

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Medicinální chemie



**Simona Horkelová**

Syntéza nových nukleosidů jako potenciálních inhibitorů flavivirové replikace  
Synthesis of new nucleosides as potential inhibitors of flaviviral replication

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Radim Nencka, Ph.D.

Praha, 2022

**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, 17.5.2022

Podpis

## **Poděkování**

Chtěla bych velmi moc poděkovat svému vedoucímu skupiny a své práci Mgr. Radimu Nenckovi, Ph.D. za vedení této práce. Můj obrovský dík patří také Michalu Šálovi, Ph.D. za velmi cenné rady při syntéze látek, za trpělivost, za předání nespočetně vědomostí a ochotu mi pomoci v jakékoli situaci. Dále bych opravdu chtěla projevit dík Ing. Tomáši Otavovi za poznámky k vylepšení mé bakalářské práce. Poděkování patří také Milanu Dejmkovi, Ph.D. a mým kolegům ze skupiny.

Ještě bych chtěla poděkovat své rodině za neskutečně pevné nervy a nekonečnou podporu při celém mém dosavadním studiu.

## Abstrakt

Viry čeledi *Flaviviridae* jsou původci mnoha nebezpečných onemocnění, pro které v současné době neznáme léčbu a výzkum nových léčiv proti nim proto představuje jednu z významných výzev pro moderní medicínskou chemii. Pro boj s viry se nejčastěji využívá cílení na jimi kódované proteiny. U flavivirů se jako jeden z nejvhodnějších molekulárních cílů jeví nestrukturní protein NS5 vykazující enzymovou aktivitu methyltransferázy (MTáza) a RNA-dependentní-RNA-polymerázy (RdRp). Bakalářská práce pojednává o syntéze nových potenciálních léčiv schopných inhibice flavivirové RdRp. Byly připravovány C-nukleosidy obsahující dva typy heterocyklické báze: 3-fluoropikolinamid modifikovaný v polohách 5 nebo 6 a pyrido[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin modifikovaný v polohách 6 nebo 7 pomocí arylového nebo heteroaromatického substituentu.

Klíčová slova: *C-nukleosidy, polymeráza, flaviviry, virus klíšťové encefalitidy, Suzukiho reakce, Grignardova reakce*

## Abstract

Viruses of the Flaviviridae family are the causative agents of many dangerous diseases for which we currently have no known cure, and research into new drugs against them therefore represents one of the major challenges for modern medicinal chemistry. Targeting the proteins encoded by viruses is the most common approach to combat them. For flaviviruses, the non-structural protein NS5 exhibiting methyltransferase (MTase) and RNA-dependent-RNA polymerase (RdRp) enzyme activity appears to be one of the most suitable molecular targets. This bachelor thesis deals with the synthesis of new potential drugs capable of inhibition skill of flaviviral RdRp. C-nucleoside analogues were prepared, containing 2 types of heterocyclical base: 3-fluoropicolamide modified in positions 5 or 6 and pyrido[3,2-*d*]pyrimidine-4-amine modified in positions 6 or 7 using aryl or heteroaromatic substituent

Key words: *C-nucleosides, polymerase, flaviviruses, Tick-borne encephalitis virus, Suzuki reaction, Grignard reaction*

## Obsah

Prohlášení:.....	2
Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	4
Obsah.....	5
Použité zkratky.....	7
1. Úvod.....	9
2. Cíle práce.....	10
3. Přehled problematiky.....	11
3.1 Významné patogeny rodu <i>Flavivirus</i> .....	11
3.2 Struktura flavivirů.....	11
3.3 Životní cyklus.....	12
3.4 Strukturní a nestrukturní proteiny.....	13
3.4.1 Strukturní proteiny.....	14
3.4.2 Nestrukturní proteiny (NS).....	15
3.5 Replikace flavivirů.....	19
3.6 N- a C-nukleosidy.....	20
3.7 Inhibitory RdRp flavivirů.....	21
3.7.1 Nukleosidové inhibitory (NI).....	21
4. Výsledky a diskuse.....	26
4.1 Syntéza chráněného ribonolaktonu.....	26
4.2 Příprava 6-brom-3-fluorpikolinonitrilu.....	26
4.3 Syntéza halogenovaných C-nukleosidů s 3-fluorpikolinamidovým skeletem substituovaným v poloze 6.....	27
4.4 Syntéza halogenovaných C-nukleosidů s 3-fluorpikolinamidovým skeletem substituovaným v poloze 5.....	27
4.5 Syntéza finálních C-nukleosidů s 3-fluorpikolinamidovým skeletem substituovaným v poloze 6.....	28
4.6 Syntéza finálních C-nukleosidů s 3-fluorpikolinamidovým skeletem substituovaným v poloze 5.....	29
4.7 Syntéza C-nukleosidů s 4-aminopyrido[3,2- <i>d</i> ]pyrimidinovým skeletem substituovaným v poloze 6.....	30
4.8 Syntéza C-nukleosidů s 4-aminopyrido[3,2- <i>d</i> ]pyrimidinovým skeletem substituovaným v poloze 7.....	31

5.	Experimentální část.....	32
5.1	Obecné postupy a chemikálie .....	32
5.1.1	Obecné postupy.....	32
5.2	Postupy syntézy a naměřená data .....	34
6.	Závěr.....	47
7.	Literatura.....	48

## Použité zkratky

C – kapsidový protein (capsid)

DENV – virus horečky dengue

DMF – *N,N*-dimethylformamid

DMSO-*d6* – hexadeuteriodimethylsulfoxid

dppf – 1,1'-Bis(difenylfosfino)ferrocen

dsRNA – dvouvláknová RNA

E – obalový protein (envelope)

EC<sub>50</sub> – koncentrace, při které je žádaný efekt pozorován u 50 % případů

ER – endoplazmatické retikulum

ESI – ionizace elektrosprejem

GTP – guanosintrifosfát

HCV – virus hepatitidy typu C

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)

IAV – virus chřipky

*J* – interakční konstanta

JEV – virus japonské encefalitidy

kb – kilobáze

LDA – diisopropylamid lithný

M – membránový protein

mRNA – mediátorová RNA

MS – hmotnostní spektrum

MTáza – methyltransferáza

NI – nukleosidové inhibitory

NMP – *N*-methyl-2-pyrrolidon

NMR – nukleární magnetická rezonance

NS – nestrukturní protein

NTP – nukleosid trifosfát

PBD – proteinová databanka (protein data bank)

pr-M – prekursor proteinu membrány

RdRp – RNA-dependetní-RNA-polymeráza

RF – replikační forma

RI – replikující meziproduct

ROESY – typ měření 2D NMR spektroskopie (rotating frame nuclear overhauser effect spectroscopy)

RVO – rotační vakuová odparka

SAH – *S*-adenosylhomocystein

SAM – *S*-adenosylmethionin

ssRNA – jednovláknová RNA

TBDMSCl – *tert*-butyldimethylchlorsilan

TBDPSCl – *tert*-butyldifenylchlorsilan

TBEV – virus klíšťové encefalitidy (tick-borne encephalitis virus)

TEAB – triethylammonium bikarbonát

THF – tetrahydrofuran

TLC – chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)

TMS – tetramethylsilan

TMP – tetramethylpiperidinyl

UPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra performance liquid chromatography)

3'-UTR – 3'-nepřekládaná oblast (untranslated region)

WNV – virus západonilské horečky (west nile virus)

YFV – virus žluté zimnice (yellow fever virus)

ZIKV – virus zika (zika virus)

## 1. Úvod

Viry již od nepaměti způsobovaly nespočet závažných nemocí, a proto je protivirová terapie považována za enormně důležitou. Zásadou farmaceutického a lékařského výzkumu existuje proti mnoha virům specifická léčba, avšak pro viry z čeledi *Flaviviridae* musí být vhodná látka zabraňující jejich šíření teprve nalezena. Právě virům rodu *Flavivirus* z čeledi *Flaviviridae* a možným inhibitorům jejich replikace bude věnována pozornost v mé bakalářské práci.

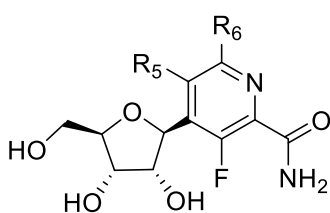
Mezi zástupce flavivirů přenášených komáry v tropických oblastech světa se řadí virus žluté zimnice (YFV), virus japonské encefalitidy (JEV), virus horečky dengue (DENV), virus západonilské horečky (WNV) a zika virus (ZIKV). Viry klíšťové encefalitidy (TBEV) patří mezi střeoevropské představitele.<sup>1</sup> Při hledání nových antivirových se jako úspěšná strategie uplatňuje cílení na proteiny, které jsou kódovány viry. Pro replikaci flavivirů v hostitelských buňkách je nepostradatelný NS5 nestrukturní protein obsahující doménu jak s metyltransferasovou aktivitou (MTáza) tak sloužící jako RNA dependentní RNA polymeráza (RdRp).<sup>2</sup> V lidském organismu nenalezneme funkční ekvivalent RdRp, což z enzymu dělá cíl pro možnou inhibici virové replikace.<sup>3</sup>

## 2. Cíle práce

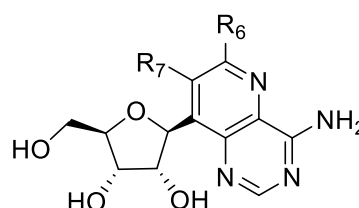
Hlavním cílem bakalářské práce byla příprava modelových C-nukleosidů obsahujících dva typy heterocyklické báze:

- 1) 3-fluorpyridinamid modifikovaný v polohách 5 nebo 6 pomocí arylového nebo heteroaromatického substituentu (Strukturní motiv A)
- 2) pyrido[3,2-*d*]pyrimidin-4-amin modifikovaný v polohách 6 nebo 7 pomocí arylového nebo heteroaromatického substituentu (Strukturní motiv B)

Jako modelové substituenty byly zvoleny *p*-methoxyfenylový a 3-thienylový zbytek.



Strukturní motiv A



Strukturní motiv B

Připravené nukleosidy budou následně podrobeny biologickým testům jejich antivirové aktivity (TBEV, DENV, SARS-CoV-2).

### 3. Přehled problematiky

#### 3.1 Významné patogeny rodu *Flavivirus*

Viry čeledi *Flaviviridae*, kam řadíme i zástupce rodu *Flavivirus*, jsou malé obalené částice způsobující celou řadu vážných nemocí. Čeď se skládá ze čtyř základních rodů, jimiž jsou hepatitidy, pestiviry, pegiviry a již zmíněné flaviviry.<sup>1</sup>

Rod je tvořen více než sedmdesáti druhy virů, jež jsou přenášeny komáry a klíšťaty.<sup>4</sup> Primárními hostiteli těchto virů jsou savci a ptáci. Infekce u člověka může probíhat bez symptomů, ale může být i smrtelná. Vážné formy nemoci se projevují hemoragickou horečkou nebo neurologickým onemocněním. Mezi flaviviry napadající člověka řadíme například zika virus (ZIKV), virus horečky dengue (DENV), virus klíšťové encefalitidy (TBEV), virus žluté zimnice (YFV), virus japonské encefalitidy (JEV) a virus západonilské horečky (WNV).<sup>1</sup> Právě WNV byl roku 1937 popsán jako první člověka napadající virus.<sup>5</sup>

Zatímco v Evropě je nejrozšířenějším zástupcem TBEV, YFV a JEV stále ohrožují dnešní populaci Afriky a Asie. YFV a JEV jsou společně se ZIKV přenášeny prostřednictvím komárů z rodu *Aedes*.<sup>5</sup>

Virus dengue napadající ročně téměř 390 milionu lidí se považuje za nejvíce prominentní virus mezi flaviviry, přičemž zhruba u dvaceti tisíc případů ročně je infekce letální.<sup>5</sup> Při vážném průběhu nemoci je nezbytná pokročilá lékařská péče, což může být velký problém v oblastech rozvojových zemí. Možnost očkování by přinesla velkou pomoc, a proto je vývoj vakcín v posledních letech velmi intenzivní. Jelikož u viru dengue existují čtyři velmi podobné sérotypy (DENV1–DENV4), na které by vakcína měla být účinná, je hledání správné látky obtížné z důvodu možné interference mezi vyvolanými imunitními reakcemi. V roce 2016 byla uvedena komerčně dostupná tetravalentní živá oslabená chimérická vakcína proti DENV.<sup>5</sup> Ačkoli proti YFV, JEV a TBEV již vakcíny existují případy nákazy jsou stále velmi časté. Naneštěstí nejsou dostupná žádná antivirotika, která by poskytla specifický krátkodobý účinek a v případě zika viru i minimalizovala neurologické poruchy plodu.

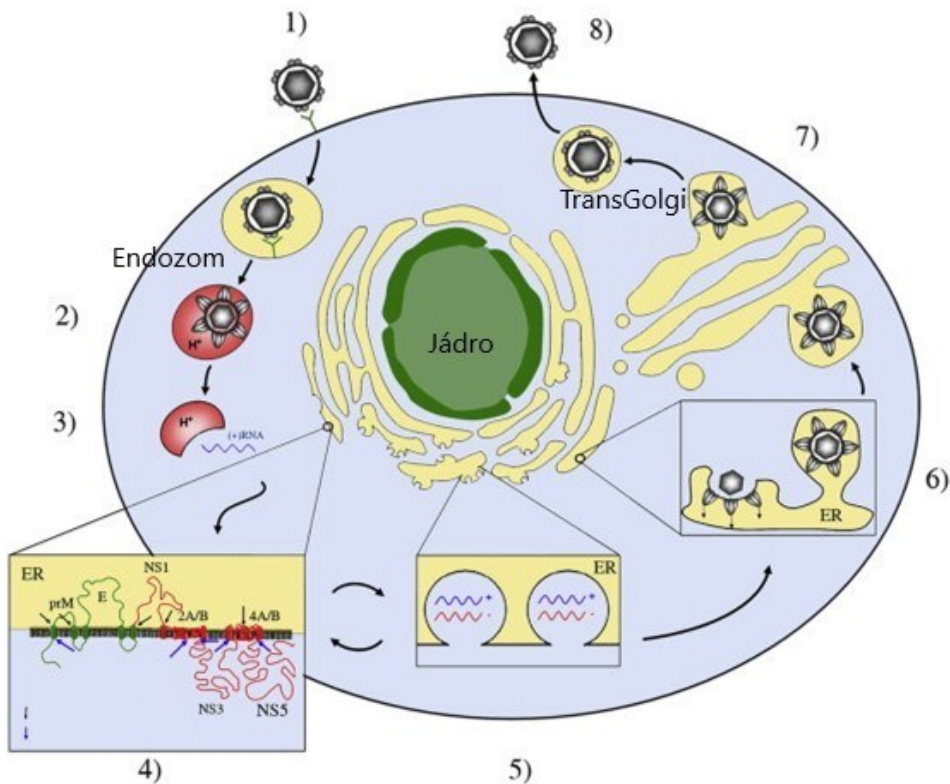
#### 3.2 Struktura flavivirů

Kulovité viriony flavivirů mají průměr asi 500 Å (~50 nm) a jsou chráněny lipidovým obalem. Skládají se z nukleové kyseliny, kapsidy a dvou až tří obalových proteinů. Genetická informace je nesena pomocí nesegmentovaného jednovláknového RNA řetězce s pozitivní polaritou (+ssRNA) obsahující asi 11 kb (kilobází). Genom obsahuje jeden dlouhý otevřený čtecí rámec kódující jediný polyprotein.<sup>6</sup> N-koncová část genomu kóduje tři strukturální proteiny

– kapsidu (C), membránu (M, vznikající z prekursoru prM) a obal (E), které tvoří částici viru. C-koncová část kóduje sedm nestrukturních proteinů (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5)<sup>5</sup> nezbytných pro replikaci viru. Protein C tvořící nukleokapsidu je složen asi z 120 aminokyselin nezbytných při zabalení virového genomu. Glykoprotein PrM tvořený asi 165 aminokyselinami a E složený asi z 495 aminokyselin obsahují každý dva transmembránové helixy.<sup>7</sup> Protein E je hlavní strukturní složkou přítomnou ve virové částici a účastní se klíčových kroků během životního cyklu viru, jako je navázání a vstup do hostitelských buněk.<sup>5</sup> Iniclace translace je umožněna čepičkou typu 1 (m<sup>7</sup>GpppAmp) nacházející se na 5' konci.<sup>8</sup> 3' konec není ukončen polyadenylátovou sekvencí vyjma pár kmenů TBEV.<sup>9</sup>

### 3.3 Životní cyklus

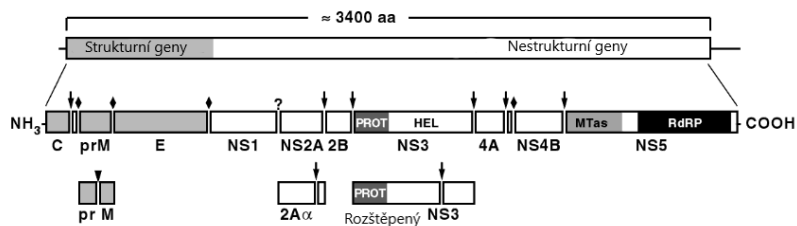
Flaviviry se váží k povrchu hostitelských buněk a prostřednictvím receptorem zprostředkované endocytózy vstupují do buňky.<sup>5</sup> Kyselé pH v časných endozomálních váčcích spouští nevratnou konformační změnu virionu – trimerizaci proteinu E vedoucí k fúzi membrány virové a buněčné. Po zániku kapsidy je genom viru uvolněn do cytoplazmy. Nejprve dochází k translaci. RNA se převede do jediného polyproteinu, ze kterého vzniká komplex umístěný na intracelulárních membránách obsahující všechny potřebné enzymy pro správnou virovou replikaci. Polyprotein se zpracovává kotranslační a posttranslační cestou pomocí virových a hostitelských proteáz: dochází k disociaci C kapsidového proteinu i RNA a je zahájena replikace probíhající na intracelulárních membránách. Replikace flavivirů probíhá pomocí dvou transkripčních kroků. Produktem prvního kroku je řetězec RNA s negativní polaritou, který je dále transkribován na výsledný řetězec RNA s pozitivní polaritou.<sup>6</sup> Nové nezralé neinfekční viry se nejprve tvoří v lumenu endoplazmatického retikula (ER). Neinfekční z důvodu, že nemohou indukovat fúzi hostitelských buněk. Tyto částice obsahují proteiny E a prM. Po rozštěpení prM na M v trans-Golgi síti dochází ke vzniku zralých již infekčních virů. V napadené buňce dochází v ER též ke vzniku subvirových částic. Z důvodu chybějící genomové RNA a kapsidového proteinu C nejsou infekční. Subvirové částice a infekční viry jsou uvolněny z buňky exocytózou a může dojít k napadení dalších buněk.<sup>7</sup> Všechny kroky životního cyklu flavivirů jsou popsány na obrázku 1.



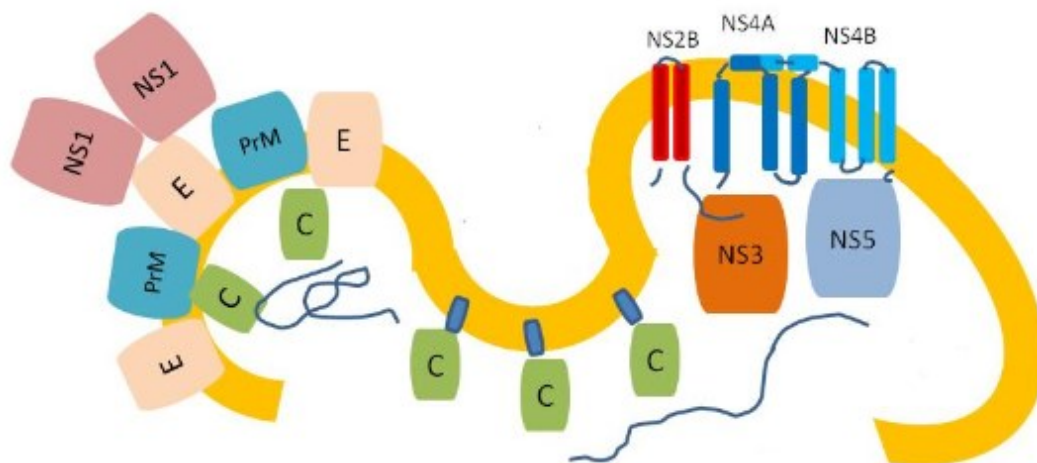
**Obrázek 1:** Klíčové kroky flavivirového životního cyklu: 1) Navázání virionu na receptor v buněčné membráně a endocytóza, 2) transport v časných endozomech kde se snižuje pH, 3) uvolnění genomu do cytoplazmy, 4) translace a zpracování polyproteinu hostitelem a proteiny kódovanými virem (místa štěpení a topologie strukturálních proteinů znázorněna zeleně a nestrukturálních proteinů červeně) na endoplazmatickém retikulu, 5) sestavení replikačního komplexu a přepsání templátu RNA (-) na RNA (+), 6) balení virionů na povrchu ER po kterém následuje pučení strukturálních proteinů a nově syntetizované RNA do lumen ER, 7) transport virionů do trans-Golgiho aparátu, kde je furinem zprostředkované štěpení prM na M, čímž vznikají zralé infekční částice, 8) uvolnění exocytózou. (Obrázek i popis byl převzat od Fernandez-Garcia, M. D. a dalších)<sup>10</sup>

### 3.4 Strukturální a nestrukturální proteiny

Jak již bylo řečeno, genomy flavivirů (viz Obrázek 2) kódují jediný polyprotein, který po štěpení vede ke třem strukturálním proteinům (obalový protein E, kapsidový protein C a prekurzorový membránový protein prM) a sedmi nestrukturálním proteinům (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5).<sup>2</sup> Znázornění jednotlivých proteinů v membráně ER je naznačeno na obrázku 3.



**Obrázek 2:** Genom flavivirů. Translací genomu dochází ke vzniku polyproteinu, jež je proteolytickými reakcemi rozdělen na jednotlivé proteiny viru. V levé N-koncové části se nachází strukturální proteiny označené šedou barvou, zatímco v pravé C-koncové části se nachází bíle značené proteiny nestrukturální. Symbol ♦ označuje místa, kde dochází ke štěpení pomocí hostitelské proteasy, konkrétně pomocí signální peptidázy. Symbol ↓ označuje místa, kde dochází ke štěpení pomocí virové proteasy, konkrétně pomocí NS2B-3 proteázy. Symbol ? mezi NS1 a NS2A značí, že dosud není jasné zda virová či hostitelská proteáza toto štěpení poskytuje. Symbol ▼ mezi pr a M označuje místo štěpení pomocí proteázy Golgiho aparátu.<sup>1</sup> (Obrázek převzat od Chambers, T. M. a dalších)<sup>6</sup>



**Obrázek 3:** Postavení jednotlivých proteinů v membráně ER. V levé části jsou zobrazené proteiny nezbytné ke správnému složení virové částice a v pravé části jsou proteiny replikačního komplexu.<sup>11</sup>

### 3.4.1 Strukturální proteiny

Kapsidový protein C se vyznačuje malou velikostí přibližně 14 kDa. Skládá se z nabitých bazických reziduí na N- a C-koncích a vnitřní hydrofobní domény. Po posttranslační modifikaci dochází ke vzniku jeho rozpustné formy.<sup>12</sup> C protein je složen ze čtyř alfa helixů. Po odštěpení hydrofobní domény pomocí virové proteasy pravděpodobně právě jeden z  $\alpha$  helixů hraje významnou roli při vzniku kompaktních dimerů ze kterých se skládá nukleokapsida.<sup>13</sup>  $\alpha$  Helixy

obou monomerů spolu asociují pro vznik kladně nabitého povrchu na N-konci, který pomáhá stabilizovat RNA molekulu.<sup>12</sup>

Flavivirový glykoprotein E je vázán na membránu. Jeho velikost se odhaduje na 53 kDa, čímž se řadí mezi velké proteiny. Tento komponent zprostředkovává fúzi membrány a navazování virionu na receptor hostitelské buňky.<sup>6</sup> Protein E je syntetizován jako membránový protein skládající se ze tří  $\beta$ -barelových strukturních domén.<sup>12</sup> Všechny tři domény se pravděpodobně podílí na vytváření homodimeru paralelního s obalem viru pomocí hydrofilních interakcí ve zralých virových částicích.<sup>6</sup> Protein E je nejprve stabilizován pomocí pM na lumenálním povrchu ER membrány, avšak tyto vzniklé heterodimery působením nízkého pH podléhají konformační změně. Peptid pM je vyříznut a vzniká zralý kulovitý virion mající na svém povrchu vystavený hotový protein E.<sup>12</sup>

Glykoprotein pM, prekurzor membránového proteinu (M) flavivirů má velikost 26 kDa,<sup>6</sup> přičemž samotný M protein je velký maximálně 10 kDa,<sup>12</sup> přičemž pM funguje s největší pravděpodobností jako pomocný protein při skládání a stabilizaci proteinu E. Jeho další úloha spočívá v ukrývání fúzní smyčky proteinu E při nízkém pH v průběhu sekrečních drah.<sup>6</sup>

### 3.4.2 Nestrukturní proteiny (NS)

Flavivirové nestrukturní proteiny jsou nezbytné pro správnou virovou replikaci. Všechny sedm nestrukturních proteinů se podílí na formaci replikačního komplexu.<sup>13</sup>

#### 3.4.2.1 NS1-NS4

Nestrukturní protein NS1 s velikostí 46 kDa je známý již velmi dlouho. NS1 je translokován do lumenu endoplazmatického retikula pomocí proteinu E<sup>6</sup>, kde je následně zpracován hostitelskou peptidázou. Nedlouho po syntéze je protein odštěpen z NS2A proteázou zatím neznámého původu. Glykoprotein NS1 vytváří homodimery a interaguje s membránami doposud neznámým mechanismem.<sup>14</sup> Nestrukturní protein NS1 může tvořit i hexamerní uskupení spojené s lipidem.<sup>2</sup> Navzdory své lokalizaci mimo cytoplazmu je NS1 nepostradatelnou složkou při virové replikaci. Pro jeho správnou funkci je nezbytná interakce s NS4A.<sup>14</sup>

Nestrukturní transmembránový hydrofobní protein NS2A mající velikost 22 kDa je obvykle asociován s ER, v němž se podílí na virové replikaci vazbou na 3'-UTR části virové RNA a další složky replikačního komplexu. NS2A je důležitý pro složení virové částice.<sup>2</sup> NS2B je

protein o velikosti 14 kDa asociovaný s membránou. Jeho hlavní funkce byla stanovena jako kofaktor pro serinovou proteázu, ve které figuruje s NS3.<sup>13</sup>

Vícedoménový NS3 (70 kDa) funguje jako hydroláza, helikáza, serinová proteáza a fosfatáza.<sup>15</sup> Jeho N-koncová doména vykazuje aktivitu serinové proteázy zajišťující proteolytické štěpení mezi NS2A a NS2B, NS2B a NS3, NS4A a NS4B, NS4B a NS5.<sup>2</sup> V C-koncové části se nachází společná doména helikázy a fosfatázy, přičemž konkrétně se jedná o nukleosidtrifosfatázy (NTPázy) a 5'-RNA-trifosfatázy (RTPázy).<sup>16</sup> Jak již bylo zmíněno NS3 vyžaduje kofaktor NS2B pro správnou funkci a složení.

O malém NS4A hydrofobním proteinu s velikostí přibližně 16 kDa<sup>6</sup> existuje jen velmi málo dostupných informací co se struktury a funkce týče. Známé schopnosti NS4A jsou tlumení interferonové signalizace, vyvolání změny membrán a autofagie.<sup>2</sup> I NS4B (27 kDa) se řadí mezi membránové proteiny.<sup>6</sup> NS4B interaguje s dalšími hostitelskými i virovými proteiny a jeho funkce jsou stejné jako u proteinu NS4A.<sup>2</sup>

### 3.4.2.2 NS5

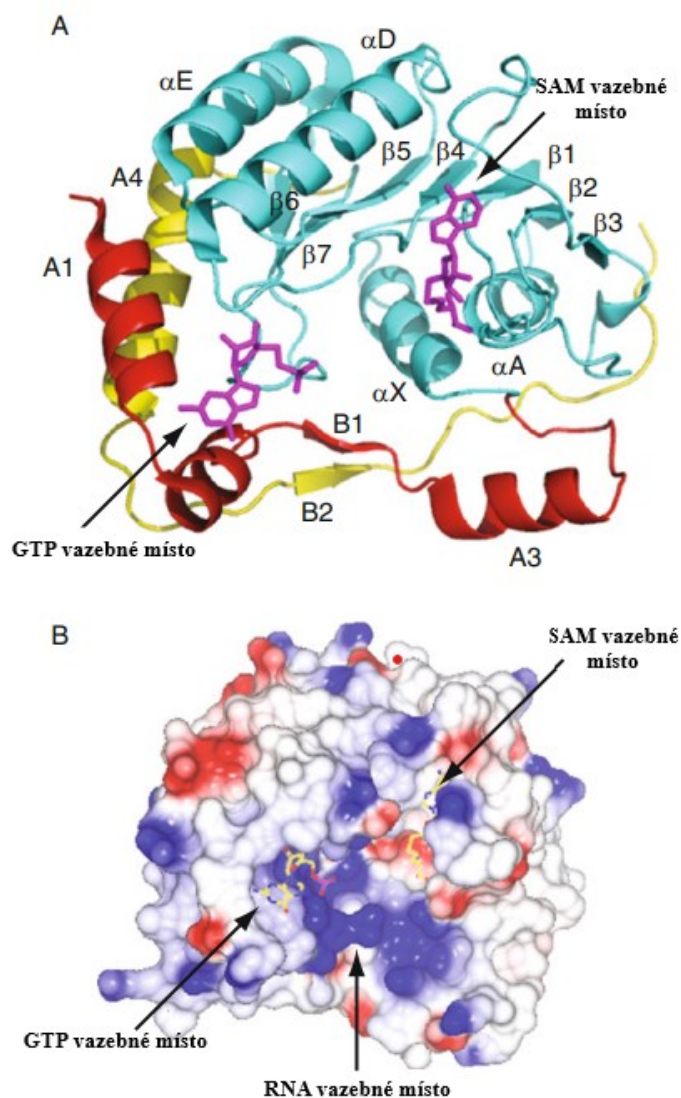
Multifunkční NS5 je největší (103 kDa) protein zapojený do replikace RNA flavivirů. NS5 je složen ze dvou domén propojených krátkou aminokyselinovou sekvencí.<sup>2</sup> N-terminální oblast obsahuje methyltransferázovou (MTázovou) doménu, kde se nachází i aktivní místo pro molekuly guanosintrifosfátu (GTP) vázajících se při reakcích katalyzovaných GTPázou.<sup>17</sup> C-koncová část zahrnuje doménu RNA-dependentní RNA polymerázy (RdRp). Je dokázáno, že NS5 může podléhat fosforylaci a následné asociaci se serin/threoninovými kinázami.<sup>6</sup>

#### 3.4.2.2.1 MTázová doména

MTáza v N-terminální oblasti (60-132 aminokyselin)<sup>6</sup> má za úkol metylaci posttranskripční modifikace čepičky virové RNA, což je nezbytná operace, aby se virus vyhnul reakci imunitního systému. V průběhu methylace se viroví RNA a donor methyly, jímž je *S*-adenosyl-L-methionin (SAM) naváží na MTázu. Následně se vytvoří na 5'-konci čepička typu 1 (m<sup>7</sup>Gpppm<sup>2</sup>'A), metylací N7 polohy guaninu a 2'-OH skupiny adenosinu. Tyto methylační kroky jsou nezbytné pro replikaci viru, a jejich narušení může proto vést k zastavení šíření viru.<sup>18</sup>

MTáza se skládá z  $\beta$ -řetězců, jež jsou obklopeny čtyřmi  $\alpha$ -helixy, jak můžeme vidět na obrázku 4. Jelikož všechny MTázy flavivirů sdílejí obdobnou strukturu a sekvenci, je šance

na vývoj širokospektrého inhibitoru, který by mohl inhibovat replikaci velkého počtu těchto patogenů poměrně vysoká.



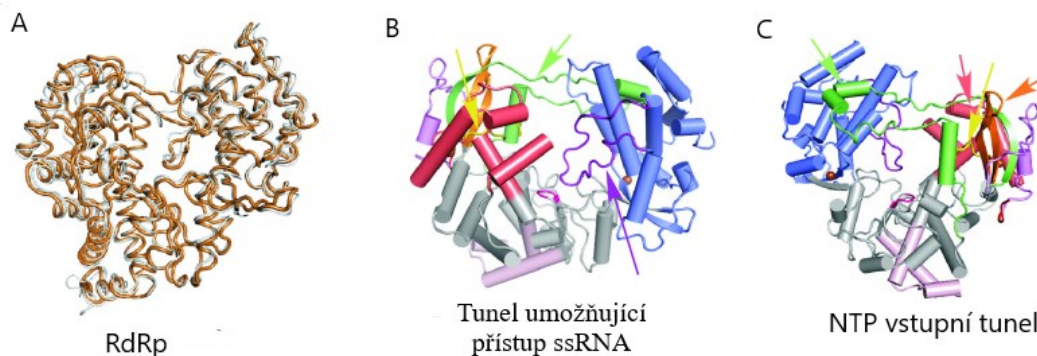
**Obrázek 4:** DENV-2 MTáza. A) Schématické znázornění struktury DENV-2 MTázy s vloženou molekulou GTP v jejím vazebném místě a s navrženým inhibitorem (fialově nakreslená struktura-PBD kód 2P1D) v SAM vazebném místě. Červená barva označuje N-terminální část, modrá jádro a žlutá C-terminální subdoménu MTázy. B) Povrch DENV-2 MTázy. Modrá barva označuje pozitivní náboj, bílá neutrální a červená negativní. (Obrázek a popis převzat od Davidson, A. D. a dalších)<sup>19</sup>

### 3.4.2.2 RdRp doména

NS5 RdRp doména je zodpovědná za syntézu RNA *de novo* mechanismem. Během infekce dochází k syntéze řetězce RNA s negativní polaritou, který je použit jako templát pro syntézu +ssRNA.<sup>18</sup>

Strukturou RdRp připomíná pravou ruku a skládá se ze tří subdomén běžně označovaných jako „prsty“, „dlaň“ a „palec“. Jednotlivé části jsou znázorněny na obrázku 5. Z oblasti prstů (Obrázek 5B a 5C, označeny zelenou, oranžovou, žlutou) vyčnívají smyčky, které obepínají aktivní místo na dlani (Obrázek 5B a 5C, šedá) a nejspíš stabilizují molekulu RNA. Dále lze ve struktuře pozorovat dva vzájemně kolmé tunely. První se nachází na rozhraní mezi oblastí prstů a palce (Obrázek 5B a 5C, modrá) a pravděpodobně umožňuje přístup ssRNA k aktivnímu místu a její koordinaci. Druhý tunel otevírá do zadní části struktury, kde koordinuje vznikající dvouvláknovou RNA<sup>19</sup> a zároveň umožňuje přístup NTP.<sup>20</sup> RdRp doména rovněž váže dva zinečnaté ionty, jeden na prstové a druhý na palcové doméně. Společně se dvěma asparagovými kyselinami katalyzují přenos nukleotidu na rostoucí RNA řetězec.<sup>21</sup> Na dlani se nachází aktivní místo polymerázy, které koordinuje dva hořečnaté ionty nezbytné pro katalýzu polymerační reakce.<sup>3</sup> Zajímavostí této polymerace je, že NTP je použit jako primer pro polymeraci.<sup>22</sup>

Ve struktuře RdRp se nachází sedm strukturních motivů A-G zodpovědných za navázání a katalýzu vazby NTP. Motivy A a C obsahující kyselinu asparagovou jsou zodpovědné za polymeraci nukleotidu. Motiv B napomáhá pohybu templátového řetězce v pozdějších stádiích transkripce. Motiv D je nezbytný pro reorganizaci RdRp pro vznik RNA-NTP-UTP komplexu. Motivy E a C interagují s kostrou RNA produktu. Funkce motivu F složeného ze tří až čtyř submotivů zahrnuje navázání kmenové smyčky před replikací virové RNA a pomoc stabilizace vznikajícího páru bází. Motiv G, též nazývaný jako „primingová smyčka“, vytváří smyčku pro vznik v pořadí prvního dinukleotidu nezbytného pro *de novo* syntézu. Dále reguluje přístup ssRNA substrátu do místa pro templát a RdRp translokaci.<sup>20</sup> RdRp doména je znázorněna na obrázku 5.

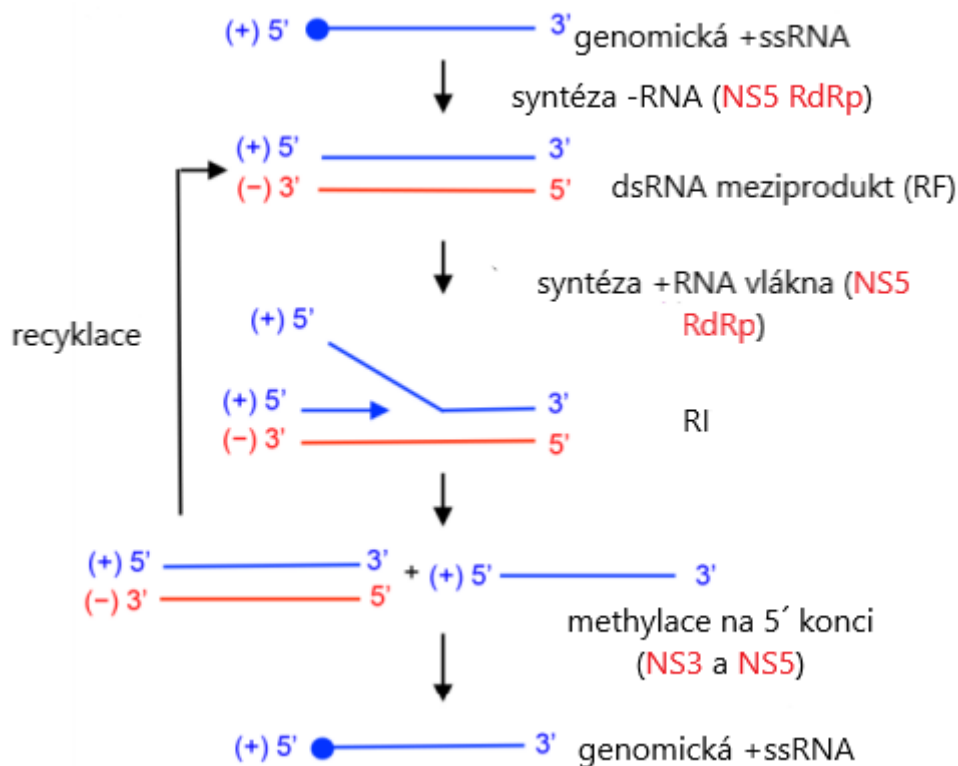


**Obrázek 5:** Struktura RdRp TBEV. A) Schéma RdRp oranžově nakreslené pro TBEV a šedou barvou zakreslené pro DENV/WNV. B) Schématické znázornění struktury RdRp TBEV v pohledu do tunelu umožňující přístup ssRNA k aktivnímu místu. Červenou barvou je znázorněn linker, oblast dlaně je znázorněna šedou barvou, N-terminální prodloužení je označeno světle fialovou. Jednotlivé prsty v prstové oblasti jsou značeny zelenou, oranžovou, žlutou a palec je značen modře. Motiv G je označen tmavě fialově, B-C motiv je označen růžově. C) Schématické znázornění struktury RdRp TBEV v pohledu NTP vstupního tunelu. Jedná se o stejnou strukturu jako za B) pouze otočenou o 180 °. (Obrázek a popis převzat od Yang, J. a dalších)<sup>23</sup>

### 3.5 Replikace flavivirů

Proces replikace probíhá v cytoplazmě hostitelských buněk.<sup>24</sup> Syntéza u flavivirů je semikonzervativní a asymetrická. Genom viru má stejnou sekvenci jako vzniklý +ssRNA řetězec. Syntéza +ssRNA výrazně převažuje nad syntézou -ssRNA. RNA řetězec s negativní polaritou je *in vivo* detekován pouze jako dsRNA. V průběhu replikace dochází ke vzniku tří forem RNA: +ssRNA, dsRNA v replikační formě (RF) a dsRNA ve formě replikujícího meziproductu (RI). Právě RI pravděpodobně obsahuje rodící se RNA na templátu RF, které stále hybridizuje také s dříve existujícím vláknem stejné polarity. Na jedné RF šabloně se syntetizuje vždy jeden až deset vznikajících řetězců RNA s pozitivní polaritou.<sup>25</sup>

Proces replikace probíhá následovně. Nejprve je genomická +ssRNA použita jako templát pro NS5 RdRp, která vytvoří komplementární -RNA vlákno. To zůstává spárované s +RNA řetězcem, čímž vzniká meziproduct dsRNA (RF). Podle -RNA vznikne nové komplementární vlákno +RNA. Pro uvolnění dsRNA vlákna je nutná aktivita NS3 helikázy. Vznikající +RNA vlákno nasyntetizované na -RNA teplátu vytěšňuje již existující +RNA z komplexu (RI). Nově vytvořená dsRNA je recyklována jako šablona pro vznik dalších kopií. Následně je RNA vlákno methylováno pro vytvoření nového konečného genomického +ssRNA vlákna. Jednotlivé kroky replikace jsou znázorněny na obrázku 6.<sup>25</sup>



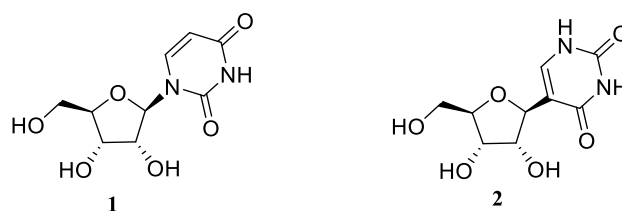
**Obrázek 6:** RNA syntéza pomocí replikačního komplexu flavivirů. Červeně jsou znázorněny nezbytné enzymy.

Pro syntézu čepičky typu 1 jsou využity čtyři sekvenční enzymatické aktivity RNA, a to RTpázy, guanylyltransferázy, guanin-N7-MTázy a RNA 2'-O-MTázy. Trifosfatáza NS3 pomocí helikázy uvolňuje konečný fosfát z 5'-trifosfátového konce (+) vlákna RNA. Guanosenmonofosfát (GMP) z GTP se přenáší na 5'-konec difosforylované RNA mechanismem guanylyltransferázy. Vzniklá RNA je pak methylována nejprve na pozici N7 guaninového konce a následně na prvním nukleotidu RNA na ribóze v poloze 2'-OH. MTázová doména NS5 provádí obě methylace pomocí SAM jako donoru methylového zbytku, přičemž vedlejším produktem reakce je *S*-adenosyl-L-homosystein (SAH).<sup>25</sup>

### 3.6 N- a C-nukleosidy

Běžné nukleosidy jsou podjednotky DNA nebo RNA a váží se pomocí  $\beta$ -*N*-glykosidické vazby z uhlíku cukru v pozici 1' na dusík příslušné báze (N<sub>1</sub> pyrimidin, N<sub>9</sub> purin). Tyto běžné nukleosidy by se daly označit jako N-nukleosidy (1).<sup>26</sup>

C-nukleosidy, na jejichž syntézu je praktická část této práce zaměřena, mají vazbu mezi anomerním uhlíkem cukerné skupiny a uhlíkem báze (2). Zástupci N- a C-nukleosidů jsou znázorněny na obrázku 7. Obrovská výhoda C-nukleosidů je odolnost proti degradaci hydrolázami, které umí štěpit N-glykosidickou vazbu.<sup>26</sup>



**Obrázek 7:** Zástupce N-nukleosidů uridin (1) a zástupce C-nukleosidů pseudouridin (2)

### 3.7 Inhibitory RdRp flavivirů

Tradičně bývají jako cíl na potenciální inhibitor brána dvě místa: vstup do tunelu pro RNA a takzvaná „kapsa N“ nacházející se v palcové doméně poblíž aktivního místa.<sup>18</sup> Látky využívající se jako inhibitory jsou buď analogy nukleosidů nebo látky nenukleosidové povahy.

Jako nukleosidové inhibitory jsou využívány látky soutěžící s endogenními NTP o navázání do nově vzniklého RNA řetězce. Vazba takovýchto analogů může způsobit předčasné ukončení replikace či letální mutaci virové RNA. Vývoj nových potenciálních látek čelí dvěma velkými problémům, a to intracelulární aktivaci a toxicitě. Příchozí nukleosid musí být kinázami aktivován fosforylací na trifosfátovou formu. Hostitelské kinázy jsou však značně substrátově specifické. Použití již monofosfátové formy naráží na problém rozpustnosti a možné degradace hostitelskými enzymy.<sup>18</sup>

Nenukleosidové inhibitory využívají většinou alosterického efektu, přičemž dochází ke změnám konformace aktivního místa a tím k deaktivaci RdRp.<sup>27</sup>

#### 3.7.1 Nukleosidové inhibitory (NI)

Právě nukleosidové analogy jsou nejčastěji využívány k inhibici flavivirové RdRp. Lidské enzymy postrádají aktivitu RdRp, čímž by nové sloučeniny měly vykazovat méně vedlejších účinků.<sup>3</sup>

NI není možné používat ve formě aktivních trifosfátů. Trifosfátové analogy jsou nabitě molekuly, které neprocházejí přes buněčnou membránu. Vstupující nukleosid je za pomoci hostitelských kináz intracelulárně fosforylován na trifosfát.<sup>28</sup>

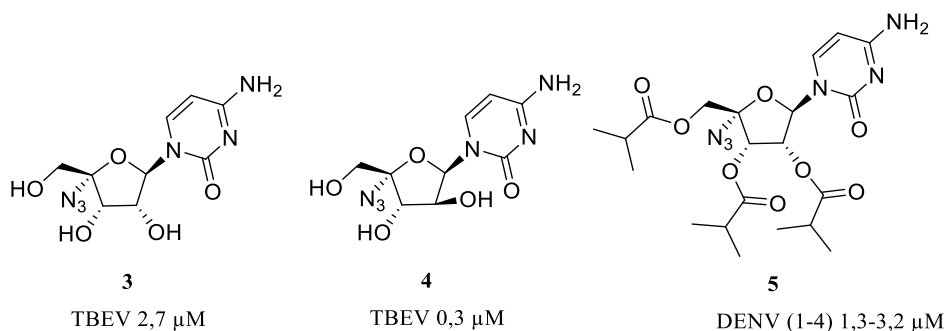
##### 3.7.1.1 4'Azidonukleosidy

Vědci z farmaceutické společnosti Roche zaznamenali, že několik cytidinových analogů s azidovou skupinou v pozici 4' má velmi silnou schopnost inhibovat replikaci viru hepatitidy

typu C (HCV).<sup>29</sup> Zároveň dle testů bylo prokázáno, že látky jsou též účinné proti henipavirům.<sup>30</sup> Dva známé modifikované nukleosidové analogy 4'-azidocytidin (3) a 4'-azido-aracytidin (4) vykazovaly i proti TBEV mikromolární antivirovou aktivitu *in vitro*.<sup>31</sup>

Proti TBEV byla úspěšná inhibice látkou 4 překvapením, jelikož neobsahuje ribózovou strukturu, což bylo považováno za klíčový prvek pro správnou funkci vodíkových vazeb při interakci s RdRp.<sup>3</sup>

Esterový derivát 4'-azidocytidin (5) označený jako Balapiravir byl *in vitro* neaktivní proti TBEV pravděpodobně z důvodu špatné interakce s aktivním místem či nedostatečné fosforylaci kinázami v použitých buněčných liniích. Oproti tomu bylo však první antivirotikum testované na DENV klinickými testy, kde byla *in vitro* potvrzena silná inhibiční činnost pro různé sérotypy.<sup>3</sup> Bohužel *in vivo* nebyla látka proti DENV účinná, jelikož virus produkuje cytokiny, které snižují přeměnu Balapiraviru na jeho trifosfátovou formu.<sup>32</sup>

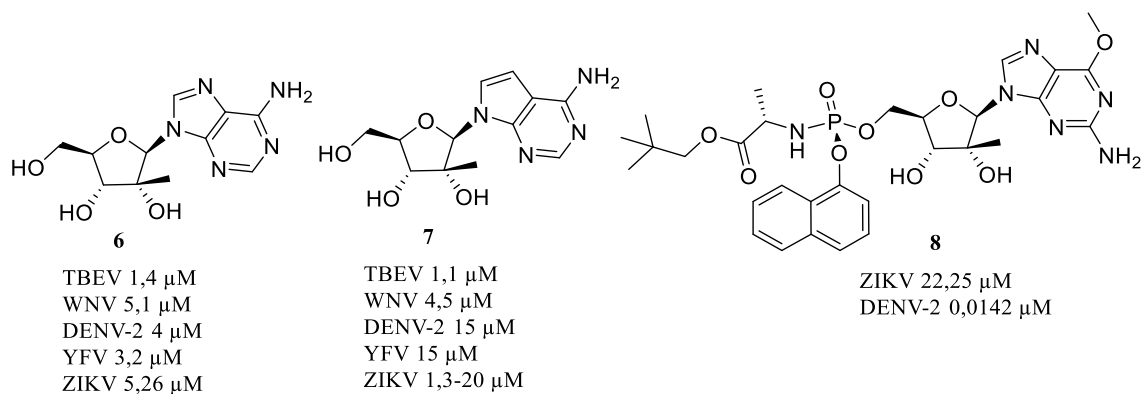


**Obrázek 8:** 4'-Azidonukleosidy vykazující aktivitu proti flavivirům a jejich hodnoty EC<sub>50</sub>: (3) R-1479, (4) RO-9187, (5) Balapiravir

### 3.7.1.2 2'-Methylnukleosidy

Výzkumnou laboratoří společnosti Merck byly nasyntetizovány 2'-metylnukleosidové skelety, jež byly potvrzeny jako silné inhibitory replikace HCV.<sup>33</sup> Antivirová aktivita byla také zaznamenána u zástupců čeledí *Picornaviridae* a *Caliciviridae*, čímž by tyto látky mohly být širokospektrální vůči ssRNA virům s pozitivně polarizovaným řetězcem.<sup>3</sup>

U flavivirové rodiny byla velmi dobrá mikromolární inhibice díky 2'-methylové skupině zaznamenána především u TBEV, WNV, DENV a YFV.<sup>3</sup> U látky 6-O-methyl-2'-methylguanosinu (8) byla zaznamenána nanomolární inhibiční aktivita proti DENV-2 (EC<sub>50</sub> 14,2 nM), přičemž kombinace této látky a léku ribavirin vedla ke značné inhibici DENV *in vitro*.<sup>34</sup> Prvním popsáním nukleosidovým inhibitorem proti ZIKV byl 7-deaza-2'-methyladenosin (7),<sup>35</sup> přičemž příslušné trifosfátové analogy vykazovaly silnou inhibici ZIKV polymerázy.<sup>3</sup>



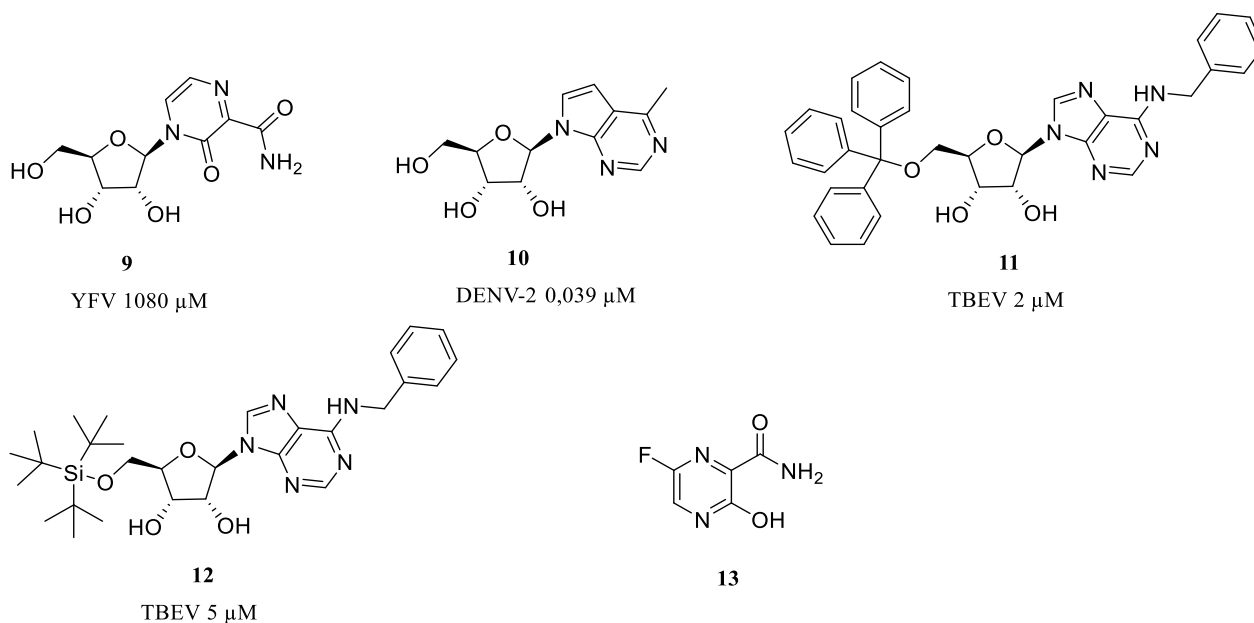
**Obrázek 9:** 2'-methylnukleosidy vykazující aktivitu proti flavivirům a jejich hodnoty EC<sub>50</sub>: (6) 2'-methyladenosin, (7) 7-deaza-2'-methyladenosin (u ZIKV záleží na sérotypu), (8) INX-08189

### 3.7.1.3 Nukleosidy s modifikovanou heterocyklickou bází

U této skupiny nukleosidů bylo prokázáno působení proti flavivirové replikaci látkami T-1106 (9), 6-methyl-7-deazaadenosinem (10) a dalšími N6-alkyl/aryl substituovanými nukleosidy. T-1106 je ribosylovaný derivát T-705 (Favipiravir-13) jež v enzymovém testování inhibuje HCV RdRp.<sup>3</sup> Derivát vykazoval příznivou účinnost, biologickou dostupnost a nízkou toxicitu na infekci virem YFV.<sup>36</sup>

Látka 10 je hydrofobní kopie adenosinu mající nanomolární inhibiční aktivitu proti DENV-2 bez cytotoxického účinku. Studie odhalily, že 5'trifosfát této látky je velmi dobrým substrátem pro RdRp, kde se snaží napodobit jak ATP tak GTP.<sup>37</sup>

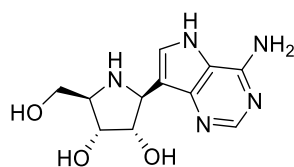
N6-Alkyl/aryl substituované nukleosidy (11 a 12) byly původně navrženy proti viru Marburg či enteroviru A71, nicméně byla potvrzena i mikromolární aktivita proti TBEV.<sup>38</sup> Mechanismus inhibice vstupu do buňky není dosud důkladně prozkoumán, avšak při použití objemných aromatických substituentů pravděpodobně dochází k interakci s virovou membránou, čímž dochází k blokaci vstupu viru do buňky.<sup>3</sup>



**Obrázek 10:** Imino-*C*-nukleosidy vykazující aktivitu proti flavivirům a jejich hodnoty  $EC_{50}$ : **(9)** T-1106, **(10)** 6-methyl-7-deazaadenosin, **(11)** *N*6-benzyl-5'-*O*-trityladenosin, **(12)** *N*6-benzyl-5'-*O*-triisopropylsilyladenosin, **(13)** T-705 (Favipiravir)

### 3.7.1.4 Imino-*C*-nukleosidy

Analog imino-*C*-nukleosidu zvaný BCX4430 **(14)** objevený společností BioCryst Pharmaceuticals Inc., byl původně zaznamenán jako inhibitor filovirových infekcí. Ačkoli bylo prokázáno, že vykazuje antivirovou specifitu proti celé řadě ssRNA virům.<sup>39</sup> BCX4430 je aktivní proti infekcím flavivirové rodiny, a to zejména proti WNV a ZIKV. Slibné výsledky přineslo i testování na viry YFV, JEV, TBEV a DENV-2, přičemž účinnost na YFV byla prokázána též *in vivo*.<sup>3</sup>



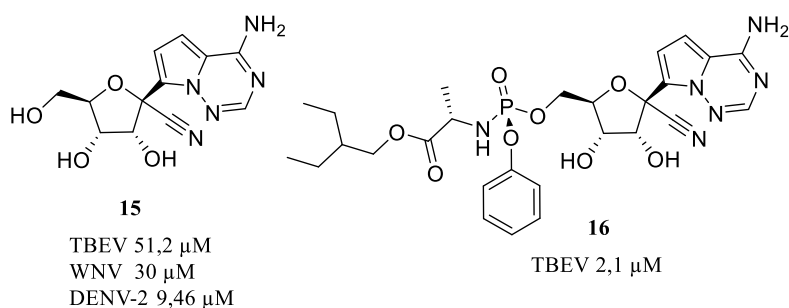
**14**

TBEV 1,48  $\mu\text{M}$   
 WNV 2,33  $\mu\text{M}$   
 DENV-2 32,8  $\mu\text{M}$   
 YFV 14,1  $\mu\text{M}$   
 ZIKV 3,8-11,7  $\mu\text{M}$   
 JEV 43,6  $\mu\text{M}$

**Obrázek 11:** Imino-*C*-nukleosid vykazující aktivitu proti flavivirům a hodnota  $EC_{50}$ : **(14)** BCX4430

### 3.7.1.5 1'-Kyanonukleosidy

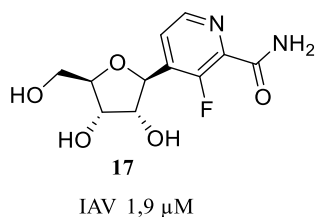
Mezi 1'-kyanonukleosidy řadíme látku GS-441524 (**15**) a její proléčivo 4-aza-7,9-dideazaadenosinu (**16**).<sup>40</sup> Ačkoli jejich původním cílem byly filoviry, látky vykazují poměrně příznivou antivirovou aktivitu i proti paramyxovirům a pneumovirům.<sup>41</sup> Remdesivir prošel do druhé fáze klinických testů proti Ebole, ale kvůli horším výsledkům než vykazují monoklonální protilátky, byl výzkum ukončen. Zároveň v době pandemie SARS-CoV-2 byl lék Remdesivir podáván pacientům s těžkým průběhem nemoci.<sup>42</sup> Při testování účinnosti proti flavivirovým infekcím na buněčných systémech byla potvrzena u látky **16** mikromolární inhibiční schopnost proti YFV ( $EC_{50}$  11  $\mu$ M) a DENV-2 ( $EC_{50}$  9,46  $\mu$ M). Méně úspěšné bylo testování proti WNV a TBEV (30–51,2  $\mu$ M) *in vitro*.<sup>3</sup>



**Obrázek 12:** 1'-Kyanonukleosidy vykazující aktivitu proti flavivirům a jejich hodnoty  $EC_{50}$ : (**15**) GS-441524, (**16**) Remdesivir

### 3.7.1.6 C-nukleosidy s amido skupinou

Látka **17** byla navržena podle léků ribavirinu či favipiraviru, které jsou testovány jako širokospektrální léky proti chřipce (IAV). Látka **17** obsahující též amidovou skupinu vykazuje velmi dobré výsledky proti IAV ( $EC_{50}$  1,9  $\mu$ M). Inhibice spočívá v napodobování adenosinu a guanosinu prostřednictvím orientací amidové skupiny. Po začlenění do vznikajícího RNA řetězce pravděpodobně dochází k letálním virovým mutacím.<sup>43</sup> Právě sloučenina **17** byla inspirací pro praktickou část mé bakalářské práce.



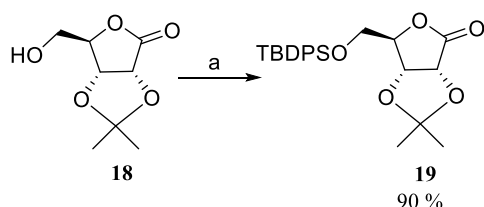
**Obrázek 13:** C-nukleosid (**17**) obsahující amidovou skupinu vykazující aktivitu proti chřipce a hodnota  $EC_{50}$

## 4. Výsledky a diskuse

Strategie syntézy cílových látek je založena na reakci vhodně ochráněného ribonolaktonu s příhodně substituovaným pyridinem na principu Grignardovi reakce. Touto reakcí byly získány klíčové chráněné C-nukleosidové intermediáty. Následnou derivatizací byly pak připraveny cílové látky v obou směrech/větvích vytyčených v Cílech bakalářské práce

### 4.1 Syntéza chráněného ribonolaktonu

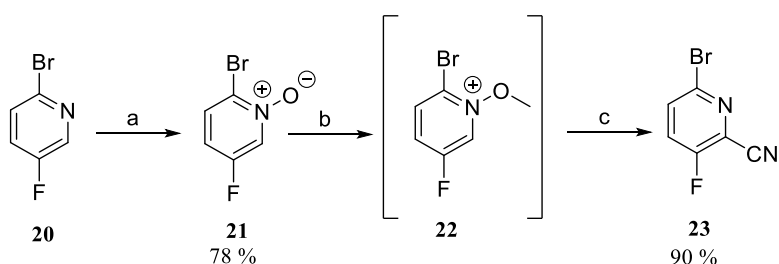
Příprava plně ochráněného ribonolaktonu **19** je znázorněna na schématu 1. Jako výchozí látka byla použita komerčně dostupná sloučenina **18**, která byla silylována v poloze 5 pomocí *tert*-butyldifenylchlorsilanu (TBDPSCl) v DMF za přítomnosti imidazolu podle publikovaného protokolu.<sup>44</sup>



**Schéma 1:** a) imidazol, TBDPSCl, DMF, 0 °C → l.t., 24 h

### 4.2 Příprava 6-brom-3-fluorpikolinonitrilu

Důležitý meziprodukt pro zavedení nukleobáze do cílových nukleosidů je 6-brom-3-fluorpikolinonitril **23**, který ovšem není komerčně dostupný. Byl připraven podle publikovaného postupu<sup>45</sup> z bromo derivátu **20**. Kyanu skupina v poloze 2 byla zavedena sledem reakcí uvedených na schématu 2. Nejprve byl připraven *N*-oxid **21**, který byl dále *O*-metylován a vzniklá látka **22** poté snadno poskytla žádaný derivát **23** reakcí s kyanidem sodným ve vysokém výtěžku 90 %.<sup>46</sup>

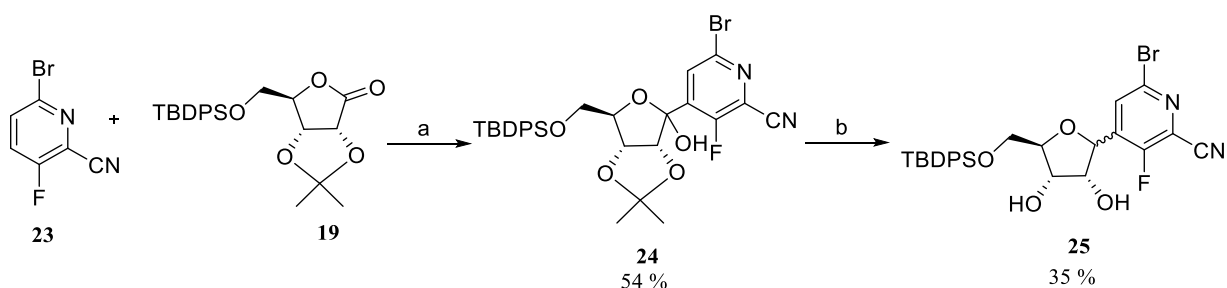


**Schéma 2:** a) anhydrid kyseliny trifluoroctové, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, l.t., 48 h, b) Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, l.t., 5 d, c) NaCN, H<sub>2</sub>O, 0 °C, 20 min

### 4.3 Syntéza halogenovaných C-nukleosidů s 3-fluorpikolinamidovým skeletem substituovaným v poloze 6

Zavedení nukleobáze na cukerný skelet bylo provedeno pomocí Grignardovy reakce mezi laktonem **19** a pyridinový derivátem **23** (Schéma 3). Prvotní pokusy o syntézu látky **24** pomocí LDA nebyly úspěšné.<sup>43</sup> Použití komplexu  $\text{TMPMgCl}\cdot\text{LiCl}$  vedlo ke zdárnému provedení této reakce a bylo docíleno výtěžku 54%.<sup>47</sup>

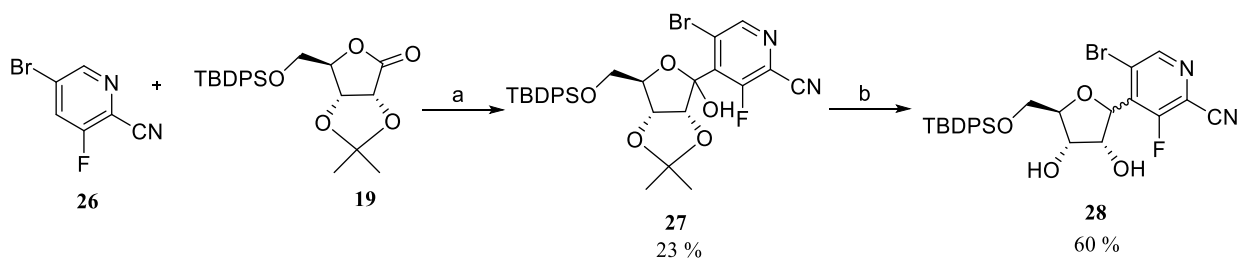
Vzniklý nukleosid **24** byl deoxygenován na pozici 1' pomocí  $\text{Et}_3\text{SiH}$  v přítomnosti silné Lewisovy kyseliny  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ .<sup>43</sup> Při reakci dochází ke vzniku dvou anomerů  $\alpha$  a  $\beta$  (**25**), přičemž požadovaný  $\beta$ -anomer je v nadbytku asi 1:9 (dle UPLC-MS chromatogramu). V této fázi není možné anomery oddělit, ale pro další zpracování to nepředstavuje žádnou komplikaci. V průběhu reakce dochází také k samovolnému ochránění 2' - a 3' -OH skupin na cukerné části z důvodu, že isopropylidenová chránicí skupina je labilní v kyselém prostředí. Opětovné ochránění 2' - a 3' - hydroxylových skupin pomocí *tert*-butyldimethylchlorsilanu (TBDMSCl)<sup>48</sup> nebylo úspěšné. Reakce vedla ke vzniku směsi látek monosilylovaných pouze na jednom hydroxyly. Tato reakce nebyla dále optimalizována, jelikož jak bude dále ukázáno chránění OH skupin v poloze 2' - a 3' - nebylo nutné. Celý postup syntézy je znázorněn na schématu 3.



**Schéma 3:** a)  $\text{TMPMgCl}\cdot\text{LiCl}$ , THF,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 5,5 h, b)  $\text{Et}_3\text{SiH}$ ,  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ →l.t., 20 h

### 4.4 Syntéza halogenovaných C-nukleosidů s 3-fluorpikolinamidovým skeletem substituovaným v poloze 5

Zcela obdobně bylo postupováno u přípravy látek, kde brom byl navázán na pyridinu v pozici 5. Reakční kroky jsou popsány na schématu 4. Výchozí sloučenina **26** byla komerčně dostupná.



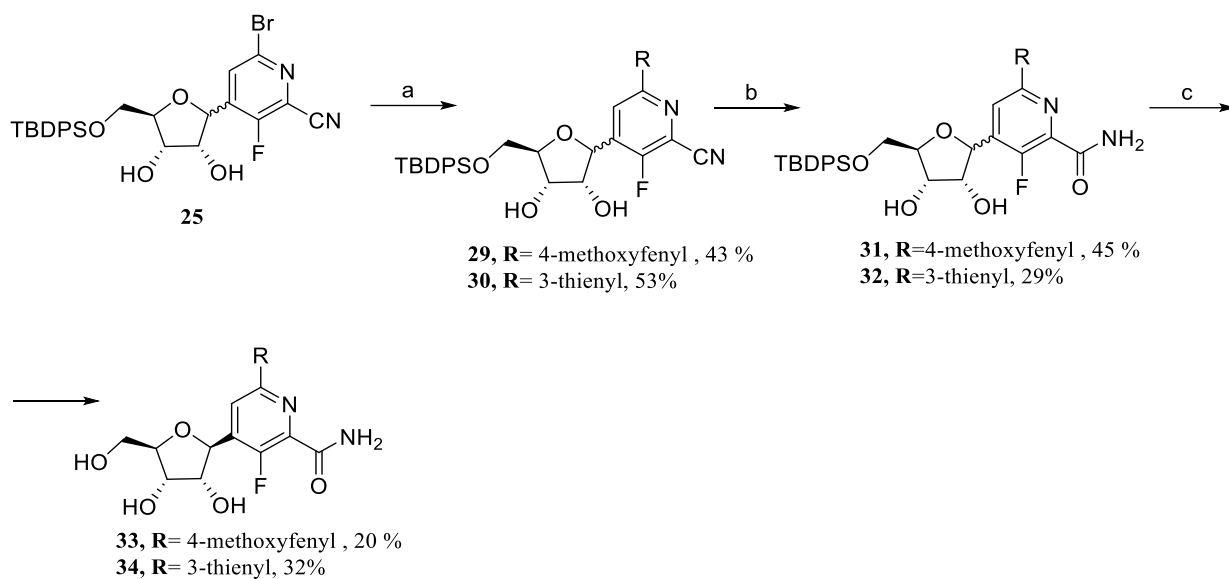
**Schéma 4:** a)  $\text{TMPMgCl} \cdot \text{LiCl}$ , THF,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ , 7 h, b)  $\text{Et}_3\text{SiH}$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , DCM,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{l.t.}$ , 16 h

#### 4.5 Syntéza finálních C-nukleosidů s 3-fluorpikolinamidovým skeletem substituovaným v poloze 6

4-Methoxyfenylový a 3-thienylový substituent byly zavedeny na nukleobázi pomocí Suzukiho reakce mezi boronovou kyselinou a bromo derivátem **25** za katalýzy  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ .<sup>49</sup> Následně byly kyano skupiny u látek **29** a **30** převedeny oxidativní hydrolýzou na příslušné amidy **31** a **32**.<sup>43</sup> Tato reakce neprobíhala s vysokými výtěžky (45 resp. 29 %). Část výchozích látek **29** a **30** se ale podařilo izolovat zpět.

Finální ochránění silylové skupiny z 5'-hydroxylového zbytku probíhala pomocí  $\text{NH}_4\text{F}$  v refluxujícím methanolu.<sup>43</sup> Po reverzní chromatografii a následné rekrystalizaci nebyl v produktu pozorován žádný  $\alpha$ -anomer. V průběhu celé syntézy nebyl žádný z  $\alpha$ -anomerů izolován. Nukleosidy **33** a **34** jsou velmi stálé a mohou být skladovány za laboratorní teploty. Veškerý sled reakčních kroků je znázorněn na schématu 5.

U nukleosidu **33** byla rovněž ověřena  $\beta$ -konfigurace pomocí ROESY spektroskopie. V ROESY spektrech byly pozorovány cross-píky mezi vodíkovými atomy v polohách 5 (nukleobáze) a 2' a zároveň mezi vodíkovými atomy v polohách 5 a 5'-hydroxylem. Tímto zjištěním byla jednoznačně podpořena skutečnost, že byl připraven  $\beta$ -anomer žádaného nukleosidu.

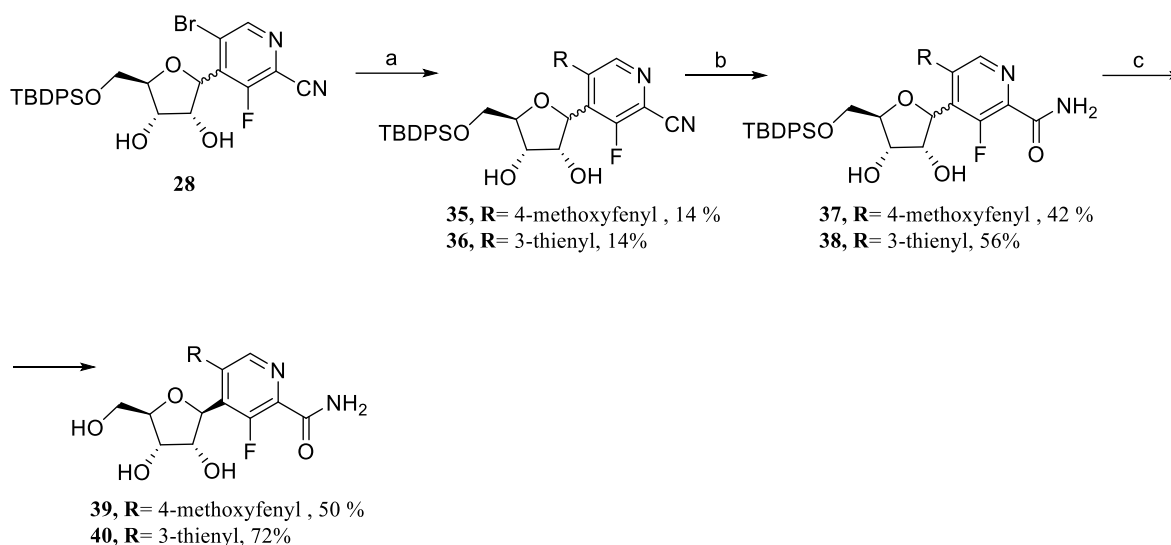


**Schéma 5:** a) 4-methoxyfenyl/thiofen-3-boronová kyselina,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$ , 95 °C, 4-16 h, b) 10 %  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MeOH, l.t., 1-2 d, c)  $\text{NH}_4\text{F}$ , MeOH, reflux, 16 h

#### 4.6 Syntéza finálních C-nukleosidů s 3-fluorpikolinamidovým skeletem substituovaným v poloze 5

Syntéza finálních nukleosidů s bázi modifikovanou v poloze 5 byla provedena obdobným způsobem nastíněným výše. Reakce jsou znázorněny na schématu 6. Výtěžky Suzukiho reakce (látky **35** a **36**) byly ovšem v tomto případě dramaticky horší, patrně z důvodu obtížnější

přístupnosti polohy 5 na pyridinovém kruhu. Nukleosidy **39** a **40** jsou také stále za laboratorní teploty.



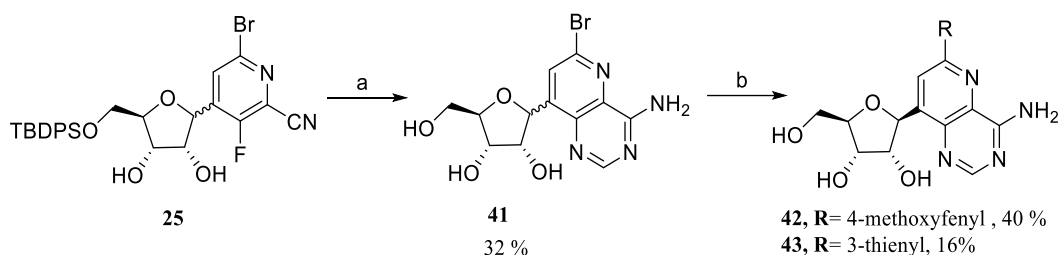
**Schéma 6:** a) 4-methoxyfenyl/thiofen-3-boronová kyselina,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ , dioxan/ $\text{H}_2\text{O}$ , 95 °C, 5-24 h, b) 10 %  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MeOH, l.t., 16 h, c)  $\text{NH}_4\text{F}$ , MeOH, reflux, 16-24 h

#### 4.7 Syntéza C-nukleosidů s 4-aminopyrido[3,2-*d*]pyrimidinovým skeletem substituovaným v poloze 6

Příprava látek s 4-aminopyrido[3,2-*d*]pyrimidinovou nukleobází byla založena vybudování druhého pyrimidinového kruhu. Byla použita známá cyklizační reakce s acetátem formanidinu.<sup>50</sup> Oproti původní práci bylo potřeba tuto reakci optimalizovat, výrazně zvýšit množství činidla (10 ekvivalentů) a zároveň bylo použito NMP (místo DMF) jako zcela inertní rozpouštědlo.

V průběhu reakce dochází také k desylilaci v pozici 5' - kvůli odstupujícímu fluoridovému aniontu. Zcela obdobně, jako v případě látek např. **29**, **30**, již není potřeba opětovně chránit hydroxylové skupiny. Finální nukleosidy **42** a **43** byly připraveny opět pomocí Suzukiho reakce<sup>49</sup> s 4-methoxyfenylboronovou a thiofen-3-boronovou kyselinou. I v tomto případě po reverzní chromatografii a rekrystalizaci v ethanolu jsou získány pouze  $\beta$ -anomery

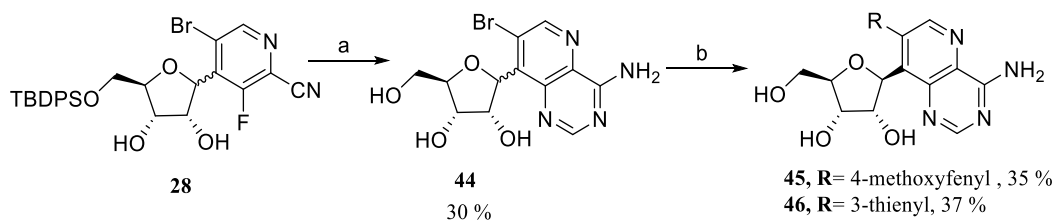
jednotlivých nukleosidových analogů, které jsou stabilní za laboratorní teploty. Sled reakčních kroků je ukázán na schématu 7.



**Schéma 7:** a) formamidin acetát, NMP, 100 °C, 24 h, b) 4-methoxyfenyl/thiofen-3-boronová kyselina, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dioxan/H<sub>2</sub>O, 95 °C, 3-16 h

#### 4.8 Syntéza C-nukleosidů s 4-aminopyrido[3,2-*d*]pyrimidinovým skeletem substituovaným v poloze 7

C- nukleosidové analogy s pyrido[3,2-*d*]pyrimidinovým cyklem modifikované v poloze 5 byly připraveny zcela stejným způsobem jako je ukázán výše. Reakce probíhaly dle schémata 8.



**Schéma 8:** a) formamidin acetát, NMP, 100 °C, 24 h, b) 4-methoxyfenyl/thiofen-3-boronová kyselina, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dioxan/H<sub>2</sub>O, 95 °C, 16-30 h

## 5. Experimentální část

### 5.1 Obecné postupy a chemikálie

Používané chemikálie byly pořízeny od běžných dodavatelů jako Sigma-Aldrich či Fluorochem. Běžná rozpouštědla byla zakoupena od společnosti Lach-Ner. Od společnosti Acros-Organics byla zakoupena suchá rozpouštědla NMP, MeOH a THF již dodána nad aktivovanými molekulovými síty. Od společnosti Sigma-Aldrich bylo zakoupeno suché rozpouštědlo DMF již dodané nad aktivovanými molekulovými síty. Rozpouštědlo dichlormethan bylo v naší laboratoři sušeno pomocí destilace v přítomnosti oxidu fosforečného a skladováno nad molekulovými síty dodanými od firmy Acros-Organics (3 Å, 8-12 mesh).

Reakce byly analyzovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC Merck, Silikagel 60 F254) a detekovány pomocí UV lampy při vlnové délce 254 nm. Pro průběžnou analýzu a analýzu finálního produktu bylo používáno UPLC-MS (voda/acetonitril, 0,1 % kyseliny mravenčí, na koloně Phenomenex Gemini-NX 3 $\mu$  C18 110 Å, 100 x 2.00 mm).

Na izolaci produktů z reakčních směsí byl používán silikagel 40-63  $\mu$ m. Flash chromatografie byla realizována s využitím Isco Combiflash Rf resp. Rf+. Od společnosti Isco byly pro reverzní chromatografie využity kolony RediSep Rf Gold® Reversed-phase C18.

Na měření vodíkových (při 400 MHz), uhlíkových (při 101 MHz) a 2 D (HMBC, HSQC, COSY) NMR spekter byl použit NMR spektrometr Bruker Avance III™ HD 400 MHz. Spektra byla měřena v CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H měření vztaženo k signálu rozpouštědla  $\delta$  7,21ppm, <sup>13</sup>C měření vztaženo k signálu rozpouštědla  $\delta$  77,23 ppm) nebo v DMSO-*d*<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H měření vztaženo k signálu rozpouštědla  $\delta$  2,50 ppm, <sup>13</sup>C měření vztaženo k signálu rozpouštědla  $\delta$  39,52 ppm) s vnitřním standardem TMS. Chemické posuny  $\delta$  jsou uváděny ve stupnici v ppm a *J* interakční konstanty v Hz.

#### 5.1.1 Obecné postupy

##### Obecný postup A – reakce laktonu s nukleobazí

Halogenovaný pyridin (**23**, **26**) (25 mmol) byl rozpuštěn v suchém THF (44 ml) pod argonem a roztok byl ochlazen na -78 °C. Do roztoku byl během 20 minut po kapkách přidán TMPMgCl·LiCl (26,8 mmol, 1,0 M roztok v THF/toluen). Reakce byla ponechána míchat 15 minut při -78 °C. Sloučenina **19** (49,2 mmol) byla rozpuštěna pod argonem v suchém THF (130 ml) a takto vzniklý roztok byl pomalu přikapán k reakční směsi po dobu asi 35 minut. Reakce probíhala do spotřebování výchozí látky při -78 °C. Průběh reakce byl kontrolován pomocí UPLC-MS. Reakce byla ukončena přidáním 140 ml nasyceného roztoku

NH<sub>4</sub>Cl. Vzniklá směs byla zředěna ethyl-acetátem (1,2 l), promyta solankou (2 x 500 ml), vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena na RVO. Produkt byl poté izolován flash chromatografií.

#### **Obecný postup B** – deoxygenace v poloze 1'

Silylovaný nukleosid (0,32 mmol) byla pod argonem rozpuštěn v suchém CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml). K roztoku vychlazeném na 0 °C byl přikapán Et<sub>3</sub>SiH (2,4 mmol) po dobu 5 minut. Po 15 minutách byl do směsi přikapán během 5 minut BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (0,70 mmol) a reakce probíhala za laboratorní teploty do spotřebování výchozí látky. Průběh reakce byl kontrolován pomocí UPLC-MS. Reakce byla zastavena přidáním 5 ml nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub> při 0 °C. Po naředění ethyl-acetátem (60 ml) byla organická fáze vytřepána NaHCO<sub>3</sub> (25 ml), následně solankou (50 ml), vysušena a odpařena. Produkt byl izolován flash chromatografií.

#### **Obecný postup C** – Suzukiova reakce

Chráněný nukleosid (0,19 mmol), boronová kyselina (0,39 mmol) a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,48 mmol) byly rozpuštěny ve směsi dioxan/voda (4 ml, 4:1). Po zavedení argonové atmosféry byl do reakční směsi přisypán Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,019 mmol). Po zavření baňky byla argonová atmosféra obnovena a reakce byla míchána při 95 °C do spotřebování výchozí látky. Průběh reakce byl kontrolován pomocí UPLC-MS. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byla reakční směs naředěna ethyl-acetátem (60 ml), vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a zkoncentrována na RVO. Produkt byl poté izolován flash chromatografií.

#### **Obecný postup D** – převedení nitrilové skupiny na amidovou

K roztoku výchozí látky (1,3 mmol) v methanolu (10 ml) byl přikapán 10 % NH<sub>3</sub> (5 ml). Do vychlazené reakční směsi na 0 °C byl pomalu po dobu 10 minut přikapán peroxid vodíku (2 ml). Po dobu 40 minut reakce probíhala při 0 °C a po odstranění ledové lázně reakce běžela dál za laboratorní teploty do spotřebování veškeré výchozí látky. Průběh reakce byl kontrolován pomocí UPLC-MS. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (10 ml) při 0 °C. Vodná fáze byla promyta ethylacetátem (2 x 150 ml) a spojené organické fáze byly vytřepány solankou (150 ml). Po vysušení bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bylo rozpouštědlo odpařeno na RVO. Produkt byl poté izolován flash chromatografií.

#### **Obecný postup E** – odstranění TBDPS skupiny v poloze 5'

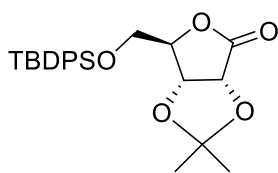
Výchozí látka (0,49 mmol) byla smíchána s NH<sub>4</sub>F (2,03 mmol). Na baňku byl připevněn spirálový chladič a následně byla do aparatury zavedena argonová atmosféra. Přes chladič byl přidán suchý methanol (18 ml) a teplota v olejové lázni byla zvýšena na 80 °C. Reflux probíhal 5 hodin a následně reakce běžela při teplotě 60 °C přes noc. Po odpaření byl produkt izolován flash chromatografií a reverzní chromatografií.

### Obecný postup F – výstavba 4-aminopyrido[3,2-*d*]pyrimidinového skeletu

Chráněný nukleosid (3,7 mmol) a formamidin acetát (37,1 mmol) byly rozpuštěny v suchém NMP (9,6 ml) pod argonem. Teplota v hnízdě byla zvýšena na 100 °C a reakce probíhala při této teplotě 24 h. Následně byla reakční směs zředěna methanolem a po adsorpci na silikagel byla provedena reverzní chromatografie.

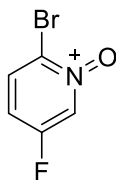
## 5.2 Postupy syntézy a naměřená data

### (3*aR*,6*R*,6*aR*)-6-(((*tert*-Butyldifenylsilyl)oxy)methyl)-2,2-dimethyldihydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4(3*aH*)-on (**19**)



Lakton **18** (20 g, 106 mmol) a imidazol (13,9 g, 204 mmol) byly rozpuštěny v suchém DMF (154 ml). Po ochlazení reakční směsi na 0 °C byl pomalu přikapán TBDPSCl (29,4 ml, 113 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty 24 hodin. Reakční směs byla zahuštěna na RVO. Odparek byl rozpuštěn v ethyl-acetátu (1,1 l) a promyt vodou (2 x 500 ml). Organická fáze byla vytřepána solankou (2 x 500 ml), vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařena na RVO. Po rekrystalizaci surového produktu v pentanu byla získána pevná bílá látka **19** (41 g, 90 %). NMR spektrum bylo shodné s publikovanými hodnotami.<sup>51</sup>

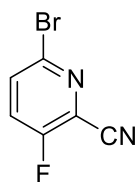
### 2-Brom-5-fluorpyridin-1-oxid (**21**)



Halogenovaný pyridin **20** (10 g, 56,9 mmol) byl rozpuštěn v suchém CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (87 ml) a roztok byl ochlazen 0 °C. Do roztoku byl po dobu 10 minut pomalu přikapán anhydrid kyseliny trifluorooctové (23,7 ml, 170 mmol). Za stálého míchání byl pomalu po dobu 15 minut přikapán 30 % roztok peroxidu vodíku (6,9 ml, 14 mmol) a reakce probíhala 48 h za laboratorní teploty. Reakce byla ukončena přidáním 100 ml nasyceného roztoku NaHCO<sub>3</sub> při 0 °C. Následně byl do roztoku přidán pevný NaHCO<sub>3</sub> do neutrálního pH. Vodná fáze byla promyta dichlormethanem (2 x 200 ml). Spojené organické

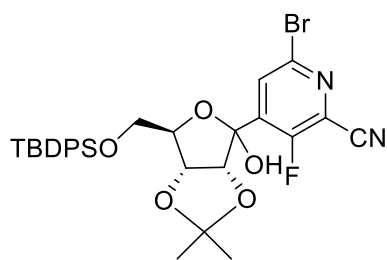
fáze byly vysušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a odpařeny. Byly získány bílé krystaly látky **21** (8,48 g, 78 %). NMR spektrum odpovídalo publikovaným hodnotám.<sup>52</sup>

### 6-Brom-3-fluorpikolinonitril (**23**)



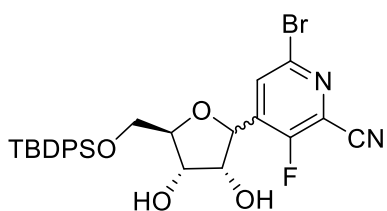
Látka **21** (8,48 g, 44,2 mmol) byla rozpuštěna v dimethylsulfátu (5 ml, 48,5 mmol) a reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 5 dní. Vysrážená pevná žlutá látka **22** byla rozpuštěna ve vodě (44 ml) a roztok byl vychlazen na 0 °C. Ke směsi byl přidán roztok NaCN (8,8 g, 172 mmol) ve vodě (44 ml) a reakční směs byla ponechána míchat dalších 20 minut při 0 °C. Vzniklý pevný produkt byl odsán na fritě a následně rozpuštěn v ethyl-acetátu (600 ml). Organická fáze byla extrahována solankou (2 x 200 ml), vysušena pomocí bezvodého Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zfiltrována a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Následně byla provedena flash chromatografie (cyklohexan/ethyl-acetát, 0-20 %). Byly získány nažloutlé krystaly látky **23** (9,85 g, 90 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,69 (dd, *J* = 8,9, 3,8 Hz, 1H), 7,46 (dd, *J* = 8,9, 7,5 Hz, 1H). <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -118,77. <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 161,25 (d, *J* = 270,8 Hz), 136,98 (d, *J* = 2,9 Hz), 134,08 (d, *J* = 4,8 Hz), 127,48 (d, *J* = 19,3 Hz), 122,90, 111,82. ESI-MS, *m/z*: 202,4 [M+H]<sup>+</sup>

### 6-Brom-4-((3*aR*,6*R*,6*aR*)-6-(((*tert*-butyldifenylsilyl)oxy)methyl)-4-hydroxy-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)-3-fluorpikolinonitril (**24**)



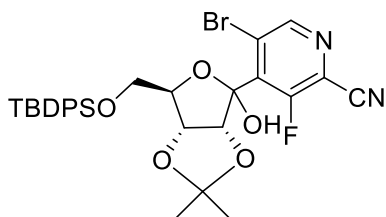
Látka **24** byla připravena podle **obecného postupu A** z látek **23** a **19**. Reakce probíhala 5,5 h při -78 °C. Flash chromatografie byla provedena v soustavě cyklohexan/ethyl-acetát, 0-10 %. Byla získána nažloutlá pěna látky **24** (4,02 g, 54 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,98 (s, 1H), 7,47 (m, 10H), 4,94 (dd, *J* = 12,9, 5,4 Hz, 1H), 4,76 (d, *J* = 30,8 Hz, 2H), 4,34 (s, 1H), 3,81 (m, 2H), 1,19 (s, 6H), 1,04 (s, 9H). <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -132,31. <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 158,54 (d, *J* = 270,9 Hz), 142,16, 135,08 (d, *J* = 14,1 Hz), 135,16, 132,60 (d, *J* = 8,2 Hz), 131,62, 130,05 (d, *J* = 11,1 Hz), 128,02, 121,63, 112,3 (d, *J* = 14,1 Hz), 104,32, 86,14, 82,57, 78,01, 75,10, 64,33, 63,37, 26,63, 18,77. ESI-MS, *m/z*: 627,9 [M+H]<sup>+</sup>

### 6-Brom-4-((3*R*,4*S*,5*R*)-5-(((*tert*-butyldifenylsilyl)oxy)methyl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)-3-fluorpikolinonitril (směs $\alpha$ a $\beta$ anomeru) (**25**)



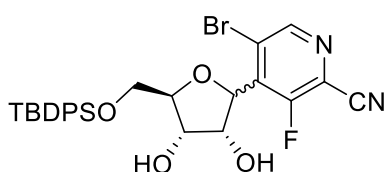
Látka **25** byla připravena podle **obecného postupu B** z látky **24**. Reakce probíhala 20 h za laboratorní teploty. Flash chromatografie byla provedena v soustavě cyklohexan/ethylacetát, 10-60 %. Byl získán průhledný olej látky **25** (0,201 g, 35 %). Poměr anomerů je přibližně 1:9 (dle UPLC-MS spektra).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7,97 (dd,  $J = 4,9, 0,9$  Hz, 1H), 7,67 (m, 4H), 7,47 (m, 6H), 5,51 (d,  $J = 5,4$  Hz, 1H), 5,17 (m, 1H), 4,99 (d,  $J = 4,5$  Hz, 1H), 4,02 (m, 4H), 3,93 (dd,  $J = 11,5, 2,0$  Hz, 1H), 3,78 (dd,  $J = 11,4, 3,1$  Hz, 1H), 1,01 (s, 9H).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  -131,98.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  159,21 (d,  $J = 268,6$  Hz), 143,20 (d,  $J = 12,9$  Hz), 136,30, 135,15 (d,  $J = 8,5$  Hz), 132,63 (d,  $J = 13,8$  Hz), 130,67, 130,08, 128,09, 121,42 (d,  $J = 18,2$  Hz), 112,55, 84,60, 77,35, 76,99, 70,90, 63,73, 26,73, 18,90. ESI-MS,  $m/z$ : 572,5  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**5-Brom-4-((3a*R*,6*R*,6a*R*)-5-(((*tert*-butyldifenylsilyl)oxy)methyl)-4-hydroxy-2,2-dimethyltetrahydrofuran[3,4-*d*][1,3]dioxol-4-yl)-3-fluorpikolinonitril (**27**)**



Látka **27** byla připravena podle **obecného postupu A** z látek **26** a **19**. Reakce probíhala 7 h při  $-78$  °C. Flash chromatografie byla provedena v soustavě cyklohexan/ethylacetát, 0-10 %. Byla získána bílá pěna látky **27** (2,461 g, 23 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,82 (s, 1H), 7,65 (m, 4H), 7,48 (m, 6H), 4,93 (m, 1H), 4,32 (dd,  $J = 9,3, 5,0$  Hz, 1H), 3,79 (m, 3H), 1,20 (d,  $J = 22,5$  Hz, 6H), 1,04 (s, 9H).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  -123,75.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  154,59 (d,  $J = 270,3$  Hz), 138,77 (d,  $J = 9,5$  Hz), 136,49, 135,27 (d,  $J = 1,7$  Hz), 134,62, 129,37, 128,23 (d,  $J = 3,5$  Hz), 127,69, 113,47, 112,07, 81,89, 78,24, 75,17, 63,52, 62,49, 60,54, 26,69, 26,04, 24,85, 18,83. ESI-MS,  $m/z$ : 628,4  $[\text{M}+\text{H}]^+$

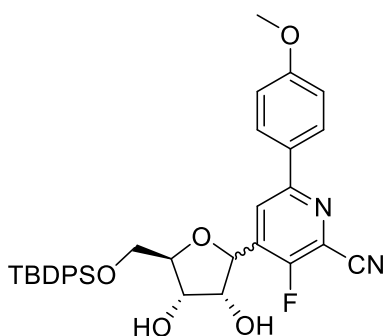
**5-Brom-4-((3*R*,4*S*,5*R*)-5-(((*tert*-butyldifenylsilyl)oxy)methyl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)-3-fluorpikolinonitril (směs  $\alpha$  a  $\beta$  anomeru) (**28**)**



Látka **28** byla připravena podle **obecného postupu B** z látky **27**. Reakce probíhala přes noc za laboratorní teploty. Flash chromatografie byla provedena v soustavě cyklohexan/ethylacetát 0-60 %. Byl získán bílý olej látky **28**

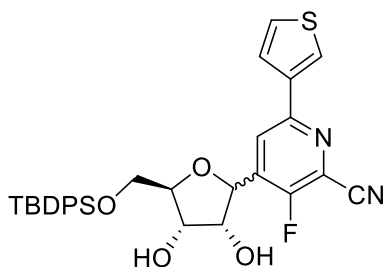
(108 mg, 60 %). Poměr  $\alpha$  a  $\beta$  anomerů je přibližně 1:11 (dle UPLC-MS spektra).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,86 (s, 1H), 7,64 (m, 4H), 7,42 (m, 6H), 5,33 (d,  $J = 5,9$  Hz, 1H), 5,19 (d,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 5,11 (m, 1H), 4,27 (m, 1H), 4,09 (d,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 3,94 (dd,  $J = 9,0, 3,4$  Hz, 1H), 3,83 (m, 1H), 3,76 (dd,  $J = 11,2, 5,4$  Hz, 1H), 0,99 (s, 9H).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  -123,88.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  158,93 (d,  $J = 272,5$  Hz), 149,39 (d,  $J = 4,3$  Hz), 135,44, 133,45, 131,16 (d,  $J = 10,7$  Hz), 129,88, 128,37, 121,72 (d,  $J = 18,1$  Hz), 121,23 (d,  $J = 2,6$  Hz), 110,81, 82,80, 80,33, 76,10, 75,73, 64,48, 26,95, 19,17. ESI-MS,  $m/z$ : 572,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**4-((3R,4S,5R)-5-(((*tert*-Butyldifenylsilyl)oxy)methyl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)-3-fluor-6-(4-methoxyfenyl)picolinonitril (směs  $\alpha$  a  $\beta$ ) (29)**



Látka **29** byla připravena podle **obecného postupu C** z látky **25** a 4-methoxyfenylboronové kyseliny. Reakce probíhala 4 h při 95 °C. Flash chromatografie byla provedena v soustavě cyklohexan/ethyl-acetát, 0-30 %. Byla získána bílá pevná látka **29** (49 mg, 43 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,23 (d,  $J = 4,5$  Hz, 1H), 7,87 (m, 2H), 7,69 (m, 10H), 7,01 (m, 2H), 5,47 (d,  $J = 5,1$  Hz, 1H), 5,27 (d,  $J = 4,4$  Hz, 1H), 5,05 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H), 4,03 (m, 5H), 3,78 (s, 3H), 0,99 (s, 9H).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  -132,12.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  160,84, 155,34 (d,  $J = 247,6$  Hz), 151,09, 138,32 (d,  $J = 11,9$  Hz), 136,50, 135,04 (d,  $J = 8,3$  Hz), 134,95, 132,68 (d,  $J = 6,7$  Hz), 129,97, 128,38, 127,92, 125,39, 120,98, 115,67, 114,43 (d,  $J = 28,0$  Hz), 113,73, 85,45, 81,50, 76,91, 71,04, 63,41, 55,33, 26,56, 18,86. ESI-MS,  $m/z$ : 599,4  $[\text{M}+\text{H}]^+$

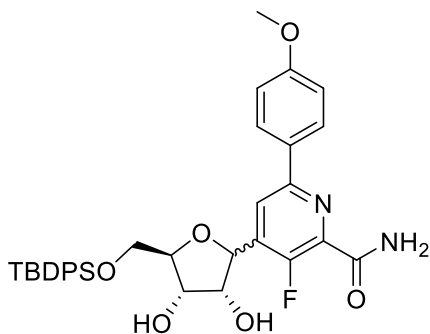
**4-((3R,4S,5R)-5-(((*tert*-Butyldifenylsilyl)oxy)methyl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)-3-fluor-6-(thiofen-3-yl)picolinonitril (směs  $\alpha$  a  $\beta$ ) (30)**



Látka **30** byla připravena podle **obecného postupu C** z látky **25** a thiofen-3-boronové kyseliny. Reakce probíhala přes noc při 95 °C. Produkt **30** byl získán po flash chromatografii (cyklohexan/ethyl-acetát, 0-35 %). Byla získána pevná bílá látka **30** (56 mg, 53 %).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,11 (d,  $J = 4,4$  Hz, 1H), 7,80 (t,  $J = 1,6$  Hz, 1H), 7,62 (m, 4H), 7,58 (dd,  $J = 5,8,$

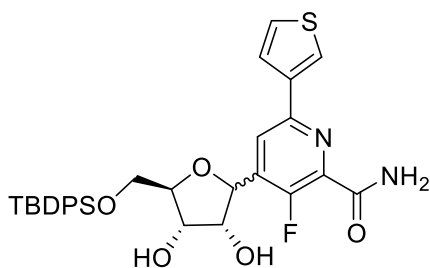
1,7 Hz, 1H), 7,38 (m, 7H), 5,27 (dd,  $J = 5,8, 3,7$  Hz, 1H), 4,78 (d,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 4,43 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 3,93 (m, 5H), 1,04 (s, 9H).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -132,62.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  156,11 (d,  $J = 249$  Hz), 149,34, 138,55, 135,44, 133,45, 131,07 (d,  $J = 11,9$  Hz), 129,88, 129,72, 128,37, 127,58, 126,67, 122,88, 121,72 (d,  $J = 19,8$  Hz), 110,29, 82,76, 79,69, 76,75, 75,62, 64,47, 26,95, 19,17. ESI-MS,  $m/z$ : 575,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**4-((3*R*,4*S*,5*R*)-5-(((*tert*-Butyldifenylsilyl)oxy)methyl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)-3-fluor-6-(4-methoxyfenyl)picolinamid (směs  $\alpha$  a  $\beta$ ) (31)**



Látka **31** byla připravena podle **obecného postupu D** z látky **29**. Reakce probíhala za laboratorní teploty přes noc. Flash chromatografie byla provedena v soustavě dichlormethan/ethyl-acetát, 0-70 %. Byla získána bílá pěna látky **31** (0,317 g, 45 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,14 (d,  $J = 4,8$  Hz, 1H), 8,01 (d,  $J = 4,2$  Hz, 1H), 7,84 (m, 2H), 7,70 (m, 5H), 7,43 (m, 6H), 6,80 (m, 2H), 5,38 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 5,11 (d,  $J = 4,9$  Hz, 1H), 5,05 (d,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 4,03 (ddd,  $J = 11,7, 9,2, 4,9$  Hz, 5H), 3,77 (s, 3H), 0,95 (s, 9H).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -132,25.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  164,91, 155,38 (d,  $J = 254,8$  Hz), 147,93, 139,85 (d,  $J = 10,1$  Hz), 135,03 (d,  $J = 11,4$  Hz), 134,97, 132,79 (d,  $J = 33,1$  Hz), 129,93, 129,53, 128,18, 127,92, 125,61, 119,75, 115,42, 113,81, 84,51, 77,06, 70,97, 64,14, 55,19, 26,57, 18,87. ESI-MS,  $m/z$ : 617,5  $[\text{M}+\text{H}]^+$

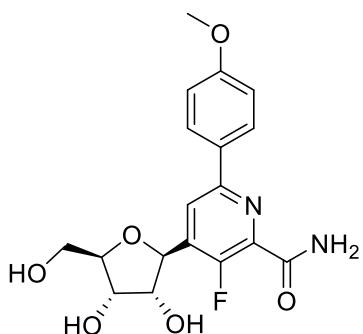
**4-((3*R*,4*S*,5*R*)-5-(((*tert*-Butyldifenylsilyl)oxy)methyl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)-3-fluor-6-(thiofen-3-yl)picolinamid (směs  $\alpha$  a  $\beta$ ) (32)**



Látka **32** byla připravena podle **obecného postupu D** z látky **30**. Reakce probíhala za laboratorní teploty 2 dny. Flash chromatografie byla provedena v soustavě dichlormethan/ethyl-acetát, 0-50 %. Byl získán nažloutlý olej látky **32** (158 mg, 29 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,19 (d,  $J = 3,9$  Hz, 1H), 7,92 (m, 2H), 7,70 (m, 5H), 7,57 (dd,  $J = 5,0, 1,3$  Hz, 1H),

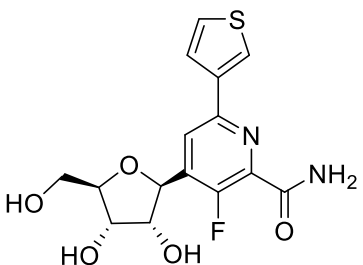
7,52 (dd,  $J = 5,0, 2,9$  Hz, 1H), 7,42 (m, 6H), 5,38 (s, 1H), 5,11 (s, 1H), 5,03 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 4,03 (m, 5H), 0,97 (s, 9H).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -132,53.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  164,66, 154,86 (d,  $J = 270,1$  Hz), 147,74 (d,  $J = 20,1$  Hz), 140,05, 138,67, 135,09, 132,85 (d,  $J = 32,7$  Hz), 129,93, 127,95 (d,  $J = 6,9$  Hz), 127,92, 126,95, 126,42, 124,64, 120,77, 84,53, 77,48, 76,83, 71,03, 64,23, 26,60, 18,88. ESI-MS,  $m/z$ : 593,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-3-fluor-6-(4-methoxyfenyl)picolinamid (33)**



Látka **33** byla připravena podle **obecného postupu E** z látky **31**. Flash chromatografie byla provedena v soustavě z ethyl-acetátu do roztoku obsahující 1:1 ethyl-acetát a směs rozpouštědel (ethyl-acetát/acetón/ethanol/voda v poměrech 20:3:1,2:0,8) s gradientem 0-50 %. Pro finální purifikaci byla provedena reverzní chromatografie (voda/acetonitril, 5-25 %). Rekrystalizací v ethanolu byly získány bílé krystaly  $\beta$  anomeru látky **33** (37 mg, 20 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,36 (d,  $J = 4,2$  Hz, 1H), 8,11 (m, 3H), 7,68 (s, 1H), 7,03 (m, 2H), 5,32 (s, 1H), 5,09 (s, 1H), 5,00 (m, 2H), 3,93 (m, 3H), 3,82 (s, 3H), 3,77 (d,  $J = 12,4$  Hz, 1H), 3,63 (m, 1H).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -132,28.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  164,99 (d,  $J = 4,8$  Hz), 160,27, 154,21 (d,  $J = 266,7$  Hz), 150,81, 140,53 (d,  $J = 12,6$  Hz), 138,55 (d,  $J = 8,7$  Hz), 129,71, 128,29, 120,50, 114,09, 84,10, 77,66, 76,91, 70,23, 60,73, 55,26. HRMS (ESI+) vypočteno  $m/z$  pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_2\text{F}$ : 379,1300  $(\text{M}+\text{H})^+$ , nalezeno: 379,1296.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -72,8$  (c 0,265, DMSO)

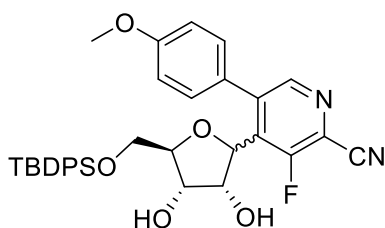
**4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-3-fluor-6-(thiofen-3-yl)picolinamid (34)**



Látka **34** byla připravena podle **obecného postupu E** z látky **32**. Flash chromatografie byla provedena v soustavě z ethyl-acetátu do roztoku obsahující 1:1 ethyl-acetát a směs rozpouštědel (ethyl-acetát/acetón/ethanol/voda v poměrech 20:3:1,2:0,8) s gradientem 0-50 %. Pro finální purifikaci byla provedena reverzní chromatografie (voda/acetonitril, 0-50 %). K eluci čistého produktu dochází při 35 % acetonitrilu. Rekrystalizací v ethanolu byly získány

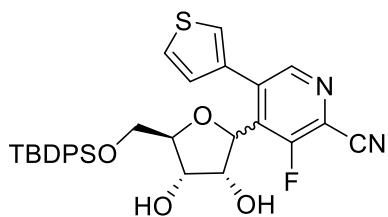
bílé krystaly  $\beta$  anomeru produktu **34** (55 mg, 32 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,32 (d,  $J = 4,4$  Hz, 1H), 8,30 (dd,  $J = 3,0, 1,3$  Hz, 1H), 8,20 (s, 1H), 7,84 (dd,  $J = 5,1, 1,3$  Hz, 1H), 7,66 (dt,  $J = 5,0, 2,4$  Hz, 2H), 5,33 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 5,09 (t,  $J = 5,4$  Hz, 1H), 5,01 (d,  $J = 4,5$  Hz, 1H), 4,97 (d,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 3,92 (m, 3H), 3,78 (ddd,  $J = 12,0, 5,5, 3,3$  Hz, 1H), 3,63 (ddd,  $J = 11,9, 5,3, 3,6$  Hz, 1H).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -132,59.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  164,75 (d,  $J = 4,9$  Hz), 154,27 (d,  $J = 267,8$  Hz), 147,70 (d,  $J = 5,6$  Hz), 140,77 (d,  $J = 12,5$  Hz), 140,39, 138,19 (d,  $J = 8,2$  Hz), 127,17, 126,67, 124,89, 121,51, 84,06, 77,66, 76,87, 70,15, 60,66. HRMS (ESI+) vypočteno  $m/z$  pro  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{N}_2\text{FS}$ : 355,0759 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , nalezeno: 355,0756.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -73,7$  (c 0,274, DMSO)

**4-((3*R*,4*S*,5*R*)-5-(((*tert*-Butyldifenylsilyl)oxy)methyl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)-3-fluor-5-(4-methoxyfenyl)pikolinonitril (směs  $\alpha$  a  $\beta$ ) (**35**)**



Látka **35** byla připravena podle **obecného postupu C** z látky **28** a 4-methoxyfenylboronové kyseliny. Reakce probíhala 5 h při 95 °C. Flash chromatografie byla provedena v soustavě cyklohexan/ethyl-acetát, 0-40 %. Frakce obsahující látku **35** byly spojeny a odpařeny na RVO. Byl získán nažloutlý olej látky **35** (18 mg, 14 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,56 (s, 1H), 7,90 (m, 2H), 7,64 (m, 4H), 7,41 (m, 6H), 7,06 (m, 2H), 5,78 (d,  $J = 6,5$  Hz, 1H), 5,72 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 5,33 (t,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 4,30 (ddd,  $J = 9,3, 6,5, 5,1$  Hz, 1H), 3,98 (m, 1H), 3,83 (d,  $J = 1,7$  Hz, 3H), 3,79 (d,  $J = 3,0$  Hz, 3H), 0,98 (s, 9H).  $^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  -123,92.  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  161,70 (d,  $J = 121,8$  Hz), 160,45, 143,38, 138,66, 135,09, 134,08, 133,01 (d,  $J = 3,2$  Hz), 130,54, 129,84, 127,80 (d,  $J = 7,7$  Hz), 126,34, 115,30, 114,50, 111,68, 87,97, 79,82, 78,93, 71,38, 63,04, 55,35, 26,51, 18,90. ESI-MS,  $m/z$ : 599,4 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$

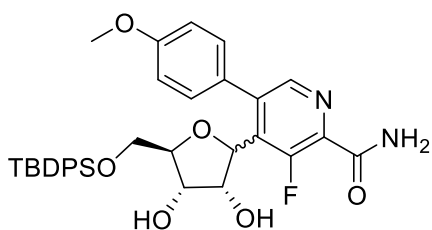
**4-((3*R*,4*S*,5*R*)-5-(((*tert*-Butyldifenylsilyl)oxy)methyl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)-3-fluor-5-(thiopen-3-yl)pikolinonitril (směs  $\alpha$  a  $\beta$ ) (**36**)**



Látka **36** byla připravena podle **obecného postupu C** z látky **28** a thiofen-3-boronové kyseliny. Reakce probíhala přes noc při 95 °C. Produkt **33** byl získán po flash chromatografii (cyklohexan/ethyl-acetát, 0-35 %). Byl získán bezbarvý olej látky **36** (12 mg, 14 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,67 (s, 1H),

7,93 (dd, *J* = 2,9, 1,3 Hz, 1H), 7,79 (dd, *J* = 5,0, 2,9 Hz, 1H), 7,63 (m, 4H), 7,41 (m, 7H), 4,90 (dd, *J* = 6,3, 1,6 Hz, 1H), 4,37 (t, *J* = 6,2 Hz, 1H), 4,12 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H), 3,84 (m, 3H), 3,73 (dd, *J* = 12,2, 6,4 Hz, 2H), 0,99 (s, 9H). <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -123,69. <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 160,59 (d, *J* = 271,8 Hz), 148,11, 138,30, 135,12, 134,04, 133,88 (d, *J* = 8,4 Hz), 132,83 (d, *J* = 2,6 Hz), 129,81, 129,33, 128,12, 127,76, 127,58, 120,26 (d, *J* = 17,2 Hz), 113,49, 84,92, 78,43, 73,89, 70,84, 63,90, 26,55, 18,79. ESI-MS, *m/z*: 575,1 [M+H]<sup>+</sup>

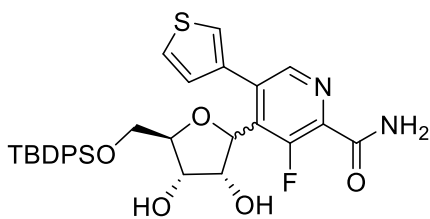
**4-((3*R*,4*S*,5*R*)-5-(((*tert*-Butyldifenylsilyl)oxy)methyl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)-3-fluor-5-(4-methoxyfenyl)picolinamid (směs α a β) (**37**)**



Látka **37** byla připravena podle **obecného postupu D** z látky **35**. Reakce probíhala za laboratorní teploty přes noc. Flash chromatografie byla provedena v soustavě dichlormethan/ethyl-acetát, 0-50 %. Byly získány nažloutlé krystaly látky **37** (0,335 g, 42 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz,

DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,35 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,63 (m, 5H), 7,40 (m, 7H), 7,06 (m, 2H), 5,20 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H), 4,98 (d, *J* = 5,9 Hz, 1H), 4,74 (m, 1H), 4,33 (d, *J* = 6,1 Hz, 1H), 3,99 (m, 1H), 3,82 (s, 3H), 3,75 (m, 3H), 0,98 (s, 9H). <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -123,86. <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 164,77, 159,59, 157,46 (d, *J* = 240,8), 144,94, 141,23, 139,16, 135,11 (d, *J* = 2,2 Hz), 133,77 (d, *J* = 9,3 Hz), 132,93 (d, *J* = 3,6 Hz), 131,32, 129,81, 127,84, 126,92, 114,03, 84,67, 79,21, 73,58, 71,08, 64,29, 55,29, 26,63, 18,83. ESI-MS, *m/z*: 617,4 [M+H]<sup>+</sup>

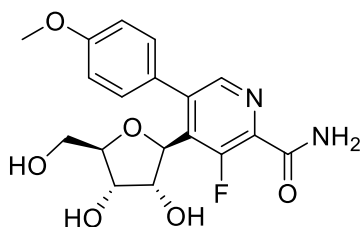
**4-((3*R*,4*S*,5*R*)-5-(((*tert*-Butyldifenylsilyl)oxy)methyl)-3,4-dihydroxytetrahydrofuran-2-yl)-3-fluor-5-(thiofen-3-yl)picolinamid (směs α a β) (**38**)**



Látka **38** byla připravena podle **obecného postupu D** z látky **36**. Reakce probíhala za laboratorní teploty přes noc. Flash chromatografie byla provedena v soustavě dichlormethan/ethyl-acetát, 0-50 %. Byla získána bílá pěna látky **38** (0,437 g, 56 %).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )

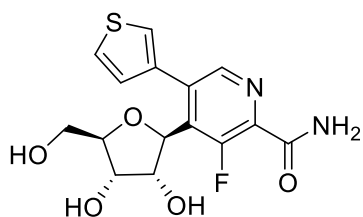
$\delta$  8.46 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.82 (dd,  $J = 3,0, 1,3$  Hz, 1H), 7.75 (dd,  $J = 4,9, 2,9$  Hz, 1H), 7.69 (m, 1H), 7.64 (dq,  $J = 6,3, 1,5$  Hz, 4H), 7.42 (m, 7H), 5.33 (d,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 5.06 (d,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 4.88 (dd,  $J = 6,5, 1,4$  Hz, 1H), 4.36 (q,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 4.03 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H), 3.83 (m, 1H), 3.73 (m, 1H), 0.99 (s, 9H).  $^{19}\text{F NMR}$  (376 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  -123,81.  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  164,71 (d,  $J = 4,4$  Hz), 155,44 (d,  $J = 271,4$  Hz), 144,73, 139,41 (d,  $J = 11,0$  Hz), 136,26, 135,09, 135,01, 133,76 (d,  $J = 9,6$  Hz), 132,89, 129,80, 129,48, 127,83, 127,08, 126,69, 84,81, 78,84, 73,69, 71,13, 64,32, 26,62, 18,81. ESI-MS,  $m/z$ : 593,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$

#### 4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-3-fluor-5-(4-methoxyphenyl)picolinamid (**39**)



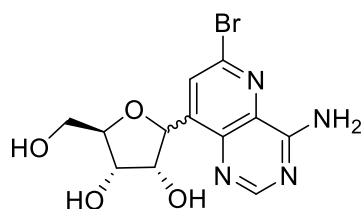
Látka **39** byla připravena podle **obecného postupu E** z látky **37**. Flash chromatografie byla provedena v soustavě z ethyl-acetátu do roztoku směsi rozpouštědel (ethyl-acetát/acetón/ethanol/voda v poměrech 20:3:1,2:0,8) s gradientem 40-100 %. Finální purifikace byla provedena reverzní chromatografie (voda/acetonitril, 5-25 %). Rekrystalizací v ethanolu byly získány bílé krystaly  $\beta$  anomeru produktu **39** (91 mg, 50 %).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,34 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,43 (dd,  $J = 8,2, 1,7$  Hz, 2H), 7,09 (dd,  $J = 8,2, 1,6$  Hz, 2H), 5,18 (dd,  $J = 5,9, 1,7$  Hz, 1H), 4,94 (dd,  $J = 5,4, 1,8$  Hz, 1H), 4,74 (t,  $J = 6,5$  Hz, 2H), 4,34 (q,  $J = 6,3$  Hz, 1H), 3,90 (q,  $J = 5,7$  Hz, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,62 (t,  $J = 5,6$  Hz, 1H), 3,53 (dt,  $J = 10,6, 5,4$  Hz, 1H).  $^{19}\text{F NMR}$  (376 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  -123,98.  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  164,83 (d,  $J = 4,5$  Hz), 159,57, 156,88 (d,  $J = 270,7$  Hz), 144,92, 141,28, 139,11 (d,  $J = 11,1$  Hz), 133,99 (d,  $J = 9,4$  Hz), 131,31, 126,92, 114,04, 85,56, 78,71, 73,55, 71,49, 62,01, 55,29. HRMS (ESI+) vypočteno  $m/z$  pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}_2\text{F}$ : 379,1300  $(\text{M}+\text{H})^+$ , nalezeno: 379,1298.  $[\alpha]_D^{20} = +12,1$  (c 0,347, DMSO)

**4-((2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-3-fluor-5-(thiofen-3-yl)pyridinamid (40)**



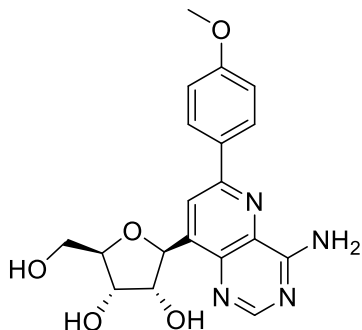
Látka **40** byla připravena podle **obecného postupu E** z látky **38**. Reflux probíhal 3 hodiny a následně reakce běžela při teplotě 60 °C přes noc. Jelikož veškerá výchozí látka nebyla přeměněná, teplota v lázni byla zvednuta na 80 °C a reakce byla ponechána 4 hodiny k refluxu. Po odpaření rozpouštědla na RVO byla provedena flash chromatografie z ethyl-acetátu do roztoku směsi rozpouštědel (ethyl-acetát/aceton/ethanol/voda v poměrech 20:3:1,2:0,8) s gradientem 40-100 % směsi rozpouštědel. Finální purifikace byla provedena reverzní chromatografie (voda/acetonitril, 5-25 %). Rekrytalizací v ethanolu byly získány bílé krystaly β anomeru produktu **40** (126 mg, 72 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,43 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 7,82 (dd, *J* = 3,0, 1,3 Hz, 1H), 7,75 (dd, *J* = 4,9, 2,9 Hz, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,38 (dd, *J* = 4,9, 1,3 Hz, 1H), 5,29 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 5,00 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 4,86 (dd, *J* = 7,0, 1,5 Hz, 1H), 4,75 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 4,34 (q, *J* = 6,3 Hz, 1H), 3,92 (q, *J* = 5,4 Hz, 1H), 3,66 (q, *J* = 5,3 Hz, 1H), 3,53 (dt, *J* = 11,1, 5,5 Hz, 1H), 3,45 (dt, *J* = 11,5, 5,8 Hz, 1H). <sup>19</sup>F NMR (376 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -123,76. <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 164,78 (d, *J* = 4,3 Hz), 156,87 (d, *J* = 271,1 Hz), 144,80, 139,31 (d, *J* = 11,0 Hz), 136,34, 135,04, 134,01 (d, *J* = 9,4 Hz), 129,52, 127,09, 126,74, 85,71, 78,28, 73,67, 71,54, 62,00. HRMS (ESI+) vypočteno *m/z* pro C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>N<sub>2</sub>FS: 355,0759 (M+H)<sup>+</sup>, nalezeno: 355,0757. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -31,7 (c 0,297, DMSO)

**(3*R*,4*S*,5*R*)-2-(4-Amino-6-brompyrido[3,2-*d*]pyrimidin-8-yl)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (směs α a β) (41)**



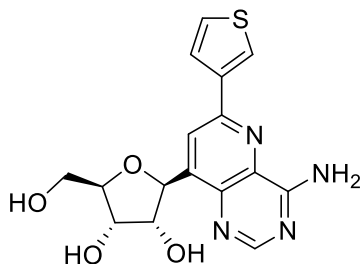
Látka **41** byla připravena podle **obecného postupu F** z látky **25**. Reakce probíhala 24 h při 100 °C. Reverzní chromatografie byla provedena v soustavě voda/acetonitril, 0-20 %. Byla získána nažloutlá pevná látka **41** (0,424 g, 32 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,46 (s, 1H), 8,21 (d, *J* = 1,0 Hz, 1H), 8,01 (d, *J* = 52,8 Hz, 2H), 5,49 (m, 1H), 5,45 (s, 1H), 5,08 (s, 1H), 4,83 (s, 1H), 3,93 (d, *J* = 13,7 Hz, 3H), 3,75 (dt, *J* = 12,2, 3,5 Hz, 1H), 3,59 (dt, *J* = 12,1, 4,2 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 161,13, 155,66, 151,06, 142,15, 138,84, 130,94, 129,12, 83,63, 79,62, 76,62, 70,21, 60,65. ESI-MS, *m/z*: 358,2 [M+H]<sup>+</sup>

**(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(4-Amino-6-(4-methoxyfenyl)pyrido[3,2-*d*]pyrimidin-8-yl)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (42)**



Látka **42** byla připravena podle **obecného postupu C** z látky **41** a 4-methoxyfenylboronové kyseliny. Reakce probíhala 3 hodiny při 95 °C. Flash chromatografie byla provedena v soustavě z ethyl-acetátu do směsi rozpouštědel (ethyl-acetát/aceton/ethanol/H<sub>2</sub>O v poměrech 20:3:1,2:0,8) s gradientem 70-100 %. Nakonec byla ještě provedena reverzní chromatografie (voda/acetonitril, 0-20 %). Rekrystalizací v ethanolu byly získány bílé krystaly β anomeru produktu **42** (27 mg, 40 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,67 (s, 1H), 8,38 (m, 3H), 8,09 (s, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,06 (m, 2H), 5,54 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 5,48 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 5,30 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,80 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 4,03 (dq, *J* = 8,7, 4,8 Hz, 2H), 3,96 (dt, *J* = 6,0, 3,1 Hz, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,81 (m, 1H), 3,67 (ddd, *J* = 12,0, 5,8, 3,4 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162,06, 160,71, 154,62, 153,61, 147,80, 141,08, 130,25, 130,04, 128,81, 121,01, 114,10, 83,56, 80,33, 76,50, 70,15, 60,71, 55,30. HRMS (ESI+) vypočteno *m/z* pro C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub>N<sub>4</sub>: 385,1507 (M+H)<sup>+</sup>, nalezeno: 385,1503. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -37,5 (c 0,248, DMSO)

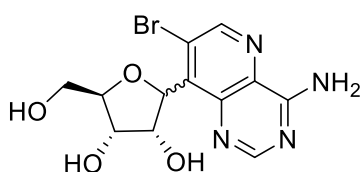
**(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(4-Amino-6-(thiofen-3-yl)pyrido[3,2-*d*]pyrimidin-8-yl)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (43)**



Látka **43** byla připravena podle **obecného postupu C** z látky **41** a thiofen-3-boronové kyseliny. Reakce probíhala přes noc při 95 °C. Flash chromatografie byla provedena v soustavě z ethyl-acetátu do směsi rozpouštědel (ethyl-acetát/aceton/ethanol/H<sub>2</sub>O v poměrech 20:3:1,2:0,8) s gradientem 70-100 %. Nakonec byla ještě provedena reverzní chromatografie (voda/acetonitril, 0-20 %). Rekrystalizací v ethanolu byly získány bílé krystaly β anomeru produktu **42** (11 mg, 16 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,61 (s, 1H), 8,47 (dd, *J* = 3,0, 1,3 Hz, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,11 (dd, *J* = 5,1, 1,2 Hz, 2H), 7,98 (s, 1H), 7,69 (dd, *J* = 5,0, 2,9 Hz, 1H), 5,52 (dd, *J* = 3,6, 0,9 Hz, 1H), 5,46 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 5,31 (t, *J* = 5,4 Hz, 1H), 4,80 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 4,03 (td, *J* = 5,9, 2,6 Hz, 2H), 3,95 (dd, *J* = 6,0, 3,1 Hz, 1H), 3,83 (m,

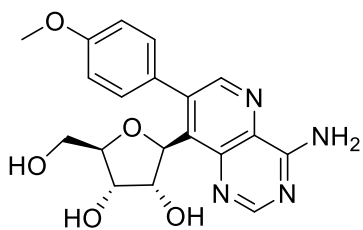
1H), 3,68 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162,04, 154,80, 150,59, 147,90, 141,56, 141,19, 130,00, 127,19, 127,09, 125,75, 122,10, 83,52, 80,27, 76,46, 70,06, 60,65. HRMS (ESI+) vypočteno m/z pro C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>S: 361,0965 (M+H)<sup>+</sup>, nalezeno: 361,0964. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -42,8 (c 0,278, DMSO)

**(3*R*,4*S*,5*R*)-2-(4-Amino-7-brompyrido[3,2-*d*]pyrimidin-8-yl)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (směs α a β) (44)**



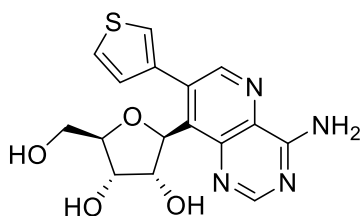
Látka **44** byla připravena podle **obecného postupu F** z látky **28**. Reakce probíhala 24 h při 100 °C. Reverzní chromatografie byla provedena v soustavě voda/acetonitril, 0-40 %. Byla získána žlutohnědá látka **44** (0,28 g, 30 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,90 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 8,22 (s, 1H), 5,79 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 5,55 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H), 4,98 (s, 2H), 4,73 (t, *J* = 6,9 Hz, 1H), 4,15 (s, 1H), 3,97 (q, *J* = 3,2 Hz, 1H), 3,66 (m, 1H), 3,56 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162,72, 155,63, 150,19, 143,97, 142,29, 130,07, 126,44, 87,17, 81,91, 74,38, 72,43, 62,43. ESI-MS, m/z: 358,9 [M+H]<sup>+</sup>

**(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(4-Amino-7-(4-methoxyfenyl)pyrido[3,2-*d*]pyrimidin-8-yl)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (45)**



Látka **45** byla připravena podle **obecného postupu C** z látky **44** a 4-methoxyfenylboronové kyseliny. Reakce probíhala 30 hodin při 95 °C. Flash chromatografie byla provedena v soustavě z ethyl-acetátu do směsi rozpouštědel (ethyl-acetát/aceton/ethanol/H<sub>2</sub>O v poměrech 20:3:1,2:0,8) s gradientem 30-100 %. Nakonec byla ještě provedena reverzní chromatografie (voda/acetonitril, 0-50 %). Rekrystalizací v ethanolu byly získány hnědé krystaly β anomeru produktu **45** (25 mg, 35 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,65 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,13 (d, *J* = 32,2 Hz, 2H), 7,49 (m, 2H), 7,09 (m, 2H), 6,10 (dd, *J* = 9,3, 2,0 Hz, 1H), 5,08 (m, 1H), 4,92 (m, 2H), 4,78 (m, 1H), 4,12 (d, *J* = 6,2 Hz, 1H), 3,86 (m, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,61 (m, 1H), 3,52 (td, *J* = 10,7, 2,7 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162,84, 159,36, 154,90, 149,72, 142,99, 142,29, 139,41, 131,55, 129,94, 128,49, 113,91, 86,98, 79,43, 74,16, 72,66, 62,58, 55,26. HRMS (ESI+) vypočteno m/z pro C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub>N<sub>4</sub>: 385,1507 (M+H)<sup>+</sup>, nalezeno: 385,1507. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -52,7 (c 0,260, DMSO)

**(2*S*,3*R*,4*S*,5*R*)-2-(4-Amino-7-(thiofen-3-yl)pyrido[3,2-*d*]pyrimidin-8-yl)-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-3,4-diol (46)**



Látka **46** byla připravena podle **obecného postupu C** z látky **44** a thiofen-3-boronoové kyseliny. Reakce probíhala přes noc při 95 °C. Flash chromatografie byla provedena v soustavě z ethyl-acetátu do směsi rozpouštědel (ethyl-acetát/acetón/ethanol/H<sub>2</sub>O v poměrech 20:3:1,2:0,8) s gradientem 40-100 %. Nakonec byla ještě provedena reverzní chromatografie (voda/acetonitril, 0-50 %). Rekrystalizací v ethanolu byly získány hnědé krystaly β-anomeru produktu **46** (25 mg, 37 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,74 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,14 (d, *J* = 29,7 Hz, 2H), 7,90 (dd, *J* = 3,0, 1,4 Hz, 1H), 7,75 (m, 1H), 7,47 (dd, *J* = 4,9, 1,4 Hz, 1H), 6,15 (dd, *J* = 9,8, 2,2 Hz, 1H), 5,24 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 5,10 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H), 4,91 (m, 1H), 4,84 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H), 4,34 (t, *J* = 5,1 Hz, 1H), 4,13 (ddd, *J* = 5,5, 4,0, 2,6 Hz, 1H), 3,89 (q, *J* = 2,7 Hz, 1H), 3,59 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 162,81, 154,94, 149,45, 143,01, 139,60, 137,35, 136,52, 130,03, 129,98, 126,89, 126,73, 87,08, 78,96, 74,27, 72,72, 62,53. HRMS (ESI<sup>+</sup>) vypočteno *m/z* pro C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>S: 361,0965 (M+H)<sup>+</sup>, nalezeno: 361,0965. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -28,5 (c 0,277, DMSO)

## 6. Závěr

Flavivirové infekce představují významnou hrozbu pro dnešní globalizovanou společnost, a to jak v rozvojových, tak i rozvinutých zemích. Fatální nedostatek vhodných terapeutik účinných proti těmto patogenům a naše současná zkušenost se SARS-CoV-2 je pádným důvodem pro intenzivní výzkum a vývoj nových léčiv proti onemocněním, které tyto viry způsobují. Cílení na viry kódované proteiny je osvědčenou a účinnou metodou, jak zastavit šíření virů a výrazně ovlivnit zdravotní stav pacientů. NS5, nestrukturní protein mající MTázovou i RdRp aktivitu, je jedním z hlavních cílů pro návrh nových terapeutik s potenciální širokospektrou účinností proti celé škále onemocnění způsobených flaviviry. V mé bakalářské práci jsem se soustředila na RdRp doménu, konkrétně na syntézu nukleosidových inhibitorů. Modifikované nukleosidové analogy se po fosforylaci v buňkách začleňují do nově vzniklé RNA, čímž dochází k terminaci syntézy nově vznikající nukleové kyseliny a ukončení replikace virů případně se k nahromadí letální mutace v jejich genomu. Trifosfátové analogy syntetizovaných látek by měly v aktivním centru soutěžit o navázání s hostitelskými NTPs.

V rámci bakalářské práce bylo připraveno celkem 8 finálních C-nukleosidů a to s dvěma typy heterocyklické báze, s 3-fluoropikolinamidem a s pyrido[3,2-d]pyrimidin-4-aminem. Byla ověřena možnost zavedení nukleobáze na chráněný ribonolakton pomocí přímé reakce obou bromovaných 3-fluoropikolonitrilů s komplexem  $\text{TMPMgCl} \cdot \text{LiCl}$  regioselektivně do polohy 4 za velmi mírných podmínek a zároveň s uspokojivými výtěžky (23-35%). Takto připravené deriváty sloužily jako klíčové meziprodukty pro další syntézu analogů nukleosidů a jejich následné modifikace pomocí Suzukioho cross-couplingových reakcí.

Všechny připravené cílové nukleosidy budou testovány v rámci spolupráce s laboratořemi Doc. Růžka na Veterinárním ústavu, Brno a Biologickém centru AV ČR, České Budějovice na aktivitu proti flavirům (TBEV, ZIKV, WNV). Další rozšířením této práce bude příprava trifosfátových analogů od všech cílových nukleosidů a jejich následné využití pro testování proti virovým polymerázám a k dalším aplikacím v chemické biologii.

## 7. Literatura

- (1) Simmonds, P.; Becher, P.; Bukh, J.; Gould, E. A.; Meyers, G.; Monath, T.; Muerhoff, S.; Pletnev, A.; Rico-Hesse, R.; Smith, D. B.; Stapleton, J. T. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98* (1), 2.
- (2) da Fonseca, N. J.; Lima Afonso, M. Q.; Pedersolli, N. G.; de Oliveira, L. C.; Andrade, D. S.; Bleicher, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *492* (4), 565–571.
- (3) Eyer, L.; Nencka, R.; De Clercq, E.; Seley-Radtke, K.; Růžek, D. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy.* **2018**, *26*.
- (4) Chambers, T. J.; Hahn, C. S.; Galler, R.; Rice, C. M. *Annu. Rev. Microbiol.* **2003**, *44*, 649–688.
- (5) Oliveira, E. R. A.; Mohana-Borges, R.; de Alencastro, R. B.; Horta, B. A. C. *Virus Res.* **2017**, *227*, 115–123.
- (6) Chambers, T. M.; Monath, T. P. *The Flaviviruses : Structure, Replication and Evolution*, 1st ed.; Elsevier. **2003**.
- (7) Mukhopadhyay, S.; Kuhn, R. J.; Rossmann, M. G. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (1).
- (8) Bollati, M.; Alvarez, K.; Assenberg, R.; Baronti, C.; Canard, B.; Cook, S.; Coutard, B.; Decroly, E.; de Lamballerie, X.; Gould, E. A.; Grard, G.; Grimes, J. M.; Hilgenfeld, R.; Jansson, A. M.; Malet, H.; Mancini, E. J.; Mastrangelo, E.; Mattevi, A.; Milani, M.; Moureau, G.; Neyts, J.; Owens, R. J.; Ren, J.; Selisko, B.; Speroni, S.; Steuber, H.; Stuart, D. I.; Unge, T.; Bolognesi, M. *Antiviral Res.* **2010**, *87* (2), 125–148.
- (9) Malet, H.; Massé, N.; Selisko, B.; Romette, J. L.; Alvarez, K.; Guillemot, J. C.; Tolou, H.; Yap, T. L.; Vasudevan, S. G.; Lescar, J.; Canard, B. *Antiviral Res.* **2008**, *80* (1), 23–35.
- (10) Fernandez-Garcia, M. D.; Mazzon, M.; Jacobs, M.; Amara, A. *Cell Host Microbe* **2009**, *5* (4), 318–328.
- (11) Rothan, H. A.; Kumar, M. *Pathog. 2019, Vol. 8, Page 148* **2019**, *8* (3), 148.
- (12) Roby, J. A.; Setoh, Y. X.; Hall, R. A.; Khromykh, A. A. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96* (7), 1551–1569.
- (13) Fields, B. *Fields Virology*, 5th ed.; Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, **2007**.
- (14) Lindenbach, B. D.; Rice, C. M. *J. Virol.* **1999**, *73* (6), 4611–4621.
- (15) Wengler, G.; Wengler, G. *Virology* **1993**, *197* (1), 265–273.
- (16) Xu, T.; Sampath, A.; Chao, A.; Wen, D.; Nanao, M.; Chene, P.; Vasudevan, S. G.;

- Lescar, J. *J. Virol.* **2005**, *79* (16), 10278.
- (17) Bollati, M.; Milani, M.; Mastrangelo, E.; Ricagno, S.; Tedeschi, G.; Nonnis, S.; Decroly, E.; Selisko, B.; de Lamballerie, X.; Coutard, B.; Canard, B.; Bolognesi, M. *J. Mol. Biol.* **2009**, *385* (1), 140–152.
- (18) Fernandes, P. O.; Chagas, M. A.; Rocha, W. R.; Moraes, A. H. *Curr. Opin. Virol.* **2021**, *50*, 30–39.
- (19) Davidson, A. D. *Adv. Virus Res.* **2009**, *74*, 41–101.
- (20) Duan, Y. P.; Zeng, M.; Jiang, B.; Zhang, W.; Wang, M.; Jia, R.; Zhu, D.; Liu, M.; Zhao, X.; Yang, Q.; Wu, Y.; Zhang, S. Q.; Liu, Y. Y.; Zhang, L.; Yu, Y. L.; Pan, L.; Chen, S.; Cheng, A. *Viruses* **2019**, *11* (10), 929.
- (21) Godoy, A. S.; Lima, G. M. A.; Oliveira, K. I. Z.; Torres, N. U.; Maluf, F. V.; Guido, R. V. C.; Oliva, G. *Nat. Commun.* **2017**.
- (22) Duan, W.; Song, H.; Wang, H.; Chai, Y.; Su, C.; Qi, J.; Shi, Y.; Gao, G. F. *EMBO J.* **2017**, *36* (7), 919–933.
- (23) Yang, J.; Jing, X.; Yi, W.; Li, X. D.; Yao, C.; Zhang, B.; Zheng, Z.; Wang, H.; Gong, P. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (3), 1567–1580.
- (24) Westaway, E. G. *Adv. Virus Res.* **1987**, *33*, 45–90.
- (25) Klema, V. J.; Padmanabhan, R.; Choi, K. H. *Viruses.* **2015**, *7* (8), 4640–4656.
- (26) De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (6), 2301–2311.
- (27) Faisal, S.; Lal Badshah, S.; Kubra, B.; Sharaf, M.; Emwas, A. H.; Jaremko, M.; Abdalla, M. *Mol.* **2021**, *27* (1), 223.
- (28) Kumar, R.; Mishra, S.; Shreya; Maurya, S. K. *Med. Chem.* **2021**, *12* (3), 306–320.
- (29) Klumpp, K.; Kalayanov, G.; Ma, H.; Le Pogam, S.; Leveque, V.; Jiang, W. R.; Inocencio, N.; De Witte, A.; Rajyaguru, S.; Tai, E.; Chanda, S.; Irwin, M. R.; Sund, C.; Winquist, A.; Maltseva, T.; Eriksson, S.; Usova, E.; Smith, M.; Alker, A.; Najera, I.; Cammack, N.; Martin, J. A.; Johansson, N. G.; Smith, D. B. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (4), 2167–2175.
- (30) Hotard, A. L.; He, B.; Nichol, S. T.; Spiropoulou, C. F.; Lo, M. K. *Antiviral Res.* **2017**, *144*, 147–152.
- (31) Eyer, L.; Šmídková, M.; Nencka, R.; Neča, J.; Kastl, T.; Palus, M.; De Clercq, E.; Růžek, D. *Antiviral Res.* **2016**, *133*, 119–129.
- (32) Chen, Y.-L.; Ghafar, N. A.; Karuna, R.; Fu, Y.; Lim, S. P.; Schul, W.; Gu, F.; Herve, M.; Yokohama, F.; Wang, G.; Cerny, D.; Fink, K.; Blasco, F.; Shi, P.-Y. *J. Virol.* **2014**, *88* (3), 1740.

- (33) Carroll, S. S.; Tomassini, J. E.; Bosserman, M.; Getty, K.; Stahlhut, M. W.; Eldrup, A. B.; Bhat, B.; Hall, D.; Simcoe, A. L.; LaFemina, R.; Rutkowski, C. A.; Wolanski, B.; Yang, Z.; Migliaccio, G.; De Francesco, R.; Kuo, L. C.; MacCoss, M.; Olsen, D. B. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (14), 11979–11984.
- (34) Yeo, K. L.; Chen, Y. L.; Xu, H. Y.; Dong, H.; Wang, Q. Y.; Yokokawa, F.; Shi, P. Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (4), 2086.
- (35) Eyer, L.; Nencka, R.; Huvarová, I.; Palus, M.; Alves, M. J.; Gould, E. A.; De Clercq, E.; Růžek, D. *J. Infect. Dis.* **2016**, *214* (5), 707–711.
- (36) Julander, J. G.; Shafer, K.; Smee, D. F.; Morrey, J. D.; Furuta, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53* (1), 202–209.
- (37) Wu, R.; Smidansky, E. D.; Oh, H. S.; Takhampunya, R.; Padmanabhan, R.; Cameron, C. E.; Peterson, B. R. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (22), 7958–7966.
- (38) Drenichev, M. S.; Oslovsky, V. E.; Sun, L.; Tijmsa, A.; Kurochkin, N. N.; Tararov, V. I.; Chizhov, A. O.; Neyts, J.; Pannecouque, C.; Leyssen, P.; Mikhailov, S. N. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *111*, 84–94.
- (39) Warren, T. K.; Wells, J.; Panchal, R. G.; Stuthman, K. S.; Garza, N. L.; Van Tongeren, S. A.; Dong, L.; Retterer, C. J.; Eaton, B. P.; Pegoraro, G.; Honnold, S.; Bantia, S.; Kotian, P.; Chen, X.; Taubenheim, B. R.; Welch, L. S.; Minning, D. M.; Babu, Y. S.; Sheridan, W. P.; Bavari, S. *Nat. 2014 5087496* **2014**, *508* (7496), 402–405.
- (40) Cho, A.; Saunders, O. L.; Butler, T.; Zhang, L.; Xu, J.; Vela, J. E.; Feng, J. Y.; Ray, A. S.; Kim, C. U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (8), 2705–2707.
- (41) Warren, T. K.; Jordan, R.; Lo, M. K.; Ray, A. S.; Mackman, R. L.; Soloveva, V.; Siegel, D.; Perron, M.; Bannister, R.; Hui, H. C.; Larson, N.; Strickley, R.; Wells, J.; Stuthman, K. S.; Van Tongeren, S. A.; Garza, N. L.; Donnelly, G.; Shurtleff, A. C.; Retterer, C. J.; Gharaibeh, D.; Zamani, R.; Kenny, T.; Eaton, B. P.; Grimes, E.; Welch, L. S.; Gomba, L.; Wilhelmsen, C. L.; Nichols, D. K.; Nuss, J. E.; Nagle, E. R.; Kugelman, J. R.; Palacios, G.; Doerffler, E.; Neville, S.; Carra, E.; Clarke, M. O.; Zhang, L.; Lew, W.; Ross, B.; Wang, Q.; Chun, K.; Wolfe, L.; Babusis, D.; Park, Y.; Stray, K. M.; Trancheva, I.; Feng, J. Y.; Barauskas, O.; Xu, Y.; Wong, P.; Braun, M. R.; Flint, M.; McMullan, L. K.; Chen, S. S.; Fearn, R.; Swaminathan, S.; Mayers, D. L.; Spiropoulou, C. F.; Lee, W. A.; Nichol, S. T.; Cihlar, T.; Bavari, S. *Nat. 2016 5317594* **2016**, *531* (7594), 381–385.
- (42) Santoro, M. G.; Carafoli, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, *538*, 145–150.
- (43) Wang, G.; Wan, J.; Hu, Y.; Wu, X.; Prhac, M.; Dyatkina, N.; Rajwanshi, V. K.;

- Smith, D. B.; Jekle, A.; Kinkade, A.; Symons, J. A.; Jin, Z.; Deval, J.; Zhang, Q.; Tam, Y.; Chanda, S.; Blatt, L.; Beigelman, L. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (10), 4611–4624.
- (44) Alzérreca, A. *J. Heterocycl. Chem.* **2003**, *40* (2), 317–320.
- (45) Hu, Y.; Wu, D.; Peng, W.; Li, X.; Hu, F.; Huang, B.; Zhu, J.; Wu, Y. Heterocyclic compound, application thereof and pharmaceutical composition comprising same. US2020/369676, November 26, **2020**.
- (46) Godbout, C.; Trieselmann, T.; Vintonyak, V. Oxadiazolopyridine Derivates for Use as Ghrelin O-Acyl Transferase Inhibitors. US2018/0037594 A1, February 8, **2018**.
- (47) Jaric, M.; Haag, B. A.; Manolikakes, S. M.; Knochel, P. *Org. Lett.* **2011**, *13* (9), 2306–2309.
- (48) Takahashi, S.; Nakata, T. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (16), 5739–5752.
- (49) Heravi, M. M.; Hashemi, E. *Tetrahedron* **2012**, *68* (45), 9145–9178.
- (50) Huang, K. H.; Veal, J.; Barta, T.; Smith, E. D.; Ma, W.; Ommen, A. Isoquinoline, Quinazoline and Phthalazine Derivatives. US2008/70935, March 20, **2008**.
- (51) Dreger, A.; Hoff, K.; Agoglitta, O.; Bülbül, E. F.; Melesina, J.; Sippl, W.; Holl, R. *Bioorg. Chem.* **2021**, *117*, 105403.
- (52) Matsuda, D.; Kobashi, Y.; Mikami, A.; Kawamura, M.; Shiozawa, F.; Kawabe, K.; Hamada, M.; Nishimoto, S.; Kimura, K.; Miyoshi, M.; Takayama, N.; Kakinuma, H.; Ohtake, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25* (16), 4339–4354.