

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

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

Doktorský studijní program: Organická chemie P1402  
Ph.D. study program: Organic chemistry P1402

*Autoreferát disertační práce*

*Summary of the Ph.D. Thesis*



Syntéza a studium reaktivity a biologické aktivity C-5 substituovaných analog  
uracilu

Synthesis, reactivity and biological activity of C-5 substituted uracil analogues

**RNDr. Lucie Brulíková**

Školitel/Supervisor: prof. RNDr. Antonín Holý, DrSc., Dr.hc. mult.

Školitel-konzultant/Supervisor-consultant: doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

Praha, 2011

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: RNDr. Lucie Brulíková (roz. Spáčilová)  
Název práce: Syntéza a studium reaktivity a biologické aktivity C-5  
substituovaných analog uracilu  
Typ práce: doktorská  
Pracoviště: Katedra organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity  
Palackého v Olomouci  
Školitel: prof. RNDr. Antonín Holý, Dr.Sc., Dr.hc. mult.  
Školitel-konzultant: doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.  
Rok obhajoby práce: 2011  
Abstrakt:

Předložená disertační práce je zaměřena na syntézu 5-substituovaných derivátů uracilu, jejich reaktivitu a studium biologické aktivity, především aktivity protinádorové. V úvodní části je vytvořen přehled dosud popsáných výsledků vybraných C-5 substituovaných derivátů uracilu na poli jejich syntézy a studia biologické aktivity. Druhá část je věnována designu nových C-5 modifikovaných analog uracilu, vývoji a optimalizaci postupů vedoucích k cílovým sloučeninám, studiu biologické aktivity a odvození vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR studie). V této části je prezentována syntéza série derivátů odvozených od 5-[alkoxy(4-nitrofenyl)methyl]uracilu a 5-alkoxymethyluracilu a rozsáhlá SAR studie v závislosti na typu substituce methylenového můstku bezprostředně navázaného do polohy C-5 a dále v závislosti na délce alkoxylového řetězce. V poslední části disertační práce je popsána syntéza dvou typů oligodeoxynukleotidů, z nichž první skupina je modifikována fenoltriazolovým skeletem navázaným do polohy C-5 a druhá skupina obsahuje v poloze C-5 bromofenylethynylový zbytek. Cílem takovéto modifikace je najít termicky stabilní sekvence použitelné v antisense terapii jako prostředek kontroly genové exprese.

Klíčová slova: Uracil, biologická aktivita, protinádorová aktivita.  
Počet stran: 141  
Počet příloh: 1  
Jazyk: anglický

## **Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: RNDr. Lucie Brulíková (nee Spáčilová)  
Title: Synthesis, reactivity and biological activity of C-5 substituted uracil analogues  
Type of thesis: Ph.D. thesis  
Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc  
Advisor: prof. RNDr. Antonín Holý, Dr.Sc., Dr.hc. mult.  
Advisor-consultant: doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.  
The year of presentation: 2011  
Abstract:

The presented thesis is focused on the synthesis of various C-5 modified uracil analogues, the study of their reactivity and biological activity, especially cytotoxic activity. In the first part, the brief survey of described results for selected 5-alkoxymethyluracil analogues is performed. The second part of the presented thesis deals with the synthesis of novel uracil analogues modified at the C-5 position, the development and optimizing of procedure leading to the desired compounds, the study of biological activity and the evaluation of structure-activity relationship (SAR). This part presents the synthesis of a series of 5-[alkoxy(4-nitrophenyl)methyl]uracil and 5-alkoxymethyluracil analogues and extended SAR studies depending on a substitution of methylene bridge directly attached at the C-5 position as well as alkoxy chain length. The last part of the presented work is focused on synthesis of pyrimidine oligodeoxynucleotides containing either substituted phenyltriazole or substituted phenylethynyl moiety at position C-5. The synthesis of such a modified oligodeoxynucleotides follows antisense approach that involves targeting of RNA within cells as a means of control of gene expression.

Keywords: Uracil, biological activity, cytotoxic activity.  
Number of pages: 141  
Number of appendixes: 1  
Language: English

## Obsah / Table of contents

### *Kapitoly v české části autoreferátu:*

1. Úvod .....	5
2. Cíle práce .....	5
3. Výsledky a diskuse .....	7
4. Závěry .....	12

### *Kapitoly v anglické části autoreferátu:*

1. Introduction .....	15
2. Aims of the study .....	15
3. Results and discussion .....	17
4. Conclusions .....	22
5. References / Použitá literatura .....	25

Curriculum vitae .....	26
------------------------	----

Seznam publikací / Selected publications .....	28
--	----

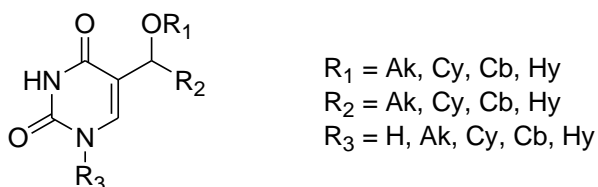
## 1. Úvod

Modifikace jednotlivých složek nukleových kyselin hraje v této oblasti výzkumu významnou roli. Na trhu již existuje celá řada preparátů, modifikovaných analogů přírodních nukleobází i nukleosidů, které našly široké terapeutické uplatnění zejména v oblasti protinádorové a protivirové terapie.

Jedním z takovýchto derivátů je např. 5-fluorouracil, po chemické i biologické stránce jedno z nejvíce prozkoumaných cytostatik, které stálo na počátku výzkumu 5-substituovaných pyrimidinových analogů. Celá řada C-5 substituovaných derivátů pyrimidinu je také známá svou schopností zasáhnout do životního cyklu viru a působit jako vysoce účinná antivirotika. Do této skupiny látek řadíme např. 5-iodo-2'-deoxyuridin účinný proti HSV a VZV virům.

Ze současných znalostí a porozumění procesům probíhajících během buněčného cyklu i životního cyklu viru čerpáme inspiraci k vývoji nových potenciálně biologicky aktivních látek, jejichž účinek by byl selektivnější, specifitější a pro organismus méně toxický.

Jedna ze skupin zkoumaných derivátů jsou analoga uracilu modifikovaných v poloze C-5 etherovým či esterovým zbytkem (Obr. 1). Přehled dosud popsanych výsledků vybraných C-5 substituovaných derivátů uracilu je náplní první části disertační práce.

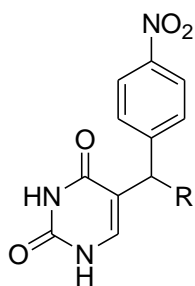


**Obr 1.** Zkoumané deriváty.

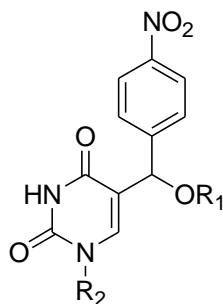
## 2. Cíle práce

Hlavním cílem předložené disertační práce byla syntéza a studium biologické aktivity nových C-5 modifikovaných analogů uracilu. Disertační práce je z tohoto pohledu rozdělena do tří hlavních částí.

První část je zaměřena na syntézu analogu 5-[(4-nitrofenyl)methyl]uracilu (Obr 2) a zhodnocení jejich cytotoxické aktivity.



- 1 R = OH  
 2 R = Cl  
 3 R = N<sub>3</sub>  
 4 R = uracil  
 5 R = OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH

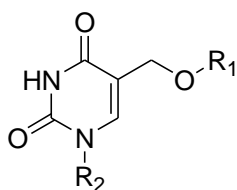


- 6 R<sub>1</sub> = alkyl, R<sub>2</sub> = H  
 7 R<sub>1</sub> = alkyl, R<sub>2</sub> = ribose

- a) R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>  
 b) R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 c) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 d) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>  
 e) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>  
 f) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>  
 g) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>  
 h) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>  
 i) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CH<sub>3</sub>  
 j) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>3</sub>  
 k) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>  
 l) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>  
 m) R<sub>1</sub> = i-Pr  
 n) R<sub>1</sub> = s-But  
 o) R<sub>1</sub> = t-But

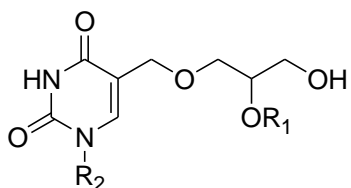
**Obr 2.** Přehled připravených derivátů odvozených od 5-[(4-nitrofenyl)methyl]uracilu.

V druhé části disertační práce je pozornost zaměřena na syntézu analog 5-alkoxymethyluracilu (*Obr 3*), studium jejich cytotoxické aktivity, porovnání s předchozími deriváty nitrofenylmethyluracilu a vytvoření SAR studie.



- 8 R<sub>1</sub> = alkyl, R<sub>2</sub> = H  
 9 R<sub>1</sub> = alkyl, R<sub>2</sub> = ribose

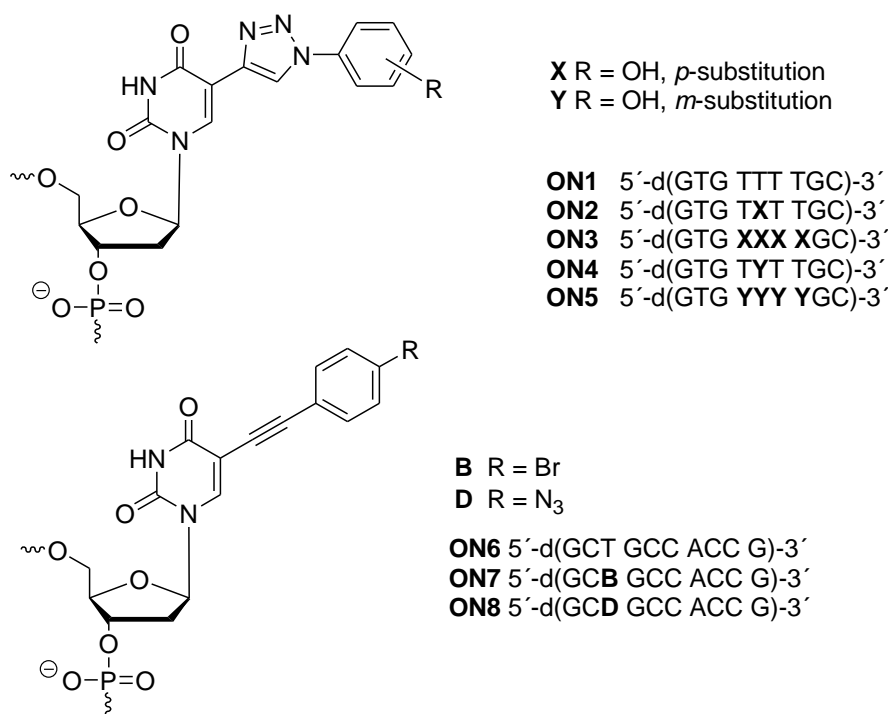
- a) R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>  
 b) R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 c) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 d) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>  
 e) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>  
 f) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>  
 g) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>CH<sub>3</sub>  
 h) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH<sub>3</sub>  
 i) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CH<sub>3</sub>  
 j) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>3</sub>  
 k) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>CH<sub>3</sub>  
 l) R<sub>1</sub> = (CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>  
 m) R<sub>1</sub> = i-Pr  
 n) R<sub>1</sub> = s-But  
 o) R<sub>1</sub> = t-But



- 10 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H  
 11 R<sub>1</sub> = CO(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H  
 12 R<sub>1</sub> = COCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H  
 13 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = ribose

**Obr 3.** Přehled připravených derivátů odvozených od 5-alkoxymethyluracilu.

Poslední část presentované práce je zaměřena na syntézu oligodeoxynukleotidů obsahujících uracil modifikovaný v poloze C-5 fenyltriazolovým skeletem (**ON2-ON5**) nebo fenylethylylovým zbytkem (**ON7-ON8**) (*Obr. 4*). Připravené oligodeoxynukleotidy byly studovány z hlediska jejich termické stability i postsyntetické reaktivity.

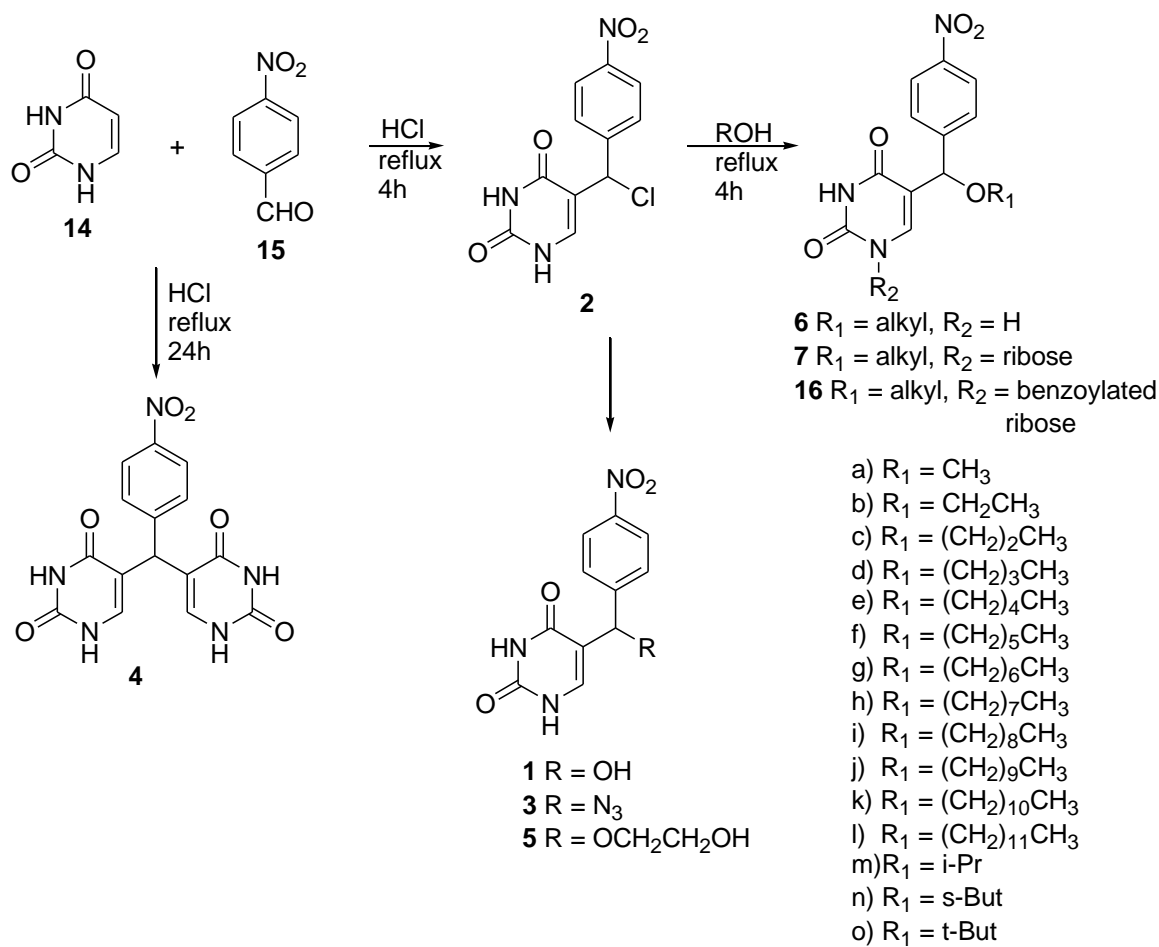


**Obr 4.** Přehled oligodeoxynukleotidů **ON1-ON8**.

### 3. Výsledky a diskuse

#### 3.1. Studium syntézy a biologické aktivity derivátů odvozených od 5-[(4-nitrofenyl)methyl]uracilu.

V rámci první části disertační práce byla připravena série derivátů strukturně odvozených od 5-[(4-nitrofenyl)methyl]uracilu za účelem studia jejich biologické aktivity (*Schéma 1*). Reakce uracilu **14** s *p*-nitrobenzaldehydem **15** poskytla reaktivní chlorderivát **2** a také známý bis-uracil derivát **4**.<sup>1</sup> Substituční reakce chlorderivátu **2** vedly k syntéze série alkoxyderivátů **6** stejně tak jako hydroxy sloučenin **1** a **5** a azidoderivátu **3**.<sup>2</sup> Efektivní ribosylace<sup>3</sup> nukleobází **6** poskytla chráněné nukleosidy **16** v jejich diastereomerní směsi. Ze směsi diastereomerů **16f-i** byly izolovány vždy dva isomery, které byly spolu s neseparovanými směsmi **16a-e** a **16m-n** ochráněny reakcí s methanolickým amoniakem za vzniku nukleosidů **7**.<sup>4</sup>



**Schéma 1.** Syntéza analog odvozených od 5-[(4-nitrofenyl)methyl]uracilu.

Všechny připravené sloučeniny byly testovány z hlediska jejich cytotoxické aktivity *in vitro* proti nádorový liniím CEM, K562, jejich drug rezistentním protějškům CEM-DNR-bulk a K562-tax, a dále proti A549, HCT116p53 a HCT116p53<sup>-/-</sup> buněčným liniím. Všechny výstupy testování cytotoxicity indikují, že žádná z připravených sloučenin nevykazuje signifikantní cytotoxickou aktivitu. Nicméně aktivita alkoxyderivátů **6** a jejich nukleosidových analog **7** vykazuje zajímavou závislost na délce postranního alkoxylového řetězce. Z tohoto důvodu může být spojení cytotoxické aktivity a látek s delším lipofilním řetězcem slibné pro další vývoj.

Dále pak bylo zjištěno, že deriváty **6f-h** inhibují syntézu DNA i RNA a indukují apoptózu při koncentraci 5x IC<sub>50</sub> (na CEM buňkách) a deriváty **6f** inhibují syntézu DNA již při koncentraci 1x IC<sub>50</sub>.<sup>2,4</sup>



### 3.2. Studium syntézy a biologické aktivity analog 5-alkoxymethyluracilu.

Tato část disertační práce je zaměřena na syntézu sloučenin odvozených od 5-alkoxymethyluracilu (Schéma 2) a studium jejich chemických a biologických vlastností. Nejdříve byla pozornost zaměřena na syntézu etherů **8** a **9** za účelem testování jejich cytotoxické aktivity a srovnání s předchozími nitrofenyl analogy **6** a **7**. Modifikované nukleobáze **8** byly připraveny reakcí 5-chloromethyluracilu **17**<sup>5,6</sup> s různými alifatickými alkoholy a dále převedeny na odpovídající ribonukleosidy **9** využitím Vorbrüggenovy metody.<sup>3</sup>

Studie v této oblasti byly dále rozšířeny na syntézu derivátů **11** a **12** obsahujících 2,3-dihydroxy-1-propoxy zbytek. Tyto estery byly úspěšně připraveny z dihydroxyderivátu **10**, který byl rovněž ribosylován za vzniku nukleosidu **13**.

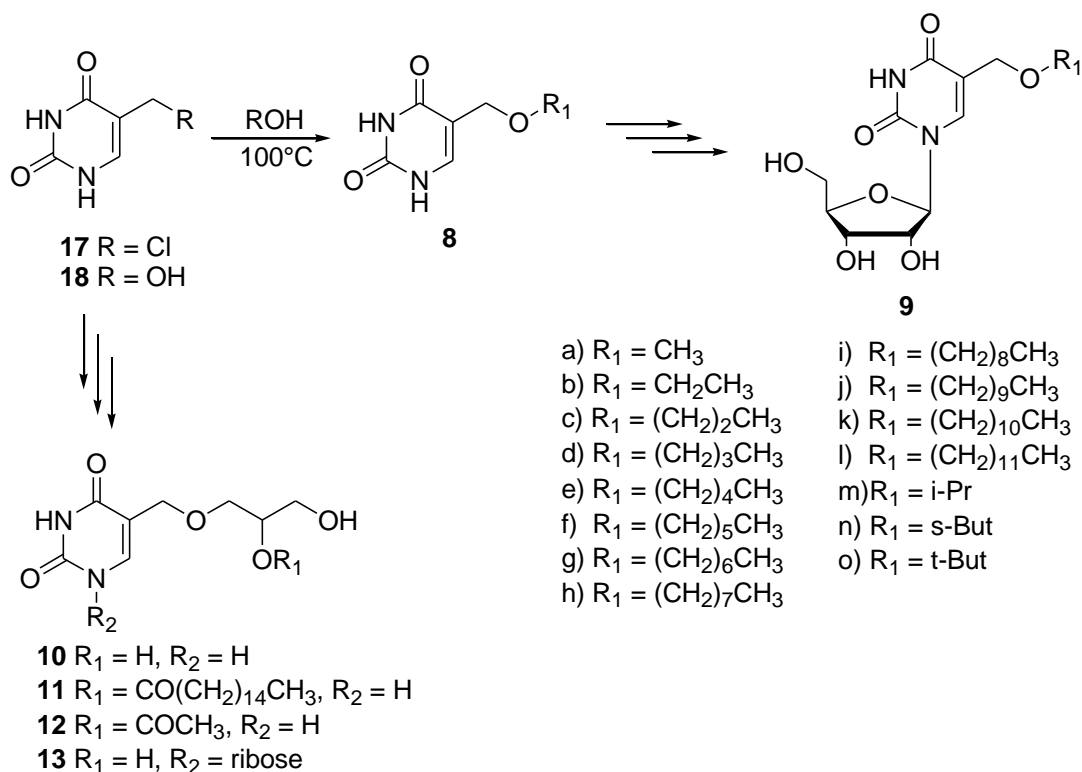


Schéma 2. Syntéza analog odvozených od 5-alkoxymethyluracilu.

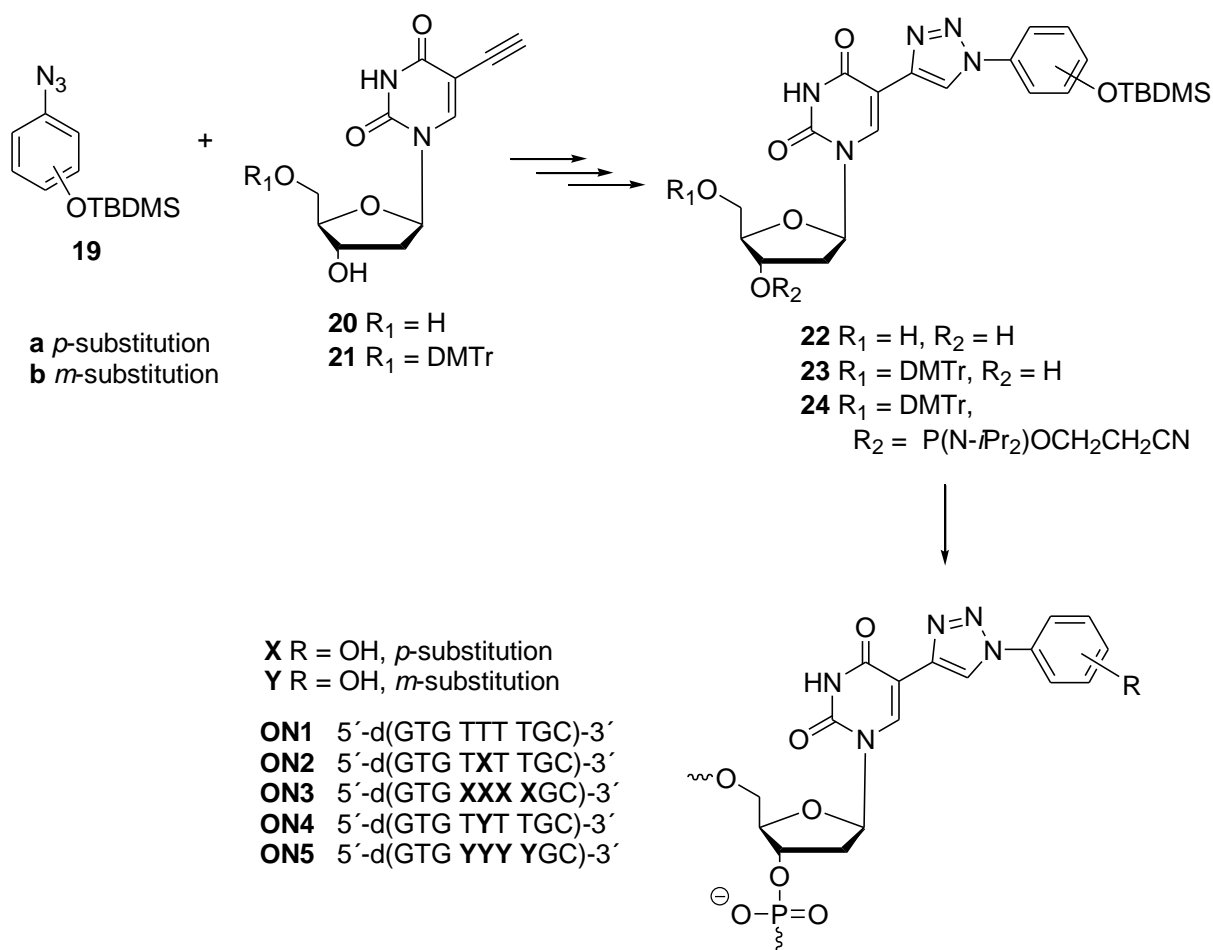
Sloučeniny **8** a **9** byly testovány z hlediska jejich cytostatických vlastností na několika nádorových liniích (CEM, K562, CEM-DNR-bulk, K562-tax, A549, HCT116p53 a HCT116p53-/-). Zatímco deriváty s rozvětveným alifatickým řetězcem **8m-o** a **9m-o** nevykazují žádnou signifikantní aktivitu, deriváty **8a-l** a **9a-l** prokázaly zajímavou závislost aktivity na délce alkylového řetězce. Nejzajímavějších výsledků bylo dosaženo v případě

nukleobází **8** proti drug rezistentním leukemickým nádorovým buněčným liniím, kde aktivita dosahovala mikromolárních hodnot  $IC_{50}$ , a to především u derivátů s delším alifatickým řetězcem ( $IC_{50} = 2.4-9.3 \mu M$ ). Srovnání cytotoxické aktivity nukleobází **8** a nukleosidů **9** proti drug rezistentním leukemickým nádorovým buněčným liniím (CEM-DNR-bulk a K562-tax) indikuje významné snížení aktivity v případě nukleosidů **9**.

Srovnání cytotoxické aktivity bází **8** a **6** indikuje, že nukleobáze **6** vykazují signifikantně nižší aktivitu proti CEM-DNR-bulk buněčné linii, ale jsou významně aktivnější proti oběma HCT buněčným liniím. Navíc, cytotoxická aktivita nukleosidů **7f-i** a **9f-i** ukazuje, že nukleosidy **7f-i** obsahující objemný nitrofenylový zbytek vykazují signifikantně vyšší cytotoxicitu než jejich alkoxymethyluracilová analoga **9f-i**.

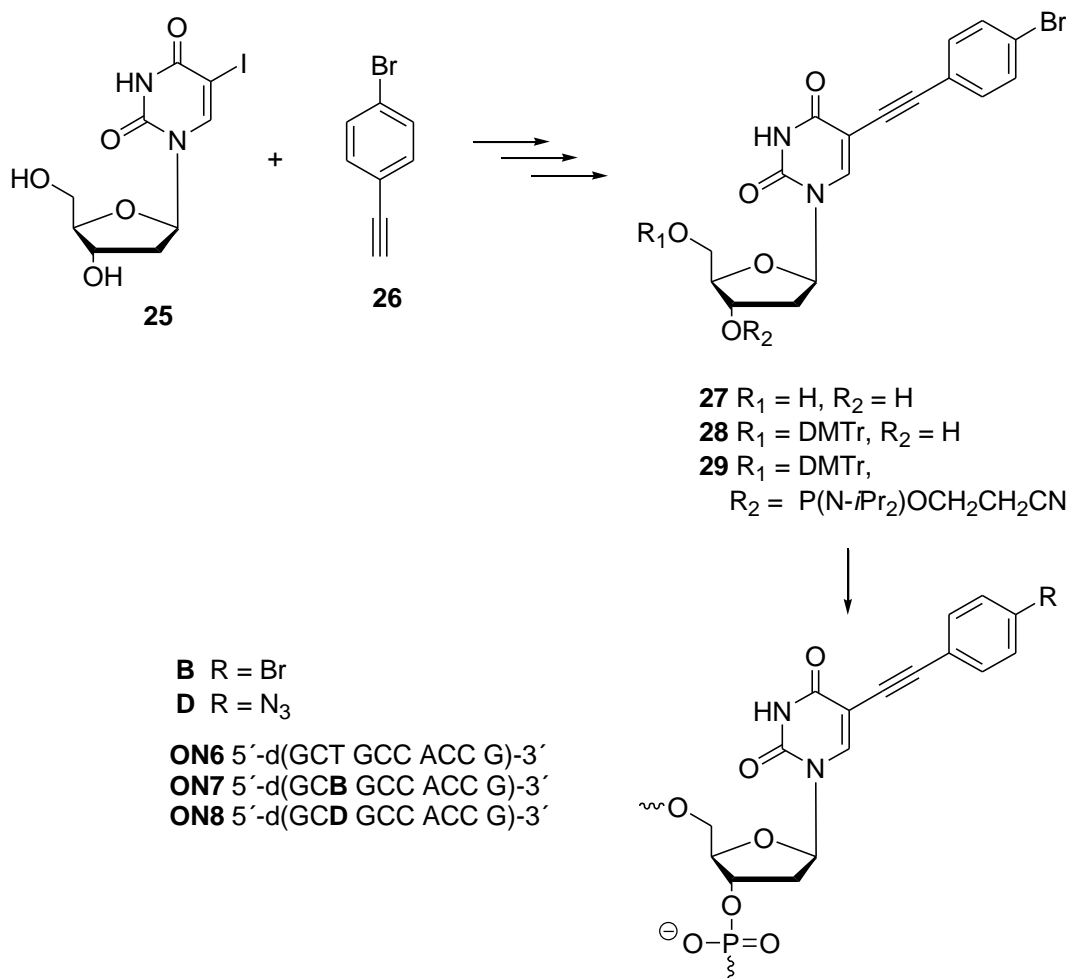
### 3.3. Syntéza modifikovaných oligodeoxynukleotidů

Třetí část prezentované práce je věnována syntéze oligodeoxynukleotidů a studiu jejich termické stability. Nejprve byla provedena Huisgen [3+2] cykloadice silylovaných sloučenin **19** s 5-ethynyl-2'-deoxyuridinem **20** či 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-ethynyl-2'-deoxyuridinem **21**, která poskytla odpovídající nukleosidy **22** a **23** (Schéma 3).<sup>7</sup> Fosfitylace nukleosidů **23** použitím 2-kyanoethyl-*N,N'*-(diisopropyl)-fosforamidochloriditu za přítomnosti diisopropylethylaminu poskytla fosforamidity **24**, který byly poté inkorporovány do oligodeoxynukleotidů **ON2-ON5** s využitím automatického DNA syntetizátoru. Oligodeoxynukleotidy **ON2-ON4** byly pomocí hybridizačních experimentů studovány z hlediska jejich termické stability. Z výsledků těchto měření plyne, že záměna centrálního thymidinu v oligonukleotidu **ON1** monomerem **X** nebo **Y** (oligonukleotidy **ON2** či **ON4**) vede k jasné destabilizaci DNA i RNA duplexu. Záměna čtyř po sobě jdoucích thymidinů monomerem **X** (**ON3**) vykazuje signifikantní stabilizaci v případě DNA:RNA duplexu ( $\Delta T = +4.8^\circ C$ ). Protože tato modifikace vede ke stabilním DNA:RNA duplexům, monomer **X** vykazuje slibný potenciál v antisense terapii.



**Schéma 3.** Syntéza oligodeoxynukleotidů **ON2-ON5**.

Dále pak byla provedena Sonogashira coupling reakce<sup>8</sup> 5-iodo-2'-deoxyuridinu **25** s 1-bromo-4-ethynylbenzenem **26**, která poskytla nukleosid **27** (Schéma 4). Tento derivát byl následně převeden na odpovídající fosforamidit **29** standardní 3'-*O*-fosfitylací s použitím 2-cyanoethyl-*N,N'*-(diisopropyl)-fosforamidochloriditu. Derivát **29** byl efektivně inkorporován do oligodeoxynukleotidu **ON7**. Následně byla studována reaktivita bromo skupiny oligonukleotidu **ON7** obsahujícího monomer **B** s myšlenkou postsyntetického značení DNA.<sup>9,10,11</sup> Tyto pokusy ovšem nebyly úspěšné. Nicméně konverze bromo skupiny na azid byla studována i na samotném nukleosidu **27**, a to s mnohem lepšími výsledky. Derivát **27** by mohl být v budoucnu dále modifikován např. výstavbou heterocyklu s fluorescenčními vlastnostmi reakcí na trojně vazbě.



**Schéma 4.** Syntéza oligodeoxynukleotidů **ON7-ON8**.

#### 4. Závěry

V rámci disertační práce byla připravena řada nových C-5 modifikovaných analog uracilu, které byly dále studovány z hlediska jejich reaktivity a biologických vlastností.

Nejprve byl vytvořen přehled dosud popsáných výsledků v oblasti studia syntézy a biologické aktivity specifických analog 5-alkoxymethyluracilu.

Dále byla syntetizována řada derivátů odvozených od 5-alkoxymethyluracilu nesoucích objemnou 4-nitrofenyl skupinu vázanou přes methylenový můstek do polohy C-5. Syntéza těchto derivátů vycházela z chloroderivátu **2**, jehož substituční reakce vedly k syntéze série alkoxyderivátů **6** stejně tak jako hydroxyderivátům **1** a **5** a azidoderivátu **3**. Efektivní ribosylace nukleobází **6** poskytla chráněné nukleosidy **16** v jejich diastereomerní směsi. Ze směsi diastereomerů **16f-i** byly izolovány dva isomery, které byly spolu s neseparovanými směsmi **16a-e** a **16m-n** ochráněny reakcí s methanolickým amoniakem a poskytly nukleosidy **7**.

Další část práce byla zaměřena na syntézu série analog 5-alkoxymethyluracilu s nesubstituovaným methylenovým můstkem. Alkoxyderiváty **8** byly připraveny reakcí 5-chloromethyluracilu **17** s různými alifatickými alkoholy a dále převedeny na odpovídající ribonukleosidy **9** využitím Vorbrüggenovy metody. Studie v této oblasti byly dále rozšířeny na syntézu derivátů **11** a **12** obsahujících 2,3-dihydroxy-1-propoxy zbytek. Tyto estery byly úspěšně připraveny z dihydroxyderivátu **10**, který byl rovněž ribosylován za vzniku nukleosidu **13**.

Nukleobáze **6** a **8** a jejich nukleosidová analoga **7** a **9** byly studovány z hlediska jejich cytotoxické aktivity *in vitro* na několika nádorových buněčných liniích (CEM, K562, CEM-DNR-bulk, K562-tax, A549, HCT116p53 a HCT116p53-/-). Získané výsledky indikují zajímavou závislost aktivity na přítomnosti nitrofenylového zbytku a/nebo ribosy a dále na délce alkylového řetězce. Nejzajímavější výsledky byly získány v případě nukleobází **8**, které vykazují mikromolární aktivitu proti drug rezistentním nádorovým buňkám CEM-DNR-bulk a K562-tax. Naproti tomu nukleobáze **6** jsou signifikantně aktivnější proti A549 a oběma HCT116p53 buněčným liniím než jejich analoga **8**. Cytotoxická aktivita nukleosidů **7** a **9** ukazuje, že nukleosidy **7** obsahující nitrofenylový zbytek vykazují významně vyšší cytotoxicitu než jejich alkoxymethyl analoga. Aktivita nukleosidů **7f-i** je vyšší proti drug senzitivním než drug rezistentním nádorovým buňkám a je nezávislá na chiralitě molekuly. Navíc bylo zjištěno, že sloučeniny **6f-h** inhibují syntézu DNA i RNA a indukují apoptózu při koncentraci 5x IC<sub>50</sub> na CEM linii. Nukleobáze **6f** způsobuje signifikantní apoptózu během 24 h již při koncentraci 1x IC<sub>50</sub>.

V poslední části disertační práce se pozornost ubírala ve směru syntézy oligodeoxynukleotidů, studia jejich termické stability a postsyntetické reaktivity. Nejdříve byly sloučeniny **22a** a **22b** inkorporovány do oligodeoxynukleotidů **ON2-ON5** standardní fosforamiditovou metodou. Hybridizační experimenty ukázaly, že vícenásobná inkorporace fenoltriazol-substituovaných analog uracilu vede ke vzniku velmi stabilních DNA:RNA duplexům a proto monomer **X** jeví slibný potenciál v antisense terapii.

Dále byl Sonogashira coupling reakcí 5-iodo-2'-deoxyuridinu **25** s 1-bromo-4-ethynylbenzenem **26** připraven nukleosid **27** a převeden na fosforamidit **29**, který byl následně inkorporován do oligonukleotidu **ON7**. Poté byla studována reaktivita bromo skupiny oligonukleotidu **ON7** obsahujícího monomer **B** s myšlenkou postsyntetického značení DNA. Tyto pokusy ovšem nebyly úspěšné. Nicméně, konverze bromo skupiny na azid byla studována i na samotném nukleosidu **27**, a to s mnohem lepšími výsledky. Derivát

**27** by mohl být v budoucnu dále modifikován a tak významně přispět k rozvoji této oblasti výzkumu.

V rámci celé disertační práce byla připravena řada C-5 substituovaných analog uracilu, studována jejich reaktivita a biologická aktivita. Rozsáhlé SAR studie přinesly významné výsledky a nastínily tak cestu k vývoji dalších potenciálně biologicky aktivním látkám, látkám, jejichž působení na nádorovou buňku by mohlo být selektivnější a více specifické.

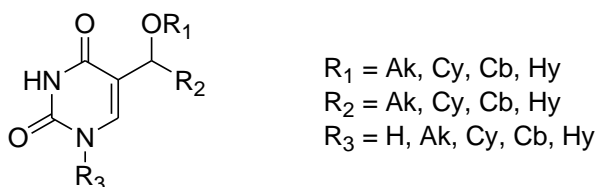
## 1. Introduction

Modifications of the nucleic acids components play a significant role in the field of nucleic acids research. Nucleoside analogues find broad therapeutic applications in anti-cancer field or antiviral chemotherapy in particular.

One of those compounds is 5-fluorouracil, for instance, one of the most investigated anticancer drugs, either chemically or biologically, and triggered the research of 5-substituted pyrimidine analogues. A number of C-5 substituted pyrimidine analogues are also known for their ability to weigh in life cycle of viruses and act as highly active antiviral agents. One of such a drug with antiviral properties is 5-iodo-2'-deoxyuridine discovered in the 1960s as the first agent active against HSV and VZV viruses.

From current pieces of knowledge and understanding to cell cycle processes and life cycle of viruses we draw inspiration to the development of new potent biological active compounds, compounds that might be more selective, more specific and much less toxic for organism.

One of those groups of investigated derivatives is a group of uracil analogues modified at the 5 position by ether or ester moiety (*Figure 1*). Within the presented thesis the attention is paid to the already published studies on synthesis of selected derivatives. The short summary of biological activity of investigated compounds is also reported.

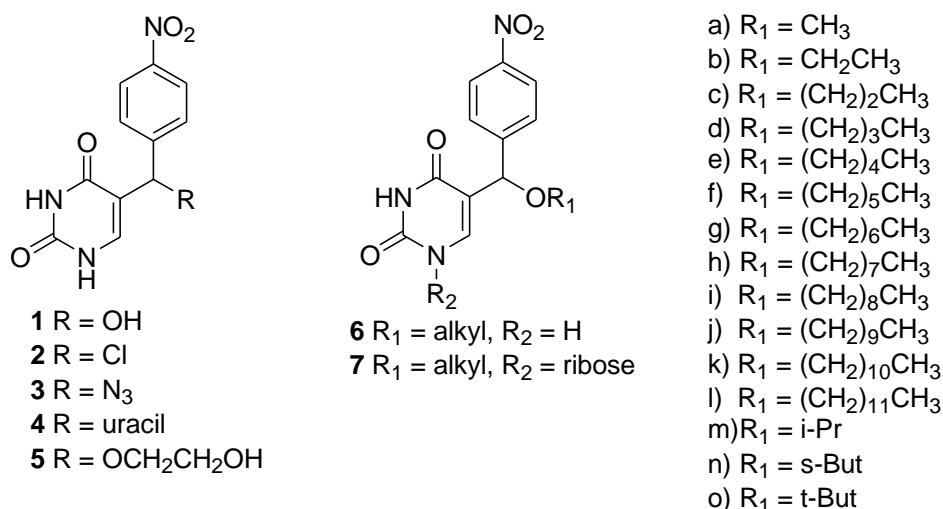


**Figure 1.** Investigated derivatives.

## 2. Aims of the study

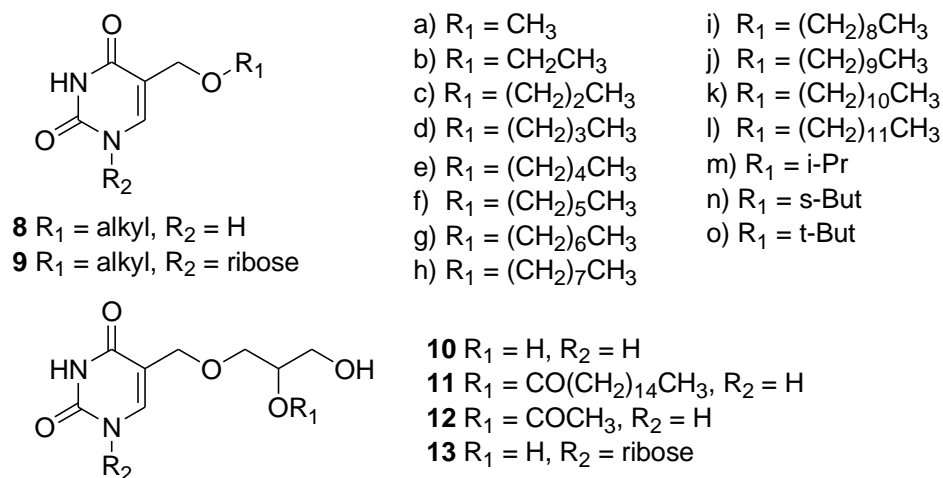
The main goal of this thesis is the study of synthesis and biological activity evaluation of new compounds based on C-5 modification of uracil analogues. The reported thesis is divided into three main parts.

The first one is focused on studies of synthesis of diverse range of aliphatic 5-[(4-nitrophenyl)methyl]uracil analogues (*Figure 2*) and evaluation of their cytotoxic activity.



**Figure 2.** Summary of prepared 5-[(4-nitrophenyl)methyl]uracil analogues.

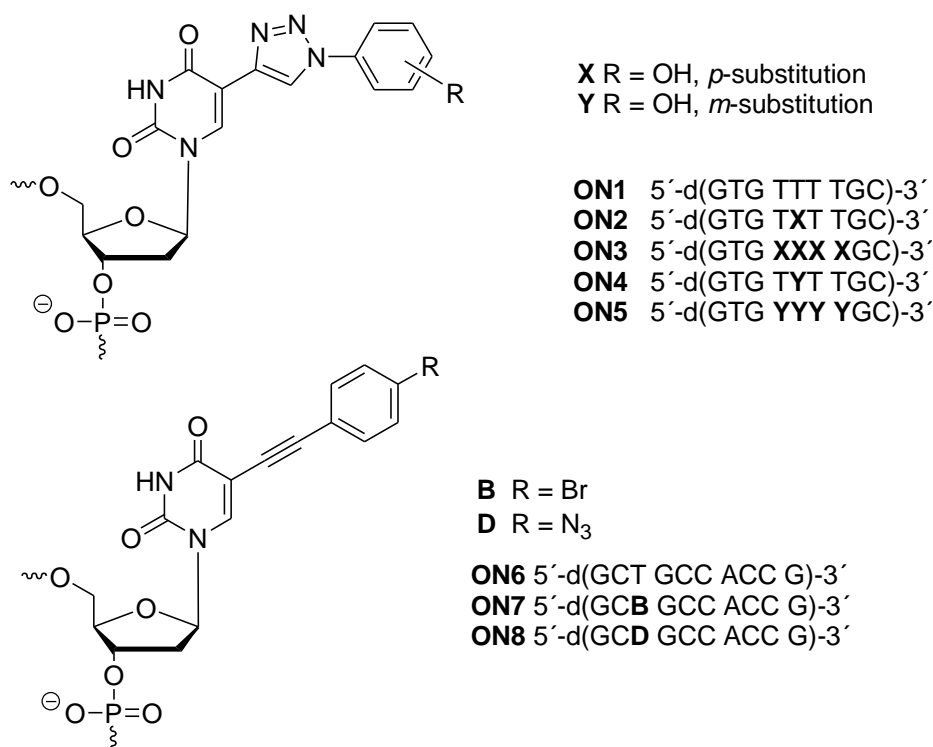
In the second part of the thesis the attention is paid to studies of synthesis of various 5-alkoxymethyluracil analogues (*Figure 3*), evaluation of their biological activity, comparison with nitrophenylmethyluracil analogues and the SAR study of prepared compounds.



**Figure 3.** Summary of prepared 5-alkoxymethyluracil analogues.

The last part of the presented work is focused on synthesis of pyrimidine oligodeoxynucleotides containing either substituted phenyltriazole **ON2-ON5** or substituted phenylethynyl moiety **ON7-ON8** attached to the 5-position and the hybridization studies of the prepared oligodeoxynucleotides (*Figure 4*).



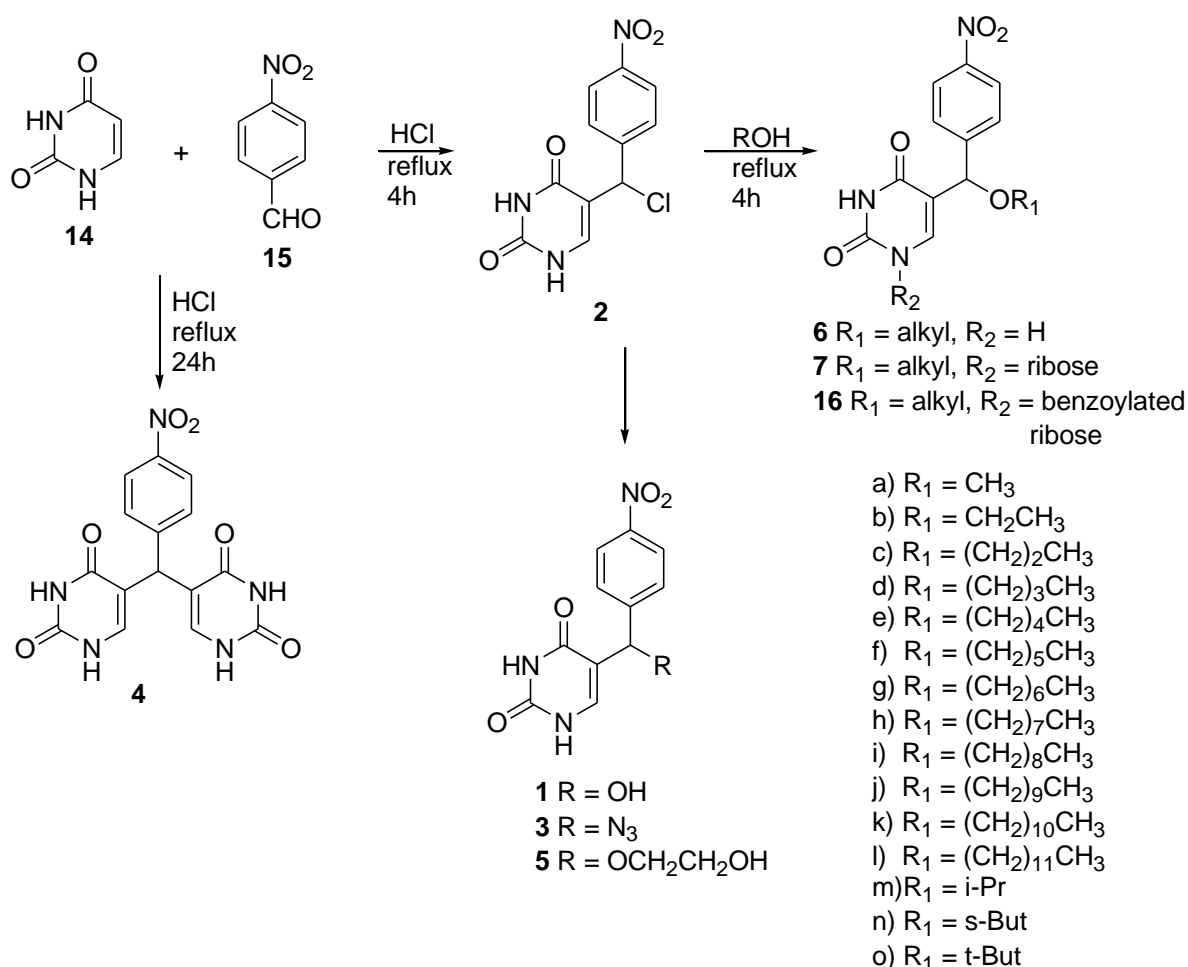


**Figure 4.** Summary of oligodeoxynucleotides **ON1-ON8**.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Studies on synthesis and biological activity of various 5-[(4-nitrophenyl)-methyl]uracil analogues

Within this part of thesis diverse range of 5-[(4-nitrophenyl)methyl]uracil analogues was synthesized in order to evaluate their biological properties (*Scheme 1*). Reaction of uracil **14** with *p*-nitrobenzaldehyde **15** afforded reactive chloroderivative **2** and also known bis-uracil compound **4**.<sup>1</sup> Substitution reactions of chloroderivative **2** led to the series of alkoxyderivatives **6** as well as hydroxyderivatives **1** and **5** and azidoderivative **3**.<sup>2</sup> Efficient ribosylation<sup>3</sup> of nucleobases **6** afforded protected nucleosides **16** in their diastereomeric mixtures, where two diastereomers from each mixture **16f-i** were isolated using silica gel column chromatography. These isomers **16f-i** along with non-separated mixtures **16a-e** and **16m-n** were deprotected by treatment with methanolic ammonia solution and gave ribonucleosides **7**.<sup>4</sup>



**Scheme 1.** General synthetic route leading to 5-[(4-nitrophenyl)methyl]uracil analogues.

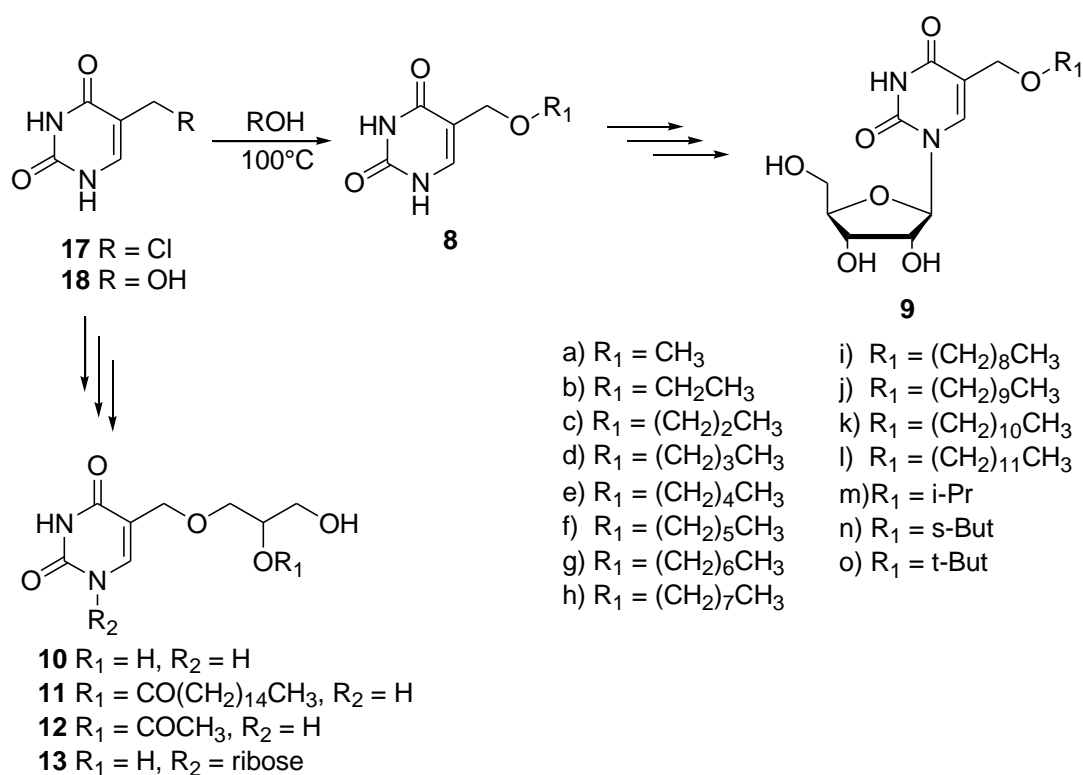
All prepared compounds were submitted to the testing for their cytotoxic activity against cancer cell lines CEM, K562, their drug resistant counterparts CEM-DNR-bulk and K562-tax, and A549, HCT116p53 and HCT116p53<sup>-/-</sup> cell lines. All outcomes indicate that none of prepared compound exhibit significant cytotoxic activity, nevertheless, cytotoxic activity of alkoxyderivatives **6** and their nucleoside analogues **7** exhibit interesting dependence on the length of alkyl chain. On that account the connection of cytotoxic activity with higher lipophilic alkyl chain might be promising for future study.

Moreover, compounds **6f-h** inhibit the synthesis of both DNA and RNA and induce apoptosis at concentration 5x  $IC_{50}$  in treated CEM cells and, interestingly, at concentration 1x  $IC_{50}$  inhibition of DNA synthesis is significant only for derivative **6f**.<sup>2,4</sup>

### 3.2. Studies on synthesis and biological activity of various 5-alkoxymethyluracil analogues

This part of thesis is focused on synthesis of 5-alkoxymethyluracil analogues (*Scheme 2*) in order to evaluate their chemical and biological properties. Firstly, the attention was paid to synthesis of ethers **8** and **9** with a view to compare a biological activity of prepared compounds with previous nitro analogues **6** and **7**. Modified nucleobases **9** were efficiently prepared via nucleophilic substitution of 5-chloromethyluracil **17**<sup>5,6</sup> and further converted to their corresponding ribonucleosides **9** using Vorbrüggen method.<sup>3</sup>

The studies were further extended to synthesis of derivatives **11** and **12** containing modified 2,3-dihydroxy-1-propoxy moiety that were successfully prepared from dihydroxyderivative **10**. Furthermore, dihydroxyderivative **10** was efficiently ribosylated to afford nucleoside **13**.



**Scheme 2.** General synthetic route leading to 5-alkoxymethyluracil analogues.

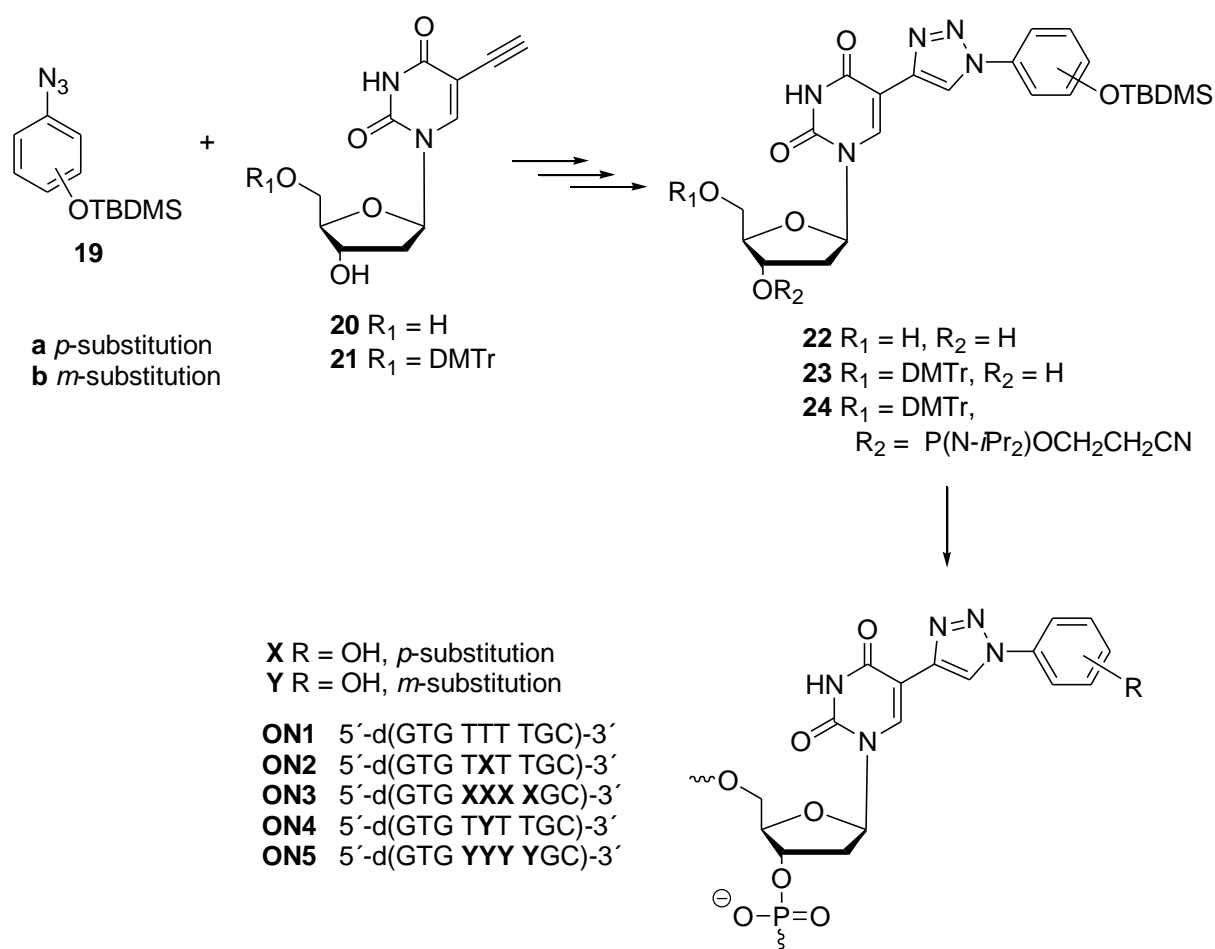
Compounds **8** and **9** were screened for their cytostatic properties against diverse range of cancer cell lines. While derivatives with branched side chain **8m-o** and **9m-o** exhibit no significant activity against any of tested cancer cell lines, derivatives **8a-l** and **9a-l** show interesting dependence on the length of alkyl chain. The most interesting results concerning to nucleobases **8** were obtained for drug resistant leukemia cancer cell lines (CEM-DNR-bulk and K562-tax), where an activity is approaching micromolar concentration of IC<sub>50</sub>. The most interestingly, a comparison of cytotoxic activity of nucleosides **9** and bases **8** against drug

resistant leukemia cancer cell lines (CEM-DNR-bulk and K562-tax) indicates significantly decreased activity of nucleosides **9**.

A comparison of cytotoxic activity of bases **8** and **6** indicates that nucleobases **6** exhibits significantly lower activity against CEM-DNR-bulk line but are significantly more active against both colorectal carcinoma cell lines. Furthermore, cytotoxic activity of nucleosides **7f-i** and **9f-i** shows that the nucleosides **7f-i** containing bulky nitrophenyl moiety exhibit significantly higher cytotoxicity than their alkoxymethyluracil analogues **9f-i**.

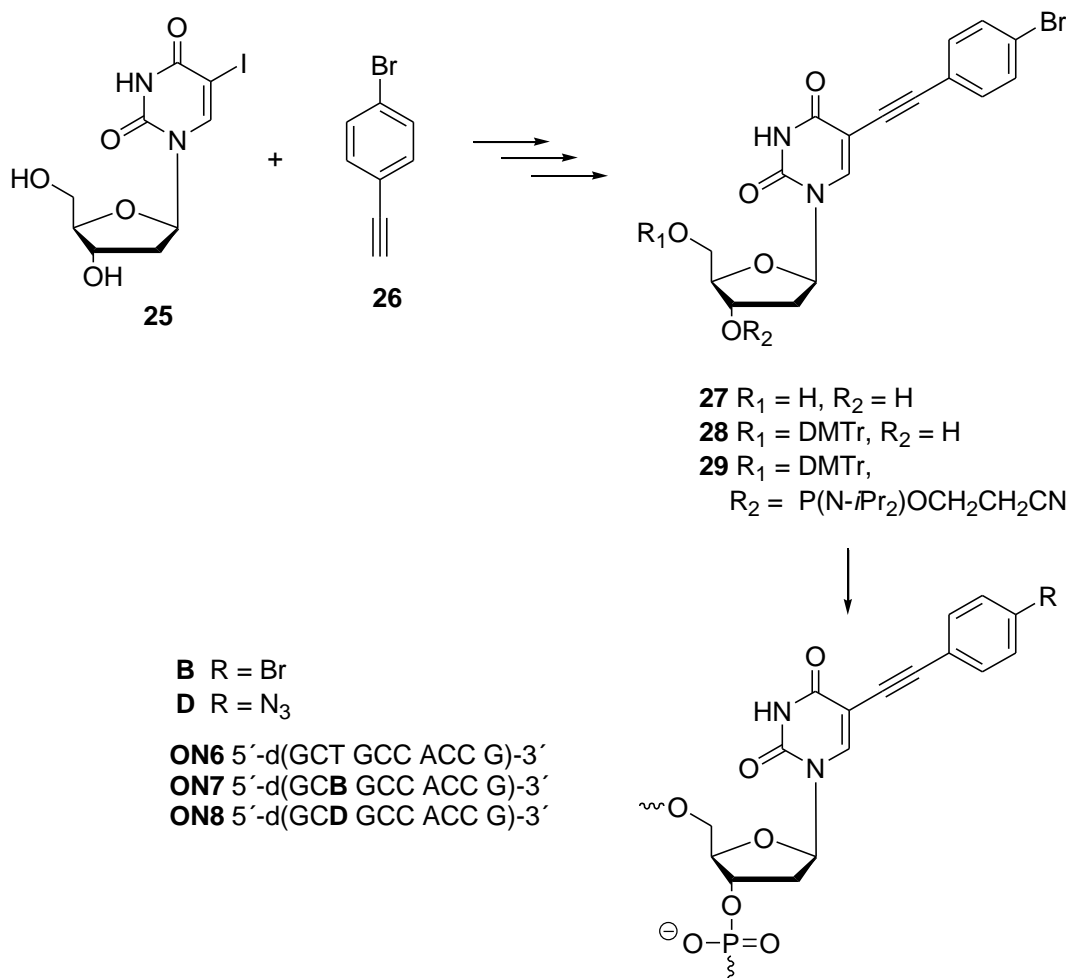
### 3.3. Synthesis of modified oligodeoxynucleotides

In the third part of reported thesis, compound **22** were successfully prepared employing click chemistry (*Scheme 3*).<sup>7</sup> Huisgen [3+2] cycloaddition of silylated compounds **19** with either 5-ethynyl-2'-deoxyuridine **20** or 5'-*O*-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-ethynyl-2'-deoxyuridine **21** gave corresponding triazole substituted nucleosides **22** and **23**, respectively. Phosphorylation of nucleosides **23** with 2-cyanoethyl-*N,N'*-(diisopropyl)-phosphoramidochloridite in the presence of diisopropylethylamin gave phosphoramidites **24**, which were incorporated into the oligodeoxynucleotides **ON2-ON5** *via* solid-phase synthesis using automated DNA synthesizer. The oligonucleotides **ON2-ON4** were mixed with complementary DNA and RNA sequences and melting temperatures for duplexes forms were obtained. While a replacing of central thymidine either with monomer **X** or monomer **Y** in oligodeoxynucleotides **ON2** and **ON4** led to a clear destabilization for both DNA and RNA duplexes, the replacing of four thymidines by monomer **X** showed significant stabilization ( $\Delta T = +4.8^{\circ}\text{C}$ ) in the case of DNA:RNA duplex. Since the stacking of triazole analogues in the major groove led to very stable DNA:RNA duplexes, the above mentioned monomer **X** shows promising therapeutical potential *via* RNA-targeting.



**Scheme 3.** General synthetic route leading to oligodeoxynucleotides **ON2-ON5**.

Moreover, Sonogashira coupling reaction<sup>8</sup> of 5-iodo-deoxyuridine **25** with 1-bromo-4-ethynylbenzene **26** afforded nucleoside **27** that was protected and converted to desired phosphoramidite **29** by the standard 3'-*O*-phosphitylation using 2-cyanoethyl-*N,N'*-(diisopropyl)-phosphoramidochloridite. Derivative **29** was successfully and efficiently incorporated into oligodeoxynucleotide **ON7**. The reactivity of bromo group of **ON7** containing monomer **B** was further studied following the idea of postsynthetic labeling of DNA.<sup>9,10,11</sup> Despite the unsuccessful postsynthetic conversion of bromo group to azide, the studies of the same reaction on the nucleoside level showed promising results. Nevertheless, the primary idea of postsynthetic substitution of bromo group with azide might be further modified. Oligonucleotide **ON7** contains also ethynylene moiety that might be further used for building up of new heterocycle and so influence a fluorescence properties of new oligodeoxynucleotide.



**Scheme 4.** General synthetic route leading to oligodeoxynucleotides **ON7-ON8**.

#### 4. Conclusions

In summary, a number of novel compounds was synthesized in order to evaluate their chemical and biological properties and explore the structure-activity relationships.

Firstly, the extensive studies of available information on synthesis and biological activity evaluation of 5-alkoxymethyluracil analogues were performed and summarized in review part.

Further, the synthesis of a diverse range of 5-alkoxymethyluracil analogues bearing bulky 4-nitrophenyl group attached to the methylene bridge was reported. Substitution reactions of chloroderivative **2** led to the series of alkoxyderivatives **6** as well as hydroxyderivatives **1** and **5** and azidoderivative **3**. Efficient ribosylation of nucleobases **6** afforded protected nucleosides **16** in their diastereomeric mixtures, where two diastereomers from each mixture **16f-i** were isolated using silica gel column chromatography. These isomers along with non-separated mixtures **164a-e** and **16m-n** were deprotected and gave ribonucleosides **7**.

In the second part of my thesis, I focused on synthesis of 5-alkoxymethyluracil analogues. Alkoxyderivatives **8** were synthesized *via* nucleophilic substitution from chloro analogue **17**. Efficient ribosylation of nucleobases **8** using Vorbrüggen method followed with deprotection afforded nucleosides **9**.

The research of 5-alkoxymethyluracil analogues was further extended to synthesis of compounds **11** and **12** and nucleoside **13** containing modified 2,3-dihydroxy-1-propyloxy moiety. Esters **11** and **12** were prepared from dihydroxyderivative **10** after protection of primary hydroxyl group with TBDMS group with subsequent reaction with palmitoyl and acetyl chloride, respectively. Furthermore, compound **10** was efficiently ribosylated to afford nucleoside **13**.

Nucleobases **6** and **8** and their nucleosides analogues **7** and **9**, respectively, were screened for their cytotoxic activity *in vitro* against cancer cell lines CEM, K562, their drug resistant counterparts CEM-DNR-bulk and K562-tax, and A549 as representative of solid tumor and colorectal carcinoma HCT116p53 and HCT116p53<sup>-/-</sup> cell lines. All available outcomes indicate the interesting dependence of cytotoxic activity on the presence of nitrophenyl and/or ribose moiety and length of alkyl chain. The most interesting results were obtained for nucleobases **8** for drug resistant leukemia cancer cell lines (CEM-DNR-bulk and K562-tax), where an activity is approaching micromolar concentration of IC<sub>50</sub>. On the other hand, nucleobases **6** are significantly more active against A549 and both colorectal carcinoma cell lines than their analogues **8**. Cytotoxic activity of nucleosides **7** and **9** shows that the nucleosides **7** containing bulky nitrophenyl moiety, exhibit significantly higher cytotoxicity than their alkoxyethyluracil analogues **9** against all screened cell lines. The activity of nucleosides **7f-i** is higher in drug sensitive than in drug resistant cancer lines and is independent of the chirality of the molecule. In addition, compounds **6f-h** were found to inhibit the synthesis of both DNA and RNA and induce apoptosis at concentration 5x IC<sub>50</sub> in treated CEM cells. Interestingly, derivative **6f** caused significant apoptosis within 24 h at concentration 1x IC<sub>50</sub>.

In the last part of my work, I concentrated my efforts on the synthesis of oligodeoxynucleotides, the study of their thermal stability and the postoligo synthesis. Firstly, compounds **22** prepared employing click chemistry was converted to their corresponding phosphoramidites **24** via tritylation of 5'-OH group with subsequent reaction with 2-cyanoethyl-*N,N'*-(diisopropyl)-phosphoramidochloridite and further incorporated into the oligodeoxynucleotides **ON2-ON5**. Hybridization experiments showed that the stacking of triazole analogues in the major groove led to very stable DNA:RNA duplexes. Thus the

monomer **X** shows promising therapeutical potential *via* RNA-targeting within cells as a means of control of a gene expression.

Moreover, derivative **27** was synthesized by Sonogashira coupling reaction of 5-iodo-2'-uridine with 1-bromo-4-ethynylbenzene and converted to corresponding phosphormidite **29** that was successfully and efficiently incorporated into oligodeoxynucleotide **ON7** *via* standard phosphoramidite method. The reactivity of bromo group of **ON7** containing monomer **B** was further studied followed the idea of postsynthetic labeling of DNA. Results obtained within these studies did not lead to desired azido substituted oligodeoxynucleotide **ON8**, however derivative **27** can be further modified and thus significantly contribute to investigation of similar compounds.

In conclusion, diverse range of C-5 substituted uracil analogues was synthesized within presented thesis and their reactivity and biological activity was studied. Extensive SAR studies brought out significant results and outlined the next inspiration to the development of new potent biological active compounds, compounds that might be more selective and more specific in targeting of cancer cells.



## 5. Použitá literatura /References

1. Weaver,D.F. WO 2006070292, 2006.
2. Spacilova,L.; Dzubak,P.; Hajduch,M.; Krupkova,S.; Hradil,P. and Hlavac,J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6647-6650.
3. Vorbruggen,H. and Ruh-Pohlenz,C. Handbook of Nucleoside Synthesis, John Wiley & Sons, inc., 2001.
4. Brulikova,L.; Dzubak,P.; Hajduch,M.; Lachnitova,L.; Kollareddy,M.; Kolar,M.; Bogdanová,K. and Hlavac,J. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3588-3594.
5. Skinner,W.A.; Schelstraete,M.G.M. and Baker,B.R. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 149-151.
6. Burckhalter,J.H.; Seiwald,R.J. and Scarborough,H.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 991-994.
7. Andersen,N.K.; Chandak,N.; Brulikova,L.; Kumar,P.; Jensen,M.D.; Jensen,F.; Sharma,P.K. and Nielsen,P. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4702-4710.
8. Graham,D.; Parkinson,J.A. and Brown,T. *J. Chem. Soc. , Perkin Trans. 1* **1998**, 1131-1138.
9. Gierlich,J.; Burley,G.A.; Gramlich,P.M.E.; Hammond,D.M. and Carell,T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642.
10. Prescher,J.A. and Bertozzi,C.R. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13-21.
11. Burley,G.A.; Gierlich,J.; Mofid,M.R.; Nir,H.; Tal,S.; Eichen,Y. and Carell,T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1398-1399.

## **Curriculum vitae:**

### **Personal Statistics:**

First name and Surname: **Lucie Brulíková (nee Spáčilová)**  
Date of Birth: 22.11.1980  
Address: Masarykova 14, Olomouc 772 00, Czech Republic  
Telephone: +420 603 174 537  
E-mail: brulikova@orgchem.upol.cz  
Marital Status: married  
Nationality: Czech

### **Educational qualifications**

09/92 - 06/99 Secondary School Šternberk – finished by state exam  
09/99 – 06/05 Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Dpt. of  
Organic Chemistry, finished by state exam (Mgr.-eq. to MS)  
09/05 – 05/06 Masaryk University Brno, Faculty of Science, Dpt. of Organic  
Chemistry, Ph.D. program  
09/06 – till now Charles University Prague, Faculty of Science, Dpt. of  
Organic Chemistry, Ph.D. program

### **Languages:**

English: advanced (First Certificate in English (FCE) - 2009)

### **Employment Record:**

2008 – till now - researcher (Dpt. of Organic Chemistry, Palacký University Olomouc,  
Faculty of Science)

### **Scholarships and Fellowships:**

9/2007 – 3/2008 – University of Southern Denmark, Sixth Framework Program Marie Curie  
Host Fellowships

### **Teaching:**

Practicals in Organic Chemistry (OCH/OCCH) 2005 - till now  
Special Seminar in Organic Chemistry (OCH/OS) 2009 - till now

Special Seminar 1 (OCH/OS1)	2009
Special Seminar 2 (OCH/OS2)	2010
Special Seminar 3 (OCH/OS3)	2010
Information Sources in Chemical Sciences (OCH/CHL)	2010

*Teaching participation:*

Fundamentals of Organic Chemistry (OCH/ZOCH)	2010
Organic Chemistry (OCH/OCHBI)	2010
Seminar in Organic Chemistry (OCH/SOCH)	2010
Seminar on Fundamentals of Organic Chemistry (OCH/SZOCH)	2010

**Supervision of Bachelor Research:**

1. Synthesis of 5-modified uracil analogues with heterocycle, study of their reactivity and biological activity (Palacky University, 2008-2010)
2. Synthesis and study of reactivity and biological activity of C5 and N1 substituted uracil analogues (Palacky University, 2009-till now )
3. Using of Sonogashiro coupling to synthesis of 5-alkynyl and 5-arylalkynyluracil analogues (Palacky University, 2010-till now )
4. Using of Sonogashiro coupling to synthesis of 5-alkynyl and 5-arylalkynylcytosin analogues (Palacky University, 2010-till now)

**Major Research Areas:**

Bioorganic chemistry, organic chemistry, nucleic acids chemistry.

**Membership in Societies:**

Czech Chemical Society (CSCH): 2007 - till now

## Seznam publikací / Selected publications

1. Brulíková, L.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Lachnitová, L.; Kollareddy, M.; Kolář, M.; Bogdanová, K.; Hlaváč, J.  
*Synthesis of 5-[alkoxy-(4-nitro-phenyl)-methyl]-uridines and study of their cytotoxic activity*  
European Journal of Medicinal Chemistry **2010**, 45, 3588-3594
2. Andersen, N.K.; Chandak, N.; Brulíková, L.; Kumar, P.; Jensen, M.D.; Jensen, F.; Sharma, P.K.; Nielsen, P.  
*Efficient RNA-targeting by the introduction of aromatic stacking in the duplex major groove via 5-(1-phenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-2'-deoxyuridines*  
Bioorganic and Medicinal Chemistry **2010**, 18, 4702-4710
3. Spáčilová, L.; Džubák, P.; Hajdúch, M.; Křupková, S.; Hradil, P.; Hlaváč, J.  
*Synthesis and Cytotoxic Activity of Various 5-[Alkoxy-(4-nitro-phenyl)-methyl]-uracils in their racemic form*  
Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters **2007**, 17, 6647-6650
4. Bertolasi, V.; Hradil, P.; Spáčilová, L.; Muller, A.; Hlaváč, J.  
*5-phenyluridine trihydrate*  
Acta Crystallografica E **2007**, E63, o3805
5. Spáčilová, L.; Hlaváč, J.; Hradil, P.; Fryšová, I.; Maloň, M.; Soral, M.; Krejčí, P.  
*Synthesis of N-amino-3-hydroxy-2-phenyl-4(1H)-quinolinone*  
Journal of Heterocyclic Chemistry **2006**, 43, 1065-1070

### Konference / Conferences:

#### a) Přednášky / Lectures:

1. Brulíková, L.; Hlaváč, J.  
*Synthesis of 5-modified uridine analogues and study of their cytotoxic activity*  
61. Zjazd Chemikův, September 7 - 11, 2009, Vysoké Tatry, Tatranské Matliare (Slovensko), ChemZi 5/9, 93, **2009**
2. Spáčilová, L.  
*Modifications at the 5-position of pyrimidine nucleotides*  
Perspectives on Nucleic Acid Chemistry for Therapy, June 17-20, **2008**, Sesimbra (Portugal)

3. Spáčilová, L.; Nielsen, P.

*Synthesis of 2'-deoxy-uridine analogues by the alkyne-azide „click“ reaction and their influence on the duplex stability*

60.sjezd chemických společností, September 1-4, 2008, Olomouc (Czech republic), Chem. Listy **2008**, 102, 617

#### **b) Postery / Posters**

1. Andersen, N.K.; Spáčilová, L.; Nielsen, P.

*Application of click chemistry in major groove functionalization of DNA*

237th ACS National Meeting, March 22-26, **2009**, Salt Lake City, UT, United States

2. Nielsen, P.; Shaikh, K.I.; Nielsen, L.J.; Andersen, N.K.; Spáčilová, L.; Nilesen, H.; Kočalka, P.; Christensen, M.S.

*Nucleic acid duplexes with zippers of additional nucleobases and aromatics in minor or major groove*

Symposium of the 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and the 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 8-12, **2008**, Kyoto (Japan), poster, Nucleic Acids Symposium Series 2008, 52, 5-6

3. Andersen, N.K.; Spáčilová, L.; Jensen, M.D.; Kočalka, P.; Jensen, F.; Nielsen, P.

*A click chemistry approach towards nucleic acid major groove functionalization*

Symposium of the 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and the 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 8-12, **2008**, Kyoto (Japan), poster, Nucleic Acids Symposium Series 2008, 52, 149-150

4. Křupková, S.; Hlaváč, J.; Spáčilová, L.

*Synthesis and biological activity of new 5-substituted uracils*

59. sjezd chemických společností, **2007**, Tatrianské Matliare (Slovensko), poster, ChemZi 2007, 3/1,115

5. Hlaváč, J.; Hradil, P.; Sural, M.; Spáčilová, L.

*Use of Phenacylestere of Substituted Benzoic Acid for Synthesis of Derivatives of 2-Phenyl-3-Hydroxy-4-(1H)-Quinolones*

19th Congress of International Society of Heterocyclic Chemistry, August 10-15th 2003, Fort Collins, CO, USA, **2003**, poster (11-PO-76)