

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Smirnova Katia

2-(Fosfonomethoxy)ethyl deriváty 3-hydroxypyrazin-2-karboxamidu

2-(Phosphonomethoxy)ethyl derivatives of 3-hydroxypyrazine-2-carboxamide

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Jindřich Jindřich, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

V Praze, 22.08.2021

Podpis

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá přípravou acyklických nukleosidfosfonátů odvozených od heterocyklické báze T-1105 (3-hydroxypyrazin-2-karboxamid). Tato báze je stabilnějším analogem T-705 (6-fluor-3-hydroxypyrazin-2-karboxamid, taktéž favipiravir). Obě látky vykazují antivirální aktivitu proti řadě RNA virů. Předpokládá se, že cílové sloučeniny jsou také biologicky aktivní, což bude dále zkoumáno na spolupracujícím pracovišti v Belgii.

Byly navrženy postupy pro přípravu 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivátu T-1105, a jeho proléčiva s pivaloyloxymethyl skupinami pro zvýšení biologické dostupnosti látky.

Klíčová slova: acyklické nukleosidfosfonáty, syntéza, T-1105, 3-hydroxypyrazin-2-karboxamid, antivirální aktivita, SARS-CoV-2, favipiravir

Abstract

The bachelor thesis deals with the preparation of acyclic nucleoside phosphonates derived from the heterocyclic base T-1105 (3-hydroxypyrazine-2-carboxamide). This base is a more stable analogue of T-705 (6-fluoro-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide, also favipiravir). Both substances show antiviral activity against a number of RNA viruses. The target compounds are also thought to be biologically active, which will be further investigated at a collaborating site in Belgium.

Procedures have been proposed for the preparation of 2- (phosphonomethoxy)ethyl derivative T-1105, and its prodrug with pivaloyloxymethyl groups to increase the bioavailability of the substance.

Key words: acyclic nucleoside phosphonates, synthesis, T-1105, 3-hydroxypyrazine-2-carboxamide, antiviral activity, SARS-CoV-2, favipiravir

Obsah

Abstrakt	3
Abstract	4
Použité zkratky	7
1. Úvod	10
2. Cíle práce	11
3. Přehled problematiky	12
3.1. SARS-CoV-2	12
3.1.1. Struktura a životní cyklus SARS-CoV-2	13
3.1.2. Antivirotika.....	15
3.1.2.1. Inhibitory virových proteáz	16
3.1.2.2. Inhibitory virového vstupu	16
3.1.2.3. Inhibitory funkce RNA-dependentní RNA polymerázy.....	17
3.2. Dusíkaté báze T-705 a T-1105.....	18
3.2.1. Buněčná aktivace dusíkatých báze T-705 a T-1105	18
3.3. Acyklické nukleosidfosfonáty.....	19
3.3.1. Syntéza ANP	21
4. Výsledky a diskuse	23
4.1. Koncept syntézy.....	23
4.2. 2-(Chloromethoxy)ethyl acetát	24
4.3. Fosfonát s hydroxylovou skupinou	25
4.4. Fosfonát s tosylátovou skupinou	26
4.5. Fosfonát s triflátovou skupinou	26
4.6. Alkylace T-1105.....	27
4.7. Hydrolýza diethylfosfonátu	29
5. Experimentální část	30
5.1. Obecné postupy a chemikálie.....	30
5.2. Pracovní postupy	31
5.2.1. 2-(Chloromethoxy)ethyl acetát (3)	31
5.2.2. 2-[(Diethoxyfosforyl)methoxy]ethyl acetát (4).....	32
5.2.3. Diethyl [(2-hydroxyethoxy)methyl]fosfonát (5).....	33
5.2.4. 2-[(Diethoxyfosforyl)methoxy]ethyl 4-methylbenzenesulfonát (6)	33
5.2.5. 2-[(Diethoxyfosforyl)methoxy]ethyl trifluormethansulfonát (7).....	34

5.2.6. Diethyl {[2-(3-karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl} fosfonát (8).....	34
5.2.7. {[2-(3-Karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl}fosfonová kyselina (9)	35
6. Závěr	36
7. Poděkování	37
8. Literatura	38

Použité zkratky

(+)ssRNA	jednovláknová RNA pozitivního smyslu
3CLpro	3C-like proteáza
Ac	acetyl
ACE2	angiotenzin-konvertující enzym 2 (angiotensin-converting enzyme 2)
ANP	acyklický nukleosidfosfonát (acyclic nucleoside phosphonate)
COSY	korelační spektroskopie (correlation spectroscopy)
COVID-19	koronavirové onemocnění 2019 (coronavirus disease 2019)
DBU	1,8-diazabicyklo-[5,4,0]undec-7-en
DCM	dichlormethan
DEPT	nezkreslené vylepšení přenosem polarizace (distortionless enhancement by polarisation transfer)
DHPA	9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
ER	endoplazmatické retikulum
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
Et	ethyl
FPMP	3-fluor-2-(fosfonomethoxy)propyl
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (human immunodeficiency virus)
HMBC	heteronukleární ^1H - ^{13}C korelace přes více chemických vazeb (heteronuclear multiple-bond correlation)
HPMPA	9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin
HPMPC	1-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosin
HSQC	heteronukleární ^1H - ^{13}C korelace přes jednu chemickou vazbu (heteronuclear single quantum correlation)

iPr	isopropyl
Me	methyl
MERS	blízkovýchodní respirační syndrom (Middle East respiratory syndrome)
MERS-CoV	blízkovýchodní respirační syndrom způsobený koronavirem (Middle East respiratory syndrome-related coronavirus)
Mg(<i>Ot</i> -Bu) ₂	<i>terc</i> -butanolát hořečnatý
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MW	mikrovlny (microwaves)
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
Piv	pivaloyl
PME	2-(fosfonomethoxy)ethyl
PMEA	9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]adenin
PMP	2-(fosfonomethoxy)propyl
PMPA	9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin
Pr	propyl
RdRp	RNA-dependentní RNA polymeráza (RNA-dependent RNA polymerase)
RMP	ribofuranosyl-5'-monofosfát
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
r.t.	laboratorní teplota (room temperature)
RVO	rotační vakuová odparka
SARS	těžký akutní respirační syndrom (severe acute respiratory syndrome)
SARS-CoV	těžký akutní respirační syndrom způsobený koronavirem (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus)
SARS-CoV-2	těžký akutní respirační syndrom způsobený koronavirem-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus-2)
Tf	triflyl (trifluormethylsulfonyl)
THF	tetrahydrofuran

TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)
Ts	tosyl (<i>p</i> -toluensulfonyl)
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie
UV	ultrafialové záření (ultraviolet)

1. Úvod

Zoonotický přenos opakovaně zaváděl a zavádí do lidské populace RNA viry. V historii je známo nemálo příkladů, kdy tyto viry byly poměrně efektivně přenášeny mezi lidmi a způsobily velká ohniska onemocnění, jako pandemie chřipky v roce 1918 nebo v poslední době vypuknutí Eboly a COVID-19 (koronavirové onemocnění 2019). Nebezpečí těchto a možných nových virových onemocnění silně zdůrazňuje naléhavou potřebu antivirových léčiv. Zejména v současné době intenzivně probíhá výzkum nového koronaviru SARS-CoV-2 (těžký akutní respirační syndrom způsobený koronavirem-2) s cílem najít léky, které by mohly být proti tomuto viru účinné. Jedním z léků, kterému se v poslední době dostává velké pozornosti je antivirovum původně vyvinuté k léčbě chřipky zvané favipiravir (T-705). De-fluor analog favipiraviru – T-1105 také prokázal svoji antivirovou aktivitu, je pro design léčiv slibnější díky větší chemické stabilitě a menší ekonomické náročnosti.

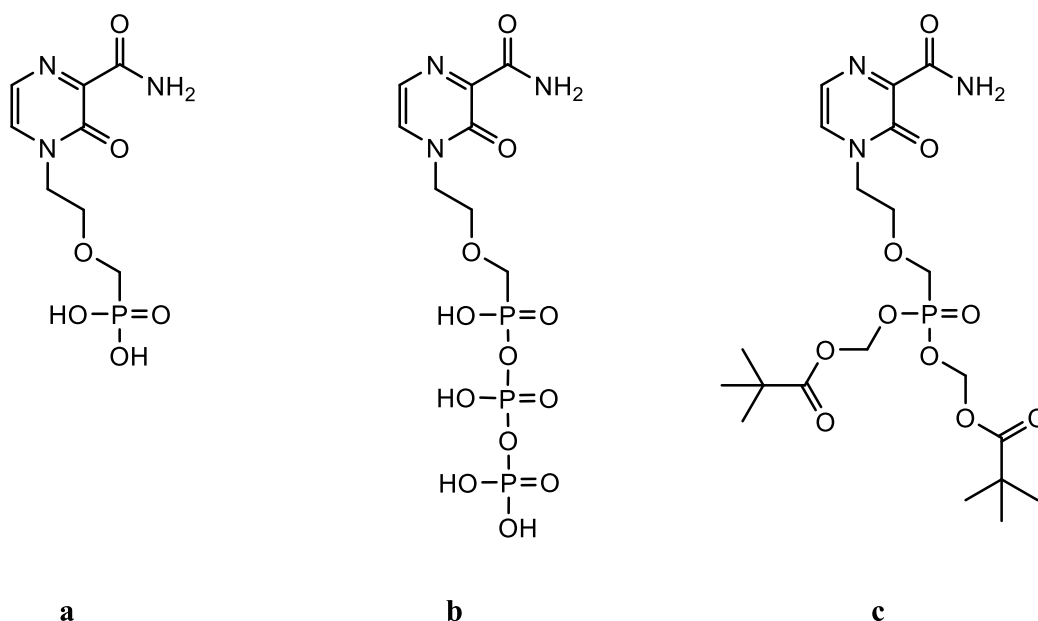
T-1105 a T-705 jsou látky mimikující přirozené nukleobáze. V intracelulárním prostředí se přemění fosforibosylací a dvojnásobnou fosforylací na ribofuranosyl-5'-trifosfát, který je aktivním metabolitem zastavujícím replikaci viru. Ovšem, kvůli vysoké specifitě buněčného enzymu hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza, proces fosforibosylace často neprobíhá efektivně¹. Dalším faktorem snižujícím biologickou dostupnost je enzymatická nestabilita fosfátové skupiny². Řešení daných problémů pravděpodobně leží v konceptu acyklických nukleosidfosfonátů (ANP). Jde o analogy nukleotidů s nahrazenou cukernou částí acyklickým řetězcem. Fosfátová skupina je nahrazena enzymaticky stabilní fosfonomethoxy skupinou. Tímto způsobem modifikované nukleotidy, objevené Antonínem Holým (ÚOCHB, Praha, Česká republika) a Erikem De Clercqem (Rega Institute for Medical Research, K.U. Leuven, Belgie), působí účinněji a déle^{3,4}. Do ANP patří celá řada sloučenin s antivirální aktivitou, z nichž některé jsou již dlouho úspěšně používány jako léčiva proti velké řadě virů. Předpokládá se, že acyklické nukleosidfosfonáty s dusíkatou bází T-1105 by také mohly mít významný farmaceutický potenciál.

2. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat syntézu nových nukleosidfosfonátů s dusíkatou bází T-1105 (3-hydroxypyrazin-2-karboxamid) a odpovídajícího proléčiva. Díky tomu, že samotná báze T-1105 je virostatikem, očekává se, že její deriváty také budou biologicky aktivní. Testování připravených látek na antivirální aktivitu bude pak provádět spolupracující virologická laboratoř v Belgii.

Byly zvoleny následující deriváty báze T-1105 (Obr. 1):

- 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivát
- difosfát 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivátu
- proléčivo s pivaloyloxymethyl skupinami odvozené od 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivátu



Obr. 1. Cílové sloučeniny

3. Přehled problematiky

Léčba nově vzniklého virového onemocnění COVID-19, vyvolaného betakoronavirem SARS-CoV-2, je v současnosti aktuálním tématem otevřené diskuse. Naléhavá potřeba specifického a účinného léčiva se stala příčinou výzkumů po celém světě. Bylo hlášeno několik již známých antivirotik, která vykazují antivirovou aktivitu proti SARS-CoV-2 in vitro. Mezi ně patří i favipiravir (T-705). Díky chemické příbuznosti jeho de-fluor analogu lze předpokládat, že T-1105 je také účinnou látkou proti SARS-CoV-2.

3.1. SARS-CoV-2

Za posledních 19 let se v lidské populaci postupně objevily až tři nové vysoce patogenní viry z rodu *β-coronavirus*, čeledi *Coronaviridae*. Poprvé v roce 2002 byl v čínském městě Fo-šan registrován nulový pacient infikovaný betakoronavirem SARS-CoV (těžký akutní respirační syndrom způsobený koronavirem)⁵. Do července roku 2003 se nová infekce zvaná SARS (těžký akutní respirační syndrom) objevila u více než 8 000 lidí ve 27 zemích⁶. Mezi hlavní příznaky onemocnění patřila horečka, bolesti hlavy, třes a průjem. Naštěstí, šíření infekce skončilo rychle. Mezi prosincem 2003 a lednem 2004 došlo jen k několika případům nákazy⁷. Nicméně, 10 let po vypuknutí infekce způsobené SARS-CoV byl v Saúdské Arábii diagnostikován první případ nakažení druhým betakoronavirem MERS-CoV (blízkovýchodní respirační syndrom způsobený koronavirem) s téměř stejnými symptomy⁸. Od roku 2012 do března 2021 bylo zaznamenáno 2574 případů nákazy MERS (blízkovýchodní respirační syndrom)⁹. Na rozdíl od SARS, MERS způsobuje větší smrtnost, ale šíří se mnohem pomaleji. Díky přijatým opatřením proti šíření infekcí a nízké nakažlivosti, SARS-CoV a MERS-CoV neměly tak velký dopad na svět jako třetí betakoronavir - SARS-CoV-2 .

O viru SARS-CoV-2 se poprvé svět dozvěděl na konci roku 2019. V prosinci několik čínských lékařských institucí hlásilo pacienty s pneumonií neznámé příčiny. Po vyšetření pacientů speciálním týmem rychlé reakce byl identifikován nový koronavirus SARS-CoV-2. Trh s mořskými plody v čínském městě Wu-chan byl považován za výchozí místo infekce přenesené z neznámého zvířete¹⁰. Během krátké doby se nové onemocnění, později nazývané COVID-19, rozšířilo z Číny do dalších zemí. Už v březnu 2020 roku byla nákaza COVID-19 označena Světovou zdravotnickou organizací za pandemii.

Virus, který dosahuje velikosti v průměru pouze 100 nanometrů¹¹, měl globální dopad na svět a nadále nepřestává způsobovat obrovskou zátěž nejen pro zdraví jednotlivce, ale i pro veřejné zdraví. Bylo zaznamenáno více než 198 milionů případů onemocnění a 4,2 milionů úmrtí¹².

Podobně jako již známý koronavirus SARS-CoV, který způsobil těžký akutní respirační syndrom tisícům lidí, fylogeneticky podobný SARS-CoV-2 může také být přenášen z netopýrů a způsobuje shodné symptomy prostřednictvím shodného mechanismu. COVID-19 má však nižší závažnost a smrtnost než SARS, ale je mnohem nakažlivější, postihuje více starších jedinců než mládež a více mužů než žen¹³.

V závislosti na věku a imunitním systému člověka infekce SARS-CoV-2 způsobí širokou škálu příznaků od mírných symptomů až po život ohrožující (respirační selhání, septický šok, mnohočetná dysfunkce orgánů).

Virus SARS-CoV-2, stejně jako většina koronaviřů, se může šířit jak orální, tak i fekálně-orální cestou¹⁴. Po vstupu do těla virus způsobuje virémii. Jako nejčastější a počáteční klinický projev vystupuje horečka, která může být doprovázena i dalšími symptomy, jako je ztráta čichu, kašel, únava, ztrátu chuti a méně častými příznaky jako jsou bolesti svalů a hlavy, dušnost, zvracení, průjem^{15,16}. Tento proces zahrnuje inkubační fázi a časnou fázi onemocnění. Inkubace trvá 1–14 dní (běžně 3–7 dní). Ve fázi inkubace nejsou leukocyty a lymfocyty v periferní krvi významně sníženy. Viry se pak šíří krevním řečištěm hlavně do plic, gastrointestinálního traktu a srdce, tedy se soustřeďují na tkáň mající angiotenzin-konvertující enzym 2 (ACE2), receptor SARS-CoV-2. K této fázi dochází přibližně 7-14 dní po nástupu příznaků onemocnění. V této době se plicní léze zhoršují a významně se snižují lymfocyty periferní krve, a to jak T, tak i B lymfocyty¹⁷.

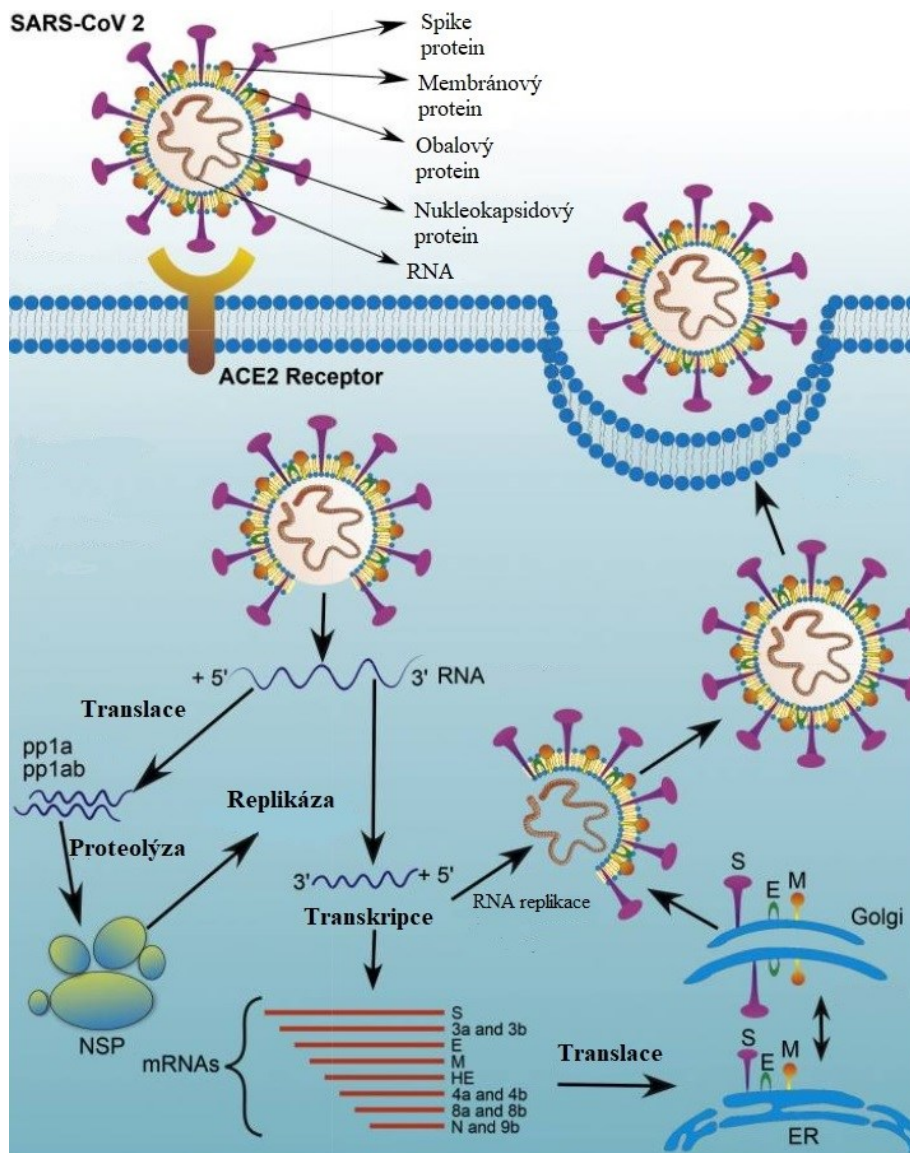
3.1.1. Struktura a životní cyklus SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 patří mezi obalované (+)ssRNA (jednovláknová RNA pozitivního smyslu) viry. Virová částice SARS-CoV-2 (Obr. 2) se skládá z genomové RNA a ze 4 typů proteinů: spike protein, membránový protein, obalový protein a nukleokapsidový protein. Virová RNA je dobře chráněna před přirozenou buněčnou imunitou specifickým uspořádáním na svém 5' konci. Tohle uspořádání připomíná nativní mRNA buněk, což chrání virovou RNA před rozložením buněčnými enzymy a současně zaručí efektivní zahájení translace^{18,19}.

Spike protein tvoří na povrchu virionu strukturu podobnou koruně, charakteristický rys koronaviru zodpovědný za jeho název. Spike protein se skládá ze dvou podjednotek, S1 a S2, zajišťující vazbu virionu na ACE2 receptory, které jsou přítomny v lidských buňkách hlavně v

plicích, srdci a střevech. Afinita vazby SARS-CoV-2 a ACE2 je přibližně 10krát větší než u SARS-CoV, což objasňuje účinnější šíření SARS-CoV-2²⁰.

Na receptor ACE2 se váže podjednotka spike proteinu S1, zatímco podjednotka S2 usnadňuje splynutí mezi hostitelskou buňkou a membránou virionu, načež virová RNA spolu s nukleokapsidem může vstoupit do cytoplasmy hostitelské buňky buď endocytózou nebo přímo přes membránu. Jakmile je virion uvnitř buněčné cytoplazmy, uvolňuje RNA. Překladem dvouřetěnové části této RNA do sekvence aminokyselin vzniknou dva polypeptidy (pp1 a pp1ab), jejichž štěpení virovou proteázou poskytne 16 nestrukturních proteinů. Funkce těchto nestrukturních proteinů spočívá v sestavení proteinového komplexu tzv. replikázy, která je následně zapojena do procesu replikace a transkripce. Po syntéze virové replikázy už může zbývající jedna třetina genomu SARS-CoV-2 být přepsaná do antisense RNA (3' až 5'). Tato antisense RNA další replikací zpět poskytne pozitivní vlákno. Ze stejné antisense RNA prostřednictvím transkripce vzniknou malé subgenomické mediátorové RNA (mRNA), které dále translací budou převedené do 4 strukturních proteinů: spike protein, membránový protein, obalový protein a nukleokapsidový protein. Pozitivní vlákno vytvoří s nukleokapsidovým proteinem nukleokapsid, na který dále na endoplasmatickém retikulu nebo na Golgiho aparátu budou vloženy membránový, obalový a spike proteiny. V posledním kroku vzniklá virová částice bude z hostitelské buňky uvolňována exocytózou²¹.



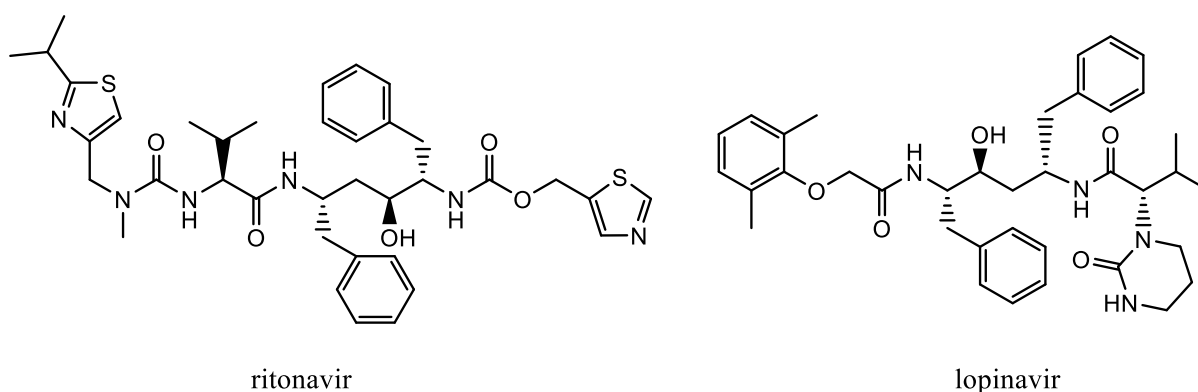
Obr. 2. Struktura a životní cyklus SARS-CoV-2 (převzato z literatury²¹ a upraveno)

3.1.2. Antivirotika

Kvůli časově náročnému procesu vývoje nových léků, byly k léčbě závažných pacientů použity látky již schválené pro léčbu jiných virových infekcí v akutní fázi²². Dosud nebylo hlášeno žádné specifické antivirotikum na léčbu COVID-19, jehož účinnost by byla jednoznačně prokázána velkými klinickými studiemi. Všechna potenciální léčiva popsána níže jsou považována za velmi slibná a v době psaní této práce jsou ve fázi intenzivního výzkumu.

3.1.2.1. Inhibitory virových proteáz

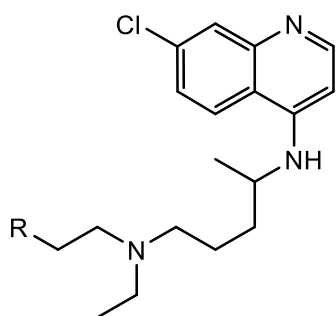
Virové proteázy štěpí ze dvou polypeptidů pp1 a pplab nestrukturní proteiny, které hrají zásadní role v procesu replikace a transkripce virového genomu. Je zřejmé, že v současnosti je věnována velká pozornost studiu látek, které mohou účinně inhibovat funkci těchto virových proteáz. Nejvíce studovanou v této skupině je kombinace lopinavir / ritonavir, u které již byla prokázána aktivita proti SARS-CoV-2 in vitro²³. Ritonavir a lopinavir (Obr. 3) se původně používaly k léčbě HIV (virus lidské imunitní nedostatečnosti) infekce. Ritonavir se v této kombinaci používá k potlačení enzymů zodpovědných za metabolismus lopinaviru, čímž formálně zvyšuje jeho biologickou dostupnost²⁴.



Obr. 3. Inhibitory virových proteáz: ritonavir a lopinavir

3.1.2.2. Inhibitory virového vstupu

Chlorochin²⁵ a hydroxychlorochin (Obr. 4) byly původně vyvinuty k léčbě malárie. Tyto látky mají schopnost proniknout do buněčných endozomů a tam se přeměnit na protonovanou formu. Kvůli této transformaci se zvýší pH endozomálního média. Protože k uvolňování viru z endozomu je nutné nízké pH, virové částice pak nemohou přejít do buněčného prostředí. Kromě toho, chlorochin a hydroxychlorochin inhibují glykosylaci ACE2. Neglykosylovaná forma ACE2 pak už nemůže interagovat se spike proteinem SARS-CoV-2, což chrání buňku před vstupem viru. Bylo in vivo prokázáno, že hydroxychlorochin je značně méně (~40%)²⁶ toxický, a in vitro je účinnější než chlorochin²⁷.



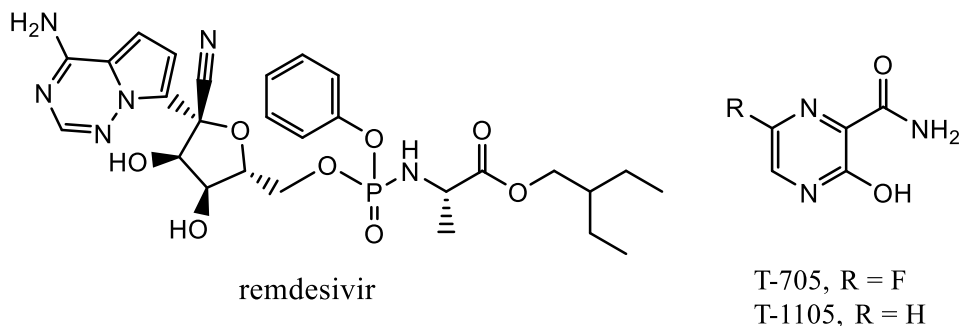
chlorochin, R = H
hydroxychlorochin, R = OH

Obr. 4. Inhibitory virového vstupu: chlorochin a hydroxychlorochin

3.1.2.3. Inhibitory funkce RNA-dependentní RNA polymerázy

Jako nadějně v terapii COVID-19 se také jeví látky, schopné inhibovat funkci virové RdRp (RNA-dependentní RNA polymeráza). Mezi tyto látky patří remdesivir²⁸, T-705²⁹ a T-1105³⁰ (Obr. 5). Remdesivir, původně používaný na léčbu Eboly, prokázal aktivitu in vitro proti SARS-CoV-2 a účinnost in vivo proti ostatním betakoronavirům u zvířecích modelů. Jedná se o proléčivo, které se přemění v hostitelské buňce na analog adenosintrifosfátu, který pak interferuje s RNA-dependentní RNA polymerázou, což způsobuje zpoždění ukončení řetězce a tím i zastavení virové replikace.

T-705, antivirotikum schválené k léčbě chřipky (rok 2002)³¹ v Číně, také prokázal svou aktivitu in vitro proti SARS-CoV-2. V intracelulárním prostředí se přemění fosforibosylací na analog nukleotidu. Tento analog nukleosidu je pak RdRp rozpoznáván jako substrát, který selektivně a účinně potlačuje její funkci nebo způsobí virovou mutagenizi netoxickou pro hostitelskou buňku, ale smrtelnou pro virovou částici³². Mezi další inhibitory funkce virové RdRp patří T-1105, de-fluor analog T-705. Díky chemické příbuznosti báze T-1105 s jeho fluor analogem lze předpokládat, že T-1105 je také účinnou látkou proti SARS-CoV-2. Svoji silnou aktivitu proti chřipce již prokázal³³.



remdesivir

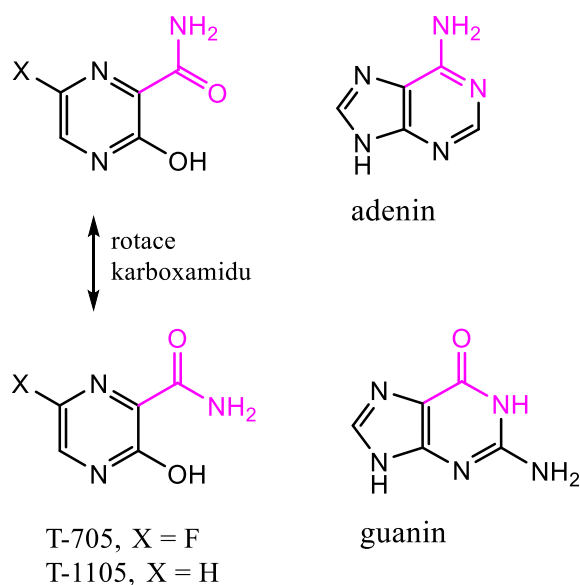
T-705, R = F
T-1105, R = H

Obr. 5. Inhibitory funkce RNA-dependentní RNA polymerázy: remdesivir, T-705, T-1105

3.2. Dusíkaté báze T-705 a T-1105

Dusíkaté báze T-705 a T-1105 jsou odvozené od pyrazin-2-karboxamidu. T-705 (favipiravir) vyvinula japonská společnost Toyama Chemical Co., Ltd. jako lék na chřipku. Poprvé proti SARS-CoV-2 byl favipiravir použit v samém epicentru pandemie ve Wu-chanu. Poté, co se pandemie rozšířila, získala tato látka schválení pro nouzové použití v řadě zemí.

T-705 a T-1105 napodobují purinové bázi (adenin a guanin). Princip antivirové aktivity T-705 a T-1105 závisí na dávce. V nižších koncentracích, díky rotaci karboxamidové skupiny (Obr. 6), mohou tyto látky být začleněné do nové vznikající virové RNA buď místo adeninu nebo místo guaninu. Důsledkem této náhlé změny genetického virového materiálu je neinfekčnost a rychle úmrtí nově vzniklých virů³². Při podání vyšších koncentrací těchto látek dochází k okamžitému ukončení replikace virové RNA³⁴.



Obr. 6. Napodobování T-705 a T-1105 purinových bází díky rotaci karboxamidu

3.2.1. Buněčná aktivace dusíkatých báze T-705 a T-1105

Nejprve budou v buňce tyto báze fosforibosylací převedené na ribofuranosyl-5'-monofosfát (RMP) hostitelským enzymem hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázou. Vzniklý monofosfát pak bude dvojnásobně fosforylován na trifosfát, který už bude aktivním metabolitem.

Avšak enzymatickými testy bylo prokázáno, že T-705 a T-1105 nejsou dobré substráty pro lidskou hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázu¹. Proces fosforibosylace tedy nebude probíhat příliš efektivně, což vynucuje podání vyšších dávek bází. V tomto ohledu je vhodné hledat deriváty, které by účinně fungovaly při nižší koncentraci. Jako slibné se jeví acyklické nukleosidfosfonáty T-705 a T-1105, které nemusí procházet problematickou fosforibosylací.

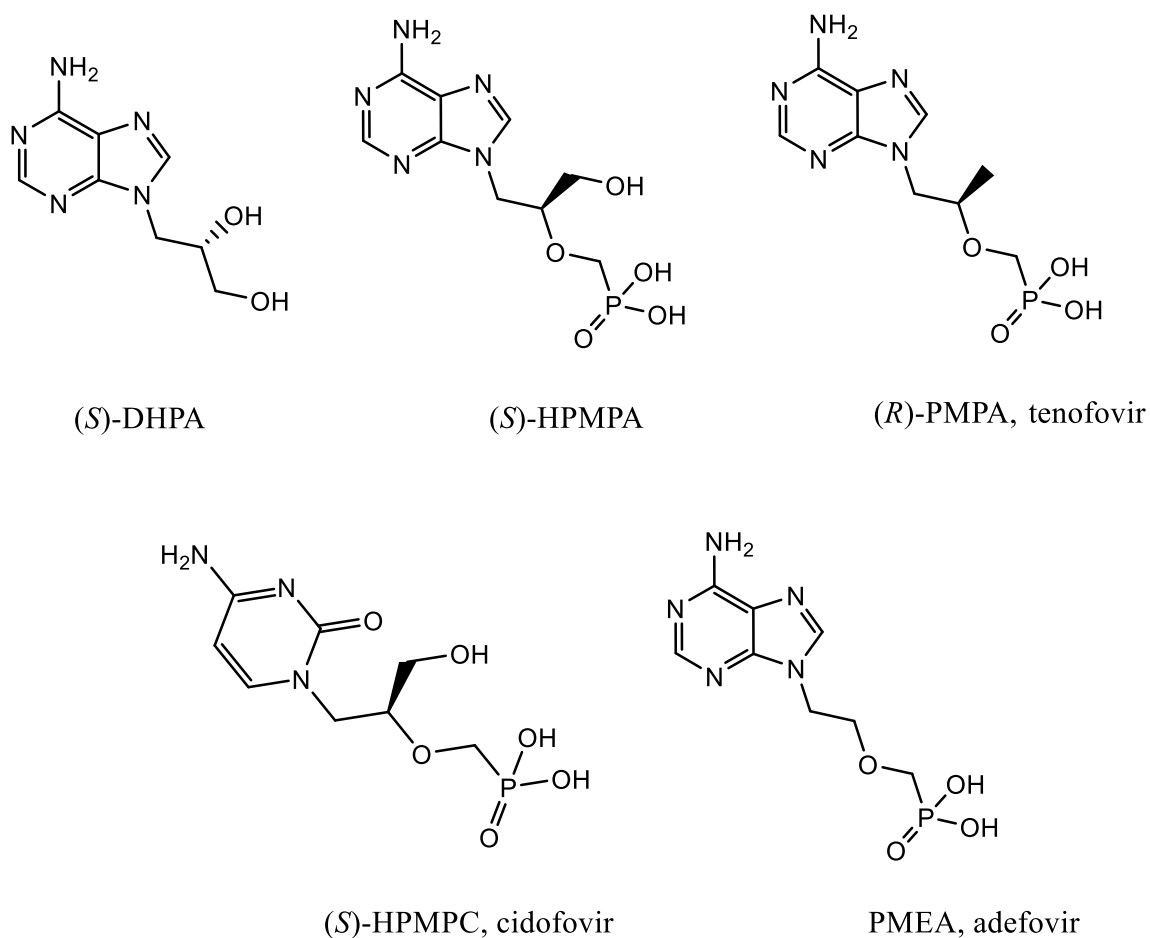
3.3. Acyklické nukleosidfosfonáty

Terapeutické použití jak modifikovaných, tak i přirozených nukleosidů a nukleotidů se ukázalo jako nedostatečně efektivní pro léčbu virových infekcí. U nukleosidů problém nastává již při prvním kroku buněčné fosforylace, která kvůli vysoké specifitě virových kináz často nebývá účinná³⁵. Nukleotidy nemusí procházet problematickým prvním krokem fosforylace, nicméně, kvůli enzymatické nestabilitě fosfátové skupiny, se hydrolyzují buněčnými enzymy zpět na nukleosidy².

Velký pokrok v řešení těchto problémů přinesla (v roce 1986)³ spolupráce Antonína Holého (ÚOCHB, Praha, Česká republika) a Erika De Clercq (Rega Institute for Medical Research, K.U. Leuven, Belgie), která vedla k objevu (*S*)-9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin ((*S*)-HPMPA, Obr. 7), prvního acyklického nukleosidfosfonátu. Jde o fosfonomethyletherovou skupinu spojenou s postranním řetězcem metabolicky inertního acyklického nukleosidového analogu 9-(*S*)-(2,3-dihydroxypropyl)adenin ((*S*)-DHPA, Obr. 7)².

(*S*)-HPMPA, který se pak stal prototypem série dalších ANP, se ukázal jako účinný lék s aktivitou proti velké řadě DNA virů a retrovirů. Navzdory své silné antivirové aktivitě nebyl (*S*)-HPMPA nikdy komercializován pro klinické použití, a to ani pro ty virové infekce, pro které neexistovala alternativní léčba³⁶. Místo (*S*)-HPMPA byl pro další klinický vývoj vybrán jeho analog s cytosinem (*S*)-1-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosin ((*S*)-HPMPC; cidofovir, Obr. 7), pak schválen pro léčbu cytomegaloviru u pacientů se syndromem získané imunodeficiency. K dalším ANP, schváleným pro klinické použití, patří 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]adenin (PMEA, adefovir, Obr. 7) a (*R*)-9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin ((*R*)-PMPA, tenofovir, Obr. 7). Adefovir se využívá v podobě proléčiva adefoviru-dipivoxilu na léčbu chronické hepatitidy typu B. Tenofovir byl schválen ve formě tenofovir-disoproxyl-fumarátu hlavně pro léčbu HIV³⁷. Během posledních pětatřiceti let

studia ANP byly popsány desítky dalších aktivních sloučenin, které ale zatím nebyly zkoumány klinickými studii.



Obr. 7. Struktura (S)-DHPA, (S)-HPMPA, (R)-PMPA, (S)-HPMPC a PMEAs

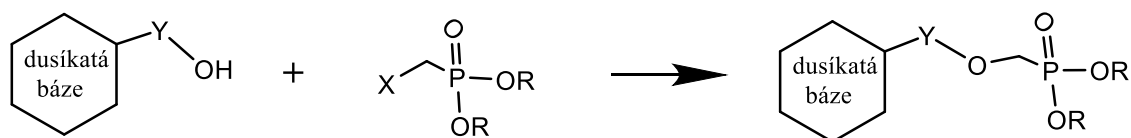
Objev Holého a De Clercq posloužil jako koncept pro novou generaci vysokoúčinných léků, které se staly částí základní terapie mnohých virových infekcí. První příčina účinnosti ANP je přítomnost fosfonátové skupiny: nemusí probíhat první krok fosforylace a fosfonátová skupina oproti fosfátové je mnohem stabilnější, neboť se nedegraduje buněčnými enzymy. Druhá příčina účinnosti ANP spočívá v zachování podobné chemické struktury ANP s přirozenými nukleotidy: isopolarita (schopnosti disociace dvou protonů), stejný počet volných elektronových párů, sterická příbuznost a stejný počet funkčních skupin, nutných pro interakci s buněčnými enzymy. Tato podobnost s přirozenými nukleotidy umožňuje optimální rozpoznávání acyklických nukleosidfosfonátů enzymy².

Díky tomu, že ANP mají fosfonátovou skupinu, nemusejí procházet prvním krokem fosforylace, která je doprovázena specifickými kinázami, kódovanými virem. Obejití tohoto kroku zaručuje acyklickým nukleosidfosfonátům účinnost proti široké škále virů. V intracelulárním prostředí budou tyto látky dvojnásobně fosforylovány buněčnými kinázami na difosfát fosfonátu, který je analogem trifosfátu a aktivním metabolitem. Začlenění aktivního metabolitu do nově vznikajícího řetězce virové nukleové kyseliny způsobí ukončení replikace³⁸.

3.3.1. Syntéza ANP

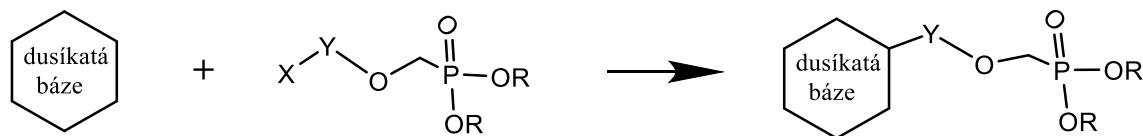
K hlavním metodám syntézy ANP patří²:

- Dvoukrokový postup (Obr. 8). Nejprve je dusíkatá báze alkylována za vzniku příslušného hydroxyalkyl derivátu, který je následně etherifikován diesterem methylfosfonové kyseliny s vhodnou odstupující skupinou.



Obr. 8. První přístup k syntéze ANP (X = odstupující skupina, Y = alkyl)

- Kondenzační reakce dusíkaté báze s fosfonomethyletherem nesoucím vhodnou odstupující skupinu (Obr. 9).



Obr. 9. Druhý přístupy k syntéze ANP (X = odstupující skupina, Y = alkyl)

Příprava hydroxyalkyl derivátu dusíkaté báze může být prováděna různými způsoby: alkylace dusíkaté báze 1,3-dioxalan-2-ony³⁹, hydroxyalkyl halogenidy⁴⁰, nebo epoxidy⁴¹. Vzniklý hydroxyalkyl řetězec dusíkaté báze se deprotonuje silnou bází, např. hydridem sodným, a následně se etherifikuje dialkyl tosyloxymethylfosfonátem. Místo tosylátové (TsO⁻) odstupující

skupiny se využívá také triflátová (TfO^-) nebo jodidová odstupující skupina³⁹. Schéma 1 demonstruje přípravu ANP etherifikací hydroxyethyllového derivátu (vzniklého alkyací adeninu 1,3-dioxalan-2-onem) dialkyl tosyloxymethylfosfonátem, připraveným reakcí dialkyl fosfitu a formaldehydu s následnou tosyací tosylchloridem .

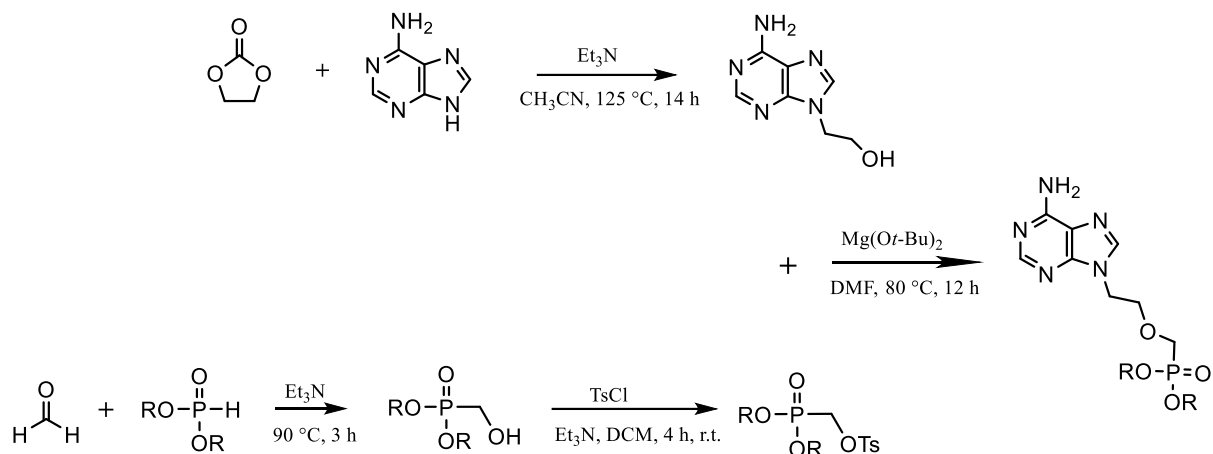
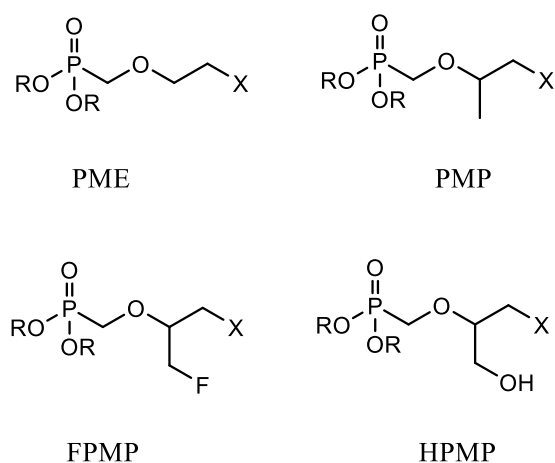


Schéma 1. Příprava ANP etherifikací hydroxyethyl derivátu adeninu (R = ethyl, isopropyl)

Další možnost přípravy ANP spočívá v přímé alkylationi dusíkaté báze sloučeninou, která na jednom konci řetězce nese vhodnou odstupující skupinu, a na druhém konci má fosfonomethoxy skupinu chráněnou isopropylem nebo ethylem . Před alkylationi je příslušná dusíkatá báze deprotonována nejčastěji NaH nebo K_2CO_3 . Jako další bázi k deprotonaci lze použít Cs_2CO_3 nebo 1,8-diazabicyklo-[5,4,0]undec-7-en (DBU).^{39,42} Jako alkylationi činidlo se používá například 2-(fosfonomethoxy)ethyl (PME), 2-(fosfonomethoxy)propyl (PMP), 3-fluor-2-(fosfonomethoxy)propyl (FPMP) a 3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl (HPMP) (Obr. 10).



Obr. 10. Sloučeniny používané k přímé alkylationi dusíkaté báze (R = ethyl, isopropyl; X = OTs, I, Br, Cl)^{39,42,43}

Posledním krokem v přípravě ANP u obou metod je hydrolyza alkylových chránicích skupin. Standardní a často používanou metodou ochrání ethylových a isopropylových skupin je transsilylace s následnou hydrolyzou. Transsilylace⁴¹ se provádí v acetonitrilu při pokojové teplotě. Jako silylační činidla se používají trimethylsilyl jodid, trimethylsilyl bromid a trimethylsilyl chlorid. Následná hydrolyza probíhá ve vodě nebo v methanolu. Nevýhody dané metody spočívají v toxicitě používaných silylačních činidel, jejich těkavosti a také v citlivosti na přítomnost vody. Dnes se k ochrání alkylových skupin raději používá alternativní metoda, založená na hydrolyze vodnými roztoky minerálních kyselin. Obecně se používá kyselina chlorovodíková. Kyselina bromovodíková je účinnější než chlorovodíková, ale v průběhu hydrolyzy kyselinou bromovodíkovou jako vedlejší produkt vzniká alkylbromid, který je silným alkylačním činidlem, interagujícím s molekulou produktu. Oproti tomu kyselina chlorovodíková je levnější možností a alkylchlorid, vznikající v průběhu hydrolyzy kyselinou chlorovodíkovou, je méně náchylný k nežádoucím alkylacím. Kvůli nižší reaktivitě HCl se hydrolyza provádí za vysokých teplot a často v mikrovlnném reaktoru⁴⁴.

4. Výsledky a diskuse

4.1. Koncept syntézy

Cílem této práce bylo připravit nové acyklické nukleosidfosfonáty s dusíkatou bází T-1105 (Schéma 2). Jako základní acyklický nukleosidfosfonát pro syntézu byl zvolen 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivát T-1105, ze kterého bylo navrženo syntetizovat dva další deriváty: jeho difosfát, který představuje aktivní metabolit, a proléčivo s lipofilními pivaloyloxymethyl skupinami, které zvyšují schopnost transportu ANP přes cytoplazmatickou membránu.

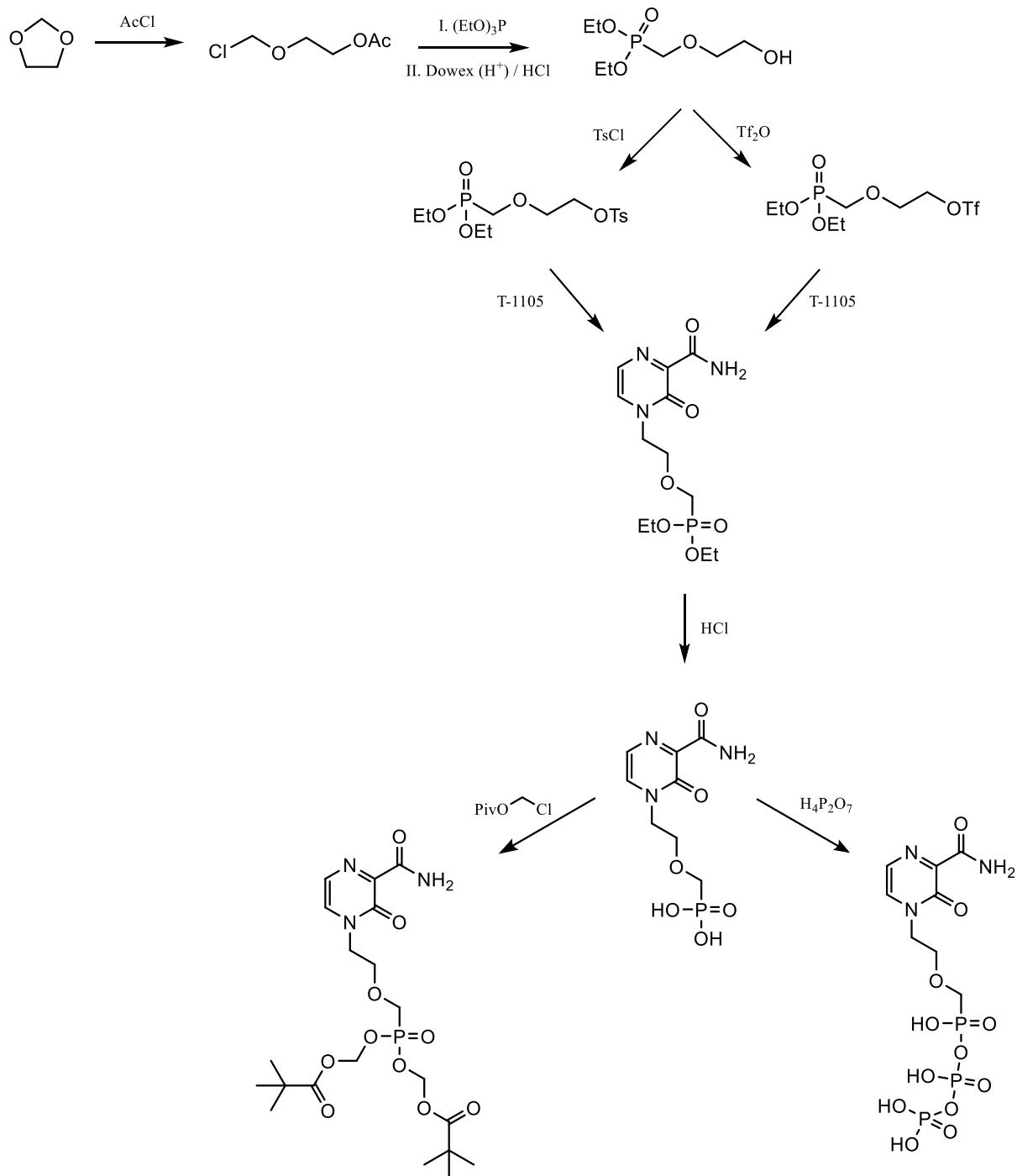


Schéma 2. Koncept syntézy (Piv – pivaloyl, Ac – acetyl, Ts – tosyl, Tf – triflyl)

4.2. 2-(Chloromethoxy)ethyl acetát

Reakcí 1,3-dioxolanu **1** s acetylchloridem **2** byl připraven 2-(chloromethoxy)ethyl acetát **3** (Schéma 3)⁴⁵. Reakce probíhá v přítomnosti chloridu zinečnatého jako katalyzátoru. Kvůli náchylnosti acetylchloridu k hydrolyze za vzniku kyseliny octové byla reakce provedena za

suchých podmínkách. Po ukončení reakce byl hexan odpařen na vakuové odparce, výsledný produkt **3** byl vyčištěn destilací za sníženého tlaku.

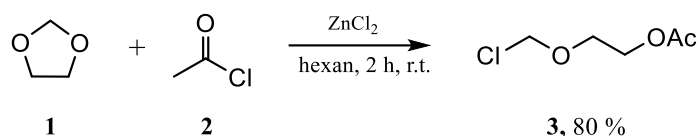


Schéma 3. Příprava 2-(chloromethoxy)ethyl acetátu

4.3. Fosfonát s hydroxylovou skupinou

Příprava fosfonátu s hydroxylovou skupinou **5** byla provedena ve dvou krocích (Schéma 4).

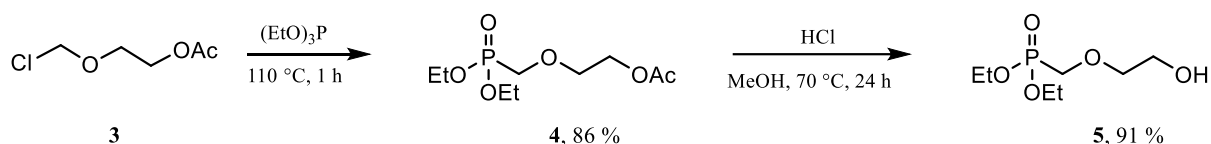


Schéma 4. Příprava fosfonátu s hydroxylovou skupinou

V prvním kroku reakcí⁴⁵ sloučeniny **3** s triethylfosfitem vzniká acetoxyfosfonát **4**. Mechanismus reakce je uveden níže (Schéma 5). Nejprve dochází k nukleofilnímu útoku fosforu na látku **3** za vzniku fosfoniové soli. Odštěpený chloridový anion následně reaguje v další S_N2 reakci s jedním z elektrofilních Et uhlíků, což vede k tvorbě konečného produktu **4** a chlorethanu. Jde o tzv. reakci Michaelis–Arbuzov⁴⁶, typicky používanou pro syntézu fosfonátů z fosfitu.

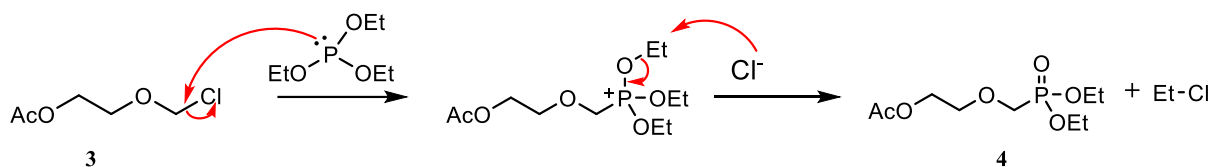


Schéma 5. Mechanismus přípravy acetoxyfosfonátu reakcí Michaelis–Arbuzov

V druhém kroku za účelem získání lepší odstupující skupiny byla acetylová skupina přeměněna na hydroxylovou, kterou lze následně převést na dobře odstupující tosylátovou nebo triflátovou skupinu.

Kyselou hydrolyzou acetoxyfosfonátu **4** byl připraven hydroxyfosfonát **5**. Nejprve byla tato reakce vyzkoušena v přítomnosti katexu v H⁺ cyklu⁴². Jako katex byl použit Dowex 50WX8,

který byl aktivován převedením do H^+ formy. I přesto, že Dowex před aktivací byl několikrát promytý ethanolem, po skončení reakce v reakční směsi byl detekován nejen produkt, ale i nečistoty, které se nepodařilo úplně odstranit ani přečistěním sloupcovou chromatografií. Kvůli tomu byla vyzkoušena alternativní metoda přípravy hydroxyfosfonátu **5** hydrolyzou látky **4** v přítomnosti koncentrované kyseliny chlorovodíkové⁴⁷. Kyselina octová, vedlejší produkt reakce, byla azeotropní destilací s toluenem odstraněná na rotační vakuové odparce. Výsledný produkt **5** byl vysušen za sníženého tlaku.

4.4. Fosfonát s tosylátovou skupinou

Za účelem získání dobře odstupující skupiny byla hydroxylová skupina na fosfonátu **5** přeměněna na tosylátovou za vzniku látky **6** (Schéma 6). Byla použita standardní metoda tosylace volného alkoholu *p*-toluensulfonylchloridem⁴². Reakce byla provedena v přítomnosti triethylaminu jako báze. Po skončení reakce byla provedena extrakce a následné dočistění produktu pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu.

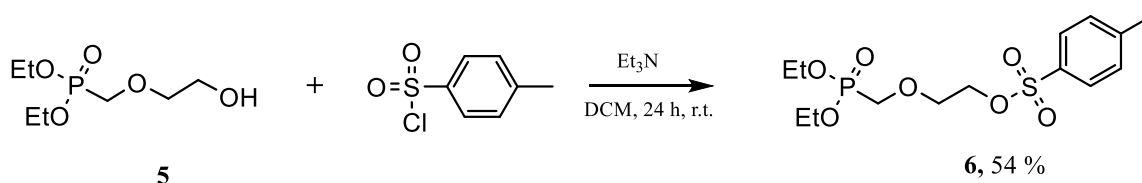


Schéma 6. Příprava fosfonátu s tosylátovou skupinou

4.5. Fosfonát s triflátovou skupinou

K přípravě látky **7** (Schéma 7) byla použita standardní metoda triflace volného alkoholu anhydridem kyseliny trifluormethansulfonové⁴⁸.

Reakce byla provedena při teplotě $-78\text{ }^\circ\text{C}$. Jako báze byl použit 2,6-lutidin. Oproti pyridinu a triethylaminu je 2,6-lutidin více stericky bráněný, což při tak nízkých teplotách zmenšuje pravděpodobnost nežádoucí triflace dané báze.

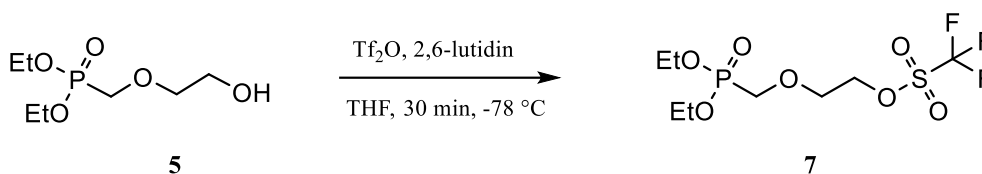


Schéma 7. Příprava fosfonátu s triflátovou skupinou

Kvůli velké citlivosti látky **7** a anhydridu kyseliny trifluormethansulfonové na vodu byla reakce provedena za suchých podmínek, jako rozpouštědlo byl použit bezvodý THF a detekce výsledného produktu **7** nebyla provedena pomocí NMR ani MS. Reakce byla provedena několikrát a vznik látky **7** byl vždy vizualizován na TLC v *p*-nitrobenzylpyridinu. Po provedení triflace a po detekci fosfonátu s triflátovou skupinou byla do reakční směsi hned přidávána deprotonovaná dusíkatá báze.

4.6. Alkylace T-1105

K reakční směsi předchozí reakce byla přidána deprotonovaná dusíkatá báze T-1105 v bezvodém DMF (Schéma 8).

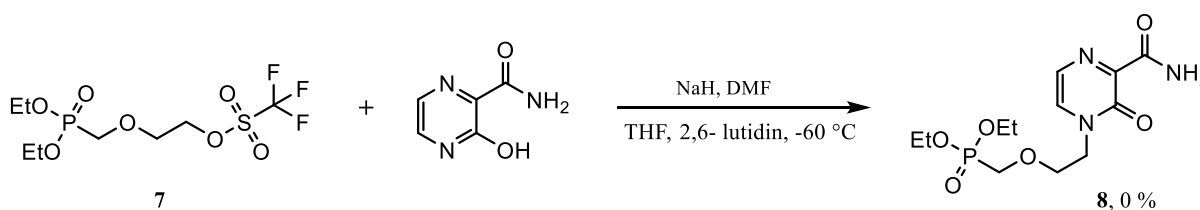


Schéma 8. Alkylace T-1105 fosfonátem s triflátovou skupinou

Reakce byla provedena několikrát, avšak vznik produktu **8** nikdy nebyl pozorován pomocí TLC a MS. Počátek reakce byl při teplotě $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kvůli tomu, že při $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ výsledný produkt **8** nebyl detekován a výchozí fosfonát **7** zůstával v reakční směsi nezreagovaný, teplota reakce se postupně zvyšovala o $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Výchozí fosfonát **7** zůstával v reakční směsi nezreagovaný až do zvýšení reakční teploty na $23\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při tak vysoké teplotě pravděpodobně docházelo k triflaci 2,6-lutidinu.

Z časových důvodů nebylo zjištěno za jakých podmínek by docházelo k triflaci T-1105. Ovšem pokud by modifikací reakce (například použitím stericky více chráněné báze a prováděním reakce při vyšší teplotě) se získal produkt **8**, mohla by se daná modifikovaná metoda dále použít

pro alkylation T-1105 fosfonátem s pivaloyloxymethyl skupinami místo ethylových. V slabě bazickém prostředí by nemělo docházet k rozkladu pivaloyloxymethyl skupin.

Další alkylation deprotonované báze T-1105 byla vyzkoušena s fosfonátem s tosylátovou skupinou **6** (Schéma 9).

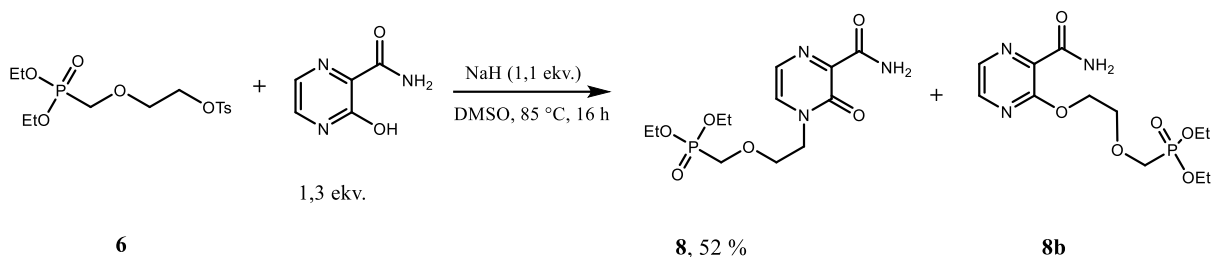


Schéma 9. Alkylation T-1105 fosfonátem s tosylátovou skupinou

Jako rozpouštědlo byl použit DMSO z důvodu rozpustnosti T-1105. Reakční teplota byla nastavena na 110 °C, jako deprotonační báze byl použit NaH. Kvůli malému objemu reakce a slabé chemické aktivitě dusíkaté báze T-1105 bylo rozhodnuto použít dvojnásobný nadbytek T-1105 vůči fosfonátu **6**. Po skončení reakce v reakční směsi bylo detekováno malé množství produktu **8** a nebyl detekován výchozí fosfonát **6**, pravděpodobně docházelo k jeho rozkladu.

Byly provedeny tři další orientační pokusy s cílem najít optimální reakční podmínky a zvýšit reakční výtěžek. K deprotonaci T-1105 byly vyzkoušeny v orientačních reakcích 3 báze: NaH, K₂CO₃ a Et₃N. Optimální teplota pro následnou alkylation deprotonované báze byla zjištěna jako 80 - 90°C. Výsledný produkt alkylation **8** vznikl v každé orientační reakci, avšak podle TLC a MS reakce v přítomnosti NaH poskytla nejmenší počet vedlejších produktů. V každé reakci vznikl s N-izomerem **8** také O-izomer **8b**, tyto dva izomery se od sebe nepodařilo oddělit. Avšak oproti reakcím v přítomnosti K₂CO₃ a Et₃N, reakce s NaH poskytla jen nepárné množství vedlejšího izomeru.

Po zjištění optimální reakční teploty a optimální deprotonační báze byla reakce dále modifikována použitím menšího množství dusíkaté báze. Jako optimální se ukázal 1,3 nadbytek (Schéma 9). Z důvodu citlivosti fosfonátu **6** na rozklad v reakční směsi byla výsledná reakce nasazena z 0,5 ekvivalentu fosfonátu, po zreagování bylo znovu přidáno stejné množství fosfonátu.

Optimalizace podmínek přípravy látky **8** je shrnuta v tabulce 1.

Tabulka 1. Optimalizace podmínek přípravy látky **8**

číslo orientační reakce	počet ekv. látky 6	počet ekv. T-1105	báze (ekv.)	teplota	Výsledek
1 ⁴²	1	2	NaH (1,8)	110 °C	rozklad výchozí látky 6 .
2	1	2	Et ₃ N (1,8)	85 °C	vznik produktu 8 .
3	1	2	K ₂ CO ₃ (1,8)	85 °C	Reakce v přítomnosti NaH poskytla nejmenší počet vedlejších produktů.
4	1	2	NaH (1,8)	85 °C	
5	1	1,3	NaH (1,1)	85 °C	izolován produkt 8 ve výtěžku 52 %.

* každá reakce byla provedena v DMSO jako rozpouštědla a ohřívána přes noc.

V čínském patentu⁴⁹ byla publikována metoda přípravy látky **8**, odlišná od výše zmíněných. Takto připravená sloučenina ale nebyla v patentu pořádně popsána. Vzhledem k tomu, že alkylace T-1105 fosfonátem s tosylátovou skupinou vedla ke vzniku stejné sloučeniny, podařilo se ji náležitě charakterizovat (viz kapitola 5.2.6.).

Identifikace N-izomeru byla provedena za pomoci 2D NMR spekter (COSY, HSQC, HMBC). Na HMBC spektru byla pozorována interakce mezi vodíky s posunem 4,17 ppm a uhlíky s posuny 155,12 ppm a 134,34 ppm. Vodíky byly identifikovány jako H-6, uhlík s posunem 155,12 ppm jako C-3 a uhlík s posunem 134,34 ppm jako C-4 (viz Obr. 11). Díky tomu bylo stanoveno, že izolovaný produkt **8** je N-izomerem. V případě O-isomeru by neměla být pozorována interakce mezi uhlíkem C-4 a vodíky H-6.

4.7. Hydrolýza diethylfosfonátu

Odchránění ethylových skupin se provádí buď transsilylací s následnou hydrolýzou produktu nebo reakcí s vodným roztokem minerální kyseliny v mikrovlnném reaktoru.

Po předchozích zkušenostech v naší skupině byla pro orientační reakci zvolena metoda odchránění v mikrovlnném reaktoru⁴⁴. K výchozí látce **8** bylo přidáno 0,5 M HCl. Směs se

zahřívala 20 min při 130 °C (Schéma 10). Reakční produkty byly analyzovány pomocí TLC, NMR a MS. Metoda odchránění v mikrovlnném reaktoru se ukázala jako nedostatečně efektivní neboť nedocházelo k úplnému odchránění ethylových skupin. Separace produktu **9** nebyla z časových důvodů provedena.

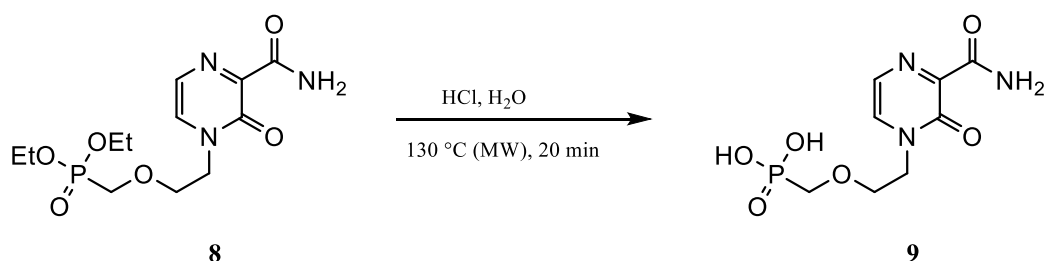


Schéma 10. Odchránění ethylových skupin

5. Experimentální část

5.1. Obecné postupy a chemikálie

Dusíkatá báze T-1105 byla zakoupena od firmy Fluorochem. Ostatní speciální chemikálie byly zakoupeny od firem Fluorochem a Merck, běžné chemikálie byly zakoupeny od firem Penta a Lach-ner. Rozpouštědla byla před použitím destilována. Voda byla používána deionizovaná. Hydrid sodný byl používán ve formě 60% suspenze v minerálním oleji.

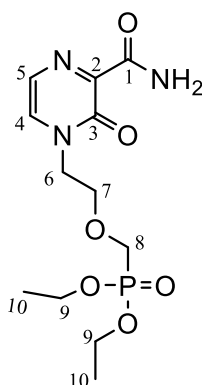
Odpařování rozpouštědel bylo prováděno na rotační vakuové odparce (RVO) firmy Büchi nebo Heidolph, produkty pak byly dosušovány na olejové vývěvě VR 1,5/2. K destilaci látky **4** na krátké dráze byl použit Kugelrohr značky Büchi B-585. Měření MS spekter bylo provedeno za použití přístroje LCMS 2020 Shimadzu,. NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker AVANCE III HD 400 v deuterovaném DMSO a methanolu. Přiřazování signálu se provádělo za pomoci DEPT a 2D NMR spekter (COSY, HSQC, HMBC).

Silikagel 60 (40–63 μm) používaný pro sloupcovou chromatografii byl zakoupen u firmy Merck. Flash chromatografie byla prováděna na přístroji Compact Preparative System od firmy Ecom za použití sypaných kolon. Pro tenkovrstvou chromatografii byly používány hliníkové destičky, zakoupené od firmy Merck, pokryté silikagelem 60 F254. Používané mobilní fáze byly následující:

S1: CHCl₃/MeOH 5/1
S2: EtOAc /hexan 15/1
S3: CHCl₃/MeOH 15/1
S4: CHCl₃/MeOH 10/1

Pro detekci látek na TLC byla používána UV lampa (vlnové délky 254 a 366 nm), KMnO₄ (roztok 1,5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃ a 1,25 ml 10% NaOH ve 200 ml H₂O) a *p*-nitrobenzylpyridin (1% roztok v EtOH). Detekce látek v *p*-nitrobenzylpyridinu byla prováděna ponořením TLC destičky do roztoku, zahřátím horkovzdušnou pistolí a následným ponořením do vodného roztoku amoniaku.

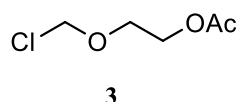
Na obr. 11 je uveden příklad číslování atomů ve výpisech NMR spekter.



Obr. 11. Příklad číslování atomů ve výpisech spekter

5.2. Pracovní postupy

5.2.1. 2-(Chloromethoxy)ethyl acetát (3)



Do 50 ml tříhrdlé baňky s kulatým dnem vybavené přikapávací nálevkou, chladičem, teploměrem a magnetickým míchadlem byl přidán 1,3-dioxolan **1** (5 g, 67,5 mmol) a chlorid zinečnatý (16 mg, 0,11 mmol). Pod argonovou atmosférou za stálého míchání k reakční směsi byl po kapkách přidáván roztok acetylchloridu **2** (4,8 ml, 67,5 mmol) v bezvodém hexanu (5 ml). Reakční teplota byla pomocí chlazení ledovou lázní udržována pod 50 °C. Po přidání acetylchloridu v hexanu reakční směs

byla míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po 2 hodinách reakční směs byla zkoncentrována na RVO při 40 °C, výsledný produkt **3** byl vydestilován za sníženého tlaku (60 °C, 0,6 mbar). Bylo získáno 8,2 g (80 %) bezbarvé kapaliny.

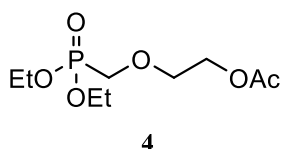
$R_F = 0,3$ (S1), detekce: *p*-nitrobenzylpyridin.

Pro **3** vypočtena $M_r = 152.578$, ESI-MS: m/z 154 $[M + H]^+$

Naměřená ^1H NMR spektra odpovídají publikaci⁴⁵:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.52$ (s, 2 H, 5-H); 4.72 (m, 2 H, 3-H); 3.90 (m, 2 H, 4-H); 2.10 (s, 3 H, 1-H) ppm.

5.2.2. 2-[(Diethoxyfosforyl)methoxy]ethyl acetát (**4**)



Metoda A: 2-(Chloromethoxy)ethyl acetát **3** (4 g, 26 mmol) byl přidán pod argonovou atmosférou do 50 ml tříhrdlé baňky s kulatým dnem vybavené přikapávací nálevkou, chladičem, teploměrem a magnetickým míchadlem. Za stálého míchání byl k látce **3** po kapkách přidáván triethylfosfit (4,5 g, 27 mmol). Po přikapání triethylfosfitu byla reakční směs 1 hodinu zahřívána na 110 °C. Výsledný produkt **4** byl vyčištěn destilací na krátké dráze (157 °C, 0,7 mbar). Destilace poskytla bezbarvou kapalinu o hmotnosti 5,7 g (86 %).

Metoda B: Příprava látky **4** byla také vyzkoušena bez izolace meziprojektu **3**⁴⁷. K dioxolanu **1** (10 g, 0,135 mol) v 37,5 ml bezvodného hexanu bylo přidáno ZnCl_2 (34 mg, 0,25 mmol). Pod argonovou atmosférou za stálého míchání byl k reakční směsi po kapkách přidáván roztok acetylchloridu **2** (11 g, 0,14 mol) v 12,5 ml bezvodného hexanu. Reakční teplota byla pomocí chlazení ledovou lázní udržována pod 50 °C. Po přidání acetylchloridu v hexanu byla reakční směs míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Po 2 hodinách byla reakční směs zkoncentrována na RVO při 40 °C. Přítomnost meziprojektu **3** byla ověřena na TLC. K reakční směsi byl postupně přidán triethylfosfit (29,25 g, 0,175 mol) a po přidání triethylfosfitu byla směs zahřívána na 85 °C. Po proběhnutí exotermické reakce byla reakční směs 2 hodiny zahřívána na 120 °C. K odstranění nezreagovaného triethylfosfitu a vedlejších produktů bylo použito sušení na olejové vývěvě při 80 °C. Produkt **4** (24 g, 70 %) byl dočištěn destilací na krátké dráze.

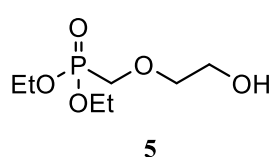
$R_F = 0,2$ (S2) detekce: KMnO_4 .

Pro **4** vypočtena $M_r = 254.22$, ESI-MS: m/z 255 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Spektrum je shodné s literaturou⁴⁵:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.24$ (t, $J = 4.7$ Hz, 2 H, 3-H); 4.23-4.17 (q, $J = 7.6$ Hz, 4 H, 6-H); 3.86 (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H, 5-H); 3.81 (t, $J = 4.7$ Hz, 2 H, 4-H); 2.09 (s, 1 H, 1-H); 1.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 6 H, 7-H) ppm.

5.2.3. Diethyl [(2-hydroxyethoxy)methyl]fosfonát (5)



2-[(diethoxyfosforyl)methoxy]ethyl acetát **4** (15 g, 0,06 mol) byl rozpouštěn v 50 ml methanolu. Pod argonovou atmosférou a za stálého míchání bylo k výchozí látce **4** rozpouštěné v methanolu přidáno 3,7 ml HCl . Reakční směs byla za stálého míchání zahřívána 24 hodin na 70°C . Po vymizení výchozí látky na TLC byl methanol odpařen na RVO. Odpařená reakční směs byla dvakrát rozpuštěna v toluenu a odpařena na RVO. Výsledný produkt **5** byl dosušen na olejové vývěvě při 70°C . Bylo získáno 11,24 g (91 %) oranžového oleje.

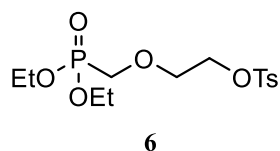
$R_F = 0,3$ (S3) detekce: KMnO_4 .

Pro **5** vypočtena $M_r = 212.183$, ESI-MS: m/z 235 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

Spektrum je shodné s literaturou⁴⁷:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.2$ (q, $J = 7.3$ Hz, 4 H, 4-H); 3.25 (s, 1 H, OH); 3.88 (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H, 3-H); 3.75 (m, 4 H, 1,2-H); 2.09 (s, 1 H, 1-H); 1.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 6 H, 5-H) ppm.

5.2.4. 2-[(Diethoxyfosforyl)methoxy]ethyl 4-methylbenzenesulfonát (6)



K roztoku látky **5** (3 g, 14 mmol) a Et_3N (4 ml, 29 mmol) byl v suchém DCM (15 ml) pod argonovou atmosférou přidán TsCl (3,2 g, 24 mmol) rozpuštěný v suchém DCM (17 ml). Směs byla míchána 24 hodiny při laboratorní teplotě. Po 24 hodinách byl přidán 4-dimethylaminopyridin (16 mg, 0,13 mmol) a reakční směs byla míchána další 4 hodiny, načež byla promyta 1M HCl (15 ml) a nasyceným roztokem NaHCO_3 (15 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým MgSO_4 , přefiltrována přes fritu S4 a dosušena na olejové vývěvě. Výsledný produkt **6** byl přečištěn flash

chromatografií v gradientu mobilní fáze MeOH v DCM 0–10 %. Bylo získáno 2,78 g (54 %) oranžového oleje.

$R_F = 0,6$ (S3) detekce: KMnO_4 , UV.

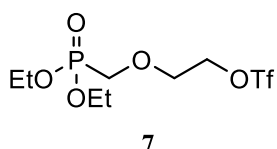
Pro **6** vypočtena $M_r = 366.372$, ESI-MS: m/z 389 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

Spektrum je shodné s literaturou⁴²:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.82$ (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, 4-H); 7.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, 3-H); 4.13-4.20 (m, 6 H, 6,9-H); 3.79-3.83 (m, 4 H, 7,8-H); 2.47 (s, 3 H, 1-H); 1.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 6 H, 10-H) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 144.96$ (5-C); 132.87 (2-C); 129.94 (3-C); 127.98 (4-C); 70.46 (d, $J = 10.7$ Hz, 7-C); 68.76 (6-C); 66.32-64.66 (d, $J = 165.1$ Hz, 8-C); 62.54 (d, $J = 6,5$ Hz, 9-C); 21.66 (1-C); 16.44 (10-C) ppm.

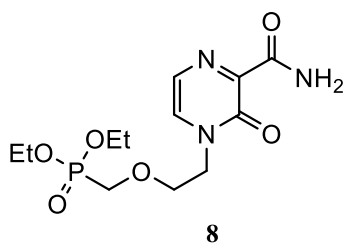
5.2.5. 2-[(Diethoxyfosforyl)methoxy]ethyl trifluormethansulfonát (7)



K roztoku látky **5** (20 mg, 80 μmol) a 2,6-lutidinu (9,3 μl , 80 μmol) v suchém THF (1,5 ml) pod argonovou atmosférou a za chlazení suchým ledem na teplotu -78°C byl přidán Tf_2O (13,0 μl , 80 μmol). Reakční směs byla chlazená za stálého míchání 30 min. Vznik produktu **7** byl detekován jen pomocí TLC kvůli velké citlivosti látky na vlhkost.

$R_F = 0,7$ (S1), detekce: *p*-nitrobenzylpyridin.

5.2.6. Diethyl {[2-(3-karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl} fosfonát (8)



Metoda A: k dusíkaté bázi T-1105 (167 mg, 1,2 mmol) v 5 ml suchého DMSO pod argonovou atmosférou byl přidán hydrid sodný (41 mg, 1,03 mmol). Reakční směs byla míchána 1 hodinu při laboratorní teplotě. Dále byla přidána látka **6** (154 mg, 0,42 mmol), směs byla zahřáta na 85°C a ponechána míchat na 3 h.

Potom byla znovu přidána látka **6** (184 mg, 0,50 mmol) a směs byla ponechána míchat přes noc. Reakce byla ukončena přidáním 40 ml vody a extrahována do vroucího chloroformu (6×50 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým MgSO_4 , přefiltrována přes fritu S4 a dosušena na

olejové vývěvě. Produkt reakce **8** (319 mg, 52 %) byl vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie za použití 50 g silikagelu a gradientu mobilní fáze MeOH v DCM 0–10 %.

$R_F = 0,4$ (S4) detekce: UV.

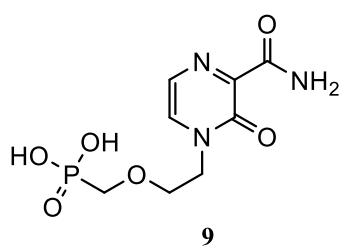
Pro **8** vypočtena $M_r = 333,28$, ESI-MS: m/z 356 $[M + Na]^+$

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO): $\delta = 8.42$ (s, 1 H, N-H); 7.82 (d, $J = 4.1$ Hz, 1 H, 5-H); 7.73 (s, 1 H, N-H); 7.5 (d, $J = 4.1$ Hz, 1 H, 4-H); 4.17 (t, $J = 5.2$ Hz, 2 H, 6-H); 3.97 (q, $J = 7.1$ Hz, 4 H, 9-H); 3.81-3.86 (m, 4 H, 7,8-H); 1.18 (t, $J = 7.0$ Hz, 6 H, 10-H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO): $\delta = 164.41$ (1-C); 155.12 (3-C); 146.99 (5-C); 134.34 (4-C); 122.97 (2-C); 69.35 (d, $J = 11.1$ Hz, 7-C); 63.48-65.09 (d, $J = 161.6$ Hz, 8-C); 62.17 (d, $J = 6.13$ Hz, 9-C); 49.13 (6-C); 16.70 (10-C) ppm.

Metoda B: k dusíkaté bázi T-1105 (50 mg, 0,36 mmol) v 5 ml suchého DMF pod argonovou atmosférou byl přidán hydrid sodný (8,6 mg, 0,215 mmol). Reakční směs byla míchána 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po 1 hodině byl roztok deprotonované báze přidán do chlazené reakční směsi s látkou **7**. Teplota reakce byla postupně zvyšována z -60 °C na 23 °C. Vznik produktu nebyl detekován pomocí TLC ani MS.

5.2.7. {[2-(3-Karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl}fosfonová kyselina (**9**)



K výchozí látce **8** (10 mg, 0,03 mmol) bylo přidáno 0,12 ml 0,5M HCl. Reakční směs byla zahřívána 20 minut při teplotě 130 °C v mikrovlnném reaktoru. Podle TLC byl předpokládán vznik produktu **9**, ale izolace a dostatečná identifikace produktu nebyly z časových důvodů provedeny.

$R_F = 0,4$ (PrOH/H₂O/NH₃ 6/3/1), detekce: UV.

6. Závěr

Pro alkylaci dusíkaté báze T-1105 za účelem získání nových acyklických nukleosidfosfonátů byla nejprve připravená alkylační činidla:

- (ethoxymethyl)fosfonát s ethylovými chránícími skupinami a tosylátovou odstupující skupinou.
- (ethoxymethyl)fosfonát s ethylovými chránícími skupinami a triflátovou odstupující skupinou.

Alkylací dusíkaté báze T-1105 postranním řetězcem s tosylátovou odstupující skupinou byl připraven acyklický nukleosidfosfonát – 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivát T-1105 s ethylovými chránícími skupinami. Byla provedena modifikace dané reakce s cílem zvýšení výtěžku.

Byla provedena také alkylace dusíkaté báze T-1105 postranním řetězcem s triflátovou odstupující skupinou. V tomto případě však nebyl vznik produktu pozorován.

Byla provedena hydrolýza ethylových skupin s cílem připravit acyklický nukleosidfosfonát – 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivát dusíkaté báze T-1105 ve formě volné kyseliny. Separace a identifikace produktu nebyla z časových důvodů provedena.

Souhrnně: byl vypracován nový postup pro přípravu nových potenciálně biologicky aktivních ANP s bází T-1105, byly získány pokročilé intermediáty, ale finální látky nebyly syntetizovány.

7. Poděkování

Především bych ráda poděkovala kolegům z laboratoře 131 – Mgr. Petrovi Kasalovi a Mgr. Konstantinu Lebedinskému za moudré rady, pomoc, podporu a trpělivost. Velké poděkování patří mému školiteli doc. RNDr. Jindřichu Jindřichovi, CSc. za vedení této bakalářské práce, za cenné rady a ochotu odpovědět na každý dotaz. Také bych chtěla poděkovat všem svým skvělým kolegům z laboratoře 135 za přátelskou a veselou atmosféru v kolektivu.

Jsem také nekonečně vděčná své rodině a přátelům, kteří mě neustále podporovali a motivovali během vypracování této práce.

8. Literatura

- (1) Naesens, L.; Guddat, L. W.; Keough, D. T.; Kuilenburg, A. B. P. van; Meijer, J.; Voorde, J. V.; Balzarini, J. Role of Human Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase in Activation of the Antiviral Agent T-705 (Favipiravir). *Mol. Pharmacol.* **2013**, *84* (4), 615–629. <https://doi.org/10.1124/mol.113.087247>.
- (2) Antonin, H. Phosphonomethoxyalkyl Analogs of Nucleotides. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9* (31), 2567–2592.
- (3) De Clercq, E. The Acyclic Nucleoside Phosphonates from Inception to Clinical Use: Historical Perspective. *Antiviral Res.* **2007**, *75* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.10.006>.
- (4) Clercq, E. D.; Holý, A. Acyclic Nucleoside Phosphonates: A Key Class of Antiviral Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4* (11), 928–940. <https://doi.org/10.1038/nrd1877>.
- (5) Zhong, N.; Zheng, B.; Li, Y.; Poon, L.; Xie, Z.; Chan, K.; Li, P.; Tan, S.; Chang, Q.; Xie, J.; Liu, X.; Xu, J.; Li, D.; Yuen, K.; Peiris, J.; Guan, Y. Epidemiology and Cause of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet Lond. Engl.* **2003**, *362* (9393), 1353–1358. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14630-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14630-2).
- (6) Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003 <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003> (accessed 2021 -04 -24).
- (7) Wang, M.; Yan, M.; Xu, H.; Liang, W.; Kan, B.; Zheng, B.; Chen, H.; Zheng, H.; Xu, Y.; Zhang, E.; Wang, H.; Ye, J.; Li, G.; Li, M.; Cui, Z.; Liu, Y.-F.; Guo, R.-T.; Liu, X.-N.; Zhan, L.-H.; Zhou, D.-H.; Zhao, A.; Hai, R.; Yu, D.; Guan, Y.; Xu, J. SARS-CoV Infection in a Restaurant from Palm Civet. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11* (12), 1860–1865. <https://doi.org/10.3201/eid1112.041293>.
- (8) Hijawi, B.; Abdallat, M.; Sayaydeh, A.; Alqasrawi, S.; Haddadin, A.; Jaarour, N.; Alsheikh, S.; Alsanouri, T. Novel Coronavirus Infections in Jordan, April 2012: Epidemiological Findings from a Retrospective Investigation. *East. Mediterr. Health J. Rev. Sante Mediterr. Orient. Al-Majallah Al-Sihhiyah Li-Sharq Al-Mutawassit* **2013**, *19* Suppl 1, S12-18.
- (9) WHO EMRO | MERS outbreaks | MERS-CoV | Health topics <http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html> (accessed 2021 -08 -14).
- (10) Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; Niu, P.; Zhan, F.; Ma, X.; Wang, D.; Xu, W.; Wu, G.; Gao, G. F.; Tan, W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382* (8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.
- (11) Bar-On, Y. M.; Flamholz, A.; Phillips, R.; Milo, R. SARS-CoV-2 (COVID-19) by the Numbers. *eLife* *9*, e57309. <https://doi.org/10.7554/eLife.57309>.
- (12) COVID-19 Map <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (accessed 2021 -06 -08).
- (13) Yi, Y.; Lagniton, P. N. P.; Ye, S.; Li, E.; Xu, R.-H. COVID-19: What Has Been Learned and to Be Learned about the Novel Coronavirus Disease. *Int. J. Biol. Sci.* **2020**, *16* (10), 1753–1766. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45134>.
- (14) Zhang, W.; Du, R.-H.; Li, B.; Zheng, X.-S.; Yang, X.-L.; Hu, B.; Wang, Y.-Y.; Xiao, G.-F.; Yan, B.; Shi, Z.-L.; Zhou, P. Molecular and Serological Investigation of 2019-NCoV Infected Patients: Implication of Multiple Shedding Routes. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9* (1), 386–389. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1729071>.

- (15) Guan, W.; Ni, Z.; Hu, Y.; Liang, W.; Ou, C.; He, J.; Liu, L.; Shan, H.; Lei, C.; Hui, D. S. C.; Du, B.; Li, L.; Zeng, G.; Yuen, K.-Y.; Chen, R.; Tang, C.; Wang, T.; Chen, P.; Xiang, J.; Li, S.; Wang, J.; Liang, Z.; Peng, Y.; Wei, L.; Liu, Y.; Hu, Y.; Peng, P.; Wang, J.; Liu, J.; Chen, Z.; Li, G.; Zheng, Z.; Qiu, S.; Luo, J.; Ye, C.; Zhu, S.; Zhong, N. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382* (18), 1708–1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>.
- (16) Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L.; Chen, H.-D.; Chen, J.; Luo, Y.; Guo, H.; Jiang, R.-D.; Liu, M.-Q.; Chen, Y.; Shen, X.-R.; Wang, X.; Zheng, X.-S.; Zhao, K.; Chen, Q.-J.; Deng, F.; Liu, L.-L.; Yan, B.; Zhan, F.-X.; Wang, Y.-Y.; Xiao, G.-F.; Shi, Z.-L. A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin. *Nature* **2020**, *579* (7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
- (17) Li, T.; Lu, H.; Zhang, W. Clinical Observation and Management of COVID-19 Patients. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9* (1), 687–690. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1741327>.
- (18) Krafcikova, P.; Silhan, J.; Nencka, R.; Boura, E. Structural Analysis of the SARS-CoV-2 Methyltransferase Complex Involved in RNA Cap Creation Bound to Sinefungin. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 3717. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17495-9>.
- (19) Bradrick, S. S. Causes and Consequences of Flavivirus RNA Methylation. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02374>.
- (20) Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K. S.; Goldsmith, J. A.; Hsieh, C.-L.; Abiona, O.; Graham, B. S.; McLellan, J. S. Cryo-EM Structure of the 2019-NCoV Spike in the Prefusion Conformation. *Science* **2020**, *367* (6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>.
- (21) Samudrala, P. K.; Kumar, P.; Choudhary, K.; Thakur, N.; Wadekar, G. S.; Dayaramani, R.; Agrawal, M.; Alexander, A. Virology, Pathogenesis, Diagnosis and in-Line Treatment of COVID-19. *Eur. J. Pharmacol.* **2020**, *883*, 173375. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173375>.
- (22) Agrawal, U.; Raju, R.; Udawadia, Z. F. Favipiravir: A New and Emerging Antiviral Option in COVID-19. *Med. J. Armed Forces India* **2020**, *76* (4), 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2020.08.004>.
- (23) Choy, K.-T.; Wong, A. Y.-L.; Kaewpreedee, P.; Sia, S. F.; Chen, D.; Hui, K. P. Y.; Chu, D. K. W.; Chan, M. C. W.; Cheung, P. P.-H.; Huang, X.; Peiris, M.; Yen, H.-L. Remdesivir, Lopinavir, Emetine, and Homoharringtonine Inhibit SARS-CoV-2 Replication in Vitro. *Antiviral Res.* **2020**, *178*, 104786. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104786>.
- (24) Yadav, M.; Dhagat, S.; Eswari, J. S. Emerging Strategies on in Silico Drug Development against COVID-19: Challenges and Opportunities. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *155*, 105522. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105522>.
- (25) Vincent, M. J.; Bergeron, E.; Benjannet, S.; Erickson, B. R.; Rollin, P. E.; Ksiazek, T. G.; Seidah, N. G.; Nichol, S. T. Chloroquine Is a Potent Inhibitor of SARS Coronavirus Infection and Spread. *Viol. J.* **2005**, *2*. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-69>.
- (26) Liu, J.; Cao, R.; Xu, M.; Wang, X.; Zhang, H.; Hu, H.; Li, Y.; Hu, Z.; Zhong, W.; Wang, M. Hydroxychloroquine, a Less Toxic Derivative of Chloroquine, Is Effective in Inhibiting SARS-CoV-2 Infection in Vitro. *Cell Discov.* **2020**, *6*, 16. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0156-0>.
- (27) Yao, X.; Ye, F.; Zhang, M.; Cui, C.; Huang, B.; Niu, P.; Liu, X.; Zhao, L.; Dong, E.; Song, C.; Zhan, S.; Lu, R.; Li, H.; Tan, W.; Liu, D. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of

- Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2020**. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa237>.
- (28) Agostini, M. L.; Andres, E. L.; Sims, A. C.; Graham, R. L.; Sheahan, T. P.; Lu, X.; Smith, E. C.; Case, J. B.; Feng, J. Y.; Jordan, R.; Ray, A. S.; Cihlar, T.; Siegel, D.; Mackman, R. L.; Clarke, M. O.; Baric, R. S.; Denison, M. R. Coronavirus Susceptibility to the Antiviral Remdesivir (GS-5734) Is Mediated by the Viral Polymerase and the Proofreading Exoribonuclease. *mBio* **2018**, *9* (2), e00221-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00221-18>.
- (29) Ghasemnejad-Berenji, M.; Pashapour, S. Favipiravir and COVID-19: A Simplified Summary. *Drug Res.* **2021**, *71* (3), 166–170. <https://doi.org/10.1055/a-1296-7935>.
- (30) Huchting, J.; Vanderlinden, E.; Winkler, M.; Nasser, H.; Naesens, L.; Meier, C. Prodrugs of the Phosphoribosylated Forms of Hydroxypyrazinecarboxamide Pseudobase T-705 and Its De-Fluoro Analogue T-1105 as Potent Influenza Virus Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (14), 6193–6210. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00617>.
- (31) Furuta, Y.; Takahashi, K.; Fukuda, Y.; Kuno, M.; Kamiyama, T.; Kozaki, K.; Nomura, N.; Egawa, H.; Minami, S.; Watanabe, Y.; Narita, H.; Shiraki, K. In Vitro and In Vivo Activities of Anti-Influenza Virus Compound T-705. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (4), 977–981. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.4.977-981.2002>.
- (32) Baranovich, T.; Wong, S.-S.; Armstrong, J.; Marjuki, H.; Webby, R. J.; Webster, R. G.; Govorkova, E. A. T-705 (Favipiravir) Induces Lethal Mutagenesis in Influenza A H1N1 Viruses In Vitro. *J. Virol.* **2013**, *87* (7), 3741–3751. <https://doi.org/10.1128/JVI.02346-12>.
- (33) Furuta, Y.; Takahashi, K.; Shiraki, K.; Sakamoto, K.; Smeets, D. F.; Barnard, D. L.; Gowen, B. B.; Julander, J. G.; Morrey, J. D. T-705 (Favipiravir) and Related Compounds: Novel Broad-Spectrum Inhibitors of RNA Viral Infections. *Antiviral Res.* **2009**, *82* (3), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.02.198>.
- (34) Vanderlinden, E.; Vrancken, B.; Van Houdt, J.; Rajwanshi, V. K.; Gillemot, S.; Andrei, G.; Lemey, P.; Naesens, L. Distinct Effects of T-705 (Favipiravir) and Ribavirin on Influenza Virus Replication and Viral RNA Synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (11), 6679–6691. <https://doi.org/10.1128/AAC.01156-16>.
- (35) De Clercq, E.; Neyts, J. Antiviral Agents Acting as DNA or RNA Chain Terminators. In *Antiviral Strategies*; Kräusslich, H.-G., Bartenschlager, R., Eds.; Příručka experimentální farmakologie; Springer: Berlin, Heidelberg, 2009; pp 53–84. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79086-0_3.
- (36) Clercq, E. D. The Acyclic Nucleoside Phosphonates (ANPs): Antonín Holý's Legacy. *Med. Res. Rev.* **2013**, *33* (6), 1278–1303. <https://doi.org/10.1002/med.21283>.
- (37) De Clercq, E. Acyclic Nucleoside Phosphonates: Past, Present and Future: Bridging Chemistry to HIV, HBV, HCV, HPV, Adeno-, Herpes-, and Poxvirus Infections: The Phosphonate Bridge. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73* (7), 911–922. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.09.014>.
- (38) De Clercq, E. Clinical Potential of the Acyclic Nucleoside Phosphonates Cidofovir, Adefovir, and Tenofovir in Treatment of DNA Virus and Retrovirus Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16* (4), 569–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.569-596.2003>.
- (39) Jones, D. J.; O'Leary, E. M.; O'Sullivan, T. P. An Improved Synthesis of Adefovir and Related Analogues. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15* (1), 801–810. <https://doi.org/10.3762/bjoc.15.77>.
- (40) Barral, K.; Priet, S.; Sire, J.; Neyts, J.; Balzarini, J.; Canard, B.; Alvarez, K. Synthesis, in Vitro Antiviral Evaluation, and Stability Studies of Novel Alpha-Borano-Nucleotide Analogues of 9-[2-(Phosphonomethoxy)Ethyl]Adenine and (R)-9-[2-

- (Phosphonomethoxy)Propyl]Adenine. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (26), 7799–7806.
<https://doi.org/10.1021/jm060030y>.
- (41) Jindřich, J.; Dvořáková, H.; Holý, A. Synthesis of Isomeric N-(3-Fluoro-2-Hydroxypropyl) and N-(2-Fluoro-3-Hydroxypropyl) Derivatives of Purine and Pyrimidine Bases. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1992**, *57* (7), 1466–1482.
<https://doi.org/10.1135/cccc19921466>.
- (42) Holý, A.; Rosenberg, I. Synthesis of 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)Adenine and Related Compounds. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1987**, *52* (11), 2801–2809.
<https://doi.org/10.1135/cccc19872801>.
- (43) Pomeisl, K.; Beier, P.; Pohl, R.; Krečmerová, M. Novel and Efficient Synthesis of Gem-Difluorinated Derivatives of Acyclic Nucleoside Phosphonates (ANPs). *ChemistrySelect* **2016**, *1* (10), 2102–2106. <https://doi.org/10.1002/slct.201600445>.
- (44) Jansa, P.; Baszczyński, O.; Procházková, E.; Dračínský, M.; Janeba, Z. Microwave-Assisted Hydrolysis of Phosphonate Diesters: An Efficient Protocol for the Preparation of Phosphonic Acids. *Green Chem.* **2012**, *14* (8), 2282–2288.
<https://doi.org/10.1039/C2GC35547G>.
- (45) Chen, W.; Flavin, M.; Xu, Z.-Q. Method for the Preparing [9-12-(Diethoxyphosphonomethoxy)Ethyl]Adenine and Analogues Thereof. 5,874,577, February 23, 1999.
- (46) Rajeshwaran, G. G.; Nandakumar, M.; Sureshbabu, R.; Mohanakrishnan, A. K. Lewis Acid-Mediated Michaelis–Arbuzov Reaction at Room Temperature: A Facile Preparation of Arylmethyl/Heteroarylmethyl Phosphonates. *Org. Lett.* **2011**, *13* (6), 1270–1273. <https://doi.org/10.1021/ol1029436>.
- (47) Shankar, R.; Yonkey, M.; Qi, Y.; Kamber, N. E. Organophosphorus Compounds for Flame Retardant Polyurethane Foams. WO2014056138 (A1), April 17, 2014.
- (48) Simões, A. V. C.; Pinto, S. M. A.; Calvete, M. J. F.; Gomes, C. M. F.; Ferreira, N. C.; Castelo-Branco, M.; Llop, J.; Pereira, M. M.; Abrunhosa, A. J. Synthesis of a New ¹⁸F Labeled Porphyrin for Potential Application in Positron Emission Tomography. In Vivo Imaging and Cellular Uptake. *RSC Adv.* **2015**, *5* (120), 99540–99546.
<https://doi.org/10.1039/C5RA16103G>.
- (49) 靳广毅. 3-Oxide-2-Methylamide Derivatives as Well as Preparation Method and Use Thereof. CN101230043A, July 30, 2008.