

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Organická chemie



Ing. Petr Jansa

Příprava purinových a pyrimidinových derivátů s potenciální biologickou aktivitou

Synthesis of purine and pyrimidine derivatives with potential biological activities

Disertační práce

Školitelé: prof. RNDr. Antonín Holý, DrSc., Dr.h.c. mult. a Ing. Zlatko Janeba, CSc.

Praha, 2011

Předkládaná disertační práce byla vypracována na *Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.* jako součást mého doktorského studia na *Katedře organické a jaderné chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze* v letech 2005-2011.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně pod vedením svých školitelů prof. RNDr. Antonína Holého, DrSc., Dr.h.c. mult. a Ing. Zlatka Janeby, CSc. a veškerou literaturu jsem řádně citoval.

Tato práce ani její část nebyla předložena k získání jiného nebo obdobného druhu vysokoškolské kvalifikace.

V Praze dne 23.8.2011

Petr Jansa

Poděkování

V první řadě musím poděkovat svým školitelům prof. RNDr. Antonínu Holému, DrSc., Dr.h.c. mult. a Ing. Zlatku Janebovi, CSc. za odborné vedení, cenné připomínky a užitečnou pomoc během celé mé práce. Pod jejich vedením jsem získal nedocenitelné zkušenosti.

Rád bych také poděkoval celému kolektivu bývalé skupiny prof. Antonína Holého, především osazenstvu naší laboratoře (laboratoř č. 180 – ÚOCHB), jmenovitě Ing. Ondřeji Baszczyňskému, Lucii Čechové, Ing. Martinu Maxmilianovi Kaiserovi, Ing. Jirkovi Blažkovi a Ondřeji Hradilovi za vytvoření výborných pracovních podmínek.

Můj dík patří pracovníkům skupiny NMR spektroskopie, především RNDr. Martinu Dračínskému, PhD. za pomoc při zpracování a interpretaci NMR spekter.

Musím také poděkovat Tomáši Cihlářovi, PhD. a Richardu Mackmanovi, PhD. (Gilead Sciences, Foster City, Ca, USA); prof. Janu Balzarinimu, prof. Eriku De Clercqovi, prof. Graciele Andrei, prof. Robertu Snoeckovi a prof. Johanu Neytsovi. (Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Belgie) za spolupráci v oblasti virologie.

Dále chci poděkovat RNDr. Ivanu Votrubovi, D.Sc. a Heleně Mertlíkové-Kaiserové, Ph.D. (ÚOCHB) za testování antiproliferačních vlastností nových sloučenin.

Zvláštní dík patří RNDr. Zdeňku Zídkovi, DrSc. a jeho spolupracovníkům (Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.) za jejich neutuchající nasazení při testování imunomodulačních vlastností nově připravených látek.

Velký dík patří mým rodičům za jejich trpělivost a velkou podporu během mého studia.

Hlavní dík patří mé ženě (a potažmo i mým synům) za její podporu, pochopení, trpělivost a lásku během celého mého doktorátu.

Tato práce, jako součást výzkumného záměru #Z4 055 0506 (ÚOCHB AV ČR, v.v.i.), byla podporována Ministerstvem školství (Výzkumné centrum Nová antivirotika a antineoplastika, #1M0508), Ministerstvem vnitra (projekt č. VG20102015046), Grantovou agenturou Akademie věd ČR (GA AV, grant KJB400550903) a firmou Gilead Sciences (Foster City, USA).

Abstrakt

Byl vypracován rozsáhlý přehled současného stavu výzkumu na poli vývoje fosfonátů acyklických nukleosidů (FAN), který cituje 196 prací v abstrahovaných časopisech. Byla vypracována nová metodika přípravy dialkyl-halogenalkylfosfonátů, která využívá mikrovlnných reaktorů. Pomocí přísné kontroly reakční teploty při ohřívání reakční směsi (díhalogenalkanů s trialkylfosfity) mikrovlnným zařízením jsme byli schopni snížit množství reaktantů až na ideální poměr 1:1. S využitím průtokového mikrovlnného reaktoru jsme byli schopni připravit klíčové stavební bloky pro syntézu FAN v 100 g množstvích, což významně urychlilo výzkum v této oblasti. Postup byl patentován a publikován.

Pro přípravu prolečiv FAN byla vyvinuta nová vysoce efektivní příprava diamidů FAN. Nalezený postup vychází přímo z esterů FAN, které reagují s trimethylsilylbromidem za vzniku bis(trimethylsilyl)esterů FAN, které jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a dobře reaktivní pro následné zavedení esterů aminokyselin. Reakcí s trimethylsilylbromidem se navíc nasilylují přítomné reaktivní skupiny ve zbytku molekuly a tím se zabrání nežádoucím vedlejším reakcím. Pomocí tohoto postupu byly navíc připraveny nové diamidy FAN s vysokou aktivitou proti HIV. Postup byl patentován a přijat k publikování.

Při studiu mikrovlnným zahříváním urychlených reakcí byl nalezen nový postup pro hydrolýzu organofosfátů a organofosfonátů na fosforečnou kyselinu či příslušné kyseliny fosfonové. Tohoto postupu bylo využito pro přípravu už více jak třiceti FAN i v několikagramových množstvích. Velkou výhodou nalezeného postupu je skutečnost, že průběh samotné reakce je možné sledovat prakticky okamžitě pouze monitorováním změny tlaku v reakční nádobě. Reakce se navíc provádí pouze pomocí levné kyseliny chlorovodíkové. Zde popsána metodika hydrolýzy diesterů fosfonových kyselin navíc dovoluje kompletní degradaci a deaktivaci organofosfátových a organofosfonátových pesticidů, insekticidů, herbicidů, polutantů, nervově paralytických látek a jejich prekurzorů. Postup byl patentován a výsledky se připravují k publikování.

Hlavním úkolem této disertační práce bylo vypracovat alternativní syntézu nově objevených PMEODAPy (tzv. FAN s „otevřeným kruhem“). Tento úkol byl též úspěšně splněn. Byla vypracována metodika přípravy základní struktury (PMEODAPy) v 100 g měřítku bez použití složitých čistících metod (publikace se připravuje). Tato syntéza dále umožnila přípravu velké série modifikovaných derivátů se zajímavými protivirovými aktivitami. Byly vypracovány tři alternativní postupy pro přípravu kýžených 5-substituovaných PMEODAPy. První postup využívá postupné výstavby celé struktury PMEODAPy již z 5-substituovaných pyrimidinů. Druhá syntetická cesta využívá přímé modifikace polohy 5 pyrimidinového kruhu pomocí substitučních (elektrofilních či radikálových) reakcí prováděných na diesteru samotného PMEODAPy. Při třetím postupu dochází k přímé modifikaci polohy 5 pyrimidinového kruhu přímo na samotném PMEODAPy (tzn. na volné fosfonové kyselině). Některé nové deriváty (substituované především v poloze 5 pyrimidinového kruhu) vykazují mikromolární a submikromolární aktivity proti virům jako HIV, VZV a HSV. Modifikací aktivních látek na lipofilní prolečiva bylo dosaženo dramatického zvýšení protivirové aktivity, kdy některé látky vykazovaly aktivity vůči VZV při koncentracích pouhých několik desítek nanomolů na litr (publikace se připravuje).

Seznam použitých zkratk a symbolů*

A	adenin
AV ČR	Akademie věd České republiky
AMP	adenosinmonofosfát
ATP	adenosintrifosfát
b.v.	bod varu
C	cytosin
CC₅₀	cytotoxická koncentrace, která vyvolá smrt u 50% buněk v porovnání s kontrolou
CMV	cytomegalovirus
cycloSAL	cyklické arylbenzylestery odvozené od kyseliny salicylové
d4AP	hydroxymethylfosfonátový analog 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy adenosinu
DAP	2,6-diaminopurin
DAPy	2,4-diaminopyrimidin
diglym	diethylenglykoldimethylether
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC₅₀	efektivní koncentrace, která vyvolá požadovaný 50% efekt vůči kontrole
FAN	fosfonáty acyklických nukleosidů
FCN	fosfonáty cyklických nukleosidů
FDA	Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FIV	virus kočičí imunitní nedostatečnosti (Feline immunodeficiency virus)
FPMP	<i>N</i> -[3-fluor-2-(fosfonomethoxy)propyl]
G	guanin
H	hypoxantin
HBV	virus hepatitidy typu B
HCV	virus hepatitidy typu C
HCMV	lidský cytomegalovirus
HDE	2-(hexadecyloxy)ethyl
HHV	lidský herpes virus

HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPMP	<i>N</i> -[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]
HSV	Herpes simplex virus
HSV TK⁻	mutant Herpes simplex viru, který už neprodukuje původní thymidinkinázu
<i>in situ</i>	z latiny, překládá se jako „na místě“ (přímo v reakční baňce)
<i>in vitro</i>	z latiny, překládá se jako „ve skle“
<i>in vivo</i>	z latiny, překládá se jako „v živém“ tedy v orgánech, resp. celých organizmech
M-A	Michaelisovy-Arbuzovovy
MCMV	myší cytomegalovirus
MSV	z anglického „murine sarcoma virus“
MV	mikrovlnný
ODE	2-(oktadecyloxy)ethyl
PEE	<i>N</i> -[2-(2-fosfonoethoxy)ethyl]
PME	<i>N</i> -[2-(fosfonomethoxy)ethyl]
PMEO	2-(fosfonomethoxy)ethyloxy
PMP	<i>N</i> -[2-(fosfonomethoxy)propyl]
POC	isopropyloxykarbonyloxymethyl
POM	pivaloyloxymethyl
RNA	ribonukleová kyselina
SATE	<i>S</i> -acylthioethyl
Sekurace	viz část 5.2 . Popis procedury sekurace
SIV	virus opičí imunitní nedostatečnosti (Simian immunodeficiency virus)
TDF	tenofovir disoproxil fumarát
THF	tetrahydrofuran
TMP	thymidinmonofosfát
VZV	Varicella-Zoster virus
XMRV	xenotropní myší virus způsobující leukémii

* některé zkratky je možné kombinovat, jako např. HDE-HPMPC = 2-(hexadecyloxy)ethyl-*N*¹-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosin

Obsah

1. Přehled současného stavu problematiky.....	9
1.1. Fosfonáty nukleosidů.....	9
1.1.1. Fosfonáty acyklických nukleosidů	12
1.1.1.1. Fosfonáty acyklických nukleosidů odvozené od hydroxymethylfosfonové kyseliny – teorie a použití	12
1.1.1.2. Ostatní fosfonáty acyklických nukleosidů – příklady a použití	26
1.1.2. Fosfonáty cyklických nukleosidů.....	28
1.1.2.1. Fosfonáty cyklických nukleosidů odvozené od hydroxymethylfosfonové kyseliny – příklady a použití	29
1.1.2.2. Ostatní fosfonáty cyklických nukleosidů – příklady a použití.....	32
2. Cíle disertační práce	33
3. Výsledky a diskuze.....	34
3.1. Přípravy dialkyl-halogenalkyloxyalkylfosfonátů a dialkyl-halogenalkylfosfonátů pomocí mikrovlnně zahřívání Michaelisovy-Arbuzovovy reakce	34
3.2. Přípravy fosfonových kyselin pomocí mikrovlnně zahřívání hydrolyzy příslušných diesterů	47
3.3. Kompletní degradace (hydrolyza) organofosfátů pomocí mikrovlnně zahřívání hydrolyzy.....	55
3.4. Příprava diamidů fosfonových kyselin s využitím příslušných bis(trimethylsilyl)esterů a biologické aktivity připravených látek	70
3.5. Efektivní přípravy FAN s „otevřeným kruhem“ (PMEO-DAPy).....	76
3.5.1. Obecné postupy pro přípravu PMEODAPy	77
3.5.2. Přípravy 5-substituovaných PMEODAPy postupnou výstavbou	80
3.5.3. Přípravy 5-substituovaných PMEODAPy přímou modifikací polohy 5 pyrimidinového kruhu vycházející z příslušných diesterů	89
3.5.4. Přípravy 5-substituovaných PMEODAPy přímou modifikací polohy 5 pyrimidinového kruhu přímo na fosfonových kyselinách.....	94
3.5.5. Protivirové aktivity připravených 5-substituovaných PMEODAPy.....	96
4. Závěr.....	102
5. Experimentální část	107
5.1. Přístroje a materiál	107
5.2. Popis procedury sekurace	108
5.3. Přípravy dialkyl-halogenalkyloxyalkylfosfonátů a dialkyl-halogenalkylfosfonátů pomocí mikrovlnně zahřívání Michaelisovy-Arbuzovovy reakce.....	108

5.4. Přípravy fosfonových kyselin pomocí mikrovlnně zahřívání hydrolyzy příslušných diesterů	114
5.5. Kompletní degradace (hydrolyza) organofosfátů pomocí mikrovlnně zahřívání hydrolyzy	127
5.6. Příprava diamidů fosfonových kyselin s využitím příslušných bis-trimethylsilyl esterů	130
5.7. Efektivní přípravy FAN s „otevřeným kruhem“ (PMEO-DAPy)	134
6. Seznam všech vlastních (abstrahovaných) publikací autora.....	180
7. Seznam patentových přihlášek autora	182
8. Seznam zvaných přednášek autora.....	182
9. Seznam získaných ocenění udělených vědeckou obcí	182
10. Literatura	183

1. Přehled současného stavu problematiky

Předmluva:

Cílem tohoto úvodu není vyčerpávající výčet literatury (což s ohledem na tisíce záznamů v primární literatuře už ani není možné), ale systematické a přehledné shrnutí současného stavu problematiky, čímž bude názorně demonstrován dosah a dopad této práce na studovanou problematiku. Název disertační práce byl volen prof. Antonínem Holým velmi obezřetně, jak se ukázalo později také velmi prozřetelně, jako příprava purinových a pyrimidinových derivátů s potenciální biologickou aktivitou. Vlastním cílem práce (popsáno dále) byla příprava nových tzv. fosfonátů acyklických nukleosidů s „otevřeným kruhem“ (vysvětleno dále), tzn. pyrimidinových derivátů napodobujících svými biologickými aktivitami příslušná purinová analoga. Dle zadání mají být všechny cílové sloučeniny substituovány fosfonátovou skupinou a mají tak patřit do skupiny látek nazývaných fosfonáty acyklických nukleosidů (FAN - vysvětleno dále). Proto bylo zadáno vypracovat přehled o současném stavu literatury na téma fosfonáty nukleosidů se zvláštním důrazem na fosfonáty acyklických nukleosidů. Studovaná problematika už byla zpracována i několika přehledovými referáty. Tyto publikace se ale vždy věnují pouze úzkému okruhu látek (např. historický popis vývoje tří schválených léků ze skupiny FAN^[1] nebo popis dosažených výsledků na dvou současně vyvíjených FAN^[2]) či biologických vlastností (např. popis protivirových aktivit známých FAN^[3, 4]) a v dnešních dnech už jsou též poměrně neaktuální (stáří šest a více let). Zde uváděný přehled literatury se snaží být maximálně obšírný pro názornost vysoké důležitosti popisovaného tématu. Z tohoto důvodu byly některé detailní informace záměrně vypuštěny (jako výsledky z preklinických, klinických a post-klinických testů biologických aktivit různých fosfonátů, detailní výsledky biologických testů v podmínkách *in vitro*, kompletní popis všech nově připravených fosfonátů nukleosidů – tato problematika byla detailně sledována a zaznamenána, ale zde z důvodu rozsáhlosti nemůže být zveřejněna).

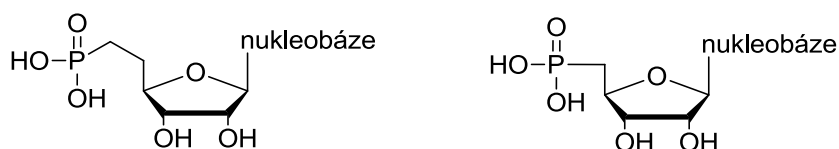
1.1. Fosfonáty nukleosidů

Purinové a pyrimidinové nukleobáze jsou základními stavebními kameny nukleových kyselin, tzv. písmena genetického kódu. Tyto složky nukleových kyselin (ať ve formě samotných nukleobází či nukleosidů, nukleotidů a jejich mono a difosfátů) nemají klíčovou roli jen při replikaci dědičné informace, ale podílejí se i na řadě regulačních a řídicích mechanismů v živých systémech. Chemickou modifikací přirozených složek nukleových kyselin se pak získávají tzv. antimetabolity složek nukleových kyselin, které mohou ovlivňovat základní životní procesy buňky či životní cyklus buněčných parazitů. Tohoto principu se hojně využívá pro návrh nových cytostatik, antivirotik, antibiotik, antiprotozoálních preparátů či látek regulujících dysfunkci či hyperfunkci některých enzymů (metabolická onemocnění).

Asi nejpočetnější skupinou používaných antimetabolitů složek nukleových kyselin jsou deriváty nukleosidů. Tyto látky ale často nejsou vlastními biologicky aktivními sloučeninami. Pro svůj biologický účinek většinou vyžadují enzymatickou aktivaci. Zvláště významné

postavení mezi enzymatickými aktivacemi derivátů nukleosidů má fosforylace, kterou se následně získávají analoga nukleotidů, nukleosid-difosfátů a nukleosid-trifosfátů. Nukleotidových analogů se používá pro ovlivnění celé řady řídicích a regulačních pochodů v cílové buňce či jejím parazitovi (příklady uvedeny dále). Látky napodobující nukleosid trifosfáty zase ovlivňují replikaci dědičné informace. V celé fosforylační kaskádě je klíčovým krokem hned první zavedení fosfátového zbytku pomocí nukleosidkináz. Aktivita vlastního nukleosidu pak může být snížena či dokonce úplně potlačena vlivem neefektivní fosforylace. K této situaci může dojít například, pokud klíčová nukleosidkináza není v cílové buňce přítomna či je její aktivita nějak snížena. U onemocnění, kde je možná genetická evoluce, může dojít až k vyselektování rezistentní varianty (nádorového či infekčního onemocnění), která už cílovou nukleosidkinázu vůbec neprodukuje (např. dobře známý mutant Herpes simplex viru, který už neprodukuje původní thymidinkinázu – označovaný jako HSV TK⁻). Celý problém je ještě umocněn faktem, že získané mono-, di- či trifosfáty se opět zpětně enzymaticky defosforylují a koncentrace aktivního metabolitu tak může být v buňce velice nízká a tím se dále snižuje potenciál látek vyžadujících fosforylaci. Z tohoto důvodu ani není možné nukleosidové antimetabolity aplikovat ve fosforylované formě, protože okamžitě podléhají defosforylacím. Dva negativní náboje na fosfátové části navíc brání prostupu látky přes buněčné membrány. Částečné řešení přináší použití neutrálních esterů, amidů či smíšených esterů/amidů cílových nukleotidů, kde jsou obě volné OH skupiny fosfátového zbytku derivatizovány na ester či amid^{5, 6}. Tato proléčiva jsou schopna dopravit nukleotid přes buněčnou membránu. V intracelulárním prostoru jsou následně takováto proléčiva enzymaticky hydrolyzována za uvolnění vlastního nukleotidu, který ovšem může být dále hydrolyzován až znovu na příslušný nukleosid.

Úplné řešení stabilizace fosfoesterové vazby vůči degradaci chemické či enzymatické přinesla chemická modifikace a náhrada fosfoesterového zbytku skupinou fosfonovou. Tedy záměna uskupení $(OH)_2P(O)-O-C$ na uskupení $(OH)_2P(O)-C$. Toto vedlo k přípravě prvních fosfonátů nukleosidů (obr. 1)⁷. Nehydrolyzovatelnost vazby P-C v molekulách fosfonátů nukleosidů je navíc činí stálými i pro opravné mechanismy, které se účastní replikace nukleové kyseliny. Připravené fosfonáty zachovávají princip stejné disociovatelnosti jako původní fosfáty (dvě OH skupiny, které mohou být disociovány – tzv. princip isopolarity).

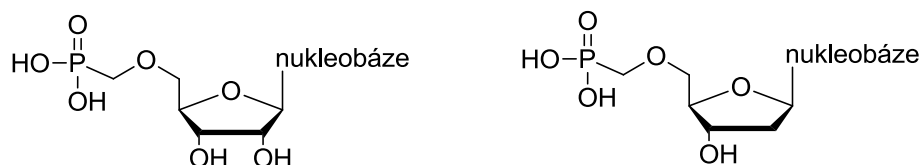


Obrázek 1. První fosfonáty nukleosidů

Přes svou podobnost s přirozenými nukleotidy nevykazují tyto látky překvapivě žádné protivirové či protinádorové aktivity.

Zde je potřeba zmínit další významnou vlastnost všech fosfonátů nukleosidů. Jako analoga nukleotidů totiž nepodléhají katabolickým reakcím, jež jsou katalyzovány enzymy nukleosidového metabolismu. Tím se výrazně zvyšuje intracelulární stabilita takovýchto antimetabolitů, čímž vzrůstá i jejich terapeutický potenciál (diskutováno dále v sekci **1.1.1.1**).

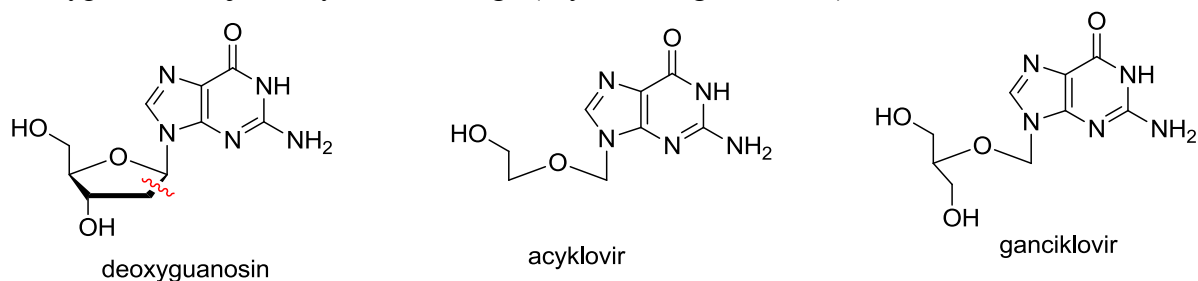
Původní myšlenka fosfonátů nukleosidů byla následně rozšířena prací prof. A. Holého a Dr. I. Rosenberga o tzv. isoelektronový princip. Dle této teorie je pro aktivitu látek esenciální stejný počet volných elektronových párů v molekule antimetabolitu jako se nachází v přirozeném substrátu (tyto elektrony totiž vytvářejí vlastní interakci s cílovým enzymem). Nová generace fosfonátů nukleosidů tedy obsahovala uskupení $(\text{OH})_2\text{P}(\text{O})\text{-CH}_2\text{-O-}$ místo původního $(\text{OH})_2\text{P}(\text{O})\text{-O-CH}_2\text{-}$ (obr. 2)^[8] a jednalo se tak o deriváty kyseliny hydroxymethylfosfonové.



Obrázek 2. Fosfonáty nukleosidů odvozené od kyseliny hydroxymethylfosfonové

Tyto látky už prokazatelně inhibují defosforylační enzymy a jsou také rozpoznávány jako substráty některých dalších enzymů. Žádný z připravených derivátů, a to ani analog odvozený od biologicky aktivních nukleosidů, nevykazuje žádnou protivirovou či protinádorovou aktivitu. Připravené látky totiž odporují dalšímu teoretickému principu a to principu isosternímu (kde mají být klíčové interagující skupiny od sebe vzdáleny stejně jako v přirozeném nukleotidu). Látky na obrázku 2 mají navíc jednu methylenovou spojku, která způsobí to, že uskupení $(\text{OH})_2\text{P}(\text{O})$ je dále od přítomné nukleobáze než je vhodné pro klíčovou interakci s enzymem. Tyto látky však stále obsahují hemiacetalové (nukleosidické) uskupení, které je jednoduše chemicky a enzymaticky hydrolyzovatelné.

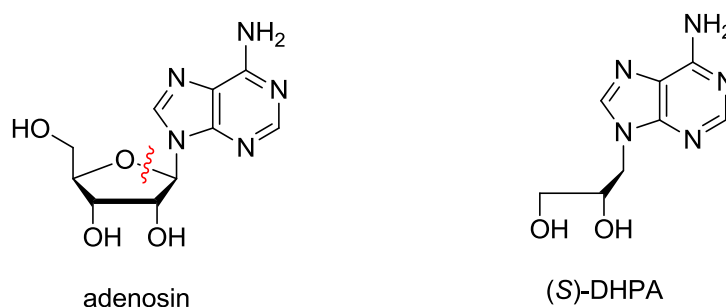
Pro další vývoj v této oblasti tak bylo nutné přijmout a zapracovat další myšlenku – teorii tzv. acyklických nukleosidů, která byla vypracována prakticky současně skupinou G. B. Elion^[9] (především H. Schaeffer^[10]) a A. Holým^[11]. Dle této teorie není nutné zachovávat maximální podobnost nového antimetabolitu se strukturou přirozeného nukleosidu, ale je důležité zachovat minimální nutný počet důležitých funkčních skupin interagujících s cílovým enzymem. Ve vlastních acyklických nukleosidech je navíc cukerná část molekuly nahrazena substituovaným alifatickým řetězcem, který je konformačně adaptabilní a může tak zaujmout konformaci, která vyhovuje požadavkům aktivního místa enzymu. Na obrázku 3 je znázorněn deoxyguanosin a jeho acyklická analoga (acyklovir a ganciklovir).



Obrázek 3. Deoxyguanosin a jeho acyklická analoga – acyklovir a ganciklovir (červeně znázorněno místo teoretické diskonekce)

Na obrázku 4 je poté znázorněn adenosin a jeho acyklický analog (*S*)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin ((*S*)-DHPA, duvira[®]). Na rozdíl od acykloviru či gancikloviru, (*S*)-DHPA již

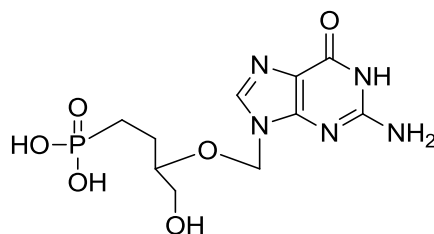
neobsahuje nukleosidovou vazbu. Místo ní je přítomna pouze velmi chemicky i enzymaticky stálá *N*-alkylová vazba, vlivem čehož je samotná látka velmi stabilní a to i za podmínek *in vivo*.



Obrázek 4. Adenosin a jeho acyklický analog – (S)-DHPA (červeně znázorněno místo teoretické diskonekce)

1.1.1. Fosfonáty acyklických nukleosidů

Kombinací výše uvedených teorií, principů a myšlenek byla objevena velmi důležitá analoga nukleotidů a to tzv. fosfonáty acyklických nukleosidů (FAN, v anglicky psané literatuře označováno jako acyclic nucleoside phosphonate - ANP). Obrázek 5 znázorňuje strukturu jednoho z prvních publikovaných derivátů tohoto druhu. Jedná se o fosfonátový analog gancikloviru, který vykazuje aktivitu proti HCMV^[12] (lidský cytomegalovirus). Jak je ale přímo ze samotného obrázku vidět, tato látka odporuje principu isoelektronovému a obsahuje navíc nestálou nukleosidovou vazbu.

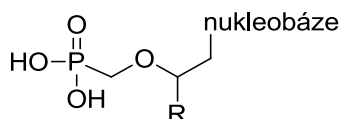


Obrázek 5. Fosfonátový analog gancikloviru

1.1.1.1. Fosfonáty acyklických nukleosidů odvozené od hydroxymethylfosfonové kyseliny – teorie a použití

Úplné naplnění všech dříve zmiňovaných principů a teorií se snoubí v látkách, které objevil A. Holý společně s I. Rosenbergem. Protivirovou aktivitu těchto látek následně dokázal E. De Clercq^[13]. Základní strukturální motiv je znázorněn na obrázku 6. Vlivem přítomné fosfonové skupiny jsou tyto látky isopolární s přirozenými nukleotidy. Díky atomu kyslíku v acyklické části (který je vázán pouze stálými etherovými vazbami) jsou látky na obrázku 6 i isoelektronové s přirozenými nukleotidy a vzhledem k tomu, že vazba acyklické části k nukleobázi má charakter stálé *N*-alkylové vazby, jsou FAN odvozené od hydroxymethylfosfonové kyseliny katabolicky zcela stálé. Jak bylo zmíněno dříve, jedná se o

obecnou vlastnost všech fosfonátů nukleosidů, že nepodléhají katabolickým reakcím pomocí enzymů nukleosidového metabolismu. U řady FAN znázorněných na obrázku 6 bylo navíc prokázáno, že jsou stále i vůči působení enzymů katalyzujícím katabolismus nukleotidů a podléhají tak pouze fosforylacím až na aktivní metabolit^[14, 15]. Bylo zároveň prokázáno, že aktivní metabolity (difosfáty) FAN mají velmi dlouhé poločasy rozpadu (desítky hodin) v intracelulárním prostředí^[15, 16], což dále zvyšuje terapeutický potenciál FAN a umožňuje to i jejich lékovou aplikaci pouze 1x denně.



Obrázek 6. Fosfonáty acyklických nukleosidů odvozené od hydroxymethylfosfonové kyseliny– základní motiv

Přítomnost a pozice kyslíkového atomu v acyklické části molekuly má navíc zásadní vliv na biologickou aktivitu. Nenaplnuje totiž pouze podmínku isoelektronovou, ale zásadně ovlivňuje také kyselost a tedy i následnou fosforylaci a protivirovou aktivitu studovaných FAN. Tabulka 1 demonstruje vliv polohy kyslíku v acyklické části na kyselost FAN a jejich schopnost být enzymaticky fosforylovány^[17]. Deriváty hydroxymethylfosfonové kyseliny tak vykazují velmi podobnou kyselost jako přirozené nukleotidy a jsou navíc prokazatelně fosforylovány v intracelulárním prostředí.

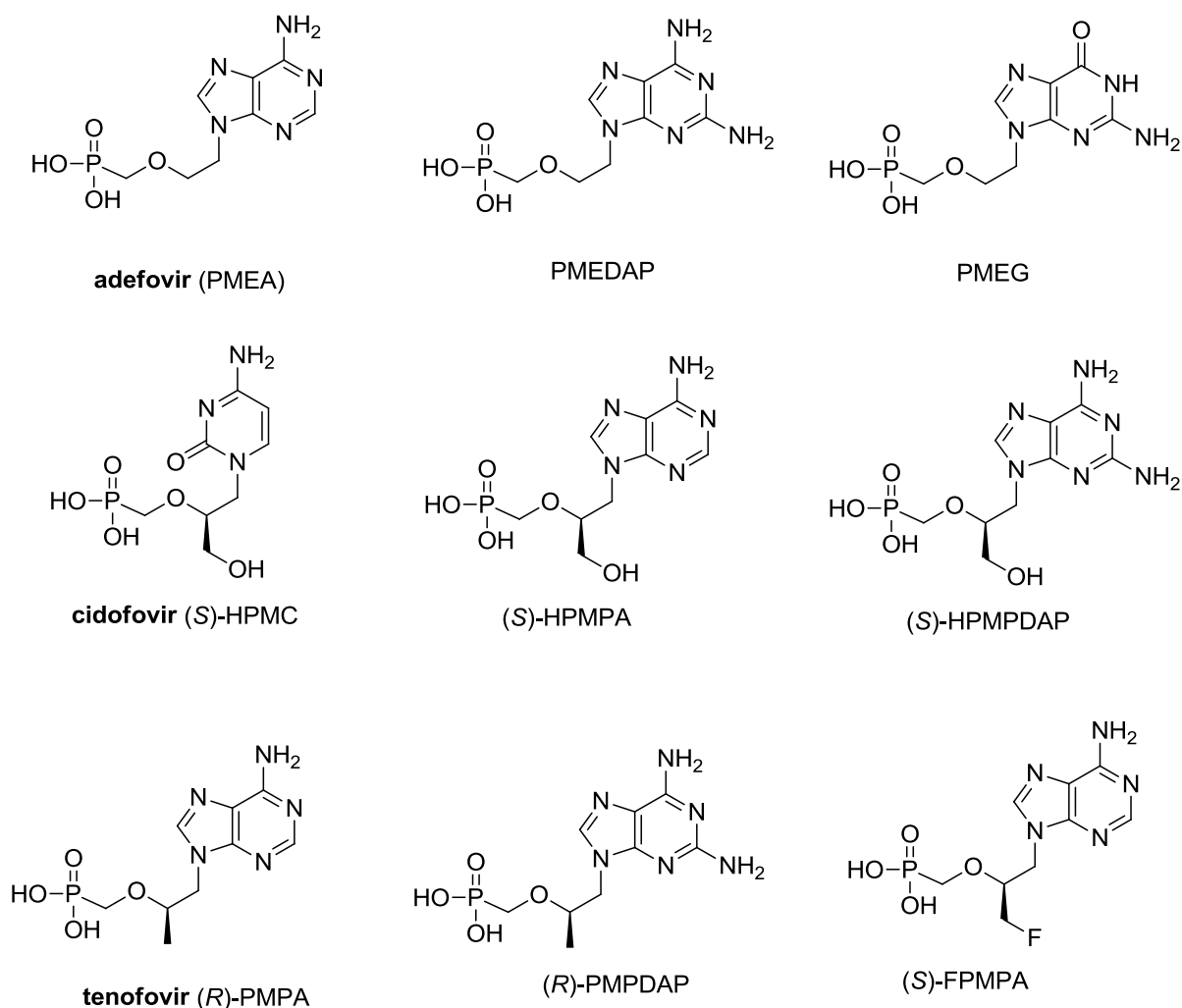
Tabulka 1. Vliv polohy atomu kyslíku na kyselost a relativní rychlost fosforylace FAN (data převzata z lit.^[17]).

Strukturní motiv	pKa ₂	Relativní rychlost následné fosforylace
	7,08	nefosforyluje se
	6,76	nefosforyluje se
	6,52	0,8
	6,50	100

Díky dlouholetému výzkumu^[1, 18] byly identifikovány čtyři hlavní strukturně obdobné řady sloučenin, lišící se pouze substitucí v acyklické části molekuly (uváděné zkratky vycházejí z anglického názvosloví, s ohledem na jejich časté užívání v primární literatuře jich budeme používat i v tomto česky psaném textu):

- 1) *N*-[2-(fosfonomethoxy)ethyl] (PME) deriváty^[19-21]
- 2) *N*-[2-(fosfonomethoxy)propyl] (PMP) deriváty^[22-24]
- 3) *N*-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl] (HPMP) deriváty^[13, 25]
- 4) *N*-[3-fluor-2-(fosfonomethoxy)propyl] (FPMP) deriváty^[26, 27]

Vybrané důležité sloučeniny s biologickou aktivitou (protivirovou či antiproliferační) jsou pro názornost vyobrazeny společně s jejich generickými názvy či používanými označeními v obrázku 7.



Obrázek 7. Přehled významných biologicky aktivních fosfonátů acyklických nukleosidů odvozených od hydroxymethylfosfonové kyseliny^[18]

Adefovir - PME A

Adefovir (obr. 7) je dobrým substrátem všech virových reverzních transkriptáz a některých virových DNA polymeráz. Vlivem toho, že postranní řetězec neobsahuje žádnou OH skupinu, nemůže po inkorporaci adefoviru do narůstající dědičné informace dojít k navázání dalšího nukleotidu a celý proces replikace se tak zastaví. Látka působí jako tzv. terminátor řetězce.

Adefovir je aktivní jak proti retrovirům (HIV, SIV a FLV), tak i proti některým DNA virům (HBV, VZV, CMV, HHV-6, HHV-7, HHV-8, HSV-1 a HSV-2)^[1, 3, 18]. Adefovir byl schválen FDA pro léčbu HBV ve formě svého proléčiva (adefovir dipivoxil, obr. 8) v roce 2002 a je nyní prodáván pod názvem Hepsera[®].

Mimo protivirových vlastností je adefovir jako analog AMP i velmi účinným inhibitorem bakteriálních adenylátcyklázových toxinů produkovaných *Bacillus anthracis*^[28] a *Bordetella pertussis*^[29]. Za zmínku stojí jistě zjištění, že adefovir difosfát je 10 000x lepším substrátem obou toxinů než přirozený substrát ATP. Fosfonáty acyklických nukleosidů tak mohou posloužit jako velice účinná anti-toxinová terapie v boji s nemocemi jako sněť slezinná a dávivý kašel.

Adefovir (ale i další FAN) je jako analog AMP schopen ovlivňovat intracelulární hladiny adenosinu^[30]. Vlivem toho je schopen ovlivňovat imunitní odpověď organismu^[31-33]. Bylo například prokázáno, že adefovir je schopen výrazně snížit mortalitu a morbiditu myši během chřipkové infekce^[34], potlačit nepřiměřenou reakci imunitního systému na transplantovanou tkáň (v myším modelu)^[32], či dokonce přímo snížit (po aplikaci adefovir dipivoxilu) rozsah zánětlivé reakce v myším modelu revmatoidní artritidy^[35].

Za zmínku také stojí fakt, že se podařilo nalézt způsob, jak je možné adefovir (potažmo i další FAN) aplikovat přes kůži třeba ve formě náplastí (které mohou představovat velice pohodlný a pozvolný způsob dávkování účinných preparátů). FAN vlivem své polarizace jen velmi pomalu a neochotně prostupují přes pokožku. Pomocí nalezeného lipofilního akcelerátoru se ovšem podařilo dosáhnout transdermální aplikací stejných koncentrací adefoviru v plazmě, jako při orální aplikaci adefovir dipivoxilu a FAN je tak v případě potřeby možno podat i přes pokožku^[36].

Tenofovir - (R)-PMPA

Tenofovir (obr. 7) je výborným substrátem všech virových reverzních transkriptáz a není substrátem jiných virových polymeráz. Vlivem toho inhibuje velice selektivně pouze replikaci virů využívajících reverzní transkripci (tzn. HIV, SIV, FLV a HBV)^[1, 3, 18]. Mechanismus účinku je stejný jako u adefoviru. Tenofovir byl schválen FDA ve formě svého proléčiva (tenofovir disoproxil fumarát – TDF, obr. 8) pro léčbu HIV v roce 2001 a pro léčbu HBV v roce 2008 a je nyní prodáván pod názvem Viread[®], Truvada[®] (kombinace s nukleosidovým inhibitorem HIV reverzní transkriptázy - emtricitabinem) a Atripla[®] (kombinace s emtricitabinem a s nenukleosidovým inhibitorem HIV reverzní transkriptázy – efavirenzem). Další dva kombinované preparáty jsou nyní v závěrečných fázích klinických zkoušek na lidských pacientech^[37]. S blížícím se koncem doby platnosti primárních patentů chránících tenofovir, můžeme očekávat brzký vývoj dalších kombinací obsahujících TDF, který se stane generikem. V důsledku toho bylo vyvinuto několik nových postupů výroby TDF, jež byly patentovány a v některých případech se objevily i v abstrahovaných časopisech^[38].

Tenofovir a jeho kombinace jsou nyní nejpoužívanějšími léky pro léčbu HIV (už v roce 2008 bylo zaznamenáno více jak 1 milion pacientů léčících se TDF^[39]) a tak jen přehled výsledků

klinických testů tohoto jediného preparátu by obsahoval stovky citací na primární literaturu. Zde se tedy zaměříme na některá nová a především zajímavá zjištění.

V klinických testech bylo například zjištěno, že léčba HIV pomocí TDF a jeho kombinací snižuje hladinu cholesterolu v krvi a má tak zajímavý pozitivní vedlejší účinek^[40]. Dále byl klinicky potvrzen profylaktický účinek TDF a jeho kombinací v prevenci přenosu HIV infekce^[41], jež byl již dříve pozorován ve zvířecím modelu^[42]. Analogický profylaktický efekt TDF a jeho kombinací byl pozorován u HIV pozitivních těhotných žen, které byly schopny porodit po intenzivní předporodní terapii zdravé potomky^[43]. FAN se vlivem své nízké rozpustnosti obecně vyznačují zvýšeným rizikem selhání ledvin. V nedávných klinických testech provedených s TDF byl ale tento efekt identifikován jako reverzibilní (u pacientů s ledvinovými problémy došlo po vysazení TDF k rychlému obnovení funkce ledvin)^[43]. Dalšími klinickými testy bylo prokázáno, že TDF a jeho kombinace nezvyšují riziko kardiovaskulárních chorob v porovnání s ostatními léky na HIV (především obsahujícím abakavir)^[44]. Díky intenzivnímu výzkumu se též podařilo najít první profylakticky účinný vaginální gel, který výrazně snižuje riziko nákazy HIV. Jedinou účinnou složkou tohoto gelu je samotný tenofovir^[45].

Testování biologických účinků FAN v podmínkách *in vitro* stále intenzivně pokračuje a přináší řadu nových a důležitých výsledků. Nedávno bylo zjištěno, že adefovir i tenofovir zabraňují replikaci dalšího retroviru, a to xenotropního myšího viru způsobujícího leukémii (XMRV). Tento virus je schopen infikovat i člověka, u kterého je následně podezřelý z indukce nádoru prostaty či z indukce chronického únavového syndromu^[46]. Adefovir a tenofovir inhibují replikaci i některých rostlinných virů, které využívají při své multiplikaci reverzní transkripci^[47]. Na replikaci jiných rostlinných RNA virů pak nemají téměř žádný efekt^[48]. Adefovir a další FAN především ze skupiny PME derivátů vytvářejí (vlivem dvojnásobně záporně nabitého zbytku kyseliny fosfonové, atomu kyslíku v acyklické části a vlivem přítomnosti atomů dusíku v nukleobázi) relativně stabilní komplexy s dvojmocnými kationty^[49] jako Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} nebo Cd^{2+} . I z tohoto důvodu byl sledován vliv tenofoviru při terapii HIV na množství Ca^{2+} v kostech. U studované skupiny pacientů nebyl pozorován žádný efekt na odvápnění kostí^[50]. Dále bylo zjištěno, že řada flavonoidů snižuje schopnost adefoviru prostupovat do ledvin, kde může vlivem jeho nízké rozpustnosti dojít až k ledvinovým dysfunkcím. Strava bohatá na některé flavonoidy tak může snižovat hlavní vedlejší účinek FAN^[51]. Stejně jako adefovir (viz výše) i tenofovir je schopen ovlivňovat produkci některých cytokinů a chemokinů^[52] a součástí jeho vysoké účinnosti v klinické praxi tak může být i stimulace imunitního systému.

Cidofovir - (S)-HPMPC

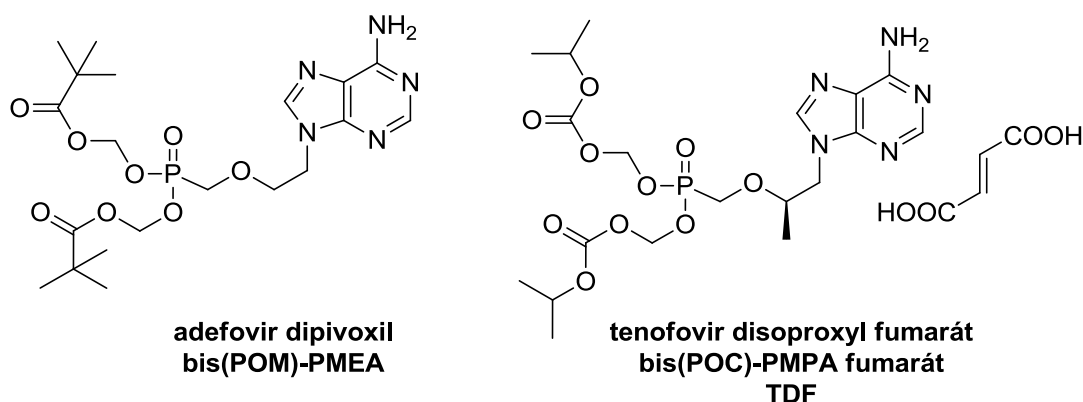
Další vysoce protivirově účinnou látkou ze skupiny FAN je cidofovir (obr. 7), který byl v roce 1996 schválen FDA pro léčbu cytomegalovirové retinitidy a je nyní prodáván pod názvem Vistide[®]. Vlivem inhibice DNA polymerázy alfa, delta i epsilon je cidofovir (a řada dalších HPMP derivátů) aktivní proti všem známým DNA virům^[1, 3, 23, 53]. Vlivem přítomné OH skupiny v acyklické části molekuly nedochází po inkorporaci cidofoviru do narůstající DNA

k přímé terminaci řetězce. Bylo prokázáno, že k vlastnímu zastavení replikace virové DNA dojde až po inkorporaci dvou molekul cidofoviru do stejného řetězce^[54].

PMEG

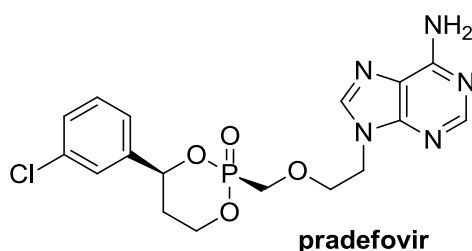
Guaninový analog adefoviru – PMEG má široké spektrum protivirových účinků^[18, 55]. Jeho protivirový potenciál je ale silně limitován jeho vysokou toxicitou. Této původně negativní vlastnosti je ale nyní naopak využíváno a řada derivátů a proléčiv PMEG je intenzivně studována a vyvíjena jako potenciální protinádorové preparáty (viz dále). Při nízkých koncentracích je hlavním mechanismem antiproliferačního účinku pouze terminace syntézy narůstajícího řetězce DNA, zatímco při vyšších intracelulárních koncentracích PMEG je tento efekt silně umocněn navozením apoptózy^[56]. Mechanismus indukce apoptózy pomocí PMEG je v současnosti studován a i přes intenzivní studie nebyl tento zřejmě komplexní mechanismus zatím zcela objasněn. Bylo například prokázáno, že PMEG zvyšuje aktivitu kaspáz 3, 8 a 9. Inhibice těchto kaspáz pomocí selektivních inhibitorů ale nemá žádný vliv na apoptózu indukovanou pomocí PMEG a apoptotická aktivita této látky je tak na kaspázách nezávislá^[57]. Dalším překvapivým zjištěním o antiproliferačních vlastnostech PMEG je například fakt, že má schopnost ovlivňovat délku telomer v leukemických buňkách. Tato vlastnost je navíc specifická pouze pro určité typy buněk. Původní předpoklad, že zkracování telomer by mohlo souviset s inhibicí telomerázy vlivem PMEG se nepotvrdil^[58] a dle všech pozorování je tento jev nezávislý na vlastní telomeráze^[59].

Pro maximální využití plného potenciálů všech fosfonátů nukleosidů v medicíně bylo potřeba vyřešit ještě jeden problém, který je způsoben dvěma zápornými náboji na fosfonátové části molekuly a je zodpovědný za pomalý a omezený vstup fosfonátů nukleosidů do cílové buňky a nízkou orální biodostupnost (5-10%)^[60]. Z tohoto důvodu jsou intenzivně zkoumána a vyvíjena lipofilní proléčiva fosfonátů nukleosidů, které nesou jen jeden negativní náboj či dokonce žádný, k čemuž se využívá chemická modifikace příslušné fosfonové kyseliny na odpovídající ester či amid (mono-, di- či smíšený ester/amid). S touto skutečností už jsme se setkali u adefoviru a tenofoviru, kde byly obě látky vyvinuty pro orální podání ve formě svých diesterů^[61] (viz obr. 8).



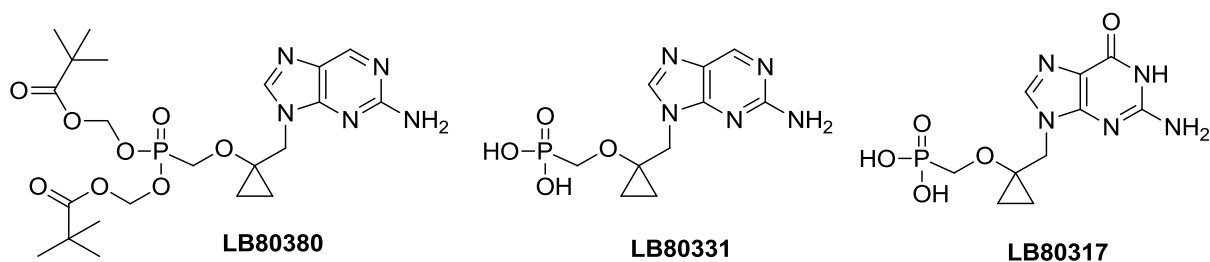
Obrázek 8. Struktura schválených orálně dostupných proléčiv adefoviru a tenofoviru.

Tvorbou vhodných proléčiv je možné dosáhnout i cíleného transportu do požadovaných tkání, čímž se dále redukuje systémová toxicita či některé vedlejší účinky. Příkladem takového proléčiva je pradefovir (obr. 9)^[62], proléčivo adefoviru, ze kterého se uvolňuje vlastní účinná látka velice selektivně pouze v játrech vlivem cytochromu P₄₅₀ (tzv. HepDirected technology^[63]). Pradefovir je tak ideálním proléčivem adefoviru pro léčbu HBV, kde je potřeba dopravit adefovir cíleně do jaterních buněk^[64]. Pradefovir je nyní ve druhé fázi klinického testování na lidech^[65] a již první výsledky jasně prokázaly dramatické zlepšení distribuce adefoviru v těle, kde bylo dosaženo 12 násobného zvýšení poměru koncentrací vlastního adefoviru v klíčových tkáních (játra/ledviny) v porovnání s adefovir dipivoxil^[66]. Tímto by měl být dramaticky redukován hlavní vedlejší efekt adefoviru – nefrotoxicita.



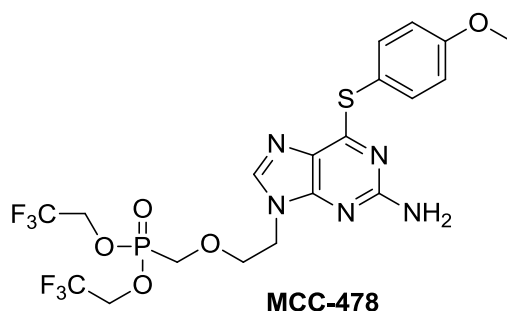
Obrázek 9. Struktura pradefoviru (proléčiva adefoviru), který selektivně uvolňuje adefovir v jaterních buňkách.

Další vysoce sofistikované a velmi nadějně proléčivo, které je schopno selektivně dopravovat aktivní látku do jaterních buněk, je látka označovaná jako LB80380^[67] (obr. 10), která je nyní v druhé fázi klinických testů na lidech^[68]. V tomto případě se jedná dokonce o dvojnásobné proléčivo^[69]. Látka LB80380 je nejdříve v intracelulárním prostoru hydrolyzována na látku LB80331, která je následně selektivně oxidována v jaterních buňkách za tvorby látky LB80317, jenž se dále postupně fosforyluje a slouží jako terminátor řetězce při replikaci HBV^[67] selektivně v jaterních buňkách.



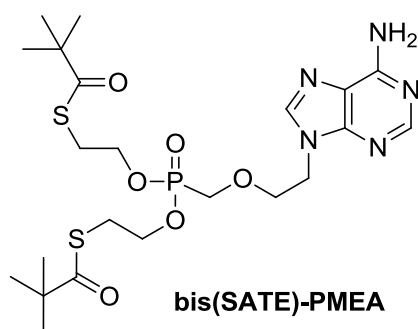
Obrázek 10. Struktura LB80317 a jeho proléčiv LB80331 a LB80380 vysoce účinných proti HBV, která jsou selektivně aktivována v jaterních buňkách.

Dalším proléčivem FAN, které bylo testováno pro léčbu HBV, byla látka MCC-478^[70] (obr. 11). Vývoj tohoto preparátu byl i přes jeho vysoké protivirové aktivity^[71] ukončen v druhé fázi klinického testování na lidech. Bylo totiž překvapivě zjištěno, že odpovídající fosfonová kyselina, nepotřebuje být fosforylována na to, aby vykazovala aktivitu proti HBV^[72] a přesný mechanismus protivirového účinku tak není znám.



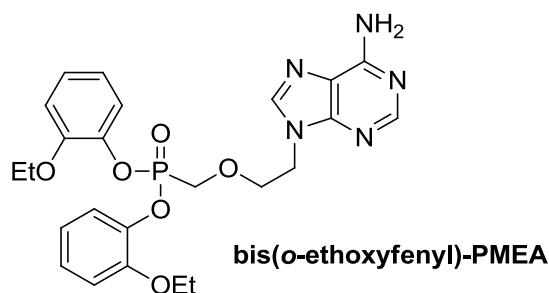
Obrázek 11. Struktura látky MCC-478, jejíž klinický vývoj byl ukončen.

Jiným používaným a studovaným proléčivem fosfonátů jsou tzv. bis(SATE) deriváty^[73]. Jedná se o *S*-acylthioethylestery (SATEestery) příslušných fosfonátů. Jednou ze studovaných látek byla i bis(SATE)-PMEA (obr. 12). Tato látka vykazuje protivirové aktivity srovnatelné se schváleným bis(POM)-PMEA proléčivem adefoviru (obr. 8). Významným rozdílem mezi bis(SATE)-PMEA a bis(POM)-PMEA je dramaticky větší stabilita bis(SATE)-PMEA v lidském séru (poločas 4 h vůči 5 minutám u bis(POM)-PMEA)^[74]. Tato látka nebyla i přes své nadějně vlastnosti dále studována.



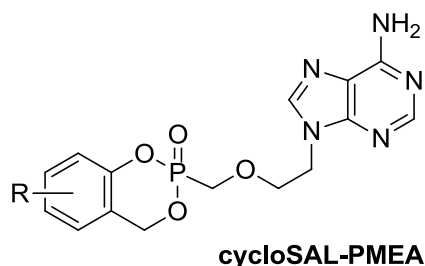
Obrázek 12. Struktura bis(SATE) derivátu adefoviru.

Další intenzivně studovanou skupinou proléčiv FAN jsou příslušné diarylestery^[75]. U bis(*o*-ethoxyfenyl)esteru PMEAs (obr. 13) bylo například prokázáno, že vykazuje vysokou orální biodostupnost (okolo 50%) a že je též selektivně aktivován v jaterních buňkách^[76]. Analogickými deriváty jsou příslušné dibenzylestery FAN. Jejich biologické aktivity však nedosahují ani hodnot naměřených pro bis(POM)-PMEA^[75].



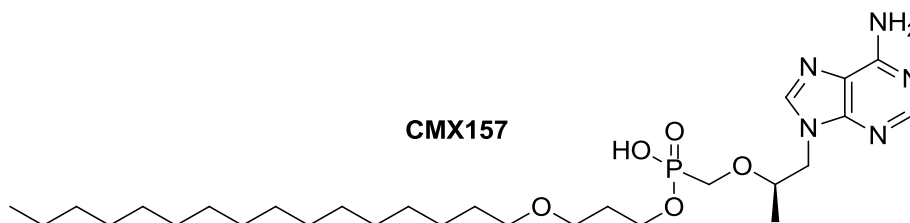
Obrázek 13. Struktura bis(*o*-ethoxyfenyl) derivátu adefoviru.

Kombinací aryl- a benzylesterů jsou cyklické arylbenzylestery FAN, tzv. cycloSAL^[77] deriváty (látky odvozené od kyseliny salicylové, obr. 14). Řada připravených derivátů cycloSAL-PMEA vykazuje vyšší protivirové aktivity v porovnání s vlastním adefovirem *in vitro*^[78]. Porovnání aktivit těchto látek se schváleným bis(POM)-PMEA ovšem chybí a u žádného cycloSAL derivátu nejsou dostupná žádná data z *in vivo* pokusů.



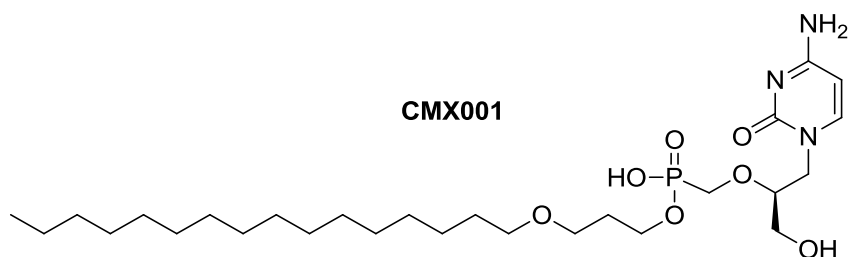
Obrázek 14. Struktura cycloSAL derivátů adefoviru.

Další intenzivně studovanou skupinou proléčiv jsou vysoce lipofilní monoestery FAN odvozené od lineárních alifatických alkoholů majících 16-20 uhlíků, kde je alespoň jedna CH₂ skupina v lineárním řetězci nahrazena atomem kyslíku (alkoxyalkoholy). Struktura těchto proléčiv byla racionálně navržena jako analogie s přirozenými fosfolipidy^[79]. Příkladem takového proléčiva je např. 3-(hexadecyloxy)propylester PMPA (obr. 15), který je v současnosti v první fázi klinického testování na lidských pacientech pod označením CMX157^[80]. Toto proléčivo vykazuje více než stonásobný nárůst protivirové aktivity vůči HIV a HBV v podmínkách *in vitro* v porovnání se samotným tenofovirem^[81].



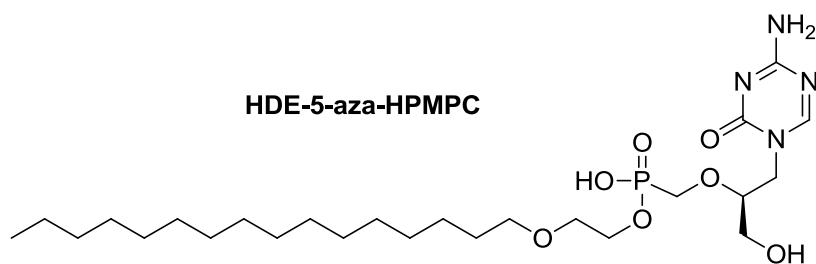
Obrázek 15. Struktura 3-(hexadecyloxy)propylesteru tenofoviru (CMX157).

Jiným příkladem proléčiva ze skupiny alkoxyalkylesterů FAN je 3-(hexadecyloxy)propylester cidofoviru (obr. 16), který je pod názvem CMX001 v druhé fázi klinických zkoušek na lidech pro léčbu infekce způsobené HCMV. CMX001 vykazuje (stejně jako cidofovir) aktivitu proti všem DNA virům, která je ovšem o dva až tři řády vyšší v podmínkách *in vivo* v porovnání s vlastním cidofovirem^[82]. Bylo navíc jasně prokázáno, že toto proléčivo vykazuje minimálně 5x vyšší koncentraci látky v plazmě a minimálně 5x nižší koncentraci látky v ledvinách než samotný cidofovir^[83], čímž je opět potlačen hlavní vedlejší účinek FAN – nefrotoxicita.



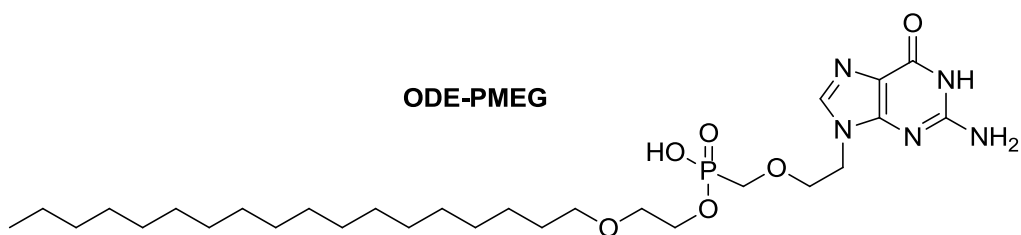
Obrázek 16. Struktura 3-(hexadecyloxy)propylesteru cidofoviru (CMX001).

Systematický výzkum v této oblasti přinesl další výsledky ve formě objevu protivirově aktivních 5-aza derivátů cidofoviru^[84]. Byly připraveny i příslušné alkoxyalkylestery (obr. 17 – 2-(hexadecyloxy)ethylester), které vykazují nejvyšší známé aktivity proti DNA virům^[85, 86]. První výsledky z *in vitro* pokusů naznačovaly vysoký farmaceutický potenciál^[87], avšak později bylo zjištěno, že se tyto látky spontánně hydrolyzují ve vodných prostředích (za otevření triazinového kruhu)^[88] a jejich aplikovatelnost ve formě orálních preparátů je tak téměř nulová.



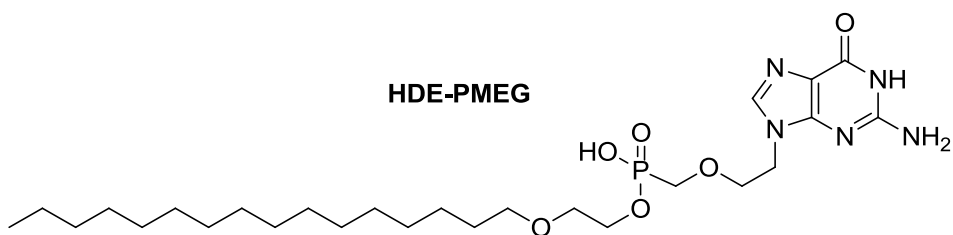
Obrázek 17. Struktura 2-(hexadecyloxy)ethyl(HDE)esteru 5-azacidofoviru.

Dalším nadějným proléčivem FAN je 2-(oktadecyloxy)ethylester PMEG (Obr. 18). Bylo zjištěno, že tato látka je schopna (při lokální aplikaci) způsobit téměř úplné vymizení nádorů děložního čípku v myším modelu^[89].



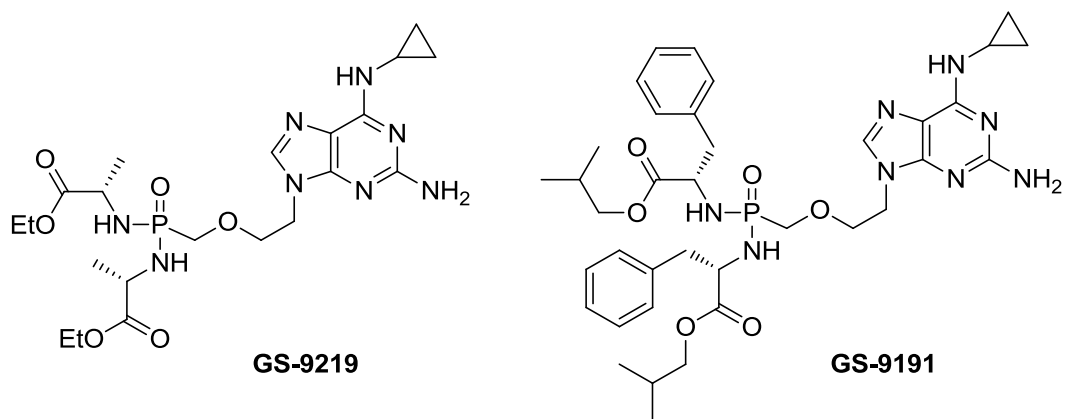
Obrázek 18. Struktura 2-(oktadecyloxy)ethyl(ODE)esteru PMEG.

Analogickým derivátem předcházející látky je 2-(hexadecyloxy)ethylester PMEG (Obr. 19), který velice selektivně inhibuje (v podmínkách *in vitro*) množení řady zhoubných nádorových buněk^[90], jež byly získány z nádorů očí.



Obrázek 19. Struktura 2-(hexadecyloxy)ethyl(HDE)esteru PMEg.

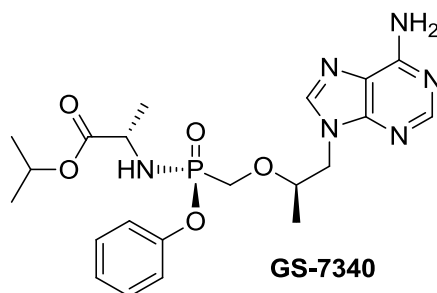
Vysoce významnou skupinou proléčiv FAN jsou jejich diamidy, mezi kterými mají velký potenciál diamidy odvozené od kódovaných aminokyselin. V tomto případě se totiž po aktivaci proléčiva na vlastní léčivo uvolňuje pouze netoxická kódovaná aminokyselina. Nejnadějnějšími sloučeninami z této skupiny jsou dvojité proléčiva PMEg, která mají velmi vysoký potenciál v léčbě nádorových a leukemických onemocnění. Látka GS-9219 (diamid s ethylesterem alaninu, obr. 20) prokázala unikátní schopnost potlačit rakovinné bujení buněk (tzv. ne-Hodgkinův lymfom) v psím zvířecím modelu, kde došlo po jediném injekčním podání k úplnému vymizení rakovinných buněk^[91]. Vývoj GS-9219 pro léčbu ne-Hodgkinových lymfomů byl ale ukončen v první fázi klinického testování na lidech po pozorování závažných vedlejších účinků. Tato látka je dále vyvíjena pro lokální aplikaci pro léčbu rakoviny děložního čípku a pro léčbu rakovinných onemocnění u psů. Analogickou sloučeninou je látka GS-9191 (diamid s isobutylesterem fenylalaninu, obr. 20), která vykazuje unikátní (subnanomolární aktivity) proti nádorům indukovaným papilomaviry^[92]. Tato látka je nyní ve druhé fázi klinických zkoušek na lidských pacientech (především pro léčbu rakoviny děložního čípku). Mechanismus účinku obou látek je společný. Diamid FAN je nejdříve aktivován pomocí katepsinu A za uvolnění *N*⁶-cyklopropyl-PMEDAP^[93, 94], který je dále selektivně hydrolyzován působením *N*⁶-methyl-AMP aminohydrolázy^[95] na PMEg (jenž je dále fosforylován a působí jako terminátor řetězce při replikaci DNA, viz výše).



Obrázek 20. Struktura dvojnásobných proléčiv PMEg – látky GS-9219 a GS-9191.

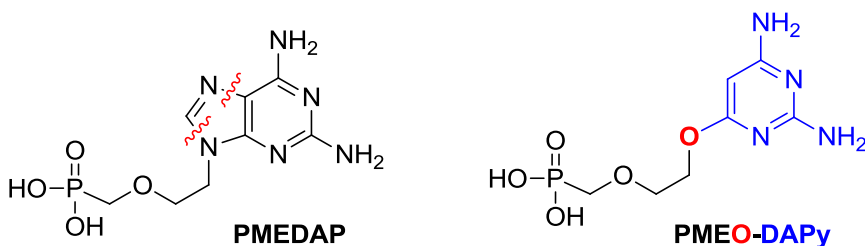
Poslední významnou skupinou proléčiv FAN jsou tzv. aryl-fosfonamidáty, zvané také jako ProTide^[5]. Jedná se o smíšené amidy a estery fosfonových kyselin. Systematickým výzkumem byla nalezena látka označovaná jako GS-7340 (proléčivo tenofoviru, obr. 21), která je nyní v první fázi klinického testování na lidských pacientech pro léčbu HIV^[37]. Tato látka vykazuje přibližně tisícínásobné zvýšení aktivity vůči HIV *in vitro* v porovnání se

samotným tenofovirem^[96]. Unikátní vlastností GS-7340 je vysoká stabilita v plazmě a preferenční akumulace v buňkách imunitního systému, kde dochází i k replikaci HIV. I při perorálním podání je tak následně dosaženo až 30x vyšší koncentrace tenofoviru v klíčových buňkách imunitního systému vůči hladinám dosaženým aplikací TDF^[96] (což dramaticky zvyšuje farmaceutický potenciál). Jako v předcházejícím případě diamidů FAN, je za aktivaci proléčiva odpovědný především katepsin A^[94, 97].



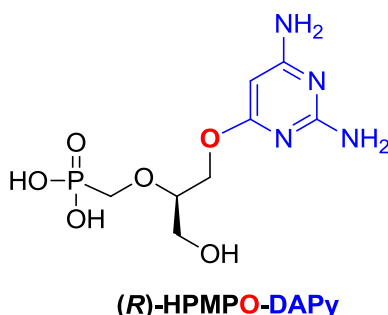
Obrázek 21. Struktura smíšeného esteru/amidu tenofoviru (GS-7340).

Intenzivní výzkum pokračuje nejen na úrovni hledání nových proléčiv již známých FAN, ale i na poli hledání nových strukturních typů FAN. Za zmínku stojí především nově objevená skupina FAN odvozená od 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidinu^[98]. Tyto látky jsou též nazývány FAN s „otevřeným kruhem“ a jejich teoretickou genezi znázorňuje obrázek 22. Jak je z obrázku 22 vidět, imidazolový kruh původního purinu je rozpojen a dusík v poloze 9 purinového kruhu je nahrazen atomem kyslíku. K označování těchto látek se pak v literatuře používají zkratky původních acyklických částí (např. PME), které jsou rozšířeny o symbol kyslíku (potom tedy PME_O). Pro označení 2,4-diaminopyrimidinu se pak používá zkratka DAPy. PME_O-DAPy vykazuje vysokou protivirovou aktivitu vůči HIV a HSV plně srovnatelnou s původním PMEDAP^[99]. Vůči virům jako jsou VZV a MSV je navíc protivirová aktivita PME_O-DAPy téměř o řád vyšší než u příslušného PMEDAP^[99]. Bylo též prokázáno, že PME_O-DAPy opravdu mimikuje svá purinová analoga (při inkorporaci do virové dědičné informace se páruje preferenčně s uracilem a asi o dva řády méně preferenčně s cytosinem, párování s guaninem či adeninem nebylo pozorováno)^[100].



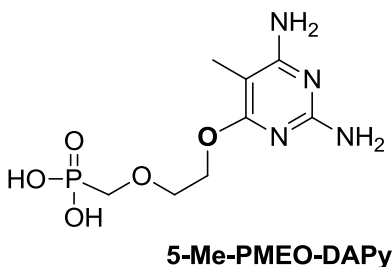
Obrázek 22. Teoretická geneze FAN s „otevřeným kruhem“. Červenými vlnovkami je zvýrazněno teoretické rozpojení imidazolového kruhu. Tyto sloučeniny pak nesou původní PME řetězec (černě), který je přes atom kyslíku (červeně) spojen s 2,4-diaminopyrimidinem (modře).

Bylo dále zjištěno, že odpovídající (*R*)-HPMPO-DAPy (obr. 23) vykazuje široké spektrum protivirové aktivity vůči všem testovaným DNA virům stejně jako cidofovir. Aktivita byla prokázána i v opičím modelu poxvirové infekce (model pravých neštovic)^[101].



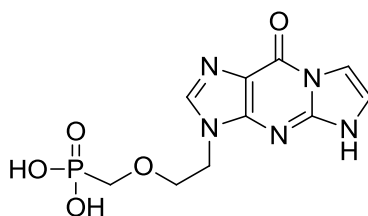
Obrázek 23. Struktura (*R*)-HPMPO-DAPy. (*R*)-HPMP řetězec (černě), atom kyslíku (červeně) a 2,4-diaminopyrimidin (modře).

Intenzivním výzkumem bylo zjištěno, že protivirová aktivita FAN s otevřeným kruhem může být dále zvýšena či modifikována (s cílem vyšší selektivity) pomocí chemické obměny polohy 5 pyrimidinového kruhu. Několik připravených derivátů vykázalo velmi vysokou aktivitu proti HIV, MSV či HBV^[102-104]. 5-Methyl-PMEO-DAPy (obr. 24) je nejúčinnějším známým FAN proti HIV a bylo též prokázáno, že je schopen inhibovat replikaci prakticky všech rezistentních kmenů HIV^[105]. Vysoký potenciál 5 substituovaných PMEO-DAPy dal vzniknout zadání této disertační práce – pyrimidinové deriváty mimikující purinová analoga.



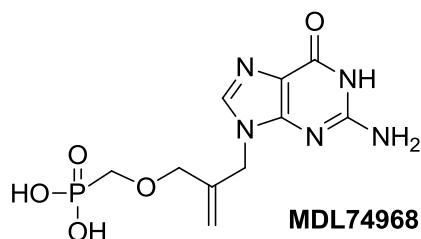
Obrázek 24. Struktura 5-methyl derivátu PMEO-DAPy.

Pro plný výčet nově objevených FAN (obsahujících modifikovanou heterocyklickou část) stojí ještě za zmínku FAN nesoucí tricyklickou nukleobázi (etheno derivát PMEG, obr 25). Tato látka vykazuje velmi vysoké aktivity vůči HCMV a VZV.



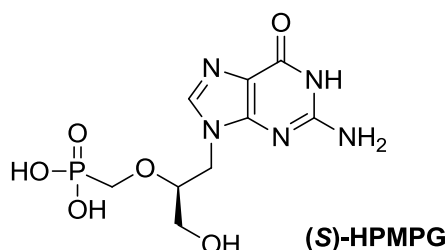
Obrázek 25. Struktura etheno derivátu PMEG.

Dalším nadějným FAN byla látka MDL74968 (obr. 26), která vykazuje vysoké protivirové aktivity (především proti HIV) srovnatelné s adefovirem či tenofovirem^[106]. Vývoj této látky byl však bez dalších informací zastaven.



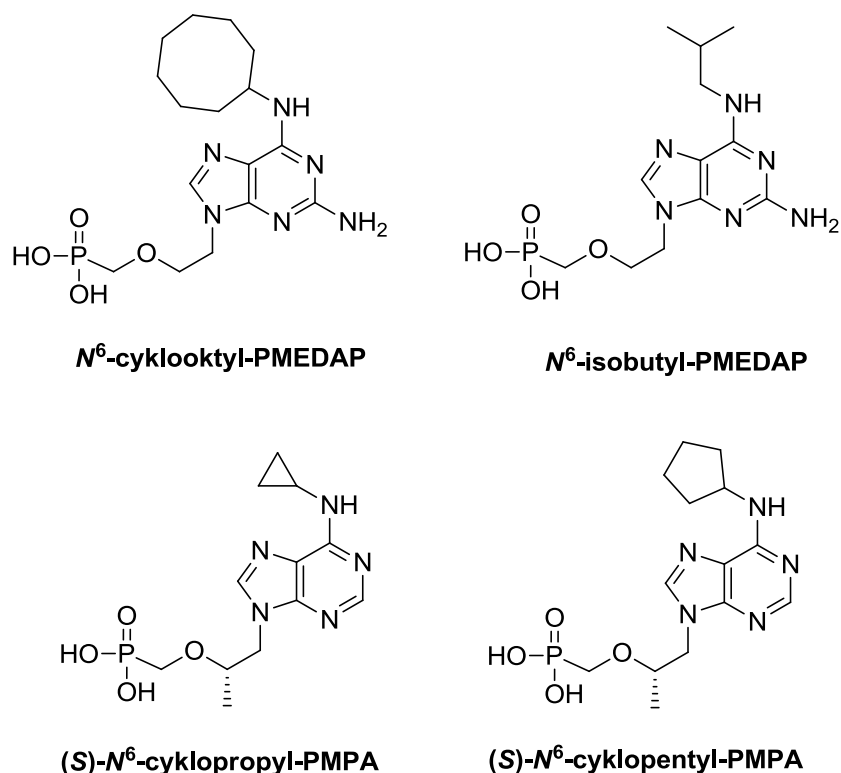
Obrázek 26. Struktura protivirově aktivní MDL74968.

Mimo protivirových aktivit našly FAN odvozené od hydroxymethylfosfonové kyseliny uplatnění i v řadě dalších oblastí, kde mohou být prospěšné antimetabolity nukleotidů. Jedním takovým příkladem jsou FAN s aktivitou proti parazitům jako např. *Plasmodium falciparum* (česky zimnička tropická, původce malárie). Tento parazit není schopen vlastní syntézy purinových nukleotidů a je tak zcela závislý na klíčovém enzymu hypoxanthinguaninxanthinofosforibosyltransferáze, jenž je pro něj jediným zdrojem životně potřebných stavebních kamenů dědičné informace^[107]. Řada FAN je (jako analoga produktu) velice účinnými inhibitory zmiňovaného parazitálního enzymu (např. (S)-HPMPG, obr. 27)^[108, 109]. Hledání nových FAN v této oblasti intenzivně pokračuje a v budoucnu tak mohou být FAN používány i jako léky proti malárii.



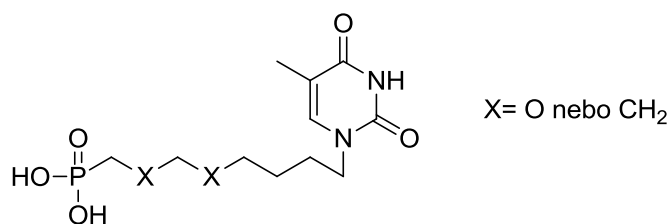
Obrázek 27. Struktura (S)-HPMPG, který je účinným inhibitorem hypoxanthinguaninxanthinofosforibosyltransferázy parazitického prvoka *Plasmodium falciparum*.

Jak je uvedeno dříve, adefovir a tenofovir mají schopnost zvyšovat sekreci řady chemokinů a cytokinů a ovlivňují tak imunitní odpověď organismu. Systematickým hledáním nových FAN byly identifikovány látky, které vykazují řádově vyšší aktivity v imunochemických testech v porovnání s adefovirem či tenofovirem. Zvláště významné se v tomto ohledu jeví *N*⁶-substituované deriváty PMEDAP a *N*⁶-substituované deriváty (S)-PMPA (obr. 28)^[33, 110].



Obrázek 28. Struktura N^6 -substituovaných derivátů PMEDAP a N^6 -substituovaných derivátů (S)-PMPA vykazujících vysoký imunostimulační účinek *in vitro*.

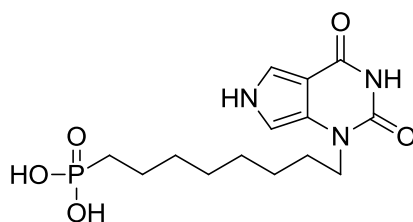
Dalším významným objevem bylo nalezení FAN (obr. 29) účinných jako inhibitory thymidinfosforylázy (enzym důležitý pro novotvorbu krevních kapilár - angiogenezi)^[111]. Tyto látky tak mohou posloužit jako doplňková léčba při chemoterapii solidních nádorů, kde mají potenciál zabraňovat dodatečnému prokrvování a vyživování nádoru.



Obrázek 29. Struktura FAN inhibujícího thymidinfosforylázu.

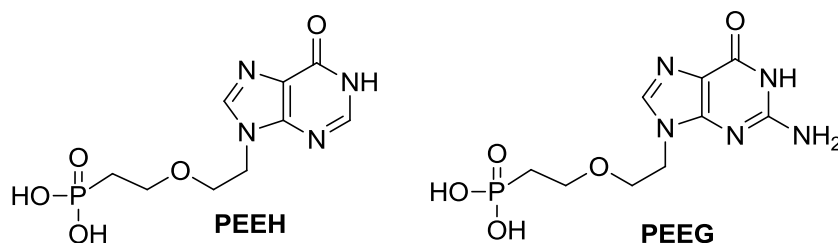
1.1.1.2. Ostatní fosfonáty acyklických nukleosidů – příklady a použití

Látek nesplňujících podmínku isoelektronovou bylo připraveno velmi mnoho, ale většina z nich nevykazovala žádnou významnou biologickou aktivitu. Mezi pár výjimek patří např. i látky z obrázku 29, kde X není kyslík, ale methylenová skupina. Analogické deriváty s bicyklickou nukleobází též vykazují inhibiční aktivitu vůči thymidinfosforyláze (obr. 30)^[112].



Obrázek 30. Struktura FAN s bicyckickou nukleobází inhibujícího thymidinfosforylázu.

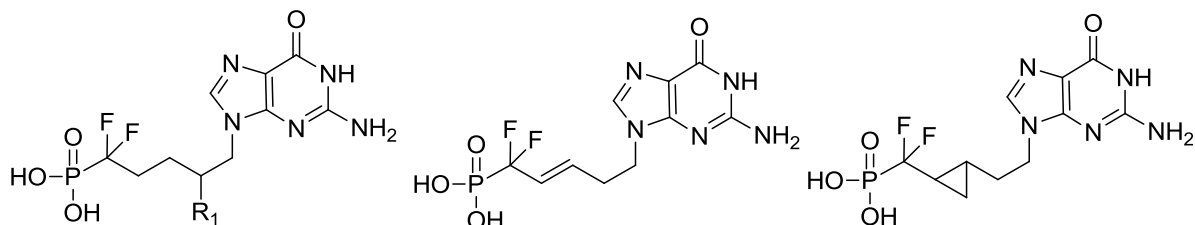
Další výjimkou mimo deriváty kyseliny hydroxymethylfosfonové jsou FAN nesoucí PEE (2-(2-fosfonoethoxy)ethyl) zbytek v acyklické části molekuly. PEE deriváty nevykazují žádné protiviřové aktivity, ale jsou výbornými inhibitory již dříve zmiřované hypoxanthinguanin-xanthinfosforibosyltransferázy prvoka z rodu *Plasmodium*. PEEH či PEEG (obr. 31) jsou dokonce výrazně lepšími inhibitory tohoto klíčového enzymu než dříve uváděný (*S*)-HPMPG (obr. 27)^[109]. O vylepřené syntéze PEE derivátů pojednává i tato disertační práce.



Obrázek 31. Struktura PEEH a PEEG, které jsou účinnými inhibitory hypoxanthinguanin-xanthinfosforibosyltransferázy prvoka *Plasmodium falciparum*.

Pro pochopení biologické aktivity látek z obrázku 30 a 31 je potřeba si uvědomit, že v obou případech látka účinkuje přímo jako analoga nukleotidu a nemusejí tedy být nejdříve fosforylovány. Fosforylace u fosfonoethoxy derivátů ani nebyla pozorována (viz tabulka 1).

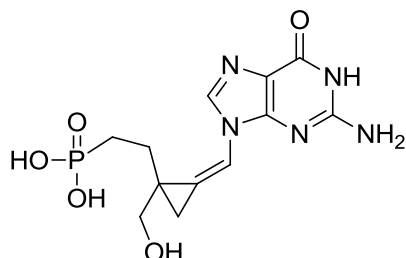
Jinou možností jak dostat podmínce isoelektronové je další druh chemické modifikace, a to zavedení atomu fluoru na uhlík přímo sousedící s atomem fosforu. Aplikací této myšlenky se podařilo nalézt novou skupinu vysoce účinných inhibitorů purinnukleosidfosforylázy (obr. 32) nesoucích vedle atomu fosforu dokonce dva atomy fluoru^[113].



Obrázek 32. Struktura difluorovaných FAN inhibujících purinnukleosidfosforylázu.

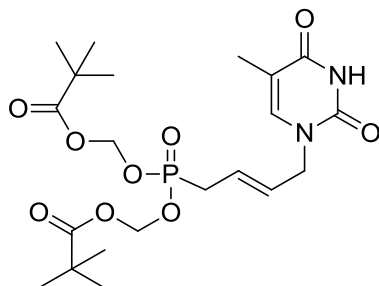
Podobně aktivní jsou i příslušná 9-deazaguaninová analoga^[114, 115]. Tyto látky by mohly posloužit v léčbě nádorových či některých parazitárních onemocnění. I přes intenzivní výzkum se u těchto derivátů nepodařilo nalézt žádné významné protiviřové aktivity (což asi opět souvisí s omezenou fosforylací). Problematiku fluorofosfonátů a difluorofosfonátů komplexně shrnuje jeden rozsáhlý přehledový referát^[116].

Alespoň částečná protivirová aktivita byla nalezena u fosfonátového analogu cyclopropaviru (obr. 33). Tato látka vykazuje aktivitu proti HCMV, MCMV a VZV^[117]. Příslušný derivát cyclopropaviru nesoucí zbytek kyseliny hydroxymethylfosfonové zatím připraven nebyl (látka již není zcela acyklická; v „acyklické“ části molekuly obsahuje cyklopropanový kruh, nejedná se však o derivát furanu a tak je uvedena mezi FAN).



Obrázek 33. Struktura protivirově aktivního fosfonátového analogu cyclopropaviru.

Protivirové aktivity vůči VZV a HSV byly nalezeny též u dalšího FAN obsahujícího v acyklické části molekuly dvojnou vazbu. U této látky (obr. 34) bylo i prokázáno, že její protivirová aktivita koreluje s její schopností vystupovat jako substrát lidské TMP kinázy (na rozdíl od řady dalších derivátů, které pak ani nevykazovaly protivirové aktivity)^[118]. U FAN neobsahujících zbytek kyseliny hydroxymethylfosfonové je tak jejich omezená fosforylace stále limitujícím faktorem pro design nových biologicky aktivních preparátů.



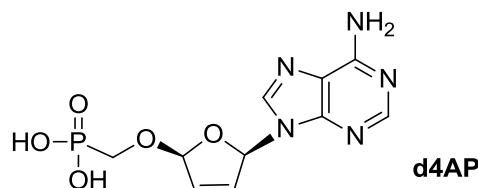
Obrázek 34. Struktura protivirově aktivního FAN nesoucího fosfonobut-2-enový zbytek.

1.1.2. Fosfonáty cyklických nukleosidů

Jak již bylo uvedeno dříve (v sekci 1.1.), fosfonáty nukleosidů odvozené přímo od přirozených nukleosidů (obr. 1) nevykazují žádné biologické aktivity. Zavedením zbytku kyseliny hydroxymethylfosfonové dojde k vyhovění principu isoelektronovému a látky z obrázku 2 už jsou substráty některých enzymů nukleotidového metabolismu. Protivirová aktivita u těchto látek ale pozorována nebyla, což se vysvětluje porušením principu isosterického, kdy je ve sloučeninách na obrázku 2 o jednu methylenovou spojku mezi nukleobází a fosfonovou skupinou více. Logickým řešením tedy bylo odebrání jedné methylenové spojky, což vedlo k objevu protivirově aktivních fosfonátů cyklických nukleosidů. (FCN).

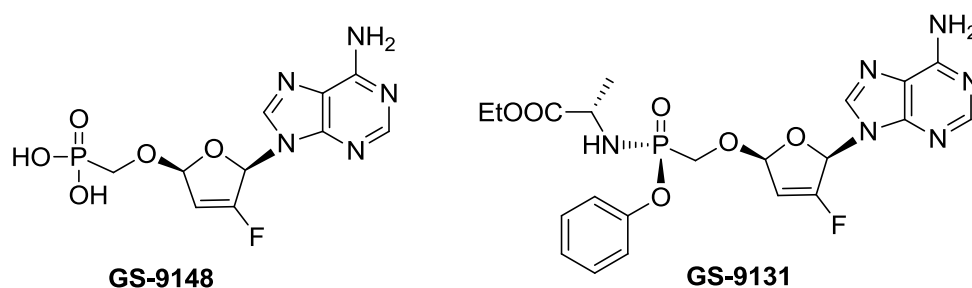
1.1.2.1. Fosfonáty cyklických nukleosidů odvozené od hydroxymethylfosfonové kyseliny – příklady a použití

Jedna z prvních sloučenin této skupiny (hydroxymethylfosfonátový analog 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-adenosinu (d4AP)) je znázorněna na obrázku 35. d4AP vykazuje protiviřivou aktivitu vůči HIV srovnatelnou s adefovirem či tenofovirem^[119]. Z důvodů náročné syntézy, s ohledem na úspěchy FAN a s vážným podezřením na mitochondriální toxicitu však nebyla tato látka dále vyvíjena. Jako součást další optimalizace struktury byla připravena i karbocyklická analoga a látky nesoucí jiné nukleobáze, ale k významnému zlepšení protiviřivou aktivitu již nedošlo^[120].



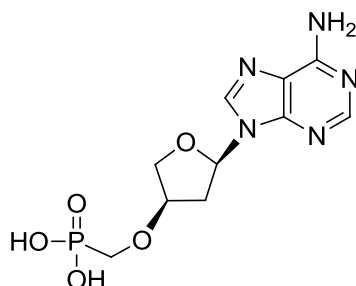
Obrázek 35. Struktura protiviřivě aktivního hydroxymethylfosfonátového analogu 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-adenosinu (d4AP).

Velká renezanace d4AP nastala až během posledních pár let. Bylo totiž zjiřtěno, že zavedením atomu fluoru (látka GS-9148 – označována též jako 2'F-d4AP, obr. 36) do polohy 2' je možné výrazně zvýřit aktivitu proti HIV a HBV^[121] a potlačit onu zmiřovanou mitochondriální toxicitu d4AP^[122]. Další důležitou vlastností je, že látka GS-9148 vykazuje téměř stejnou protiviřivou aktivitu proti všem dosud testovaným rezistentním mutantům HIV (i proti mutantům jevícím sníženou citlivostí vůči tenofoviru)^[123]. Jeřtě důležitějším objevem bylo zjiřtění, že tyto FCN nejsou akumulovány v ledvinách (jako je tomu u FAN) a jedná se tedy o látky s potenciálně velmi nízkou nefrotoxicitou^[124]. Dalřím intenzivním výzkumem se podařilo najít vhodné proléčivo – látku GS-9131, která vykazuje aktivitu proti HIV přibližně 100x vyšří v porovnání s vlastní GS-9148 v podmínkách *in vitro*^[123]. Proléčivo GS-9131 má (stejně jako GS-7340, obr. 21) schopnost dopravovat aktivní látku cíleně do požadovaných buněk imunitního systému, kde dochází k replikaci HIV^[123]. V těchto buňkách má navíc aktivní metabolit (difosfát GS-9148) velmi dlouhý biologický poločas stability (>24 h)^[122]. První pokusy *in vivo* naznačují, že i po podání malé dávky GS-9131 (3 mg/kg, orálně u psů) je možné dosáhnout dokonce 20x vyšřích intracelulárních hladin GS-9148, než jakých se dosahuje pro tenofovir po aplikaci TDF^[125]. GS-9131 je tak velkým přislibem pro léčbu HIV.



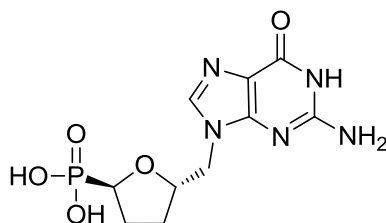
Obrázek 36. Struktura protiviřivě aktivního GS-9148 a jeho proléčiva GS-9131.

Jiným příkladem FCN nesoucího zbytek kyseliny hydroxymethylfosfonové je látka označovaná jako PMDTA (obr. 37), která vykazuje též zajímavé aktivity proti HIV srovnatelné s tenofovirem. PMDTA však není (dle dostupných informací) dále vyvíjena v preklinické fázi vývoje. Jako součást dalšího výzkumu byly připraveny nové deriváty, jež ovšem postrádaly protivirové aktivity^[126].



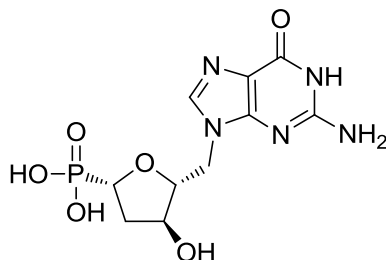
Obrázek 37. Struktura protivirově aktivní PMDTA.

Dalším příkladem látky, kde je možné vysledovat strukturní motiv hydroxymethylfosfonové kyseliny (uskupení $(OH)_2PO-C-O$), je sloučenina na obrázku 38, která jeví vysoké aktivity i proti jinak resistantním mutantům HCMV^[127]. Tato látka byla vzhledem ke své toxicitě následně testována (pod označením BCH-1868) jako potenciální protinádorový preparát a vykazovala dobré aktivity *in vitro*. Jedná se vlastně o ethylenem přemostěný PMEG (obr. 7). Výsledky provedených *in vivo* studií však nenaplnily očekávání^[128].



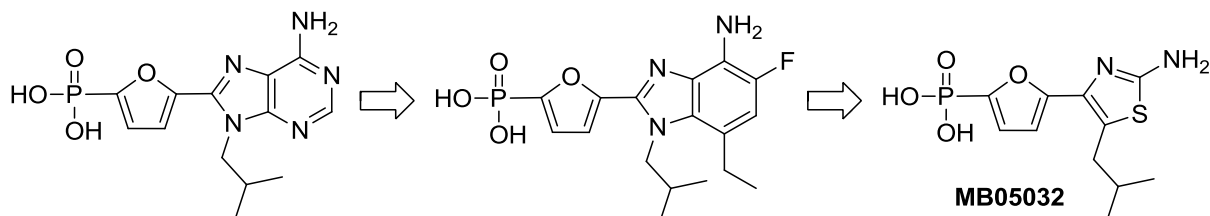
Obrázek 38. Struktura látky BCH-1868, která jeví protivirovou a protinádorovou aktivitu.

Další optimalizace struktury vedla až k objevu velice silných antiproliferačních preparátů účinných v podmínkách *in vitro*. Nejaktivnější látka je znázorněna na obrázku 39^[129]. Aktivity *in vivo* bohužel známé nejsou.



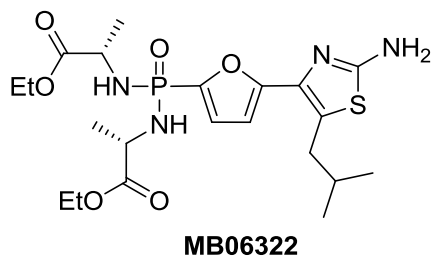
Obrázek 39. Struktura derivátu BCH-1868, který jeví vysokou antiproliferační aktivitu.

Jinou skupinou látek, kde je možné vysledovat strukturní motiv hydroxymethylfosfonové kyseliny (uskupení $(\text{OH})_2\text{PO-C-O}$), jsou látky na obrázku 40, které byly vyvinuty jako velmi účinné inhibitory fruktoso-1,6-bisfosfatázy pro potenciální léčbu diabetu typu II. Několik úspěšných generací těchto inhibitorů (obr. 40) vedlo až k identifikaci lékového kandidáta MB05032 (obr. 40)^[130-132]. Mechanismem účinku těchto látek je navázání do vazebného místa pro AMP, které funguje u tohoto enzymu jako přirozený regulátor aktivity. Jedná se tedy opět o antimetabolity nukleotidů^[133].



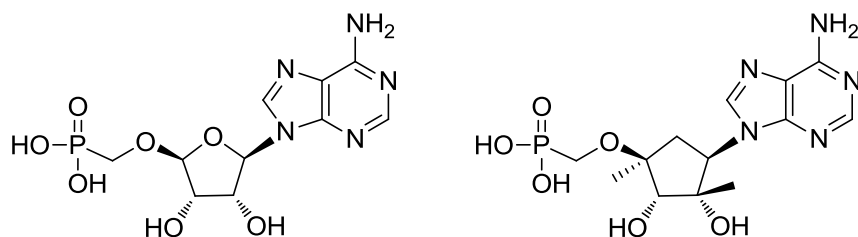
Obrázek 40. Schéma postupné optimalizace struktury účinného inhibitoru fruktoso-1,6-bisfosfatázy, identifikace látky MB05032.

Systematickým hledáním vhodného proléčiva látky MB05032 byla identifikována látka MB06322 (obr. 41)^[132, 134] s vhodnými farmakokinetickými parametry, která byla následně testována pro léčbu diabetu typu II dokonce v druhé fázi klinických zkoušek na lidech. Jedná se opět o diamid fosfonové kyseliny s ethylesterem alaninu (jako látky na obr. 20). Po odkoupení společnosti (a rozprášení celé pracovní skupiny), která látky vyvíjela, došlo zřejmě k zastavení tohoto projektu a látka se již dále nezkoumá.



Obrázek 41. Struktura účinného a orálně dostupného proléčiva vyselektovaného inhibitoru fruktoso-1,6-bisfosfatázy, identifikace proléčiva MB06322.

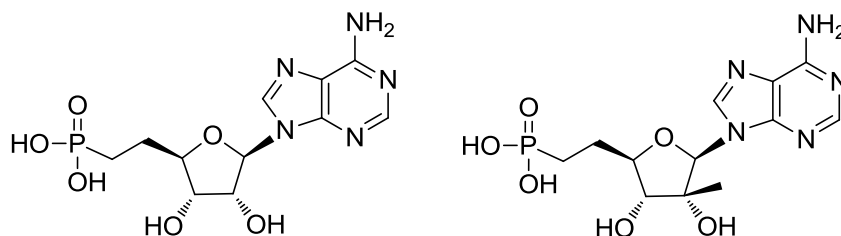
Velkou výjimkou mezi fosfonáty nukleosidů jsou látky na obrázku 42, které vykazují aktivitu vůči HCV^[135, 136]. Jedná se o deriváty d4AP (obr. 35). Léčba HCV (RNA virus) je nyní velkou výzvou a ve skupině fosfonátů nukleosidů se zatím podařilo nalézt pouze velmi málo látek, které by byly schopny inhibovat replikaci jakýchkoliv RNA virů (navíc vždy pouze s mírnými aktivitami).



Obrázek 42. Struktura fosfonátů nukleosidů vykazujících alespoň slabou aktivitu vůči HCV.

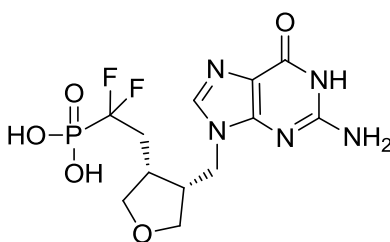
1.1.2.2. Ostatní fosfonáty cyklických nukleosidů – příklady a použití

Biologické aktivity této skupiny látek jsou velmi sporadické a mezi pár významných příkladů patří uhlíkatá analoga látek na obrázku 42. Tyto deriváty (obr. 43) vykazují také alespoň nízkou aktivitu vůči HCV^[135].



Obrázek 43. Struktura uhlíkatých analogů fosfonátů nukleosidů vykazujících alespoň slabou aktivitu vůči HCV.

Poslední látkou tohoto přehledu¹ je cyklický derivát (obr. 44) již dříve uváděných inhibitorů purinnukleosidfosforylázy (obr. 32) nesoucích vedle atomu fosforu dva atomy fluoru. Zavedením kruhu do acyklické části molekuly bylo v tomto případě dosaženo mírného zvýšení inhibiční aktivity vůči purinnukleosidfosforyláze^[137].



Obrázek 44. Struktura cyklického inhibitoru purinnukleosidfosforylázy.

¹ Po doplnění konkrétních údajů o biologických aktivitách a po doplnění přehledu o syntetických postupech pro přípravy fosfonátů nukleosidů chce autor této práce publikovat zde uváděný přehled formou přehledového referátu (review) v některém zahraničním impaktovaném časopise.

2. Cíle disertační práce

Základním cílem disertační práce bylo vypracování nového výhodného syntetického přístupu k tzv. fosfonátům acylických nukleosidů s „otevřeným kruhem“ (PMEO-DAPy). Prvních několik látek z této skupiny vykazuje velmi nadějně protivirové aktivity, především vůči HIV, VZV, MSV a HCMV^[102, 104]. Jednou z hlavních komplikací při výzkumu PMEODAPy je jejich náročná příprava, která vyžaduje opakovaná čištění sloupcovou chromatografií. Nalezení nového syntetického přístupu a příprava série nových derivátů je nyní klíčovým faktorem při dalším preklinickém vývoji těchto sloučenin.

Cíle této práce:

- 1) Vypracovat obšírný a aktuální přehledový referát o současném stavu vývoje na poli fosfonátů nukleosidů se zvláštním důrazem na acyklické fosfonáty nukleosidů.
- 2) Vyvinout novou syntetickou cestu pro přípravu fosfonátů acylických nukleosidů s „otevřeným kruhem“, která by byla aplikovatelná i v průmyslovém měřítku.
- 3) Připravit sérii 5-substituovaných derivátů PMEODAPy a sledovat vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou.
- 4) Příprava proléčiv nejnadějnějších derivátů PMEODAPy.
- 5) Vyvinutí nové, výhodné a originální procedury pro přípravu diamidů fosfonových kyselin s estery kódovaných aminokyseliny.
- 6) Zkoumání potenciálu nových technologií organické syntézy při přípravě a výrobě fosfonátů nukleosidů.

Obecným cílem této disertační práce byl vývoj nových potenciálně biologicky aktivních látek odvozených od fosfonátů nukleosidů, nukleosidů či samotných nukleobází. Dále pak získání údajů o těch strukturních parametrech, které ovlivňují jejich biologickou aktivitu.

3. Výsledky a diskuze

3.1. Přípravy dialkyl-halogenalkyloxyalkylfosfonátů a dialkyl-halogenalkylfosfonátů pomocí mikrovlnně zahřívání Michaelisovy-Arbuzovovy reakce

Prvním logickým krokem pro řešení zadaného tématu byla optimalizace příprav klíčových stavebních bloků (tzv. synthonů) pro zavádění fosfonátové části molekuly.

Při přípravách a výroбах fosfonátů nukleosidů obsahujících zbytek kyseliny hydroxymethylfosfonové se nejčastěji používá dialkylesterů kyseliny tosyloxymethylfosfonové^[18] (více než 250 záznamů v Chem. Abstr.). Příprava těchto sloučenin však vyžaduje (pro dosažení maximální čistoty) čištění sloupcovou chromatografií a je tak poměrně náročná při přípravách větších množství tohoto klíčového synthonu. Syntetickým ekvivalentem dialkylesterů kyseliny tosyloxymethylfosfonové jsou dialkylestery kyselin halomethylfosfonových. Jejich příprava je teoreticky jednoduše možná s využitím tzv. Michaelisovy-Arbuzovovy (M-A) reakce (přehledový referát^[138]), kde následně reaguje trialkylfosfit s příslušným dihalomethanem. M-A reakce je široce používaná pro přípravu řady fosfonátů^[138]. Pro přípravu libovolných dialkylesterů kyselin halogenalkylfosfonových má tento přístup ale jednu zásadní nevýhodu. Při reakci trialkylfosfitů s dihalogenalkany totiž molekula produktu obsahuje stále jeden reaktivní atom halogenu, který může reagovat ve smyslu M-A reakce dále. Konečným produktem tak jsou až příslušné bisfosfonáty. Tento problém je možné částečně potlačit vysokým nadbytkem dihalogenalkanu v reakční směsi, kde je následně statisticky pravděpodobnější reakce trialkylfosfitu s dihalogenalkanem. Toto řešení ale výrazně zvyšuje náklady na provedení reakce (vlivem vysokých nadbytků dihalogenalkanů) a často též ztěžuje izolaci požadovaných produktů. I přes uvedené nedostatky se tohoto uspořádání využívá i pro výroby vysoce důležitých dialkyl-halogenalkylfosfonátů. Jedním příkladem je optimalizovaná příprava diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu^[139], kde se využívá reakce dvou ekvivalentů 1,2-dichlorethanu s triisopropylfosfitem. M-A reakce s chloralkany je obecně velmi pomalá a tak i tato reakce vyžaduje zahřívání reakční směsi k varu po dobu 48 dní. Požadovaný produkt byl následně izolován v 54% výtěžku^[139]. Diisopropyl-2-chlorethylfosfonát slouží jako meziprodukt při výrobě velmi důležité 2-chlorethylfosfonové kyseliny (ethephon). Ethephon je jedním z nejhodněji používaných stimulantů růstu rostlin a stimulantů dozrávání ovoce a zeleniny (slouží jako zdroj ethylenu)^[140].

Během posledních pár let bylo pro urychlení průběhu M-A reakce několikrát úspěšně použito mikrovlnné (MV) ohřívání reakční směsi, kdy došlo vždy k výraznému zvýšení rychlosti reakce^[141, 142]. V literatuře se vyskytuje jediný příklad využití MV ohřevu reakční směsi při M-A reakci dihalogenalkanů^[142]. V této práci byly zkoumány pouze reakce dibromalkanů a problém reaktivity druhého atomu bromu byl opět řešen vysokým přebytkem (více jak 6 ekvivalentů) výchozího dihalogenalkanu vůči použitému trialkylfosfitu.

Publikované řešení je laboratorně použitelné, ale značně ekonomicky náročné a neekologické při průmyslové výrobě vlivem vysokého nadbytku dihalogenalkanu v reakční směsi (který často není možné účinně regenerovat). Reakce byly navíc vždy prováděny pouze v otevřené reakční nádobě za varu reakční směsi, což dovoluje provést M-A reakci pouze ideálně vroucích výchozích látek. V tomto provedení jsou však dichloralkany příliš těkavé a nereaktivní, zatímco dibromalkany a diiodalkany jsou často až příliš reaktivní a poskytují bohatou směs vedlejších produktů.

Naším cílem proto bylo rozšíření platnosti a optimalizace publikovaného protokolu. Jako modelová reakce byla zvolena příprava dříve zmiňovaného diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu reakcí triisopropylfosfitu s 1,2-dichlorethanem (Schéma 1).

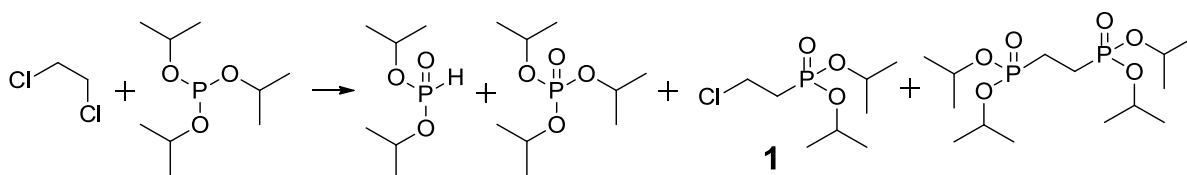


Schéma 1. Příprava diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu (**1**) reakcí 1,2-dichlorethanu s triisopropylfosfitem za současného vzniku diisopropyl-fosfonátu, triisopropyl-fosfátu a tetraisopropyl-ethylenbisfosfonátu jako vedlejších produktů.

Pro optimalizaci této reakce byl použit MV reaktor typ I (s reakčními zkumavkami o objemu 10 ml, viz experimentální část – 5.1.). Do MV zkumavky byly předloženy triisopropylfosfit (2,0 ml; 8 mmol) a odpovídající množství 1,2-dichlorethanu (viz Tabulka 2). Navážka 20 byla provedena z polovičního množství tak, aby nedošlo k přeplnění 10 ml zkumavky – 1,0 ml triisopropylfosfitu (4 mmol) a 2,7 ml 1,2-dichlorethanu (40 mmol). Navážka 30 byla z důvodu nízkého množství 1,2-dichlorethanu provedena z dvojnásobného množství – 4,0 ml triisopropylfosfitu (16 mmol) a 1,3 ml 1,2-dichlorethanu (19 mmol).

Nejprve byl studován efekt reakční teploty za konstantního reakčního času (tabulka 2, navážka 1, 2, 5 a 6). Vznik požadovaného produktu nebyl při teplotách 130 a 150 °C vůbec pozorován (navážka 1 a 2). Při teplotách 180 a 200 °C již však diisopropyl-2-chlorethylfosfonát (**1**) prokazatelně vzniká (navážka 5 a 6). Prodlužováním reakční doby se následně dosáhne logicky vyšší konverze (navážka 10). Dalším zvyšováním reakční teploty nad 200 °C bylo sice primárně dosaženo vyšší konverze, ale při vzniku nižšího množství požadovaného produktu (navážky 9 a 10). Toto snížení je vyvoláno urychlením vedlejší eliminační reakce vedoucí ke vzniku diisopropyl-fosfonátu (v tabulce označen jako látka **C**) za vyšší teploty. Tato vedlejší eliminační reakce však při teplotě 180 °C prakticky nebyla pozorována (navážka 11 a 18). Další vedlejší reakcí je oxidace výchozího triisopropylfosfitu, která vede ke vzniku triisopropyl-fosfátu (v tabulce označen jako látka **D**) a je též významně urychlena při vyšší reakční teplotě (navážky 9 a 10). Oxidaci výchozí látky vlivem přítomného kyslíku v reakční směsi je ale logicky možné potlačit velice jednoduše vysycením reakční směsi inertním plynem, což bylo uděláno a vedlo to i k výraznému potlačení oxidace výchozího triisopropylfosfitu (navážky 10 a 13). I krátký kontakt reakční směsi se vzduchem opět vede ke zvýšení množství oxidované výchozí látky (navážky 13 a 14). Zde je potřeba

ještě zmínit, že samotná výchozí látka už v originálním balení obsahovala přibližně 1% triisopropyl-fosfátu. Při vyšších reakčních teplotách (>200 °C, navážka 9) je též možné jednoznačně pozorovat urychlení tvorby příslušného bisfosfonátu (v tabulce označen jako látka **E**), který představuje nejhůře oddělitelný vedlejší produkt při přípravě látky **1**.

Tabulka 2. Podmínky optimalizace přípravy diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu (**1**).

navážka č.	čas (min)	teplota (°C)	molární poměr A:B	složení reakční směsi dle GC/MS (%)					poznámka
				B	C	D	1	E	
1	20	130	4:1	98,7	0,0	1,3	0,0	0,0	<i>a</i>
2	20	150	4:1	98,6	0,0	1,4	0,0	0,0	<i>a</i>
3	20	130	4:1	96,0	0,0	4,0	0,0	0,0	<i>a+b</i>
4	20	150	4:1	98,2	0,0	1,8	0,0	0,0	<i>a+b</i>
5	20	180	4:1	93,0	0,0	3,1	3,9	0,0	<i>a</i>
6	20	200	4:1	85,2	0,0	3,5	11,4	0,0	<i>a</i>
7	20	180	4:1	97,3	0,0	2,7	0,0	0,0	<i>a+b</i>
8	20	200	4:1	95,5	0,0	4,5	0,0	0,0	<i>a+b</i>
9	80	210	4:1	8,6	15,5	28,7	46,7	0,5	<i>a</i>
10	80	200	4:1	15,5	10,1	20,4	54,0	0,0	<i>a</i>
11	80	180	4:1	78,1	0,0	21,9	0,0	0,0	<i>a+b</i>
12	80	200	4:1	81,2	0,0	18,8	0,0	0,0	<i>a+b</i>
13	80	200	4:1	0,0	13,4	3,2	83,4	0,0	<i>c</i>
14	80	200	4:1	0,0	13,9	5,0	81,1	0,0	<i>d</i>
15	80	190	4:1	19,5	5,3	1,3	73,9	0,0	<i>c</i>
16	80+80	190	4:1	0,0	12,0	3,3	84,8	0,0	<i>e</i>
17	80	190	4:1	98,9	0,0	1,1	0,0	0,0	<i>c+f</i>
18	160	180	4:1	44,2	1,9	1,4	52,6	0,0	<i>c</i>
19	160	190	4:1	0,0	10,3	2,2	87,5	0,0	<i>c</i>
20	160	190	10:1	0,0	8,5	2,3	89,2	0,0	<i>c</i>
21	160	190	4:1	87,9	0,0	3,3	8,8	0,0	<i>c+g</i>
22	160	190	4:1	85,3	0,3	3,5	10,9	0,0	<i>c+h</i>
23	160	190	4:1	0,0	73,9	23,7	2,4	0,0	<i>c+i</i>
24	160	190	4:1	82,9	0,6	3,7	12,8	0,0	<i>c+j</i>
25	160	190	4:1	15,3	13,0	5,9	65,8	0,0	<i>c+k</i>
26	160	190	4:1	0,0	22,0	8,6	69,5	0,0	<i>c+l</i>
27	160	190	3:1	1,4	11,2	10,8	76,1	0,5	<i>a</i>
28	160	190	2:1	0,1	13,5	12,8	72,3	1,3	<i>a</i>
29	160	190	1:1	4,4	15,8	14,3	63,1	2,4	<i>a</i>
30	190	190	1,2:1	0,0	15,7	2,9	79,1	2,3	<i>c</i>

Kde **A** = 1,2-dichlorethan, **B** = triisopropylfosfit, **C** = diisopropyl-fosfonát, **D** = triisopropyl-fosfát a **E** = tetraisopropyl-ethylenbisfosfonát. Poznámka: *a* (bez sekurace), *b* (+20 molárních ekvivalentů toluenu), *c* (5x sekurováno, viz experimentální část), *d* (5x sekurováno, otevřeno pro přístup vzduchu a znovu uzavřeno), *e* (navážka 15 po reakci otevřena pro přístup vzduchu, uzavřena a zahřívána dalších 80 min.), *f* (+1 molární ekvivalent toluenu), *g* (+10 molárních ekvivalentů *p*-xylenu), *h* (+10 molárních ekvivalentů tetrahydrofuranu - THF), *i* (+10 molárních ekvivalentů pyridinu), *j* (+10 molárních ekvivalentů diglymu), *k* (+10 molárních ekvivalentů CH₃CN), *l* (+10 molárních ekvivalentů DMF). Vliv přídavku organického rozpouštědla byl studován pro potřeby průtokového MV reaktoru, kde byla následně testována tlaková těsnost celé soustavy pomocí vhodného rozpouštědla (nesnižujícího výtěžek prováděné MV reakce – tj. CH₃CN či DMF), které bylo před připojením reakční směsi z reaktoru vypuštěno. Tlaková těsnost reaktoru tedy nemusí být testována relativně

nebezpečnou a toxickou reakční směsí, ale pouze vhodným rozpouštědlem, jehož zbytky v MV reaktoru nijak nesnižují výtěžek reakce.

Pro maximální potlačení vedlejších reakcí tak byly další optimalizace prováděny vždy nejvýše při teplotě 190 °C. Snížení reakční teploty bylo logicky spojeno se zpomalením reakce (navážky 13 a 15). Prodloužením reakčních časů se ale dospělo k významně vyšším výtěžkům požadovaného produktu v porovnání s experimenty při vyšších teplotách (navážky 13 a 19). Dalším snižováním reakční teploty na 180 °C je možné vedlejší reakce ještě více potlačit. Samotný vznik požadovaného produktu pak ovšem probíhá velice pomalu a po 160 minutách zahřívání reakční směs obsahuje stále velké množství výchozího triisopropylfosfitu (navážka 18). Konečná fáze optimalizace tak byla dělána už jen při teplotě 190 °C, která odpovídá přijatelné reaktivitě ve smyslu M-A reakce a nízké tendenci k vedlejším reakcím. Další fází optimalizace bylo sledování vlivu nadbytku 1,2-dichlorethanu na průběh a selektivitu zkoumané reakce. Bylo překvapivě zjištěno, že zvýšení nadbytku 1,2-dichlorethanu (navážka 19) vede překvapivě pouze k mírnému nárůstu tvorby diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu (**1**). Toto nás vedlo k myšlence výrazně snížit nadbytek 1,2-dichlorethanu v reakční směsi. Byly proto vykonány další optimalizační kroky a bylo zjištěno, že i při molárním poměru 1,2-dichlorethanu ku triisopropylfosfitu 3:1, 2:1 či dokonce 1:1 dochází k tvorbě požadovaného produktu ve vysokém množství (navážky 27, 28 a 29), při nijak velké tvorbě příslušného bisfosfonátu. Při molárním poměru obou reaktantů 1:1 bylo pozorováno částečné snížení reakční rychlosti (což je logické s ohledem na fakt, že se rychlost reakce řídí kinetikou druhého řádu). Optimální reakce tedy byla provedena při 190 °C pod inertní atmosférou při poměru reaktantů téměř 1:1 (nadbytek 20% u 1,2-dichlorethanu byl použit k potlačení ztráty této látky během sycení reakční směsi argonem, k čemuž evidentně u této těkavé látky docházelo). Při nalezených optimálních podmínkách dochází k tvorbě požadovaného diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu (**1**) v uspokojivém výtěžku 79%, což představuje i při pouhém jednom ekvivalentu 1,2-dichlorethanu zvýšení výtěžku o 25% a zkrácení reakční doby přibližně 360x vůči optimalizovanému postupu z literatury^[139] (ve kterém byl navíc 1,2-dichlorethan použit v nadbytku a množství odpovídajícího, těžko odstranitelného, bisfosfonátu nebylo vůbec sledováno). Postup dle navážky 30 (tabulka 2) tak představuje výrazné zlepšení přípravy diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu (**1**), který je klíčovým meziproduktem při přípravě (agrochemicky velmi důležité) 2-chlorethylfosfonové kyseliny (ethephon – diskutováno výše). Pokusy dle navážek 19 a 30 byly opakovány v preparativním měřítku a po vakuové destilaci byl izolován diisopropyl-2-chlorethylfosfonát (**1**) v čistotě >99,9% (dle GC/MS) a ve výtěžku 83% (navážka 19) a 74% (navážka 30).

Především pro potřeby zjišťování těsnosti při potenciální aplikaci průtokového reaktoru byl studován vliv přítomnosti různých organických rozpouštědel na průběh sledované reakce (toluen – navážky 11 a 12, xylene – navážka 21, THF – navážka 22, pyridin – navážka 23, diglym – navážka 24, acetonitril – navážka 25 a DMF navážka 26). U průtokového reaktoru je výhodné nejdříve otestovat tlakovou těsnost celé aparatury před samotnou reakcí pomocí ohřevu vhodného organického rozpouštědla (namísto potenciálně či reálně jedovaté reakční směsi), které ovšem není nutné následně úplně odstranit z reakční aparatury, neboť jeho přítomnost neovlivňuje průběh studované M-A reakce. Bylo zjištěno, že reakci je možné bez výrazné změny provést v DMF či acetonitrilu (navážky 26 a 25). Reakce v DMF je

prokazatelně rychlejší (navážka 26), ale použití acetonitrilu (navážka 26) vede evidentně k tvorbě nižšího množství vedlejších produktů. Proto byl acetonitril vybrán pro následovné zjišťování tlakové těsnosti aparatury (či může posloužit při reakcích pevných nerozpustných sloučenin). Velkým překvapením bylo úplné zastavení sledované reakce přidáním toluenu do reakční směsi (navážky 11 a 12). Pozorovaný efekt přídavku toluenu je tak silný, že stačí přídavek jediného ekvivalentu toluenu do reakční směsi na úplné zastavení tvorby látky **1** (navážka 17), kde za jinak identických podmínek vzniká více jak 73% požadovaného produktu (navážka 15). Tento efekt toluenu je ještě více překvapující po prozkoumání literatury, která uvádí^[138, 143], že toluen byl několikrát úspěšně použit jako vhodné rozpouštědlo při M-A reakcích (které však byly ohřívány olejovou lázní a ne tedy pomocí MV). S ohledem na vysoké reakční teploty nebylo možné udělat dostatečně věrohodný kontrolní experiment při zahřívání pomocí olejové lázně a studovat tak vlastní efekt MV záření (studován při přípravě látky **5**, viz dále).

Pro zjištění reprodukovatelnosti tohoto postupu pro různé MV reaktory byl stejný pokus opakován za jinak identických reakčních podmínek v MV reaktoru typ II (viz experimentální část – **5.1.**). Dle GC/MS analýzy obsahovala tato nová reakční směs prakticky stejná množství všech komponent. Jediným rozdílem bylo to, že pro dosažení stejné míry konverze bylo potřeba prodloužit reakční dobu o 40 minut, což je v logickém souladu s konstrukčními rozdíly obou reaktorů. Typ II (na rozdíl od typu I) neposkytuje soustředěný MV výkon do centra reakční nádoby a tak je pro stejnou míru MV záření potřeba delší reakční čas.

Další studovanou M-A reakcí byla příprava diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonátu (**2**), který je klíčovým synthonem pro přípravu tzv. PEE derivátů (obr. 31). PEEH a PEEG jsou vysoce účinnými inhibitory hypoxanthinguanintransferázy prvoka *Plasmodium falciparum* a mohou tak posloužit jako potenciální léky na malárii^[109]. Popsaná příprava látky **2** (diethylesteru) poskytuje požadovaný produkt ve velmi variabilním a neuspokojivém výtěžku (0-50%)^[144]. Pro získání čisté látky je navíc potřebná precizní chromatografická separace.

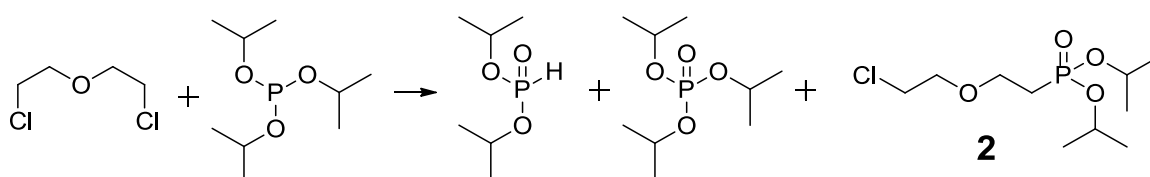


Schéma 2. Příprava diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonátu (**2**) reakcí 2,2'-dichlordiethyletheru s triisopropylfosfitem za současného vzniku diisopropyl-fosfonátu a triisopropyl-fosfátu jako vedlejších produktů.

Vlivem analogie s předcházející reakcí byly bez jakékoliv optimalizace aplikovány podmínky odpovídající navážkám 19 a 30 (z tabulky 2) v preparativním měřítku. Požadovaný diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonát (**2**) byl po vakuové destilaci izolován v čistotě >99,9% (dle GC/MS) a ve výtěžku 81% (analogie navážky 19, tabulka 2) a 73% (analogie navážky 30, tabulka 2, tento pokus byl proveden ve větší reakční nádobě o objemu 80ml), což demonstruje širokou aplikovatelnost nalezených optimálních podmínek.

Vlivem vysoké důležitosti látky **2** při hledání nových PEE derivátů jako potenciálních léků na malárii bylo zadáno připravit minimálně 200 g diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonátu (**2**). Proto byla stejná reakce provedena i v MV průtokovém reaktoru, jehož tlaková těsnost byla nejdříve testována pomocí zahřívání samotného acetonitrilu (viz výše). Poměr výchozích látek byl opět volen v analogii s navázkou 30 (tabulka 2, tzn. 1:1,2). Reakční směs byla poté MV zahřívána tak, že reakční teplota postupně vzrůstala ze 120 °C na 210 °C v krocích po 10 °C během 7 h při průtoku 40 ml/min, kdy se částečně zreagovaná reakční směs vracela zpět do zásobní baňky. Po každém navýšení byl odebrán vzorek reakční směsi opouštějící MV reaktor na GC/MS analýzu (viz Tabulka 3). Po 20 minutách při 210 °C došlo dle GC/MS analýzy reakční směsi k plné konverzi. Požadovaný diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonát (**2**) byl po vakuové destilaci izolován v čistotě >99,9% (dle GC/MS) a ve výtěžku 70% (249 g). Naměřená data v tabulce 3 jsou opět v souladu s předcházejícími pozorováními, kdy samotná reakce probíhá uspokojivou rychlostí od teploty 180 °C.

Tabulka 3. Podmínky optimalizace přípravy diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonátu (**2**) v průtokovém mikrovlnném reaktoru.

vzorek	teplota (°C)	složení reakční směsi dle GC/MS (molární %)			
		B	C	D	2
1	120	91,0	3,7	1,5	3,8
2	140	88,0	3,1	1,6	7,3
3	150	83,4	4,5	1,9	10,2
4	160	78,9	5,4	2,4	13,4
5	170	64,6	7,3	2,3	25,8
6	180	38,6	9,2	2,3	50,0
7	190	19,2	11,6	2,6	66,5
8	200	11,2	12,8	2,2	73,9
9	210	0,0	15,5	2,4	82,0

Kde **B** = triisopropylfosfit, **C** = diisopropyl-fosfonát a **D** = triisopropyl-fosfát.

Další otázkou byla přenositelnost nalezených podmínek na dihalogenalkany obsahující jiné atomy halogenů. Z tohoto důvodu byla provedena optimalizace přípravy diisopropyl-2-bromethylfosfonátu (**3**) s využitím opět MV reaktoru typ I (schéma 3).

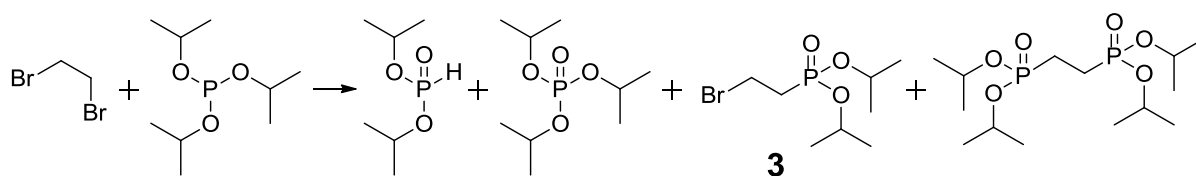


Schéma 3. Příprava diisopropyl-2-bromethylfosfonátu (**3**) reakcí 1,2-dibromethanu s triisopropylfosfitem za současného vzniku diisopropyl-fosfonátu, triisopropyl-fosfátu a tetraisopropyl-ethylenbisfosfonátu jako vedlejších produktů.

Poměr výchozích látek byl volen v analogii s navážkou 30 (tabulka 2, tzn. 1:1,2). Jak ukazuje tabulka 4, byl opět sledován vliv reakční teploty na rychlost studované reakce. Dle očekávání bylo zjištěno, že reakce probíhá již při 130 °C, při kterých je potřeba 120 minut pro dosažení plné konverze. Dobrých výtěžků látky **3** bylo překvapivě dosaženo i při vyšších teplotách (navážka 5 a 6), kde nebyl pozorován významný nárůst tvorby vedlejších produktů. Přípravu diisopropyl-2-bromethylfosfonátu (**3**) je tak možné uskutečnit díky MV zahřívání za 10 minut při teplotě 170 °C. Pokus při 170 °C byl opakován v preparativním měřítku, kde byl po následné vakuové destilaci získán požadovaný produkt ve výtěžku 84%. Dle GC/MS analýzy obsahoval izolovaný produkt tetraisopropyl-ethylenbisfosfonát v množství 2,6% (v tomto případě se tedy nepodařilo získat jednou vakuovou destilací absolutně čistý produkt).

Tabulka 4. Podmínky optimalizace přípravy diisopropyl-2-bromethylfosfonátu (**3**).

navážka č.	teplota (°C)	čas (min)	složení reakční směsi dle GC/MS (molární %)				
			B	C	D	3	E
1	130	30	41,5	2,6	2,0	53,4	0,4
2	130	60	9,7	2,1	2,5	83,8	2,0
3	130	90	2,5	2,9	3,3	89,0	2,3
4	130	120	0,0	2,7	3,8	90,5	3,1
5	150	30	0,7	4,0	4,9	87,3	3,0
6	170	10	0,0	4,4	4,4	88,7	2,5

Kde **B** = triisopropylfosfit, **C** = diisopropyl-fosfonát, **D** = triisopropyl-fosfát a **E** = tetraisopropyl-ethylenbisfosfonát.

Další studovanou M-A reakcí (schéma 4) byla příprava diisopropyl-brommethylfosfonátu (**4**), který je syntetickým ekvivalentem dříve zmiňovaného tosyloxymethylfosfonátu a je tak alternativním synthonem pro přípravu derivátů hydroxymethylfosfonové kyseliny (viz teoretický úvod).

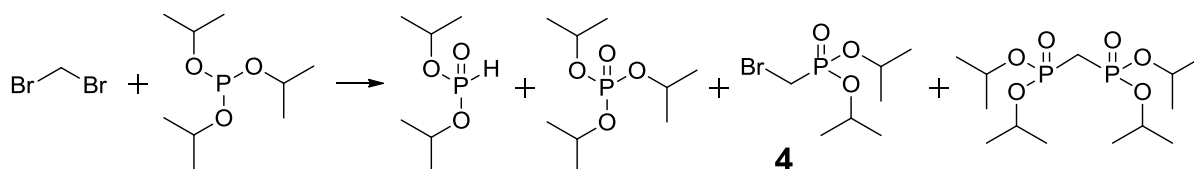


Schéma 4. Příprava diisopropyl-brommethylfosfonátu (**4**) reakcí 1,2-dibrommethanu s triisopropylfosfitem za současného vzniku diisopropyl-fosfonátu, triisopropyl-fosfátu a tetraisopropyl-methylenbisfosfonátu jako vedlejších produktů.

Vlivem analogie s přecházející reakcí byly bez jakékoliv optimalizace aplikovány podmínky odpovídající navázce 5 (z tabulky 4) v preparativním měřítku. Požadovaný diisopropyl-brommethylfosfonát (**4**) byl po vakuové destilaci izolován v čistotě >99,9% (dle GC/MS) a ve velmi uspokojivém výtěžku 78%, což opět demonstruje širokou aplikovatelnost nalezených optimálních podmínek vždy pro jednotlivé halogeny. Získaná látka **4** byla následně mnohokrát použita při řešení zadané disertační práce. Postup popsáný v sekci **5.3.4.** tak byl vícekrát opakován a bylo zjištěno, že uváděný výtěžek je vysoce reprodukovatelný (75-80%).

Pro zjištění celé šířky aplikovatelnosti MV zahřívání M-A reakce byla studována příprava diisopropyl-jodmethylfosfonátu (**5**) reakcí diiodmethanu s triisopropylfosfitem (schéma 5). Nejdříve jsme se snažili provést kontrolní experiment (pro studium vlastního efektu MV záření) pomocí ohřevu reakční směsi klasickou metodou (pomocí olejové lázně). Tento experiment byl již popsán v literatuře^[145], ale naše opakované snažení poskytlo požadovaný diisopropyl-jodmethylfosfonát (**5**) ve výtěžku maximálně 14% (5-14%; oproti publikovaným 47%, naším hlavním produktem byl tetraisopropyl-methylenbisfosfonát).

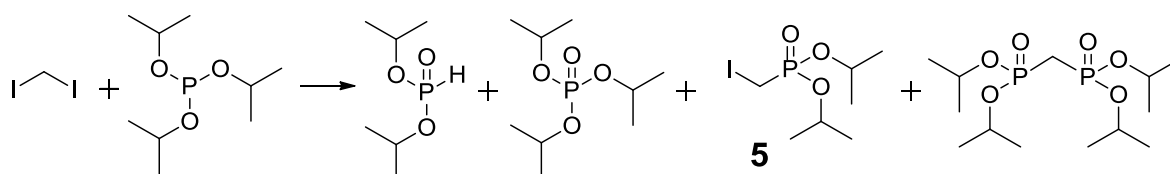
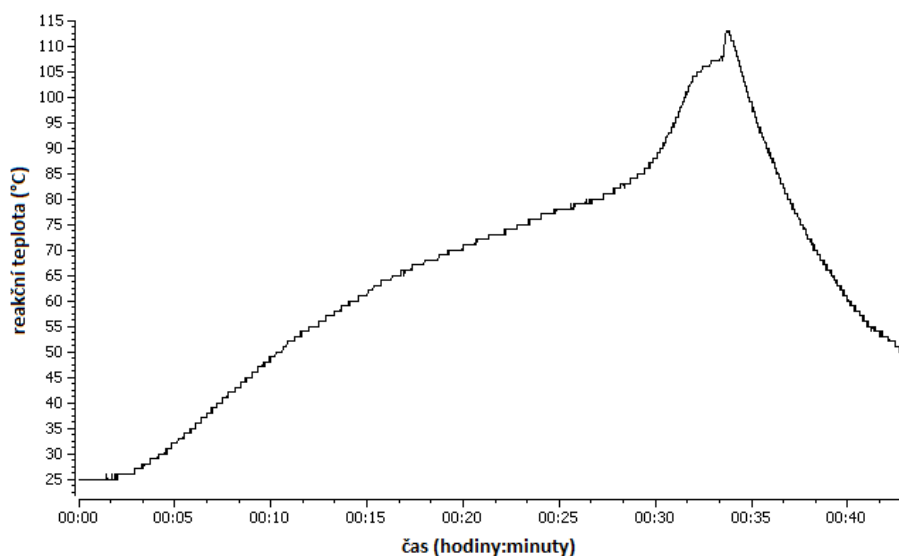


Schéma 5. Příprava diisopropyl-jodmethylfosfonátu (**5**) reakcí diiodmethanu s triisopropylfosfitem za současného vzniku diisopropyl-fosfonátu, triisopropyl-fosfátu a tetraisopropyl-methylenbisfosfonátu jako vedlejších produktů.

Vlivem přítomnosti reaktivnějšího halogenu byla opět provedena optimalizace reakčních podmínek s využitím MV reaktoru typ I (viz tabulka 5). Studovaná reakce probíhá (v souladu s očekáváním) již při výrazně nižší teplotě (90-100 °C) než předcházející záměny atomu chloru a bromu. Výraznější byla i tendence k tvorbě příslušného bisfosfonátu (a to i při čtyřnásobném přebytku diiodmethanu, navázka 2, tabulka 5). Průběh reakční teploty při navázce 2 (tabulka 5) vykazoval dramatický skokový nárůst měřené teploty po prohřátí reakční směsi přibližně na 90 °C. Tento jev byl následně intenzivně zkoumán. Nejprve bylo zjištěno, že tvorbu příslušného bisfosfonátu a i ono skokové přehřátí reakční směsi je možné částečně potlačit snížením hodnoty maximálního aplikovaného MV výkonu (snížení z 300 W na 50 W, navázky 2 a 3, tabulka 5), kdy dochází k pomalejšímu a rovnoměrnějšímu prohřívání reakční směsi. Efekt maximálního MV výkonu byl studován vzhledem k možnosti

lokálního přehřívání při aplikaci maximálního dosažitelného MV výkonu. Pro studium onoho skokového přehřátí reakční směsi byly připraveny dvě modelové reakce. V obou reakčních směsích byl identický poměr výchozích látek (1:1). Obě navíc byly prohřívány absolutně identickou rychlostí pomocí nastavení konstantního MV výkonu (30W). Obrázek 45 znázorňuje průběh reakční teploty u tohoto prvního kontrolního pokusu, ve kterém je jasně pozorovatelný teplotní šok (exploze) při 90 °C, který vede k nekontrolovatelnému ohřevu reakční směsi až na 115 °C (což následně způsobuje onu větší tendenci k tvorbě příslušného bisfosfonátu). Při přípravě samotných reakčních směsí byl pozorován lom světla na rozhraní dvou „nemísitelných“ kapalin. Výchozí látky se totiž vyznačují velmi vysokým rozdílem hustot a tak i po intenzivním rozmíchání dojde během pár minut opět k vytvoření dvou (organických) vrstev. Toto pozorování však nabízí logické vysvětlení pozorovaného fenoménu skokového přehřátí reakční směsi. Dvě nemísitelné kapaliny jsou nejdříve zahřívány MV zářením. Vlivem velmi nízké pravděpodobnosti setkání obou reaktantů (dvě fáze) dochází i při jinak dostatečné reakční teplotě k téměř nulové tvorbě požadovaného produktu. Reakční směs je následně zahřívána dále na vyšší a vyšší teplotu, během čehož dojde k tvorbě dostatečného množství požadovaného produktu nato, aby pomohl vytvořit homogenní reakční směs. Tato přehřátá homogenní reakční směs následně bouřlivě reaguje a vlivem exotermního průběhu dochází ke skokovému přehřátí reakční směsi, což vede ke zvýšené produkci nežádoucího bisfosfonátu.

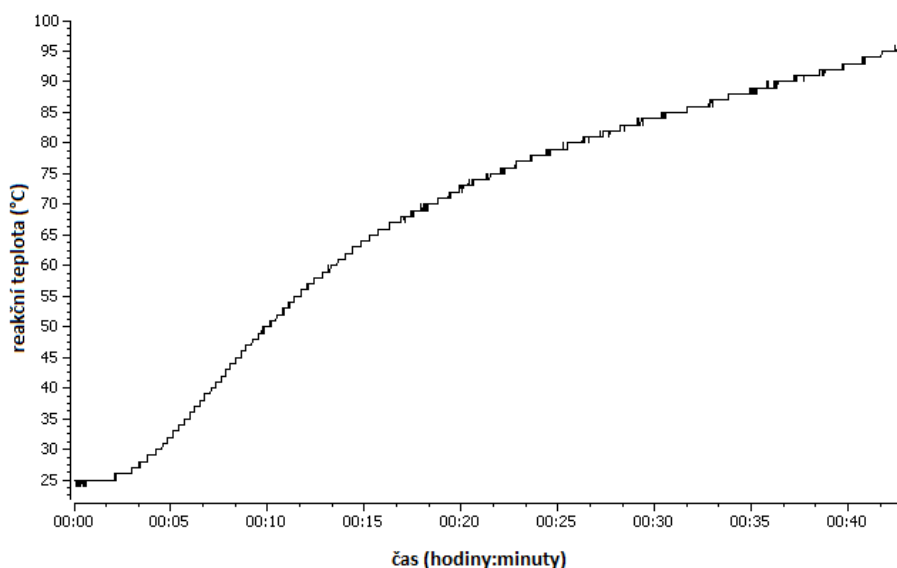


Obrázek 45. Průběh reakční teploty modelové reakce při přípravě diisopropyl-jodmethylfosfonátu (**5**) s využitím konstantního MV výkonu 30W – teplotní šok (explozi) při 90 °C, který vede k nekontrolovatelnému ohřevu reakční směsi až na 115 °C.

Pro potvrzení této myšlenky bylo do reakční směsi druhého kontrolního pokusu přidáno i malé množství (3%) diisopropyl-jodmethylfosfonátu (**5**). Na obrázku 46 je možné vidět potvrzení navržené teorie, kde již nedochází ke skokovému přehřátí reakční směsi za jinak identických podmínek kontrolního experimentu.

Tohoto elegantního řešení „zhomogenizování“ reakční směsi pomocí pouhých 3% látky **5** bylo následně využito pro další optimalizaci reakčních podmínek přípravy diisopropyl-

jodmethylfosfonátu (**5**). Z porovnání výsledků navážky 3 a 5 (tabulka 5) je vidět významné zlepšení výtěžku požadovaného produktu.



Obrázek 46. Průběh reakční teploty modelové reakce při přípravě diisopropyl-jodmethylfosfonátu (**5**) s využitím konstantního MV výkonu 30W – přidavek 3% produktu do reakční směsi vede k hladkému průběhu reakce.

Tabulka 5. Podmínky optimalizace přípravy diisopropyl-jodmethylfosfonátu (**5**).

složení reakční směsi dle GC/MS (molární %)

navážka č.	čas (min)	teplota (°C)	molární poměr I:B	B	C	D	5	J	pozn.
1	15	80	4:1	93,8	0,6	1,5	4,1	0,0	<i>a</i>
2	120	90	4:1	4,9	8,9	7,4	73,5	5,3	<i>a</i>
3	120	90	4:1	5,7	6,4	6,7	79,3	1,9	<i>a+b</i>
4	120	90	4:1	9,6	0,7	2,3	87,4	0,0	<i>a+b+c</i>
5	150	90	4:1	2,3	1,2	4,1	92,4	0,0	<i>a+b+c</i>
6	60	100	4:1	0,0	2,2	2,1	95,5	0,2	<i>a+b+c</i>
7	180	90	2:1	0,5	1,6	3,2	94,6	0,1	<i>a+b+c</i>
8	180	90	1:1	6,7	2,7	3,4	87,1	0,1	<i>a+b+c</i>
9	200	90	1:1	0,2	3,1	3,6	92,8	0,3	<i>a+b+c</i>

Kde **B** = triisopropylfosfit, **C** = diisopropyl-fosfonát, **D** = triisopropyl-fosfát a **J** = tetraisopropyl-methylenbisfosfonát. Poznámka: *a* (5x sekurováno), *b* (max. výkon 50W), *c* (+0,1 ml látky **5**).

Kombinací snížení maximálního aplikovaného MV výkonu a přidáním látky (**5**) do reakční směsi se tak dosáhne zvýšení výtěžku látky (**5**) o přibližně 20% (navážky 2 a 5, tabulka 5). Přidáním požadovaného produktu do reakční směsi se ale především docílí úplného zamezení tvorby těžko odstranitelného tetraisopropyl-methylenbisfosfonátu. Při zvýšení reakční teploty na 100 °C došlo k logickému urychlení požadované reakce, které ovšem bylo provázeno opět urychlením tvorby nežádoucího bisfosfonátu (navážky 5 a 6, tabulka 5). Pro další optimalizaci tak byla vybrána teplota 90 °C. Stejně jako u předcházejících reakcí byl následně studován vliv přebytku dihalogenalkanu (navážky 7, 8 a 9; tabulka 5). Při 90°C, snížení maximálního aplikovaného výkonu na 50 W a při přidavku 3% diisopropyl-jodmethylfosfonátu bylo možné snížit poměr reaktantů až na 1:1 při dosažení velmi vysokého výtěžku >92% (navážka 9, tabulka 5). Navážka 9 byla následně opakována ve větším měřítku. Požadovaný diisopropyl-jodmethylfosfonát (**5**) byl po vakuové destilaci izolován v čistotě >99,9% (dle GC/MS) a ve velmi uspokojivém výtěžku 86%.

Pro zjištění reprodukovatelnosti předkládaného řešení pro různé MV reaktory byl tento pokus opakován za jinak identických reakčních podmínek v MV reaktoru typ II (viz experimentální část – 5.1.). Dle GC/MS analýzy obsahovala tato nová reakční směs prakticky stejná množství všech komponent. Jediným rozdílem bylo to, že pro dosažení stejné míry konverze bylo potřeba prodloužit reakční dobu o 40 minut, což je v logickém souladu s konstrukčními rozdíly obou reaktorů. Typ II (na rozdíl od typu I) neposkytuje soustředěný MV výkon do centra reakční nádoby a tak je pro stejnou míru MV záření potřeba delší reakční čas.

Byl též znovu proveden kontrolní experiment se zahříváním reakční směsi pomocí olejové lázně. Při podmínkách identických navážce 9 (tabulka 5, tzn. i s přidáním 3% látky **5**) bylo po vakuové destilaci získáno pouhých 37% požadovaného produktu, což je výrazně nižší výtěžek než po experimentu s MV ohřevem (86% viz výše). Tato hodnota už lépe odpovídá údajům z literatury^[145] (analogický pokus bez přidavku látky **5**, tak jak je uveden v literatuře, ovšem vedl již k dříve zmiňovanému výtěžku 14%). Studované reakce tedy poskytují při mikrovlnném zahřívání výrazně vyšší výtěžky požadovaných dialkyl-fosfonátů (bez významné tvorby příslušných bisfosfonátů) oproti experimentům ohříváním klasickým přenosem tepla. Vysvětlením toho pozorování je spíše zajištění homogenního prohřívání reakční směsi (kde nedochází ani k lokálnímu přehřívání reakční směsi – jako např. na stěnách baňky při ohřevu olejovou lázní) než nějaký „speciální mikrovlnný efekt“^[146-148].

Ke zvýšení kapacity přípravy byla provedena optimalizace reakce diiodmethanu s triisopropylfosfitem s využitím MV reaktoru typ III s 250 ml reakční nádobou (viz experimentální část – 5.1.). Triisopropylfosfit (113 ml; 470 mmol) a diiodmethan (38 ml; 470 mmol) byly předloženy do MV reakční nádoby o objemu 250 ml, reakční směs byla následně sekurována vždy 5x a poté MV zahřívána dle Tabulky 6 vždy po dobu 160 minut. Bylo zjištěno, že reakce probíhá uspokojivou rychlostí až při teplotě 110°C (navážka 2, tabulka 6). Zdánlivé zvýšení potřebné reakční teploty v rektoru typ III (tabulka 6) vůči hodnotám získaným s reaktorem typ I (tabulka 5) je možné vysvětlit rozdílnou technikou měření reakční teploty. V reaktoru typ III je reakční teplota měřena pomocí vnitřního čidla, zatímco u reaktoru typ I je měřena pomocí infračerveného čidla, které měří především teplotu na povrchu reakční nádoby a v samotné reakční směsi je tak teplota vyšší (přibližně o 20 °C). Při

120°C dochází k tvorbě požadované látky v uspokojivém výtěžku (navážka 3, tabulka 6). Další zvyšování reakční teploty už opět vedlo k urychlení tvorby příslušného bisfosfonátu (navážky 5 a 6, tabulka 6). Byl též proveden jeden kontrolní pokus, kde nebyla přidána látka **5**, což vedlo k výraznému poklesu výtěžku požadovaného produktu a urychlení tvorby všech vedlejších produktů (navážky 3 a 4, tabulka 6). Byl také opět studován efekt maximálního MV na složení reakční směsi vzhledem k možnosti lokálního přehřívání. Bylo zjištěno, že aplikací MV záření o maximálním výkonu 100 W se významně zvyšuje výtěžek diisopropyl-jodmethylfosfonátu (především vlivem přibližně dvojnásobného snížení tvorby tetraisopropyl-methylenbisfosfonátu). Po vakuové destilaci navážky 5 (tabulka 6) byl izolován diisopropyl-jodmethylfosfonát (**5**) v čistotě >99,9% (dle GC/MS) a ve velmi uspokojivém výtěžku 80%.

Tabulka 6. Podmínky optimalizace přípravy diisopropyl-jodmethylfosfonátu (**5**) ve větším měřítku s využitím MV reaktoru typ III.

složení reakční směsi dle GC/MS (molární %)

navážka č.	maximální výkon (W)	teplota (°C)	B	C	D	5	J	poznámka
1	200	100	51,2	1,5	3,2	43,9	0,2	<i>a+b</i>
2	200	110	12,5	2,3	4,6	80,1	0,5	<i>a+b</i>
3	200	120	0,0	4,1	6,0	85,4	4,5	<i>a+b</i>
4	200	120	0,0	10,4	11,4	70,5	7,7	<i>a</i>
5	100	120	0,0	3,8	6,2	87,9	2,1	<i>a+b</i>
6	100	130	0,0	4,8	5,2	84,5	5,5	<i>a+b</i>

Kde **B** = triisopropylfosfit, **C** = diisopropyl-fosfonát, **D** = triisopropyl-fosfát a **J** = tetraisopropyl-methylenbisfosfonát. Poznámka: *a* (5x sekurováno), *b* (1 ml látky **5**).

Dalším pokusem bylo otestování použitelnosti triethylfosfitu pro studované reakce. Při jeho reakci ve smyslu M-A reakce totiž vzniká ethylhalogenid, který je ovšem stejně dobrým substrátem pro M-A reakce jako používané dihalogenalkany. Tento pokus byl tedy proveden spíše pro demonstraci výhodnosti použití triisopropylfosfitu (u kterého následně vzniká isopropylhalogenid, který je vlivem sterického bránění špatným substrátem této M-A reakce probíhající mechanismem S_N2). Byl proto učiněn pouze jediný pokus, do kterého byl nadávkován triethylfosfit společně se čtyřmi ekvivalenty 1,2-dichlorethanu. Tato reakční směs byla po vysekurování zahřívána pomocí MV reaktoru typ I na teplotu 190°C po dobu 120 minut (analogue navážky 19, tabulka 2). Dle očekávání byla obdržena bohatá směs produktů obsahující mimo dříve uváděných vedlejších produktů také diethyl-ethylfosfonát v množství 15%. U této reakce byla i při vysokém nadbytku (3 ekvivalenty) 1,2-dichlorethanu pozorována významná tvorba příslušného bisfosfonátu (3%). I přes výše uvedené skutečnosti obsahovala reakční směs (dle GC/MS) minimálně 77% požadovaná látka **6**. Po opatrné vakuové destilaci získané reakční směsi byl izolován diethyl-2-chlorethylfosfonát (**6**) v čistotě >99% (dle GC/MS) a v akceptovatelném výtěžku 62%. Vlivem podobné těkavosti 1,2-

dichlorethanu s chlorethanem není možné tento vznikající vedlejší produkt z reakční směsi jednoduše odstraňovat a ani další optimalizace tak nemůže příliš potlačit vznik diethyl-ethylfosfonátu (další pokusy tak dělány nebyly).

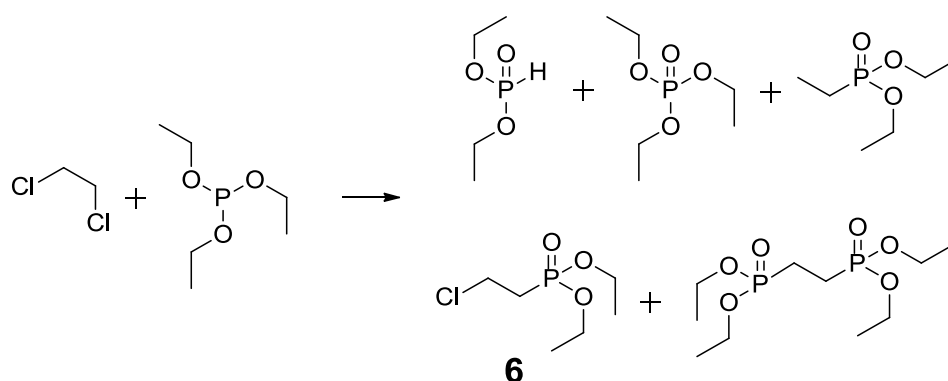


Schéma 6. Příprava diethyl-2-chlorethylfosfonátu (**6**) reakcí 1,2-dichlorethanu s triethylfosfitem za současného vzniku diethyl-fosfonátu, triethyl-fosfátu, diethyl-ethylfosfonátu a tetraethyl-ethylenbisfosfonátu jako vedlejších produktů.

Další studovanou reakcí byla potenciální reakce dibrommethanu s tris(2-chlorethyl)fosfitem, kde se dalo předpokládat, že vlivem vysokého rozdílu reaktivity různých halogenů dojde preferenčně k intermolekulární M-A reakci (schéma 7). Dle výše uváděných pozorování totiž reagují dibromalkany ve smyslu M-A reakce už při 130 °C, zatímco dichloralkany až při teplotách nad 180 °C. Při aplikování podmínek analogických optimálním podmínkám pro přípravu látek **3** a **4** (navážka 6, tabulka 4) však byl pozorován vznik jediného majoritního produktu, kterým byl bis(2-chlorethyl)-2-chlorethylfosfonát (**7**). Dle GC/MS analýzy obsahovala získaná surová reakční směs bis(2-chlorethyl)-2-chlorethylfosfonát v množství >90%. Po vakuové destilaci byl izolován bis(2-chlorethyl)-2-chlorethylfosfonát (**7**) v čistotě >99,9% (dle GC/MS) a ve velmi vysokém výtěžku 83%. Intramolekulární substituční reakce chloru (ve smyslu M-A reakce), tak je výrazně rychlejší než intermolekulární substituce bromu.

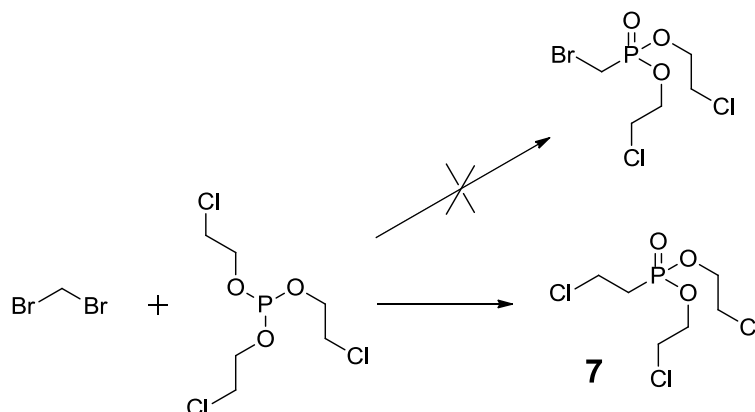


Schéma 7. Tvorba bis(2-chlorethyl)-2-chlorethylfosfonátu (**7**) při MV zahřívání směsi tris(2-chlorethyl)fosfitu a dibrommethanu.

Pro dokončení celé série diisopropyl-2-halogenalkylfosfonátů byl připraven i diisopropyl-2-jodethylfosfonát (**8**). U této látky bylo vlivem vysoké ceny 1,2-dijodethanu přistoupeno k jinému způsobu přípravy. Vlivem vysoce optimalizované a levné přípravy látky **1** bylo využito Finkelsteinovy reakce diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu (**1**) se sušeným jodidem sodným v suchém acetonu (Schéma 8). Požadovaný diisopropyl-2-jodethylfosfonát (**8**) byl po následné vakuové destilaci získán ve vysoké čistotě >99,9% (dle GC/MS) a ve velmi vysokém výtěžku 88%.

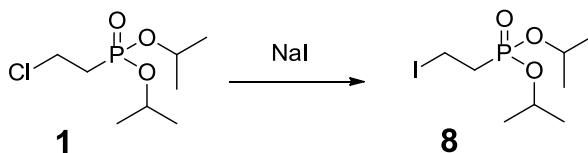


Schéma 8. Příprava diisopropyl-2-jodethylfosfonátu (**8**) reakcí diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu (**1**) s jodidem sodným.

3.2. Přípravy fosfonových kyselin pomocí mikrovlnně zahřívání hydrolyzy příslušných diesterů

Pomocí látek připravených v sekci **3.1.** je možné připravit celou paletu různých diesterů fosfonových kyselin. Dalším logickým stupněm optimalizací příprav fosfonátů nukleosidů (a fosfonových kyselin obecně) je hydrolyza příslušných diesterů na odpovídající fosfonové kyseliny. Bazická hydrolyza diesterů fosfonových kyselin skýtá řadu úskalí. Prvním je fakt, že vlivem tetrahedrálního uspořádání na atomu fosforu je téměř nemožná hydrolyza mechanismem B_{AC}2. Jedinou schůdnou možností je hydrolyza mechanismem B_{AL}2, které ovšem podléhají pouze estery s primárními alkoholy (nejlépe methyl estery). I v tomto případě se ale hydrolyza diesteru zastaví ve stádiu stabilního monoesteru, který už další hydrolyze (vlivem přítomného záporného náboje) nepodléhá^[149]. Stericky bráněné diisopropylestery se hydrolyzují na příslušné monoestery pouze za drastických podmínek a to jen silnými nukleofily (jako např. azidy)^[150].

Jiným široce používaným řešením je kyselá hydrolyza, která umožňuje plnou hydrolyzu dialkyl-fosfonátů až na příslušné fosfonové kyseliny (více jak 90 tis. citací v databázi Chemical Abstracts). Při vlastní reakci se pak využívá hydrolyzy (štěpení) katalyzované různými Lewisovými či minerálními kyselinami. V literatuře je popsáno použití několika činidel a postupů. Prvním a široce laboratorně používaným postupem je reakce s trimethylsilylbromidem, chloridem či jodidem^[18, 84, 151-155]. Trimethylsilylhalogenidy se používají i průmyslově, ale jejich aplikace má řadu zásadních nevýhod, jako jsou vysoká cena, korozivní vlastnosti, jedovatost, těkavost, tendence reagovat se vzdušnou vlhkostí a v poslední řadě i tvorba těžko odstranitelných nečistot (ukázáno dále).

Druhou možností je hydrolyza katalyzovaná silnými minerálními kyselinami. Nejčastěji používané jsou v tomto ohledu kyseliny halogenovodíkové (více jak 40 tis. citací v databázi

Chemical Abstracts). Kyselina bromovodíková je účinnější než kyselina chlorovodíková^[156], ale její cena je řádově vyšší. Při použití HBr (stejně jako při použití trimethylsilylbromidu) navíc z odstupující esterové funkce vzniká alkylbromid, který je vysoce reaktivním alkylačním činidlem. Kyselina chlorovodíková je činidlem nejlevnějším, ale její reaktivita je nízká a reakce proto vyžadují vysoké reakční teploty a dlouhé zahřívání (desítky až stovky hodin)^[115, 157]. Výhodou dále je, že vznikající alkylchlorid je slabší alkylační činidlo v porovnání s alkylbromidem, tím se snižuje pravděpodobnost vzniku vedlejších produktů (vysoce reaktivní alkylační činidlo může vytvářet vedlejší produkty alkylací reaktivních skupin jako NH₂ či OH). Mechanismus kyselí katalyzované hydrolyzy dialkyl-fosfonátů a trialkyl-fosfátů byl intenzivně studován^[158, 159] a bylo zjištěno, že při hydrolyze isopropyl či *tert*-butyl esterů vznikají příslušné stabilní karbokationty. Průběh reakce je tak možné označit jako hydrolyzu typu A_{AL}1, kdy nejdříve dochází k protonaci atomu kyslíku esterové funkce. Tento protonovaný ester následně odštěpuje v rychlost určujícím kroku příslušný karbokationt, který dále rekombinuje s přítomným chloridovým aniontem za vzniku alkylchloridu (Schéma 9).

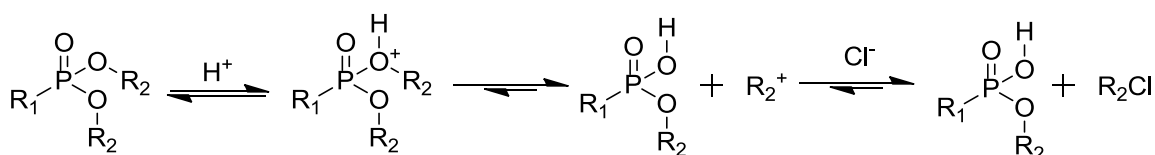
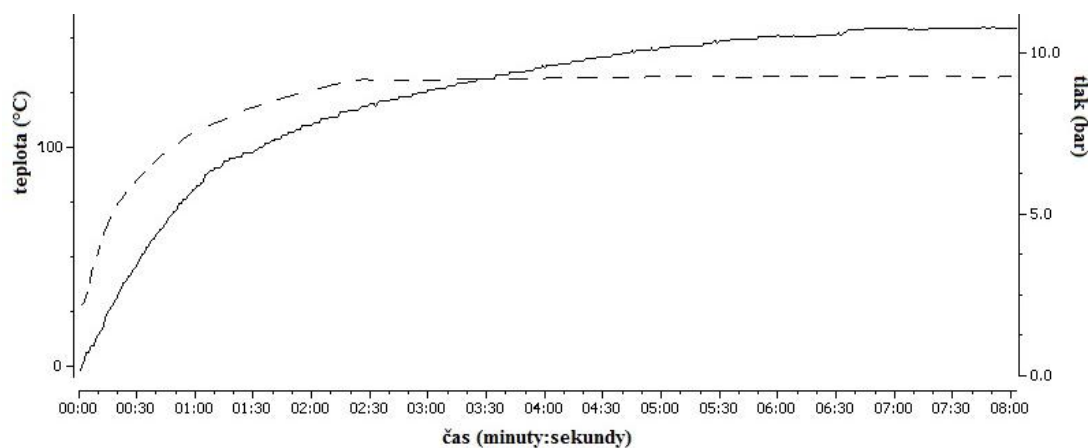


Schéma 9. Mechanismus kyselí katalyzované hydrolyzy dialkyl-fosfonátů (pro alkyly vytvářející stabilní karbokationty).

Dle předpokladu, že je reakce urychlena stabilizací karbokationtu, může dojít k urychlení této hydrolyzy zvýšením polarizace prostředí (jež má schopnost ještě více stabilizovat vznikající karbokationt). U mikrovlnných ohřevů organických reakcí je jako jeden možný činitel, který je zodpovědný za nečekané urychlení studovaných reakcí, označován efekt tzv. superpolárního prostředí (které je hypoteticky navozeno oscilujícím magnetickým polem uvnitř magnetronu)^[146, 147, 160].

Z tohoto důvodu bylo logické otestovat možnost urychlení kyselí katalyzované hydrolyzy pomocí mikrovlnného záření. Navrhovaný postup skýtá ještě jednu velkou výhodu. Pokud se totiž použije pouze odpovídající množství ekvivalentů HCl na každou esterovou funkci, dojde během reakce k úplnému převedení kyseliny chlorovodíkové na příslušný alkylchlorid. Reakci tak není nutné neutralizovat a následně odsolovat. Bylo tedy pracováno s kyselinou chlorovodíkovou o definované molární koncentraci, tak aby bylo možné přesně a jednoduše dávkovat ekvivalenty HCl (byly připraveny roztoky o koncentracích 0,5M a 1M). Už během prvních pokusů byla zjištěna další výhoda tohoto přístupu pro hydrolyzu dialkyl-fosfonátů. Pokud je totiž reakce prováděna v uzavřené reakční nádobě, dochází při vzrůstající teplotě nejdříve (logicky) k nárůstu tlaku par kapaliny (obzvláště při teplotách nad bodem varu kapaliny při atmosférickém tlaku). Po dosažení nastavené reakční teploty se ale rychle ustálí tlak uvnitř reakční nádoby. Pokud ale dochází v požadované reakci k tvorbě velmi těžkého alkylchloridu, je možné sledovat průběh samotné reakce okamžitě jen pouze pomocí změny tlaku v reakční nádobě. Toto pozorování demonstrovuje záznam průběhu reakční teploty a tlaku

(jak ho přímo zaznamenává použitý MV reaktor typ I). Obrázek 47 reprezentuje měřené veličiny při hydrolyze (*R*)-diisopropyl-1-(2,6-diamino-9*H*-purin-9-yl)propan-2-yloxymethylfosfonátu (1 mmol) ve 4 ml 0,5M kyseliny chlorovodíkové (tzn. 2 mmol HCl) pomocí MV reaktoru typ I vedoucí k tvorbě (*R*)-1-(2,6-diamino-9*H*-purin-9-yl)propan-2-yloxymethylfosfonové kyseliny (**9**, schéma 10). Jak je z obrázku 47 jasně vidět, po přibližně dvou a půl minutách došlo vlivem MV zahřívání k dosažení nastavené reakční teploty (130 °C, teplota znázorněna čárkovaně). Po této době ale stále dochází k pozvolnému nárůstu tlaku uvnitř aparatury (tlak znázorněn čarou plnou) vlivem vznikajícího isopropylchloridu. Po přibližně 7 minutách se nárůst tlaku zastaví, což znamená, že reakce dospěla do plné konverze. Toto bylo potvrzeno i opakováním stejného experimentu, kdy byla reakční směs zahřívána buď na 4, 5, 6 či 7 minut. Dle provedených analýz obsahoval vzorek zahříváný na 6 minut ještě stopy výchozí látky. Ve vzorku zahříváném na 7 minut už výchozí látka pozorována nebyla.



Obrázek 47. Průběh tlaku (plnou čarou) uvnitř reakční nádoby při přípravě látky **9** (schéma je znázorněno ve schématu 10). Od sedmé minuty nedochází k nárůstu tlaku, což znamená, že reakce dospěla do plné konverze. Průběh reakční teploty je znázorněn čárkovaně.

Bez zdlouhavých optimalizací tak bylo možné provést hydrolyzy celé řady esterů s možností okamžitého sledování průběhu reakce. Schéma 10 znázorňuje provedené reakce, kde jsou též uvedeny nastavené reakční teploty, nastavené reakční časy, tučně číslo sloučeniny v experimentální části a v závorce izolovaný výtěžek. Bylo tak velmi rychle připraveno 8 FAN (ve vysokém výtěžku), mezi kterými byly například i dříve zmiňované látky jako PMEG, adefovir či tenofovir. U derivátů DAP byla pozorována částečná hydrolyza aminoskupiny v poloze 6 za získání příslušného guaninového derivátu (při 140 °C v 1M HCl vzniká přibližně 10% tohoto vedlejšího produktu). Tuto vedlejší reakci se podařilo výrazně potlačit snížením reakční teploty na 130 °C (při prodloužení reakčního času) a použitím 0,5M HCl.

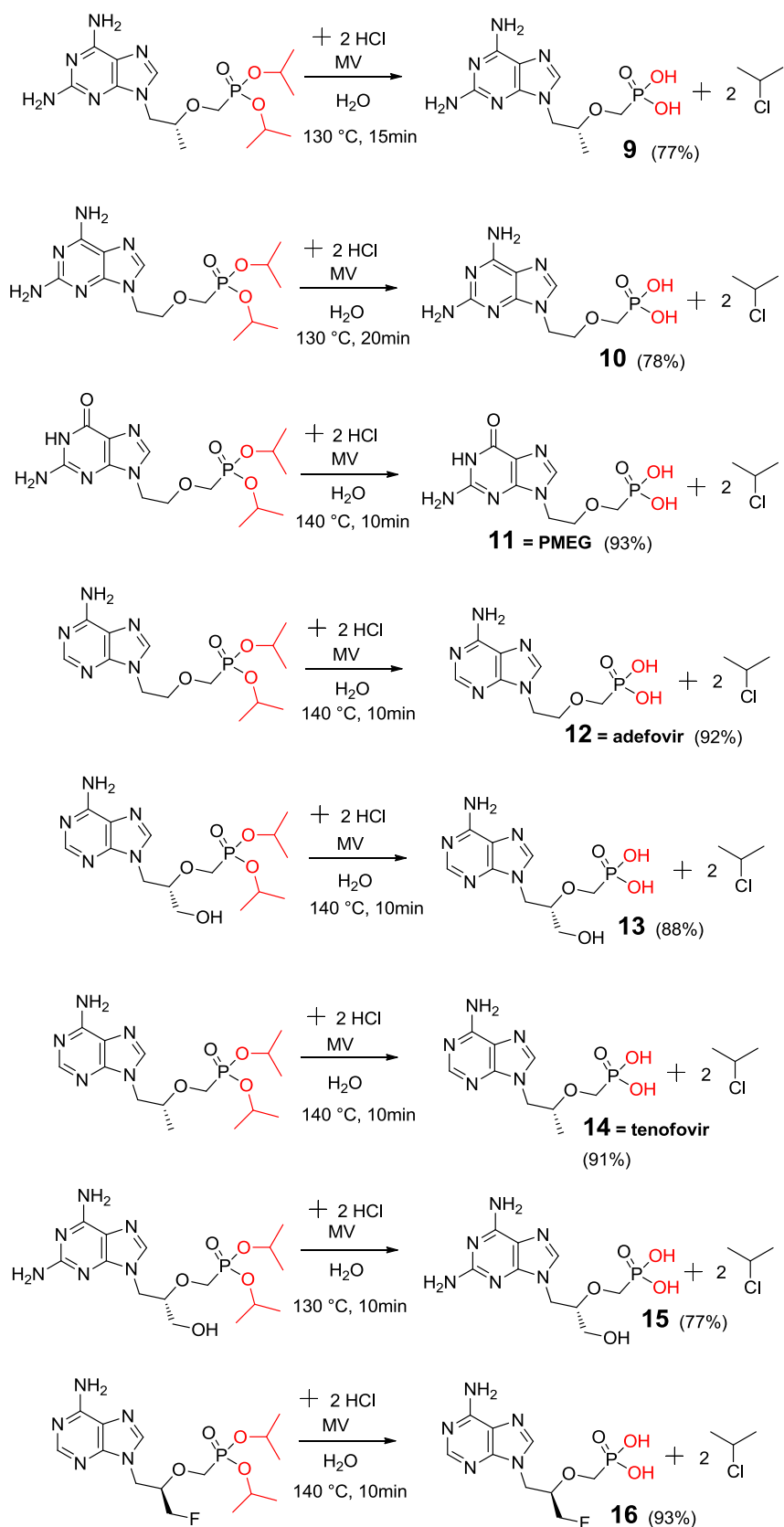


Schéma 10. Příprava vybraných FAN hydrolyzou příslušných diisopylesterů (1 mmol) v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové (měnící se funkční skupiny jsou zvýrazněny červeně).

Za těchto podmínek pak příslušný guaninový derivát vzniká v množství, které je menší jak 5%. Zmiňovanou nečistotu je navíc možné jednoduše oddělit od požadovaného produktu (viz dále). V případě adeninových derivátů bylo těžké hydrolyzu aminoskupiny v poloze 6 vůbec pozorovat (při 140 °C v 1M HCl). Odpovídající hypoxanthinový derivát totiž vzniká v množství menším jak 2% a jeho separace od požadovaného produktu je též jednoduchá jako v případě guaninového derivátu (viz dále).

Další výhodou tohoto způsobu hydrolyzy dialkyl-fosfonátů je možnost provádět hydrolytické modifikace ve zbytku molekuly (schéma 11). Vlivem toho mohou být např. deriváty 6-chlorpurinu transformovány na příslušné deriváty hypoxanthinu (látka **17**). Deriváty 2-amino-6-chlorpurinu je pak možné hydrolyzovat na příslušné deriváty guaninu (látky **11**, **18**, **19** a **20**) které jsou jinak synteticky těžko dostupné vlivem neochoty guaninu se přímo a regioselektivně alkylovat do požadované polohy 9. Deriváty 2,6-dichlorpurinu je možné tímto postupem převést na deriváty xanthinu (látka **21**), které jsou synteticky jinak ještě hůře dostupné) či při opatrném řízení reakce relativně selektivně dokonce na příslušné deriváty 2-chlorhypoxanthinu (látka **22**). Další výhodou je, že při těchto transformacích stačí použít pouze jediný ekvivalent HCl na hydrolyzu obou isopropyl esterů. Druhá molekula HCl se totiž generuje sama kyselou katalyzovanou hydrolyzou atomu chloru v poloze 6 purinového kruhu (k této hydrolyze dochází i při nižší teplotě než která je potřebná pro hydrolyzu isopropyl esterů). Při hydrolyze derivátů 2,6-dichlorpurinu je teoreticky možné použít pouze katalytické množství HCl. Pokusem ale bylo prokázáno, že katalytické množství HCl pro reakci nestačí vlivem toho, že ke kyselé katalyzované hydrolyze atomu chloru v poloze 2 purinového zbytku dochází až při vyšších teplotách, než jaké jsou potřebné k hydrolyze isopropyl esterů. Jeden vzniklý ekvivalent (z chloru v poloze 6) tak reaguje společně s použitým katalytickým množstvím HCl ve smyslu reakce znázorněné ve schématu 9. Všechny HCl se tak spotřebuje na reakci s isopropyl estery (která ani nedosáhne vlivem nedostatku HCl plné konverze) a není poté přítomen pro katalýzu hydrolyzy atomu chloru v poloze 2 purinového kruhu. Při použití jednoho ekvivalentu HCl je ale možné požadovanou reakci uskutečnit (při zahřívání reakční směsi na 150 °C po dobu 20 minut) a připravit tak příslušný xanthinový derivát (látka **21**).

Zde je potřeba uvést další zajímavý fakt. I přes 20 let intenzivního vývoje FAN a to především v oblasti syntézy derivátů adefoviru a tenofoviru je toto první záznam přípravy látek **20**, **21** a **22**. U všech látek byla testována jejich protivirová aktivita a překvapivě bylo zjištěno, že látka **21** a **22** vykazují zajímavé (mikromolární) protivirové aktivity především vůči HSV. Obě látky jsou nyní dále testovány v myším modelu HSV infekce. Byla tedy objevena nová podskupina protivirově aktivních FAN, které nebyly dříve zkoumány především vlivem syntetické náročnosti. Pro demonstraci byla připravena látka **21** pomocí postupů analogických s literaturou. Pod vedením autora této disertační práce vypracovala tuto syntézu studentka (v té době druhého ročníku bakalářského studia) Přírodovědecké fakulty UK – Eliška Procházková. Tato syntéza je detailně popsána v její bakalářské práci (Životní cyklus a metabolické dráhy původce malárie a návrh syntézy potenciálního inhibitoru hypoxanthin-guanin-xanthin-fosforibosyltransferasy; obhájeno na UK v roce 2009) a zde tedy

uvedeme pouze fakt, že se jedná o náročnou čtyřkrokovou syntézu s celkovým výtěžkem necelých 14%.

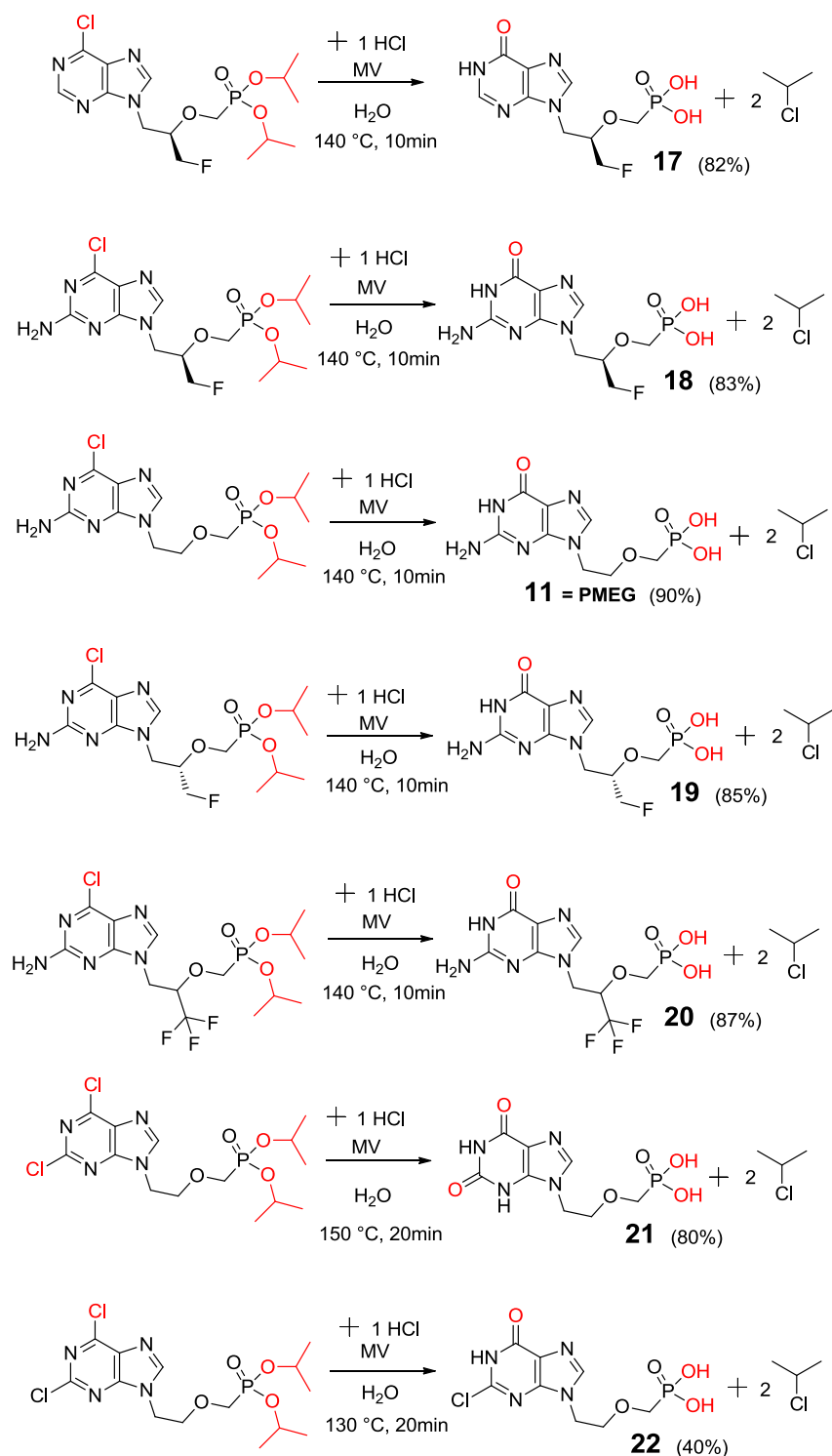


Schéma 11. Příprava vybraných FAN hydrolyzou příslušných diisopylesterů (1 mmol) v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové za současné hydrolyzy atomů chloru na purinovém kruhu (měnící se funkční skupiny jsou zvýrazněny červeně).

Dalšími pokusy bylo prokázáno (schéma 12), že je tohoto postupu možno použít obecně pro přípravu dalších fosfonových kyselin. Z látky **1** byl například připraven ve vysokém výtěžku již dříve zmiňovaný ethephon (**23**). Dále byla testována možnost hydrolyzy diethylesterů FAN (schéma 12). Dle očekávání bylo zjištěno, že podmínky dostačující pro plnou hydrolyzu diisopropyl esterů nedostačují pro úplné odreagování odpovídajících diethyl esterů. Vlivem daleko méně stabilního ethylového karbokationtu - ethylia (v porovnání s isopropyllovým – prop-2-yliem) je nutno pro dosažení plné konverze prodloužit reakční čas přibližně třikrát. Popisovaný postup byl též úspěšně využit pro hydrolyzu FAN odvozených od kyseliny 2-hydroxyethylfosfonové (látka **24**).

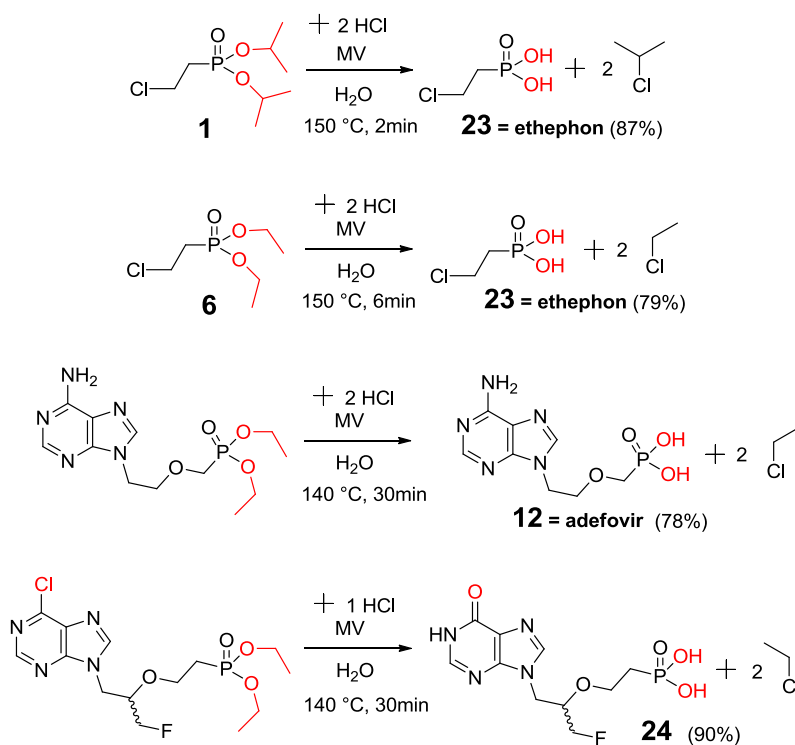


Schéma 12. Testování širší platnosti popisovaného postupu. Hydrolyza různých druhů dialkyl-fosfonátů.

Jinou velmi významnou vlastností tohoto postupu jsou možnosti velmi jednoduché izolace připravených látek. Pracuje se totiž v relativně hodně koncentrovaných roztocích (0,25M až 1M). Vlivem toho, že je všechen HCl během reakce spotřebován, dochází často k samovolnému a kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu (FAN obsahující bazickou nukleobázi jsou totiž látky tvořící vlivem přítomnosti kyselého zbytku kyseliny fosfonové dobře známé obojetné ionty – FAN se v literatuře vždy zapisují ve formě své dikyseliny a proto i v tomto textu je zmiňovaný zvyk zachován, ač jsme si vědomi toho, že popisované FAN se často vyskytují ve formě příslušného obojetného iontu a kreslené struktury tak přesně neodpovídají realitě). FAN vytvářející obojetné ionty vykazují okolo neutrálního pH velmi nízkou (často téměř nulovou) rozpustnost ve vodě. Připravené látky se tak často samovolně vylučují z reakční směsi a následně je stačí pouze odsát na fritě a promýt vodou, ethanolem a acetonem, čímž se získají FAN s čistotou > 98%. Již dříve bylo uvedeno, že při hydrolyzách derivátů DAP a adeninu byla pozorována částečná hydrolyza

aminoskupiny v poloze 6 purinového kruhu. Vznikající deriváty hypoxanthinu a guaninu či dokonce xanthinu jsou látky s mnohonásobně vyšší rozpustností ve vodě a tak i při jejich částečném vzniku dochází k samovolnému vylučování čistých (požadovaných) derivátů DAP či adeninu.

V případě, že je požadovaným produktem FAN nesoucí jako nukleobázi guanin, hypoxanthin či xanthin, je možné provést izolaci též velice jednoduše a to jen přidáním acetonu do reakční směsi. FAN a i řada dalších fosfonových kyselin (jako např. ethephon **23**) jsou látky prakticky nerozpustné v acetonu a jeho přídavek tak vede ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu. Jak je uvedeno výše, při přípravách xanthinových derivátů je potřeba použít 1 ekvivalent HCl. Dva další ekvivalenty se během hydrolyzy 2,6-dichlorpurinových derivátů vytvoří a po reakci tak reakční směs obsahuje stále jeden ekvivalent HCl. Xanthin a jeho deriváty ale nejsou dostatečně bazické pro tvorbu příslušných hydrochloridů^[161] a tak po přidání acetonu opět dochází k vyloučení čistého FAN nesoucího xanthinovou nukleobázi. Bylo též zjištěno, že pro iniciaci krystalizace xanthinových FAN je lepší místo acetonu použít kyselinu octovou.

Již dříve bylo zmíněno, že při použití trimethylsilylbromidu dochází k tvorbě velmi těžko odstranitelných nečistot. Pomocí detailní elementární analýzy bylo zjištěno, že FAN **9** připravený pomocí trimethylsilylbromidu (dle literatury^[22]) obsahuje až pět hmotnostních procent křemíku. Látka **9** připravená dle schématu 10 neobsahuje dle detailní elementární analýzy ani křemík či chlor a dle HPLC vykazuje čistotu > 98%. Po rekrystalizaci z vody byla po přidání acetonu izolována látka **9** ve farmaceutické čistotě (> 99,5% dle HPLC). Citovaná multiprvková analýza byla provedena pomocí rentgenového fluorescenčního analyzátoru SPECTRO iQ II (SPECTRO Analytical Instruments).

S ohledem na relativně drastické podmínky hydrolyzy byla testována i optická čistota látky **9** (i přes skutečnost, že asymetrický uhlík se nachází v alifatické části molekuly a pro racemizaci tak není důvod). Byl použit nový postup popsany v literatuře využívající pro analýzu optické čistoty FAN kapilární elektroforézu^[162]. Optická čistota látky **9** byla již v tomto článku zkoumána. Proto mohlo být využito již popsanych podmínek a optická čistota látky **9** (připravené dle schématu 10) byla stanovena na 99,2%. K racemizaci studovaných FAN tedy nedochází.

Závěrem této části je potřeba uvést, že diskutovaný postup byl úspěšně použit (s využitím MV reaktoru typ III) i pro přípravu řady FAN (**9**, **11**, **12**, **13**, **14**, **21** a **22**) v multigramovém množství (jako zdroj FAN pro další výzkum, viz závěr). Pozorované výtěžky byly v dobré shodě s výtěžky pozorovanými při pokusech provedených z 1 mmol výchozí látky (viz **5.4.**). Jedna látka byla dokonce připravena v množství 250 g (jednalo se o zakázkovou syntézu a struktura sloučeniny tak zde nemůže být zveřejněna).

3.3. Kompletní degradace (hydrolýza) organofosfátů pomocí mikrovlnně zahřívání hydrolýzy

Specifickou skupinou fosfonátů jsou tzv. organofosfonáty (halogenidy, estery, thioestery a amidy fosfonových kyselin). Společně s organofosfáty (halogenidy, estery, thioestery a amidy kyseliny fosforečné) mají některé tyto látky schopnost nevratně (ireverzibilně) inhibovat enzym acetylcholinesterázu, který na nervových zakončeních katalyzuje rozklad nervového přenašeče acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou. Toto vede ke zvýšení hladiny acetylcholinu na nervových zakončeních. Organofosfáty a organofosfonáty tedy způsobují neustálé nervové dráždění v těch částech organismu, kde se acetylcholin vyskytuje (jako jsou dřeň nadledvin, nervosvalové ploténky a centrální nervový systém). Z tohoto důvodu se organofosfáty a organofosfonáty používají a vyvíjejí jako pesticidy a tzv. nervově paralytické zbraně hromadného ničení.

Mezi nejznámější pesticidy a insekticidy patří: malathion, parathion, paraoxon, azinphos-methyl, chlorpyrifos, diazinon, dichlorvos, fenitrothion, fenthion, pirimiphos-methyl a temefos.

Mezi nejznámější nervově paralytické zbraně patří: sarin, soman, tabun, látky VX, tj. *S*-(2-(diisopropylamino)ethyl)-*O*-(ethyl)-methylfosfonothioát, VG, tj. *S*-(2-(diethylamino)ethyl)-*O,O*-(diethyl)-fosfonothioát, VM, tj. *S*-(2-(diethylamino)ethyl)-*O*-(ethyl)-methylfosfonothioát, VR, tj. *S*-(2-(diethylamino)ethyl)-*O*-(isobutyl)-methylfosfonothioát^[163] a tzv. Novichok agents, tedy organofosfáty s připojenou dihalogenformaldoximovou skupinou, substituované na atomu fosforu alkylem, alkoylem, alkylaminoskupinou, nebo halogenem a na aldoximovém uhlíku halogenem (F, Cl, Br) či pseudohalogenem (CN).

Dalšími aplikacemi organofosfátů a organofosfonátů jsou: léky pro oční lékařství: echothiophate a diisopropyl-fluorfosfát^[164]; prostředky proti parazitickým červům jako: trichlorfon^[165]; herbicidy jako: tribufos, merphos či bensulide^[166].

Organofosfáty a organofosfonáty pronikají do těla dobře třemi cestami: při vdechnutí (inhalaci) se první příznaky objevují během několika minut, při požití ústy během desítek minut, při absorpci kůží během několika hodin. Způsobují nadměrné slinění, neklid, záškuby a křeče svalů. Což se projevuje až selháním srdce, ochrnutím dýchacích svalů a následně vede až ke smrti. Vlivem masivní aplikace těchto látek (především v zemědělství) docházelo a dochází k zamořování životního prostředí vysoce jedovatými látkami. Zamoření některých ekosystémů je tak výrazné, že celý tento jev získal i své vlastní označení tzv. otrava organofosfáty (organophosphate poisoning)^[167].

Pro účely odmořování (pesticidů i nervově-paralytických zbraní) byla vypracována široká paleta technik a postupů degradací a rozkladů organofosfátů a organofosfonátů (přehledový referát^[168]). Pro účely dekontaminace především nervově-paralytických zbraní byla původně vyvinuta různá oxidační činidla na bázi chlornanu vápenatého a chlornanu sodného^[168]. Používaná oxidační činidla mají ale řadu praktických nevýhod, jako např.: jejich aktivita dramaticky klesá během skladování, pro plnou degradaci je zapotřebí vysokých nadbytků

těchto činidel a v neposlední řadě jsou tato činidla vysoce korozivní a sama dosti nebezpečná. Další skupinou činidel jsou silně bazické roztoky hydroxidů ve směsi s alifatickými aminy a hydroxyalkyletery^[168]. Tato činidla jsou stále dosti agresivní (např. vůči pokožce) a nezanedbatelně toxická. Navíc např. při bazické hydrolyze látky VX vznikají stále vysoce toxické produkty hydrolyzy. Bazická hydrolyza navíc umožňuje pouze částečný rozklad, kdy k hydrolyze do prvního stupně dochází ještě rychle, ale následná reakce fosfátového či fosfonátového monoaniontu s hydroxidovým aniontem už téměř neprobíhá^[158]. V poslední době je této problematice věnována zvýšená pozornost z obav před použitím organofosfátů a organofosfonátů pro účely chemického terorismu. Pro účely maximální připravenosti bylo vyvinuto několik nových metodik degradace organofosfátů a organofosfonátů, jako např.: enzymatická degradace^[169], degradace pomocí plasmatu generovaného radiovými frekvencemi^[170, 171] či mikrovlnnými frekvencemi^[172], degradace působením různých mikroorganismů^[173], degradace fotochemická za účasti ultrazvuku^[174] či na povrchu TiO₂^[175], degradace s využitím modifikovaných oxidů kovů^[176] či zeolitů^[177].

S ohledem na vypracování velmi rychlého a praktického postupu hydrolyzy dialkyl-fosfonátů (sekce 3.2.) bylo dalším logickým krokem otestování této metodiky při degradacích organofosfátů. Velkou výhodou zvoleného řešení je fakt, že konečným produktem kompletní hydrolyzy je pouze (environmentálně kompatibilní) kyselina fosforečná. Vlivem velmi vysoké nebezpečnosti a jedovatosti nervově-paralytických organofosfátů a organofosfonátů byly použity dvě modelové sloučeniny (diethyl-chlorfosfát **25** a diisopropyl-chlorfosfát **26**), které se jako modelové sloučeniny pro sledování rozkladu nervově-paralytických organofosfátů a organofosfonátů běžně používají (tzv. “nerve agent mimics” či “chemical warfare simulants”)^[178]. Tyto látky jsou stále velmi toxické nervově-paralytické jedy. V porovnání s látkami jako sarin, soman a tabun jsou však tyto látky přibližně řádově méně toxické a nebezpečné (jejich LD₅₀ je přibližně řádově vyšší). Pro možnost přímé detekce pomocí nukleární magnetické rezonance (¹H NMR a ³¹P NMR) byly reakce prováděny přímo v D₂O (místo H₂O) a případně s přidávkem DCl (místo HCl).

3.3.1. Mikrovlnně zahřívání hydrolyza (MV) diethyl-chlorfosfátu (25)

První zkoumanou reakcí byla mikrovlnně zahřívání hydrolyza diethyl-chlorfosfátu (**25**). V prvním kroku této reakce (schéma 13) dochází k tvorbě diethylfosforečné kyseliny (**25.A**), která následně dále hydrolyzuje za vzniku ethylfosforečné kyseliny (**25.B**), jež dále hydrolyzuje až na kyselinu fosforečnou (**25.C**).

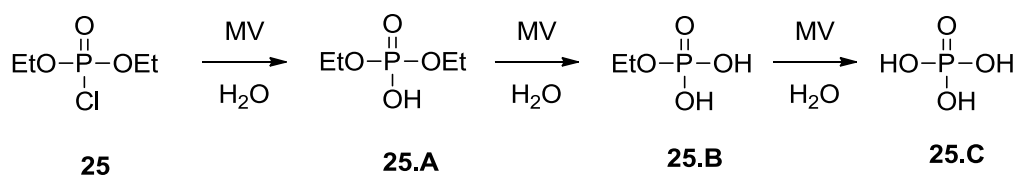
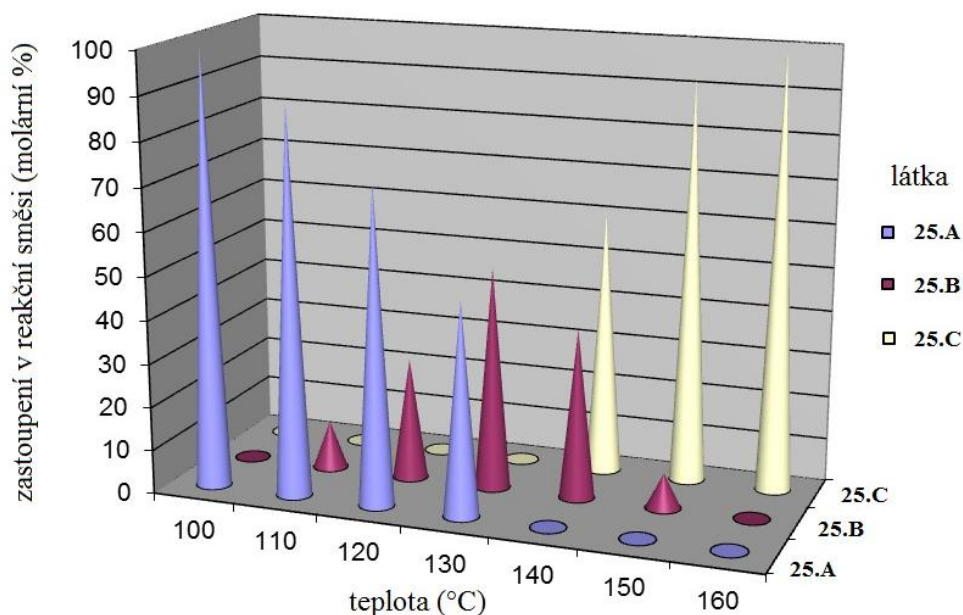


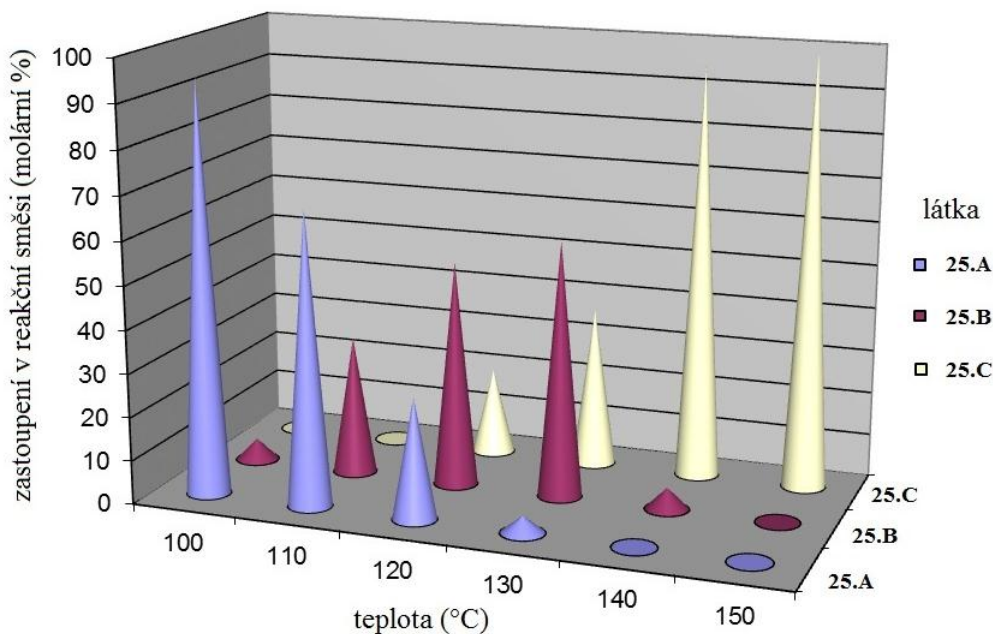
Schéma 13. Mikrovlnně zahřívání hydrolyza (MV) diethyl-chlorfosfátu (**25**) vedoucí přes diethylfosforečnou kyselinu (**25.A**), ethylfosforečnou kyselinu (**25.B**) až ke kyselině fosforečné (**25.C**).

Jako první byl zkoumán vliv množství přítomného HCl na průběh reakce (zde je potřeba zdůraznit, že jeden ekvivalent HCl se uvolňuje v prvním kroku hydrolyzy z **25** na **25.A**). Byly proto nachystány čtyři experimenty s různými koncentracemi HCl – pokus v samotné vodě (**5.5.1.**, kde se jeden ekvivalent HCl generuje v prvním kroku hydrolyzy), pokus v 0,5M vodné HCl (**5.5.2.**, tzn. přidavek jednoho ekvivalentu HCl na diethyl-chlorfosfát **25**, kde se druhý ekvivalent HCl generuje v prvním kroku hydrolyzy), pokus v 1M vodné HCl (**5.5.3.**, tzn. přidavek dvou ekvivalentů HCl na diethyl-chlorfosfát **25**, kde se třetí ekvivalent HCl generuje v prvním kroku hydrolyzy) a pokus koncentrované HCl (**5.5.4.**, kde je vysoký nadbytek HCl). Takto připravené roztoky byly následně postupně zahřívány v MV reaktoru typ I na 10 minut při teplotě od 100 °C až po 160 °C (po 10 °C). Po každém navýšení reakční teploty byl odebrán vzorek (0,2 ml) reakční směsi a po přidání 0,3 ml DMSO-*d*₆ byla měřena ¹H a ³¹P NMR spektra pro analýzu složení reakční směsi. Obrázky 48-51 zachycují průběh reakce pro jednotlivé koncentrace HCl při různých teplotách (zde je potřeba zdůraznit, že se jedná o kumulativní výsledky – stejná reakční směs byla po odebrání vzorku pro analýzu zahřívána dále na o 10 °C vyšší teplotu). Výsledek pokusu **5.5.1.** (čistá voda) je znázorněn na obrázku 48 z kterého je zřejmé, že k hydrolyze začíná docházet při 110 °C, při 140 °C je výrazně urychlena a po zahřívání při 160 °C dojde k plné konverzi na kyselinu fosforečnou (**25.C**).



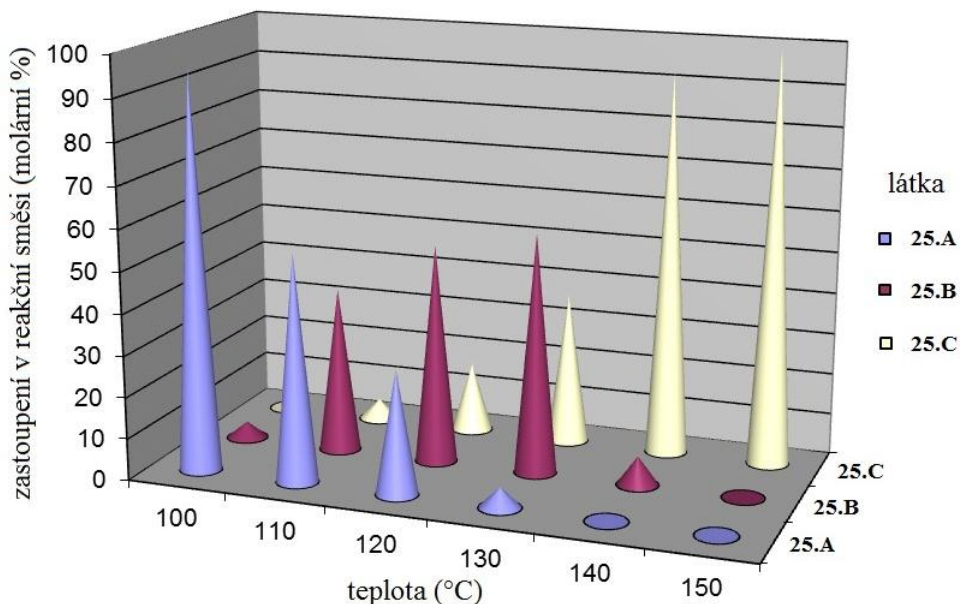
Obrázek 48. Průběh reakce hydrolyzy látky **25** v čisté vodě (**5.5.1.**) zaznamenaný na základě integrace signálů v ³¹P NMR spektru reakční směsi.

Výsledek pokusu **5.5.2.** je názorně zobrazen na obrázku 49, z kterého je zřejmé, že k hydrolyze začíná docházet už při 100 °C, při 140 °C je výrazně urychlena a po zahřívání při 150 °C dojde k plné konverzi na kyselinu fosforečnou (**25.C**).



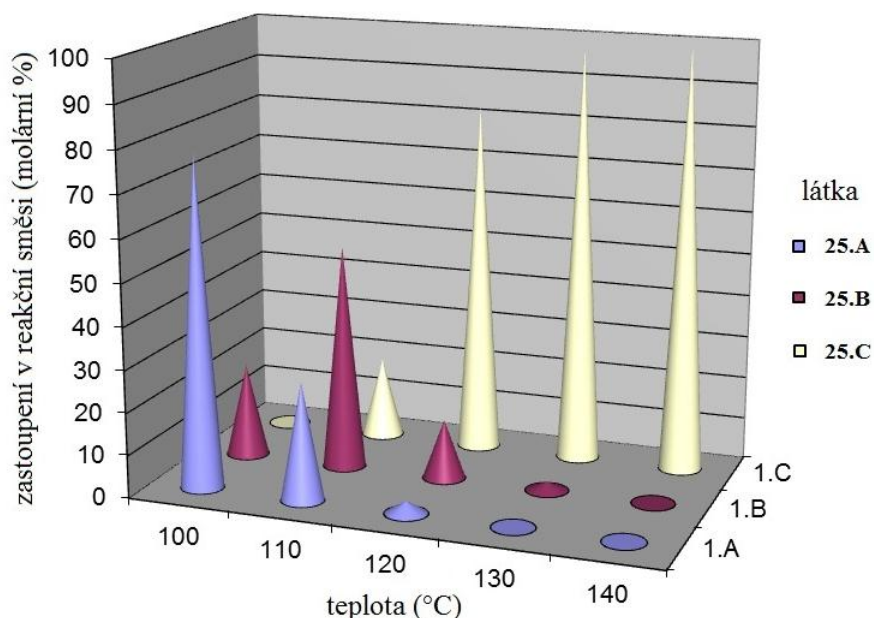
Obrázek 49. Průběh hydrolyzy látky **25** v 0,5M HCl (**5.5.2.**) zaznamenaný na základě integrace signálů v ^{31}P NMR spektru reakční směsi.

Výsledek pokusu **5.5.3.** je znázorněn na obrázku 50, ze kterého je zřejmé, že k hydrolyze začíná docházet už při 100 °C, při 140 °C je výrazně urychlena a po zahřívání při 150 °C dojde k plné konverzi na kyselinu fosforečnou (**25.C**).



Obrázek 50. Průběh hydrolyzy látky **25** v 1M HCl (**5.5.3.**) zaznamenaný na základě integrace signálů v ^{31}P NMR spektru reakční směsi.

Naměřená data z pokusu **5.5.4.** jsou znázorněna na obrázku 51, z kterého je jasné vidět, že k hydrolyze začíná docházet už při 100 °C, při 120 °C je výrazně urychlena a při 140 °C dojde k plné konverzi na kyselinu fosforečnou (**25.C**).



Obrázek 51. Průběh hydrolyzy látky **25** v koncentrované HCl (**5.5.4.**) zaznamenaný na základě integrace signálů v ^{31}P NMR spektru reakční směsi.

Z Obrázků 48-51 je tedy evidentní, že je možné díky MV záření docílit plné hydrolyzy látky **25** až na kyselinu fosforečnou. Porovnáním dat pro jednotlivé koncentrace HCl při stejných teplotách byl jednoznačně prokázán urychlující efekt přidaného HCl na studovanou hydrolyzu. Kdy např. v koncentrované kyselině chlorovodíkové dojde k téměř úplné hydrolyze po zahřívání na pouhých 130 °C. Bylo ale zároveň jednoznačně prokázáno, že i přes pozitivní efekt HCl na rychlost hydrolyzy je možné provést úplnou degradaci organofosfátu **25** v čisté vodě (Obr. 48).

3.3.2. Mikrovlnně zahřívání hydrolyza (MV) diisopropyl-chlorfosfátu (**26**)

Druhou zkoumanou reakcí byla mikrovlnně zahřívání hydrolyza diisopropyl-chlorfosfátu (**26**). V prvním kroku této reakce (schéma 14) dochází k tvorbě diisopropylfosforečné kyseliny (**26.A**), která následně dále hydrolyzuje za vzniku isopropylfosforečné kyseliny (**26.B**), jež dále hydrolyzuje až na kyselinu fosforečnou (**26.C=25.C**).

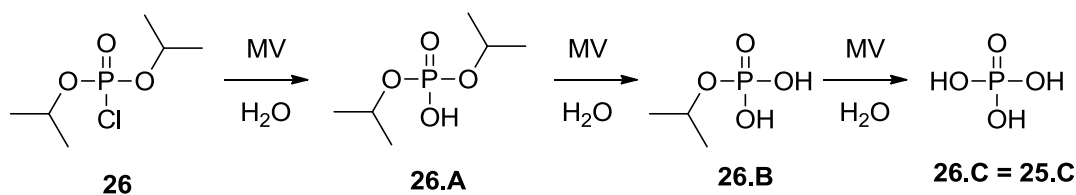
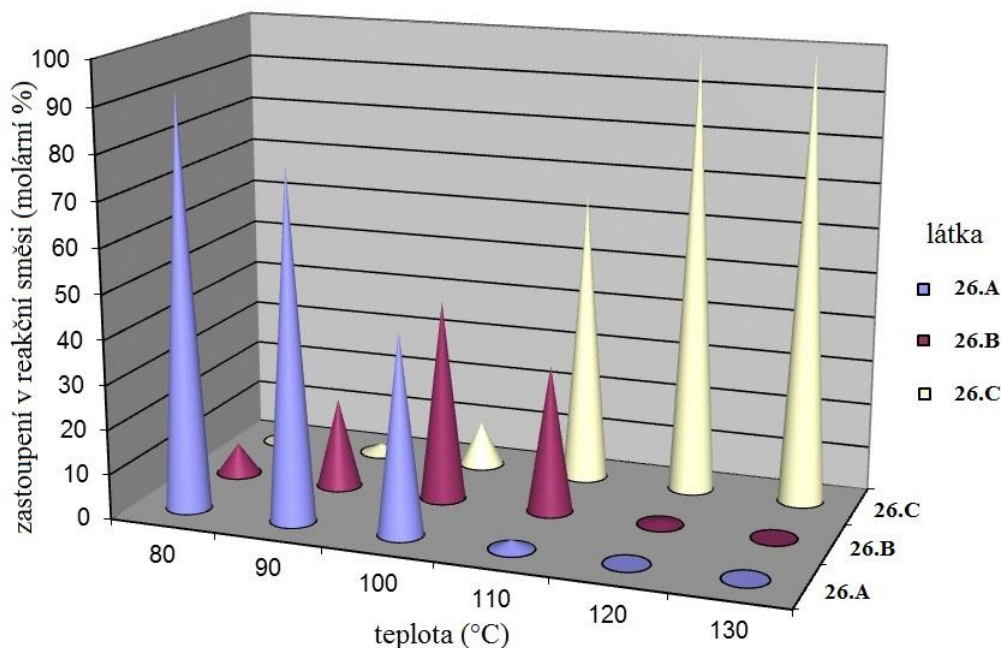


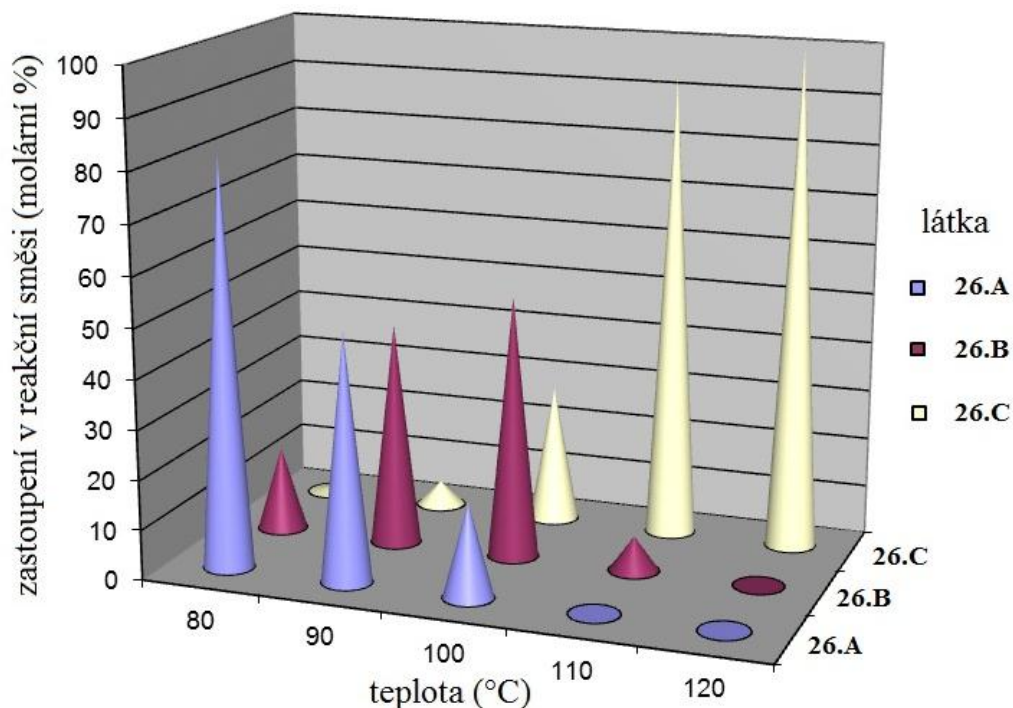
Schéma 14. Mikrovlnně zahřívání hydrolyza (MV) diisopropyl-chlorfosfátu (**26**) vedoucí přes diisopropylfosforečnou kyselinu (**26.A**), isopropylfosforečnou kyselinu (**26.B**) až ke kyselině fosforečné (**26.C**).

Zde byl též zkoumán vliv množství přítomného HCl na průběh reakce. S ohledem na předpoklad výrazně rychlejší hydrolyzy vlivem tvorby stabilnějšího (isopropylového) karbokationtu byly nachystány pouze dva experimenty s různými koncentracemi HCl – pokus v samotné vodě (**5.5.5.**, kde se jeden ekvivalent HCl generuje v prvním kroku hydrolyzy), pokus v 0,5M vodné HCl (**5.5.6.**, tzn. přidavek jednoho ekvivalentu HCl na diisopropyl-chlorfosfát **26**, kde se druhý ekvivalent HCl generuje v prvním kroku hydrolyzy). Tyto připravené roztoky byly následně postupně zahřívány v MV reaktoru typ I na 10 minut při teplotě od 80 °C až po 130 °C (po 10 °C – vlivem rychlejší hydrolyzy isopropylesterů byla též snížena i počáteční teplota z 100 °C na 80 °C). Po každém navýšení reakční teploty byl znovu odebrán vzorek (0,2 ml) reakční směsi a po přidání 0,3 ml DMSO-*d*₆ byla měřena ¹H a ³¹P NMR spektra pro analýzu složení reakční směsi. Obrázky 52 a 53 zachycují průběh reakce pro jednotlivé koncentrace HCl při různých teplotách. Výsledek pokusu **5.5.5.** (čistá voda) je znázorněn na obrázku 52, z kterého je zřejmé, že k hydrolyze začíná docházet už při 80 °C, při 110 °C je výrazně urychlena a po zahřívání při 120 °C dojde k téměř úplné konverzi na kyselinu fosforečnou (**26.C**).



Obrázek 52. Průběh hydrolyzy látky **26** v čisté vodě (**5.5.5.**) zaznamenaný na základě integrace signálů v ³¹P NMR spektru reakční směsi.

Přídavek HCl pak má opět pozitivní efekt na urychlení studované hydrolyzy. Výsledek tohoto pokusu (5.5.6.) je znázorněn na obrázku 53, ze kterého je zřejmé, že k hydrolyze začíná docházet už při 80 °C, při 100 °C je výrazně urychlena a po zahřívání při 110 °C dojde k téměř plné konverzi na kyselinu fosforečnou (26.C).



Obrázek 53. Průběh hydrolyzy látky **26** v 0,5M HCl (5.5.6.) zaznamenaný na základě integrace signálů v ^{31}P NMR spektru reakční směsi.

Bylo opět prokázáno, že i přes pozitivní efekt HCl na rychlost hydrolyzy je možné provést úplnou degradaci organofosfátu **26** v čisté vodě a to i pod bodem varu vody (Obr. 52). Získaná data (významně vyšší rychlost hydrolyzy isopropyl esterů vůči ethyl esterům) jsou v souladu s navrženým mechanismem reakce zahrnujícím tvorbu karbokationtu (schéma 9).

3.3.3. Mikrovlnně zahřívání hydrolyza (MV) diethyl-(4-nitrofenyl)-fosfátu (27 - pesticid paraoxon)

Poslední studovanou reakcí byla hydrolyza vybraného zástupce ze skupiny organofosfátových pesticidů. Zde bylo velmi překvapivě zjištěno, že hydrolyza v čisté vodě má velmi selektivní průběh (schéma 15), při níž vzniká nejdříve ethyl-(4-nitrofenyl)fosforečná kyselina (**27.A**), která následně dále hydrolyzuje na ethylfosforečnou kyselinu (**27.B = 25.B**), jejíž hydrolyzou se získá finální produkt degradace – kyselina fosforečná (**27.C – identické s 25.C a 26.C**).

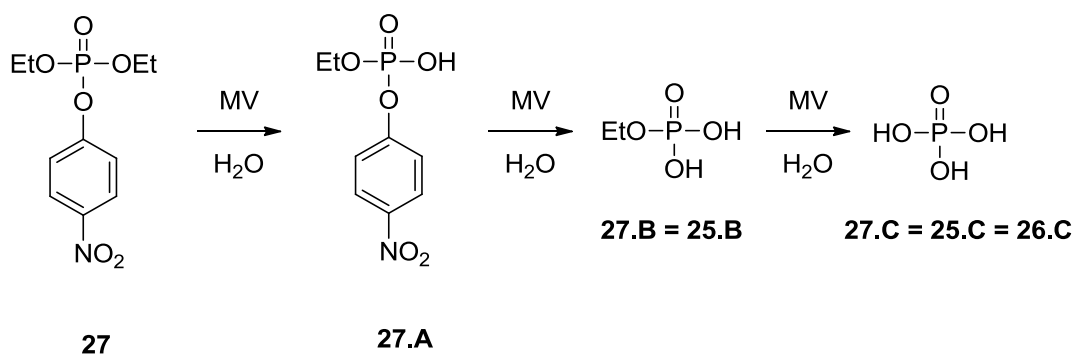
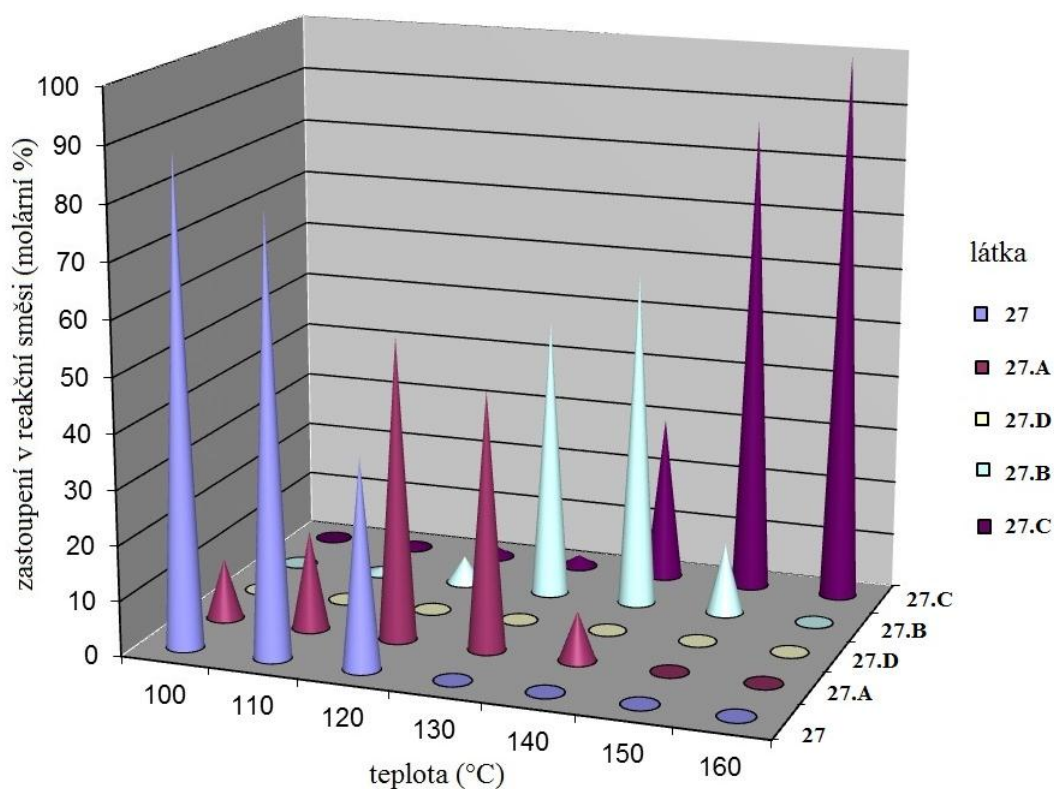


Schéma 15. Mikrovlnně zahřívání (MV) diethyl-(4-nitrofenyl)-fosfátu (**27** - pesticid paraoxon) v čisté vodě vedoucí přes ethyl-(4-nitrofenyl)fosforečnou kyselinu (**27.A**), ethylfosforečnou kyselinu (**27.B**) až ke kyselině fosforečné (**27.C**).

Vznik diethylfosforečné kyseliny nebyl v tomto případě vůbec pozorován. Detailní složení reakčních směsí při pokusu **5.5.7.** znázorňuje obrázek 54 z kterého je zřejmé, že k hydrolyze začíná docházet už při 100 °C, při 140 °C je výrazně urychlena a po zahřívání při 160 °C dojde k plné konverzi na kyselinu fosforečnou (**27.C**).



Obrázek 54. Průběh hydrolyzy látky **27** v čisté vodě (**5.5.7.**) zaznamenaný na základě integrace signálů v ^{31}P NMR spektru reakční směsi.

Analogická reakce v 1M kyselině chlorovodíkové už neposkytuje tak čistý průběh reakce (pokus **5.5.8.**). Tato skutečnost je vyjádřena ve schématu **16**, z kterého je vidět, že se výchozí

látku hydrolyzuje ve větší míře na ethyl-(4-nitrofenyl)fosforečnou kyselinu (**27.A**). Část výchozí látky je ale přímo hydrolyzována těž na diethylfosforečnou kyselinu (**27.D = 25.A**). Následnou hydrolyzou obou látek (**27.A** a **27.D**) vzniká pouze ethylfosforečná kyselina (**27.B**). Vznik (4-nitrofenyl)fosforečné kyseliny nebyl pozorován ani v jenom experimentu (**5.5.7.** či **5.5.8.**).

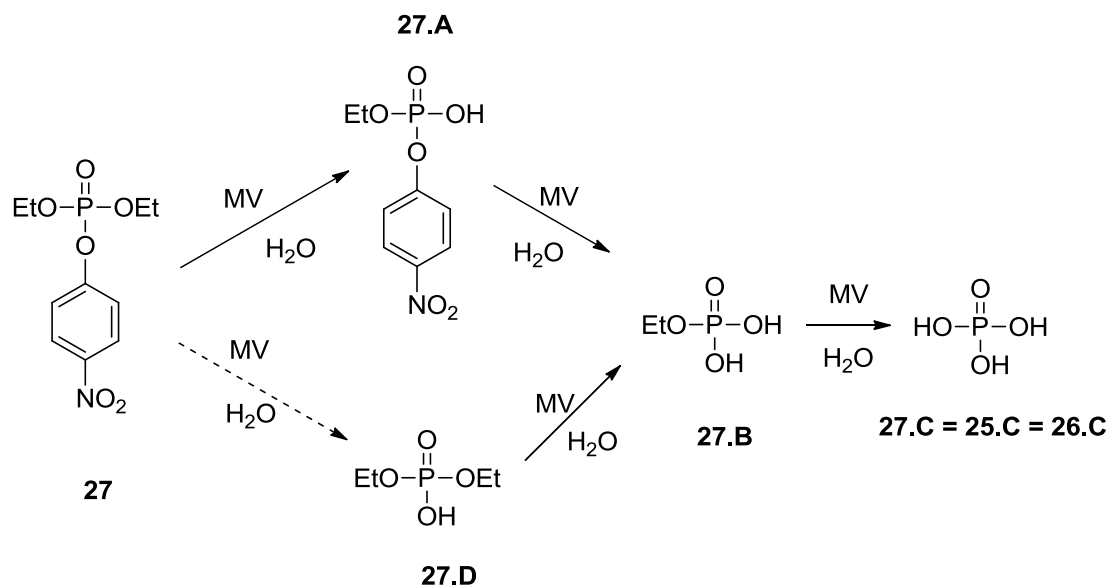
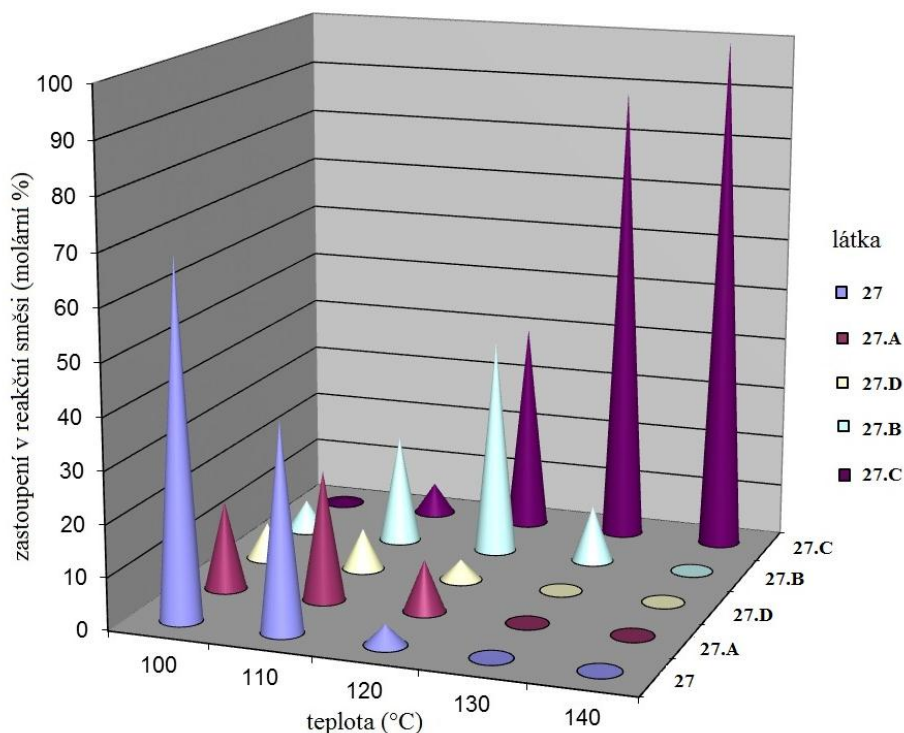


Schéma 16. Mikrovlnně zahřívání hydrolyza (MV) diethyl-(4-nitrofenyl)-fosfátu (**27** - pesticid paraoxon) v 1M HCl vedoucí přes ethyl-(4-nitrofenyl)fosforečnou kyselinu (**27.A**) a diethylfosforečnou kyselinu (**27.D**) na ethylfosforečnou kyselinu (**27.B**), která dále hydrolyzuje až na kyselinu fosforečnou (**27.C**).

Detailní složení reakčních směsí při pokusu **5.5.8.** znázorňuje obrázek 55 z kterého je zřejmé, že k hydrolyze začíná docházet už při $100\text{ }^\circ\text{C}$, při $130\text{ }^\circ\text{C}$ je výrazně urychlena a po zahřívání při $140\text{ }^\circ\text{C}$ dojde k plné konverzi na kyselinu fosforečnou (**27.C**).

Pozorovaný průběh hydrolyzy látky **27** je možné logicky vysvětlit opět na základě vzniku ethylového karbokationtu. V pokusu **5.5.7.** není přítomna žádná HCl a tak nedochází k protonaci výchozí látky **27**. Působením MV záření následně dochází k disociaci pouze na ethylesterové funkci (vlivem stabilizace ethylového karbokationtu). Vznik alternativního nitrofenylového karbokationtu je velmi nepravděpodobný. V prvním kroku hydrolyzy v čisté vodě tak vzniká pouze ethyl-(4-nitrofenyl)fosforečná kyselina (**27.A**). Tato látka už ale nese kyselý vodík, který následně zřejmě protonuje kyslík 4-nitrofenylesterové funkce, čímž vzniká velmi dobrá odstupující skupina (4-nitrofenol), což vede k dalšímu velmi selektivnímu průběhu následné hydrolyzy za vzniku ethylfosforečné kyseliny (**27.B**).

V případě, že je v reakční směsi přítomna i HCl dochází k protonaci výchozí látky **27** a to ve větší míře na kyslík ethylesterové funkce (je bazičtější, než kyslík 4-nitrofenylesterové funkce). V prvním kroku hydrolyzy se tak získá směs ethyl-(4-nitrofenyl)fosforečné kyseliny (**27.A**) a diethylfosforečné kyseliny (**27.D**). Diethylfosforečná kyselina může podléhat další hydrolyze pouze na kyselinu ethylfosforečnou (**27.B**).



Obrázek 55. Průběh hydrolyzy látky **27** v 1M HCl (**5.5.8.**) zaznamenaný na základě integrace signálů v ^{31}P NMR spektru reakční směsi.

Pozorovaná selektivní hydrolyza ethyl-(4-nitrofenyl)fosforečné kyseliny (**27.A**) vždy pouze na ethylfosforečnou kyselinu (**27.B**) zůstává stále malou záhadou (vznik (4-nitrofenyl)fosforečné kyseliny nebyl pozorován ani v pokusu **5.5.7** či **5.5.8.**). K hydrolyze látky **27.A** navíc dochází i bez přítomnosti HCl. Logickým vysvětlením zde může být stabilizace příslušného aniontu látky **27.A** rezonancí záporného náboje do elektronově deficitního 4-nitrofenylového kruhu. Vlivem toho vzrůstá elektronová hustota na atomu kyslíku 4-nitrofenylesterové funkce a tím vzrůstá i tendence tohoto atomu kyslíků přijímat kyselý proton. Schéma 17 znázorňuje teoreticky možné struktury, které se mohou uplatnit v rychlost určujícím kroku selektivní hydrolyzy ethyl-(4-nitrofenyl)fosforečné kyseliny (**27.A**) na kyselinu ethylfosforečnou (**27.B**).

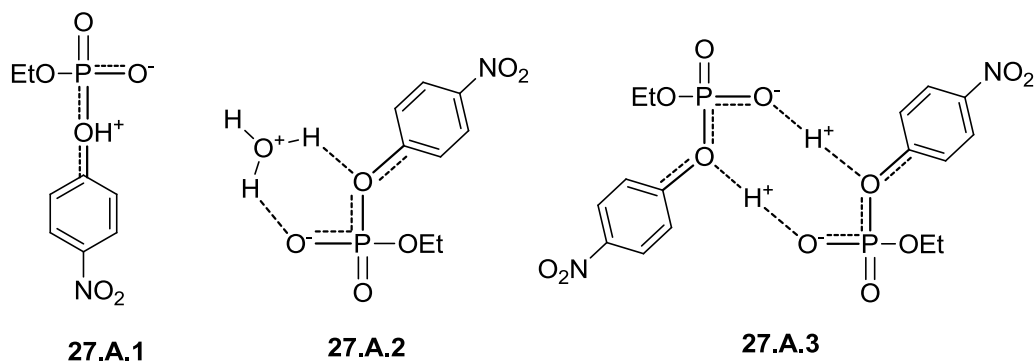


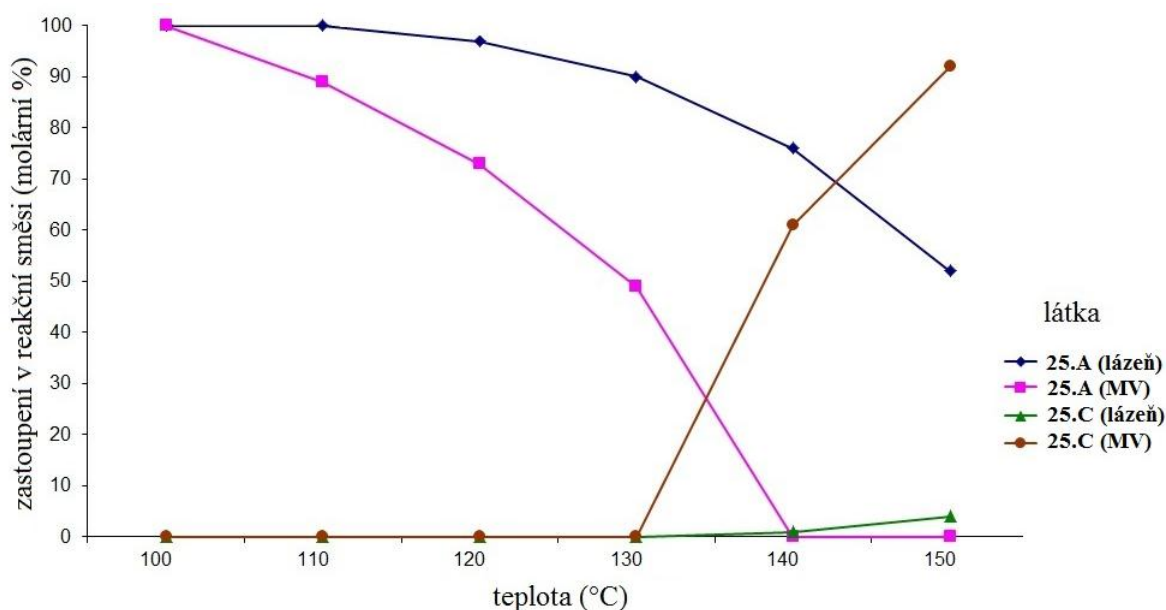
Schéma 17. Teoretické struktury, které se mohou uplatnit v rychlost určujícím kroku selektivní hydrolyzy ethyl-(4-nitrofenyl)fosforečné kyseliny (**27.A**) na kyselinu ethylfosforečnou (**27.B**).

První možností je jednoduchá protonace atomu kyslíku 4-nitrofenylesterové funkce (**27.A.1**), druhou možností je participace molekuly vody (**27.A.2**) a třetí navrženou možností je tvorba těsného páru (**27.A.3**) dvou molekul látky **27.A** (analogie s karboxylovými kyselinami).

Pro přesnější vysvětlení podstaty této selektivní hydrolyzy by bylo potřeba provést detailnější mechanistickou studii, což nebylo zadáním této disertační práce. Další možností jak zkoumat efekty ovlivňující selektivitu této reakce je studování průběhu hydrolyzy nových derivátů látky **27.A** (především derivátů nesoucích různé substituenty v poloze 4 fenylového kruhu). Tyto mechanistické pokusy budou součástí dalšího výzkumu (uvažované látky jsou často komerčně dostupné).

3.3.4. Studium vlastního efektu MV záření

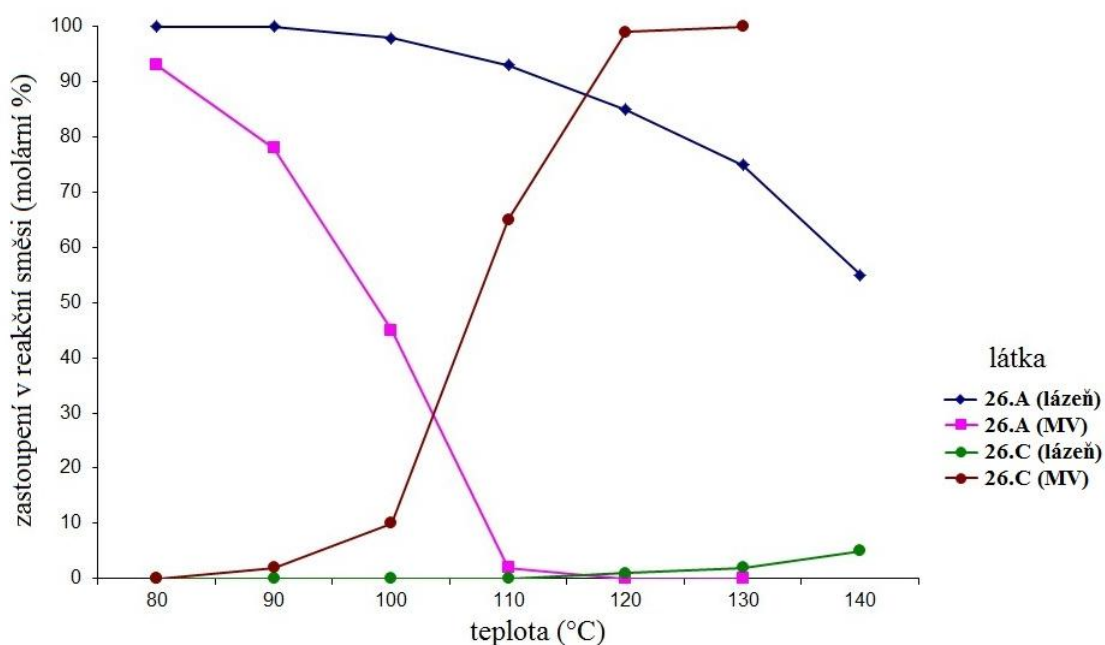
Už v předcházejících kapitolách byl studován vlastní efekt MV záření v porovnání s experimenty zahříváním olejovou lázní. Vlivem možnosti jednoduché analýzy detailního složení reakční směsi, byly provedeny srovnávací experimenty pro zvolené MV pokusy (**5.5.1.** a **5.5.5.**). Detailní popis experimentů je zaznamenán v části **5.5.9.** (analogie **5.5.1.** ohřívání olejovou lázní) a **5.5.10.** (analogie **5.5.5.** ohřívání olejovou lázní). Obrázek 56 zachycuje pozorované rozdíly ve složení reakční směsi při hydrolyze látky **25** v čisté vodě při zahřívání pomocí MV záření (**5.5.1.**) či při zahřívání olejovou lázní (**5.5.9.**).



Obrázek 56. Porovnání průběhu reakce znázorněné ve schématu 13 při zahřívání pomocí mikrovlnného záření (MV) či při zahřívání olejovou lázní (lázeň).

Obrázek 56 jasně demonstruje výrazné urychlení hydrolyzy organofosfátů pomocí mikrovlnného záření. Pro dosažení stejné konverze je v případě použití běžného konvenčního zahřívání olejovou lázní potřeba minimálně o 20 °C vyšší teplota oproti zahřívání pomocí mikrovln. Pozorovaný rozdíl je potřeba interpretovat velmi opatrně. Pro jednoznačnost výsledku by bylo potřeba měřit reakční teplotu za absolutně identických podmínek (což

nebylo s ohledem na přístrojové vybavení možné). Reakční teploty u pokusu označeného jako MV (viz 5.1. MV reaktor typ I) jsou měřeny na povrchu reakční nádoby pomocí tepelného vyzařování. Skutečná teplota reakční směsi je tak určitě vyšší. U experimentu zahřívání olejovou lázní byla zase teplota měřena v samotné olejové lázni. Samotná teplota reakční směsi tak byla jistě nižší. Proto z tohoto pokusu není možné jednoznačně říci, zda se při studované hydrolyze uplatňuje nějaký „speciální mikrovlnný efekt“ (jeho případná existence je nyní intenzivně diskutována a studována^[146, 148, 160]). Byl proto opakován i pokus 5.5.5. za podmínek ohřevu reakční směsi olejovou lázní. U látky 26 totiž bylo pozorováno dramatické urychlení hydrolyzy, kdy samotná reakce probíhá i při 80 °C za podmínek MV ohřevu. Teoretickým předpokladem zde bylo, že vlivem případného „superpolárního“ prostředí generovaného v MV reaktoru by se tento efekt měl nejvíce uplatnit právě u látky, která disociuje na stabilní karbokationt (tzn. látka 26 poskytuje isopropylový karbokationt). Obrázek 57 zachycuje pozorované rozdíly ve složení reakční směsi při hydrolyze látky 26 v čisté vodě při zahřívání pomocí MV záření (5.5.5.) či při zahřívání olejovou lázní (5.5.10.).



Obrázek 57. Porovnání průběhu reakce znázorněné ve schématu 14 při zahřívání pomocí mikrovlnného záření (MV) či při zahřívání olejovou lázní (lázeň).

Tento obrázek jasně demonstruje výrazné urychlení hydrolyzy organofosfátů pomocí mikrovln. Pro dosažení stejné konverze je v případě použití běžného konvenčního zahřívání olejovou lázní potřeba o 40 °C vyšší teplota oproti zahřívání pomocí mikrovln. Porovnáním obrázků 56 a 57 je také jasně ukázáno vyšší urychlení rozkladů sekundárních esterů (snížení reakční teploty o přibližně 40 °C) oproti esterům primárním (snížení reakční teploty o přibližně 20 °C). Jak už bylo uvedeno výše při vlastní interpretaci výsledků je potřeba brát v úvahu rozdílné techniky měření reakční teploty. Zjištěný rozdíl 40 °C už je ovšem příliš vysoký na to aby se dal vysvětlit chybou stanovení. Samotná chyba by navíc měla být pro oba srovnávací pokusy stejná (obr. 56 a 57), protože měření teploty bylo pro oba pokusy stejné. Pokud tedy předpokládáme, že je chyba měření oněch 20 °C pozorovaných na obrázku 56,

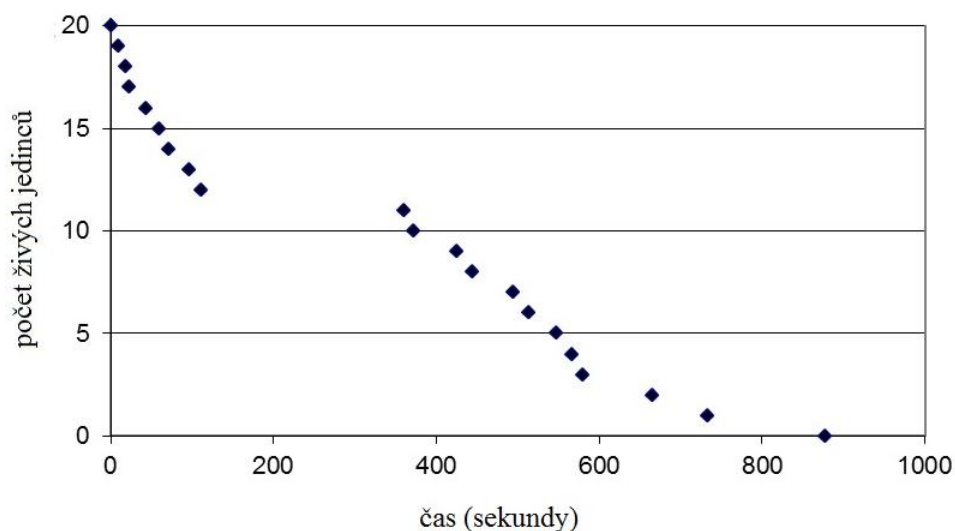
zbývá nám vysvětlit urychlení hydrolyzy látky **27** o dalších 20 °C. Dle těchto pozorování je tedy možné, že se u hydrolyzy látky **27** uplatňuje nějaký „speciální mikrovlnný“ efekt a tato reakce si tak zaslouží další zkoumání (po dovybavení MV reaktoru typ I čidlem pro přímé měření reakční teploty uvnitř reakční nádoby, budou tedy provedeny další porovnávací pokusy).

3.3.5. Rozklad organofosfátů pomocí kuchyňské mikrovlnné trouby

Vzhledem k tomu, že k hydrolyze diisopropyl-chlorfosfátu (**26**) v čisté vodě dochází už při 80 °C (viz příklad **5.5.5.**), byl tento pokus opakován i s použitím běžně dostupné kuchyňské mikrovlnné trouby (Daewoo typ - KOR 6105 s výkonem 800W) s použitím komerčně dostupného mikrovlnného tlakového hrnce (Tescoma). Do tohoto mikrovlnného tlakového hrnce byla umístěna čistá voda s kádinkou (jako stojánkem) ve které byla umístěna 10 ml reakční kvjeta naplněná stejnou reakční směsí, jaká je popsána v pokusu **5.5.5.** Voda v hrnci obklopující kádinku slouží pro udržování tlaku páry, který vyrovnává nárůst tlaku uvnitř reakční zkumavky (která je utěsněná septem). Toto provedení dovoluje pracovat s minimálním množstvím rozkládaných látek i v tomto neutěsněném reakčním uspořádání (čímž se snižuje nebezpečnost provedeného pokusu). Celý hrnec byl následně zahříván při maximálním výkonu mikrovlnné trouby po dobu 15 minut. Následná analýza prokázala, že pro hydrolyzu sekundárních alkyl esterů postačuje kuchyňská mikrovlnná trouba. Reakční směs obsahovala dle ³¹P NMR 0% látky **26**, 14% látky **26.A**, 65% látky **26.B** a 21% kyseliny fosforečné (schéma 14). Pro dosažení plné konverze na kyselinu fosforečnou byla tato směs dále zahřívána za stejných podmínek po dobu 20 minut.

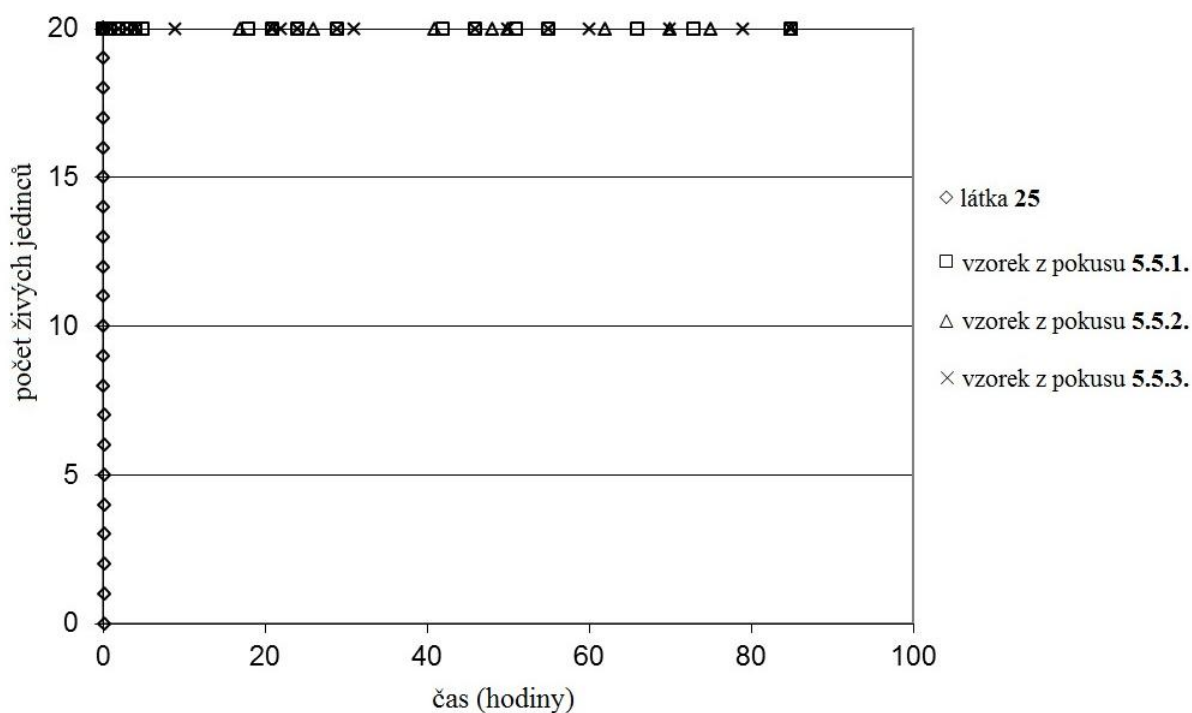
3.3.6. Prokázání biologické dekontaminace

Pro ověření biologické nezávadnosti rozložených organofosfátů bylo využito metodiky popsané v literatuře^[171]. Mušky rodu *Drosophila* (octomilky, zde bych rád poděkoval pracovníkům biologického servisního týmu na ÚOCHB, kteří dodali potřebný počet mušek pro všechny pokusy – jmenovitě tedy p. Hovorkovi a pí. Titzenthalerové) byly vystaveny působení původních organofosfátů (jako pozitivní kontrola). Jiné skupiny poté byly vystaveny působení rozložených směsí (z pokusů **5.5.1.**, **5.5.2.**, **5.5.3.**, **5.5.7.** a **5.5.8.** – takových, kde došlo dle NMR k plnému rozkladu na kyselinu fosforečnou). Látka **25** prokázala svou vysokou toxicitu (vlivem své těkavosti = bojový plyn), kde po 880 sekundách došlo k úmrtí všech 20 pokusných jedinců (znázorněno na obrázku 58). Zdánlivá nulová změna mezi 110 a 360 sekundou (žádný nový mrtvý jedinec) je dána tím, že prvních 8 jedinců bylo v okamžiku aplikování látky v dolní části nádoby (kam byl jed nanesen), zatímco zbylých 12 bylo v horní části nádoby. V 360 vteřině tedy bojový plyn difundoval až do horní části nádoby a vyvolal úmrtí zbytku jedinců.



Obrázek 58. Toxický efekt látky **25** na mušky rodu *Drosophila* (octomilka) po aplikaci látky na dno nádoby obsahující 20 jedinců (čas 0).

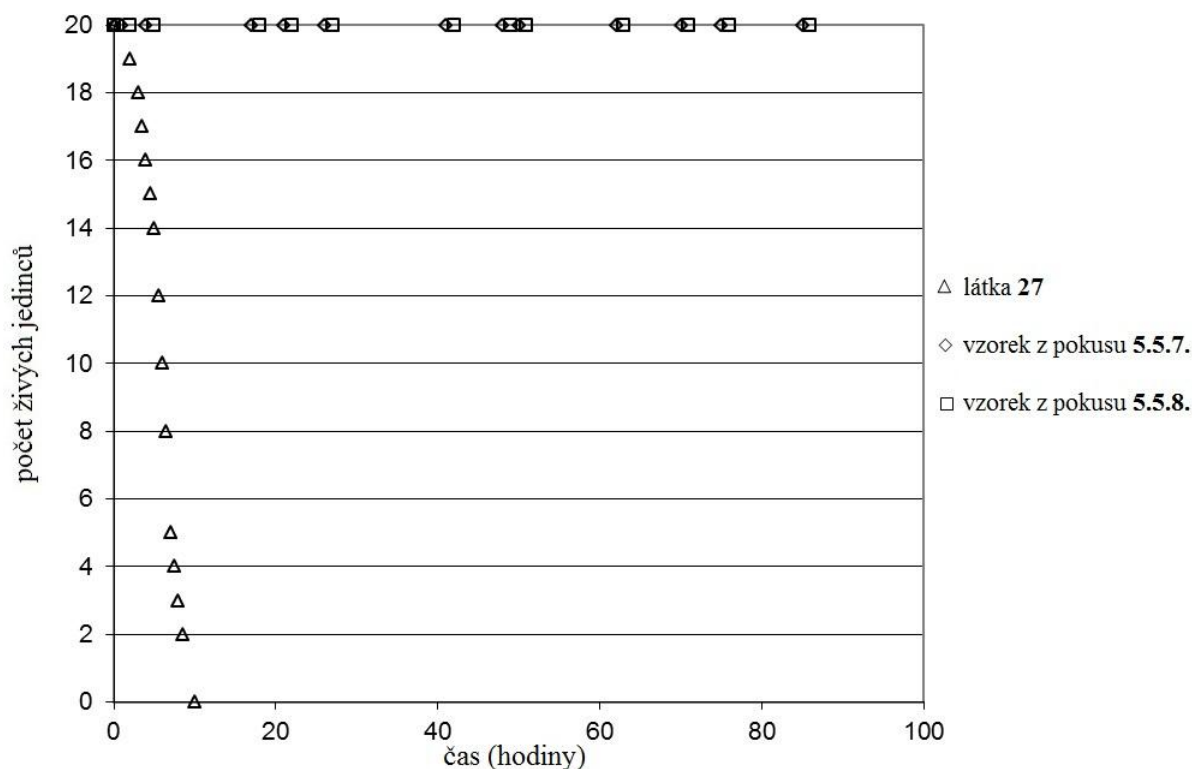
Jak je vidět z obrázku 59, organofosfát rozložený dle příkladu **5.5.1.**, **5.5.2.** a **5.5.3.** nejeví už žádnou toxicitu ani v řádu mnoha desítek hodin.



Obrázek 59. Netoxičnost vzorků připravených v pokusech **5.5.1.**, **5.5.2.** a **5.5.3.** (aplikována byla vždy reakční směs po dosažení plné konverze dle NMR). Pro ilustraci je vynesena i efekt látky **25** do stejného grafu (do grafu se stejným měřítkem).

Látka **27** (pesticid paraoxon) také prokázala svůj insekticidní charakter (obrázek 60). V tomto případě došlo k úmrtí všech 20 pokusných jedinců do 10 hodin (látka funguje jako kontaktní jed, proto nemá tak rychlý účinek jak látka **25**). Jak je vidět z obrázku 60, organofosfát

rozložený dle příkladu 5.5.7. a 5.5.8. nejeví už také žádnou toxicitu ani v řádu mnoha desítek hodin.



Obrázek 60. Netoxičnost vzorků připravených v pokusech 5.5.7. a 5.5.8. (aplikována byla vždy reakční směs po dosažení plné konverze dle NMR). Pro ilustraci je vyneseno i efekt látky 27 do stejného grafu.

Zde popsán způsob kompletní degradace a deaktivace organofosfátových a organofosfonátových pesticidů, insekticidů, herbicidů, nervově paralytických látek a polutantů pomocí mikrovlnně zahřívání hydrolyzy může být označen jako „zelený“ nebo „ekologicky šetrný“, neboť se reakce provádí ve vodě jako rozpouštědlo a to i ve vysokých koncentracích výchozí látky (desítky hmotnostních procent ve vodném roztoku). Tím je velice nízká i spotřeba vody. Průběh vlastní reakce je navíc možné sledovat opět okamžitě na základě změny reakčního tlaku (viz 3.2.). Po dokončení reakce se žádný alkylhalogenid dále neuvolňuje (tzn., že nedochází k dalšímu nárůstu tlaku v reakční aparatuře) a reakci je tak možné zastavit okamžitě po dosažení maximální konverze. Tímto se dosáhne i maximální energetické efektivity a ekonomické výhodnosti celého postupu, kdy reakce není zbytečně zahřívána déle, než je potřeba. Získané vodné roztoky kyseliny fosforečné jsou dle provedených testů biologické aktivity netoxické a mohou být tedy bez další úpravy vráceny zpět do ekosystému. Celý postup je efektivnější, rychlejší, levnější a šetrnější k životnímu prostředí než postupy dosud popsané v literatuře. Možnost provedení popisovaného postupu i v průtokovém mikrovlnném reaktoru dovoluje velkotonážní aplikace s minimálními nároky na optimalizaci reakčních podmínek pro větší navážky, eliminuje některá bezpečnostní rizika, dramaticky snižuje prostorové nároky a redukuje nutnost použití velkotonážních průmyslových reaktorů.

3.4. Příprava diamidů fosfonových kyselin s využitím příslušných bis(trimethylsilyl)esterů a biologické aktivity připravených látek

V přehledu současného stavu literatury (1.1.) byly několikrát zmíněny vysoce nadějně diamidy FAN (obr. 20 a 41). Pro přípravu a výrobu těchto proléčiv fosfonových kyselin byly vypracovány dva syntetické postupy. Oba ovšem vycházejí přímo z příslušných fosfonových kyselin. Prvním postupem je aktivace (volné) fosfonové kyseliny pomocí směsi 2,2'-dithiodipyridinu (AldrithiolTM) a trifenyfosfinu, která je následována reakcí s příslušným aminem (esterem aminokyseliny)^[125]. Tímto postupem se po chromatografické separaci získá požadovaný diamid FAN ve výtěžcích 10-44%. Druhým přístupem je převedení fosfonových kyselin na odpovídající dichloridy, které následně reagují s příslušnými aminy (estery aminokyselin)^[131]. Tento postup poskytuje požadované diamidy FAN ve výtěžcích 20-55%.

Znamé postupy ovšem mají řadu zásadních nedostatků. Např. výchozí fosfonové kyseliny (jejichž příprava, izolace a čištění samy o sobě skýtají mnoho technologických komplikací) jsou v organických rozpouštědlech často velice omezeně rozpustné, což zvyšuje nároky na množství rozpouštědla, reakční čas a teplotu. Volné fosfonové kyseliny často krystalují ve formě hydrátů (s jednou či více molekulami vody), což dramaticky zvyšuje nároky na množství použitého dehydratačního činidla a tím se celá výroba znatelně prodražuje.

Dalším cílem této disertační práce taky bylo vypracovat novou originální (patentovatelnou) metodiku přípravy diamidů FAN. Ústřední myšlenkou nového přístupu je použití bis(trialkylsilyl)esterů fosfonových kyselin, které se získávají velice jednoduše pomocí postupů popsanych v literatuře (či jejich vhodné kombinace) ze synteticky snadno dostupných dialkylesterů fosfonových kyselin (viz též např. 3.1.). Tyto bis(trialkylsilyl)estery FAN jsou dobře známy, ovšem jejich použití se zatím překvapivě omezuje pouze na přípravu samotných fosfonových kyselin pomocí rozkladu vodou či některým alkoholem (viz též např. úvod k 3.2.). Navržený postup má několik klíčových výhod:

- 1) Silylované fosfonové kyseliny (ať už vlastní diestery či dokonce ještě výhodněji látky nesoucí další trialkylsilylové funkce na dalších reaktivních skupinách v molekule, jako jsou např. NH₂ či OH), jsou velice dobře rozpustné v organických rozpouštědlech, což umožňuje další jednoduchou derivatizaci i při použití malých množství rozpouštědel za mírných reakčních podmínek.
- 2) Zavedení trialkylsilylových skupin i na další reaktivní skupiny (např. na NH₂ či OH) v molekule se dramaticky redukuje vznik vedlejších produktů, vytvářených konkurenčními reakcemi na těchto skupinách.
- 3) Přidáním vhodné organické báze se přednostně aktivují (disociují) trialkylsilylové skupiny na fosfonové funkci, což dovoluje selektivní transformaci fosfonové funkce za současného zachování dobré rozpustnosti v organických rozpouštědlech (i při částečném vyloučení vzniklé soli vzniká velice jemná a stále dobře reaktivní suspenze).
- 4) Nepřítomnost vody při použití bis(trialkylsilyl)esterů fosfonových kyselin (ať už krystalické či vznikající při neutralizaci fosfonové kyseliny nebo vody přítomné v reakční směsi či na stěnách reakční nádoby - tato vlhkost je odstraněna mírným přebytkem činidla

pro zavádění trialkylsilylové funkce) dramaticky a zásadně snižuje nároky na množství reaktantů či dehydratačních činidel a celý proces se tak ekonomicky zefektivňuje.

Byla tedy zkoumána příprava diamidů FAN vycházející přímo z příslušných dialkylesterů. Zvolené dialkylestery byly převedeny reakcí s trimethylsilylbromidem na odpovídající bis(trimethylsilyl)estery, které byly dále (pouze po odpaření přebytku trimethylsilylbromidu) podrobeny následné reakci s 2,2'-dithiodipyrindinem (AldrithiolTM) a trifenyfosfinem. K získané směsi byl dále přidán zvolený ester aminokyseliny a při 50 °C došlo během 2-3 hodin k plné konverzi na požadovaný diamid FAN. Celá reakce tak probíhá (sekvenčně) v jedné reakční nádobě a může tak být označena jako multi-složková syntéza v jedné nádobě (multi-component one-pot synthesis). Úvahy o detailním mechanismu reakce vycházejí ze znalosti známých reakcí diesterů FAN s trimethylsilylbromidem^[151] (schéma 18) a ze známého mechanismu reakce 2,2'-dithiodipyrindinu (AldrithiolTM) s trifenyfosfinem^[179] (schéma 19).

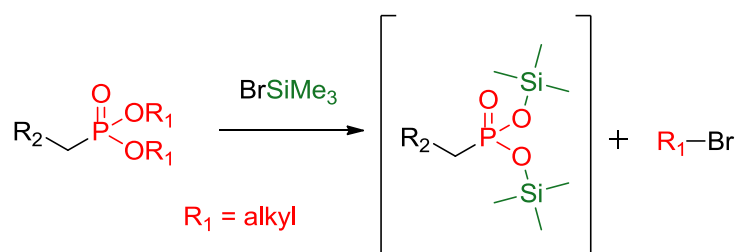


Schéma 18. Tvorba bis(trimethylsilyl)esterů FAN reakcí příslušných dialkylesterů s trimethylsilylbromidem.

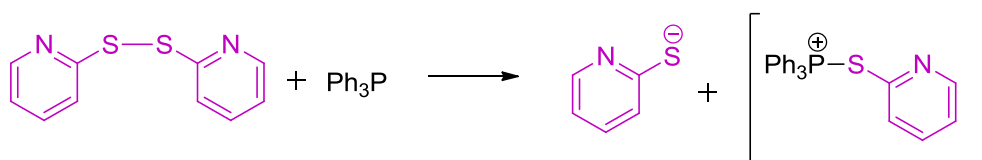


Schéma 19. Reakce 2,2'-dithiodipyrindinu (AldrithiolTM) s trifenyfosfinem.

Předpokládaný mechanismus reakce (schéma 20) pak vychází ještě ze znalosti tvorby bis(pyridin-2-yl)thioesterů při reakci směsi 2,2'-dithiodipyrindinu a trifenyfosfinu se samotnými fosfonovými či fosforečnými kyselinami^[180].

Tento postup (viz 5.6.) byl s výbornými výsledky aplikován na několik vybraných dialkylesterů FAN (tabulka 7). Byla též vyvinuta efektivní metoda izolace spočívající v extrakci surové reakční směsi čtyř-složkovou směsí rozpouštědel (hexan, toluen, methanol, voda - viz 5.6.). Po následné filtraci získaných extraktů přes malou vrstvu silikagelu byly získány požadované diamidy FAN ve výborných výtěžcích. Tabulka 7 přehledně znázorňuje připravené diamidy FAN společně se získanými izolovanými výtěžky.

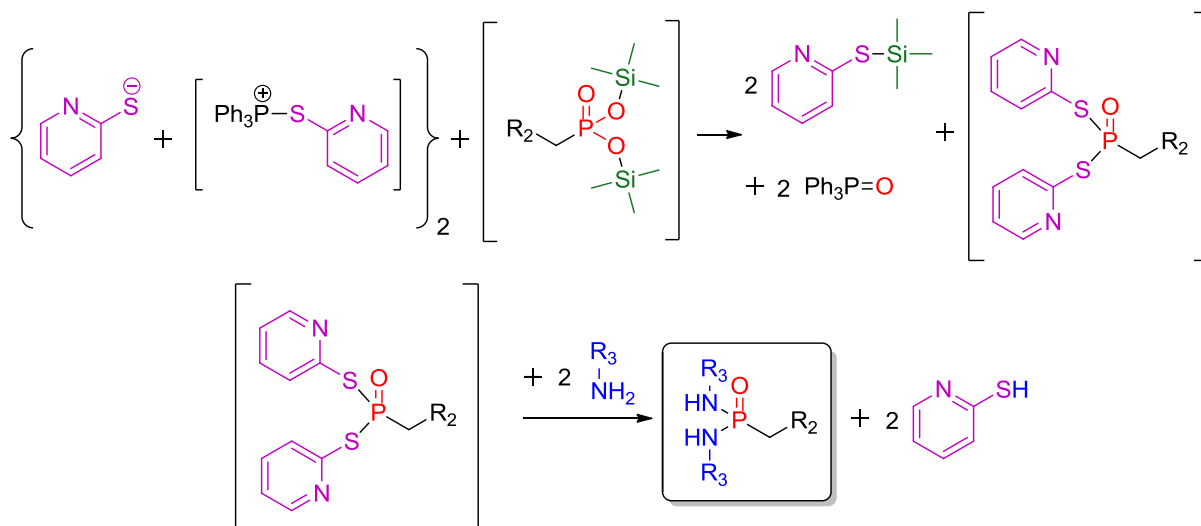
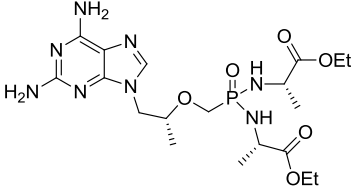
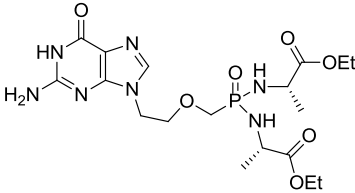
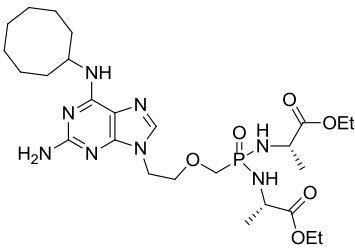
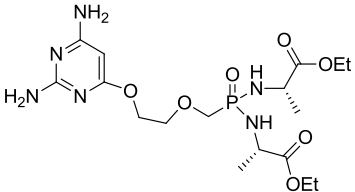
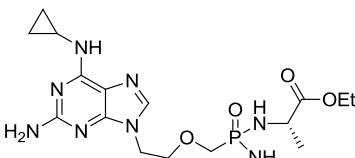



Schéma 20. Tvorba diamidů FAN z příslušných bis(trimethylsilyl)esterů FAN za pomoci 2,2'-dithiodipyridinu a trifenylofosfinu.

Bylo též testováno ovlivnění průběhu a výtěžku reakce při zvýšení navážky. Pro tento pokus byla vybrána látka **32**, která byla již dříve zmiňována (obr. 20, GS-9219) v souvislosti s jejím vysokým potenciálem při léčbě leukemických onemocnění. Při provedení pokusu **5.6.5.** s 10x většími navážkami (**5.6.6.**) bylo dokonce dosaženo zvýšení výtěžku reakce téměř až na hodnoty teoretického výtěžku (tabulka 7).

S ohledem na vysoký biologický potenciál připravených látek byla testována též jejich biologická aktivita. Prvním krokem bylo otestování cytotoxických vlastností připravených sloučenin. Dle očekávání bylo zjištěno, že obě proléčiva PMEG (látky **29** a **32**) vykazují v antiproliferační aktivitu proti leukemickým buněčným liniím. Látka **32** je již dříve uváděnou (známou látkou GS-9219, která je dále zkoumána pro své anti-leukemické aktivity). Látka **32** je dvojnásobným proléčivem vlastního cytotoxického PMEG (viz **1.1.1.1.**). Je až s podivem, že (i přes intenzivní výzkum v této oblasti) samotný diamid PMEG (látka **29**) zatím připraven nebyl. Jak je z tabulky 8 zřejmé, látka **32** vykazuje významně vyšší antiproliferační aktivitu na všech měřených nádorových liniích v porovnání s látkou **29**. Toto pozorování pomáhá vysvětlit velmi vysoký terapeutický potenciál látky **32**. Pro vlastní transport (selektivitu i jeho rychlost) proléčiva do cílové buňky je rozhodující diamidová část proléčiv^[93], která je ovšem v obou látkách absolutně totožná. Lze tedy předpokládat, že i rychlost transportu obou látek do intracelulárního prostředí bude podobná. Zásadní rozdíl ale nastává v dalším kroku metabolické aktivace. Zatímco látka **29** okamžitě vytváří vysokou intracelulární koncentraci PMEG (jenž je dále fosforylován a působí jako vlastní cytotoxický činitel), látka **32** uvolňuje PMEG pomaleji vlivem druhého proléčiva (aktivovaného *N*⁶-methyl-AMP aminohydrolázou - viz **1.1.1.1.**).

Tabulka 7. Struktury a výtěžky připravených diamidů FAN.

pokus č.	produkt	číslo látky	výtěžek ^a
5.6.1.		28	87% ^b
5.6.2.		29	83% ^b
5.6.3.		30	94% ^b
5.6.4.		31	90% ^b
5.6.5.		32	92% ^b
5.6.6.			98% ^c

^aizolovaný výtěžek (látky jsou hygroskopické a tak byly sušeny jeden týden při teplotě 30 °C a tlaku 0,1 mbar); ^bpři navážce z 1 mmol výchozí látky, ^cpři navážce z 10 mmol výchozí látky

Zdánlivý paradox, že vyšší intracelulární hladina PMEG vede k nižší antiproliferační aktivitě, má ovšem logické vysvětlení. Jak už bylo uvedeno v **1.1.1.1.**, PMEG má při vyšších intracelulárních koncentracích schopnost indukovat apoptózu. Mechanismus tohoto působení není znám, ale je logické, že se tedy PMEG při vysokých intracelulárních koncentracích „spotřebovává“ ještě na jiné interakce než je požadovaná inkorporace do DNA (která je

zodpovědná za antiproliferační aktivitu). Druhým a ještě více pravděpodobným vysvětlením pozorovaného paradoxu je známá věc, že FAN mají schopnost procházet buněčnou stěnou i jako samotné fosfonové kyseliny (ne tedy jen jako prolečiva; aktivita nově připravených FAN se u nich testuje nejčastěji ve formě jejich volné fosfonové kyseliny a až poté se případně připravují prolečiva). Pokud se aplikací látky **29** dosahuje vysokých intracelulárních koncentrací PMEG, je tím ale také urychlen eflux (vylučování) PMEG z vlastní buňky. Vznikající PMEG se tak nestačí fosforylovat a inkorporovat do DNA. Vůči látce **32** tak látka **29** poskytuje nižší množství difosforylovaného PMEG, což vede k nižší antiproliferační aktivitě. Získané výsledky zdůrazňují význam *N*⁶-methyl-AMP aminohydrolázy pro vývoj a výzkum nadějných lékových kandidátů odvozených od PMEG.

Tabulka 8. Antiproliferační aktivity dvou vybraných látek.

látka	antiproliferační aktivita* – EC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)			
	<i>HepG2</i>	<i>HL60</i>	<i>HeLa S3</i>	<i>CCRF-CEM</i>
29	2,32 ± 0,17	3,02 ± 0,08	3,94 ± 0,37	1,22 ± 0,15
32	1,74 ± 0,16	0,78 ± 0,01	2,15 ± 0,16	0,48 ± 0,03

*detailní popis testování je uveden v publikaci 20. viz sekce 6.

Látky **28** a **31** představují prolečiva dvou známých FAN s vysokou protivirovou aktivitou vůči HIV. Byla proto měřena i aktivita těchto dvou látek proti viru HIV. Jak demonstruje tabulka 9, bylo zjištěno, že látka **28** vykazuje významné (přibližně třináásobné) zvýšení aktivity proti viru HIV (látka **28** tak dosahuje zajímavých submikromolárních aktivit vůči HIV). Přípravou prolečiva již dříve zmiňované látky PMEO-DAPy (obr. 22), bylo naopak dosaženo snížení protivirové aktivity vůči HIV. Tento zvláštní paradox (že pomocí obecně používaných typů prolečiv se u těchto látek dosahuje nižších aktivit vůči HIV) má obecnější platnost a je dále diskutován v sekci 3.5.

Tabulka 9. Aktivita dvou vybraných látek vůči HIV*.

látka	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)		EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
28	0,29	>100	odpovídající	0,94	>100
31	1,13	73,30	kyselina	0,93	97,70

*detailní popis testování je uveden v publikaci 20. viz sekce 6.

Samotná fosfonová kyselina odpovídající látce **30** byla již dříve zkoumána pro své vysoké imunostimulační aktivity (měřené pomocí sledování tvorby oxidu dusnatého a řady chemokinů a cytokinů v myších makrofázích). Imunostimulační aktivity *N*⁶-substituovaných derivátů PMEDAP a *N*⁶-substituovaných derivátů (*S*)-PMPA jsou též diskutovány v sekci 1.1.1.1. (obr. 28). Látka **30** proto byla studována ve stejném testovacím modelu imunomodulačních vlastností. Bylo překvapivě zjištěno, že látka **30** nevykazuje absolutně žádné imunostimulační vlastnosti. Možná vysvětlení pro toto pozorování jsou v zásadě dvě. Prvním je možnost, že prolečivo **30** není v myších makrofázích aktivováno na samotnou

fosfonovou kyselinu (jenž vykazuje imunostimulační vlastnosti). Druhé vysvětlení je ve světle dalších zjištění ještě pravděpodobnější. Dřívější způsoby izolací FAN využívaly čištění finálních produktů pomocí série chromatografií na iontoměničích (ne tak už náš postup viz sekce 3.2.). Během těchto operací se pracuje s velkými objemy vody (která se používá jako mobilní fáze). Pokud se ale nepoužije ve všech čistících krocích absolutně čistá (apyrogenní voda), může dojít ke kontaminaci FAN bakteriálním lipopolysacharidem (či jinými složkami buněčných stěn mikroorganismů, což bylo i experimentálně potvrzeno^[33]). Zde je potřeba uvést, že používané metody testování imunomodulačních vlastností jsou extrémně citlivé na přítomnost bakteriálního lipopolysacharidu a podobných sloučenin (už při kontaminaci okolo tisícín molárních procent). Samotný lipopolysacharid je možné jednoduše detegovat, ale další látky (které mohou též výrazně ovlivnit výsledky provedených testů) už se stanovují velmi obtížně. Je tedy možné, že řada FAN u kterých byla dříve zjištěna imunostimulační aktivita, je pouze kontaminována nějakou komponentou bakteriálních stěn. Pro potvrzení této teorie byla volná fosfonová kyselina odpovídající látce **30** připravena dle literatury znova^[181], ale za striktního využívání apyrogenní vody a vyžihaného laboratorního nádobí. Takto připravený vzorek (v přímém kontrastu s dříve připravenou identickou sloučeninou) už žádné imunostimulační aktivity nevykazuje. S ohledem na toto zjištění jsme ve spolupráci s Dr. Zídkem z Ústavu experimentální medicíny AV ČR vypracovali metodiku jednoduchého přečištění všech nízkomolekulárních sloučenin pro imunochemické testy pomocí filtrací přes filtry odstraňující látky dle molekulové hmotnosti (složky bakteriálních stěn, které mají možnost ovlivňovat výsledky testů mají molekulovou hmotu v řádech desítek tisíců). Použitím filtru pro odstranění všech látek s molekulovou hmotou nad tři tisíce je tak možné věrohodně zkoumat nízkomolekulární sloučeniny v testech imunomodulačních vlastností (publikace se připravuje).

Druhou možností jak obejít potenciální kontaminace připravených FAN, je přímá příprava proléčiv (zvláště výhodně dle postupu uvedeného v této sekci). Příprava samotných FAN či diamidů dle této sekce vychází v obou případech z esterů FAN a pokusem bylo ověřeno, že příprava proléčiva dle postupu 5.6. je časově méně náročná než příprava samotné fosfonové kyseliny. Finální čistící operací při přípravách diamidů dle postupu 5.6. je filtrace přes malou vrstvu silikagelu za použití organického rozpouštědla, což vylučuje kontaminaci připravených proléčiv nečistotami případně přítomnými ve vodě.

3.5. Efektivní přípravy FAN s „otevřeným kruhem“ (PMEO-DAPy)

Ústřední částí předkládané disertační práce je tato kapitola o nových efektivních přípravách FAN s „otevřeným kruhem“ (PMEO-DAPy). Vysoký protivirový potenciál těchto látek byl diskutován v sekci 1.1.1.1. (obr. 22 a 23). Jedním velkým omezením při výzkumu nových PMEODAPy byla jejich náročná syntéza. V literatuře popsany postup^[99, 102] využívá zdánlivě jednoduchou alkylaci 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidinu pomocí činidla pro zavedení celého PME řetězce. Jak je ze schématu 21 vidět, tato reakce poskytuje směs dvou velmi podobných konstitučních isomerů (společně s velmi bohatou směsí di- a trialkylovaných vedlejších produktů), jejichž separace následně vyžaduje opakované chromatografie. Izolované výtěžky požadovaného produktu se navíc pohybují na úrovni 10% teoretického množství.

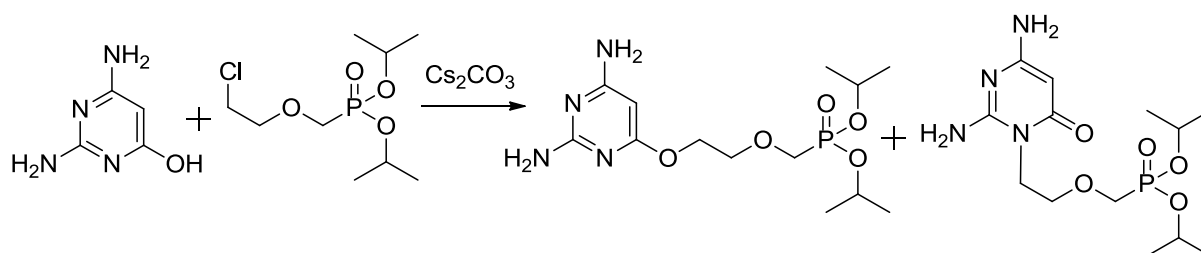


Schéma 21. Příprava PMEODAPy alkylací 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidinu dle literatury^[99, 102] – vznik *O*- a *N*-isomerů.

Primární úkolem bylo vyvinout nový syntetický přístup pro přípravu PMEODAPy, který by nevyžadoval chromatografické separace a umožňoval přípravu těchto sloučenin v množství desítek až stovek gramů (pro laboratorní výzkum i preklinický vývoj).

Zadaného cíle bylo dosaženo pomocí změny retrosyntetické diskonekce jak ukazuje schéma 22. Touto záměnou z alkylační reakce na substituci nukleofilní aromatickou je možné teoreticky dosáhnout jednoznačného průběhu reakce, kde vzniká pouze požadovaný *O*-substituovaný produkt. Reakce 2,4-diamino-6-chlorpyrimidinu s příslušným substituovaným alkoholem (PME-OH, jenž je znázorněn ve schématu 22) byla intenzivně zkoumána a bylo zjištěno, že 2,4-diamino-6-chlorpyrimidin je příliš málo reaktivní substrát ve smyslu nukleofilní aromatické substituce. Jeho reakce s alkoxidy vyžaduje vysoké teploty a silně bazické prostředí. Za těchto podmínek už ale není PME-OH stálý a podléhá vedlejším reakcím.

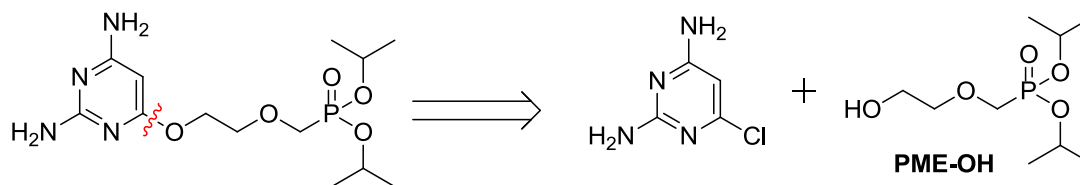


Schéma 22. Alternativní teoretická diskonekce PMEODAPy, kde pomocí nukleofilní aromatické substituce vzniká pouze požadovaný *O*-isomer.

3.5.1. Obecné postupy pro přípravu PMEODAPy

Původní myšlenka příprav PMEODAPy tak musela být poněkud obměněna na dvoustupňovou reakci, kde v prvním kroku reaguje 2,4-diamino-6-chlorpyrimidin s ethylenglykolem v přítomnosti silné báze za vzniku 2,4-diamino-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidinu. Vzniklý 2-hydroxyethoxy derivát následně reaguje v druhém kroku s alkylačním činidlem odvozeným od methylfosfonové kyseliny (schéma 23).

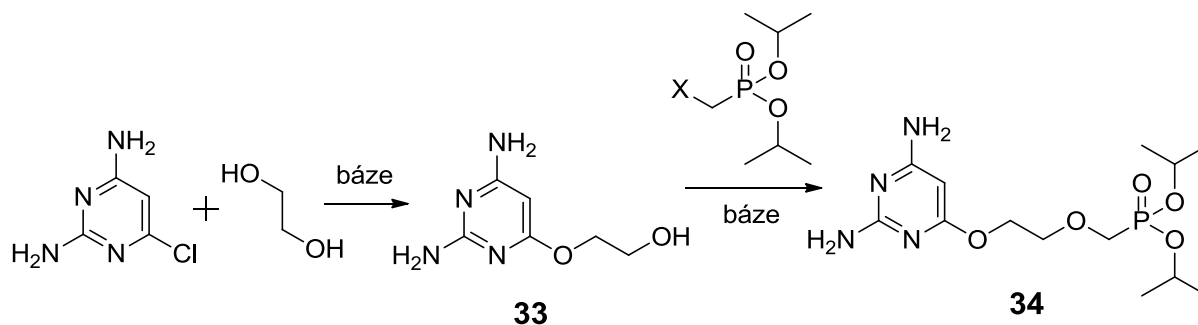


Schéma 23. Nová alternativní syntéza PMEODAPy vedoucí přes 2,4-diamino-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidin (**33**) k požadované látce **34** (X je dobrá odstupující skupina tosyloxy či brom).

Samotná reakce 2,4-diamino-6-chlorpyrimidinu s ethylenglykolem se provádí přímo v ethylenglykolu jako rozpouštědlo (viz 5.7.1.). Pro generování příslušného alkoholátu bylo využito velmi výhodně *tert*-butanolátů alkalických kovů (*tert*-butylkohl je nenukleofilní a při teplotách nad 120 °C, při kterých se reakce provádí, sám vydestiluje z reakční směsi). Experimentálně bylo zjištěno, že výtěžek reakce je prakticky identický při použití *tert*-butanolátu sodného či draselného. Významný rozdíl byl ale pozorován v rychlosti samotné reakce, kde za použití *tert*-butanolátu draselného dochází k plné konverzi za polovinu času, než je potřeba při použití *tert*-butanolátu sodného. Při použití více než dvou ekvivalentů *tert*-butanolátu draselného dospěje reakce při teplotách okolo 120 °C (potřebná reakční teplota závisí na substituci pyrimidinového kruhu, viz dále) vždy do plné konverze. Procedura 5.7.1. v experimentální části popisuje detailně provedení této reakce, jež byla následně úspěšně aplikována i pro přípravu řady další derivátů PMEODAPy (viz dále). Izolovaný výtěžek je následně ovlivněn hlavně zvolenou metodou izolace. V laboratorních podmínkách je výhodné provést odstranění ethylenglykolu pomocí uchycení získaného (bazického) pyrimidinu na kyselý iontoměnič. Destilovanou vodou se nejdříve vyplaví všechen ethylenglykol a samotný požadovaný produkt se uvolní neutralizací kyselého iontoměniče vodným amoniakem. Získaný roztok připravené látky ve vodném amoniaku se odpaří a odparek se rekrystaluje z vody (tímto postupem se dosahuje maximálního, téměř kvantitativního, izolovaného výtěžku). Pro velkotonážní aplikace byly vypracovány dvě metody srážení požadovaného produktu přímo z reakční směsi (viz 5.7.1.), které už nevyžadují použití iontoměničů, ale zase neposkytují tak vysoké izolované výtěžky (při dalších přípravách substituovaných 2-hydroxyethoxy-pyrimidinů tak bylo vždy využito izolace na iontoměniči).

Dalším stupněm nové alternativní přípravy PMEODAPy je následně zavedení zbytku methylfosfonové kyseliny na volnou hydroxy skupinu připraveného 2,4-diamino-6-(2-

hydroxyethyloxy)pyrimidinu (**33**) (schéma 23). Podobné reakce jsou v literatuře známy, ale popisované výtěžky se pohybují jen okolo 20-40% teoretického množství^[85, 152, 154, 155]. V tomto kroku navíc opět dochází k vedlejším alkylačním reakcím na přítomných atomech dusíku (exocyklických či endocyklických). Dle teoretického předpokladu, ale všechny *N*-alkylované vedlejší produkty obsahují volnou hydroxy skupinu (celé 2-hydroxyethyloxy uskupení). Jejich chemické vlastnosti (polarita a rozpustnost) se tak mohou zásadně lišit od požadovaného produktu. Tento předpoklad byl potvrzen hned během prvních orientačních experimentů, kde se retenční faktor těchto *N*-alkylovaných vedlejších produktů liší od požadované látky až o hodnotu 0,6. Dalšími pokusy bylo dokonce zjištěno, že vlivem přítomné hydroxyskupiny je možno všechny tyto *N*-alkylované vedlejší produkty oddělit od látky **34** pouhou extrakcí reakční směsi mezi vodu a organické rozpouštědlo (*N*-alkylované vedlejší produkty zůstávají kvantitativně ve vodné vrstvě a látka **34** během čtyř extrakcí kvantitativně přejde do organické fáze). Toto klíčové zjištění tak umožňuje oddělit *N*-alkylované vedlejší produkty od látky **34** pouhou extrakcí reakční směsi, což umožňuje využití tohoto syntetického přístupu pro přípravu požadovaných látek i v průmyslovém měřítku. Pokusy o přesnou identifikaci *N*-alkylovaných vedlejších produktů nebyly úspěšné, bylo totiž zjištěno, že se jedná o velmi bohatou směs (minimálně šesti látek), která obsahuje 4 isomerní látky s molekulovou hmotou odpovídající látce **34**.

Dále bylo přistoupeno k vlastní optimalizaci studované *O*-alkylace 2,4-diamino-6-(2-hydroxyethyloxy)pyrimidinu (**33**) za vzniku látky **34** (viz schéma 23). Jak bude zřejmé z dalšího textu, jedná se možná o nejdůležitější reakci celé disertace. Vlivem toho byly při optimalizaci sledovány efekty řady možných faktorů, které mohou ovlivnit výtěžek (jako efekt rozpouštědla, teploty, báze, použitého alkylačního činidla, poměru reaktantů, koncentrace reakční směsi a časového dávkování). Celkově bylo provedeno 86 optimalizačních experimentů vycházejících vždy z 1 mmol látky **33**. Z prostorového důvodu zde nejsou uvedeny výsledky všech provedených pokusů (získaný optimalizovaný postup je popsán v experimentální části 5.7.2.). Při optimalizaci bylo využito dvanácti-pozicového reaktoru umožňujícího paralelní syntézu (zařízení Carousel 12 od firmy Radleys Discovery Technologies). Průběh reakce byl primárně monitorován pouze na TLC (v soustavě chloroform/methanol, 85/15). Produkty z experimentů, při kterých došlo k významné konverzi, byly následně izolovány sloupcovou chromatografií (v soustavě chloroform/methanol, 85/15). Bylo zjištěno, že reakce je velmi citlivá na přítomnost vody (ať už přítomné v hydrátu či z rozpouštědla). Dále bylo zjištěno, že nevhodnějšími rozpouštědly jsou DMF a DMSO. Nejlepších výtěžků bylo dosaženo při použití hydridu sodného jako báze. Vhodným alkylačním činidlem jsou diisopropyl-brommethylfosfonát (**4**) a diisopropyl-tosyloxymethylfosfonát (použití diisopropyl-jodmethylfosfonátu (**5**) vedlo k bohatší směsi produktů). Vliv molárních poměrů byl zkoumán po 0,05 ekvivalentech (pro alkylační činidlo od 1,0 do 1,3 ekvivalentů a pro hydrid sodný od 1,1 do 1,5 ekvivalentů). Bylo zjištěno, že optimální poměry reaktantů jsou 1,35 ekvivalentů hydridu sodného a 1,05 ekvivalentů alkylačního činidla. Dále bylo zjištěno, že reakce probíhá uspokojivě při laboratorní teplotě. Nejlepších výtěžků bylo dosaženo v experimentech, kde je nejdříve vytvořena sodná sůl látky **33** (přidáním hydridu sodného do DMF roztoku látky **33** za laboratorní teploty a míchání 15 minut) a až poté je přidáno alkylační činidlo. Bylo zjištěno, že koncentrace nemá zásadní vliv

na výtěžek reakce (až do množství při kterém se přestává vytvořená sodná sůl látky **33** efektivně míchat). Při větších navážkách se následně projevilo pouze to, že studovaná reakce je exotermní (což vedlo k samovolnému ohřátí reakční směsi až na 55 °C). Nárůst teploty vlivem exotermní reakce snižuje rozpustnost částečně rozpuštěného molekulárního vodíku (který vzniká z hydridu sodného při tvorbě soli látky **33**) a může (při větších navážkách) vést k poměrně masivnímu vývoji plynu. Reakční směs proto byla chlazená vodní lázní na laboratorní teplotu. Bylo též zjištěno, že přídavek 4-(dimethylamino)pyridinu (DMAP) má pozitivní efekt na rychlost reakce (výtěžek však neovlivňuje). Během optimalizace bylo též zjištěno, že se vytvářejí další vedlejší produkty. K jejich zvýšené tvorbě docházelo u reakcí s více jak 1,1 ekvivalenty alkylačního činidla. Tyto nečistoty se nepodařilo jednoznačně identifikovat, ale dle hmotnostního spektra (a i dle NMR) by se mohlo jednat o produkty dvojnásobné alkylace. Toto koresponduje s pozorováním, že ke zvýšené tvorbě těchto nečistot dochází hlavně u pokusů obsahujících více než 1,1 ekvivalentů alkylačního činidla. Tyto nečistoty jsou ale vlivem přítomnosti minimálně čtyř isopropylových skupin velmi dobře rozpustné v diethyletheru (látka **34** v diethyletheru prakticky rozpustná není). Dialkylované (polyalkylované) nečistoty je tak možné odstranit rovněž bez použití chromatografie. K odparku po extrakci (viz výše) se přidá hexan a celá směs se vystaví působení ultrazvuku po dobu 10 minut. Během toho dojde k prokrystalování získaného odparku (kde do hexanu přejde minerální olej, který pochází z použité suspenze hydridu sodného v minerálním oleji). Hexan se následně dekantuje a tato operace s hexanem se ještě jednou zopakuje. K získaným krystalům (vedlejší dialkylované produkty nejsou krystalické) se následně přidá diethylether a celá směs se opět vystaví působení ultrazvuku po dobu 10 minut (během kterých dojde ke kvantitativnímu převedení dialkylovaných a polyalkylovaných vedlejších produktů do etheru). Obdržené krystaly pak stačí odsát na fritě a promýt dvakrát etherem pro získání požadovaného produktu v čistotě vyšší jak 95% (bez použití jakékoliv chromatografie). V experimentální části (viz **5.7.2.**) je detailně popsán nalezený optimální postup pro přípravu látky **34**. Tento postup byl následně vícekrát úspěšně použit pro přípravu řady derivátů látky **34**.

Pro přípravy vlastních PMEO-DAPy je ještě potřeba provést hydrolyzu přítomných isopropylesterů. Jako první byl testován postup dle sekce **3.2.** využívající mikrovlnně zahřívání hydrolyzy diesterů fosfonových kyselin ve vodné kyselině chlorovodíkové. Překvapivě bylo zjištěno, že tohoto postupu není možné pro přípravu PMEO-DAPy využít. Za podmínek popsanych v sekci **3.2.** totiž dochází velmi rychle k hydrolyze v acyklické části molekuly za odštěpení 2,4-diamino-4-hydroxypyrimidinu (viz schéma 24), jehož vznik byl potvrzen směsných ¹³C NMR spektrem s komerčním 2,4-diamino-4-hydroxypyrimidinem.

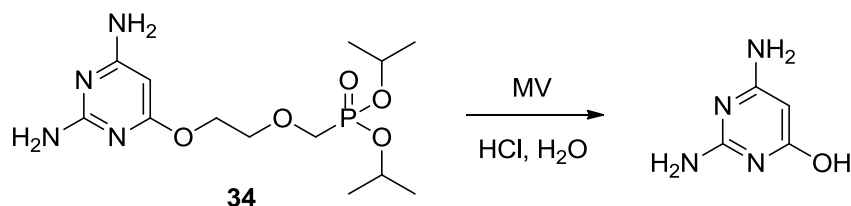


Schéma 24. Degradace acyklické části molekuly při MV hydrolyze látky **34** za vzniku 2,4-diamino-4-hydroxypyrimidinu.

Pro hydrolyzu všech připravených diesterů derivátů PMEODAPy na příslušné fosfonové kyseliny tak byla vybrána klasická metoda využívající dobře známou reakci diesterů FAN s trimethylsilylbromidem^[18, 84, 151-155], která byla modifikována s ohledem na již dříve uváděné nedostatky (jako je zdlouhavá a náročná izolace pomocí iontoměničů a možná kontaminace připravených FAN zbytky z použitého trimethylsilylbromidu). Získané bis(trialkylsilyl)estery (viz schéma 25 a postup 5.7.3.) se po důkladném odstranění nezreagovaného trimethylsilylbromidu (kdestilací získaného odparku s toluenem) rozpustí v ethanolu, ke kterému se přidá objemový díl vody.

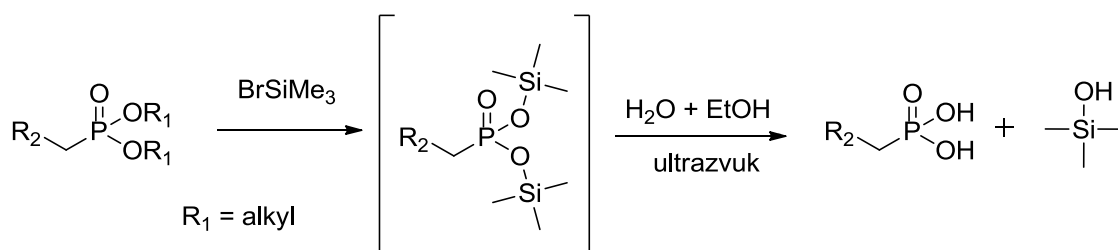


Schéma 25. Rozklad bis(trialkylsilyl)esterů pomocí vody a ethanolu za vzniku trimethylhydroxysilanu.

Získaná směs se vystaví působení ultrazvuku po dobu 10 minut, během kterých dojde ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného FAN za současné tvorby trimethylhydroxysilanu, který se následně odstraní důkladným odpařením získané směsi, kdy trimethylhydroxysilan kdestiluje s přítomnou vodou a ethanolem. Získaný odparek se suspenduje v 50% vodném ethanolu a získaná směs je opět vystavena působení ultrazvuku, kdy všechen případně přítomný trimethylhydroxysilan přejde do roztoku. Získaná fosfonová kyselina se odsaje na fritě, promyje ethanolem a acetonem a suší ve vakuové sušárně (připravené látky je možné dle potřeby rekrystalovat z vody či rozpustit ve vodě a srazit ethanolem). Samotná PMEODAPy (**35**) byla tímto postupem připravena prakticky v kvantitativním výtěžku v čistotě vyšší jak 95%. Tento postup byl též úspěšně aplikován na většinu připravených diesterů modifikovaných PMEODAPy.

3.5.2. Přípravy 5-substituovaných PMEODAPy postupnou výstavbou

3.5.2.1. Přípravy substituovaných chlorpyrimidinů pro postupnou výstavbu

Dalším zadaným dílčím úkolem bylo připravit větší množství již dříve zmiňovaného 5-methyl derivátu PMEODAPy, který je nejúčinnějším známým FAN proti HIV (obr. 24). Potřebný 2,4-diamino-6-chlor-5-methylpyrimidin byl připraven z komerčního 2,4,6-trichlor-5-methylpyrimidinu reakcí s methanolickým amoniakem v autoklávu při zahřívání na 100 °C (schéma 26 a sekce 5.7.4.). Tato reakce poskytla směs tří látek, kde byla požadovaná látka **38** zastoupena jako majoritní produkt. Po rozdělení získané směsi sloupcovou chromatografií byly izolovány látky **36** (12%), **37** (20%) a **38** (63% teorie). Při opakované přípravě látky **38** z 2,4,6-trichlor-5-methylpyrimidinu bylo následně použito ethanolickeho amoniaku a byl též

prodloužen reakční čas. Za těchto podmínek byla získána pouze látka **38** v izolovaném výtěžku 89% teorie (která byla použita v dalším kroku syntézy viz **3.5.2.2.**).

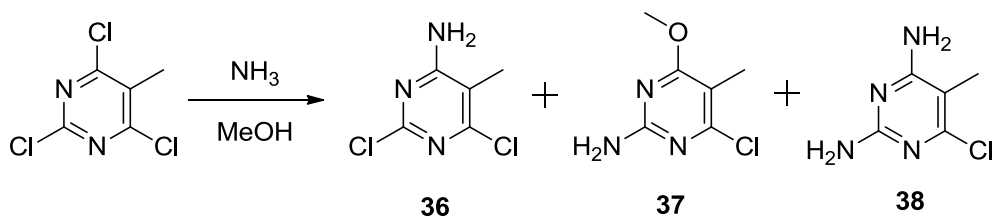


Schéma 26. Příprava 2,4-diamino-6-chlor-5-methylpyrimidinu (**38**) reakcí 2,4,6-trichlor-5-methylpyrimidinu s amoniakem (v methanolu) za současného vzniku 4-amino-2,6-dichlor-5-methylpyrimidinu (**36**) a 2-amino-4-chlor-6-methoxy-5-methylpyrimidinu (**37**).

Další vyžádanou látkou byl 5-fluor derivát PMEODAPy. Z tohoto důvodu byl připraven 2-amino-5-fluor-4,6-dichlorpyrimidin (**39**) kondenzační reakcí diethyl-fluormalonátu s guanidinem poskytující 2-amino-5-fluor-4,6-dihydroxypyrimidin, jenž byl bez dalších izolací převeden rovnou na 2-amino-5-fluor-4,6-dichlorpyrimidin (**39**) reakcí s POCl_3 v přítomnosti 2-methylpyridinu (schéma 27 a sekce **5.7.5.**). Celkově byl získán požadovaný produkt **39** v uspokojivém výtěžku 78% teorie (po obou reakčních krocích).

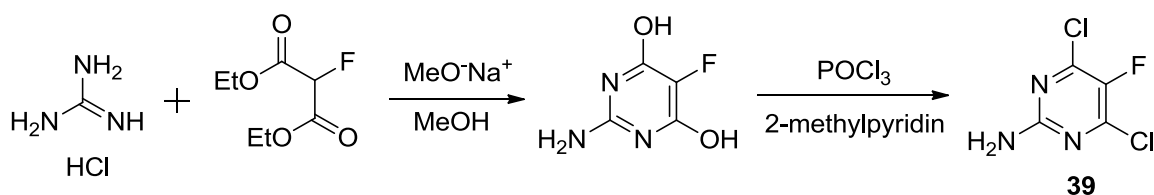


Schéma 27. Příprava 2-amino-5-fluor-4,6-dichlorpyrimidinu (**39**) reakcí vycházející z diethyl-fluormalonátu.

Získaná látka **39** byla následně převedena na 2,4-diamino-5-fluor-6-chlorpyrimidin (**40**) opět reakcí s ethanolickým amoniakem (jako při přípravě látky **38**) ve výtěžku 86% teorie (Schéma 28 a sekce **5.7.6.**).

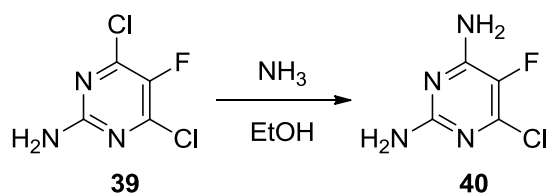


Schéma 28. Příprava 2,4-diamino-5-fluor-6-chlorpyrimidinu (**40**) z 2-amino-5-fluor-4,6-dichlorpyrimidinu (**39**) reakcí s ethanolickým amoniakem.

Dalším připraveným chlorpyrimidinem byl 2,4-diamino-6-chlor-5-nitropyrimidin (**41**), jenž byl připraven dle postupu popsaného v literatuře^[182] s výtěžkem 42% teorie (schéma 29 a sekce **5.7.7.**).

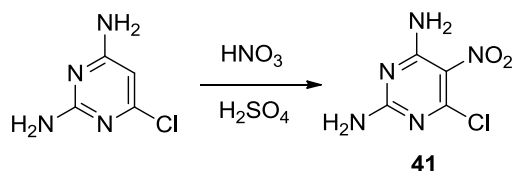


Schéma 29. Příprava 2,4-diamino-6-chlor-5-nitropyrimidinu (**41**) nitrací 2,4-diamino-6-chlorpyrimidinu.

Posledním vyžádaným 5-substituovaným PMEODAPy, jenž měl být připraven ve větším množství, měl být příslušný 5-chlor derivát (též velmi aktivní vůči HIV^[102]). Pro přípravu potřebného pyrimidinu byl využit komerční 2,4,6-trifluor-5-chlorpyrimidin (schéma 30 a sekce 5.7.8.). Pro opětovnou substituci atomů halogenu amoniakem byl využit methanolický amoniak (analogie reakce ve schématu 26, provedená dle postupu 5.7.4.). Tato reakce poskytla bohatou směs produktů, jak ukazuje schéma 30. Po rozdělení získané směsi sloupcovou chromatografií byly izolovány látky **42** (17%), **43** (9%), **44** (40%) a **45** (32% teorie). Pro efektivní přípravu požadovaného 5-chlor PMEODAPy je tak lepší využít přímo chloraci snadno dostupné látky **34** (diskutováno dále v sekci 3.5.3.). Po porovnání reaktivity byla přesto látka **45** využita pro postupnou výstavbu.

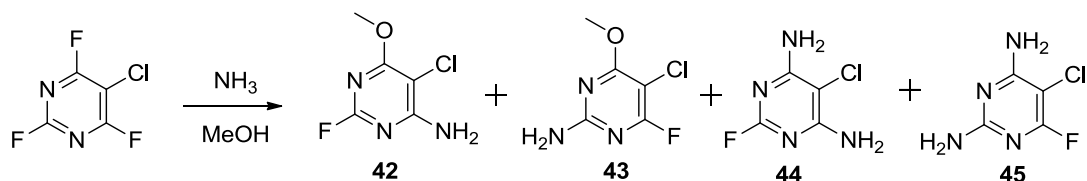


Schéma 30. Reakce 2,4,6-trifluor-5-chlorpyrimidinu s methanolickým amoniakem.

Pro přípravu 5-alkyl a 5-fenyl PMEODAPy bylo též využito postupné výstavby. Právě 5-alkyl deriváty se jen těžko připravují přímou modifikací polohy 5 pyrimidinového kruhu, jak je popisováno ve dvou následujících kapitolách. Pro přípravu výchozích pyrimidinů byla využita analogie reakce zachycené ve schématu 27. V tomto případě se jedná o přímou přípravu 5-substituovaných 2,4-diamino-6-chlorpyrimidinů. V prvním kroku reakce dochází ke kondenzaci guanidinu s komerčně dostupnými substituovanými ethyl-kyanacetáty. Získané 5-substituované 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidiny jsou bez další izolace převedeny reakcí s POCl₃ v přítomnosti 2-methylpyridinu rovnou na požadované 5-substituované 2,4-diamino-6-chlorpyrimidiny (schéma 31 a sekce 5.7.9.). Takto byla připravena celá skupina substituovaných 2,4-diamino-6-chlorpyrimidinů v uspokojivých výtěžcích 62-83% teorie (viz sekce 5.7.9.).

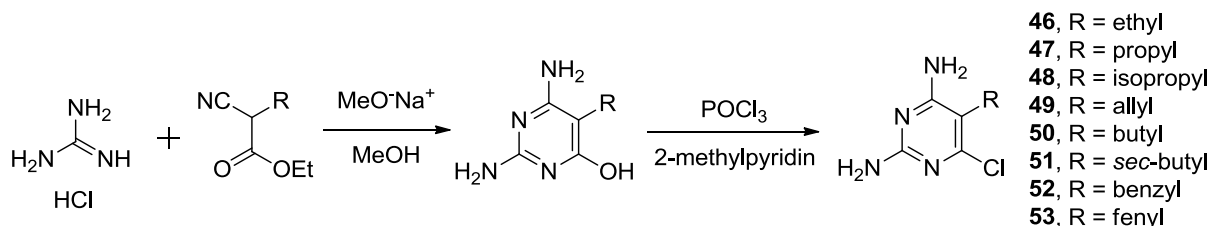
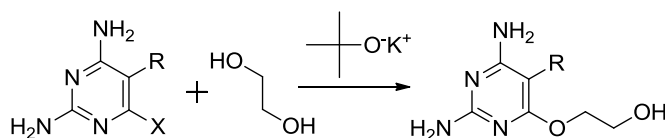


Schéma 31. Příprava 5-substituovaných 2,4-diamino-6-chlorpyrimidinů ze substituovaných ethyl-kyanacetátů.

3.5.2.2. Přípravy substituovaných (2-hydroxyethoxy)pyrimidinů a odpovídajících derivátů pro postupnou výstavbu

Série připravených 5-substituovaných 2,4-diamino-6-halogenpyrimidinů byla následně úspěšně převedena nalezenou reakcí s ethylenglykolem (sekce 3.5.1. a 5.7.1.) na odpovídající 5-substituované 2,4-diamino-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidiny ve vysokých výtěžcích (schéma 32 a sekce 5.7.10.). Dle očekávání bylo zjištěno, že tato nukleofilní aromatická substituce probíhá výrazně rychleji při substituci atomu fluoru než při substituci atomu chloru. Látka **45** tak poskytuje požadovaný produkt **57** (dle postupu 5.7.1.) během několika desítek minut, zatímco látky **46-53** vyžadují pro plnou konverzi zahřívání minimálně na čtyři hodiny. V souladu s elektronovými efekty v alternujících polohách bylo zjištěno, že reaktivita látek **40** a **41** je vlivem přítomných elektronakceptorních substituentů v poloze 5 pyrimidinového kruhu též významně urychlena. Celkově tak byla připravena série dvanácti 5-substituovaných 2,4-diamino-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidinů s využitím univerzálního postupu ve výtěžcích 85-97%.

38, X= Cl, R = methyl
40, X= Cl, R = F
41, X= Cl, R = nitro
45, X= F, R = Cl
46, X= Cl, R = ethyl
47, X= Cl, R = propyl
48, X= Cl, R = isopropyl
49, X= Cl, R = allyl
50, X= Cl, R = butyl
51, X= Cl, R = sec-butyl
52, X= Cl, R = benzyl
53, X= Cl, R = fenyl



54, R = methyl
55, R = F
56, R = nitro
57, R = Cl
58, R = ethyl
59, R = propyl
60, R = isopropyl
61, R = allyl
62, R = butyl
63, R = sec-butyl
64, R = benzyl
65, R = fenyl

Schéma 32. Příprava 5-substituovaných 2,4-diamino-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidinů z příslušných 2,4-diamino-6-halogenpyrimidinů.

Nalezená procedura pro zavádění 2-hydroxyethoxy skupiny byla následně aplikována i s využitím jiných dihydroxyalkanů. Zde byl postup pouze mírně upraven s ohledem na výrazně vyšší ceny složitějších dihydroxyalkanů. Reakce už nebyla prováděna v samotném dihydroxyalkanu jako rozpouštědlo. Místo toho byla výchozí látka společně s deseti ekvivalenty zvoleného diolu rozpuštěna v DMF a následně podrobena reakci dle procedury 5.7.1. Bylo pozorováno částečné snížení izolovaných výtěžků a významné zpomalení reakce, kde bylo pro plnou konverzi potřeba zahřívát reakční směs minimálně 10 hodin. Schéma 33 znázorňuje připravené sloučeniny, jež byly získány ve výtěžcích 69-81% (látky jsou popsány v sekci 5.7.11.).

Vlivem snížené reaktivity byly konány pokusy o urychlení zkoumaných reakcí pomocí mikrovlnných ohřevů. Schéma 34 znázorňuje získané sloučeniny pro dva provedené pokusy. Bylo zjištěno, že MV záření výrazně urychluje rozklad DMF na dimethylamin a oxid uhelnatý. Vzniklý dimethylamin při použitých 160 °C okamžitě substituuje přítomný atom chloru a produktem jsou tak pouze 2,4-diamino-6-(dimethylamino)pyrimidiny. Izolací dle postupu 3.7.1. byla získána látka **70** ve výtěžku 86% a látka **71** ve výtěžku 83% teorie (látky jsou popsány v sekci 5.7.12.).

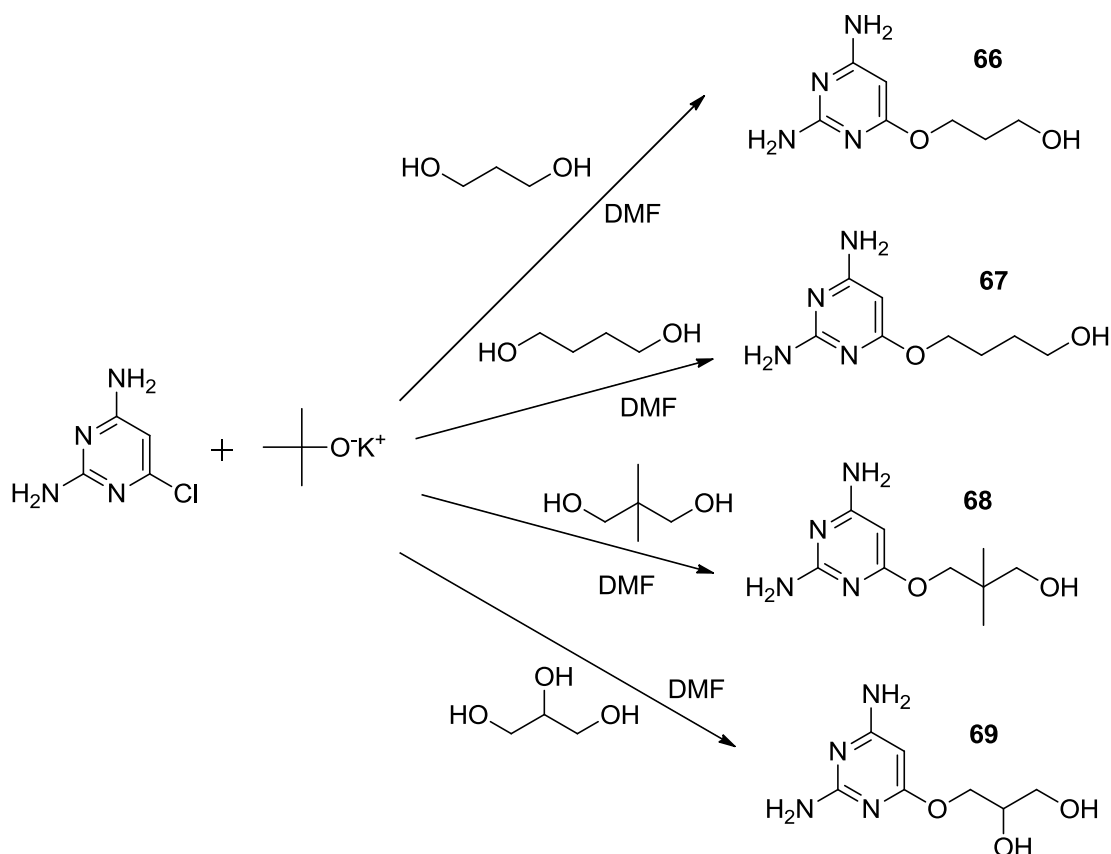


Schéma 33. Příprava 2,4-diamino-6-(hydroxyalkoxy)pyrimidinů z 2,4-diamino-6-chloropyrimidinu.

Tuto problematiku mikrovlnných rozkladů DMF následně (pod vedením autora této disertační práce) rozpracovala studentka prvního ročníku VŠCHT (Lucie Čechová). Byly podrobně popsány efekty ovlivňující rozklad DMF v MV reaktoru a uvolněný dimethylamin (a další aminy, z různých formamidů) byl synteticky využit. Tato studie byla následně publikována formou samostatného článku^[183].

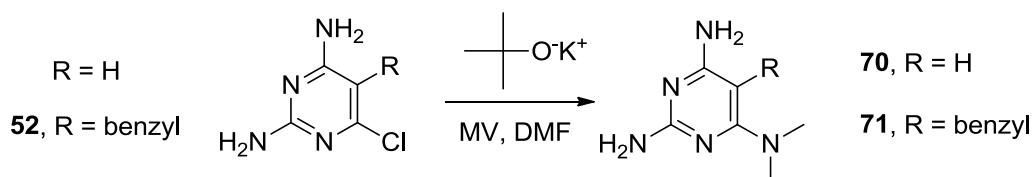


Schéma 34. Vznik 2,4-diamino-6-(dimethylamino)pyrimidinů mikrovlnným rozkladem DMF.

Pro zjištění plné šířky aplikovatelnosti nalezeného postupu pro zavádění hydroxyalkoxy skupin byly činěny pokusy s jedním vybraným složitějším alkoholem (sorbitolem – levný a symetrický). Bylo zjištěno, že za podmínek zahřívání na 120 °C v DMF při reakci sorbitolu s 2,4-diamino-6-chloropyrimidinem vzniká velmi bohatá směs produktů. Pro tuto reakci tak bylo využito dříve zjištěné vysoké reaktivity látky **45** ve smyslu studovaných nukleofilních aromatických substitucí. Jak ukazuje schéma 35 (postup **5.7.13.**), s využitím látky **45** se podařilo docílit požadované reakce i s takto složitým alkoholem, jakým je sorbitol (a to bez

chránění přítomných OH skupin). Látka **72** byla izolována dle postupu **5.7.1.** ve výtěžku 73% teorie.

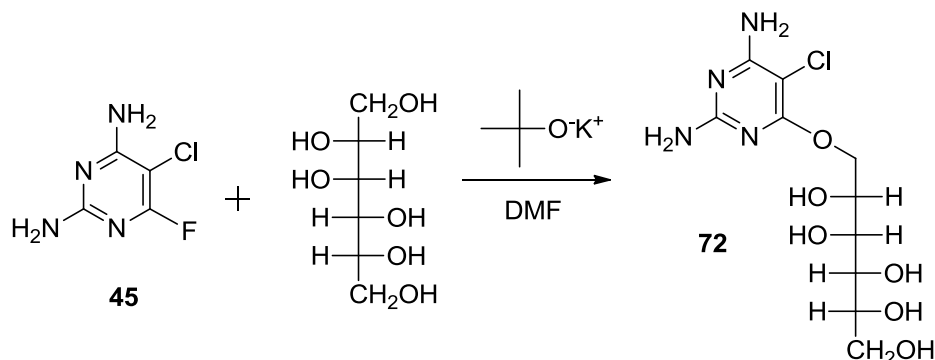


Schéma 35. Reakce látky **45** se sorbitolem.

Byl též proveden orientační pokus pro přípravu 2-amino-6-(2-hydroxyethoxy)-4-methoxypyrimidinů. Dříve izolovaný vedlejší produkt (**37**) byl podroben reakci dle obecného postupu (sekce **3.5.1.** a **5.7.1.**) s ethyleglykolem jako rozpouštědlem (schéma 36 a sekce **5.7.13.**). Překvapivě bylo zjištěno, že požadovaný produkt (látka **73**) je v reakční směsi zastoupen v minoritním množství (izolovaný výtěžek 14%). Za použitých podmínek reakce se methoxy skupina chová též jako dobrá odstupující skupina při nukleofilní aromatické substituci. Látka **74**, která vzniká primárním atakem alkoxidu na methoxy skupinu, byla v reakční směsi zastoupena prakticky ve stejném množství (izolovaný výtěžek 11%) jako požadovaný produkt **73**. Hlavním produktem reakce byla látka (**75**) nesoucí dokonce dvě 2-hydroxyethoxy skupiny (izolovaný výtěžek 63%). Látka **75** byla použita spolupracovnicí Petrou Dolákovou (nyní Břehovou) pro další výzkum^[155].

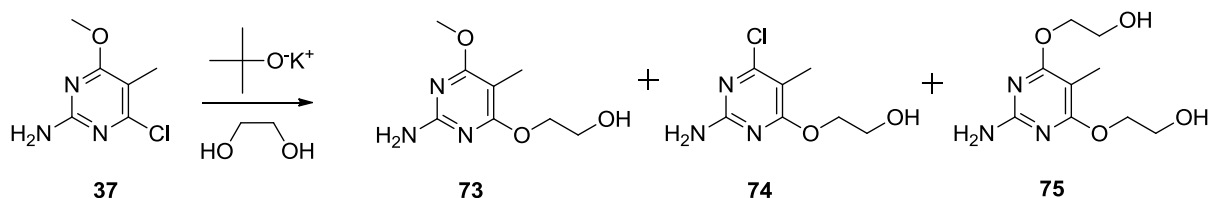


Schéma 36. Reakce látky **37** s ethylenglykolem vedoucí až ke tvorbě dvojnásobně substituovaného produktu **75**.

Další zkoumanou možností modifikace základního PME-O-DAPy byla příprava polohového isomeru PME-O-DAPy, který by nesl celý PME řetězec v poloze 2 pyrimidinového kruhu (aminoskupiny pak v poloze 4 a 6). Pro tuto modifikaci bylo výhodně využito dříve připraveného vedlejšího produktu **44**, který byl dle postupu **5.7.1.** převeden ve vysokém výtěžku (95% teorie) na požadovanou látku **76** (schéma 37 a sekce **5.7.14.**). Tímto postupem byl připraven polohový izomer dříve uváděné látky **57**.

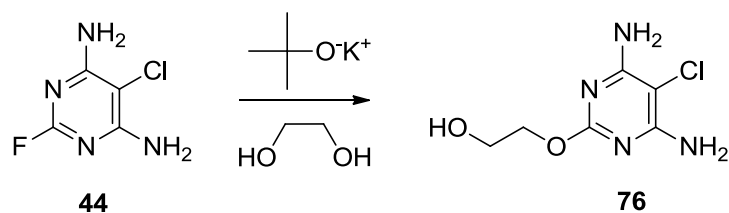


Schéma 37. Reakce látky **44** s ethylenglykolem vedoucí ke tvorbě látky **76** - požadovaný polohový izomer látky **57**.

3.5.2.3. Přípravy substituovaných PMEODAPy esterů a samotných volných kyselin postupnou výstavbou

Získané hydroxyalkoxyypyrimidiny byly následně převedeny reakcí s látkou **4** (dle obecného postupu viz sekce **3.5.1.** a **5.7.2.**) na příslušné diestery PMEODAPy v uspokojivých výtěžcích 39-62% teorie. Připravené diestery byly podrobeny reakci s trimethylsilylbromidem (dle obecného postupu viz sekce **3.5.1.** a **5.7.3.**) za vzniku požadovaných fosfonových kyselin. Schéma 38 znázorňuje reakci látek připravených dle schématu 32 (tzn. 5-substituovaných 2,4-diamino-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidinů) s alkylačním činidlem **4** pro zavedení zbytku kyseliny methylfosfonové. Detailní popis sloučenin a izolovaných výtěžků je uveden v sekci **5.7.15.**

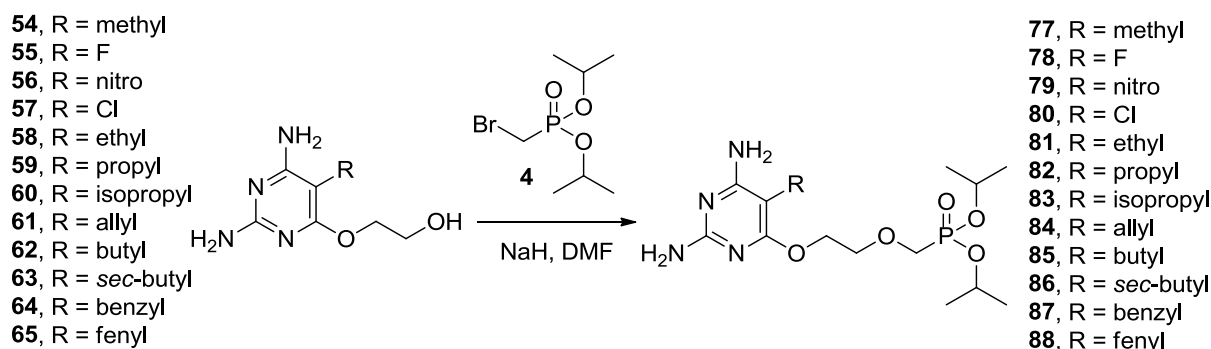
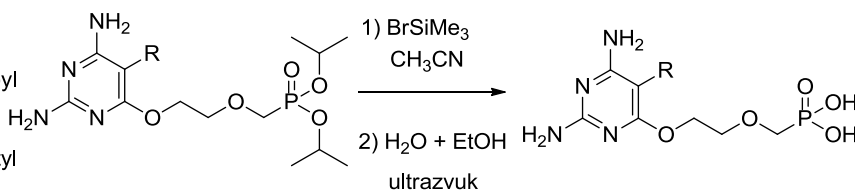


Schéma 38. Příprava diesterů PMEODAPy z připravených 5-substituovaných 2,4-diamino-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidinů.

Získané estery byly po plné identifikaci převedeny na odpovídající 5-substituované PMEODAPy pomocí reakce s trimethylsilylbromidem (dle obecného postupu viz sekce **3.5.1.** a **5.7.3.**) ve výtěžcích 76-98% teorie, jak je znázorněno ve schématu 39. Detailní popis sloučenin a izolovaných výtěžků je uveden v sekci **5.7.16.**

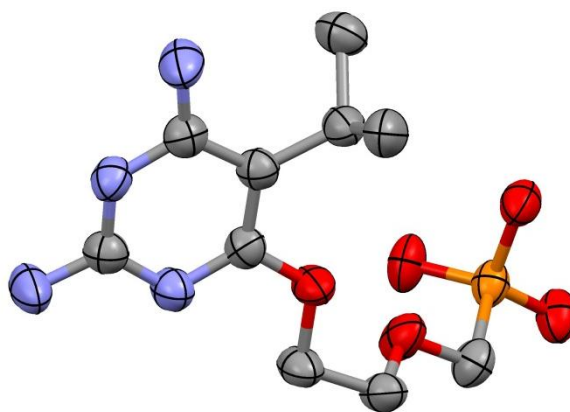
- 77, R = methyl
- 78, R = F
- 79, R = nitro
- 80, R = Cl
- 81, R = ethyl
- 82, R = propyl
- 83, R = isopropyl
- 84, R = allyl
- 85, R = butyl
- 86, R = sec-butyl
- 87, R = benzyl
- 88, R = fenyl



- 89, R = methyl
- 90, R = F
- 91, R = nitro
- 92, R = Cl
- 93, R = ethyl
- 94, R = propyl
- 95, R = isopropyl
- 96, R = allyl
- 97, R = butyl
- 98, R = sec-butyl
- 99, R = benzyl
- 100, R = fenyl

Schéma 39. Převedení získaných diesterů PMEODAPy na příslušné fosfonové kyseliny (cílové 5-substituované PMEODAPy).

Vysokou čistotu takto připravených sloučenin demonstrují naměřené elementární analýzy (viz sekce 5.7.16.). Při rekrystalizaci látky **95** se navíc podařilo vypěstovat monokrystal vhodný pro rentgenovou strukturní analýzu. Obrázek 61 reprezentuje nalezenou strukturu látky **95** v obdrženém krystalu. I přes mnohaletý výzkum v oblasti FAN jsou do dnešních dnů známé pouze dvě vyřešené krystalové struktury FAN^[184].



Obrázek 61. ORTEP diagram znázorňující látku **95**, reprezentující pozice těžkých atomů s pravděpodobností 90% (data naměřila Blanka Klepetářová PhD. na přístroji popsáném v literatuře^[152]).

Připravené hydroxyalkoxyypyrimidiny (dle schématu 33) byly též pobrobeny této alkylační reakci. V případě použití látky **69** nebyl pozorován vznik žádného produktu. Reakce byla opakována v několika provedeních za mírně změněných podmínek, ale ani jeden pokus nevedl ani ke stopě jakéhokoliv diesteru FAN. Pro přípravu HPMPO-DAPy postupnou výstavbou tak bude potřeba použít chránicí skupiny (pro chránění primární OH skupiny, nejlépe tedy trityl). Příprava HPMPO-DAPy ale nebyla zadáním této disertační práce a tak jsme se jí dále nevěnovali. Schéma 40 znázorňuje úspěšné převedení připravených hydroxyalkoxyypyrimidinů (**66-68**) na odpovídající diestery FAN ve výtěžcích 51-60% teorie. Tyto estery byly následně (bez jakékoliv analýzy) podrobeny reakci s trimethylsilylbromidem (dle obecného postupu viz sekce 3.5.1. a 5.7.3.), čímž byly získány požadované fosfonové kyseliny **101-103** ve výtěžcích 87-93% teorie (počítáno z diesterů, viz sekce 5.7.17.).

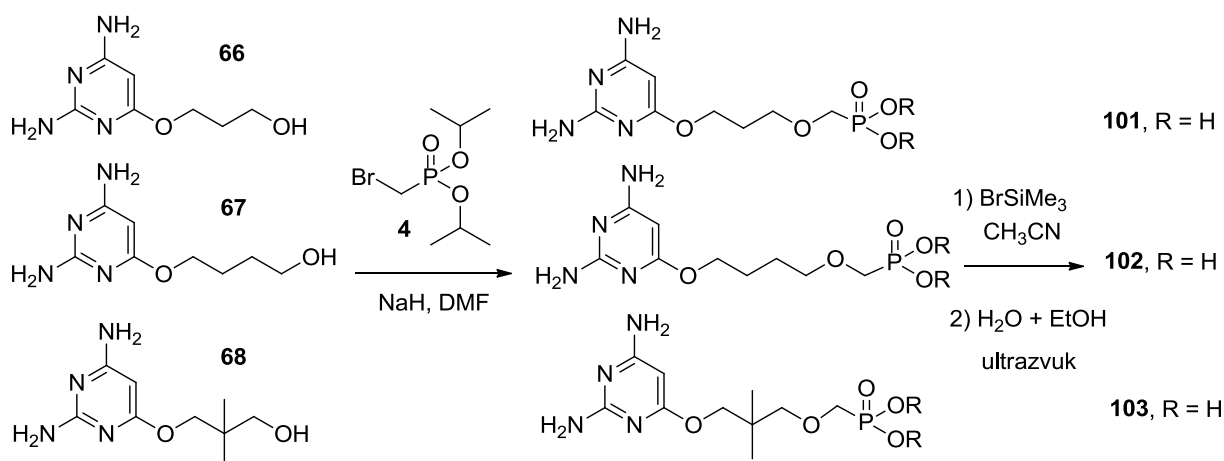


Schéma 40. Příprava modifikovaných „PMEO“-DAPy z připravených 2,4-diamino-6-(hydroxyalkoxy)pyrimidinů.

Připravený polohový izomer látky **57** (označen jako **76**) byl též podroben reakci s látkou **4** (dle obecného postupu viz sekce **3.5.1.** a **5.7.2.**). V tomto případě byla získána směs dvou látek. Sloupcovou chromatografií byly obě látky odděleny (viz sekce **5.7.18.**). Takto byla získána látka **104** (výtěžek 37% teorie) a látka **105** (29% teorie). Struktura obou sloučenin byla jednoznačně prokázána pomocí NMR a je znázorněna ve schématu 41.

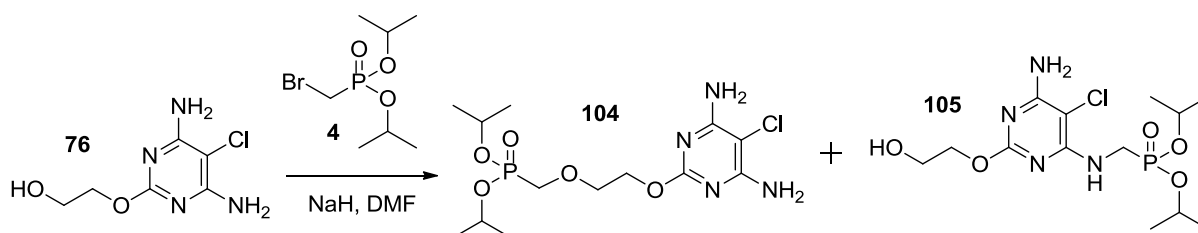


Schéma 41. Reakce látky **76** s látkou **4** za vzniku požadovaného produktu **104** a izolovaného vedlejšího produktu **105**.

Oba takto získané estery byly následně převedeny reakcí s trimethylsilylbromidem (dle obecného postupu viz sekce **3.5.1.** a **5.7.3.**) na příslušné fosfonové kyseliny ve výtěžku 93% (pro látku **106**) a 86% (pro látku **107**), jak ukazuje schéma 42 (viz též sekce **5.7.19.**).

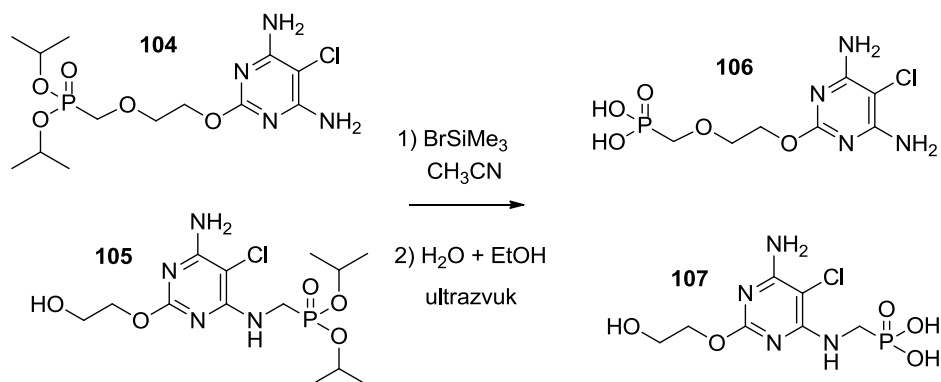


Schéma 42. Příprava fosfonových kyselin **106** a **107** z příslušných diesterů **104** a **105**.

Dalším zadaným cílem této disertační práce bylo připravit lipofilní proléčiva od vybraných PMEODAPy. Příprava a protivirové aktivity prvního proléčiva PMEODAPy byly již popsány v části 3.4. (látka 31). S využitím dvou připravených 2-hydroxyethoxyprymidinů a alkylačního činidla popsaného v literatuře^[185] se nám podařilo efektivně připravit dvě vysoce lipofilní proléčiva FAN (schéma 43) v uspokojivých výtěžcích (látku 108 ve výtěžku 43% a látku 109 ve výtěžku 39% teorie). Detailní postup přípravy je popsán v části 5.7.20.

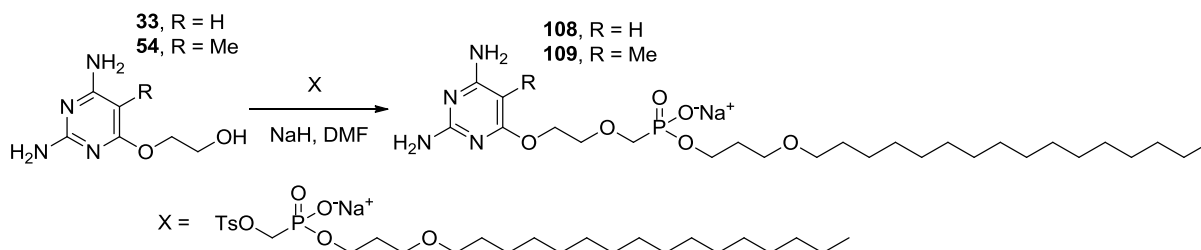


Schéma 43. Příprava lipofilních proléčiv 108 a 109 (odpovídajících kyselinám 35 a 89).

3.5.3. Přípravy 5-substituovaných PMEODAPy přímou modifikací polohy 5 pyrimidinového kruhu vycházející z příslušných diesterů

Vysoká reaktivita polohy 5 pyrimidinového kruhu ve smyslu substitucí elektrofilních a radikálových nás vedla k domněnce, že budeme moci s využitím (nyní lehce dostupné) látky 34 rychle a efektivně připravit celou sérii 5-substituovaných derivátů látky 34 přímou derivatizací. Tento předpoklad byl záhy několikrát úspěšně potvrzen. Schéma 44 ukazuje první sérii přímých derivatizací látky 34 v poloze 5 pyrimidinového kruhu. Prvním zástupcem elektrofilní aromatické substituce byla azokopulace. Pomocí benzendiazoniové soli (viz 5.7.21.) byl připraven ve vysokém výtěžku (92%) požadovaný 5-fenylazo derivát 110 (tzn. produkt C-azokopulace). Vznik příslušného triazenu (produktu N-azokopulace) pozorován nebyl. Látka 110 pak byla dle univerzálního postupu 5.7.3. úspěšně převedena na 5-fenylazo-PMEODAPy (111) ve výtěžku 76% (viz 5.7.22.). Další úspěšně testovanou reakcí byla oxidace polohy 5 pyrimidinového kruhu pomocí $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (viz 5.7.23.) za vzniku aduktu 112 v izolovaném výtěžku 62% teorie (dle postupu popsaného v literatuře^[186]). Tato látka se ovšem ukázala jako velmi nestabilní a všechny pokusy o převedení látky 112 na příslušnou fosfonovou kyselinu skončily vždy tvorbou 2,4-diamino-5,6-dihydroxypyrimidinu. Jinou testovanou elektrofilní aromatickou substitucí byla nitrosace látky 34, která poskytla velmi rychle a kvantitativně požadovaný 5-nitroso derivát 113 (viz 5.7.24.). Rekrystalizací této látky se podařilo vypěstovat monokrystal vhodný pro rentgenostrukturní analýzu (viz obrázek 62). Pokusy o převedení látky 113 na volnou fosfonovou kyselinu nebyly úspěšné. Místo toho se ale podařilo přítomnou nitrososkupinu zredukovat na aminoskupinu za tvorby látky 114 (ve výtěžku 84%). Tato látka je překvapivě nestabilní a podléhá oxidacím vzdušným kyslíkem. Příslušný hydrochlorid pak už bylo možné dlouhodobě skladovat (viz 5.7.25.).

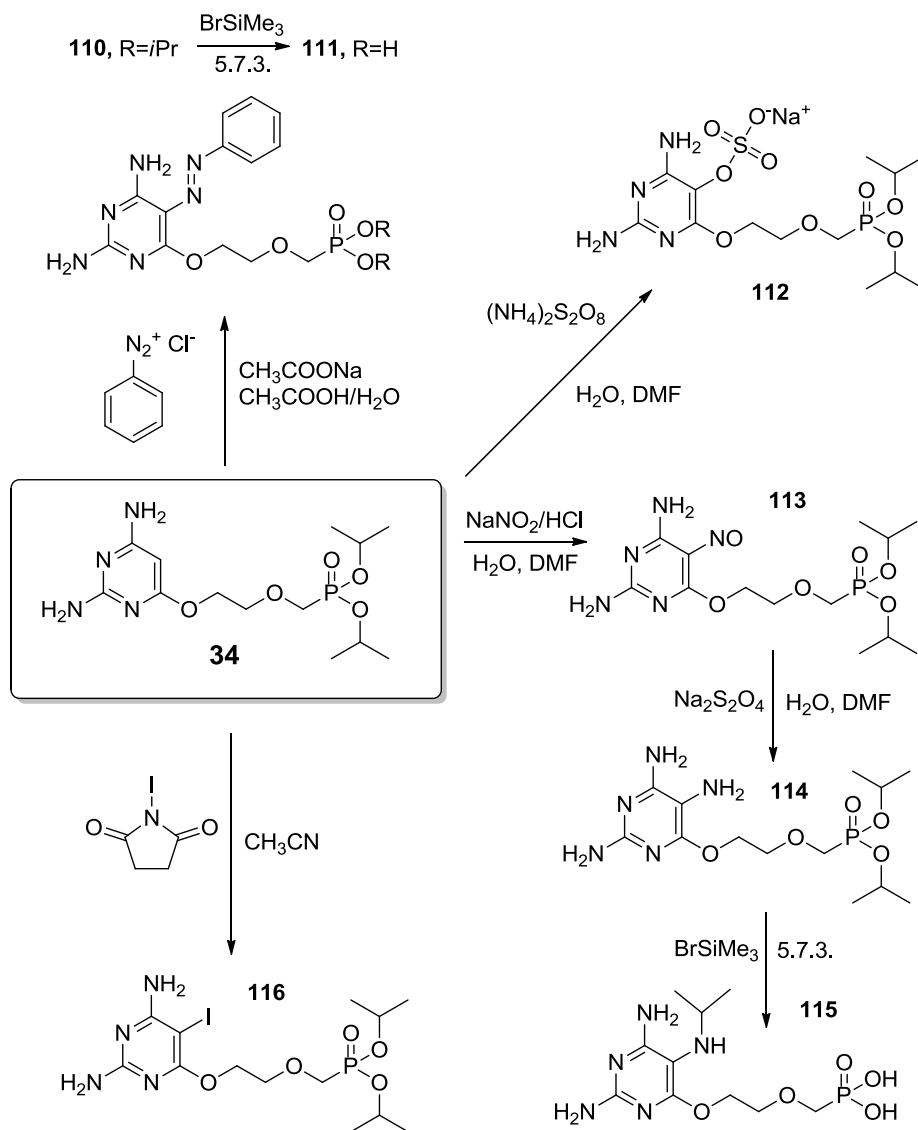
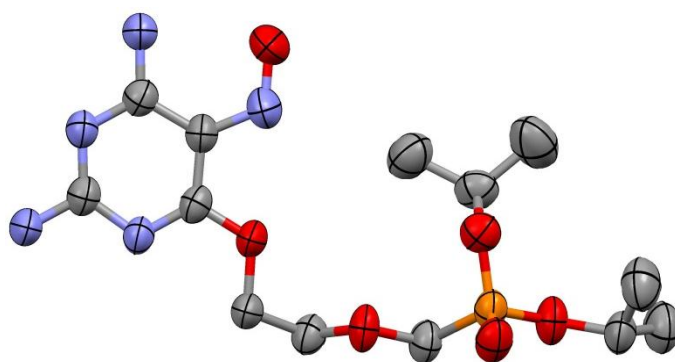
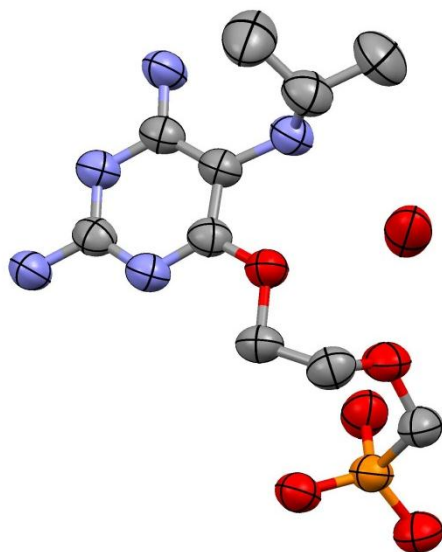


Schéma 44. Substituční reakce v poloze 5 pyrimidinového kruhu vycházející z připravené látky **34**.



Obrázek 62. ORTEP diagram znázorňující látku **113**, reprezentující pozice těžkých atomů s pravděpodobností 90% (data naměřila Blanka Klepetářová PhD. na přístroji popsáném v literatuře^[152]).

Látka **114** byla podrobena postupu **5.7.3.** pro hydrolyzu diisopropyl esterů (viz **5.7.26.**). Jediným produktem této reakce je látka **115** (izolovaný výtěžek 89%). Struktra produktu byla jednoznačně potvrzena pomocí rentgenostrukturní analýzy (viz obrázek 63). Vysoká nukleofilita aminoskupiny v poloze 5 (zapříčiněná přítomností tří elektron donorních substituentů v alternujících polohách) tak nedovoluje připravit požadovaný 5-amino-PMEO-DAPy (vznikající isopropylbromid okamžitě substituuje tuto aminoskupinu v poloze 5). Tato alkylace aminoskupiny nebyla pro aminoskupiny v poloze 2 a 4 nikdy pozorována (aminoskupiny v poloze 2 a 4 jsou totiž deaktivovány pro alkylační reakci rezonancí do pyrimidinového kruhu).



Obrázek 63. ORTEP diagram znázorňující látku **115** (monohydrát látky **115**), reprezentující pozice těžkých atomů s pravděpodobností 90% (data naměřila Blanka Klepetářová PhD. na přístroji popsaném v literatuře^[152]).

Další provedenou substituční reakcí byla jodace polohy 5 pyrimidinového kruhu látky **34** pomocí *N*-jodsukcinimidu (izolovaný výtěžek 93%, viz **5.7.27.**). Vzniklá látka **116** již byla dříve připravena^[102], zde nám ale následně posloužila jako výborná výchozí surovina pro C-C „cross-coupling“ reakce.

Jinou variantou přímé modifikace polohy 5 pyrimidinového kruhu (látky **34**) byla úspěšná radikálová substituce pomocí *in situ* generovaného dithiokyanátu (schéma 45). Vzniklý 5-thiokyanáto derivát **117** byl získán ve vysokém výtěžku 97% teorie (viz **5.7.28.**). Převedení této sloučeniny na volnou fosfonovou kyselinu však nebylo úspěšné (nejspíš vlivem nestability přítomné SCN skupiny při reakci s trimethylsilylbromidem). Látka **117** byla následně využita jako další výborná výchozí sloučenina pro následné.

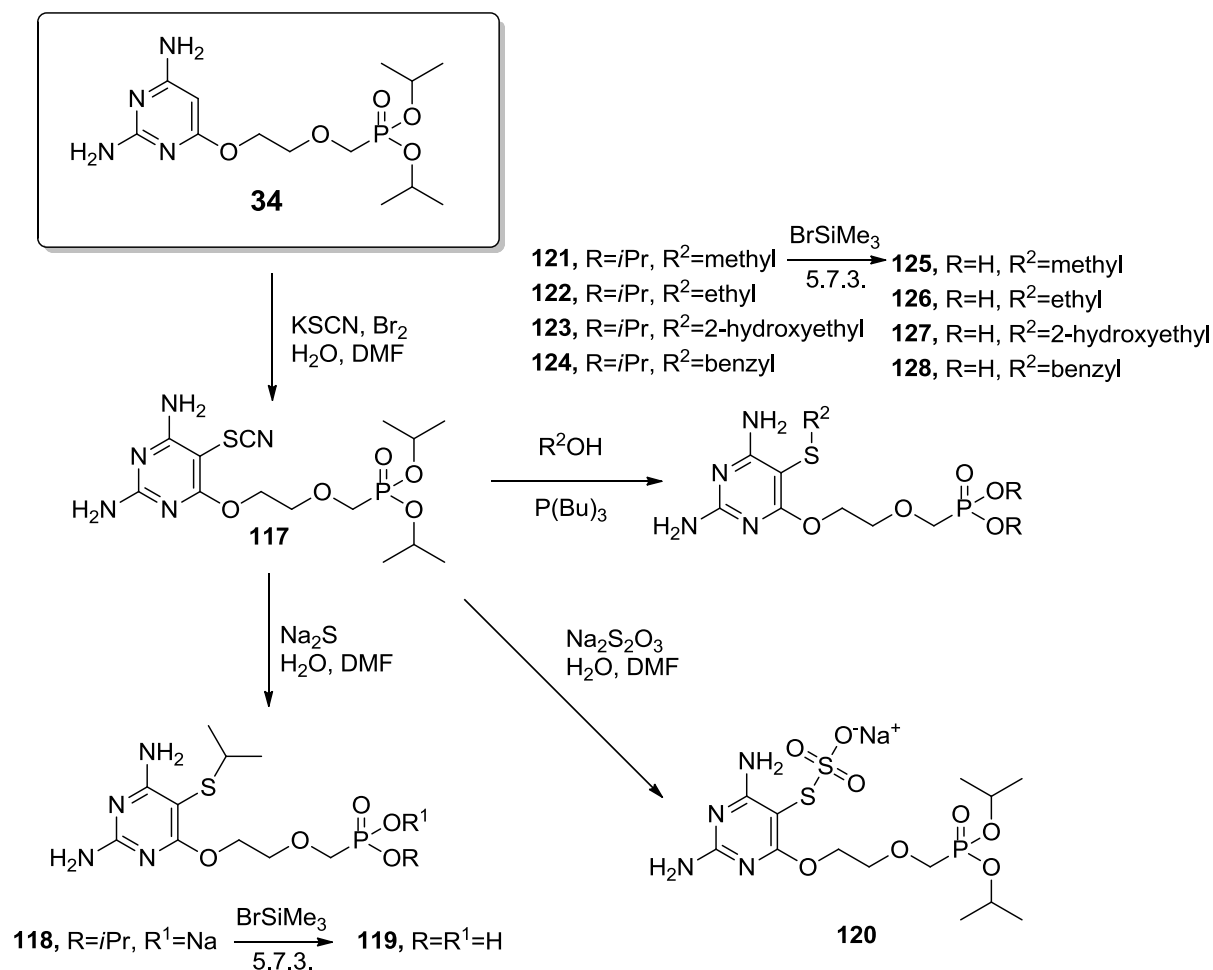


Schéma 45. Další substituční reakce v poloze 5 pyrimidinového kruhu vycházející z připravené látky **34** a využívající látku **117** jako klíčový meziprodukt.

První studovanou reakcí byla zamýšlená hydrolyza thiokyanátové skupiny až na skupinu thiolovou pomocí reakce se sulfidem sodným. První pokus o realizaci této reakce poskytl směs dvou produktů (směs látek **118** a **120**). Obě látky byly izolovány a plně charakterizovány. Vznik látky **120** byl nejdříve velkou záhadou. Použitý sulfid sodný byl hydrát, jehož datum výroby spadalo do předminulého století. Je známo, že hydrát sulfidu sodného může podléhat oxidaci vzdušným kyslíkem až na thiosíran sodný, což by mohlo vysvětlovat vznik pozorovaných produktů. Reakce tedy byla nejdříve opakována s novým sulfidem sodným (viz **5.7.29**). A poté byla získána pouze látka **118** a to ve vysokém výtěžku 73% teorie (migrace isopropylové skupiny je analogií vzniku látky **115** viz schéma 43, kde je *in situ* vzniklá thiolová skupina evidentně tak nukleofilní, že si vynutí migraci isopropylové skupiny z fosfonátové části molekuly). Látka **118** byla úspěšně převedena na příslušnou fosfonovou kyselinu **119** ve výtěžku 81% teorie (viz **5.7.30**). Následně byla zkoumána reakce látky **117** pouze s thiosíranem sodným. Překvapivě bylo zjištěno, že dochází pouze ke vzniku látky **120** a to ve velmi vysokém výtěžku 87% teorie (viz **5.7.31**). Příprav arylthiosíranů je v literatuře známo relativně jen málo^[187]. Nalezená reakce reprezentuje (dle důkladného prozkoumání literatury) úplně novou chemickou reakci. Vlivem toho byla intenzivně zkoumána na dalších arylthiokyanátech a bylo zjištěno, že se jedná o obecnou metodu

přípravy arylthiosíranů. Část těchto pokusů vykonala (pod vedením autora této disertační práce) studentka prvního ročníku VŠCHT Lucie Čechová. Tato studie nebyla zadáním předkládané disertační práce, proto zde neuvádíme další získané výsledky (které se připravují k publikování, jako navržený mechanismus, identifikace klíčového intermediátu nesoucího tři atomy síry vedle sebe atd.). Samotnou látku **120** se ale nepodařilo převést na odpovídající fosfonovou kyselinu (reakce poskytla velmi bohatou a nedělitelnou směs produktů). Pro další modifikace thiokyanáto skupiny byla použita metodika popsaná v literatuře^[188], která využívá aktivaci SCN skupiny pomocí trialkylfosfinu. Při této reakci slouží použitý trialkylfosfin též jako činidlo jež generuje z přidaného alkoholu odpovídající alkylační činidlo *in situ*. Produktem reakce pak jsou příslušné alkylsulfidy **121-124** (viz schéma 45 a sekce **5.7.32.**) izolované ve vysokých výtěžcích (75-92%). Připravené alkylsulfidy pak byly úspěšně převedeny na odpovídající fosfonové kyseliny **125-128** pomocí univerzálního postupu **5.7.3.** (ve výtěžcích 71-90%, viz **5.7.33.**).

Dříve připravená látka **116** byla následně využita pro modifikace polohy 5 pyrimidinového kruhu s využitím C-C „cross-coupling“ reakcí katalyzovaných přechodnými kovy (schéma 46).

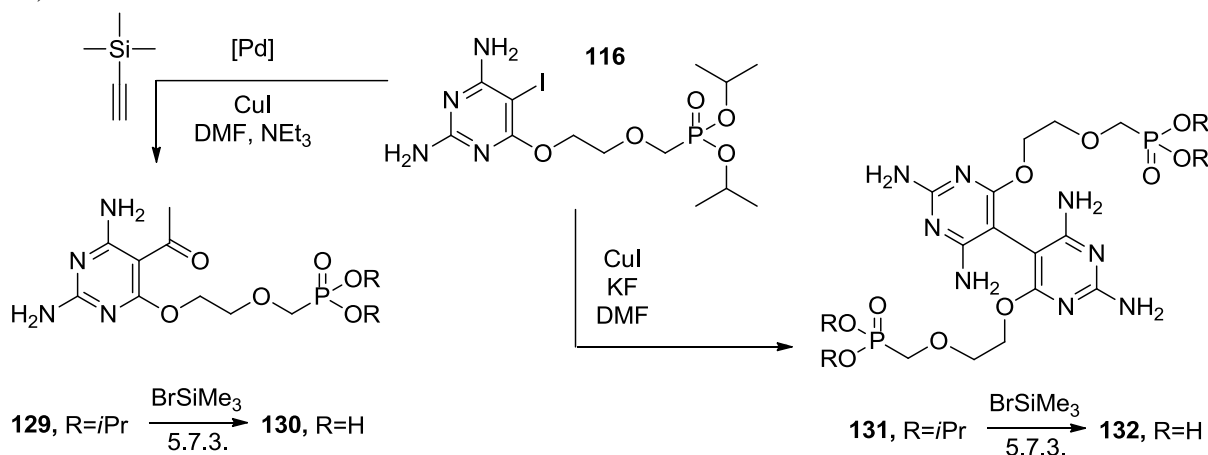
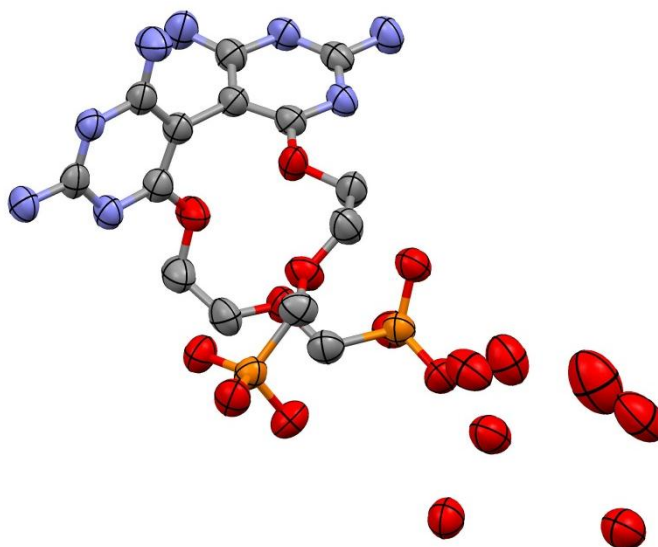


Schéma 46. Modifikace polohy 5 pyrimidinového kruhu pomocí C-C „cross-coupling“ reakcí vycházejících z dříve připravené látky **116**.

První testovanou reakcí byla zamýšlená příprava příslušného 5-ethynyl derivátu za podmínek Sonogashirovy reakce. V tomto případě byl jediným izolovaným produktem příslušný 5-acetyl derivát PMEODAPy (látka **129**, schéma 45). Tento pokus byl opakován a bylo zjištěno, že v samotné reakční směsi látka **129** přítomna není (dle TLC obsahuje reakční směs pouze jediný produkt, dle hmotnostního spektra extrahované reakční směsi odpovídá nejintenzivnější signál ve spektru molekulové váze příslušného 5-ethynyl derivátu). Při studované reakci tak zřejmě dochází primárně ke vzniku příslušného 5-ethynyl derivátu. Tato látka ovšem podléhá okamžité hydrataci za tvorby sloučeniny **129** při chromatografii na silikagelu (který vodu obsahuje). Reakce tak poskytuje další zajímavou sloučeninu **129** v uspokojivém výtěžku 64% teorie (viz **5.7.34.**), jež byla převedena dle univerzálního postupu **5.7.3.** na příslušnou fosfonovou kyselinu ve výtěžku 87% teorie (viz **5.7.35.**). V dalším pokusu se pomocí podmínek pro Ullmanovu reakci podařilo docílit předpokládaného zdvojení celé molekuly PMEODAPy vytvořením C-C vazby mezi uhlíky v polohách 5

pyrimidinových kruhů za tvorby látky **131** ve výtěžku 63% teorie (viz **5.7.36.**). Tento tetraester difosfonové kyseliny byl následně opět úspěšně převeden na odpovídající fosfonovou kyselinu dle obecného postupu **5.7.3.** ve výtěžku 90% teorie. Po rekrystalizaci získané sloučeniny z vody se dokonce podařilo vypěstovat monokrystal vhodný pro rentgenostrukturní analýzu. Naměřená data (obrázek 64) jednoznačně potvrzují strukturu látky **132** (po rekrystalizaci z vody látka obsahuje v krystalové mřížce 7 molekul vody na každou molekulu látky **132**, potvrzeno i elementární analýzou, viz **5.7.37.**).



Obrázek 64. ORTEP diagram znázorňující látku **132** (heptahydrát), reprezentující pozice těžkých atomů s pravděpodobností 90% (data naměřila Blanka Klepetářová PhD. na přístroji popsaném v literatuře^[152]).

3.5.4. Přípravy 5-substituovaných PME0-DAPy přímou modifikací polohy 5 pyrimidinového kruhu přímo na fosfonových kyselinách

Vysoká reaktivita polohy 5 pyrimidinového kruhu, pozorované vysoké konverze a téměř kvantitativní výtěžky při reakcích popsaných v sekci **3.5.4.** nás vedly k úvahám provést některé tyto reakce přímo na (volné) fosfonové kyselině **35**. Při přípravě látky **113** bylo pozorováno výrazné snížení rozpustnosti získaného produktu vůči rozpustnosti výchozí látky **34**. Naší úvahou tedy bylo provést stejnou reakci přímo na látce **35** za podmínek, kdy bude alespoň část této sloučeniny rozpuštěna. Teoretickým předpokladem pak bylo, že vlivem (možné) nižší rozpustnosti produktu nitrosace dojde k postupnému kvantitativnímu převedení látky **35** na požadovaný nitroso derivát (který se kvantitativně vyloučí z reakční směsi).

Tento teoretický předpoklad byl následně velmi úspěšně potvrzen. Látka **35** byla suspendována ve vodné kyselině octové (dle TLC se alespoň část látky **35** rozpustila). K této suspenzi byl pomalu přikapán isoamylnitrit jako zdroj NO^+ a reakce byla míchána za postupného vylučování modré látky **133** (schéma 47). Po šesti hodinách již reakční směs neobsahovala výchozí látku a kvantitativního vyloučení látky **133** bylo dosaženo přidáním

acetonu k reakční směsi (v acetonu jsou FAN prakticky nerozpustné). Nízká rozpustnost FAN se zde ukázala dokonce výhodou. Vyloučený produkt totiž bylo možné promýt vodou, methanolem a acetonem za získání velmi čistého produktu **133** v kvantitativním izolovaném výtěžku (viz 5.7.38.). Při důkladném vysušení látka **133** mění barvu z modré na zelenou. Bylo zjištěno, že látka **133** je překvapivě plně stálá.

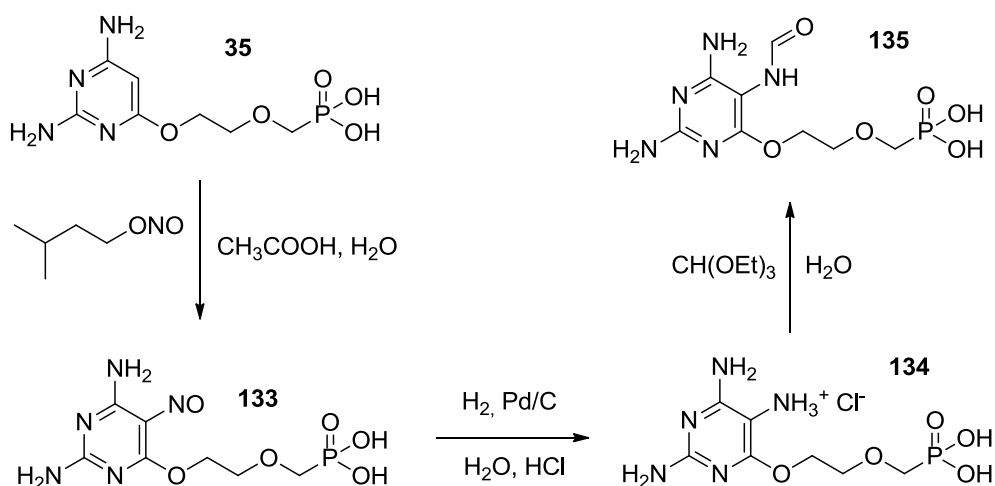


Schéma 47. Efektivní modifikace polohy 5 pyrimidinového kruhu prováděné přímo na fosfonových kyselinách.

Další úspěšnou přímou derivatizací byla následná redukce látky **134**, kde byl při hydrogenaci v přítomnosti HCl (primárně pro rozpuštění látky **133**) získán rovnou stabilní hydrochlorid **134** (viz 5.7.39.). Jeho kvantitativního vyloučení bylo opět dosaženo pouhým přidáním acetonu k reakční směsi (po dekantaci použitého hydrogenačního katalyzátoru). Vysoká reaktivita aminoskupiny v poloze 5 pyrimidinového kruhu (viz výše) byla následně využita při reakci látky **134** s triethyl-orthoformiátem, kde došlo k jednoznačné konverzi látky **134** na látku **135** nesoucí v poloze 5 pyrimidinového kruhu *N*-formylamino skupinu. Izolace byla opět provedena pouhým přidáním acetonu k reakční směsi za získání látky **135** ve výtěžku 93% teorie (viz 5.7.40.).

Vysoké konverze, snadná izolace a skutečnost, že se potenciálně biologicky aktivní látky připravují v jednom jediném syntetickém kroku (z lehce dostupné výchozí sloučeniny) činí tuto strategii vysoce přínosnou pro další budoucí modifikace celé skupiny FAN. Vysoký potenciál reakcí přímo na (volných) fosfonových kyselinách demonstruje i fakt, že žádná ze sloučenin **133-135** nemohla být připravena s použitím příslušných esterů substituovaných PMEODAPy (viz výše, např. vznik látky **115**).

3.5.5. Protivirové aktivity připravených 5-substituovaných PME0-DAPy

Všechny látky připravené v sekci 3.5. byly zkoumány pro své potenciální protivirové aktivity. Byly testovány biologické aktivity nejen samotných (volných) kyselin, ale i všech meziproductů (především úplně všech hydroxyalkoxyprymidinů, jež mohou být fosforylovány na přítomné OH skupině a účinkovat tak jako acyklická analoga nukleosidů, viz sekce 1.1.). Tabulka 10 uvádí naměřené protivirové aktivity (pro maximální přehlednost jsou v tabulce uvedeny pouze sloučeniny, které vykazovaly alespoň nějakou protivirovou aktivitu). U žádného monohydroxyalkoxyprymidinu nebyla pozorována žádná protivirová aktivita. U připraveného derivátu sorbitolu (látko 72) byla pozorována alespoň nízká aktivita vůči VZV.

Tabulka 10. Naměřené protivirové aktivity připravených 5-substituovaných PME0-DAPy*.

látko	EC ₅₀ (μM) CC ₅₀ (μM)			EC ₅₀ (μM)				CC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)			EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
	HIV-1	HIV-2	HIV	VZV-OKA	VZV-YS	VZV-07/1	VZV-YS/R	VZV	HSV-1	HSV-2	HSV-1 TK	Coxsackie	Coxsackie
72	>308	>308	>308	308	242			>308					
89	0,7	0,7	8	18	42	49	23		>360	>360	>360	>360	>360
90	10	4,2	262	39	110			>350	212	>352	>352	>352	>352
91	>323	184	>323	>323		>323		>323	>324	>324	>324	>324	>324
108	7	19	40	0,08	0,07	0,05	0,1	153	>40	>40	>40	4	172
109	0,2	0,2	6	0,1	0,5	0,3	0,4	41	>34	>34	>34	18	172
111	>272	>272	>272	18		43		>272	>272	>272	>272	>272	>272
115	>311	>311	>311	58		130		>311	>311	>311	>311	>311	>311
119	>296	>296	>296	233		263		>296	>296	>296	>296	>296	
127	>294	116	>294	79		59		>294	>294	>294	>294	>294	
132	>190	>190	>190	52		89		>190	>190	>190	>190	>190	
133	1,1	0,5	13					5,7	2,8	11		>285	>285
134	18	15	145	3,6		6,4		>266	63	25	63	>266	
135	83	24	>280	7		21		>280	>280	>280	>280	>280	
35	5,1	2,3	42	4,5	4,2	9,8		45	25	91	36		
adefovír	7,1	7,8	121	35		35			24	24			

*samotné testování biologické aktivity bylo provedeno v souladu s literaturou^[99, 102] (v této literatuře je též detailně vysvětlen smysl použitých zkratk a symbolů). Prázdná pole znamenají, že tato aktivita nebyla testována. V tabulce jsou uvedeny pouze sloučeniny, které vykazovaly alespoň nějakou měřitelnou protivirovou aktivitu.

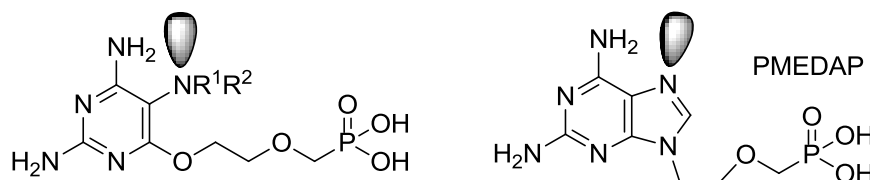
U látko 89 byla potvrzena její vysoká aktivita vůči HIV. Tento vzorek byl testován pro ověření dříve zjištěné biologické aktivity. Látko popsáná v literatuře totiž byla připravena s použitím organokovové chemie^[102] a tak zde bylo potřeba vyvrátit možnou variantu, že za vysoké protivirové aktivity je zodpovědná případná nečistota pocházející z použitého palládiového katalyzátoru. Jak je ale z tabulky 10 vidět, látko 89 je také poměrně cytotoxická a tak je její vysoká protivirová aktivita diskutabilní. Bylo překvapivě zjištěno, že i samotná látko 35 vykazuje nezanedbatelnou cytotoxicitu. Připravený 5-fluor derivát (látko 90) už je výrazně méně cytotoxický. Samotná protivirová aktivita (vůči HIV i VZV) však též významně poklesla (v porovnání s látkou 35). Připravený 5-nitro derivát (látko 91) vykazuje jen mizivou aktivitu a to jen vůči HIV-2. Získaná proléčiva 108 a 109 byla primárně zklamáním, kdy proléčivo látko 35 (sloučenina 108) vykazuje dokonce nižší aktivity vůči HIV než samotná fosfonová kyselina. Přípravou proléčiva 109 došlo jen k částečnému zvýšení aktivity vůči HIV (dle literatury se tímto typem proléčiva dosahuje až o tři řády vyšší

protivirová aktivita). Obě proléčiva se ovšem ukázala opravdu velmi účinná proti VZV (a to i proti všem testovaným kmenům). U obou látek došlo k přibližně stonásobnému zvýšení protivirové aktivity vůči VZV v porovnání se samotnými fosfonovými kyselinami. Látka **108** tak vykazuje aktivity proti VZV v koncentracích desítek nanomolů na litr. Překvapivě bylo též pozorováno (transformací látky **35** na proléčivo **108**) významné snížení cytotoxicity. Dramatické zvýšení protivirové aktivity a částečné snížení cytotoxicity vedlo k nárůstu indexu selektivity na hodnotu okolo dvou tisíc, což už je hodnota zajímavá pro praktickou protivirovou terapii. Dalším velice překvapivým zjištěním byla aktivita látky **108** vůči viru Cocksackie (typ B4). Toto zjištění je vysoce zajímavé s ohledem na fakt, že zmiňovaný virus patří do rodiny RNA virů a do této doby nebyla pozorována žádná aktivita jakéhokoliv FAN vůči tomuto viru.

Další protivirově aktivní sloučeninou se ukázal být připravený 5-fenylazo derivát látky **35** (látka **111**). Tato látka jeví velmi selektivní účinek proti VZV (absolutně neaktivní vůči HIV), kdy nebyl pozorován ani náznak cytotoxicity. Podobně selektivně aktivní se ukázal být i připravený 5-isopropylamino derivát látky **35** (látka **115**). Analogický 5-isopropylthio derivát látky **35** vykazuje už jen velmi slabou aktivitu vůči VZV (látka **119**). Získaný 5-(2-hydroxyethoxythio) derivát látky **35** vykazuje též selektivní aktivitu pouze vůči VZV. Opravdu velkým překvapením byla látka **132** (bis-5,5'-PMEO-DAPy), která i přes svou vysokou molekulovou hmotu a přítomnost dvou PME zbytků vykazuje relativně zajímavou aktivitu vůči VZV. Jako velmi protivirově účinnou látkou se ukázala být sloučenina **133** (5-nitroso derivát látky **35**), která je vysoce aktivní proti HIV i HSV (aktivita vůči VZV se teprve testuje). Látka **133** vykazovala též nezanedbatelnou cytotoxicitu při testování HIV a její skutečný potenciál je tak potřeba dále zkoumat. Látka **134** nesoucí v poloze 5 pyrimidinového kruhu pouze aminoskupinu se ukázala být rovněž protivirově účinnou. Aktivita vůči HIV a HSV se sice částečně snížila v porovnání s látkou **35**. Protivirová aktivita vůči VZV však významně vzrostla. S ohledem na fakt, že se jedná o neúčinnější substituovaný PME-DAPy vůči VZV (který zároveň nevykazuje v testech VZV ani náznak cytotoxicity), je tato látka opravdu zajímavá pro další výzkum. Logickým budoucím krokem je tedy příprava lipofilního proléčiva (jako u látky **108**, kde došlo ke stonásobnému zvýšení aktivity proti VZV, na této modifikaci se pracuje). Další zamýšlenou modifikací je výměna PME řetězce za HPMP řetězec (HPMPO-DAPy je výrazně aktivnější vůči VZV než PME-DAPy^[99]). Jinou připravenou látkou, která vykazuje dokonce ještě selektivnější aktivity vůči VZV, je příslušný 5-formylamino derivát látky **35** (látka **135**). Zavedením formyl skupiny na látku **134** došlo sice k částečnému snížení samotné aktivity vůči VZV. Látka **135** ovšem nevykazuje cytotoxické vlastnosti už ani v jednom provedeném testu.

Při studiu vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou byl jasně vyzorován společný efekt pro řadu látek aktivních vůči VZV. Jedná se o deriváty látky **134** (a látku samotnou). Tzn. PME-DAPy substituované v poloze 5 pyrimidinového kruhu funkční skupinou připojenou atomem dusíku. Jedinou pozorovanou výjimkou z tohoto obecného pravidla je látka **91** (5-nitro derivát). Obecné pravidlo tedy může spíše vyžadovat přítomnost elektronového páru na atomu dusíku (který je připojen k poloze 5 pyrimidinového kruhu). Toto pravidlo má pak i logickou souvislost s vlastní koncepcí těchto FAN „s otevřeným

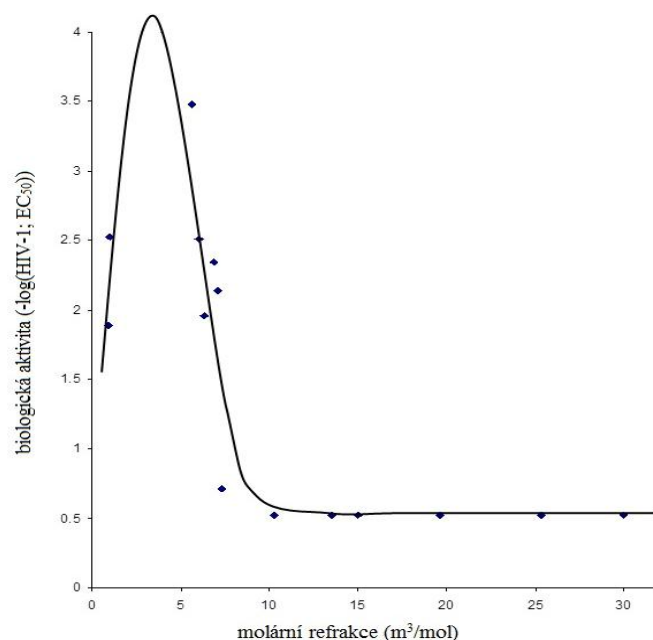
kruhem“. Elektronový pár na atomu dusíku, jenž je připojen k poloze 5 pyrimidinového kruhu, pak napodobuje volný elektronový pár, jenž nese původní purinový analog v poloze 7 (viz obráček 65). Takto vhodně substituované PMEODAPy jsou tak lepšími isoelektronovými analogy purinových nukleotidů než samotná látka **35** (PMEODAPy). Důležitost přítomnosti elektronového páru v poloze 7 purinového kruhu (pro aktivitu PME derivátů vůči VZV) potvrzuje i skutečnost, že 7-deaza-PMEDAP je až 50x méně účinný proti VZV než PMEDAP samotný^[21].



Obráček 65. Přítomnost klíčového elektronového páru. Isoelektronová struktura vhodně substituovaných PMEODAPy s původními purinovými analogy.

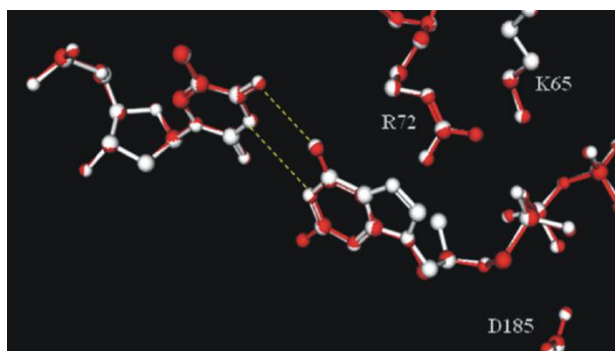
Při interpretaci naměřených aktivit vůči HIV nebyl tento společný efekt elektronového páru pozorován. Při studiu získaných aktivit vůči HIV byl rozpoznán jiný zajímavý efekt ovlivňující biologickou aktivitu připravených 5-substituovaných PMEODAPy. Zjednodušeně řečeno se zdá, že aktivitu proti HIV vykazují pouze PMEODAPy nesoucí v poloze 5 pyrimidinového kruhu objemově malý substituent. Samotný fakt, že 5-methyl PMEODAPy je nejúčinnějším FAN proti HIV a analogická sloučenina nesoucí pouze o jednu methylenovou spojku více (5-ethyl PMEODAPy) je absolutně neaktivní (stejně jako všechny další alkylem substituované PMEODAPy) jasně demonstruje vysoké „nároky“ na vlastnosti substituentu v poloze 5 pyrimidinového kruhu. Pro přesnější vědeckou interpretaci byly použity techniky kvantitativního studia vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (parametrické vlastnosti substituentů). Jako parametr vhodně popisující objem substituentu byla použita molární refrakce (molekulární refraktivita, stérický komplexní strukturní parametr zahrnující právě i schopnost substituentu interagovat s další molekulou - enzymem)^[189]. Obráček 66 znázorňuje závislost aktivity vůči HIV na parametru popisující „efektivní“ molekulový objem substituentu v poloze 5 pyrimidinového kruhu (na obrázku jsou znázorněny aktivity látek připravených dle této disertace společně s látkami popsány v literatuře^[99, 102, 104]).

Dle tohoto zjištění tedy nemá smysl připravenou sérii 5-substituovaných PMEODAPy dále bezmyšlenkovitě rozšiřovat. Pro design nových 5-substituovaných PMEODAPy (jako inhibitorů HIV replikace) jsou tak velmi nadějně substituenty, jejichž molární refrakce je menší jak 7 m³/mol. Pozorovaná aktivita pouze u substituentů s malým molekulovým objemem musí mít i nějakou molekulární podstatu na úrovni interakce 5-substituovaných PMEODAPy s klíčovým enzymem.



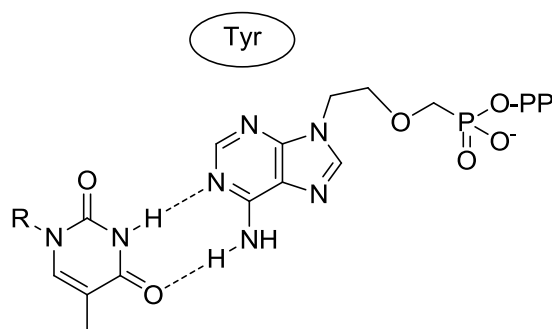
Obrázek 66. Závislost naměřené aktivity vůči HIV na molární refrakci (parametru popisující „efektivní“ molekulový objem) substituentu v poloze 5 pyrimidinového kruhu – modré body (černá křivka znázorňuje orientační proložení). Hodnota 0,5 na ose y reprezentuje neaktivitu látky i v nejvyšší testované koncentraci.

Pro hlubší pochopení vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou jsme proto studovali možnou konformaci PMEODAPy v komplexu s HIV reverzní transkriptázou a narůstající provirovou DNA. Pro tyto studie a úvahy byla použita naměřená struktura stejného komplexu tenofoviru^[190]. I pro plně vědecky věrohodnou analýzu zde není potřeba využívat žádné složité kvantově-chemické simulace. Vazebné místo pro trifosfátovou část molekuly je totiž přesně dáno a vlivem jasného párování s nukleobazí z druhého řetězce, je vazebné místo všech FAN přesně definované. V nedávno uveřejněné publikaci^[100] již byla použita identická metodika studia konformace PMEODAPy při inkorporaci do narůstající provirové DNA. Obrázek 67 znázorňuje publikovanou strukturu možné konformace PMEODAPy v cílovém místě účinku.



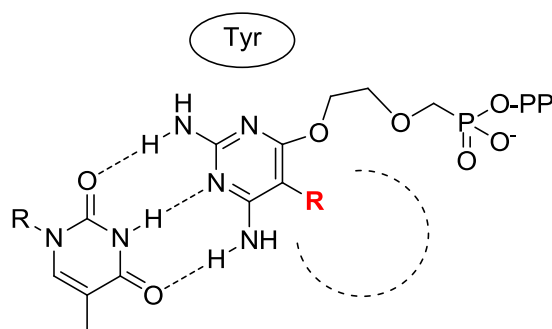
Obrázek 67. Publikovaná^[100] struktura možné konformace PMEODAPy v cílovém místě enzymu. Bíle je znázorněna struktura známého komplexu s tenofovirem^[190]. Červeně je pak znázorněna predikce (v které byl tenofovir nahrazen PMEODAPy), která má zároveň potvrdovat teorii, že PMEODAPy jsou opravdu purinovými analogy.

Pozorované biologické aktivity jsou ovšem v rozporu s touto predikcí. Pro názornost je na obrázku 68 vyobrazený stejný komplex tenofoviru jako na obrázku 67, kde jsou znázorněny pouze molekuly, jež se přímo účastní interakcí s purinovým kruhem (původního tenofoviru).



Obrázek 68. Schématicky znázorněná naměřená^[190] struktura tenofoviru v cílovém místě.

Bylo zjištěno, že v samotné HIV reverzní transkriptáze je jedna důležitá aminokyselina, která se nachází velmi blízko purinového kruhu. Jedná se o aminokyselinu tyrosin, která je v obrázku 68 znázorněna jako elipsa s nápisem Tyr. Aromatický kruh této aminokyseliny uzavírá prostor, do kterého se váže vlastní purinová báze (rovina tyrosinového kruhu je přesně kolmá na rovinu tvořenou kruhem purinovým). Obrázek 69 pak ve stejném formátu popisuje strukturu publikovaného komplexu^[100] (obrázek 67) PMEODAPy s HIV reverzní transkriptázou a narůstající provirovou DNA. Konformace dle obrázku 69 opravdu reprezentuje teorii, že PMEODAPy jsou přesnými analogy purinových FAN. V této konformaci ale směřuje substituent v poloze 5 do vnitřní kavity enzymu, která je poměrně velká (znázorněno tečkovaným kruhem).

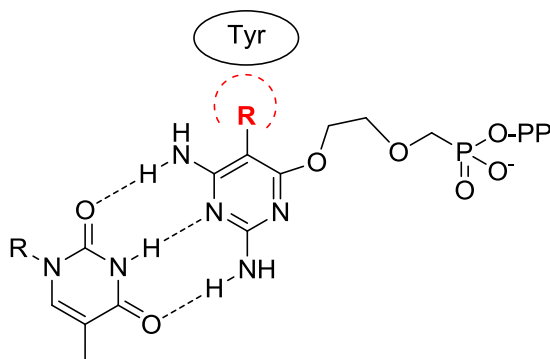


Obrázek 69. Schématicky znázorněná napředikovaná struktura PMEODAPy v cílovém místě, dle literatury^[100].

Zde je potřeba si uvědomit, že molekula PMEODAPy obsahuje (na rozdíl od purinových FAN) jednu jednoduchou vazbu, okolo které může docházet k volné rotaci (vazba mezi pyrimidinovým kruhem a atomem kyslíku acyklické části molekuly). Při rotaci o 180° okolo této vazby získáme strukturu vyobrazenou na obrázku 70. Je možné předpokládat, že vlivem stejného párování je energie této konformace prakticky identická s konformací vyobrazenou na obrázku 69. Jediným rozdílem je velikost kavity, do které směřuje substituent v poloze 5 pyrimidinového kruhu. Velikost tohoto prostoru mezi pyrimidinovým kruhem a aromatickou částí tyrosinu odpovídá velmi dobře nalezené závislosti na obrázku 66 (kdy například methyl

velmi pěkně vyplní vytvořený prostor, zatímco například ethyl není možné do této kavity vůbec umístit).

Pro vysvětlení pozorování na obrázku 66 je možné podat řadu dalších možných vysvětlení, jako například omezená fosforylace PMEODAPy nesoucích velké substituenty v poloze 5. Řada PMEODAPy s velkými substituenty ale vykazuje protivirové aktivity vůči jiným virům a tyto látky jsou tak zřejmě stále účinně fosforylovány (jako např. látka **111** nesoucí celou fenylozskupinu). Je tedy vysoce pravděpodobné, že fosforylace není oním selekčním činitelem.



Obrázek 70. Schématicky znázorněná námi napředikovaná struktura PMEODAPy v cílovém místě korespondující s naměřenými protivirovými aktivitami.

Naší finální hypotézou tak je, že PMEODAPy nejsou přesnými analogy purinových FAN. Jejich mechanismus inkorporace do provirové DNA pomocí HIV reverzní transkriptázy je jiný (u replikace VZV se zdá, že je situace jiná; viz obr. 65). Tuto teorii se nyní snažíme jednoznačně prokázat vypěstováním monokrystalu (vhodného pro rentgenostrukturní analýzu) látky **89** v komplexu s HIV reverzní transkriptázou a narůstající provirovou DNA. Naše teorie nás ovšem vedla dále až k návrhu nové generace FAN. Navržené látky byly připraveny a jejich protivirová aktivita je natolik zajímavá, že tyto sloučeniny nemohou být z důvodů patentové ochrany zatím uveřejněny (patentová přihláška se připravuje, hlavní devízou těchto nových FAN je především jejich nulová cytotoxicita).

4. Závěr

Byl vypracován rozsáhlý přehled současného stavu výzkumu na poli vývoje fosfonátů acyklických nukleosidů (FAN), který cituje 196 prací v abstrahovaných časopisech. Všechny cíle disertační práce bylo úspěšně dosaženo. V průběhu disertační práce bylo řešeno několik témat:

1) Mikrovlnně urychlená příprava dialkyl-halogenalkylfosfonátů

Pro účely zavedení hydroxyalkylfosfonátové funkce se používá v chemii fosfonátů acyklických nukleosidů (FAN) nejčastěji příslušných tosyloxyalkylfosfonátů. Odpovídající syntetické analogy – halogenalkylfosfonáty jsou látky teoreticky dobře dostupné pomocí tzv. Arbuzovovy reakce, kdy reagují dihalogenalkany s trialkylfosfitem. V tomto případě je ale v molekule produktu přítomen stále reaktivní atom halogenu a reakce tak pokračuje dále za vzniku příslušných bisfosfonátů. Tento problém se nám podařilo úspěšně vyřešit pomocí aplikace mikrovlnných (MV) reaktorů, kde za přísné kontroly reakční teploty reaguje selektivně pouze první atom halogenu. Obrázek 71 schematicky znázorňuje přípravu těchto sloučenin společně s jejich potenciálními aplikacemi při vývoji a výrobě léčiv odvozených od FAN, či při výrobě klíčového stimulantu růstu a dozrávání ovoce a zeleniny (ethephonu).



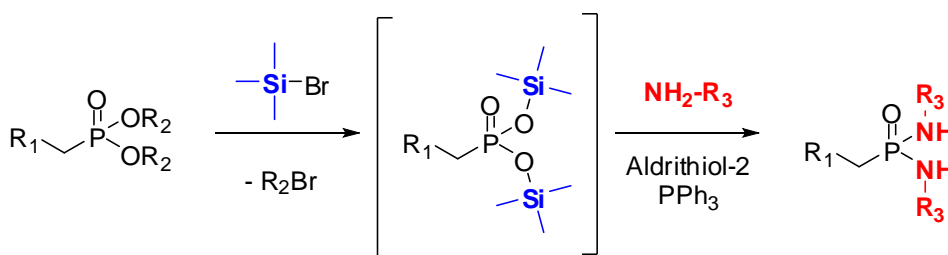
Obrázek 71. Mikrovlnně urychlená příprava dialkyl-halogenalkylfosfonátů a její aplikace.

Pomocí přísné kontroly reakční teploty při ohřívání reakční směsi mikrovlnným zářením jsme byli schopni snížit množství reaktantů až na ideální poměr 1:1. Reakce se navíc provádí bez rozpouštědla a je tak velmi šetrná k životnímu prostředí. Pomocí průtokového mikrovlnného reaktoru jsme byli schopni připravit klíčové stavební bloky pro syntézu FAN v 100 g množstvích, což významně urychlilo výzkum v této oblasti. Postup byl patentován (PV 2010-583 viz sekce 7.) a publikován v prestižním časopise^[191]. Metodika má potenciálně dopad na zlevnění výroby FAN a zrychlení výzkumu při hledání nových FAN. Připravený diisopropylbrommethylfosfonát (**4**) byl také záhy použit pro přípravu celé řady strukturně různorodých FAN^[152] (plus v sekci 6. publikace 20, 21 a 22).

Nalezený postup byl úspěšně aplikován i pro přípravu vybraných arylfosfonátů. Tuto problematiku rozpracoval pod vedením autora předkládané disertační práce student prvního ročníku VŠCHT (Ondřej Hradil). Mezi připravenými sloučeninami se podařilo identifikovat sloučeninu s protivirovými aktivitami proti všem testovaným kmenům chřipky (publikace odeslaná redakci).

2) Nová vysoce efektivní metodika přípravy diamidů FAN, tzv. bisamidátů FAN

FAN jsou látky vysoce polární vlivem čehož je snížena jejich schopnost prostupovat do buněk, kde inhibují např. množení virů. Pro překonání této komplikace se připravují lipofilní proléčiva. Zvláště významnou skupinou látek jsou diamidy FAN s estery esenciálních aminokyselin (tzv. bisamidáty), kde se po uvolnění aktivního FAN vytvoří pouze ona esenciální aminokyselina a tyto proléčiva tak nezvyšují zátěž organismu. V současnosti jsou tři tyto látky v klinických testech na lidských pacientech a další látky jsou ve fázi preklinického vývoje. Příprava a výroba bisamidátů FAN je ale značně náročná a známé postupy poskytují požadované látky v nízkých výtěžcích (20-40%) a nízké čistotě (čištění sloupcovou chromatografií v kombinaci s HPLC). Aplikací jednoduché, ale efektivní myšlenky se nám podařilo docílit téměř kvantitativních výtěžků požadovaných proléčiv ve vysoké čistotě, kde je finální čistící operací (pro získání farmaceuticky čistého produktu) pouze filtrace přes malou vrstvu silikagelu. Náš nový postup vychází přímo z esterů FAN (které se primárně připravují např. pomocí Arbuzovy reakce viz výše), které reagují s trimethylsilylbromidem za vzniku bis(trimethylsilyl)esterů FAN, které jsou dobře rozpustné v organických rozpouštědlech (na rozdíl od FAN) a dobře reaktivní pro následné zavedení esterů aminokyselin (obrázek 72).



Obrázek 72. Efektivní metodika přípravy diamidů FAN s využitím příslušných bis(trimethylsilyl)esterů.

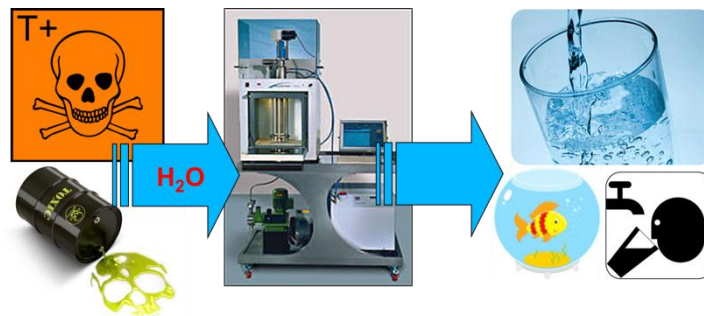
Reakcí s trimethylsilylbromidem se navíc nasilylují přítomné reaktivní skupiny ve zbytku molekuly a tím se zabrání nežádoucím vedlejším reakcím. Pomocí tohoto postupu se nám navíc podařilo identifikovat nové bisamidáty FAN s vysokou aktivitou proti HIV. Postup byl patentován (PV 2011-103 viz sekce 7.) a přijat k publikování (viz sekce 6. publikace 20). Metodika má potenciálně dopad na zlevnění výroby bisamidátů FAN i zrychlení výzkumu při hledání nových proléčiv FAN.

3) Mikrovlnně zahřívání hydrolyza organofosfátů a organofosfonátů

Při studiu mikrovlnným zahříváním urychlených reakcí byl nalezen nový postup pro hydrolyzu organofosfátů a organofosfonátů na fosforečnou kyselinu či příslušné kyseliny fosfonové. Tohoto postupu je možné využít pro přípravu a výrobu FAN, kde byl tento postup úspěšně použit pro nyní už více jak 30 FAN i v několikagramových množstvích. Velkou výhodou nalezeného postupu je skutečnost, že průběh samotné reakce je možné sledovat prakticky okamžitě pouze monitorováním změny tlaku v reakční nádobě. Reakce se navíc provádí pouze pomocí levné kyseliny chlorovodíkové, kdy stačí pouze ekvimolární množství HCl na počet přítomných esterových funkcí. Reakční směs pak není nutné ani neutralizovat a

následně složitě odsolovat. Připravené FAN se následně často samovolně vylučují přímo z reakční směsi. Izolace je pak provedena pouze odfiltrováním vyloučeného produktu. Tohoto postupu bylo velmi úspěšně využito pro přípravu (jinak synteticky těžko dostupných) FAN odvozených od guaninu, hypoxanthinu, 2-chlorhypoxanthinu a xanthinu. Při přípravách těchto sloučenin je navíc možné použít pouze jeden ekvivalent HCl na hydrolýzu obou esterových funkcí (druhý ekvivalent se generuje přímo v reakční směsi hydrolýzou použité chlorpurinové výchozí látky). Překvapivě bylo zjištěno, že dosud neznámá látka PMEX, vykazuje vysoké aktivity vůči HSV. Potenciál této látky je nyní zkoumán v myším modelu HSV infekce. Vybrané FAN byly pomocí tohoto postupu připraveny v množství až desítek gramů. Tyto látky jsou nyní využívány pro další výzkum (především pro přípravu nových typů proléčiv již známých FAN - navázána spolupráce s prof. C. E. McKennou, kterému jsme dodali sérii FAN v gramových množstvích pro vývoj nových proléčiv FAN). Jedna látka byla dokonce připravena v množství 250 g (jednalo se o zakázkovou syntézu a struktura sloučeniny tak zde nemůže být zveřejněna, tato sloučenina je vyvíjena jako potenciální veterinární preparát).

Zde popsaná metodika hydrolýzy diesterů fosfonových kyselin navíc dovoluje kompletní degradaci a deaktivaci organofosfátových a organofosfonátových pesticidů, insekticidů, herbicidů, polutantů, nervově paralytických látek a jejich prekurzorů. Postup byl patentován (PV 2011-325 viz sekce 7.) a výsledky se připravují k publikování v prestižním časopise. Obrázek 73 schematicky zachycuje potenciál nalezeného postupu, kdy je možné pouze pomocí vody a mikrovlnného záření provést hydrolýzu nebezpečných organofosfátů až na kyselinu fosforečnou (její zředěný roztok).



Obrázek 73. Kompletní hydrolýza organofosfátových pesticidů, insekticidů, herbicidů, polutantů, nervově paralytických látek a jejich prekurzorů až na kyselinu fosforečnou.

4) Efektivní přípravy substituovaných PMEODAPy (tzv. FAN s „otevřeným kruhem“)

Hlavním úkolem této disertační práce bylo vypracovat alternativní syntézu nově objevených PMEODAPy. Tento úkol byl též úspěšně splněn. Byla vypracována metodika přípravy základní struktury (PMEODAPy) v 100 g měřítku bez použití složitých čistících metod (publikace se připravuje). Tato syntéza dále umožnila přípravu velké série dále modifikovaných derivátů se zajímavými protivirovými aktivitami. Byly vypracovány tři alternativní postupy pro přípravu kýžených 5-substituovaných PMEODAPy. První postup využívá postupné výstavby celé struktury PMEODAPy již z 5-substituovaných pyrimidinů.

Druhá syntetická cesta využívá přímé modifikace polohy 5 pyrimidinového kruhu pomocí substitučních (elektrofilních či radikálových) reakcí prováděných na diesteru samotného PMEODAPy. Při třetím postupu dochází k přímé modifikaci polohy 5 pyrimidinového kruhu přímo na samotném PMEODAPy (tzn. na fosfonové kyselině). Vysoké konverze, snadná izolace a skutečnost, že se potenciálně biologicky aktivní látky připravují v jednom jediném syntetickém kroku (z lehce dostupné výchozí sloučeniny) činí tuto strategii vysoce přínosnou pro další budoucí modifikace celé rodiny FAN. Vysoký potenciál reakcí přímo na (volných) fosfonových kyselinách demonstruje i fakt, že se pomocí tohoto postupu podařilo připravit i látky, jejichž syntéza z odpovídajících diesterů fosfonových kyseliny není možná.

Některé nové deriváty (substituované především v poloze 5 pyrimidinového kruhu) vykazují mikromolární a submikromolární aktivity proti virům jako HIV, VZV a HSV. Modifikací aktivních látek na lipofilní proléčiva bylo dosaženo dramatického zvýšení protivirové aktivity, kdy některé látky vykazovaly aktivity vůči VZV při koncentracích pouhých několik desítek nanomolů na litr (publikace se připravuje).

Pečlivou interpretací naměřených protivirových aktivit vůči VZV byla formulována teorie o výhodnosti přítomnosti volného elektronového páru na atomu dusíku, který je přímo připojen k poloze 5 pyrimidinového kruhu základního PMEODAPy (tento elektronový pár tak zřejmě napodobuje původní elektronový pár atomu dusíku v poloze 7 kruhu purinového). Při inhibici replikace VZV tak pravděpodobně PMEODAPy účinkují jako pravá analoga purinových FAN.

Systematickou studií vztahů mezi strukturou a protivirovou aktivitou vůči HIV v sérii připravených 5-substituovaných PMEODAPy byla zformulována teorie o možné alternativní konformaci 5-substituovaných PMEODAPy v komplexu s HIV reverzní transkriptázou a narůstající provirovou DNA. Tato teorie měla zásadní vliv na design úplně nové generace FAN. Navržené látky byly připraveny a jejich protivirová aktivita je natolik zajímavá, že tyto sloučeniny nemohou být z důvodů patentové ochrany zatím uveřejněny (patentová přihláška se připravuje, hlavní devízou těchto nových FAN je především jejich nulová cytotoxicita).

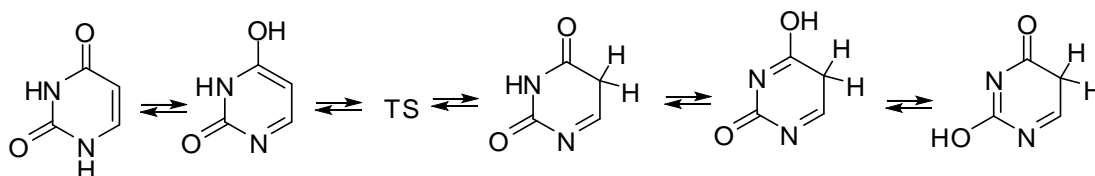
5) Mikrovlnný rozklad DMF a jeho využití

Při přípravách zadaných FAN bylo zjištěno, že se při zahřívání DMF v mikrovlnném reaktoru uvolňuje dimethylamin, který může být přímo synteticky využit. Tuto problematiku (pod vedením autora této disertační práce) následně rozpracovala Lucie Čechová (studentka prvního ročníku VŠCHT). Pro urychlení tohoto rozkladu byl studován vliv teploty a různých aditiv a nalezených výsledků bylo využito pro přípravu celé série purinových derivátů substituovaných dimethylamino skupinou^[183].

6) Experimentální důkaz nového tautomeru uracilu a dalších pyrimidinových derivátů

Během preklinické fáze vývoje dříve zmiňovaných fosfonátů acyklických nukleosidů s otevřeným kruhem bylo zjištěno, že látka nesoucí v poloze 5 pyrimidinového kruhu atom tritia není stálá a samovolně se hydrolyzuje na isotopem neznačenou látku. Toto zajímavé zjištění jsme podrobili (ve spolupráci s Dr. M. Dračínským, na řešení této problematiky se

nám podařilo získat i juniorských grant) intenzivnímu zkoumání. Díky tomu byl nalezen nový tautomer uracilu^[192] nesoucí v poloze 5 pyrimidinového kruhu dva atomy vodíku (mající tedy hybridizaci sp^3 , viz obrázek 74).



Obrázek 74. Tautomerní rovnováha vedoucí k tvorbě dosud nepopsané tautomerní formy uracilu nesoucí v poloze 5 pyrimidinového kruhu dva atomy vodíku (mající hybridizaci sp^3).

Systematickým výzkumem^[193] se nám podařilo zjistit, že vznik tohoto tautomeru je dramaticky urychlen pomocí nukleofilních katalyzátorů (např. pyridinu), čehož bylo využito pro rychlé a levné isotopové značení uracilových derivátů tritiem pomocí výměny v T_2O za katalýzy pyridinem (přijato k publikování, viz sekce 6. publikace 23).

Další aktivity spojené s vědeckou činností:

V roce 2006 jsem dostal za úkol naplánovat, zařídit a vybavit novou laboratoř prof. Holého na UOCHB (pro 5 lidí). Ještě ten samý rok už začala laboratoř č. 180 produkovat nové výsledky a já jsem byl pověřen prof. Holým vedením této laboratoře.

V roce 2010 jsem prakticky sám připravil žádost (čítající i s přílohami 120 stran) o grant (Cílený vývoj léčiv použitelných k ochraně obyvatelstva před bioterorismem. Vývoj a studium účinných inhibitorů adenylátcyklasového toxinu patogenů *Bordetella pertusis* a *Bacillus anthracis*.) s rozpočtem okolo 45 mil. Kč. Tento grant nám byl následně udělen Ministerstvem vnitra ČR (naš projekt byl dokonce vyhodnocen jako nejlepší ze všech předložených projektů, dle použité metodiky hodnocení).

5. Experimentální část

5.1. Přístroje a materiál

Body tání byly měřeny na přístroji Büchi B-540. Analytická chromatografie na tenké vrstvě (TLC) byla prováděna na fóliích s fluorescenčním indikátorem Silica gel 60 F254 foils (Merck). Pro preparativní chromatografii byl použit Silikagel 60 (Merck). *N,N*-dimethylformamid, acetonitril a pyridin byly destilovány od P_2O_5 a skladovány nad molekulovými sítí. Pokud není uvedeno jinak, rozpouštědla byla odpařována na vakuové rotační odparce při 2 kPa a teplotě lázně v rozmezí 40-45 °C, látky byly sušeny při 100 Pa při teplotě 30 °C pomocí vakuové sušárny (Thermo). Hmotnostní spektra byla měřena na několika instrumentech: 1) na spektrometru ZAB-EQ (VG Analytical) – ionizace FAB (ionizace pomocí Xe, urychlující napětí 8 kV, jako matrice použita směs thioglycerolu a glycerolu (3:1) nebo bis(2-hydroxyethyl)disulfid), 2) na přístroji LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) – ionizace ESI, 3) na přístroji GCT Premier (Vodas) – ionizace EI. 1H NMR spektra byla měřena na spektrometru Bruker Avance II-600 nebo Bruker Avance II-500 instruments (600.1 resp. 500.0 MHz pro 1H a 150.9 resp. 125.7 MHz for ^{13}C). Jako rozpouštědlo byl použit hexadeuteriodimethylsulfoxid (DMSO- d_6) - měření vztaženo k signálu rozpouštědla δ 2,50 ppm a deuteriochloroform ($CDCl_3$) s vnitřním standardem tetramethylsilanem (TMS). Chemické posuny jsou uvedeny v ppm, interakční konstanty (J) v Hz. Elementární analýzy byly měřeny na přístroji Perkin–Elmer CHN Analyzer 2400, Series II (Perkin–Elmer). Multiprvková analýza byla provedena pomocí rentgenového fluorescenčního analyzátoru SPECTRO iQ II (SPECTRO Analytical Instruments).

Mikrovlnné (MV) zahřívání bylo prováděno v následujících komerčních mikrovlnných reaktorech: Typ I – Discover s modulem Explorer (CEM), zařízení se soustředěným MV zahříváním (MV výkon 0-300 W, navyšování po 1 W, infračervený (IČ) teplotní senzor, možnost práce v otevřené či uzavřené nádobě, rozmezí pracovních tlaků 0-20 bar, objem reakční nádoby 10 ml či 80 ml); Typ II – Initiator (Biotage), zařízení s nesoustředěným MV zahříváním (MV výkon 0-400 W, navyšování po 1 W, IČ teplotní senzor, možnost práce pouze v uzavřené nádobě, rozmezí pracovních tlaků 0-20 bar, objem reakční nádoby 5 ml); Typ III – BatchSYNTH (Milestone), zařízení pro poloprovozní výroby (MV výkon 0-1000 W, navyšování po 10 W, vnitřní teplotní senzor, vsádkový mód, rozmezí pracovních tlaků 0-30 bar, objem reakční nádoby 250 ml); Typ IV – FlowSYNTH (Milestone), průtokový poloprovozní reaktor (MV výkon 0-1000 W, navyšování po 10 W, vnitřní teplotní senzor, průtokový mód, rozmezí pracovních tlaků 0-30 bar, objem reakční nádoby 200 ml, průtok 1-100 ml/min). GC/MS analýzy byly měřeny na plynovém chromatografu 6890N (Agilent) připojeném ke kvadrupólovému hmotnostnímu detektoru. Pro analýzy byla použita kapilára s označením HP 5ms (30 m \times 0,25 mm; 0,25 μ m; Agilent). Nosným plynem bylo hélium s průtokem 1 ml/min. Vakuové destilace byly prováděny s využitím chemické hybridní pumpy RC6 (VACUUBRAND). Velikost vakua byla měřena pomocí detektoru VAP5 (VACUUBRAND) s deklarovanou chybou měření $\pm 10\%$.

5.2. Popis procedury sekurace

Uzavřené reakční zkumavky či reakční nádoby s namíchanou reakční směsí byly prostřednictvím septa s jehlou připojeny k lince pro aplikaci vakua a inertní atmosféry. Za intenzivního míchání magnetickým míchadlem byl nejprve připojen zdroj vakua, který byl udržován v činnosti, dokud se nepřestaly objevovat bublinky vzduchu/plynu. Následně byla reakční směs sycena argonem. Tento cyklus střídavé aplikace vakua a argonu byl několikrát opakován (viz detailní popis reakčního postupu).

5.3. Přípravy dialkyl-halogenalkyloxyalkylfosfonátů a dialkyl-halogenalkylfosfonátů pomocí mikrovlnně zahřívání Michaelisovy-Arbuzovovy reakce

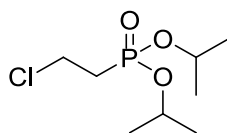
5.3.1. Přípravy diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu (1)

Příprava diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu (1) (viz Tabulka 2, navážka 19)

Triisopropylfosfit (2,0 ml; 8 mmol) a 1,2-dichlorethan (2,2 ml; 32 mmol) byly předloženy do MV zkumavky o objemu 10 ml, celá reakční směs byla sekurována (5x) a za míchání MV zahřívána v reaktoru typu I na 190 °C po dobu 160 min (max. výkon 300 W). Následně byl postup opakován devětkrát. Všechny 10 takto získaných reakčních směsí bylo společně odpařeno na vakuové rotační odparce (65 °C; 2 mbar). Dle GC/MS analýzy obsahovala tato surová reakční směs požadovaný produkt ve velkém množství (> 90 %) a hlavní nečistotou byl triisopropyl-fosfát. Čistý diisopropyl-2-chlorethylfosfonát (1) byl izolován v 83% teoretickém výtěžku (15,2 g) vakuovou destilací při teplotě 74-75 °C a tlaku 0,056 mbar.

Příprava diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu (1) (viz Tabulka 2, navážka 30)

Triisopropylfosfit (4,0 ml; 16 mmol) a 1,2-dichlorethan (1,3 ml; 19 mmol) byly předloženy do MV zkumavky o objemu 10 ml, celá reakční směs byla sekurována (5x) a za míchání MV zahřívána v reaktoru typu I na 190 °C po dobu 190 min (max. výkon 300 W). Tento postup byl opakován devětkrát. Všechny 10 takto získaných reakčních směsí bylo následně společně odpařeno na vakuové rotační odparce (65 °C, 2 mbar). Dle GC/MS analýzy obsahovala tato surová reakční směs požadovaný produkt ve velkém množství (> 88 %) a hlavními nečistotami byly triisopropyl-fosfát a tetraisopropyl-ethylenbisfosfonát. Čistý diisopropyl-2-chlorethylfosfonát (1) byl izolován v 74% teoretickém výtěžku (27,2 g) vakuovou destilací při teplotě 72-73 °C a tlaku 0,051 mbar.



Diisopropyl-2-chlorethylfosfonát (1): bezbarvý olej, bod varu (b.v.) 74-75 °C při tlaku 0,056 mbar, nebo 72-73 °C při tlaku 0,051 mbar. GC/MS-EI (R_T 16,75 min), m/z (%): 145 [volná kyselina⁺] (100). FABMS, m/z (%): 229 [M^+] (26), 191 (19), 145 [volná kyselina⁺] (100). ¹H NMR (DMSO- d_6): 4,58 dsept, 2 H, $J(1',2') = 6,2$, $J(1',P) = 7,9$ (H-1'); 3,69 dm, 2 H, $J(2,P) = 11,0$ (H-2); 2,26 dm, 2 H, $J(1,P) = 18,3$ (H-1); 1,25 d, 12 H, $J(2',1') = 6,2$ (H-2'). ¹³C NMR (DMSO- d_6): 70,03 d, $J(1',P) = 6,4$ (C-1'); 38,66 (C-2); 30,50 d, $J(1,P) = 136,3$ (C-1); 23,92 d a 23,86 d, $J(2',P) = 3,9$ a $J(2',P) = 4,8$ (C-2'). Pro C₈H₁₈ClO₃P (228,7) vypočteno (%): C 42,02; H 7,93; Cl 15,51; P 13,55; nalezeno (%): C 41,95; H 8,04; Cl 15,47; P 13,43.

5.3.2. Přípravy diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonátu (2)

Příprava diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonátu (2) (odpovídající navážce 19 z Tabulky 2)

Triisopropylfosfit (2,0 ml; 8 mmol) a 2,2'-dichlordiethylether (3,8 ml; 32 mmol) byly předloženy do MV zkumavky o objemu 10 ml, celá reakční směs byla sekurována (5x) a za míchání MV zahřívána v reaktoru typu I na 190 °C po dobu 160 min (max. výkon 300 W). Tento postup byl opakován devětkrát. Všechny 10 takto získaných reakčních směsí bylo následně společně odpařeno na vakuové rotační odparce (70 °C, 2 mbar). Dle GC/MS analýzy obsahovala tato surová reakční směs požadovaný produkt ve velkém množství (> 90 %). Čistý diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonát (2) byl izolován vakuovou destilací při teplotě 102-104 °C a tlaku 0,5 mbar v 81% teoretickém výtěžku (17,7 g).

Pro zvýšení kapacity přípravy byly použity následující postupy:

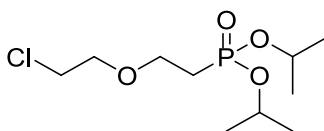
Příprava diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonátu (2) (odpovídající navážce 30 z Tabulky 2)

Triisopropylfosfit (32,0 ml; 130 mmol) a 2,2'-dichlordiethylether (18,3 ml; 156 mmol) byly předloženy do MV zkumavky o objemu 80 ml, celá reakční směs byla sekurována (5x) a za míchání MV zahřívána v reaktoru typu I na 190 °C po dobu 190 min (max. výkon 300 W). Reakční směs byla následně odpařena na vakuové rotační odparce (70 °C, 2 mbar). Dle GC/MS analýzy obsahovala tato surová reakční směs požadovaný produkt ve velkém množství (> 90 %) a byla kontaminována především odpovídajícím bisfosfonátem. Čistý diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonát (2) byl izolován vakuovou destilací při teplotě 101-102 °C za tlaku 0,47 mbar v 73% teoretickém výtěžku (25,9 g).

Optimalizace přípravy diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonátu (2) v průtokovém mikrovlnném reaktoru

Triisopropylfosfit (320 ml; 1,30 mol) a 2,2'-dichlordiethylether (183 ml; 1,56 mol) byly

předloženy do baňky s obsahem 1000 ml. Reakční směs byla sekurována (5x) a připojena ke kontinuálnímu průtokovému MV reaktoru – typu IV, který byl napuštěn CH₃CN (pro kontrolu tlakové těsnosti). Teplota reakční směsi v 1000 ml baňce byla udržována na 60 °C olejovou lázní. Při této teplotě byl následně destilací odstraněn vznikající isopropylchlorid (který se vrací z MV reaktoru spolu s částečně zreagovanou reakční směsí). Reakční směs byla poté MV zahřívána (max. výkon 500 W) tak, že reakční teplota postupně vzrůstala ze 120 °C na 210 °C v krocích po 10 °C během 7 h při průtoku 40 ml/min, kdy se částečně zreagovaná reakční směs vracela zpět do zásobní 1000 ml baňky. Po každém navýšení byl odebrán vzorek reakční směsi opouštějící MV reaktor na GC/MS analýzu (viz Tabulka 3). Při 210 °C došlo dle GC/MS analýzy reakční směsi k plné konverzi. Reakční směs byla následně odpařena na vakuové rotační odparce (70 °C, 2 mbar). Dle GC/MS analýzy tato surová reakční směs obsahovala požadovaný produkt ve velkém množství (> 80 %). Čistý diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonát (**2**) byl izolován vakuovou destilací při teplotě 85-87 °C za tlaku 0,32 mbar v 70% teoretickém výtěžku (249 g).

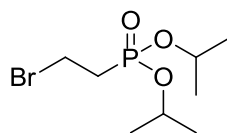


Diisopropyl-2-(2-chlorethoxy)ethylfosfonát (2): bezbarvý olej, b.v. 85-87°C při tlaku 0,32 mbar, nebo 102-104°C při tlaku 0,5 mbar, či 101-102°C při tlaku 0,47 mbar. GC/MS-EI (R_T 16,60 min), m/z (%): 189 [volná kyselina⁺] (76), 125 [volná kyselina⁺ -C₂H₄Cl] (100). FABMS, m/z (%): 295 [M+Na⁺] (49), 273 [M⁺] (81), 189 [volná kyselina⁺] (100). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 4,56 dsept, 2 H, $J(1'',2'') = 6,2$, $J(1'',P) = 8,0$ (H-1''); 3,57-3,74 m, 6 H, (H-2; H-1'; H-2'); 2,01 dm, 2H, $J(1,P) = 18,7$ (H-1); 1,23 d, 6 H a 1,23 d, 6 H, $J(2'',1'') = 6,2$ a $J(2'',1'') = 6,2$ (H-2''). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 70,34 (C-1'); 69,60 d, $J(1'',P) = 6,2$ (C-1''); 64,80 (C-2); 43,79 (C-2'); 27,42 d, $J(1,P) = 138,2$ (C-1); 24,03 d a 23,97 d, $J(2'',P) = 3,7$ a $J(2'',P) = 4,9$ (C-2''). Pro C₁₀H₂₂ClO₄P (272,7) vypočteno (%): C 44,04; H 8,13; Cl 13,00; P 11,36; nalezeno (%): C 43,93; H 8,18; Cl 13,11; P 11,38.

5.3.3. Příprava diisopropyl-2-bromethylfosfonátu (3)

Příprava diisopropyl-2-bromethylfosfonátu (3) (viz Tabulka 4, navázka 6)

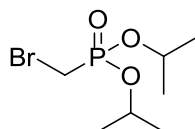
Triisopropylfosfit (4,0 ml; 16 mmol) a 1,2-dibromoethan (1,7 ml; 19,2 mmol) byly předloženy do MV zkumavky o objemu 10 ml, celá reakční směs byla sekurována (5x) a za míchání MV zahřívána pomocí reaktoru typu I na 170 °C (max. výkon 300 W). Tento pokus byl následně opakován devětkrát. Všech 10 takto získaných reakčních směsí bylo následně společně odpařeno na vakuové rotační odparce (65 °C, 2 mbar). Dle GC/MS analýzy obsahovala tato surová reakční směs požadovaný produkt ve velkém množství (> 95 %) a hlavními nečistotami byly triisopropyl-fosfát a odpovídající bisfosfonát. Čistý diisopropyl-2-bromethylfosfonát (**3**) byl izolován vakuovou destilací při teplotě 82-83 °C za tlaku 0,053 mbar v 84% teoretickém výtěžku (36,6 g). Dle GC/MS analýzy obsahoval konečný produkt odpovídající bisfosfonát v množství 2,6%.



Diisopropyl-2-bromomethylfosfonát (3): bezbarvý olej, b.v. 82-83 °C/0,053 mbar. GC/MS-EI (R_T 13,93 min), m/z (%): 191 a 189 [volná kyselina⁺] (100). FABMS, m/z (%): 297 a 295 [M+Na⁺] (9), 275 a 273 [M⁺] (23), 191 a 189 [volná kyselina⁺] (100). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 4,58 dsept, 2 H, $J(1',2') = 6,2$, $J(1',P) = 7,9$ (H-1'); 3,52 dm, 2 H, $J(2,P) = 10,1$ (H-2); 2,36 dm, 2 H, $J(1,P) = 18,5$ (H-1); 1,24 d, 12 H, $J(2',1') = 6,2$ (H-2'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 70,21 d, $J(1',P) = 6,4$ (C-1'); 30,90 d, $J(1,P) = 133,8$ (C-1); 25,81 (C-2); 23,99 d a 23,93 d, $J(2',P) = 3,9$ a $J(2',P) = 4,7$ (C-2'). Pro C₈H₁₈BrO₃P (273,1) vypočteno (%): C 35,18; H 6,64; Br 29,26; P 11,34; nalezeno (%): C 35,24; H 6,57; Br 29,05; P 11,47.

5.3.4. Příprava diisopropyl-bromomethylfosfonátu (4)

Triisopropylfosfit (4,0 ml; 16 mmol) a dibrommethan (1,4 ml; 19,2 mmol) byly předloženy do MV zkumavky o objemu 10 ml, celá reakční směs byla sekurována (5x) a za míchání MV zahřívána v reaktoru typu I na 150 °C po dobu 30 min (max. výkon 300 W). Tento postup byl opakován ještě devětkrát. Všech 10 takto získaných reakčních směsí bylo následně společně odpařeno na vakuové rotační odparce (65 °C, 2 mbar). Dle GC/MS analýzy obsahovala tato surová reakční směs požadovaný produkt ve velkém množství (> 95 %), kde hlavní nečistotou byl odpovídající bisfosfonát. Čistý diisopropyl-bromomethylfosfonát (4) byl izolován vakuovou destilací při teplotě 93-95 °C za tlaku 0,26 mbar v 78% teoretickém výtěžku (32,2 g).



Diisopropyl-bromomethylfosfonát (4): bezbarvý olej, b.v. 93-95 °C/0,26 mbar. GC/MS-EI (R_T 12,76 min), m/z (%): 177 a 175 [volná kyselina⁺] (100). FABMS, m/z (%): 261 a 259 [M⁺] (11), 177 a 175 [volná kyselina⁺] (100). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 4,62 dsept, 2 H, $J(1',2') = 6,2$, $J(1',P) = 7,1$ (H-1'); 3,25 d, 2 H, $J(1,P) = 9,7$ (H-1); 1,37 d, 6 H a 1,37 d, 6 H, $J(2',1') = 6,2$, $J(2',1') = 6,2$ (H-2'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 72,10 d, $J(1',P) = 6,9$ (C-1'); 23,96 d a 23,76 d, $J(2',P) = 4,1$ a $J(2',P) = 5,3$ (C-2'); 18,74 d, $J(1,P) = 159,5$ (C-1). Pro C₇H₁₆BrO₃P (259,1) vypočteno (%): C 32,45; H 6,22; Br 30,84; P 11,96; nalezeno (%): C 32,57; H 6,20; Br 30,75; P 11,84.

5.3.5. Příprava diisopropyl-jodmethylfosfonátu (5)

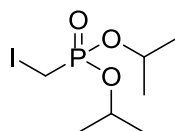
Příprava diisopropyl-jodmethylfosfonátu (5) (viz Tabulka 5, navázka 9)

Triisopropylfosfit (4,0 ml; 16,0 mmol), diiodmethan (1,3 ml; 16,0 mmol) a diisopropyl-jodmethylfosfonát (5) (0,1 ml; 0,5 mmol) byly předloženy do MV zkumavky o objemu 10 ml, celá reakční směs byla sekurována (5x) a za míchání MV zahřívána v reaktoru typu I na 90 °C po dobu 200 min (max. výkon 50 W). Tento postup byl opakován ještě devětkrát. Následně bylo všech 10 takto získaných reakčních směsí společně odpařeno na vakuové rotační odparce (65 °C, 2 mbar). Dle GC/MS analýzy obsahovala tato surová reakční směs požadovaný produkt ve velkém množství (> 90 %), kde hlavní nečistotu tvořil odpovídající bisfosfonát. Čistý diisopropyl-jodmethylfosfonát (5) byl izolován vakuovou destilací při teplotě 76-77 °C za tlaku 0,05 mbar v 86% teoretickém výtěžku (43,3 g).

Ke zvýšení kapacity přípravy byla reakce provedena s využitím MV reaktoru typu III.

Příprava diisopropyl-jodmethylfosfonátu (5) (viz Tabulka 6, navázka 5)

Triisopropylfosfit (113 ml; 470 mmol), diiodmethan (38 ml; 470 mmol) a diisopropyl-jodomethylfosfonát (5) (1 ml; 5 mmol) byly předloženy do reakční nádoby o objemu 250 ml MV reaktoru typu III, celá reakční směs byla sekurována (5x) a za míchání MV zahřívána pomocí reaktoru typu III na 120 °C po dobu 120 min (max. výkon 100 W). Reakční směs byla následně odpařena na vakuové rotační odparce (69 °C, 2 mbar). Dle GC/MS analýzy obsahovala tato surová reakční směs požadovaný produkt ve velkém množství (> 90 %), kde hlavní nečistotu představoval odpovídající bisfosfonát. Čistý diisopropyl-jodmethylfosfonát (5) byl izolován vakuovou destilací při teplotě 75-76 °C za tlaku 0,05 mbar v 80% teoretickém výtěžku (116 g).

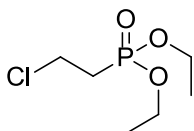


Diisopropyl-jodmethylfosfonát (5): bezbarvý olej, b.v. 75-77 °C/0,05 mbar. GC/MS-EI (R_T 14,03 min), m/z (%): 223 [volná kyselina⁺] (100). FABMS, m/z (%): 329 [M+Na⁺] (17), 307 [M⁺] (34), 223 [volná kyselina⁺] (100). ¹H NMR (DMSO- d_6): 4,76 dsept, 2 H, $J(1',2') = 6,2$, $J(1',P) = 7,6$ (H-1'); 3,01 d, 2 H, $J(1,P) = 10,3$ (H-1); 1,36 m, 12 H, (H-2'). ¹³C NMR (DMSO- d_6): 71,99 d, $J(1',P) = 6,5$ (C-1'); 23,97 d a 23,80 d, $J(2',P) = 3,7$ a $J(2',P) = 5,3$ (C-2'); 12,70 d, $J(1,P) = 156,8$ (C-1). Pro C₇H₁₆IO₃P (306,1) vypočteno (%): C 27,47; H 5,27; I 41,46; P 10,12; nalezeno (%): C 27,58; H 5,34; I 41,40; P 10,19.

5.3.6. Příprava diethyl-2-chlorethylfosfonátu (6)

Triethylfosfit (2,8 ml; 16 mmol) a 1,2-dichlorethan (4,5 ml; 64 mmol) byly předloženy do MV zkumavky o objemu 10 ml, celá reakční směs byla sekurována (5x) a za míchání MV zahřívána v reaktoru typu I na 190 °C po dobu 120 min (max. výkon 300 W). Tento postup

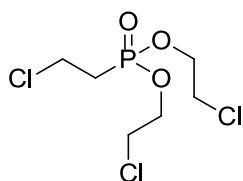
byl opakován ještě devětkrát. Všechno 10 takto získaných reakčních směsí bylo následně společně odpařeno na vakuové rotační odparce (65 °C, 2 mbar). Dle GC/MS analýzy tato surová reakční směs obsahovala požadovaný produkt ve směsi s diethyl-ethylfosfonátem. Diethyl-2-chlorethylfosfonát (**6**) byl izolován vakuovou destilací při teplotě 74-75 °C za tlaku 0,08 mbar v 62% teoretickém výtěžku (19,8 g).



Diethyl-2-chlorethylfosfonát (6): bezbarvý olej, b.v. 74-75 °C/0,08 mbar. GC/MS-EI (R_T 12,12 min), m/z (%): 145 [volná kyselina⁺] (90), 138 [M^+ -C₂H₄Cl] (100). FABMS, m/z (%): 201 [M^+] (100), 145 [volná kyselina⁺] (38). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 4,13 m, 4 H, (H-1'); 3,72 dm, 2 H, $J(2,P) = 9,4$ (H-2); 2,30 dm, 2 H, $J(1,P) = 18,5$ (H-1); 1,34 t, 6 H, $J(2',1') = 7,0$ (H-2'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 61,97 d, $J(1',P) = 6,5$ (C-1'); 37,59 (C-2); 30,29 d, $J(1,P) = 136,9$ (C-1); 16,37 d, (2',P) = 5,9 (C-2'). Pro C₆H₁₄ClO₃P (200,6) vypočteno (%): C 35,92; H 7,03; Cl 17,67; P 15,44; nalezeno (%): C 36,18; H 7,14; Cl 17,49; P 15,53.

5.3.7. Tvorba bis(2-chlorethyl)-2-chlorethylfosfonátu (**7**) při MV zahřívání směsi tris(2-chlorethyl)fosfitu a dibrommethanu.

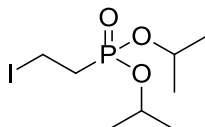
Tris(2-chlorethyl)fosfit (4,3 g; 16 mmol) a dibrommethan (1,4 ml; 19,2 mmol) byly předloženy do 10 ml MV vialky, celá reakční směs byla sekurována (5x) a za míchání MV zahřívána pomocí reaktoru typ I na 170 °C po dobu 60 min (max. výkon 300W). Tento pokus byl opakován 9krát. Všechno 10 takto získaných reakčních směsí bylo následně společně odpařeno na vakuové rotační odparce (65 °C, 2 mbar). Dle GC/MS analýzy obsahuje tato surová reakční směs bis(2-chlorethyl)-2-chlorethylfosfonát ve vysokém množství (>90%). Tento produkt byl následně izolován vakuovou destilací při teplotě 83-84 °C za tlaku 0,05 mbar v 83% teoretickém výtěžku (35,5 g).



Bis(2-chlorethyl)-2-chlorethylfosfonát (7): bezbarvý olej, b.v. 83-84 °C/0,05 mbar. GC/MS-EI (R_T 17,86 min), m/z (%): 235, 233 [M^+ -HCl] (100). FABMS, m/z (%): 293, 291 [$M+Na^+$] (13), 271, 269 [M^+] (54), 154 (100), 145 [volná kyselina⁺] (31). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 4,33 m, 4 H, (H-1'); 3,77 dm, 2 H, $J(2,P) = 11,3$ (H-2); 3,73 t, 4 H, $J(2',1') = 5,5$ (H-2'); 2,42 dm, 2 H, $J(1,P) = 18,7$ (H-1). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 65,54 d, $J(1',P) = 6,3$ (C-1'); 42,85 d, $J(2',P) = 6,5$ (C-2'); 37,10 (C-2); 30,08 d, $J(1,P) = 138,3$ (C-1). Pro C₆H₁₂Cl₃O₃P (269,5) vypočteno (%): C 26,74; H 4,49; Cl 39,47; P 11,49; nalezeno (%): C 26,53; H 4,51; Cl 39,26; P 11,65.

5.3.8. Příprava diisopropyl-2-jodethylfosfonátu (8)

Sušený jodid sodný (15 g, 100 mmol) byl přidán do roztoku diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu (2.3 g, 10 mmol) v suchém acetonu (30ml) a celá reakční směs byla zahřívána k refluxu po dobu 16 hodin. Získaný odparek byl po odpaření acetonu rozsuspendedován v etheru (30ml). Etherický roztok byl promyt nasyceným roztokem thiosíranu sodného (3x10 ml) a sušen pomocí bezvodého síranu hořečnatého. Po odfiltrování sušidla a odpaření etheru na vakuové rotační odparce byl požadovaný produkt izolován pomocí vakuové destilace při teplotě 89-91 °C za tlaku 0,05 mbar v 88% teoretickém výtěžku (2,8 g).



Diisopropyl-2-jodethylfosfonát (8): bezbarvý olej, b.v. 89-91 °C/0,05 mbar. FABMS, m/z (%): 321 [M^+] (9), 181 (100). 1H NMR (DMSO- d_6): 4,57 dsept, 2 H, $J(1',2') = 6,2$, $J(1',P) = 7,9$ (H-1'); 3,21 m, 2 H, (H-2); 2,37 dm, 2 H, $J(1,P) = 18,4$ (H-1); 1,24 d, 12 H, $J(2',1') = 6,2$ (H-2'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 70,04 d, $J(1',P) = 6,4$ (C-1'); 31,92 d, $J(1,P) = 132,3$ (C-1); 23,89 m (C-2'); 5,06 d, $J(2,P) = 3,7$ (C-2); Pro $C_8H_{18}IO_3P$ (320,1) vypočteno (%): C 30,02; H 5,67; I 39,64; P 9,68; nalezeno (%): C 30,23; H 5,83; I 39,25; P 9,87.

5.4. Přípravy fosfonových kyselin pomocí mikrovlnně zahřívání hydrolyzy příslušných diesterů

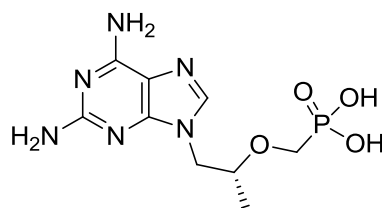
Obecný postup přípravy substituovaných fosfonových kyselin hydrolyzou příslušných esterů:

1 mmol diesteru fosfonové kyseliny (výchozí látka byla připravena dle literatury, která je stejná pro následnou fosfonovou kyselinu, viz jednotlivé příklady) byl předložen do 10 ml reakční zkumavky společně s magnetickým míchadlem a určitým množstvím kyseliny chlorovodíkové (viz jednotlivé příklady). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na určitou teplotu po určitou dobu (viz jednotlivé příklady). Po ochlazení reakční směsi byla fosfonová kyselina izolována dle postupu pro jednotlivé příklady. Vlivem vysoké rozmanitosti připravovaných sloučenin není možné popsat univerzální postup přípravy a izolace. Pro přesný popis provedených experimentů je potřeba uvést konkrétní postupy, teploty, navážky, srážecí a krystalizační roztoky (tak jak je to uvedeno pro jednotlivé přípravy; odpovídající měrou tím narůstá rozsah experimentální části **5.4.**).

Pro jednoznačnou identifikaci známých fosfonových kyselin bylo (vlivem přístupu ke vzorkům prof. A. Holého) provedeno měření směsných ^{13}C NMR spekter látky připravené dle této disertační práce (2 díly) a látky připravené dle literatury (1 díl) – odkazy na literaturu jsou uvedeny u jednotlivých příkladů.

5.4.1. Příprava (*R*)-1-(2,6-diamino-9*H*-purin-9-yl)propan-2-yloxymethylfosfonové kyseliny (**9**)

Vlivem přítomné ne zcela hydrolyticky stálé DAP skupiny je potřeba snížit reakční teplotu pod 150°C (při které už částečně dochází k hydrolytické transformaci DAP skupiny na skupinu guaninovou). Tuto reakci je dále možné potlačit provedením reakce ve zředěnější kyselině chlorovodíkové. Do 10 ml reakční zkumavky proto bylo předloženo 386 mg (1 mmol) (*R*)-diisopropyl-1-(2,6-diamino-9*H*-purin-9-yl)propan-2-yloxymethylfosfonátu a 4 ml 0,5 M vodné kyseliny chlorovodíkové (2 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 130°C po dobu 10 minut. Průběh reakce pomocí sledování změny tlaku v reakční nádobě je znázorněn na obrázku 47. Po ochlazení reakční směsi na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován z vody, kde bylo po následném ochlazení přidáno ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité vody za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 234 mg (77% teorie) požadovaného produktu (při pokusu ze 100 mmol výchozí látky byla pomocí MV reaktoru typ III za jinak analogických podmínek získána látka **9** ve výtěžku 23,80 g = 79% teorie).

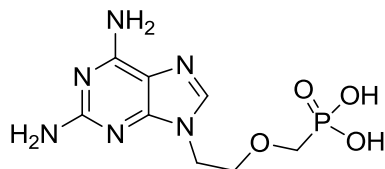


(*R*)-1-(2,6-Diamino-9*H*-purin-9-yl)propan-2-yloxymethylfosfonová kyselina (9**):** směsná ¹³C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle [221]. Pro C₉H₁₅N₆O₄P (302,1) vypočteno (%): C 35,77; H 5,00; N 27,81; nalezeno (%): C 35,54; H 5,23; N 27,59. MS ESI(-), *m/z* (%): 301 [M⁻] (100). Optická čistota (%): 99,2 – stanoveno pomocí chirální kapilární elektroforézy dle [162]. Chemická čistota byla též určena pomocí multiprvkové elementární analýzy, kde kontrolní vzorek připravený dle [221] jednoznačně obsahuje křemík (jenž pochází z použitého trimethylsilylbromidu). Naproti tomu, vzorek připravený pomocí MV ohřívání hydrolyzy, kromě očekávaného fosforu, žádný další prvek těžší než sodík neobsahuje (použitý disperzní rentgenový fluorescenční analyzátor SPECTRO iQ II - SPECTRO Analytical Instruments detekuje pouze prvky těžší než sodík).

5.4.2. Příprava 2-(2,6-diamino-9*H*-purin-9-yl)ethyloxymethylfosfonové kyseliny (**10**)

Do 10 ml reakční zkumavky bylo předloženo 372 mg (1 mmol) diisopropyl-2-(2,6-diamino-9*H*-purin-9-yl)ethyloxymethylfosfonátu a 4 ml 0,5 M vodné kyseliny chlorovodíkové (2 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 130°C po dobu 20 minut. Po ochlazení reakční směsi na 0°C

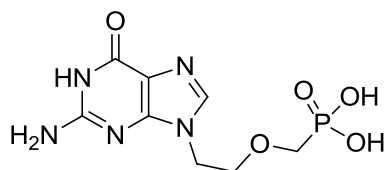
došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován z vody, kde bylo po následném ochlazení přidáno ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité vody za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 225 mg (78% teorie) požadovaného produktu.



2-(2,6-Diamino-9H-purin-9-yl)ethoxymethylfosfonová kyselina (10): směsná ^{13}C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle ^[20]. Pro $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_6\text{O}_4\text{P}$ (288,1) vypočteno (%): C 33,34; H 4,55; N 29,16; nalezeno (%): C 33,54; H 4,84; N 29,03. MS ESI(-), m/z (%): 287 [M] (100).

5.4.3. Příprava 2-(2-amino-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)ethoxymethylfosfonové kyseliny (11)

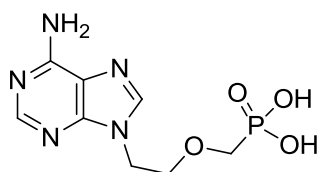
Do 10 ml reakční zkumavky bylo předloženo 373 mg (1 mmol) diisopropyl-2-(2-amino-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)ethoxymethylfosfonátu a 2 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (2 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 140°C po dobu 10 minut. Po přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován ze směsi voda/ethanol, kde bylo po následném ochlazení přidáno ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité směsi za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 269 mg (93% teorie) požadovaného produktu (při pokusu z 50 mmol výchozí látky byla pomocí MV reaktoru typ III za jinak analogických podmínek získána látka **11** ve výtěžku 13,15 g = 91% teorie).



2-(2-Amino-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)ethoxymethylfosfonová kyselina (11): směsná ^{13}C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle ^[20]. Pro $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_5\text{P}$ (289,1) vypočteno (%): C 33,23; H 4,18; N 24,22; nalezeno (%): C 33,43; H 4,37; N 24,16. MS ESI(-), m/z (%): 288 [M] (100), 310 [MNa] (21); HRMS ESI(-) vypočteno (m/z): 288,0502; nalezeno: 288,0492.

5.4.4. Příprava 2-(6-amino-9H-purin-9-yl)ethyloxymethylfosfonové kyseliny (12)

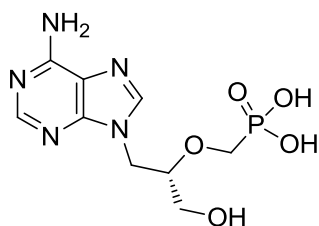
Do 10 ml reakční zkumavky bylo předloženo 357 mg (1 mmol) diisopropyl-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)ethyloxymethylfosfonátu a 2 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (2 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 140°C po dobu 10 minut. Po přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován z vody, kde byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité vody za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 250 mg (92% teorie) požadovaného produktu (při pokusu z 100 mmol výchozí látky byla pomocí MV reaktoru typ III za jinak analogických podmínek získána látka **12** ve výtěžku 25,90 g = 95% teorie).



2-(6-Amino-9H-purin-9-yl)ethyloxymethylfosfonová kyselina (12): směšná ¹³C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle^[19]. Pro C₈H₁₂N₅O₄P (273,1) vypočteno (%): C 35,17; H 4,43; N 25,64; nalezeno (%): C 35,28; H 4,59; N 25,43. MS ESI(-), *m/z* (%): 272 [M⁻] (100), 294 [MNa] (17).

5.4.5. Příprava (S)-1-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-hydroxypropan-2-yloxymethylfosfonové kyseliny (13)

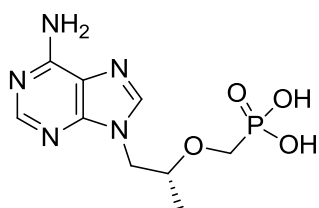
Do 10 ml reakční zkumavky bylo předloženo 387 mg (1 mmol) diisopropyl-(S)-1-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-hydroxypropan-2-yloxymethylfosfonátu a 2 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (2 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 140°C po dobu 10 minut. Po přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován z vody, kde byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité vody za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 267 mg (88% teorie) požadovaného produktu (při pokusu z 50 mmol výchozí látky byla pomocí MV reaktoru typ III za jinak analogických podmínek získána látka **13** ve výtěžku 13,98 g = 92% teorie).



(S)-1-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3-hydroxypropan-2-yl oxymethylfosfonová kyselina (13): směsná ^{13}C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle ^[25]. Pro $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_5\text{P}$ (303,1) vypočteno (%): C 35,65; H 4,65; N 23,10; nalezeno (%): C 35,47; H 4,83; N 23,02. MS ESI(-), m/z (%): 303 [M] (100).

5.4.6. Příprava (R)-1-(6-amino-9H-purin-9-yl)propan-2-yl oxymethylfosfonové kyseliny (14)

Do 10 ml reakční zkumavky bylo předloženo 371 mg (1 mmol) (*R*)-diisopropyl-1-(6-amino-9H-purin-9-yl)propan-2-yl oxymethylfosfonátu a 2 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (2 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 140°C po dobu 10 minut. Po přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován z vody, kde byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité vody za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 260 mg (91% teorie) požadovaného produktu (při pokusu z 50 mmol výchozí látky byla pomocí MV reaktoru typ III za jinak analogických podmínek získána látka **14** ve výtěžku 12,97 g = 90% teorie).

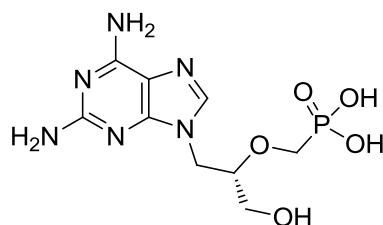


(R)-1-(6-Amino-9H-purin-9-yl)propan-2-yl oxymethylfosfonová kyselina (14): směsná ^{13}C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle ^[194]. Pro $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_4\text{P}$ (287,1) vypočteno (%): C 37,64; H 4,91; N 24,38; nalezeno (%): C 37,49; H 5,17; N 24,27. MS ESI(-), m/z (%): 301 [M] (100).

5.4.7. Příprava (S)-1-(2,6-diamino-9H-purin-9-yl)-3-hydroxypropan-2-yl oxymethylfosfonové kyseliny (15)

Do 10 ml reakční zkumavky bylo předloženo 402 mg (1 mmol) diisopropyl-(*S*)-1-(2,6-diamino-9H-purin-9-yl)-3-hydroxypropan-2-yl oxymethylfosfonátu a 4 ml 0,5 M vodné kyseliny chlorovodíkové (2 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání

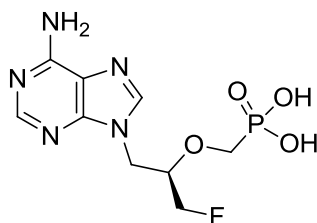
zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 130°C po dobu 20 minut. Po ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován z vody, kde byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité vody za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 230 mg (72% teorie) požadovaného produktu.



(S)-1-(2,6-Diamino-9H-purin-9-yl)-3-hydroxypropan-2-ylloxymethylfosfonová kyselina (15): směšná ^{13}C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle ^[195]. Pro $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}$ (318,1) vypočteno (%): C 33,86; H 4,42; N 21,94; nalezeno (%): C 33,65; H 4,67; N 21,72. MS ESI(-), m/z (%): 317 [M⁻] (100).

5.4.8. Příprava (R)-1-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-fluorpropan-2-ylloxymethylfosfonové kyseliny (16)

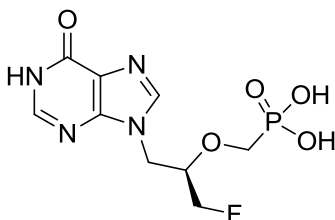
Do 10 ml reakční zkumavky bylo předloženo 389 mg (1 mmol) (R)-diisopropyl-1-(6-amino-9H-purin-9-yl)-3-fluorpropan-2-ylloxymethylfosfonátu a 2 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (2 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 140°C po dobu 10 minut. Po přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován z vody, kde byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité vody za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 284 mg (93% teorie) požadovaného produktu.



(R)-1-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-3-fluorpropan-2-ylloxymethylfosfonová kyselina (16): směšná ^{13}C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle ^[27, 152]. Pro $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{FN}_5\text{O}_4\text{P}$ (305,1) vypočteno (%): C 35,42; H 4,29; N 22,95; nalezeno (%): C 35,63; H 4,48; N 22,81. MS ESI(-), m/z (%): 304 [M⁻] (100). Tato látka byla připravena ve spolupráci s Ondřejem Baszczyňským (připravil dle literatury ^[152] výchozí látku).

5.4.9. Příprava (*R*)-1-fluor-3-(6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)propan-2-yloxymethylfosfonové kyseliny (17)

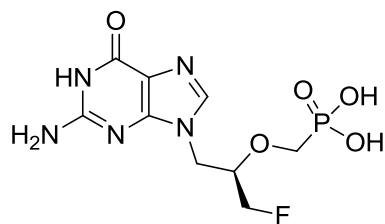
Vlivem hydrolyzujícího se atomu chloru v poloze 6 purinového kruhu se během reakce generuje jeden ekvivalent HCl a reakci je tak možné provést pouze s jedním ekvivalentem HCl. Do 10 ml reakční zkumavky proto bylo předloženo 409 mg (1 mmol) (*R*)-diisopropyl-1-fluor-3-(6-chlor-9*H*-purin-9-yl)propan-2-yloxymethylfosfonátu a 1 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (1 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 140°C po dobu 10 minut. Po odpaření, přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován ze směsi voda/ethanol, kde byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité směsi za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 251 mg (82% teorie) požadovaného produktu.



(*R*)-1-Fluor-3-(6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)propan-2-yloxymethylfosfonová kyselina (17): směsná ¹³C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle [27, 152]. Pro C₉H₁₂FN₄O₅P (306,1) vypočteno (%): C 35,30; H 3,95; N 18,30; nalezeno (%): C 35,43; H 4,20; N 18,17. MS ESI(-), *m/z* (%): 305 [M] (100). HRMS ESI(-) vypočteno (*m/z*): 305,0451; nalezeno: 305,0450. Tuto látku připravil Ondřej Baszczyňský – zde ji uvádíme pro demonstraci univerzálnosti nalezeného postupu.

5.4.10. Příprava (*R*)-1-(2-amino-6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)-3-fluorpropan-2-yloxymethylfosfonové kyseliny (18)

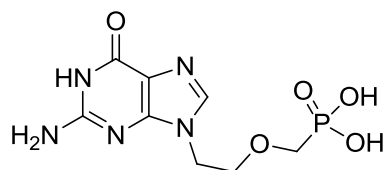
Vlivem hydrolyzujícího se atomu chloru v poloze 6 purinového kruhu se během reakce generuje jeden ekvivalent HCl a reakci je tak možné provést pouze s jedním ekvivalentem HCl. Do 10 ml reakční zkumavky proto bylo předloženo 423 mg (1 mmol) (*R*)-diisopropyl-1-(2-amino-6-chlor-9*H*-purin-9-yl)-3-fluorpropan-2-yloxymethylfosfonátu a 1 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (1 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 140°C po dobu 10 minut. Po přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován ze směsi voda/ethanol, kde byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité směsi za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 266 mg (83% teorie) požadovaného produktu.



(R)-1-(2-Amino-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)-3-fluoropropan-2-yloxymethylfosfonová kyselina (18): směsná ^{13}C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle ^[27, 152]. Pro $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{FN}_5\text{O}_5\text{P}$ (321,1) vypočteno (%): C 33,65; H 4,08; N 21,80; nalezeno (%): C 33,68; H 4,25; N 21,59. MS ESI(-), m/z (%): 320 [M⁻] (100). Tato látka byla připravena ve spolupráci s Ondřejem Baszczyńským (připravil dle literatury^[152] výchozí látku).

5.4.11. Příprava 2-(2-amino-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)ethoxymethylfosfonové kyseliny (11)

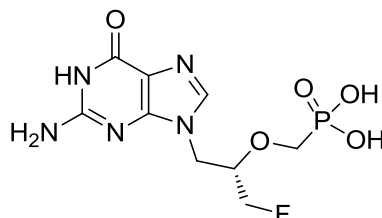
Vlivem hydrolyzujícího se atomu chloru v poloze 6 purinového kruhu se během reakce generuje jeden ekvivalent HCl a reakci je tak možné provést pouze s jedním ekvivalentem HCl. Do 10 ml reakční zkumavky proto bylo předloženo 391 mg (1 mmol) diisopropyl-2-(2-amino-6-chlor-9H-purin-9-yl)ethoxymethylfosfonátu a 1 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (1 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 140°C po dobu 10 minut. Po přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován z vody, kde byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité vody za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 260 mg (90% teorie) požadovaného produktu.



2-(2-Amino-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)ethoxymethylfosfonová kyselina (11): směsná ^{13}C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle ^[20]. Směsná ^{13}C NMR spektra shodná též s látkou připravenou dle příkladu 5.4.3. Pro $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_5\text{P}$ (289,1) vypočteno (%): C 33,23; H 4,18; N 24,22; nalezeno (%): C 33,17; H 4,43; N 24,07. MS ESI(-), m/z (%): 288 [M⁻] (100), 310 [MNa] (18).

5.4.12. Příprava (*S*)-1-(2-amino-6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)-3-fluorpropan-2-yloxymethylfosfonové kyseliny (19)

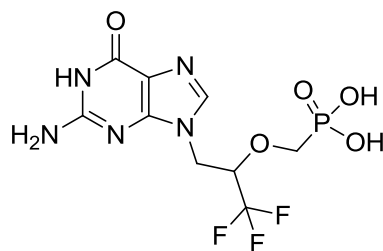
Vlivem hydrolyzujícího se atomu chloru v poloze 6 purinového kruhu se během reakce generuje jeden ekvivalent HCl a reakci je tak možné provést pouze s jedním ekvivalentem HCl. Do 10 ml reakční zkumavky proto bylo předloženo 423 mg (1 mmol) (*S*)-diisopropyl-1-(2-amino-6-chlor-9*H*-purin-9-yl)-3-fluorpropan-2-yloxymethylfosfonátu a 1 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (1 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 140°C po dobu 10 minut. Po přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován ze směsi voda/ethanol, kde byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité směsi za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 274 mg (85% teorie) požadovaného produktu.



(*S*)-1-(2-Amino-6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)-3-fluorpropan-2-yloxymethylfosfonová kyselina (19): směsná ¹³C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle [27, 152]. Pro C₉H₁₃FN₅O₅P (321,1) vypočteno (%): C 33,65; H 4,08; N 21,80; nalezeno (%): C 33,57; H 4,23; N 21,64. MS ESI(-), *m/z* (%): 320 [M⁻] (100), 342 [MNa⁻] (26). Tuto látku připravil Ondřej Baszczyňský – zde ji uvádíme pro demonstraci univerzálnosti nalezeného postupu.

5.4.13. Příprava 1-(2-amino-6-oxo-1*H*-purin-9(6*H*)-yl)-3,3,3-trifluorpropan-2-yloxymethylfosfonové kyseliny (20)

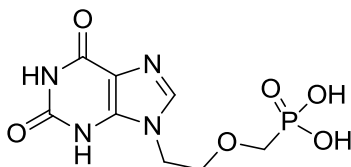
Vlivem hydrolyzujícího se atomu chloru v poloze 6 purinového kruhu se během reakce generuje jeden ekvivalent HCl a reakci je tak možné provést pouze s jedním ekvivalentem HCl. Do 10 ml reakční zkumavky proto bylo předloženo 460 mg (1 mmol) diisopropyl-1-(2-amino-6-chlor-9*H*-purin-9-yl)-3,3,3-trifluorpropan-2-yloxymethylfosfonátu (připraveného dle literatury viz sekce 6, publikace 22.) a 1 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (1 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 140°C po dobu 10 minut. Po přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován ze směsi voda/ethanol, kde byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité směsi za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 312 mg (87% teorie) požadovaného produktu.



(±)-1-(2-Amino-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)-3,3,3-trifluoropropan-2-yloxymethyl-fosfonová kyselina (20): ^1H NMR (D_2O): 8,21 s, 1H (H-8''); 4,43 m, 1H (H-1'a); 4,31 – 4,43 m, 2H (H-1'b, H-2'); 3,84 dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 12,5$, $J(1,\text{P}) = 9,6$ a 3,46 dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 12,5$, $J(1,\text{P}) = 9,3$ (CH_2P). ^{13}C NMR (D_2O): 173,46 (C-6''); 156,60 (C-2''); 153,34 (C-4''); 137,67 (C-8''); 123,42 q, $J(3',\text{F}) = 286,3$ (C-3'); 116,63 (C-5''); 77,58 qd, $J(2',\text{F}) = 29,6$, $J(2',\text{P}) = 12,7$ (C-2'); 71,24 d, $J(1,\text{P}) = 153,1$ (C-1); 42,46 (C-1'). Pro $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_5\text{N}_5\text{F}_3\text{P} + 1,5 \text{H}_2\text{O}$ (348.2) vypočteno (%): C 24,17; H 4,73; N 15,66; F 12,74; nalezeno (%): C 24,34; H 4,82; N 15,55; F 12,90%. MS ESI(-), m/z (%): 356 [M] (100); HRMS ESI(-) vypočteno (m/z): 356,0372; nalezeno: 356,0368.

5.4.14. Příprava 2-(2,6-dioxo-2,3-dihydro-1H-purin-9(6H)-yl)ethoxymethylfosfonové kyseliny (21)

Vlivem hydrolyzujícího se atomu chloru v poloze 6 purinového kruhu se během reakce generuje jeden ekvivalent HCl a reakci je tak možné provést pouze s jedním ekvivalentem HCl. Druhý atom chloru se zjevně hydrolyzuje až po esterových skupinách a tak je pro hladký průběh reakce potřeba minimálně jeden ekvivalent HCl. Pro úplnou hydrolyzu druhého atomu chloru je potřeba prodloužit reakční dobu a zvýšit reakční teplotu. Do 10 ml reakční zkumavky proto bylo předloženo 411 mg (1 mmol) diisopropyl-2-(2,6-dichlor-9H-purin-9-yl)ethoxymethylfosfonátu a 1 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (1 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 150°C po dobu 20 minut. Po odpaření, přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován z vodného ethanolu. Ke krystalizačnímu roztoku byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu a ledové kyseliny octové na množství použitého ethanolu za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 234 mg (81% teorie) požadovaného produktu.

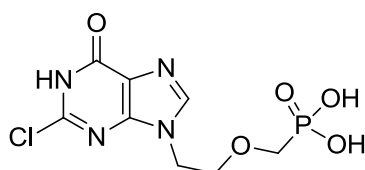


2-(2,6-Dioxo-2,3-dihydro-1H-purin-9(6H)-yl)ethoxymethylfosfonová kyselina (21): ^1H NMR (D_2O): 7,84 s, 1H (H-8''); 4,39 t, 2H, $J(2',1') = 5,0$ (H-2'); 3,95 t, 2H, $J(1',2') = 5,1$ (H-1'); 3,80 d, 2H, $J(1,\text{P}) = 8,5$ (CH_2P). ^{13}C NMR (D_2O): 158,78 (C-6''); 151,53 (C-2'');

141,18 (C-4''); 138,37 (C-8''); 115,97 (C-5''); 71,04 d, $J(1',P) = 10,4$ (C-1'); 66,97 d, $J(1,P) = 159,8$ (CH₂P); 44,58 (C-2'). Pro C₈H₁₁N₄O₆P (290,0) vypočteno (%): C 33,11; H 3,82; N 19,31; nalezeno (%): C 33,26; H 4,07; N 19,18. MS ESI(-), m/z (%): 289 [M] (100), 311 [M Na] (12).

5.4.15. Příprava 2-(2-chlor-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)ethoxymethylfosfonové kyseliny (22)

Vlivem dramaticky rozdílné hydrolytické stability atomu chloru v poloze 2 a 6 purinového kruhu je možné dosáhnout volbou reakčních podmínek selektivní hydrolyzy pouze méně stálého chloru v poloze 6. Do 10 ml reakční zkumavky proto bylo předloženo 411 mg (1 mmol) diisopropyl-2-(2,6-dichlor-9H-purin-9-yl)ethoxymethylfosfonátu a 1 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (1 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 130°C po dobu 20 minut. Po odpaření, přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován z vodného ethanolu kde byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu na množství použitého ethanolu za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 123 mg (40% teorie) požadovaného produktu. Z matečného louhu bylo získáno ještě 23 mg (8% teorie) látky **21**.

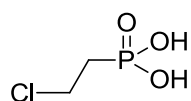


2-(2-Chlor-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)ethoxymethylfosfonová kyselina (22): ¹H NMR (D₂O): 8,05 s, 1H (H-8''); 4,32 m, 2H, $J(2'-1') = 5,3$ (H-2'); 3,92 m, 2H, $J(1'-2') = 5,3$ (H-1'); 3,48 d, 2H, $J(1,P) = 8,4$ (CH₂P). ¹³C NMR (D₂O): 168,21 (C-6''); 154,39 (C-2''); 151,28 (C-4''); 141,97 (C-8''); 122,61 (C-5''); 70,73 d, $J(1'-P) = 9,9$ (C-1'); 69,53 d, $J(1,P) = 150,0$ (CH₂P); 40,01 (C-2'). Pro C₈H₁₀ClN₄O₅P (308,0077) vypočteno (%): C 31,13; H 3,27; N 18,15; nalezeno (%): C 30,94; H 3,25; N 17,86. MS ESI(-), m/z (%): 307, 309 [M] (100). HRMS ESI(-) vypočteno (m/z): 306,9999; nalezeno: 307,0006. Tuto látku připravil Ondřej Baszczyňský – zde ji uvádíme pro demonstraci univerzálnosti nalezeného postupu.

5.4.16. Příprava 2-chlorethylfosfonové kyseliny (23)

Vlivem přítomného hydrolyticky ne zcela stálého atomu chloru je výhodné reakci provést v koncentrované kyselině chlorovodíkové, kde se maximálně eliminuje riziko hydrolyzy atomu chloru na skupinu OH. Do 10 ml reakční zkumavky proto bylo předloženo 2,28 g (10 mmol) diisopropyl-2-chlorethylfosfonátu (**1**) a 3 g (30 mmol HCl) koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 100°C po dobu 10 minut. Dle změny tlaku v reakční nádobě

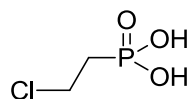
dojde k úplnému odreagování výchozí látky při této teplotě za 9 minut. Pokus byl opakován při různých reakčních teplotách. Při 120°C došlo k úplnému odreagování výchozí látky (dle změny reakčního tlaku) za 4 minuty a při 150°C došlo k úplnému odreagování výchozí látky (dle změny reakčního tlaku) za 2 minuty. Při dalším zvyšování reakční teploty dojde k dosažení plné konverze ještě dříve, než se podaří prohřát reakční směs na tyto vysoké teploty (při kterých už ale byly pozorovány i vedlejší reakce – především eliminace HCl). Jednotlivé reakční směsi byly následně odpařeny pomocí rotační vakuové odparky (40°C a 2 mbar). Získaný odparek byl následně po přidání acetonu zahříván k refluxu a vyloučený produkt byl odsán na fritě a promyt acetonem a ledovým ethanolem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno toto množství požadovaného produktu: 1,21 g (84% teorie) pro pokus při 100°C, 1,26 g (87% teorie) pro pokus při 120°C a 1,23 g (85% teorie) pro pokus při 150°C.



2-Chlorethylfosfonová kyselina (23): směsná ^{13}C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle ^[139]. Pro $\text{C}_2\text{H}_6\text{ClO}_3\text{P}$ (144,0) vypočteno (%): C 16,62; H 4,19; Cl 24,54; nalezeno (%): C 16,53; H 4,32; Cl 24,67. MS ESI(+), m/z (%): 145 a 147 [M^+] (100).

5.4.17. Příprava 2-chlorethylfosfonové kyseliny (23)

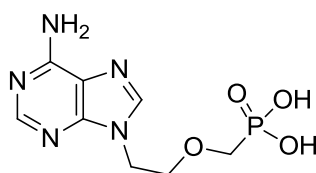
Vlivem pomalejší hydrolyzy diethyl esterů vůči diisopropyl esterům je potřeba při hydrolyze diethyl esterů prodloužit reakční čas. Do 10 ml reakční zkumavky proto bylo předloženo 2,00 g (10 mmol) diethyl-2-chlorethylfosfonátu (6) a 3 g (30 mmol HCl) koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 100°C po dobu 25 minut. Dle změny tlaku v reakční nádobě dojde k úplnému odreagování výchozí látky při této teplotě za 22 minut. Reakční směs byla následně odpařena pomocí rotační vakuové odparky (40°C a 2 mbar). Získaný odparek byl následně po přidání acetonu zahříván k refluxu a vyloučený produkt byl odsán na fritě a promyt acetonem a ledovým ethanolem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 1,14 g (79% teorie) požadovaného produktu.



2-Chlorethylfosfonová kyselina (23): směsná ^{13}C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle ^[139]. Směsná ^{13}C NMR spektra shodná též s látkou připravenou dle 5.4.16. Pro $\text{C}_2\text{H}_6\text{ClO}_3\text{P}$ (144,0) vypočteno (%): C 16,62; H 4,19; Cl 24,54; nalezeno (%): C 16,78; H 4,26; Cl 24,71. MS ESI(+), m/z (%): 145 a 147 [M^+] (100).

5.4.18. Příprava 2-(6-amino-9H-purin-9-yl)ethyloxymethylfosfonové kyseliny (12)

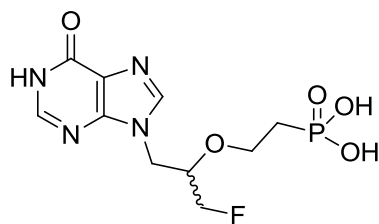
Vlivem pomalejší hydrolyzy diethyl esterů vůči diisopropyl esterům je potřeba při hydrolyze diethyl esterů prodloužit reakční čas. Do 10 ml reakční zkumavky bylo předloženo 329 mg (1 mmol) diethyl-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)ethyloxymethylfosfonátu a 2 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (2 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 140°C po dobu 30 minut. Po přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován z vody, kde byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité vody za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 239 mg (88% teorie) požadovaného produktu.



2-(6-Amino-9H-purin-9-yl)ethyloxymethylfosfonová kyselina (12): směsná ¹³C NMR (viz výše) shodná – standard připraven dle [19]. Směsná ¹³C NMR spektra shodná též s látkou připravenou dle 5.4.4. Pro C₈H₁₂N₅O₄P (273,1) vypočteno (%): C 35,17; H 4,43; N 25,64; nalezeno (%): C 35,35; H 4,60; N 25,38. MS ESI(-), *m/z* (%): 272 [M⁻] (100), 294 [MNa⁻] (14).

5.4.19. Příprava 2-(1-fluor-3-(6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)propan-2-yloxy)ethylfosfonové kyseliny (24)

Vlivem pomalejší hydrolyzy diethyl esterů vůči diisopropyl esterům je potřeba při hydrolyze diethyl esterů prodloužit reakční čas. Do 10 ml reakční zkumavky proto bylo předloženo 394 mg (1 mmol) diethyl-2-(1-(6-chlor-9H-purin-9-yl)-3-fluorpropan-2-yloxy)ethylfosfonátu (připravil Ondřej Baszczyňský) a 1 ml 1 M vodné kyseliny chlorovodíkové (1 mmol HCl). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typ I na 140°C po dobu 30 minut. Po odpaření, přidání acetonu a ochlazení na 0°C došlo ke kvantitativnímu vyloučení požadovaného produktu, který byl následně odsán a rekrystalován ze směsi voda/ethanol, kde byl po následném ochlazení přidán ještě jeden objemový díl acetonu na množství použité směsi za kvantitativního vyloučení čistého produktu, který byl odsán a promyt ethanolem a acetonem. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 287 mg (90% teorie) požadovaného produktu.



2-(1-Fluor-3-(6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)propan-2-yloxy)ethylfosfonová kyselina (24): ^1H NMR (D_2O): 8,13 s, 1H (H-2''); 7,99 s, 1H (H-8''); 4,67 ddd, 1H, $J(1\text{a}',\text{F}) = 46,9$, $J_{\text{gem}} = 10,6$, $J(1\text{a}',2') = 3,0$ (H-1a'); 4,33-4,49 m, 3H, H-3' (1'b); 4,08 m, 1H (H-2'); 3,72 a 3,82 m, 2H (H-2); 1,63-1,70 m, 2H (H-1). ^{13}C NMR (D_2O): 168,36 (C-6''); 154,26 (C-2''); 150,54 (C-4''); 141,8 (C-8''); 123,49 (C-5''); 82,96 d, $J(1',\text{F}) = 167,7$ (C-1'); 76,43 d, $J(2',\text{F}) = 18,7$ (C-2'); 68,47 d, $J(2,\text{P}) = 4,4$, (C-2); 43,72 d, (C-3'); 30,98 d, $J(1,\text{P}) = 123,3$ (C-1). Pro $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{FN}_4\text{O}_5\text{P}$ (320,1) vypočteno (%): C 37,51; H 4,41; F 5,93; N 17,50; nalezeno (%): C 37,67; H 4,43; F 5,87; N 17,33. MS ESI(-), m/z (%): 319 [M] (100). HRMS ESI(-) vypočteno (m/z): 319,0608; nalezeno: 319,0610. Tuto látku připravil Ondřej Baszczyňský – zde ji uvádíme pro demonstraci univerzálnosti nalezeného postupu.

5.5. Kompletní degradace (hydrolyza) organofosfátů pomocí mikrovlnně zahřívání hydrolyzy

Obecný postup:

1 mmol organofosfátu byl předložen do 10 ml reakční zkumavky společně s magnetickým míchadlem a 2 ml D_2O či DCI v D_2O (viz jednotlivé pokusy). Po uzavření septem byla reakční směs za míchání zahřívána pomocí mikrovlnného reaktoru typu I na určitou teplotu vždy po dobu 10 minut (viz jednotlivé příklady). Po ochlazení reakční směsi byl vždy odebrán reprezentativní vzorek o objemu 0,2 ml, který byl společně s 0,3 ml $\text{DMSO-}d_6$ předložen do NMR kyvety k analýze. Zbylá reakční směs pak byla zahřívána dále vždy na teplotu o 10 °C vyšší a vždy po dobu 10 minut. NMR spektra byla měřena na FT NMR spektrometru (Bruker Avance I 400) v deuterovaném dimethylsulfoxidu - $\text{DMSO-}d_6$ (^1H při 400 MHz a ^{31}P při 162 MHz). Pro jednoznačnou identifikaci byly ^{31}P signály přiřazeny pomocí směsných spekter s komerčně dostupnými standardy.

5.5.1. Mikrovlnně zahřívání hydrolyza (MV) diethyl-chlorfosfátu (25) v čisté D_2O

Dle obecného postupu bylo předloženo 173 mg diethyl-chlorfosfátu (25) do 10 ml reakční kyvety společně s 2 ml D_2O . Reakční směs byla postupně zahřívána od 100 °C až do teploty 160 °C vždy na deset minut (teplota byla navyšována po 10 °C, poté byl vždy odebrán vzorek pro analýzu). Výsledek pokusu je znázorněn na **obrázku 48**.

5.5.2. Mikrovlnně zahřívání hydrolyzy (MV) diethyl-chlorfosfátu (25) v 0,5 M DCl/D₂O

Dle obecného postupu bylo předloženo 173 mg diethyl-chlorfosfátu (25) do 10 ml reakční kyvety společně s 2 ml 0,5M DCl v D₂O. Reakční směs byla postupně zahřívána od 100 °C až do teploty 150 °C vždy na deset minut (teplota byla navyšována po 10 °C, poté byl vždy odebrán vzorek pro analýzu). Výsledek pokusu je názorně zobrazen na **obrázku 49**.

5.5.3. Mikrovlnně zahřívání hydrolyzy (MV) diethyl-chlorfosfátu (25) v 1 M DCl/D₂O

Dle obecného postupu bylo předloženo 173 mg diethyl-chlorfosfátu (25) do 10 ml reakční kyvety společně s 2 ml 1M DCl v D₂O. Reakční směs byla postupně zahřívána od 100 °C až do teploty 150 °C vždy na deset minut (teplota byla navyšována po 10 °C, poté byl vždy odebrán vzorek pro analýzu). Výsledek pokusu je znázorněn na **obrázku 50**.

5.5.4. Mikrovlnně zahřívání hydrolyzy (MV) diethyl-chlorfosfátu (25) v koncentrované DCl/D₂O

Dle obecného postupu bylo předloženo 173 mg diethyl-chlorfosfátu (25) do 10 ml reakční kyvety společně s 2 ml koncentrované DCl v D₂O. Reakční směs byla postupně zahřívána od 100 °C až do teploty 140 °C vždy na deset minut (teplota byla navyšována po 10 °C, poté byl vždy odebrán vzorek pro analýzu). Výsledek pokusu je znázorněn na **obrázku 51**.

5.5.5. Mikrovlnně zahřívání hydrolyzy (MV) diisopropyl-chlorfosfátu (26) v čisté D₂O

Dle obecného postupu bylo předloženo 201 mg diisopropyl-chlorfosfátu (26) do 10 ml reakční kyvety společně s 2 ml D₂O. Reakční směs byla postupně zahřívána od 80 °C až do teploty 130 °C vždy na deset minut (teplota byla navyšována po 10 °C, poté byl vždy odebrán vzorek pro analýzu). Výsledek pokusu je znázorněn na **obrázku 52**.

5.5.6. Mikrovlnně zahřívání hydrolyzy (MV) diisopropyl-chlorfosfátu (26) v 0,5 M DCl/D₂O

Dle obecného postupu bylo předloženo 201 mg diisopropyl-chlorfosfátu (26) do 10 ml reakční kyvety společně s 2 ml 0,5M DCl v D₂O. Reakční směs byla postupně zahřívána od 80 °C až do teploty 120 °C vždy na deset minut (teplota byla navyšována po 10 °C, poté byl vždy odebrán vzorek pro analýzu). Výsledek pokusu je znázorněn na **obrázku 53**.

5.5.7. Mikrovlnně zahřívání hydrolyza (MV) diethyl-(4-nitrofenyl)-fosfátu (27 - pesticid paraoxon) v čistém D₂O

Dle obecného postupu bylo předloženo 275 mg diethyl-(4-nitrofenyl)-fosfátu (27) do 10 ml reakční kyvety společně s 2 ml D₂O. Reakční směs byla postupně zahřívána od 100 °C až do teploty 160 °C vždy na deset minut (teplota byla navyšována po 10 °C, poté byl vždy odebrán vzorek pro analýzu). Výsledek pokusu je znázorněn na **obrázku 54**.

5.5.8. Mikrovlnně zahřívání hydrolyza (MV) diethyl-(4-nitrofenyl)-fosfátu (27 - pesticid paraoxon) v 1 M DCI/D₂O

Dle obecného způsobu bylo předloženo 275 mg diethyl-(4-nitrofenyl)-fosfátu (27) do 10 ml reakční kyvety společně s 2 ml 1M DCI v D₂O. Reakční směs byla postupně zahřívána od 100 °C až do teploty 140 °C vždy na deset minut (teplota navyšována po 10 °C, poté vždy odebrán vzorek pro analýzu). Výsledek pokusu je znázorněn na **obrázku 55**.

5.5.9. Hydrolyza diethyl-chlorfosfátu (25) v čistém D₂O pomocí ohřevu olejovou lázní

V analogii s postupem **5.5.1**, bylo do 10 ml reakční kyvety předloženo 173 mg diethyl-chlorfosfátu (25) společně s 2 ml D₂O. Olejová lázeň byla následně vyhřátá na teplotu odpovídající pokusu **5.5.1**. (od 100 °C až do teploty 150 °C, teplota byla navyšována po 10 °C). Reakční kyveta byla ponořena do vyhřáté olejové lázně na 15 minut (10 minut jako v experimentu **5.5.1**. + 5 minut na dosažení této teploty). Obrázek **56** znázorňuje rozdíly ve složení reakčních směsí pro pokus **5.5.1**. (mikrovlnný pokus – označeno jako **MV**) a pro pokus **5.5.9**. (zahřívání olejovou lázní – označeno jako **lázeň**).

5.5.10. Hydrolyza diisopropyl-chlorfosfátu (26) v čistém D₂O pomocí ohřevu olejovou lázní

V analogii s postupem **5.5.5**, bylo do 10 ml reakční kyvety předloženo 201 mg diisopropyl-chlorfosfátu (26) společně s 2 ml D₂O. Olejová lázeň byla následně vyhřátá na teplotu odpovídající pokusu **5.5.5**. (od 80 °C až do teploty 140 °C, teplota byla navyšována po 10 °C). Reakční kyveta byla ponořena do vyhřáté olejové lázně na 15 minut (10 minut jako v experimentu **5.5.5**. + 5 minut na dosažení této teploty). Obrázek **57** znázorňuje rozdíly ve složení reakčních směsí pro pokus **5.5.5**. (mikrovlnný pokus – označeno jako **MV**) a pro pokus **5.5.10**. (zahřívání olejovou lázní – označeno jako **lázeň**).

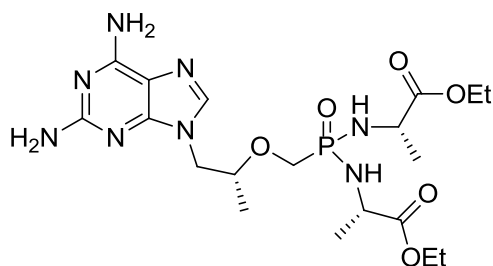
5.6. Příprava diamidů fosfonových kyselin s využitím příslušných bis-trimethylsilyl esterů

Obecný postup:

Do baňky se pod argonem předloží 1 mmol diesteru fosfonové kyseliny, 5 mmol trimethylsilylbromidu a 10 ml suchého acetonitrilu. Tato směs se míchá při teplotě místnosti po dobu 12 hodin. Po odpaření reakční směsi na vakuové rotační odparce při tlaku 2 mbar a teplotě 40 °C se reakční směs kódestiluje s toluenem (tak, aby se k reakční směsi nedostal vzduch). Reakční nádoba se znovu nasatí argonem a přidají se 4 mmol hydrochloridu esteru aminokyseliny, 2 ml suchého triethylaminu a 8 ml suchého pyridinu; a reakční směs se pak zahřívá na 50 °C. Následně se pod argonem přidá roztok obsahující 6 mmol 2,2'-dithiodipyridinu, 6 mmol trifenylfosfinu a 10 ml suchého pyridinu a celá reakční směs se zahřívá na 50 °C po dobu 3 hodin. Po ochlazení se reakční směs odpaří na vakuové rotační odparce (40 °C, 2 mbar) a k získanému odparku se přidá 10 ml methanolu, 10 ml vody, 10 ml toluenu a 10 ml hexanu. Celá tato směs se pak přenesse do dělicí nálevky, pomocí níž se následně oddělí vrchní vrstva organických rozpouštědel. Fáze obsahující methanol a vodu se pro odstranění nečistot 3x extrahuje směsí hexan a toluen (poměr rozpouštědel závisí na lipofilitě použité fosfonové kyseliny, např. v příkladu **5.6.2.** byla použita směs o objemovém poměru 1:1 a v příkladu **5.6.3.** byl použit čistý toluen). Produkt se z fáze, obsahující methanol a vodu, získá extrakcí vhodným organickým rozpouštědlem (výhodně 3x ethyl-acetátem, chloroformem či dichlormethanem). Tyto spojené organické frakce se suší pomocí MgSO₄ a následně se po filtraci odpaří. K pevnému odparku se přidá 20 ml směsi hexan/diethylether (1:1) k odstranění další nečistoty. Pevný vzorek se následně rozpustí v minimálním množství ethanolu a poté se přidá diethylether za vyloučení pyridin-2-thiolu, který se po ochlazení směsi na 0 °C odsaje. Pevný pyridin-2-thiol se ještě promyje ledovou směsí ethanolu a diethyletheru (1:10). Spojené organické frakce se odpaří, odparek rozpustí v ethyl-acetátu a požadovaný produkt se izoluje filtrací skrze malou vrstvu silikagelu (3 hmotnostní ekvivalenty vzhledem ke hmotě pevného odparku). Nečistoty se vyplaví 100% ethyl-acetátem a požadovaný produkt se vyplaví směsí ethyl-acetát/acetón/ethanol/voda (objem. poměr záleží na lipofilitě použité fosfonové kyseliny, např. pro příklad **5.6.1.** = 30/3/4/3). Po rekrystalizaci ze směsi ethyl-acetát/hexan se izolovaný produkt suší ve vakuové sušárně při teplotě 30 °C a tlaku 0,1 mbar jeden týden.

5.6.1. Příprava (2*S*,2'*S*)-diethyl-2,2'-((((*R*)-1-(2,6-diamino-9*H*-purin-9-yl)propan-2-yl)oxy)methyl)-fosforyl)bis(azanediy)l)dipropanoátu (28)

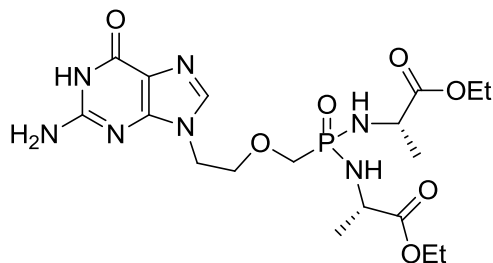
Z 1 mmol diisopropyl-(*R*)-(((1-(2,6-diamino-9*H*-purin-9-yl)propan-2-yl)oxy)methyl)-fosfonátu^[22] a 4 mmol hydrochloridu ethyl-alaninu bylo dle obecného postupu získáno 430 mg požadovaného produktu (87% teoretického výtěžku).



(2S,2'S)-Diethyl-2,2'-((((R)-1-(2,6-diamino-9H-purin-9-yl)propan-2-yl)oxy)methyl)fosforyl)bis(azanediyl)dipropanoát (28): bílá krystalická látka, b.t. 145-146 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 7,71 s, 1 H, (H-8); 6,65 bs, 2 H, (6-NH₂); 5,75 bs, 2 H, (2-NH₂); 4,51 dd, 1 H, *J*(NH,P) = 12,1 a *J*(NH,CH) = 10,3 (NH); 4,37 dd, 1 H, *J*(NH,P) = 11,5 a *J*(NH,CH) = 10,4 (NH); 4,13 – 4,01 m, 5 H, (COO-CH₂ a H-1'^b); 3,96 dd, 1 H, *J*_{gem} = 14,3 a *J*(1'^a,2') = 6,0 (H-1'^a); 3,87 – 3,80 m, 3 H, (H-2' a NH-CH); 3,62 dd, 1 H, *J*_{gem} = 13,0 a *J*(CH,P) = 8,3 (O-CH₂-P); 3,56 dd, 1 H, *J*_{gem} = 13,0 a *J*(CH,P) = 9,0 (O-CH₂-P); 1,25-1,23 m, 6 H, (NH-CH-CH₃); 1,19 t, 3 H, *J*(CH₃,CH₂) = 7,1 (COO-CH₂-CH₃); 1,16 t, 3 H, *J*(CH₃,CH₂) = 7,1 (COO-CH₂-CH₃); 1,01 d, 3 H, *J*(3',2') = 6,3 (H-3'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 174,3 – 174,2 m, (COO); 160,5 (C-2); 156,3 (C-6); 152,3 (C-4); 138,4 (C-8); 113,0 (C-5); 75,6 d, *J*(2',P) = 12 (C-2'); 65,8 d, *J*(C,P) = 135 (O-CH₂-P); 60,59 a 60,56 (COO-CH₂); 48,33 a 48,30 (NH-CH); 46,5 (C-1'); 21,0 d, *J*(C-C-N-P) = 4,6 (NH-CH-CH₃); 20,8 d, *J*(C-C-N-P) = 5,4 (NH-CH-CH₃); 17,0 (C-3'); 14,20 a 14,19 (COO-CH₂-CH₃). MS (ESI+), *m/z* (%): 501 [M+H⁺] (100), 523 [M+Na⁺] (64). HR-MS (ESI+) pro C₁₉H₃₄O₆N₈P vypočteno: 501,2333; nalezeno: 501,2331. Pro C₁₉H₃₃O₆N₈P (500,5) vypočteno (%): C 45,60; H 6,65; N 22,39; nalezeno (%): C 45,73; H 6,78; N 22,10. [α ²⁰] = - 55,7° (c 0,3 g/100 ml, voda).

5.6.2. Příprava (2S,2'S)-diethyl-2,2'-((((2-(2-amino-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)ethoxy)methyl)fosforyl)bis(azanediyl)dipropanoátu (29)

Z 1 mmol diisopropyl-((2-(2-amino-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)ethoxy)methyl)fosfonátu^[21] a 4 mmol hydrochloridu ethyl-alaninu bylo dle obecného postupu získáno 405 mg požadovaného produktu (83% teoretického výtěžku).

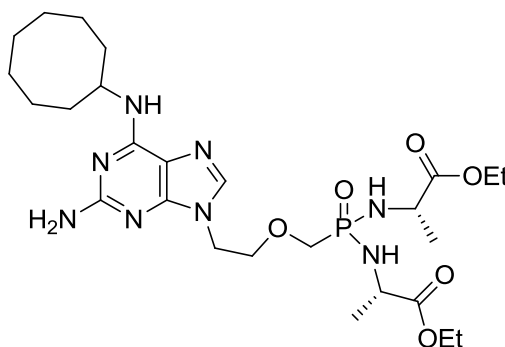


(2S,2'S)-Diethyl-2,2'-((((2-(2-amino-6-oxo-1H-purin-9(6H)-yl)ethoxy)methyl)fosforyl)bis(azanediyl)dipropanoát (29): bílá krystalická látka, b.t. 189-190 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 10,57 bs, 1H, (NH); 7,73 s, 1 H (H-8); 6,47 bs, 2 H, (NH₂); 4,56 dd, 1 H, *J*(NH,P) = 12,0 a *J*(NH,CH) = 10,3 (NHP); 4,48 t, 1 H, *J*(NH,P) = *J*(NH,CH) = 10,6 (NHP); 4,11 – 4,02 m, 6 H, (COO-CH₂ a H-1'); 3,85 – 3,75 m, 4 H, (H-2' a CHCOO); 3,61 d, 2 H, *J*(CH,P) = 7,6 (O-

CH₂-P); 1,22 d, 6 H, $J(\text{CH}_3, \text{CH}) = 6,9$ (NH-CH-**CH₃**); 1,17 t, 3 H, $J(\text{CH}_3, \text{CH}_2) = 7,1$ (COO-CH₂-**CH₃**); 1,16 t, 3 H, $J(\text{CH}_3, \text{CH}_2) = 7,1$ (COO-CH₂-**CH₃**). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 173,8 – 173,7 m, (COO); 156,7 (C-2); 153,4 (C-4); 151,0 (C-6); 137,6 (C-8); 116,3 (C-5); 70,2 d, $J(2', \text{P}) = 10$ (C-2'); 67,4 d, $J(\text{C}, \text{P}) = 136$ (O-CH₂-P); 60,2 (COO-CH₂); 48,0 (NH-**CH**); 42,1 (C-1'); 20,5 d, $J(\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{P}) = 4,3$ (NH-CH-**CH₃**); 20,5 d, $J(\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{P}) = 5,0$ (NH-CH-**CH₃**); 13,8 (COO-CH₂-**CH₃**). MS (ESI+), m/z (%): 488 [M+H⁺] (38), 510 [M+Na⁺] (100). MS (ESI-), m/z (%): 486 [M-H⁺] (100). HR-MS (ESI+) pro C₁₈H₃₁O₇N₇P vypočteno: 488,2017; nalezeno: 488,2016. Pro C₁₈H₃₁O₇N₇P vypočteno (%): C 44,35; H 6,20; N 20,11; nalezeno (%): C 44,56; H 6,46; N 20,03. $[\alpha]^{20} = -42,7^\circ$ (c 0,3 g/100 ml, voda).

5.6.3. Příprava (2*S*,2'*S*)-diethyl-2,2'-((((2-(2-amino-6-(cyklooktylamino)-9*H*-purin-9-yl)ethoxy)methyl)-fosforyl)-bis(azanediyl))dipropanoátu (30)

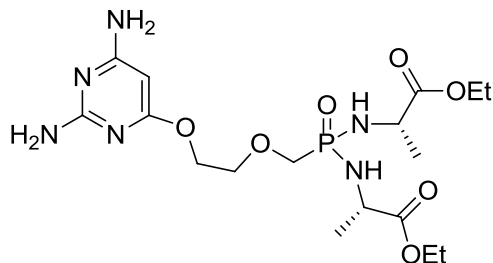
Z 1 mmol diisopropyl-((2-(2-amino-6-(cyklooktylamino)-9*H*-purin-9-yl)ethoxy)methyl)-fosfonátu a 4 mmol hydrochloridu ethyl-alaninu bylo dle obecného postupu získáno 560 mg požadovaného produktu (94% teoretického výtěžku).



(2*S*,2'*S*)-Diethyl-2,2'-((((2-(2-amino-6-(cyklooktylamino)-9*H*-purin-9-yl)ethoxy)methyl)-fosforyl)-bis(azanediyl))dipropanoát (30): bílá krystalická látka, b.t. 68-70 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 7,65 s, 1 H, (H-8); 6,83 bs, 1 H, (6-NH); 5,76 bs, 2 H, (NH₂); 4,56 t, 1 H, $J(\text{NH}, \text{P}) = J(\text{NH}, \text{CH}) = 10,3$ (NHP); 4,48 t, 1 H, $J(\text{NH}, \text{P}) = J(\text{NH}, \text{CH}) = 10,7$ (NHP); 4,33 – 4,19 m, 1 H, (CHCH₂); 4,12 – 4,00 m, 6 H, (COO-CH₂ a H-1'); 3,87 – 3,75 m, 4 H, (H-2' a CHCOO); 3,61 d, 2 H, $J(\text{CH}, \text{P}) = 7,8$ (O-CH₂-P); 1,80 – 1,40 m, 14 H, (7x CH₂); 1,22 d, 6 H, $J(\text{CH}_3, \text{CH}) = 7,3$ (NH-CH-**CH₃**); 1,18 t, 3 H, $J(\text{CH}_3, \text{CH}_2) = 7,1$ (COO-CH₂-**CH₃**); 1,17 t, 3 H, $J(\text{CH}_3, \text{CH}_2) = 7,1$ (COO-CH₂-**CH₃**). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) 173,9 – 173,8 m, (COO); 160,0 (C-2); 153,8 (C-4); 137,2 (C-8); 136,5 (C-6); 113,3 (C-5); 70,3 d, $J(2', \text{P}) = 10$ (C-2'); 67,6 d, $J(\text{C}, \text{P}) = 135$ (O-CH₂-P); 66,2 (CH₂); 60,24 a 60,21 (COO-CH₂); 48,00 a 47,97 (NH-**CH**); 41,8 (C-1'); 26,8, 25,0 a 23,6 (3x CH₂); 20,6 d, $J(\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{P}) = 4,8$ (NH-CH-**CH₃**); 20,5 d, $J(\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{P}) = 5,1$ (NH-CH-**CH₃**); 14,52 a 13,36 (COO-CH₂-**CH₃**); 6,42 (CHCH₂). MS (ESI+), m/z (%): 597 [M+H⁺] (100), 619 [M+Na⁺] (58). HR-MS pro C₂₆H₄₆O₆N₈P vypočteno: 597,3272; nalezeno: 597,3271. Pro C₂₆H₄₅O₆N₈P vypočteno (%): C 52,34; H 7,60; N 18,78; nalezeno (%): C 52,54; H 7,82; N 18,63. $[\alpha]^{20} = -16,7^\circ$ (c 0,4 g/100 ml, voda).

5.6.4. Příprava (2*S*,2'*S*)-diethyl-2,2'-((((2-((2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosforyl)-bis(azanediy))dipropanoátu (31)

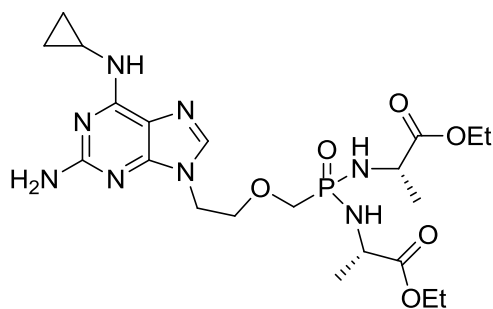
Z 1 mmol diisopropyl-((2-((2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonátu^[99] a 4 mmol hydrochloridu ethyl-alaninu bylo dle obecného postupu získáno 414 mg požadovaného produktu (90% teoretického výtěžku).



(2*S*,2'*S*)-Diethyl-2,2'-((((2-((2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosforyl)-bis(azanediy))dipropanoát (31): bílá krystalická látka, b.t. 150-151 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 6,02 bs, 2 H, (NH₂); 5,87 bs, 2 H, (NH₂); 5,03 s, 1 H, (H-5); 4,57 dd, 1 H, *J*(NH,P) = 11,2 a *J*(NH,CH) = 10,9 (NHP); 4,50 t, 1 H, *J*(NH,P) = *J*(NH,CH) = 10,3 (NHP); 4,20 t, 2 H, (H-1'); 4,10 – 4,00 m, 4 H, (COO-CH₂); 3,88 – 3,82 m, 2 H, (CHCOO), 3,71 t, 2 H, (H-2'); 3,62 d, 2 H, *J*(CH,P) = 7,8 (O-CH₂-P); 1,26 m, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,9 (NH-CH-CH₃); 1,18 t, 3 H, *J*(CH₃,CH₂) = 7,0 (COO-CH₂-CH₃); 1,17 t, 3 H, *J*(CH₃,CH₂) = 7,0 (COO-CH₂-CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) 173,9 – 173,8 m, (COO); 169,7 (C-2); 165,8 (C-4); 162,7 (C-6); 76,1 (C-5); 70,7 d, *J*(2',P) = 9 (C-2'); 67,8 d, *J*(C,P) = 138 (O-CH₂-P); 63,54 (COO-CH₂); 60,2 (C-1'); 48,0 (NH-CH); 20,6 d, *J*(C-C-N-P) = 4,5 (NH-CH-CH₃); 20,4 d, *J*(C-C-N-P) = 4,8 (NH-CH-CH₃); 13,9 (COO-CH₂-CH₃). MS (ESI+), *m/z* (%): 463 [M+H⁺] (100), 485 [M+Na⁺] (57). HR-MS (ESI+) pro C₁₇H₃₂O₇N₆P vypočteno: 463,2065; nalezeno: 463,2064. Pro C₁₇H₃₂O₇N₆P vypočteno (%): C 44,15; H 6,76; N 18,17; nalezeno (%): C 44,46; H 6,93; N 17,96. [α²⁰] = - 20,1° (c 0,3 g/100 ml, voda).

5.6.5. Příprava (2*S*,2'*S*)-diethyl-2,2'-((((2-(2-amino-6-(cyklopropylamino)-9*H*-purin-9-yl)ethoxy)methyl)fosforyl)bis(azanediy))dipropanoátu (32)

Z 1 mmol diisopropyl-((2-(2-amino-6-(cyklopropylamino)-9*H*-purin-9-yl)ethoxy)methyl)fosfonátu^[196] a 4 mmol hydrochloridu ethyl-alaninu bylo dle obecného postupu získáno 485 mg požadovaného produktu (92% teoretického výtěžku).



(2*S*,2'*S*)-Diethyl-2,2'-((((2-(2-amino-6-(cyklopropylamino)-9*H*-purin-9-yl)ethoxy)-methyl)fosforyl)bis(azanediy))dipropanoát (32): bílá krystalická látka, b.t. 127-129 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 7,69 s, 1 H, (H-8); 7,26 bs, 1 H, (6-NH); 5,82 bs, 2 H, (NH₂); 4,56 dd, 1 H, $J(\text{NH},\text{P}) = 12,2$ a $J(\text{NH},\text{CH}) = 10,4$ (NHP); 4,48 t, 1 H, $J(\text{NH},\text{P}) = J(\text{NH},\text{CH}) = 10,5$ (NHP); 4,12 – 4,00 m, 6 H, (COO-CH₂ a H-1'); 3,86 – 3,76 m, 4 H, (H-2' a CHCOO); 3,61 d, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,8$ (O-CH₂-P); 3,08 – 2,96 m, 1H, (CHCH₂); 1,24 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 7,1$ (NH-CH-CH₃); 1,17 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,1$ (COO-CH₂-CH₃); 1,16 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,1$ (COO-CH₂-CH₃); 0,66 – 0,63 m, 2 H, (CHCH₂); 0,57 – 0,55 m, 2 H, (CHCH₂). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) 174,1 – 173,9 m, (COO); 160,1 (C-2); 155,8 (C-4); 138,6 (C-8); 136,5 (C-6); 113,2 (C-5); 70,4 d, $J(\text{C}',\text{P}) = 11$ (C-2'); 66,7 d, $J(\text{C},\text{P}) = 131$ (O-CH₂-P); 60,59 a 60,56 (COO-CH₂); 48,70 a 47,40 (NH-CH); 43,3 (C-1'); 21,8 d, $J(\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{P}) = 4,5$ (NH-CH-CH₃); 20,0 d, $J(\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{P}) = 5,3$ (NH-CH-CH₃); 14,59 a 13,32 (COO-CH₂-CH₃); 6,42 (CHCH₂). MS (ESI+), *m/z* (%): 527 [M+H⁺] (100), 549 [M+Na⁺] (74). HR-MS (ESI+) pro C₂₁H₃₆O₆N₈P vypočteno: 527,2490; nalezeno: 527,2491. Pro C₂₁H₃₅O₆N₈P vypočteno (%): C 47,90; H 6,70; N 21,28; nalezeno (%): C 47,83; H 6,92; N 21,15. $[\alpha]^{20} = -37,6^\circ$ (c 0,4 g/100 ml, voda).

5.6.6. Příprava (2*S*,2'*S*)-diethyl-2,2'-((((2-(2-amino-6-(cyklopropylamino)-9*H*-purin-9-yl)ethoxy)methyl)fosforyl)bis(azanediy))dipropanoátu (32)

Z 10 mmol diisopropyl-((2-(2-amino-6-(cyklopropylamino)-9*H*-purin-9-yl)ethoxy)methyl)-fosfonátu^[196] a 40 mmol hydrochloridu ethyl-alaninu bylo dle analogie obecného postupu získáno 5150 mg požadovaného produktu (98% teoretického výtěžku).

5.7. Efektivní přípravy FAN s „otevřeným kruhem“ (PMEO-DAPy)

5.7.1. Příprava 2,4-diamino-6-(2-hydroxyethyloxy)pyrimidinu (33) – zároveň obecný postup pro přípravu dalších 2-hydroxyethyloxy-pyrimidinů

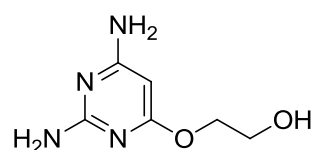
40 g (277 mmol) 2,4-diamino-6-chlorpyrimidinu bylo společně s 400 ml suchého ethylenglykolu předloženo do vyžíhané baňky naplněné argonem. Následně bylo přidáno 46,6 g (415 mmol) *tert*-butanolátu draselného. Reakční nádoba byla opatřena chlorkalciovým uzávěrem a byla následně zahřívána na 120 °C po dobu pěti hodin, během kterých došlo k plné konverzi. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 10 g iontoměniče DOWEX D50x8 v H⁺ cyklu pro neutralizaci reakční směsi. Tato směs byla nanášena na sloupcovou kolonu 100 g DOWEX D50x8 v H⁺ cyklu. Kolona byla následně promyta dvěma litry destilované vody pro důkladné vyplavení veškerého ethylenglykolu. Požadovaný produkt byl následně rychle vyplaven 2,5% vodným amoniakem (kontrolováno pomocí UV detekce). Průtok vodného amoniaku je nutné maximálně urychlit (natlakováním prostoru nad kolonou) vlivem rychlé krystalizace uvolněného čistého produktu (bez tlakování přímo na koloně). Frakce obsahující požadovanou látku byly odpařeny na vakuové rotační odparce. Získané krystaly byly rekrystalovány z vody za přídavku karborafinu. Po ochlazení krystalizačního

roztoku na 5 °C došlo ke kvantitativnímu vyloučení čistého produktu, který byl následně odsát na fritě a promyt 2x studenou vodou (20 ml) a 1x ledovým ethanolem (10 ml). Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně při 80 °C a tlaku 0,1 mbar (což je nutné především pro následnou reakci protože produkt obsahuje krystalovou vodu) bylo získáno 45,3 g (96%) látky **33**.

Pro průmyslovou aplikovatelnost byly vyvinuty dvě alternativní metody izolace požadovaného produktu z reakční směsi (odstranění ethylenglykolu) bez použití iontoměničů.

1) Po ochlazení získané reakční směsi na laboratorní teplotu bylo přidáno 500 ml destilované vody a celá směs byla chlazená na -20 °C (v mrazicím boxu) po dobu dvou dnů, během kterých došlo k přibližně 80% vykristalování požadovaného produktu z chlazené směsi. Krystaly byly následně rychle odsáty a promyty 2x studenou vodou. Po rekrystalizaci (jak je popsána výše) byl získán požadovaný produkt ve výtěžku o 18% nižším, než je popsáno výše.

2) Po ochlazení získané reakční směsi na laboratorní teplotu bylo přidáno 500 ml diethyletheru za vyloučení bílé sraženiny (obsahující požadovanou látku a chlorid draselný). Po ochlazení na 0 °C byla získaná sraženina odfiltrována, promyta 3x diethyletherem a rekrystalizována z vody (jak je popsáno výše). Byl získán požadovaný produkt ve výtěžku o 7% nižším než při použití iontoměničů.

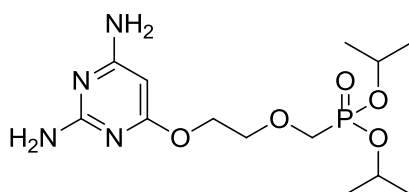


2,4-Diamino-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidin (33): bílá krystalická látka, b.t. 221-22 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 7,02 bs, 2 H, (NH₂); 5,90 bs, 2 H, (NH₂); 5,04 s, 1 H, (H-5); 4,80 t, 1 H, *J*(OH,CH₂) = 5,4 (OH); 4,09 m, 2 H, (H-1'); 3,61 m, 2 H, (H-2'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 170,3 (C-6); 166,2 (C-4); 163,14 (C-2); 76,5 (C-5); 66,8 (C-1'); 59,9 (C-2'). Pro C₆H₁₀N₄O₂ (170,2) vypočteno (%): C 42,35; H 5,92; N 32,92; nalezeno (%): C 42,17; H 6,02; N 32,75. MS ESI(+), *m/z* (%): 171 [M⁺] (100), 193 [M⁺Na] (85).

5.7.2. Příprava diisopropyl-((2-((2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)-fosfonátu (34) – zároveň obecný postup pro přípravu dalších diisopropylesterů PMEO-DAPy

Do vyžíhané baňky bylo pod argonem předloženo 17,02 g (100 mmol) látky **33** a 200 ml suchého DMF. Reakční nádoba byla opatřena chlorkalciovým uzávěrem. Za intenzivního míchání magnetickým míchadlem bylo přidáno 0,02 g (katal.) DMAP a 5,40 g (135 mmol) hydridu sodného (60% suspenze v minerálním oleji). Postupně vznikající suspenze sodné soli látky **33** byla dále intenzivně míchána při laboratorní teplotě po dobu 15 minut (za vývoje vodíku). Následně byla reakční nádoba opatřena vodní lázní pro udržování reakční teploty na laboratorní teplotě a k vzniklé soli látky **33** bylo přidáno 27,21 g (105 mmol) diisopropylbrommethylfosfonátu (**4**). Reakční směs byla dále míchána při laboratorní teplotě 12 hodin, během kterých se ze suspenze sodné soli látky **33** stal žlutý průzračný roztok látky **34**. Celá

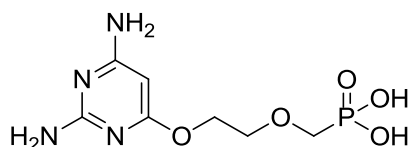
reakční směs byla následně odpařena na vakuové rotační odparce a získaný odparek byl extrahován mezi vodu (400 ml) a chloroform (100ml). Vodná vrstva byla extrahována ještě třikrát 100 ml chloroformu. Spojené organické frakce byly sušeny bezvodým MgSO₄. Po důkladném odpaření veškerého chloroformu byla získána pomalu krystalující bílá látka. K získanému odparku bylo přidáno 50 ml hexanu a celá směs byla vystavena působení ultrazvuku po dobu 10 minut. Hexan byl dekantován a celý postup s hexanem byl opakován ještě jednou. K získaným krystalům bylo následně přidáno 50 ml diethyletheru a celá směs byla opět vystavena působení ultrazvuku po dobu 10 minut. Získané sněhově bílé krystaly byly odsáty na fritě a promyty 2x 10 ml diethyletheru. Po vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 20,15 g látky **34** (58% teorie) v čistotě vyšší jak 95%.



Diisopropyl-((2-((2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (34): bílá krystalická látka, b.t. 180-181 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 6,01 bs, 2 H, (NH₂); 5,87 bs, 2 H, (NH₂); 5,02 s, 1 H, (H-5''); 4,59 dsept, 2 H, *J*(CH,P) = 7,7, *J*(CH,CH₃) = 6,2 (CH); 4,22 m, 2 H, (H-2'); 3,78 d, 2 H, *J*(1,P) = 8,3 (H-1); 3,74 m, 2 H, (H-1'); 1,24 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,1 (CH₃); 1,23 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,1 (CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 169,9 (C-4''); 166,2 (C-6''); 163,1 (C-2''); 76,4 (C-5''); 71,1 d, *J*(1',P) = 11,7 (C-1'); 70,4 d, *J*(CH,P) = 6,3 (CH); 65,0 d, *J*(1,P) = 164,5 (C-1); 63,7 (C-2'); 24,0 d, *J*(CH₃,P) = 3,9 (CH₃); 23,9 d, *J*(CH₃,P) = 4,4 (CH₃). Pro C₁₃H₂₅N₄O₅P (348,3) vypočteno (%): C 44,82; H 7,23; N 16,08; nalezeno (%): C 44,67; H 7,34; N 16,00. MS ESI(+), *m/z* (%): 349 [M⁺] (100).

5.7.3. Příprava ((2-((2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonové kyseliny (35) – zároveň obecný postup pro přípravu dalších volných PMEODAPy

Do vyžíhané baňky bylo pod argonem předloženo 3,48 g (10 mmol) látky **34**, 100 ml suchého acetonitrilu a 7,65 g (50 mmol) trimethylsilylbromidu. Reakční nádoba byla těsně uzavřena silikonovým septem a míchána magnetickým míchadlem 12 hodin. Poté byla reakční směs důkladně odpařena na vakuové rotační odparce při tlaku 2 mbar a teplotě 40 °C. Získaný odparek byl dvakrát kodestilován s 50 ml suchého toluenu. Získaný bis(trialkylsilyl)ester byl rozpuštěn v 100 ml ethanolu. Ke vzniklému roztoku bylo přidáno 100 ml vody a celá směs byla vystavena působení ultrazvuku po dobu 10 minut. Získaná suspenze požadovaného produktu byla důkladně odpařena na vakuové rotační odparce při tlaku 2 mbar a teplotě 60 °C. Vzniklý odparek byl suspendován v 50 ml 50% vodného ethanolu a vystaven působení ultrazvuku po dobu dalších 10 minut. Sněhově bílá látka **35** byla odsáta na fritě a promyta 2x 20 ml ethanolu a 1x 20 ml acetonu. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 2,45 g (93% teorie) látky **35** v čistotě vyšší jak 95%. Získané fosfonové kyseliny je možno dle potřeby (pro zvýšení čistoty či vypěstování monokrystalu pro rentgenovou strukturní analýzu) rekrystalovat z destilované vody.

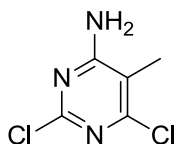


((2-((2,6-Diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (35): bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 5,37 s, 1 H, (H-5''); 4,21 m, 2 H, (H-2'); 3,84 m, 2 H, (H-1'); 3,50 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,4$ (H-1). ^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 170,8 (C-4''); 166,7 (C-6''); 162,7 (C-2''); 76,8 (C-5''); 70,3 d, $J(1',\text{P}) = 10,7$ (C-1'); 69,1 d, $J(1,\text{P}) = 149,9$ (C-1); 66,2 (C-2'). Pro $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{P}$ (264,2) vypočteno (%): C 31,83; H 4,96; N 21,21; nalezeno (%): C 31,69; H 4,86; N 20,95. MS ESI(+), m/z (%): 265 [M^+] (100), 287 [M^+Na] (35).

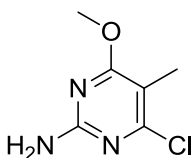
5.7.4. Reakce amoniaku s 2,4,6-trichlor-5-methylpyrimidinem

Do autoklávu bylo předloženo 19,7 g (100 mmol) 2,4,6-trichlor-5-methylpyrimidinu a 300 ml 2M methanického amoniaku (600 mmol). Po uzavření byla reakční směs zahřívána na 100 °C po dobu 4 hodin. Po ochlazení byla reakční směs odpařena a extrahována mezi chloroform a vodu (pro odstranění chloridu amonného). Organická vrstva byla navíc extrahována 3x 100 ml chloroformu a spojené organické frakce byly odpařeny. Získaný odparek byl dělen gradientovou sloupcovou chromatografií (silikagel, chloroform/methanol, 99/1 až 90/10). Postupně byly eluovány látky **36** (2,10 g tzn. 12% teorie), **37** (3,49 g tzn. 20% teorie) a nakonec požadovaná látka **38** (10,10 g tzn. 64% teorie). Látka **38** byla pro maximální čistotu rekrystalována z 96% ethanolu.

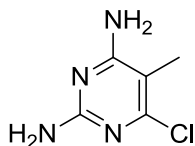
Při analogické reakci 2,4,6-trichlor-5-methylpyrimidinu s ethanolickým amoniakem byla po zahřívání na 100 °C po dobu 6 hodin získána pouze látka **38**. Izolace byla provedena extrakcí (jak je popsáno výše) a rekrystalizací opět z 96% ethanolu. Takto bylo získáno 14,18 g látky **38** (89% teorie).



4-Amino-2,6-dichlor-5-methylpyrimidin (36): bílá krystalická látka, b.t. 157-158 °C. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 7,84 bs a 7,37 bs, 2 H, (NH_2); 2,04 s, 3 H, (CH_3). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 165,0 (C-4); 156,8 (C-6); 155,7 (C-2); 109,2 (C-5); 12,5 (CH_3). Pro $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_3\text{Cl}_2$ (178,0) vypočteno (%): C 33,73; H 2,83; N 23,60; nalezeno (%): C 33,91; H 2,85; N 23,41. MS ESI(+), m/z (%): 178 [M^+] (100).



2-Amino-4-chlor-6-methoxy-5-methylpyrimidin (37): bílá krystalická látka, b.t. 112-114 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 6,76 bs, 2 H, (NH₂); 3,84 s, 3 H, (OCH₃); 1,95 s, 3 H, (CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 168,9 (C-6); 160,7 (C-2); 158,8 (C-4); 101,5 (C-5); 54,3 (OCH₃); 10,8 (CH₃). Pro C₆H₈N₃O (173,6) vypočteno (%): C 41,51; H 4,64; N 24,21; nalezeno (%): C 41,56; H 4,46; N 23,97. MS ESI(+), *m/z* (%): 174 [M⁺] (100).



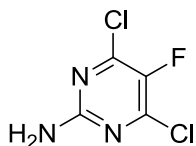
2,4-Diamino-6-chlor-5-methylpyrimidin (38): bílá krystalická látka, b.t. 214-215 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 6,48 bs, 2 H, (NH₂); 6,05 bs, 2 H, (NH₂); 1,92 s, 3 H, (CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 164,2 (C-4); 160,9 (C-2); 157,5 (C-6); 98,0 (C-5); 12,2 (CH₃). Pro C₅H₇N₄Cl (158,6) vypočteno (%): C 37,87; H 4,45; N 35,33; nalezeno (%): C 37,71; H 4,47; N 35,48. MS ESI(+), *m/z* (%): 159 [M⁺] (100).

5.7.5. Příprava 2-amino-5-fluor-4,6-dichlorpyrimidinu (39) – zároveň obecný postup pro přípravu dalších 5-substituovaných 2,4-diamino-6-chlorpyrimidinů viz 3.5.2.1.

V 300 ml absolutního methanolu bylo pod inertním plynem (argonem) rozpuštěno 12,9 g (560 mmol) kovového sodíku za intenzivního míchání hřidelovým míchadlem. Reakční nádoba byla opatřena kondenzačním chladičem s chlorkalciovým uzávěrem, tak aby nedocházelo k tlakování reakční směsi vlivem masivního vývoje vodíku a rychlého ohřívání rozpouštědla, které přechází až ve var. Po rozpuštění veškerého sodíku a po ochlazení reakční směsi na teplotu místnosti bylo za intenzivního míchání přidáno 21,02 g (220 mmol) hydrochloridu guanidinu a následně 35,63 g (200 mmol) diethyl-fluoromalonátu (či mono-substituovaného ethyl-kyanacetátu). Reakční směs byla dále intenzivně míchána po dobu 4 hodin. Poté byla reakční směs za míchání zahřívána k varu jednu hodinu. Následně bylo na vakuové rotační odparce odpařeno cca 200-300 ml methanolu a k reakční směsi bylo přidáno 500 ml vody. Získaný roztok byl následně neutralizován přikapáním kyseliny octové za okamžitého vyloučení kýženého produktu ve formě sraženiny. Ta byla následně refluxována 10 minut a poté ochlazená na laboratorní teplotu. Toto refluxování a chlazení bylo opakováno ještě 2x za vzniku dobře filtrovatelného pevného produktu. Po odsátí a promytí 2x50 ml vody, 2x50 ml ethanolu a 2x50 ml acetonu byl produkt sušen ve vakuové sušárně při 60 °C a tlaku 0,1 mbar dva dny. Získaná čistota takto připraveného produktu je dostatečná pro následující reakci a dle analýz obsahuje pouze krystalickou vodu. Po důkladném vysušení (při 80 °C a tlaku 0,1 mbar po dobu pěti dní) bylo získáno 29 g požadovaného produktu (kvantitativní výtěžek).

14,51 g (100 mmol) získaného 2-amino-5-fluor-4,6-dihydroxypyrimidinu (či 5-substituovaných 2,4-amino-6-hydroxypyrimidinů) bylo předloženo pod argonem do reakční baňky společně s 23,28 g (250 mmol) 2-methylpyridinu. Za intenzivního míchání a chlazení reakční nádoby (lázně obsahující vodu a led) bylo velmi pomalu přikapáno 91,14 g (600 mmol) POCl₃. Následně byla odstraněna chladičí lázeň a reakční směs byla následně ohřívána

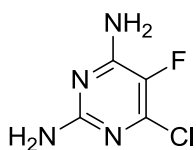
olejovou lázní na 110 °C po dobu 4 hodin. Po této době byla reakční směs nalita na drcený led a následně neutralizována nasyceným vodným roztokem NaHCO₃. Vyloučený produkt byl odsát a promyt 4x 300 ml vody a 1x 30 ml ledového ethanolu. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 16,14 g surového produktu (89% teorie). Po rekrystalizaci z ethanolu bylo získáno 14,25 g (78% teorie) velmi čisté látky **39**.



2-Amino-5-fluor-4,6-dichloropyrimidin (39): bílá krystalická látka, b.t. 231-233 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 7,45 bs, 2 H (NH₂). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 158,4 d, *J*(2,F) = 5,0 (C-2); 147,4 d, *J*(4 a 6,F) = 18,2 (C-4 a 6); 141,3 d, *J*(5,F) = 250,3 (C-5). Pro C₄H₂N₃Cl₂F (182,0) vypočteno (%): C 26,40; H 1,11; N 23,09; nalezeno (%): C 26,21; H 1,25; N 23,00. MS ESI(+), *m/z* (%): 182 [M⁺] (100).

5.7.6. Příprava 2,4-diamino-5-fluor-6-chlorpyrimidinu (40)

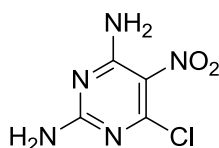
Z 9,06 g (50 mmol) výchozí látky **39** bylo postupem popsaným v sekci **5.7.4**. po rekrystalizaci z ethanolu získáno 6,98 g (86% teorie) požadované látky **40**.



2,4-Diamino-5-fluor-6-chlorpyrimidin (40): bílá krystalická látka, b.t. 244-245 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 6,99 bs, 2 H (NH₂); 6,25 bs, 2 H (NH₂). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 158,2 d, *J*(2,F) = 4,5 (C-2); 154,4 d, *J*(4,F) = 12,8 (C-4); 141,4 d, *J*(6,F) = 14,7 (C-6); 133,3 d, *J*(5,F) = 243,1 (C-5). Pro C₄H₄N₄ClF (162,6) vypočteno (%): C 29,56; H 2,48; N 34,47; nalezeno (%): C 29,43; H 2,54; N 34,28. MS ESI(+), *m/z* (%): 163 [M⁺] (100).

5.7.7. Příprava 2,4-diamino-6-chlor-5-nitropyrimidinu (41)

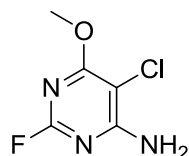
Pro přípravu této látky byl přesně opakován postup popsaný v literatuře^[182] (nitrace 2,4-diamino-6-chlorpyrimidinu nitrační směsí). Ze 7,23 g (50 mmol) výchozí látky bylo získáno 3,95 g (42% teorie) požadovaného produktu **41**.



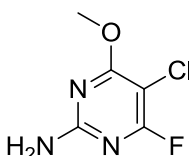
2,4-Diamino-6-chlor-5-nitropyrimidin (41): bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 8,00 bs a 7,80 bs, 2 H (NH₂); 7,64 bs a 7,46 bs, 2 H (NH₂). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 160,9 (C-4); 156,2 (C-2); 154,3 (C-6); 110,56 (C-5). Pro C₄H₄N₂O₂Cl (189,6) vypočteno (%): C 25,34; H 2,13; N 36,95; nalezeno (%): C 25,56; H 2,27; N 36,75. MS ESI(+), m/z (%): 190 [M⁺] (100).

5.7.8. Reakce amoniaku s 2,4,6-fluor-5-chlorpyrimidinem

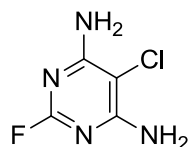
Při této reakci byly využity navážky a podmínky identické s postupem 5.7.4. jediným rozdílem bylo použití 2,4,6-fluor-5-chlorpyrimidinu jako výchozí látky. Po extrakci byla získaná směs dělena gradientovou sloupcovou chromatografií (silikagel; hexan/ethyl-acetát, 90/10 až 50/50). Postupně byly eluovány látky **42** (2,95 g tzn. 17% teorie), **43** (1,56 g tzn. 9% teorie), **44** (6,45 g tzn. 40% teorie) a nakonec požadovaná látka **45** (5,25 g tzn. 32% teorie). Látka **44** a **46** byla pro maximální čistotu rekrystalována v 96% ethanolu.



4-Amino-2-fluor-5-chlor-6-methoxy-pyrimidin (42): bílá krystalická látka, b.t. 134-136 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6) 7,70 bs a 7,30 bs, 2 H, (NH₂); 3,89 s, 3 H, (OCH₃). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) 166,0 d, $J(6,\text{F}) = 17,8$ (C-6); 162,7 d, $J(4,\text{F}) = 19,6$ (C-4); 159,2 d, $J(2,\text{F}) = 208,4$ (C-2); 90,4 d, $J(5,\text{F}) = 8,1$ (C-5); 55,1 (OCH₃). Pro C₅H₅N₃OCIF (177,6) vypočteno (%): C 33,82; H 2,84; N 23,66; nalezeno (%): C 34,04; H 2,66; N 23,38. MS ESI(+), m/z (%): 178 [M⁺] (100).

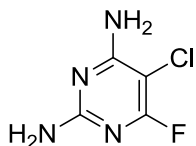


2-Amino-4-fluor-5-chlor-6-methoxy-pyrimidin (43): bílá krystalická látka, b.t. 145-146 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6) 7,24 bs, 2 H, (NH₂); 3,92 s, 3 H, (OCH₃). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) 167,2 d, $J(6,\text{F}) = 7,6$ (C-6); 165,3 d, $J(4,\text{F}) = 235,8$ (C-4); 160,2 d, $J(2,\text{F}) = 24,8$ (C-2); 85,5 d, $J(5,\text{F}) = 32,3$ (C-5); 55,2 (OCH₃). Pro C₅H₅N₃OCIF (177,6) vypočteno (%): C 33,82; H 2,84; N 23,66; nalezeno (%): C 33,89; H 2,97; N 23,54. MS ESI(+), m/z (%): 178 [M⁺] (100).



4,6-Diamino-2-fluor-5-chloropyrimidin (44): bílá krystalická látka, b.t. 181-182 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6) 6,90 bs, (NH₂). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) 161,1 d, $J(6$ či $4,\text{F}) = 20,4$ (C-4 a 6); 160,2 d, $J(2,\text{F}) = 202,7$ (C-2); 86,36 d, $J(5,\text{F}) = 6,9$ (C-5). Pro C₄H₄N₄ClF (162,6) vypočteno (%): C

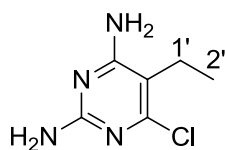
29,56; H 2,48; N 34,47; nalezeno (%): C 29,84; H 2,36; N 33,24. MS ESI(+), m/z (%): 163 $[M^+]$ (100).



2,4-Diamino-6-fluor-5-chloropyrimidin (45): bílá krystalická látka, b.t. 198-199 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6) 6,99 bs, 2 H (NH₂); 6,51 bs, 2 H (NH₂). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) 164,5 d, $J(6,\text{F}) = 232,6$ (C-6); 162,9 d, $J(4,\text{F}) = 5,7$ (C-4); 160,6 d, $J(2,\text{F}) = 23,2$ (C-2); 81,33 d, $J(5,\text{F}) = 31,7$ (C-5). Pro C₄H₄N₄ClF (162,6) vypočteno (%): C 29,56; H 2,48; N 34,47; nalezeno (%): C 29,81; H 2,39; N 33,40. MS ESI(+), m/z (%): 163 $[M^+]$ (100).

5.7.9. Příprava 5-substituovaných 2,4-diamino-6-chlorpyrimidinů (46-53)

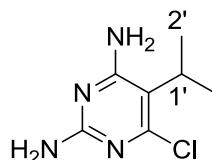
Při těchto reakcích byly využity navážky a podmínky identické s postupem 5.7.5. jediným rozdílem bylo použití substituovaných ethyl-kyanacetátů jako výchozích látek. Získané sraženiny (po reakci vždy 100 mmol 5-substituovaných 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidinů s POCl₃) byly vždy rekrystalovány z 96% ethanolu. Dále jsou uvedeny jednotlivé sloučeniny společně s izolovanými výtěžky.



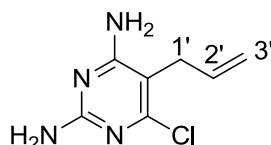
2,4-Diamino-5-ethyl-6-chloropyrimidin (46): získáno 13,40 g (78% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 183-184 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,49 bs, 2 H, (NH₂); 6,04 bs, 2 H, (NH₂); 2,41 q, 2 H, $J(\text{CH}_2,\text{CH}_3) = 7,4$ (H-1'); 0,96 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,4$ (H-2'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 163,6 (C-2); 160,9 (C-4); 157,4 (C-6); 104,0 (C-5); 19,3 (C-1'); 12,9 (C-2'). Pro C₆H₉N₄Cl (172,6) vypočteno (%): C 41,75; H 5,26; N 32,46; nalezeno (%): C 41,60; H 5,28; N 32,26. MS ESI(+), m/z (%): 173 $[M^+]$ (100).



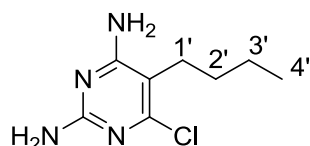
2,4-Diamino-6-chlor-5-propylpyrimidin (47): získáno 11,52 g (62% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 177-178 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,55 bs, 2 H, (NH₂); 6,23 bs, 2 H, (NH₂); 2,30 t, 2 H, $J(\text{CH}_2,\text{CH}_2) = 7,3$ (H-1'); 1,30 m, 2 H, (H-2'); 0,87 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,5$ (H-3'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 163,2 (C-2); 161,3 (C-4); 157,7 (C-6); 104,9 (C-5); 23,5 (C-1'); 21,6 (C-2'); 13,4 (C-3'). Pro C₇H₁₁N₄Cl (186,6) vypočteno (%): C 45,05; H 5,94; N 30,02; nalezeno (%): C 45,21; H 5,78; N 29,77. MS ESI(+), m/z (%): 187 $[M^+]$ (100).



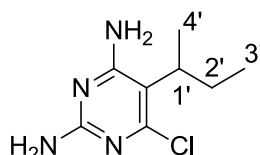
2,4-Diamino-6-chlor-5-isopropylpyrimidin (48): získáno 14,96 g (80% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 189-190 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,36 bs, 2 H, (NH₂); 6,04 bs, 2 H, (NH₂); 3,19 sept, 1 H, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 7,2$ (H-1'); 1,20 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 7,2$ (H-2'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 163,5 (C-4); 160,5 (C-2); 157,2 (C-6); 107,1 (C-5); 25,78 (C-1'); 19,9 (C-2'). Pro C₇H₁₁N₄Cl (186,6) vypočteno (%): C 45,05; H 5,94; N 30,02; nalezeno (%): C 45,20; H 5,87; N 29,87. MS ESI(+), m/z (%): 187 [M⁺] (100).



5-Allyl-2,4-diamino-6-chloropyrimidin (49): získáno 12,51 g (68% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 188-189 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,46 bs, 2 H, (NH₂); 6,13 bs, 2 H, (NH₂); 5,76 ddt, 1 H, $J(2',1') = 5,9$, $J(2',3'_{\text{cis}}) = 10,1$, $J(2',3'_{\text{trans}}) = 17,1$ (H-2'); 5,00 ddt, 1 H, $J(3'_{\text{trans}},1') = 1,7$, $J(\text{gem}) = 2,0$, $J(3'_{\text{trans}},2') = 17,1$ (H-3'_{\text{trans}}); 4,96 ddt, 1 H, $J(3'_{\text{cis}},1') = 1,7$, $J(\text{gem}) = 2,0$, $J(3'_{\text{cis}},2') = 10,1$ (H-3'_{\text{cis}}); 3,16 dt, 2H, $J(1',3') = 1,7$, $J(1',2') = 5,9$ (H-1'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 163,8 (C-2); 161,2 (C-4); 158,3 (C-6); 134,8 (C-2'); 115,0 (C-3'); 99,9 (C-5); 29,8 (C-1'). Pro C₇H₉N₄Cl (184,6) vypočteno (%): C 45,54; H 4,91; N 30,25; nalezeno (%): C 45,40; H 4,87; N 30,00. MS ESI(+), m/z (%): 185 [M⁺] (100).

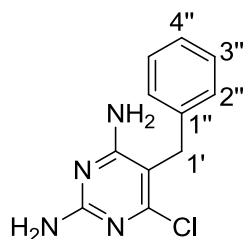


2,4-Diamino-5-butyl-6-chloropyrimidin (50): získáno 14,70 g (73% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 168-169 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,75 bs, 2 H, (NH₂); 6,05 bs, 2 H, (NH₂); 2,29 t, 2 H, $J(\text{CH}_2,\text{CH}_2) = 7,2$ (H-1'); 1,29 m, 4 H, (H-2' a 3'); 0,83 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,2$ (H-4'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 163,6 (C-2); 161,5 (C-4); 157,4 (C-6); 105,3 (C-5); 30,8 (C-2'); 22,3 (C-1'); 21,5 (C-3'); 14,5 (C-4'). Pro C₈H₁₃N₄Cl (200,7) vypočteno (%): C 47,88; H 6,53; N 27,92; nalezeno (%): C 47,65; H 6,78; N 27,82. MS ESI(+), m/z (%): 201 [M⁺] (100).

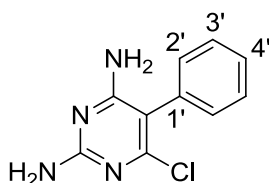


2,4-Diamino-6-chlor-5-(sec-butyl)pyrimidin (51): získáno 15,34 g (76% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 161-162 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,77 bs, 2 H, (NH₂); 6,23 bs, 2 H, (NH₂); 2,64 m, 1 H, (H-1'); 1,63 m a 1,44 m, 2 H, (H-2'); 1,17 d, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,6$ (H-4'); 0,75 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,3$ (H-3'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 163,5 (C-2); 161,3 (C-4);

157,1 (C-6); 105,7 (C-5); 30,8 (C-1'); 27,6 (C-2'); 19,7 (C-4'); 12,1 (C-3'). Pro C₈H₁₃N₄Cl (200,7) vypočteno (%): C 47,88; H 6,53; N 27,92; nalezeno (%): C 47,97; H 6,47; N 27,68. MS ESI(+), *m/z* (%): 201 [M⁺] (100).



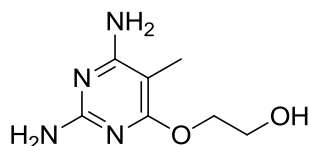
2,4-Diamino-5-benzyl-6-chloropyrimidin (52): získáno 19,41 g (83% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 177-179 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 7,26 m, 2 H, (H-3''); 7,17 m, 2 H, (H-2''); 7,14 m, 1 H, (H-4''); 5,51 bs, 2 H, (NH₂); 6,18 bs, 2 H, (NH₂); 3,81 s, 2 H, (H-1'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 163,5 (C-2); 161,6 (C-4); 158,5 (C-6); 141,5 (C-1''); 128,3 (C-3''); 128,0 (C-2''); 125,8 (C-4''); 100,1 (C-5); 27,9 (C-1'). Pro C₁₁H₁₁N₄Cl (234,7) vypočteno (%): C 56,30; H 4,72; N 23,87; nalezeno (%): C 56,43; H 4,89; N 23,72. MS ESI(+), *m/z* (%): 235 [M⁺] (100).



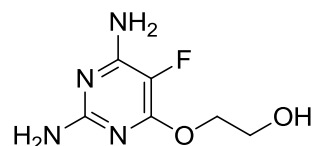
2,4-Diamino-5-fenyl-6-chloropyrimidin (53): získáno 14,05 g (69% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 185-186 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 7,43 m, 2 H, (H-3'); 7,35 m, 2 H, (H-2'); 7,22 m, 1 H, (H-4'); 6,40 bs, 2 H, (NH₂); 6,00 bs, 2 H, (NH₂). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 163,3 (C-2); 161,7 (C-4); 156,9 (C-6); 134,3 (C-1'); 130,8 (C-3'); 129,0 (C-2'); 127,8 (C-4'); 105,2 (C-5). Pro C₁₀H₉N₄Cl (220,7) vypočteno (%): C 54,43; H 4,11; N 25,39; nalezeno (%): C 54,23; H 4,20; N 25,25. MS ESI(+), *m/z* (%): 221 [M⁺] (100).

5.7.10. Příprava 5-substituovaných 2,4-diamino-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidinů (54-65)

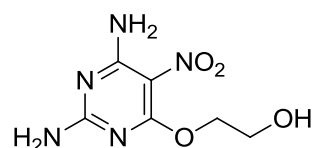
Pro přípravu těchto látek byl využit univerzální postup, tak jak je popsán v sekci 5.7.1., vždy z 20 mmol výchozí látky. U všech dále uváděných 2-hydroxyethoxy sloučenin je (bez ohledu na název) pro přehlednost (a konzistenci) zbytek 2-hydroxyethoxy v NMR spektru číslován jako hlavní vedlejší (tzn. jedna čárka) zatímco substituenty v poloze 5 pyrimidinového kruhu jsou značeny jako následné (tzn. dvě či tři čárky). Izolované výtěžky jsou uváděny vždy u každé sloučeniny jednotlivě.



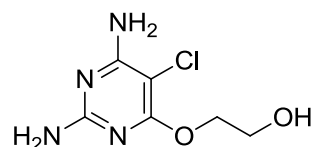
2,4-Diamino-6-(2-hydroxyethoxy)-5-methylpyrimidin (54): získáno 3,21 g (87% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 189-191 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 5,83 bs, 2 H, (NH₂); 5,63 bs, 2 H, (NH₂); 4,76 t, 1 H, *J*(OH,CH₂) = 5,1 (OH); 4,14 m, 2 H, (H-1'); 3,63 m, 2 H, (H-2'); 1,74 s, 3 H, (CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) 166,9 (C-6); 164,1 (C-4); 160,6 (C-2); 83,4 (C-5); 66,9 (C-1'); 60,0 (C-2'); 8,0 (CH₃). Pro C₇H₁₂N₄O₂ (184,2) vypočteno (%): C 45,64; H 6,67; N 30,42; nalezeno (%): C 45,42; H 6,44; N 30,47. MS ESI(+), *m/z* (%): 185 [M⁺] (100), 197 [M⁺Na] (25).



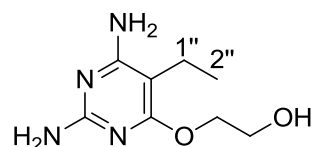
2,4-Diamino-5-fluor-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidin (55): získáno 3,60 g (96% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 235-237 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 6,29 bs, 2 H, (NH₂); 5,82 bs, 2 H, (NH₂); 4,82 t, 1 H, *J*(OH,CH₂) = 5,5 (OH); 4,19 t, 2 H, *J*(1',2') = 5,4 (H-1'); 3,65 q, 2 H, *J*(2',1') = *J*(2',OH) = 5,4 (H-2'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) 157,6 d, *J*(2,F) = 5,9 (C-2); 155,9 d, *J*(6,F) = 7,5 (C-6); 154,0 d, *J*(4,F) = 10,0 (C-4); 125,2 d, *J*(5,F) = 233,6 (C-5); 67,32 (C-1'); 59,6 (C-2'). Pro C₆H₉N₄O₂ (188,2) vypočteno (%): C 38,30; H 4,82; N 29,78; nalezeno (%): C 38,35; H 4,70; N 29,54. MS ESI(+), *m/z* (%): 189 [M⁺] (100).



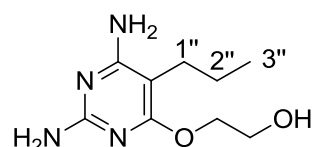
2,4-Diamino-6-(2-hydroxyethoxy)-5-nitropyrimidin (56): získáno 3,86 g (90% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 7,90 bs, 2 H, (NH₂); 7,17 bs, 2 H, (NH₂); 4,80 t, 1 H, *J*(OH,CH₂) = 5,3 (OH); 4,34 t, 2 H, *J*(1',2') = 5,3 (H-1'); 3,69 q, 2 H, *J*(2',1') = *J*(2',OH) = 5,3 (H-2'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) 164,9 (C-6); 161,0 a 160,2 (C-2 a 4); 109,6 (C-5); 68,7 (C-1'); 59,3 (C-2'). Pro C₆H₉N₅O₄ (215,2) vypočteno (%): C 33,49; H 4,22; N 32,55; nalezeno (%): C 33,78; H 4,03; N 32,29. MS ESI(+), *m/z* (%): 216 [M⁺] (100), 238 [M⁺Na] (20).



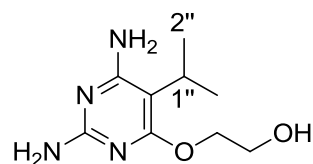
2,4-Diamino-6-(2-hydroxyethoxy)-5-chloropyrimidin (57): získáno 3,95 g (97% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 217-219 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 5,93 bs, 2 H, (NH₂); 5,78 bs, 2 H, (NH₂); 4,85 t, 1 H, *J*(OH,CH₂) = 5,0 (OH); 4,16 m, 2 H, (H-1'); 3,62 m, 2 H, (H-2'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) 171,2 (C-6); 164,2 (C-4); 160,9 (C-2); 83,1 (C-5); 66,3 (C-1'); 60,7 (C-2'). Pro C₆H₉N₄O₂Cl (204,6) vypočteno (%): C 35,22; H 4,43; N 27,38; nalezeno (%): C 35,07; H 4,63; N 27,15. MS ESI(+), *m/z* (%): 205 [M⁺] (100), 227 [M⁺Na] (35).



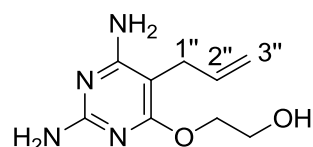
2,4-Diamino-5-ethyl-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidin (58): získáno 3,50 g (88% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 175-176 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 5,82 bs, 2 H, (NH₂); 5,61 bs, 2 H, (NH₂); 5,73 t, 1 H, $J(\text{OH},\text{CH}_2) = 5,6$ (OH); 4,14 m, 2 H, (H-1'); 3,61 m, 2 H, (H-2'); 2,27 q, 2 H, $J(\text{CH}_2,\text{CH}_3) = 7,3$ (H-1''); 0,91 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,3$ (H-2''). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 166,9 (C-6); 163,3 (C-4); 160,6 (C-2); 90,2 (C-5); 66,7 (C-1'); 60,0 (C-2'); 15,4 (C-1''); 13,6 (C-2''). Pro C₈H₁₄N₄O₂ (198,2) vypočteno (%): C 48,47; H 7,12; N 28,26; nalezeno (%): C 48,19; H 7,34; N 28,22. MS ESI(+), m/z (%): 199 [M⁺] (100), 221 [M⁺Na] (25).



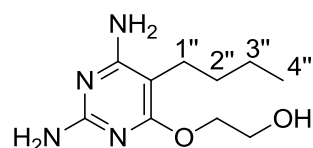
2,4-Diamino-6-(2-hydroxyethoxy)-5-propylpyrimidin (59): získáno 3,90 g (92% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 154-155 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 5,81 bs, 2 H, (NH₂); 5,61 bs, 2 H, (NH₂); 4,72 t, 1 H, $J(\text{OH},\text{CH}_2) = 5,5$ (OH); 4,14 m, 2 H, (H-1'); 3,61 m, 2 H, (H-2'); 2,23 t, 2 H, $J(\text{CH}_2,\text{CH}_2) = 7,5$ (H-1''); 1,34 m, 2 H, (H-2''); 0,84 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,3$ (H-3''). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 167,2 (C-6); 163,7 (C-4); 160,6 (C-2); 88,2 (C-5); 66,7 (C-1'); 60,0 (C-2'); 24,0 (C-1''); 21,7 (C-2''); 13,9 (C-3''). Pro C₉H₁₆N₄O₂ (212,3) vypočteno (%): C 50,93; H 7,60; N 26,40; nalezeno (%): C 50,87; H 7,55; N 26,19. MS ESI(+), m/z (%): 213 [M⁺] (100), 235 [M⁺Na] (40).



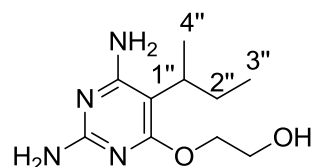
2,4-Diamino-6-(2-hydroxyethoxy)-5-isopropylpyrimidin (60): získáno 3,85 g (91% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 140-142 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 5,75 bs, 2 H, (NH₂); 5,57 bs, 2 H, (NH₂); 4,70 t, 1 H, $J(\text{OH},\text{CH}_2) = 5,2$ (OH); 4,14 m, 2 H, (H-1'); 3,64 m, 2 H, (H-2'); 2,89 sept, 1 H, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,8$ (H-1''); 1,14 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,8$ (H-2''). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 167,5 (C-6); 162,9 (C-4); 160,3 (C-2); 94,0 (C-5); 66,6 (C-1'); 60,0 (C-2'); 23,4 (C-1''); 21,0 (C-2''). Pro C₉H₁₆N₄O₂ (212,3) vypočteno (%): C 50,93; H 7,60; N 26,40; nalezeno (%): C 50,99; H 7,48; N 26,32. MS ESI(+), m/z (%): 213 [M⁺] (100), 235 [M⁺Na] (15).



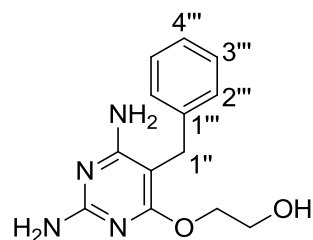
5-Allyl-2,4-diamino-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidin (61): získáno 3,80 g (90% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 134-136 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 5,78 bs, 2 H, (NH₂); 5,70 bs, 2 H, (NH₂); 5,73 ddt, 1 H, $J(2'',1'') = 6,2$, $J(2'',3''_{\text{cis}}) = 10,0$, $J(2'',3''_{\text{trans}}) = 17,1$ (H-2''); 5,00 ddt, 1 H, $J(3''_{\text{trans}},1'') = 1,6$, $J(\text{gem}) = 2,3$, $J(3''_{\text{trans}},2'') = 17,1$ (H-3''_{trans}); 4,87 ddt, 1 H, $J(3''_{\text{cis}},1'') = 1,6$, $J(\text{gem}) = 2,3$, $J(3''_{\text{cis}},2'') = 10,0$ (H-3''_{cis}); 4,73 t, 1 H, $J(\text{OH},\text{CH}_2) = 5,0$ (OH); 4,14 m, 2 H, (H-1'); 3,60 m, 2 H, (H-2'); 3,01 dt, 2H, $J(1'',3'') = 1,6$, $J(1'',2'') = 6,2$ (H-1''). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 167,1 (C-6); 163,6 (C-4); 161,0 (C-2); 136,6 (C-2''); 114,2 (C-3''); 86,0 (C-5); 66,8 (C-1'); 60,0 (C-2'); 26,4 (C-1''). Pro C₉H₁₄N₄O₂ (210,3) vypočteno (%): C 51,42; H 6,71; N 26,65; nalezeno (%): C 51,28; H 6,64; N 26,38. MS ESI(+), *m/z* (%): 211 [M⁺] (100), 233 [M⁺Na] (30).



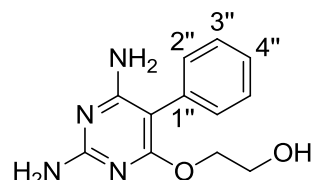
2,4-Diamino-5-butyl-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidin (62): získáno 3,90 g (86% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 144-146 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 5,76 bs, 2 H, (NH₂); 5,60 bs, 2 H, (NH₂); 4,71 t, 1 H, $J(\text{OH},\text{CH}_2) = 5,2$ (OH); 4,14 m, 2 H, (H-1'); 3,61 m, 2 H, (H-2'); 2,25 t, 2 H, $J(\text{CH}_2,\text{CH}_2) = 7,3$ (H-1''); 1,28 m, 4 H, (H-2'' a 3''); 0,86 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,1$ (H-4''). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 167,1 (C-6); 163,6 (C-4); 160,6 (C-2); 88,8 (C-5); 66,6 (C-1'); 60,0 (C-2'); 30,8 (C-2''); 22,0 (C-1''); 21,8 (C-3''); 14,2 (C-4''). Pro C₁₀H₁₈N₄O₂ (212,3) vypočteno (%): C 53,08; H 8,02; N 24,76; nalezeno (%): C 52,89; H 7,86; N 24,67. MS ESI(+), *m/z* (%): 227 [M⁺] (100), 249 [M⁺Na] (30).



2,4-Diamino-6-(2-hydroxyethoxy)-5-(*sec*-butyl)pyrimidin (63): získáno 3,84 g (85% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 127-129 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 5,75 bs, 2 H, (NH₂); 5,59 bs, 2 H, (NH₂); 4,69 t, 1 H, $J(\text{OH},\text{CH}_2) = 5,0$ (OH); 4,13 m, 2 H, (H-1'); 3,62 m, 2 H, (H-2'); 2,61 m, 1 H, (H-1''); 1,67 m a 1,47 m, 2 H, (H-2''); 1,12 d, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,8$ (H-4''); 0,73 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,3$ (H-3''). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 167,5 (C-6); 163,7 (C-4); 160,4 (C-2); 92,3 (C-5); 66,6 (C-1'); 60,0 (C-2'); 30,6 (C-1''); 27,5 (C-2''); 19,2 (C-4''); 12,8 (C-3''). Pro C₁₀H₁₈N₄O₂ (226,3) vypočteno (%): C 53,08; H 8,02; N 24,76; nalezeno (%): C 53,24; H 8,07; N 24,69. MS ESI(+), *m/z* (%): 227 [M⁺] (100), 249 [M⁺Na] (55).



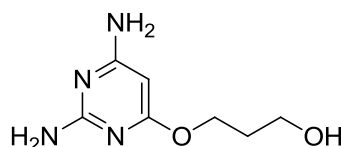
2,4-Diamino-5-benzyl-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidin (64): získáno 5,00 g (96% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 134-136 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 7,22 m, 2 H, (H-3''); 7,20 m, 2 H, (H-2''); 7,11 m, 1 H, (H-4''); 5,86 bs, 2 H, (NH₂); 5,72 bs, 2 H, (NH₂); 4,73 t, 1 H, *J*(OH,CH₂) = 5,2 (OH); 4,16 m, 2 H, (H-1'); 3,63 s, 2 H, (H-1''); 3,61 m, 2 H, (H-2'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 167,3 (C-6); 163,7 (C-4); 161,0 (C-2); 141,6 (C-1''); 128,3 (C-3''); 128,1 (C-2''); 125,6 (C-4''); 88,1 (C-5); 66,8 (C-1'); 59,9 (C-2'); 27,7 (C-1'). Pro C₁₃H₁₆N₄O₂ (260,3) vypočteno (%): C 59,99; H 6,20; N 21,52; nalezeno (%): C 59,78; H 6,23; N 21,37. MS ESI(+), *m/z* (%): 261 [M⁺] (100), 283 [M⁺Na] (20).



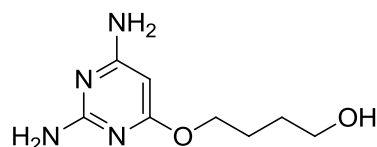
2,4-Diamino-5-fenyl-6-(2-hydroxyethoxy)pyrimidin (65): získáno 4,57 g (93% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 169-170 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 7,35 m, 2 H, (H-3''); 7,26 m, 2 H, (H-2''); 7,23 m, 1 H, (H-4''); 5,99 bs, 2 H, (NH₂); 5,56 bs, 2 H, (NH₂); 4,64 t, 1 H, *J*(OH,CH₂) = 5,2 (OH); 4,16 m, 2 H, (H-1'); 3,54 m, 2 H, (H-2'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 166,2 (C-6); 162,9 (C-4); 161,4 (C-2); 134,1 (C-1''); 130,9 (C-3''); 128,5 (C-2''); 126,3 (C-4''); 91,2 (C-5); 66,7 (C-1'); 59,8 (C-2'). Pro C₁₂H₁₄N₄O₂ (246,3) vypočteno (%): C 58,53; H 5,73; N 22,75; nalezeno (%): C 58,36; H 5,77; N 22,50. MS ESI(+), *m/z* (%): 247 [M⁺] (100), 269 [M⁺Na] (35).

5.7.11. Příprava 2,4-diamino-6-(hydroxyalkoxy)pyrimidinů (66-69)

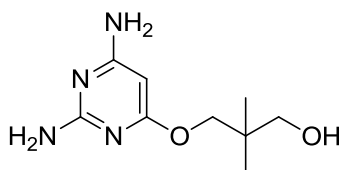
Pro přípravu těchto látek byl využit upravený univerzální postup **5.7.1**. Výchozí 2,4-diamino-6-chlorpyrimidin (20 mmol) byl společně s deseti ekvivalenty zvoleného diolu rozpuštěn v DMF a následně podroben reakci dle procedury **5.7.1**. Reakce byly pro dosažení plné konverze zahřívány vždy 12 hodin na 120 °C. Izolace byla provedena dle postupu **5.7.1**. Izolované výtěžky jsou uváděny u každé sloučeniny jednotlivě.



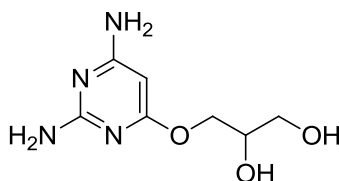
2,4-Diamino-6-(3-hydroxyprop-1-yloxy)pyrimidin (66): získáno 2,97 g (81% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 185-186 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 6,80 bs, 2 H, (NH₂); 6,69 bs, 2 H, (NH₂); 5,17 s, 1 H, (H-5); 4,61 bs, 1 H, (OH); 4,16 t, 2 H, *J*(1',2') = 6,5 (H-1'); 3,47 t, 2 H, *J*(3',2') = 6,3 (H-3'); 1,76 p, 2 H, *J*(2',1') = *J*(2',3') = 6,4 (H-2'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 169,9 (C-6); 163,3 (C-2); 159,9 (C-4); 76,1 (C-5); 63,2 (C-1'); 57,4 (C-3'); 32,1 (C-2'). Pro C₇H₁₂N₄O₂ (184,2) vypočteno (%): C 45,64; H 6,57; N 30,42; nalezeno (%): C 45,48; H 6,45; N 30,19. MS ESI(+), *m/z* (%): 185 [M⁺] (100), 207 [M⁺Na] (65).



2,4-Diamino-6-(4-hydroxybut-1-yloxy)pyrimidin (67): získáno 2,73 g (69% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 130-132 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 6,00 bs, 2 H, (NH₂); 5,88 bs, 2 H, (NH₂); 5,02 s, 1 H, (H-5); 4,61 bs, 1 H, (OH); 4,06 t, 2 H, *J*(1',2') = 6,7 (H-1'); 3,41 m, 2 H, (H-4'); 1,63 m, 2 H, (H-2'); 1,48 m, 2 H, (H-3'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 170,4 (C-6); 166,2 (C-2); 163,2 (C-4); 76,3 (C-5); 64,8 (C-1'); 60,7 (C-4'); 29,3 (C-3'); 25,6 (C-2'). Pro C₈H₁₄N₄O₂ (184,2) vypočteno (%): C 48,47; H 7,12; N 28,26; nalezeno (%): C 48,59; H 6,95; N 28,37. MS ESI(+), *m/z* (%): 199 [M⁺] (100), 221 [M⁺Na] (30).



2,4-Diamino-6-(2,2-dimethyl-3-hydroxyprop-1-yloxy)pyrimidin (68): získáno 3,26 g (77% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 175-177 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 6,14 bs, 2 H, (NH₂); 6,01 bs, 2 H, (NH₂); 5,06 s, 1 H, (H-5); 4,63 bs, 1 H, (OH); 3,83 s, 2 H, (H-1'); 3,18 bs, 2 H, (H-3'); 1,43 s, 6 H, (CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 170,7 (C-6); 165,7 (C-4); 162,5 (C-2); 76,2 (C-5); 70,6 (C-1'); 67,0 (C-3'); 36,3 (C-2'); 21,8 (CH₃). Pro C₉H₁₆N₄O₂ (212,3) vypočteno (%): C 50,93; H 7,60; N 26,40; nalezeno (%): C 50,73; H 7,49; N 26,21. MS ESI(+), *m/z* (%): 213 [M⁺] (100), 235 [M⁺Na] (45).

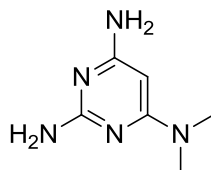


2,4-Diamino-6-(2,3-dihydroxyprop-1-yloxy)pyrimidin (69): získáno 2,87 g (72% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 217-219 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 6,03 bs, 2 H, (NH₂); 5,90 bs, 2 H, (NH₂); 5,04 s, 1 H, (H-5); 4,92 bs, 1 H, (2'-OH); 4,64 bs, 1 H, (3'-OH); 4,08 dd, 1 H, *J*(1a',2') = 4,4, *J*(gem) = 10,8 (H-1a'); 3,98 dd, 1 H, *J*(1b',2') = 4,4, *J*(gem) = 10,8 (H-1b'); 3,68 m, 1 H, (H-2'); 3,39 m, 2 H, (H-3'). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 170,4 (C-6); 166,2 (C-4); 163,1 (C-2); 76,4 (C-5); 70,2 (C-2'); 67,0 (C-1'); 63,1 (C-3'). Pro C₇H₁₂N₄O₃ (200,2) vypočteno (%): C 42,00; H 6,04; N 27,99; nalezeno (%): C 42,25; H 6,20; N 27,83. MS ESI(+), *m/z* (%): 201 [M⁺] (100), 223 [M⁺Na] (85).

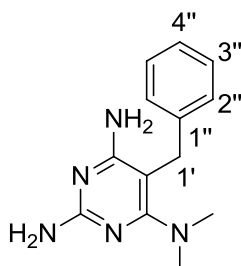
5.7.12. Vznik 2,4-diamino-6-(dimethylamino)pyrimidinů (70-71) při MV zahřívání DMF

Reakční směs dle postupu 5.7.11. (z 2 mmol výchozí látky) byla zahřívána na 160 °C v MV reaktoru typ I. Získaná směs byla izolována v souladu s postupem 5.7.1. Tento postup byl

testován na 2,4-diamino-6-chlorpyrimidinu a 2,4-diamino-5-benzyl-6-chlorpyrimidinu (**52**). Izolované výtěžky jsou uváděny u každé sloučeniny jednotlivě.



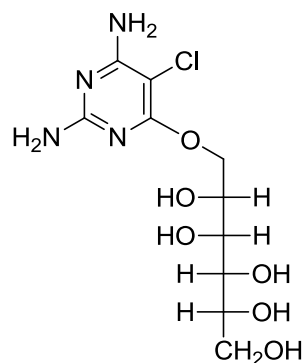
2,4-Diamino-6-(dimethylamino)pyrimidin (70): získáno 263 mg (96% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 5,61 bs, 2 H, (NH₂); 5,40 bs, 2 H, (NH₂); 4,92 s, 1 H, (H-5); 2,86 s, 6 H, (CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 164,9 (C-2); 164,2 (C-6); 162,7 (C-4); 73,5 (C-5); 36,9 (CH₃). Pro C₆H₁₁N₅ (153,2) vypočteno (%): C 47,04; H 7,24; N 45,72; nalezeno (%): C 46,87; H 7,15; N 45,53. MS ESI(+), *m/z* (%): 154 [M⁺] (100).



2,4-Diamino-5-benzyl-6-(dimethylamino)pyrimidin (71): získáno 404 mg (83% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 7,26 m, 2 H, (H-3''); 7,15 m, 3 H, (H-2'' a 4''); 5,63 bs, 2 H, (NH₂); 5,58 bs, 2 H, (NH₂); 3,73 s, 2 H, (H-1'); 2,64 s, 6 H, (CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 167,6 (C-6); 164,2 (C-4); 160,6 (C-2); 140,9 (C-1''); 128,4 (C-2''); 128,0 (C-3''); 125,9 (C-4''); 89,2 (C-5); 41,7 (CH₃); 31,0 (C-1'). Pro C₁₃H₁₇N₅ (243,3) vypočteno (%): C 64,17; H 7,04; N 28,78; nalezeno (%): C 64,25; H 7,13; N 28,69. MS ESI(+), *m/z* (%): 244 [M⁺] (100).

5.7.13. Příprava (((2,4-Diamino-5-chlor-6-(((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)-oxy)pyrimidin

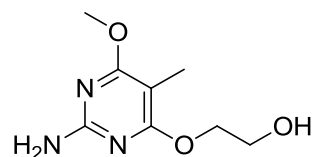
Reakce 2,4-diamino-6-fluor-5-chlorpyrimidinu (**45**) se sorbitolem byla provedena dle postupu **5.7.11.** (z 2 mmol výchozí látky). Po izolaci v souladu s postupem **5.7.1.** byla získána látka **72** ve výtěžku 473 mg (73% teorie).



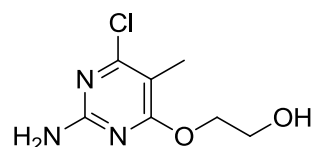
(((2,4-Diamino-5-chlor-6-(((2R,3R,4R,5R)-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)oxy)pyrimidin (72): bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,54 bs, 2 H, (NH₂); 5,75 bs, 2 H, (NH₂); 4,41 dd, 1 H, $J(1a',2') = 2,2$, $J(\text{gem}) = 11,2$ (H-1a'); 4,19 dd, 1 H, $J(1b',2') = 6,8$, $J(\text{gem}) = 11,2$ (H-1b'); 3,75 ddd, 1 H, $J(2',1a') = 2,2$, $J(2',1b') = 6,8$, $J(2',3') = 9,0$ (H-2'); 3,61 dd, 1 H, $J(6a',5') = 3,4$, $J(\text{gem}) = 11,0$ (H-6a'); 3,59 m, 2 H, (H-3' a 4'); 3,48 m, 1 H, (H-5'); 3,39 dd, 1 H, $J(6b',5') = 6,2$, $J(\text{gem}) = 11,0$ (H-6b'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 164,4 (C-4); 161,1 (C-6); 160,3 (C-2); 83,2 (C-5); 71,4 (C-5'); 69,7 (C-3'); 69,6 (C-1'); 69,5 (C-4'); 69,3 (C-2'); 64,1 (C-6'). Pro C₁₀H₁₇N₄O₆Cl+2H₂O (360,1) vypočteno (%): C 33,29; H 5,87; N 15,53; nalezeno (%): C 33,18; H 5,95; N 15,39. MS ESI(+), m/z (%): 325 [M⁺] (80), 347 [M⁺Na] (100).

5.7.14. Reakce látky 47 s ethylenglykolem

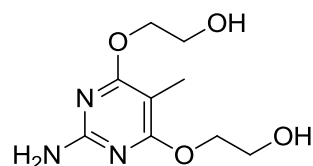
Pro tento pokus byl využit univerzální postup, tak jak je popsán v sekci 5.7.1., z 10 mmol výchozí látky. Po odreagování veškeré výchozí látky byl přebytečný ethylenglykol odstraněn dle postupu 5.7.1. Získaná směs tří sloučenin byla následně dělena gradientovou sloupcovou chromatografií (silikagel; chloroform/ethanol, 95/5 až 85/15). Postupně byly eluovány látky 73 (285 mg tzn. 14% teorie), 74 (220 mg tzn. 11% teorie) a nakonec majoritní produkt reakce látka 75 (1450 mg tzn. 63% teorie).



2-Amino-4-(2-hydroxyethoxy)-6-methoxy-5-methylpyrimidin (73): bílá krystalická látka, b.t. 115-116 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6) 6,25 bs, 2 H, (NH₂); 4,78 t, 1 H, $J(\text{OH},\text{CH}_2) = 5,5$ (OH); 4,20 m, 2 H, (H-1'); 3,78 s, 3 H, (OCH₃); 3,65 m, 2 H, (H-2'); 1,77 s, 3 H, (CH₃). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) 168,7 (C-6); 168,3 (C-4); 160,4 (C-2); 86,7 (C-5); 67,5 (C-1'); 59,8 (C-2'); 53,5 (OCH₃); 7,0 (CH₃). Pro C₈H₁₃N₃O₃ (199,2) vypočteno (%): C 48,23; H 6,58; N 21,09; nalezeno (%): C 48,10; H 6,71; N 21,24. MS ESI(+), m/z (%): 200 [M⁺] (100), 222 [M⁺Na] (40).



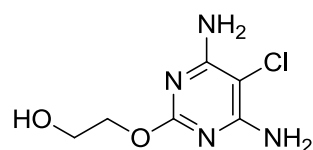
2-Amino-4-(2-hydroxyethoxy)-6-chloro-5-methylpyrimidin (74): bílá krystalická látka, b.t. 134-136 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6) 6,70 bs, 2 H, (NH₂); 4,82 t, 1 H, $J(\text{OH},\text{CH}_2) = 5,6$ (OH); 4,26 t, 2 H, $J(1',2') = 5,1$ (H-1'); 3,68 m, 2 H, (H-2'); 1,97 s, 3 H, (CH₃). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) 168,6 (C-4); 160,6 (C-2); 158,9 (C-6); 101,7 (C-5); 68,3 (C-1'); 59,4 (C-2'); 10,8 (CH₃). Pro C₇H₁₀N₃O₃Cl (203,6) vypočteno (%): C 41,29; H 4,95; N 20,64; nalezeno (%): C 41,51; H 4,74; N 20,49. MS ESI(+), m/z (%): 204 [M⁺] (100), 226 [M⁺Na] (17).



2-Amino-4,6-bis(2-hydroxyethoxy)-5-methylpyrimidin (75): bílá krystalická látka, b.t. 197-199 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6) 6,20 bs, 2 H, (NH₂); 4,76 t, 2 H, $J(\text{OH},\text{CH}_2) = 5,4$ (OH); 4,23 t, 4 H, $J(1',2') = 4,5$ (H-1'); 3,61 m, 4 H, (H-2'); 1,87 s, 3 H, (CH₃). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) 168,1 (C-4 a 6); 160,0 (C-2); 86,6 (C-5); 68,1 (C-1'); 59,5 (C-2'); 10,6 (CH₃). Pro C₉H₁₅N₃O₄ (229,2) vypočteno (%): C 47,16; H 6,60; N 18,33; nalezeno (%): C 47,30; H 6,55; N 18,06. MS ESI(+), m/z (%): 230 [M⁺] (100), 252 [M⁺Na] (27).

5.7.14. Příprava 4,6-diamino-2-(2-hydroxyethoxy)-5-chlorpyrimidinu reakcí látky 44 s ethylenglykolem

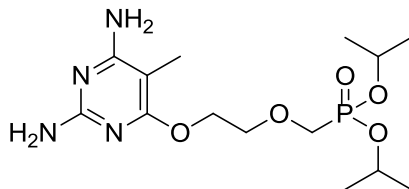
Pro tento pokus byl využit univerzální postup, tak jak je popsán v sekci 5.7.1., vycházející z 20 mmol výchozí látky. Izolace byla provedena též v souladu s postupem 5.7.1. Po rekrystalizaci z 96% ethanolu bylo získáno 3,91 g (95% teorie) látky 76.



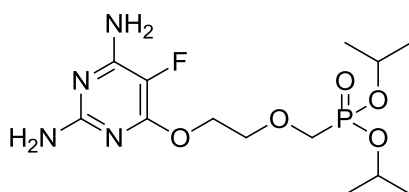
4,6-Diamino-2-(2-hydroxyethoxy)-5-chlorpyrimidin (76): bílá krystalická látka, b.t. 235-236 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,42 bs, 4 H, (NH₂); 4,76 bs, 1 H, (OH); 4,10 t, 2 H, $J(1',2') = 5,3$ (H-1'); 3,61 t, 2 H, $J(2',1') = 5,3$ (H-2'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 162,1 (C-2); 160,1 (C-4 a 6); 84,3 (C-5); 68,0 (C-1'); 59,7 (C-2'). Pro C₆H₉N₄O₂Cl (240,6) vypočteno (%): C 35,22; H 4,43; N 17,33; nalezeno (%): C 35,20; H 4,37; N 17,26. MS ESI(+), m/z (%): 205 [M⁺] (100), 227 [M⁺Na] (30).

5.7.15. Přípravy diisopropylesterů 5-substituovaných PMEO-DAPy

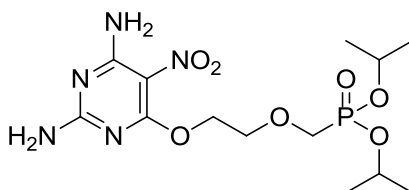
Pro tyto přípravy byl využit univerzální postup, tak jak je popsán v sekci 5.7.2., vycházející z 5 mmol výchozí látky. Izolace byla provedena též v souladu s postupem 5.7.2. Samotné výtěžky jsou uváděny u každé sloučeniny jednotlivě.



Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-methylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (77): získáno 922 mg (51% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 154-155 °C. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): 5,85 bs, 2 H, (NH₂); 5,64 bs, 2 H, (NH₂); 4,59 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,7$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,26 m, 2 H, (H-2'); 3,80 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,4$ (H-1); 3,76 m, 2 H, (H-1'); 1,72 s, 3 H, (5-CH₃); 1,23 m, 12 H, (CH₃-iPr). $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6): 166,6 (C-4''); 164,1 (C-6''); 160,6 (C-2''); 83,2 (C-5''); 71,3 d, $J(1',\text{P}) = 12,3$ (C-1'); 70,4 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,2$ (CH); 65,1 d, $J(1,\text{P}) = 163,7$ (C-1); 64,1 (C-2'); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,3$ (CH₃-iPr); 23,9 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,2$ (CH₃-iPr); 7,96 (5''-CH₃). Pro C₁₄H₂₇N₄O₅P (362,4) vypočteno (%): C 46,40; H 7,51; N 15,46; nalezeno (%): C 46,43; H 7,46; N 15,49. MS ESI(+), m/z (%): 363 [M⁺] (100), 385 [M⁺Na] (40).

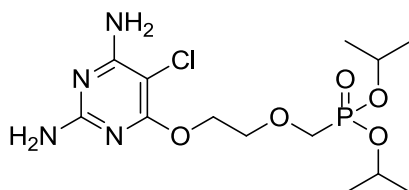


Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-fluoropyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (78): získáno 745 mg (43% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 90-91 °C. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) 6,30 bs, 2 H, (NH₂); 5,82 bs, 2 H, (NH₂); 4,59 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,6$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,32 m, 2 H, (H-2'); 3,79 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,3$ (H-1); 3,78 m, 2 H, (H-1'); 1,24 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH₃); 1,22 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,1$ (CH₃). $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6): 157,6 d, $J(2'',\text{F}) = 5,7$ (C-2''); 155,6 d, $J(4'',\text{F}) = 7,6$ (C-4''); 154,1 d, $J(6'',\text{F}) = 9,9$ (C-6''); 125,1 d, $J(5'',\text{F}) = 233,9$ (C-5''); 70,9 d, $J(1',\text{P}) = 12,1$ (C-1'); 70,4 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,3$ (CH); 65,0 d, $J(1,\text{P}) = 164,1$ (C-1); 64,43 (C-2'); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,5$ (CH₃); 23,9 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,4$ (CH₃). Pro C₁₃H₂₄N₄O₅P (366,3) vypočteno (%): C 42,62; H 6,60; N 15,29; nalezeno (%): C 42,55; H 6,73; N 15,14. MS ESI(+), m/z (%): 367 [M⁺] (93), 389 [M⁺Na] (100).

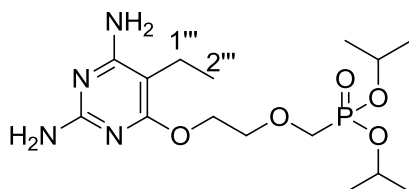


Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-nitropyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (79):

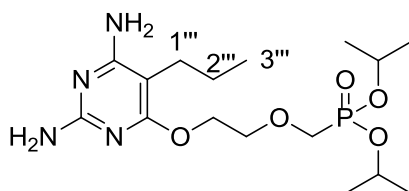
získáno 1054 mg (55% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 131-132 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 7,89 bs, 2 H, (NH₂); 7,29 bs a 7,18 bs, 2 H, (NH₂); 4,57 dsept, 2 H, *J*(CH,P) = 7,7, *J*(CH,CH₃) = 6,2 (CH); 4,45 m, 2 H, (H-2'); 3,85 d, 2 H, *J*(1,P) = 8,3 (H-1); 3,83 m, 2 H, (H-1'); 1,22 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,2 (CH₃); 1,20 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,2 (CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 164,7 (C-4''); 160,9 (C-2''); 160,1 (C-6''); 109,48 (C-5''); 70,4 d, *J*(1',P) = 12,3 (C-1'); 70,1 d, *J*(CH,P) = 6,4 (CH); 66,4 (C-2'); 65,2 d, *J*(1,P) = 164,0 (C-1); 24,0 d, *J*(CH₃,P) = 3,4 (CH₃); 23,8 d, *J*(CH₃,P) = 4,2 (CH₃). Pro C₁₃H₂₄N₅O₇P (393,3) vypočteno (%): C 39,70; H 6,15; N 17,81; nalezeno (%): C 39,68; H 6,09; N 17,79. MS ESI(+), *m/z* (%): 394 [M⁺] (20), 416 [M⁺Na] (100).

**Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-chloropyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (80):**

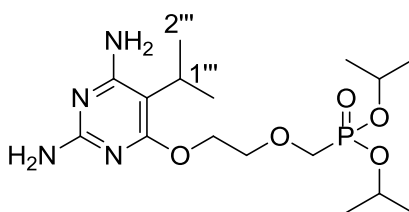
získáno 1157 mg (60% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 87-88 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 6,36 bs, 2 H, (NH₂); 6,07 bs, 2 H, (NH₂); 4,59 dsept, 2 H, *J*(CH,P) = 7,7, *J*(CH,CH₃) = 6,2 (CH); 4,33 m, 2 H, (H-2'); 3,82 d, 2 H, *J*(1,P) = 8,4 (H-1); 3,79 m, 2 H, (H-1'); 1,23 m, 12 H, (CH₃-*i*Pr). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 163,6 (C-4''); 161,1 (C-6''); 160,3 (C-2''); 83,0 (C-5''); 70,8 d, *J*(1',P) = 12,1 (C-1'); 70,4 d, *J*(CH,P) = 6,2 (CH); 65,2 d, *J*(1,P) = 164,2 (C-1); 65,1 (C-2'); 24,0 d, *J*(CH₃,P) = 3,4 (CH₃-*i*Pr); 23,9 d, *J*(CH₃,P) = 4,2 (CH₃-*i*Pr). Pro C₁₃H₂₄N₄O₅PCl (382,8) vypočteno (%): C 40,79; H 6,32; N 14,64; nalezeno (%): C 40,58; H 6,21; N 14,56. MS ESI(+), *m/z* (%): 383 [M⁺] (100), 405 [M⁺Na] (50).

**Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-ethylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (81):**

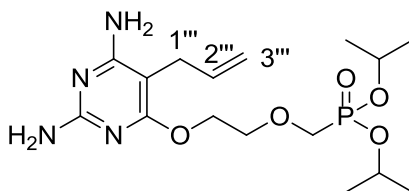
získáno 856 mg (45% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 87-88 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 5,84 bs, 2 H, (NH₂); 5,63 bs, 2 H, (NH₂); 4,59 dsept, 2 H, *J*(CH,P) = 7,7, *J*(CH,CH₃) = 6,2 (CH); 4,27 m, 2 H, (H-2'); 3,80 d, 2 H, *J*(1,P) = 8,4 (H-1); 3,76 m, 2 H, (H-1'); 2,26 q, 2 H, *J*(CH₂,CH₃) = 7,3 (H-1'''); 1,24 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,1 (CH₃-*i*Pr); 1,22 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,1 (CH₃-*i*Pr); 0,91 t, 3 H, *J*(CH₃,CH₂) = 7,4 (H-2'''). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 166,6 (C-4''); 163,4 (C-6''); 160,5 (C-2''); 90,1 (C-5''); 71,3 d, *J*(1',P) = 12,1 (C-1'); 70,3 d, *J*(CH,P) = 6,4 (CH); 65,2 d, *J*(1,P) = 164,4 (C-1); 64,1 (C-2'); 24,0 d, *J*(CH₃,P) = 3,9 (CH₃-*i*Pr); 23,9 d, *J*(CH₃,P) = 4,7 (CH₃-*i*Pr); 15,4 (C-1'''); 13,6 (C-2'''). Pro C₁₅H₂₉N₄O₅P (376,4) vypočteno (%): C 47,87; H 7,77; N 14,89; nalezeno (%): C 47,57; H 7,81; N 14,63. MS ESI(+), *m/z* (%): 377 [M⁺] (100).



Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-propylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (82): získáno 1010 mg (52% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 60-62 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 5,81 bs, 2 H, (NH₂); 5,61 bs, 2 H, (NH₂); 4,59 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,7$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,26 m, 2 H, (H-2'); 3,80 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,4$ (H-1); 3,74 m, 2 H, (H-1'); 2,22 m, 2 H, (H-1'''); 1,34 m, 2 H, (H-2'''); 1,23 m, 12 H, (CH₃-iPr); 0,85 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,4$ (H-3'''). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 166,9 (C-4''); 163,7 (C-6''); 160,6 (C-2''); 88,5 (C-5''); 71,3 d, $J(1',\text{P}) = 12,4$ (C-1'); 70,3 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,3$ (CH); 65,3 d, $J(1,\text{P}) = 164,5$ (C-1); 64,2 (C-2'); 24,1 (C-1'''); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,9$ (CH₃-iPr); 23,9 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,4$ (CH₃-iPr); 21,7 (C-2'''); 13,9 (C-3'''). Pro C₁₆H₃₁N₄O₅P (390,4) vypočteno (%): C 49,22; H 8,00; N 14,35; nalezeno (%): C 48,98; H 8,06; N 14,31. MS ESI(+), m/z (%): 391 [M⁺] (100).

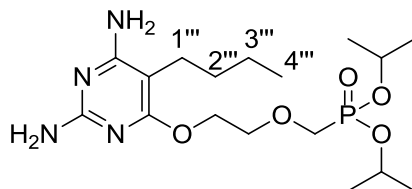


Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-isopropylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (83): získáno 773 mg (40% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 73-75 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,22 bs, 2 H, (NH₂); 6,15 bs, 2 H, (NH₂); 4,59 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,7$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,30 m, 2 H, (H-2'); 3,80 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,3$ (H-1); 3,78 m, 2 H, (H-1'); 2,90 sept, 1 H, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 7,1$ (H-1'''); 1,23 m, 12 H, (CH₃-OiPr); 1,14 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 7,0$ (H-2'''). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 167,6 (C-4''); 162,0 (C-6''); 158,8 (C-2''); 93,8 (C-5''); 71,18 d, $J(1',\text{P}) = 11,9$ (C-1'); 70,3 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,3$ (CH); 65,2 d, $J(1,\text{P}) = 164,6$ (C-1); 64,3 (C-2'); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,9$ (CH₃-OiPr); 23,9 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,9$ (CH₃-OiPr); 23,2 (C-1'''); 20,8 (C-2'''). Pro C₁₆H₃₁N₄O₅P (390,4) vypočteno (%): C 49,22; H 8,00; N 14,35; nalezeno (%): C 49,13; H 7,96; N 14,08. MS ESI(+), m/z (%): 391 [M⁺] (100).

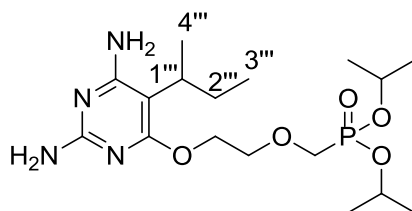


Diisopropyl-((2-((5-allyl-2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (84): získáno 1023 mg (53% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 89-90 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 5,78 bs, 2 H, (NH₂); 5,69 bs, 2 H, (NH₂); 5,73 ddt, 1 H, $J(2''',1''') = 6,1$, $J(2''',3''')_{\text{cis}} = 10,0$, $J(2''',3''')_{\text{trans}} = 17,1$ (H-2'''); 5,01 dq, 1 H, $J(3''')_{\text{trans},1'''} = J(\text{gem}) = 1,8$, $J(3''')_{\text{trans},2'''} = 17,1$ (H-3''')_{trans}; 4,87 dq, 1 H, $J(3''')_{\text{cis},1'''} = J(\text{gem}) = 1,8$, $J(3''')_{\text{cis},2'''} = 10,0$ (H-3''')_{cis}; 4,26 m, 2 H, (H-2'); 4,59 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,7$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 3,75 m, 2 H, (H-

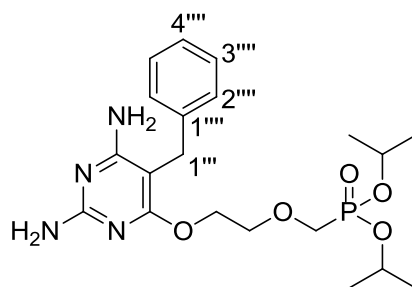
1'); 3,79 d, 2 H, $J(1,P) = 8,4$ (H-1); 3,00 dt, 2H, $J(1''',3''') = 1,5$, $J(1''',2''') = 6,1$ (H-1'''); 1,23 m, 12 H, (CH₃-iPr). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 166,8 (C-4''); 163,6 (C-6''); 160,9 (C-2''); 136,4 (C-2'''); 114,2 (C-3'''); 85,9 (C-5''); 71,2 d, $J(1',P) = 12,2$ (C-1'); 70,3 d, $J(\text{CH},P) = 6,3$ (CH-iPr); 65,2 d, $J(1,P) = 164,1$ (C-1); 64,2 (C-2'); 26,4 (C-1'''); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,P) = 3,9$ (CH₃-iPr); 23,8 d, $J(\text{CH}_3,P) = 4,4$ (CH₃-iPr). Pro C₁₆H₂₉N₄O₅P (388,4) vypočteno (%): C 49,48; H 7,53; N 14,43; nalezeno (%): C 49,23; H 7,66; N 14,34. MS ESI(+), m/z (%): 389 [M⁺] (100).



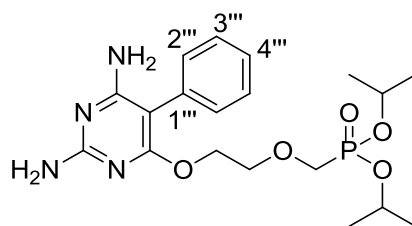
Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-butylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (85): získáno 964 mg (48% teorie); bezbarvá olejovitá látka. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 5,78 bs, 2 H, (NH₂); 5,60 bs, 2 H, (NH₂); 4,59 dsept, 2 H, $J(\text{CH},P) = 7,7$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,26 m, 2 H, (H-2'); 3,79 d, 2 H, $J(1,P) = 8,4$ (H-1); 3,75 m, 2 H, (H-1'); 2,24 t, 2 H, $J(\text{CH}_2,\text{CH}_2) = 7,0$ (H-1'''); 1,28 m, 4 H, (H-2''') a 3'''); 1,24 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,1$ (CH₃-iPr); 1,23 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,1$ (CH₃-iPr); 0,86 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,1$ (H-4'''). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 166,8 (C-4''); 163,6 (C-6''); 160,5 (C-2''); 88,7 (C-5''); 70,0 d, $J(\text{CH},P) = 6,3$ (CH); 69,6 d, $J(1',P) = 11,7$ (C-1'); 65,3 d, $J(1,P) = 164,5$ (C-1); 64,1 (C-2'); 30,9 (C-2'''); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,P) = 3,9$ (CH₃-iPr); 23,8 d, $J(\text{CH}_3,P) = 4,4$ (CH₃-iPr); 22,1 (C-3'''); 21,9 (C-1'''); 13,1 (C-4'''). Pro C₁₇H₃₃N₄O₅P (404,4) vypočteno (%): C 50,48; H 8,22; N 13,85; nalezeno (%): C 50,46; H 8,36; N 13,68. MS ESI(+), m/z (%): 405 [M⁺] (100).



Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-(*sec*-butyl)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (86): získáno 795 mg (39% teorie); bezbarvá olejovitá látka. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 5,73 bs, 2 H, (NH₂); 5,58 bs, 2 H, (NH₂); 4,59 dsept, 2 H, $J(\text{CH},P) = 7,7$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,25 m, 2 H, (H-2'); 3,78 d, 2 H, $J(1,P) = 8,3$ (H-1); 3,76 m, 2 H, (H-1'); 2,62 m, 1 H, (H-1'''); 1,66 m a 1,47 m, 2 H, (H-2'''); 1,24 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,1$ (CH₃-iPr); 1,23 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH₃-iPr); 1,11 d, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 7,0$ (H-4''); 0,74 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,4$ (H-3'''). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 167,2 (C-4''); 163,8 (C-6''); 160,3 (C-2''); 92,3 (C-5''); 71,4 d, $J(1',P) = 11,7$ (C-1'); 70,3 d, $J(\text{CH},P) = 6,3$ (CH); 65,2 d, $J(1,P) = 165,0$ (C-1); 63,8 (C-2'); 30,5 (C-1'''); 27,5 (C-2'''); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,P) = 3,4$ (CH₃-iPr); 23,9 d, $J(\text{CH}_3,P) = 4,4$ (CH₃-iPr); 19,1 (C-4'''); 12,8 (C-3'''). Pro C₁₇H₃₃N₄O₅P (404,4) vypočteno (%): C 50,48; H 8,22; N 13,85; nalezeno (%): C 50,39; H 8,33; N 13,79. MS ESI(+), m/z (%): 405 [M⁺] (100).



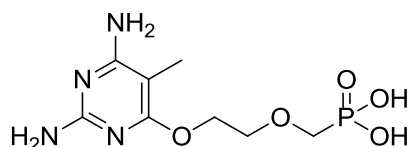
Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-benzylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (87): získáno 1246 mg (57% teorie); bezbarvá olejovitá látka. ^1H NMR (DMSO- d_6): 7,22 m, 2 H, (H-3'''); 7,20 m, 2 H, (H-2'''); 7,12 m, 1 H, (H-4'''); 6,06 bs, 2 H, (NH₂); 5,95 bs, 2 H, (NH₂); 4,56 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,6$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,30 m, 2 H, (H-2'); 3,62 s, 2 H, (H-1'''); 3,36 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,3$ (H-1); 3,28 m, 2 H, (H-1'); 1,22 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH₃-iPr); 1,20 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH₃-iPr). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 167,1 (C-4''); 162,9 (C-6''); 160,2 (C-2''); 141,2 (C-1'''); 128,3 (C-3'''); 128,1 (C-2'''); 125,6 (C-4'''); 87,9 (C-5''); 71,2 d, $J(1',\text{P}) = 11,6$ (C-1'); 70,3 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,3$ (CH); 65,2 d, $J(1,\text{P}) = 164,6$ (C-1); 64,3 (C-2'); 27,5 (C-1''); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,9$ (CH₃-iPr); 23,8 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,9$ (CH₃-iPr). Pro C₂₀H₃₁N₄O₅P (438,5) vypočteno (%): C 54,79; H 7,13; N 12,78; nalezeno (%): C 54,65; H 7,00; N 12,59. MS ESI(+), m/z (%): 439 [M⁺] (100).



Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-fenylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (88): získáno 1003 mg (47% teorie); bezbarvá olejovitá látka. ^1H NMR (DMSO- d_6): 7,35 m, 2 H, (H-3'''); 7,24 m, 2 H, (H-2'''); 7,23 m, 1 H, (H-4'''); 6,12 bs, 2 H, (NH₂); 5,63 bs, 2 H, (NH₂); 4,52 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,6$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,27 m, 2 H, (H-2'); 3,68 s, 2 H, (H-1'); 3,67 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,2$ (H-1); 1,20 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH₃-iPr); 1,17 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH₃-iPr). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 166,0 (C-4''); 162,5 (C-6''); 160,9 (C-2''); 133,7 (C-1'''); 130,8 (C-3'''); 128,5 (C-2'''); 126,5 (C-4'''); 91,1 (C-5''); 71,0 d, $J(1',\text{P}) = 12,3$ (C-1'); 70,2 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,3$ (CH); 65,2 d, $J(1,\text{P}) = 164,6$ (C-1); 64,4 (C-2'); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,9$ (CH₃-iPr); 23,8 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,9$ (CH₃-iPr). Pro C₁₉H₂₉N₄O₅P (424,4) vypočteno (%): C 53,77; H 6,89; N 13,20; nalezeno (%): C 53,54; H 7,11; N 13,12. MS ESI(+), m/z (%): 425 [M⁺] (100).

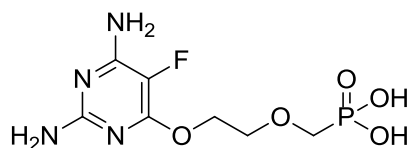
5.7.16. Přípravy 5-substituovaných PMEODAPy z příslušných diesterů (viz 5.7.15.)

Pro tyto přípravy byl využit univerzální postup, tak jak je popsán v sekci 5.7.3., vycházející z 1 mmol výchozí látky. Izolace byla provedena též v souladu s postupem 5.7.3. Samotné výtěžky jsou uváděny u každé sloučeniny jednotlivě.



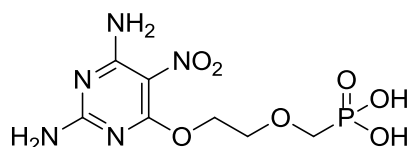
((2-((2,6-Diamino-5-methylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (89):

získáno 229 mg (82% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 4,36 m, 2 H, (H-2'); 3,91 m, 2 H, (H-1'); 3,57 d, 2 H, *J*(1,P) = 8,4 (H-1); 1,83 s, 3 H, (5-CH₃). ¹³C NMR (D₂O+NaOD): 168,0 (C-4''); 164,4 (C-6''); 160,9 (C-2''); 87,6 (C-5''); 71,4 d, *J*(1',P) = 9,9 (C-1'); 69,8 d, *J*(1,P) = 149,2 (C-1); 66,4 (C-2'); 7,6 (5''-CH₃). Pro C₈H₁₅N₄O₅P (278,2) vypočteno (%): C 34,54; H 5,43; N 20,14; nalezeno (%): C 34,40; H 5,31; N 19,89. MS ESI(+), *m/z* (%): 279 [M⁺] (100), 301 [M⁺Na] (65).



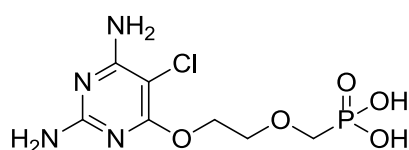
((2-((2,6-Diamino-5-fluoropyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (90):

získáno 276 mg (98% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 4,42 m, 2 H, (H-2'); 3,91 m, 2 H, (H-1'); 3,64 d, 2 H, *J*(1,P) = 8,6 (H-1). ¹³C NMR (D₂O+NaOD): 157,9 d, *J*(2'',F) = 5,5 (C-2''); 156,9 d, *J*(4'',F) = 8,3 (C-4''); 154,5 d, *J*(6'',F) = 11,7 (C-6''); 126,7 d, *J*(5'',F) = 233,9 (C-5''); 71,2 d, *J*(1',P) = 10,6 (C-1'); 68,6 d, *J*(1,P) = 153,3 (C-1); 66,63 (C-2'). Pro C₇H₁₂N₄O₅P (282,2) vypočteno (%): C 29,80; H 4,29; N 19,86; nalezeno (%): C 29,57; H 4,42; N 19,58. MS ESI(+), *m/z* (%): 283 [M⁺] (100), 305 [M⁺Na] (10).



((2-((2,6-Diamino-5-nitropyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (91):

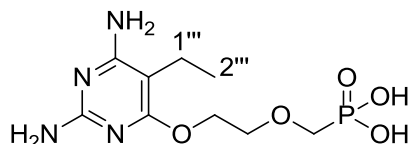
získáno 295 mg (95% teorie); žlutá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 4,57 m, 2 H, (H-2'); 3,96 m, 2 H, (H-1'); 3,66 d, 2 H, *J*(1,P) = 8,4 (H-1). ¹³C NMR (D₂O+NaOD): 166,2 (C-4''); 161,7 (C-2''); 161,2 (C-6''); 110,6 (C-5''); 70,8 d, *J*(1',P) = 10,3 (C-1'); 68,7 d, *J*(1,P) = 153,0 (C-1); 67,9 (C-2'). Pro C₇H₁₂N₅O₇P (309,2) vypočteno (%): C 27,19; H 3,91; N 22,65; nalezeno (%): C 36,92; H 3,74; N 22,44. MS ESI(+), *m/z* (%): 310 [M⁺] (100), 332 [M⁺Na] (65).



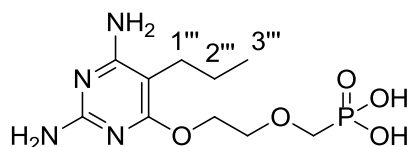
((2-((2,6-Diamino-5-chloropyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (92):

získáno 280 mg (94% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 4,31 m, 2 H, (H-2'); 3,99 m, 2 H, (H-1'); 3,53 d, 2 H, *J*(1,P) = 8,3 (H-1). ¹³C NMR

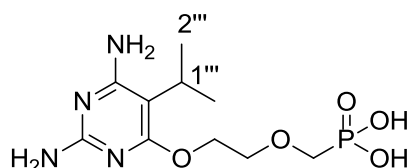
(D₂O+NaOD): 168,8 (C-4''); 164,4 (C-6''); 160,6 (C-2''); 86,7 (C-5''); 71,1 d, $J(1',P) = 9,7$ (C-1'); 69,5 d, $J(1,P) = 153,2$ (C-1); 66,9 (C-2'). Pro C₇H₁₂N₄O₅PCl (298,6) vypočteno (%): C 28,15; H 4,05; N 18,76; nalezeno (%): C 27,97; H 4,26; N 18,58. MS ESI(+), m/z (%): 299 [M⁺] (100), 321 [M⁺Na] (40).



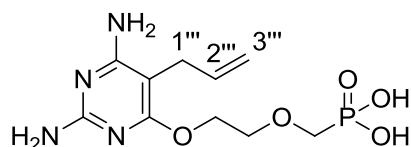
((2-((2,6-Diamino-5-ethylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (93): získáno 267 mg (91% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 4,32 m, 2 H, (H-2'); 3,90 m, 2 H, (H-1'); 3,61 d, 2 H, $J(1,P) = 8,5$ (H-1); 2,31q, 2 H, $J(\text{CH}_2,\text{CH}_3) = 7,5$ (H-1'''); 0,98 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,5$ (H-2'''). ¹³C NMR (D₂O+NaOD): 168,3 (C-4''); 161,1 (C-6''); 158,8 (C-2''); 93,4 (C-5''); 71,4 d, $J(1',P) = 10,9$ (C-1'); 69,7 d, $J(1,P) = 150,9$ (C-1); 66,9 (C-2'); 15,8 (C-1'''); 12,6 (C-2'''). Pro C₉H₁₇N₄O₅P (292,2) vypočteno (%): C 36,99; H 5,86; N 19,17; nalezeno (%): C 36,87; H 5,80; N 19,03. MS ESI(+), m/z (%): 293 [M⁺] (100), 315 [M⁺Na] (35).



((2-((2,6-Diamino-5-propylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (94): získáno 259 mg (85% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 4,39 m, 2 H, (H-2'); 3,90 m, 2 H, (H-1'); 3,53 d, 2 H, $J(1,P) = 8,1$ (H-1); 2,34 m, 2 H, (H-1'''); 1,38 m, 2 H, (H-2'''); 0,89 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,3$ (H-3'''). ¹³C NMR (D₂O+NaOD): 168,3 (C-4''); 163,7 (C-6''); 161,2 (C-2''); 97,6 (C-5''); 71,3 d, $J(1',P) = 8,0$ (C-1'); 69,4 d, $J(1,P) = 154,3$ (C-1); 66,7 (C-2'); 23,8 (C-1'''); 21,3 (C-2'''); 13,7 (C-3'''). Pro C₁₀H₁₉N₄O₅P (306,3) vypočteno (%): C 39,22; H 6,26; N 18,29; nalezeno (%): C 39,17; H 6,18; N 18,03. MS ESI(+), m/z (%): 307 [M⁺] (100), 329 [M⁺Na] (55).

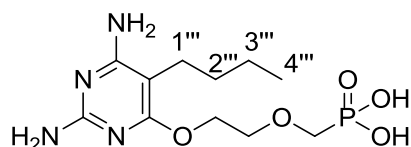


((2-((2,6-Diamino-5-isopropylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (95): získáno 240 mg (79% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 4,37 m, 2 H, (H-2'); 3,94 m, 2 H, (H-1'); 3,59 d, 2 H, $J(1,P) = 8,0$ (H-1); 2,99 sept, 1 H, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 7,1$ (H-1'''); 1,22 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 7,1$ (H-2'''). ¹³C NMR (D₂O+NaOD): 168,7 (C-4''); 163,6 (C-6''); 160,8 (C-2''); 98,0 (C-5''); 71,4 d, $J(1',P) = 8,1$ (C-1'); 69,8 d, $J(1,P) = 149,5$ (C-1); 66,2 (C-2'); 24,1 (C-1'''); 20,3 (C-2'''). Pro C₁₀H₁₉N₄O₅P (306,3) vypočteno (%): C 39,22; H 6,26; N 18,29; nalezeno (%): C 39,45; H 6,39; N 18,14. MS ESI(+), m/z (%): 307 [M⁺] (100), 329 [M⁺Na] (15).



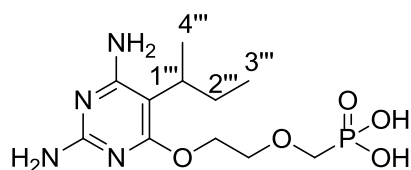
((2-((5-Allyl-2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (96):

získáno 256 mg (84% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 5,90 ddt, 1 H, $J(2''',1''')$ = 5,5, $J(2''',3''')$ _{cis} = 10,2, $J(2''',3''')$ _{trans} = 17,2 (H-2'''); 5,05 dq, 1 H, $J(3''')$ _{cis},1''') = $J(\text{gem})$ = 1,7, $J(3''')$ _{cis},2''') = 10,2 (H-3''') _{cis}; 5,01 dq, 1 H, $J(3''')$ _{trans},1''') = $J(\text{gem})$ = 1,9, $J(3''')$ _{trans},2''') = 17,2 (H-3''') _{trans}; 4,38 m, 2 H, (H-2'); 3,90 m, 2 H, (H-1'); 3,56 d, 2 H, $J(1,P)$ = 8,2 (H-1); 3,16 dt, 2H, $J(1''',3''')$ = 1,8, $J(1''',2''')$ = 5,5 (H-1'''). ¹³C NMR (D₂O+NaOD): 168,5 (C-4''); 164,4 (C-6''); 161,5 (C-2''); 135,9 (C-2''); 115,2 (C-3'''); 89,4 (C-5''); 71,3 d, $J(1',P)$ = 9,1 (C-1'); 69,8 d, $J(1,P)$ = 149,8 (C-1); 66,5 (C-2'); 26,5 (C-1'''). Pro C₁₀H₁₇N₄O₅P (304,3) vypočteno (%): C 39,48; H 5,63; N 18,42; nalezeno (%): C 39,40; H 5,66; N 18,27. MS ESI(+), m/z (%): 305 [M⁺] (100), 327 [M⁺Na] (30).



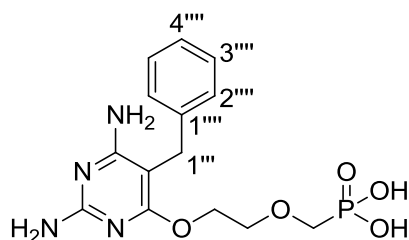
((2-((2,6-Diamino-5-butylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (97):

získáno 243 mg (76% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 4,36 m, 2 H, (H-2'); 3,91 m, 2 H, (H-1'); 3,57 d, 2 H, $J(1,P)$ = 8,1 (H-1); 2,31 t, 2 H, $J(\text{CH}_2,\text{CH}_3)$ = 7,5 (H-1'''); 1,39 m, 2 H, (H-2'''); 1,31 m, 2 H, (H-3'''); 0,89 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2)$ = 7,3 (H-4'''). ¹³C NMR (D₂O+NaOD): 168,4 (C-4''); 164,1 (C-6''); 161,0 (C-2''); 92,8 (C-5''); 71,4 d, $J(1',P)$ = 8,7 (C-1'); 69,8 d, $J(1,P)$ = 149,7 (C-1); 66,3 (C-2'); 30,5 (C-2'''); 22,5 (C-3'''); 22,2 (C-1'''); 14,1 (C-4'''). Pro C₁₁H₂₁N₄O₅P (320,3) vypočteno (%): C 41,25; H 6,61; N 17,49; nalezeno (%): C 40,97; H 6,72; N 17,55. MS ESI(+), m/z (%): 321 [M⁺] (100), 343 [M⁺Na] (45).

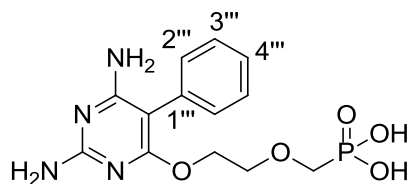


((2-((2,6-Diamino-5-(*sec*-butyl)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina

(98): získáno 297 mg (93% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 4,38 m, 2 H, (H-2'); 3,91 m, 2 H, (H-1'); 3,58 d, 2 H, $J(1,P)$ = 7,9 (H-1); 2,72 m, 1 H, (H-1'''); 1,71 m a 1,60 m, 2 H, (H-2'''); 1,21 d, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH})$ = 7,1 (H-4'''); 0,78 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2)$ = 7,4 (H-3'''). ¹³C NMR (D₂O+NaOD): 168,9 (C-4''); 164,2 (C-6''); 160,9 (C-2''); 96,4 (C-5''); 71,4 d, $J(1',P)$ = 8,1 (C-1'); 69,8 d, $J(1,P)$ = 149,6 (C-1); 66,1 (C-2'); 31,4 (C-1'''); 27,7 (C-2'''); 18,6 (C-4'''); 12,7 (C-3'''). Pro C₁₁H₂₁N₄O₅P (320,3) vypočteno (%): C 41,25; H 6,61; N 17,49; nalezeno (%): C 41,22; H 6,80; N 17,37. MS ESI(+), m/z (%): 321 [M⁺] (100), 343 [M⁺Na] (15).



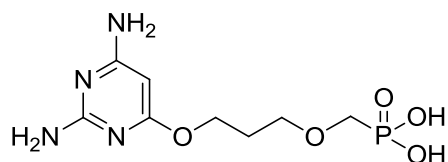
((2-((2,6-Diamino-5-benzylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (99): získáno 284 mg (80% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 7,34 m, 2 H, (H-3'''); 7,28 m, 2 H, (H-2'''); 7,25 m, 1 H, (H-4'''); 4,39 m, 2 H, (H-2'); 3,88 m, 2 H, (H-1'); 3,77 s, 2 H, (H-1''); 3,55 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,1$ (H-1). ^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 168,7 (C-4''); 164,3 (C-6''); 161,5 (C-2''); 140,6 (C-1'''); 129,4 (C-3'''); 128,6 (C-2'''); 127,0 (C-4'''); 91,0 (C-5''); 71,2 d, $J(1',\text{P}) = 8,6$ (C-1'); 69,8 d, $J(1,\text{P}) = 149,6$ (C-1); 66,4 (C-2'); 28,1 (C-1''). Pro $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_5\text{P}$ (354,3) vypočteno (%): C 47,46; H 5,41; N 15,81; nalezeno (%): C 47,26; H 5,48; N 15,62. MS ESI(+), m/z (%): 355 [M^+] (100), 377 [M^+Na] (50).



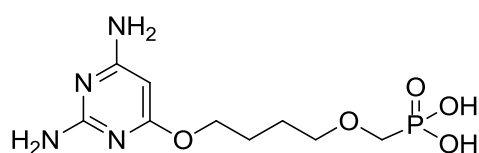
((2-((2,6-Diamino-5-fenylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (100): získáno 298 mg (88% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 7,51 m, 2 H, (H-3'''); 7,42 m, 1 H, (H-4'''); 7,36 m, 2 H, (H-2'''); 4,38 m, 2 H, (H-2'); 3,78 m, 2 H, (H-1'); 3,44 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,1$ (H-1). ^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 167,5 (C-4''); 164,0 (C-6''); 162,1 (C-2''); 132,8 (C-1'''); 131,6 (C-2'''); 129,9 (C-3'''); 128,5 (C-4'''); 94,4 (C-5''); 71,1 d, $J(1',\text{P}) = 8,7$ (C-1'); 69,7 d, $J(1,\text{P}) = 149,7$ (C-1); 66,3 (C-2'). Pro $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_5\text{P}$ (340,3) vypočteno (%): C 45,89; H 5,04; N 16,47; nalezeno (%): C 46,66; H 5,00; N 16,31. MS ESI(+), m/z (%): 341 [M^+] (100), 363 [M^+Na] (35).

5.7.17. Přípravy modifikovaných „PMEO“-DAPy 101-103 z látek 66-68

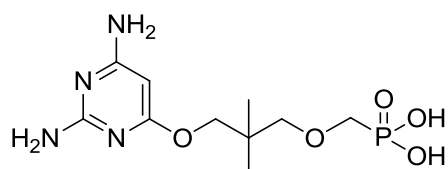
Připravené hydroxyalkoxyprymidiny **66-68** byly pobrobeny reakcí s alkylačním činidlem dle postupu **5.7.2.** (vždy z 5 mmol výchozí látky). Odpovídající diestery byly pro látky **66**, **67** a **68** izolovány ve výtěžcích 51%, 57%, respektive 60% teorie. Izolované estery byly následně (bez jakékoliv analýzy) převedeny (1 mmol) na odpovídající fosfonové kyseliny reakcí s trimethylsilylbromidem (dle obecného postupu viz sekce **3.5.1.** a **5.7.3.**), čímž byly získány látky **101-103**. Izolace byla provedena též v souladu s postupem **5.7.3.** Samotné výtěžky jsou uváděny u každé sloučeniny jednotlivě.



((3-((2,6-Diaminopyrimidin-4-yl)oxy)propoxy)methyl)fosfonová kyselina (101): získáno 241 mg (87% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 5,20 s, 1 H, (H-5''); 4,18 t, 2 H, $J(3', 2') = 6,7$ (H-3'); 3,54 t, 2 H, $J(1', 2') = 6,5$ (H-1'); 3,46 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,8$ (H-1); 1,85 p, 2 H, $J(2', 1') = J(2', 3') = 6,6$ (H-2'). ^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 170,0 (C-4''); 161,9 (C-2''); 158,5 (C-6''); 75,9 (C-5''); 68,9 d, $J(1',\text{P}) = 11,5$ (C-1'); 67,6 d, $J(1,\text{P}) = 159,1$ (C-1); 63,9 (C-3'); 28,9 (C-2'). Pro $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_5\text{P}$ (278,2) vypočteno (%): C 34,54; H 5,43; N 20,14; nalezeno (%): C 34,67; H 5,31; N 20,02. MS ESI(+), m/z (%): 279 [M^+] (100), 301 [M^+Na] (65).



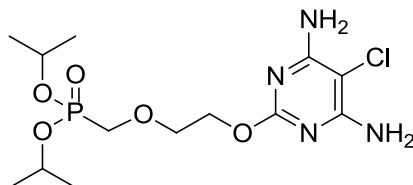
((4-((2,6-Diaminopyrimidin-4-yl)oxy)butoxy)methyl)fosfonová kyselina (102): získáno 273 mg (93% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 5,25 s, 1 H, (H-5''); 4,13 t, 2 H, $J(1',2') = 6,3$ (H-1'); 3,49 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,6$ (H-1); 3,42 m, 2 H, (H-4'); 1,67 m, 2 H, (H-2'); 1,40 m, 2 H, (H-3'). ^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 170,3 (C-4''); 161,0 (C-2''); 158,7 (C-6''); 75,2 (C-5''); 68,7 d, $J(1',\text{P}) = 11,3$ (C-1'); 67,0 d, $J(1,\text{P}) = 164,5$ (C-1); 60,7 (C-4'); 29,3 (C-3'); 25,6 (C-2'). Pro $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_5\text{P}$ (292,2) vypočteno (%): C 36,99; H 5,89; N 19,17; nalezeno (%): C 36,78; H 5,83; N 19,09. MS ESI(+), m/z (%): 293 [M^+] (100), 315 [M^+Na] (35).



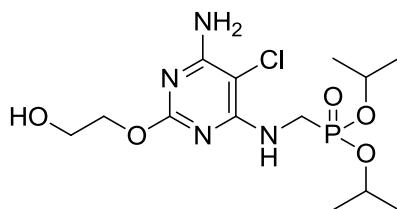
((3-((2,6-Diaminopyrimidin-4-yl)oxy)-2,2-dimethylpropoxy)methyl)fosfonová kyselina (103): získáno 233 mg (88% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 5,48 s, 1 H, (H-5''); 4,03 s, 2 H, (H-3'); 3,57 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,3$ (H-1); 3,35 s, 2 H, (H-1'); 0,95 s, 6 H, (CH_3). ^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 169,1 (C-4''); 159,4 (C-6''); 154,9 (C-2''); 77,9 d, $J(1',\text{P}) = 9,5$ (C-1'); 75,9 (C-5''); 72,7 (C-3'); 67,6 d, $J(1,\text{P}) = 160,4$ (C-1); 35,6 (C-2'); 21,2 (CH_3). Pro $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_5\text{P}$ (264,2) vypočteno (%): C 34,54; H 5,43; N 20,14; nalezeno (%): C 34,67; H 5,31; N 20,02. MS ESI(+), m/z (%): 279 [M^+] (100), 301 [M^+Na] (65).

5.7.18. Alkylace látky 76 sloučeninou 4 za tvorby dvou izomerních sloučenin

Tento pokus byl proveden s využitím univerzálního postupu, tak jak je popsán v sekci 5.7.2., vycházející z 5 mmol výchozí látky. Izolace byla provedena též v souladu s postupem 5.7.2. Takto byla získána směs dvou sloučenin, jež byla dělena pomocí gradientové sloupcové chromatografie (silikagel; chloroform/methanol, 95/5 až 85/15). Postupně byly eluovány látky 104 a 105. Výtěžky jsou uváděny u každé sloučeniny jednotlivě.



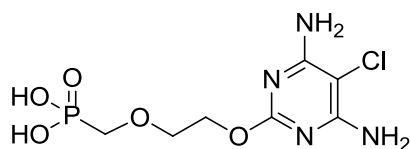
Diisopropyl-((2-((4,6-diamino-5-chloropyrimidin-2-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (104): získáno 702 mg (37% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 137-138 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,43 bs, 4 H, (2x NH $_2$); 4,58 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,8$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,21 m, 2 H, (H-2'); 3,79 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,3$ (H-1); 3,75 m, 2 H, (H-1'); 1,23 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH $_3$ -iPr); 1,22 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH $_3$ -iPr). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 162,0 (C-2''); 160,2 (C-4'' a 6''); 84,4 (C-5''); 71,5 d, $J(1',\text{P}) = 12,0$ (C-1'); 70,4 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,2$ (CH); 65,2 d, $J(1,\text{P}) = 164,4$ (C-1); 65,2 (C-2'); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,1$ (CH $_3$ -iPr); 23,9 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,2$ (CH $_3$ -iPr). Pro C $_{13}$ H $_{24}$ N $_4$ O $_5$ PCl (382,8) vypočteno (%): C 40,79; H 6,32; N 14,64; nalezeno (%): C 40,86; H 6,40 N 14,59. MS ESI(+), m/z (%): 383 [M $^+$] (100), 405 [M $^+$ Na] (80).



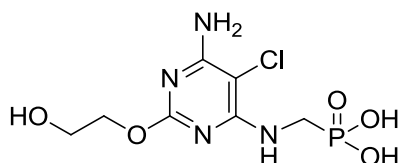
Diisopropyl-(((6-amino-5-chlor-2-(2-hydroxyethoxy)pyrimidin-4-yl)amino)methyl)fosfonát (105): získáno 554 mg (29% teorie); bílá krystalická látka, b.t. 143-144 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,51 bs, 2 H, (NH $_2$); 6,41 t, 1 H, $J(\text{NH},\text{CH}_2) = 6,2$ (NH); 4,79 t, 1 H, $J(\text{OH},\text{CH}_2) = 5,6$ (OH); 4,57 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,6$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,14 m, 2 H, (H-2''); 3,76 dd, 2 H, $J(1,\text{P}) = 10,5$, $J(1,\text{NH}) = 6,1$ (H-1); 3,63 m, 2 H, (H-1''); 1,23 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH $_3$ -iPr); 1,18 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH $_3$ -iPr). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 162,0 (C-2'); 159,9 (C-4'); 157,9 (C-6'); 85,0 (C-5'); 70,3 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,5$ (CH); 68,1 (C-1''); 59,7 (C-2''); 37,2 d, $J(1,\text{P}) = 157,9$ (C-1); 24,1 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,4$ (CH $_3$ -iPr); 23,8 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,5$ (CH $_3$ -iPr). Pro C $_{13}$ H $_{24}$ N $_4$ O $_5$ PCl (382,8) vypočteno (%): C 40,79; H 6,32; N 14,64; nalezeno (%): C 40,68; H 6,26 N 14,39. MS ESI(+), m/z (%): 383 [M $^+$] (100), 405 [M $^+$ Na] (10).

5.7.19. Přípravy modifikovaných PMEODAPy 106 a 107 z příslušných diesterů 104 a 105

Pro tyto přípravy byl využit univerzální postup, tak jak je popsán v sekci 5.7.3., vycházející z 1 mmol výchozí látky. Izolace byla provedena též v souladu s postupem 5.7.3. Získané výtěžky jsou uváděny u každé sloučeniny jednotlivě.



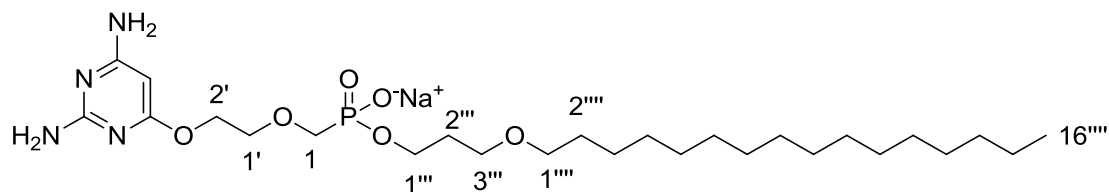
((2-((4,6-Diamino-5-chloropyrimidin-2-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (106): získáno 311 mg (93% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 4,35 m, 2 H, (H-2'); 3,87 m, 2 H, (H-1'); 3,54 d, 2 H, *J*(1,P) = 8,4 (H-1). ¹³C NMR (D₂O+NaOD): 162,6 (C-2''); 160,8 (C-4'' a 6''); 86,7 (C-5''); 71,0 d, *J*(1',P) = 9,9 (C-1'); 69,6 d, *J*(1,P) = 149,9 (C-1); 69,9 (C-2'). Pro C₇H₁₂N₄O₅PCl+2H₂O (334,7) vypočteno (%): C 25,12; H 4,82; N 16,74; nalezeno (%): C 25,14; H 4,63; N 16,63. MS ESI(+), *m/z* (%): 335 [M⁺] (100), 357 [M⁺Na] (80).



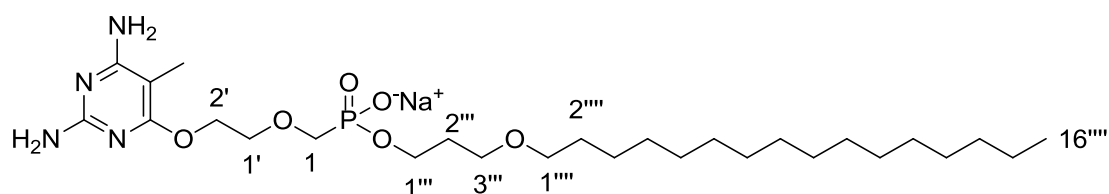
(((6-amino-5-chlor-2-(2-hydroxyethoxy)pyrimidin-4-yl)amino)methyl) fosfonová kyselina (107): získáno 287 mg (86% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 4,36 m, 2 H, (H-2''); 3,87 m, 2 H, (H-1''); 3,37 d, 2 H, *J*(1,P) = 12,8 (H-1). ¹³C NMR (D₂O+NaOD): 163,0 (C-2'); 159,9 (C-6'); 159,6 (C-4'); 86,8 (C-5'); 68,9 (C-1''); 60,8 (C-2''); 40,7 d, *J*(1,P) = 137,0 (C-1). Pro C₇H₁₂N₄O₅PCl+2H₂O (334,7) vypočteno (%): C 25,12; H 4,82; N 16,74; nalezeno (%): C 25,07; H 4,74; N 16,59. MS ESI(+), *m/z* (%): 335 [M⁺] (100), 357 [M⁺Na] (90).

5.7.20. Příprava lipofilních proléčiv 108 a 109 (odpovídajících kyselinám 35 a 89)

Použitě alkylační činidlo bylo připraveno dle literatury^[185]. Samotná alkylace byla provedena v souladu s postupem 5.7.3. z 1 mmol výchozích látek (**33** a **54**). Požadované produkty byly izolovány (z odpařené reakční směsi) pomocí gradientové sloupcové chromatografie (silikagel; chloroform/methanol, 90/10 až 70/30). Látka **108** byla získána v množství 247 mg (43% teorie). Látka **109** byla izolována v množství 225 mg (39% teorie).



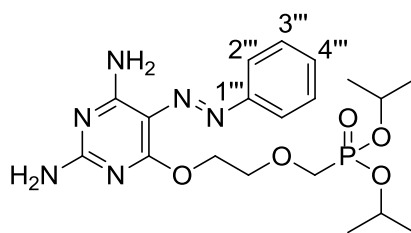
3-(Hexadecyloxy)propyl-((2-((2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)-fosfonát sodný (108): „pevná“ bílá látka, b.t. 86-98 °C. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 5,21 s, 1 H, (H-5''); 4,32 m, 2 H, (H-2'); 4,02 m, 2 H, (H-1'''); 3,83 m, 2 H, (H-1'); 3,75 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 7,0$ (H-1); 3,52 m, 2 H, (H-3'''); 3,41 m, 2 H, (H-1'''''); 1,91 m, 2 H, (H-2'''); 1,55 m, 2 H, (H-2'''''); 1,23 m, 26 H, (CH_2 '''''); 0,88 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,0$ (H-16'''''). $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): 171,1 (C-4''); 157,0 (C-6''); 154,9 (C-2''); 76,1 (C-5''); 71,1 (C-1'''); 70,8 d, $J(1',\text{P}) = 11,7$ (C-1'); 67,0 (C-3'''); 66,3 (C-2'); 61,9 (C-1'''); 30,9 (C-2'''); 29,8 (C-2'''''); 29,5, 29,4, 29,2, 25,9 a 22,5 (CH_2 '''''); 13,9 (C-16''''') – signál pro C-1 nenalezen. Pro $\text{C}_{26}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_6\text{PNa}$ (568,7) vypočteno (%): C 54,91; H 8,86; N 9,85; nalezeno (%): C 54,78; H 8,99; N 9,57. MS ESI(+), m/z (%): 569 [$\text{M}(\text{Na})^+$] (100).



3-(Hexadecyloxy)propyl-((2-((2,6-diamino-5-methylpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)-fosfonát sodný (109): „pevná“ bílá látka, b.t. 80-97 °C. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 4,35 m, 2 H, (H-2'); 4,00 m, 2 H, (H-1'''); 3,79 m, 4 H, (H-1 a 1'); 3,47 m, 2 H, (H-3'''); 3,35 m, 2 H, (H-1'''''); 1,85 m, 2 H, (H-2'''); 1,73 s, 3 H, (5- CH_3); 1,52 m, 2 H, (H-2'''''); 1,25 m, 26 H, (CH_2 '''''); 0,88 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,1$ (H-16'''''). $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): 171,3 (C-4''); 157,2 (C-6''); 154,8 (C-2''); 84,0 (C-5''); 71,1 (C-1'''); 70,9 d, $J(1',\text{P}) = 11,9$ (C-1'); 67,3 (C-3'''); 66,3 (C-2'); 62,2 (C-1'''); 31,2 (C-2'''); 29,4 (C-2'''''); 29,3, 29,1, 28,6, 26,3 a 22,0 (CH_2 '''''); 14,1 (C-16'''''); 7,1 (5''- CH_3) – signál pro C-1 nenalezen. Pro $\text{C}_{27}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_6\text{PNa}$ (582,7) vypočteno (%): C 55,65; H 9,00; N 9,62; nalezeno (%): C 55,39; H 9,24; N 9,48. MS ESI(+), m/z (%): 583 [$\text{M}(\text{Na})^+$] (100).

5.7.21. Příprava diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-fenylazopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)-methyl)fosfonátu (110)

696 mg (2 mmol) látky **34** bylo ropuštěno v 20 ml DMF. K tomuto roztoku byly následně přidány 2 g octanu sodného společně s 7 ml kyseliny octové a 11 ml vody. Do této směsi byl přikápan roztok fenyldiazoniové soli (2,6 mmol) připravený dle literatury^[197]. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 5 hodin, během kterých došlo k plné konverzi. Po odpaření byl získaný odparek suspendován na vodě a extrahován 3x 50 ml chloroformu. Spojené chloroformové frakce byly odpařeny na vakuové rotační odparce. Získaný odparek byl čistěn gradientovou sloupcovou chromatografií (silikagel; chloroform/methanol, 98/2 až 95/5). Po odpaření frakcí obsahujících požadovaný produkt bylo k odparku přidáno 20 ml hexanu a tato směs byla vystavena působení ultrazvuku po dobu 10 minut. Získané modrofialové krystaly byly odsáty a promyty 2x 10 ml hexanu. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 831 mg (92% teorie) látky **110**.

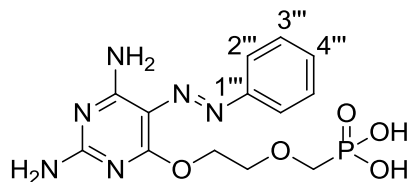


Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-fenylazopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát

(110): modro-fialová krystalická látka, b.t. 139-140 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 9,48 d, 1 H, $J(\text{gem}) = 4,7$ (6''-NH $_{2a}$); 7,67 d, 1 H, $J(\text{gem}) = 4,7$ (6''-NH $_{2b}$); 7,66 m, 2 H, (H-2'''); 7,43 m, 2 H, (H-3'''); 7,30 m, 1 H, (H-4'''); 6,94 bs, 2 H, (NH $_2$); 4,56 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,8$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,53 m, 2 H, (H-2''); 3,91 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,4$ (H-1); 3,91 m, 2 H, (H-1'); 1,18 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,1$ (CH $_3$); 1,16 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,0$ (CH $_3$). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 168,0 (C-4''); 162,3 (C-2''); 156,3 (C-6''); 152,9 (C-1'''); 129,2 (C-3'''); 128,1 (C-4'''); 121,1 (C-2'''); 111,4 (C-5''); 70,8 d, $J(1',\text{P}) = 12,5$ (C-1'); 70,3 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,4$ (CH); 65,6 (C-2'); 65,4 d, $J(1,\text{P}) = 164,0$ (C-1); 23,9 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,8$ (CH $_3$); 23,8 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,5$ (CH $_3$). Pro C $_{19}$ H $_{29}$ N $_6$ O $_5$ P (452,4) vypočteno (%): C 50,44; H 6,46; N 18,57; nalezeno (%): C 50,35; H 6,40; N 18,54. MS ESI(+), m/z (%): 453 [M $^+$] (100), 475 [M $^+$ Na] (95).

5.7.22. Příprava diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-fenylazopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonátu (111)

Pro tuto přípravu byl využit univerzální postup, tak jak je popsán v sekci 5.7.3., vycházející z 1 mmol výchozí látky **110**. Izolace byla provedena též v souladu s postupem 5.7.3. Bylo získáno 292 mg (76% teorie) látky **111**.



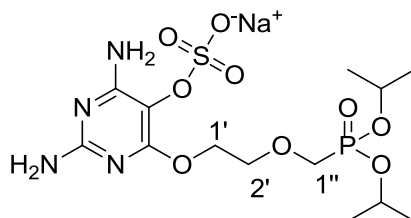
((2-((2,6-Diamino-5-fenylazopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (111):

modro-fialová krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR (D $_2$ O+NaOD): 7,58 m, 2 H, (H-2'''); 7,46 m, 2 H, (H-3'''); 7,39 m, 1 H, (H-4'''); 4,50 m, 2 H, (H-2''); 3,96 m, 2 H, (H-1'); 3,57 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,3$ (H-1). ^{13}C NMR (D $_2$ O+NaOD): 168,5 (C-4''); 162,4 (C-2''); 156,6 (C-6''); 152,9 (C-1'''); 129,8 (C-3'''); 129,7 (C-4'''); 121,9 (C-2'''); 112,2 (C-5''); 70,8 d, $J(1',\text{P}) = 9,2$ (C-1'); 69,6 d, $J(1,\text{P}) = 149,6$ (C-1); 66,7 (C-2'). Pro C $_{13}$ H $_{17}$ N $_6$ O $_5$ P (368,3) vypočteno (%): C 42,40; H 4,65; N 22,82; nalezeno (%): C 42,45; H 4,90; N 22,67. MS ESI(-), m/z (%): 367 [M] (100).

5.7.23. Příprava 2,4-diamino-6-(2-((diisopropoxyfosforyl)methoxy)ethoxy)pyrimidin-5-ylsulfátu sodného (112)

Pro tuto reakci byl pužit obecný postup pro oxidaci pyrimidinů (do polohy 5) popsáný v literatuře^[186]. Do baňky bylo předloženo 696 mg (2 mmol) látky **34**, 502 mg (2,2 mmol)

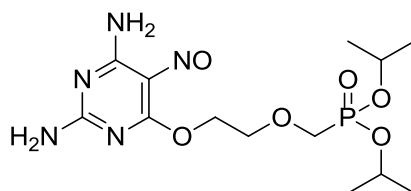
(NH₄)₂S₂O₈, 20 ml DMF a 10 ml vody. Tato směs byla zahřívána na 60 °C po dobu 4 hodin, během kterých došlo k plné konverzi. Získaná reakční směs byla po odpaření dělena gradientovou sloupcovou chromatografií (silikagel; chloroform/methanol, 90/10 až 70/30). Po odpaření frakcí obsahujících požadovaný produkt bylo k odparku přidáno 20 ml diethyletheru a tato směs byla vystavena působení ultrazvuku po dobu 10 minut. Získané sněhově bílé krystaly byly odsáty a promyty 2x 10 ml diethyletheru. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 625 mg (62% teorie) látky **112**.



2,4-Diamino-6-(2-((diisopropoxyfosforyl)methoxy)ethoxy)pyrimidin-5-ylsulfát sodný (112): bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 7,66 bs, 2 H, (NH₂); 7,26 bs, 2 H, (NH₂); 4,58 dsept, 2 H, *J*(CH,P) = 7,7, *J*(CH,CH₃) = 6,2 (CH); 4,43 m, 2 H, (H-1'); 3,81 d, 2 H, *J*(1'',P) = 8,1 (H-1''); 3,80 m, 2 H, (H-2'); 1,24 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,2 (CH₃); 1,22 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,2 (CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 164,1 (C-4); 159,4 (C-6); 151,3 (C-2); 109,3 (C-5); 70,5 d, *J*(2',P) = 11,4 (C-2'); 70,3 d, *J*(CH,P) = 6,4 (CH); 66,2 (C-1'); 65,3 d, *J*(1'',P) = 163,8 (C-1''); 24,0 d, *J*(CH₃,P) = 3,8 (CH₃); 23,8 d, *J*(CH₃,P) = 4,5 (CH₃). Pro C₁₃H₂₄N₄O₉PSNa+2H₂O (502,4) vypočteno (%): C 31,08; H 5,62; N 11,15; S 6,38; nalezeno (%): C 31,22; H 5,43; N 11,07; S 6,14. MS ESI(+), *m/z* (%): 445 [M⁺(-Na)] (10), 467 [M⁺(Na)] (100), 489 [M⁺(Na)Na] (40).

5.7.24. Příprava diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-nitrosopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonátu (113)

Do baňky bylo předloženo 1392 mg (4 mmol) látky **34**, 321 mg (4,64 mmol) NaNO₂ a 40 ml vody. Tato směs byla ochlazena na 0 °C ledovou lázní. Následně bylo pomalu přikapáno 6 ml kyseliny octové v 40 ml vody. Po 2 hodinách došlo k plné konverzi za vyloučení požadovaného produktu přímo z reakční směsi. Pevný produkt byl odsát a promyt 3x 50 ml vody. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 1504 mg (kvantitativní výtěžek) látky **113**.

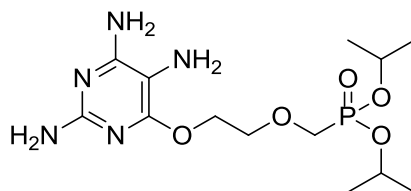


Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-nitrosopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (113): modrá krystalická látka, b.t. 75-76 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 10,06 bd, 1 H, *J*(gem) = 4,2 a 8,00 bd, 1 H, *J*(gem) = 4,2 (NH₂); 7,82 bs a 7,78 bs, 2 H, (NH₂); 4,64 m, 2 H, (H-2'); 4,57

dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,6$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 3,99 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,3$ (H-1); 3,94 m, 2 H, (H-1'); 1,21 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH₃); 1,18 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 170,9 (C-4''); 163,6 (C-2''); 151,0 (C-6''); 139,7 (C-5''); 70,5 d, $J(1',\text{P}) = 12,0$ (C-1'); 70,4 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,1$ (CH); 66,0 (C-2'); 65,2 d, $J(1,\text{P}) = 164,1$ (C-1); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,3$ (CH₃); 23,8 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,4$ (CH₃). Pro C₁₃H₂₄N₅O₆P (377,3) vypočteno (%): C 41,38; H 6,41; N 18,56; nalezeno (%): C 41,33; H 6,32; N 18,36. MS ESI(+), *m/z* (%): 378 [M⁺] (25), 400 [M⁺Na] (100).

5.7.25. Příprava diisopropyl-((2-((2,5,6-triaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)-fosfonátu (114)

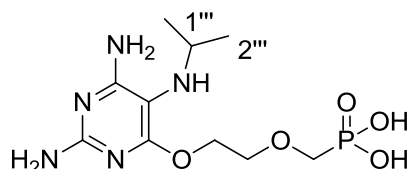
Do baňky bylo předloženo 755 mg (2 mmol) látky **113** a 10 ml methanolu za vzniku temně modrého roztoku. Za intenzivního míchání byl přikapán roztok obsahující 1392 mg (8 mmol) Na₂S₂O₄ a 20 ml vody. Během přikapání došlo ke kompletnímu odbarvení reakční směsi (plná konverze). Reakce byla dále míchána 1 hodinu a poté byla přímo extrahována chloroformem (6x 40 ml). Spojené organické frakce byly sušeny bezvodým MgSO₄. Po odpaření chloroformu bylo k získanému odparku přidáno 20 ml diethyletheru a tato směs byla vystavena působení ultrazvuku po dobu 10 minut. Získané sněhově bílé krystaly byly odsáty a promyty 2x 10 ml diethyletheru. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 612 mg (84% teorie) látky **114**. Produkt podléhá degradaci vzdušným kyslíkem. Pro dlouhodobé skladování byla látka **114** převedena na hydrochlorid, který už je plně stálý. Samotná látka **114** byla rozpuštěna v acetonu a k vzniklému roztoku byl přidán jeden ekvivalent HCl v diethyletheru za kvantitativního vyloučení příslušného hydrochloridu.



Diisopropyl-((2-((2,5,6-triaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (114): na vzduchu nestálá bílá krystalická látka (plně stála jako hydrochlorid), b.t. 65-66 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 5,68 bs, 2 H, (NH₂); 5,27 bs, 2 H, (NH₂); 4,59 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,7$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,27 m, 2 H, (H-2'); 3,80 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,2$ (H-1); 3,79 m, 2 H, (H-1'); 3,34 bs, 2 H (NH₂); 1,24 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH₃); 1,23 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 157,5 (C-4''); 155,7 (C-2''); 155,6 (C-6''); 100,3 (C-5''); 71,3 d, $J(1',\text{P}) = 11,9$ (C-1'); 70,4 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,3$ (CH); 65,1 d, $J(1,\text{P}) = 164,2$ (C-1); 64,2 (C-2'); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,5$ (CH₃); 23,9 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,4$ (CH₃). Pro C₁₃H₂₆N₅O₅P (363,4) vypočteno (%): C 42,97; H 7,21; N 19,27; nalezeno (%): C 42,82; H 7,11; N 19,17. MS ESI(+), *m/z* (%): 364 [M⁺] (100), 386 [M⁺Na] (60).

5.7.26. Příprava ((2-((2,6-diamino-5-(isopropylamino)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonové kyseliny (115)

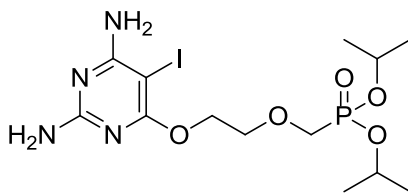
Pro tuto přípravu byl využit univerzální postup, tak jak je popsán v sekci 5.7.3., vycházející z 1 mmol výchozí látky **114**. Izolace byla provedena též v souladu s postupem 5.7.3. Bylo získáno 287 mg (89% teorie) látky **115**.



((2-((2,6-Diamino-5-(isopropylamino)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (115): bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 4,38 m, 2 H, (H-2'); 3,92 m, 2 H, (H-1'); 3,56 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,0$ (H-1); 3,12 sept, 1 H, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,4$ (H-1''); 1,07 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,4$ (H-2'''). ^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 165,1 (C-4''); 161,4 (C-2''); 159,3 (C-6''); 101,2 (C-5''); 71,1 d, $J(1',\text{P}) = 8,3$ (C-1'); 69,5 d, $J(1,\text{P}) = 149,8$ (C-1); 66,2 (C-2'); 49,1 (C-1'''); 22,3 (C-2'''). Pro $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_5\text{P}$ (321,3) vypočteno (%): C 37,39; H 6,27; N 21,08; nalezeno (%): C 37,43; H 6,24; N 20,87. MS ESI(+), m/z (%): 322 [M^+] (100).

5.7.27. Příprava diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-jodpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonátu (116)

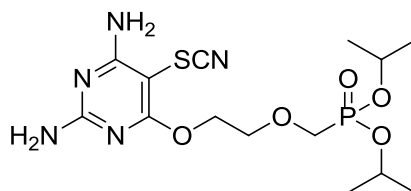
Tato sloučenina byla připravena přesně dle postupu popsaného v literatuře^[102]. Z 1392 mg (4 mmol) látky **34** bylo získáno 1760 mg (93% teorie) látky **116**.



Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-jodpyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (116): bílá krystalická látka, b.t. 183-184 °C. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 6,22 bs, 2 H, (NH_2); 6,15 bs, 2 H, (NH_2); 4,59 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,7$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,31 m, 2 H, (H-2'); 3,85 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,4$ (H-1); 3,79 m, 2 H, (H-1'); 1,24 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,3$ (CH_3); 1,23 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,3$ (CH_3). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$): 167,3 (C-4''); 164,6 (C-6''); 162,5 (C-2''); 70,9 d, $J(1',\text{P}) = 12,2$ (C-1'); 70,4 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,2$ (CH); 65,6 (C-2'); 65,4 d, $J(1,\text{P}) = 163,8$ (C-1); 43,1 (C-5''); 24,1 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,2$ (CH_3); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,2$ (CH_3). Pro $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_5\text{PI}$ (474,2) vypočteno (%): C 32,92; H 5,10; N 11,81; nalezeno (%): C 32,98; H 5,07; N 11,73. MS ESI(+), m/z (%): 475 [M^+] (100).

5.7.28. Příprava diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-thiokyanatopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonátu (117)

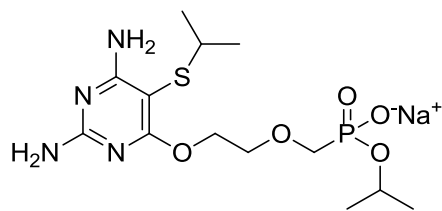
Do baňky bylo předloženo 10,45 g (30 mmol) látky **34**, 11,66 g (120 mmol) KSCN, 100 ml DMF a 8 ml pyridinu. Tato směs byla ochlazena na 0 °C ledovou lázní. Následně byl pomalu přikapán roztok obsahující 6,71 g (42 mmol) Br₂ v 30 ml DMF. Po 2 hodinách došlo k plné konverzi za částečného vyloučení požadovaného produktu přímo z reakční směsi. K reakční směsi bylo přidáno 200 ml vody a získaná směs byla přímo extrahována chloroformem (6x 100 ml). Spojené chloroformové extrakty byly přefiltrovány přes vrstvu silikagelu (3 cm), která byla ještě promyta 50 ml směsí chloroform/methanol (85/15). Spojené organické frakce byly odpařeny na vakuové rotační odparce. K získanému odparku bylo přidáno 50 ml diethyletheru a tato směs byla vystavena působení ultrazvuku po dobu 10 minut. Získané sněhově bílé krystaly byly odsáty a promyty 2x 20 ml diethyletheru. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 11,85 g (97% teorie) látky **117**.



Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-thiokyanatopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (117): bílá krystalická látka, b.t. 78-80 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 6,94 bs, 2 H, (NH₂); 6,64 bs, 2 H, (NH₂); 4,59 dsept, 2 H, *J*(CH,P) = 7,7, *J*(CH,CH₃) = 6,2 (CH); 4,40 m, 2 H, (H-2''); 3,84 d, 2 H, *J*(1,P) = 8,3 (H-1); 3,83 m, 2 H, (H-1'); 1,24 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,2 (CH₃); 1,23 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,2 (CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 169,2 (C-4''); 165,9 (C-6''); 163,2 (C-2''); 112,3 (C-5''); 70,9 d, *J*(1',P) = 12,1 (C-1'); 70,4 d, *J*(CH,P) = 6,2 (CH); 65,6 (C-2'); 65,3 d, *J*(1,P) = 164,0 (C-1); 24,1 d, *J*(CH₃,P) = 3,1 (CH₃); 23,9 d, *J*(CH₃,P) = 4,2 (CH₃). Signál pro uhlík z SCN skupiny nebyl nalezen. Pro C₁₄H₂₄N₅O₅PS (405,4) vypočteno (%): C 41,48; H 5,97; N 17,27; S 7,91; nalezeno (%): C 41,54; H 6,00; N 17,21; S 7,82. MS ESI(-), *m/z* (%): 404 [M] (100).

5.7.29. Příprava isopropyl-((2-((2,6-diamino-5-(isopropylthio)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonátu sodného (118)

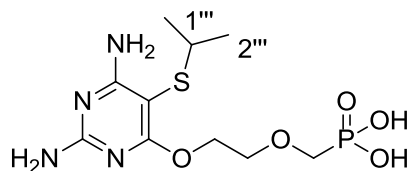
Do baňky bylo předloženo 810 mg (2 mmol) látky **117**, 624 mg (8 mmol) nového Na₂S a 100 ml vody. Tato suspenze byla zahřívána k varu po dobu 1 hodiny (během které došlo k rozpuštění a plné konverzi). Po odpaření byla získaná reakční směs čištěna gradientovou sloupcovou chromatografií (silikagel; chloroform/methanol, 90/10 až 70/30). Frakce obsahující požadovaný produkt byly spojeny a odpařeny. K získanému odparku bylo přidáno 10 ml diethyletheru a tato směs byla vystavena působení ultrazvuku po dobu 10 minut. Získané sněhově bílé krystaly byly odsáty a promyty 2x 10 ml diethyletheru. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 586 mg (73% teorie) látky **118**.



Isopropyl-((2-((2,6-diamino-5-(isopropylthio)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát sodný (118): bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,24 bs, 2 H, (NH₂); 6,17 bs, 2 H, (NH₂); 4,29 dsept, 1 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 8,5$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (OCH); 4,26 m, 2 H, (H-2'); 3,69 m, 2 H, (H-1'); 3,38 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,0$ (H-1); 2,99 sept, 1 H, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,7$ (SCH); 1,11 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,7$ (SCH-CH₃); 1,09 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,2$ (OCH-CH₃). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 169,9 (C-4''); 167,3 (C-6''); 162,0 (C-2''); 78,6 (C-5''); 71,0 d, $J(1',\text{P}) = 9,9$ (C-1'); 68,7 d, $J(1,\text{P}) = 154,0$ (C-1); 65,9 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 5,2$ (CH); 64,8 (C-2'); 37,6 (SCH); 24,8 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,6$ (OCH-CH₃); 22,9 (SCH-CH₃). Pro C₁₃H₂₄N₄O₅PSNa (402,4) vypočteno (%): C 38,80; H 6,01; N 13,92; nalezeno (%): C 38,59; H 6,24; N 13,78. MS ESI(-), m/z (%): 379 [M⁻(Na)] (80), 401 [M⁻(Na)] (100); ESI(+), m/z (%): 381 [M⁺(-Na)] (10), 403 [M⁺(Na)] (15), 425 [M⁺Na(Na)] (100).

5.7.30. Příprava ((2-((2,6-diamino-5-(isopropylthio)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonové kyseliny (119)

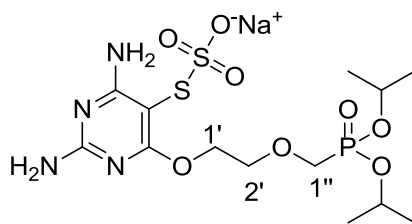
Pro tuto přípravu byl využit univerzální postup, tak jak je popsán v sekci 5.7.3., vycházející z 1 mmol výchozí látky **118**. Izolace byla provedena též v souladu s postupem 5.7.3. Bylo získáno 273 mg (81% teorie) látky **119**.



((2-((2,6-Diamino-5-(isopropylthio)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (119): bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR (D₂O+NaOD): 4,42 m, 2 H, (H-2'); 3,91 m, 2 H, (H-1'); 3,55 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,2$ (H-1); 3,11 sept, 1 H, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,7$ (H-1'''); 1,16 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,7$ (H-2'''). ^{13}C NMR (D₂O+NaOD): 170,4 (C-4''); 167,1 (C-6''); 161,8 (C-2''); 80,7 (C-5''); 70,4 d, $J(1',\text{P}) = 9,0$ (C-1'); 69,0 d, $J(1,\text{P}) = 149,7$ (C-1); 65,7 (C-2'); 38,3 (C-1'''); 21,9 (C-2'''). Pro C₁₀H₁₉N₄O₅PS (338,3) vypočteno (%): C 35,50; H 5,66; N 16,56; nalezeno (%): C 35,71; H 5,73; N 16,53. MS ESI(+), m/z (%): 339 [M⁺] (100), 361 [M⁺Na] (10).

5.7.31. Příprava *S*-(2,4-diamino-6-(2-((diisopropoxyfosforyl)methoxy)ethoxy)pyrimidin-5-yl)thiosulfátu sodného (**120**)

Do baňky bylo předloženo 810 mg (2 mmol) látky **117**, 1986 mg (8 mmol) Na₂S₂O₃·5H₂O a 100 ml vody. Tato suspenze byla zahřívána k varu po dobu 2 hodin (během kterých došlo k rozpuštění a plné konverzi). Po odpaření byla získaná reakční směs čištěna gradientovou sloupcovou chromatografií (silikagel; chloroform/methanol, 90/10 až 70/30). Frakce obsahující požadovaný produkt byly spojeny a odpařeny. K získanému odparku bylo přidáno 10 ml diethyletheru a tato směs byla vystavena působení ultrazvuku po dobu 10 minut. Získané sněhově bílé krystaly byly odsáty a promyty 2x 10 ml diethyletheru. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 898 mg (87% teorie) látky **120**.

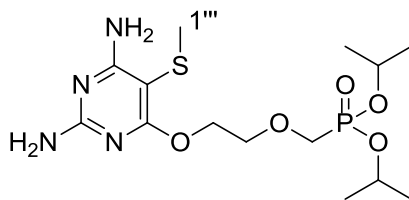


***S*-(2,4-Diamino-6-(2-((diisopropoxyfosforyl)methoxy)ethoxy)pyrimidin-5-yl)thiosulfát sodný (**120**):** bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 6,78 bs, 2 H, (NH₂); 6,70 bs, 2 H, (NH₂); 4,58 dsept, 2 H, *J*(CH,P) = 7,7, *J*(CH,CH₃) = 6,2 (CH); 4,32 m, 2 H, (H-1'); 3,83 d, 2 H, *J*(1'',P) = 8,2 (H-1''); 3,77 m, 2 H, (H-2'); 1,23 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,2 (CH₃); 1,22 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,2 (CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 169,3 (C-4); 164,4 (C-6); 159,7 (C-2); 81,4 (C-5); 70,8 d, *J*(2',P) = 12,0 (C-2'); 70,4 d, *J*(CH,P) = 6,3 (CH); 65,5 (C-1'); 65,3 d, *J*(1'',P) = 163,6 (C-1''); 24,1 d, *J*(CH₃,P) = 3,7 (CH₃); 24,0 d, *J*(CH₃,P) = 4,5 (CH₃). Pro C₁₃H₂₄N₄O₈PS₂Na+2H₂O (518,5) vypočteno (%): C 30,12; H 5,44; N 10,81; S 12,37; nalezeno (%): C 30,23; H 5,52; N 10,76; S 12,20. MS ESI(+), *m/z* (%): 461 [M⁺(-Na)] (30), 483 [M⁺(Na)] (85), 505 [M⁺(Na)Na] (100). HR-MS ESI (+) pro C₁₃H₂₅N₄O₈PS₂Na vypočteno: 461,0930; nalezeno: 461,0941; pro C₁₃H₂₅N₄O₈PS₂Na vypočteno: 483,0749; nalezeno: 483,0751; pro C₁₃H₂₄N₄O₈PS₂Na₂ vypočteno: 505,0569; nalezeno: 505,0561.

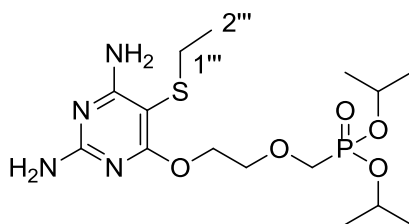
5.7.32. Přípravy diesterů 5-(alkylthio)-PMEO-DAPy (**121-124**)

Do vyžihavé a vysekurované reakční baňky bylo pod nátokem argonu předloženo 810 mg (2 mmol) látky **117**, 809 mg (4 mmol) P(Bu)₃ a 10 ml příslušného suchého alkoholu. Reakční směs byla následně míchána 12 hodin za laboratorní teploty (během čehož došlo k plné konverzi). Přebytek alkoholu byl v případě methanolu a ethanolu odstraněn odpařením reakční směsi. V případě použití ethylenglykolu a benzylalkoholu bylo využito zachycení požadovaného produktu na iontoměničce DOWEX D50x8 v H⁺ cyklu (jak je popsáno v sekci **5.7.1**). Přebytek alkoholu byl vyplaven 50% vodným ethanollem. Požadovaný produkt byl následně eluován 5% amoniakem v 50% vodném ethanolu. Získaný roztok byl odpařen na vakuové rotační odparce. Tyto získané odparky (dva dle tohoto postupu a dva získané přímým odpařením reakční směsi) byly čištěny gradientovou sloupcovou chromatografií (silikagel; chloroform/methanol, 98/2 až 90/10). Frakce obsahující požadovaný produkt byly vždy

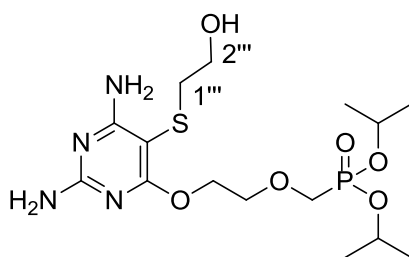
spojeny a odpařeny. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno: 724 mg (92% teorie) látky **121** (při reakci s methanolem), 726 mg (89% teorie) látky **122** (při reakci s ethanolem), 641 mg (75% teorie) látky **123** (při reakci s ethylenglykolem) a 741 mg (79% teorie) látky **124** (při reakci s benzylalkoholem).



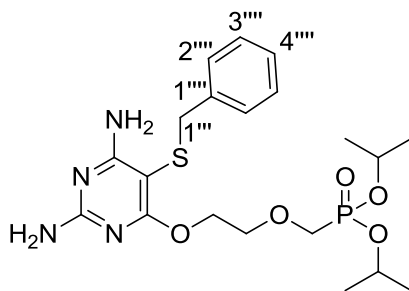
Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-(methylthio)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (121): bezbarvá olejovitá látka. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,32 bs, 2 H, (NH₂); 6,14 bs, 2 H, (NH₂); 4,59 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,7$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,33 m, 2 H, (H-2'); 3,85 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,4$ (H-1); 3,80 m, 2 H, (H-1'); 2,04 s, 3 H, (H-1'''); 1,23 m, 12 H, (CH₃-*i*Pr). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 169,2 (C-4''); 166,3 (C-6''); 161,9 (C-2''); 80,6 (C-5''); 71,0 d, $J(1',\text{P}) = 12,1$ (C-1'); 70,3 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,2$ (CH); 65,3 d, $J(1,\text{P}) = 164,2$ (C-1); 64,9 (C-2'); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,4$ (CH₃-*i*Pr); 23,9 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,4$ (CH₃-*i*Pr); 17,9 (C-1'''). Pro C₁₄H₂₇N₄O₅PS (394,4) vypočteno (%): C 42,63; H 6,90; N 14,20; nalezeno (%): C 42,50; H 6,91; N 14,14. MS ESI(+), m/z (%): 395 [M⁺] (100), 417 [M⁺Na] (40).



Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-(ethylthio)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (122): bezbarvá olejovitá látka. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,29 bs, 2 H, (NH₂); 6,15 bs, 2 H, (NH₂); 4,59 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,7$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,31 m, 2 H, (H-2'); 3,85 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,3$ (H-1); 3,79 m, 2 H, (H-1'); 2,48 q, 2 H, $J(\text{CH}_2,\text{CH}_3) = 7,4$ (H-1'''); 1,23 m, 12 H, (CH₃-*i*Pr); 1,07 t, 3 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}_2) = 7,4$ (H-2'''). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 169,6 (C-4''); 167,0 (C-6''); 161,9 (C-2''); 78,3 (C-5''); 71,0 d, $J(1',\text{P}) = 12,0$ (C-1'); 70,3 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,2$ (CH); 65,3 d, $J(1,\text{P}) = 164,3$ (C-1); 64,3 (C-2'); 28,0 (C-1'''); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,5$ (CH₃-*i*Pr); 23,9 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,3$ (CH₃-*i*Pr); 14,5 (C-2'''). Pro C₁₅H₂₉N₄O₅PS (408,5) vypočteno (%): C 44,11; H 7,16; N 13,72; nalezeno (%): C 43,99; H 7,10; N 13,64. MS ESI(+), m/z (%): 409 [M⁺] (100), 431 [M⁺Na] (20).



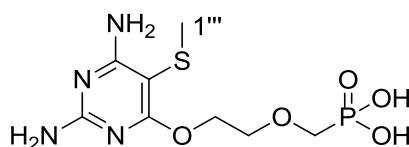
Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-(2-hydroxyethylthio)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)-fosfonát (123): bezbarvá olejovitá látka. ^1H NMR (DMSO- d_6): 6,35 bs, 2 H, (NH₂); 6,16 bs, 2 H, (NH₂); 4,70 t, 1 H, $J(\text{OH},\text{CH}_2) = 5,7$ (OH); 4,60 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,7$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,32 m, 2 H, (H-2'); 3,85 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,3$ (H-1); 3,79 m, 2 H, (H-1'); 3,41 m, 2 H, (H-2''); 2,52 t, 2 H, $J(\text{CH}_2,\text{CH}_2) = 6,9$ (H-1'''); 1,23 m, 12 H, (CH₃-*i*Pr). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 169,6 (C-4''); 167,2 (C-6''); 162,0 (C-2''); 78,4 (C-5''); 71,0 d, $J(1',\text{P}) = 12,0$ (C-1'); 70,4 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,3$ (CH); 65,3 d, $J(1,\text{P}) = 164,3$ (C-1); 64,9 (C-2'); 60,2 (C-2''); 37,5 (C-1'''); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,5$ (CH₃-*i*Pr); 23,9 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,3$ (CH₃-*i*Pr). Pro C₁₅H₂₉N₄O₆PS (424,5) vypočteno (%): C 42,45; H 6,89; N 13,20; nalezeno (%): C 42,48; H 6,94; N 13,11. MS ESI(+), m/z (%): 425 [M⁺] (100), 447 [M⁺Na] (75).



Diisopropyl-((2-((2,6-diamino-5-(benzylthio)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)-fosfonát (124): bezbarvá olejovitá látka. ^1H NMR (DMSO- d_6): 7,25-7,15 m, 5 H, (Ph); 6,13 bs, 4 H, (2x NH₂); 4,59 dsept, 2 H, $J(\text{CH},\text{P}) = 7,7$, $J(\text{CH},\text{CH}_3) = 6,2$ (CH); 4,23 m, 2 H, (H-2'); 3,85 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,3$ (H-1); 3,75 m, 2 H, (H-1'); 3,70 s, 2 H, (1'''); 1,21 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,0$ (CH₃-*i*Pr); 1,20 d, 6 H, $J(\text{CH}_3,\text{CH}) = 6,3$ (CH₃-*i*Pr). ^{13}C NMR (DMSO- d_6): 169,6 (C-4''); 166,6 (C-6''); 161,0 (C-2''); 138,5 (C-1'''); 129,1 (C-2'''); 128,2 (C-3'''); 126,8 (C-4'''); 78,6 (C-5''); 71,0 d, $J(1',\text{P}) = 12,1$ (C-1'); 70,4 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,4$ (CH); 65,4 d, $J(1,\text{P}) = 164,34$ (C-1); 64,9 (C-2'); 38,3 (C-1'''); 24,0 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 3,7$ (CH₃-*i*Pr); 23,9 d, $J(\text{CH}_3,\text{P}) = 4,5$ (CH₃-*i*Pr). Pro C₂₀H₃₁N₄O₅PS (470,5) vypočteno (%): C 51,05; H 6,64; N 11,91; nalezeno (%): C 51,04; H 6,61; N 11,85. MS ESI(+), m/z (%): 471 [M⁺] (100), 493 [M⁺Na] (15).

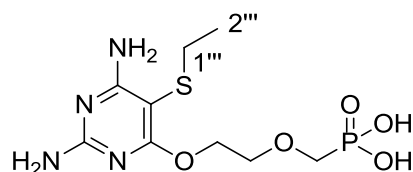
5.7.33. Přípravy 5-(alkylthio)-PMEO-DAPy (125-128)

Pro tyto přípravy byl využit univerzální postup, tak jak je popsán v sekci 5.7.3., vycházející z 1 mmol výchozí látky 121-125. Izolace byla provedena též v souladu s postupem 5.7.3. Izolované výtěžky jsou uvedeny u každé sloučeniny jednotlivě.



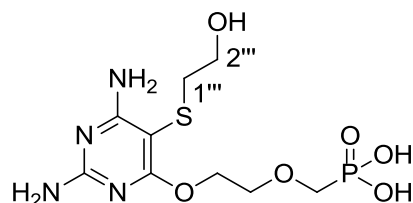
((2-((2,6-Diamino-5-(methylthio)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (125): získáno 272 mg (88% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR (D₂O+NaOD): 4,41 m, 2 H, (H-2'); 3,92 m, 2 H, (H-1'); 3,63 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,5$ (H-1); 2,11 s, 3 H, (H-1'''). ^{13}C NMR (D₂O+NaOD): 170,1 (C-4''); 165,5 (C-6''); 161,1 (C-2''); 83,1 (C-

5''); 70,8 d, $J(1',P) = 10,4$ (C-1'); 68,9 d, $J(1,P) = 151,5$ (C-1); 66,4 (C-2'); 17,2 (C-1'''). Pro $C_8H_{15}N_4O_5PS$ (310,3) vypočteno (%): C 30,97; H 4,87; N 18,06; nalezeno (%): C 30,78; H 4,94; N 17,87. MS ESI(+), m/z (%): 311 [M^+] (100), 333 [M^+Na] (35).



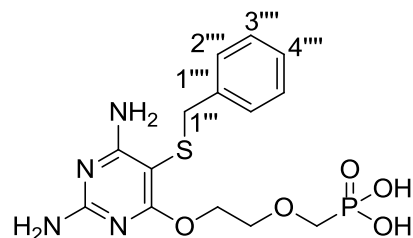
((2-((2,6-Diamino-5-(ethylthio)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina

(126): získáno 276 mg (85% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. 1H NMR ($D_2O+NaOD$): 4,38 m, 2 H, (H-2'); 3,90 m, 2 H, (H-1'); 3,66 d, 2 H, $J(1,P) = 8,5$ (H-1); 2,56 q, 2 H, $J(CH_2,CH_3) = 7,4$ (H-1'''); 1,10 t, 3 H, $J(CH_3,CH_2) = 7,4$ (H-2'''). ^{13}C NMR ($D_2O+NaOD$): 171,0 (C-4''); 164,8 (C-6''); 160,9 (C-2''); 81,1 (C-5''); 71,3 d, $J(1',P) = 10,9$ (C-1'); 68,7 d, $J(1,P) = 153,3$ (C-1); 66,9 (C-2'); 28,5 (C-1'''); 14,7 (C-2'''). Pro $C_9H_{17}N_4O_5PS$ (324,3) vypočteno (%): C 33,33; H 5,28; N 17,28; nalezeno (%): C 33,42; H 5,28; N 17,17. MS ESI(+), m/z (%): 325 [M^+] (100), 347 [M^+Na] (20).



((2-((2,6-Diamino-5-(2-hydroxyethylthio)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (127):

získáno 241 mg (71% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. 1H NMR ($D_2O+NaOD$): 4,41 m, 2 H, (H-2'); 3,91 m, 2 H, (H-1'); 3,65 d, 2 H, $J(1,P) = 8,6$ (H-1); 3,62 t, 2 H, $J(CH_2,CH_2) = 6,4$ (H-2'''); 2,70 t, 2 H, $J(CH_2,CH_2) = 6,4$ (H-1'''). ^{13}C NMR ($D_2O+NaOD$): 171,0 (C-4''); 166,2 (C-6''); 161,4 (C-2''); 80,7 (C-5''); 71,2 d, $J(1',P) = 10,9$ (C-1'); 68,8 d, $J(1,P) = 152,7$ (C-1); 66,8 (C-2'); 60,7 (C-2'''); 36,9 (C-1'''). Pro $C_9H_{17}N_4O_6PS$ (340,3) vypočteno (%): C 31,77; H 5,04; N 16,46; nalezeno (%): C 31,75; H 5,19; N 16,37. MS ESI(+), m/z (%): 341 [M^+] (100), 363 [M^+Na] (45).



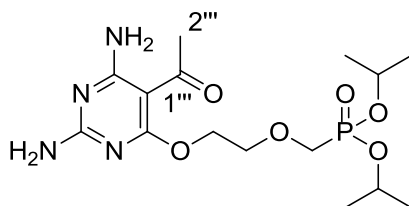
((2-((2,6-Diamino-5-(benzylthio)pyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina

(126): získáno 349 mg (90% teorie); bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. 1H NMR ($D_2O+NaOD$): 7,27-7,21 m, 3 H, (H-3'''' a 4''''); 7,08 m, 2 H, (H-2'''); 4,08 m, 2 H, (H-2'); 3,72 s, 2 H, (H-1'''); 3,71 m, 2 H, (H-1'); 3,58 d, 2 H, $J(1,P) = 8,5$ (H-1). ^{13}C NMR ($D_2O+NaOD$): 171,2 (C-4''); 166,6 (C-6''); 161,8 (C-2''); 138,7 (C-1'''); 129,7 (C-2'''); 128,8 (C-3'''); 127,7 (C-4'''); 80,2 (C-5''); 70,9 d, $J(1',P) = 10,5$ (C-1'); 69,2 d, $J(1,P) =$

151,6 (C-1); 66,5 (C-2'); 38,1 (C-1'''). Pro C₁₄H₁₉N₄O₅PS (386,4) vypočteno (%): C 43,52; H 4,96; N 14,50; nalezeno (%): C 43,43; H 4,93; N 14,26. MS ESI(+), *m/z* (%): 387 [M⁺] (100), 409 [M⁺Na] (60).

5.7.34. Vznik diisopropyl-((2-((5-acetyl-2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)-fosfonátu (129)

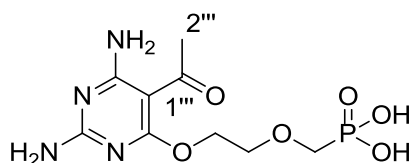
Do vyžíhané a vysekurované reakční baňky bylo pod nátokem argonu předloženo 950 mg (2 mmol) látky **116**, 491 mg (5 mmol) trimethylsilylacetyleny, 280 mg (0,4 mmol) [PdCl₂(PPh₃)₂], 190 mg (1 mmol) CuI, 20 ml suchého DMF a 1 ml suchého NEt₃. Reakční směs byla následně míchána 12 hodin při zahřívání na 70 °C. Poté byla odpařena na vakuové rotační odparce. Získaný odparek byl čištěn gradientovou sloupcovou chromatografií (silikagel; chloroform/methanol, 99/1 až 90/10). Frakce obsahující požadovaný produkt byly spojeny a odpařeny. K získanému odparku bylo přidáno 10 ml hexanu a tato směs byla vystavena působení ultrazvuku po dobu 10 minut. Získané sněhově bílé krystaly byly odsáty a promyty 2x 10 ml hexanu. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 498 mg (64% teorie) látky **129**.



Diisopropyl-((2-((5-acetyl-2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonát (129): bílá krystalická látka, b.t. 104-106 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): 8,97 bs a 7,15 bs, 2 H, (NH₂); 6,83 bs, 2 H, (NH₂); 4,57 dsept, 2 H, *J*(CH,P) = 7,7, *J*(CH,CH₃) = 6,2 (CH); 4,42 m, 2 H, (H-2'); 3,84 m, 2 H, (H-1'); 3,79 d, 2 H, *J*(1,P) = 8,3 (H-1); 2,41 s, 3 H, (H-2'''); 1,22 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,2 (CH₃-*i*Pr); 1,20 d, 6 H, *J*(CH₃,CH) = 6,2 (CH₃-*i*Pr). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 195,5 (C-1'''); 170,0 (C-4''); 165,7 (C-2''); 161,9 (C-6''); 91,7 (C-5''); 70,7 d, *J*(1',P) = 11,9 (C-1'); 70,2 d, *J*(CH,P) = 6,3 (CH); 65,0 d, *J*(1,P) = 164,7 (C-1); 64,8 (C-2'); 33,2 (C-2'''); 23,9 d, *J*(CH₃,P) = 3,7 (CH₃-*i*Pr); 23,8 d, *J*(CH₃,P) = 4,3 (CH₃-*i*Pr). Pro C₁₅H₂₇N₄O₆P (390,4) vypočteno (%): C 46,15; H 6,97; N 14,35; nalezeno (%): C 46,35; H 6,80; N 14,27. MS ESI(+), *m/z* (%): 391 [M⁺] (100), 413 [M⁺Na] (90).

5.7.35. Příprava ((2-((5-acetyl-2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonové kyseliny (130)

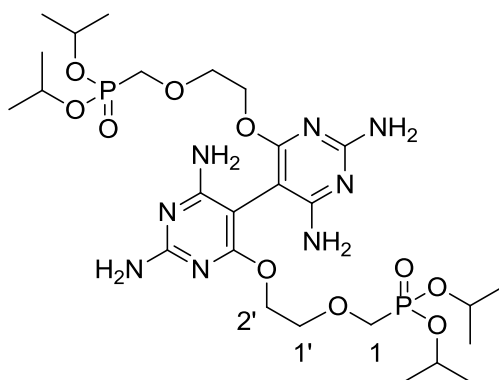
Pro tuto reakci byl využit univerzální postup, tak jak je popsán v sekci 5.7.3., vycházející z 1 mmol výchozí látky **129**. Izolace byla provedena též v souladu s postupem 5.7.3. Bylo získáno 297 mg (87% teorie) látky **130**.



((2-((5-Acetyl-2,6-diaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (130): bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 4,50 m, 2 H, (H-2'); 3,98 m, 2 H, (H-1'); 3,56 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,0$ (H-1); 2,54 s, 3 H, (H-2'''). ^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 200,9 (CO); 172,1 (C-4''); 166,4 (C-6''); 163,0 (C-2''); 93,4 (C-5''); 70,9 d, $J(1',\text{P}) = 8,2$ (C-1'); 69,6 d, $J(1,\text{P}) = 149,5$ (C-1); 66,8 (C-2'); 33,1 (C-1'''). Pro $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_6\text{P}+2\text{H}_2\text{O}$ (342,2) vypočteno (%): C 31,58; H 5,60; N 16,37; nalezeno (%): C 31,63; H 5,43; N 16,28. MS ESI(+), m/z (%): 343 [M^+] (100), 365 [M^+Na] (60).

5.7.36. Příprava tetraisopropyl-((((2,2',6,6'-tetraamino-[5,5'-bipyrimidin]-4,4'-diyl)bis(oxy))bis(ethan-2,1-diyl))bis(oxy))bis(methylen))bis(fosfonátu) (131)

Do vyžihavé a vysekurované reakční baňky bylo pod nátokem argonu předloženo 950 mg (2 mmol) látky **116**, 952 mg (5 mmol) CuI, 291 mg (5 mmol) suchého KF a 20 ml suchého DMF. Reakční směs byla následně míchána 48 hodin při zahřívání na 90 °C. Následně byla odpařena na vakuové rotační odparce. Získaný odparek byl suspendován ve vodě a extrahován 3x 50 ml chloroformu. Po vysušení a odpaření spojených chloroformových frakcí byla získaná směs čištěna gradientovou sloupcovou chromatografií (silikagel; chloroform/methanol, 99/1 až 90/10). Frakce obsahující požadovaný produkt byly spojeny a odpařeny. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 435 mg (63% teorie) látky **131**.

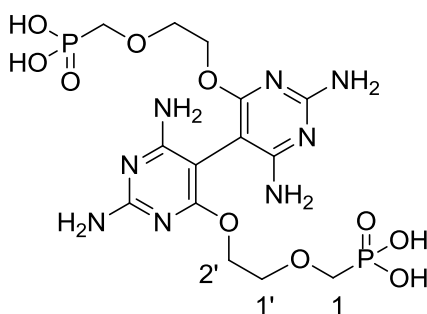


Tetraisopropyl-((((2,2',6,6'-tetraamino-[5,5'-bipyrimidin]-4,4'-diyl)bis(oxy))bis(ethan-2,1-diyl))bis(oxy))bis(methylen))bis(fosfonát) (131): bezbarvá olejovitá látka. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 4,93 bs, 8 H, (NH_2); 4,69 m, 6 H, (CH a 2'a); 4,18 ddd, 2 H, $J_{\text{gem}} = 12,1$, $J(2'b,1'a) = 5,0$, $J(2'b,1'b) = 3,7$ (2'b); 3,68-3,84 m, 8 H, (1 a 1'); 1,30 m, 24 H, (CH_3). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 167,5 (C-4''); 163,5 a 161,2 (C-2'' a 6''); 82,32 (C-5); 71,5 d, $J(1',\text{P}) = 12,8$ (C-1'); 71,1 d a 71,0 d, $J(\text{CH},\text{P}) = 6,4$ (CH); 65,8 d, $J(1,\text{P}) = 168,2$ (C-1); 64,5 (C-2'); 24,0 m, (CH_3). Pro $\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{P}_2$ (694,7) vypočteno (%): C 44,95; H 6,95; N 16,13;

nalezeno (%): C 44,71; H 6,73; N 15,86. MS ESI(+), m/z (%): 695 [M^+] (80), 717 [M^+Na] (100).

5.7.37. Příprava (((((2,2',6,6'-tetraamino-[5,5'-bipyrimidin]-4,4'-diyl)bis(oxy))bis(ethan-2,1-diyl))bis(oxy))bis(methylen))difosfonové kyseliny (132)

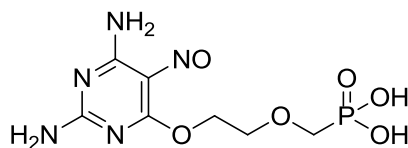
Pro tuto reakci byl využit univerzální postup, tak jak je popsán v sekci 5.7.3., vycházející z 0,5 mmol výchozí látky **131**. Izolace byla provedena též v souladu s postupem 5.7.3. Bylo získáno 295 mg (90% teorie) látky **132**.



(((2,2',6,6'-Tetraamino-[5,5'-bipyrimidin]-4,4'-diyl)bis(oxy))bis(ethan-2,1-diyl))bis(oxy))bis(methylen))difosfonová kyselina (**132**): bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. 1H NMR ($D_2O+NaOD$): 4,58 ddd, 2 H, $J(\text{gem}) = 11,9$, $J(2'a,1') = 6,5$ a $3,6$ (H-2'a); 4,19 ddd, 2 H, $J(\text{gem}) = 11,9$, $J(2'b,1') = 5,4$ a $3,6$ (H-2'b); 3,79 m, 4 H, (H-1'); 3,45 m, 4 H, (H-1). ^{13}C NMR ($D_2O+NaOD$): 168,7 (C-4''); 165,0 (C-2''); 162,9 (C-6''); 82,56 (C-5''); 71,2 d, $J(1',P) = 9,0$ (C-1'); 69,8 d, $J(1,P) = 149,9$ (C-1); 66,3 (C-2'). Pro $C_{14}H_{24}N_8O_{10}P_2+7H_2O$ (652,4) vypočteno (%): C 25,77; H 5,87; N 17,17; nalezeno (%): C 25,57; H 5,83; N 17,09. MS ESI(+), m/z (%): 527 [M^+] (50), 549 [M^+Na] (100).

5.7.38. Příprava ((2-((2,6-diamino-5-nitrosopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonové kyseliny (133)

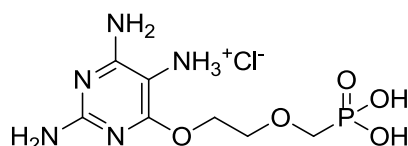
Do baňky bylo předloženo 985 mg (4 mmol) látky **35** a 40 ml 20% vodné kyseliny octové. Tato směs byla ochlazená na 0 °C ledovou lázní. Následně bylo pomalu přikapáno 516 mg (4,4 mmol) isoamylnitritu (každá kapka okamžitě barví reakční směs do modra) a reakční směs byla míchána a chlazená na 0 °C dále za vylučování modrého pevného produktu. Po 6 hodinách již reakční směs neobsahovala žádnou výchozí látku. V reakční směsi bylo následně přidáno 100 ml acetonu a pevný vyloučený produkt byl odsát a promyt 2x 10 ml vody, 2x 40 ml ethanolu a 2x 40 ml acetonu. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 1168 mg (kvantitativní výtěžek) látky **133**.



((2-((2,6-Diamino-5-nitrosopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (133): zelená krystalická látka (hydrát modrý), b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 4,67 m, 2 H, (H-2'); 4,02 m, 2 H, (H-1'); 3,56 d, 2 H, *J*(1,P) = 8,3 (H-1). ¹³C NMR (D₂O+NaOD): 171,2 (C-4''); 164,7 (C-2''); 153,0 (C-6''); 138,5 (C-5''); 70,4 d, *J*(1',P) = 9,5 (C-1'); 69,6 d, *J*(1,P) = 149,8 (C-1); 67,8 (C-2'). Pro C₇H₁₂N₅O₆P (293,2) vypočteno (%): C 28,68; H 4,13; N 23,89; nalezeno (%): C 28,67; H 4,30; N 23,70. MS ESI(+), *m/z* (%): 294 [M⁺] (100), 316 [M⁺Na] (20).

5.7.39. Příprava hydrochloridu ((2-((2,5,6-triaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)-fosfonové kyseliny (134)

Do baňky bylo předloženo 880 mg (3 mmol) látky **133**, 3,5 ml 1M vodné kyseliny chlorovodíkové a 50 ml vody. Tato směs byla ochlazena na 0 °C ledovou lázní. Následně byla reakční nádoba vysycena argonem a pod nátokem argonu bylo přidáno 60 mg hydrogenačního katalyzátoru (10% Pd/C). Reakční směs byla následně vysycena vodíkem a celá nádoba byla připojena k zásobnímu gumovému balónku, jenž byl naplněn vodíkem (hydrogenace prakticky za atmosférického tlaku). Během jedné hodiny došlo k plné konverzi. Hydrogenační katalyzátor byl odstraněn dekantací (opakována 2x). Získaný roztok byl bez zahřívání zahuštěn na vakuové rotační odparce na objem cca. 5 ml. K získané směsi bylo přidáno 100 ml acetonu za vyloučení požadovaného produktu. Ten byl následně odsán na fritě a promyt 2x 30 ml acetonu a 2x 20 ml diethyletheru. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 913 mg (91% teorie) látky **134**.

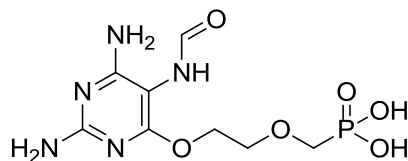


Hydrochlorid ((2-((2,5,6-triaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonové kyseliny (134): bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ¹H NMR (D₂O+NaOD): 4,63 m, 2 H, (H-2'); 3,96 m, 2 H, (H-1'); 3,74 d, 2 H, *J*(1,P) = 8,6 (H-1). ¹³C NMR (D₂O+NaOD): 165,8 (C-4''); 154,8 (C-2''); 151,8 (C-6''); 84,3 (C-5''); 70,9 d, *J*(1',P) = 10,6 (C-1'); 67,9 (C-2'); 67,2 d, *J*(1,P) = 157,2 (C-1). Pro C₇H₁₅N₅O₅PCl+H₂O (333,7) vypočteno (%): C 25,20; H 5,14; N 20,99; nalezeno (%): C 25,43; H 5,18; N 20,89. MS ESI(+), *m/z* (%): 280 [M⁺] (100), 302 [M⁺Na] (35).

5.7.40. Příprava ((2-((2,6-diamino-5-formylaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)-fosfonové kyseliny (135)

Do baňky bylo předloženo 334 mg (1 mmol) látky **134**, 296 mg (2 mmol) triethyl-orthoformiátu a 20 ml vody. Tato směs byla míchána za laboratorní teploty dvě hodiny, během kterých došlo k plné konverzi na požadovaný produkt. Získaný roztok byl bez zahřívání zahuštěn na vakuové rotační odparce na objem cca. 5 ml. K získané směsi bylo

přidáno 100 ml acetonu za vyloučení požadovaného produktu. Ten byl následně odsán na fritě a promyt 2x 30 ml acetonu a 2x 20 ml diethyletheru. Po důkladném vysušení ve vakuové sušárně bylo získáno 285 mg (93% teorie) látky **134**.



((2-((2,6-Diamino-5-formylaminopyrimidin-4-yl)oxy)ethoxy)methyl)fosfonová kyselina (135): bílá krystalická látka, b.t. >250 °C. ^1H NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 8,23 s, 1 H, (CHO); 4,39 m, 2 H, (H-2'); 3,86 m, 2 H, (H-1'); 3,60 d, 2 H, $J(1,\text{P}) = 8,5$ (H-1). ^{13}C NMR ($\text{D}_2\text{O}+\text{NaOD}$): 165,8 (C-4''); 165,5 (CHO); 161,9 (C-2''); 161,3 (C-6''); 89,0 (C-5''); 71,2 d, $J(1',\text{P}) = 10,5$ (C-1'); 69,0 d, $J(1,\text{P}) = 152,8$ (C-1); 66,7 (C-2'). Pro $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}$ (307,2) vypočteno (%): C 31,28; H 4,59; N 22,80; nalezeno (%): C 31,46; H 4,37; N 22,64. MS ESI(-), m/z (%): 306 [M] (100), 328 [MNa] (15).

6. Seznam všech vlastních (abstrahovaných) publikací autora

1. Janik, M.; Sterba, V.; Cerny, J.; Machacek, V.; **Jansa, P.**: Kinetics of base-catalysed ring closure of methyl 2,6-dinitrophenylsulfanylethanoate. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2005**, 844-849.
2. Peskova, M.; **Jansa, P.**; Machacek, V.: A new method of preparation of 2-hydroxy-3,5-dinitrobenzotrile. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A: Faculty of Chemical Technology* **2005**, 147-153.
3. **Jansa, P.**; Machacek, V.; Bertolasi, V.: Derivatives of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid. *Heterocycles* **2006**, 59-69.
4. **Jansa, P.**; Wsol, V.; Bertolasi, V.; Machacek, V.: Hydantoins and thiohydantoins derived from 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid. *Heterocycles* **2006**, 2527-2547.
5. Hanusek, J.; Sedlak, M.; **Jansa, P.**; Sterba, V.: Study of ring closure reaction of substituted phenyl N-(2-thiocarbamoylphenyl)carbamates catalysed by methoxide ion. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2006**, 61-67.
6. Hanusek, J.; Russell, M.; Laws, A.; **Jansa, P.**; Atherton, J.; Fettes, K.; Page, M.: Mechanism of the sulfurisation of phosphines and phosphites using 3-amino-1,2,4-dithiazole-5-thione (xanthane hydride). *Organic & Biomolecular Chemistry* **2007**, 478-484.
7. **Jansa, P.**; Machacek, V.; Nachtigall, P.; Wsol, V.; Svobodova, M.: Coordination compounds based on 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid. *Molecules* **2007**, 12, 1064-1079.
8. Nencka, R.; Votruba, I.; Hrebabecky, H.; **Jansa, P.**; Tloust'ova, E.; Horska, K.; Masojdkova, M.; Holy, A.: Discovery of 5-substituted-6-chlorouracils as efficient inhibitors of human thymidine phosphorylase. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 6016-6023.
9. Drabina, P.; Valenta, P.; **Jansa, P.**; Ruzicka, A.; Hanusek, J.; Sedlak, M.: Copper(II) complexes derived from substituted 2,2'-bis-(4-isopropyl-4-methyl-4,5-dihydro-1H-imidazol-5-one) ligands: Synthesis, structure and catalytic activity. *Polyhedron* **2008**, 268-274.
10. **Jansa, P.**; Dracinsky, M.; Holy, A.: Efficient synthesis of "open-ring, close-ring" acyclic nucleoside phosphonates. In *Chemistry of Nucleic Acid Components*, Hocek, M., Ed. **2008**; Vol. 10, pp 360-361 (abstrakt konference).
11. Prikryl, J.; Machacek, V.; **Jansa, P.**; Svobodova, M.; Ruzicka, A.; Nachtigal, P.; Cerny, M.: Stable triazenes derived from 2-alkylaminonaphthalenes and 5-nitrobenzo[c]-1,2-thiazole-3-diazonium hydrogensulfate. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 3272-3278.
12. Dracinsky, M.; Holy, A.; **Jansa, P.**; Kovackova, S.; Budesinsky, M.: Isotopic Exchange of Hydrogen at C-5 in Pyrimidine Derivatives: Tautomers with an sp(3)-Hybridised C-5 Carbon Atom. *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, 4117-4122.

13. Prochazkova, E.; Mertlikova-Kaiserova, H.; Holy, A.; **Jansa, P.**; Otmar, M.; Sala, M.; Hrebabecky, H.; Marak, D.; Cechova, L.; Votruba, I.: Evaluation of direct antioxidative and pro-oxidative properties of some nucleotide, nucleoside and nucleobase analogues. *Febs Journal* **2010**, *277*, 220-220 (abstrakt konference).
14. Baszczynski, O.; **Jansa, P.**; Dracinsky, M.; Klepetarova, B.; Holy, A.; Votruba, I.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Janeba, Z.: Synthesis and antiviral activity of N-9-3-fluoro-2-(phosphonomethoxy)propyl analogues derived from N-6-substituted adenines and 2,6-diaminopurines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 2114-2124.
15. Cechova, L.; **Jansa, P.**; Sala, M.; Dracinsky, M.; Holy, A.; Janeba, Z.: The optimized microwave-assisted decomposition of formamides and its synthetic utility in the amination reactions of purines. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 866-871.
16. Dracinsky, M.; **Jansa, P.**; Ahonen, K.; Budesinsky, M.: Tautomerism and the Protonation/Deprotonation of Isocytosine in Liquid- and Solid-States Studied by NMR Spectroscopy and Theoretical Calculations. *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, 1544-1551.
17. Dracinsky, M.; **Jansa, P.**; Chocholousova, J.; Vacek, J.; Kovackova, S.; Holy, A.: Mechanism of the Isotopic Exchange Reaction of the 5-H Hydrogen of Uracil Derivatives in Water and Nonprotic Solvents. *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, 777-785.
18. **Jansa, P.**; Holy, A.; Dracinsky, M.; Baszczynski, O.; Cesnek, M.; Janeba, Z.: Efficient and 'green' microwave-assisted synthesis of haloalkylphosphonates via the Michaelis-Arbuzov reaction. *Green Chemistry* **2011**, *13*, 882-888.
19. Jiraskova-Vanickova, J.; Ettrich, R.; Vorlova, B.; Hoffman, H. E.; Lepsik, M.; **Jansa, P.**; Konvalinka, J.: Inhibition of Human Serine Racemase, an Emerging Target for Medicinal Chemistry. *Current Drug Targets* **2011**, *12*, 1037-1055.
20. **Jansa, P.**; Baszczynski, O.; Dracinsky, M.; Votruba, I.; Zidek, Z.; Bahador, G.; Stepan, G.; Cihlar, T.; Mackman, R.; Holý, A.; Janeba, Z.: A novel and efficient one-pot synthesis of symmetrical diamide (bis-amidate) prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates and evaluation of their biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *v tisku* (dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.05.040).
21. **Jansa, P.**; Spacek, P.; Votruba, I.; Brehova, P.; Dracinsky, M.; Klepetarova, B.; Janeba, Z.: Efficient one-pot synthesis of polysubstituted 6-[(1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl]uracils through the "click" protocol. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2011**, *přijato*.
22. **Jansa, P.**; Kolman, V.; Dracinsky, M.; Kostinova, A.; Kaiserova-Mertlikova, H.; Janeba, Z.: Efficient synthesis and biological properties of the 2'-trifluoromethyl analogs of acyclic nucleosides and acyclic nucleoside phosphonates. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2011**, *přijato*.
23. Dracinsky, M.; **Jansa, P.**; Elber, T.: Isotope exchange reaction of the hydrogen H-5 of selected pyrimidine derivatives and the preparation of tritium-labeled pyrimidines. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2011**, *přijato*.

7. Seznam patentových přihlášek autora

PV 2010-583 (29.7.2010)

PV 2011-26 (18.1.2011)

PV 2011-103 (28.2.2011)

PV 2011-325 (1.6.2011)

8. Seznam zvaných přednášek autora

ACYCLIC NUCLEOSIDE PHOSPHONATES: NEW TYPE OF ANTIVIRAL DRUGS

BIT Life Sciences' 2nd Annual World Summit of Antivirals 2009 (Peking, Čína)

LATEST ACHIEVEMENTS IN THE FIELD OF ANTIVIRAL DRUG DEVELOPMENT -
ACYCLIC NUCLEOSIDE PHOSPHONATES

Prague Hepatology Meeting 2010 (Praha, Česká republika)

ACYCLIC NUCLEOSIDE PHOSPHONATES: CURRENT STATE OF THE ART

Antonín Holý Symposium: Chemistry Meets Biology 2011 (Praha, Česká republika)

9. Seznam získaných ocenění udělených vědeckou obcí

Cena za nejlepší poster v kategorii farmaceutická chemie - Joint Meeting Marburg - 2006.

Cena za nejlepší poster v kategorii organická chemie - 60. Jubilejní sjezd asociací českých a slovenských chemických společností - 2008.

Stipendium farmaceutické firmy Gilead Sciences - 2008.

Cena za nejlepší přednášku v kategorii organická chemie - Sigma-Aldrich CZ – 10. konference mladých vědců - 2010.

Druhé místo v soutěži Sanofi-Aventis cena za farmacii 2011.

10. Literatura

- [1] E. De Clercq, A. Holy, *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4*, 928-940.
- [2] J. T. Hwang, J. R. Choi, *Drugs of the Future* **2004**, *29*, 163-177.
- [3] E. De Clercq, *Clinical Microbiology Reviews* **2003**, *16*, 569-596.
- [4] J. Balzarini, C. Pannecouque, E. De Clercq, S. Aquaro, C. F. Perno, H. Egberink, A. Holy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2002**, *46*, 2185-2193; E. De Clercq, *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, *1*, 13-25.
- [5] Y. Mehellou, J. Balzarini, C. McGuigan, *Chemmedchem* **2009**, *4*, 1779-1791.
- [6] D. Cahard, C. McGuigan, J. Balzarini, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2004**, *4*, 371-381; L. W. Peterson, C. E. McKenna, *Expert Opinion on Drug Delivery* **2009**, *6*, 405-420; H. Kalasz, A. Adem, M. Y. Hasan, E. Adegbate, N. Ram, Z. Gulyas, K. Tekes, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2010**, *10*, 822-845.
- [7] A. Holy, *Tetrahedron Letters* **1967**, 881-884; L. Yengoyan, D. H. Rammner, *Biochemistry* **1966**, *5*, 3629-3638; G. H. Jones, J. G. Moffatt, *Journal of the American Chemical Society* **1968**, *90*, 5337-5338.
- [8] A. Holy, I. Rosenberg, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1982**, *47*, 3447-3463; M. Krecmerova, H. Hrebabecky, A. Holy, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1990**, *55*, 2521-2536.
- [9] G. B. Elion, P. A. Furman, J. A. Fyfe, P. Demiranda, L. Beauchamp, H. J. Schaeffer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1977**, *74*, 5716-5720.
- [10] H. J. Schaeffer, S. Gurwar, R. Vince, S. Bittner, *Journal of Medicinal Chemistry* **1971**, *14*, 367-369.
- [11] E. De Clercq, J. Descamps, P. Desomer, A. Holy, *Science* **1978**, *200*, 563-565.
- [12] E. J. Prisbe, J. C. Martin, D. P. C. McGee, M. F. Barker, D. F. Smee, A. E. Duke, T. R. Matthews, J. P. H. Verheyden, *Journal of Medicinal Chemistry* **1986**, *29*, 671-675.
- [13] E. De Clercq, A. Holy, I. Rosenberg, T. Sakuma, J. Balzarini, P. C. Maudgal, *Nature* **1986**, *323*, 464-467.
- [14] J. Balzarini, H. Zhang, P. Herdewijn, D. G. Johns, E. De Clercq, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88*, 1499-1503; B. L. Robbins, J. Greenhaw, M. C. Connelly, A. Fridland, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1995**, *39*, 2304-2308.
- [15] B. L. Robbins, R. V. Srinivas, C. Kim, N. Bischofberger, A. Fridland, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, *42*, 612-617; P. Aduma, M. C. Connelly, R. V. Srinivas, A. Fridland, *Molecular Pharmacology* **1995**, *47*, 816-822.
- [16] W. E. Delaney, A. S. Ray, H. L. Yang, X. P. Qi, S. Xiong, Y. A. Zhu, M. D. Miller, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2006**, *50*, 2471-2477; A. S. Ray, J. E. Vela, L. Olson, A. Fridland, *Biochemical Pharmacology* **2004**, *68*, 1825-1831.
- [17] C. U. Kim, B. Y. Luh, P. F. Misco, J. J. Bronson, M. J. M. Hitchcock, I. Ghazzouli, J. C. Martin, *Journal of Medicinal Chemistry* **1990**, *33*, 1207-1213.
- [18] A. Holy, *Current Pharmaceutical Design* **2003**, *9*, 2567-2592.
- [19] A. Holy, I. Rosenberg, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1987**, *52*, 2801-2809.

- [20] A. Holy, I. Rosenberg, H. Dvorakova, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1989**, *54*, 2190-2210.
- [21] A. Holy, J. Gunter, H. Dvorakova, M. Masojdkova, G. Andrei, R. Snoeck, J. Balzarini, E. De Clercq, *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 2064-2086.
- [22] A. Holy, M. Masojdkova, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1995**, *60*, 1196-1212.
- [23] J. Balzarini, A. Holy, J. Jindrich, L. Naesens, R. Snoeck, D. Schols, E. De Clercq, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1993**, *37*, 332-338.
- [24] J. Balzarini, S. Aquaro, C. F. Perno, M. Witvrouw, A. Holy, E. De Clercq, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, *219*, 337-341.
- [25] A. Holy, I. Rosenberg, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1987**, *52*, 2775-2791.
- [26] J. Balzarini, A. Holy, J. Jindrich, H. Dvorakova, Z. Hao, R. Snoeck, P. Herdewijn, D. G. Johns, E. De Clercq, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88*, 4961-4965.
- [27] J. Jindrich, A. Holy, H. Dvorakova, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1993**, *58*, 1645-1667.
- [28] Y. Shen, N. Zhukovskaya, M. Zimmer, S. Soelaiman, P. Bergson, C. Wang, C. Gibbs, W. Tang, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 3242-3247.
- [29] M. Goettle, S. Dove, P. Steindel, Y. Shen, W. J. Tang, J. Geduhn, B. Koenig, R. Seifert, *Molecular Pharmacology* **2007**, *72*, 526-535.
- [30] Z. Zidek, E. Kmonickova, A. Holy, *European Journal of Pharmacology* **2004**, *501*, 79-86.
- [31] R. Calio, N. Villani, E. Balestra, F. Sesa, A. Holy, J. Balzarini, E. De Clercq, C. F. Perno, V. Delgobbo, *Antiviral Research* **1994**, *23*, 77-89; V. Delgobbo, A. Foli, J. Balzarini, E. De Clercq, E. Balestra, N. Villani, S. Marini, C. F. Perno, R. Calio, *Antiviral Research* **1991**, *16*, 65-75; Z. Zidek, *European Cytokine Network* **1999**, *10*, 319-328; P. Potmesil, A. Holy, E. Kmonickova, J. Krizkova, Z. Zidek, *Journal of Biomedical Science* **2007**, *14*, 59-66; E. Kmonickova, P. Potmesil, A. Holy, Z. Zidek, *European Journal of Pharmacology* **2006**, *530*, 179-187.
- [32] B. Otova, Z. Zidek, A. Holy, I. Votruba, D. Frankova, *Folia Biologica* **1994**, *40*, 185-192.
- [33] Z. Zidek, E. Kmonickova, A. Holy, *European Journal of Pharmacology* **2007**, *574*, 77-84.
- [34] N. Villani, R. Calio, E. Balestra, J. Balzarini, E. De Clercq, E. Fabrizi, C. F. Perno, V. Delgobbo, *Antiviral Research* **1994**, *25*, 81-89.
- [35] Z. Zidek, A. Holy, D. Frankova, B. Otova, *European Journal of Pharmacology* **1995**, *286*, 307-310; Z. Zidek, D. Frankova, A. Holy, *European Journal of Pharmacology* **1999**, *376*, 91-100.
- [36] K. Vavrova, K. Lorencova, J. Klimentova, J. Novotny, A. Holy, A. Hrabalek, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, *69*, 597-604; K. Vavrova, K. Lorencova, J. Novotny, A. Holy, A. Hrabalek, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, *70*, 901-907.
- [37] T. Cihlar, A. S. Ray, *Antiviral Research* **2010**, *85*, 39-58.
- [38] S. R. Houghton, J. Melton, J. Fortunak, D. H. B. Ripin, C. N. Boddy, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 8137-8144; D. H. B. Ripin, D. S. Teager, J. Fortunak, S. M. Basha, N. Bivins, C. N. Boddy, S. Byrn, K. K. Catlin, S. R. Houghton, S. T. Jagadeesh, K. A. Kumar, J. Melton, S. Muneer, L. N. Rao, R. V. Rao, P. C. Ray, N. G. Reddy, R. M. Reddy, K. C. Shekar, T. Silverton, D. T. Smith, R. W. Stringham, G. V. Subbaraju, F. Talley, A. Williams, *Organic Process Research & Development* **2010**, *14*, 1194-1201.

- [39] A. Pozniak, *International Journal of Clinical Practice* **2008**, *62*, 1285-1293.
- [40] M. Fabbiani, L. Bracciale, M. Doino, L. Sidella, S. Farina, V. Di Cristo, R. Cauda, A. De Luca, S. Di Giambenedetto, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2011**, *66*, 682-683.
- [41] K. Underhill, *New England Journal of Medicine* **2011**, *364*, 1374-1374; R. M. Grant, J. R. Lama, P. L. Anderson, V. McMahan, A. Y. Liu, L. Vargas, P. Goicochea, M. Casapia, J. V. Guanira-Carranza, M. E. Ramirez-Cardich, O. Montoya-Herrera, T. Fernandez, V. G. Veloso, S. P. Buchbinder, S. Chariyalertsak, M. Schechter, L. G. Bekker, K. H. Mayer, E. G. Kallas, K. R. Amico, K. Mulligan, L. R. Bushman, R. J. Hance, C. Ganoza, P. Defechereux, B. Postle, F. R. Wang, J. J. McConnell, J. H. Zheng, J. Lee, J. F. Rooney, H. S. Jaffe, A. I. Martinez, D. N. Burns, D. V. Glidden, T. iPrEx Study, *New England Journal of Medicine* **2010**, *363*, 2587-2599.
- [42] U. M. Parikh, C. Dobard, S. Sharma, M. E. Cong, H. W. Jia, A. Martin, C. P. Pau, D. L. Hanson, P. Guenther, J. Smith, E. Kersh, J. G. Garcia-Lerma, F. J. Novembre, R. Otten, T. Folks, W. Heneine, *Journal of Virology* **2009**, *83*, 10358-10365; C. C. Tsai, K. E. Follis, A. Sabo, T. W. Beck, R. F. Grant, N. Bischofberger, R. E. Benveniste, R. Black, *Science* **1995**, *270*, 1197-1199.
- [43] E. Arrive, M. L. Chaix, E. Nerrienet, S. Blanche, C. Rouzioux, D. Avit, L. S. Kruy, J. McIntyre, L. Say, G. Gray, D. K. Ekouevi, F. Dabis, T. E. A. S. Grp, *Aids* **2010**, *24*, 2478-2485.
- [44] K. Sinn, R. Richardson, A. Carr, *Aids* **2010**, *24*, 2403-2405.
- [45] Q. A. Karim, S. S. A. Karim, J. A. Frohlich, A. C. Grobler, C. Baxter, L. E. Mansoor, A. B. M. Kharsany, S. Sibeko, K. P. Mlisana, Z. Omar, T. N. Gengiah, S. Maarschalk, N. Arulappan, M. Mlotshwa, L. Morris, D. Taylor, C. T. Grp, *Science* **2010**, *329*, 1168-1174.
- [46] L. Menendez-Arias, *Reviews in Medical Virology* **2011**, *21*, 3-17; I. R. Singh, J. E. Gorzynski, D. Drobysheva, L. Bassit, R. F. Schinazi, *Plos One* **2010**, *5*; R. A. Smith, G. S. Gottlieb, A. D. Miller, *Retrovirology* **2010**, *7*.
- [47] B. Helliot, B. Panis, E. Frison, E. De Clercq, R. Swennen, P. Lepoivre, J. Neyts, *Antiviral Research* **2003**, *59*, 121-126.
- [48] J. Spak, A. Holy, D. Pavingerova, I. Votruba, V. Spakova, K. Petrzik, *Antiviral Research* **2010**, *88*, 296-303.
- [49] A. Fernandez-Botello, B. P. Operschall, A. Holy, V. Moreno, H. Sigel, *Dalton Transactions* **2010**, *39*, 6344-6354; A. Fernandez-Botello, A. Holy, V. Moreno, H. Sigel, *Polyhedron* **2003**, *22*, 1067-1076; A. Fernandez-Botello, A. Holy, V. Moreno, H. Sigel, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2004**, *98*, 2114-2124; A. Fernandez-Botello, R. Griesser, A. Holy, V. Moreno, H. Sigel, *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 5104-5117; A. Fernandez-Botello, A. Escuer, X. Solans, M. Font-Bardia, A. Holy, H. Sigel, V. Moreno, *European Journal of Inorganic Chemistry* **2007**, 1867-1873; A. Fernandez-Botello, A. Holy, V. Moreno, B. P. Operschall, H. Sigel, *Inorganica Chimica Acta* **2009**, *362*, 799-810.
- [50] A. Vigano, G. V. Zuccotti, M. Puzzovio, V. Pivetti, I. Zamproni, C. Cerini, V. Fabiano, V. Giacomet, S. Mora, *Antiviral Therapy* **2010**, *15*, 1053-1058.
- [51] C. C. Wong, N. P. Botting, C. Orfila, N. Al-Maharik, G. Williamson, *Biochemical Pharmacology* **2011**, *81*, 942-949.
- [52] Z. Zidek, D. Frankova, A. Holy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2001**, *45*, 3381-3386; Z. Zidek, A. Holy, D. Frankova, *European Journal of Pharmacology* **1997**, *331*, 245-252; K. K. A. Van Rompay, M. L. Marthas, N. Bischofberger, *Antiviral Research* **2004**, *63*, 133-138.
- [53] E. De Clercq, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1998**, *63*, 480-506.
- [54] J. Balzarini, L. Naesens, E. De Clercq, *Current Opinion in Microbiology* **1998**, *1*, 535-546.

- [55] D. L. Barnard, N. Bischofberger, C. U. Kim, J. H. Huffman, R. W. Sidwell, J. R. Dougherty, W. Lew, M. A. Williams, W. Yang, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **1997**, *8*, 223-233; H. Dvorakova, M. Masojdkova, A. Holy, J. Balzarini, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39*, 3263-3268; T. Yokota, K. Konno, S. Shigeta, A. Holy, J. Balzarini, E. De Clercq, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **1994**, *5*, 57-63.
- [56] F. Franek, A. Holy, I. Votruba, T. Eckschlager, *International Journal of Oncology* **1999**, *14*, 745-752.
- [57] H. Mertlikova-Kaiserova, I. Votruba, M. Matousova, A. Holy, M. Hajek, *Anticancer Research* **2010**, *30*, 2791-2798.
- [58] M. Hajek, N. Matulova, I. Votruba, A. Holy, E. Tloust'ova, *Biochemical Pharmacology* **2005**, *70*, 894-900.
- [59] M. Hajek, V. Cvilink, I. Votruba, A. Holy, H. Mertlikova-Kaiserova, *European Journal of Pharmacology* **2010**, *643*, 6-12.
- [60] K. C. Cundy, *Clinical Pharmacokinetics* **1999**, *36*, 127-143; K. C. Cundy, A. M. Bidgood, G. Lynch, J. P. Shaw, L. Griffin, W. A. Lee, *Drug Metabolism and Disposition* **1996**, *24*, 745-752; K. C. Cundy, Z. H. Li, M. J. M. Hitchcock, W. A. Lee, *Drug Metabolism and Disposition* **1996**, *24*, 738-744; K. C. Cundy, J. P. Shaw, W. A. Lee, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1994**, *38*, 365-368.
- [61] J. P. Shaw, C. M. Sueoka, R. Oliyai, W. A. Lee, M. N. Arimilli, C. U. Kim, K. C. Cundy, *Pharmaceutical Research* **1997**, *14*, 1824-1829; M. N. Arimilli, C. U. Kim, J. Dougherty, A. Mulato, R. Oliyai, J. P. Shaw, K. C. Cundy, N. Bischofberger, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **1997**, *8*, 557-564; J. E. Starrett, D. R. Tortolani, M. J. M. Hitchcock, J. C. Martin, M. M. Mansuri, *Antiviral Research* **1992**, *19*, 267-273.
- [62] K. R. Reddy, M. C. Matelich, B. G. Ugarkar, J. E. Gomez-Galeno, J. Dare, K. Ollis, Z. Sun, W. Craigo, T. J. Colby, J. M. Fujitaki, S. H. Boyer, P. D. van Poelje, M. D. Erion, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 666-676.
- [63] M. D. Erion, D. A. Bullough, C. C. Lin, Z. Hong, *Current Opinion in Investigational Drugs* **2006**, *7*, 109-117.
- [64] L. A. Sorbera, N. Serradell, J. Bolos, *Drugs of the Future* **2007**, *32*, 137-143.
- [65] C. C. Lin, C. Xu, A. Teng, L. T. Yeh, J. Peterson, *Journal of Clinical Pharmacology* **2005**, *45*, 1250-1258.
- [66] M. D. Erion, P. D. van Poelje, D. A. MacKenna, T. J. Colby, A. C. Montag, J. M. Fujitaki, D. L. Linemeyer, D. A. Bullough, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2005**, *312*, 554-560.
- [67] J. R. Choi, D. G. Cho, K. Y. Roh, J. T. Hwang, S. Ahn, H. S. Jang, W. Y. Cho, K. W. Kim, Y. G. Cho, J. Kim, Y. Z. Kim, *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 2864-2869.
- [68] M. F. Yuen, S. H. Lee, H. M. Kang, C. R. Kim, J. Kim, V. Ngai, C. L. Lai, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, *53*, 1779-1785; M. F. Yuen, K. H. Han, S. H. Um, S. K. Yoon, H. R. Kim, J. Kim, C. R. Kim, C. L. Lai, *Hepatology* **2010**, *51*, 767-776.
- [69] J. Fung, C. L. Lai, M. F. Yuen, *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2008**, *17*, 1581-1588.
- [70] K. Sekiya, H. Takashima, N. Ueda, N. Kamiya, S. Yuasa, Y. Fujimura, M. Ubasawa, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 3138-3142.
- [71] T. Shaw, S. Locarnini, D. Colledge, S. Lewin, J. Colacino, S. Wise, *Hepatology* **2002**, *36*, 628A-628A; S. K. Ono-Nita, N. Kato, Y. Shiratori, F. J. Carrilho, M. Omata, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2002**, *46*, 2602-2605; N. Kato, S. K. Ono-Nita, Y. Shiratori, M. Omata, *Hepatology* **2002**, *36*, 629A-629A.

- [72] N. Kamiya, A. Kubota, Y. Iwase, K. Sekiya, M. Ubasawa, S. Yuasa, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2002**, *46*, 2872-2877.
- [73] S. J. Hecker, M. D. Erion, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 2328-2345.
- [74] S. Benzaria, H. Pelicano, R. Johnson, G. Maury, J. L. Imbach, A. M. Aubertin, G. Obert, G. Gosselin, *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39*, 4958-4965.
- [75] H. T. Serafinowska, R. J. Ashton, S. Bailey, M. R. Harnden, S. M. Jackson, D. Sutton, *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, *38*, 1372-1379.
- [76] J. P. Shaw, M. S. Louie, V. V. Krishnamurthy, M. N. Arimilli, R. J. Jones, A. M. Bidgood, W. A. Lee, K. C. Cundy, *Drug Metabolism and Disposition* **1997**, *25*, 362-366.
- [77] C. Meier, *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1996**, *35*, 70-72.
- [78] C. Meier, U. Gorbig, C. Muller, J. Balzarini, *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 8079-8086.
- [79] K. Y. Hostetler, *Antiviral Research* **2009**, *82*, A84-A98.
- [80] E. R. Lanier, R. G. Ptak, B. M. Lampert, L. Keilholz, T. Hartman, R. W. Buckheit, M. K. Mankowski, M. C. Osterling, M. R. Almond, G. R. Painter, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2010**, *54*, 2901-2909.
- [81] G. R. Painter, M. R. Almond, L. C. Trost, B. M. Lampert, J. Neyts, E. De Clercq, B. E. Korba, K. A. Aldern, J. R. Beadle, K. Y. Hostetler, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2007**, *51*, 3505-3509.
- [82] R. Lanier, L. Trost, T. Tippin, B. Lampert, A. Robertson, S. Foster, M. Rose, W. Painter, R. O'Mahony, M. Almond, G. Painter, *Viruses-Basel* **2010**, *2*, 2740-2762; G. R. Painter, L. C. Trost, B. M. Lampert, M. R. Almond, M. Buller, E. Kern, G. P. Painter, A. T. Robertson, N. Frazer, R. O'Mahony, *Drugs of the Future* **2008**, *33*, 655-661; S. Parker, E. Touchette, C. Oberle, M. Almond, A. Robertson, L. C. Trost, B. Lampert, G. Painter, R. M. Buller, *Antiviral Research* **2008**, *77*, 39-49; K. Toth, J. F. Spencer, D. Dhar, J. E. Sagartz, R. M. L. Buller, G. R. Painter, W. S. M. Wold, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 7293-7297.
- [83] S. L. Ciesla, J. Trahan, W. B. Wan, J. R. Beadle, K. A. Aldern, G. R. Painter, K. Y. Hostetler, *Antiviral Research* **2003**, *59*, 163-171.
- [84] M. Krecmerova, A. Holy, A. Piskala, M. Masojdkova, G. Andrei, L. Naesens, J. Neyts, J. Balzarini, E. De Clercq, R. Snoeck, *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 1069-1077.
- [85] M. Krecmerova, A. Holy, R. Pohl, M. Masojdkova, G. Andrei, L. Naesens, J. Neyts, J. Balzarini, E. De Clercq, R. Snoeck, *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 5765-5772.
- [86] I. Lebeau, G. Andrei, M. Krecmerova, E. De Clercq, A. Holy, R. Snoeck, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2007**, *51*, 2268-2273.
- [87] L. Naesens, G. Andrei, I. Votruba, M. Krecmerova, A. Holy, J. Neyts, E. De Clercq, R. Snoeck, *Biochemical Pharmacology* **2008**, *76*, 997-1005.
- [88] M. Dracinsky, M. Krecmerova, A. Holy, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 6778-6782.
- [89] N. Valiaeva, J. Trahan, K. A. Aldern, J. R. Beadle, K. Y. Hostetler, *Chemotherapy* **2010**, *56*, 54-59.
- [90] J. P. Hou, Y. L. Li, Z. L. Zhou, N. Valiaeva, J. R. Beadle, K. Hostetler, W. R. Freeman, D. N. Hu, H. Chen, L. Y. Cheng, *Molecular Vision* **2011**, *17*, 627-637.
- [91] C. Y. Tsai, A. S. Ray, D. B. Tumas, M. J. Keating, H. Reiser, W. Plunkett, *Clinical Cancer Research* **2009**, *15*, 3760-3769; D. M. Vail, D. H. Thamm, H. Reiser, A. S. Ray, G. H. I. Wolfgang, W. J. Watkins, D. Babusis, I. N. Henne, M. J. Hawkins, I. D. Kurzman, R. Jeraj, M. Vanderhoek, S. Plaza, C.

- Anderson, M. A. Wessel, C. Robat, J. Lawrence, D. B. Tumas, *Clinical Cancer Research* **2009**, *15*, 3503-3510; H. Reiser, J. Y. Wang, L. Chong, W. J. Watkins, A. S. Ray, R. Shibata, G. Birkus, T. Cihlar, S. Wu, B. Li, X. H. Liu, I. N. Henne, G. H. I. Wolfgang, M. Desai, G. R. Rhodes, A. Fridland, W. A. Lee, W. Plunkett, D. Vail, D. H. Thamm, R. Jeraj, D. B. Tumas, *Clinical Cancer Research* **2008**, *14*, 2824-2832.
- [92] G. H. I. Wolfgang, R. Shibata, J. Wang, A. S. Ray, S. Wu, E. Doerrfler, H. Reiser, W. A. Lee, G. Birkus, N. D. Christensen, G. Andrei, R. Snoeck, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, *53*, 2777-2784.
- [93] G. Birkus, N. Kutty, C. R. Frey, R. Shribata, T. F. Chou, C. Wagner, M. McDermott, T. Cihlar, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, *55*, 2166-2173.
- [94] G. Birkus, R. Wang, X. H. Liu, N. Kutty, H. MacArthur, T. Cihlar, C. Gibbs, S. Swaminathan, W. Lee, M. McDermott, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2007**, *51*, 543-550.
- [95] M. Schinkmanova, I. Votruba, R. Shibata, B. Han, X. H. Liu, T. Cihlar, A. Holy, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2008**, *73*, 275-291; M. Schinkmanova, I. Votruba, A. Holy, *Biochemical Pharmacology* **2006**, *71*, 1370-1376.
- [96] W. A. Lee, G. X. He, E. Eisenberg, T. Cihlar, S. Swaminathan, A. Mulato, K. C. Cundy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49*, 1898-1906.
- [97] G. Birkus, N. Kutty, G. X. He, A. Mulato, W. Lee, M. McDermott, T. Cihlar, *Molecular Pharmacology* **2008**, *74*, 92-100.
- [98] E. De Clercq, G. Andrei, J. Balzarini, P. Leyssen, L. Naesens, J. Neyts, C. Pannecouque, R. Snoeck, C. Ying, D. Hockova, A. Holy, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2005**, *24*, 331-341.
- [99] A. Holy, I. Votruba, M. Masojdkova, G. Andrei, R. Snoeck, L. Naesens, E. De Clercq, J. Balzarini, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 1918-1929.
- [100] B. D. Herman, I. Votruba, A. Holy, N. Sluis-Cremer, J. Balzarini, *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 12101-12108.
- [101] K. J. Stittelaar, J. Neyts, L. Naesens, G. van Amerongen, R. F. van Lavieren, A. Holy, E. De Clercq, H. G. M. Niesters, E. Fries, C. Maas, P. G. H. Mulder, B. A. M. van der Zeijst, A. Osterhaus, *Nature* **2006**, *439*, 745-748; F. Dal Pozzo, G. Andrei, A. Holy, J. Van Den Oord, A. Scagliarini, E. De Clercq, R. Snoeck, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49*, 4843-4852; L. Naesens, L. Lenaerts, G. Andrei, R. Snoeck, D. Van Beers, A. Holy, J. Balzarini, E. De Clercq, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49*, 1010-1016.
- [102] D. Hockova, A. Holy, M. Masojdkova, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 5064-5073.
- [103] C. Ying, A. Holy, D. Hockova, E. De Clercq, J. Neyts, *Antiviral Research* **2004**, *62*, 1177-1180.
- [104] D. Hockova, A. Holy, M. Masojdkova, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 3197-3202.
- [105] J. Balzarini, D. Schols, K. Van Laethem, E. De Clercq, D. Hockova, M. Masojdkova, A. Holy, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2007**, *59*, 80-86.
- [106] D. L. Taylor, S. P. Ahmed, T. M. Brennan, J. F. Nave, P. Casara, A. S. Tyms, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **1996**, *7*, 253-260; J. Balzarini, T. Vahlenkamp, H. Egberink, K. Hartmann, M. Witvrouw, C. Pannecouque, P. Casara, J. F. Nave, E. De Clercq, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1997**, *41*, 611-616; C. G. Bridges, D. L. Taylor, P. S. Ahmed, T. M. Brennan, J. M. Hornsperger, J. F. Nave, P. Casara, A. S. Tyms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1996**, *40*, 1072-1077.

- [107] D. T. Keough, D. Hockova, M. Krecmerova, M. Cesnek, A. Holy, L. Naesens, I. M. Brereton, D. J. Winzor, J. de Jersey, L. W. Guddat, *Molecular and Biochemical Parasitology* **2010**, *173*, 165-169.
- [108] D. Hockova, A. Holy, M. Masojdkova, D. T. Keough, J. de Jersey, L. W. Guddat, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 6218-6232.
- [109] D. T. Keough, D. Hockova, A. Holy, L. M. J. Naesens, T. S. Skinner-Adams, J. de Jersey, L. W. Guddat, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 4391-4399.
- [110] P. Potmesil, M. Krecmerova, E. Kmonickova, A. Holy, Z. Zidek, *European Journal of Pharmacology* **2006**, *540*, 191-199.
- [111] A. Esteban-Gamboa, J. Balzarini, R. Esnouf, E. De Clercq, M. J. Camarasa, M. J. Perez-Perez, *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 971-983.
- [112] D. Marak, M. Otmar, I. Votruba, M. Dracinsky, M. Krecmerova, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 652-654.
- [113] L. Glavas-Obrovac, M. Suver, S. Hikishima, M. Hashimoto, T. Yokomatsu, L. Magnowska, A. Bzowska, *Chemical Biology & Drug Design* **2010**, 392-399; T. Yokomatsu, H. Abe, M. Sato, K. Suemune, T. Kihara, S. Soeda, H. Shimeno, S. Shibuya, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1998**, *6*, 2495-2505; T. Yokomatsu, S. Shibuya, *Journal of Synthetic Organic Chemistry Japan* **2002**, *60*, 740-751; S. Hikishima, M. Isobe, S. Koyanagi, S. Soeda, H. Shimeno, S. Shibuya, T. Yokomatsu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14*, 1660-1670; M. Luic, G. Koellner, T. Yokomatsu, S. Shibuya, A. Bzowska, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **2004**, *60*, 1417-1424.
- [114] K. Breer, L. Glavas-Obrovac, M. Suver, S. Hikishima, M. Hashimoto, T. Yokomatsu, B. Wielgus-Kutrowska, L. Magnowska, A. Bzowska, *Febs Journal* **2010**, *277*, 1747-1760.
- [115] S. Hikishima, M. Hashimoto, L. Magnowska, A. Bzowska, T. Yokomatsu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 2275-2284.
- [116] V. D. Romanenko, V. P. Kukhar, *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 3868-3935.
- [117] S. B. Mhaske, B. Ksebati, M. N. Prichard, J. C. Drach, J. Zemlicka, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 3892-3899.
- [118] D. Topalis, U. Pradere, V. Roy, C. Caillat, A. Azzouzi, J. Broggi, R. Snoeck, G. Andrei, J. Lin, S. Eriksson, J. A. C. Alexandre, C. El-Amri, D. Deville-Bonne, P. Meyer, J. Balzarini, L. A. Agrofoglio, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 222-232.
- [119] C. U. Kim, B. Y. Luh, J. C. Martin, *Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 2642-2647.
- [120] C. U. Kim, J. J. Bronson, L. M. Ferrara, J. C. Martin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1992**, *2*, 367-370; R. L. Mackman, C. G. Booramra, V. Prasad, L. J. Zhang, K. Y. Lin, O. Petrakovsky, D. Babusis, J. Chen, J. Douglas, D. Grant, H. C. Hui, C. U. Kim, D. Y. Markevitch, J. Vela, A. Ray, T. Cihlar, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 6785-6789.
- [121] C. G. Booramra, R. L. Mackman, D. Y. Markevitch, V. Prasad, A. S. Ray, J. Douglas, D. Grant, C. U. Kim, T. Cihlar, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 1120-1123.
- [122] A. S. Ray, J. E. Vela, C. G. Booramra, L. Zhang, H. Hui, C. Callebaut, K. Stray, K. Y. Lin, Y. Gao, R. L. Mackman, T. Cihlar, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2008**, *52*, 648-654.
- [123] T. Cihlar, A. S. Ray, C. G. Booramra, L. Zhang, H. Hui, G. Laflamme, J. E. Vela, D. Grant, J. Chen, F. Myrick, K. L. White, Y. Gao, K. Y. Lin, J. L. Douglas, N. T. Parkin, A. Carey, R. Pakdaman, R. L. Mackman, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2008**, *52*, 655-665.

- [124] T. Cihlar, G. LaFlamme, R. Fisher, A. C. Carey, J. E. Vela, R. Mackman, A. S. Ray, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2009**, *53*, 150-156.
- [125] R. L. Mackman, A. S. Ray, H. C. Hui, L. J. Zhang, G. Birkus, C. G. Booramra, M. C. Desai, J. L. Douglas, Y. Gao, D. Grant, G. Laflamme, K. Y. Lin, D. Y. Markevitch, R. Mishra, M. McDermott, R. Pakdaman, O. V. Petrakovsky, J. E. Vela, T. Cihlar, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 3606-3617.
- [126] Q. Y. Huang, P. Herdewijn, *Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 3742-3753; M. C. M. Cesnek, P. Herdewijn, *Heterocycles* **2010**, *82*, 663-687; Q. Y. Huang, P. Herdewijn, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2009**, *28*, 337-351.
- [127] J. Bedard, S. May, M. Lis, L. Tryphonas, J. Drach, J. Huffman, R. Sidwell, L. Chan, T. Bowlin, R. Rando, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, *43*, 557-567.
- [128] L. Leblond, G. Attardo, B. Hamelin, D. Y. Bouffard, N. Nguyen-Ba, H. Gourdeau, *Molecular Cancer Therapeutics* **2002**, *1*, 737-746.
- [129] M. Bubenik, R. Rej, N. Nguyen-Ba, G. Attardo, F. Ouellet, L. Chan, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, *12*, 3063-3066.
- [130] M. D. Erion, P. D. van Poelje, Q. Dang, S. R. Kasibhatla, S. C. Potter, M. R. Reddy, K. R. Reddy, T. Jiang, W. N. Lipscomb, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 7970-7975; P. D. van Poelje, Q. Dang, M. D. Erion, *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **2007**, *10*, 430-437.
- [131] Q. Dang, S. R. Kasibhatla, K. R. Reddy, T. Jiang, M. R. Reddy, S. C. Potter, J. M. Fujitaki, P. D. van Poelje, J. Huang, W. N. Lipscomb, M. D. Erion, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 15491-15502.
- [132] T. Yoshida, A. Okuno, M. Izumi, K. Takahashi, Y. Hagsawa, J. Ohsumi, T. Fujiwara, *European Journal of Pharmacology* **2008**, *601*, 192-197.
- [133] Q. Dang, S. R. Kasibhatla, W. Xiao, Y. Liu, J. Dare, F. Taplin, K. R. Reddy, G. R. Scarlato, T. Gibson, P. D. van Poelje, S. C. Potter, M. D. Erion, *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 441-451.
- [134] T. Y. T. Yoshida, A. Okuno, K. Takahashi, J. Ogawa, Y. Hagsawa, S. Kanda, T. Fujiwara, *Journal of Pharmacological Sciences* **2011**, *115*, 329-335; Q. Dang, Y. Liu, D. K. Cashion, S. R. Kasibhatla, T. Jiang, F. Taplin, J. D. Jacintho, H. Q. Li, Z. L. Sun, Y. Fan, J. Dare, F. Tian, W. Y. Li, T. Gibson, R. Lemus, P. D. van Poelje, S. C. Potter, M. D. Erion, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 153-165; Q. Dang, S. R. Kasibhatla, T. Jiang, F. Taplin, T. Gibson, S. C. Potter, P. D. van Poelje, M. D. Erion, *Medchemcomm* **2011**, *2*, 287-290; Q. Dang, S. R. Kasibhatla, T. Jiang, K. Fan, Y. Liu, F. Taplin, W. Schulz, D. K. Cashion, K. R. Reddy, P. D. van Poelje, J. M. Fujitaki, S. C. Potter, M. D. Erion, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 4331-4339.
- [135] Y. H. Koh, J. H. Shim, J. Z. Wu, W. D. Zhong, Z. Hong, J. L. Girardet, *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 2867-2875.
- [136] L. J. Lin, R. S. Seo, S. W. Yoo, J. Choi, J. H. Hong, *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2010**, *31*, 915-920.
- [137] T. Yokomatsu, Y. Hayakawa, T. Kihara, S. Koyanagi, S. Soeda, H. Shimeno, S. Shibuya, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2000**, *8*, 2571-2579.
- [138] A. K. Bhattacharya, G. Thyagarajan, *Chemical Reviews* **1981**, *81*, 415-430.
- [139] L. Cauret, J. C. Brosse, D. Derouet, H. DeLivonniere, *Synthetic Communications* **1997**, *27*, 647-653.
- [140] E. Szyjewicz, N. Rosner, W. M. Kliewer, *American Journal of Enology and Viticulture* **1984**, *35*, 117-123; R. K. Sonkar, D. A. Sarnaik, S. N. Dikshit, P. L. Saroj, A. D. Huchche, *Journal of Food Science*

- and Technology-Mysore* **2008**, *45*, 199-208; T. D. Davis, E. A. Curry, *Critical Reviews in Plant Sciences* **1991**, *10*, 151-188.
- [141] F. Gallier, S. Peyrottes, C. Perigaud, *European Journal of Organic Chemistry* **2007**, 925-933; S. Peyrottes, F. Gallier, A. Papillaud, J. Bejaud, C. Perigaud, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1513-1515; S. Peyrottes, F. Gallier, J. Bejaud, C. Perigaud, *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 7719-7721; B. Kaboudin, M. S. Balakrishna, *Synthetic Communications* **2001**, *31*, 2773-2776; J. J. Kiddle, A. F. Gurley, *Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements* **2000**, *160*, 195-205.
- [142] D. Villemain, F. Simeon, H. Decreus, P. A. Jaffres, *Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements* **1998**, *133*, 209-213.
- [143] A. P. Kozikowski, K. L. Sorgi, *Tetrahedron Letters* **1984**, *25*, 2085-2088; G. S. Prasad, M. Manjunath, K. Reddy, O. V. S. Reddy, C. S. Reddy, *Arkivoc* **2006**, 128-135.
- [144] A. Holy, I. Rosenberg, H. Dvorakova, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1990**, *55*, 809-818.
- [145] B. J. Magerlein, F. Kagan, *Journal of the American Chemical Society* **1960**, *82*, 593-596.
- [146] C. O. Kappe, *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43*, 6250-6284.
- [147] L. Perreux, A. Loupy, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9199-9223.
- [148] D. Obermayer, B. Gutmann, C. O. Kappe, *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48*, 8321-8324; M. A. Herrero, J. M. Kreamer, C. O. Kappe, *Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 36-47; T. Razzaq, J. M. Kreamer, C. O. Kappe, *Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73*, 6321-6329.
- [149] I. Kosiova, Z. Tocik, M. Budesinsky, O. Simak, R. Liboska, D. Rejman, O. Paces, I. Rosenberg, *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, 6745-6747.
- [150] A. Holy, *Synthesis-Stuttgart* **1998**, 381-385.
- [151] C. E. McKenna, J. Schmidhauser, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1979**, 739-739.
- [152] O. Baszczyński, P. Jansa, M. Dracinsky, B. Klepetarova, A. Holy, I. Votruba, E. De Clercq, J. Balzarini, Z. Janeba, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 2114-2124.
- [153] P. Jansa, M. Dracinsky, A. Holy, in *Chemistry of Nucleic Acid Components, Vol. 10* (Ed.: M. Hocek), **2008**, pp. 360-361.
- [154] D. Hockova, M. Masojdkova, A. Holy, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2005**, *70*, 247-258; M. Krecmerova, M. Masojdkova, A. Holy, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 387-395.
- [155] P. Dolakova, M. Dracinsky, M. Masojdkova, V. Solinova, V. Kasicka, A. Holy, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44*, 2408-2424.
- [156] C. Giordano, G. Castaldi, *Journal of Organic Chemistry* **1989**, *54*, 1470-1473; P. Kafarski, B. Lejczak, J. Szewczyk, *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1983**, *61*, 2425-2430; D. P. Phillion, S. S. Andrew, *Tetrahedron Letters* **1986**, *27*, 1477-1480; H. Stamm, G. Gerster, *Tetrahedron Letters* **1980**, *21*, 1623-1626.
- [157] J. W. De Schutter, S. Zaretsky, S. Welbourn, A. Pause, Y. S. Tsantrizos, *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 5781-5786; Z. C. Duan, X. P. Hu, C. Zhang, Z. Zheng, *Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 8319-8321; C. E. McKenna, B. A. Kashemirov, K. M. Błazewska, I. Mallard-Favier, C. A. Stewart, J. Rojas, M. W. Lundy, F. H. Ebetino, R. A. Baron, J. E. Dunford, M. L. Kirsten, M. C. Seabra, J. L. Bala, M. S. Marma, M. J. Rogers, F. P. Coxon, *J Med Chem* **2010**, *53*, 3454-3464; T. Mendgen, T. Scholz, C. D. Klein, *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 5757-5762; R. Norlin, G. Lindberg, *Journal of Labelled*

- Compounds & Radiopharmaceuticals* **2003**, *46*, 599-604; M. J. Pulwer, T. M. Balthazor, *Synthetic Communications* **1986**, *16*, 733-739; C. Selvam, N. Oueslati, I. A. Lemasson, I. Brabet, D. Rigault, T. Courtiol, S. Cesarini, N. Triballeau, H. O. Bertrand, C. Goudet, J. P. Pin, F. C. Acher, *J Med Chem* **2010**, *53*, 2797-2813; V. N. Zemlianoy, A. Chernega, A. V. Gutov, A. O. Kolodiazhna, O. I. Kolodiazhnyi, *Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements* **2011**, *186*, 481-488.
- [158] V. E. Belskii, *Uspekhi Khimii* **1977**, *46*, 1578-1603.
- [159] J. R. Cox, M. G. Newton, *Journal of Organic Chemistry* **1969**, *34*, 2600-&; J. R. Cox, M. G. Newton, *Journal of Organic Chemistry* **1969**, *34*, 2600-2605.
- [160] C. O. Kappe, *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 1127-1139.
- [161] A. G. Ogston, *Journal of the Chemical Society* **1935**, 1376-1379.
- [162] V. Solinova, V. Kasicka, P. Sazelova, A. Holy, *Electrophoresis* **2009**, *30*, 2245-2254.
- [163] C. H. Gunderson, C. R. Lehmann, F. R. Sidell, B. Jabbari, *Neurology* **1992**, *42*, 946-950; N. B. Munro, S. S. Talmage, G. D. Griffin, L. C. Waters, A. P. Watson, J. F. King, V. Hauschild, *Environmental Health Perspectives* **1999**, *107*, 933-974.
- [164] B. T. Gabelt, E. A. Hennes, J. L. Seeman, B. Tian, P. L. Kaufman, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2004**, *45*, 2732-2736.
- [165] A. G. P. Ross, P. B. Bartley, A. C. Sleight, G. R. Olds, Y. S. Li, G. M. Williams, D. P. McManus, *New England Journal of Medicine* **2002**, *346*, 1212-1220.
- [166] W. Kilgore, C. Fischer, J. Rivers, N. Akesson, J. Wicks, W. Winters, W. Winterlin, *Residue Reviews* **1984**, *91*, 71-101.
- [167] H. Aardema, J. Meertens, J. J. M. Ligtenberg, O. M. Peters-Polman, J. E. Tulleken, J. G. Zijlstra, *Netherlands Journal of Medicine* **2008**, *66*, 149-153; J. Bajgar, *Advances in Clinical Chemistry*, Vol. **38** **2004**, *38*, 151-216; P. G. Bardin, S. F. Vaneeden, J. A. Moolman, A. P. Foden, J. R. Joubert, *Archives of Internal Medicine* **1994**, *154*, 1433-1441; N. A. Buckley, M. Eddleston, Y. Li, M. Bevan, J. Robertson, *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2011**; J. L. Deblecker, J. L. Dereuck, J. L. Willems, *Clinical Neurology and Neurosurgery* **1992**, *94*, 93-103; T. Caceres, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, N. Sethunathan, R. Naidu, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol **205** **2010**, *205*, 117-162; M. Eddleston, N. A. Buckley, P. Eyer, A. H. Dawson, *Lancet* **2008**, *371*, 597-607; R. Kamanyire, L. Karalliedde, *Occupational Medicine-Oxford* **2004**, *54*, 69-75; Y. Li, M. L. Tse, I. Gawarammana, N. Buckley, M. Eddleston, *Clinical Toxicology* **2009**, *47*, 179-192; T. C. Marrs, *Pharmacology & Therapeutics* **1993**, *58*, 51-66; B. P. Paudyal, *Journal of Nepal Medical Association* **2008**, *47*, 251-258.
- [168] Y. C. Yang, J. A. Baker, J. R. Ward, *Chemical Reviews* **1992**, *92*, 1729-1743.
- [169] P. C. Tsai, A. Bigley, Y. C. Li, E. Ghanem, C. L. Cadieux, S. A. Kasten, T. E. Reeves, D. M. Cerasoli, F. M. Raushel, *Biochemistry* **2010**, *49*, 7978-7987; G. Amitai, L. Gaidukov, R. Adani, S. Yishay, G. Yacov, M. Kushnir, S. Teitlboim, M. Lindenbaum, P. Bel, O. Khersonsky, D. S. Tawfik, H. Meshulam, *Febs Journal* **2006**, *273*, 1906-1919; I. Gill, A. Ballesteros, *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, *70*, 400-410; K. E. LeJeune, J. R. Wild, A. J. Russell, *Nature* **1998**, *395*, 27-28; D. A. Schofield, A. A. DiNovo, *Journal of Applied Microbiology* **2010**, *109*, 548-557; A. Tamilselvi, G. Mugesh, *Chemistry-a European Journal* **2010**, *16*, 8878-8886.
- [170] D. B. Kim, B. Gweon, S. Y. Moon, W. Choe, *Current Applied Physics* **2009**, *9*, 1093-1096.
- [171] S. H. Kim, J. H. Kim, B. K. Kang, *Langmuir* **2007**, *23*, 8074-8078.
- [172] L. J. Bailin, M. E. Sibert, L. A. Jonas, A. T. Bell, *Environmental Science & Technology* **1975**, *9*, 254-258.

- [173] E. Chanika, D. Georgiadou, E. Soueref, P. Karas, E. Karanasios, N. G. Tsiropoulos, E. A. Tzortzakakis, D. G. Karpouzas, *Bioresource Technology* **2011**, *102*, 3184-3192; J. Y. Ning, Z. H. Bai, G. Gang, D. Jiang, Q. Hu, J. Z. He, H. X. Zhang, G. Q. Zhuang, *Fems Microbiology Letters* **2010**, *306*, 135-143.
- [174] Y. C. Chen, A. V. Vorontsov, P. G. Smirniotis, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2003**, *2*, 694-698.
- [175] B. Sun, A. V. Vorontsov, P. G. Smirniotis, *Journal of Hazardous Materials* **2011**, *186*, 1147-1153.
- [176] E. Gershonov, I. Columbus, Y. Zafrani, *Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 329-338; T. H. Mahato, G. K. Prasad, B. Singh, J. Acharya, A. R. Srivastava, R. Vijayaraghavan, *Journal of Hazardous Materials* **2009**, *165*, 928-932; D. M. Mizrahi, S. Saphier, I. Columbus, *Journal of Hazardous Materials* **2010**, *179*, 495-499; J. S. Ratliff, S. A. Tenney, X. F. Hu, S. F. Conner, S. G. Ma, D. A. Chen, *Langmuir* **2009**, *25*, 216-225; A. Saxena, A. K. Srivastava, B. Singh, A. K. Gupta, M. V. S. Suryanarayana, P. Pandey, *Journal of Hazardous Materials* **2010**, *175*, 795-801.
- [177] Q. G. M. Q. G. Meng, D. C. Doetschman, A. K. Rizos, M. H. Lee, J. T. Schulte, A. Spyros, C. W. Kanyi, *Environmental Science & Technology* **2011**, *45*, 3000-3005.
- [178] I. Campos, L. Gil, R. Martinez-Manez, J. Soto, J. L. Vivancos, *Electroanalysis* **2010**, *22*, 1643-1649; I. Candel, A. Bernardos, E. Climent, M. D. Marcos, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, J. Soto, A. Costero, S. Gil, M. Parra, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 8313-8315; A. M. Costero, M. Parra, S. Gil, R. Gotor, P. M. E. Mancini, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, S. Royo, *Chemistry-an Asian Journal* **2010**, *5*, 1573-1585; P. M. Diakowski, Y. Z. Xiao, M. W. P. Petryk, H. B. Kraatz, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 3191-3197; P. Garg, D. Pardasani, A. Mazumder, A. Purohit, D. K. Dubey, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *399*, 955-963; D. Matatagui, J. Marti, M. J. Fernandez, J. L. Fontecha, J. Gutierrez, I. Gracia, C. Cane, M. C. Horrillo, *Sensors and Actuators B-Chemical* **2011**, *154*, 199-205; M. M. Y. Motamedhashemi, F. Egolfopoulos, T. Tsotsis, *Journal of Membrane Science* **2011**, *376*, 119-131; B. Rowland, D. Jolley, B. Bennett, B. Johnson, G. Moffett, L. Adair, M. Hanning-Lee, G. Bottelberghe, T. Mamo, J. Kaufman, *Polymer Testing* **2010**, *29*, 777-783; S. Royo, R. Martinez-Manez, F. Sancenon, A. M. Costero, M. Parra, S. Gil, *Chemical Communications* **2007**, 4839-4847; K. J. Wallace, J. Morey, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, *New Journal of Chemistry* **2005**, *29*, 1469-1474; A. J. Weerasinghe, C. Schrniesing, E. Sinn, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 2833-2838.
- [179] T. Mukaiyam, M. Hashimot, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1971**, *44*, 196-199.
- [180] M. Hashimoto, M. Ueki, T. Mukaiyama, *Chemistry Letters* **1976**, 157-160.
- [181] A. Holy, I. Votruba, E. Tloustova, M. Masojidkova, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **2001**, *66*, 1545-1592.
- [182] F. Marchetti, C. Cano, N. J. Curtin, B. T. Golding, R. J. Griffin, K. Haggerty, D. R. Newell, R. J. Parsons, S. L. Payne, L. Z. Wang, I. R. Hardcastle, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 2397-2407.
- [183] L. Cechova, P. Jansa, M. Sala, M. Dracinsky, A. Holy, Z. Janeba, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 866-871.
- [184] J. Symersky, A. Holy, *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications* **1991**, *47*, 2104-2107; C. H. Schwalbe, W. Thomson, S. Freeman, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1991**, 1348-1349.
- [185] J. R. Beadle, W. B. Wan, S. L. Ciesla, K. A. Keith, C. Hartline, E. R. Kern, K. Y. Hostetler, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 2010-2015.
- [186] E. J. Behrman, *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2*; E. J. Behrman, *Journal of Chemical Research-S* **2003**, 702-703; D. T. Hurst, *Australian Journal of Chemistry* **1983**, *36*, 1285-1289.
- [187] W. J. Chen, T. H. Liao, *Protein Journal* **2008**, *27*, 240-246; H. Z. Lecher, E. M. Hardy, *Journal of Organic Chemistry* **1955**, *20*, 475-487.

- [188] T. K. Chen, W. T. Flowers, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1990**, 27, 831-833.
- [189] A. N. Choudhary, A. Kumar, V. Juyal, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2010**, 10, 705-714; C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, *Current Medicinal Chemistry* **2010**, 17, 3162-3214; S. Prasanna, R. J. Doerksen, *Current Medicinal Chemistry* **2009**, 16, 21-41; R. P. Verma, C. Hansch, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2008**, 97, 88-110.
- [190] S. Tuske, S. G. Sarafianos, A. D. Clark, J. P. Ding, L. K. Naeger, K. L. White, M. D. Miller, C. S. Gibbs, P. L. Boyer, P. Clark, G. Wang, B. L. Gaffney, R. A. Jones, D. M. Jerina, S. H. Hughes, E. Arnold, *Nature Structural & Molecular Biology* **2004**, 11, 469-474.
- [191] P. Jansa, A. Holy, M. Dracinsky, O. Baszczynski, M. Cesnek, Z. Janeba, *Green Chemistry* **2011**, 13, 882-888.
- [192] M. Dracinsky, A. Holy, P. Jansa, S. Kovackova, M. Budesinsky, *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, 4117-4122.
- [193] M. Dracinsky, P. Jansa, J. Chocholousova, J. Vacek, S. Kovackova, A. Holy, *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, 777-785; M. Dracinsky, P. Jansa, K. Ahonen, M. Budesinsky, *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, 1544-1551.
- [194] I. Rosenberg, A. Holy, M. Masojidkova, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1988**, 53, 2753-2777.
- [195] A. Holy, I. Rosenberg, H. Dvorakova, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **1989**, 54, 2470-2501.
- [196] K. Horejsi, G. Andrei, E. De Clercq, R. Snoeck, R. Pohl, A. Holy, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14, 8057-8065.
- [197] M. L. Peterson, R. Vince, *Journal of Medicinal Chemistry* **1990**, 33, 1214-1219.

Abstract

An extensive overview of the current state of the research in the field of the development of acyclic nucleoside phosphonates (ANPs) was elaborated, which quotes from 196 publications in abstracted journals. A new microwave-assisted methodology for the preparation of dialkyl haloalkylphosphonates was developed. Through strict control of the reaction temperatures in microwave reactor, it was possible to lower the amount of the reactants all the way to the ideal ratio of 1:1. With the use of a continuous-flow microwave reactor, it was possible to prepare the key building blocks for the subsequent syntheses of ANPs in large quantities (100 g), which significantly accelerates research in this area. The new method was patented and published.

While studying various ANP prodrugs, a new highly effective methodology for the preparation of the diamides of ANPs was developed. The method starts directly from ANP diesters, which react with trimethylsilylbromide to form the corresponding bis(trimethylsilyl)esters of ANPs, which are well soluble in organic solvents and react smoothly during the subsequent introduction of amino acid esters. Moreover, the reaction with trimethylsilylbromide protects the reactive groups present in the rest of the molecule and thus prevents undesired side reactions. Furthermore, using this method new highly active diamides of ANPs against HIV were prepared. The method was patented and accepted for publication. While studying effect of the microwave irradiation on the reaction speed, a new method was discovered for the hydrolysis of organophosphates and organophosphonates to the corresponding phosphoric and phosphonic acids. This method has already been utilized for the preparation of more than thirty ANPs even on multigram scales. The great advantage of the method discovered is the fact that the course of the reaction can be followed practically immediately by simple monitoring of the pressure changes in the reaction vessel. Moreover, the methodology for the hydrolysis of diesters of phosphonates allows complete degradation and deactivation of organophosphate and organophosphonate pesticides, insecticides, herbicides, pollutants and nerve agents. The method has been patented and it will be published soon. The main task of this work was to elaborate an alternative synthesis of recently discovered PMEODAPy analogues (so-called 'open-ring' ANPs). This task was also successfully completed. A new method for the preparation of the parent PMEODAPy on the 100 g scale was developed while eliminating laborious purification methods (the publication is being prepared). Three alternative methods for the preparation of the desired 5-substituted derivatives of PMEODAPy were developed. The first method exploits the gradual building of the entire structure of the PMEODAPy from 5-substituted pyrimidines. The second, synthetic way used direct modification of the position 5 of the pyrimidine ring by substitution (electrophilic or radical) reactions carried out on the diester of the PMEODAPy. In the third method, the direct modification of position 5 of the pyrimidine ring occurs directly on the PMEODAPy analogues themselves (i.e. on free phosphonic acids). Some of the new derivatives (substituted in position 5 of the pyrimidine ring) exhibit micromolar and submicromolar activities against viruses like HIV, VZV and HSV. A dramatic increase of the antiviral activities was achieved by the transformation of the active compounds to their lipophilic prodrugs, where some compounds showed activity towards VZV in concentrations of tens of nM (the publication is being prepared).