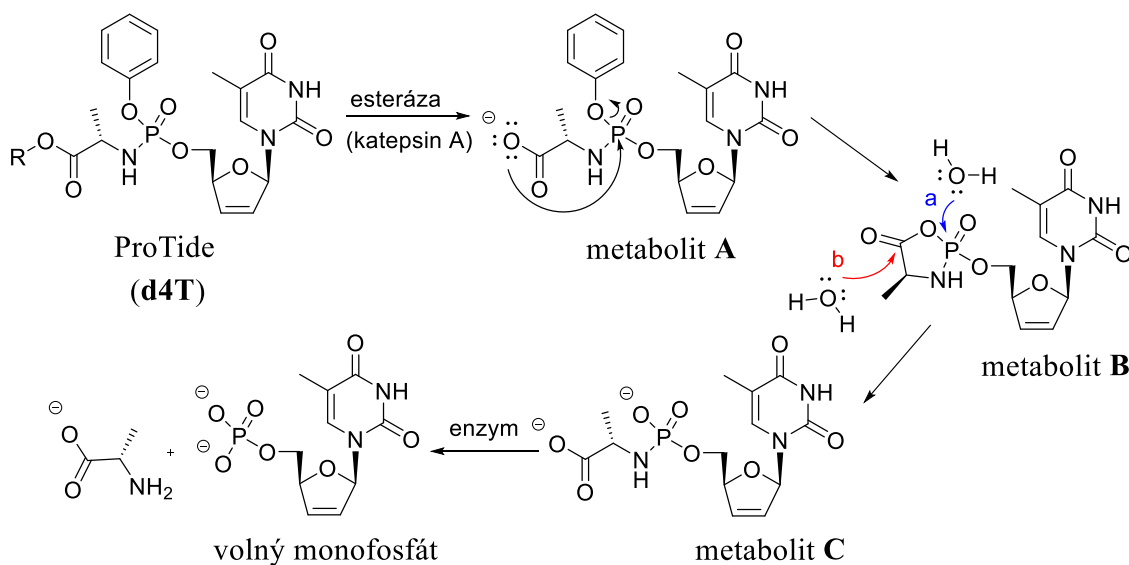


Sofosbuvir

ProTide proléčivo vstoupí do buňky za pomoci přenašeče či pasivní difúzí. Vně buňky k jeho štěpení nedochází, neboť esterázy lidské plazmy nejsou schopny hydrolyzovat ester sekundárního alkoholu. Uvnitř buňky je látka již esterázami

atakována a její esterová vazba v aminokyselinovém řetězci je štěpena. Jako hlavní esteráza účastnící se hydrolyzy esterů ProTidů byl identifikován katepsin A.

Schéma 14: Postulovaný reakční mechanismus ProTide proléčiv ukázaný na příkladu ProTidu 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidinu (**d4T**).⁽²¹⁾



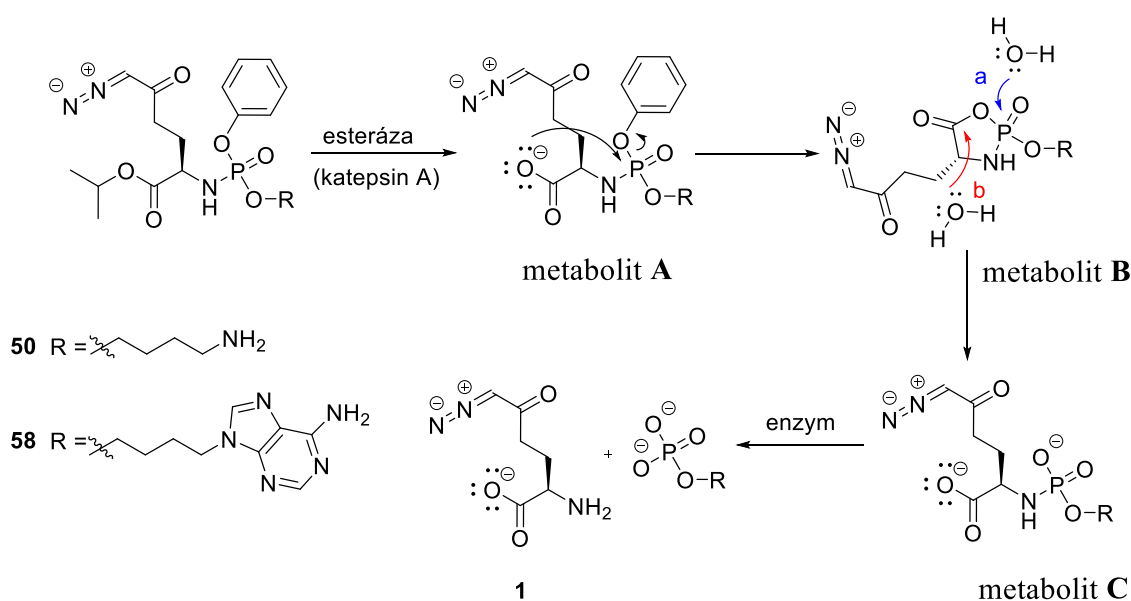
Ve Schématu 14 je naznačen reakční mechanismus metabolismu ProTidu 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidinu (**d4T**). Po odštěpení esteru z molekuly ProTide proléčiva dochází k nukleofilnímu ataku karboxylátu na fosfát za odstoupení aromatického substituentu a vytvoření vysoce nestabilního cyklického anhydridu **B**. Přistupující voda může s metabolitem **B** interagovat dvěma různými způsoby, a to buď nukleofilním atakem na fosfát (varianta **a**), nebo na karbonyl (varianta **b**). V obou případech můžeme očekávat stejný produkt **C**, který je následně enzymaticky štěpen za uvolnění nukleosid monofosfátu.

Analogický způsob metabolismu je předpokládán i u našich proléčiv **50** a **58** (viz Schéma 15). Katepsin A odštěpí isopropylester navázaného DONu. Poté dojde k cyklizaci látky na nestabilní anhydrid **A** za odstoupení aromatického substituentu - fenolátu. Následuje nukleofilní atak vody na metabolit **B** za otevření cyklu. Metabolit **C** je enzymaticky štěpen za uvolnění DONu **1**. Zatímco účinnou látkou je u ProTide proléčiv volný monofosfát, u našich proléčiv je to naopak odštěpená aminokyselina.

Volný fosfát je pouze pomocnou molekulou a účinnou látkou je volný DON. Jedná se tedy o tzv. reverzní ProTide.

Proléčiva **50** a **58** se liší navázanými skupinami R. Oba substituenty jsou zakončeny volnou aminoskupinou, která může být navázána na biologickou adresu, což je malá molekula, která se váže na receptor či transportér a působí přenos látky dovnitř buňky. K přednostnímu přenosu proléčiva do rakovinných buněk dochází kvůli vysoké metabolické aktivitě rostoucí rakovinné tkáně.

Schéma 15: Předpokládaný mechanismus metabolismu látek **50** a **58**.



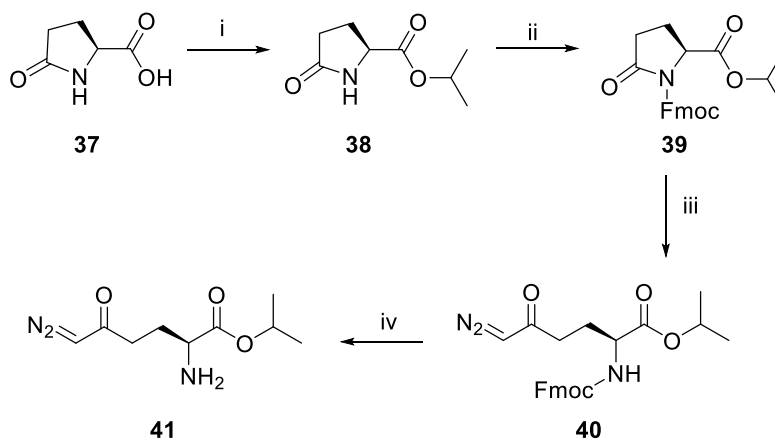
4.2 Příprava isopropylesteru 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu

Pro přípravu zamýšlených derivátů DONu bylo potřeba nejprve syntetizovat klíčový intermediát isopropylester 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu **41**. V následných transformacích byla substituována jeho volná aminoskupina.

Syntéza látky **41** byla inspirována již zmíněnou publikací Couttse a Santa.⁽⁷⁾ Výchozí látkou byla kyselina L-pyroglutamová (**37**), která byla nejprve převedena na isopropyl ester Fisherovou esterifikací. Ta byla provedena v 2-propanolu za přítomnosti katalytického množství kyseliny *p*-toluensulfonové. Reakční rovnováha byla posunuta ve prospěch produktu **38** použitím molekulových sít vychytávajících vznikající molekuly vody, které by mohly ester zpětně hydrolyzovat na volnou kyselinu.

Očekávaný produkt byl potvrzen naměřením ^1H NMR spekter, kde byly pozorovány charakteristické signály isopropylové skupiny, a to dublet s chemickým posunem 1,24 ppm a heptet s chemickým posunem 5,03 ppm a vzájemnou interakční konstantou 6,3 Hz.

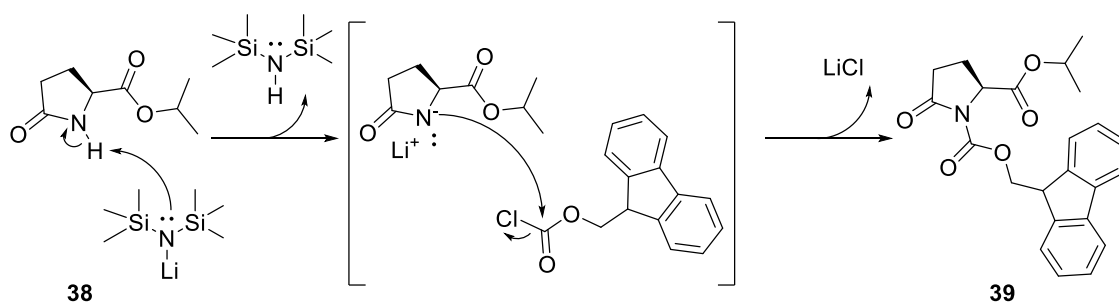
Schéma 16: Syntéza isopropylesteru 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu **41**.ⁱ



ⁱ**Reakční podmínky:** (i) kys. *p*-toluensulfonová, *i*-PrOH, lab. tep. až 100 °C, mol. síta, reflux, 17 h, 73%; (ii) LiHMDS, Fmoc-Cl, THF, -78 °C, 6 h, 92%; (iii) trimethylsilyldiazomethan, BuLi, THF, -116 °C až -78 °C, 3 h, 85%; (iv) piperidin, DCM, lab. tep., 4,5 h, 72%.

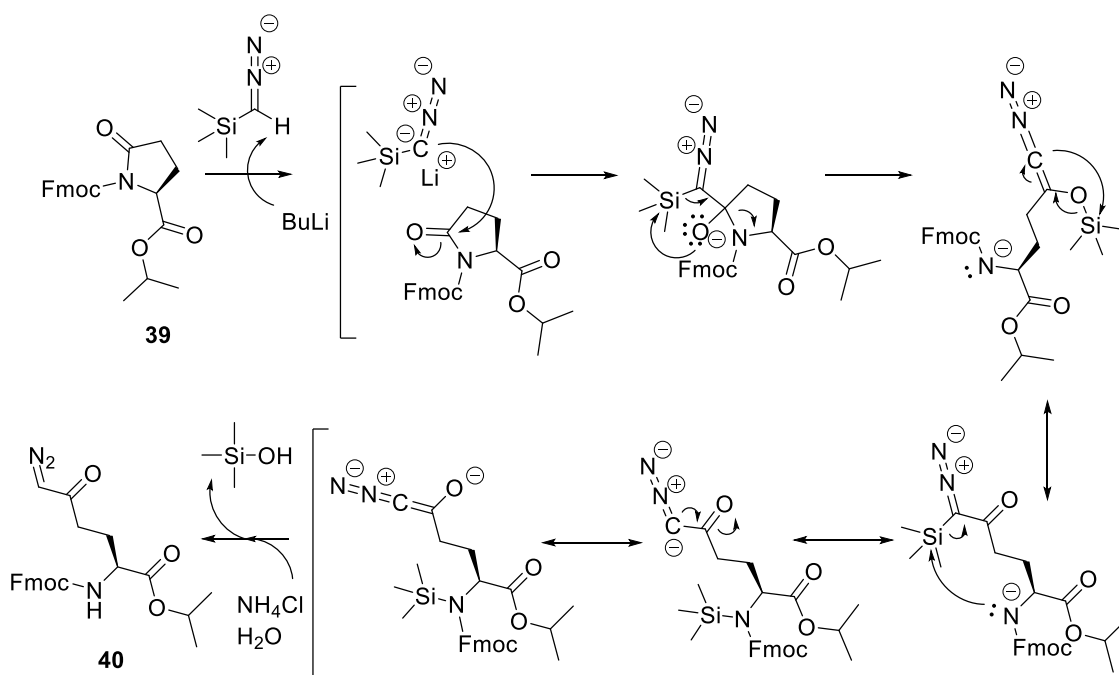
V dalším kroku bylo třeba ochránit pyrrolidinonový dusík látky **38** 9-fluorenylmethyloxykarbonylovou chránicí skupinou. Pro deprotonaci NH skupiny isopropylesteru **38** byl použit LiHMDS. Pro samotné ochránění pak byl použit nadbytek (5 ekvivalentů) Fmoc chloridu. Tento poměr přidané báze a Fmoc chloridu je velmi důležitý pro zachování rovnováhy reakce ve prospěch produktu **39**, neboť navázaná Fmoc skupina je v bazickém prostředí nestabilní a mohlo by docházet ke zpětnému odchránění produktu **39**.

Schéma 17: Navržený mechanismus ochrání sekundárního aminu látky **38**.



Struktura očekávaného produktu **39** byla potvrzena podle charakteristických signálů navázané Fmoc skupiny v ^1H a ^{13}C NMR spektru.

Schéma 18: Navržený mechanismus otevření pyrrolidinonového kruhu látky **39** trimethylsilyldiazomethanem.

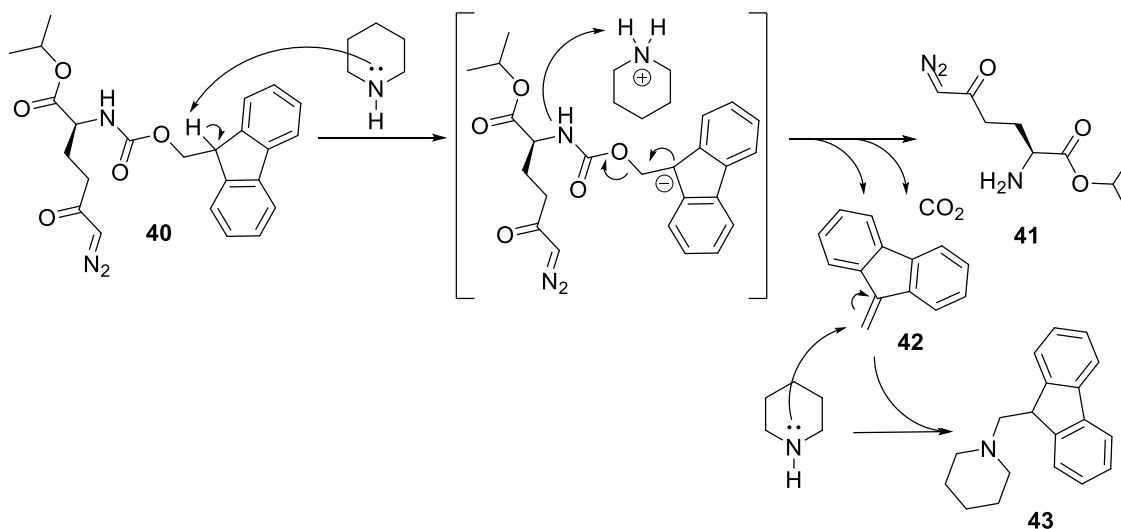


Otevření pyrrolidinonového kruhu látky **39** bylo provedeno použitím lithné soli trimethylsilyldiazomethanu. Na její přípravu byla použita silná báze, $n\text{-BuLi}$. Následným nukleofilním atakem aniontu trimethylsilyldiazomethanu na karbonylovou skupinu pak došlo k vytvoření acyklické struktury, jak je naznačeno v reakčním Schématu 18. Trimethylsilylová skupina byla z molekuly odstraněna ve formě

trimethylsilanolu přidáním vody na konci reakce. Vytvořený produkt **40** byl potvrzen například naměřeným ^1H NMR spektrem, kdy vodík mezi diazokupinou a karbonylem reprezentuje charakteristický široký signál s chemickým posunem 5,25–5,35 ppm (v CDCl_3).

Klíčový intermediát isopropylester 6-diazo-5-oxo-L-norleucin (**41**) byl v dalším kroku získán ochráněním Fmoc skupiny látky **40** v bazickém prostředí piperidinu s uspokojivým výtěžkem 72%. Piperidin nejprve deprotonuje uhlík na fluorenylovém kruhu. Následně dojde ke spontánní eliminaci, vzniku dibenzofulvenu **42** a oxidu uhličitého. Vedlejší produkt **42** by mohl znovu reagovat s ochráněnou aminoskupinou. Přednostně ale dochází k jeho další reakci s piperidinem za vzniku vedlejšího produktu 1-((9*H*-fluoren-9-yl)methyl)piperidinu (**43**), jak je naznačeno ve Schématu 19. Přítomnost látky **41** byla potvrzena ^1H NMR spektrem, kde chybí signály charakteristické pro Fmoc skupinu v aromatické oblasti spektra kolem 7 ppm a objevuje se široký signál primární aminoskupiny s posunem 2,36 – 2,53 ppm.

Schéma 19: Navržený mechanismus ochránění aminoskupiny intermediátu **40**.



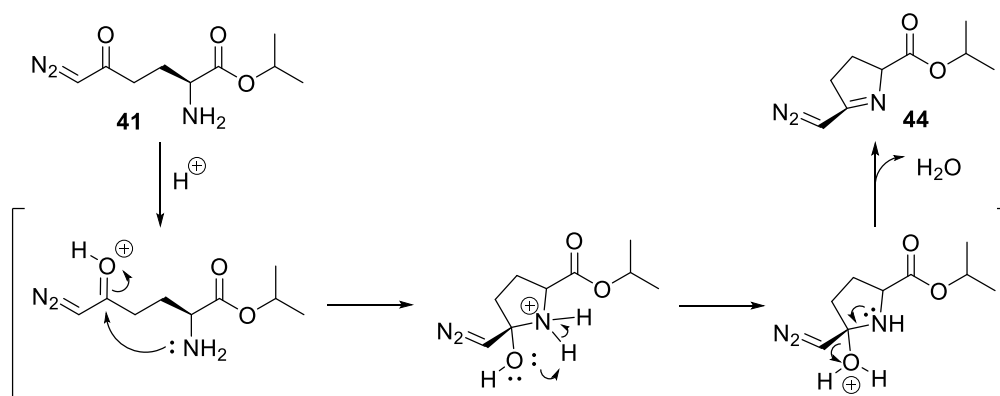
4.3 Cyklizace isopropylesteru 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu

Vzhledem ke znalosti nestability látky **1** v kyselém prostředí byla provedena jednoduchá kinetická studie sledující stabilitu látky **41** pomocí NMR spektroskopie. Byly připraveny 2 vzorky, jeden v CDCl_3 a druhý v d_6 -DMSO, a ty byly ponechány v NMR kyvetě za laboratorní teploty. Z takto připravených vzorků byla měřena

^1H NMR spektra v časových intervalech 30 min, 60 min, 18 h, 24 h, 2 dny, 3 dny, 5 dní, 6 dní a 1 měsíc.

Vzorek rozpuštěný v deuterovaném dimethylsulfoxidu vykazoval stabilitu i po 6 dnech (viz Příloha 1). Určitý rozklad látky **41** byl pozorován teprve ve spektru měřené látky po 1 měsíci stání v roztoku. Naproti tomu vzorek rozpuštěný v deuterovaném chloroformu byl značně nestabilní. Jak je patrné z naměřených ^1H NMR spekter (viz Příloha 2), již po několika hodinách dochází k transformaci látky **41** na cyklický diazo-imin **44**. Návrh mechanismu cyklizace je uveden ve Schématu 20.

Schéma 20: Navržený mechanismus ireverzibilní cyklizace látky **41** v kyselém prostředí.



Tímto experimentem byla potvrzena hypotéza o nestabilitě analogu **41** v kyselém prostředí, neboť CDCl_3 se pomalu rozkládá za uvolnění DCl , což je s největší pravděpodobností příčina cyklizace látky **41** v tomto vzorku.

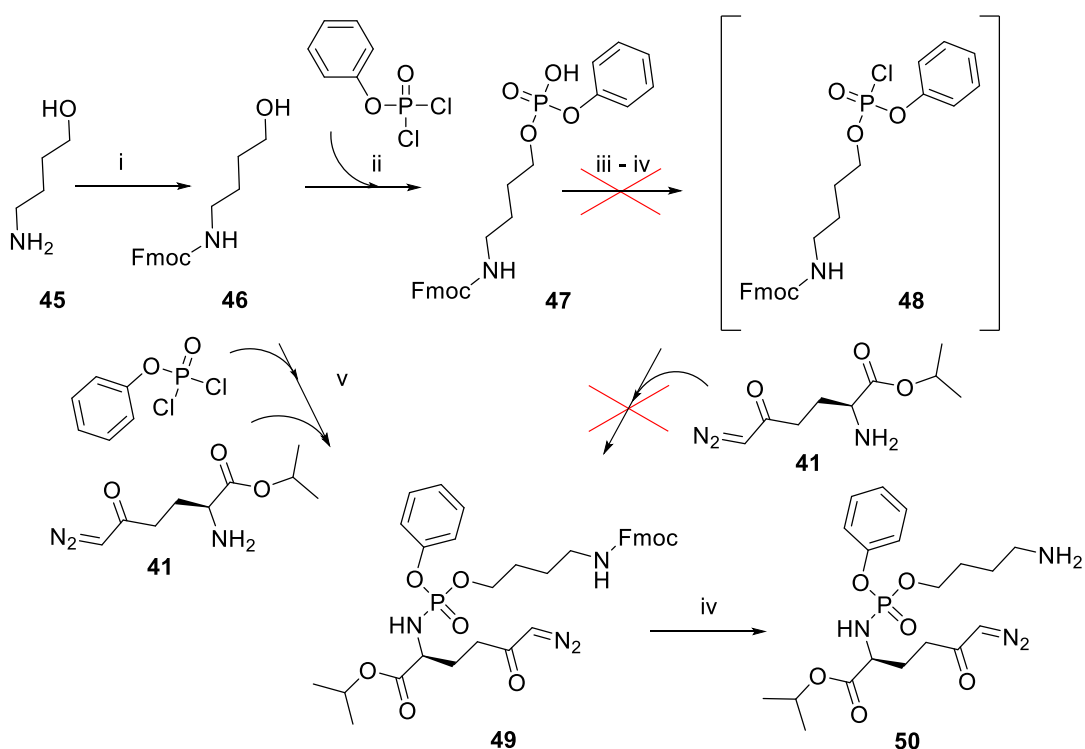
4.4 Syntéza derivátů isopropylesteru 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, samotná látka **41** je díky reaktivní aminoskupině značně nestabilní a velmi ochotně se transformuje na cyklický diazo-imin. Proto musela být uchovávána při nižší teplotě (obvykle $-80\text{ }^\circ\text{C}$) a nejlépe okamžitě použita do dalších kroků, v tomto případě pro přípravu nových proléčiv.

První cesta je založena na připojení 4-aminobutanolu přes fosfonátovou spojku na isopropylester **41** (viz Schéma 21).

Výchozí látkou byl již zmíněný 4-aminobutanol (**45**). Jeho volná aminoskupina musela být nejprve ochráněna 9-fluorenylmethoxykarbonylovou skupinou. Dusík aminoskupiny je nukleofilnější ve srovnání s kyslíkem hydroxyly, tedy je i reaktivnější vůči fenyloxydichlorofosfátu v následujícím kroku, což je v tomto případě nežádoucí.

Schéma 21: Syntéza proléčiva **50**.^j



^j**Reakční podmínky:** (i) Fmoc-Cl, NaHCO₃, dioxan, 0 °C, 2 h, 67%; (ii) a) K₂CO₃, acetonitril, 0 °C, 24 h; b) H₂O, 73%; (iii) (COCl)₂, DMF, DCM, lab. tep., 2h (iv) DIEA, pyridin, -20 °C až lab. tep., 12 h (v) collidin, THF, 0 °C až lab. tep., 5 h, 41%; (vi) piperidin, DCM, lab. tep., 2,5 h, 73%.

Látka **47** byla připravena nukleofilní substitucí chloru na fenyloxydichlorofosfátu alkoholem **46**. Tento krok se ovšem zpočátku nedařilo provést s dostatečně vysokým výtěžkem. Při snaze o optimalizaci reakčních podmínek bylo vyzkoušeno několik různých experimentů, kdy se měnilo rozpouštědlo, použitá báze a také poměry jednotlivých reagentů v reakční směsi. Přehled reakčních podmínek pro jednotlivé experimenty je uveden v Tabulce 5. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze: aceton/EtOH/EtOAc/H₂O, 6:5:36:3) a očekávaný produkt **47** měl R_F = 0,15. U většiny zvolených podmínek nebyl produkt detekován vůbec, či jen ve velmi nízké koncentraci. Nejlepších výsledků dosahovala reakce, ve které bylo použito

2 ekvivalentů K_2CO_3 jako báze a 2 ekvivalentů fenyl dichlorofosfátu v acetonitrilu při teplotě 0 °C. Produkt **47** byl za těchto podmínek izolován ve výtěžku 73%.

Tabulka 5: Reakční podmínky při optimalizaci přípravy látky **47**.^k

| Experiment | Báze | | Počet ekvivalentů fenyl dichlorofosfátu | Rozpouštědlo | Teplota (°C) |
|------------|--------------------------------|-------------------|---|--------------------|--------------|
| | Název | Počet ekvivalentů | | | |
| 1 | TEA | 1,1 | 1,05 | THF | 0 |
| 2 | TEA | 1,1 | 1,05 | DCM | 0 |
| 3 | TEA | 4 | 1,05 | THF | 0 |
| 4 | TEA | 5 | 2 | THF | 0 |
| 5 | DEA | 5 | 2 | THF | 0 |
| 6 | DIEA | 5 | 2 | CH ₃ CN | 0 |
| 7 | DIEA | 1 | 1 | THF | -78 |
| 8 | DIEA | 5 | 2 | DCM | 0 |
| 9 | DIEA | 5 | 2 | DMF | 0 |
| 10 | DBU | 5 | 2 | THF | 0 |
| 11 | DBU | 3 | 2 | DCM | 0 |
| 12 | K ₂ CO ₃ | 2 | 2 | DCM | 0 |
| 13 | K ₂ CO ₃ | 2 | 2 | DMF | 0 |
| 14 | K ₂ CO ₃ | 2 | 2 | CH ₃ CN | 0 |

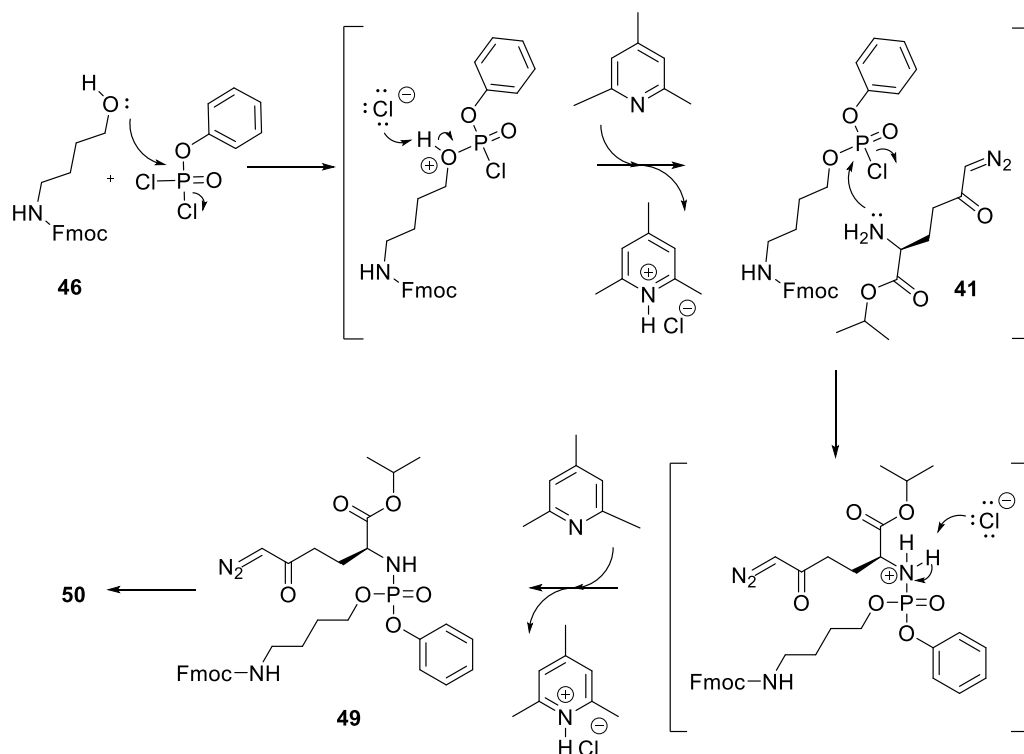
^kTeplota je uvedena pro okamžik smíchání jednotlivých komponent. Změny teploty v dalším průběhu reakce jsou popsány v experimentální části.

V dalším reakčním kroku bylo mým cílem vygenerovat *in situ* chlorid **48**, který měl reagovat s volnou aminoskupinou látky **41** za vzniku produktu **49**. Za uvedených podmínek se však zamýšlenou látku **49** nepodařilo připravit.

Z důvodu neúspěchu předchozí reakční sekvence byla testována alternativní cesta, kdy byla sloučenina **46** postupně smíchána s fenyl dichlorofosfátem a látkou **41** za vzniku produktu **49**. Po optimalizaci podmínek byl produkt **49** izolován v relativně dobrém výtěžku 41%. Navržený reakční mechanismus je zobrazen ve Schématu 22. Nejprve dochází k neukleofilní substituci chloru na fenyl dichlorofosfátu alkoholem **46**. Uvolňující se molekula chlorovodíku okamžitě vytváří s collidinem příslušnou sůl. Vzniklý intermediát dále reaguje s isopropylesterem 6-diazo-5-oxo-L-norleucinu **41**, jehož volná aminoskupina nukleofilně substituuje druhý atom chloru na fenyl dichlorofosfátu. Odstupuje druhá molekula chlorovodíku, která je opět zachycena

collidinem za vzniku 2,4,6-trimethylpyridinium chloridu. Přítomnost látky **49** byla potvrzena naměřenými ^1H a ^{31}P NMR spektry a pomocí LC/MS spektra, kde byla pozorována hmota látky se sodíkem 685 g/mol. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 15:1), kdy produkt měl $R_F = 0,67$.

Schéma 22: Navržený reakční mechanismus syntézy intermediátu **49**.



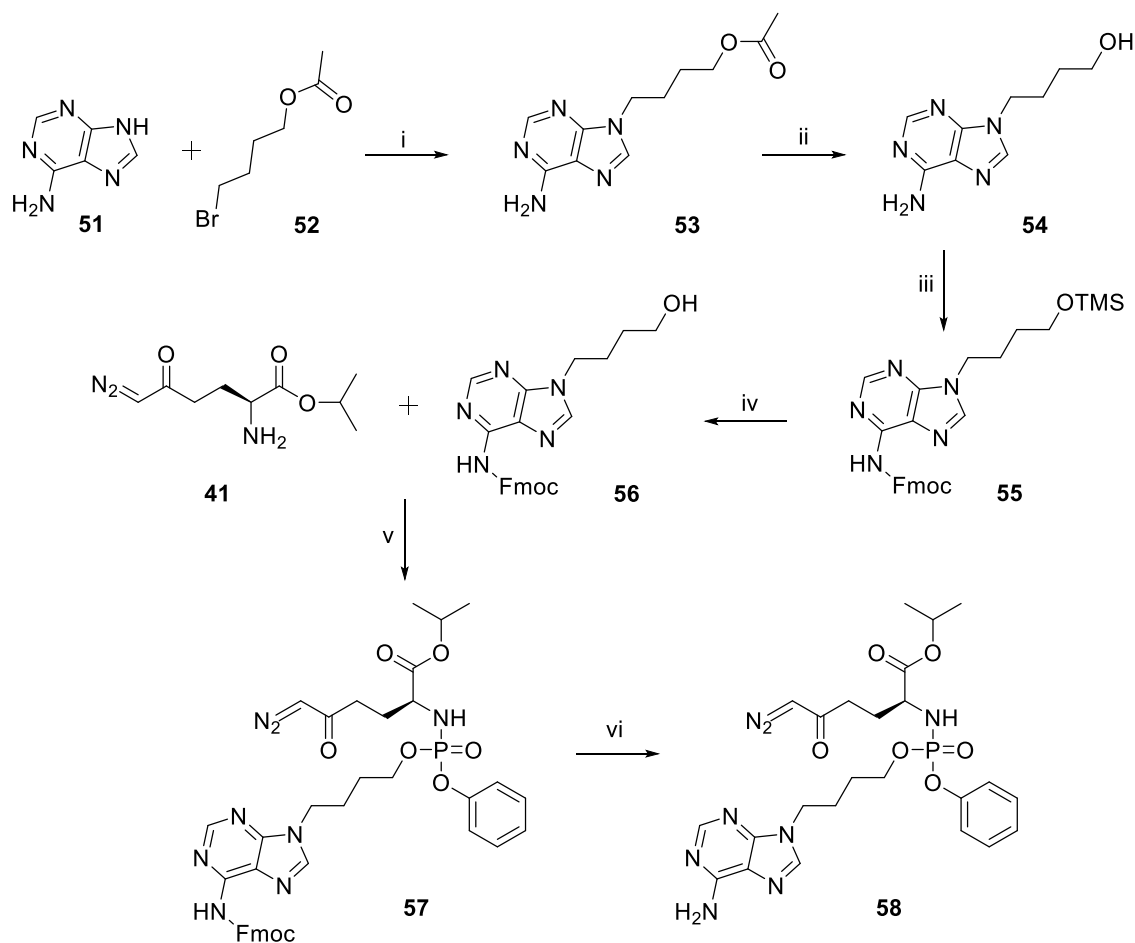
Standardními podmínkami pak byla pomocí sekundárního aminu (diethylaminu) odstraněna Fmoc chránící skupina látky **49** za vzniku primárního aminu látky **50**. Tento derivát se ukázal být značně nestabilní, neboť připravená látka se velmi rychle rozkládá na komplikovanou směs produktů. Aby mohl být produkt vůbec izolován z reakční směsi, musí být chromatografie provedena velmi rychle a získanou látku je nutné skladovat při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Pro další použití (biochemické experimenty) je lepší uchovávat stabilní derivát **49**, který je po převedení na produkt **50** v surovém stavu bez čištění okamžitě použit pro následující reakce.

Čistotu proléčiva **50** po rychle provedené sloupcové chromatografii, odpaření rozpouštědel a následném okamžitém změření ^1H NMR spektra naznačuje níže vyobrazené spektrum (viz Příloha 3). Již zde je patrné, jak dochází k částečnému

rozkladu látky, ukazujícím na její nestabilitu. ^{13}C NMR spektrum z tohoto důvodu nebylo vůbec měřeno.

Druhý způsob substituce volné aminoskupiny látky **41** je opět proveden přes fosfát, na který je připojen adeninový skelet přes alkylový linker.

Schéma 23: Syntéza fosfátového proléčiva s připojeným adeninovým skeletem přes alkoxylový linker.¹

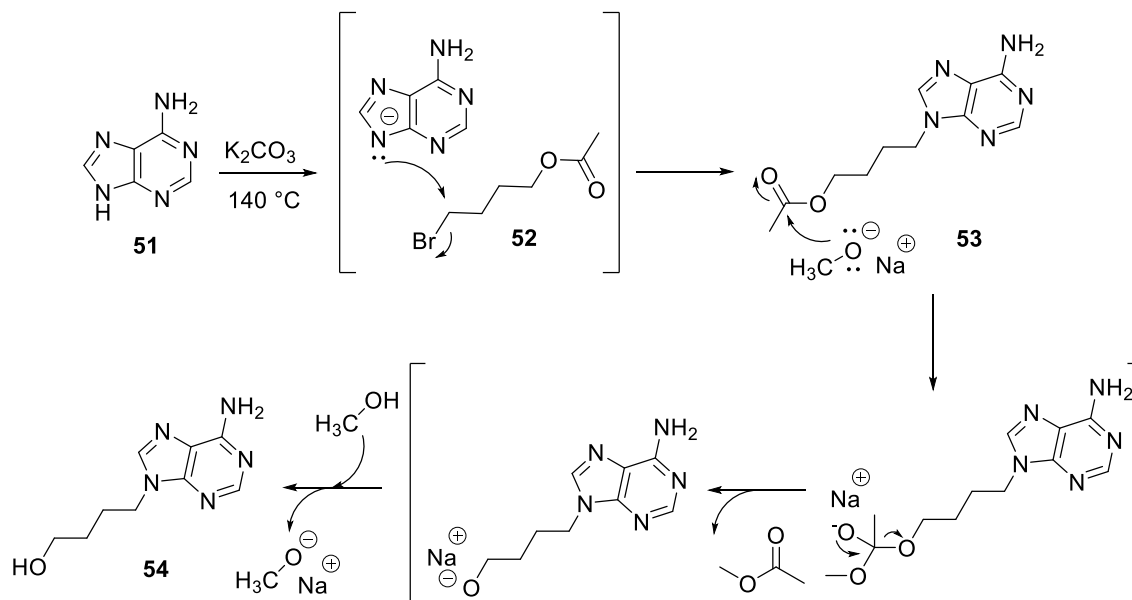


Reakční podmínky: (i) K_2CO_3 , DMF, $140\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h, 34%; (ii) MeONa, MeOH, lab. tep., 0,5 h, 36 %; (iii) TMS-Cl, Fmoc-Cl, pyridin, lab. tep., 4h, 59%; (iv) 1M HCl, THF, lab. tep., 0,5 h, kvant.; (v) collidin, fenylchlorofosfát, THF, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 2,5 h, 35%; (vi) DEA, DCM, lab. tep., 3h, 66%.

V prvním kroku syntézy dochází k alkylnaci adeninu **51** 4-brombutyl acetátem **52** nukleofilní substitucí bromu dusíkem za vzniku látky **53**. Následná transformace zahrnuje deacetylaci methoxidem sodným v methanolu, kde dochází k nukleofilnímu

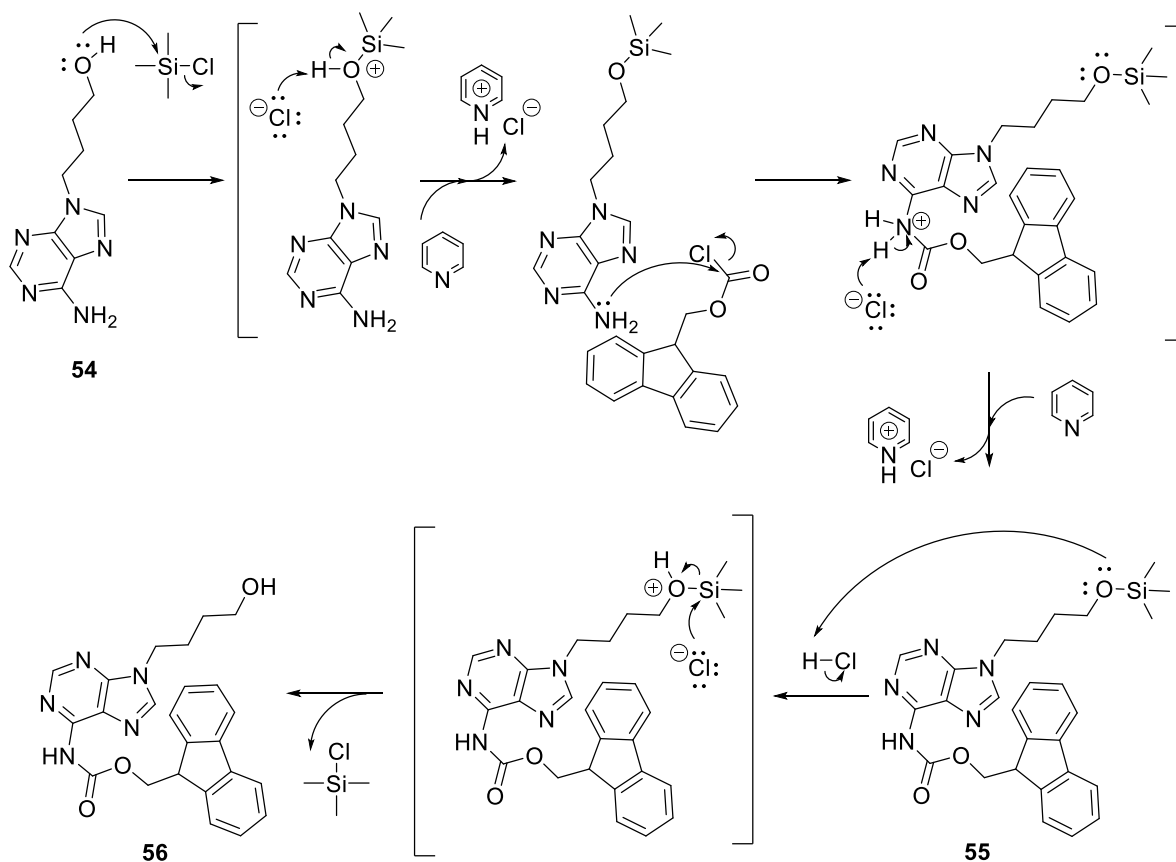
ataku methoxidového aniontu na karbonylový uhlík za odstoupení methylesteru kyseliny octové a vzniku alkoholu **54**.

Schéma 24: Navržený reakční mechanismus přípravy látky **54**.

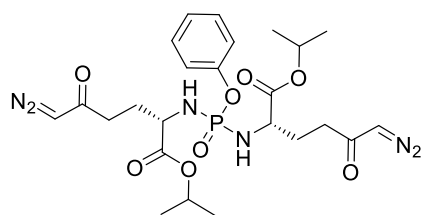


Dále bylo třeba ochránit volnou aminoskupinu na adeninovém skeletu. Fmoc chlorid by však mohl atakovat také volný hydroxyl, proto je třeba ho nejprve převést na trimethylsilyloxy skupinu a až poté provést protekci aminoskupiny. Reakce je prováděna v pyridinu, který kromě úlohy rozpouštědla má také funkci vychytávat uvolňující se molekulu chlorovodíku za vzniku pyridinium chloridu, který pak lze snadno z reakční směsi oddělit extrakcí vodou. Trimethylsilylová chránící skupina látky **55** byla následně odstraněna v prostředí 1M HCl za vzniku alkoholu **56** a současného odstoupení trimethylsilyl chloridu.

Schéma 25: Navržený reakční mechanismus syntézy meziproduktů **55** a **56**.

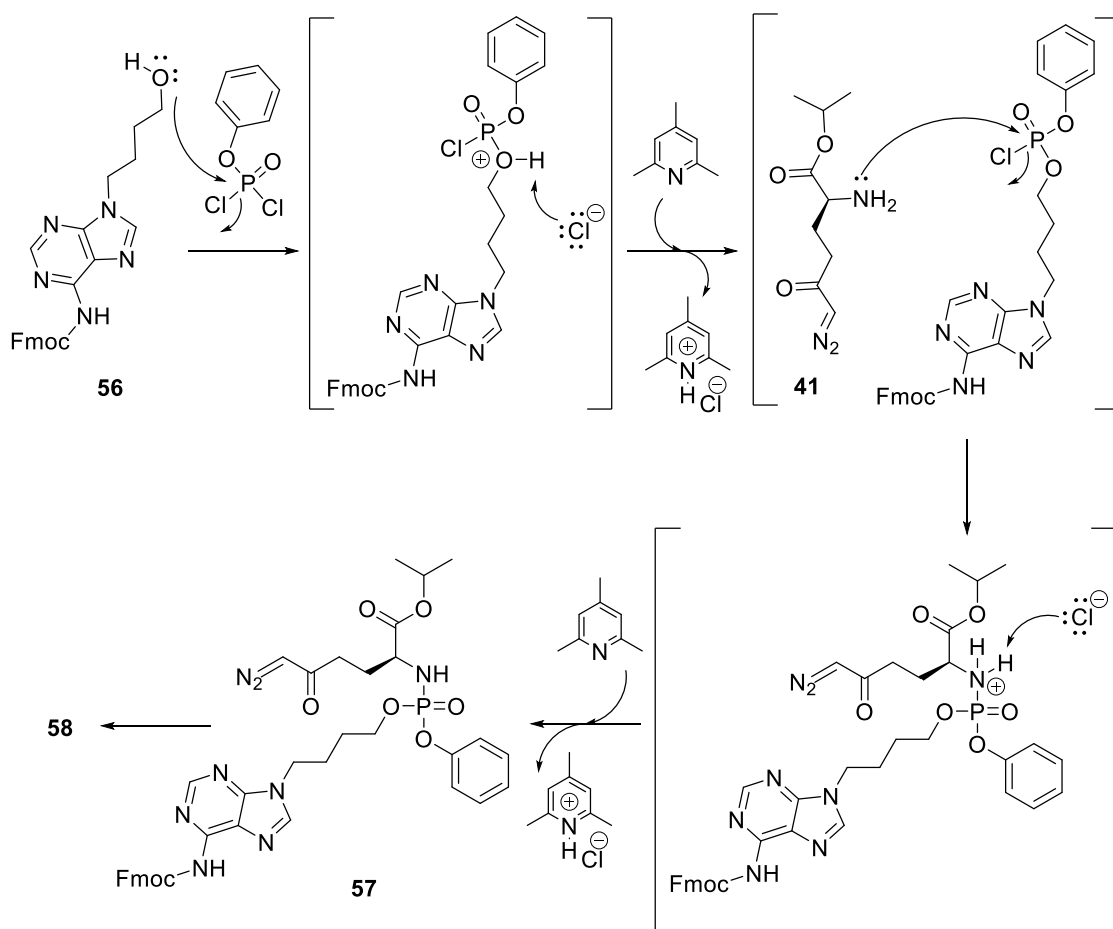


Při přípravě intermediátu **57** bylo využito zkušeností se syntézou látky **49**. Fenyl dichlorofosfát byl smíchán s collidinem. Po chvíli byl přidán intermediát **56** a vzápětí látka **41**. Reakční mechanismus je obdobný přípravě intermediátu **49**. Chlor na fenyl dichlorofosfátu je nejprve nukleofilně substituován alkoholem **56**. Uvolňující se chlorovodík je přitom okamžitě vázán přebytkem báze za tvorby collidinium chloridu. Druhý atom chloru je pak substituován volnou aminoskupinou isopropylesteru **41**. Uvolňuje se druhá molekula chlorovodíku, která je ihned vázána collidinem jako v předchozím případě. Produkt **57** byl izolován s výtěžkem 35%. Při analýze reakční směsi byl vedle očekávaného produktu **57** pozorován také vznik látky **59** vytvořené substitucí obou atomů chloru u fenyldichlorofosfátu za dvě molekuly **41**.



59

Schéma 26: Návrh reakčního mechanismu syntézy intermediátu 57.



V posledním kroku syntézy byla standardními podmínkami pomocí sekundárního aminu (diethylaminu) odstraněna Fmoc chránící skupina látky 57 za vzniku primárního aminu látky 58 ve výtěžku 66%. Ve srovnání s derivátem 50 byla tato látka stabilní, proto mohla být plně charakterizována. ¹H NMR spektrum je součástí příloh této práce (viz Příloha 4).

5. Experimentální část

5.1 Obecné metody a použité chemikálie

Průběh většiny reakcí byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie s využitím silikagelových desek Kieselgel 60 F254 od firmy Merck. Pro detekci látek byl použit roztok PMA tvořený $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1%) a $\text{H}_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4$ (2%) v kyselině sírové (10%) a ethanolu.

Použité chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich, TCI nebo Combi-Blocks a byly použity bez předchozího čištění. Bezvodá rozpouštědla byla připravena podle postupů uvedených v literatuře⁽²³⁾ a destilována pod inertní atmosférou dusíku.

^1H NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance IIITM HD 600 MHz při pracovní frekvenci 401 MHz nebo 501 MHz, ^{13}C NMR spektra při 101 MHz či 125,7 MHz, ^{31}P NMR spektra při 101 MHz. Pro standardizaci ^1H NMR spekter byl použit interní signál TMS ($\delta = 0,0$ ppm; CDCl_3) nebo signály použitých rozpouštědel ($\delta = 7,26$ ppm pro CDCl_3 a $\delta = 3,31$ ppm pro CD_3OD). ^{13}C NMR spektra byla kalibrována na signály použitých rozpouštědel ($\delta = 77,00$ ppm pro CDCl_3 a $\delta = 49,00$ ppm pro CD_3OD). Chemický posun δ je uváděn v ppm, interakční konstanty J jsou uvedeny v Hz.

ESI hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru Waters Micromass ZQ. Pro ESI hmotnostní spektra s nízkým rozlišením byl použit tandemový hybridní hmotnostní spektrometr Waters Q-ToF micro, který obsahuje kvadrupól a ortogonální průtokový hmotnostní analyzátor (TOF). Pro měření ESI hmotnostních spekter s vysokým rozlišením byl použit hybridní hmotnostní spektrometr LTQ Orbitrap XL s FT kombinující hmotnostní analyzátor lineární iontovou past a orbitrap. Vzorky byly rozpouštěny v MeOH a aplikovány přímým nástřikem.

Optické rotace byly měřeny v CHCl_3 na přístroji Autopol IV od společnosti Rudolph Research Analytical.

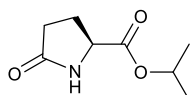
Čistota jednotlivých sloučenin byla stanovována pomocí HPLC Jasco Inc. obsahující kolonu Reprosil 100 C18, $5\mu\text{m}$, 250×4 mm. K analýze byl použit gradient 2% CH_3CN / 98% H_2O s 0,1% TFA \rightarrow 100% CH_3CN během 40 minut. UV detekce byla prováděna při $\lambda = 210$ nm.

Infračervená spektra byla měřena v CHCl₃ nebo KBr na FT-IR spektrometru.

Teploty tání byly měřeny na bodotávku Helmut Hund GmbH H 600/12.

5.2 Pracovní postupy

Isopropyl (*S*)-5-oxopyrrolidin-2-karboxylát (**38**)



Kyselina L-pyroglutamová **37** (12,9 g; 99,0 mmol; 1,0 ekv.) a kyselina *p*-toluensulfonová (1,90 g; 99,0 mmol; 1,0 ekv.) byly rozpuštěny v isopropanolu (25 ml). Do reakční směsi byla přidána molekulová síta (20 kuliček) a reakční směs byla refluxována (100 °C) pod inertní atmosférou dusíku přes noc (16 h). Směs byla poté ochlazena na laboratorní teplotu, byl přidán EtOAc (400 ml) a organická fáze promyta nasyceným roztokem NaHCO₃ (60 ml) a NaCl (50 ml). Spojené anorganické podíly byly znovu extrahovány EtOAc (200 ml) a spojené organické části byly sušeny bezvodým MgSO₄. Rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí RVO. Produkt **38** (12,4 g; 73%) byl získán ve formě bezbarvé pevné látky.

Teplota tání: 65,5 – 66,5 °C.

¹H-NMR (401 MHz, CDCl₃): δ 1,24 (d; *J* = 6,3; 6H); 2,08 – 2,23 (m; 1H); 2,24 – 2,50 (m; 3H); 4,17 (ddd; *J* = 8,7; 5,3; 0,7; 1H); 5,03 (hept; *J* = 6,3; 1H); 6,70 (bs; 1H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 21,8 (2C); 24,9; 29,4; 55,7; 69,4; 171,6; 178,2.

Optická rotace: [α]²²_D +1,8° (c 0,221; MeOH).

IČ (CHCl₃): 3439, 2986, 2897, 1736, 1707, 1389, 1377, 1241, 1183, 1147, 1040 cm⁻¹.

LR CI MS: 172 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₈H₁₄O₃N 172,0974; nalezeno 172,0975.

1-((9*H*-Fluoren-9-yl)methyl) 2-isopropyl (*S*)-5-oxopyrrolidin-1,2-dikarboxylát (**39**)



Látka **38** (2,94 g; 17,2 mmol, 1,0 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém THF (90 ml) pod inertní atmosférou a směs byla ochlazena na -78 °C. Během 10 minut byl přikapán roztok LiHMDS (1,0 M v THF; 16,3 ml; 16,3 mmol; 0,95 ekv.) a reakční směs byla míchána při stejné teplotě ještě 15 minut. Výsledná žlutá směs byla během 15 minut převedena kanylou k roztoku Fmoc chloridu (22,2 g; 85,8 mmol; 5,0 ekv.) rozpuštěného v bezvodém THF (90 ml) a vychlazeného na -78 °C. Reakční směs byla míchána při stejné teplotě 2 hodiny. Následně byla reakce ukončena pozvolným přidáním nasyceného roztoku NH₄Cl (100 ml). Reakční směs byla extrahována EtOAc (3 × 50 ml), spojené organické vrstvy byly promyty vodou (40

ml), solankou (40 ml) a sušeny bezvodým MgSO₄. Rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí RVO. Získaná směs byla rozdělena sloupcovou chromatografií na silikagelu (EtOAc/hexan, 1:2) za zisku bezbarvého pevného produktu **39** (6,20 g; 92%).

Teplota tání: 120,4 – 121,2 °C.

¹H-NMR (401 MHz, CDCl₃): δ 1,23 (d; *J* = 6,3; 3H); 1,26 (d; *J* = 6,3; 3H); 2,06 – 2,13 (m; 1H); 2,34 – 2,45 (m; 1H); 2,53 – 2,61 (m; 1H); 2,67 – 2,76 (m; 1H); 4,31 (t; *J* = 7,5; 1H); 4,40 – 4,44 (m; 1H); 4,53 – 4,57 (m; 1H); 4,65 (dd; *J* = 9,4; 2,6; 1H); 5,07 (hept; *J* = 6,3; 1H); 7,31 – 7,35 (m; 2H); 7,39 – 7,43 (m; 2H); 7,71 – 7,78 (m; 4H).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 21,7; 21,8; 22,0; 31,3; 46,6; 59,0; 69,2; 69,8; 120,1; 120,1; 125,4; 125,6; 127,3 (2C); 128,0 (2C); 141,3; 141,3; 143,4; 143,4; 151,6; 170,6; 172,9.

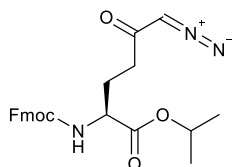
Optická rotace: [α]²²_D -24,1° (c 0,332; CHCl₃).

IČ (CHCl₃): 3068, 3029, 2985, 2939, 2883, 1797, 1758, 1739, 1724, 1609, 1580, 1479, 1463, 1452, 1421, 1386, 1377, 1305, 1194, 1105, 1045, 1033, 621, 425 cm⁻¹.

LR ESI MS: 416 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₃H₂₃O₅NNa 416,1468; nalezeno: 416,1469.

Isopropyl (S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)-6-diazo-5-oxohexanoát (40)



Roztok trimethylsilyl diazomethanu (2,0 M v Et₂O; 6,00 ml; 11,9 mmol; 1,2 ekv.) byl přidán k bezvodému THF (55 ml) pod inertní atmosférou a tato směs byla ochlazena na -98 °C pomocí chladicí lázně tvořené methanolem a kapalným dusíkem.

Do reakční směsi byl po kapkách přidán roztok *n*-BuLi (2,5 M v hexanu; 4,90 ml; 12,2 mmol; 1,2 ekv.). Směs byla míchána při -98 °C po dobu 30 minut a následně převedena kanylou do roztoku látky **39** (3,91 g; 9,94 mmol; 1,0 ekv.) v bezvodém THF (100 ml) vychlazeném na teplotu -116 °C pomocí směsi ethanolu a kapalného dusíku. Reakční směs byla ponechána pozvolna ohřát na -78 °C během 30 minut a poté byla reakce ukončena přidávkem nasyceného roztoku NH₄Cl (100 ml). Směs byla extrahována EtOAc (3 × 50 ml), spojené organické podíly byly promyty vodou (40 ml), solankou (40 ml) a následně sušeny bezvodým MgSO₄. Rozpouštědlo

bylo odpařeno na RVO a směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií (aceton/CHCl₃, 1:20) za zisku žlutého pevného produktu **40** (3,68 g; 85%).

Teplota tání: 94,8 – 96,2 °C.

¹H-NMR (401 MHz, CDCl₃): δ 1,25 – 1,28 (m; 6H); 1,95 – 2,04 (m; 1H); 2,17 – 2,26 (m; 1H); 2,31 – 2,52 (m; 2H); 4,22 (t; *J* = 7,1; 1H); 4,29 – 4,43 (m; 3H); 5,06 (hept; *J* = 6,1; 1H); 5,27 (s; 1H); 5,59 (d; *J* = 8,2; 1H); 7,30 – 7,34 (m; 2H); 7,38 – 7,42 (m; 2H); 7,59 – 7,62 (m; 2H); 7,75 – 7,77 (m; 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 21,8; 21,8; 27,7; 36,6; 47,2; 53,7; 67,1; 69,6; 120,1; 120,1; 125,2; 125,2; 127,2 (2C); 127,8 (2C); 141,4 (2C); 141,4; 143,8; 144,0; 156,2; 171,5; 193,7.

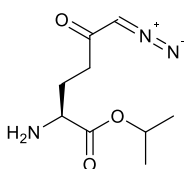
Optická rotace: [α]²²_D +15,1° (c 0,674; CHCl₃).

IČ (CHCl₃): 3428, 3116, 3068, 2985, 2940, 2882, 2110, 1731, 1719, 1641, 1608, 1580, 1509, 1478, 1466, 1451, 1418, 1386, 1377, 1349, 1232, 1105, 1052, 1033, 622, 539, 488, 426 cm⁻¹.

LR ESI MS: 458 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₄H₂₅O₅N₃Na 458,1687; nalezeno 458,1686.

Isopropyl (*S*)-2-amino-6-diazo-5-oxohexanoát (**41**)



Látka **40** (900 mg; 2,07 mmol; 1,0 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DCM (10 ml). Následně byl přidán piperidin (0,443 mg; 514 μl; 5,17 mmol; 2,5 ekv.) a reakční směs byla míchána po dobu 5 hodin za laboratorní teploty pod inertní atmosférou. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno a směs byla rozdělena sloupcovou chromatografií (CHCl₃/MeOH, 30:1) za zisku produktu **41** (316 mg; 72%) ve formě žlutohnědé olejovité látky.

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): δ 1,21 (d; *J* = 1,8; 3H); 1,23 (d; *J* = 1,8; 3H); 1,52 (bs; 2H); 1,74 – 1,85 (m; 1H); 2,02 – 2,10 (m; 1H); 2,36 – 2,53 (m; 2H); 3,37 (dd; *J* = 8,4; 5,0; 1H); 5,00 (hept; *J* = 6,3; 1H); 5,27 (s; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 21,9; 21,9; 29,7; 37,0; 53,9; 54,7; 68,6; 175,2; 194,3.

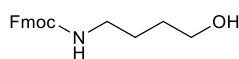
Optická rotace: [α]²²_D +6,5° (c 0,444; CHCl₃).

IČ (CHCl₃): 3390, 3323, 3116, 2984, 2939, 2877, 2109, 1725, 1640, 1467, 1454, 1439, 1388, 1376, 1349, 1199, 1106 cm⁻¹.

LR CI MS: 236 ([M + Na]⁺).

HR CI MS: vypočteno pro C₉H₁₅O₃N₃Na 236,1006; nalezeno 236,1007.

(9H-Fluoren-9-yl)methyl (4-hydroxybutyl)karbamát (46)

 4-Aminobutanol **45** (967 mg; 1,00 ml; 10,8 mmol; 1,0 ekv.)

byl rozpuštěn v dioxanu (30 ml) a směs byla ochlazena na 0 °C.

Během 5 minut byl přidán nasycený roztok NaHCO₃ (15 ml). Následně byl přisypán Fmoc chlorid (3,08 g; 11,9 mmol; 1,1 ekv.) a reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 1 hodinu. Reakce byla ukončena pozvolným přidávkem nasyceného roztoku NaCl (50 ml). Získaná směs byla extrahována EtOAc (3 × 50 ml), spojené organické podíly byly promyty vodou (40 ml), solankou (40 ml) a vysušeny bezvodým MgSO₄. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Směs byla rozdělena sloupcovou chromatografií (EtOAc/hexan, 1:1) za zisku produktu **46** (2,05 g; 67%) ve formě bezbarvé krystalické látky.

Teplota tání: 118,9 – 119,8 °C.

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): δ 1,47 – 1,32 (m; 4H); 2,97 (q; *J* = 6,2 Hz; 2H); 3,38 (d; *J* = 4,7 Hz; 2H); 4,20 (t; *J* = 6,7 Hz; 1H); 4,28 (d; *J* = 6,7 Hz; 2H); 4,38 (t; *J* = 5,0 Hz; 1H); 7,27 (s; 1H); 7,33 (d; *J* = 7,4; 1,1 Hz; 2H); 7,41 (t; *J* = 7,4 Hz; 2H); 7,68 (d; *J* = 7,4 Hz; 2H); 7,89 (d; *J* = 7,4 Hz; 2H).

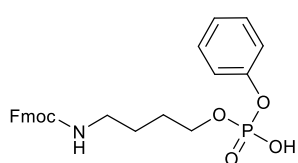
¹³C NMR (101 MHz, DMSO): δ 26,1; 29,8; 40,2; 46,8; 60,4; 65,2; 120,1 (2C); 125,2 (2C); 127,1 (2); 127,6 (2C); 140,7 (2C); 144,0 (2C); 156,0.

IČ (CHCl₃): 3627, 3452, 3352, 2944, 2883, 1718, 1517, 1033 cm⁻¹.

LR ESI MS: 334 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₁₉H₂₁O₃NNa 334,1413; nalezeno 334,1414.

(9H-Fluoren-9-yl)methyl (4-((hydroxy(fenoxy)fosforyl)oxy)butyl)karbamát (47)



Fenyl dichlorofosfát (48,0 μl; 0,320 mmol; 2,0 ekv.)

byl rozpuštěn v bezvodém acetonitrilu (2,5 ml) pod argonovou atmosférou. K roztoku byla přidána látka **46** (50,0 mg; 0,160 mmol; 1,0 ekv.) a reakční směs byla ochlazena na 0 °C.

Poté byl přidán uhličitán draselný (440 mg; 0,320 mmol; 2,0 ekv.). Směs byla míchána 15 minut při 0 °C a dále při laboratorní teplotě do druhého dne. Po 16 hodinách byla reakce ukončena přidávkem vody (9 ml). Reakční směs byla odpařena na RVO

a rozdělena sloupcovou chromatografií na silikagelu (aceton/EtOH/EtOAc/H₂O, 6:5:36:3 a potom MeOH/H₂O, 2:1). Takto získaná látka byla dále rozpuštěna v malém množství vody a acetonitrilu, okyselena na pH 2 přidavkem 1M HCl a poté zfiltrována za zisku produktu **47** (52,3 mg, 73 %) ve formě bezbarvé pevné látky.

Teplota tání: 191,3 – 192,2 °C.

¹H NMR (501 MHz, CD₃OD): δ 1,47 – 1,57 (m; 2H); 1,57 – 1,64 (m; 2H); 3,09 (t; 2H; *J* = 6,7); 3,94 (q; 1H; *J*_{H,P} = *J* = 6,2); 4,18 (t; 1H; *J* = 6,8); 4,33 (d; 2H; *J* = 6,8); 7,01 (m; 1H); 7,21 (m; 2H); 7,25 (m; 2H); 7,30 (td; 2H; *J* = 7,5; *J* = 1,2); 7,38 (t; 2H; *J* = 7,5); 7,64 (d; 2H; *J* = 7,5); 7,79 (d; 2H; *J* = 7,5).

¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): δ 25,9 (2C); 27,5; 46,8 (2C); 64,6; 65,2; 119,9 (2C); 120,1 (2C); 125,1 (2C); 127,0 (3C); 127,6 (2C); 128,78 (2C); 140,7 (2C); 143,9 (2C); 156,0.

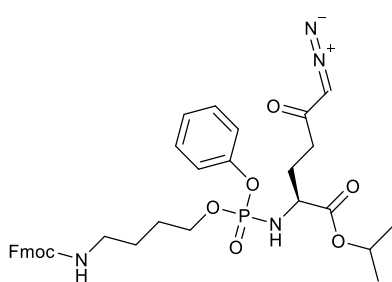
³¹P NMR (101 MHz, CDCl₃): δ -3,57

IČ (KBr): 3429, 3066, 3041, 2949, 2926, 2855, 2060, 1953, 1725, 1696, 1654, 1595, 1526, 1492, 1479, 1424, 1450, 1242, 1233, 1105, 1072, 1026, 1007, 921, 901, 759, 741, 692, 620, 507, 426 cm⁻¹.

LR ESI MS: 466 ([M - H]).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₅H₂₅O₆NP 466,1425; nalezeno 466,1420.

Isopropyl (2*S*)-2-(((4-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)butoxy)(fenoxy)fosforyl)amino)-6-diazo-5-oxohexanoát (**49**)



Pod inertní argonovou atmosférou byl připraven roztok fenyloxydichlorofosfátu (1,05 ml; 7,05 mmol; 1,5 ekv.) v bezvodém THF (8,5 ml). Reakční směs byla ochlazená na 0 °C a poté byl pomalu přidán 2,4,6-trimethylpyridin (9,28 ml; 70,3 mmol; 15 ekv.). Dále byl přikapán roztok látky **46** (1,46 g; 4,70 mmol; 1,0 ekv.) v bezvodém THF (8,5 ml) a reakční směs byla při stejné teplotě míchána ještě 20 minut. Následně byl pomalu přikapán roztok látky **41** (1,00 g; 4,70 mmol; 1,0 ekv.) v bezvodém THF (3,5 ml), směs byla míchána 30 minut při 0 °C, poté ponechána ohřát na laboratorní teplotu a míchána další 2 hodiny. Rozpouštědlo bylo odpařeno a směs

byla rozdělena sloupcovou chromatografií (gradient CHCl₃/MeOH, 30:1 → 15:1) za zisku produktu **49** (1,26 g; 41 %) ve formě žluté amorfnní látky.

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): δ 1,18 – 1,25 (m; 6H); 1,49 – 1,75 (m; 4H); 1,83 – 1,90 (m; 1H); 2,02 – 2,15 (m; 1H); 2,19 – 2,43 (m; 2H); 2,97 – 3,25 (m; 2H); 3,68 (q; *J* = 9,9; 1H); 3,84 – 3,99 (m; 1H); 4,04 – 4,19 (m; 2H); 4,20 (t; *J* = 6,7; 1H); 4,34 – 4,51 (m; 2H); 4,99 (hept; *J* = 6,3; 1H); 5,07 – 5,20 (bs; 1H); 7,13 (t; *J* = 7,2; 1H); 7,18 – 7,24 (m; 2H); 7,27 – 7,34 (m; 4H); 7,39 (t; *J* = 7,4; 2H); 7,59 (d; *J* = 7,4; 2H); 7,76 (d; *J* = 7,5; 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 21,8; 21,9; 26,2; 27,2 (d; *J* = 6,8); 29,3; 36,0; 40,5; 47,4; 54,1; 54,2; 66,6 (d; *J* = 5,8); 67,0; 69,7 (d; *J* = 6,8); 120,1 (2C); 120,2 (d; *J* = 4,9); 120,4 (d; *J* = 3,8); 125,0 (d; *J* = 6,2); 125,2 (2C); 127,1 (2C); 127,8 (2C); 129,8 (2C); 141,4 (2C); 144,1 (2C); 151,0 (d; *J* = 3,6); 156,6; 172,2 (d; *J* = 5,4); 193,6.

³¹P NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 5,07; 5,19.

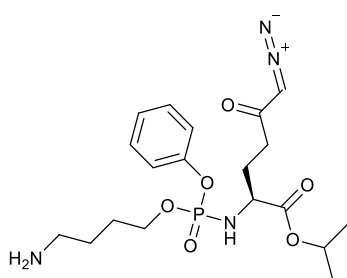
Optická rotace: [α]²²_D +6,6° (c 0,151; CHCl₃).

IČ (CHCl₃): 3452, 3388, 3115, 2877, 2110, 1725, 1713, 1641, 1610, 1592, 1580, 1517, 1491, 1478, 1467, 1451, 1388, 1382, 1377, 1349, 1327, 1286, 1249, 1164, 1144, 1134, 1105, 1025, 939, 903, 827, 821, 690, 622, 588, 488, 426 cm⁻¹.

LR ESI MS: 685 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₃₄H₃₉N₄O₈PNa 685,2398; nalezeno 685,2399.

Isopropyl (2*S*)-2-(((4-aminobutoxy)(fenoxy)fosforyl)amino)-6-diazo-5-oxohexanoát (50)



Látka **49** (340 mg; 0,513 mmol; 1,0 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DCM (7 ml) pod inertní atmosférou. Poté byl přidán piperidin (1,00 ml; 10,3 mmol; 20 ekv.) a reakční směs byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po vymizení výchozí látky **49** v reakční směsi sledované pomocí TLC (CHCl₃/MeOH, 1:1 + 2% Et₃N;

R_F = 0.18) bylo rozpouštědlo odpařeno a směs byla rychle rozdělena sloupcovou chromatografií (CHCl₃/MeOH, 1:1 + 2% Et₃N) za zisku produktu **50** (165 mg; 73 %) ve formě žluté olejovité látky. Připravený derivát je velmi nestabilní, proto musí být uchováván při teplotě -80 °C.

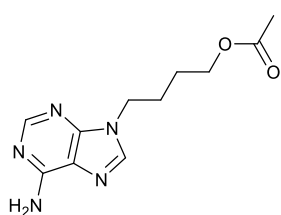
¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): δ 1,19 – 1,25 (m; 6H); 1,51 – 1,64 (m; 2H); 1,64 – 1,77 (m; 2H); 1,84 – 1,92 (m; 1H); 2,03 – 2,14 (m; 1H); 2,23 – 2,42 (m; 2H); 2,74 (dt; *J* = 11,8; 7,1; 2H); 3,14 – 3,40 (m; 2H); 3,77 – 3,99 (m; 2H); 4,10 (dt; *J* = 7,6; 6,3; 2H); 4,99 (hept; *J* = 6,3; 1H); 5,21 (bs; 1H); 7,12 – 7,17 (m; 1H); 7,19 – 7,23 (m; 2H); 7,29 – 7,35 (m; 2H).

³¹P NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 5,42; 5,58.

LR ESI MS: 441 ([M + H]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₁₉H₃₀O₆N₄P 441,1898; nalezeno 441,1899.

4-(6-Amino-9H-purin-9-yl)butyl acetát (53)



Adenin **51** (1,80 g; 13,3 mmol; 1,0 ekv.) byl suspendován v bezvodém DMF (23 ml) pod inertní atmosférou a poté byl do reakční směsi přisypán K₂CO₃ (3,87 g; 28,0 mmol; 2,1 ekv.). Směs byla zahřívána na teplotu 140 °C po dobu 30 minut. Poté byl pozvolna během 5 minut přikapán roztok 4-brombutyl acetátu **52** (4,55 g; 3,40 ml; 23,3 mmol; 1,75 ekv.) v bezvodém DMF (3 ml). Vzniklá suspenze žlutého zbarvení byla míchána při stejné teplotě po dobu 16 hodin. Reakční směs byla ochlazena na laboratorní teplotu, pevný podíl odfiltrován, promyt EtOAc (20 ml) a rozpouštědlo bylo odpařeno za vakua. Surová reakční směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií (CHCl₃/MeOH, 20:1), kdy očekávaný produkt **53** byl izolován ve formě bezbarvé pevné látky (1,78 g; 53%).

Teplota tání: 169,4 – 170,4 °C.

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): δ 1,48 – 1,58 (m; 2H); 1,80 – 1,90 (m; 2H); 1,97 (s; 3H); 4,00 (t; *J* = 6,6; 2H); 4,16 (t; *J* = 7,0; 2H); 7,19 (bs; 2H); 8,13 (s; 1H); 8,14 (s; 1H).

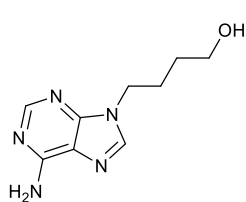
¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): δ 20,7; 25,3; 26,1; 42,5; 63,2; 118,7; 140,8; 149,5; 152,4; 156,0; 170,4.

IČ (CHCl₃): 3477, 3414, 1733, 1630, 1589, 1473, 1367, 1244, 1050, 649 cm⁻¹.

LR CI MS: 250 ([M + H]⁺).

HR CI MS: vypočteno pro C₁₁H₁₆O₂N₅ 250,1304; nalezeno 250,1302.

4-(6-Amino-9H-purin-9-yl)butan-1-ol (**54**)



Látka **53** (1,10 g; 4,41 mmol; 1,0 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém MeOH (30 ml) za laboratorní teploty pod inertní atmosférou dusíku a k reakční směsi byla přisypána navážka methanolátu sodného (159 mg; 2,94 mmol; 0,67 ekv.). Po 10 minutách byla reakce ukončena, vzniklá pevná látka odfiltrována, filtrát byl promyt EtOH (5 ml), Et₂O (2 × 5 ml) a vysušen na vakuu za zisku produktu **54** (756 mg; 68 %) ve formě bezbarvé pevné látky.

Teplota tání: 200,2 – 201,1 °C.

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): δ 1,33 – 1,44 (m; 2H); 1,74 – 1,90 (m; 2H); 3,39 (q; *J* = 6,2; 2H); 4,14 (t; *J* = 7,1; 2H); 4,43 (t; *J* = 5,2; 1H); 7,16 (bs; 2H); 8,12 (s; 1H); 8,13 (s; 1H).

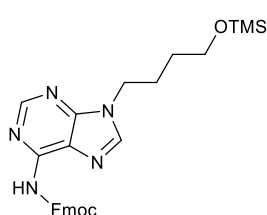
¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): δ 26,3; 29,5; 42,9; 60,1; 118,8; 140,9; 149,6; 152,4; 156,0.

IČ (CHCl₃): 3306, 2929, 2863, 1684, 1607, 1575, 1420, 1306, 1253, 1204, 1060, 1022, 797, 725 cm⁻¹.

LR ESI MS: 208 ([M + H]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₉H₁₄ON₅ 208,1193; nalezeno 208,1192.

(9H-Fluoren-9-yl)methyl (9-(4-((trimethylsilyl)oxy)butyl)-9H-purin-6-yl)karbamát (**55**)



Látka **54** (373 mg; 1,80 mmol; 1,0 ekv.) byla suspendována v bezvodém pyridinu (8 ml) pod inertní atmosférou za laboratorní teploty. Do reakční směsi byl přikapán trimethylsilylchlorid (587 mg; 685 μl; 5,40 mmol; 3,0 ekv.) za současného odbarvení směsi. Po 30 minutách míchání byl do reakce přidán Fmoc chlorid (559 mg; 2,16 mmol; 1,2 ekv.) za pozorovaného zežloutnutí směsi. Reakce byla za stejné teploty míchána přes noc. Po 22 hodinách byl ve směsi identifikován produkt **55** pomocí TLC (EtOAc; *R_F* = 0,38), rozpouštědlo bylo odpařeno, residuum bylo rozpuštěno v EtOAc (100 ml) a promyto vodou (50 ml) a nasyceným roztokem NaCl (50 ml). Organický podíl byl vysušen bezvodým MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Produkt **55** byl přečištěn sloupcovou

chromatografií (EtOAc) a získán ve formě bezbarvé pevné látky ve výtěžku 59% (574 mg).

Teplota tání: 210,6 – 211,5 °C.

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): δ 0,08 (s; 9H); 1,52 (dt; *J* = 12,6; 6,1; 2H); 2,01 – 1,89 (m; 2H); 3,58 (t; *J* = 6,1; 2H); 4,27 (t; *J* = 7,2; 2H); 4,33 (t; *J* = 6,7, 1H); 4,63 (d; *J* = 6,7; 2H); 7,26 (t; *J* = 7,6; 2H); 7,37 (t; *J* = 7,6; 2H); 7,61 (d; *J* = 7,5, 2H); 7,73 (d; *J* = 7,5; 2H); 7,98 (s; 1H); 8,79 (s; 1H); 9,04 (s; 1H).

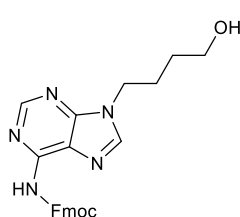
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ -0,5 (3C); 27,0; 29,5; 44,2; 47,1; 61,8; 67,8; 120,1 (2C); 122,1; 125,1 (2C); 127,3 (2C); 127,9 (2C); 141,4 (2C); 142,9; 143,6 (2C); 149,5; 151,5; 151,8; 152,8.

IČ (CHCl₃): 3405, 1759, 1732, 1614, 1587, 1528, 1472, 1405, 1253, 1154, 1106, 1094, 990, 870, 844 cm⁻¹.

LR ESI MS: 524 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₇H₃₁O₃N₅NaSi 524,2088; nalezeno 524,2088.

(9*H*-Fluoren-9-yl)methyl (9-(4-hydroxybutyl)-9*H*-purin-6-yl)karbamát (**56**)



Látka **55** (117 mg; 0,233 mmol; 1,0 ekv.) byla rozpuštěna v THF (3 ml) za laboratorní teploty. Do reakční směsi byla přidána 1M HCl (0,5 ml). Po 45 minutách byl ve směsi detekován pomocí TLC (EtOAc/MeOH, 10:1) pouze produkt **56** (*R_F* = 0,25), rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO a produkt **56** byl získán v kvantitativním výtěžku (100 mg) ve formě bezbarvé pevné látky.

Teplota tání: 138,1 – 139,0 °C.

¹H NMR (401 MHz, *d*₆-DMSO): δ 1,37 – 1,48 (m; 2H); 1,88 – 1,97 (m; 2H); 3,41 (t; *J* = 6,3; 2H); 4,34 – 4,42 (m; 3H); 4,51 (d; *J* = 7,3; 2H); 6,11 (bs; 2H); 7,35 (td; *J* = 7,5; 1,2; 2H); 7,43 (t; *J* = 7,5; 2H); 7,84 (d; *J* = 7,4; 2H); 7,91 (d; *J* = 7,4; 2H); 8,82 (s; 1H); 9,26 (s; 1H).

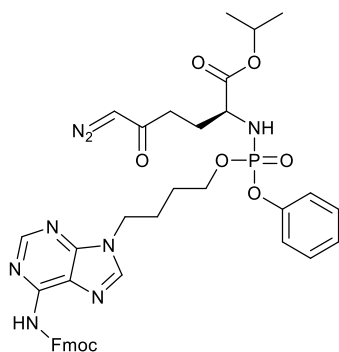
¹³C NMR (101 MHz, *d*₆-DMSO): δ 25,8; 29,3; 44,4; 46,2; 60,0; 67,5; 117,4; 120,2 (2C); 125,5 (2C); 127,2 (2C); 127,9 (2C); 140,8 (2C); 141,0; 143,4 (2C); 147,6; 151,1; 151,5; 152,9.

IČ (CHCl₃): 3424, 3260, 2947, 2876, 1745, 1653, 1622, 1597, 1552, 1527, 1469, 1421, 1407, 1253, 1217, 1034, 988, 761, 742, 609 cm⁻¹.

LR ESI MS: 452 ($[M + Na]^+$).

HR ESI MS: vypočteno pro $C_{24}H_{23}O_3N_5Na$ 452,1693; nalezeno 452,1693.

Isopropyl (2*S*)-2-(((4-(6-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)karbonyl)amino)-9*H*-purin-9-yl)butoxy)(fenoxy)fosforyl)amino)-6-diazo-5-oxohexanoát (57)



Fenyl dichlorofosfát (400 mg; 280 μ l; 1,90 mmol; 1,0 ekv.)

byl rozpuštěn v bezvodém THF (8 ml) pod inertní atmosférou dusíku a reakční směs byla ochlazena na 0 °C.

Byl přidán collidin (2,30 g; 2,5 ml; 19,0 mmol; 10 ekv.)

a po 10 minutách míchání byl přikapán roztok látky **56** (500 mg; 1,16 mmol; 0,6 ekv.) v bezvodém THF (4 ml).

Po 30 minutách byl do reakční směsi pozvolna přikapán roztok látky **41** (250 mg; 1,17 mmol; 0,6 ekv.) v bezvodém

THF (4 ml). Směs byla míchána ještě 1,5 hodiny při stejné teplotě a následně byla reakce ukončena a rozpouštědla odpařena na RVO. Produkt **57** byl ve směsi detekován pomocí TLC ($CHCl_3/MeOH$, 15:1; $R_F = 0,35$). Reakční směs byla rozpuštěna v DCM (100 ml) a promyta vodou (100 ml). Organický podíl byl vysušen bezvodým $MgSO_4$ a rozpouštědlo bylo odpařeno. Produkt **57** (518 mg; 35%) byl ze směsi izolován sloupcovou chromatografií ($CHCl_3/MeOH$, 40:1) ve formě žluté amorfnní látky.

1H NMR (401 MHz, $CDCl_3$): 1,17 – 1,22 (m; 6H); 1,60 – 1,73 (m; 2H); 1,82 – 1,99 (m; 3H); 2,02 – 2,14 (m; 1H); 2,27 – 2,42 (m; 2H); 3,79 – 3,88 (m; 1H); 3,88 – 4,00 (m; 1H); 4,03 – 4,17 (m; 2H); 4,17 – 4,27 (m; 2H); 4,31 (t; $J = 6,8$; 1H); 4,61 (d; $J = 6,8$; 2H); 4,97 (hept; $J = 6,3$; 1H); 5,13 (bs; 1H); 7,08 – 7,14 (m; 1H); 7,16 – 7,22 (m; 2H); 7,24 – 7,31 (m; 4H); 7,37 (t; $J = 7,4$; 2H); 7,62 (d; $J = 7,5$; 2H); 7,73 (d; $J = 7,6$; 2H); 7,97 (d; $J = 13,0$; 1H); 8,76 (d; $J = 4,7$; 1H); 8,97 (bs; 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): 21,8; 21,8; 26,3; 27,2 (d; $J = 2,7$); 29,2; 36,0; 43,5 (d; $J = 3,6$); 47,0; 54,1; 54,2; 66,3 (d; $J = 5,4$); 67,8; 69,7 (d; $J = 3,2$); 120,1 (2C); 120,2 (d; $J = 4,9$); 120,4 (d; $J = 4,8$); 122,1 (d; $J = 3,0$); 125,0 (d; $J = 6,2$); 125,1 (2C); 127,2 (2C); 127,9 (2C); 129,8 (2C); 141,4 (2C); 142,9; 143,6 (2C); 149,5; 150,9 (d; $J = 2,1$); 151,4; 151,7; 152,7; 172,2 (d; $J = 5,6$); 193,4.

^{31}P NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ 5,44; 5,63.

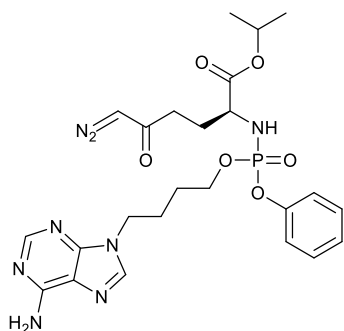
Optická rotace: $[\alpha]_D^{22} +4,1^\circ$ (c 0,122; $CHCl_3$).

IČ (CHCl₃): 3435, 3200, 3067, 2104, 1733, 1702, 1635, 1616, 1585, 1466, 1452, 1401, 1386, 1213, 1106, 990, 761, 743, 646 cm⁻¹.

LR ESI MS: 803 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₃₉H₄₁O₈N₈NaP 803,2677; nalezeno 803,2679.

Isopropyl (2S)-2-(((4-(6-amino-9H-purin-9-yl)butoxy)(fenoxy)fosforyl)amino)-6-diazo-5-oxohexanoát (58)



Látka **57** (102 mg; 130 μmol, 1,0 ekv.) byla rozpuštěna v bezvodém DCM pod inertní atmosférou za laboratorní teploty. Do reakční směsi byl pozvolna přikapán diethylamin (84,5 mg; 119 μl; 650 μmol; 5,0 ekv.) a směs byla míchána 3 hodiny při stejné teplotě. Produkt **58** byl v reakční směsi detekován pomocí TLC (CHCl₃/MeOH, 20:1; R_F = 0,20). Rozpouštědlo

bylo odpařeno a produkt **58** (48 mg; 66%) byl izolován sloupcovou chromatografií (gradient CHCl₃/MeOH, 20:1 → 10:1) ve formě amorfni světle žluté látky.

¹H NMR (401 MHz, CDCl₃): 1,16 – 1,23 (m; 6H); 1,61 – 1,77 (m; 2H); 1,82 – 2,02 (m; 3H); 2,03 – 2,15 (m; 1H); 2,18 – 2,42 (m; 2H); 3,84 – 4,00 (m; 1H); 4,04 – 4,28 (m; 5H); 4,97 (hept; J = 6,3; 1H); 5,14 (bs; 1H); 5,99 (bs; 2H); 7,09 – 7,15 (m; 1H); 7,16 – 7,22 (m; 2H); 7,26 – 7,32 (m; 2H); 7,78 (d; J = 12,6; 1H); 8,33 (d; J = 5,8; 1H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): 21,8; 21,8; 26,5; 27,3 (d; J = 3,3); 29,3; 36,1; 43,3 (d; J = 1,6); 54,2; 66,3 (d; J = 5,7); 67,8; 69,6 (d; J = 2,8); 119,7 (d; J = 2,8); 120,2 (d; J = 4,9); 120,4 (d; J = 4,8); 125,0 (d; J = 5,4); 129,8 (2C); 140,6; 150,1; 150,9; 152,9; 155,6; 172,3 (d; J = 5,3); 193,5.

³¹P NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 5,56; 5,75.

Optická rotace: [α]²²_D +8,8° (c 0,272; CHCl₃).

IČ (CHCl₃): 3525, 3484, 3254, 2110, 1731, 1644, 1633, 1591, 1507, 1491, 1473, 1456, 1448, 1376, 1327, 1301, 1105, 650, 616 cm⁻¹.

ESI MS: 581 ([M + Na]⁺).

HR ESI MS: vypočteno pro C₂₄H₃₁O₆N₈NaP 581,1996; nalezeno 581,1997.

6. Závěr

V první části mé experimentální práce jsem úspěšně zopakovala přípravu klíčového intermediátu isopropyl (*S*)-2-amino-6-diazo-5-oxohexanoátu **41**, pro který byla na našem pracovišti již dříve vyvinuta a optimalizována metoda. Jednalo se o čtyř krokovou syntézu vycházející z komerčně dostupné kyseliny L-pyroglutamové (**37**), která byla nejprve převedena na isopropylester **38**, jehož pyrolidinonový dusík byl poté ochráněn 9-fluorenylmethoxykarbonylovou skupinou za vzniku derivátu **39**. Pyrolidinonový cyklus byl následně otevřen pomocí *in situ* generované lithné soli trimethylsilyldiazomethanu za přípravy látky **40**. V posledním kroku pak došlo v přítomnosti sekundárního aminu k ochránění aminoskupiny za vzniku produktu **41**. Celkový výtěžek této syntézy činil 41%.

Na základě dříve pozorované nestability látky **41**, kdy dochází k přeměně na cyklický diazo-imin **44**, byl tento intermediát zkoumán v jednoduchém NMR experimentu. Vzorek látky byl rozpuštěn ve dvou různých deuterovaných rozpouštědlech - CDCl₃ a *d*₆-DMSO a ponechán stát v příslušných roztocích v NMR kyvetách při laboratorní teplotě. V různých časových intervalech (30 minut až 1 měsíc) pak byly měřeny ¹H NMR spektra těchto vzorků. Z naměřených dat byla poté porovnávána stabilita látky. V případě CDCl₃, který obsahuje malé množství DCl, dochází již během prvních minut k pozorované tvorbě cyklického diazo-iminu **44**. Výchozí látka prakticky zmizí během jednoho dne a měřené spektrum se pak v průběhu času již dále nemění. Oproti tomu je látka **41** výrazně stabilnější v *d*₆-DMSO, kdy určitá míra rozkladu/cyklizace je pozorována teprve ve spektru měřeném po měsíci od jejího rozpuštění.

Z takto připravené látky **41** byly následně úspěšně syntetizovány dva fosfonáty, isopropyl (2*S*)-2-(((4-aminobutoxy)(fenoxy)fosforyl)amino)-6-diazo-5-oxohexanoát (**50**) a isopropyl (2*S*)-2-(((4-(6-amino-9*H*-purin.9-yl)butoxy)(fenoxy)fosforyl)amino)-6-diazo-5-oxohexanoát (**58**), které jsou v současné době používány pro různá biologická testování na našem spolupracujícím pracovišti (Johns Hopkins University, USA).

V obou případech bylo použito podobných dvou krokových syntéz zahrnujících v prvním kroku dvojnásobnou substituci atomu chloru u dichlorofosfátu za amin látky **41** a hydroxy skupinu intermediátů **46** nebo **56**. Tyto sloučeniny jsem si předně připravila na základě literární předlohy⁽²⁴⁾ nebo jejich obměn. Výtěžky prvního kroku

se pohybovaly v rozmezí 35-41%. Ve druhém kroku jsem poté opět použila sekundárního aminu pro shození chránící skupiny a tím pro přípravu volného aminu látek **50** a **58** ve výtěžku 73% respektive 66%. Zatímco první zmíněný derivát **50** byl značně nestabilní a okamžitě se rozkládal na směs různých látek, finální produkt **58** byl mnohem stabilnější.

Všechny syntetizované deriváty byly po izolaci z reakčních směsí plně charakterizovány pomocí dostupných spektrálních metod (viz Experimentální část) a u všech popisovaných reakcí byly navrženy reakční mechanismy.

7. Literatura

- (1) Dion, H. W.; Fusari, S. A.; Jakubowski, Z. L.; Zora, J. G.; Bartz, Q. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 3075–3077.
- (2) Magill, G. B.; Myers, W. P. L.; Reilly, H. C.; Putnam, R. C.; Magill, J. W.; Sykes, M. P.; Escher, G. C.; Karnofsky, D. A.; Burchenal, J. H. *Cancer* **1957**, *10*, 1138–1150.
- (3) Maux, P. L.; Nicolas, I.; Chevance, S.; Simonneaux, G. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 4462–4468.
- (4) Alt, J.; Potter, M. C.; Rojas, C.; Slusher, B. S. *Anal. Biochem.* **2015**, *474*, 28–34.
- (5) DeWald, H. A.; Moore, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 3941–3945.
- (6) Pettit, G. R.; Nelson, P. S. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 741–744.
- (7) Coutts, I. G. C.; Saint, R. E. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3243–3246.
- (8) Walker, B.; Brown, M. F.; Lynas, J. F.; Martin, S. L.; McDowell, A.; Badet, B.; Hill, A. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2795–2798.
- (9) Warburg, O.; Posener, K.; Negelein, E. *Biochemische Zeitschrift* **1924**, *152*, 319–344.
- (10) Slaninová, V.; Kejčí, A. *Živa* **2013**, *5*, 202 – 205.
- (11) Ortlund, E.; Lacount, M. W.; Lewinski, K.; Lebioda, L. *Biochemistry* **2000**, *39*, 1199–1204.
- (12) LaRonde-LaBlanc, N.; Resto, M.; Gerratana, B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 421–429.
- (12) Tarnowski, G. S.; Mountain, I. M.; Stock, C. Ch. *Cancer Res.* **1970**, *30*, 1118–1122.
- (13) Mueller, C.; Al-Batran, S.; Jaeger, E.; Schmidt, B.; Bausch, M.; Unger, C.; Sethuraman, N. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 2533.
- (14) Rajagopalan, P. T. R.; Zhang, Z.; McCourt, L.; Dwyer, M.; Benkovic, S. J.; Hammes, G. G. *PNAS* **2002**, *99*, 13481–13486.
- (15) Goodsell, D. S. *The Oncologist* **1999**, *4*, 340–341.
- (16) Gangjee, A.; Kalman, T. I.; Bardos, T. J. *J. Pharm. Sci.* **1982**, *71*, 717–719.
- (17) Rais, R.; Jančařík, A.; Tenora, L.; Nedelcovych, M.; Alt, J.; Englert, J.; Rojas, C.; Le, A.; Elgogary, A.; Tan, J.; Monincová, L.; Pate, K.; Adams, R.; Ferraris, D.; Powell, J.; Majer, P.; Slusher, B. S. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 8621–8633.

- (18) Nedelcovych, M. T.; Tenora, L.; Kim, B. H.; Kelschenbach, J.; Chao, W.; Hadas, E.; Jančařík, A.; Prchalová, E.; Zimmermann, S. C.; Dash, R. P.; Gadiano, A. J.; Garret, C.; Furtmüller, G.; Oh, B.; Brandacher, G.; Alt, J.; Majer, P.; Volsky, D. J.; Rais, R.; Slusher, B. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7168–7198.
- (19) Elbirt, D.; Guri, K. M.; Rosenberg, S. B.; Gill, H.; Attali, M.; Asher, I. *IMAJ* **2015**, *17*, 54–59.
- (20) Mehellou, Y.; Rattan, H. S.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **2017**, *61*, 2211–2226.
- (21) Mehellou, Y.; Balzarini, J.; McGuigan, C. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1779–1791.
- (22) Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. *Purification of laboratory chemicals*; IV. vydání, **1996**, Oxford: Butterworth-Heinemann, ISBN 0–7506–3761–7.
- (23) Rosenberg, I.; Holý, A.; Masojídková, M. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1988**, *53*, 2753–2777.