

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Lucie Josefa Lamačová

2-(Fosfonomethoxy)ethyl deriváty 6-fluor-3-hydroxypyrazin-2-karboxamidu
2-(Phosphonomethoxy)ethyl derivatives of 6-fluoro-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide

Bakalářská práce

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

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze, 16. 5. 2019

Podpis

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá přípravou derivátů acyklických nukleosidfosfonátů s dusíkatou bází favipiravirem. Existuje mnoho příkladů acyklických nukleosidfosfonátů, které jsou díky své struktuře používány jako léčiva proti virovým onemocněním. Favipiravir sám o sobě vykazuje antivirální aktivitu proti viru chřipky. Cílové sloučeniny tedy mají potenciál být biologicky aktivní, což bude testováno ve virologických laboratořích na KU Leuven v Belgii.

Byly navrženy postupy pro přípravu 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivátu favipiraviru, dále jeho difosfátu a proléčiva s pivaloyloxymethyl skupinami pro zvýšení biologické dostupnosti látky. Připraveny tedy byly 2-(fosfonomethoxy)ethyl deriváty favipiraviru a jeho de-fluor analoga.

Klíčová slova: acyklické nukleosidfosfonáty, T-705, favipiravir, T-1105, chřipka, antivirální aktivita

Abstract

This bachelor thesis deals with the preparation of derivatives of acyclic nucleoside phosphonates with nitrogenous base favipiravir. There are many examples of acyclic nucleoside phosphonates that are used as antiviral drugs due to their structure. Favipiravir shows antiviral activity against the influenza virus. The target compounds thus might have the potential to be biologically active, which will be tested in virological laboratories at KU Leuven in Belgium.

First, the methods for preparation of 2-(phosphonmethoxy)ethyl derivative of favipiravir was designed, then for its diphosphate and a prodrug with pivaloyloxymethyl groups to increase the bioavailability of the compound. Thus, 2-(phosphonmethoxy)ethyl derivatives of favipiravir and its de-fluoro analogue were prepared.

Key words: acyclic nucleoside phosphonates, T-705, favipiravir, T-1105, influenza, antiviral activity

Obsah

| | |
|---|----|
| Abstrakt | 3 |
| Abstract..... | 4 |
| Použité zkratky..... | 6 |
| 1. Úvod..... | 8 |
| 2. Cíle práce..... | 9 |
| 3. Přehled problematiky | 10 |
| 3.1. Chřipka..... | 10 |
| 3.1.1. Struktura a životní cyklus chřipkového viru A..... | 11 |
| 3.1.2. Antivirotika..... | 14 |
| 3.2. Dusíkaté báze T-705 a T-1105..... | 18 |
| 3.3. Acyklické nukleosidfosfonáty | 20 |
| 3.3.1. Mechanismus účinku ANP | 21 |
| 3.3.2. Přístupy k syntéze ANP..... | 22 |
| 4. Výsledky a diskuse..... | 28 |
| 4.1. Koncept syntézy..... | 28 |
| 4.2. Diisopropyl [(2-chlorethoxy)methyl]fosfonát..... | 29 |
| 4.3. Diisopropyl {[2-(3-karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl}fosfonát..... | 29 |
| 4.4. Diisopropyl {[2-(3-karbamoyl-5-fluor-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy] methyl}fosfonát | 31 |
| 4.5. Diisopropyl [(2-hydroxyethoxy)methyl]fosfonát | 32 |
| 4.6. 2-[(Diisopropoxyfosforyl)methoxy]ethyl trifluormethansulfonát | 33 |
| 4.7. Diisopropyl {[2-(3-karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl}fosfonát připravený z fosfonátu s triflátovou skupinou | 33 |
| 4.8. {[2-(3-Karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl}fosfonová kyselina | 34 |
| 4.9. [{{[2-(3-Karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl}fosforyl}bis(oxy)]bis (methylen) bis(2,2-dimethylpropanoát)..... | 35 |
| 5. Experimentální část | 37 |
| 5.1. Obecné postupy a chemikálie..... | 37 |
| 5.2. Pracovní postupy | 38 |
| 6. Závěr | 43 |
| 7. Poděkování..... | 44 |
| 8. Literatura | 45 |

Použité zkratky

| | |
|-------|---|
| ANP | acyklický nukleosidfosfonát (Acyclic Nucleoside Phosphonate) |
| APRT | adenin fosforibosyltransferáza |
| COSY | korelační spektroskopie (Correlation Spectroscopy) |
| DBU | 1,8-diazabicyklo-[5,4,0]undec-7-en |
| DCM | dichlormethan |
| DEPT | nezkreslené vylepšení přenosem polarizace (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer) |
| DHPA | 9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin |
| DMF | <i>N,N</i> -dimethylformamid |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DRIFT | infračervená spektroskopie rozptýleného odrazu s Fourierovou transformací (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy) |
| ESI | ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization) |
| Et | ethyl |
| FPMP | 3-fluor-2-(fosfonomethoxy)propyl |
| HA | hemaglutinin |
| HGPRT | hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza |
| HMBC | heteronukleární ^1H - ^{13}C korelace přes více chemických vazeb (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation) |
| HPMP | 3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl |
| HPMPA | 9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin |
| HPMPC | 1-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosin |
| HSQC | heteronukleární ^1H - ^{13}C korelace přes jednu chemickou vazbu (Heteronuclear Single Quantum Correlation) |
| IMPDH | inosinmonofosfát dehydrogenáza |
| iPr | isopropyl |
| IR | infračervené záření (Infrared) |
| M1 | virový matrixový protein |
| M2 | virový membránový protein |
| Me | methyl |
| MS | hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry) |

| | |
|------|---|
| MW | mikrovlny (Microwaves) |
| NA | neuraminidáza |
| NMR | nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance) |
| NP | virový nukleoprotein |
| NS | virový nestrukturní protein |
| PA | virová kyselá polymeráza |
| PB1 | virová bazická polymeráza 1 |
| PB2 | virová bazická polymeráza 2 |
| PME | 2-(fosfonomethoxy)ethyl |
| PMEA | 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]adenin |
| PMP | 2-(fosfonomethoxy)propyl |
| PMPA | 9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin |
| POC | isopropyloxykarbonyloxymethyl |
| POM | pivaloyloxymethyl |
| Pr | propyl |
| RMP | ribofuranosyl-5'-monofosfát |
| rt | laboratorní teplota (room temperature) |
| RTP | ribofuranosyl-5'-trifosfát |
| RVO | rotační vakuová odparka |
| SATE | S-acylthioethyl |
| Tf | triflát (trifluormethansulfonát) |
| THF | tetrahydrofuran |
| TLC | chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography) |
| Ts | tosyl (<i>p</i> -toluensulfonyl) |
| UV | ultrafialové záření (Ultraviolet) |
| vRNP | komplex virových nukleoproteinů s vRNA |

1. Úvod

Acyklické nukleosidfosfonáty (ANP) jsou farmaceuticky významnou skupinou látek. Jedná se o analogy nukleotidů, kde je cukerná část nahrazena acyklickým řetězcem. Zároveň je fosfátová skupina vázaná v původním nukleotidu esterovou vazbou na sacharid nahrazena fosfonomethoxy skupinou, neboť tato je odolnější vůči enzymatickému štěpení v buňce. Patří sem celá řada sloučenin s antivirální aktivitou, které jsou již mnoho let běžně využívány jako léčiva proti AIDS, žloutence typu B a dalším onemocněním¹.

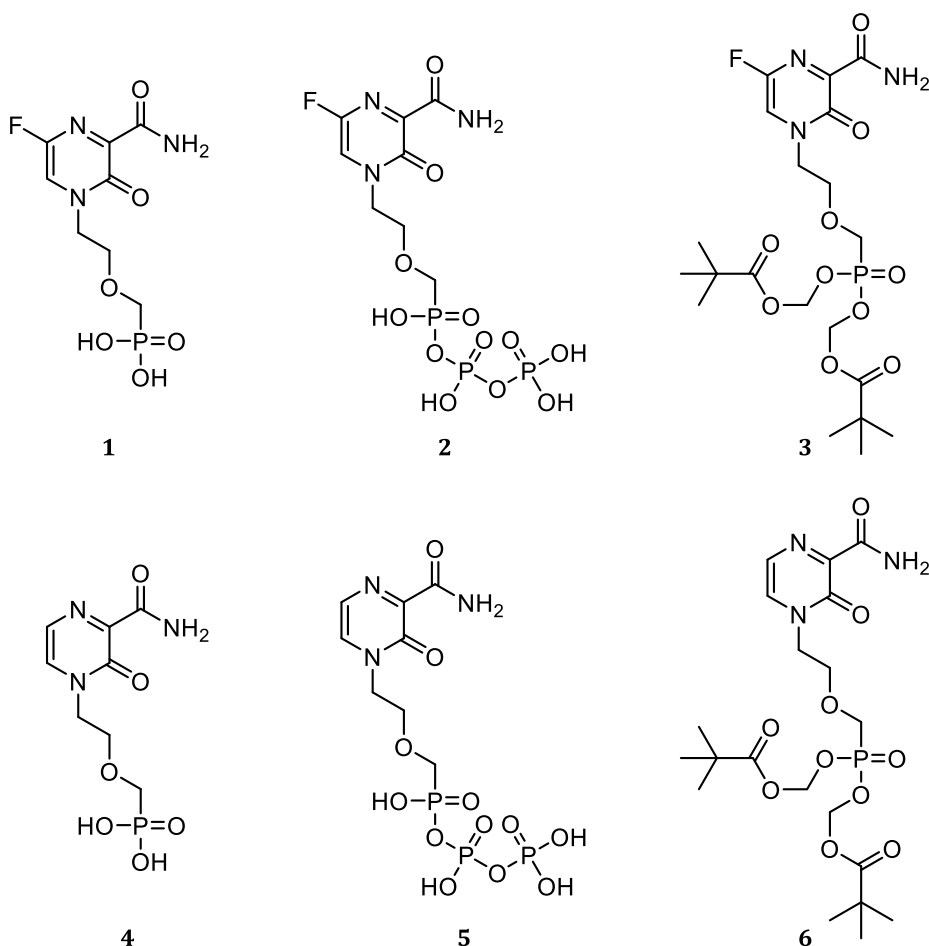
Dusíkatá báze T-705, zvaná také favipiravir, vykazuje biologickou aktivitu proti chřipkovému viru a její používání jako léčiva je již schváleno v Japonsku. Mechanismem jejího působení v buňce je terminace elongace replikovaného řetězce virové RNA nebo letální mutageneze viru².

Spojením těchto strukturních motivů lze očekávat analoga nesoucí výhody obou látek – ANP, kde je nukleobáze nahrazena bází T-705. ANP se běžně používají ve formě derivátů s lepšími farmakokinetickými vlastnostmi. Biologická aktivita původních ANP objevených profesory Antonínem Holým a Erikem De Clerqem byla testována ve virologických laboratořích na KU Leuven v Belgii.

2. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce byla příprava acyklických nukleosidfosfonátů s dusíkatými bázemi 6-fluor-3-hydroxypyrazin-2-karboxamidem (nazýván též T-705 nebo favipiravir) a jeho de-fluor analogem (T-1105). Tyto látky by mohly být potenciálními antivirotyky, neboť sama dusíkatá báze T-705 vykazuje antivirální aktivitu. Cílové sloučeniny budou dále testovány na biologickou aktivitu ve virologických laboratořích na KU Leuven v Belgii. Byly navrženy následující deriváty bází T-705 a T-1105 (obr. 1):

- 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivát (**1 a 4**);
- difosfát (**2 a 5**) fosfonové kyseliny připravené v bodě a), který v buňce napodobuje trifosfát, a je tak možné se vyhnout buněčné fosforylaci, která nemusí být úplně efektivní;
- proléčivo odvozené z fosfonové kyseliny připravené v bodě a) s lipofilními pivaloyloxymethyl skupinami, které zvyšují biologickou dostupnost (**3 a 6**).



Obr. 1. Cílové sloučeniny

3. Přehled problematiky

3.1. Chřipka

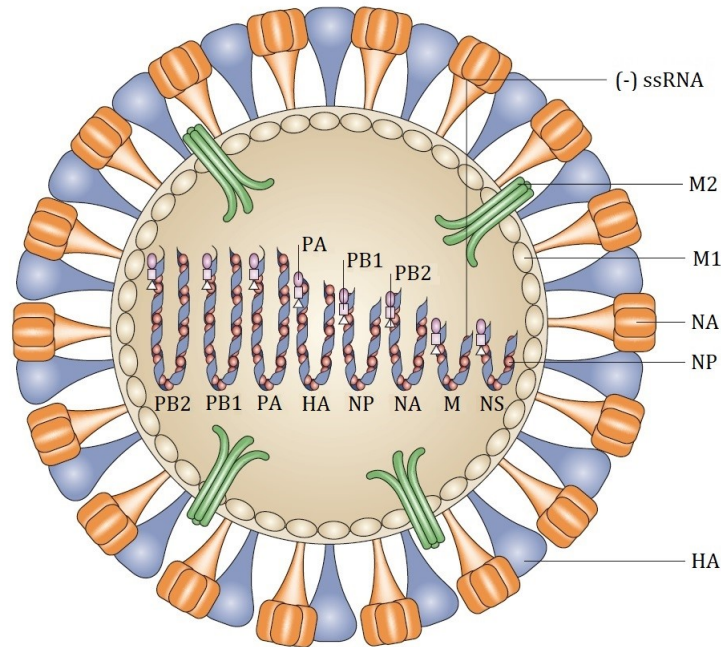
Podle odhadů Světové zdravotnické organizace ročně zemře 290 000–650 000 lidí na selhání dýchacího systému způsobené sezónní chřipkou³. Rizikovými skupinami jsou především děti do 5 let a osoby starší 65 let. Od začátku 20. století došlo ke čtyřem chřipkovým pandemiím. První a zároveň největší pandemie tzv. Španělské chřipky, byla způsobena virem A/H1N1 a zasáhla svět v letech 1918–1920. Navzdory svému jménu má svůj původ nejspíše v Severní Americe, odtud se šířila s americkými vojáky do Evropy. Právě díky válečným operacím měl virus možnost rozšířit se téměř po celé Evropě, odtud dále do Ruska, severní Afriky, Austrálie, Indie, na Nový Zéland a Filipíny. Zvláštností Španělské chřipky bylo, že kromě rizikových skupin napadala osoby od 20 do 40 let. Odhaduje se, že nakaženo bylo 50 % populace a zemřelo 40–50 milionů lidí⁴. V letech 1957–1958 způsobil virus A/H2N2 tzv. asijskou chřipku, která se z Číny postupně rozšířila do Austrálie a na tichomořské ostrovy, do Evropy, Afriky a Severní i Jižní Ameriky. Celosvětová úmrtnost se odhaduje na 1,1 milionů osob⁵. Třetí pandemie způsobená virem A/H3N2 – tzv. hongkongská chřipka – propukla mezi lety 1968–1969 hlavně v Asii a Spojených státech amerických, v druhé vlně v letech 1969–1970 zasáhla ještě intenzivněji v Anglii, celkový odhad úmrtí je 1 milion⁶. Poslední pandemií byla v roce 2009 tzv. prasečí chřipka způsobená subtypem A/H1N1 pocházející z Mexika. Rychle se rozšířila ve Spojených státech, pak dále do celého světa. Laboratorně bylo potvrzeno 18 500 úmrtí, odhaduje se však, že jich mohlo být až přes 200 000⁷.

Chřipka je způsobována RNA virem z čeledi *Orthomyxoviridae*⁸. Existují tři typy – A, B a C. Typ A je nejzávažnější, jak epidemiologicky, tak i samotným průběhem onemocnění. Infikuje všechny věkové skupiny a kromě lidí také další savce a ptáky. Prasata jsou „mixážní nádobou“, kde se setkávají různé subtypy viru a mohou zde vznikat nové⁹. Virus prochází dvěma formami evoluce, dochází k antigennímu driftu a shiftu. Drift je způsoben bodovými mutacemi a vede jen k drobným modifikacím viru jako odpověď na imunitní systém hostitele. Tyto změny při replikaci virové RNA se dějí běžně a neustále a mohou vést k menším epidemiím. Naopak při shiftu dochází k výměně velké části genomu a vzniká nový subtyp chřipky, který může způsobit až pandemii¹⁰. K tomuto jevu však dochází v rádech desítek let. Chřipka typu B má mírnější průběh, vyskytuje se

hlavně u člověka a dochází pouze k antigennímu driftu. Nejméně závažný je typ C, který se projevuje jen u malých dětí⁸.

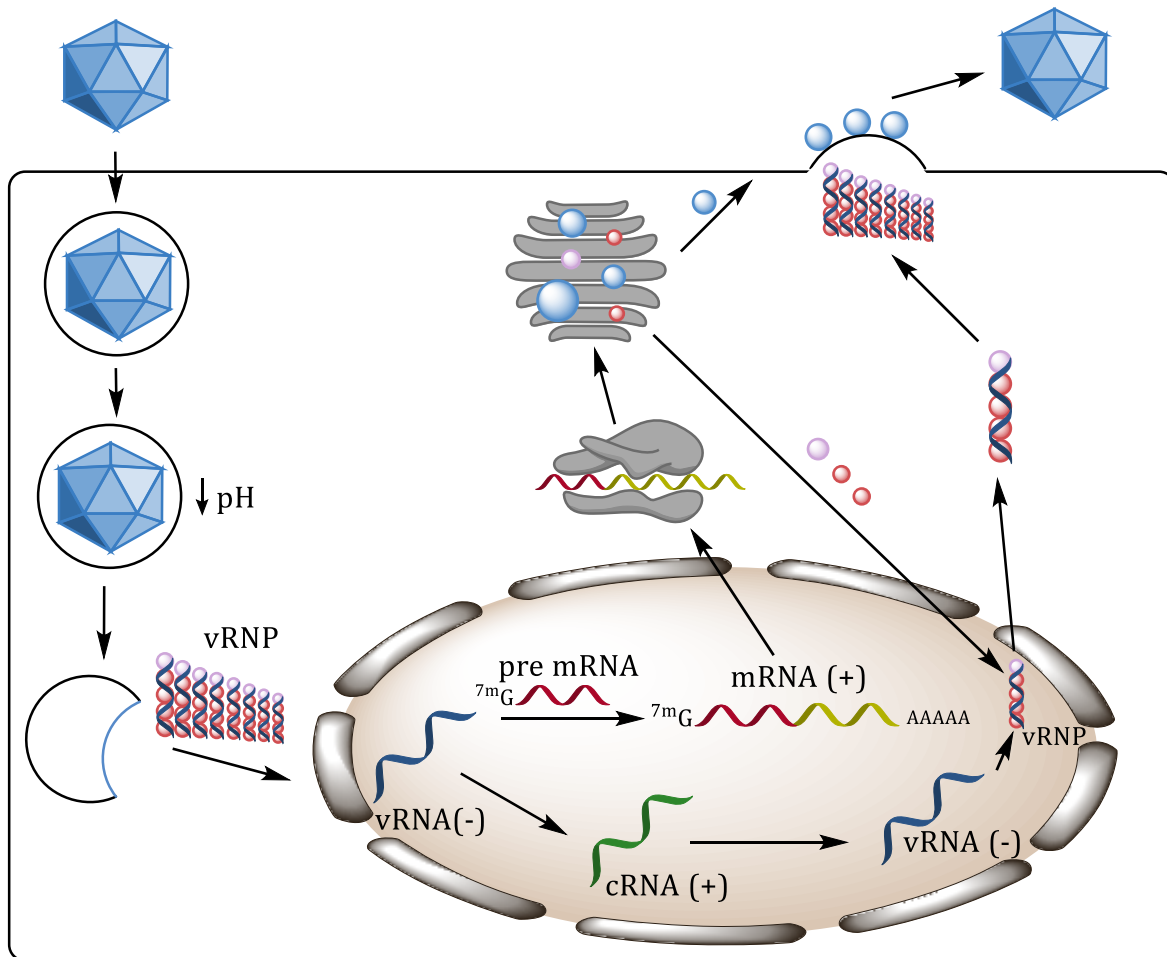
3.1.1. Struktura a životní cyklus chřipkového viru A

Virová částice chřipky A¹¹ (obr. 2) měří 80–120 nm v průměru. Obal je tvořen fosfolipidovou dvojvrstvou, která je odvozena z cytoplazmatické membrány hostitelské buňky. Pod obalem se nachází vrstva složená ze strukturních matrixových M1 proteinů. Skrz obal prochází M2 proteiny, které mají funkci kanálů pro H⁺ ionty. Na povrchu membrány se vyskytují dva druhy obalových proteinů – hemagglutinin (HA) a neuraminidáza (NA). Bylo popsáno 18 subtypů hemagglutininu (H1 – H18) a 11 subtypů neuraminidázy (N1 – N11)¹². Ty se spolu mohou různě kombinovat, a lze tedy teoreticky dosáhnout až 198 subtypů viru. Podle proteinového složení obalu se i jednotlivé subtypy nazývají, např. virus H1N1 byl původcem poslední chřipkové pandemie. Uvnitř virionu (funkční virové částice) se nachází jednovláknová RNA s negativní polaritou ((-)ssRNA), tzn. její orientace je 3' → 5'. Je rozdělena do osmi segmentů a je nesena nukleoproteiny (NP). Každý ze segmentů kóduje syntézu jiného virového proteinu (PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1 + M2, NS (nestrukturní protein)) a má také svůj polymerázový komplex složený ze tří proteinů – PA, PB1 a PB2. Aby byl virion virulentní, musí obsahovat všech 8 segmentů RNA. Je-li v buňce přítomno více různých virionů, může při vzniku nové generace dojít k přimíchání cizích segmentů do genomu (tzv. reassortment), protože začleňování těchto segmentů do nové generace jedinců je z části náhodné. Právě v ten moment mohou vznikat nové subtypy viru (antigenní shift). Jejich virulence může být nižší a nové generace neinfekční nebo naopak vyšší a vést až k pandemii. Při té poslední v roce 2009 došlo ke smíchání dvou různých prasečích, ptačích a lidských segmentů genomu¹³.



Obr. 2. Struktura virové částice chřipky – virová partikule je složena z molekul matrixového proteinu (M1), mezi které jsou vmezeřeny membránové proteiny (M2), na svém povrchu má obalové proteiny hemagglutinin (HA) a neuraminidázu (NA) a uvnitř 8 segmentů vRNA, z nichž každý nese polymerázový komplex a kóduje jeden z virových proteinů¹⁴

Životní cyklus viru¹⁵ (obr. 3) začíná jeho vstupem do buňky endocytózou. Hemagglutinin na povrchu viru se naváže na kyselinu sialovou na receptorech na hostitelské cytoplazmatické membráně. Virová částice je uzavřena do endozómu, který se pohybuje v buňce směrem od membrány. Uvnitř endozómu dochází ke snížení pH, H⁺ ionty prochází skrz M2 kanály dovnitř virionu. Acidifikace vyvolá změnu konformace hemagglutininu. Hydrofobní fúzíjící peptid, který je součástí HA a byl dosud ukryt ve struktuře proteinu, je vysunut, spojí se s membránou endozómu, dochází k fúzi membrán a vytváří se pór, který umožňuje volný průchod komplexů nukleoproteinů s virovou RNA (vRNP) do cytosolu hostitelské buňky. vRNP jsou díky jadernému lokalizačnímu signálu dopraveny do jádra. Zde dochází k transkripci do mediátorové RNA (mRNA) a replikaci virové RNA (vRNA)^{16,17}.



Obr. 3. Životní cyklus viru chřipky – virion vstupuje do buňky, po snížení pH uniká z endozómu do cytoplazmy, virové nukleoproteiny s vRNA vstupují do jádra, zde dochází k transkripci a replikaci vRNA, mRNA je translatována za vzniku nových virových proteinů, dochází k sestavení nové generace virionů a jejich pučení z buňky ven

Transkripce vRNA začíná tím, že doména PB2 virové polymerázy naváže do svého aktivního místa 5' čepičku hostitelské pre-mRNA, počátečním nukleosidem je 7-methylguanin. Za 10.–13. nukleotidem dochází k odštěpení zbytku řetězce prostřednictvím endonukleázy – podjednotky PA. Toto využití buněčné RNA jako primeru se nazývá cap-snatching. Vzniklý 3' konec hostitelské pre-mRNA a templát vRNA nasednou na svá aktivní místa na podjednotce PB1. Dochází k elongaci řetězce – postupnému navazování jednotlivých nukleotidů na vznikající vlákno komplementární k templátu. Blíží-li se již elongace ke konci, dochází k opakované reakci s uridintrifosfátem a to ze sterických důvodů, 5' konec vRNA je po celou dobu elongace

také vázán k PB1. Tato polyU sekvence vyvolá uvolnění čepičky z PB1 a terminující polyadenylaci vznikající virové mRNA¹⁵.

Replikace vRNA probíhá ve dvou krocích. Nejdříve se syntetizuje komplementární vlákno (cRNA) s pozitivní polaritou (5' → 3'), které dále slouží jako templát pro syntézu nových vRNA. Replikace je zprostředkována PB1 podjednotkou virové polymerázy a nezávisí na buněčném primeru¹⁵.

Virová mRNA vzniklá transkripcí je transportována do cytoplazmy, dále translatována a vzniklé proteiny modifikovány na endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu. HA, NA a M2 proteiny jsou potom dopraveny k cytoplazmatické membráně. Polymerázový komplex, M1, NP a NS putují zpět do jádra, kde se podílejí na vzniku nových vRNP a jejich transportu do cytoplazmy až k cytoplazmatické membráně. Z ní poté vypučí nová generace virionů obalená hostitelskou membránou, na jejímž povrchu jsou syntetizované HA a NA. Virion opouštějící buňku je navázán svými HA na kyselinu sialovou na povrchu buněčných receptorů. Tuto vazbu rozštěpí NA a virion opouští buňku¹⁵.

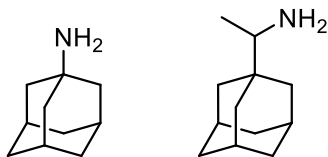
3.1.2. Antivirotika

Každoročně jsou vyvíjeny vakcíny proti sezónní chřipce¹⁸. Pacientům se podávají usmrcené nebo oslabené viry. Antivirotika se podávají buď jako prevence při sezónních epidemiích a na počátku propuknutí pandemie, nebo přímo jako léčivo. Proti mnoha z nich si již virus vybudoval rezistenci, je proto velká snaha najít nová účinná antivirotika. Životní cyklus viru může být blokován v různých fázích inhibicí jednoho z virových proteinů.

3.1.2.1. Antivirotika blokující funkci M2 kanálu

Funkcí M2 kanálu je dopravovat H⁺ z endozómu dovnitř virionu. Snížení pH vyvolá konformační změnu hemaglutininu a virion může z endozómu uniknout. Nedojde-li ke snížení pH, zůstane uzavřen v endozómu a nerozmnoží se. Existují léčiva odvozená od adamantanu – amantadin a rimantadin (obr. 4), která se vážou do vnitřku kanálu a zabraňují tak průchodu iontů. Mechanismy přenosu iontů, vazby léčiva a inhibice zůstávají stále nejasné¹⁹. Bodová mutace M2 proteinu znemožňující vazbu

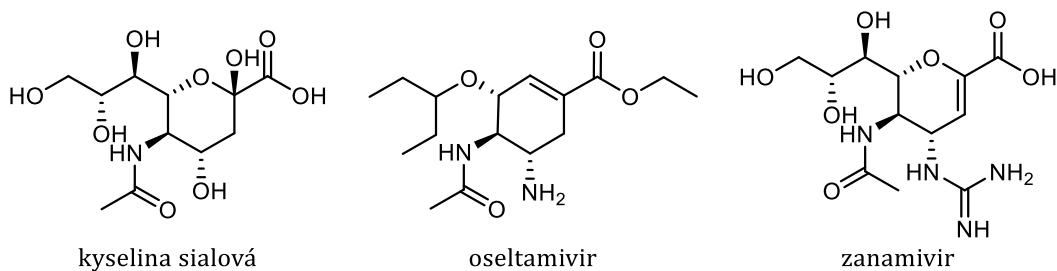
adamantanových léčiv už je však velmi rozšířená, rezistence viru A/H3N2 se uvádí v některých zemích až 100 %, u typu A/H1N1 je to celosvětově 15,5 %²⁰. Aktivitu proti chřipce B tato antivirotika dokonce vůbec nevykazují. Amantadin se používá také při léčbě parkinsonismu²¹.



Obr. 4. Amantadin a rimantadin

3.1.2.2. Antivirotika blokuující funkci NA

NA uzavírá životní cyklus viru, odštěpuje poslední molekulu kyseliny sialové na povrchu buněčného receptoru, na kterou je virion navázán prostřednictvím hemagglutininu. Umožňuje tak viru opustit buňku a dále se šířit. Léčiva oseltamivir a zanamivir byla navržena jako analoga kyseliny sialové (obr. 5) podle krystalové struktury NA²². Váží se do aktivního místa NA, ta proto nemůže odštěpit kyselinu sialovou s navázaným HA, virion zůstává připojen k povrchu buňky, a nemůže tak infikovat další. Modifikace léčiv oproti struktuře kyseliny sialové jsou nutné ke snížení cytotoxicity a optimalizaci farmakokinetiky. Oseltamivir je podáván orálně ve formě kapslí pod komerčním názvem Tamiflu®, zatímco zanamivir se v podobě prášku vdechuje a prodává se pod názvem Relenza®²³. Obě látky jsou aktivní proti všem subtypům NA i chřipce typu B. V roce 2009 však došlo k celosvětovému rozšíření kmene chřipky A/H1N1, který je rezistentní vůči oseltamiviru²⁴. Zároveň musí být tyto inhibitory NA podány pacientovi do 48 hodin od prvních příznaků onemocnění, jinak je jejich efektivita výrazně snížena²⁵. Na vývoji dalších inhibitorů NA se stále pracuje, například peramivir a laninamivir jsou testovány, v některých zemích již schváleny²⁶.

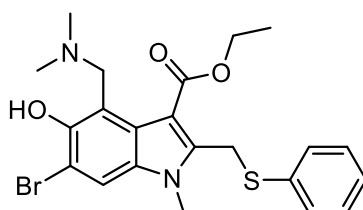


Obr. 5. Kyselina sialová a její analogy – inhibitory neuraminidázy

3.1.2.3. Antivirotika blokuující funkci HA

HA má v životním cyklu viru dvě funkce – vazbu virionu k povrchu buňky a fúzi virové membrány s membránou endozómu, čímž umožní uvolnění vRNP do cytoplazmy buňky. HA je homotrimer, každý z jeho monomerů je syntetizován jako prekurzor HA0, který je štěpen hostitelskou proteázou na dva fragmenty (HA1 a HA2) a tím je aktivován. Funkcí HA1 je vazba na receptor, HA2 má na svém N-konci tzv. fúzující peptid. Snížením pH dochází ke změně konformace HA2, fúzující peptid se naváže na membránu endozómu a dojde k fúzi obou membrán²⁷.

V současnosti jsou zkoumány dva způsoby blokování funkce HA. Používají se buď protilátky jak proti „hlavě“ (HA1), tak proti „kmeni“ (HA2)²⁸, nebo nízkomolekulární látky, které jsou mnohdy limitované pouze na specifické druhy HA. V Rusku a Číně bylo schváleno používání tzv. umifenoviru prodáváného pod názvem Arbidol® (obr. 6)²⁹.



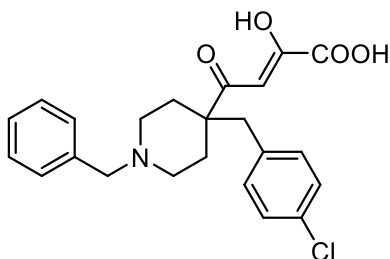
Obr. 6. Umifenovir blokuující fúzi membrán

3.1.2.4. Antivirotika blokuující funkci virové polymerázy

Funkce virové polymerázy¹⁶ je pro přežití viru naprosto zásadní. Zajišťuje jak transkripci, tak replikaci virové RNA a její struktura je pro všechny subtypy relativně stejná a neměnná. Díky tomu je polymeráza velmi vhodným cílem výzkumu antivirotik. Blokovány mohou být funkce každé z podjednotek polymerázy – PA, PB1 i PB2.

3.1.2.4.1. Antivirotika blokující funkci PA

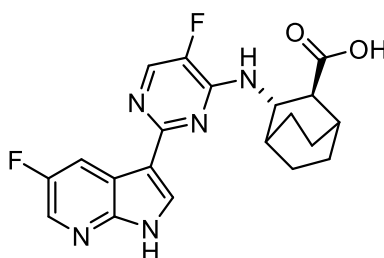
Podjednotka PA je endonukleázou odštěpující buněčný primer nutný k syntéze virové RNA. První možností blokování její funkce je navázání malé molekuly do jejího aktivního místa. To obsahuje také ionty kovů, zřejmě Mg^{2+} nebo Mn^{2+} , probíhá tedy výzkum vhodných chelatačních činidel, která by vytvářela vazbu s těmito kovy¹⁶. Ve fázi klinických testů je nyní například sloučenina zvaná L-742,001 (obr. 7)³⁰.



Obr. 7. Sloučenina L-742,001 – inhibitor PA

3.1.2.4.2. Antivirotika blokující funkci PB2

Podjednotka PB2 váže do svého aktivního místa čepičku buněčné mRNA. Inhibice probíhá podobně jako u PA, molekula antivirotika se váže do aktivního místa enzymu a zabraňuje tak jeho správné funkci¹⁶. Ve fázi klinických testů je například látka VX-787 (obr. 8)³¹.

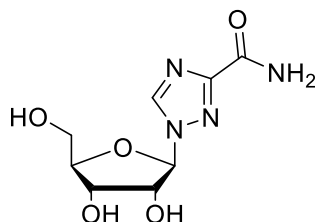


Obr. 8. Sloučenina VX-787 – inhibitor PB2

3.1.2.4.3. Antivirotika blokující funkci PB1

Podjednotka PB1 má na starost samotnou syntézu vlákna RNA. Inhibice často probíhá analogy ribonukleotidů nebo jinými sloučeninami, které se chovají jako alternativní substrát polymerázy. Tím dochází k mutagenезi viru nebo k úplnému zastavení elongace řetězce. Mezi tyto látky patří ribavirin (obr. 9), který byl objeven už v roce 1972

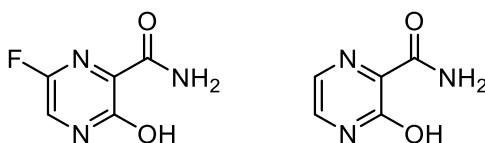
a používá se také k léčbě hepatitidy C. V buňce zároveň způsobuje tzv. GTP depleci – inhibuje inosinmonofosfát dehydrogenázu (IMPDH), která se podílí na syntéze GTP, což vede ke snížení jeho koncentrace v buňce a tím k nepřímému zastavení transkripce a replikace virové RNA. Dalším alternativním substrátem může být favipiravir neboli T-705¹⁶.



Obr. 9. Ribavirin

3.2. Dusíkaté báze T-705 a T-1105

Dusíkaté báze T-705 (favipiravir) a T-1105 (obr. 10) jsou deriváty pyrazin-2-karboxamidu. Byly objeveny japonskou společností Toyama Chemical Co., Ltd. Vykazují antivirální aktivitu proti celé řadě virů, významná je především inhibice viru chřipky derivátem T-705³².

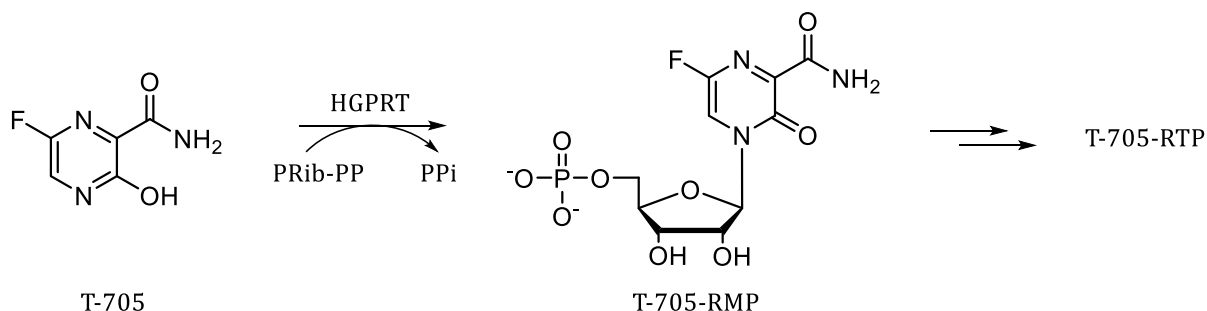


Obr. 10. Dusíkaté báze T-705 a T-1105

Při experimentech s T-705 *in vitro* i *in vivo* byly zjištěny nízké efektivní koncentrace a zároveň nízká cytotoxicita, což ukazuje na vysokou selektivitu inhibice viru. Účinnost byla prokázána i proti vysoce patogennímu chřipkovému viru A/H5N1, tzv. ptačí a proti subtypům s rezistencí vůči oseltamiviru³³.

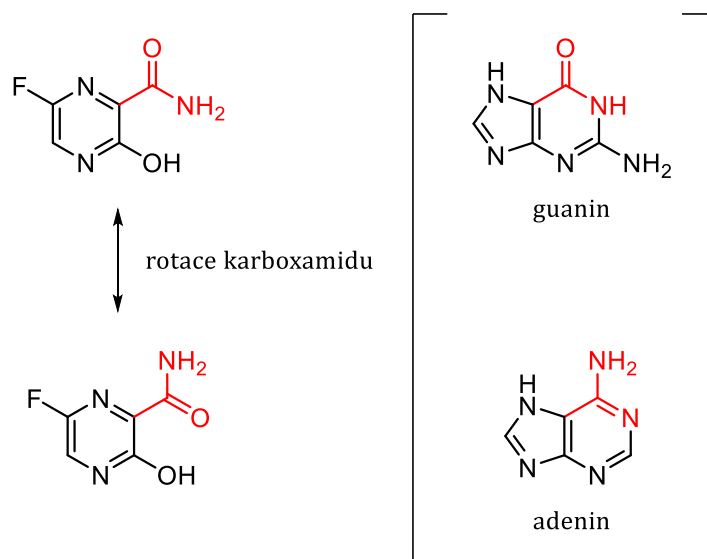
Po vstupu do buňky je báze T-705 fosforibosylována enzymem hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázou (HGPRT) nebo adenin fosforibosyltransferázou (APRT). Ukázalo se, že fosforibosylace HGPRT je 40krát účinnější, ani ta ovšem není příliš efektivní³⁴. Z tohoto důvodu jsou tyto deriváty syntetizovány a dále laboratorně

testovány s cílem zvýšit účinnost inhibice³⁵. Prekurzor T-705-RMP je buněčnými nukleotid kinázami dále fosforylován na T-705-RTP (obr. 11).



Obr. 11. Aktivace báze T-705 v cytosolu buňky

Další zkoumání mechanismu působení odhalilo, že T-705 inhibuje virovou replikaci, při které se chová jako purinová báze³⁶. Díky rotaci karboxamidu může být virovou polymerázou rozpoznána jako guanin nebo adenin, jak je ukázáno na obrázku 12.



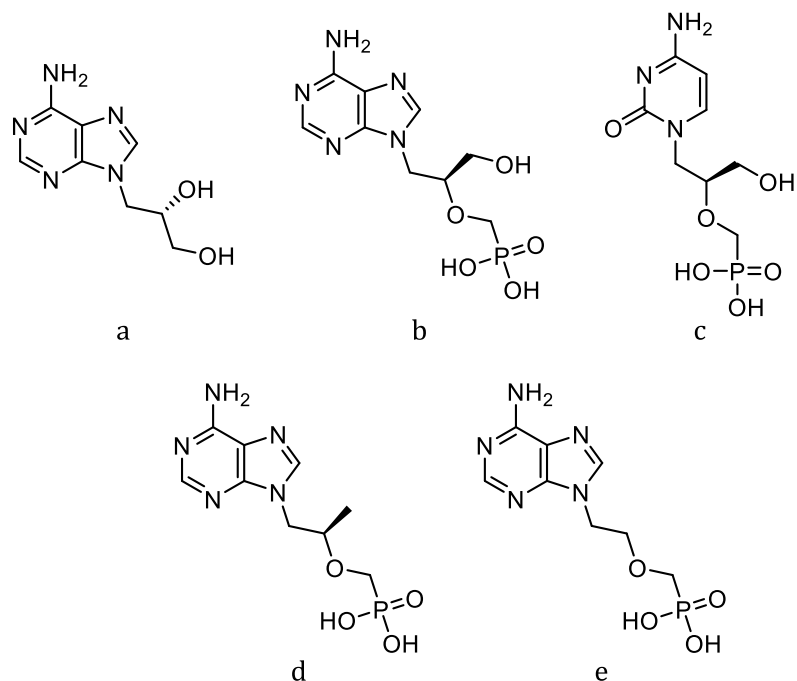
Obr. 12. Napodobování purinových nukleových bází dusíkatou bází T-705

Bylo také zjištěno, že průběh inhibice závisí na koncentraci T-705. Při nižších koncentracích má mutagenní efekt. Replikace řetězce vRNA není zastavena, ale vzniklé viriony jsou neinfekční. Je-li koncentrace vyšší a dojde k začlenění dvou T-705-RMP za sebou, proběhne okamžitá terminace syntézy řetězce².

Kromě viru chřipky působí T-705 na celou řadu dalších RNA virů z čeledi *Arenaviridae*, *Bunyaviridae* a *Flaviviridae*³³. Úspěchy zaznamenává také při testování proti ebolě³⁷, vzteklině³⁸ nebo respiračnímu syncytiálnímu viru³⁹.

3.3. Acyklické nukleosidfosfonáty

O historii výzkumu v oblasti acyklických nukleosidfosfonátů (ANP) vyšel v roce 2005 přehledný článek¹. Vše se začalo v roce 1976, kdy vznikla první spolupráce profesorů Antonína Holého z ÚOCHB AV ČR a Erika De Clerqa z belgického Rega Institute of Medical Research pod KU Leuven. Už od začátku 60. let byly analogy nukleosidů a nukleotidů zkoumány jako potenciální léčiva. Po dvou letech této spolupráce byla objevena první molekula s – z dnešního hlediska slabou – antivirální aktivitou proti řadě DNA a RNA virů – (*S*)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin ((*S*)-DHPA, obr. 13a). Oproti nukleosidům byl monosacharid v molekule nahrazen acyklickým řetězcem. V buňce je molekula aktivována trojí fosforylací, ta však není příliš efektivní, především její první krok. Dalším cílem tedy bylo připravit látku izopolární a ideálně izosterickou s nukleotidy, aby mohla být vynechána první problematická fosforylace. Esterová vazba P-O-C je však snadno štěpitelná buněčnými enzymy, byla proto nahrazena izomerní vazbou P-C-O, která je vůči enzymům stabilnější. Tak byl objeven (*S*)-9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin ((*S*)-HPMPA, obr. 13b), první acyklický nukleosidfosfonát s antivirální aktivitou proti řadě DNA virů (např. herpes simplex virus, lidský cytomegalovirus, vaccinia virus, některé adenoviry a retroviry)⁴⁰. Další výzkum přinesl tři nejvýznamnější látky, které jsou v současnosti používány jako léčiva. Cidofovir (obr. 13c) se od roku 1996 podává pacientům s AIDS pro léčbu cytomegalovirové infekce pod obchodním názvem Vistide®. Tenofovir (obr. 13d), prodáváný pod názvem Viread®, se ve formě proléčiva tenofovir-disoproxil-fumarátu používá k léčbě HIV od roku 2001. Adefovirem (obr. 13e) se ve formě proléčiva s pivaloyloxymethyl skupinami pod obchodním názvem Hepsera® od roku 2002 léčí hepatitida typu B.



Obr. 13. a) (*S*)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenin ((*S*)-DHPA); b) (*S*)-9-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin ((*S*)-HPMPA); c) (*S*)-1-[3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl]cytosin ((*S*)-HPMPC, cidofovir); d) (*R*)-9-[2-(fosfonomethoxy)propyl]adenin ((*R*)-PMPA, tenofovir); e) 9-[2-(fosfonomethoxy)ethyl]adenin (PMEA, adefovir)

3.3.1. Mechanismus účinku ANP

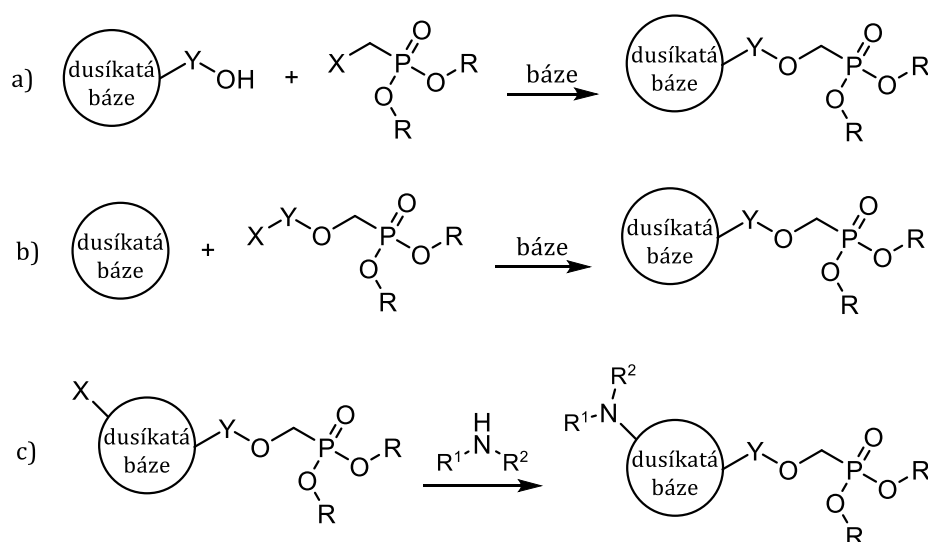
ANP se v buňce chovají jako analogy 2',3'-dideoxynukleotidů. Díky své fosfonové skupině, která nahrazuje fosfát, nemusí procházet málo efektivní první fosforylací buněčnými nukleosid kinázami. Probíhá až dvojitá fosforylace nukleotid kinázami (GMP nebo AMP kinázou) na difosfát fosfonátu, analog trifosfátu. Takto aktivované molekuly se pak stávají substrátem pro cílovou polymerázu. Začleněním difosfátu acyklického nukleosidfosfonátu na 3' konec vznikajícího řetězce DNA dochází k terminaci jeho syntézy¹.

3.3.2. Přístupy k syntéze ANP

Existují tři hlavní přístupy k syntéze acyklických nukleosidfosfonátů:

- příprava hydroxyalkyl derivátu dusíkaté báze a následná etherifikace diesterem methylfosfonové kyseliny s vhodnou odstupující skupinou (obr. 14a);
- příprava postranního řetězce s esterifikovanými OH skupinami fosfonátu a vhodnou odstupující skupinou a jeho následná reakce s heterocyklickou bází (obr. 14b);
- modifikace chráněného prekursoru acyklického nukleosidfosfonátu s reaktivními skupinami na heterocyklické části molekuly (obr. 14c).

Ve všech případech následuje hydrolyza diesteru fosfonové kyseliny¹.

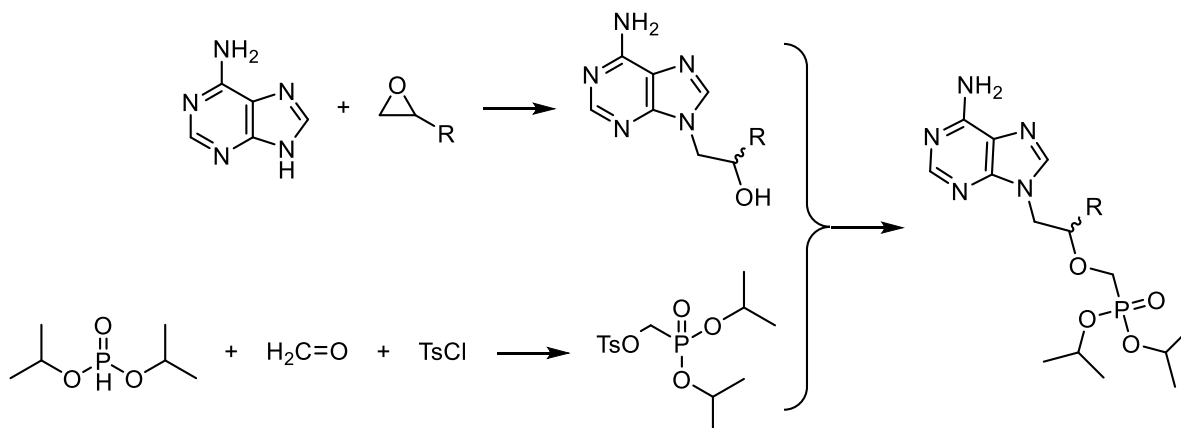


Obr. 14. Přístupy k syntéze ANP (Y – ethylen (PME), 3-hydroxy-1,2-propylen (HPMP), 1,2-propylen (PMP), 3-fluor-1,2-propylen (FPMP); X – odstupující skupina)

3.3.2.1. Etherifikace hydroxyalkyl derivátů nukleobází

Prvním krokem přípravy ANP pomocí etherifikace je příprava hydroxyalkyl derivátu příslušné dusíkaté báze. Purinové nebo pyrimidinové báze mohou být alkylovány chráněnými hydroxyalkyl halogenidy⁴¹, substituovanými 1,3-dioxalan-2-ony⁴² nebo epoxidy⁴³. V případě cytosinu, adeninu a 2,6-diaminopurinu vznikají specificky cílené regioisomery⁴⁴, v ostatních případech je často nutné použít vhodné ochránění funkčních skupin dusíkatých bází.

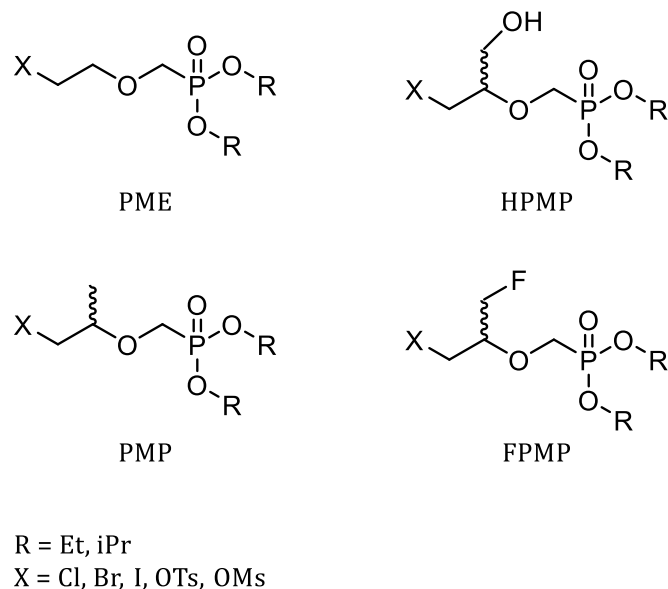
Druhým krokem je pak etherifikační reakce s dialkyl tosyloxymethylfosfonátem v přítomnosti silné báze, například hydridu sodného. Pro tento účel nejčastěji používaný diisopropyl tosyloxymethylfosfonát lze připravit reakcí diisopropyl fosfitu s formaldehydem nebo 1,3,5-trioxanem za přítomnosti triethylaminu a následnou tosyací. Místo diisopropyl tosyloxymethylfosfonátu může být také použit například (diethoxyfosforyl)methyl triflát.⁴⁴ Na obrázku 15 je příklad přípravy ANP odvozeného od adeninu pomocí etherifikace.



Obr. 15. Příklad syntézy ANP pomocí etherifikace hydroxyalkyl derivátu adeninu

3.3.2.2. Alkylace dusíkaté báze fosfonoalkylovým postranním řetězcem

Další možností přípravy ANP je přímá alkylace dusíkaté báze vhodným synthonem. Ten by měl nést na jedné straně odstupující skupinu a na druhé fosfonomethoxy skupinu chráněnou alkyly, nejčastěji isopropylovými nebo ethylovými skupinami. Připravují se především čtyři druhy těchto postranních řetězců: 2-(fosfonomethoxy)ethyl (PME), 3-hydroxy-2-(fosfonomethoxy)propyl (HPMP), 2-(fosfonomethoxy)propyl (PMP) a 3-fluor-2-(fosfonomethoxy)propyl (FPMP) (obr. 16)⁴⁴.

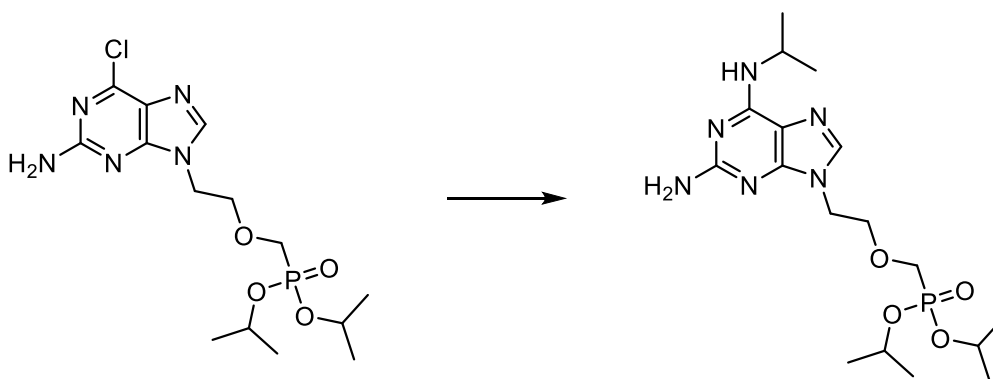


Obr. 16. Synthony používané k přípravě ANP přímou alkylací dusíkaté báze

Jako odstupující skupiny se používají halogenidy, tosylát nebo mesylát. Reakce probíhá v přítomnosti báze, nejčastěji NaH, která nejprve deprotonuje dusíkatou bázi. Ta pak ve formě sodné soli reaguje s příslušným synthonem. Jako báze mohou být též použity K_2CO_3 , Cs_2CO_3 nebo 1,8-diazabicyklo-[5,4,0]undec-7-en (DBU). Tyto reakce jsou často prováděny za vysokých teplot v DMF jako rozpouštědle⁴⁴⁻⁴⁶.

3.3.2.3. Modifikace funkčních skupin na heterocyklické části ANP

Třetím možným přístupem k syntéze ANP je transformace funkčních skupin na heterocyklické části již připravených ANP. Provádějí se deaminace adeninu, guaninu nebo cytosinu, alkylace NH-skupin v kruhu nebo halogenace. Halogenace probíhají v pozici C-5 u pyrimidinových bází a u purinových bází v pozici C-8, ale nejčastěji v pozici C-6. Například 6-chlorpurin nebo 2-amino-6-chlorpurin jsou významnými prekurzory v přípravě nových ANP. Atom chloru v molekule může být nahrazen například aminem (obr. 17), sulfanylovou skupinou nebo oxo-skupinou^{43,44,46,47}.



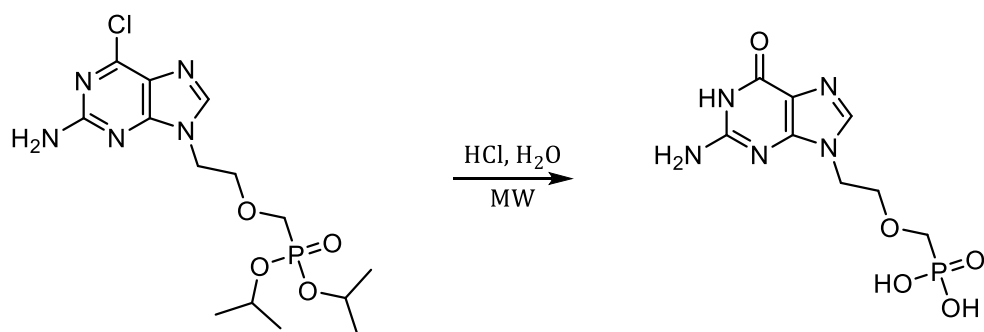
Obr. 17. Příklad přípravy nového ANP z derivátu 2-amino-6-chlorpurinu

3.3.2.4. Hydrolýza alkylových chránících skupin

Standardní metodou odchránění ANP je transsilylace pomocí trimethylsilyl chloridu, bromidu nebo jodidu následovaná hydrolýzou vodou či methanolem. Jako rozpouštědlo se používá acetonitril a reakce probíhá při pokojové teplotě. Přestože je tato metoda volena velmi často, má celou řadu nevýhod. Trimethylsilyl halogenidy jsou látky velice toxické, korozivní a jejich vysoká citlivost na vodu často snižuje výtěžky reakcí.

Alternativní metodou je použití vodných roztoků halogenovodíkových kyselin. Kyselina bromovodíková je oproti kyselině chlorovodíkové efektivnější. Při hydrolýze však vzniká jako vedlejší produkt alkyl bromid, který je silným alkylačním činidlem, a může tak dále reagovat s molekulami produktu. Používá se tedy hydrolýza kyselinou chlorovodíkovou například v mikrovlnném reaktoru.

Hydrolýza pomocí HCl v mikrovlnném reaktoru se dá s výhodou použít také k přípravě derivátů guaninu, které jsou jinak obtížně dosažitelné kvůli nízké regioselektivitě. Při hydrolýze diesterů ANP s 2-amino-6-chlorpurinem jako bází dochází totiž také k výměně atomu chloru za oxo-skupinu (obr. 18)⁴⁸.

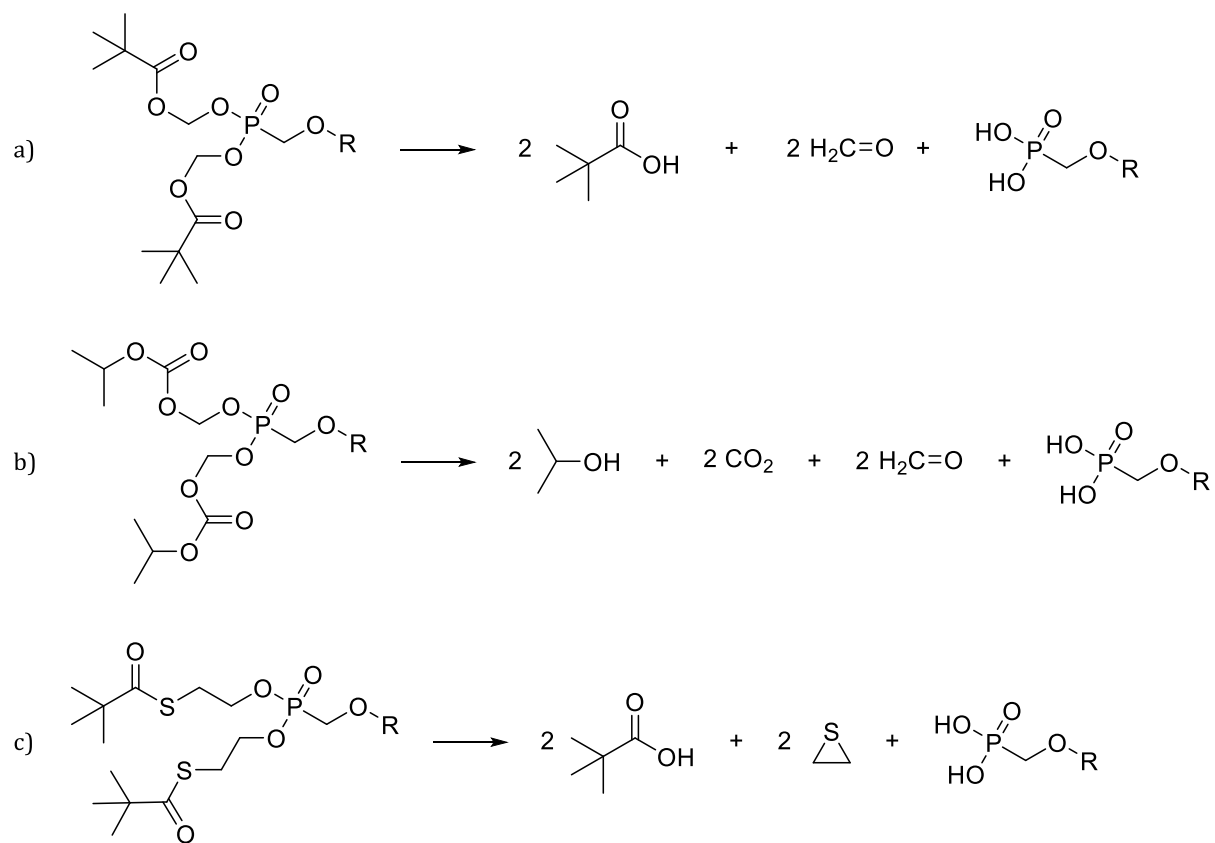


Obr. 18. Příprava ANP odvozeného od guaninu pomocí hydrolyzy HCl v mikrovlnném reaktoru

3.3.2.5. Příprava proléčiv ANP

Biologická aktivita ANP silně závisí na jejich transportu přes cytoplazmatickou membránu buněk. Protože se jedná o látky velice polární, je třeba snížit jejich polaritu esterifikací fosfonové skupiny. Vzniklá esterová vazba musí být dostatečně stabilní, aby vydržela transport k cílové buňce a přes její cytoplazmatickou membránu, ale zároveň musí být snadno štěpitelná buněčnými enzymy v cytoplasmě buňky. Přestože i dialkyl estery některých látek vykazují jistou biologickou aktivitu⁴⁹, jako vhodnější se ukázala proléčiva s acyloxyalkyl skupinami, jejichž degradace v buňce probíhá ve dvou krocích. Nejprve je enzymaticky štěpen acyl ester a poté následuje spontánní rozklad proléčiva na volnou fosfonovou kyselinu⁴⁴.

Příklady lipofilních skupin používaných pro přípravu proléčiv jsou pivaloxyloxymethyl (pivoxil, POM), isopropyloxykarbonyloxymethyl (disoproxil, POC) a *S*-acylthioethyl (SATE) skupiny. Z POM skupiny je v buňce nejprve odštěpena kyselina pivalová a poté je eliminován formaldehyd za vzniku volné fosfonové kyseliny (obr. 19a)⁵⁰. Tuto skupinu můžeme najít v proléčivu adefoviru, který se pacientům podává jako adefovir dipivoxil (bis(POM)-PMEA)¹. Tato modifikace zvyšuje jeho účinnost proti některým virům až stopadesátkrát⁵¹. Buněčná hydrolyza POC skupiny poskytuje isopropanol, oxid uhličitý a formaldehyd (obr. 19b)⁵². Tenofovir disoproxil fumarát (bis(POC)-PMPA fumarát) je proléčivo tenofoviru podávané pacientům¹. Rozkladem SATE skupiny vzniká opět pivalová kyselina a episulfid (obr. 19c)^{50,53}.

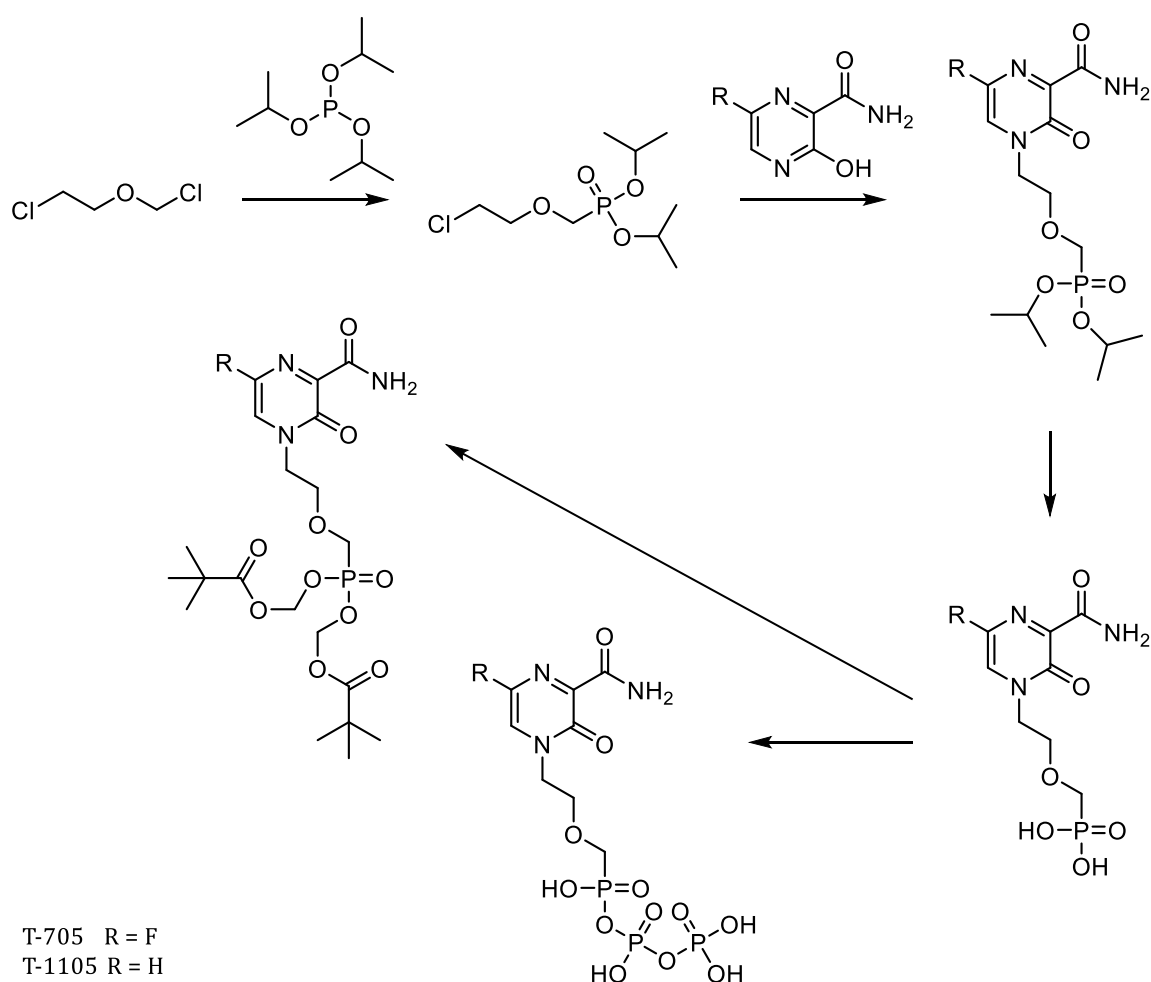


Obr. 19. Hydrolýza proléčiv POM (a), POC (b) a SATE (c) v cytosolu buňky

4. Výsledky a diskuse

4.1. Koncept syntézy

Cílem této bakalářské práce bylo připravit 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivát dusíkaté báze T-705 a z něj následně další deriváty. Byl navržen analog trifosfátu – fosfonát-difosfát, abychom obešli problematickou fosforylaci v buňce, a dále proléčivo s lipofilními pivaloyloxymethyl skupinami pro optimalizaci průchodu molekuly přes cytoplazmatickou membránu buňky. Vzhledem ke ekonomické náročnosti a nižší chemické stabilitě dusíkaté báze T-705 byla příprava těchto derivátů nejprve zkoumána s jejím de-fluor analogem, T-1105 (obr. 20).



Obr. 20. Koncept syntézy

4.2. Diisopropyl [(2-chlorethoxy)methyl]fosfonát

Příprava [(2-chlorethoxy)methyl]fosfonátu ochráněného isopropylovými skupinami (schéma 1) byla provedena analogicky podle publikovaného postupu přípravy fosfonátu chráněného ethylovými skupinami⁵⁴. Reakce byla nasazena s nadbytkem výchozí látky **7**, abychom se vyhnuli separaci produktu pomocí sloupcové chromatografie. Po skončení reakce byla provedena hydrolýza tohoto nadbytku a produkty hydrolýzy (vznikající výměnou atomu chloru za hydroxylovou skupinu) byly separovány pomocí extrakce.

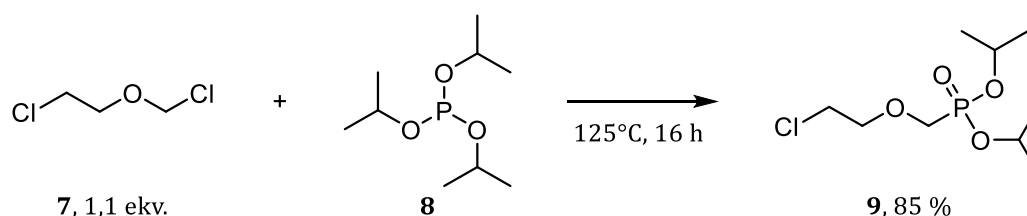


Schéma 1. Příprava diisopropyl [(2-chlorethoxy)methyl]fosfonátu

4.3. Diisopropyl {[2-(3-karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl} fosfonát

Reakce fosfonátu s dusíkatou bází T-1105 (schéma 2) byla provedena za různých podmínek, které jsou uvedeny v tabulce 1. Stupeň konverze byl pozorován na TLC, z reakcí 3, 15 a 16 byl izolován čistý produkt.

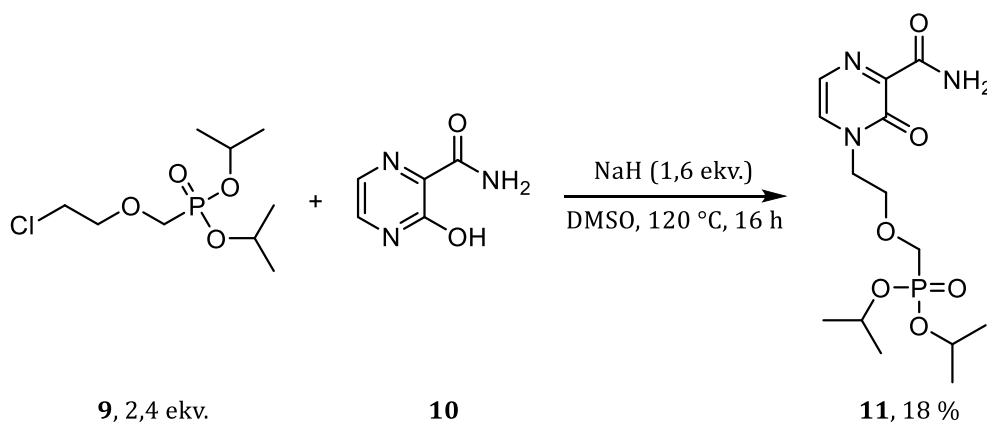


Schéma 2. Příprava fosfonátu s T-1105

Tabulka 1. Optimalizace podmínek přípravy látky **11**

| číslo reakce | počet ekv. 9 | rozpouštědlo | báze (ekv.) | teplota | doba reakce | výtěžek* |
|------------------|---------------------|--------------|--------------------------------------|---------|-------------|----------|
| 1 | 1 | DMF | NaH (1) | 70 °C | 16 h | |
| 2 | 1 | DMF | NaH (1) | 90 °C | 16 h | |
| 3 | 1 | DMF | NaH (1,6) | 70 °C | 16 h | 0,34 % |
| 4 | 1 | DMF | K ₂ CO ₃ (2) | rt | 16 h | ∅ |
| 5 | 1 | DMF | NaH (2) | 70 °C | 48 h | |
| 6 | 1 | DMF | NaH (4) | 70 °C | 48 h | |
| 7 | 1 | DMF | K ₂ CO ₃ (2) | 70 °C | 48 h | |
| 8 | 1 | DMSO | NaH (2) | 90 °C | 16 h | |
| 9 ⁵⁴ | 1 | DMF | NaH (2) | 90 °C | 16 h | |
| 10 ⁵⁵ | 1 | DMF | K ₂ CO ₃ (2)** | 70 °C | 16 h | |
| 11 ⁵⁶ | 1 | DMF | K ₂ CO ₃ (1) | 100 °C | 4 h | |
| 12 | 1,2 | DMSO | NaH (5) | 80 °C | 4 d | |
| 13 | 2,4 | DMSO | NaH (1,6) | 140 °C | 6 d | |
| 14 | 2,4 | DMSO | K ₂ CO ₃ (1,6) | 140 °C | 6 d | |
| 15 | 2,4 | DMSO | NaH (1,6) | 120 °C | 16 h | 18 % |
| 16 | 1,2 | DMSO | NaH (1,6) | 120 °C | 4 d | 13 % |

* ∅ – žádná konverze; není-li výtěžek uveden, produkt byl pozorován na TLC, ale nebyl separován kvůli příliš malé konverzi

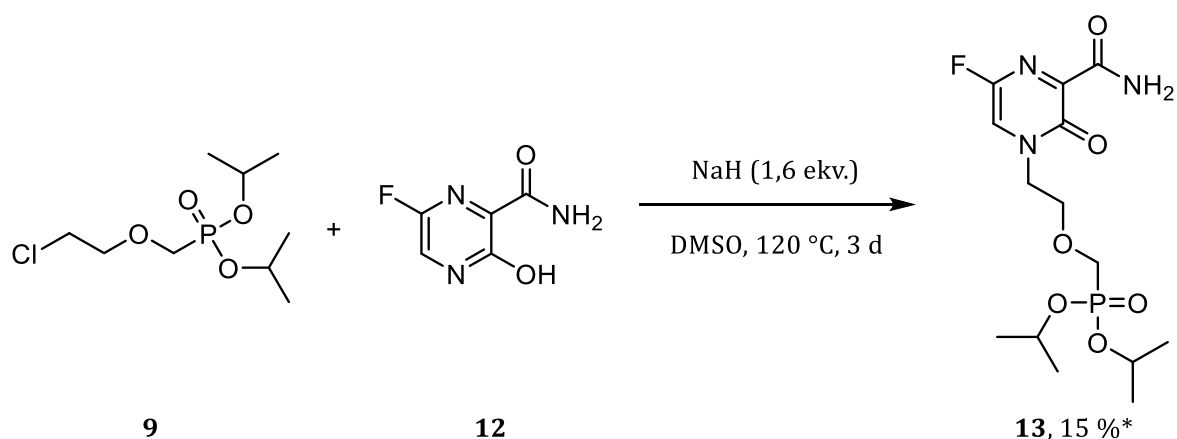
** přidavek KI (1 ekv.) s cílem výměny atomu chloru za atom jodu v molekule **9**

Ve všech reakcích (kromě reakce 4) byl pozorován vznik produktu. Nejprve byl použit DMF jako rozpouštědlo a hydrid sodný jako báze (reakce 1-3), bohužel bylo dosaženo pouze malých výtěžků. Byla vyzkoušena změna báze – hydridu sodného za uhličitan draselný (reakce 4, 7, 10, 11 a 14), hydrid jakožto silnější báze se však ukázal jako lepší možnost. Zároveň byly zkoušeny různé ekvivalenty bází (reakce 5, 6 a 12), nadbytek 5 ekvivalentů hydridu v reakci 12 však způsoboval rozklad výchozí látky **9**. Nejlepší konverze na produkt bylo dosaženo při reakcích v DMSO (reakce 8, 12-16), protože se v něm báze **10** lépe rozpouští. Do reakce 10 byl přidán KI s cílem výměny atomu chloru za atom jodu v molekule **9**, a tím získání lepší odstupující skupiny. Přestože byla

v literatuře⁵⁵ reakce prováděna se stejnou dusíkatou bází, pouze s ethylovými chránícími skupinami na fosfonátu, nebylo pozorováno zvýšení konverze. Také reakce 9 a 11 byly provedeny analogicky s literaturou^{54,56}, v článcích však byly připravovány deriváty purinových bází. Z důvodu citlivosti fosfonátu **9** na rozklad v reakční směsi byly reakce 13, 14 a 15 nasazeny nejdříve z 1,2 ekvivalentů fosfonátu a po cca polovině reakční doby bylo přidáno stejné množství znovu.

4.4. Diisopropyl {[2-(3-karbamoyl-5-fluor-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl}fosfonát

Reakce fosfonátu s dusíkatou bází T-705 (schéma 3) byla provedena analogicky jako reakce s T-1105. Delším reakčním časem se nepodařilo zvýšit konverzi, po 5 dnech zahřívání na 120 °C docházelo k rozkladu produktu pozorovaného na TLC, ale také částečnému rozkladu zbývající báze **12**.



*30 % nečistot dle ¹H NMR

Schéma 3. Příprava fosfonátu s T-705

Při separaci sloupcovou chromatografií byl izolován vedlejší produkt, který mohl být stejně jako hlavní produkt detekován pomocí UV záření. Nepodařilo se ho však oddělit úplně ani při druhé sloupcové chromatografii s pomalejší mobilní fází. Bylo změřeno NMR spektrum, ze kterého bylo zjištěno, že připravená látka **13** obsahuje asi 30 % nečistoty. Podle naměřeného MS spektra odpovídá vedlejšímu produktu hodnota $m/z = 582$, což naznačuje dvojitou substituci báze acyklickým řetězcem a zároveň ztrátu

fluoru. Nestabilita fluoru ve struktuře T-705 je jev popsáný v literatuře³⁵. Další čištění produktu pomocí HPLC nebylo z časových a technických (porucha HPLC pumpy) důvodů dokončeno.

4.5. Diisopropyl [(2-hydroxyethoxy)methyl]fosfonát

Diisopropyl [(2-hydroxyethoxy)methyl]fosfonát byl připraven za účelem získání lepší odstupující skupiny (schéma 4), neboť hydroxylovou skupinu je možné dále převést na velmi dobře odstupující trifluormethansulfonát. Hydrolyzu alkyhalogenidů lze provádět za přítomnosti stříbrných iontů a vody⁵⁷. Reakce byla provedena za různých podmínek, které jsou uvedeny v tabulce 2.

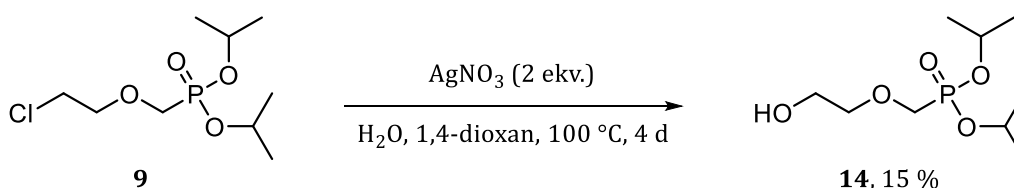


Schéma 4. Hydrolyza chloridu fosfonátu

Tabulka 2. Podmínky přípravy látky **14**

| číslo reakce | zdroj Ag ⁺ | rozpuštědlo | teplota | doba reakce | výtěžek |
|--------------|-----------------------|------------------------------------|---------|-------------|---------|
| 1 | Ag ₂ O | H ₂ O/THF 1/1 | 70 °C | 11 d | ∅ |
| 2 | AgNO ₃ | H ₂ O/THF 1/1 | 70 °C | 11 d | ∅ |
| 3 | AgNO ₃ | H ₂ O/DMF 1/1 | 80 °C | 2 d | ∅ |
| 4 | AgNO ₃ | H ₂ O/butanol 2/1 | 90 °C | 6 d | < 10 % |
| 5 | AgNO ₃ | H ₂ O/ethylenglykol 2/1 | 90 °C | 6 d | < 10 % |
| 6 | AgNO ₃ | H ₂ O/1,4-dioxan 2/1 | 100 °C | 4 d | 15 % |

Při prvních dvou reakcích (reakce 1 a 2) nebyl pozorován vznik produktu. Při reakci 3 v DMF byl pomocí MS pozorován vznik produktu reakce výchozí látky **9** s rozpouštědlem. V reakci 4 vznikalo malé množství produktu. Produkt vznikal také v reakci 5, ale opět zde byl MS potvrzen majoritní produkt reakce s rozpouštědlem. Optimálním rozpouštědlem byl 1,4-dioxan. Nejvyšší použitelná teplota byla 100 °C, při

110 °C začínalo docházet k rozkladu výchozí látky i produktu na produkty nedetekovatelné na TLC pomocí KMnO_4 . Reakce byla zastavena po vymizení výchozí látky z reakční směsi.

4.6. 2-[(Diisopropoxyfosforyl)methoxy]ethyl trifluormethansulfonát

Triflace hydroxyfosfonátu byla provedena běžnou metodou⁵⁸ použitím anhydridu kyseliny trifluormethansulfonové (schéma 5). Jako báze byl místo triethylaminu nebo pyridinu použit 2,6-lutidin, protože je více stericky bráněný, a tím je snížena pravděpodobnost jeho reakce s triflačním činidlem. Jako rozpouštědlo byl použit bezvodý THF a reakce byla provedena za chlazení suchým ledem při teplotě $-78\text{ }^\circ\text{C}$.

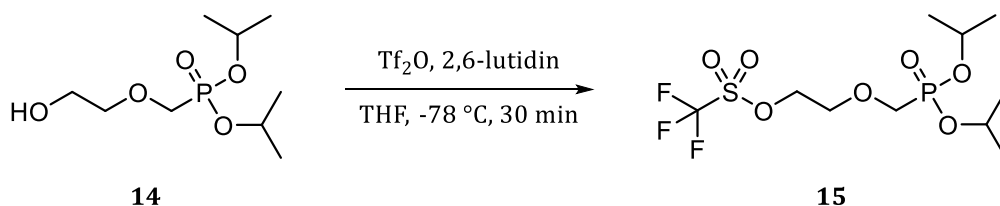


Schéma 5. Triflace diisopropyl [(2-hydroxyethoxy)methyl]fosfonátu

Pro vysokou citlivost produktu na vodu nebyl vznik produktu ověřován klasickými metodami (TLC, MS, NMR) a ihned byla přidána dusíkaté báze **10** pro provedení následující reakce.

4.7. Diisopropyl {[2-(3-karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy)methyl} fosfonát připravený z fosfonátu s triflátovou skupinou

Roztok deprotonované báze v bezvodém DMF byl přidán k reakční směsi z předchozí reakce (schéma 6). Vznik produktu **11** však nebyl pozorován pomocí TLC, MS ani ^1H NMR. Ke vzniku meziproductu **15** buď vůbec nedošlo, mohl být hydrolyzován, nebo nedošlo k reakci s dusíkatou bází **10**. Všechny tyto hypotézy budou dále zkoumány. Další pokusy budou provedeny modifikací použitých podmínek (rozpouštědlo, reakční doba, koncentrace výchozích látek v reakční směsi).

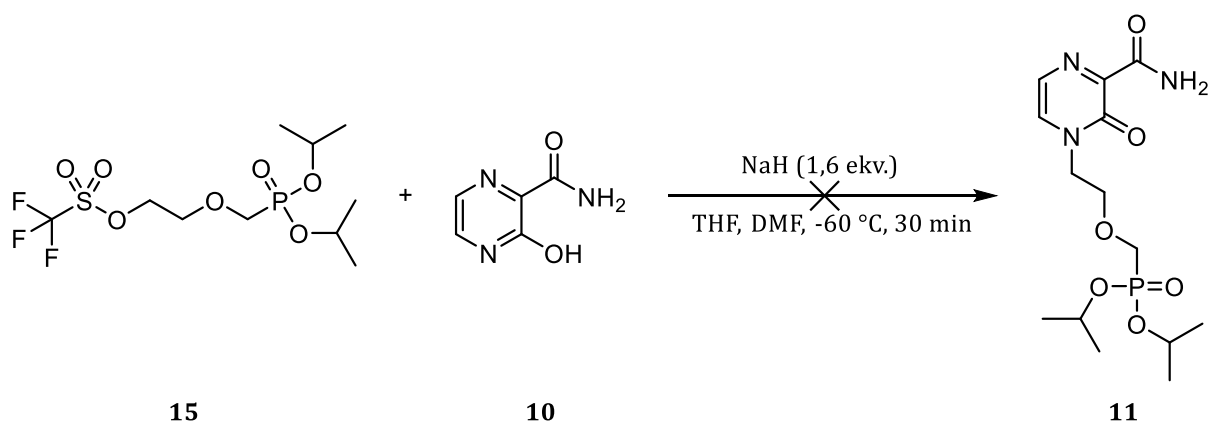


Schéma 6. Reakce T-1105 s fosfonátem s triflátem jakou odstupující skupinou

4.8. {[2-(3-Karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl}fosfonová kyselina

Hydrolýza isopropylových chránících skupin za účelem získání cílového 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivátu báze T-1105 byla nejprve zkoušena metodou často citovanou v literatuře^{59,60}, reakcí s trimethylsilyl bromidem v acetonitrilu za laboratorní teploty přes noc. Na TLC však byla pozorována nízká konverze. Byla-li reakce ponechána míchat dva dny, produkt již nebyl pozorován na TLC. Kromě vzniku volné fosfonové kyseliny byl pozorován vznik vedlejšího produktu, částečně odchráněného monoesteru. Tento jev je též zmiňován v literatuře⁴⁵.

Byla vyzkoušena alternativní metoda hydrolýzy pomocí minerálních kyselin, konkrétně HCl, v mikrovlnném reaktoru. Tato metoda je vhodná k hydrolýze řady diisopropylesterů a diethylesterů ANP na odpovídající volné fosfonové kyseliny⁴⁸. Za použití této metody (schéma 7) byla konverze pozorovaná na TLC výrazně vyšší a zároveň byl omezen vznik vedlejších produktů.

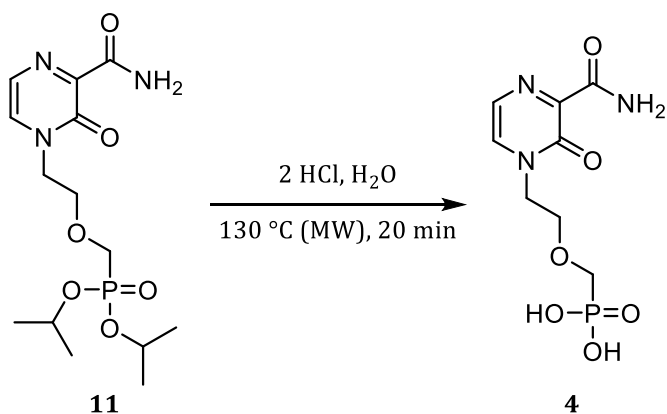


Schéma 7. Odchránění acyklického nukleosidfosfonátu s T-1105

Nejprve byla vyzkoušena separace pomocí silného anexu v acetátové formě, což je často používaný způsob^{43,59–61}. Tato metoda se však ukázala jako nepříliš efektivní a velmi časově náročná. Produkt bylo třeba vymývat velkým množstvím rozpouštědla a nepodařilo se ho vymýt všechen. Byla tedy provedena separace pomocí sloupcové chromatografie následovaná převodem amonné soli produktu zpět na kyselinu pomocí silného katexu. Z ¹H NMR spektra bylo zjištěno 25 % nečistot, nicméně přítomnost produktu se potvrdila. Další separace nebyla z časových důvodů provedena.

4.9. [({[2-(3-Karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl}fosforyl)bis(oxy)]bis(methylen) bis(2,2-dimethylpropanoát)

Přestože požadovaná fosfonová kyselina nebyla připravena v dostatečné čistotě, byla z časových důvodů nasazena jedna orientační reakce s chlormethyl pivalátem **16** (schéma 8). Reakce byla provedena v DMF při laboratorní teplotě za použití triethylaminu jako báze⁶².

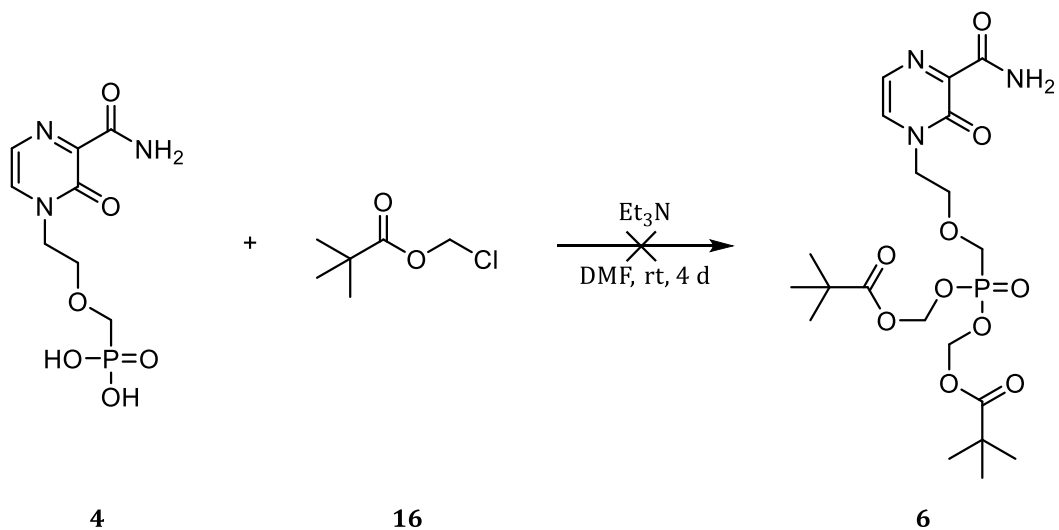


Schéma 8. Příprava proléčiva ANP s T-1105

Pravděpodobně z důvodu interference nečistot nedošlo ke vzniku produktu, nebyl detekován pomocí TLC ani MS. Po přečištění výchozí látky **4** bude vyzkoušen jiný přístup k syntéze za použití silnější báze – DBU a vyšší koncentrace výchozích látek v reakční směsi⁶³.

5. Experimentální část

5.1. Obecné postupy a chemikálie

Použité chemikálie byly zakoupeny od firem Manchester Organics (T-705), Fluorochem (T-1105, 1-chlor-2-(chlormethoxy)ethan), Sigma-Aldrich (triisopropyl fosfit, hydrid sodný, deuterovaná rozpouštědla, trimethylsilyl bromid), Penta (AgNO_3 , kyselina octová) a Lach-ner (kyselina chlorovodíková). Hydrid sodný byl použit ve formě 60% suspenze v minerálním oleji. Všechna rozpouštědla byla před použitím destilována, voda byla deionizovaná.

Pro sloupcovou chromatografii byl použit silikagel 60 (40–63 μm) od firmy Merck, silný katex Dowex 50WX8 od firmy Sigma-Aldrich a silný anex Dowex 2X8 od firmy Fluka. Pro TLC byly použity silikagelové destičky 60 F₂₅₄ od firmy Merck. Používané mobilní fáze byly následující:

S1: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20/1

S2: DCM/MeOH 7/1

S3: $\text{DCM}/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 7/1/0,1

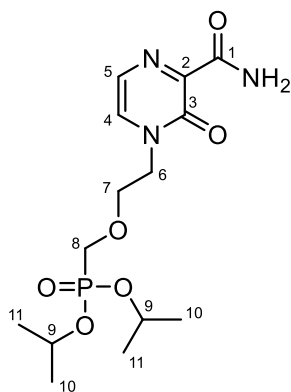
S4: $\text{PrOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3$ 6/3/1.

Aromatické látky byly detekovány pomocí UV záření o vlnové délce 366 nm, alkylační činidla ponořením do 1% roztoku 4-(4-nitrobenzoyl)pyridinu v ethanolu, zahřátím horkovzdušnou pistolí a následným ponořením do vodného roztoku amoniaku. Dále byl k detekci použit bazický roztok manganistanu draselného (1,5 g KMnO_4 , 10 g K_2CO_3 a 1,25 ml 10% NaOH v 200 ml vody).

K odpařování rozpouštědel byla používána rotační vakuová odparka Büchi při teplotě 40 °C, následně byly produkty dosušovány za sníženého tlaku pomocí olejové vývěvy při teplotách do 80 °C.

Pro měření infračervených spekter byly vzorky smíchány s KBr a byl použit přístroj Thermo Nicolet AVATAR 370 FT-IR s metodou DRIFT.

NMR spektra byla pořízena pomocí přístroje Bruker AVANCE III HD 400. Jako rozpouštědla byly použity CDCl_3 , D_2O a CD_3OD . Všechny chemické posuny jsou uvedeny v jednotkách ppm. Přiřazování spekter bylo prováděno za pomoci DEPT a 2D spekter (COSY, HSQC, HMBC). Ve výpisech spekter jsou desetinné čárky nahrazeny desetinnými tečkami pro větší přehlednost. Příklad číslování atomů ve výpisech spekter je uveden na obrázku 21.

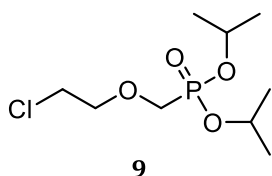


Obr. 21. Příklad číslování atomů ve výpisech spekter

Hmotnostní spektra byla měřena pomocí přístroje LCMS 2020 Shimadzu s ionizací elektrosprejem. Vzorky byly rozpuštěny v methanolu.

5.2. Pracovní postupy

5.2.1. Diisopropyl [(2-chlorethoxy)methyl]fosfonát (9)



K výchozí látce **7** (7,74 g, 60,0 mmol) byl během 90 minut přikapán triisopropyl fosfit **8** (12,5 ml, 54,6 mmol) při 90 °C za stálého míchání pod argonovou atmosférou. Poté byla teplota zvýšena na 125 °C a reakce byla míchána přes noc. Nadbytek výchozí látky **7** byl hydrolyzován směsí 30 ml THF a 30 ml 0,5% HCl. Produkt byl extrahován 3 × 100 ml toluenu, organická fáze byla dosušena síranem hořečnatým. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO a pomocí olejové pumpy. Produktem byla jemně žlutá olejovitá kapalina, výtěžek činil 85 %.

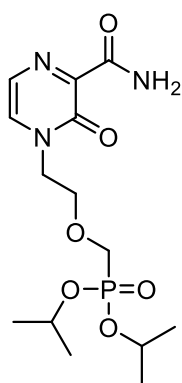
$R_F = 0,5$ (S1)

Naměřená ^1H NMR a ^{13}C NMR odpovídají publikaci⁶⁴.

Pro $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{ClO}_4\text{P}$ vypočtena $M_r = 258.08$, ESI-MS: m/z 259 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 281 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

5.2.2. Diisopropyl {[2-(3-karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl}fosfonát

(11)



11

Dusíkatá báze **10** (100 mg, 0,719 mmol) byla rozpuštěna v 3 ml suchého DMSO a za chlazení ledem a pod argonovou atmosférou byl přidán 60% NaH (46 mg, 1,15 mmol) a ponecháno 1 hodinu míchat. Dále byl přidán fosfonát **9** (223 mg, 0,863 mmol), teplota byla zvýšena na 120 °C a reakční směs byla míchána dvě hodiny. Bylo přidáno znovu stejné množství fosfonátu **9** a reakční směs byla ponechána míchat přes noc. Poté bylo zahřívání zastaveno a reakce byla ukončena přidávkem 20 ml vody. Produkt byl extrahován 3 × 50 ml vroucího chloroformu. Organická fáze byla přes noc dosušena síranem hořečnatým. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie za použití 24 g silikagelu a mobilní fáze DCM/MeOH 12/1. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO a produkt byl dosušen na olejové vývěvě. Výtěžek činil 46,3 mg, tedy 18 %.

$R_F = 0,4$ (S2)

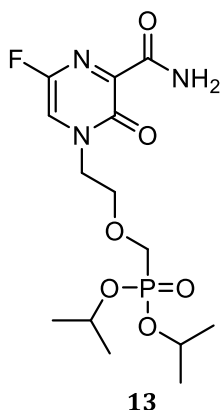
IR(KBr): 3372 ν (N-H), 2980 ν (C-H), 2929 ν (C-H), 2875 ν (C-H), 1676 ν (C=O), 1649 ν (C=O), 1242 ν (P=O), 1222 ν (P=O), 991 ν (P-OR) cm^{-1}

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.27$ (d, $J = 6.2$ Hz, 6 H, 10-H, 11-H); 1.30 (d, $J = 6.2$ Hz, 6 H, 10-H, 11-H); 3.71 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, 8-H); 3.93 (t, $J = 4.9$ Hz, 2 H, 6-H); 4.25 (t, $J = 4.5$ Hz, 2 H, 7-H); 4.69 (m, 2 H, 9-H); 6.18 (bs, 1 H, N-H); 7.61 (d, $J = 3.9$ Hz, 1 H, 5-H); 7.70 (d, $J = 4.0$ Hz, 1 H, 4-H); 9.20 (bs, 1 H, N-H)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 24.01$ (C_{10} , C_{11}); 24.05 (C_{10} , C_{11}); 50.16 (C_6); 66.11 (d, $J = 168.5$ Hz, C_8); 69.58 (d, $J = 10.3$ Hz, C_9); 71.28 (d, $J = 6.6$ Hz, C_7); 124.35 (C_4); 133.92 (C_5); 143.81 (C_2); 156.06 (C_3); 163.29 (C_1)

Pro $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}$ vypočtena $M_r = 361.14$, ESI-MS: m/z 362 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 384 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

5.2.3. Diisopropyl {[2-(3-karbamoyl-5-fluor-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl} fosfonát (13)



Dusíkatá báze **12** (100 mg, 0,636 mmol) byla rozpuštěna v 3 ml suchého DMSO a za chlazení ledem a pod argonovou atmosférou byl přidán 60% NaH (41 mg, 1,02 mmol) a ponecháno 1 hodinu míchat. Dále byl přidán fosfonát **9** (187 mg, 0,863 mmol), teplota byla zvýšena na 120 °C a reakční směs byla míchána přes noc. Bylo přidáno znovu stejné množství fosfonátu **9** a reakční směs byla ponechána míchat další dva dny. Poté bylo zahřívání zastaveno a reakce byla ukončena přidávkem 20 ml vody. Produkt byl extrahován 3 × 50 ml vroucího chloroformu. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie za použití 24 g silikagelu a mobilní fáze DCM/MeOH/NH₃ 25/1/0,1. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO a produkt byl dosušen na olejové vývěvě. Produkt musel být znovu přečištěn sloupcovou chromatografií za použití 2,5 g silikagelu a mobilní fáze DCM/MeOH/NH₃ 50/1/0,1. Proměřením NMR spekter však byla zjištěna nečistota*, neseparovaný výtěžek činil 10,5 %.

$R_F = 0,7$ (S3)

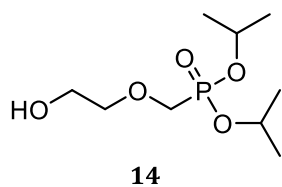
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 1.30$ (d, $J = 6.8$ Hz, 6 H, 10-H, 11-H); 1.33 (d, $J = 7.1$ Hz, 6 H, 10-H, 11-H); 3.80 (m, nečistota*) 3.84 (d, $J = 8.2$ Hz, 2 H, 8-H); 4.01 (t, $J = 4.7$ Hz, 2 H, 7-H); 4.63 (t, $J = 4.6$ Hz, 2 H, 6-H); 4.73 (m, 2 H, 9-H); 6.12 (bs, 1 H, N-H); 7.69 (bs, 1 H, N-H); 8.11 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H, 4-H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 24.11$ (C₁₀, C₁₁); 66.20 (d, $J = 167.9$ Hz, C₈); 67.17 (C₆); 70.84 (d, $J = 10.2$ Hz, C₇); 71.31 (d, $J = 6.7$ Hz, C₉); 75.21 (d, $J = 9.2$ Hz, C₄); 131.70 (d, $J = 41.3$ Hz, C₅); 153.41 (C₂); 155.86 (C₃); 162.91 (C₁)

Pro C₁₄H₂₃FN₃O₆P vypočtena $M_r = 379.13$, ESI-MS: m/z 380 [M + H]⁺, 402 [M + Na]⁺

*výtěžek znečištěného produktu (po separaci na druhé koloně) činil 15 %, z NMR spektra byla zjištěna 30% nečistota, teoretický výtěžek produktu bez finální separace byl 10,5 %

5.2.4. Diisopropyl [(2-hydroxyethoxy)methyl]fosfonát (14)



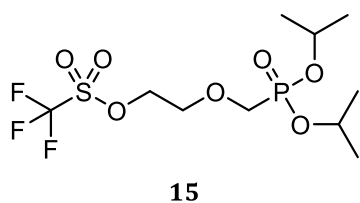
Chlorid fosfonátu **9** (20 mg, 78 μmol) byl rozpuštěn v 0,2 ml 1,4-dioxanu a 0,4 ml vody. Byl přidán AgNO_3 (26 mg, 155 μmol) a reakční směs byla za stálého míchání zahřívána 4 dny na 100 °C.

Po vymizení výchozí látky na TLC byla rozpouštědla odpařena. Reakční směs byla absorbována na 100 mg silikagelu a produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie za použití 2 g silikagelu a mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 50/1. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO a produkt byl dosušen na olejové vývěvě. Výtěžek činil 15 %.

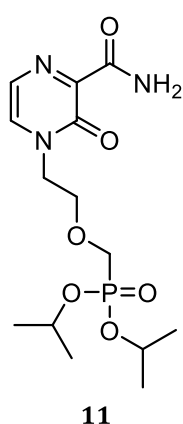
$R_F = 0,2$ (S1)

Pro $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{O}_5\text{P}$ vypočtena $M_r = 240.11$, ESI-MS: m/z 241 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 263 $[\text{M} + \text{Na}]^+$

5.2.5. Diisopropyl {[2-(3-karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl}fosfonát (11) připravený z fosfonátu s triflátovou skupinou (15)

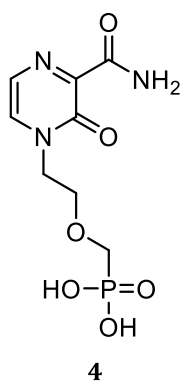


Fosfonát s hydroxylovou skupinou **14** (2 mg, 8 μmol) byl rozpuštěn v 0,15 ml bezvodého THF a byl přidán 2,6-lutidin (4,1 μl , 42 μmol). Pod argonovou atmosférou a za chlazení suchým ledem na teplotu -78 °C byl přidán anhydrid



kyseliny trifluormethansulfonové (7,0 μl , 42 μmol). Dusíkatá báze **10** (5 mg, 14 μmol) byla rozpuštěna v 0,5 ml bezvodého DMF a byl přidán NaH (2,3 mg, 58 μmol). Po 30 minutách byl roztok deprotonované dusíkaté báze **10** přidán do chlazené reakční směsi. Teplota byla zvýšena na -60 °C, aby nedošlo ke zmrznutí DMF. Vznik produktu nebyl detekován pomocí TLC ani MS.

5.2.6. {[2-(3-Karbamoyl-2-oxopyrazin-1-yl)ethoxy]methyl}fosfonová kyselina (4)



Acyklický nukleosidfosfonát s isopropylovými skupinami **11** (36 mg, 0,1 mmol) byl rozpuštěn v 0,4 ml 0,5M HCl a byla provedena reakce v mikrovlnném reaktoru při teplotě 130 °C po dobu 20 minut. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie za použití 3,6 g silikagelu a mobilní fáze PrOH/H₂O/NH₃ 10/3/1. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO a produkt byl dosušen na olejové vývěvě. 1 ml silného katexu byl promyt 5 ml 5% NaOH, deionozovanou vodou do neutrálního pH, 5 ml 5% HCl a znovu vodou do neutrálního pH. Produkt rozpuštěný v 1 ml vody byl nanesen na katex a vymyt cca 10 ml vody. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO a produkt byl dosušen na olejové vývěvě. Z ¹H NMR spektra bylo zjištěno 25 % nečistot. Další separace nebyla z časových důvodů provedena.

$R_F = 0,4$ (S4)

Z důvodu interference nečistot nebylo možné změřit MS spektrum ani látku charakterizovat pomocí ¹H NMR a ¹³C NMR.

6. Závěr

V rámci této bakalářské práce byly připraveny deriváty acyklických nukleosidfosfonátů.

- Byl připraven postranní řetězec - (ethoxymethyl)fosfonát s isopropylovými chránícími skupinami a chlorem jako odstupující skupinou.
- Byl připraven 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivát dusíkaté báze T-1105 s isopropylovými chránícími skupinami. Byl proveden pokus o zvýšení výtěžku reakce výměnou odstupující skupiny na postranním řetězci – chloru za triflátovou skupinu. V tomto případě však nebyl vznik produktu pozorován.
- Byl připraven 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivát dusíkaté báze T-705 s isopropylovými chránícími skupinami. Finální čištění produktu pomocí HPLC nebylo z důvodu poruchy stroje dokončeno.
- Hydrolýzou isopropylových skupin byl získán 2-(fosfonomethoxy)ethyl derivát dusíkaté báze T-1105 ve formě volné kyseliny. Pomocí ^1H NMR bylo zjištěno asi 25 % nečistot, separace však nebyla z časových důvodů dokončena.
- Byla provedena orientační reakce fosfonové kyseliny s chlormethyl pivalátem pro přípravu proléčiva. Vznik produktu však nebyl pozorován.

7. Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala svému vedoucímu doc. RNDr. Jindřichu Jindřichovi, CSc. za výběr pro mne velice zajímavého tématu bakalářské práce, za její vedení, pohotové odpovědi na každý dotaz a neustálou snahu probudit ve mně motivaci a zápal pro věc.

Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z laboratoří 131 a 135 za to, že byli vždy ochotni poradit s jakýmkoliv problémem a udržovali v laboratoři stále příjemnou atmosféru. Především pak děkuji Mgr. Ivetě Cheně Tiché a Mgr. Petru Kasalovi za rady s přiřazováním NMR spekter, za obrovskou pomoc v začátcích práce a nekonečnou trpělivost při každé konzultaci.

Poděkování patří také prof. Lieve Naesens a jejímu týmu za umožnění návštěvy jejich laboratoří na KU Leuven v Belgii a pomoc s pochopením biologické části problematiky.

8. Literatura

- (1) Clercq, E. D.; Holý, A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4* (11), 928.
- (2) Vanderlinden, E.; Vrancken, B.; Van Houdt, J.; Rajwanshi, V. K.; Gillemot, S.; Andrei, G.; Lemey, P.; Naesens, L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (11), 6679.
- (3) Iuliano, A. D.; Roguski, K. M.; Chang, H. H.; Muscatello, D. J.; Palekar, R.; Tempia, S.; Cohen, C.; Gran, J. M.; Schanzer, D.; Cowling, B. J.; Wu, P.; Kyncl, J.; Ang, L. W.; Park, M.; Redlberger-Fritz, M.; Yu, H.; Espenhain, L.; Krishnan, A.; Emukule, G.; van Asten, L.; Pereira da Silva, S.; Aungkulanon, S.; Buchholz, U.; Widdowson, M.-A.; Bresee, J. S.; Azziz-Baumgartner, E.; Cheng, P.-Y.; Dawood, F.; Foppa, I.; Olsen, S.; Haber, M.; Jeffers, C.; MacIntyre, C. R.; Newall, A. T.; Wood, J. G.; Kundi, M.; Popow-Kraupp, T.; Ahmed, M.; Rahman, M.; Marinho, F.; Sotomayor Proschle, C. V.; Vergara Mallegas, N.; Luzhao, F.; Sa, L.; Barbosa-Ramírez, J.; Sanchez, D. M.; Gomez, L. A.; Vargas, X. B.; Acosta Herrera, aBetsy; Llanés, M. J.; Fischer, T. K.; Krause, T. G.; Mølbak, K.; Nielsen, J.; Trebbien, R.; Bruno, A.; Ojeda, J.; Ramos, H.; an der Heiden, M.; del Carmen Castillo Signor, L.; Serrano, C. E.; Bhardwaj, R.; Chadha, M.; Narayan, V.; Kosen, S.; Bromberg, M.; Glatman-Freedman, A.; Kaufman, Z.; Arima, Y.; Oishi, K.; Chaves, S.; Nyawanda, B.; Al-Jarallah, R. A.; Kuri-Morales, P. A.; Matus, C. R.; Corona, M. E. J.; Burmaa, A.; Darmaa, O.; Obtel, M.; Cherkaoui, I.; van den Wijngaard, C. C.; van der Hoek, W.; Baker, M.; Bandaranayake, D.; Bissielo, A.; Huang, S.; Lopez, L.; Newbern, C.; Flem, E.; Grøneng, G. M.; Hauge, S.; de Cosío, F. G.; de Moltó, Y.; Castillo, L. M.; Cabello, M. A.; von Horoch, M.; Medina Osis, J.; Machado, A.; Nunes, B.; Rodrigues, A. P.; Rodrigues, E.; Calomfirescu, C.; Lupulescu, E.; Popescu, R.; Popovici, O.; Bogdanovic, D.; Kostic, M.; Lazarevic, K.; Milosevic, Z.; Tiodorovic, B.; Chen, M.; Cutter, J.; Lee, V.; Lin, R.; Ma, S.; Cohen, A. L.; Treurnicht, F.; Kim, W. J.; Delgado-Sanz, C.; de mateo Ontañón, S.; Larrauri, A.; León, I. L.; Vallejo, F.; Born, R.; Junker, C.; Koch, D.; Chuang, J.-H.; Huang, W.-T.; Kuo, H.-W.; Tsai, Y.-C.; Bundhamcharoen, K.; Chittaganpitch, M.; Green, H. K.; Pebody, R.; Goñi, N.; Chiparelli, H.; Brammer, L.; Mustaquim, D. *The Lancet* **2018**, *391* (10127), 1285.
- (4) Potter, C. W. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91* (4), 572.
- (5) Viboud, C.; Simonsen, L.; Fuentes, R.; Flores, J.; Miller, M. A.; Chowell, G. *J. Infect. Dis.* **2016**, *213* (5), 738.
- (6) Viboud, C.; Grais, R. F.; Lafont, B. A. P.; Miller, M. A.; Simonsen, L.; Multinational Influenza Seasonal Mortality Study Group. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192* (2), 233.
- (7) Dawood, F. S.; Iuliano, A. D.; Reed, C.; Meltzer, M. I.; Shay, D. K.; Cheng, P.-Y.; Bandaranayake, D.; Breiman, R. F.; Brooks, W. A.; Buchy, P.; Feikin, D. R.; Fowler, K. B.; Gordon, A.; Hien, N. T.; Horby, P.; Huang, Q. S.; Katz, M. A.; Krishnan, A.; Lal, R.; Montgomery, J. M.; Mølbak, K.; Pebody, R.; Presanis, A. M.; Razuri, H.; Steens, A.; Tinoco, Y. O.; Wallinga, J.; Yu, H.; Vong, S.; Bresee, J.; Widdowson, M.-A. *Lancet Infect. Dis.* **2012**, *12* (9), 687.
- (8) Longo, D.; Fauci, A.; Kasper, D.; Hauser, S.; Jameson, J.; Loscalzo, J. *Harrison's Manual of Medicine, 18th Edition*; McGraw-Hill Professional: New York, 2012.
- (9) Ito, T.; Castrucci, M. R.; Donatelli, I.; Kida, H.; Paulson, J. C.; Webster, R. G.; Kawaoka, Y. *J. VIROL* **1998**, *72*, 7.
- (10) Olsen, C. W. *Virus Res.* **2002**, *85* (2), 199.
- (11) Webster, R. G.; Bean, W. J.; Gorman, O. T.; Chambers, T. M.; Kawaoka, Y. *Microbiol. Rev.* **1992**, *56* (1), 152.
- (12) Wu, Y.; Wu, Y.; Tefsen, B.; Shi, Y.; Gao, G. F. *Trends Microbiol.* **2014**, *22* (4), 183.

- (13) Neumann, G.; Noda, T.; Kawaoka, Y. *Nature* **2009**, *459* (7249), 931.
- (14) Horimoto, T.; Kawaoka, Y. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (8), 591.
- (15) Vanderlinden, E.; Naesens, L. *Med. Res. Rev.* **2014**, *34* (2), 301.
- (16) Stevaert, A.; Naesens, L. *Med. Res. Rev.* **2016**, *36* (6), 1127.
- (17) Fodor, E. *Acta Virol.* **2013**, *57* (02), 113.
- (18) Das, K.; Aramini, J. M.; Ma, L.-C.; Krug, R. M.; Arnold, E. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17* (5), 530.
- (19) Pinto, L. H.; Lamb, R. A. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (14), 8997.
- (20) Deyde, V. M.; Xu, X.; Bright, R. A.; Shaw, M.; Smith, C. B.; Zhang, Y.; Shu, Y.; Gubareva, L. V.; Cox, N. J.; Klimov, A. I. *J. Infect. Dis.* **2007**, *196* (2), 249.
- (21) Connolly, B. S.; Lang, A. E. *JAMA* **2014**, *311* (16), 1670.
- (22) von Itzstein, M. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (12), 967.
- (23) Moscona, A. *N. Engl. J. Med.* **2005**, 11.
- (24) Moscona, A. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360* (10), 953.
- (25) Nguyen-Van-Tam, J. S.; Venkatesan, S.; Muthuri, S. G.; Myles, P. R. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015**, *21* (3), 222.
- (26) Ison, M. G. *Clin. Chest Med.* **2017**, *38* (1), 139.
- (27) Skehel, J. J.; Wiley, D. C. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69* (1), 531.
- (28) Corti, D.; Cameroni, E.; Guarino, B.; Kallewaard, N. L.; Zhu, Q.; Lanzavecchia, A. *Curr. Opin. Virol.* **2017**, *24*, 60.
- (29) Leneva, I. A.; Burtseva, E. I.; Yatsyshina, S. B.; Fedyakina, I. T.; Kirillova, E. S.; Selkova, E. P.; Osipova, E.; Maleev, V. V. *Int. J. Infect. Dis.* **2016**, *43*, 77.
- (30) Stevaert, A.; Dallochio, R.; Dessi, A.; Pala, N.; Rogolino, D.; Sechi, M.; Naesens, L. *J. Virol.* **2013**, *87* (19), 10524.
- (31) Byrn, R. A.; Jones, S. M.; Bennett, H. B.; Bral, C.; Clark, M. P.; Jacobs, M. D.; Kwong, A. D.; Ledebor, M. W.; Leeman, J. R.; McNeil, C. F.; Murcko, M. A.; Nezami, A.; Perola, E.; Rijnbrand, R.; Saxena, K.; Tsai, A. W.; Zhou, Y.; Charifson, P. S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59* (3), 1569.
- (32) Furuta, Y.; Takahashi, K.; Shiraki, K.; Sakamoto, K.; Smee, D. F.; Barnard, D. L.; Gowen, B. B.; Julander, J. G.; Morrey, J. D. *Antiviral Res.* **2009**, *82* (3), 95.
- (33) Furuta, Y.; Gowen, B. B.; Takahashi, K.; Shiraki, K.; Smee, D. F.; Barnard, D. L. *Antiviral Res.* **2013**, *100* (2), 446.
- (34) Naesens, L.; Guddat, L. W.; Keough, D. T.; van Kuilenburg, A. B. P.; Meijer, J.; Vande Voorde, J.; Balzarini, J. *Mol. Pharmacol.* **2013**, *84* (4), 615.
- (35) Huchting, J.; Winkler, M.; Nasser, H.; Meier, C. *ChemMedChem* **2017**, *12* (9), 652.
- (36) Furuta, Y.; Takahashi, K.; Kuno-Maekawa, M.; Sangawa, H.; Uehara, S.; Kozaki, K.; Nomura, N.; Egawa, H.; Shiraki, K. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49* (3), 981.
- (37) Oestereich, L.; Lüdtke, A.; Wurr, S.; Rieger, T.; Muñoz-Fontela, C.; Günther, S. *Antiviral Res.* **2014**, *105*, 17.
- (38) Yamada, K.; Noguchi, K.; Komeno, T.; Furuta, Y.; Nishizono, A. *J. Infect. Dis.* **2016**, *213* (8), 1253.
- (39) Jochmans, D.; van Nieuwkoop, S.; Smits, S. L.; Neyts, J.; Fouchier, R. A. M.; van den Hoogen, B. G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60* (8), 4620.
- (40) De Clercq, E.; Holý, A.; Rosenberg, I.; Sakuma, T.; Balzarini, J.; Maudgal, P. C. *Nature* **1986**, *323* (6087), 464.
- (41) Barral, K.; Priet, S.; Sire, J.; Neyts, J.; Balzarini, J.; Canard, B.; Alvarez, K. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (26), 7799.
- (42) Holý, A. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1978**, *43* (8), 2054.

- (43) Holý, A.; Votruba, I.; Tloušťová, E.; Masojídková, M. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **2001**, *66* (10), 1545.
- (44) Holy, A. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9* (31), 2567.
- (45) Jones, D. J.; O'Leary, E. M.; O'Sullivan, T. P. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, *15*, 801.
- (46) Holý, A.; Dvořáková, H.; Masojídková, M. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1995**, *60* (8), 1390.
- (47) Baszczyński, O.; Jansa, P.; Dračínský, M.; Klepetářová, B.; Holý, A.; Votruba, I.; Clercq, E. de; Balzarini, J.; Janeba, Z. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (7), 2114.
- (48) Jansa, P.; Baszczyński, O.; Procházková, E.; Dračínský, M.; Janeba, Z. *Green Chem.* **2012**, *14* (8), 2282.
- (49) Holý, A.; Günter, J.; Dvořáková, H.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (12), 2064.
- (50) Wiemer, A. J.; Wiemer, D. F. In *Phosphorus Chemistry I*; Montchamp, J.-L., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2014; Vol. 360, pp 115–160.
- (51) Starrett, J. E.; Tortolani, D. R.; Hitchcock, M. J. M.; Martin, J. C.; Mansuri, M. M. *Antiviral Res.* **1992**, *19* (3), 267.
- (52) Naesens, L.; Bischofberger, N.; Augustijns, P.; Annaert, P.; Van den Mooter, G.; Arimilli, M. N.; Kim, C. U.; De Clercq, E. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42* (7), 1568.
- (53) Peyrottes, S.; Villard, A.-L.; Coussot, G.; Augustijns, P.; Lefebvre, I.; Aubertin, A.-M.; Gosselin, G.; Perigaud, C. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, *52* (1), 539.
- (54) Holý, A.; Rosenberg, I.; Dvořáková, H. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1989**, *54* (8), 2190.
- (55) Jin, G. 3-oxide-2-methylamide derivatives as well as preparation method and use thereof. CN101230043, July 30, 2008.
- (56) Holý, A.; Dvořáková, H.; Jindřich; Masojídková, M.; Buděšínský, M.; Balzarini, J.; Andrei, G.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (20), 4073.
- (57) Ye, Z.; Zhang, X.; Zhu, Y.; Song, T.; Chen, X.; Lei, X.; Wang, C. *Mol. Pharm.* **2018**, *15* (6), 2413.
- (58) Pinto, S. M. A.; Lourenço, M. A. O.; Calvete, M. J. F.; Abreu, A. R.; Rosado, M. T. S.; Burrows, H. D.; Pereira, M. M. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (17), 7916.
- (59) Holý, A.; Votruba, I.; Masojídková, M.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Naesens, L.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (9), 1918.
- (60) Břehová, P.; Česnek, M.; Dračínský, M.; Holý, A.; Janeba, Z. *Tetrahedron* **2011**, *67* (38), 7379.
- (61) Krečmerová, M.; Jansa, P.; Dračínský, M.; Sázelová, P.; Kašička, V.; Neyts, J.; Auwerx, J.; Kiss, E.; Goris, N.; Stepan, G.; Janeba, Z. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (5), 1199.
- (62) Wu, M.; El-Kattan, Y.; Lin, T.-H.; Ghosh, A.; Kumar, V. S.; Kotian, P. L.; Cheng, X.; Bantia, S.; Babu, Y. S.; Chand, P. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, *24* (10–12), 1569.
- (63) Min, Y. S.; Lee, H. C. DH-type crystalline form of adefovir dipivoxil, preparing method thereof, and pharmaceutical composition for antiviral agent comprising the same. WO 2010/110506 A1, September 30, 2010.
- (64) Rejman, D.; Masojídková, M.; De Clercq, E.; Rosenberg, I. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20* (8), 1497.