

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



**Vojtěch Havlíček**

**SYNTÉZA NOVÝCH C-NUKLEOSIDŮ S  
MODIFIKOVANÝM CUKREM**

*Synthesis of novel C-nucleosides  
with modified sugar*

Bakalářská práce

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Michal Hocek, DSc.

Praha 2015

Tato práce byla vypracovávána na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i., v Praze, od října 2014, do května 2015.

## Prohlášení

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

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 20. května 2015.

## Poděkování

Mé největší poděkování patří mému školiteli prof. Michalu Hockovi za možnost práce v jeho výzkumné skupině a za vedení a cenné rady v průběhu řešení tohoto projektu. Rád bych poděkoval Anně Tokarenko za vedení, spoustu cenných rad a trpělivost, při pomoci vstupu do světa organické syntézy. Dále děkuji Michalu Tichému, Pavle Perlíkové a všem členům laboratoře ÚOCHB B 3.15 za cenné rady při psaní této práce. Musím poděkovat Lence Slavětínské-Poštové za interpretaci NMR spekter a týmu hmotnostní spektrometrie UOCHB v.v.i. za změření hmotnostních spekter. V neposlední řadě moje poděkování patří mé rodině za podporu při studiu.

## Abstrakt

V rámci předložené bakalářské práce byla vyvinuta metoda přípravy nových C-nukleosidů odvozených od 2'-deoxy-2',2'-difluorribosy. V řešení bylo použito nukleofilní adice na furanolakton a pro tuto modifikaci byla vyvinuta metoda tzv. modulárního přístupu, kterou lze připravit sérii strukturně podobných sloučenin. Podařilo se připravit dva C-nukleosidy, potenciálně biologicky aktivní látky.

## Klíčová slova

nukleosidy, sacharidy, cross-coupling reakce

## Abstract

In this bachelor thesis, a new method of preparation of C-nucleosides with 2'-deoxy-2',2'-difluoro modified sugar part was developed. During the research, nucleophilic addition on furanolacton was used and for this modification, the method of modular approach was developed. Using this method, it is possible to prepare a series of structurally similar compounds. We succeeded in preparing two C-nucleosides, potentially biologically active substances.

## Keywords

nucleosides, sugars, cross-coupling reactions

## Seznam zkratek

<b>Ac</b>	Acetyl
<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>Ar</b>	Aryl
<b>ATR</b>	Metoda zeslabené totální reflexe
<b>B.t.</b>	Bod tání
<b>Bu</b>	Butyl
<b>Bz</b>	Benzoyl
<b>CAM</b>	Molybdenan amonno-ceričitý
<b>DCC</b>	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
<b>dFdC</b>	2',2'-difluor-2'-deoxycytidin (Gemcitabin)
<b>dFdCDP</b>	2',2'-difluor-2'-deoxycytidin difosfát
<b>dFdCTP</b>	2',2'-difluor-2'-deoxycytidin trifosfát
<b>DMAP</b>	4-dimethylaminopyridin
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -dimethylformamid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>EC</b>	Efektivní dávka
<b>ELSD</b>	Evaporative Light Scattering detector
<b>Et</b>	Ethyl
<b>HHV-5</b>	Lidský cytomegalovirus
<b>HPFC</b>	Vysokoúčinná kolonová chromatografie
<b>HRMS</b>	Hmotnostní spektroskopie s vysokým rozlišením
<b>IČ</b>	Infračervená spektrometrie
<b>Me</b>	Methyl
<b>NMR</b>	Spektroskopie nukleární magnetické resonance
<b>Ph</b>	Fenyl
<b>RNA</b>	Ribonukleová kyselina
<b>RNR</b>	Ribonukleotidreduktáza
<b>RSV</b>	Lidský respirační syncyaliální virus
<b>RT</b>	Laboratorní teplota

---

<b>STAB</b>	Triacetoxyhydroborát sodný
<b>TBAF</b>	Tetra- <i>n</i> -butylamonium fluorid
<b>TBS</b>	tert-Butyldimethylsilyl
<b>TCRB</b>	2,5,6-trichloro-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)benzimidazol
<b>THF</b>	Tetrahydrofuran
<b>TLC</b>	Tenkovrstevná chromatografie
<b>UV</b>	Ultrafialové světlo
<b><math>\psi</math></b>	Pseudouridin

# Obsah

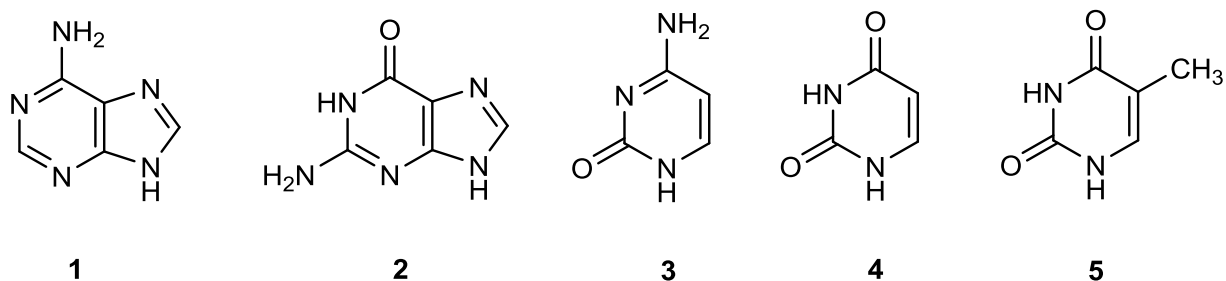
Prohlášení .....	2
Poděkování .....	3
Abstrakt .....	4
Klíčová slova .....	4
Abstract.....	5
Keywords.....	5
Seznam zkratek.....	6
Obsah.....	8
1 Úvod.....	9
1.1 Nukleosidy .....	9
1.2 Historie a biologická aktivita C-nukleosidů .....	11
1.3 Biologická aktivita.....	12
1.3.1 Biologická aktivita C-nukleosidů.....	12
1.3.2 Modifikace cukerné části - 2',2'-difluor-2'-deoxyribonolakton.....	13
1.4 Vybrané metody přípravy C-nukleosidů.....	15
1.4.1 Nukleofilní adice na furanolakton.....	15
1.4.2 Coupling s halogenosou .....	16
1.4.3 Heckova cross-coupling reakce.....	17
1.4.4 Modulární přístup.....	18
2 Cíle práce.....	19
3 Výsledky a diskuze.....	20
3.1 Příprava vhodně chráněných cukerných stavebních bloků.....	20
3.2 Nukleofilní adice na furanolakton .....	23
3.3 Modulární přístup .....	24
4 Závěr.....	27
5 Experimentální část.....	28
5.1 Obecné poznámky .....	28
5.2 Syntézy cílových sloučenin.....	29
Citovaná literatura .....	36



# 1 Úvod

## 1.1 Nukleosidy

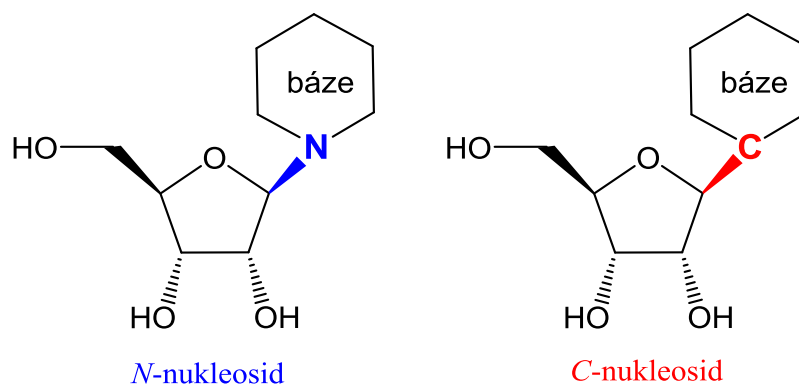
Nukleosidy a jejich deriváty jsou velmi významné látky, zastoupené téměř ve všech biochemických reakcích.<sup>1</sup> Jsou to glykosidy, které jsou složené ze sacharidu a nukleové báze. Ve většině případů je jako cukerná část uplatňována D-ribose nebo 2-deoxy-D-ribose, potom je můžeme pojmenovat jako ribonukleosidy, potažmo deoxyribonukleosidy. Obrazně si je lze představit jako nukleotidy, bez fosfátové skupiny na 5' pozici. Obecně jako nukleosidy považujeme sacharid s bází spojenou N-glykosidickou vazbou. Ty jsou zranitelné enzymatickou a kyselé katalyzovanou hydrolyzou, která rozkládá jejich uhlíko-dusíkovou glykosidickou vazbu. Jako báze jsou uplatňovány deriváty purinu - adenin (**1**) a guanin (**2**), které nesou genetickou informaci v DNA i RNA. Obdobně je tomu i u cytosinu (**3**), který je jako pyrimidinová báze obsažen v obou typech nukleových kyselin. Další pyrimidinové báze se liší a to tím, kde jsou obsaženy - thymín (**4**) v DNA a uracil (**5**) v RNA (**Obrázek 1**).<sup>2</sup>



**Obrázek 1.** Purinové pyrimidinové báze nukleových kyselin (1–5).

Mimo standardních N-nukleosidů známe jejich modifikaci, kterou jsou jejich C-analogy. C-nukleosidy se odlišují spojením aglykonu s cukernou částí pomocí uhlíko-uhlíkové vazby (**Obrázek 2**), která je zodpovědná za jejich vyšší stabilitu.<sup>3,4,5</sup> I přes to, že se jedná o přírodní látky, tak v historii nebylo možné s těmito látkami pracovat a to z důvodu jejich malého obsahu v přírodních maticích. Až rozvoj nových syntetických metod umožnil přípravu širokého spektra C-nukleosidů, které nachází své uplatnění

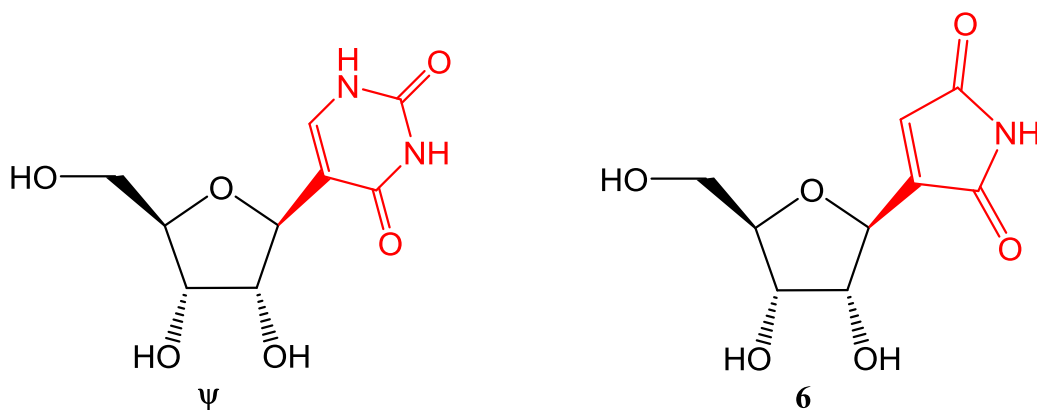
především v medicíně a biochemii.<sup>6</sup> Uplatňují se především jako biologicky aktivní látky (antivirotika, antibiotika, antineoplastika či cytostatika), využívají se jako nástroje k studiu struktury a aktivity, nebo k fluorescenčnímu značení.<sup>7</sup>



**Obrázek 2.** Obecná struktura rozdílu mezi *N*-nukleosidem a *C*-nukleosidem.

## 1.2 Historie a biologická aktivita C-nukleosidů

Dějiny C-nukleosidů začínají v 60. letech 20. století objevem pseudouridinu ( $\Psi$ ) a showdomycinu (**6**) (Obrázek 3).<sup>8</sup>



**Obrázek 3** Strukturální vzorce přírodních C-nukleosidů:  $\Psi$  a showdomycin.

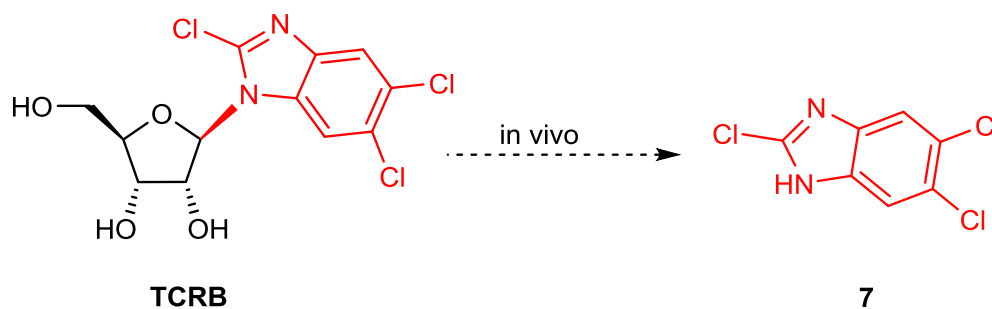
První jmenovaný, pseudouridin, byl zároveň prvním objeveným C-nukleosidem v roce 1957, kdy byl izolován z transferové RNA. Jeho funkcí je stabilizace RNA duplexu.<sup>9,10</sup> Pseudouridin vzniká post-transkripční přeměnou (izomerizací) uridinu pomocí pseudouridin syntázy.<sup>11,12</sup> Žádný z aglykonových analogů pseudouridinu nevykazuje žádnou biologickou aktivitu.

Jiným, strukturálně podobným nukleosidem je showdomycin (**6**), který je nukleosidickým antibiotikem.<sup>13</sup> Přestože byl poprvé izolován již v roce 1964,<sup>14</sup> mechanismus jeho účinku byl objeven až v roce 1979.<sup>15</sup> Má mírnou aktivitu proti gram-positivním i gram-negativním bakteriím, je také cytotoxický vůči rakovinným buňkám. Jeho účinek spočívá v inhibici enzymů, které jsou nezbytné pro stavbu jejich buněčné stěny a také vykazuje inhibiční účinek RNA a DNA polymerázy.<sup>16</sup>

## 1.3 Biologická aktivita

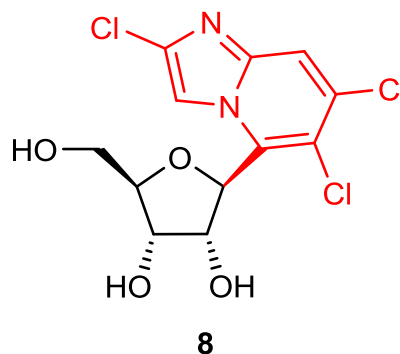
### 1.3.1 Biologická aktivita C-nukleosidů

Jak již bylo řečeno, C-nukleosidy jsou oproti N-nukleosidům stabilnější proti enzymatické hydrolýze, což může být jejich velká výhoda. To si lze představit na příkladu 2,5,6-trichloro-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)benzimidazolu (**TCRB**). Tento nukleosid vykazuje silnou a velmi selektivní aktivitu proti lidskému cytomegaloviru (HHV-5) s nízkou buněčnou toxicitou.<sup>17</sup> Ačkoliv farmaceutické studie prováděné na krysách a opicích potvrdily rychlou odbouratelnost TCRB při intravenózním i orálním podání, u lidí dochází k hydrolýze TCRB a k uvolnění škodlivého 2,5,6-trichlorobenzimidazolu (**7**).<sup>18</sup>



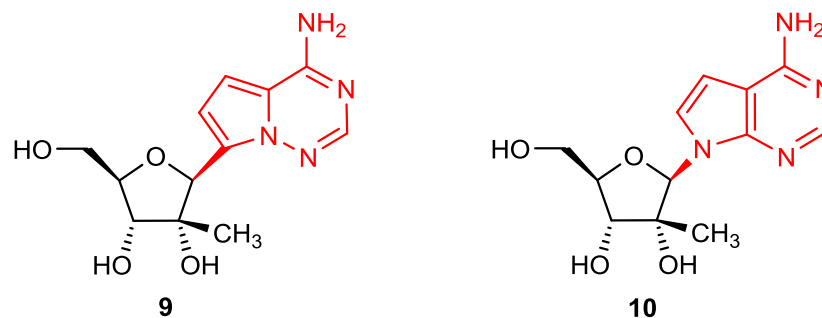
**Schéma 1** - Depurinace N-nukleosidu s antivirální aktivitou.<sup>18</sup>

Právě z tohoto důvodu byl připraven analogický C-nukleosid. Byl objeven 2,6,7-trichloro-3-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)imidazo[1,2-a]pyridin (**8**) (**Obrázek 4**), u kterého byla také zaznamenána biologická aktivita vůči HHV-5, ale nedochází k hydrolýze.<sup>19</sup>



**Obrázek 4** - C-nukleosid strukturně podobný TCRB.

Mimo biologické aktivity vůči HHV-5 vykazují C-nucleosidy aktivitu proti rakovině, nebo proti infekční žloutence typu C (HCV)<sup>20,21</sup>, která způsobuje cirhózu jater a rakovinu jaterních buněk.<sup>22</sup> Například sloučenina 4-amino-7-(2-C-methyl- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin (**9**) má více než 50 x vyšší biologickou aktivitu vůči HHV-5 než 2'-CMe-7-deaza-adenosin (**10**) (**Obrázek 5**), její N-nukleosidický analog.<sup>23</sup>



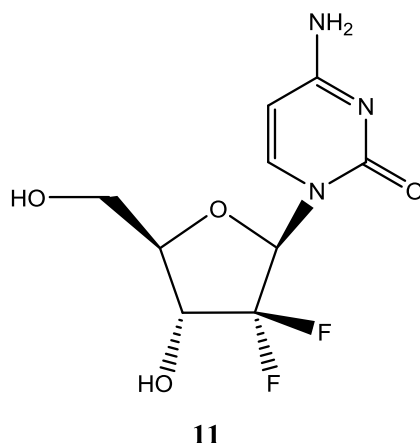
**Obrázek 5** – 2'-CMe-7deaza-adenosin a jeho C-nukleosidický analog.<sup>23</sup>

Obecně platí, že  $\alpha$  anomery nukleosidů nezasahují do metabolismu buňky a obvykle mají nižší biologickou aktivitu oproti jejich  $\beta$  anomerům.<sup>24</sup>

C-nukleosidy mají obdobný mechanismus účinku jako standardní N-nukleosidy, tj. že inhibují některý z enzymů klíčových pro metabolismus nukleových kyselin a jejich derivátů. C-nukleosidy jsou také vhodné pro použití jako stavební bloky oligonukleotidů při stavbě triplexové DNA v genové terapii.<sup>25</sup>

### 1.3.2 Modifikace cukerné části - 2',2'-difluor-2'-deoxyribonolakton

Gemcitabin (**Obrázek 6**), neboli 2',2'-difluor-2'-deoxycytidin, zkráceně též dFdC, je na cukru modifikovaným deoxycytidinem, prokazujícím velmi slibné antivirální a cytostatické účinky. Tato látka byla poprvé syntetizována v 80. letech 20. století Larry Hertelem v laboratořích Eli Lilly and Company v Indianapolis.<sup>26</sup> V této době bylo syntetizováno velké množství deoxyribonukleotidů, které měly zaměněny oba vodíky ve 2 pozici za atomy fluoru. Následně v roce 1990 byl poprvé publikován gemcitabin jako velmi silný inhibitor lidské leukemie.<sup>27</sup>



**Obrázek 6** Stuktura 2',2'-difluor-2'-deoxycytidinu (gemcitabin).

Dnes je tato látka podávána pacientům intravenózně proti nemalobuněčné plicní rakovině, proti rakovině močového měchýře, vaječníků, slinivky břišní a v neposlední řadě i proti rakovině prsu.<sup>28</sup> Po podání nukleosidu jako prekurzoru do organismu dojde k tvorbě jeho metabolitů. Pomocí deoxycytidinkinázy dojde k přeměně na odpovídající 5'-di-fosfát (dFdCDP) a 5'-trifosfát (dFdCTP).<sup>29,30</sup> Cytotoxický efekt gemcitabinu je dán kombinací právě těchto dvou metabolitů.

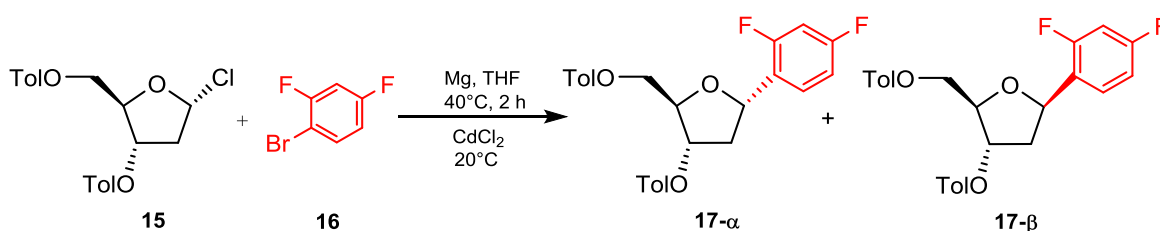
První z nich, dFdCDP, slouží jako inhibitor ribonukleotidreduktázy (RNR), která je zodpovědná za katalýzu redukce ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy, čímž dochází k zredukování počtu stavebních kamenů (nukleotidů) pro syntézu nukleových kyselin v buňce.<sup>28,31</sup> Druhý z výše jmenovaných, dFdCTP konkuruje přírodnímu deoxycytidinu-5-trifosfátu v inkorporaci v replikující se DNA. Začleněním i jedné molekuly dFdCTP do řetězce DNA je další syntéza velmi významně omezena.



Modifikace cukerné části i aglykonu ovlivňuje výtěžek reakce i její stereochemii.<sup>19</sup> Klíčovým faktorem je volba správné chránicí skupiny. Ta musí být dostatečně neobjemná, aby stericky nebránila nukleofilnímu ataku.

### 1.4.2 Coupling s halogenosou

Halogenosa v reakci s organokovem je jednou z nejstarších syntetických metod v historii výzkumu C-nukleosidů. Nejčastěji používanou je Hofferův chlorovaný cukr (1-chlor-2-deoxy-3,5-bis[O-(p-toluoyl)]- $\alpha$ -D-ribosuranosa) (**15**), se kterým reaguje organická sloučenina s hořčíkem<sup>33,34</sup>, lithiem<sup>35</sup>, mědí<sup>36,37</sup>, kadmíem<sup>38,39</sup>, zinkem<sup>40</sup> nebo rtutí<sup>41</sup>. Výtěžek tohoto druhu reakce se pohybuje velmi nízko a jako hlavní produkt vzniká  $\alpha$  anomer, který ve většině případů nemá biologickou aktivitu. Z těchto důvodů je ve většině případů nezbytná následná kysele katalyzovaná epimerizace, kterou dojde k převedení do  $\beta$ -formy.



**Schéma 3** Coupling Hofferova cukru s organokovem.

Příklad couplingu (**Schéma 3**) na chlorovaný cukr **15** s organokovovou sloučeninou **16** poskytuje směs nukleosidů **17- $\alpha$**  a **17- $\beta$**  se 76 % výtěžkem a poměrem anomerů  $\alpha$ : $\beta$  2:1. Po reakci byly anomery separovány na chromatografické koloně a **17- $\alpha$**  byl epimerizován pomocí TFA. Po dvou epimerizacích bylo dosaženo 80 % výtěžku **17- $\beta$** .<sup>42</sup>

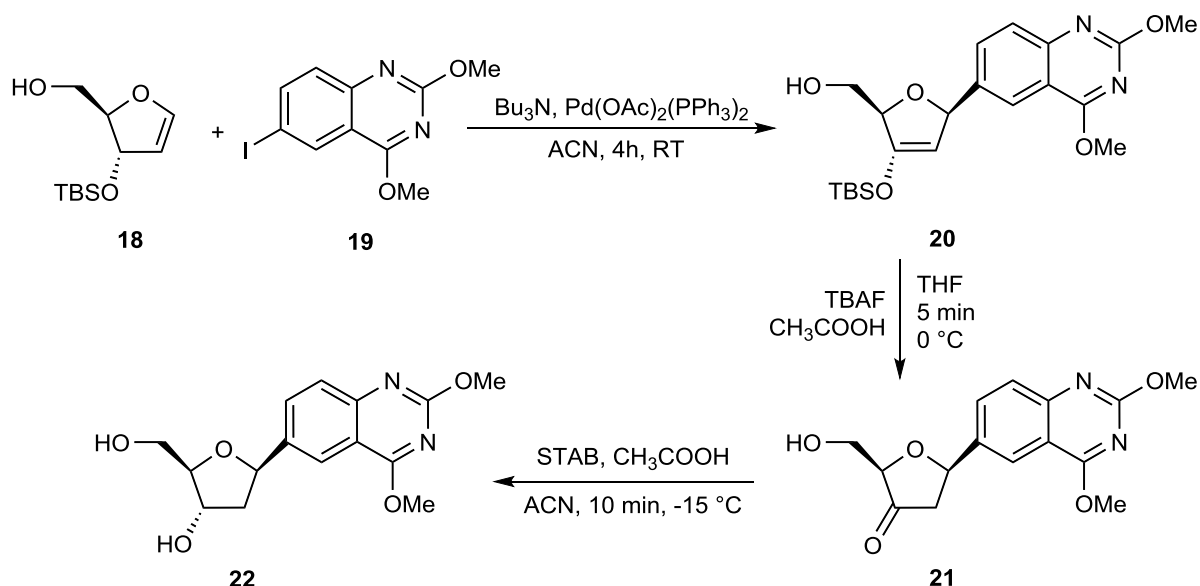


### 1.4.3 Heckova cross-coupling reakce

Heckova reakce (někdy též nazvaná Mizorokiho - Heckova reakce) je nejběžnější a jednou z nejefektivnějších metod pro přípravu C-nukleosidů.<sup>43</sup> Nejvýhodnější na této reakci je stereoselektivita vzniklých produktů, která velmi závisí na zvolené výchozí látce. Tuto metodu objevil v roce 1968 Richard F. Heck<sup>44</sup> a v roce 2010 za ní získal Nobelovu cenu. V roce 1978 byla tato reakce poprvé využita k syntéze C-C vazby při přípravě nukleosidů G. D. Davesem.<sup>45</sup>

Obecně je tato reakce popsána při použití Pd(0) ( $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{Pd}_2\text{dba}_3$ , ligandu a báze (nejčastěji používanými jsou  $\text{Bu}_3\text{N}$ ,  $i\text{-PrNEt}_2$  nebo  $\text{Et}_3\text{N}$ ). Jako rozpouštědlo se využívá DMF, THF, ACN, nebo jiné aprotické polární rozpouštědlo. Stereochemie reakce je ovlivněna volbou chránicí skupiny na cukerné části. Nechráněná 3-hydroxy poloha glykalu umožňuje aglykonu přístup z  $\alpha$ -strany a vznikají 1'- $\alpha$ -C-nukleosidy.<sup>46,47</sup> Naopak při nechránění 5-hydroxy pozice glykalu vznikají 1'- $\beta$ -C-nukleosidy jako samostatné produkty.<sup>46,47</sup>

1,2-dehydro-3-*O*-(tert-butyldimethylsilyl)-5-hydroxymethylfuran (**18**) byl vystaven Heckově cross-couplingové reakci (**Schéma 4**), se vznikem 1'- $\beta$ -C-nukleosidu (**22**) a výtěžkem 85%.<sup>48</sup>

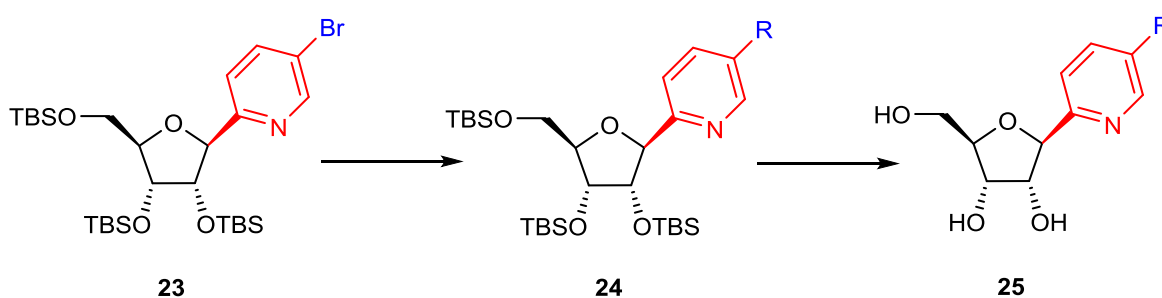


**Schéma 4** – Heckova cross-couplingová reakce.<sup>48</sup>

### 1.4.4 Modulární přístup

Nejobtížnějším krokem syntézy je glykosilace, kterou je nutné při každé syntéze optimalizovat zvlášť, pro každou konkrétní cílovou sloučeninu a to především z hlediska anomerů. Při přípravě požadovaného anomeru (nečastěji  $\beta$ ) pomocí modulárního přístupu řešíme stereochemii reakce pouze jednou a následně lze připravit serii strukturně podobných látek. Z tohoto důvodu byla naší skupinou vyvinuta a zpracována metoda tzv. modulárního přístupu (modular approach), díky které lze připravit požadovaný nukleosid ve dvou krocích. Prvním krokem je vytvoření halo-(het)aryl-C-nukleosidu (**23**), který je syntetizován jedním z výše uvedených postupů. Ten je perfektní výchozí látkou pro zavedení libovolné funkční skupiny. Naší skupinou byly vyvinuty a popsány metody pro přípravu C-ribonukleosidu nesoucí jako „bázi“: 3- a 4- substituovaný benzen,<sup>40</sup> 6-substituovaný pyridin-2-yl,<sup>49</sup> 6-substituovaný pyridin-3-yl<sup>50</sup>, 5-substituovaný thiophen-2-yl<sup>51</sup>, 5-substituovaný furan-2-yl<sup>52</sup> a 2,4-disubstituovaný pyridin-5-yl<sup>53</sup>.

Druhým krokem je výběr požadovaných substituentů, která se většinou cross-couplingovou reakcí, aminací, aminokarbonylací nebo hydroxylací vymění za halogen v naší sloučenině a vznikne chráněný nukleosid (**24**). Nejčastějšími funkčními skupinami jsou methyl, fenyl, thiofenyl, pyridinyl, amin, hydroxyl a spousta dalších. Posledním krokem je odstranění chránících skupin za vzniku nukleosidu (**25**) s velmi dobrými výtěžky reakcí (**Schéma 5**).<sup>54</sup>



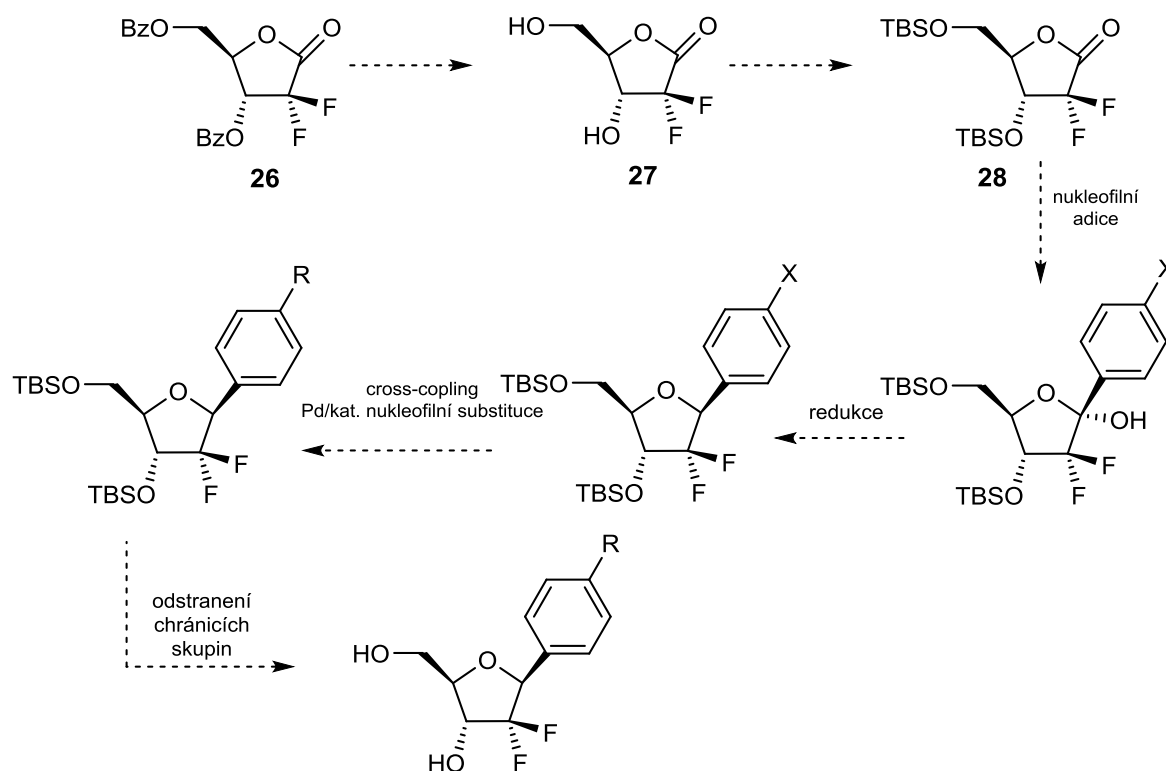
**Schéma 5** – Modulární přístup k syntéze (4-substituovaného pyridin-2-yl) 2-C-ribonukleosidu.<sup>32</sup>

## 2 Cíle práce

Prozkoumat možnosti syntézy aryl substituovaných C-nukleosidů, odvozených od 2'-deoxy-2',2'-difluor-D-ribofuranosy pomocí adice na lakton, vyvinout modulární přístup ke karbaanalogům Gemcitabinu, potenciálně biologicky aktivním látkám.

### 3 Výsledky a diskuze

Plánem syntézy bylo vytvoření metody pro přípravu série karboanalogů Gemcitabinu. Strategií bylo zavedení arylové skupiny nesoucí halogen na vhodně chráněný lakton (**Schéma 6**).



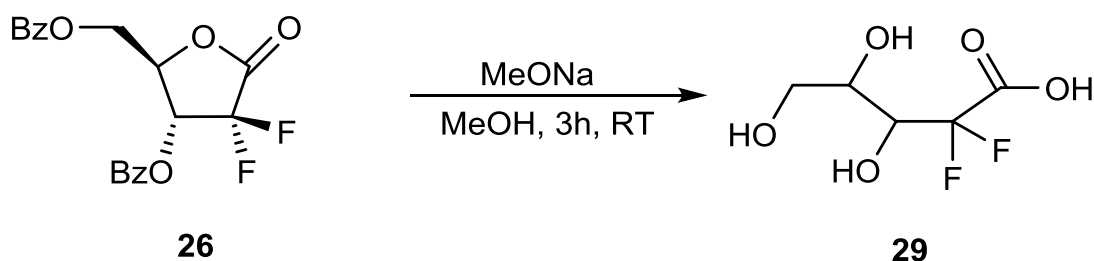
**Schéma 6** – Syntetický plán

#### 3.1 Příprava vhodně chráněných cukerných stavebních bloků

Komerčně dostupná výchozí látka (3,5-*O*-benzoyl-2-deoxy-2,2-difluor-ribofuran-2(1H)-on) (**26**) je chráněná pomocí benzoylových skupin. Benzoylové skupiny jsou esterové skupiny a může na ně probíhat nukleofilní adice, stejně jako na lakton. Snažil jsem se o přechránění na 3,5-*O*-tertbutylsilyl-2-deoxy-2,2-difluor-ribofuran-2(1H)-on (**28**), který by byl lepší výchozí látkou pro nukleofilní adici.

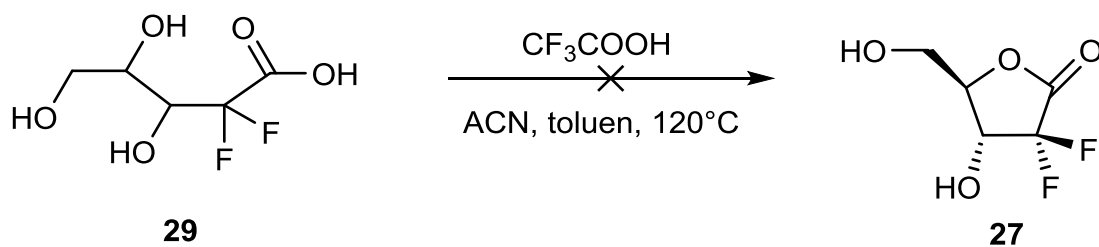
Bohužel toto přechránění provázela spousta nepříjemností. Jednou z nich je, že po odchránění benzoylů, které jsou UV aktivní, se látka nepodařila detegovat na TLC, ani při použití série postřiků, kterými byly roztoky anýzaldehydu, vanilínu, CAM, manganistanu draselného, nebo zředěné kyseliny sírové. Metoda byla vždy testována bez i s následným žiháním horkovzdušnou pistolí. Z tohoto důvodu musela být chromatografie, běžně prováděná ručně s následnou TLC detekcí, prováděna na HPFC s ELSD detekcí.

Reakce s methoxidem sodným probíhala v suchém MeOH, pod inertní atmosférou a to za stálého míchání po dobu 3 hodin (sledováno pomocí TLC – změna Rf skvrny detekované pomocí UV po odchránění benzoylů). Tím vznikla kyselina s otevřeným kruhem cukru. Reakce byla ukončena přidáním kyseliny octové, která byla opakovaně odpařována s MeOH pro odstranění methyl benzoátu a následně separována pomocí HPFC-ELSD. Tím byla získána 2,2-difluor-3,4,5-trihydroxypentanová kyselina (**29**) (Schéma 7) s výtěžkem 99 %.



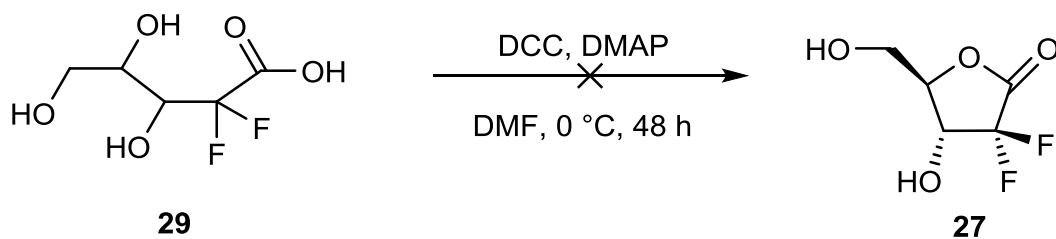
**Schéma 7** – Odchránění benzoylů pomocí methoxidu sodného.

Dle článku<sup>55</sup> pracujícího s velmi podobnou látkou následoval pokus o uzavření kruhu pomocí destilace dle Dean-Starka. Vzniklá kyselina byla rozpustěna ve směsi suchého ACN a suchého toluenu a byla přidána trifluoroctová kyselina v katalytickém množství. Destilace podle Dean-Starka byla prováděna přerušovaně, dohromady po dobu 32 hodin a průběžně byla odebírána reakční směs. Ta byla kontrolována pomocí NMR, čímž se zjišťovalo, zda došlo ke konverzi. Bohužel se touto metodou nepodařilo kruh uzavřít.



**Schéma 8** – Neprobíhající kyselá esterifikace dle Dean-Starka při uzavírání 2,2-difluor-3,4,5-trihydroxypentanové kyseliny na 2,2-difluor-2-deoxyribonolakton .

Dále následoval pokus o uzavření cukerné části z kyseliny rozpuštěné v DMF pomocí *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) s použitím 4-dimethylaminopyridinu (DMAP). Reakce probíhala po dobu 48 hodin za 0 °C, ale opět bohužel k žádné konverzi nedošlo.

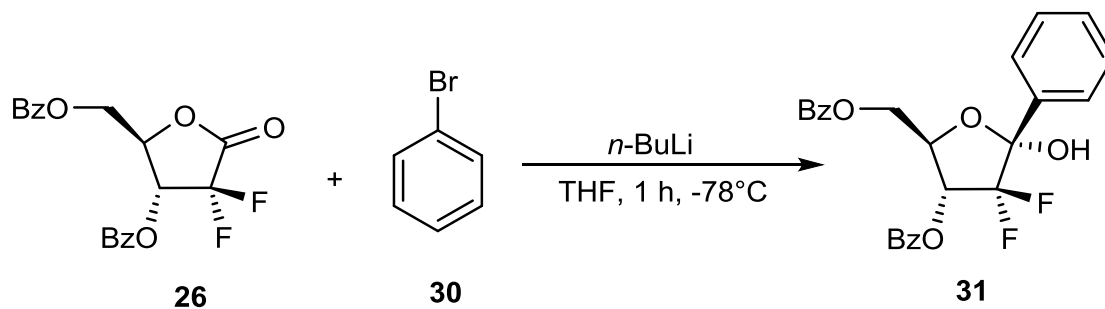


**Schéma 9** – Neprobíhající esterifikace s využitím DCC při uzavírání 2,2-difluor-3,4,5-trihydroxypentanové kyseliny na 2,2-difluor-2-deoxyribonolakton.

Ani jednou z výše uvedených reakcí se nepodařilo převést 2,2-difluor-3,4,5-trihydroxypentanovou kyselinu na 2,2-difluor-2-deoxyribonolakton.

### 3.2 Nukleofilní adice na furanolakton

Po neúspěchu s přechráněním byla reakce provedena přímo na 3,5-*O*-benzyl-2-deoxy-2,2-difluor-ribonolaktonu (**26**) i přes riziko vedlejších reakcí na benzoylech. Byla využívána nukleofilní adice na furanolakton.



**Schéma 10** – Nukleofilní adice na 3,5-*O*-benzoyl-2-deoxy-2,2-difluor-ribonolakton.

Při optimalizaci metody bylo odzkoušeno několik různých poměrů *n*-BuLi i brombenzenu (**30**) (**Tabulka 1**). Nejlepšího výtěžku se podařilo dosáhnout při 1,1 ekv. *n*-BuLi a při 1,5 ekv. PhBr a to při vzniku hemiketalu (**31**) s výtěžkem 17 %, který vzniká selektivně jako  $\alpha$  anomer.

**Tabulka 1** Optimalizace nukleofilní adice

Vstup	<i>n</i> -BuLi	PhBr	Reakční podmínky	Výtěžek reakce
1	5,00 ekv.	6,00 ekv.	-78 °C, 1 h	reakce neprobíhá
2	1,65 ekv.	2,00 ekv.	-78 °C, 2 h	12 %
3	1,10 ekv.	1,50 ekv.	-78 °C, 1 h	19 %

Dalším krokem byla redukce hemiketalu na chráněný nukleosid. Tato reakce byla prováděna rozpuštěním hemiketalu (**31**) v dichlormethanu v inertní atmosféře. Směs byla ochlazená na 0 °C. Do takto ochlazené směsi se přidal triethylsilan a fluorid boritý rozpuštěný v diethyletheru. Nejprve byla reakce prováděna pouze po dobu 30 min podle obecného postupu za 0 °C,<sup>56</sup> ale konverze reakce byla pouze 15 %. Mimo chráněný nukleosid zůstávalo v reakční směsi velké množství výchozí látky, nebyly pozorovány

žádné jiné postranní reakce. Při druhém pokusu byl jednak prodloužen čas reakce a to tak, že původních 30 minut při 0 °C bylo zachováno a následně byl čas prodloužen o 1 hodinu při míchání za laboratorní teploty. Tím vzniknul chráněný nukleosid (**32**) s výtěžkem 79 % (Schéma 11).

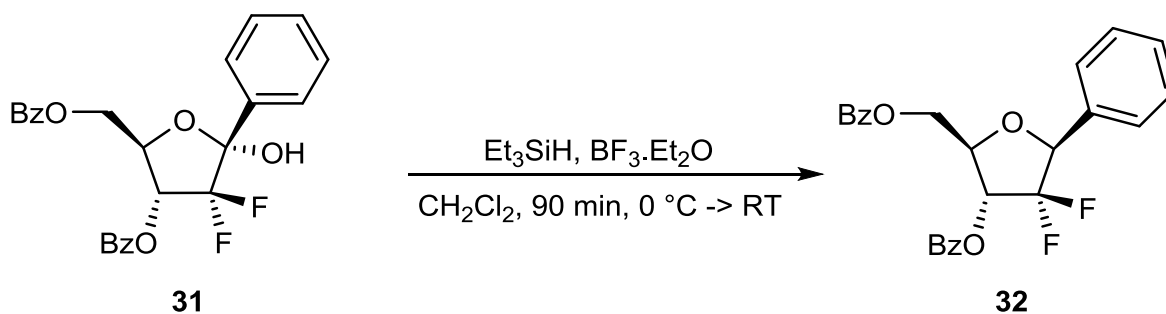


Schéma 11 – Redukce hemiketalu na chráněný nukleosid.

V syntéze následoval poslední krok a tím bylo odstranění chránicí skupiny cukerné části. Ta byla prováděna stejně jako při odchránění ribonolaktonu methoxidem sodným v suchém MeOH. Výsledkem syntézy byl nukleosid (**33**) s výtěžkem 74 % (Schéma 12).

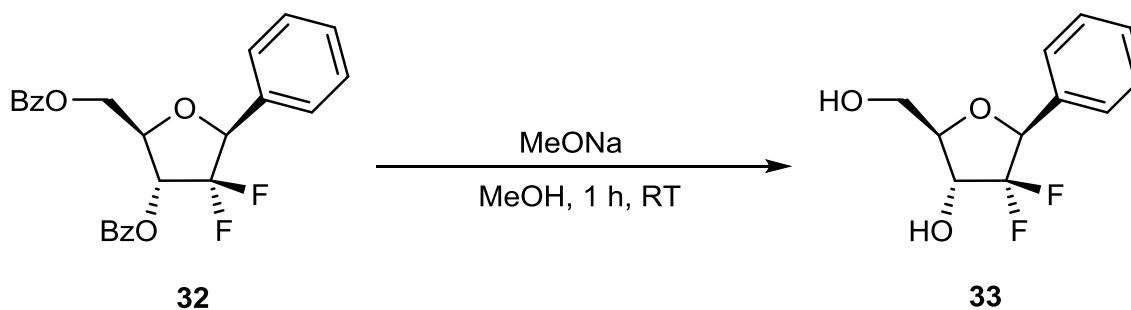
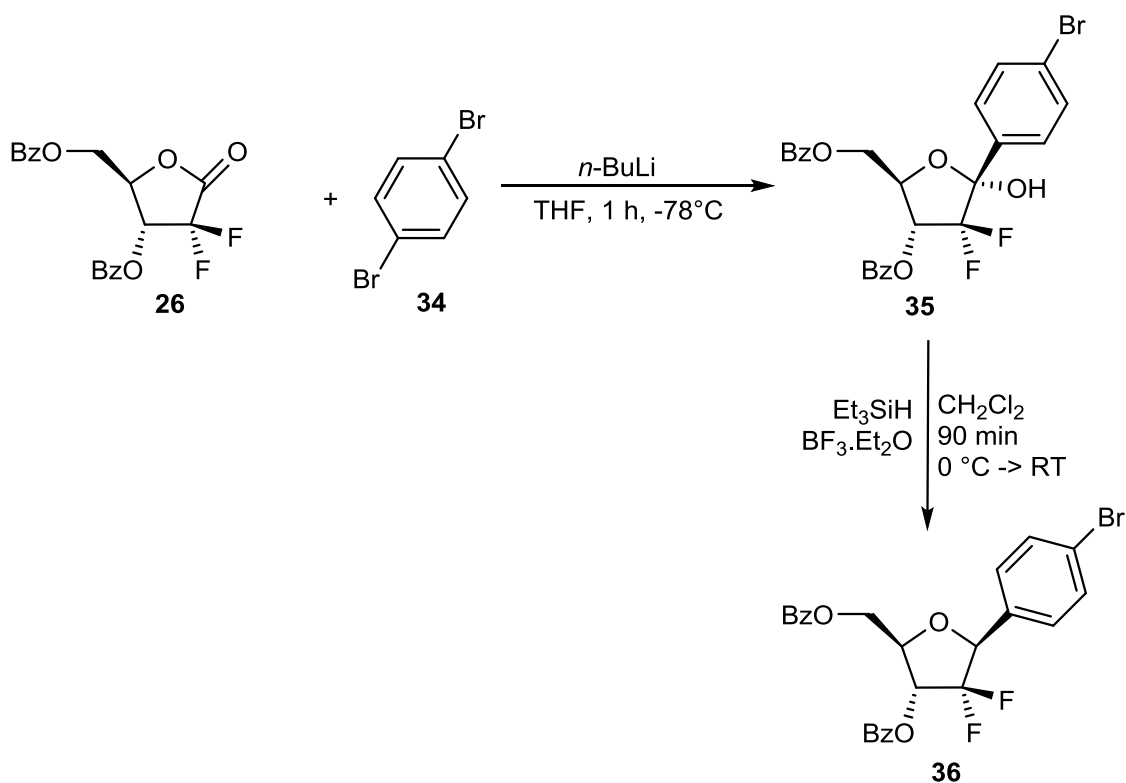


Schéma 12 – Odstranění chránicích skupin z nukleosidu.

### 3.3 Modulární přístup

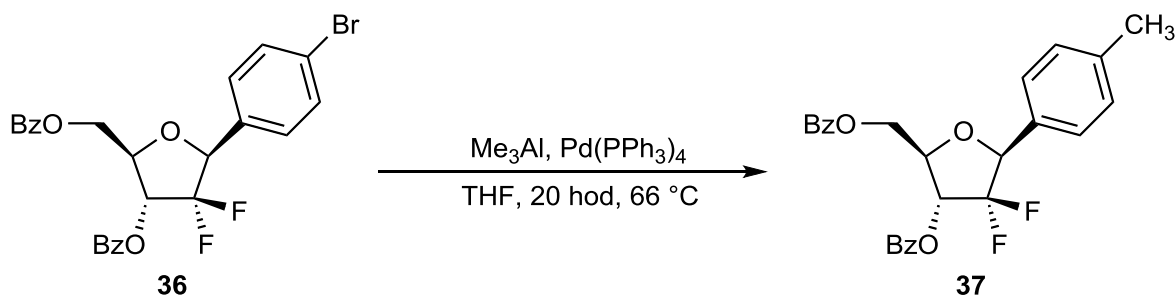
Velmi obdobně jako nukleofilní adice s brombenzenem byla provedena i syntéza s 1,4-dibrombenzenem (**34**). První část reakce, nukleofilní adice na furanolakton, byla prováděna s 1,1 ekv. *n*-BuLi a 1,1 ekv. 1,4-dibrombenzenu. Výtěžek reakce byl 12 %, opět selektivně na  $\alpha$  anomer. Následovala redukce hemiketalu (**35**) na chráněný nukleosid (**36**) (Schéma 13).





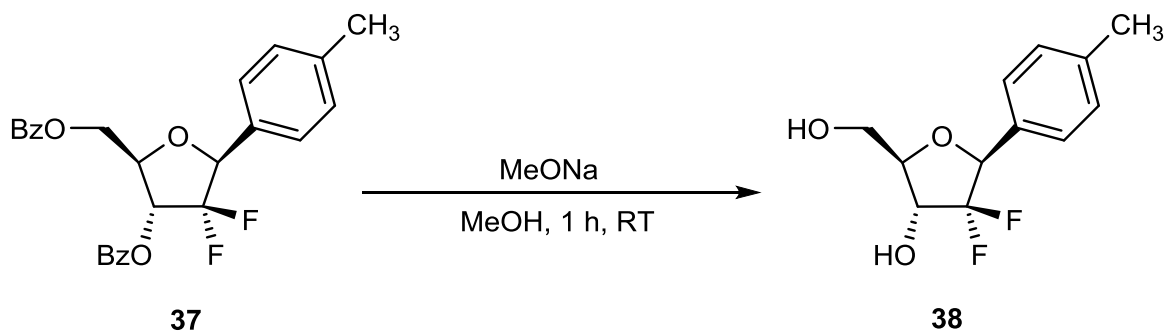
**Schéma 13** – Příprava chráněného bromovaného nukleosidu nukleofilní adicí a následnou redukcí hemiketalu.

Takto byla připravena výchozí látka **36** pro další substituční reakce. Dalším krokem byl coupling na brom v para pozici fenylu. Ten byl vystaven působení  $\text{Me}_3\text{Al}$ , za katalýzy  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ , čímž vznikl methylem substituovaný chráněný nukleosid (**37**) (**Schéma 14**).



**Schéma 14** – Syntéza na 4-substituovaný fenylnukleosid methylem.

Posledním krokem syntézy bylo opět odstranění chránících skupin substituovaného nukleosidu pomocí MeONa (**Schéma 15**). Reakce probíhala v suchém MeOH. Výsledkem reakce byl nukleosid (**38**) s výtěžkem 78 %.



**Schéma 15** – Odstranění chránících skupin z nukleosidu.

Z bromovaného meziprojektu (**36**), lze jednoduše pomocí cross-couplingových nebo paladiem katalyzovaných reakcí připravit celou serii nukleosidů.

## 4 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřil na syntézu C-nukleosidů s modifikovaným cukrem (2'-deoxy-2',2'-difluor-D-ribofuranosou). Na základě prováděných syntéz jsem připravil dva nukleosidy, potenciálně biologicky aktivní látky. Jako postup jsem zvolil nukleofilní adicí na furanolakton. Tím byla vyvinuta metoda pro přípravu nové série C-nukleosidů se 4-substituovaným benzenem jako bazí. Obdobně lze vyvinout i metodu pro modulární přípravu 3-substituovaného benzenu, nebo různé varianty substitucí na pyridinu, všechny s modifikací cukru dvěma fluory ve 2' pozici. Tyto látky budou předmětem mého dalšího vědeckého výzkumu.

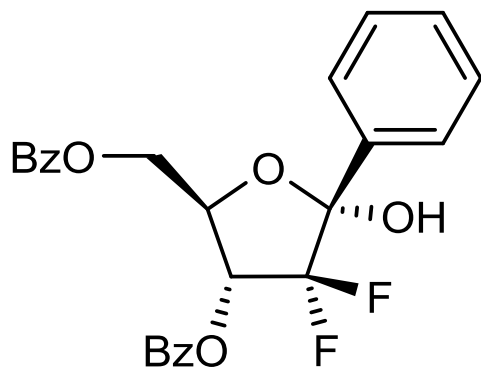
## 5 Experimentální část

### 5.1 Obecné poznámky

Výchozí látky byly získány komerčně (firmy Sigma-Aldrich, Fluka, Penta, Merck a Santiago) a pokud není uvedeno jinak, nebyly dále zpracovávány ani čištěny. Použitá rozpouštědla ke chromatografiím i prováděným reakcím byla zakoupena především od firmy Penta v p.a. kvalitě a také nebyla nijak dále čištěna. Ke sloupcovým chromatografiím byl využíván Merck Silica gel 60. Dále byly chromatografie prováděny na přístrojích HPFC TELEDYNE ISCO CombiFlash® Rf+ s UV detekcí při 254 nm a 280 nm a na přístroji HPFC REVELERIS® Flash Chromatography System s detekcí na detektoru ELSD a UV při 254 nm. Byly použity plnicí předkolony se silikagelem Merck Silica gel 60 a kolon FLASH 40+M a FLASH 25+M, obě naplněné silikagelem KP-Sil (rozměr částic 40-63  $\mu\text{m}$ ). Průběh reakcí byl sledován na deskách TLC Merck Kieselgel 60 F-254 a látky byly detekovány pod UV lampou při záření o vlnové délce 254 nm a 365 nm, u UV neaktivních látek postříkem roztoku anýzaldehydu (9.2 ml p-anýzaldehydu, 3.75 ml ledové kyseliny octové, 338 ml 96% ethanolu, 12.5 ml koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), vanilínu (3 g vanilínu, 50 ml 96% ethanolu, 15 ml 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), postříkem roztoku CAM (40 ml koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 360 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 10g  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ , 4g  $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4$ ), roztokem manganistanu draselného v acetonu, nebo roztokem 12% kyseliny sírové a následným ohřevem horkovzdušnou pistolí. Ke sledování reakcí a jejich konverze pomocí  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR a  $^{19}\text{F}$  NMR byl použit přístroj BRUKER Ascend™ 400 Prodigy a přístroj BRUKER UltraShield™ 400 při 25°C. Rozpouštědly byly komerčně dostupný MeOD, DMSO- $d_6$  a  $\text{CDCl}_3$ . Chemické posuny byly referencovány vzhledem k signálu rozpouštědla. NMR spektra pro charakterizaci produktů byla měřena na spektrometru Bruker Avance™ 500. Chemické posuny byly referencovány vůči signálům rozpouštědel a jsou uvedeny v ppm. Interakční konstanty jsou uvedeny v Hz. Signály jsou přiřazeny podle číslování použitého ve vzorcích látek. IČ spektra byla měřena metodou ATR na spektrometru BRUKER Alpha FT-IR™ Platinum ATR. Vlnočty jsou uvedeny v  $\text{cm}^{-1}$ . Body tání byly měřeny na automatickém botodávku Stuart SMP40 a jsou nekorigované.

## 5.2 Syntézy cílových sloučenin

### 3,5-di-*O*-(benzoyl)-2-deoxy-1-fenyl-2,2-difluor- $\alpha$ -D-erythro-pentofuranosa (31)



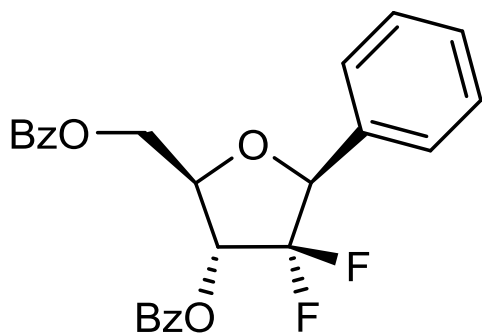
Brombenzen (**30**) (0,21 ml; 1,99 mmol) byl rozpuštěn v suchém THF (4 ml). Směs byla míchána za - 78 °C pod inertní atmosférou. Následně byl přidán 1,6M roztok *n*-butyllithia v hexanu (0,91 ml; 1,46 mmol). Paralelně byl v jiné baňce rozpuštěn 3,5-*O*-benzoyl-2-deoxy-2,2-difluor-ribonolakton **26** (500 mg; 1,33 mmol) v THF (2 ml). Tato směs byla chlazená na 0 °C

pro snížení teplotního šoku při přidání k výše uvedené směsi. Po třiceti minutách od přidání *n*-Bu-Li k PhBr byly směsi smíchány. Roztok laktonu v THF byl přidáván po kapkách za stálého míchání. Reakce byla dále 30 minut míchána za -78 °C. K ukončení reakce došlo přidáním nasyceného roztoku NH<sub>4</sub>Cl a přidáním vody, směs byla extrahována do EtOAc v dělicí nálevce. Následně byla organická část sušena pomocí bezvodého MgSO<sub>4</sub>. Směs byla zfiltrována a odpařena na vakuové rotační odparce a separována pomocí HPFC s UV detekcí (hexan/EtOAc, 15-19 % EtOAc). Byl získán hemiketal **31** (116 mg; 19 %), jako bílá pevná látka.

B.t. 115 – 122 °C, HRMS (ESI) pro C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>F<sub>2</sub>Na: [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno 477,11202; nalezeno 477,11205. IČ (ATR):  $\nu$  = 3418, 3077, 2971, 2924, 1713, 1608, 1498, 1457, 1403, 1349, 1272, 1215, 1182, 1126, 1067, 1025, 969, 906, 855, 808, 775, 748, 709 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 4.73 (m, 1H, H-5'a); 4.83 – 4.88 (m, 2H, H-5'b,4'); 5.56 (dd, 1H,  $J_{3',F} = 17.8$ ,  $J_{3',4'} = 4.6$  Hz, H-3'); 7.36 – 7.42 (m, 3H, H-*o,p*-Ph); 7.50 – 7.56 (m, 4H, H-*o*-Ph, H-*m*-Bz); 7.60 (m, 2H, H-*m*-Bz); 7.67 and 7.74 (2×m, 2×1H, H-*p*-Bz); 7.80 (d, 1H,  $J_{OH,F'} = 3.7$  Hz, OH-1'); 8.00 and 8.06 (2×m, 2×2H, H-*o*-Bz). <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 63.37 (CH<sub>2</sub>-5'); 72.12 (dd,  $J_{C,F} = 38.8$  and 17.9 Hz, CH-3'); 77.02 (CH-4'); 101.08 (dd,  $J_{C,F} = 33.8$  and 22.0 Hz, CH-1'); 121.21 (dd,  $J_{C,F} = 276.4$  and 249.3 Hz, C-2'); 126.97 (CH-*o*-Ph); 128.09 (CH-*m*-Ph); 128.67 (C-*i*-Bz); 129.03 and 129.15 (CH-*m*-Bz); 129.35 (CH-*o*-Bz); 129.44 (CH-*p*-Ph); 129.54 (C-*i*-Bz); 129.75 (CH-*o*-Bz); 133.78

and 134.28 (CH-*p*-Bz); 136.44 (C-*i*-Ph); 164.95 and 165.68 (CO).  $^{19}\text{F}$  NMR (470.3 MHz, DMSO- $d_6$ ): -122.02 and -101.93 (2 $\times$ d, 2 $\times$ 1F,  $J_{gem} = 239.0$  Hz).

**[3,5-di-*O*-(benzoyl)-2-deoxy-2,2-difluor- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl]-benzen (32)**

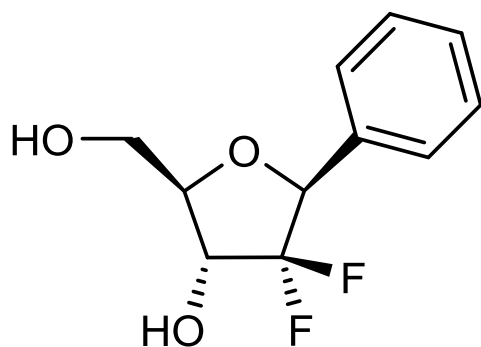


Hemiketal **31** (200 mg; 0,44 mmol) byl rozpuštěn v dichlormethanu (6 ml) a směs byla chlazená pomocí ledu na 0 °C. Po 5 minutách byl přidán Et<sub>3</sub>SiH (0,21 ml; 1,32 mmol) a roztok BF<sub>3</sub> v diethyletheru (0,08 ml; 0,66 mmol). Po 30 minutách míchání za 0 °C, byla baňka vyjmuta z chladicí lázně a směs míchána po dobu

1 hodiny za laboratorní teploty. K ukončení reakce byl do směsi přidán NEt<sub>3</sub> (0,61 ml; 4,40 mmol). Následně byla reakční směs odpařena na vakuové rotační odparce a separována na HPFC s UV detekcí (hexan/EtOAc, 8-12 % EtOAc). Byl získán chráněný nukleosid **32** (153 mg; 79 %), jako bezbarvý olej.

HRMS (ESI) pro C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>F<sub>2</sub>Na: [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno 461,11710; nalezeno 461,11704, pro C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub>F<sub>2</sub>: [M+H]<sup>+</sup> vypočteno 439,13516; nalezeno 439,13517. IČ (ATR):  $\nu = 3076, 3045, 2966, 2934, 1609, 1501, 1457, 1378, 1320, 1270, 1203, 1178, 1099, 1067, 1029, 825, 759, 709$  cm<sup>-1</sup>.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): 4.70 (dd, 1H,  $J_{gem} = 11.6$  Hz,  $J_{5'a,4'}$  = 4.4 Hz, H-5'a); 4.73 (m, 1H, H-4'); 4.81 (dd, 1H,  $J_{gem} = 11.6$  Hz,  $J_{5'b,4'}$  = 2.8 Hz, H-5'b); 5.29 (dd, 1H,  $J_{1',F} = 19.4$  and 7.2 Hz, H-1'); 5.64 (dd, 1H,  $J_{3',F} = 15.3$ ,  $J_{3',4'}$  = 5.2 Hz, H-3'); 7.38 – 7.44 (m, 5H, H-*o,m,p*-Ph); 7.53 and 7.60 (2 $\times$ m, 2 $\times$ 2H, H-*m*-Bz); 7.67 and 7.75 (2 $\times$ m, 2 $\times$ 1H, H-*p*-Bz); 8.01 and 8.10 (2 $\times$ m, 2 $\times$ 2H, H-*o*-Bz).  $^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz, DMSO- $d_6$ ): 63.37 (CH<sub>2</sub>-5'); 73.38 (dd,  $J_{C,F} = 37.6$  and 16.8 Hz, CH-3'); 78.52 (CH-4'); 80.74 (dd,  $J_{C,F} = 29.9$  and 24.9 Hz, CH-1'); 122.77 (dd,  $J_{C,F} = 262.0$  and 256.5 Hz, C-2'); 127.50 (CH-*o*-Ph); 128.45 (C-*i*-Bz); 128.52 (CH-*m*-Ph); 129.03 and 129.15 (CH-*m*-Bz); 129.27 (CH-*p*-Ph); 129.38 (CH-*o*-Bz); 129.48 (C-*i*-Bz); 129.87 (CH-*o*-Bz); 132.16 (C-*i*-Ph); 133.80 and 134.39 (CH-*p*-Bz); 164.67 and 165.64 (CO).  $^{19}\text{F}$  NMR (470.3 MHz, DMSO- $d_6$ ): -115.28 and -107.48 (2 $\times$ d, 2 $\times$ 1F,  $J_{gem} = 239.0$  Hz).

**[2-deoxy-2,2-difluor- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl]benzen (33)**

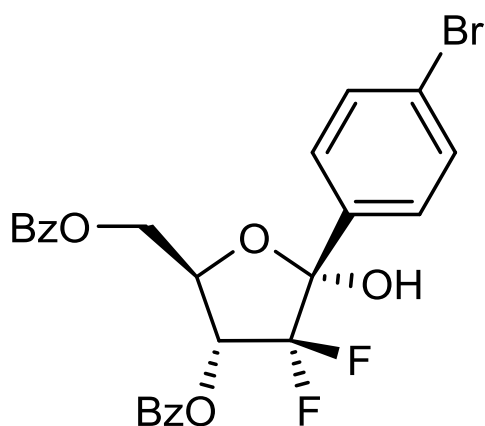


Chráněný nukleosid **32** (100 mg; 0,23 mmol) byl rozpuštěn v suchém methanolu (4 ml). Následně byl přidán 25 hm. % roztok MeONa v methanolu (0,52 ml; 2,28 mmol). Reakce byla míchána 1 hodinu za laboratorní teploty a poté byla ukončena přidáním CH<sub>3</sub>COOH (0,26 ml; 4,56 mmol). Směs byla opakovaně odpařena s MeOH

a následně separována na HPFC s ELSD detekcí (hexan/EtOAc, 56-67 % EtOAc). Byl získán nukleosid **33** (39 mg, 74 %), jako bílá pevná látka.

B.t. 144 – 146 °C,  $[\alpha]_{589}^{25} 32,3$  (c 0,192), HRMS (ESI) pro C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>F<sub>2</sub>Na:  $[M+Na]^+$  vypočteno 253,06467; nalezeno 253,06460. IČ (ATR):  $\nu = 3397, 3201, 2936, 2892, 1499, 1457, 1378, 1337, 1301, 1269, 1227, 1196, 1117, 1087, 1040, 927, 895, 826, 772, 724 \text{ cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 3.62 (bdt, 1H,  $J_{gem} = 12.1 \text{ Hz}$ ,  $J_{5'a,OH} = J_{5'a,4'} = 5.6 \text{ Hz}$ , H-5'a); 3.68 (bddd, 1H,  $J_{gem} = 12.1 \text{ Hz}$ ,  $J_{5'b,OH} = 5.6 \text{ Hz}$ ,  $J_{5'b,4'} = 4.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{5'b,F} = 1.3 \text{ Hz}$ , H-5'b); 3.81 (m, 1H, H-4'); 4.03 (m, 1H, H-3'); 4.95 (dd, 1H,  $J_{1',F} = 16.5$  and  $10.2 \text{ Hz}$ , H-1'); 5.02 (t, 1H,  $J_{OH,5'a} = J_{OH,5'b} = 5.8 \text{ Hz}$ , OH-5'); 6.14 (d, 1H,  $J_{OH,3'} = 5.9 \text{ Hz}$ , OH-3'); 7.34 – 7.43 (m, 5H, H-*o,m,p*-Ph). <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 60.58 (CH<sub>2</sub>-5'); 71.70 (dd,  $J_{C,F} = 31.3$  and  $18.1 \text{ Hz}$ , CH-3'); 80.64 (dd,  $J_{C,F} = 30.4$  and  $25.5 \text{ Hz}$ , CH-1'); 83.46 (dd,  $J_{C,F} = 5.3$  and  $2.7 \text{ Hz}$ , CH-4'); 124.64 (dd,  $J_{C,F} = 257.8$  and  $255.8 \text{ Hz}$ , C-2'); 127.46 (CH-*o*-Ph); 128.28 (CH-*m*-Ph); 128.74 (CH-*p*-Ph); 134.08 (C-*i*-Ph). <sup>19</sup>F NMR (470.3 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): -114.03 and -107.71 (2×d, 2×1F,  $J_{gem} = 230.7 \text{ Hz}$ ).

**3,5-di-*O*-(benzoyl)-1-(4-bromfenyl)- 2-deoxy-2,2-difluor-  $\alpha$ -D-erythro-pentofuranosa (35)**

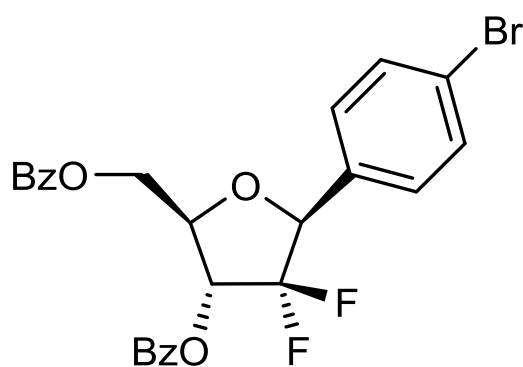


1,4-dibrombenzen (**34**) (3.450 mg; 14,63 mmol) byl rozpuštěn v suchém THF (40 ml). Směs byla dána pod inertní atmosféru a chlazená pomocí suchého ledu a acetonu na  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následně byl přidán 1,6M roztok *n*-butyllithia v hexanu (9,14 ml; 14,63 mmol). Paralelně byl v jiné baňce rozpuštěn 3,5-*O*-benzoyl-2-deoxy-2,2-difluor-ribonolakton **26** (5000 mg; 13,30 mmol) v THF (20 ml). Ten byl chlazen na  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro snížení teplotního šoku při přidávání k výše uvedené směsi. Po třiceti minutách od přidání *n*-Bu-Li k 1,4-dibrombenzenu byly směsi smíchány. Roztok laktonu v THF byl přidáván po kapkách za stálého míchání. Reakce byla dále 30 minut míchána za  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . K ukončení reakce došlo přidáním nasyceného roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a přidáním vody, směs byla extrahována do EtOAc v dělicí nálevce. Následně byla organická část sušena pomocí bezvodého  $\text{MgSO}_4$ . Směs byla filtrována a odpařena na vakuové rotační odparce a separována pomocí HPFC s UV detekcí (hexan/EtOAc, 13-18 % EtOAc). Byl získán hemiketal **35** (730 mg; 12 %), jako bílá pevná látka.

B.t.  $102 - 104\text{ }^{\circ}\text{C}$ , HRMS (ESI) pro  $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{BrF}_2\text{O}_6\text{Na}$ :  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  vypočteno 555,02253; nalezeno 555,02255. IČ (ATR):  $\nu = 3416, 3072, 3020, 2971, 1696, 1602, 1494, 1456, 1397, 1353, 1322, 1269, 1220, 1183, 1118, 1075, 1009, 920, 867, 827, 758, 709\text{ cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 4.74 (m, 1H, H-5'a); 4.84 (m, 1H, H-5'b); 4.86 (m, 1H, H-4'); 5.56 (dd, 1H,  $J_{3',F} = 17.8, J_{3',4'} = 4.7\text{ Hz}$ , H-3'); 7.45 (m, 2H, H-*o*-Ph); 7.53 and 7.60 (2×m, 2×2H, H-*m*-Bz); 7.61 (m, 2H, H-*m*-Ph); 7.67 and 7.74 (2×m, 2×1H, H-*p*-Bz); 7.93 (d, 1H,  $J_{\text{OH},F} = 3.7\text{ Hz}$ , OH-1'); 7.99 and 8.05 (2×m, 2×2H, H-*o*-Bz).  $^{13}\text{C}$  NMR (125.7 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 63.38 ( $\text{CH}_2$ -5'); 72.02 (dd,  $J_{\text{C},F} = 38.5$  and  $17.9\text{ Hz}$ , CH-3'); 77.21 (CH-4'); 100.83 (dd,  $J_{\text{C},F} = 33.9$  and  $21.8\text{ Hz}$ , CH-1'); 121.13 (dd,  $J_{\text{C},F} = 276.7$  and  $249.4\text{ Hz}$ , C-2'); 122.97 (C-*p*-Ph); 128.64 (C-*i*-Bz); 129.07 (CH-*m*-Bz); 129.18 (CH-*m*-Bz, CH-*o*-Ph); 129.36 (CH-*o*-Bz); 129.51 (C-*i*-Bz); 129.77 (CH-*o*-Bz); 131.20 (CH-*m*-Ph); 133.83 and 134.33 (CH-*p*-Bz); 135.86 (C-*i*-Ph); 164.95 and 165.71 (CO).  $^{19}\text{F}$  NMR (470.3 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): -121.90 and -102.02 (2×d, 2×1F,  $J_{\text{gem}} = 239.0\text{ Hz}$ ).



**4-[3,5-di-*O*-(benzoyl)-2-deoxy-2,2-difluor- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl]-1-brombenzen (36)**

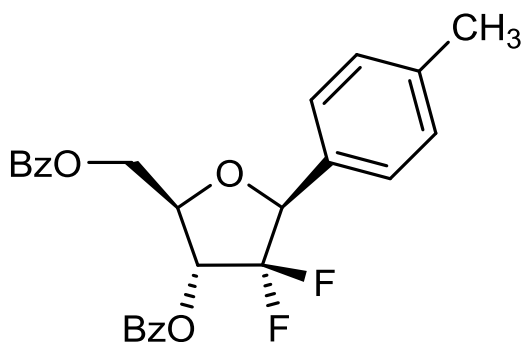


Hemiketal **35** (152 mg; 0,29 mmol) byl rozpuštěn v dichlormethanu (5 ml) a směs byla chlazená pomocí ledu na 0 °C. Po 5 minutách byl přidán Et<sub>3</sub>SiH (0,09 ml; 0,71 mmol) a roztok BF<sub>3</sub> v diethyletheru (0,25 ml; 1,42 mmol). Po 30 minutách míchání za 0 °C následně byla baňka vyjmuta z chladicí lázně a směs byla míchána po dobu 1 hodiny

za laboratorní teploty. K ukončení reakce byl do směsi přidán NEt<sub>3</sub> (0,40 ml; 2,86 mmol). Následně byla reakční směs odpařena na vakuové rotační odparce a separována na HPFC s UV detekcí (hexan/EtOAc, 7-10 % EtOAc). Byl získán chráněný nukleosid **36** (126 mg; 84 %), jako bezbarvý olej.

HRMS (ESI) pro C<sub>25</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub>BrF<sub>2</sub>Na: [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno 539,02761; nalezeno 539,02779, pro C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>BrF<sub>2</sub>: [M+H]<sup>+</sup> vypočteno 517,04567; nalezeno 517,04596. IČ (ATR):  $\nu$  = 3074, 3044, 2972, 2904, 1604, 1495, 1456, 1376, 1322, 1270, 1247, 1178, 1102, 1069, 1009, 914, 849, 796, 709 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 4.70 (dd, 1H,  $J_{gem} = 11.7$  Hz,  $J_{5'a,4'} = 4.4$  Hz, H-5'a); 4.74 (m, 1H, H-4'); 4.79 (dd, 1H,  $J_{gem} = 11.7$  Hz,  $J_{5'b,4'} = 3.0$  Hz, H-5'b); 5.32 (dd, 1H,  $J_{1',F} = 19.3$  and 7.0 Hz, H-1'); 5.63 (dd, 1H,  $J_{3',F} = 15.3$ ,  $J_{3',4'} = 5.2$  Hz, H-3'); 7.38 (m, 2H, H-*o*-Ph); 7.53 and 7.60 (2×m, 2×2H, H-*m*-Bz); 7.63 (m, 2H, H-*m*-Ph); 7.67 and 7.75 (2×m, 2×1H, H-*p*-Bz); 8.00 and 8.09 (2×m, 2×2H, H-*o*-Bz). <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 63.39 (CH<sub>2</sub>-5'); 73.30 (dd,  $J_{C,F} = 37.5$  and 16.9 Hz, CH-3'); 78.68 (CH-4'); 80.03 (dd,  $J_{C,F} = 30.0$  and 24.6 Hz, CH-1'); 122.64 (C-*p*-Ph); 122.64 (bt,  $J_{C,F} = 259.3$  Hz, C-2'); 128.41 (C-*i*-Bz); 129.04 (CH-*m*-Bz); 129.14 (CH-*m*-Bz); 129.38 (CH-*o*-Bz); 129.45 (C-*i*-Bz); 129.76 (CH-*o*-Ph); 129.87 (CH-*o*-Bz); 131.59 (CH-*m*-Ph); 131.6 (C-*i*-Ph); 133.81 and 134.41 (CH-*p*-Bz); 164.64 and 165.64 (CO). <sup>19</sup>F NMR (470.3 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): -115.38 and -107.61 (2×d, 2×1F,  $J_{gem} = 239.4$  Hz).

**[3,5-di-*O*-(benzoyl)-2-deoxy-2,2-difluor- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl]-4-toluen (37)**

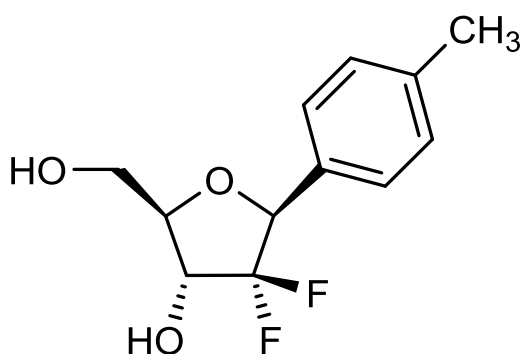


Chráněný nuklosid **36** (185 mg; 0,36 mmol) s Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (21 mg, 0,02 mmol) byl rozpuštěn v suchém THF (4 ml). Následně byl přidán 2M roztok Me<sub>3</sub>Al v toluenu (0,54 ml, 1,07 mmol). Směs byla míchána a zahřívána na teplotu 66 °C po dobu 20 hodin. K ukončení reakce došlo přidáním nasyceného roztoku

dihydrogenfosforečnanu sodného. Látka byla extrahována do ethylacetátu, který byl následně sušen pomocí MgSO<sub>4</sub>. Po odpaření rozpouštědla byla reakční směs separována na HPFC s UV detekcí (hexan/EtOAc, 7-10 % EtOAc). Byl získán chráněný nukleosid **37** (96 mg; 61 %), jako bezbarvý olej.

HRMS (ESI) pro C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>F<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na: [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno 475,13275; nalezeno 475,13276. IČ (ATR):  $\nu$  = 3073, 2933, 1610, 1522, 1456, 1378, 1270, 1252, 1205, 1178, 1101, 1068, 1027, 804, 776, 709 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ph); 4.66 – 4.73 (m, 2H, H-4',5'a); 4.79 (m, 1H, H-5'b); 5.22 (dd, 1H,  $J_{1',F}$  = 19.4 and 7.4 Hz, H-1'); 5.62 (dd, 1H,  $J_{3',F}$  = 15.2,  $J_{3',4'}$  = 5.3 Hz, H-3'); 7.20 (m, 2H, H-*m*-Ph); 7.30 (m, 2H, H-*o*-Ph); 7.53 and 7.60 (2×m, 2×2H, H-*m*-Bz); 7.67 and 7.74 (2×m, 2×1H, H-*p*-Bz); 8.00 and 8.09 (2×m, 2×2H, H-*o*-Bz). <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 20.99 (CH<sub>3</sub>-Ph); 63.38 (CH<sub>2</sub>-5'); 73.39 (dd,  $J_{C,F}$  = 37.7 and 16.8 Hz, CH-3'); 78.40 (CH-4'); 80.73 (dd,  $J_{C,F}$  = 30.0 and 24.7 Hz, CH-1'); 122.71 (dd,  $J_{C,F}$  = 261.7 and 256.3 Hz, C-2'); 127.49 (CH-*o*-Ph); 128.45 (C-*i*-Bz); 129.03 (CH-*m*-Bz); 129.05 (C-*i*-Ph); 129.08 (CH-*m*-Ph); 129.14 (CH-*m*-Bz); 129.37 (CH-*o*-Bz); 129.48 (C-*i*-Bz); 129.86 (CH-*o*-Bz); 133.80 and 134.38 (CH-*p*-Bz); 138.69 (C-*p*-Ph); 164.67 and 165.63 (CO). <sup>19</sup>F NMR (470.3 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): -115.36 and -107.54 (2×d, 2×1F,  $J_{gem}$  = 238.8 Hz).

**[2-deoxy-2,2-difluor- $\beta$ -D-erythro-pentofuranosyl]-4-toluen (38)**



Chráněný nukleosid **37** (124 mg; 0,27 mmol) byl rozpuštěn v suchém methanolu (5 ml). Následně byl přidán 25 hm. % roztok MeONa v methanolu (0,61 ml; 2,65 mmol). Reakce byla míchána 45 minut za laboratorní teploty a následně byla ukončena přidáním CH<sub>3</sub>COOH (0,31 ml; 5,30 mmol). Směs byla opakovaně

odpařena s MeOH a následně separována na HPFC s ELSD detekcí (hexan/EtOAc, 62-90 % EtOAc). Byl získán nukleosid **38** (51 mg, 78 %), jako bílá pevná látka.

B.t. 72 – 73 °C,  $[\alpha]_{589}^{20}$  1,5 (c 0,261), HRMS (ESI) pro C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>F<sub>2</sub>Na: [M+Na]<sup>+</sup> vypočteno 268,08032; nalezeno 268,08035. IČ (ATR):  $\nu$  = 3066, 3042, 2984, 2933, 2909, 1607, 1524, 1497, 1455, 1402, 1377, 1329, 1273, 1182, 1116, 1062, 1026, 743, 707 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ph); 3.61 (bdt, 1H,  $J_{gem} = 12.1$  Hz,  $J_{5'a,OH} = J_{5'a,4'} = 5.6$  Hz, H-5'a); 3.67 (bdt, 1H,  $J_{gem} = 12.1$  Hz,  $J_{5'b,OH} = 5.5$  Hz,  $J_{5'b,4'} = 3.9$  Hz,  $J_{5'b,F} = 1.0$  Hz, H-5'b); 3.79 (bq, 1H,  $J_{4',5'a} = J_{4',5'b} = J_{4',3'} = 5.1$  Hz,  $J_{4',F} = 1.3$  Hz, H-4'); 4.01 (dtd, 1H,  $J_{3',F} = 15.9$  Hz,  $J_{3',OH} = J_{3',4'} = 5.9$  Hz,  $J_{3',F} = 4.1$  Hz, H-3'); 4.89 (dd, 1H,  $J_{1',F} = 16.6$  and 10.3 Hz, H-1'); 4.99 (t, 1H,  $J_{OH,5'a} = J_{OH,5'b} = 5.8$  Hz, OH-5'); 6.10 (d, 1H,  $J_{OH,3'} = 5.9$  Hz, OH-3'); 7.19 (m, 2H, H-*m*-Ph); 7.28 (m, 2H, H-*o*-Ph). <sup>13</sup>C NMR (125.7 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 20.96 (CH<sub>3</sub>-Ph); 60.60 (CH<sub>2</sub>-5'); 71.71 (dd,  $J_{C,F} = 31.4$  and 18.1 Hz, CH-3'); 80.61 (dd,  $J_{C,F} = 30.3$  and 25.4 Hz, CH-1'); 83.36 (dd,  $J_{C,F} = 5.4$  and 2.7 Hz, CH-4'); 124.55 (dd,  $J_{C,F} = 257.8$  and 255.5 Hz, C-2'); 127.42 (CH-*o*-Ph); 128.81 (CH-*m*-Ph); 131.03 (C-*i*-Ph); 137.99 (C-*p*-Ph). <sup>19</sup>F NMR (470.3 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): -114.14 and -107.72 (2×d, 2×1F,  $J_{gem} = 230.7$  Hz).

## Citovaná literatura

- <sup>1</sup> Štambaský, J.; Hocek, M.; Kočovský, P.: *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 6729-6764.
- <sup>2</sup> Nelson, D.L.; Cox, M.M.: *Lehninger, Principles of biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman and Company; New York; **2008**.
- <sup>3</sup> Cho, A.; Zhang L., Xu, J.; Babusis, D.; Butler, T.; Lee, R.; Saunders, O.; Wang, T.; Parrish, J.; Perry, J.; Feng, J.; Ray, A.; Kim, C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2012**, 22, 4127-4132.
- <sup>4</sup> Butora, G.; Olsen, D.; Carroll, S.; McMasters, D.; Schmitt, C.; Leone, J.; Stahlhut, M.; Burlein, C.; MacCoss, M.: *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 5219-5229.
- <sup>5</sup> Wellington, K.; Benner, S.: *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, **2006**, 25, 1309-1333.
- <sup>6</sup> Postema, M.H.D.: *Tetrahedron*, **1992**, 48, 8545-8854.
- <sup>7</sup> Adamo, M.; Pergoli, R.: *Curr. Org. Chem.*, **2008**, 12, 1544-1569.
- <sup>8</sup> Davis, D.R.: *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23, 5020-5026.
- <sup>9</sup> Davides, F.; Allen, F.: *J. Biol. Chem.*, **1957**, 227, 907-915.
- <sup>10</sup> Ge, J.; Yu, Y.: *Trends in Biochemical Science*, **2013**, 38, 210-218.
- <sup>11</sup> Cohn, W.: *J. Biol. Chem.*, **1960**, 235, 1488-1498.
- <sup>12</sup> Koonin, E.V.: *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 2411-2415.
- <sup>13</sup> Böther, T.; Sieber, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 6964-6972.
- <sup>14</sup> Nakagawa, Y.; Kaño, H.; Tsukuda, Y.; Koyama, H.: *Tetrahedron Lett.*, **1967**, 40, 4105-4109.
- <sup>15</sup> Uehara, Y.I.; Fisher, J.M.; Rabinowicz, M.: *Biochem. Pharmacol.*, **1980**, 29(16), 2199-2204.
- <sup>16</sup> Just, G.; Lim, M.-I.: *Can. J. Chem.*, **1977**, 55, 2993-2997.
- <sup>17</sup> Gudmundsson K.S.; Williams J.D.; Drach J.C.; Townsend L.B.: *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 1449-1455.
- <sup>18</sup> Good, S. S.; Owens, B. S.; Townsend, L. B.; Drach, J. C. : *Antiviral Res.*, **1994**, 23, 103-125.

- <sup>19</sup> Gudmundsson, K. S.; Drach, J. C.; Townsend, L. B.: *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 3453-3459.
- <sup>20</sup> Cho, A.; Zhang, L.; Xu, J.; Lee, R.; Butler, T.; Metobo, S.; Aktoudianakis, V.; Lew, W.; Ye, H.; Clarke, M.; Doerffler, E.; Byun, D.; Wang, T.; Babusis, D.; Carey, A. C.; German, P.; Sauer, D.; Zhong, W.; Rossi, S.; Fenaux, M.; McHutchison, J. G.; Perry, J.; Feng, J.; Ray, A.S.; Kim, C.U.: *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 1812–1825.
- <sup>21</sup> Feng, J.Y.; Cheng, G.; Perry, J.; Barauskas, O.; Xu, Y.; Fenaux, M.; Eng, S.; Tirunagari, N.; Peng, B.; Yu, M.; Tian, Y.; Lee, Y.-J.; Stepan, G.; Lagpacan, L.L.; Jin, D.; Hung, M.; Ku, K. S.; Han, B.: *Agents Chemother.*, **2014**, 58, 1930–1942.
- <sup>22</sup> Lavanchy, D.: *Liver Int.*, **2009**, 74-81.
- <sup>23</sup> Draffan, A.G.; Frey, B.; Pool, B.; Gannon, C.; Tyndall, E.M.; Lilly, M.; Francom, P.; Hufton, R.; Halim, R.; Jahangiri, S.; Bond, S.; Nguyen, V.T.T.; Jeynes, T.P.; Wirth, V.; Luttick, A.; Tilmanis, D.; Thomas, J.D.; Pryor, M.; Porter, K.; Morton, C.J.; Lin, B.; Duan, J.; Kukolj, G.; Simoneau, B.; McKercher, G.; Lagacé, L.; Amad, M.; Bethell, R.C.; Tucker, S.P.: *ACS Med. Chem. Lett.*, **2014**, 5, 679-684.
- <sup>24</sup> Lepage, G.; Junga, i.; Bowman, B.: *Cancer Res.*, **1964**, 24, 835–840.
- <sup>25</sup> Guntaka, R.V.; Varma, B.R.; Weber, K.T.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2003**, 35, 22–31.
- <sup>26</sup> Sneader, W.: *Drug discovery in a history*, New York: Wiley, **2005**.
- <sup>27</sup> Hertel, L.W.; Boder, G.B.; Kroin, J.S.; Rinzel, S.M; Poor, G.A.; Todd, G.C.; Grindey, G.B.: *Cancer Res.*, **1990**, 50, 4417-4422.
- <sup>28</sup> Cerqueira, N.; Fernandes, P.; Ramos, M.: *Che. Eur. J.*, **2007**, 13, 8507-8515.
- <sup>29</sup> Merriman, R.; Hertel, L.; Schultz, R.; Houghton, P.; Houghton, J; Rutherford, P.; Tanzer, L.; Boder, G.; Grindey, G.: *Investigation New Drugs*, **1996**, 3, 243-247.
- <sup>30</sup> Wilt, C.; Kroep, J.; Bergman, A.; Loves, W. J. P.; Alvarez, E.; Talianidis, I.; Erikson, S.; Groemingen, C.; Pinedo, H.; Peters, G.: *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2002**, 486, 287-290.
- <sup>31</sup> Huang, G.: *Biochemistry*, **1991**, 30, 5164-5171.
- <sup>32</sup> Štefko, M.; Slavětínská, L.; Klepetářová, B.; Hocek M.: *J. Org. Chem.*, **2011**, 76, 6619-6635.
- <sup>33</sup> Chen, D.; Beuscher, A.; Stevens, R.; Wirsching, P.; Lerner R.; Janda, K.: *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 1725-1732.

- 34 Chiba, J.; Takeshima, S.; Mishima, K.; Maeda, H.; Nanai, Y.; Mizuno, K.; Inouye, M.: *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 8124-8130.
- 35 Shapiro, R.; Chambers, R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 83, 5432-5443.
- 36 Bihovsky, R.; Salick, C.; Giusti, I.: *J. Org. Chem.*, **1988**, 53, 4026-4031.
- 37 Hainka, S.; Singh, I.; Hemmings, J.; Seitz, O.: *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 8811-8819.
- 38 Chaudhuri, N.; Kool, E.: *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 1795-1798.
- 39 Klein, R.; Kotick, M.; Watanabe, K.; Fox, J.: *J. Org. Chem.*, **1971**, 36, 4113-4116.
- 40 Hocek, M.; Klepetářová, B.; Pohl, R.: *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 4525-4528.
- 41 Maeba, I.; Iwata, K.; Usami, F.; Furukawa, H.: *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 2998-3002.
- 42 Jiang, Y.L.; Stivers J.T.: *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 4051-4055.
- 43 Wellington, K.W.; Bennr, S.A.: *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, **2006**, 25, 1309-1333.
- 44 Heck, F.R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91, 6707-6714.
- 45 Arai, I.; Daves, G.D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1978**, 100, 287-288.
- 46 Cheng, J.C.-Y.; Hacksell, U.; Daves, G.D.: *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 3093-3098.
- 47 Zhang, H.C.; Daves, G.D.: *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 4690-4696.
- 48 Lee, A.H.F.; Kool, E.T.: *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 132-140.
- 49 Urban M.; Pohl, R.; Klepetářová, B.; Hocek, M.: *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 7322-7328.
- 50 Joubert, N.; Pohl, R.; Klepetářová, B.; Hocek, M.: *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 6797-6805.
- 51 Bárta, J.; Pohl, R.; Klepetářová, B.; Ernsting, N. P.; Hocek, M.: *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 3798-3806.
- 52 Bárta, J.; Slavětínská, L.; Klepetářová, B.; Hocek, M.: *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 5432-5443.
- 53 Kubelka, T.; Slavětínská, L.; Klepetářová, B.; Hocek, M.: *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 2666-2669.
- 54 Joubert, N.; Urban, M.; Pohl, R.; Hocek, M.: *Synthesis*, **2008**, 1918-1932.

<sup>55</sup> Chou, T.S.; Heath, P.C.; Patterson, L.E.; Poteet, L.M.; Lakin, R.E; Hunt, A.H.: *Synthesis*, **1992**, 6, 565-570.

<sup>56</sup> Anna Tokarenko, nepublikované výsledky.