

3. Badania własne

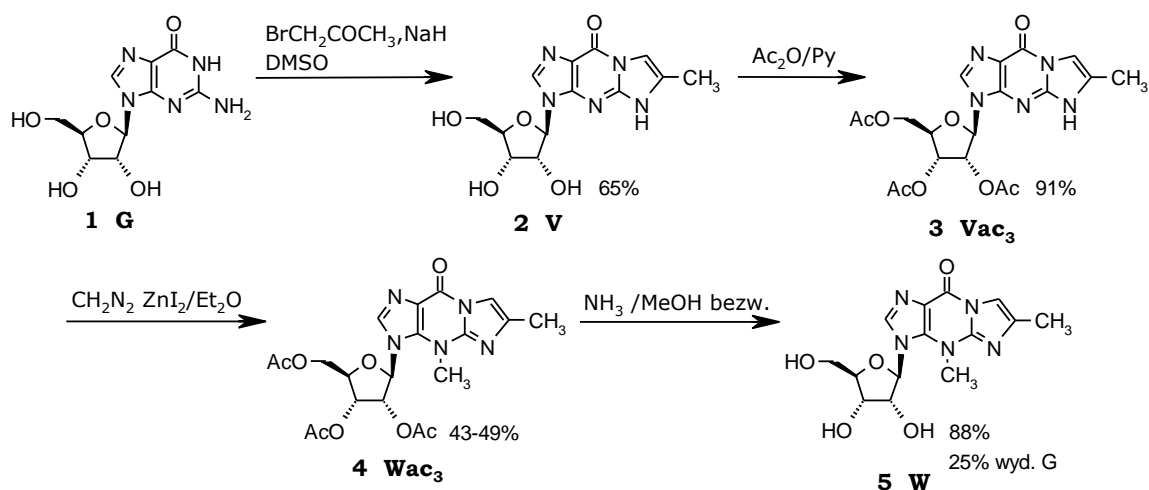
3.1. Synteza C2 podstawionych pochodnych wyozyzny

3.1.1. Uwagi wstępne

Pochodne wyozyzny podstawione w pozycji C2 grupami o różnorodnych właściwościach elektronowych i przestrzennych służyły do badań ich wpływu na parametry konformacyjne, w szczególności na pofałdowanie cukru i jego ustawienie względem zasady oraz na trwałość wiązania glikozydowego. Łatwość hydrolytycznego rozpadu tego ostatniego stanowiła jedną z istotnych trudności syntezy.

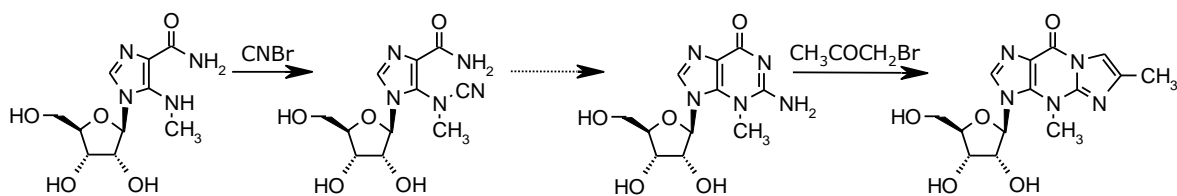
Synteza C2-podstawionych analogów przebiegała zasadniczo według opisanego w literaturze^{455,456} przejścia z guanozyny **1** poprzez związki pośrednie **2-4** do wyozyzny **5** (**Schemat 1**)

Schemat 1. Synteza wyozyzny poprzez układ N4-dezmetylowyozyzny (V)



Należy wspomnieć o alternatywnych podejściach do syntezy wyozyzny podjętych przez zespół S. Nakatsuki⁴⁵⁷ oraz nieco później przez zespół T. Itayi⁴⁵⁸ w których substratem wyjściowym był 5-(metyloamino)-1-β-D-rybofuranozyloimidazo-4-karboksyamid. (**Schemat 2**) W metodzie tej na drodze pięcioetapowej syntezy, otrzymywano 3-metyloguanozynę (z wydajnością całkowitą 19%), którą następnie poddawano reakcji alkilowania i cyklizacji otrzymując wyozynę. Zastosowanie tej drogi do otrzymania C2 podstawionych pochodnych

Schemat 2. Alternatywne podejście do syntezy wyozyzny przez 3-metyloguanozynę



wyozyiny uznałem jako słabo rokujące ze względu na zwiększenie skomplikowania procedury oraz duże prawdopodobieństwo wysokiej nietrwałości C8 podstawionych pochodnych 3-metyloguanozyny.

3.1.2. Synteza 2-metylowyozyiny

2-Metylowyozyina, 2-MeW, której właściwości konformacyjne stały się inspiracją dla moich badań została otrzymana uprzednio w naszym zespole uciążliwą drogą z bardzo niską wydajnością w stosunku do startowej G (*ca* 1%). Pierwszym etapem wspomnianej wyżej syntezy, była katalizowana przez jony Fe^{2+} reakcja wolnorodnikowego metylowania guanozyny w pozycji C8. Zasadniczą wadą tej metody było: niecałkowite przejście guanozyny w 8-metyloguanozynę i niemożność oddzielenia produktu od substratu. W miarę dalszego przekształcania mieszaniny w tricykliczne pochodne, V i 2-MeV, i ich metylowania do W i 2-MeW, udział w niej związków 2-podstawionych stale się zmniejszał wskutek wolniejszego tempa ich reagowania. Na drodze wielokrotnych rozdziałów chromatograficznych otrzymano kilka miligramów jednorodnej 2-metylowyozyiny.³¹

Moje poszukiwania korzystniejszych dróg syntezy 2-podstawionych pochodnych wyozyiny zacząłem więc od tego związku (**Schemat 3**). Startując z 8-bromoguanozyny 8-BrG (**6**) jako substratu, testowałem różne drogi prowadzące do kluczowego związku pośredniego, 2-metylo-N4-dezmetylowyozyiny, 5,9-dihydro-2,6-dimetylo-9-okso-3-(β -D-rybofuranozylo)-5H-imidazo[1,2-a]puryny (2-MeV). W pierwszej kolejności przekształciłem 8-BrG w 8-metyloguanozynę, 8-MeG (**7**) według procedury literaturowej⁴⁵⁹, opracowanej dla otrzymania nukleozydów purynowych podstawionych łańcuchami alifatycznymi w pozycji C8. W metodzie tej wykorzystano reakcję sprzęgania (*cross-coupling*) trimetyloglinu z 8-bromo-2',3',5'-trimetylosililowanymi nukleozydami purynowymi katalizowaną przez kompleks chlorku palladu (II) z trifenylofosfiną. Ocena przebiegu reakcji na podstawie TLC wskazywała, na całkowite przereagowanie 8-BrG oraz obecność 8-MeG jako głównego produktu. Widmo ^1H NMR mieszaniny poreakcyjnej potwierdziło obecność 8-MeG, sygnał ^1H grupy metylowej w pozycji C8 występował jako singlet przy 2.40 ppm (wg autorów 2.42 ppm). 8-MeG wyizolowałem na drodze rozdziału chromatograficznego z wydajnością 56% stosując jako eluent układ CHCl_3 :MeOH 3:1. Podane przez autorów ogólne warunki (CHCl_3 :MeOH 10:1) rozdziału dla szeregu 8-podstawionych okazały się nieprzydatne gdyż nawet w bardziej polarnym układzie CHCl_3 :MeOH 3:1 stwierdziłem bardzo niską ruchliwość chromatograficzną 8-MeG i 8-BrG ($R_f \approx 0.1-0.15$). Ze względu na znaczne zużycie eluentu oraz czasochłonność rozdziału podjąłem próby izolacji 8-MeG przez krystalizację mieszaniny

metylowej ($\delta=2.37$) uległ niewielkiemu przesunięciu w stronę wyższego pola w porównaniu 8-MeG. Użycie 8-MeGac₃ jako substratu do reakcji alkilowania-cyklizacji nie ulepszyło procedury, gdyż zamiast pożądanej triacetylowanej pochodnej 2-MeVac₃ (**11**) uzyskałem 2-MeV (**9**) z 50% wydajnością (11% wydajności względem G). Zrezygnowałem z optymalizowania tego podejścia i syntezę 2-MeV przeprowadziłem bezpośrednio z 8-MeG działaniem wodoru sodu i bromoacetonu w DMSO (wydajność 67%). Ponadto reakcję wprowadzenia grupy metylowej przetestowałem na poziomie tricyklicznego analogu 8-BrG tj. 2-bromo-N⁴-dezmetylowozyyny 2-BrV (**10**) stosując warunki reakcji identyczne z zastosowanymi dla otrzymania 8-MeG. 2-BrV otrzymałem z wydajnością 84% (DMSO) lub 78% (DMF) na drodze reakcji N¹-alkilowania - cyklizacji 8-BrG stosując wodorek sodu i bromoaceton.

Okazało się, że pomimo odmiennej struktury a tym samym właściwości elektronowych układu tricyklicznego 2-BrV, pozycja C2 (odpowiednik pozycji C8 guanozyny) podstawiona atomem bromu zachowuje swój elektrofilowy charakter. Ocena TLC przeprowadzonych prób metylowania 2-BrV w C2 wskazywała na całkowite przereagowanie substratu oraz obecność 2-MeV jako głównego produktu. Próba izolacji 2-MeV przez krystalizację nie powiodła się, stąd konieczne było przeprowadzenie rozdzielów chromatograficznych po których wydajność końcowego produktu wynosiła 50%, a więc była nieco niższa od wydajności syntezy 8-MeG. Próby modyfikacji warunków reakcji poprzez podwyższenie temperatury nie prowadziły do poprawienia wydajności. Widma ¹H i ¹³C NMR potwierdziły strukturę 2-MeV. Sygnały dla nowopowstałego pierścienia, a więc H7, 6CH₃, C7, C6 i 6CH₃ przyjmowały następujące wartości przesunięcia chemicznego: 7.34 ppm (dublet), 2.25 ppm (dublet), 103.27 ppm, 126.12 ppm i 10.44 ppm. Obecność grupy metylowej w pozycji C2 została potwierdzona sygnałami przy 2.48 ppm oraz 14.68 ppm. Wydajności obu dróg syntezy 2-MeV liczone względem G były porównywalne. Dla przejścia przez 2-BrV wydajność wynosiła 39%, natomiast dla drugiej drogi 35%. Dodatkową zaletą przejścia przez 2-BrV była potrzeba przeprowadzenia tylko jednego rozdzielu chromatograficznego tj. dla etapu 2-BrV→2-MeV, natomiast w przejściu 8-BrG→8-MeG→2-MeV rozdziały konieczne były dla każdego etapu. Następnie przeprowadziłem 2-MeV w jej triacetylo pochodną, 2-MeVac₃, (**11**) z użyciem bezwodnika octowego w pirydynie z wydajnością 50%. Zablokowanie grup hydroksylowych było konieczne ze względu na wysoką reaktywność czynnika metylującego stosowanego w następnym etapie. Wydajność reakcji acetylowania 2-MeV była znacznie niższa w porównaniu z wydajnością uzyskaną dla V. Obok 2-MeVac₃, obserwowałem powstawanie 2',3'-diacetylo-N⁴-dezmetylowozyyny, 2-MeVac₂ (**12**) jak i N⁵,2',3',5'-tetracetylo-N⁴-dezmetylowozyyny, 2-MeVac₄ (**13**) z wydajnością odpowiednio 7% i 17%. O obecności

wolnej grupy 5'OH w 2-MeVac₂ świadczyło widmo ¹H NMR, na którym zaobserwowałem występowanie sygnału przy 5.28 ppm jako tripletu (5'OH), zwiększenie multiletowości sygnałów H5'/H5'' w porównaniu z analogicznymi sygnałami obserwowanymi dla 2-MeVac₃ oraz różnice w ilości sygnałów grup metylowych pochodzących od grup acetylowych.

Podjąłem także próbę sprawdzenia analogicznej reakcji sprzęgania z AlMe₃ na 2-bromo-2',3',5'-triacetylo-N4-dezmetylwozynie, 2-BrVac₃, (**14**) która powstawała z 2-BrV z wysoką wydajnością 89%. Wydajność reakcji metylowania w C2 była znacznie niższa od przeprowadzonej dla 2-BrV (21% 2-MeVac₃), produktem ubocznym w tym, przejściu był związek 2-MeVac₂ powstający z wydajnością 16%. Oba przedstawione wyżej podejścia wprowadzenia grupy metylowej różnią się wydajnością liczoną względem guanozyny. Przejście 2-BrV→2-MeV→2-MeVac₃ jest bardziej wydajne od przejścia 2-BrV→2-BrVac₃→2-MeVac₃ (**Schemat 3**), ponadto w pierwszym przejściu powstaje dodatkowo związek tetraacetylowany-2-MeVac₄, który można w łagodnych warunkach przeprowadzić w jego triacetylo pochodną-2-MeVac₃.

Przedostatnim a zarazem kluczowym etapem otrzymania pochodnych wozyny było wprowadzenie w pozycję N4 grupy metylowej za pomocą kompleksu diazometanu z ZnJ₂ w eterze dietylowym (odczynnik Simmons-Smitha) znanego i zwykle stosowanego jako reagent cyklopropylujący. Wydajność tej metody w przypadku otrzymania 2',3',5'-triacetylowozyny **4** (Wac₃) wynosiła 43-49%, ubocznym produktem powstającym z małą wydajnością była zasada metylowana w pozycji N1. Natomiast w przypadku 2-metylo-2',3',5'-triacetylowozyny 2-MeWac₃ (**15**) wydajność reakcji ulegała znacznemu spadkowi. Przyczyną tego stanu rzeczy było powstawanie, obok pożądanego związku czyli 2-MeWac₃ ubocznego produktu metylowania na azocie N1 czyli 4,9-dihydro-N1-metylo-2,4,6-trimetylo-9-okso-5H-imidazo[1,2-*a*]puryny **16**. Liczne próby optymalizacyjne warunków reakcji nie pozwoliły mi na uzyskanie znaczącej przewagi pożądanego produktu w mieszaninie, w każdym przypadku obserwowałem obecność zasady. Najlepszą wydajność jaką udało mi się uzyskać dla 2-MeWac₃ wynosiła zaledwie 22%. W ostatnim etapie 2-MeWac₃ poddałem reakcji odblokowania grup hydroksylowych za pomocą roztworu NH₃ w bezwodnym metanolu, otrzymując końcowy produkt – 2-metylowozynę 2-MeW (**17**) z wydajnością 81%. Całkowita wydajność syntezy 2-MeW liczona względem guanozyny wynosi 3%. Jest ona 3 krotnie wyższa od wydajności pierwotnej metody syntezy, ale mnie nie satysfakcjonuje. Uważam, że realne jest uzyskanie wyższej końcowej wydajności 2-MeW poprzez dalszą modyfikację warunków reakcji na poszczególnych etapach syntezy. W szczególności najbardziej obiecująca wydaje się droga prowadząca przez 2-BrV.

3.1.3. Synteza nowych C2 podstawionych pochodnych wyozyzny

W dalszej pracy planowałem otrzymać trzy nowe pochodne wyozyzny podstawione w pozycji C2 grupami o różnorodnych właściwościach elektronowych - metoksy, benzyloksy, fenyl. Otrzymałem 2-metoksy i 2-benzyloksy pochodne wyozyzny oraz wskutek przebiegu niektórych reakcji w nieoczekiwanym kierunku, pochodne 2-metylotio, 2-okso i N1-metylo-2-okso. Podstawnik 2-fenylowy wywoływał objawy nietrwałości już na etapie pochodnych N4-dezmetrylowyozyzny. Zaniechałem więc wysiłków w kierunku uzyskania tak podstawionej wyozyzny na rzecz optymalizacji syntezy 2-metoksy i 2-benzyloksy pochodnych oraz związków nieoczekiwanych. W trakcie badań przetestowałem różne możliwości dróg otrzymania docelowych związków pod kątem wydajności oraz czasochłonności wszystkich operacji.

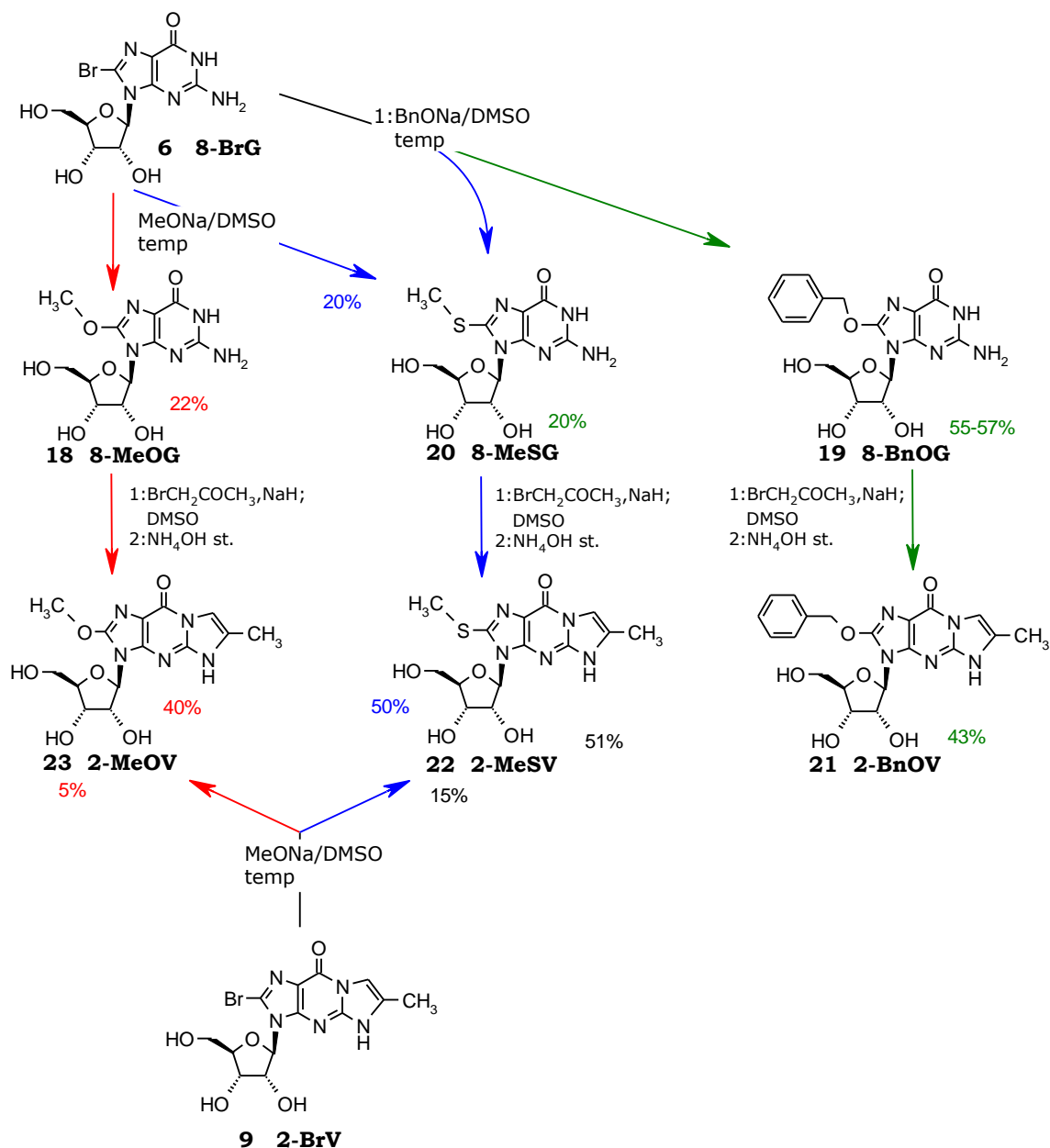
Syntezę 2-metoksy i 2-benzyloksy pochodnych wyozyzny, 2-MeOW i 2-BnOW realizowałem w dwóch zasadniczych etapach: I) synteza 2',3',5'-triacetylo-4-dezmetrylo pochodnych: 2-MeOVac₃ i 2-BnOVac₃. II) przejście z 2-MeOVac₃ i 2-BnOVac₃ do 2-MeOW i 2-BnOW na drodze metylowania w położeniu N-4 a następnie usunięcia grup acetylowych. Jako substrat używałem 8-BrG.

W początkowych próbach, według przepisu literaturowego⁴⁶⁰ roztwór 8-BrG w DMSO dodawałem do roztworu sodu roztworzonego w mieszaninie alkohol metylowy/DMSO lub alkohol benzyloxy/DMSO i ogrzewałem w temperaturze 70°C. W wyniku tych reakcji otrzymałem mieszaniny oczekiwanej 8-metoksyguanozyny, 8-MeOG (**18**) lub 8-benzyloksyguanozyny, 8-BnOG (**19**) z ubocznym produktem. Widma ¹H NMR mieszanin sugerowały, że produkt ten jest w obu przypadkach identyczny. Próby optymalizacji warunków reakcji nie doprowadziły do wymuszenia jej jednokierunkowego przebiegu. (**Schemat 4**)

W przypadku syntezy 8-BnOG domieszka produktu ubocznego pojawiała się w znacznie mniejszej niż produkt główny ilości. Krystalizacja w układzie etanol:woda lub izopropanol:woda pozwoliła mi na uzyskanie czystego chromatograficznie 8-BnOG z wydajnością 55-57%. Produktu dodatkowego nie udało mi się wyodrębnić w stanie czystym, wydajność jego oszacowałem na ok 20%. Strukturę 8-benzyloksyguanozyny potwierdziło widmo ¹H NMR przez sygnały wskazujące obecność pierścienia benzenu (multiplet 7.39-7.50 ppm) i grupy metylenowej (singlet, 5.41 ppm) oraz brak sygnału dla protonu H8. Wstępne przypisanie sygnałów w widmie ¹H NMR mieszaniny wskazywało, że drugi produkt jest pochodną guanozyny także podstawioną w pozycji C8. Singlet przy $\delta=2.57$ ppm oraz wielkość jego integracji (3 protony) sugerowały grupę metylową w C8. Porównanie wartości

δ^H ubocznego produktu z 8-MeG (Tabela 8a) wskazywało na duże podobieństwo widm 1H obu związków. Jednakże różnice położenia sygnałów protonów H2', grup OH oraz Me były na tyle znaczące, aby nasunąć przypuszczenie, że uboczny produkt to 8-metylotioguanozyna 8-MeSG, (20), tworząca się w jakiś sposób dzięki DMSO w którym prowadzona była synteza. W przypadku syntezy 8-MeOG ilość towarzyszącej jej 8-MeSG była szacunkowo (według integracji sygnałów w widmie 1H NMR) bardzo zbliżona. Próby rozdzielenia związków na drodze krystalizacji oraz chromatografii kolumnowej nie powiodły się. Z bardzo niską wydajnością udało się wyodrębnić 8-MeSG stosując chromatografię cienkowarstwową w układzie dioksan:woda 9:1.

Schemat 4. Synteza 2-metoksy, 2-benzylksoy i 2-metylotio-N4-dezmetylowozyzyny.
Pierwsze podejście



3. Badania własne

W porównaniu z odczytanymi przeze mnie, z widm ^1H NMR mieszanin, sygnałami protonów części cukrowej 8-MeOG, 8-BnOG, 8-MeG i 8-MeSG (**Tabela 8a**), odpowiednie przypisania literaturowe⁴⁶⁰ okazały się mało przydatne ze względu na podanie znacznie szerszych zakresów przesunięć chemicznych w/w sygnałów (**Tabela 8b**).

Tabela 8. Przesunięcia chemiczne ^1H NMR części cukrowej 8-MeOG, 8-BnOG, 8-MeG i 8-MeSG
a. Przypisania własne

	H5'/H5''	H4'	H3'	H2'	2'-OH	3'-OH	5'-OH	H1'	8-X
8-MeOG	3.59-3.52 3.48-3.40	3.78	4.03	4.72	5.33	5.02	4.87	5.59	3.96
8-BnOG	3.53-3.45 3.42-3.36	3.76	3.97	4.72	5.34	5.00	4.85	5.62	5.40 7.36-7.49
8-MeG	3.67-3.60 3.56-3.49	3.84	4.06-4.11	4.68	5.33	5.08-5.13		5.66	2.40
8-MeSG	3.67-3.60 3.55-3.48	3.81-3.86	4.06-4.11	4.87	5.40	5.10	4.97	5.64	2.57

b. Dane literaturowe^{459,460}

	H5'/H5''	H4'	H3'	H2', 2'-, 3'-, 5'-OH	H1'	8-X
8-MeOG	3.32-3.68	3.60-4.01	4.01-4.22	4.56-4.89	5.65	3.96
8-BnOG	3.36-3.65	3.66-3.88	3.88-4.04	4.60-4.94	5.64	5.41 7.21-7.53
8-MeG	3.42-3.71	3.87	4.11	4.71, 5.13 (x2), 5.35	5.69	2.42
8-MeSG	3.42-3.70	3.72-3.99	3.99-4.18	4.64-5.50	5.64	2.54

Wyodrębnione 8-podstawione pochodne tj. 8-BnOG i 8-MeSG poddałem następnie działaniu wodoru sodu i bromoacetonu w DMSO otrzymując 2-benzylotio, 2-BnOV (**21**) i 2-metylotio, 2-MeSV (**22**) pochodne N4-dezmetylwozyny z wydajnością odpowiednio 43% i 51%. (**Schemat 4**) W celu uniknięcia strat powodowanych krystalizacją 8-BnOG próby N1-alkilowania-cyklizacji przeprowadziłem na surowej mieszaninie obu związków. Izolacji obu produktów dokonałem na drodze rozdzielania chromatograficznego w fazie $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$, (95:5). Potwierdzenie tricyklicznej struktury przeprowadziłem w oparciu o widma ^1H , ^{13}C NMR obserwując obecność dodatkowych sygnałów dla nowopowstałego pierścienia, a więc H7 i 6CH_3 (odpowiednio 7.38 ppm i 2.26 ppm dla 2-MeSV, 7.35 ppm i 2.26 ppm dla 2-BnOV) oraz sygnałów C6, C7 i 6CH_3 (odpowiednio 126.28 ppm, 103.42 ppm i 10.40 ppm dla 2-MeSV oraz 125.81 ppm, 103.34 ppm i 10.36 ppm dla 2-BnOV). Ponadto sygnały ^1H , ^{13}C NMR potwierdzały obecność w pozycji C2 grup metylotio (2.65 ppm i 14.52 ppm) i benzylotio (CH_2O : 5.49 ppm, 70.65 ppm; C_6H_5 7.38-7.53 ppm, 135.67 ppm, 128.39

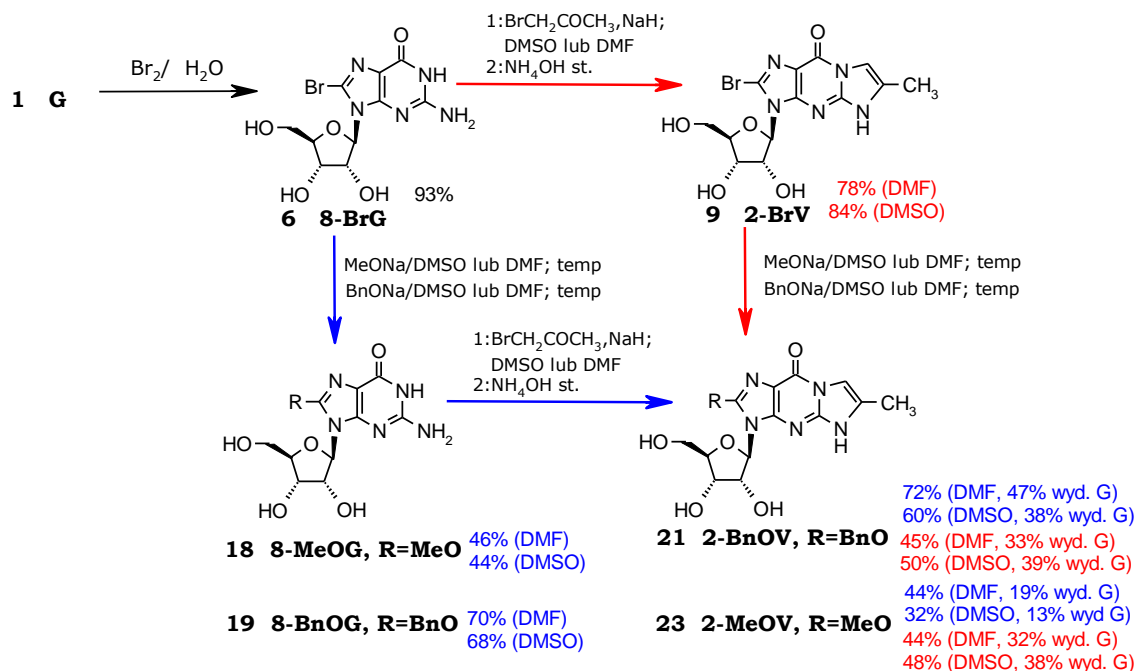
ppm, 128.23 ppm, 128.04 ppm). Widma ^1H , ^{13}C dla 2-MeV i 2-MeSV są bardzo podobne do siebie, jednak obserwowane różnice δ^{H} dotyczące sygnałów H2' (odpowiednio 4.85 i 5.02 ppm), 5'OH (5.02 i 5.15 ppm) i grupy metylowej przy C2 (2.47 i 2.65 ppm) pokazują że są to odmienne struktury. Strukturę 2-MeSV ostatecznie potwierdziło widmo masowe.

Mieszaninę związków 8-MeOG i 8-MeSG poddałem analogicznej reakcji z bromoacetonem otrzymując 2-metoksy-N4-dezmetylowoizynę, 2-MeOV (**23**) oraz 2-MeSV z wydajnością odpowiednio około 40% i 50%. Próba wyodrębnienia czystego 2-MeOV na drodze chromatografii kolumnowej nie powiodła się, otrzymywałem obok czystego 2-MeSV mieszaninę 2-MeOV i 2-MeSV. Podobnie, wynikiem reakcji przeprowadzonej na poziomie 2-BrV, było otrzymanie z niską wydajnością 2-metylotiopochothanej oraz skomplikowanej mieszaniny zawierającej 2-MeSV i 2-MeOV w stosunku 3:1.

W celu wyjaśnienia nieoczekiwane powstawania 8-MeSG przeszukałem dane literaturowe na temat wprowadzania grupy metylio w zbliżonych do wyżej opisanych warunkach. Nie znalazłem odnotowania przypadku w którym DMSO służył jako donor grupy metylio. Literaturowa metoda syntezy 8-MeSG obejmuje dwa etapy, w pierwszym syntezę 8-merkaptoguanozyny poprzez reakcję 8-BrG z tiomocznikiem w bezwodnym etanolu; w następnym reakcję 8-merkaptoguanozyny z siarczanem dimetylu lub jodku metylo w obecności K_2CO_3 lub NaOH do 8-metylotioguanozyny.⁴⁶⁰⁻⁴⁶² Alternatywny sposób wprowadzenia grupy metylio w pozycję 8 nukleozydów purynowych polega na reakcji odpowiednich 8-bromo pochodnych z solą sodową merkaptanu metylowego.⁴⁶³⁻⁴⁶⁵

Przeanalizowanie preparatyki 8-BnOG w wcześniejszej pracy⁴⁶⁶ wskazało na przyczynę powstawania drugiego związku. W pracy tej autorzy wyraźnie określają kolejność dodawania poszczególnych odczynników tj. roztworu 8-BrG w DMSO do soli sodowej alkoholu benzylowego. Nieprecyzyjny opis preparatyki w pracy⁴⁶⁰ sprawił iż w początkowych próbach otrzymania 8-MeOG i 8-BnOG reakcję roztwarzania sodu w alkoholu przeprowadzałem w obecności DMSO, co prowadziło do powstawania 8-MeSG.

Można przypuścić, że kluczowym warunkiem nieoczekiwane powstawania 8-MeSG jest etap generowania soli sodowej alkoholu w obecności DMSO. W celu potwierdzenia tego przypuszczenia, reakcję roztwarzania sodu w alkoholu metylowym lub benzylowym przeprowadziłem bez udziału DMSO, a następnie, po przereagowaniu sodu, dodawałem roztwór 8-BrG w DMSO lub DMF. W obu przypadkach otrzymałem po krystalizacji z wody lub etanolu czyste produkty tj. 8-MeOG oraz 8-BnOG z wydajnością odpowiednio 44% i 68%. (**Schemat 5**) Wpływ zmiany rozpuszczalnika z DMSO na DMF okazał się nie mieć istotnego znaczenia na poprawę wydajności reakcji, stwierdziłem jedynie jej 2% wzrost.

Schemat 5. Optymalizacja syntezy 2-metoksy- i 2-benzylksoy-N4-dezmetylowozyyny

Obecność podstawnika metoksy i benzylksoy w C8 została potwierdzona sygnałami na widmach ^1H : obecność singletu przy 3.96 ppm (grupa metoksy); multipletu przy 7.21-7.53 ppm (pierścień benzenu), singletu przy 5.41 ppm (grupa metylenowa) oraz brak sygnału dla protonu H8 w obu przypadkach.

Na podstawie powyższych obserwacji założyłem następujący mechanizm: podczas generowania soli sodowej alkoholu w obecności DMSO wydzielający się wodór *in statu nascendi* redukuje DMSO do sulfidu metylowego, który w środowisku zasadowym ulega przekształceniu do soli sodowej merkaptanu metylowego a następnie wchodzi w reakcję z 8-BrG.

Powyższe wyniki eksperymentów skłoniły mnie do przeprowadzenia szeregu prób optymalizacyjnych w celu sprawdzenia możliwości syntezy 8-MeSG nową drogą. Temperatura wrzenia sulfidu metylowego wynosi 37.3°C , stąd uzasadnione wydawało się obniżenie temperatury reakcji. Przy zastosowaniu identycznych z literaturą nadmiarów odczynników przy jednoczesnym obniżeniu temperatury reakcji do 20°C nie obserwowałem powstawania żadnego produktu. Podwyższenie temperatury do zakresu $40\text{-}45^\circ\text{C}$ powodowało powstawanie 8-MeSG obok nieprzereagowanej 8-BrG, natomiast zwiększenie nadmiaru sodu powodowało pojawienie się 8-MeOG obok 8-MeSG. W świetle powyższych wyników proponowany mechanizm wydaje się być prawdopodobny, jednak potwierdzenie jego słuszności wymaga przeprowadzenia dalszych eksperymentów. Z punktu widzenia preparatywnego, metoda ta okazała się mało efektywna oraz uciążliwa, ze względu na trudność wyizolowania produktów reakcji. Próby krystalizacji z alkoholi lub wody nie

przyniosły pożądaných rezultatów, za każdym razem otrzymywałem bezpostaciowe osady z tendencją do tworzenia się żeli. Podobne rezultaty dała próba izolacji drogą rozdziału chromatograficznego, niemożność rozdzielenia 8-MeSG od 8-MeOG w fazie CH₂Cl₂-EtOH przy bardzo dużym zużyciu fazy oraz brak możliwości rozróżnienia 8-MeSG od 8-BrG w różnorodnych fazach. Wobec powyższych trudności zrezygnowałem z dalszych prób optymalizacji tej reakcji.

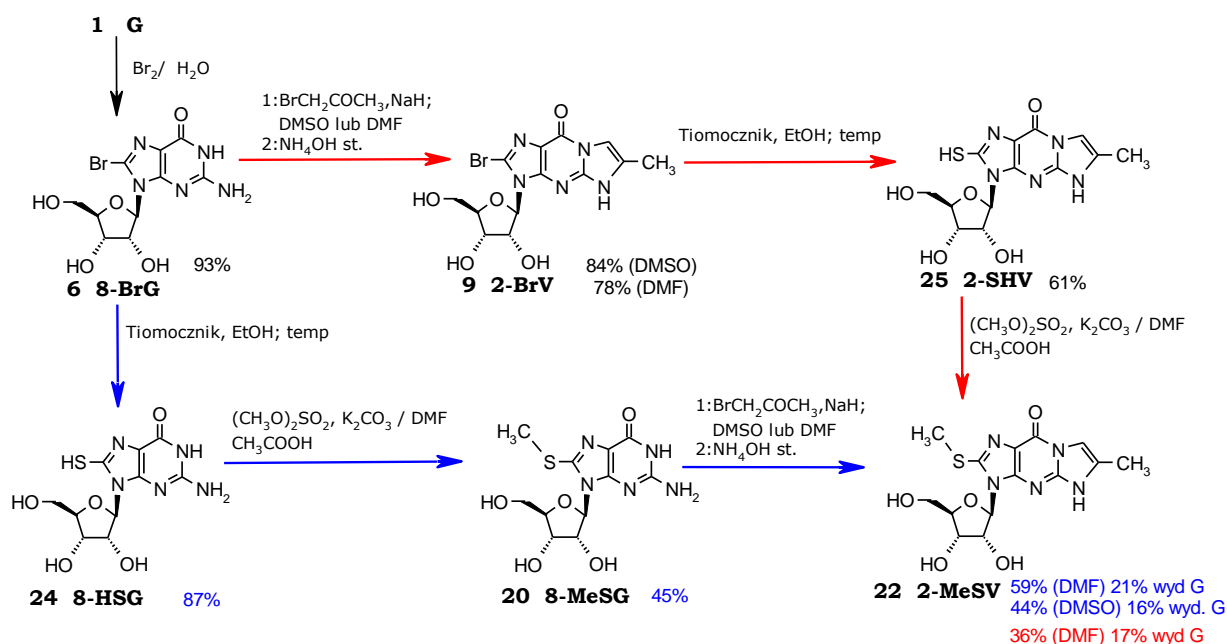
W dalszej kolejności 8-MeOG i 8-BnOG poddawałem działaniu wodoru sodu i bromoacetonu w DMSO lub DMF otrzymując 2-MeOV i 2-BnOV (**Schemat 5**). Wydajność wyżej wymienionych związków okazała się być wyraźnie wyższa gdy jako rozpuszczalnik zastosowałem DMF (odpowiednio 44% i 72%) w porównaniu z DMSO (32% i 60%). Związki 2-MeOV i 2-BnOV otrzymałem również alternatywną drogą, działając solą sodową alkoholu metylowego lub benzyłowego na 2-BrV w DMSO lub DMF. W przypadku 2-BnOV, wydajność liczona względem G była wyższa dla przejścia przez 8-BnOG (38-47%) aniżeli przez 2-BrV (33-39%). Natomiast synteza 2-MeOV przebiegała wydajniej przez 2-BrV (32-38%). Potwierdzenie tricyklicznej struktury przeprowadziłem w oparciu o widma ¹H, ¹³C NMR obserwując obecność dodatkowych sygnałów dla nowopowstałego pierścienia, a więc H7 i 6CH₃ (odpowiednio 7.34 ppm i 2.25 ppm dla 2-MeOV, 7.35 ppm i 2.26 ppm dla 2-BnOV) oraz sygnałów C6, C7 i 6C_H3 (odpowiednio 126.14 ppm, 103.60 ppm i 10.55 ppm dla 2-MeOV oraz 125.81 ppm, 103.34 ppm i 10.36 ppm dla 2-BnOV).

Nieoczekiwane tworzenie się 8-MeSG jako produktu ubocznego syntezy 8-MeOG i 8-BnOG skłoniło mnie do poszerzenia planowanej początkowo serii 2-podstawionych pochodnych wyożyny o 2-MeSW. Wykorzystałem literaturową metodę wprowadzenia tej grupy startując z 8-BrG.⁴⁶⁰⁻⁴⁶² Analogicznie do wyżej przeprowadzonych syntez 2-MeOV i 2-BnOV, związek pośredni tj. 2-metylotio-N4-dezmetylowyożynę, 2-MeSV (**22**) otrzymałem dwoma drogami. (**Schemat 6**) W pierwszym podejściu, 8-BrG poddałem działaniu tiomocznika w EtOH otrzymując 8-merkaptoguanozynę, 8-HSG (**24**) z wydajnością 87%. Następnie 8-HSG przekształciłem w 8-MeSG z wydajnością 45% stosując jako odczynnik metylujący siarczan dimetylu w obecności węgla potasu w DMF. Oba produkty - 8-HSG i 8-MeSG oczyściłem przez krystalizację z wody. 8-MeSG poddałem działaniu bromoacetonu i wodoru sodu w DMSO lub DMF uzyskując 2-MeSV, którą oczyściłem na drodze rozdziału chromatograficznego. Wydajność tej reakcji była zależna od rozpuszczalnika, wyższa w DMF (59%), niż w DMSO (44%).

Druga droga syntezy 2-MeSV polegała na wprowadzeniu grupy metylotio na poziomie układu tricyklicznego tj 2-BrV (**Schemat 6**). Jako produkt pośredni w tym przejściu wyodrębniłem przez krystalizację z wody 2-merkaptio-N4-dezmetylowyożynę, 2-HSV (**25**) z

wydajnością 61%. Przekształciłem ją następnie w 2-MeSV z wydajnością 36% po oczyszczeniu przez krystalizację z etanolu. Porównując obie drogi syntezy 2-MeSV, nie stwierdziłem znaczących różnic w wydajnościach liczonych względem guanozyny (odpowiednio 21% i 17%). Z punktu widzenia preparatywnego droga druga jest mniej uciążliwa ze względu na brak konieczności przeprowadzenia czasochłonnego rozdzielania chromatograficznego.

Schemat 6. Optymalizacja syntezy 2-metylotio-N4-dezmetylowozyzyny

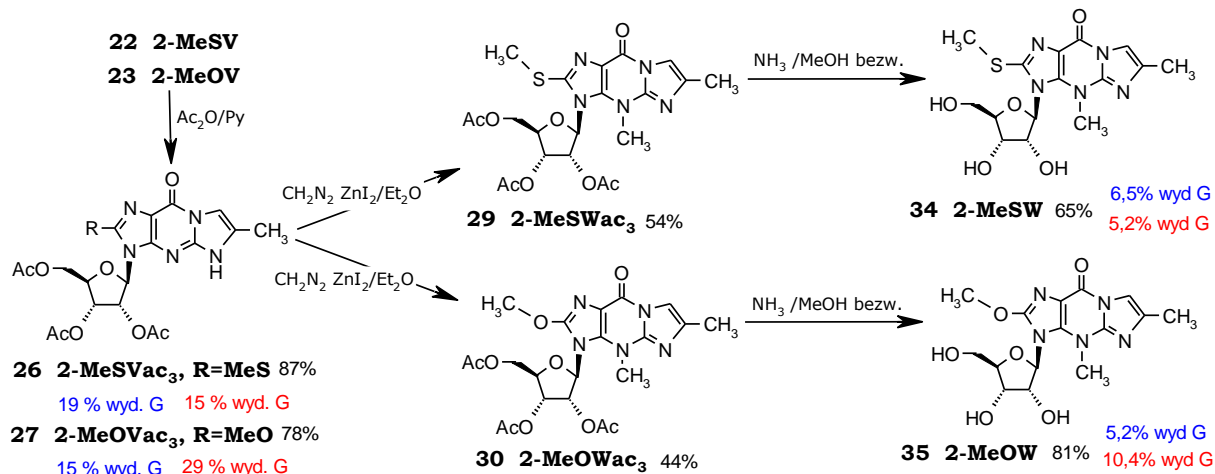


Podczas kolejnego etapu syntezy, który obejmował przeprowadzenie otrzymanych C2 pochodnych N4-dezmetylowozyzyny w triacetylowe pochodne za pomocą bezwodnika octowego w pirydynie, nie obserwowałem powstawania dodatkowych produktów. Wydajność tych reakcji była znacznie wyższa niż dla 2-MeVac₃ i wynosiła dla 2-MeSVac₃ (**26**) - 87%, 2-MeOVac₃ (**27**) 78% i 2-BnOVac₃ (**28**) 82% (**Schemat 7 i 8**).

W dalszej kolejności związki 2-MeOVac₃, 2-MeSVac₃ i 2-BnOVac₃ poddałem reakcji z kompleksem diazometanu z jodkiem cynku w eterze w celu wprowadzenia grupy metylowej w N4. Powyższa reakcja zachodziła najlepiej na metylootio pochodnej Vac₃. 2-MeSWac₃ (**29**) powstawała z dobrą wydajnością (54%) wyższą od wydajności dla Vac₃. Substrat nie ulegał całkowitemu przereagowaniu. Wydłużanie czasu reakcji zwiększało wydajność, jednakże obok 2-MeSWac₃ stwierdzałem powstawanie niewielkiej ilości zasady. Z kolei 2-MeOWac₃ (**30**) powstawała z nieco niższą wydajnością (44%). Obok niej obserwowałem powstawanie niewielkich ilości 2-metoksyweiny metylowanej w pozycji N1 jak i pochodnej 2-MeOVac₃ metylowanej w N5. (**Schemat 7**) Obecność grupy metylowej w N4 dla 2-MeSWac₃ i 2-MeOWac₃ potwierdziłem widmami ¹H i ¹³C, wartości δ^H i δ^C są następujące 4.04 i 35.79 ppm (2-MeSWac₃) oraz 4.11 i 34.55 ppm (2-MeOWac₃). Ponadto potwierdziłem położenie grupy

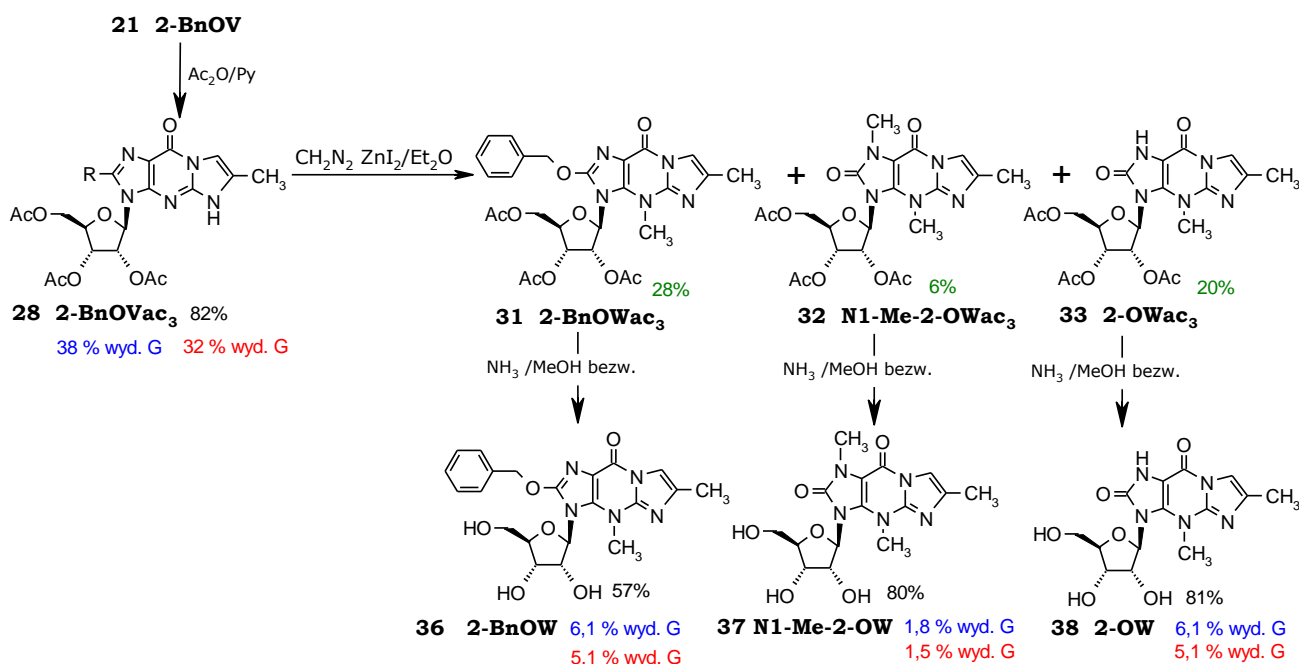
metylowej w pozycji N4 dla 2-MeSWac₃ uzyskałem na drodze eksperymentu ¹³C, ¹H HMQC. Strukturę 2-MeSWac₃ potwierdziłem widmem masowym. Bardziej szczegółowe omówienie wyników eksperymentów NMR dla pochodnych wyożyny zamieściłem w rozdziale 3.2.1.2.

Schemat 7. Synteza 2-metoksy- i 2-metylotiowyożyny



Przebieg reakcji metylowania 2-BnOVac₃ w pozycji N4 okazał się najbardziej skomplikowany. Obok głównego produktu tj. 2-benzylotio-2',3',5'-triacetylowyożyny, 2-BnOVac₃ (**31**, 28%) powstawała N1-metylo-2-okso-2',3',5'-triacetylowyożyna N1-Me-2-OWac₃ (**32**, 6%) oraz 2-okso-2',3',5'-triacetylowyożyna, 2-OWac₃ (**33**, 20%, **Schemat 8**) Próby optymalizacji warunków reakcji nie prowadziły do jednokierunkowego przebiegu reakcji. Wydłużenie czasu reakcji powodowała wzrost udziału N1-Me-2-OWac₃ w mieszaninie nawet do 100%. Zasadniczą trudnością było rozdzielanie pochodnej 2-BnOVac₃ od N1-Me-2-OWac₃ ze względu na identyczną ruchliwość chromatograficzną. Próby użycia różnych faz do rozdzielania (CHCl₃/CH₂Cl₂:MeOH/EtOH/IpOH, Tol:MeOH/EtOH) nie

Schemat 8. Synteza 2-benzylotio-, 2-okso- i N1-metylo-2-oksowyożyny



przyniosły pożądaných rezultatów w postaci rozdzielenia obu związków. Dopiero zastosowanie fazy toluen:aceton (4:1→3:1) pozwoliło na rozdzielenie 2-BnOWac₃ od N1-Me-2-OWac₃. Obserwacja ta prowadzi do wniosku, iż pochodna N1-metylo-2-okso powstaje wskutek ubocznej reakcji 2-BnOWac₃ z kompleksem CH₂N₂/ZnJ₂. Związek 2-OWac₃ jest prawdopodobnie produktem pośrednim wyżej wymienionego przejścia. Widma ¹H NMR mieszanin wykazywały obecność obu pochodnych, których stosunek ilościowy wyliczony na podstawie stosunku intensywności sygnałów w najlepszym eksperymencie wynosił 4:1 dla 2-BnOWac₃. Widmo czystego 2-BnOWac₃ pokrywało się z przypisaniami sygnałów dla mieszaniny. Lokalizację grupy metylowej w N4 dla 2-BnOWac₃, N1-Me-2-OWac₃ i 2-OWac₃ ustaliłem na podstawie widm ¹H i ¹³C NMR oraz eksperymentów ¹³C,¹H HMQC. Wartości δ^H i δ^C dla otrzymanych pochodnych są następujące: 4.08 i 34.79 ppm (2-BnOWac₃), 4.10 i 34.97 ppm (N1-Me-2-OWac₃) oraz 4.12 i 35.10 ppm (2-OWac₃). Ponadto potwierdzenie pozycji grupy metylowej na N1 w 1N-Me-2-OWac₃ uzyskałem na drodze eksperymentów ¹³C,¹H HMQC, protony tej grupy wykazywały sprzężenie dalekiego zasięgu z atomami węgla C2 i C9a.

Usunięcie grup acetylowych w w/w otrzymanych C2 podstawionych pochodnych Wac₃ przeprowadziłem za pomocą roztworu NH₃ w bezwodnym metanolu otrzymując 2-metylotiowyozynę, 2-MeSW (**34**), 2-metoksywozynę, 2-MeOW (**35**), 2-benzyloksywozynę, 2-BnOW (**36**), N1-metylo-2-oksowyozynę, N1-Me-2-OW (**37**), 2-oksowyozynę, 2-OW (**38**) z wydajnością odpowiednio 65%, 78%, 57%, 80% i 81%. (**Schemat 7 i 8**). Najwięcej trudności sprawiło otrzymanie czystej 2-BnOW, wskutek wysokiej labilności wiązania glikozydowego. Stwierdziłem, że przedłużanie reakcji odblokowania ponad 2.5 godziny prowadziło do powstawania zasady jako kolejnego produktu, przy jednoczesnym braku substratu. Całkowita wydajność syntezy 2-MeSW, 2-MeOW, 2-BnOW, N1-Me-2-OW i 2-OW względem **G 1** wynosiła odpowiednio 6.5%, 10.4%, 6.1%, 1.8% i 6.1%.