

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Milan Štefek

Příprava fluorovaných karbocyklických derivátů nukleosidů jako potenciálních inhibitorů
virové replikace
Preparation of fluorinated carbocyclic derivatives of nucleosides as potential viral replication
inhibitors

Diplomová práce

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

Praha, 2019

Prohlášení:

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

V Praze, 28. 9. 2019

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému vedoucímu práce Mgr. Radimu Nenckovi, Ph.D. za projevenou důvěru, pomoc a vedení při této práci. Dále bych chtěl poděkovat Milanu Dejmkovi, Ph.D. a Michalu Šálovi, Ph.D. za cenné rady, pomoc při řešení celé řady problémů a především trpělivost. Dík patří také mým ostatním kolegům.

V neposlední řadě děkuji také své rodině za dlouhodobou podporu a mé přítelkyni, která mi byla oporou po celou dobu studií.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá přípravou fluorovaných derivátů karbocyklických nukleosidů, které by mohly sloužit jako inhibitory replikace flavivirů. Byly připravovány monofluorované i *gem*-difluorované analogy *ribo* i 2'-deoxyribonukleosidů. Zatímco pro přípravu monofluorovaných sloučenin byly nalezeny vhodné a poměrně spolehlivé syntetické cesty, syntéza *gem*-difluorovaných látek se ukázala jako velmi komplikovaná. Ačkoli se většina syntéz prezentovaných v této práci zabývala přípravou látek s adeninem jakožto nukleobazí, obecná aplikovatelnost vyvinutých postupů byla demonstrována přípravou molekuly guanosinového typu. Po optimalizaci by tedy mělo být možné uvedené reakční sekvence využít k přípravě rozsáhlejších sérií látek.

Klíčová slova: flaviviry, antivirotika, karbocyklické nukleosidy, fluorované nukleosidy

Abstract

This master thesis is dedicated to the preparation of fluorinated derivatives of carbocyclic nucleosides, that may serve as flaviviral replication inhibitors. Preparation of both monofluorinated as well as *gem*-difluorinated analogs of *ribo* and 2'-deoxyribonucleoside was attempted. While a suitable and reliable route for the preparation of monofluorinated compounds was found, synthesis of *gem*-difluorinated turned out to be rather challenging. Although most of the presented work dealt with compounds bearing adenine as a nucleobase, the universal applicability of the developed procedures, demonstrated on the preparation of a guanosine-type molecule, suggests that after slight optimization larger series of this type of compounds could be prepared.

Keywords: flaviviruses, antiviral agents, carbocyclic nucleosides, fluorinated nucleosides

Obsah

Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	4
Přehled zkratk.....	6
1 Úvod.....	9
2 Cíle práce.....	10
3 Přehled problematiky.....	11
3.1 Flaviviry a inhibitory jejich replikace.....	11
3.1.1 Flaviviry a jejich patogenita.....	11
3.1.2 Charakteristika virionu, RNA a proteomu flavivirů.....	11
3.2 Fluor a jeho využití v medicíně.....	14
3.2.1 Základní vlastnosti fluoru a přírodní organické látky obsahující fluor.....	14
3.2.2 Vliv zavedení fluoru na fyzikálně chemické vlastnosti molekuly.....	17
3.2.3 Vliv fluorace na metabolismus látek.....	22
3.2.4 Fluorované strukturní motivy a jejich bioisosterie.....	24
3.2.5 Metody fluorace využívané v medicíně.....	28
3.3 Fluorované deriváty nukleosidů s protivirovými účinky.....	33
3.3.1 Analogy nukleosidů s fluorací báze.....	34
3.3.2 Analogy nukleosidů s fluorací cukerné části.....	36
4 Diskuse a výsledky.....	38
4.1 Příprava karbocyklických nukleosidů.....	38
4.1.1 Příprava <i>gem</i> -difluorovaných derivátů nukleosidů.....	38
4.1.2 Příprava 6'-monofluorovaných derivátů.....	46
5 Experimentální část.....	51
5.1 Obecné postupy a chemikálie.....	51

5.2	Použité postupy a naměřená data.....	51
6	Závěr	68
7	Literatura	69

Přehled zkratk

ACN	Acetonitril
Ac	Acetyl
Acac	Acetylacetonát
Bz	Benzoyl
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dikyano-1,4-benzochinon
DMAP	N,N-dimethylaminopyridin
DMF	N,N-dimethylformamid
DCM	Dichlormethan
DIAD	Diisopropyl azodikarboxylát
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESI	Ionizace elektrosprejem
EtOAc	Ethylacetát
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HBV	Virus hepatitidy B
HCV	Virus hepatitidy C
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
HRMS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
MS	Hmotnostní spektrometrie
NA	Analog nukleosidu
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid
NIS	<i>N</i> -jodsukcinimid
NMMO	N-methylmorfolin N-oxid

NS	Nestrukturní protein
NTP	Nukleosidtrifosfát
ORF	Otevřený čtecí rámeček
PCC	Pyridinium chlorochromát
PMB	4-methoxybenzyl
RdRp	RNA dependentní RNA polymeráza
RNA	Ribonukleová kyselina
ssRNA	Jednovláknová RNA
TEA	Triethylamin
TBAF	Tetra-n-butylamonium fluorid
TBAI	Tetra-n-butylamonium jodid
Tf	Trifluormethansulfonyl
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
TMS	Trimethylsilyl
Ts	<i>p</i> -toluensulfonyl
UPLC	Ultra-účinná kapalinová chromatografie
UTR	Netranslatovaný úsek RNA

1 Úvod

Jedněmi z významných lidských patogenů jsou zástupci rodu *Flavivirus*. Zástupci tohoto rodu jsou původci mnoha závažných onemocnění, a to především v tropických oblastech světa. Nemoci způsobené těmito viry jsou například horečka dengue, žlutá zimnice, horečka zika a japonská encefalitida. V prostředí střední Evropy je významný především virus klíšťové encefalitidy, kdy jen v ČR bylo v roce 2016 zaznamenáno 565 případů. V současnosti není známa žádná specifická léčba těchto onemocnění, a tak je vývoj nových potenciálních antivirových zásadních pro omezení jejich šíření. Pro množení viru v lidských buňkách je klíčový virový enzym RNA dependentní RNA polymeráza (RdRp) umožňující replikaci genetické informace viru. Jelikož se tento enzym významně liší od lidských polymeráz, je velmi zajímavý jako terapeutický cíl.

Pro inhibici RdRp různých virů lze využít látky, které můžeme rozdělit na nukleosidové a nenukleosidové. Nukleosidové inhibitory působí tak, že jsou začleněny do prodlužujícího se řetězce nové RNA, což vede buďto k zastavení replikace nebo k hromadění chyb v genetickém kódu. Nenukleosidové inhibitory v mnoha případech působí jako alosterické inhibitory. Obecně jsou úspěšnější nukleosidové inhibitory díky vyšší selektivitě a nižšímu riziku vzniku rezistence.

Karbocyklické nukleosidy jsou jednou z významných skupin moderních antivirových, v nichž je atom kyslíku furanosového cyklu nahrazen methylenovou skupinou. Tím pádem je glykosidická vazba nahrazena prostou vazbou C-N, která je výrazně stabilnější nejen při syntéze, ale také metabolicky, jelikož tyto látky již nejsou substrátem hydroláz štěpících glykosidickou vazbu. Uhlík této methylenové skupiny může být navíc dále funkcionalizován.

Častou modifikací užívanou při vývoji nových terapeutik je zavádění atomu fluoru, má mnohé unikátní vlastnosti s ohledem na jeho vysokou polaritu a malý atomový poloměr. Proto může v mnoha aplikacích vystupovat jako bioisoster vodíkového nebo kyslíkového atomu. Neopomenutelný je také fakt, že fluor je špatně odstupující skupinou, a je tak vhodný pro použití v živých systémech. Přípravou fluorovaných derivátů karbocyklických nukleosidů se zabývá tato diplomová práce.

2 Cíle práce

Připravit deriváty karbocyklických nukleosidů s jedním či dvěma atomy fluoru na 6'-uhlíku.

Tyto deriváty připravit v *ribo* i 2'-deoxyribo sérii.

Po nalezení vhodných syntetických postupů připravit deriváty v různých purinovými nukleobazemi.

Studiem literatury i vlastními experimenty se seznámit s metodami příprav a vlastnostmi karbocyklických nukleosidů a prohloubit tak své dosavadní znalosti chemie nukleosidů.

3 Přehled problematiky

3.1 Flaviviry a inhibitory jejich replikace

3.1.1 Flaviviry a jejich patogenita

Rod *Flavivirus* je jedním z rodů čeledi *Flaviviridae*, zahrnující dále rody *Hepacivirus* a *Pestivirus*. Jedná se o viry s lineární jednovláknou RNA s pozitivní polaritou. Tento rod zahrnuje více než 70 virů, z nich jsou některé významnými lidskými patogeny, projevující se v terminální fázi obvykle hemorhagickou horečkou nebo encefalitidou. Konkrétními příklady jsou virus žluté zimnice, virus horečky dengue, virus západonilské horečky, virus horečky zika nebo virus klíšťové encefalitidy.¹ S výjimkou viru klíšťové encefalitidy se všechny uvedené nemoci vyskytují především v tropických oblastech Afriky, Ameriky a Asie, nicméně v důsledku klimatických změn dochází k rozšíření teritoria jich hlavního vektoru, kterým jsou antropofilní komáři (např. *Aedes aegypti* nebo *Aedes albopictus*). Vzácněji mohou být tyto nemoci přenášeny i ostatními druhy komárů rodu *Aedes* a *Culex*. Hlavním přenašečem klíšťové encefalitidy je klíště *Ixodes ricinus*. Všechny tyto viry tudíž spadají do skupiny arbovirů, tedy virů přenášených hmyzem.² Člověk je v případě většiny virů tohoto rodu konečným hostitelem a až na výjimky viru žluté zimnice, horečky dengue a pravděpodobně i viru zika není zdrojem další nákazy.²

Jedinou v současné době dostupnou pomocí v boji v uvedenými viry je očkování, které je dostupné proti viru žluté zimnice, viru japonské encefalitidy a viru klíšťové encefalitidy. Ačkoli byl ale již vyvinut tento obecně velmi mocný nástroj, jeho užití je komplikováno tím, že první dva uvedené viry se vyskytují především v oblastech s obtížně dostupnou kvalitní lékařskou péčí.³ Proti ostatním flavivirům dosud nebylo vyvinuto spolehlivé očkování, ačkoli v nedávné době byla pro klinické použití schválena vakcína proti viru dengue.⁴ Ta sice nedosahuje optimální účinnosti, přesto by ale její využívání mohlo vést alespoň k částečnému omezení výskytu onemocnění.⁵ Po nedávné epidemii viru zika je značná pozornost věnována také vývoji vakcín proti tomuto viru, přičemž první vakcíny vstoupily do první fáze klinického testování.⁶

3.1.2 Charakteristika virionu, RNA a proteomu flavivirů

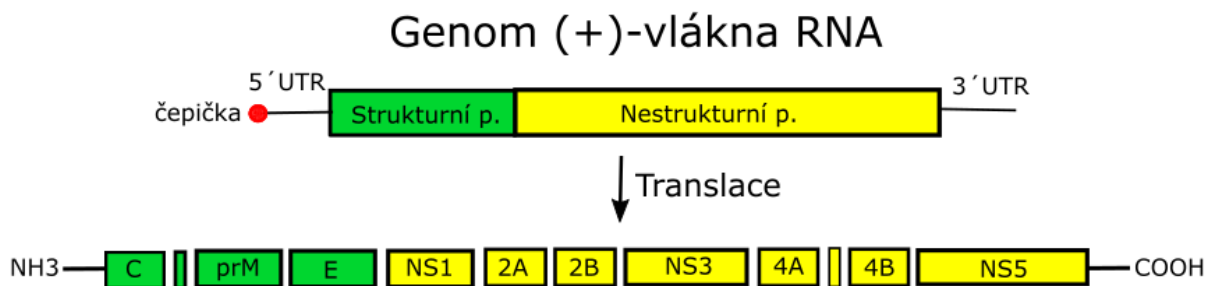
3.1.2.1 Struktura virionu

Virion flavivirů je tvořen kaspidou složenou z kapsidových proteinů obalenou lipidovou dvojvrstvou. Tato membrána vzniká úpravou membrány hostitelských buněk, obsahuje však

virové proteiny E a M, přičemž obálkový protein E je obsažen v takové míře, že ji zcela pokrývá. Zralý virion je kulovitou částicí o průměru přibližně 500 Å.^{1,7}

3.1.2.2 Struktura genomu

Kapsida flavivirů obsahuje jednovláknovou molekulu RNA o délce přibližně 11 kb. Jelikož se jedná o pozitivní vlákno RNA, a tedy přímo slouží jako templát při proteosyntéze, mimikuje RNA flavivirů mRNA. Ta svým 5'-konci nese čepičku typu 1, která nejenže vede k rozpoznání hostitelskými enzymy a zahájení proteosyntézy, ale také chrání virovou RNA před degradací jakožto cizorodé nukleové kyseliny.⁸ Oproti tomu 3'-konec nebývá až na výjimky polyadenylován.⁹ RNA obsahuje jediný otevřený čtecí rámec s délkou přesahující 10 kb, ohraničený na koncích netranslatovanými úseky plnicími patrně regulační funkcí. Produktem translace je jediný polyprotein, který je následně štěpen jak hostitelskými enzymy, tak virovou proteázou. Produktem štěpení je 7 nestrukturních a 3 strukturní proteiny.¹⁰ Struktura genomu a produkty jeho translace a následného štěpení jsou uvedeny vyobrazeny níže (Obrázek 1)



Obrázek 1 - Struktura genomu flavivirů a produkty jeho translace

3.1.2.3 Strukturní proteiny

Jedná se o proteiny podílející se na stavbě nukleokapsidy a obalu virionu. Polymerací kapsidového proteinu (C proteinu) vzniká kapsida obalující RNA. Pravděpodobně se podílí také na skládání virové částice v důsledku interakce s Golgiho aparátem.¹¹ Protein prM brání předčasné maturaci virové částice, která by vedla k přerušení životního cyklu.¹² Jak již bylo uvedeno výše, obálkový protein E zcela obaluje membránu získanou z hostitelské buňky a jeho úkolem je interakce s proteiny na povrchu buněk umožňující vstup virionu do buňky a je tedy klíčový pro infekci.⁷

3.1.2.4 Proteiny NS1, NS2A/B a NS4A/B

Funkce těchto nestrukturních proteinů není zcela jasná. Patrně plní pomocnou funkci tím, že jsou součástí komplexů virových proteinů s enzymatickou funkcí.¹³ Protein NS1 se od ostatních

nestrukturních proteinů odlišuje svým umístěním, jelikož se nachází uvnitř endoplazmatického retikula. Vazbou na NS4A, kofaktor proteinu NS5, se podílí na stavbě replikačního komplexu. Dále je NS1 sekretován a může se vyskytovat také na povrchu infikovaných buněk. Pak působí imunogenně a podílí se na patogenezi.¹⁴

3.1.2.5 Protein NS3

NS3 je jedním ze dvou proteinů flavivirů s enzymatickou aktivitou a stejně jako druhý z nich, NS5, vykonává více enzymatických funkcí. Zatímco N-koncová doména má proteázovou aktivitu, větší C-koncová má funkci helikázy, RNA trifosfatázy a nukleosid trifosfatázy. NS3 protein utváří heterodimer s transmembránovým proteinem NS2B.¹⁵ Kromě přichycení proteinu NS3 k endoplazmatickému retikulu je tato vazba nezbytná i pro samotnou enzymatickou aktivitu. Virová proteáza štěpí přibližně polovinu z vazeb nutných pro rozdělení polyproteinu a jakožto enzym, jehož funkce je pro virus nezbytná, je zajímavým terapeutickým cílem.¹⁶ Helikázová aktivita druhé domény tohoto proteinu je nezbytná pro zahájení syntézy komplementárního (-)-RNA vlákna, jelikož 3'-konec (+)-vlákna je zakončen smyčkou, a také k oddělení komplementárních vláken při syntéze (+)-RNA. Při tomto procesu je spotřebováno ATP (proto nukleosid trifosfatázová aktivita). C-koncová doména také odstraňuje 5'-koncový fosfát z RNA, což je proces nutný pro syntézu 5'-čepičky (RNA trifosfatázová aktivita). NS3 protein je současně nositelem neenzymatických funkcí, jelikož ovlivňuje také některé procesy v hostitelské buňce a má význam i při skládání virionu.¹⁵

3.1.2.6 Protein NS5

Největším proteinem flavivirů je dvoudoménový NS5 protein zastávající funkci RNA-dependentní RNA-polymerázy (RdRp) (větší, N-koncová doména) a methyltransferázy. Jde také o nejvíce konzervovaný z proteinů flavivirů.³ Spoluutváří replikační komplex zahrnující všechny nestrukturní virové, a také některé hostitelské, proteiny. Jediná vazba na komplex je tvořena s proteinem NS3. Z důvodu ochrany replikačního komplexu před degradací buněčnými enzymy utváří virové proteiny jednomembránové váčky uvnitř endoplazmatického retikula, spojené s cytoplazmou jen malým otvorem.¹⁵

RdRp je klíčovým enzymem při replikaci flavivirů. Jeho úlohou je *de novo* syntéza virové RNA. Podobně jako další RdRp je i tato typická svým tvarem. Tři subdomény utvářejí strukturu podobnou přivřenému pravému ruce a z toho vyplývá také jejich označení: palec, dlaň a prsty.¹⁶ Nachází se na nich celkem 7 konzervovaných motivů, které se podílejí například na vazbě a orientaci nově přístupujících NTP, deprotonaci 3'-koncového hydroxyly nebo stabilizaci *de novo* iniciačního komplexu.¹⁷ Funkcí RdRp je syntéza (-)-vlákna ke genomické RNA a následná

produkce vláken s pozitivní polaritou sloužících buď jako templát při proteosyntéze nebo jsou obalovány kapsidovým proteinem a stávají se základem nových virových částic.¹⁶

Druhou, pro virus rovněž klíčovou funkcí proteinu NS5, je methyltransferázová aktivita. Jejím projevem je methylace 5'-čepičky v polohách N-7 guaninu a 2'-O adenosinu, přičemž výsledná podoba čepičky je m⁷GpppAm-RNA. Tímto způsobem jsou falaviviry schopny napodobovat mRNA.¹⁸ Zatímco methylace guaninu je naprosto nezbytná pro zahájení translace a nepřítomnost methylu v této poloze vede k RNA, která nemůže sloužit jako templát, chybějící methylace adenosinu není nutně fatální. Její úlohou je zabránění rozeznání imunitním systémem, a tak v buňkách s nedostatečnou produkcí interferonu nedojde k jejich rozeznání jakožto cizorodé RNA.¹⁷

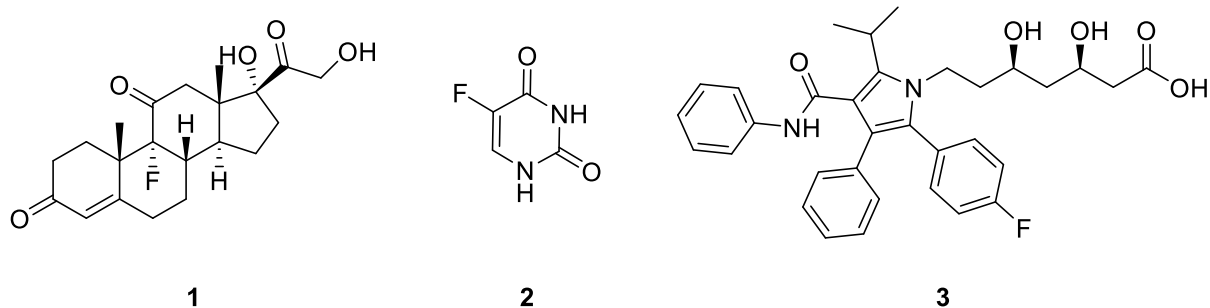
NS5 je tedy zodpovědný za několik esenciálních funkcí a je proto logickým cílem, na nějž je směřováno úsilí při vývoji nových inhibitorů replikace flavivirů.

3.2 Fluor a jeho využití v medicíně

3.2.1 Základní vlastnosti fluoru a přírodní organické látky obsahující fluor

Již z letmého pohledu na periodickou tabulku prvků je zřejmé, že fluor je nositelem zajímavých a mnohdy unikátních vlastností, které je možno využít při návrhu nových léčiv. Nicméně po dlouhá léta byla přítomnost tohoto prvku v léčivech považována za naprosto nevhodnou.¹⁹ Nejvyšší elektronegativita a oxidační potenciál byly příčinou toho, že ačkoli je fluor 13. nejčastěji se vyskytujícím prvkem v zemské kůře a některé jeho sloučeniny byly využívány v metalurgii nebo při leptání skla, byl izolován až v roce 1886 francouzským chemikem Henri Moissanem jako 75. prvek.²⁰ Jeho objevu oceněnému v roce 1906 Nobelovou cenou předcházela řada úmrtí jiných chemiků pokoušejících se o jeho přípravu. Pozoruhodné je, že jím vyvinutá metoda přípravy elektrolyzou směsi fluoridu draselného a fluorovodíku je do dnešních dní principem průmyslové výroby. Po tomto objevu nicméně nenásledoval nijak rychlý rozvoj využívání fluoru. Částečně kvůli nevelkému množství lidí schopných s ním pracovat ale také nedostupnosti vhodného laboratorního vybavení.¹⁹ Ke skutečnému rozvoji přispěla až potřeba získávání uranu obohaceného o izotop U-235. Optimální vlastnosti pro separaci centrifugací vykazoval UF₆, jehož extrémně korozivní vlastnosti vedly k nutnosti vývoje nových materiálů, z nichž patrně nejznámějším je Teflon.²¹ Došlo tak k rozvoji této oblasti chemie a vývoji nových metod a činidel umožňujících snazší a bezpečnější syntetické postupy. Nicméně až do 50. let byly fluorované látky považovány za vhodné pro použití pouze pro vojenské účely a vývoj materiálů. Tento pohled se nicméně zásadně změnil po uvedení

fludrokortisonu (**1**) (objeven 1953) jakožto prvního léčiva obsahujícího fluor na trh v roce 1954, které bylo následováno v roce 1962 5-fluorouracilem (**2**) (objeven 1957) (Obrázek 2- Příklady fluorovaných látek využívaných jako léčiva).^{22,23} Od té doby se z fluoru stal „druhý nejoblíbenější prvek medicínálních chemiků“ (po dusíku) a další rozvoj metod fluorace a výzkum vlivu fluoru na vlastnosti látek vedl až k současnému stavu, kdy přibližně 20-25 % léčiv uváděných na trh obsahuje alespoň jeden atom tohoto prvku.²⁴ Z 30 nejpredepisovanějších léčiv v USA jich obsahuje fluor 5 a až do doby vypršení patentové ochrany v roce 2011 byl léčivem s největšími tržbami atorvastatin (**3**), známý pod komerčním názvem Lipitor, využívaný k prevenci kardiovaskulárních chorob.²⁵



Obrázek 2- Příklady fluorovaných látek využívaných jako léčiva

Jedním z důvodů, proč nebyla modifikace látek zavedením atomů fluoru považována za metodu, již by bylo možné dosáhnout zlepšení vlastností léčiv, byl i velmi ojedinělý výskyt přírodních fluorovaných látek. Ačkoli je fluor zdaleka nejzastoupenějším halogenidem v zemské kůře, je obsažen jen asi ve 20 z více než 5000 přírodních organických halogenidů.¹⁹ Navíc i těchto málo látek bylo známo především pro svou toxicitu. První izolovanou přírodní látkou se stala sodná sůl kyseliny fluorooctové, která byla identifikována jako zdroj toxicity některých keřů v Austrálii, Brazílii a Africe.²⁶ Její toxicita spočívá v tom, že následuje stejné metabolické cesty jako kyselina octová. Krom toho, že může být začleňována do mastných kyselin za vzniku ω -fluoro mastných kyselin (fluoroacetát je tedy využíván jen jako první stavební jednotka, a ne k prodlužování řetězce) rovněž vykazujících toxicitu, dochází při vstupu fluoroacetátu do Krebsova cyklu k inhibici akonitázy.²⁷ Hlavní příčinou nízkého výskytu fluorovaných látek v přírodě je faktická nemožnost využití obvyklých cest biochemické halogenace a také velmi nízká rozpustnost hlavních minerálů fluoru (fluoritu a kryolitu) ve vodě. Jednou z možností pro enzymatickou halogenaci je využití halogenidů v oxidačním čísle +1 vznikajících jejich oxidací H_2O_2 enzymem obsahujícím vanad. S ohledem na nejvyšší oxidační potenciál fluoru ovšem tato varianta není možná. Další běžné enzymatické začlenění fluoru probíhá naopak jako nukleofilní otevírání epoxidu. V tomto případě je ovšem na

překážku neobvykle vysoká hydratační energie fluoridového aniontu.¹⁹ Ten je tedy dobře solvatován a jeho nukleofilita je velmi nízká. Zdá se proto, že všechny známé přírodní látky obsahující fluor pocházejí z jediné metabolické dráhy. V ní dochází k substituci methioninu v S-adenosylmethioninu fluoridovým aniontem za vzniku 5'-fluoro-5'-deoxyadenosinu v reakci katalyzované fluorinázou.²⁷

Pro pochopení efektu zavedení fluoru do molekuly na její vlastnosti jako jsou lipofilita, pK_A , preferovaná konformace nebo také na reaktivitu a metabolismus je vhodné shrnout vlastnosti atomu fluoru a jeho vazeb a srovnat je s vlastnostmi prvků a skupin, za něž bývá využíván jako substituce. Některé z nich jsou uvedeny v Tabulka 1-Vybrané vlastnosti vazby C-F jejich srovnání s vlastnostmi jiných vazeb 1.²⁸

Vazba	Elektronegativita prvku (Pauling)	Délka vazby (Å)	van der Waalsův poloměr (Å)	Dipólový moment (D)	Disociační energie vazby (kcal/mol)
C-H	2,2	1,09	1,2	-0,4	98,8
C-F	3,98	1,35	1,47	1,81 (CH ₃ F)	105,4
C-Cl	3,16	1,77	1,75	1,87 (CH ₃ Cl)	78,5
C=O	3,44	1,23	1,52	2,33 (CH ₂ O)	85 (π vazba)
C-OH	3,44	1,43 (CH ₃ -OH)	1,52	2,87 (CH ₃ OH)	84
C-C \equiv N		2,22 (HCN)		3,92 (CH ₃ CN)	

Tabulka 1-Vybrané vlastnosti vazby C-F jejich srovnání s vlastnostmi jiných vazeb

Nejběžnější využití fluoru je jako náhrada za vodíkový atom. Jak je patrné z tabulky, atom fluoru má přibližně o 20 % větší poloměr než atom vodíku. Tento relativně malý rozdíl vede k tomu, že tato substituce jen zřídka vede k narušení interakce molekul s jejím terapeutickým cílem z důvod stérické náročnosti. Z hlediska délky vazby je nejbližší dvojně vazbě mezi kyslíkem a uhlíkem v karbonylové skupině.

Zcela zásadní je ale rozdíl mezi elektronegativitou fluoru a vodíku vedoucí k tomu, že dipólový moment je nejen mnohem větší, ale především směřuje opačným směrem. Nicméně s ohledem na malou délku vazby a míry její polarizovatelnosti je citelně nižší než u ostatních uvedených skupin. S nízkou polarizovatelností souvisí také to, že fluor se oproti jiným halogenidům jen zřídka účastní halogenových vazeb. Významná je také vysoká disociační energie vazby C-F, která je jedna z nejvyšších v organické chemii. Díky tomu dochází jen zřídka k substitučím/eliminačním reakcím, v nichž by fluoridový aniont vystupoval jako odstupující skupina a oproti jiným organickým halogenidům se chová méně často jako alkylační činidlo (toto tvrzení ovšem neplatí v případě nukleofilní aromatické substituce).²⁹

3.2.2 Vliv zavedení fluoru na fyzikálně chemické vlastnosti molekuly

3.2.2.1 Lipofilita molekuly

Jedním z obvykle sledovaných parametrů molekul sloužících navrhovaných jako léčiva je jejich lipofilita. S touto jsou svázány vlastnosti jako je rozpustnost, schopnost prostupovat membránami nebo také samotná biologická aktivita látky. Parametrem využívaným pro porovnávání lipofility je $\log P$, tedy rozdělovací koeficient (nejčastěji oktanol/voda) vyjádřený jako dekadický logaritmus. Dalším možným měřítkem, které lépe odpovídá situaci *in vivo*, je distribuční koeficient, obvykle zapisovaný rovněž v podobě dekadického logaritmu jako $\log D$. Zatímco $\log P$ vyjadřuje poměr koncentrací látky v neutrálním stavu, $\log D$ porovnává součet koncentrací látky v neutrálním, tak i v různě nabitých stavech. Jelikož zastoupení různě nabitých stavů molekuly závislé na pH vodné fáze, je nutné uvádět i pH, při kterém byl distribuční koeficient stanoven. Obvykle se jedná o hodnotu odpovídající pH lidské krevní plazmy, tedy 7,4. Podle Lipinského pravidel pěti, empirických pravidel popisujících ideální vlastnosti pro léčiva, by $\log P$ měl být nižší než 5.³⁰ Zatímco nízké $\log P$ vede k dobré rozpustnosti ve vodném prostředí, ale komplikuje průchod látky membránami, pokud je látka velmi lipofilní může vykazovat příliš nízkou rozpustnost. Také na schopnost prostupovat membránami může mít příliš vysoké $\log P$ negativní dopad, jelikož taková molekula sice vstoupí do lipidické dvojvrstvy cytoplazmatické membrány, nicméně je v ní zachycena a není dále distribuována. Je tedy patrné, že optimalizace $\log P$ a respektive $\log D$ (souvisejícího rovněž s pK_A molekuly) je klíčová pro vývoj látky, která má sloužit jako léčivo.³¹

Substituce vodíku fluorem je obecně považována za krok vedoucí k vyšší lipofilitě, nicméně bylo by chybou se domnívat, že k tomu dochází vždy. Fluorace aromatických substituentů a perfluorace zpravidla skutečně vede k nárůstu $\log P$ a kupříkladu skupiny CF_3 , OCF_3 a SCF_3 jsou mezi těmi nejlipofilnějšími. Složitější je ovšem situace v případě fluorace alifatických struktur. Jednoduchá ale i vícenásobná fluorace může vést ke snížení $\log P$. Příklady změny $\log P$ v důsledku fluorace jsou uvedeny v Tabulce 2- Příklady $\log P$ vybraných fluorovaných a nefluorovaných látek 2.^{29,30} Jisté strukturální motivy jsou přímo spojovány se snížením lipofility. Kupříkladu pokud je fluor v blízkosti kyslíku nebo se jedná o vicinální alkyldifluoridy, kdy je preferována konformace vedoucí k většímu dipólovému momentu v důsledku stabilizace polárnější konformace *gauche* efektem, jehož vliv na konformaci molekul bude popsán níže.³²

	logP		logP	
C ₆ H ₆	2,1	CH ₃ CH ₃	1,81	
C ₆ H ₅ F	2,3	CH ₃ CHF ₂	0,75	
C ₆ H ₅ -CH ₃	2,1	CH ₃ (CH ₂) ₃ CH ₃	3,11	
C ₆ H ₅ -CF ₃	3	CH ₃ (CH ₂) ₃ CH ₂ F	2,33	

Tabulka 2- Příklady logP vybraných fluorovaných a nefluorovaných látek

3.2.2.2 Ovlivnění pK_A molekuly

Vliv substituce vodíku fluorem na pK_A kyseliny octové a jejích derivátů je učebnicovým příkladem vlivu silně elektronegativních substituentů na kyselost látek. pK_A je významným parametrem látek, který v kontextu vývoje léčiv souvisí jak s afinitou molekuly k terapeutickému cíli, tak i s její distribucí a biologickou dostupností. Afinita a schopnost být absorbována mohou v případě ionizovatelných látek souviset mimo jiné i se zastoupením jednotlivých stavů. Přítomnost fluoru na uhlících v blízkosti ionizovatelných skupin vede k poklesu jejich pK_A a jeho zavedení tedy může být využito k úpravě pK_A aminů, heterocyklů obsahujících dusík, karboxylových kyselin nebo alkoholů.³¹ Například substituce anilinů, fenolů a benzoových kyselin v poloze *ortho* vede k poklesu pK_A o jednotku.²⁹ Často je využívána substituce v blízkosti aminových skupin vedoucí k nižší ionizaci při fyziologickém pH, přičemž efekt je možno odhadnout na základě počtu a polohy atomů fluoru. Velmi výrazně se tento efekt projevuje také v případě heterocyklických bází. Je ovšem na místě poznamenat, že ačkoli lze snížením pK_A dosáhnout lepší biologické dostupnosti, může současně tato změna vést i k poklesu afinity. Je tedy potřeba, obdobně jako v případě logP, dosáhnout hodnoty vhodné ze všech ohledů.³⁰ Příklady vlivu fluorace na pK_A molekul jsou uvedeny v Tabulka 3 - Vliv fluorace na pK_A některých zástupců nesoucích vybrané funkční skupiny 3.

Amin	pK _A	Alkohol	pK _A	Karboxylová kyselina	pK _A	Heterocyklická báze	pK _A
CH ₃ CH ₂ NH ₂	10,6	CH ₃ CH ₂ OH	15,9	CH ₃ COOH	4,76	imidazol	7,1
CF ₃ CH ₂ NH ₂	5,7	CF ₃ CH ₂ OH	12,4	CH ₂ FCOOH	2,59	2-fluoroimidazol	2,45
C ₆ H ₅ NH ₂	4,6	(CH ₃) ₃ COH	19,2	CHF ₂ COOH	1,34	4-fluoroimidazol	2,4
C ₆ F ₅ NH ₂	-0,37	(CF ₃) ₃ COH	5,1	CF ₃ COOH	0,52		

Tabulka 3 - Vliv fluorace na pK_A některých zástupců nesoucích vybrané funkční skupiny

3.2.2.3 Vodíkové vazby a dipolární interakce

Vodíkové můstky hrají jednu ze zásadních rolí v interakci substrátů s biologickým cílem. Tímto cílem je totiž zpravidla protein, který má ve svém aktivním místě velké množství míst pro tvorbu vodíkových můstků nebo vznik dipolárních interakcí.²⁹

Ačkoli je fluor velmi elektronegativní, má k dispozici volné elektronové páry, které by se teoreticky mohly účastnit tvorby vodíkových vazeb a fluoridový aniont vytváří velmi silné vodíkové můstky, je atom fluoru v organických fluoridech jen velmi špatným akceptorem. Toto je způsobeno především jeho malou polarizovatelností a tedy nízkou mírou přenosu elektronů do orbitalu vodíku.³⁰ Po letech, kdy panovaly rozpory o existenci vodíkové vazby C-F...H-X, je v současné době její existence považována za prokázanou. Jedná se ale o vazbu, jejíž energie je výrazně nižší, než je obvyklé u běžných vodíkových vazeb. Častěji se vyskytují intramolekulární interakce, jejichž vznik je snazší. Důsledkem existence takové vazby může být například preference jedné z možných konformací molekuly vedoucí k vyšší specifitě interakcí, a tedy i rozdílné afinitě k různým isoformám enzymů.³³ Ačkoli samotný fluor samozřejmě nemůže vystupovat jako donor vodíkové vazby, difluoromethylová skupina -CHF₂ obsahuje výrazně kyselý vodík vytvářející vazbu například s kyslíkem karbonylové skupiny. Tato interakce je poměrně dobře prostudována, a -CHF₂ bývá využívána mimo jiné jako skupina bioisosterní k hydroxyly.²⁸

I přes neochotu fluoru přímo se účastnit vodíkových vazeb má fluorace významný nepřímý dopad na vodíkové vazby vytvářené skupinami v jeho blízkosti. Jak již bylo uvedeno, přítomnost fluoru i fluoroalkylových skupin vede k poklesu pK_A jiných skupin, čímž je ovlivněn jejich charakter jakožto donorů nebo akceptorů. Zatímco nárůst kyselosti alkoholů z nich dělá lepší donory, odčerpání elektronové hustoty z karbonylové skupiny nebo aminu omezí jejich schopnost poskytnout elektrony, a tedy z nich učiní horší akceptory.²⁹

V případě organických fluoridů jsou častější formou nekovalentních interakcí elektrostatické dipól-dipólové interakce. Poměrně velký dipólový moment vazby C-F umožňuje interakci s dalšími polárními skupinami vazebného místa na terapeutickém cíli. Poměrně časté je například pozorování vzájemné blízkosti atomu fluoru a uhlíku karbonylové skupiny nasvědčující existenci vzájemného působení.³⁴

3.2.2.4 Konformační změny v důsledku fluorace

Vědomosti ohledně energeticky nejvýhodnější konformace látky jsou užitečné pro její další vývoj. Pokud je totiž známa konformace molekuly interagující s biologickým cílem, mohou být navrženy její úpravy vedoucí ke stabilizaci této nebo blízké konformace. Tím je omezena potřeba entropicky nevýhodné preorganizace molekuly a zvýšeno množství energie uvolněné vazbou ligandu k cíli, a tedy její afinita.

Zavedení jednoho fluoru na místo vodíku zpravidla nevede k významným změnám konformace z důvodu sterické náročnosti. Jeho atom je, jak již bylo uvedeno výše, jen mírně větší než atom vodíku. K daleko výraznějším změnám vede zavedení více atomů fluoru. Obvyklým příkladem je rozdíl ve velikosti mezi trifluormethylovou a methylovou skupinou. Vypočítaný van der Waalsův objem perfluorované skupiny je přibližně dvakrát větší a je blízký velikosti skupiny ethylové, od které se ovšem významně liší tvarem. CF₃ bývá někdy isosterní isopropylové skupině. Ta je sice výrazně větší a rovněž se liší tvarem, ale jejich vliv na konformaci cyklohexanu a rotaci bifenylu je srovnatelný, i když v případě isopropylu mírně vyšší. Isosterie CF₃ tedy patrně záleží na kontextu. Níže jsou uvedeny parametry popisující velikost vybraných skupin (Tabulka 4 - Objem vybraných skupin a veličiny vyjadřující faktický dopad jejich velikosti).^{28,35,36}

	van der Waalsův poloměr (Å ³)	A hodnota (kcal/mol)	Experimentální zábrana rotace bifenylu (kcal/mol)
H	7,24		
F	13,3	0,15	4,4
Me	21,6	1,7	7,4
Et	38,9	1,7	8,7
CF ₃	39,8	2,1	10,5
iPr	56,2	2,15	11,1
tBu	73,5	>4,5	15,4

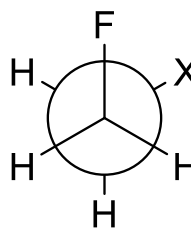
Tabulka 4 - Objem vybraných skupin a veličiny vyjadřující faktický dopad jejich velikosti

Kromě sterické náročnosti substituentů je konformace ovlivňována také stereoelektronickými efekty, které jsou v případě fluorovaných látek mnohdy dominují. Jedním z příkladů je rozdíl v konformaci methoxyfenylové a trifluormethoxyfenylové skupiny. V případě methoxyfenylové skupiny je kyslík rehybridizován tak, aby byla umožněna konjugace jeho nevázebného elektronového páru s π elektrony aromatického systému. Tato změna hybridizace vede ke stavu, kdy methoxy skupina leží v rovině aromatického kruhu. V případě trifluormethoxyfenylové skupiny je ovšem situace zcela odlišná. Kromě nárůstu velikosti dochází především ke snížení elektronové hustoty na kyslíku a ten již není schopen konjugace s aromatickým systémem. Důsledkem je, že trifluormethoxylová skupina je přibližně kolmá k rovině kruhu.³⁷

Přítomnost fluoru v poloze vicinální k další elektronegativní skupině může vést k dramatickým dopadům na konformaci molekuly v důsledku gauche efektu. Modelovým příkladem je 1,2-difluoroethan, ve které fluory zajímají preferenčně gauche (jinak také synklinální) konformaci.

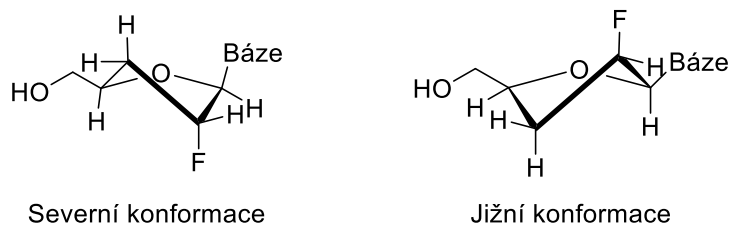
Původ tohoto efektu je obdobný jako v případě anomerního efektu. Dochází při něm k přenosu elektronové hustoty z C-H σ vazebného orbitalu (HOMO) do C-F σ^* antivazebného orbitalu (LUMO). Takovýto přenos je neefektivnější, pokud jsou daný vodík a fluor uspořádány antiperiplanárně.³⁸ Aby mohlo dojít k takovému přenosu elektronové hustoty v případě obou fluorů, je jedinou možností synklinální poloha fluorů. Tento efekt se ovšem neomezuje jen na vicinální difluoridy a projevuje se i při kombinaci jiných elektronegativních skupin.³⁹ Příklady stabilizační energie pro kombinaci fluoru s jinými skupinami jsou uvedeny v Tabulka 5 - Stabilizační energie gauche konformace různých derivátů fluoroethanu.²⁸ Dobře prozkoumaným případem je rozdílné prohnutí kruhu prolinu v závislosti na konfiguraci fluoru v poloze 4 v důsledku synklinální orientace fluoru a amidového uhlíku.⁴⁰ Dále se gauche efekt projevuje například u β -fluoroaminokyselin. Posledně uvedené příklady, spolu s interakcí dipólů v případě α -fluoroamidů vedoucí k orientaci fluoru do polohy anti vůči kyslíku karbonylu, naznačují možnost kontroly konformace polypeptidů.²⁹

	stabilizační energie (kcal/mol)
F	0,5-1,0
OH	1,0-2,0
Oac	1,6
NHAc	1,8
NH ₂	0,9-1,0
NH ₃ ⁺	5,8



Tabulka 5 - Stabilizační energie gauche konformace různých derivátů fluoroethanu

Jelikož praktická část této práce se věnuje přípravě fluorovaných karbocyklických derivátů nukleosidů, je vhodné také zmínit, jaký efekt na konformaci nukleosidu může fluorace mít (Obrázek 3). Je totiž známo, že preferovaná konformace významně ovlivňuje biologickou aktivitu NA.⁴¹ Fluorace ribózového kruhu nukleosidu vede ke kombinaci efektů stérických, dipól-dipólových a gauche interakcí a patrně také k tvorbě slabých vodíkových vazeb mezi fluorem a vodíky na ribóze nebo bázi. Kombinace všech těchto efektů vede k výslednému tvaru molekuly. Efekt fluorace je dobře patrný například u 3'-deoxyribonukleosidů substituovaných fluorem v poloze 2'. Zatímco 2'- α -fluoro deriváty výrazně preferují severní konformaci, 2'- β -fluoro deriváty se vyskytují spíše v jižní konfiguraci. V tomto případě ovšem preference není tak výrazná. Může být ovšem podpořena přítomností fluoru ještě v poloze 3'- α .⁴²



Obrázek 3 - Severní a jižní konformery 2'-fluoro nukleosidů

3.2.3 Vliv fluorace na metabolismus látek

3.2.3.1 Oxidativní metabolismus

Jak již bylo nastíněno v předchozí části této práce, fluorace může mít dopad na mnoho vlastností látek. Znalost a předpovídání těchto efektů je významná pro schopnost racionální optimalizace molekul. Velmi často je fluorace využívána pro úpravu metabolické stability. Po podání léčiva a jeho absorpci je obvyklou reakcí těla snaha jej opět vyloučit. K jejich vyloučení může dojít v nezměněné, častěji ale metabolizované, podobě. Nejvýznamnější skupinou enzymů podílejících se na metabolismu xenobiotik jsou enzymy ze skupiny cytochromů P450. Tyto enzymy se vyskytují především v játrech. Cílem oxidace je omezení lipofilního charakteru látky, čímž je usnadněno její vyloučení z organismu. Nízká metabolická stabilita z důvodu oxidace, kdy často značná část potenciálního léčiva nepřečká ani první průchod játry po absorpci, je běžným problémem při vývoji nových léčiv.³⁰ Fluorace je obvykle využita k přímé blokaci místa náchylného k oxidaci cytochromy. Jako důvod lepší stability bývá uváděna větší síla vazby C-F ve srovnání s C-H, ale především fakt, že vazba O-F vzniká jen velmi obtížně. Fluorace ovšem nemusí vést jen k zablokování konkrétního místa a její efekt může být i nepřímý.²⁹ Kvůli tomu může nastat jak situace, kdy je metabolismus zcela omezen a výsledná látka je stabilní, ale také ta, kdy je z důvodu jeho pouhého přesměrování změna jen malá až žádná.⁴³ Změna metabolismu v důsledku fluorace byla pozorována i v případě vůbec prvního léčiva obsahujícího fluor, fludrokortisonu.³⁴

Fluorace bývá využívána pro zamezení oxidace aromatických systémů, k čemuž přispívá ze dvou důvodů. Prvním je přímé zablokování oxidované pozice a druhým snížení elektronové hustoty π -systému a tím i jeho reaktivity. Nicméně i tak podléhají fluorované aromatické kruhy oxidaci, které může být provázena přesmykem známým jako NIH-shift.⁴⁴ Příkladem léčiva, u něhož byla tato fluorace využita, je Ezetimib, lék na snížení hladiny cholesterolu. Změnami vedoucími ke vzniku Ezetimibu optimalizací látky SCH48461 bylo dosaženo zvýšení aktivity čtyřicetkrát (Schéma 1).⁴⁵ Kromě fluoru bývají využívány i fluoralkylové skupiny CF_2 , CF_3 , C_2F_5 , které jsou vůči oxidaci takřka inertní.

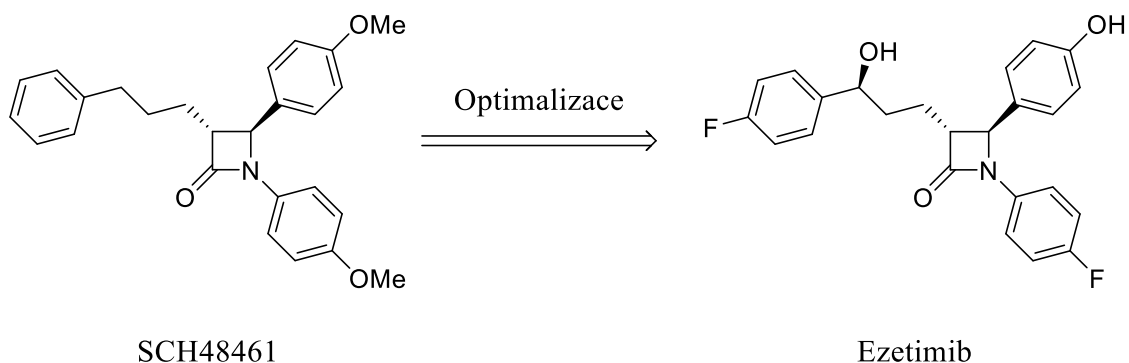
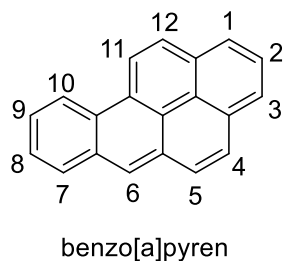


Schéma 1 - Optimalizace molekuly vedoucí k Ezetimibu

Nevhodný metabolismus nevede vždy jen k rychlé eliminaci látky a často je pozorován i vznik toxických nebo karcinogenních produktů. Klasickým příkladem je problematika karcinogenity polycyklických aromatických látek, jejichž bioaktivace oxidací vede ke vzniku látek schopných jak iniciace karcinogeneze z důvodu tvorby aduktů s DNA, tak i jejího urychlení z důvodu narušení regulace růstu buněk. Bylo prokázáno, že substituce libovolného vodíku na aromatickém kruhu benzo[a]pyrenu podléhající oxidaci (vodíky číslo 7, 8, 9, 10) (viz Obrázek 4) fluorem vede k zabránění vzniku diol-epoxidu zodpovědného za karcinogenní účinky.⁴⁶



Obrázek 4 - Číslování poloh benzo[a]pyrenu

3.2.3.2 Hydrolytický metabolismus

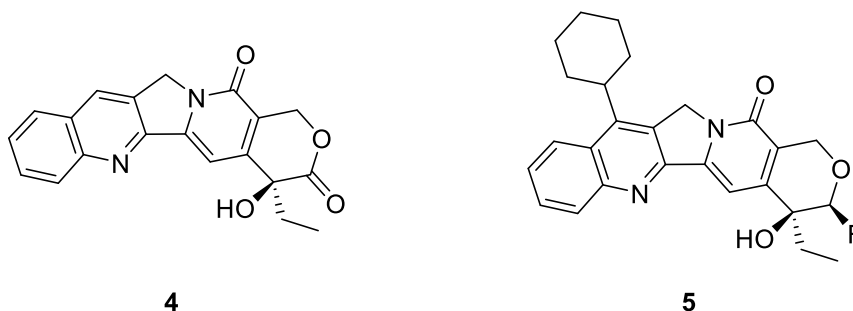
Také hydrolytický metabolismus může být významně ovlivněn fluorací. Příčinou je destabilizace pozitivně nabitých reakčních intermediátů v důsledku elektrony odtahujícího efektu fluoru. Toto je významné především u látek citlivých na kyselé prostředí, které mají být podávány orálně.²⁹ Nízká stabilita dideoxyinosinu vůči hydrolýze v kyselém prostředí byla výrazně vylepšena zavedením fluoru do polohy 2- β za zachování protivirové aktivity *in vitro*. Tato modifikace výrazně znevýhodnila vznik oxoniového kationtu vystupujícího jako meziprodukt.⁴⁷ Také využití trifluormethylové skupiny může vést k podobnému účinku.

3.2.4 Fluorované strukturní motivy a jejich bioisosterie

3.2.4.1 Bioisosterie fluorovaných skupin ke karbonylu

3.2.4.1.1 Bioisosterie karbonylové skupiny a sp^3 hybridizovaného fluorovaného uhlíku

Myšlenka, že by sp^3 hybridizovaný uhlík nesoucí jeden atom fluoru mohl napodobit karbonylovou skupinu, vychází jistě z podobnosti délky vazeb, atomových poloměrů a dipólového momentu. Takováto záměna by pak mohla vést ke zlepšení metabolické stability.²⁸ Příklad takového využití poskytuje výzkum derivátů camptothecinu (**4**) (Obrázek 5), látky obsažené v kůře a kmeni stromu *Camptotheca acuminata*, vykazující protirakovinný účinek v důsledku inhibice topoisomerázy I.⁴⁸ Její biologická dostupnost je nicméně omezená z důvodu její špatné rozpustnosti a přítomnosti laktonu náchylného k hydrolyze vedoucí k neaktivní formě. Stabilita obou možných izomerů (*R* a *S*) monofluorovaného derivátu camptothecinu byla významně vyšší než u přírodní látky. Toto ovšem neplatilo pro protinádorovou aktivitu. Její opětovné nabytí bylo v případě aktivnějšího *S* izomeru dosaženo další modifikací vedoucí k látce (**5**), jejíž aktivita byla srovnatelná s camptothecinem.⁴⁹

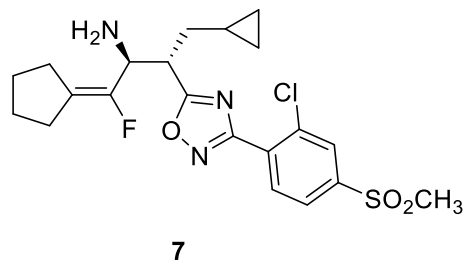
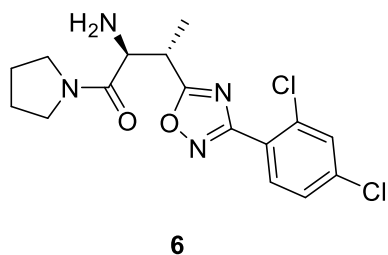


3.2.4.1.2 Bioisosterie fluoroalkenů k amidům

Z důvodu podobnosti tvaru, sterické náročnosti i elektronových poměrů byly fluoro-, chloro- i trifluormethylalkeny testovány jako bioisosterní k amidům s cílem zvýšit jejich biologickou stabilitu. Zatímco podobnost tvaru skupiny je dobrá, dipólový moment je v případě uvedených skupin výrazně nižší.²⁸

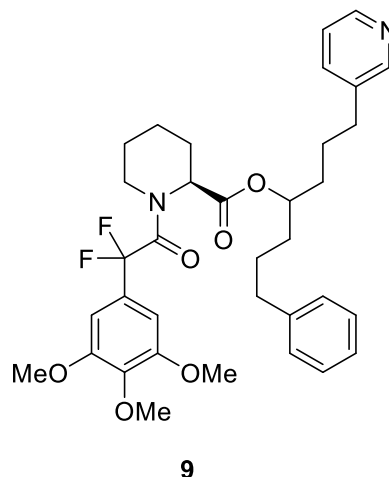
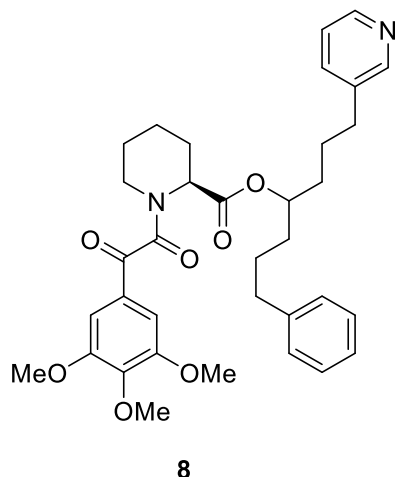
Příkladem látky, v níž bylo této bioisosterie využito je látka **7**. Ta vychází z amidu **6**, látky schopné inhibovat dipeptidyl peptidázu IV, enzym, jehož inhibice může vést k terapii diabetes melitus typu 2. Ačkoli samotná záměna zmiňovaných skupin vedla k poklesu aktivity, biologická dostupnost a stabilita se zlepšily. Modifikací dalších skupin bylo dosaženo velmi potentní látky a bioisosterie fluoroalkenu a amidu byla podložena krystalovou strukturou. Vývoj těchto fluoroalkenů byl nicméně přerušen z důvodu vzniku reaktivních toxických

metabolitů.⁵⁰ Podobná schopnost fluoroarenů napodobovat laktamy byla rovněž pozorována a potvrzena krystalovou strukturou.⁵¹



3.2.4.1.3 Bioisosterie skupiny CF₂ ke karbonylu

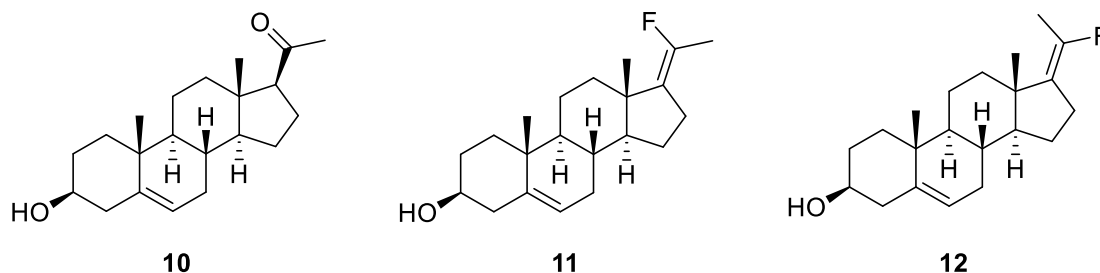
Také *gem*-difluoromethylenová skupina může sloužit jako bioisoster karbonylu, což bylo ukázáno na příkladu syntézy neimunopresivního ligandu FK506-vázajícího proteinu. FK506 je makrolidové imunopresivum využívané při transplantacích. FK506-vázající protein je nicméně spojen i s ochranou vůči neurodegenerativním procesům z důvodu indukce exprese chaperonů.⁵² Byla připravena série ligandů obsahujících *gem*-difluoromethylenovou skupinu vykazujících přinejmenším srovnatelnou aktivitu, jako jejich protějšky obsahující keto skupinu. Přímé srovnání neaktivnějších, a také příbuzných, derivátů **8** a **9** nicméně vyznělo pro keto-sloučeninu. Za pozornost stojí, že v krystalové struktuře fluorované látky byla pozorována obdobná blízkost fluoru k vodíkovému atomu hydroxyly tyrosinu, jako v případě látky **8**, nasvědčující možnosti existence alespoň slabé vodíkové vazby.⁵³



3.2.4.1.4 Bioisosterie fluoroalkenů k enolům

Ačkoli se nejedná o náhradu karbonylové skupiny, má s ní bioisosterie fluoroalkenů k enolům zjevnou souvislost. Enoly totiž mohou vystupovat jako intermediáty enzymatických reakcí probíhajících na karbonylové skupině. Imitace tohoto intermediátu a jeho vazba k enzymu pak může vést k inhibici dané enzymatické dráhy. Jedním z případů, kdy enol vystupuje jako

intermediát je hydroxylace pregnenolonu (**10**) vedoucí k 17 α -hydroxypregnenolonu, který je pekurzorem androstendionu. Jelikož má produkce androgenů a estrogenů souvislost s hormonálně závislou rakovinou prsu. Inhibice jejich tvorby je proto z terapeutického hlediska zajímavá. Schopnost inhibovat tuto hydroxylaci byla prokázána u fluoroalkenyl derivátů **11** a **12**.



3.2.4.2 Fluorované motivy bioisosterní k hydroxyly

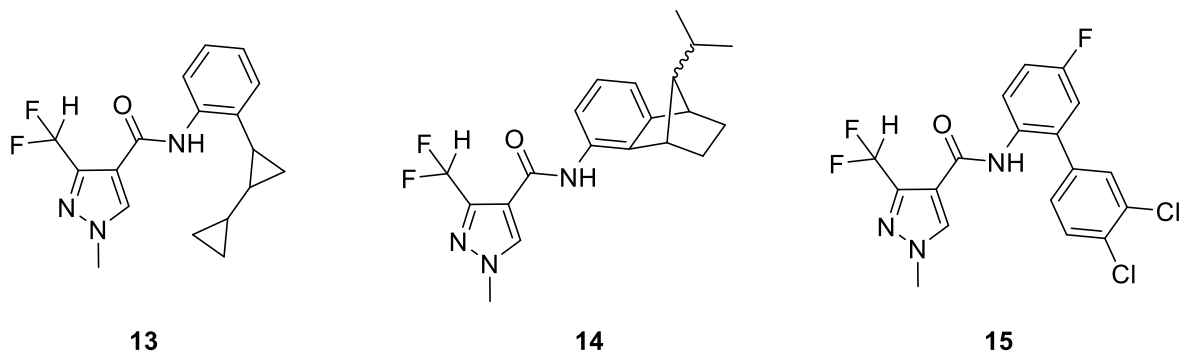
3.2.4.2.1 Bioisosterie C-F k hydroxyly

Náhrada hydroxylové skupiny fluorem je, spolu s náhradou vodíkového atomu, patrně nejprozkoumanější možností bioisosterie fluoru a stala se běžnou praxí při vývoji léčiv a zkoumání metabolismu. Již bylo zmíněno, že je to především z důvodu podobnosti polaritě a sterické náročnosti. Fluor nicméně, na rozdíl od hydroxyly, může být pouze akceptorem vodíkové vazby. Vytvářené vodíkové vazby jsou také navíc slabší, než je běžné pro jiné akceptory. Důsledky využití této bioisosterie jsou lépe předvídatelné v případě rigidnějších struktur, jako jsou například cyklické molekuly. V jejich případě sice fluorace má vliv na konformaci, není ale tak dramatický, jako v případě konformačně labilních molekul, u nichž ztráta možnosti tvořit vodíkové vazby v kombinaci s gauche efektem může vést k naprosté změně konformace a tím i ztrátě aktivity.⁵⁴ Skupinou látek, u nichž je této bioisosterie široce využíváno jsou fluorované deriváty nukleosidů, jimž bude v této práci věnován ještě samostatný prostor. Dokladem schopnosti fluoru podílet se na specifických interakcích s enzymem je srovnání aktivity sofosbuviru s jeho 2'- β -fluoro analogem. Fluor sofosbuviru interaguje s postranním řetězcem asparaginu virové polymerázy, k čemuž v případě analogu s konfigurací *ara* nedochází.⁵⁵

3.2.4.2.2 Bioisosterie skupiny CF₂H k hydroxyly

Ačkoli samotný fluor není schopen vystupovat jako náhrada hydroxyly ve smyslu donoru vodíkové vazby, difluormethylová skupina donorem být může. Je to tak díky podobnosti dipólových momentů. Vysoká elektronegativita fluoru vede k elektronovému deficitu na atomu vodíku, podobně jako je tomu v případě hydroxyly.⁵⁶ Ačkoli je ale skupina CF₂H potenciálním

donorem vodíkové vazby, je nutno poznamenat, že takováto vazba je zpravidla slabší než v případě obvyklých donorů. Difluormethylová skupina je společným prvkem řady příbuzných fungicidů (sedaxan (**13**), isopyrazam (**14**), fluxapyroxad (**15**)). V tomto případě se podílí na tvorbě intramolekulární vodíkové vazby s kyslíkem karbonylu amidové skupiny. Důležitost této interakce byla prokázána ztrátou aktivity v případě zavedení trifluormethylové skupiny na místo CF_2H .⁵⁷ Kromě hydroxyly je skupina CF_2H schopna mimikovat také thioly a hydroxamové kyseliny.⁵⁸

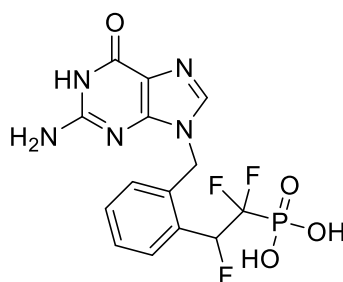


3.2.4.3 Skupina CF_2 jako bioisoster kyslíku

Gem-difluoromethylenová skupina bývá využívána nejen jako bioisoster karbonylové skupiny, ale také kyslíkového atomu. V takových případech se předpokládá, že atomy fluoru zaplní místo, které v případě kyslíkového atomu patří volným elektronovým pářům.²⁸ Je tak dosaženo obdobných elektronových poměrů, jako v případě kyslíku, a to bez významného narušení geometrie molekuly. Jedním z příkladů je využití v případě karbocyklických sacharidů. Glykosidická vazba tvořená takovýmito cukry je totiž odolná vůči hydrolýze, čehož může být využito jak v případě oligosacharidů, tak i nukleosidů. Prostá náhrada kyslíku za methylenovou skupinu ovšem vede k narušení stereoelektronických efektů a případné nemožnosti utváření interakcí závislých na přítomnosti polárního centra. Bylo ukázáno, že náhrada kyslíku za difluoromethylenovou skupinu vede k zachování elektronových poměrů kyslíkatého cyklu při současné vyšší stabilitě.⁵⁹

Další příklad této bioisosterie je možno nalézt v chemii fosfátů, jejichž bioisostery fosfonáty jsou odolné vůči hydrolýze. Fosfonáty našly uplatnění například jako inhibitory fosfatázy nebo jako nukleotidová léčiva, u nichž je tak obejitá nutnost biologické aktivace kinázami. Náhrada kyslíku fosfátu za methylen ovšem vede také ke změnám vazebných úhlů a pK_A fosfátové skupiny, což se může negativně projevit na její schopnosti skutečně vystupovat jako bioisoster. Fluorací této methylenové skupiny se vlastnosti fosfonátu přibližují původnímu fosfátu a to jak ve smyslu snížení pK_A , tak i částečné opravy vazebných úhlů.^{60,61} *Gem*-difluorofosfonáty byly

úspěšně využity při výzkumu inhibitorů fosforylázy purinových nukleosidů. Ta katalyzuje reverzibilní fosforolýzu guanosinu a inosinu (a jejich 2'-deoxy analogů) za vzniku volné báze a ribózy-1-fosfátu (respektive deoxoribózy-1-fosfátu). Její inhibice tak může vést mimo jiné k prodloužení účinku jiných léčiv z důvodu jejich pomalejší metabolizace. Jedním z prozatím nejúčinnějších inhibitorů tohoto enzymu je látka **16**, *gem*-difluoroderivát *ortho*-substituovaného 9-benzylguaninu.⁶²



16

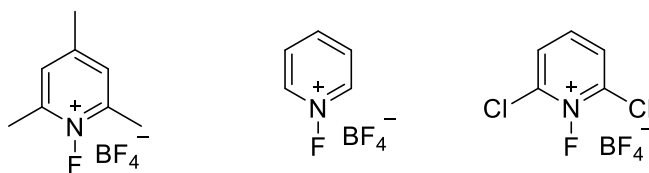
3.2.5 Metody fluorace využívané v medicíně

3.2.5.1 Elektrofilní fluorace

V počátcích organofluorové chemie byl jediným zdrojem kationtu F^+ plynný fluor. Extrémní reaktivita fluoru, mimo jiné pramenící z nízké energie vazby fluorů v molekule F_2 a naopak tvorby silných vazeb s ostatními prvky, vedla k nutnosti využívání speciálního laboratorního vybavení a nasazení skutečně dobře proškoleného osazenstva laboratoře. Vysoká reaktivita plynného fluoru se projevuje také nízkou selektivitou reakcí a rizikem iniciace radikálových reakcí vedoucích k dalším vedlejším produktům. Nicméně i tak se fluor osvědčil, a to především při přípravě jednoduchých fluorovaných uhlíkových řetězců. S ohledem na možnosti uplatnění fluorovaných organických látek došlo přirozeně i k vývoji selektivnější a bezpečnější činidel. Zatímco využívání fluoranů, fluoridu perchlorylu nebo fluoru zředěného inertním plynem bylo stále velmi riskantní, nověji vyvinutý XeF_2 představoval již bezpečnější a stabilnější činidlo. I tak ale jeho silné oxidační schopnosti do značné míry omezovaly, jaké skupiny budou tolerovány. Dalšího rozšíření možností fluorace z důvodu širšího spektra substrátů pak bylo dosaženo využíváním činidel s vazbou O-F, jako byl například CF_3OF nebo $AcOF$.^{63,64}

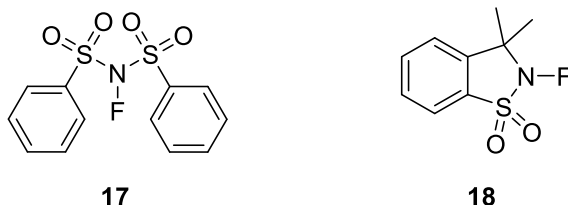
K výraznému pokroku v oblasti činidel poskytujících elektrofilní fluor byl učiněn v 80. letech s příchodem látek s vazbou N-F. Díky většímu rozdílu elektronegativit, než tomu bylo v případě sloučenin s kyslíkem, a větší síle vazby N-F se jedná o látky stabilní, bezpečné a díky nižší elektrophilitě také selektivnější. Jednou ze skupin těchto látek jsou soli N-fluoropyridinia s nenukleofilními anionty, jako jsou TfO^- nebo BF_4^- . Jejich reaktivita je závislá na elektronové

hustotě vazby N-F a je tedy možné ji ovlivnit volbou substituce na pyridinu (některé možnosti jsou vyobrazeny na Obrázek 5).⁶⁵

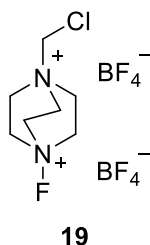


Obrázek 5- Příklady soli N-fluoropyridinia využívaných pro fluorace

Další skupinou jsou látky odvozené od N-fluorosulfonamidu a to N-alkyl-N-fluorosulfonamidy a N-fluorosulfonimidy, které jsou získávány z amidů jejich reakcí se zředěným fluorem. Mezi dnes komerčně dostupné látky patří například N-fluorobenzensulfonimid (**17**), který je kromě využití jako zdroj fluoru při reakcích enolů a karbaniontů využíván také při couplingových reakcích.⁶⁶ Příkladem z kategorie N-alkyl-N-fluorosulfonamidů je látka **18**.⁶⁷



Významnou skupinu elektrofilních fluoračních činidel tvoří Selectfluor (**19**) a jeho deriváty. Ten se pro svou výjimečnou stabilitu, uživatelskou přívětivost, široké možnosti využití a nízkou cenu stal jedním z nejpobulárnějších činidel pro tento typ reakcí. Jeho poměrně přímočará syntéza vychází z diazabicyklo[2.2.2]oktanu a fluorace působením F_2 je posledním krokem. Reaktivita jeho derivátů je určena schopností substituentu na dusíkovém atomu odtahovat elektrony. Reaktivita stoupá od jednoduchých alkylových skupin, přes chloromethyl až k nejreaktivnějšímu derivátu nesoucímu 2,2,2-trifluorethylovou skupinu, který je schopný fluorovat i benzen.⁶⁸



V případě reakcí s alifatickými substráty jsou elektrofilní fluorační činidla využívána pro tvorbu α -fluorokarbonylových sloučenin. Substráty takových reakcí bývají enoláty nebo silyl-

enol ethery pocházející zpravidla z karbonylových nebo β -keto-karbonylových sloučenin, eventuálně i allylsilánových derivátů. Zatímco v případě starších a reaktivnějších činidel docházelo obvykle ke vzniku produktů difluorovaných, s novějšími a nyní také primárně užívanými činidly je dosažováno monofluorace.⁶⁵ Byly vyvinuty také metody enantioselektivní fluorace. Ta je založena buď na přípravě chirálního činidla, jako je například N-fluorochinin reakcí chininu se Selectfluorem, nebo na využití chirálních katalyzátorů.⁶⁹ Jako příklad je uvedena reakce s derivátem chininu (DHQB). Jako skupina R vystupují skupiny methylová, ethylová a benzylová, u nichž bylo dosaženo enantiomerních přebytků v rozmezí 54–89 % (Schéma 2).

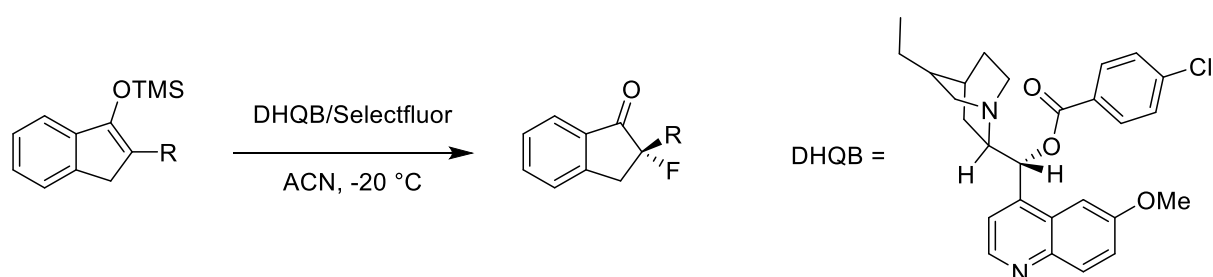


Schéma 2 - Využití Selectfluoru k enantioselektivní fluoraci enoletheru

Fluorace aromatických sloučenin elektrofilní aromatickou substitucí je náročnější než ostatní halogenace. Příčinou je především extrémní elektronegativita fluoru destabilizující halocyklohexadienylový kationt. Aromatické sloučeniny obsahující zinek, cín, křemík, germanium nebo i boronové kyseliny nejsou příliš reaktivní a pro jejich fluoraci je zapotřebí silných fluoračních činidel jako je fluor nebo fluorid xenonový. Oproti tomu reaktivnější Grignardova činidla a aryllitné sloučeniny mohou reagovat regioselectivně i s N-F činidly. Problém v jejich případě nicméně působí jejich velká bazicita a nukleofilita, omezující spektrum vhodných substrátů. Nejnovější metodou je fluorace katalyzovaná paládiovými katalyzátory. Jako substrát mohou sloužit funkcionalizované sloučeniny, jako jsou například boronové kyseliny, nebo i nefunkcionalizované, které nicméně musí nést vhodnou, například dusíkatou, řídicí skupinu.⁷⁰

3.2.5.2 Nukleofilní fluorace

Ačkoli jsou nukleofilní fluorace v současné chemii obvyklými reakcemi, fluoridový aniont obvykle vystupuje jako špatný nukleofil. Fluorace je sice z termodynamického hlediska výhodná, ovšem z důvodu velké aktivační energie tvorby vazby mezi uhlíkem a fluorem jsou často nutné velmi energické podmínky a například i vhodná volba rozpouštědla.⁶⁴ Fluoridový aniont je v protických rozpouštědlech silně solvatován, čímž je jeho reaktivita minimalizována.

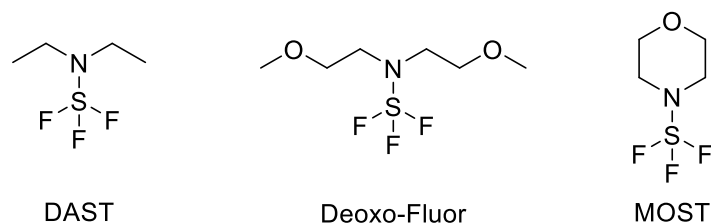
Oproti tomu v nepolárních rozpouštědlech je většina jednoduchých fluoridů nerozpustných z důvodu tvorby blízkých iontových párů. Vhodnou volbou jsou obvykle polární aprotická rozpouštědla tvořící kompromis mezi rozpustností a nukleofilitou. V případě fluoridu je ovšem nukleofilita v úzké souvislosti s bazicitou a její nárůst tedy může vést ke vzniku vedlejších produktů.⁷¹ Pozitivní vliv na poměr těchto dvou vlastností mají terciární alkoholy, jako například *tert*-butanol. Ty nesolvují fluoridový aniont tak dobře jako jiné alkoholy, a přitom jsou schopny snížit jeho bazicitu.⁷²

Pro substituční reakce, probíhající obvykle mechanismem S_N2 (s častou možností kompetice E2-eliminace), mohou být využívány například fluoridy alkalických kovů, které jsou výhodné zejména pro svou nízkou cenu.⁶⁵ Obvykle se jedná hlavně o KF a CsF. Jejich kombinace s crown ethery je využívána pro zvýšení rozpustnosti v důsledku komplexace kationtu, a tedy separace iontů. Jinou možností je využití fluoridů s objemným kationtem, umožňujícím delokalizaci pozitivního náboje a lepší rozpustnost v organických rozpouštědlech. Typickým příkladem je tetrabutylammonium fluorid (TBAF), který je dostupný jako trihydrát. Přítomnost vody má však negativní vliv na reaktivitu.⁶⁴ Jeho sušení je problematické z důvodů možné Hoffmanovy eliminace. Syntéza bezvodého TBAF byla představena v roce 2005.⁷³ Jinou možností pak je využití tetramethylammonium fluoridu, který může být připraven i sušením bez rizika eliminace.⁶⁵

Jiným zdrojem fluoridových aniontů jsou činidla vzniklá smísením fluorovodíku s aminy, v jejichž případě jsou omezeny korozivní vlastnosti a reaktivita. Příklady takových směsí jsou triethylamin tris(hydrogenfluorid) Et₃N·3HF nebo pyridinium poly(hydrogenfluorid) (PPHF), známý také jako Olahovo činidlo. V důsledku snížení nukleofility aminy vyžadují tato činidla použití aktivovaných substrátů, jako jsou například epoxidy.⁶³ Jiné využití nacházejí v kombinaci s oxidačními látkami, jako jsou NIS a NBS v případě fluorodesulfurizačních reakcí. Při nich patrně dochází ke vzniku fluoridů daných halogenidů *in situ*, aktivaci vazby C-S a konečně substituci síry fluoridovým aniontem.⁷⁴ Tato kombinace je využívána také při reakcích s alkeny za vzniku vicinálních dihalogenidů. Reakce připomínající běžnou halogenaci dvojně vazby probíhá podle Markovnikova pravidla.⁶³

V kontextu této práce je nejvýznamnější skupinou látek ta, která je využívána na deoxofluorační reakce. Historickým předchůdcem dnes laboratorně využívaných činidel je plynný fluorid siřičitý. Ten byl však již před koncem minulého tisíciletí nahrazen méně toxickými a korozivními, kapalnými, selektivnějšími a z hlediska deoxofluoračních reakcí aktivnějšími deriváty. Jejich syntéza však stále zahrnuje využití SF₄. Prvním derivátem SF₄, který umožnil

rozšíření deoxofluoračních reakcí, se stal v roce 1975 diethylaminosulfur trifluorid (DAST).⁷⁵ Následovaly jej objevy dalších derivátů, jako jsou například morfolinový (MOST) a bis(methoxyethyl)aminový analog, známý pod označením Deoxo-Fluor. Význam derivátů DASTu spočívá jak v odlišné reaktivitě, tak především ve vyšší tepelné stabilitě. DAST totiž při teplotách nad 90 °C exploduje. Zmíněné látky jsou vyobrazeny na 6 a mechanismus jejich popisuje Schéma 3. Vzácně může docházet také k retenci konfigurace pramenící například z participace jiných funkčních skupin v molekule substrátu.⁷⁶



Obrázek 6 - DAST a jeho deriváty

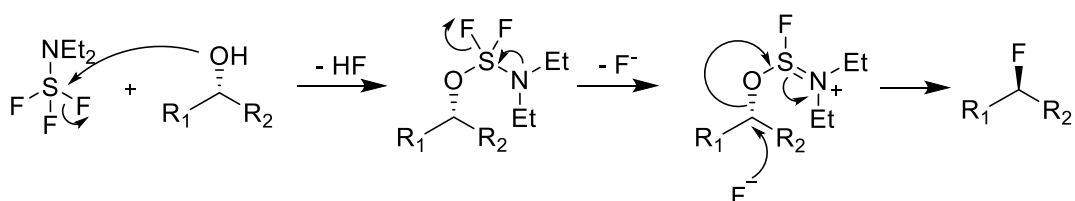
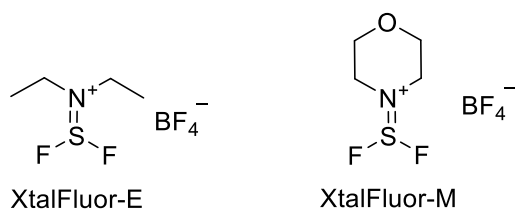


Schéma 3 - Mechanismus deoxofluorační reakce DASTu s alkoholem

Ačkoli používání DASTu a jeho derivátů přímo nevyžaduje využívání speciálního laboratorního vybavení, dochází v případě běžného borosilikátového skla k jeho postupnému naleptávání v důsledku přítomnosti uvolňovaného a také toxického HF. Jako krystalická, neexplozivní alternativa neprodukující HF byla vyvinuta činidla XtalFluor-E a XtalFluor-M (Obrázek 7 - Alternativní činidla k DASTu, aminodifluorsulfoniové soli. Tak jsou produkována reakcí DASTu (respektive příslušného derivátu) s BF_3 . Oproti výše uvedenému mechanismu ovšem není intermediát vzniklý jejich reakcí s alkoholy (z důvodu protonace aminu) schopný uvolnění fluoridového aniontu a je nutné využití aditiv. Jako ta slouží buď $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ nebo DBU.⁷⁷



Obrázek 7 - Alternativní činidla k DASTu, aminodifluorsulfiniové soli

Kromě deoxofluorační reakce s alkoholy jsou DAST a jemu příbuzné látky schopny reakce také s karbonylovými sloučeninami. Z ketonů a aldehydů tak vzniká difluoromethylenová skupina, z kyselin a chloridů kyselin trifluormethylová skupina a z esterů α,α -difluoroethery.⁷⁶ Předpokládá se, že reakce s karbonylovými sloučeninami je zahájena adicí HF na dvojnou vazbu C=O, následovanou běžnou deoxofluorační reakcí. Pro iniciaci obvykle stačí HF vzniklý hydrolyzou fluoračního činidla, v případě látek typu XtalFluor-E k hydrolyze dochází minimálně, a tak je potřeba jeho vnější zdroj.⁷⁸

Jednou z metod využívaných pro přípravu fluorovaných aromatických látek je aromatická nukleofilní substituce, již je možno fluor zavést na elektronově deficitní areny. Obvykle se jedná o tzv. Halex proces, tedy o výměnu halogenů. Jelikož rychlost určujícím krokem je tvorba Meisenheimerova komplexu, probíhá nejnáze substituce chloru. Pro tyto reakce bývají využívány bezvodé fluoridy alkalických kovů (KF, CsF) a probíhají při vysokých teplotách (přibližně 200 °C).⁷⁰ Alternativními zdroji fluoridu jsou TBAF a tetramethylammonium fluorid. Při jejich použití je možné substituce dosáhnout i laboratorní teplotě. S využitím tetramethylammonium fluoridu bylo dosaženo dokonce fluorace neaktivovaného substrátu.⁷⁹ Ovšem, jak bylo demonstrováno na reakci 2-bromonaftalenu, v případě tohoto zdroje velmi bazického fluoridového aniontu může reakce probíhat arynovým mechanismem a vést ke směsi produktů.⁸⁰ Alternativou k Halex procesu je fluorodenitrace. Při ní vystupuje jako odstupující skupina nitroskupina. Při současné přítomnosti nitro i chloro skupiny je preferována substituce prvně jmenované.⁸¹ Ještě efektivněji probíhá substituce trimethylammoniové skupiny.⁸²

3.3 Fluorované deriváty nukleosidů s protivirovými účinky

V posledních několika dekádách bylo v oblasti léčby virových onemocnění dosaženo významných úspěchů a byla vytvořena terapie některých z dříve neléčitelných onemocnění. Také získávají pozornost onemocnění, která byla dříve vnímána jen okrajově. Mezi nimi jsou

například onemocnění způsobená virem Zika, Ebola, některými kmeny herpes virů a virů způsobujících hepatitidy, přičemž některé z těchto nemocí mají potenciál širokého rozšíření. Problematický je rovněž vznik rezistentních kmenů virů, na něž léčba již existuje. Nový vývoj antivirotik tak, ačkoli jsou infekční nemoci s případnými fatálními důsledky v rozvinutém světě považovány za minulost, představuje oblast, jíž by měla být věnována dostatečná pozornost. Nezanedbatelný význam má rovněž vývoj bezpečných léčiv na onemocnění, jako jsou sezónní rýmy, jejichž každoroční negativní dopad na ekonomiku je zásadní.⁸³

Mezi současnými antiviroty představují různé nukleosidové analogy (NA) početnou a strukturně rozmanitou skupinu. Do této skupiny patří také mnohá z nejúspěšnějších léčiv proti virům. Ačkoli jsou do jisté míry podobná NA cytostatikům, jejich užívání zpravidla nevede k vývoji tak zásadních nežádoucích účinků. Tato lepší tolerance je založena především na faktu, že terapeutickými cíli jsou obvykle virové enzymy a selektivnější lidské enzymy s nimi takřka neinteragují. Ačkoli se NA staly běžnou součástí terapií, jsou s jejich vývojem obvykle spjaty jisté problémy. Z důvodu vysoké polaridy molekul je mechanismus pasivního vstupu do buněk omezen a vývoj vhodných proléčiv je nutností. Jisté další úskalí skýtá nutnost NA být pro svůj účinek ve formě trifosfátu. Především zavedení prvního fosfátu je z důvodu vysoké selektivity endogenních kináz složité. Z tohoto důvodu bývají NA někdy připravovány v podobě fosfátů, fosfonátů či fosforamidových proléčiv.⁴²

Využití substituce vodíku nebo hydroxyly v molekulách nukleosidů se stalo poměrně obvyklou strategií při optimalizaci jejich účinku a stability. Fluorace v polohách 2' a 3' je spojována s nárůstem stability glykosidické vazby, a to jak chemické stability (tedy především odolnosti vůči působení kyselého prostředí žaludku), tak i stability metabolické.⁸⁴

3.3.1 Analogy nukleosidů s fluorací báze

3.3.1.1 Trifluridin

Prvním schváleným fluorovaným antivirotem se v roce 1980 stal trifluridin (**22**). Ten je využíván především pro léčbu zánětu rohovky způsobeného virem *Herpes simplex* typu 1 a 2, *vaccinia* virem a také cytomegalovirem. Ve formě monofosfátu tato látka inhibuje činnost thymidylát syntázy a její trifosfát může být začleněn do nově vznikající virové DNA.⁸⁵ V kombinaci s tipiracilem, inhibátorem thymidinofosforylázy zpomalujícím jeho metabolismus, je využíván i pro léčbu metastatického kolorektálního karcinomu.⁸⁶

3.3.1.2 Emtricitabin

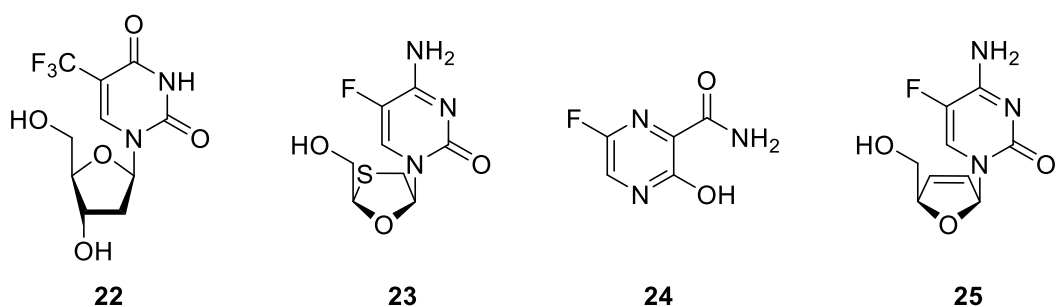
Emtriciabin (**23**) je inhibítozem reverzní transkriptázy HIV, jehož používání bylo schváleno v roce 2003. Využíván je spolu s dalšími látkami v kombinacích jako jsou Truvada, Atripla, Stribild, či Genvoya.⁸⁷ Pro svůj velký význam při léčbě HIV byl zařazen na seznam esenciálních léčiv WHO.⁸⁸ Zajímavým strukturním prvkem je přítomnost oxathiolanového kruhu, čímž se velmi podobá lamivudinu, od nějž se liší jen fluorací. Z tohoto důvodu je v jejich případě vysoké riziko zkřížených rezistencí. Kromě HIV je emtricitabin i inhibítozem HBV, nicméně pro použití na léčbu onemocnění způsobených tímto virem nebyl dosud schválen.⁸⁹

3.3.1.3 Favipiravir

Favipiravir (**24**) je fluorovaný pyrazinový karboxamid, který byl v roce 2004 schválen pro léčbu chřipky typu A, B i C v Japonsku a jeho schvalování v dalších zemích v současné době probíhá. Ačkoli v Japonsku jsou vytvářeny jeho zásoby pro případ pandemie chřipky, stále panují pochybnosti o jeho skutečné efektivitě.⁹⁰ Favipiravir je proléčivem a pro svou aktivitu musí být nejprve metabolizován na ribofuranosyl trifosfát. Takto aktivovaný následně selektivně inhibuje činnost virové RdRp, přičemž napodobuje pyrimidinové báze.⁴² Novější výzkumy rovněž ukazují, že by v jeho případě mohlo docházet rovněž k letální mutagenizi. Toto širší spektrum mechanismů může být také příčinou faktu, že favipiravir vykazuje aktivitu také vůči jiným RNA virům, jako jsou Zika, Chikungunya a především Ebola. Na léčbu onemocnění způsobeného posledně jmenovaným byl testován v průběhu epidemie v roce 2014, a ačkoli je potřeba dalšího ověření, zatím bylo dosaženo slibných výsledků.⁹¹

3.3.1.4 Elvucitabine

Příkladem fluorovaného NA, u něhož ještě nebylo dokončeno klinické testování je Elvucitabin (**25**). Jedná se o analog *L*-cytidinu zkoumaný pro svůj účinek proti HIV a HBV, přičemž je účinný i proti kmenům HIV rezistentním vůči zidovudinu a lamivudinu. Aktuálně se nachází v druhé fázi klinického testování. V předchozí fázi bylo nicméně zjištěno, že jeho podávání vede u některých pacientů k potlačení tvorby kostní dřeně. Aktuálně vývoj probíhá v Číně, Hongkongu a na Taiwanu.^{92,93}



Obrázek 8 - Antivirotika s fluorací báze

3.3.2 Analogy nukleosidů s fluorací cukerné části

3.3.2.1 Sofosbuvir

Sofosbuvir, známý také pod obchodním označením Sovaldi, je látkou, která po svém schválení a uvedení na trh v roce 2013 způsobila revoluci v léčbě HCV. Sofosbuvir je určen k léčbě chronických infekcí způsobených HCV genotypu 1, 2, 3 a 4, přičemž 80 dní trvající terapie vede k vyléčení až u 90 % pacientů. Díky faktu, že dochází zpravidla k naprostému vymizení viru má sofosbuvir vysokou bariéru pro vývoj rezistence. Sofosbuvir působí jako inhibitor virového proteinu NS5B, který slouží jako RdRp, přičemž po biologické aktivaci na analogický trifosfát využíván mimikuje přirozený uridinový substrát. Jeho začlenění do rostoucího řetězce vede k terminaci syntézy RNA.⁹⁴ Pro dosažení výraznějších účinků bývá sofosbuvir kombinován s inhibitory dalších virových enzymů, jako jsou proteáza NS3 nebo multifunkční protein NS5A.⁸⁷ Sofosbuvir patří do kategorie pro-nukleotidů a jako proléčivo využívá fosforamidovou skupinu. Tento přístup k proléčivům se stal velmi populární v posledních letech při vývoji nových proléčiv již známých látek. Příkladem takového postupu je tenofovir alafenamid, nové proléčivo tenofoviru schválené pro léčbu HIV roku 2015.⁹⁵

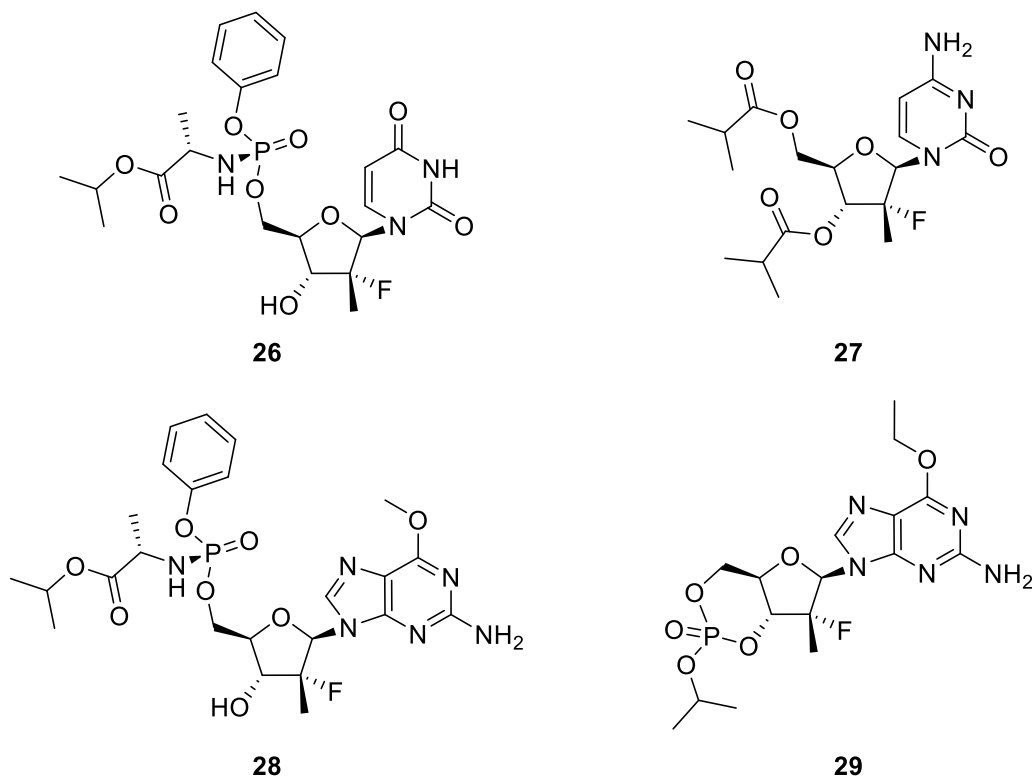
3.3.2.2 Mericitabin

Mericitabin je příkladem látky, která dosud nebyla schválena pro klinické použití a dosáhla druhé fáze klinického testování. Jedná se o látku analogickou sofosbuviru, lišící se od něj cytidinovou bází.⁹⁶ Ačkoli výsledky klinických testů potvrzovaly jeho dobrou aktivitu proti HCV, jeho další vývoj byl přerušeno, jelikož se nezdálo, že by přinášel zásadní zlepšení oproti již dostupným látkám.⁹⁷

3.3.2.3 PSI 353661 a PSI 352938

Jedná se o dvě proléčiva vycházející z velmi podobných látek. Ta je zástupcem analogů purinových nukleosidů. Stejně jako předchozí dvě uvedené látky je inhibitorem replikace HCV a také obsahuje stejnou cukernou jednotku. Liší se ovšem tím, že pro vývoj rezistence musí

dojít k vícečetným mutacím, a jejich vývoj je tedy zajímavý a nacházejí se ve fázi preklinického vývoje.⁹⁸



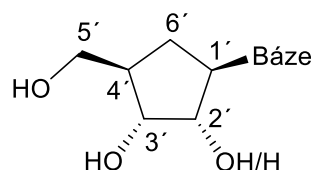
Obrázek 9 - Látky s antivirovými účinky s fluorací cukerné části molekuly

4 Diskuse a výsledky

4.1 Příprava karbocyklických nukleosidů

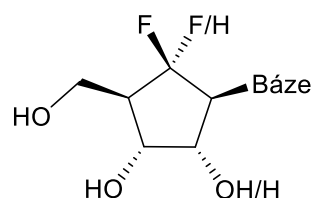
4.1.1 Příprava *gem*-difluorovaných derivátů nukleosidů

Při popisu připravovaných molekul bylo použito nestandardní číslování uhlíků alicyklické části molekuly. Tento systém byl zvolen proto, aby bylo zachováno číslování poloh 1' až 5' tak, jak je určeno pro nukleosidy. Číslování je naznačeno v Obrázku 10.



Obrázek 10- Číslování poloh v připravovaných karbocyklických nukleosidech

Jak je patrné z Obrázku 11, zobrazujícího obecný vzorec připravovaných látek, byly syntetizovány karbocyklické nukleosidy s jedním či dvěma atomy fluoru v poloze 6' a to buď s 2'-hydroxyskupinou v konfiguraci *ribo* nebo jako 2'-deoxynukleosidy. Kombinace těchto variant vede ke čtyřem různým pseudocukerným jednotkám, ke kterým je připojena vhodná purinová nukleobáze.



Obrázek 11 - Obecný strukturální vzorec připravovaných látek

Syntetická cesta k připravovaným karbocyklickým nukleosidům byla započata alkyací cyklopentadienu sodného, přímo následovanou enantioselektivní hydroborací-oxidací využívající chirální (-)-diisopinan-3-ylboran, která byla již dříve popsána.⁹⁹ Tento boran byl připravován reakcí (+)- α -pinenu s komplexem dimethylsulfidu s boranem a s ohledem na jeho nízkou stabilitu při kontaktu se vzduchem byl použit po trituraci přímo pro následující reakci. Sekvence těchto kroků poskytovala intermediát **30** ve výtěžku 40 %, který byl sice nižší než dosud publikované výsledky, nicméně, s ohledem na nepříliš vysokou cenu prekurzorů, přijatelný.^{100,101} Pro výtěžek reakce se ukázala být naprosto zásadní kvalita vstupních surovin, která se obzvláště v případě roztoku NaCp s časem skladování po prvním otevření velmi rychle snižovala. Jisté komplikace působilo oddělení produktu z reakční směsi, jelikož produkt

získaný při chromatografické separaci byl zpravidla kontaminován benzyl alkoholem. Jako instrumentálně nejsnazší se nakonec ukázala vícenásobná kódestilace s vodou. Z takto připraveného alkoholu **30** byl reakcí využívající VO(acac)₂ jako katalyzátor připraven epoxid **31** při poměru diasteromerů 88:12 ve prospěch žádaného produktu.¹⁰⁰ Reakce bez využití zmíněného katalyzátoru byla nejen výrazně pomalejší, ale poskytovala produkt s dr ≈ 6:4.

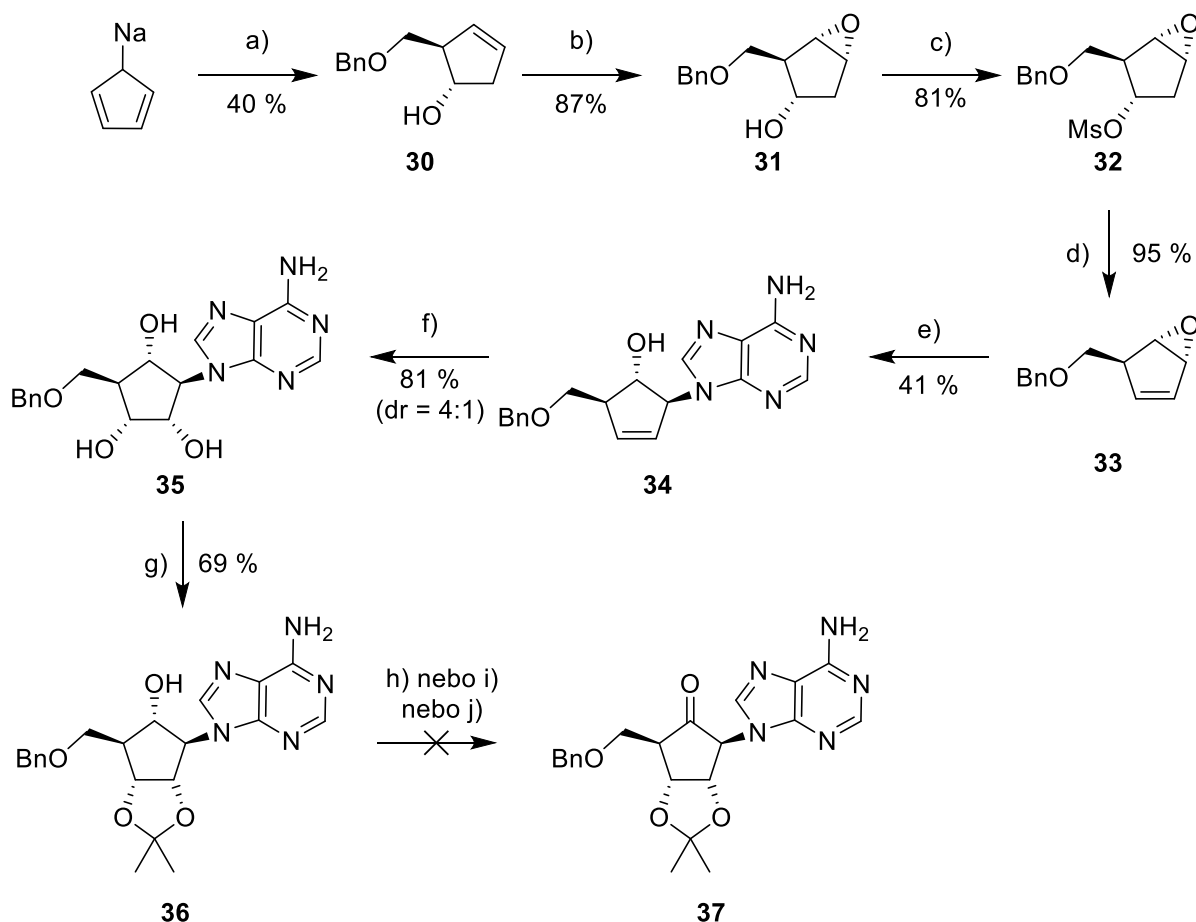


Schéma 4- Postup syntézy sloučeniny **37** s využitím bidentátní chránicí skupiny a) i) NaCp, BnOCH₂Cl, THF, -45 °C, 1 h; ii) (-)-diisopinán-3-ylboran, -60 °C → 5 °C, 19 h; iii) H₂O₂, NaOH, 5 °C, 1 h; b) *t*-BuOOH, VO(acac)₂, DCE, 25 °C, 3 h; c) MsCl, Et₃N, DMAP, DCM, 0 °C, 2 h; d) TBAF, THF, 35 °C, 3 d; e) adenin, DBU, DMF, 100 °C, 14 h; f) AD-mix-β, MsNH₂, H₂O/*t*-BuOH (1:1), 25 °C, 3 d; g) 2,2-dimethoxypropan; TsOH·H₂O, aceton, reflux, 2 h; h) i) DMSO, (COCl)₂, DCM, -78 °C, 1 h; ii) Et₃N, -78 °C → 25 °C, 2 h; i) DMP, *t*-BuOH, DCM, 0 °C → 25 °C, 2 h; j) CrO₃, pyridin, Ac₂O, DCM, 25 °C

Pro přípravu 2',3'-dihydroxy derivátů, byla nejprve zvolena syntetická cesta uvedená ve Schématu 4. Z epoxidu **31** byla reakcí s methansulfonyl chloridem připravena látka **32**. Následná eliminace mesylové skupiny byla provedena působením TBAF.¹⁰² Přestože byla tato báze použita ve velkém přebytku, trvala reakce minimálně 5 dní. Jelikož je bazicita fluoridového aniontu silně závislá na přítomnosti vody, byl učiněn pokus s provedením reakce za přítomnosti aktivovaných molekulových sít. Reakce sice probíhala přibližně dvakrát

rychleji, docházelo však ke vzniku většího množství vedlejších produktů. Zvýšení rychlosti reakce bez narušení selektivity bylo dosaženo zvýšením reakční teploty na 35 °C a v takovém případě proběhla do plné konverze za 2-3 dny.

Reakcí DBU soli adeninu s epoxidem **33** byl připraven nukleosid **34** ve výtěžku 41 %, přičemž hlavním vedlejším produktem byl N7-izomer, který je snadno rozpoznatelný díky odlišnému absorpčnímu spektru. Jako jedna z možností, jak získat *gem*-difluorovanou látku, se nabízela oxidace hydroxylové skupiny látky **34** a následná deoxofluorační reakce. Tato cesta se ovšem ukázala jako nevhodná z důvodu migrace dvojnás vazby mezi uhlíky 3' a 4', k níž dochází při oxidaci. Karbocyklický nukleosid byl tedy nejprve *cis*-hydroxylován. Reakce s OsO₄ nicméně probíhala pomalu a pouze s poměrně nízkou selektivitou ($d_r \approx 2,5:1$) pro ribo-konfiguraci hydroxylů, a tak bylo přistoupeno k využití AD-mix- β , komerčně dostupně směsi pro asymetrickou dihydroxylaci, s níž bylo dosahováno poměru diastereomerů až 6:1. Bylo popsáno, že v případě podobných substrátů, které neodpovídají těm, pro něž jsou činidla AD-mix určena, příliš nezáleží na volbě α nebo β .¹⁰³ Z důvodu nízké konverze při využití pouze AD-mix byl do reakční směsi postupně přidáván v malých dávkách OsO₄, což vedlo ke spotřebování substrátu bez narušení selektivity. Takto získanou směs izomerů se nepodařilo zcela rozdělit, nicméně po ochránění hydroxylů v polohách 2' a 3' bidentátní isopropylidenovou skupinou bylo možné chromatograficky získat jednotlivé izomery. Pro zavedení dvou atomů fluoru do polohy 6' bylo nejprve nutné hydroxyl v této poloze oxidovat na karbonylovou skupinu. Překvapivě ani v tomto případě, podobně jako dříve u intermediátu **34**, nebyl získán produkt. Při využití Swernovy oxidace bylo dosaženo jen velmi nízké konverze, aniž by byl získán kýžený produkt. Naopak v případě reakcí s Dessovým-Martinovým činidlem (DMP) a směsí CrO₃/pyridin/Ac₂O (1:2:1) sice bylo dosaženo plné konverze substrátu, ovšem bylo získáno jen široké spektrum vedlejších produktů. Jejich vznik byl patrně spojen s labilitou isopropylidenové skupiny. Jelikož se po této zkušenosti zdál přístup využívající bidentátní chránění vicinálních hydroxylů nevhodný, byla navržena jiná syntetická cesta, která je vyobrazena na Schématu 5.

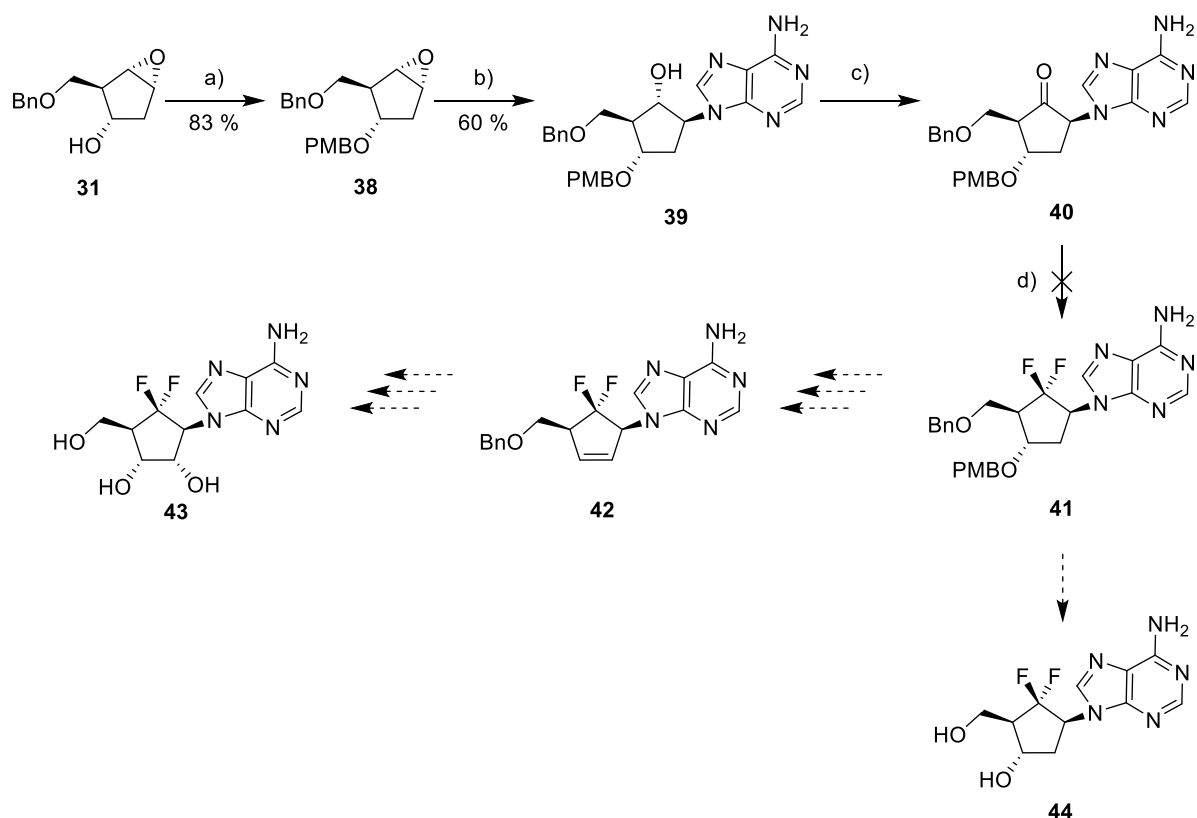


Schéma 5- Postup syntézy látky 41 s využitím deoxofluorační reakce a) i) NaH, THF, 25 °C, 1h; ii) PMBCl, TBAI, DMF, reflux, 2h; b) adenin, DBU, DMF, 110 °C, 20 h; c) DMP, t-BuOH, NaHCO₃, DCM, 0 °C -> 25 °C, 3 h (použito dále ihned po extrakci DCM/H₂O); d) DAST, DCM, 0 °C -> 25 °C, 24 h

Nově navržená cesta byla založena na změně pořadí prováděných modifikací molekuly, kdy oxidace a fluorace předcházejí eliminaci hydroxyly z polohy 3'. Tímto postupem, až do fáze oxidace podobným se syntézou entecaviru,¹⁰⁴ by navíc bylo umožněno získat jak 2',3'-dihydroxy derivát **43** tak i 2'-deoxy derivát **44** z jediného fluorovaného meziprojektu. Také ochráněný nenasycený intermediát **44** a případně z něj odvozený 2', 3'-dideoxy derivát by rovněž představovaly látky s potenciální biologickou aktivitou a prezentovaná syntetická cesta by poskytovala poměrně široké spektrum nukleosidových analogů.

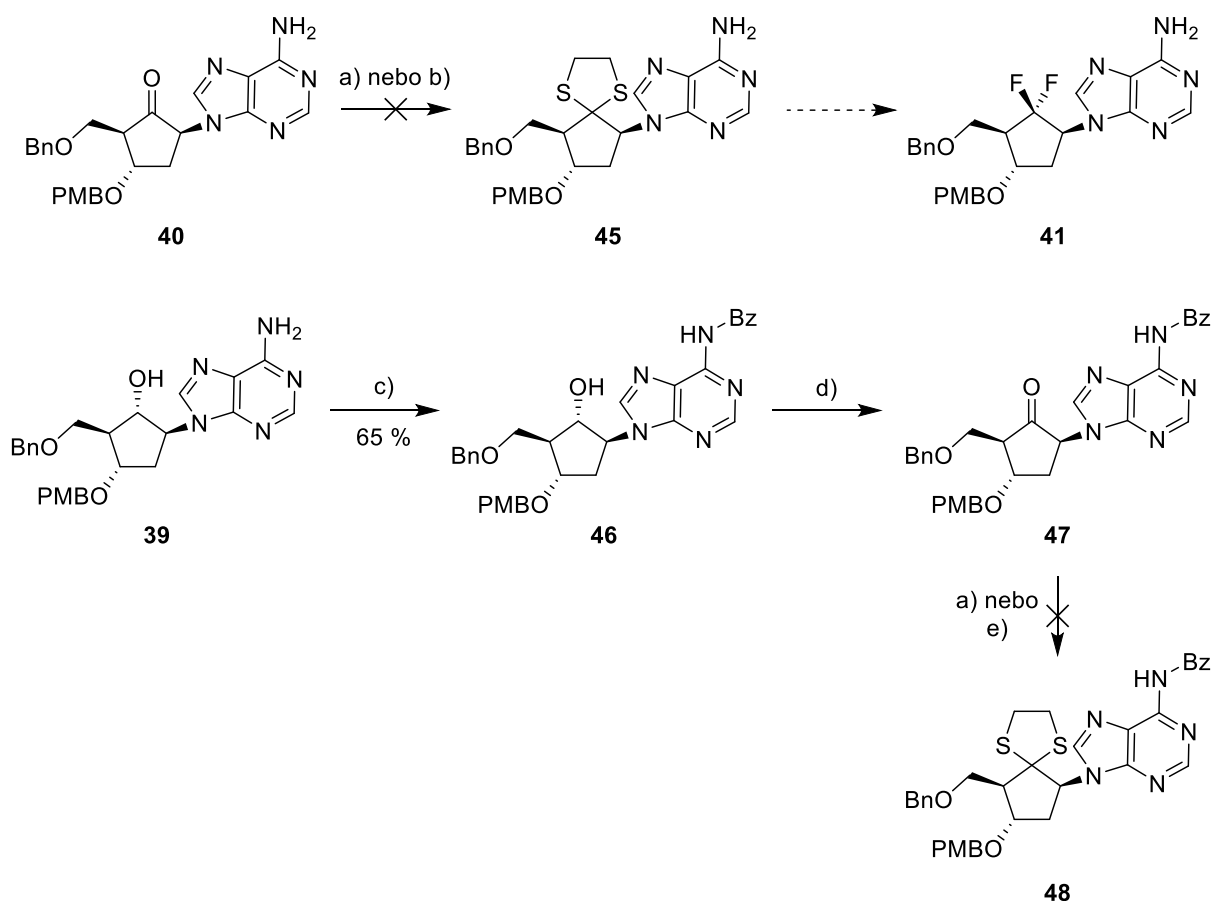
Jako chránicí skupina 3'-hydroxyly byla zvolena 4-methoxybenzyllová skupina a to z důvodu její předpokládané inertnosti v plánovaných syntetických krocích a současné možnosti provést její selektivní odstranění v přítomnosti benzyletherové skupiny. Epoxid **38** byl připraven podle publikovaného postupu.¹⁰² Jeho reakcí s DBU solí adeninu byl získán nukleosid **39** ve výtěžku 50-60 %. Podobně jako v případě reakce s epoxidem **33** představoval nejvíce zastoupený vedlejší produkt N7-izomer. Problematickým krokem se opět, byť pravděpodobně z jiné příčiny, stala příprava ketonukleosidu. Žádoucí produkt **40** totiž snadno podléhá β-eliminaci 4-methoxybenzyl alkoholu, přičemž tato reakce byla již dříve pozorována v případech příbuzných

látek. Různí autoři ji uvádějí jako katalyzovanou kyselé, bazicky a také SiO_2 (při současné stabilitě konkrétní látky v kyselém prostředí).¹⁰⁵ Přesto byl velmi podobný ketonukleosid úspěšně využit při syntéze entecaviru.¹⁰⁴ Pro oxidaci příslušného alkoholu na keton bylo využíváno Dessovo-Martinovo činidlo, umožňující provedení reakce za mírných podmínek. Toto činidlo může být také kombinováno s *tert*-butanolem, který substituuje jeden z acetátů v DMP, čímž je získána látka s menší náchylností k vedlejším reakcím. Další možností modifikace reakce s DMP je přidavek báze sloužící k zachycení uvolňovaného acetátu. V případě oxidace látky **39** bylo nejlepších výsledků, tedy nejnižší míry eliminace 4-methoxybenzyl alkoholu, dosaženo při přidavku NaHCO_3 , zatímco přidavek pyridinu vedl ke vzniku velmi nečistého produktu. I po nalezení vhodných podmínek se nicméně jednalo o látku nestabilní, a tedy byla vždy připravována krátce před použitím v následující reakci.

Pro difluoraci ketonu **40** byl zvolen nejprve DAST, jehož využívání je pro tento účel z důvodu přímočarosti nejobvyklejší. V tomto případě se ovšem ukázal jako nevhodný. Fluorace karbonylových sloučenin jeho působením sice v některých případech může probíhat i za nízkých ($< 0\text{ }^\circ\text{C}$) teplot, často je však nutno přistoupit k zahřívání a v případě skutečně málo reaktivních substrátů přistoupit k záměně za termicky stabilnější DeoxoFluor. Tyto energičtější podmínky ovšem nebyly slučitelné se stabilitou substrátu, kdy i při teplotě kolem $25\text{ }^\circ\text{C}$ docházelo k eliminaci PMBOH a vznik fluorované sloučeniny nebyl pozorován.

Jelikož se předpokládanou příčinou nestability zdála být možnost β -eliminace vedoucí ke vzniku α,β -nenasyceného ketonu, byl navržen desulfofluorační přístup, který je naznačen ve Schématu 6. I v tomto případě sice bylo nutno připravit ketonukleosid **40**, jeho reakce s ethan-1,2-dithiolem v přítomnosti Lewisovy kyseliny za vzniku 1,3-dithiolánu však slibovala mírnější reakční podmínky. Reakce s dithiolem ať už za přítomnosti BF_3 nebo $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ však nevedla ke vzniku produktu **45**, což bylo přisuzováno přítomnosti nechráněné aminoskupiny adeninu. Přítomnost Lewisových kyselin se ovšem nezdála být problematická z pohledu dříve pozorované eliminační reakce, která probíhala jen pomalu. Problém s přítomností volné aminoskupiny byl snadno vyřešen její benzoylací. Při oxidaci této látky se ukázalo, že je méně náchylná k β -eliminaci, což do jisté míry potvrdilo dříve publikovanou informaci, že k této nechtěné reakci dochází v důsledku přítomnosti nukleobáze a její modifikace tedy může do jisté míry ovlivnit i náchylnost k eliminaci.¹⁰⁶ Přesto nebylo možné využít chromatografickou separaci a jediným separačním krokem tak byla extrakce. Převedení aminoskupiny na amid vedlo ke změně reaktivity také při tvorbě 1,3-dithiolánu. Projevila se totiž schopnost BF_3 (která je popsána také v případě jiných Lewisových kyselin) odstranit 4-methoxybenzyl etherovou

chránící skupinu, a v reakční směsi tak byl velmi rychle pozorován vznik látky s volnou hydroxylovou skupinou v poloze 3'. Kyselinou, kterou je rovněž možno využít při reakci karbonylových sloučenin s thioley a současně lépe toleruje přítomnost 4-methoxybenzyl etherovou skupinu, je *p*-toluensulfonová kyselina. Její přítomnost pravděpodobně zabraňovala nežádoucí eliminační reakci a substrát tak projevoval dříve nepozorovanou stabilitu i v případě zvýšení teploty na více než 60 °C. Bohužel ale ani v tomto případě nebyl pozorován vznik kýženého produktu **48**. Z důvodů pozorované vyšší stability byla benzoylovaná látka **47** testována také jako substrát pro deoxofluorační reakci s Deoxo-Fluorem a také Xtal-Fluorem-E s přídavkem TEA·2HF jakožto iniciátoru reakce, nicméně v obou případech docházelo k nežádoucí eliminaci a vznik produktu nebyl pozorován.



*Schéma 6 - Postup syntézy látky 41 s využitím desulfofluorační reakce a) (CH₂SH)₂, BF₃·Et₂O, 25 °C, 16 h; b) (CH₂SH)₂, Zn(OTf)₂, DCM, 25 °C, 16 h; c) i) TMSCl, pyridin, DCM, 0 °C, 30 min; ii) BzCl, 0 °C -> 25 °C, 18h; d) DMP, NaHCO₃, DCM, 0 °C -> 25 °C, 5 h (použito do další reakce přímo po extrakci); f) (CH₂SH)₂, *p*-TsOH, CHCl₃, 3Å MS, reflux, 3 d*

Z důvodu výše popsané nízké stability klíčového intermediátu neumožňující využití energičtějších reakčních podmínek, bylo přistoupeno k další změně v syntetické cestě. Zatímco v případě nukleosidů je problematická β -eliminace popsána, v případě podobných struktur bez

přítomnosti nukleobáze k ní zpravidla nedochází.¹⁰⁵ Pro nukleofilní atak uhlíku oxiranového kruhu v epoxidu **38** tedy byla využita jiná vhodná nukleofilní činidla, která by po klíčové fluoraci poskytovala skupiny vhodné pro syntézu nukleosidu. To by umožňovaly jak kyslíkaté nukleofily poskytující hydroxylovou skupinu, která by po změně konfigurace mohla být Mitsunobuovou reakcí substituována, tak i dusíkaté, poskytující aminoskupinu umožňující výstavbu báze.

Jedním z využitých kyslíkatých nukleofilů byla sodná sůl allyl alkoholu, která byla připravena *in situ* reakcí s NaH, poskytující produkt **49** ve výtěžku 79 %, jehož oxidací DMP byl získán keton **50**. Následná deoxofluorační reakce působením DASTu však vedla jen ke vzniku velkého množství vedlejších produktů. Dalším zvoleným nukleofilem byl benzoát sodný poskytující produkt **52** v 70% výtěžku. Ačkoli i v tomto případě byl oxidací získán stabilnější produkt, než byly dříve používané nukleosidy, deoxofluorace opět poskytovala jen řadu neidentifikovaných vedlejších produktů. Z dusíkatých nukleofilů byl nejprve využit azid sodný, jehož reakcí s epoxidem v přítomnosti salmiaku vznikl azid **54**. Jeho oxidace Jonesovým ani Dessovým-Martinovým činidlem ovšem nevedla k potřebnému ketonu. Azid byl proto nejprve redukován Staudingerovou reakcí na amin **56**, který byl následně ochráněn *tert*-butoxykarbonylovou skupinou. Bohužel ani tento substrát nebyl vhodný pro oxidaci hydroxyly. Posledním testovaným nukleofilem byl ftalimid draselný. Podobně jako v předchozích pokusech probíhala reakce s epoxidem s dobrým výtěžkem. Při samotné oxidaci DMP byl pozorován vznik produktu eliminace jen v minimálním množství, nicméně i přes tento nadějný fakt nebylo dosaženo fluorace karbonylové skupiny působením DASTu, kombinace DASTu a Olahova činidla, ani Xtal-Fluorem-E s TEA·3HF jako iniciátorem. Ve všech uvedených případech byl pozorován především produkt eliminace PMBOH.

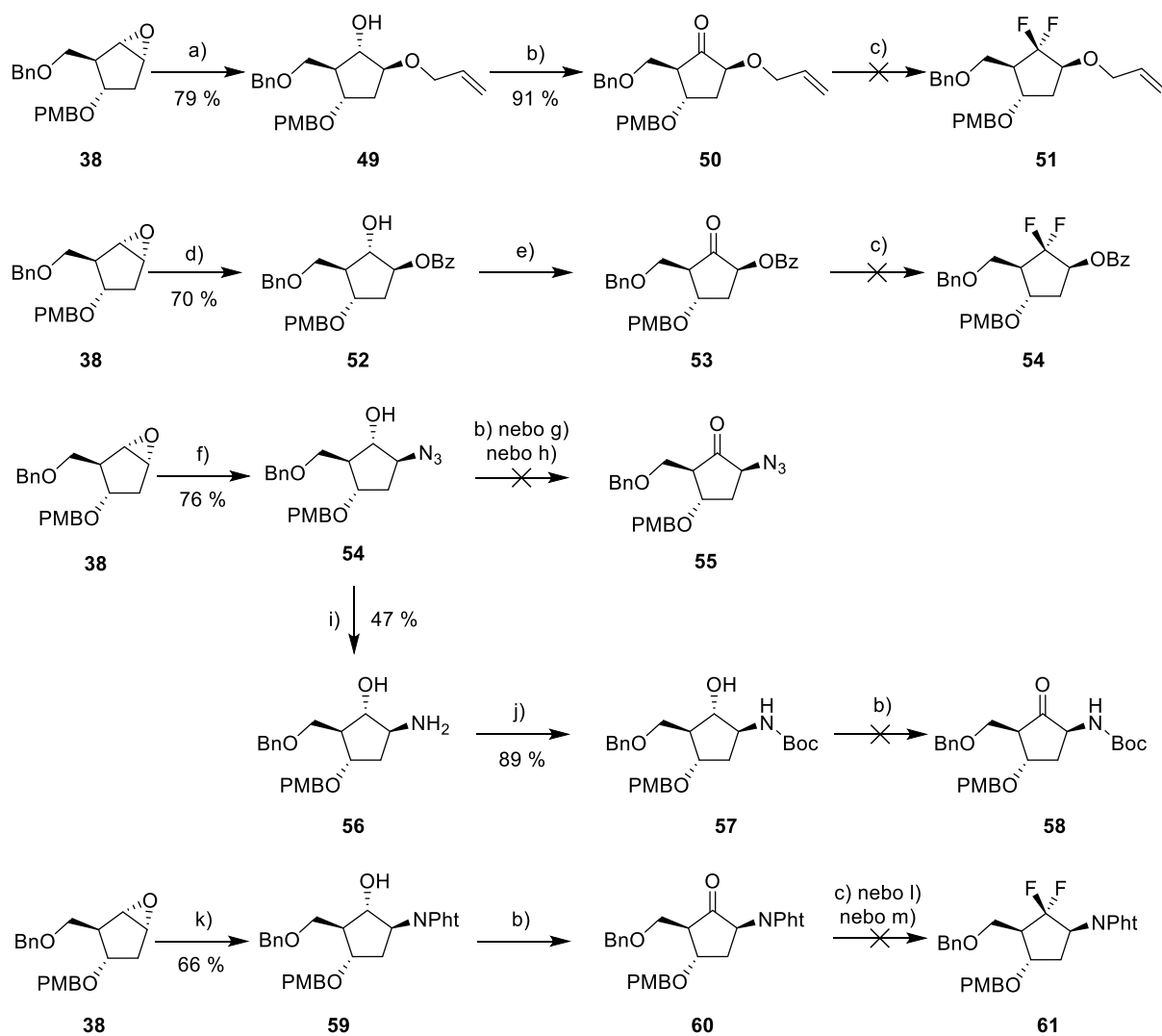


Schéma 7 - Příprava difluorovaných intermediátů a) allyl alkohol, NaH, reflux, 3 d; b) DMP, DCM, RT, 1h; c) DAST, DCM, 25 °C, 16 h; d) BzONa, HMPA, 110 °C, 3d; e) PCC, DCM, 4 Å MS, 0 °C -> 25 °C, 14 h; f) NaN₃, NH₄Cl, DMF, 100 °C, 16 h; g) i) DMSO, (COCl)₂, DCM, -78 °C -> 25 °C, 1,5 h; ii) Et₃N, -78 °C -> 25 °C, 1 h; h) Jonesovo činidlo, aceton, 0 °C, 20 min; i) PPh₃, H₂O, THF, 25 °C, 14 h; j) (Boc)₂O, Et₃N, DCM, 25 °C, 2 h; k) ftalimid draselný, ftalimid, DMSO, 150 °C, 4 h; l) XtalFluor-E, TEA·3HF, DCE, 25 °C -> reflux, 16 h; m) DAST, Olahovo činidlo, DCM, 25 °C, 14 h

Po veškerém úsilí vynaloženém na výše popsané pokusy o přípravu 6',6'-difluoro derivátů, které bohužel nevedly ke kýženým produktům, byla práce na této skupině látek přerušena. Nicméně v červnu roku 2019 byla publikována úspěšná syntéza těchto látek v enantiomerně čisté formě.¹⁰⁷ Publikovaný syntetický postup je uveden ve Schématu 8. Jak je patrné, byl autory využit zcela odlišný přístup, kdy bylo využito činidlo poskytující elektrofilní atom fluoru ve dvakrát opakované reakci se silyl enol éterem získaným sérií reakcí z D-ribózy. Výsledky biologického testování jejich protivirové aktivity potvrzují, že myšlenka syntézy takovýchto látek byla správná.

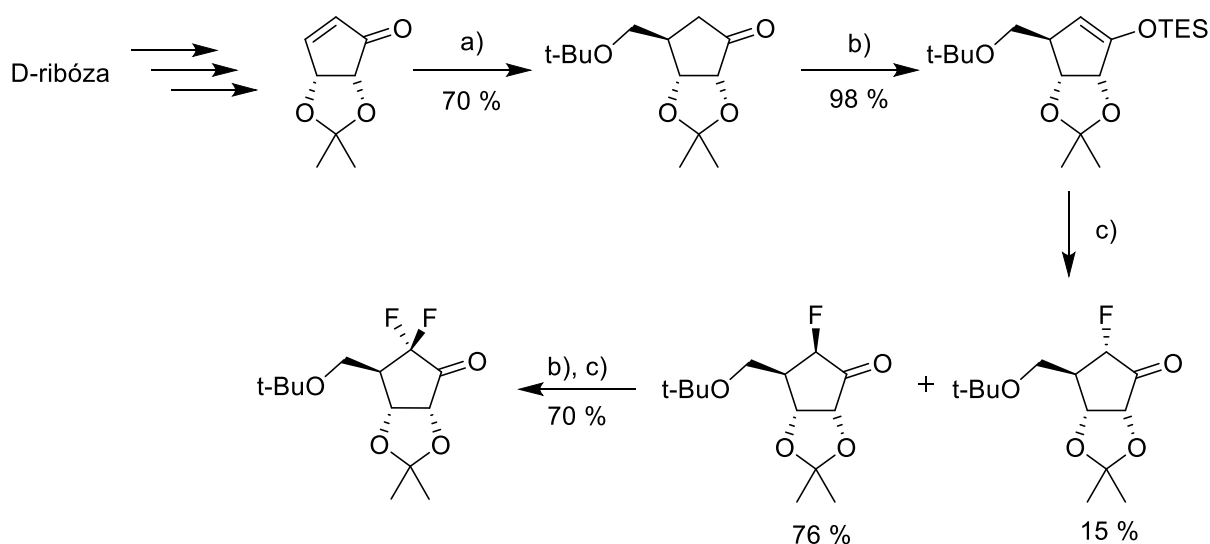


Schéma 8 - Publikovaná syntéza difluorovaného intermediátu využitého pro přípravu karbocyklických nukleosidů a) $\text{LiCu}(\text{CH}_2\text{Ot-Bu})_2$; b) TESCl, LiHMDS, THF, -78°C , 10 min; c) Selectfluor, DMF, 0°C , 12 h

4.1.2 Příprava 6'-monofluorovaných derivátů

Druhou částí diplomové práce je příprava 6'- β -fluorovaných derivátů nukleosidů. Výchozí látkou pro jejich syntézu byl epoxid **38**. Jeho reakcí s adeninem (viz výše) připravený nukleosid **39** byl již přímo substrátem deoxofluorační reakce. Reakcí s DASTem za obvyklých podmínek, tedy při -78°C až 25°C s využitím DCM jako rozpouštědla, byl získán fluorovaný nukleosid **62** ve 31% výtěžku. Důvodem tohoto spíše nízkého výtěžku bylo pravděpodobně velké zastoupení nežádoucích reakcí (především eliminace intermediární odstupující skupiny pocházející z reakce s DASTem a dále její hydrolýza), které rovněž komplikovalo chromatografickou separaci. Jistého zlepšení bylo dosaženo při využití Deoxo-Fluoru, vedoucí k nárůstu výtěžku na 38 %. K výraznému navýšení účinnosti reakci došlo při kombinaci DASTu s CsF a provedení reakce v dioxanu.¹⁰⁸ Tato reakce poskytuje látku **62** až v 64% výtěžku. Pro současné odstranění obou chránících skupin byla nejprve využita katalytická transfer hydrogenace s cyklohexenem jako zdrojem vodíku a $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ jako katalyzátorem. Ukázalo se ovšem, že zatímco benzylová skupina je odstranitelná velmi snadno, 4-methoxybenzyl ether byl za daných podmínek takřka inertní. Jelikož byla ale již dříve v rámci tohoto projektu pozorována možnost, byť v danou chvíli nevhodná, odstranit tuto skupinu působením některých Lewisových kyselin a dle literatury jsou schopny odstranit i benzylovou chránící skupinu z hydroxyly, byl pro získání látky **63** využit BCl_3 . Tímto postupem byl získán produkt v téměř kvantitativním výtěžku.

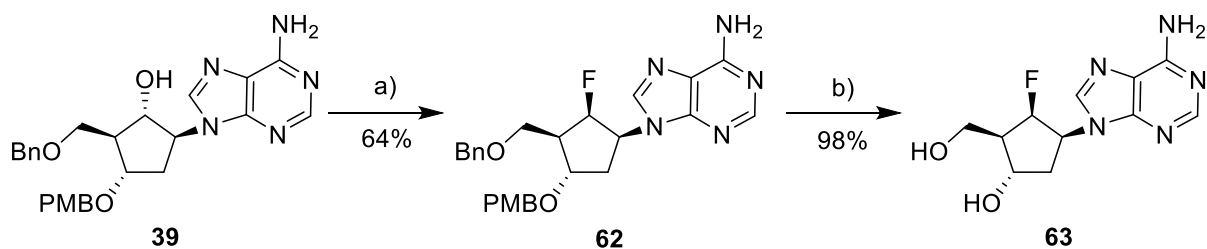


Schéma 9 - Postup syntézy 6'- α -fluoro-2'-deoxy derivátu adenosinu a) DAST, CsF, dioxan, RT, 18 h; b) BCl₃, DCM, -78 °C, 1h

Téměř stejný postup byl využit i pro přípravu analogického derivátu guanosinu. Pro reakci s **38** byl použit upravený popsaný postup využívající sodnou sůl 6-O-benzylguaninu připravenou zahříváním této báze (**64**) s NaH.¹⁰⁴ Následná fluorace byla prováděna za podobných podmínek jako v případě nukleosidu **39** s výtěžky kolem 25 % bez pozorovatelného vlivu přídavku CsF. Odstranění všech tří benzylových chránících skupin bylo opět provedeno působením BCl₃. Po 3 hodinách při - 78 °C byla přítomna jen monobenzylovaná látka a pro pokračování reakce bylo nutné ponechat teplotu vystoupat na 25 °C. Takto byl získán nukleosid **67** v 69% výtěžku.

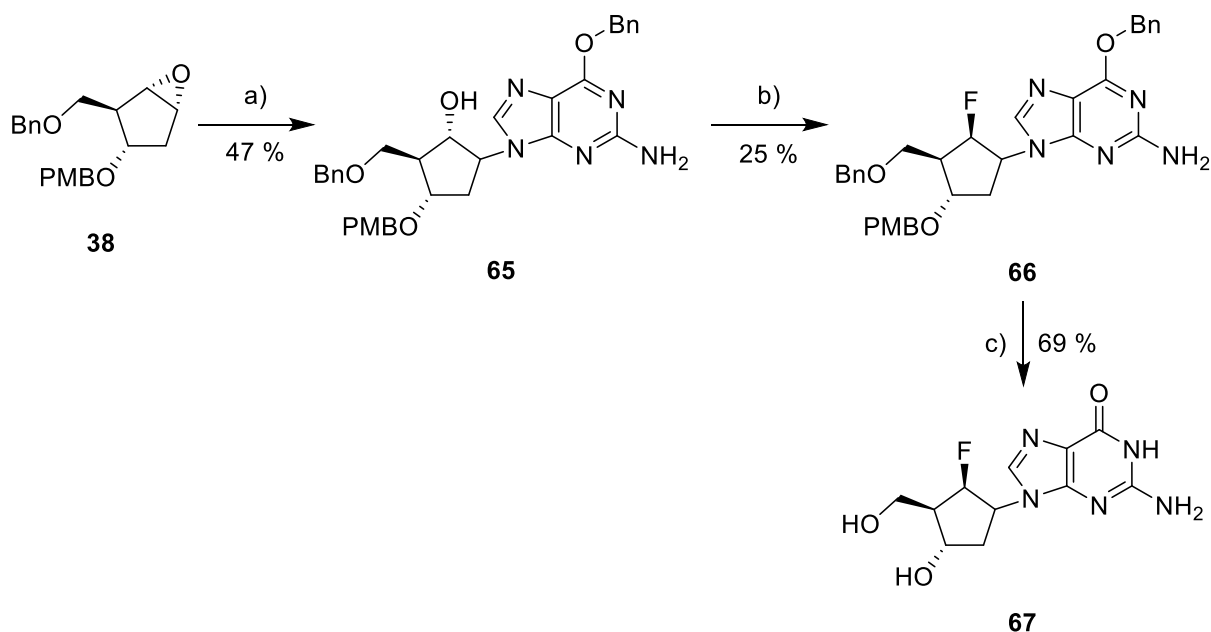
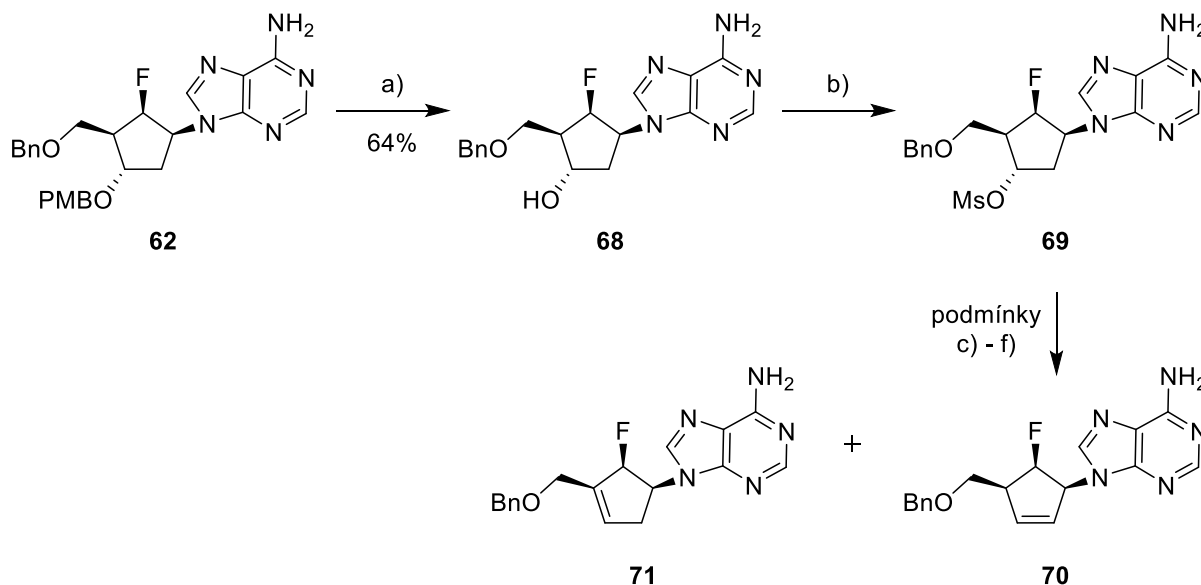


Schéma 10-Postup syntézy 6'- α -fluoro-2'-deoxy derivátu guanosinu a)i) 6O-benzylguanin (**64**), NaH, DMF, 90 °C, 25 min; ii) **38**, 15-crown-5 ether, 100 °C, 22 h; b) DAST, CsF, dioxan, RT, 18 h; c) BCl₃, DCM, -78 °C -> 25 °C, 22 h

Fluorovaný nukleosid **62** byl zamýšlen také jako výchozí látka pro přípravu 2',3'-dihydroxy derivátu a to tak, že z něj nejprve bude připraven 2',3'-nenasycený nukleosid, podobně jako v případě nenasyceného epoxidu **33**, a ten následně dihydroxylován. 4-Methoxybenzylová skupina byla selektivně odstraněna působením DDQ při 0 °C. Z látky **68** byl připraven mesylát

69, který již byl substrátem eliminační reakce. Pro jeho nízkou stabilitu při kontaktu s SiO₂ byla pro jeho separaci využívána pouze extrakce. První volbou při výběru báze byl TBAF, který byl již dříve v rámci tohoto projektu pro podobnou reakci použit. Oproti předchozí zkušenosti však v tomto případě došlo ke změně regioselektivity a byla získána směs produktů **70** a **71** v poměru 1:3. Jelikož reakce s TBAF v tomto případě neposkytovala očekávaný výsledek, byly pro tuto eliminaci otestovány i jiné báze. Ukázalo se ale, že reakce s DBU, t-BuOK i MeONa poskytují výlučně produkt **71** s dvojnou vazbou mezi uhlíky 3' a 4'.



*Schéma 11 - Příprava nenasyceného fluorovaného nukleosidu **70** a) DDQ, H₂O, DCM, 0 °C, 5h; b) MsCl, Et₃N, DMAP, DCM 0 °C -> 25 °C, 3 h; c) TBAF (1M v THF), THF, 25 °C, 3 d (poměr produktů **70** a **71** 1:3); d) DBU, THF, 25 °C, 16 h (pouze produkt **71**); e) t-BuOK, DMF, 70 °C, 7h (pouze produkt **71**) f) NaH, MeOH, DMF, 0 °C -> 25 °C, 2 h (pouze produkt **71**)*

Protože ani změna báze nevedla k získání očekávaného produktu, byly testovány další možnosti tvorby potřebné dvojně vazby. Jednou z variant bylo využití podmínek Mitsunobuovy reakce, nicméně z látky **68** byl působením kombinace DIAD a PPh₃ připraven **71** s nevhodnou polohou dvojně vazby. Protože dosavadní pokusy o získání látky **70** selhaly, byl navržen přístup využívající syn-eliminaci. Nejprve bylo potřeba změnit konfiguraci 3'-hydroxyly v **68**, čehož bylo dosaženo Mitsunobuovou reakcí s *p*-nitrobenzoovou kyselinou a následující alkoholýzou. Reakce s 1,1-thiokarbonyldiimidazolem však ani při dlouhodobém zahřívání nevedla ke vzniku očekávaného produktu.

Dále testovanou možností byla fluorace nenasyceného nukleosidu **34**. Jeho reakcí s DAST s přídavkem CsF vedla sice k získání **70**, ovšem jen v nízkém 18% výtěžku. NMR experimenty navíc ukázaly, že ačkoli hlavní separovanou látkou je skutečně **70**, je tato kontaminována

mnoha dalšími fluorovanými látkami, jejichž struktura nebyla určena. Experimenty s využitím samotného DAST nebo jeho kombinace s pyridinem vedly jen k ještě většímu zastoupení vedlejších produktů, mezi nimiž byl nejvýznamnější produkt eliminace vody. Využití sekvence reakcí sestávajících z přeměny alkoholu na lepší odstupující skupinu (mesyl, triflyl, nonaflyl) a následné reakce se zdrojem fluoridového aniontu (KF, TBAF, TEA·3HF) bohužel rovněž neposkytovalo látku **70**, ale jen směs nejrůznějších vedlejších produktů.

Protože přítomnost dvojné vazby byla zjevně nevhodná pro průběh deoxofluorační reakce bylo přistoupeno k postupu vyobrazenému na Schématu 12, který konečně vedl k získání kýženého produktu. Tento postup byl navržen, jelikož dříve prováděná fluorace látky **39** probíhala bez problémů a látka **75** se liší pouze přítomností ochráněné hydroxylové skupiny v poloze 2'. Hydroxylová skupina látky **34** byla selektivně acetylována acetanhydridem. Pro *cis*-hydroxylaci byl nejprve, po vzoru přípravy látky **35**, využit AD-mix-β. Ukázalo se však, že přítomnost acetylové skupiny má zásadní vliv na stereoselektivitu reakce. Poměr diastereomerů byl v tomto případě blízký 1:1. Z důvodu nulové selektivity nemělo smysl dále používat AD-mix. Překvapivě se ukázalo, že při reakci pouze s OsO₄ v přítomnosti NMMO jako reoxidantu je dr ≈ 2:1 ve prospěch žádaného produktu. Jeho oddělení od nežádoucího diastereomeru vyžadovalo použití velkých kolon reverzní fáze. Proto bylo k separaci diastereomerů přistoupeno až po benzoylaci volných hydroxylových skupin, kdy se retenční časy izomerů výrazněji lišily. Ačkoli byly nejprve jakožto skupiny pro chránění volných hydroxylů zamýšleny 4-methoxybenzyl ethery, jejichž odstranění by mohlo být provedeno v jediném kroku spolu se skupinou v poloze 5', jejich zavedení se ukázalo být problematické. Působením NaH nutným pro přípravu sodné soli došlo k částečnému odstranění acetylové skupiny, a tedy vzniku směsi produktů s jednou až třemi 4-methoxybenzyl etherovými skupinami. S ohledem na tuto komplikaci bylo využito benzoylového chránění. Selektivním odstraněním acetátu působením acetyl chloridu v methanolu byla získána látka **75**. Zatímco její fluorace působením DASTu v DCM vedla pouze ke směsi nežádoucích produktů, při přidavku CsF byl produkt izolován ve výtěžku 54 %. Konečné odstranění chránících skupin bylo provedeno nejprve působením NaOH a následně BCl₃.^{109,110} Takto by připraven finální produkt **78**, který byl jedním z hlavních cílů této diplomové práce.

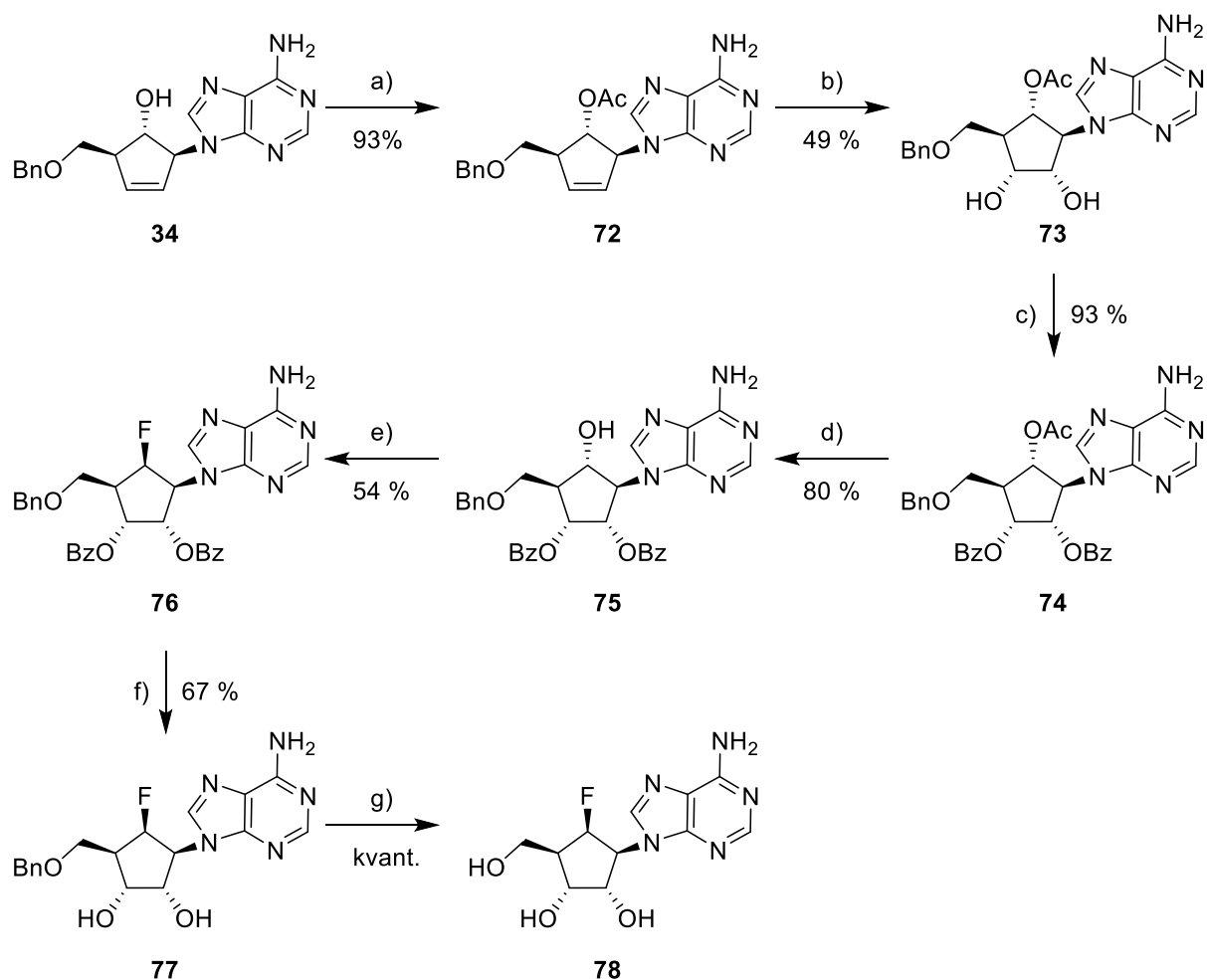


Schéma 12 - Postup syntézy 6'-a-fluorovaného karbocyklického derivátu adenosinu a) Ac_2O , DMAP, TEA, ACN, 25 °C, 30 min; b) OsO_4 , NMMO· H_2O , THF, H_2O , 25 °C, 22 h; c) Bz_2O , DMAP, pyridin, 25 °C, 17 h; d) $AcCl$, MeOH, 0°C → 25 °C, 24 h; e) DAST, CsF, dioxan, 25 °C, 18 h; f) NaOH, H_2O/THF (1:1), 25 °C, 30 min; g) BCl_3 , DCM, -78 °C → 25 °C, 20 h

5 Experimentální část

5.1 Obecné postupy a chemikálie

Používané chemikálie byly zakoupeny u běžných komerčních dodavatelů (např. Sigma-Aldrich, Fluorochem). Používaná rozpouštědla byla zakoupena u společnosti Lach-Ner. Suchá rozpouštědla byla sušena destilací a skladována nad aktivovanými molekulovými sítí. Suché DMF, DMSO a MeOH, byly zakoupeny od komerčních dodavatelů.

Průběžná analýza směsí byla prováděna buď pomocí TLC (Merck, Silikagel 60 F₂₅₄, detekce UV, KMnO₄, p-nitrobynzylypyridinem/NH₄OH nebo 2,4-dinitrofenylhydrazinem) nebo s využitím UPLC-MS (gradient voda-acetonitril, 0,1 % kyseliny mravenčí, na koloně Waters Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm (2.1x50mm)).

Pro sloupcovou chromatografii a HILIC byl používán 40-63 μm silikagel. Pro chromatografii na reverzní fázi byly využívány kolony RediSep Rf Gold® Reversed-phase C18 od společnosti Isco. Flash chromatografie byla prováděna na systému Isco Combiflash Rf resp. Rf+.

Vodíková, uhlíková a 2D (HSQC, HMBC, COSY) NMR spektra byla měřena na NMR spektrometru Bruker Avance III™ HD 400 MHz vybaveném Prodigy kryo-sondou (¹H při 400 MHz, ¹³C při 101 MHz, ¹⁹F při 377 MHz) v CDCl₃ nebo DMSO-d⁶. Spektra byla referencována na signál rozpouštědla (CDCl₃ δ 7,26 ppm pro ¹H, DMSO-d⁶ δ 2,50 ppm pro ¹H a δ 39,70 ppm pro ¹³C), chemické posuny jsou uváděny ve stupnici δ v ppm a interakční konstanty *J* v Hz.

5.2 Použité postupy a naměřená data

(-)-diisopinan-3-ylboran

K roztoku (+)-pinenu (14 ml, 86,4 mmol) v THF (10,5 ml) v baňce s argonovou atmosférou byl při 0 °C přikapán komplex BH₃·DMS. Po 10 minutách při 0 °C byla reakční směs ponechána stát bez míchání 14 hodin při teplotě 25 °C a nakonec byla na 2 hodiny ponořena do ledové lázně. Kapalina překrývající krystaly produktu byla injekční jehlou odebrána, krystaly byly rozmělněny na menší kusu a následně promyty 3 x 9 ml Et₂O zchlazeného na – 20 °, přičemž veškerá výměna rozpouštědel probíhala pouze skrz septum pomocí jehly. Zbytky rozpouštědel byly odpařeny za vysokého vakua. Takto získaný produkt byl přímo využit do následující reakce. Výtěžek: 8,507 g (79 %).

(1*S*,2*R*)-2-((benzyloxy)methyl)cyklopent-3-en-1-ol (30)

K roztoku benzyloxymethyl chloridu (90% čistota, 23,1 ml, 150 mmol, 1,5 ekv.) v suchém THF byl při $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ přikapán během 20 minut 2M roztok NaCp v THF (50 ml, 100 mmol, 1 ekv.). Po 1 hodině míchání při teplotě $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla vzniklá suspenze přenesena jehlou k suspenzi (-)-diisopinan-3-ylboranu (35,041 g, 122 mmol, 1,22 ekv.) v THF udržované při teplotě $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po jedné hodině při této teplotě byla reakční směs ponechána pomalu ohřát na $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a dále míchána po dobu 17 hodin. Přibližně polovina objemu reakční směsi byla odpařena, zbytek byl zředěn 100 ml Et_2O , a při teplotě $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ byl přikapán nejprve 3M vodný roztok NaOH (37 ml) následovaný 30% roztokem H_2O_2 (37 ml). Po 2 hodinách při $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly fáze odděleny, vodná extrahována 120 ml Et_2O , spojené organické frakce pak byly promyty solankou a vysušeny NaSO_4 . Chromatografií (gradient EtOAc v cyklohexanu, 5 – 35%) byl získán produkt kontaminovaný benzyl alkoholem. Po trojnásobné kódestilaci s vodou a následně ethanolem byl získán produkt **30** v množství 8,564 g (výtěžek 42 %), jehož NMR charakteristika odpovídala publikovaným hodnotám.

(1*S*,2*R*,3*S*,5*R*)-2-((benzyloxy)methyl)-6-oxabicyclo[3.1.0]hexan-3-ol (31)

K roztoku **30** (2,00 g, 9,80 mmol) (předem kódestilované s toluenem) v DCE (10 ml) byl přisypán $\text{VO}(\text{acac})_2$ (26 mg, 1 mol%) a v průběhu 45 minut přikapán *t*-BuOOH (5,5 M v dekanu, 3,56 ml). Po přidání přibližně poloviny roztoku *t*-BuOOH bylo přisypáno dalších 26 mg $\text{VO}(\text{acac})_2$ a opět stejná dávka po hodině od ukončení přikapávání *t*-BuOOH. Po další hodině byla reakce zchlazena na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a ukončena přidáním nasyceného vodného roztoku Na_2SO_3 (10 ml). Po 3 hodinách intenzivního míchání při teplotě $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly fáze odděleny, vodná extrahována 20 ml DCM a spojené organické frakce byly promyty vodou a vysušeny Na_2SO_4 . Chromatografií (gradient EtOAc v cyklohexanu, 15 – 65%) bylo získáno 1,886 g (výtěžek 87 %) produktu **31**, jehož NMR charakteristika odpovídala publikovaným hodnotám.

(1*S*,2*S*,3*S*,5*R*)-2-((benzyloxy)methyl)-6-oxabicyclo[3.1.0]hexan-3-yl methansulfonát (32)

K roztoku látky **31** (1,846 g, 8,39 mmol), DMAP (30 mg, 0,25 mmol, 3 mol%) a Et_3N (1,40 ml, 10,1 mmol, 1,2 ekv.) v DCM (40 ml, vysušeno stáním nad Na_2SO_4) byl při $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ během 5 minut přikapán MsCl (722 μl , 9,23 mmol, 1,1 ekv.). Po jedné hodině míchání při $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo přidáno ještě 0,2 ekvivalentu Et_3N i MsCl. Po další hodině byla reakce ukončena 20 ml vody, fáze byly odděleny, vodná extrahována 30 ml DCM, spojené dichloromethanové frakce byly promyty nasyceným roztokem NaHCO_3 , solankou a vysušeny Na_2SO_4 . Po odpaření DCM byl olejovitý zbytek triturován Et_2O , vytvořené krystaly byly odfiltrovány a promyty dalším

etherem. Bylo získáno 2,027 g (výtěžek 81 %) látky **32**. NMR charakteristika se shodovala s publikovanými hodnotami.

(1R,4S,5S)-4-((benzyloxy)methyl)-6-oxabicyklo[3.1.0]hex-2-en (33)

Sloučenina **32** (2,24 g, 7,51 mmol) byla rozpuštěna v 5 ml suchého THF a při teplotě 25 °C k ní byl přilít 1M roztok TBAF v tetrahydrofuranu (37,5 ml, 37,5 mmol, 5 ekv.). Po 12 hodinách při teplotě okolí byla reakční směs zahřata na 35 °C a při této teplotě udržována dalších 36 hodin, dokud nebylo dosaženo úplné konverze. Po odpaření THF byl zbytek zředěn dichlormethanem (50 ml) a vodou (30 ml), fáze byly odděleny a ta organická čtyřikrát promyta 15 ml H₂O, jednou solankou a nakonec vysušena Na₂SO₄. Po odpaření dichlormethanu byla takto připravená látka (1,43 g, 94 %) použita přímo do další reakce. Podle NMR obsahoval produkt <1% výchozí látky a jeho čistota byla 90–95 %. NMR produktu se shodovalo s publikovanými hodnotami.

(1S,2S,5S)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-((benzyloxy)methyl)cyklopent-3-en-1-ol (34)

Adenin (523 mg, 3,87 mmol, 2,5 ekv.), kodestilovaný s 8 ml DMF, byl suspendován v DMF (8ml) a byl k němu přidán DBU (701 µl, 4,66 mmol, 3 ekv.). Směs byla zahřívána pod atmosférou argonu při 90 °C po dobu 1 hodiny. Po jejím zchladnutí na přibližně 50 °C, byl přidán epoxid **33** (314 mg, 1,04 mmol, 1 ekv.) rozpuštěný ve 2 ml DMF. Teplota byla zvýšena na 100 °C a udržována 14 h. Po odpaření rozpouštědla byl produkt izolován flash chromatografií (gradient MeOH v DCM, 2 – 15 %). Bylo získáno 216 mg produktu (výtěžek 41 %). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.13 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.37 – 7.25 (m, 5H), 7.21 (s, 2H), 6.04 (dt, *J* = 6.1, 2.1 Hz, 1H), 5.83 (dt, *J* = 6.1, 2.1 Hz, 1H), 5.57 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 5.34 (dq, *J* = 6.0, 2.1 Hz, 1H), 4.52 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 4.27 (q, *J* = 5.9 Hz, 1H), 3.64 (dd, *J* = 9.3, 4.8 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J* = 9.3, 6.7 Hz, 1H), 2.82 (dddt, *J* = 8.7, 6.5, 4.3, 2.0 Hz, 1H) ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 156.18, 152.46, 149.77, 139.32, 138.64, 135.16, 128.84, 128.43, 127.60, 127.58, 119.19, 80.30, 72.34, 70.64, 67.35, 52.68. HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₁₈H₂₀O₂N₅⁺ [M + H]⁺: 338.16115, nalezeno: 338.16125.

(1R,2S,3R,4S,5S)-3-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-((benzyloxy)methyl)cyklopentan-1,2,4-triol (35)

K roztoku látky **34** (181 mg, 0,536 mmol) ve směsi vody (10 ml) a *tert*-butanolu (10 ml) byl přisypán amid kyseliny methansulfonové (204 mg, 2,14 mmol, 4 ekv.) a následně také AD-mix-β (751 mg, 1,4 g/mmol). Směs byla míchána při teplotě 25 °C 3 dny, jelikož ještě reakce

nebyla hotova, byl přidán 4% vodný roztok OsO₄ (22 µl) a 560 mg AD-mix-β. Po 24 hodinách bylo přidáno opět 22 µl roztoku oxidu osmičelého a po 16 hodinách byl substrát spotřebován. Reakce byla ukončena přidavkem 5 ml nasyceného roztoku NaHSO₃ a po odpaření rozpouštědel byla přímo provedena chromatografie na reverzní fázi (gradient ACN ve vodě, 10 – 75 %). Byla získána směs isomerů v poměru 4:1 ve prospěch látky **35** v množství 162 mg (výtěžek 81 %). NMR směsi není z důvodu komplikované interpretace uvedeno.

(3a*S*,4*R*,5*S*,6*S*,6a*R*)-4-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-6-((benzyloxy)methyl)-2,2-dimethyltetrahydro-4*H*-cyklopenta[*d*][1,3]dioxol-5-ol (36)

Směs **35** (155 mg, 0,417 mmol), monohydrátu kyseliny *p*-toluensulfonové (80 mg, 0,420 mmol, 1 ekv.) a 2,2-dimethoxypropanu (511 µl, 4,17 mmol, 10 ekv.) v 10 ml acetonu byla 2 hodiny refluxována. Po zchlazení na 25 °C byl do směsi přisypán NaHCO₃ (53 mg, 0,631 mmol, 1,5 ekv.) a ta byla ještě 90 minut míchána. Pevné částice byly odfiltrovány a filtrát byl odpařen. Látka **36** byla získána chromatografickou separací (gradient směsi EtOAc, acetonu, ethanolu a vody (20:3:1,2:0,8) v EtOAc, 50 - 90 %) a to ve množství 132 mg (výtěžek 77 %). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.15 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.41 – 7.26 (m, 5H), 7.19 (s, 2H), 5.35 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.71 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.62 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.59 – 4.55 (m, 1H), 4.55 – 4.50 (m, 2H), 4.28 (td, *J* = 10.3, 6.8 Hz, 1H), 3.74 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H), 3.67 (dd, *J* = 9.0, 4.1 Hz, 1H), 2.18 (tt, *J* = 10.0, 4.5 Hz, 1H), 1.40 (s, 3H), 1.20 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 156.32, 152.72, 150.57, 140.58, 139.05, 127.92, 127.82, 118.85, 109.73, 76.53, 75.09, 72.89, 72.63, 71.33, 67.23, 61.68, 46.83, 40.20, 25.96, 24.13. HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₂₁H₂₆O₄N₅⁺ [M + H]⁺: 412.19793, nalezeno: 412.19808.

(1*S*,2*R*,3*S*,5*R*)-2-((benzyloxy)methyl)-3-((4-methoxybenzyl)oxy)-6-oxabicyklo[3.1.0]hexan (38)

Epoxid **31** (3,055 g, 13,87 mmol) byl rozpuštěn v suchém tetrahydrofuranu (6 ml) a při teplotě 25 °C přikapán k suspenzi NaH (60% v minerálním oleji, 610 mg, 15,3 mmol, 1,1 ekv.) ve 12 ml suchého THF překryté atmosférou argonu. Po 1 hodině byl přidán 4-methoxybenzyl chlorid (2,068 ml, 15,26 mmol, 1,1 ekv.), tetrabutylamonium chlorid (51 mg, 0,139 mmol, 1 mol%) a 3 ml DMF. Směs byla refluxována po dobu 2,5 hodiny. Po zchlazení byla odpařena rozpouštědla, zbytek zředěn 40 ml Et₂O, promyt 3 x 15 ml vody a 10 ml solanky. Organická fáze byla vysušena Na₂SO₄ a odpařena. Po sloupcové chromatografii (gradient EtOAc v cyklohexanu, 5 – 30 %) bylo získáno 3,903 g (výtěžek 83 %) produktu **38**. NMR charakteristika byla shodná s dříve publikovanou.¹¹¹

(1*S*,2*S*,3*S*,5*S*)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2-((benzyloxy)methyl)-3-((4-methoxybenzyl)oxy)cyklopentan-1-ol (39)

Adenin (2,50 g, 18,5 mmol, 2,5 ekv.) (předem kodedistilovaný s DMF) byl suspendován v suchém DMF (40 ml) a spolu s DBU (3,34 ml, 22,2 mmol, 3 ekv.) byl 1 hodinu zahříván na 90 °C a pak ještě 10 minut na 110 °C (čímž bylo dosaženo rozpuštění báze). Po zchladnutí na přibližně 80 °C byl přidán epoxid **38** (2,515 g, 7,4 mmol) rozpuštěný ve 2 ml DMF. Teplota byla opět zvýšena na 110 °C a to po dobu 23 hodin. Po zchladnutí reakční směsi bylo rozpouštědlo odpařeno a produkt izolován flash chromatografií (gradient MeOH v DCM, 2 - 15 %). Látka **39** byla získána v množství 2,094 g (60 %). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.20 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.40 – 7.28 (m, 5H), 7.28 – 7.22 (m, 2H), 7.19 (s, 2H), 6.91 – 6.84 (m, 2H), 5.42 (s, 1H), 4.72 (ddd, *J* = 11.7, 9.2, 7.7 Hz, 1H), 4.54 (s, 2H), 4.47 – 4.37 (m, 2H), 4.30 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.94 (ddt, *J* = 7.0, 4.3, 2.1 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.65 (dd, *J* = 9.5, 3.9 Hz, 1H), 3.55 (dd, *J* = 9.5, 6.6 Hz, 1H), 2.49 – 2.38 (m, 1H), 2.24 – 2.15 (m, 1H), 2.14 – 2.06 (m, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 159.08, 156.47, 152.49, 150.16, 140.73, 139.02, 130.94, 129.68, 128.70, 127.86, 127.83, 119.86, 114.03, 76.52, 74.61, 72.65, 69.78, 69.35, 60.99, 55.51, 52.58, 34.42. HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₂₆H₂₉O₄N₅Na⁺ [M + Na]⁺: 498.21118, nalezeno: 498.21093.

(2*R*,3*S*,5*S*)-5-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2-((benzyloxy)methyl)-3-((4-methoxybenzyl)oxy)cyklopentan-1-on (40)

K suspenzi Dessova-Martinoва činidla (116 mg, 0,273 mmol, 2,6 ekv.) v 1,5 ml suchého DCM byl přidán suchý *t*-BuOH (26 μl, 0,273 mmol, 2,6 ekv.) a tato směs byla míchána 40 minut při 25 °C, pročež byla při 0 °C přidána k suspenzi **39** (50 mg, 0,105 mmol) a NaHCO₃ (46 mg, 0,546 mmol, 5,2 ekv.) v DCM (2ml). Teplota reakce byla ponechána stoupnout na 25 °C během 2 hodin. Jelikož do té doby reakce neproběhla do plné konverze a nebyla již pozorována změna zastoupení produktu a výchozí látky, byla přidána směs DMP a *t*-BuOH ve stejném množství jako na začátku. Po 1 hodině při 25 °C byla reakční směs zředěna 6,5 ml chloroformu a reakce ukončena přidávkem 10 ml směsi tvořené 5 ml nasyceného roztoku NaHCO₃ a 5 ml 10% roztoku Na₂SO₃. Tento dvoufázový systém byl hodinu intenzivně míchán. Fáze byly rozděleny a vodná extrahována chloroformem. Spojené organické frakce byly vysušeny a odpařeny. Takto připravená látka **40** byla rovnou použita do následných reakcí. NMR spektrum látky **40** nebylo změřeno a jako dostatečný důkaz její identity byla považována reakce s 2,4-dinitrofenylhydrazinem a detekce látky s odpovídající hmotností na UPLC-MS.

N-(9-((1*S*,2*S*,3*S*,4*S*)-3-((benzyloxy)methyl)-2-hydroxy-4-((4-methoxybenzyl)oxy)cyclopentyl)-9H-purin-6-yl)benzamid (46)

Nukleosid **39** (475 mg, 1,00 mmol) byl kdestilován se suchým pyridinem A poté rozpuštěn ve směsi suchého dichlormethanu (6 ml) a pyridinu (3,2 ml) po atmosférou argonu. Při 0 °C byl přidán TMSCl (635 µl, 5,00 mmol, 5 ekv.). Po 30 minutách byl přidán chlorid kyseliny benzoové (232 µl, 2,00 mmol, 2 ekv.) a reakce dále probíhala 18 hodin, přičemž teplota byla ponechána stoupnout na 25 °C. Reakce byla ukončena přidavkem 25 ml methanolu, 20 ml tetrahydrofuranu, 5 ml vody a 400 mg NaOH. Po 30 minutách bylo pH upraveno na neutrální přidavkem kyseliny octové. Po odpaření rozpouštědel byla směs adsorbována na SiO₂ a produkt byl izolován flash chromatografií (gradient MeOH v DCM, 2-10 %). Bylo získáno 379 mg (výtěžek 65 %) látky **46**. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.12 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.07 – 8.01 (m, 2H), 7.67 – 7.61 (m, 1H), 7.55 (ddt, *J* = 8.2, 6.5, 1.2 Hz, 2H), 7.40 – 7.28 (m, 4H), 7.28 – 7.23 (m, 2H), 6.92 – 6.86 (m, 2H), 5.45 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.87 (dt, *J* = 11.7, 8.5 Hz, 1H), 4.55 (s, 2H), 4.48 – 4.39 (m, 2H), 4.35 (td, *J* = 8.9, 6.1 Hz, 1H), 3.98 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.66 (dd, *J* = 9.5, 3.9 Hz, 1H), 3.57 (dd, *J* = 9.5, 6.6 Hz, 1H), 2.25 (dd, *J* = 13.4, 7.8 Hz, 1H), 2.18 – 2.08 (m, 1H).

N-(9-((1*S*,3*R*,4*S*)-3-((benzyloxy)methyl)-4-((4-methoxybenzyl)oxy)-2-oxocyclopentyl)-9H-purin-6-yl)benzamid (47)

K roztoku látky **46** (58 mg, 0,10 mmol) v suchém dichlormethanu (3 ml) byl přisypán NaHCO₃ (44 mg, 0,520 mmol, 5,2 ekv.) a DMP (111 mg, 0,260 mmol, 2,6 ekv.) Reakce probíhala pod atmosférou argonu při teplotě 0 – 25 °C po dobu 2 hodin. Jelikož byla pozorována jen nízká konverze, byla do reakční směsi třikrát ve dvouhodinových intervalech přidávána stejná množství DMP i NaHCO₃, a to v množství stejném, jako na začátku. Po spotřebování veškerého substrátu byla reakční směs zředěna 20 ml DCM a tento roztok byl dvakrát promyt vodou, jednou solankou a vysušen Na₂SO₄ a odpařen. Takto připravená látka **46** byla rovnou použita do následných reakcí. NMR spektrum látky **46** nebylo změřeno a jako dostatečný důkaz její identity byla považována reakce s 2,4-dinitrofenylhydrazinem a detekce látky s odpovídající hmotností na UPLC-MS.

(1*S*,2*S*,3*S*,5*S*)-5-(allyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-3-((4-methoxybenzyl)oxy)cyclopentan-1-ol (49)

K míchanému roztoku látky **39** (250 mg, 0,735 mmol) v suchém allyl alkoholu (10 ml) byl při 25 °C přidán NaH (60% v minerálním oleji, 74 mg, 1,84 mmol, 2,5 ekv.) a vzniklá směs byla

po dobu 3 dní pod argonem zahřívána k refluxu. Po odpaření přebytečného alkoholu byl chromatografií na reverzní fázi (gradient ACN ve vodě, 10 – 90 %) získán produkt **49** (231 mg, 79 %). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.39 – 7.24 (m, 5H), 7.22 – 7.14 (m, 2H), 6.89 – 6.81 (m, 2H), 5.86 (ddt, *J* = 17.3, 10.5, 5.3 Hz, 1H), 5.22 (dq, *J* = 17.3, 1.8 Hz, 1H), 5.10 (dq, *J* = 10.4, 1.6 Hz, 1H), 5.04 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.52 – 4.41 (m, 2H), 4.40 – 4.28 (m, 2H), 4.04 – 3.93 (m, 2H), 3.77 – 3.67 (m, 2H) 3.72 (s, 3H), 3.61 (dt, *J* = 7.6, 5.7 Hz, 1H), 3.55 – 3.41 (m, 2H), 1.98 – 1.91 (m, 1H), 1.91 – 1.85 (m, 1H), 1.71 (dt, *J* = 13.8, 7.1 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 138.77, 135.82, 130.82, 129.26, 128.37, 127.53, 127.50, 116.03, 113.69, 83.55, 76.86, 76.31, 72.29, 69.66, 69.10, 55.19, 52.36, 35.15.

(2*R*,3*S*,5*S*)-5-(allyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-3-((4-methoxybenzyl)oxy)cyklopentan-1-on (50)

K roztoku **49** (80 mg, 0,2 mmol) (předem kodestilovaného s toluenem) ve 2 ml DCM bylo přidáno Dessovo-Martinovo činidlo (170 mg, 0,4 mmol, 2 ekv.). Po jedné hodině byla reakce ukončena přidavkem 2 ml nasyceného roztoku NaHSO₃ a 2 ml nasyceného roztoku NaHCO₃, pročež byla ještě hodinu ponechána intenzivně míchat. Po zředění DCM a vodou byly fáze odděleny a vodná jednou extrahována dichlormethanem. Dichlormethanové frakce byly promyty solankou a vysušeny Na₂SO₄. Chromatografií (gradient EtOAc v cyklohexanu, 0 – 30 %) byla získána látka **50** v množství 74 mg (93%). Podle NMR měření však dosahovala jen 85% čistoty. ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.39 – 7.17 (m, 7H), 6.94 – 6.85 (m, 2H), 5.91 – 5.80 (m, 1H), 5.25 (dq, *J* = 17.3, 1.8 Hz, 1H), 5.14 (ddt, *J* = 10.4, 2.0, 1.3 Hz, 1H), 4.50 – 4.37 (m, 4H), 4.21 – 4.08 (m, 4H), 4.05 (ddt, *J* = 13.1, 5.5, 1.5 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.67 (dd, *J* = 9.4, 5.1 Hz, 1H), 3.61 – 3.57 (m, 1H), 2.61 (dh, *J* = 5.2, 1.7 Hz, 1H), 2.37 (dddd, *J* = 12.9, 7.8, 3.0, 1.8 Hz, 1H), 1.98 (ddd, *J* = 13.3, 9.7, 5.8 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 214.04, 158.88, 138.30, 135.07, 130.32, 129.52, 128.39, 127.40, 116.89, 113.79, 78.71, 75.10, 72.38, 70.33, 69.57, 67.67, 55.22, 52.70, 34.21.

(1*S*,2*S*,3*S*,4*S*)-3-((benzyloxy)methyl)-2-hydroxy-4-((4-methoxybenzyl)oxy)cyklopentyl benzoát (52)

Epoxid **39** (282 mg, 0,83 mmol) byl rozpuštěn v hexamethylfosfortriamidu (10 ml) a po přidání benzoátu sodného (597 mg, 4,15 mmol, 5 ekv.) byla směs zahřívána 4 dny na 110 °C. Po zředění EtOAc a H₂O, oddělení fází a extrakci vodné fáze EtOAc byly spojené organické frakce spojeny a vysušeny. Chromatografií (gradient EtOAc v cyklohexanu, 10 – 35 %) bylo izolováno 268 mg látky **52** (výtěžek 70 %). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.99 – 7.87 (m, 2H), 7.69 – 7.59

(m, 1H), 7.56 – 7.45 (m, 3H), 7.37 – 7.14 (m, 7H), 6.91 – 6.83 (m, 2H), 5.34 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 5.11 (td, $J = 7.2, 6.0$ Hz, 1H), 4.55 – 4.43 (m, 2H), 4.43 – 4.33 (m, 2H), 3.90 (ddt, $J = 12.6, 7.1, 5.5$ Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.55 (h, $J = 5.2$ Hz, 2H), 2.17 (ddd, $J = 13.7, 7.3, 4.5$ Hz, 1H), 2.04 – 1.97 (m, 1H), 1.88 (dt, $J = 14.0, 7.2$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.66, 158.81, 138.68, 133.51, 133.05, 130.67, 129.95, 129.36, 128.89, 128.40, 127.58, 127.56, 113.75, 79.77, 76.62, 74.85, 72.36, 69.87, 68.65, 55.21, 51.77, 35.03.

(1*S*,3*R*,4*S*)-3-((benzyloxy)methyl)-4-((4-methoxybenzyl)oxy)-2-oxocyklopentyl benzoát (53)

K roztoku látky **52** (69 mg, 0,15 mmol) v DCM (2 ml) byla přisypána drcená 4Å molekulová síta (100 mg) a následně při 0 °C PCC (81 mg, 0,375 mmol, 2,5 ekv.). Teplota byla ponechána stoupnout na 25 °C a po 14 hodinách byly do reakční směsi přility 2 ml Et₂O. Po dvouhodinovém míchání byla směs přefiltrována přes křemelinu a filtrační koláč byl promyt DCM. Filtrát byl odpařen a získaná olejovitá látka byla použita do následující reakce. NMR spektrum látky **52** nebylo změřeno a jako dostatečný důkaz její identity byla považována reakce s 2,4-dinitrofenylhydrazinem a detekce látky s odpovídající hmotností na UPLC-MS.

(1*S*,2*S*,3*S*,5*S*)-5-azido-2-((benzyloxy)methyl)-3-((4-methoxybenzyl)oxy)cyklopentan-1-ol (54)

K epoxidu **39** (340 mg, 1 mmol) rozpuštěnému v DMF byly přidány NaN₃ (780 mg, 12 mmol, 12 ekv.) a NH₄Cl (642 mg, 12 mmol, 12 ekv.). Vzniklá suspenze byla zahřívána pod argonem na 100 °C po dobu 16 hodin. Po zchlazení byla směs přefiltrována přes křemelinu a filtrační koláč byl promyt DCM. Po odpaření filtrátu byl odparek zředěn DCM a vodou. Po oddělení vrstev byla dichlormethanová frakce odpařena a produkt byl izolován flash chromatografií (gradient EtOAc v cyklohexanu, 15 – 50 %), čímž byl získán produkt **54** (293 mg, 76 %). ^1H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.38 – 7.24 (m, 6H), 7.22 – 7.17 (m, 2H), 6.88 – 6.82 (m, 2H), 5.45 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 4.34 (q, $J = 11.6$ Hz, 2H), 3.79 (dt, $J = 10.2, 7.7$ Hz, 1H), 3.77 – 3.70 (m, 1H) 3.72 (s, 3H), 3.61 – 3.55 (m, 1H), 3.54 – 3.49 (m, 1H), 3.46 (dd, $J = 9.5, 5.9$ Hz, 1H), 2.05 – 1.96 (m, 1H), 1.96 – 1.87 (m, 1H), 1.60 (ddd, $J = 13.6, 10.2, 7.1$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 158.78, 138.67, 130.60, 129.34, 128.40, 127.52, 113.71, 76.27, 72.34, 69.58, 68.76, 65.85, 55.20, 52.37, 34.00.

(1*S*,2*S*,3*S*,5*S*)-5-amino-2-((benzyloxy)methyl)-3-((4-methoxybenzyl)oxy)cyklopentan-1-ol (56)

Azid **54** (329 mg, 0,859 mmol) byl rozpuštěn v 5 ml THF a při 25 °C byla přidána voda (100 µl) a PPh₃ (271 mg, 1,032 mmol) 1,2 ekv.). Po 12 hodinách při teplotě laboratoře bylo přidáno ještě 56 mg PPh₃ (0,25 ekv.). Po 90 minutách byl přidán 1 ml vody a směs ještě 30 minut míchána. Po odpaření byl chromatografií (gradient MeOH v DCM, 5 – 20 %) izolován produkt **56** (144 mg, 47 %). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.37 – 7.24 (m, 5H), 7.22 – 7.13 (m, 2H), 6.88 – 6.78 (m, 2H), 4.46 (s, 2H), 4.38 – 4.27 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.72 – 3.68 (m, 1H), 3.53 (dd, *J* = 9.4, 4.0 Hz, 1H), 3.42 (dd, *J* = 9.4, 6.3 Hz, 1H), 3.20 (q, *J* = 9.3, 8.7 Hz, 1H), 3.01 (dt, *J* = 10.3, 7.5 Hz, 1H), 1.94 – 1.79 (m, 2H), 1.42 (ddd, *J* = 13.4, 10.3, 7.1 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 158.68, 138.81, 130.96, 129.18, 128.37, 127.53, 127.49, 113.68, 79.00, 77.21, 72.30, 69.63, 69.43, 57.40, 55.20, 52.94, 37.21.

***tert*-butyl((1*S*,2*S*,3*S*,4*S*)-3-((benzyloxy)methyl)-2-hydroxy-4-((4-methoxybenzyl)oxy)cyklopentyl)karbamát (57)**

Sloučenina **56** (138 mg, 0,389 mmol) byla společně s TEA (108 µl, 0,773 mmol, 2 ekv.) a (Boc)₂O (121 µl, 0,580 mmol, 1,5 ekv.) rozpuštěna ve 3 ml dichlormetanu a byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin. Dichlormethan byl odpařen a chromatografií (gradient EtOAc v cyklohexanu, 10 – 40 %) byl izolován produkt **57** (159 mg, 89 %). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.38 – 7.24 (m, 5H), 7.23 – 7.14 (m, 2H), 6.91 – 6.82 (m, 2H), 6.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.88 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.40 – 4.26 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.71 – 3.66 (m, 2H), 3.55 – 3.46 (m, 2H), 3.41 (dd, *J* = 9.4, 6.2 Hz, 1H), 1.89 (h, *J* = 6.4, 4.8 Hz, 2H), 1.55 – 1.42 (m, 1H), 1.37 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 158.70, 155.60, 138.76, 130.86, 129.20, 128.36, 127.53, 127.49, 113.69, 77.59, 76.43, 75.25, 72.30, 69.36, 69.19, 56.19, 55.20, 52.45, 39.07, 35.35, 28.47.

2-((1*S*,2*S*,3*S*,4*S*)-3-((benzyloxy)methyl)-2-hydroxy-4-((4-methoxybenzyl)oxy)cyklopentyl)isoindoline-1,3-dion (59)

K roztoku epoxidu **39** (170 mg, 0,5 mmol) ve 4 ml suchého DMSO byl přidán flalimid (276 mg, 1,875 mmol, 3,75 ekv.) a draselná sůl ftalimidu (278 mg, 1,5 mmol, 3 ekv.) a vzniklá směs byla pod atmosférou argonu zahřívána na 150 °C po dobu 3 dní. Po zchlazení byla zředěna diethyletherem a vodou. Po oddělení fázi byla vodná vrstva extrahována Et₂O (3x 40 ml), spojené organické frakce byly spojeny a vysušeny Na₂SO₄. Látka **59** byla izolována chromatografií na reverzní fázi (gradient ACN ve vodě, 0 – 30 %) v množství 128 mg (53%). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.89 – 7.80 (m, 4H), 7.40 – 7.26 (m, 5H), 7.25 – 7.19 (m, 2H), 6.93 – 6.83 (m, 2H), 5.21 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 4.51 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 4.47 – 4.30 (m,

4H), 3.92 (ddd, $J = 7.3, 4.9, 2.6$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.59 (dd, $J = 9.5, 3.8$ Hz, 1H), 3.50 (dd, $J = 9.5, 5.9$ Hz, 1H), 2.41 – 2.30 (m, 1H), 1.99 (dq, $J = 9.1, 4.8$ Hz, 1H), 1.94 – 1.84 (m, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 168.28, 158.78, 138.77, 134.57, 131.71, 130.71, 129.34, 128.40, 127.50, 123.08, 113.75, 76.02, 72.34, 71.34, 69.60, 68.60, 55.95, 55.21, 51.89, 31.50.

2-((1*S*,3*R*,4*S*)-3-((benzyloxy)methyl)-4-((4-methoxybenzyl)oxy)-2-oxocyclopentyl)isoindolin-1,3-dion (60)

K roztoku **59** (60 mg, 0,123 mmol) (předem kodestilované s toluenem) v DCM (2ml) bylo přisypáno DMP (105 mg, 0,246 mmol, 2 ekv.) a reakce byla míchána 30 minut při 25 °C než byla ukončena přidávkem 2 ml NaHSO₃ (nasycený roztok) a 2 ml NaHCO₃ (nasycený roztok). Po zředění DCM a vodou byly fáze odděleny, vodná fáze byla extrahována DCM, spojené dichlormethanové frakce byly vysušeny Na₂SO₄ a odpařeny. Takto připravená látka **60** byla bez dalšího zpracování přímo použita do následných reakcí. NMR spektrum látky **60** nebylo změřeno a jako dostatečný důkaz její identity byla považována reakce s 2,4-dinitrofenylhydrazinem a detekce látky s odpovídající hmotností na UPLC-MS.

9-((1*S*,2*R*,3*R*,4*S*)-3-((benzyloxy)methyl)-2-fluoro-4-((4-methoxybenzyl)oxy)cyclopentyl)-9H-purin-6-amin (62)

Látka **39** (473 mg, 1 mmol) byla spolu s CsF (683 mg, 4,50 mmol, 4,5 ekv.) kodestilována se suchým dioxanem. Následně byl odparek suspendován ve 12 ml suchého dioxanu a vzniklá směs byla ponechána 15 minut v ultrazvukové lázni pod argonovou atmosférou. Poté byl do míchané suspenze při 25 °C přidán DAST (667 μl , 5,00 mmol, 5 ekv.) a reakce byla míchán 18 hodin. Reakce byla ukončena přidávkem vodného roztoku NaHCO₃ (potřeba přidávat opatrně, dochází ke vzpěnění směsi). Po ukončení vývoje bublin byla rozpouštědla odpařena a odparek byl zředěn DCM a vodou. Po oddělení fází byla vodná jednou extrahována dichlormethanem, organické frakce byly spojeny, vysušeny Na₂SO₄ a odpařeny. Chromatografií (gradient MeOH v DCM, 2-10 %) byl získán produkt **62** v množství 307 mg (64 %). ^1H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.19 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.40 – 7.19 (m, 8H), 6.92 – 6.85 (m, 2H), 5.30 (dt, $J = 55.3, 3.4$ Hz, 1H), 5.14 (dddd, $J = 30.5, 11.6, 8.3, 3.0$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 1.9$ Hz, 2H), 4.47 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.40 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 3.98 (ddd, $J = 7.5, 5.4, 1.9$ Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.65 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 3.57 (ddd, $J = 9.4, 5.6, 1.7$ Hz, 1H), 2.67 – 2.77 (m, 1H), 2.58 – 2.76 (m, 1H), 2.45 – 2.36 (m, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 158.88, 156.17, 152.64, 149.85, 139.84 (d, $J = 3.7$), 138.49, 130.32, 129.47, 128.42, 127.65, 127.61, 118.71, 113.78, 94.12 (d, $J = 182.1$), 77.77, 72.25, 70.28, 66.68 (d, $J = 10.1$), 55.25, 55.23, 55.08, 49.86 (d, $J =$

17.4), 33.27. ¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO-*d*₆) δ -207.23 (dt, *J* = 55.5, 32.1 Hz). HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₂₆H₂₈O₃N₅FNa⁺ [M + Na]⁺: 500.20684, nalezeno: 500.20666.

(1*S*,2*R*,3*R*,4*S*)-4-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-3-fluoro-2-(hydroxymethyl)cyklopentan-1-ol (63)

K roztoku **62** (143 mg, 0,3 mmol) v dichlormethanu pod ochrannou atmosférou argonu byl při – 78 °C přikapán 1M roztok BCl₃ v heptanu (2,4 ml, 2,4 mmol, 4 ekv. na 1 etherovou skupinu). Po 1 hodině při – 78°C bylo DCM odpařeno a produkt izolován flash chromatografií na reverzní fázi (gradient ACN ve vodě, 0 – 30 %). Bylo získáno 98 mg látky **63** (výtěžek 98 %). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.18 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.24 (s, 2H), 5.23 (dt, *J* = 55.2, 3.3), 5.16 (dddd, *J* = 30.6, 11.8, 8.8, 3.1), 4.05 (ddd, *J* = 8.6, 6.3, 2.6 Hz, 1H), 3.64 (ddd, *J* = 10.6, 5.8, 1.9 Hz, 1H), 3.57 (t, *J* = 10.1 Hz, 1H), 2.73 (ddd, *J* = 13.3, 11.2, 8.2 Hz, 1H), 2.15 (ddd, *J* = 13.6, 8.7, 2.5 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 156.16, 152.62, 149.85, 139.89 (d, *J* = 3.4), 118.75, 94.27 (d, *J* = 181.6), 69.85, 57.94, 57.85, 54.93 (d, *J* = 17.5), 54.92 (d, *J* = 17.6), 36.69. ¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO-*d*₆) δ -207.86 (ddd, *J* = 55.0, 34.6, 30.8 Hz). HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₁₁H₁₄O₂N₅FNa⁺ [M + Na]⁺: 290.10237, nalezeno: 290.10256.

O6-benzylguanin (64)

Benzyl alkohol (6 ml, 58 mmol, 10 ekv.) byl spolu s hydroxidem sodným (466 mg, 11,6 mmol, 2 ekv.) zahříván na 140 °C tak dlouho, dokud se veškerý hydroxid sodný nerozpustil. Roztok byl ponechán zchladnout a byl do něj přisypán 2-amino-6-chloropurin (1,00 g, 5,83 mmol). Směs byla míchána při 85 °C 17 hodin. Po zchladnutí byla reakční směs zředěna 20 ml methyl(*tert*-butyl)etheru a extrahována 2 x 17 ml 1% roztoku NaOH. Spojené vodné frakce byly promyty toluenem a pH následně upraveno konc. HCl na přibližně 7. Tím došlo k precipitaci produktu, který byl odfiltrován a vysušen. Získáno bylo 1,217 g O6-benzylguaninu (výtěžek 87 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.43 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.54 – 7.47 (m, 2H), 7.43 – 7.29 (m, 4H), 6.27 (s, 2H), 5.49 (s, 2H).

(1*S*,2*S*,3*S*)-5-(2-amino-6-(benzyloxy)-9*H*-purin-9-yl)-2-((benzyloxy)methyl)-3-((4-methoxybenzyl)oxy)cyklopentan-1-ol (65)

O6-benzylguanin (362 mg, 1,50 mmol, 1,50 ekv.) byl kodestilován s DMF a následně v DMF (5 ml) suspendován. Po přidání NaH (60% v minerálním oleji, 40 mg, 1 mmol, 1 ekv.) byla

směs 25 minut zahřívána na 90 °C pod argonovou atmosférou. Po zchladnutí směsi na přibližně 50 °C byl přidán 15-crown-5 ether (28 µl) a epoxid **38** rozpuštěný ve 2 ml DMF. Reakční teplota byla zvýšena na 100 °C po dobu 22 hodin a poté ještě na 4 hodiny na 110 °C. Po zchladnutí bylo DMF odpařeno a produkt **65** byl izolován chromatografií (gradient MeOH v DCM, 2-10 %) v množství 238 mg (výtěžek 41 %). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.97 (s, 1H), 7.53 – 7.46 (m, 2H), 7.43 – 7.26 (m, 8H), 7.26 – 7.21 (m, 2H), 6.90 – 6.85 (m, 2H), 6.41 (s, 2H), 5.49 (s, 2H), 5.42 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.63 (ddd, *J* = 11.8, 9.2, 7.5 Hz, 1H), 4.53 (s, 2H), 4.40 (s, 2H), 4.13 (td, *J* = 8.8, 5.8 Hz, 1H), 3.87 (ddd, *J* = 6.5, 3.8, 1.7 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.63 (dd, *J* = 9.5, 4.1 Hz, 1H), 3.52 (dd, *J* = 9.5, 7.3 Hz, 1H), 2.29 – 2.04 (m, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 160.16, 159.53, 158.81, 154.95, 138.70, 138.65, 136.92, 130.62, 129.47, 128.59, 128.57, 128.43, 128.18, 127.59, 127.56, 114.21, 113.75, 76.47, 74.82, 72.36, 69.41, 66.91, 59.56, 55.23, 52.30, 34.64. HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₃₃H₃₅O₅N₅Na⁺ [M + Na]⁺: 604.25304, nalezeno: 604.25321.

6-(benzyloxy)-9-((2*R*,3*R*,4*S*)-3-((benzyloxy)methyl)-2-fluoro-4-((4-methoxybenzyl)oxy)cyklopentyl)-9H-purin-2-amin (66)

Nukleosid **65** (250 mg, 0,430 mmol) byl kódestilován spolu s CsF (294 mg, 1,93 mmol, 4,5 ekv.) se suchým dioxanem. Poté byl přidán další dioxan (5 ml) a směs byla pod atmosférou argonu na 15 minut umístěna do ultrazvukové lázně. Posléze byl za míchání přidán DAST (284 µl, 215 mmol, 5 ekv.) a směs byla míchána 18 hodin při teplotě 25 °C. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku NaHCO₃. Po odpaření dioxanu byl odparek zředěn DCM a vodou a po rozdělení fází byla vodná fáze extrahována 10 ml DCM. Dichlormethanové frakce byly spojeny, vysušeny Na₂SO₄ a odpařeny. Produkt **66** byl izolován flash chromatografií (gradient EtOAc v cyklohexanu, 20 – 70 %) v množství 55 mg (22 %). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.93 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.55 – 7.47 (m, 2H), 7.45 – 7.28 (m, 8H), 7.27 – 7.21 (m, 2H), 6.92 – 6.85 (m, 2H), 6.51 (s, 2H), 5.51 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 5.27 (dt, *J* = 55.1, 3.4 Hz, 1H), 4.99 (dddd, *J* = 30.9, 11.7, 8.1, 2.9 Hz, 1H), 4.53 (s, 2H), 4.48 – 4.37 (m, 2H), 3.95 (ddd, *J* = 7.3, 5.0, 1.7 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.65 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H), 3.56 (ddd, *J* = 9.8, 7.0, 1.7 Hz, 1H), 2.68 – 2.50 (m, 1H), 2.64 (td, *J* = 13.1, 7.5 Hz, 1H), 2.39 – 2.30 (m, 1H). ¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO-*d*₆) δ -207.38 (dt, *J* = 56.0, 32.0 Hz). HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₃₃H₃₄O₄N₅FNa⁺ [M + Na]⁺: 606.24870, nalezeno: 606.24894.

2-amino-9-((2*R*,3*R*,4*S*)-2-fluoro-4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)cyklopentyl)-1,9-dihydro-6H-purin-6-on (67)

Látka **66** (48 mg, 0,082 mmol) byla kodestilována s toluenem a rozpuštěna v suchém dichlormethanu v baňce naplněné argonem. Po zchlazení na -78°C byl přikapán roztok 1M roztok BCl_3 v heptanu (0,741 ml, 0,741 mmol, 3 ekv. na 1 etherovou skupinu). Teplota byla udržována na -78°C po dobu 4 hodin a pak byla ponechána stoupnout na 25°C , při níž reakce probíhala dalších 17 hodin, než došlo k jejímu ukončení 1 ml methanolu. Po odpaření rozpouštědel byl produkt izolován flash chromatografií na reverzní fázi (gradient ACN ve vodě, 0 – 30 %). Bylo získáno 16 mg (67%) látky **67**. ^1H NMR (401 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.60 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.47 (s, 2H), 5.14 (dt, $J = 55.1, 3.2$ Hz, 1H), 5.10 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 4.90 (dddd, $J = 30.9, 11.6, 8.5, 2.9$ Hz, 1H), 4.71 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.00 (q, $J = 7.5, 6.2$ Hz, 1H), 3.68 – 3.49 (m, 2H), 2.67 – 2.52 (m, 1H), 2.24 – 2.02 (m, 1H), 2.05 (ddd, $J = 13.4, 8.6, 2.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 156.97, 153.77, 151.43, 136.29 (d, $J = 3.8$), 116.49, 94.15 (d, $J = 181.5$), 69.67, 57.84 (d, $J = 9.1$), 55.04 (d, $J = 17.6$), 54.63 (d, $J = 17.7$), 36.61. ^{19}F NMR (377 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -208.50 (dt, $J = 55.4, 32.8$ Hz). HRMS ESI m/z : vypočteno pro $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{N}_5\text{FNa}^+ [\text{M} + \text{Na}]^+$: 306.09729, nalezeno: 306.09737.

(1*S*,2*R*,3*R*,4*S*)-4-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2-((benzyloxy)methyl)-3-fluorocyklopentan-1-ol (68)

Nukleosid **62** (133 mg, 0,279 mmol) byl rozpuštěn v DCM (10 ml) a byla k němu přidána voda (0,75 ml). Za intenzivního míchání bylo při 0°C přisypáno DDQ (126 mg, 0,557 mmol, 2 ekv.). Po 2 hodinách při 0°C byl přidán ještě jeden ekvivalent (63 mg) DDQ a po 90 minutách byla reakce ukončena přidáním nasyceného roztoku NaHCO_3 . Po oddělení fází by vodná fáze znovu extrahována DCM, dichlormethanové frakce byly spojeny, promyty solankou a vysušeny Na_2SO_4 . Produkt byl izolován flash chromatografií (gradient MeOH v DCM, 5 – 20 %). Bylo získáno 63 mg (64%) látky **68**. ^1H NMR (401 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.18 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.38 – 7.26 (m, 5H), 7.24 (s, 2H), 5.33 – 5.13 (m, 3H), 4.57 – 4.46 (m, 2H), 4.10 (td, $J = 8.2, 3.0$ Hz, 1H), 3.67 – 3.56 (m, 2H), 2.73 (ddd, $J = 13.6, 11.3, 8.2$ Hz, 1H), 2.53 – 2.57 (m, 1H) 2.17 (ddd, $J = 13.0, 8.9, 2.7$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 156.15, 152.61, 149.85, 139.89 (d, $J = 3.6$), 138.57, 128.41, 127.62, 127.58, 118.72, 94.34 (d, $J = 182.1$), 72.23, 69.98, 66.61 (d, $J = 8.6$), 54.83 (d, $J = 14.4$), 52.08 (d, $J = 17.3$), 36.61. ^{19}F NMR (377 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -207.25 (dt, $J = 55.1, 32.7$ Hz). HRMS ESI m/z : vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{O}_2\text{N}_5\text{F}^+ [\text{M} + \text{H}]^+$: 358.16738, nalezeno: 358.16754.

(1*S*,2*R*,3*R*,4*S*)-4-(6-amino-9H-purin-9-yl)-2-((benzyloxy)methyl)-3-fluorocyklopentyl methansulfonát (69)

Substrát **68** (54 mg, 0,151 mmol) byl spolu s DMAP (2 mg, 12 mol%) a triethylaminem (25,2 μ l, 0,181 mmol, 1,2 ekv.) rozpuštěn ve 2 ml DCM. Do směsi zchlazené na 0 °C a chráněné argonovou atmosférou byl přidán MsCl (13 μ l, 0,166 mmol, 1,1 ekv.). Po 2 hodinách bylo do reakce přidáno ještě 26 μ l MsCl a 50 μ l Et₃N a teplota byla zvýšena na 25 °C. Po 1 hodině byla reakce ukončena 1 ml vody. Po zředění byly fáze odděleny a vodná byla extrahována dichlormethanem. Spojené organické frakce byly promyty nasyceným roztokem NaHCO₃, solankou a vysušeny Na₂SO₄. Po odpaření DCM byla látka **69** použita do dalších reakcí bez dalšího zpracování. ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.21 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.38 – 7.28 (m, 5H), 7.28 (s, 2H), 5.36 (dt, *J* = 54.8, 3.5 Hz, 1H), 5.34 – 5.19 (m, 1H), 5.14 (ddd, *J* = 8.2, 5.8, 2.3 Hz, 1H), 4.62 – 4.47 (m, 2H), 3.77 – 3.65 (m, 2H), 3.21 (s, 3H), 3.03 (ddd, *J* = 14.6, 11.7, 8.2 Hz, 1H), 3.02 – 2.86 (m, 1H) 2.61 (ddd, *J* = 14.6, 8.5, 2.2 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 156.18, 152.65, 149.86, 139.82 (d, *J* = 3.5), 138.26, 128.44, 127.72, 127.69, 118.69, 93.50 (d, *J* = 183.2), 80.60, 72.41, 65.70 (d, *J* = 8.7), 54.57 (d, *J* = 17.2), 49.26 (d, *J* = 17.6), 37.63, 34.29. ¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO-*d*₆) δ -206.94 (dt, *J* = 54.8, 31.7 Hz).

(1*S*,2*S*,5*S*)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-((benzyloxy)methyl)cyklopent-3-en-1-yl acetát (72)

K suspenzi substrátu **34** (337 mg, 1 mmol) v 10 ml suchého ACN byly přidány DMAP (15 mg, 0,12 mmol, 12 mol%) a TEA (418 μ l, 3 mmol, 3 ekv.) a anhydrid kyseliny octové (283 μ l, 3 mmol, 3 ekv.). Po 30 minutách míchání při 25 °C pod argonem byla reakce ukončena 2 ml methanolu. Po odpaření těkavých složek směsi byl zbytek zředěn ethylacetátem a vodou. Po oddělení fází byla vodná fáze extrahována EtOAc, organické frakce byly promyty solankou a vysušeny Na₂SO₄. Chromatografií (gradient MeOH v DCM, 2 – 10 %) bylo získáno 353 mg látky **72** (94 %). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.09 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.39 – 7.24 (m, 5H), 7.21 (s, 2H), 6.11 (dt, *J* = 6.0, 2.1 Hz, 1H), 5.89 (dt, *J* = 6.0, 2.2 Hz, 1H), 5.57 (dd, *J* = 4.2, 2.0 Hz, 1H), 5.33 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.50 (s, 2H), 3.67 (dd, *J* = 5.5, 2.3 Hz, 2H), 3.12 – 3.04 (m, 1H), 2.00 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 170.13, 156.16, 152.56, 149.57, 139.18, 138.43, 135.68, 128.43, 127.63, 127.55, 119.04, 81.40, 72.38, 70.19, 65.33, 51.46, 20.90. HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₂₀H₂₁O₃N₅Na⁺ [M + Na]⁺: 402.15366, nalezeno: 402.15371.

(1*S*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-((benzyloxy)methyl)-3,4-dihydroxycyklopentyl acetát (73)

K roztoku substrátu **72** (72 mg, 0,19 mmol) ve směsi THF (8 ml) a vody (1ml) byl přisypán NMMO·H₂O (64 mg, 0,475 mmol, 2,5ekv.) a následně přidán 4% vodný roztok OsO₄ (121 μ l,

10 mol%). Po 3 hodinách při 25 °C byla do reakce přidána další porce NMMO·H₂O (64 mg, 0,475 mmol, 2,5ekv.) a OsO₄ (121 µl, 10 mol%) a směs byla míchána dalších 18 hodin. Reakce byla ukončena 2 ml nasyceného roztoku NaHSO₄. Po odpaření rozpouštědel a chromatografií na reverzní fázi (gradient ACN ve vodě, 10 – 40 %) bylo získáno 39 mg (49 %) látky **73**. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.16 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.42 – 7.26 (m, 5H), 7.18 (s, 2H), 5.44 (dd, *J* = 8.1, 5.7 Hz, 1H), 5.21 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.07 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.82 (dd, *J* = 9.7, 8.1 Hz, 1H), 4.57 – 4.49 (m, 2H), 3.97 – 3.93 (m, 1H), 3.72 – 3.59 (m, 2H), 2.27 – 2.16 (m, 1H), 1.87 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 170.06, 156.15, 152.30, 150.05, 140.72, 138.61, 128.41, 127.58, 127.54, 119.51, 74.60, 72.34, 72.02, 71.07, 69.50, 64.61, 49.95, 20.77. HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₂₀H₂₃O₅N₅Na⁺ [M + Na]⁺: 436.15914, nalezeno: 436.15900.

(1*R*,2*S*,3*R*,4*S*,5*S*)-4-acetoxy-3-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-((benzyloxy)methyl)cyklopentan-1,2-diyl dibenzoát (74)

Substrát **73** (216 mg, 0,523 mmol) (předem kodestilovaný se suchým pyridinem) byl rozpuštěn v 10 ml suchého pyridinu. Po přidání DMAP (26 mg, 0,21 mmol, 0,4 ekv.) a anhydridu kyseliny benzoové (478 mg, 2,09 mmol, 4 ekv.) byla reakční směs překrytá argonem míchána 15 hodin při teplotě 25 °C. Pro dosažení plné konverze bylo přidáno 60 mg Bz₂O (0,5 ekv.). Po dvou hodinách byla reakční směs odpařena, zředěna DCM, promyta roztokem NaHCO₃, organické frakce vysušeny Na₂SO₄ a odpařeny. Chromatografií (gradient MeOH v DCM, 2 – 10 %) bylo získáno 303 mg (výtěžek 93 %) produktu. ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.30 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.00 – 7.92 (m, 2H), 7.76 – 7.71 (m, 2H), 7.70 – 7.64 (m, 1H), 7.60 – 7.48 (m, 3H), 7.44 – 7.28 (m, 7H), 7.27 (s, 2H), 6.17 (dd, *J* = 9.2, 5.7 Hz, 1H), 5.83 (dd, *J* = 8.1, 6.5 Hz, 1H), 5.78 (dd, *J* = 5.6, 4.1 Hz, 1H), 5.47 (dd, *J* = 9.1, 8.1 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 3.92 – 3.83 (m, 2H), 2.83 (dt, *J* = 9.6, 4.8 Hz, 1H), 1.95 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 170.05, 165.06, 164.61, 156.23, 152.65, 149.78, 140.57, 138.42, 133.95, 133.92, 129.51, 129.31, 129.19, 128.97, 128.81, 128.51, 128.42, 127.62, 127.48, 119.30, 73.02, 72.87, 72.50, 71.92, 68.09, 62.67, 47.75, 20.71. HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₃₄H₃₁O₇N₅Na⁺ [M + Na]⁺: 644.21157, nalezeno: 644.21146.

(1*R*,2*S*,3*R*,4*S*,5*S*)-3-(6-amino-9H-purin-9-yl)-5-((benzyloxy)methyl)-4-hydroxycyklopentan-1,2-diyl dibenzoát (75)

K roztoku **74** (297 mg, 0,479 mmol) v suchém methanolu (21 ml) v baňce vyplněné argonem byl při 0 °C přikapán acetylchlorid (479 µl, 6,71 mmol, 14 ekv.). Teplota byla ponechána stoupnout na 25 °C a po 7 hodinách bylo přidáno dalších 240 µl acetylchloridu. Reakce

pokračovala dalších 17 hodin, než byla ukončena přidavkem roztoku NaHCO₃ (do dosažení neutrálního pH) a odpařena. Po zředění DCM a roztokem NaHCO₃ byly fáze odděleny a vodná fáze extrahována dvakrát dichlormethanem. Spojené organické frakce byly vysušeny Na₂SO₄ a odpařeny. Produkt **75** (218 mg, 79 %) byl izolován flash chromatografií (gradient MeOH v DCM, 2 – 10 %). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.34 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.96 – 7.90 (m, 2H), 7.73 – 7.68 (m, 2H), 7.68 – 7.61 (m, 1H), 7.58 – 7.51 (m, 1H), 7.48 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.44 – 7.38 (m, 2H), 7.33 (td, *J* = 7.7, 3.5 Hz, 4H), 7.29 – 7.25 (m, 1H), 7.24 (s, 2H), 6.03 (dd, *J* = 9.1, 6.4 Hz, 1H), 5.79 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 5.71 (dd, *J* = 6.3, 5.2 Hz, 1H), 5.09 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H), 4.68 (td, *J* = 8.6, 6.1 Hz, 1H), 4.62 (s, 2H), 3.84 – 3.70 (m, 2H), 2.26 – 2.48 (m, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.14, 164.69, 156.23, 152.51, 149.90, 141.01, 138.60, 133.81, 133.77, 129.43, 129.31, 129.26, 128.88, 128.74, 128.68, 128.40, 127.54, 127.40, 119.53, 72.41, 72.30, 71.21, 69.62, 67.89, 65.36, 49.88. HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₃₂H₂₉O₆N₅Na⁺ [M + Na]⁺: 602.20100, nalezeno: 602.20077.

(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-5-((benzyloxy)methyl)-4-fluorocyklopentan-1,2-diyl dibenzoát (76)

Při přípravě látky **76** vycházející z **75** (213 mg, 0,368 mmol) bylo postupováno podle postupu popsaného výše pro přípravu látek **62** a **66**. Bylo získáno 115 mg (výtěžek 54%) látky **76**. ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.37 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.92 – 7.87 (m, 2H), 7.74 – 7.69 (m, 2H), 7.65 – 7.59 (m, 1H), 7.55 (ddt, *J* = 8.8, 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.43 (tt, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 2H), 7.36 – 7.21 (m, 10H), 6.33 (dd, *J* = 9.0, 7.2 Hz, 1H), 5.71 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 5.71 – 5.59 (m, 1H), 5.41 (dt, *J* = 54.3, 3.9 Hz, 1H), 4.60 – 4.50 (m, 2H), 3.91 – 3.74 (m, 2H), 3.37 – 3.19 (m, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 165.02, 164.73, 156.22, 152.86, 150.14, 140.10 (d, *J* = 4.0), 138.33, 133.94, 133.87, 129.33, 129.01, 128.83, 128.78, 128.48, 128.39, 127.62, 118.42, 91.27 (d, *J* = 183.1), 73.13, 72.37, 71.24, 66.29 (d, *J* = 8.7), 59.64 (d, *J* = 16.5), 46.82 (d, *J* = 17.9). ¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO-*d*₆) δ -202.68 (dt, *J* = 54.3, 31.4 Hz). HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₃₂H₂₈O₅N₅FNa⁺ [M + Na]⁺: 604.19667, nalezeno: 604.19691.

(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-5-((benzyloxy)methyl)-4-fluorocyklopentan-1,2-diol (77)

Látka **76** (110 mg, 0,189 mmol) byla rozpuštěna v 10 ml methanolu a za míchání z ní byl při teplotě 25 °C najednou přilít 0,1M vodný roztok hydroxidu sodného. K hydrolyze obou benzoylů došlo za 25 minut a reakce byla ukončena 9 ml 0,1M roztoku HCl. Po odpaření

rozpouštědel a chromatografii (gradient MeOH v DCM, 5 – 15 %) byla získána látka **77** (47 mg, 67%). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.20 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.38 – 7.26 (m, 5H), 7.25 (s, 2H), 5.25 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 5.22 – 5.06 (m, 1H), 5.05 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 4.86 (ddd, *J* = 30.2, 9.8, 3.5 Hz, 1H), 4.66 (dt, *J* = 9.1, 6.5 Hz, 1H), 4.52 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 3.88 (q, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.67 – 3.56 (m, 2H), 2.60 – 2.44 (m, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 156.15, 152.65, 150.26, 139.92 (d, *J* = 2.5), 138.55, 128.43, 127.66, 127.61, 118.66, 90.92 (d, *J* = 181.6), 72.24, 71.59, 69.67, 66.87 (d, *J* = 10.3), 61.31 (d, *J* = 17.0), 49.36 (d, *J* = 17.8). ¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO-*d*₆) δ -204.52 (dt, *J* = 54.9, 31.1 Hz). HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₁₈H₂₁O₃N₅F⁺ [M + H]⁺: 374.16229, nalezeno: 374.16253.

(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3-(6-amino-9H-purin-9-yl)-4-fluoro-5-(hydroxymethyl)cyklopentan-1,2-diol (78)

K suspenzi látky **77** (12 mg, 0,032) v suchém dichlormethanu (2 ml) byl při - 78 °C přidán 1M roztok BCl₃ v DCM (129 μl, 0,129 mmol, 4 ekv.) a reakce byla při uvedené teplotě udržována 3 hodiny, než k ní byla přidána další dávka BCl₃ (129 μl) a teplota byla ponechána zvolna stoupnout na 25 °C. Po 12 hodinách bylo přidáno opět stejné množství BCl₃ a o dvě hodiny později byla reakce ukončena přidavkem 3 ml methanolu. Po chromatografii (gradient směsi EtOAc, acetonu, ethanolu a vody (18:3:2,5:1,5) v EtOAc, 60 – 100 %) bylo získáno 9 mg **78** (kvantitativní výtěžek). ¹H NMR (401 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.22 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.25 (s, 2H), 5.24 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 5.11 (dt, *J* = 54.8, 4.0 Hz, 1H), 4.99 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.82 (ddd, *J* = 30.7, 10.2, 3.9 Hz, 1H), 4.76 – 4.73 (m, 1H), 4.69 – 4.57 (m, 1H), 3.83 (q, *J* = 5.1 Hz, 1H), 3.60 (dd, *J* = 7.8, 5.0 Hz, 2H), 2.32 (ddq, *J* = 30.8, 7.7, 4.5, 3.9 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 156.15, 152.65, 150.26, 139.95 (d, *J* = 2.9), 118.68, 90.89 (d, *J* = 181.0), 71.65, 69.50, 61.41 (d, *J* = 17.0), 58.19 (d, *J* = 105), 52.11 (d, *J* = 17.7). ¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO-*d*₆) δ -205.05 (dt, *J* = 54.8, 31.2 Hz). HRMS ESI *m/z*: vypočteno pro C₁₁H₁₅O₃N₅F⁺ [M + H]⁺: 284.11534, nalezeno: 284.11541.

6 Závěr

Byly nalezeny syntetické postupy vhodné pro přípravu 6'-fluorovaných derivátů karbocyklických nukleosidů, a to jak pro deriváty s *ribo* konfigurací hydroxylů, tak pro 2'-deoxyribo sloučeniny. Zatímco většina experimentů byla prováděna s analogy aristeromycinu, aplikovatelnost postupu pro přípravu 2'-deoxynukleosidů byla ověřena využitím guaninu jako nukleobáze. Syntéza 6',6'-*gem*-difluoro derivátů bohužel nebyla úspěšná. Hlavní příčinou se zdá být nízká stabilita klíčového intermediátu v kombinaci s jeho nízkou reaktivitou při deoxofluoračních reakcích. Získané poznatky budou využity pro rozšíření série látek s využitím jiných nukleobází a případně také syntézou 2',3'-dideoxy a 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrogen derivátů 6'-fluorovaných karbocyklických nukleosidů. Biologická aktivita připravených látek bude v nejbližší době otestována ve spolupracujících laboratořích.

7 Literatura

- (1) Mukhopadhyay, S.; Kuhn, R. J.; Rossmann, M. G. A Structural Perspective of the *Flavivirus* Life Cycle. *Nature Reviews Microbiology* **2005**, *3* (1), 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>.
- (2) Gritsun, T. S.; Lashkevich, V. A.; Gould, E. A. Tick-Borne Encephalitis. *Antiviral Research* **2003**, *57* (1), 129–146. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(02\)00206-1](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00206-1).
- (3) Kok, W. M. New Developments in Flavivirus Drug Discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2016**, *11* (5), 433–445. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1160887>.
- (4) Heinz, F. X.; Stiasny, K. Flaviviruses and Flavivirus Vaccines. *Vaccine* **2012**, *30* (29), 4301–4306. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.114>.
- (5) Guy, B.; Briand, O.; Lang, J.; Saville, M.; Jackson, N. Development of the Sanofi Pasteur Tetravalent Dengue Vaccine: One More Step Forward. *Vaccine* **2015**, *33* (50), 7100–7111. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.108>.
- (6) Fernandez, E.; Diamond, M. S. Vaccination Strategies against Zika Virus. *Current Opinion in Virology* **2017**, *23*, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.006>.
- (7) Stiasny, K.; Heinz, F. X. Flavivirus Membrane Fusion. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87* (Pt 10), 2755–2766. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82210-0>.
- (8) Bollati, M.; Alvarez, K.; Assenberg, R.; Baronti, C.; Canard, B.; Cook, S.; Coutard, B.; Decroly, E.; de Lamballerie, X.; Gould, E. A.; et al. Structure and Functionality in Flavivirus NS-Proteins: Perspectives for Drug Design. *Antiviral Research* **2010**, *87* (2), 125–148. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.009>.
- (9) Malet, H.; Massé, N.; Selisko, B.; Romette, J.-L.; Alvarez, K.; Guillemot, J. C.; Tolou, H.; Yap, T. L.; Vasudevan, S. G.; Lescar, J.; et al. The Flavivirus Polymerase as a Target for Drug Discovery. *Antiviral Research* **2008**, *80* (1), 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.06.007>.
- (10) Rice, C. M.; Lenches, E. M.; Eddy; Shin, S. J.; Sheets, R. L.; Strauss, J. H. Nucleotide Sequence of Yellow Fever Virus: Implications for Flavivirus Gene Expression and Evolution. *Science* **1985**, *229* (4715), 726–733. <https://doi.org/10.1126/science.4023707>.
- (11) Ma, L.; Jones, C. T.; Groesch, T. D.; Kuhn, R. J.; Post, C. B. Solution Structure of Dengue Virus Capsid Protein Reveals Another Fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (10), 3414–3419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305892101>.
- (12) Sampath, A.; Padmanabhan, R. Molecular Targets for Flavivirus Drug Discovery. *Antiviral Res.* **2009**, *81* (1), 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.08.004>.
- (13) Chambers, T. J.; Hahn, C. S.; Galler, R.; Rice, C. M. Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **1990**, *44*, 649–688. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.003245>.
- (14) Muller, D. A.; Young, P. R. The Flavivirus NS1 Protein: Molecular and Structural Biology, Immunology, Role in Pathogenesis and Application as a Diagnostic Biomarker. *Antiviral Research* **2013**, *98* (2), 192–208. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>.
- (15) Luo, D.; Vasudevan, S. G.; Lescar, J. The Flavivirus NS2B–NS3 Protease–Helicase as a Target for Antiviral Drug Development. *Antiviral Research* **2015**, *118*, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.014>.
- (16) Noble, C. G.; Shi, P.-Y. Structural Biology of Dengue Virus Enzymes: Towards Rational Design of Therapeutics. *Antiviral Research* **2012**, *96* (2), 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.09.007>.
- (17) Lim, S. P.; Noble, C. G.; Shi, P.-Y. The Dengue Virus NS5 Protein as a Target for Drug Discovery. *Antiviral Res.* **2015**, *119*, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.010>.

- (18) Dong, H.; Chang, D. C.; Xie, X.; Toh, Y. X.; Chung, K. Y.; Zou, G.; Lescar, J.; Lim, S. P.; Shi, P.-Y. Biochemical and Genetic Characterization of Dengue Virus Methyltransferase. *Virology* **2010**, *405* (2), 568–578. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.039>.
- (19) Wang, J.; Sánchez-Roselló, M.; Aceña, J. L.; del Pozo, C.; Sorochinsky, A. E.; Fustero, S.; Soloshonok, V. A.; Liu, H. Fluorine in Pharmaceutical Industry: Fluorine-Containing Drugs Introduced to the Market in the Last Decade (2001–2011). *Chem. Rev.* **2014**, *114* (4), 2432–2506. <https://doi.org/10.1021/cr4002879>.
- (20) Abundance of Elements in Earth's Crust. *Wikipedia*; 2019.
- (21) Hiyama, T. *Organofluorine Compounds: Chemistry and Applications*; Yamamoto, H., Ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2000.
- (22) Fried, J.; Sabo, E. F. SYNTHESIS OF 17 α -HYDROXYCORTICOSTERONE AND ITS 9 α -HALO DERIVATIVES FROM 11-EPI-17 α -HYDROXYCORTICOSTERONE. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75* (9), 2273–2274. <https://doi.org/10.1021/ja01105a527>.
- (23) Heidelberger, C.; Chaudhuri, N. K.; Danneberg, P.; Mooren, D.; Griesbach, L.; Duschinsky, R.; Schnitzer, R. J.; Plevin, E.; Scheiner, J. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature* **1957**, *179* (4561), 663–666. <https://doi.org/10.1038/179663a0>.
- (24) Honda, T.; Ojima, I. 17 - Strategic Incorporation of Fluorine for Drug Discovery and Development. In *Modern Synthesis Processes and Reactivity of Fluorinated Compounds*; Groult, H., Leroux, F. R., Tressaud, A., Eds.; Elsevier, 2017; pp 499–531. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803740-9.00017-2>.
- (25) Fuentes, A. V.; Pineda, M. D.; Venkata, K. C. N. Comprehension of Top 200 Prescribed Drugs in the US as a Resource for Pharmacy Teaching, Training and Practice. *Pharmacy* **2018**, *6* (2), 43. <https://doi.org/10.3390/pharmacy6020043>.
- (26) O'Hagan, D.; B. Harper, D. Fluorine-Containing Natural Products. *Journal of Fluorine Chemistry* **1999**, *100* (1), 127–133. [https://doi.org/10.1016/S0022-1139\(99\)00201-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1139(99)00201-8).
- (27) Walker, M. C.; Chang, M. C. Y. Natural and Engineered Biosynthesis of Fluorinated Natural Products. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (18), 6527–6536. <https://doi.org/10.1039/C4CS00027G>.
- (28) Meanwell, N. A. Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (14), 5822–5880. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01788>.
- (29) Bégué, J.; Bonnet-Delpon, D. Chapter 13 - Biological Impacts of Fluorination: Pharmaceuticals Based on Natural Products. In *Fluorine and Health*; Tressaud, A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2008; pp 553–622. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53086-8.00013-8>.
- (30) Purser, S.; Moore, P. R.; Swallow, S.; Gouverneur, V. Fluorine in Medicinal Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (2), 320–330. <https://doi.org/10.1039/B610213C>.
- (31) Böhm, H.-J.; Banner, D.; Bendels, S.; Kansy, M.; Kuhn, B.; Müller, K.; Obst-Sander, U.; Stahl, M. Fluorine in Medicinal Chemistry. *ChemBioChem* **2004**, *5* (5), 637–643. <https://doi.org/10.1002/cbic.200301023>.
- (32) Smart, B. E. Fluorine Substituent Effects (on Bioactivity). *Journal of Fluorine Chemistry* **2001**, *109* (1), 3–11. [https://doi.org/10.1016/S0022-1139\(01\)00375-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1139(01)00375-X).
- (33) Alexandre Champagne, P.; Desroches, J.; Paquin, J.-F. Organic Fluorine as a Hydrogen-Bond Acceptor: Recent Examples and Applications. *Synthesis* **2014**, *47*, 306–322. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1379537>.
- (34) Park, B. K.; Kitteringham, N. R.; O'Neill, P. M. Metabolism of Fluorine-Containing Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 443–470. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.443>.

- (35) Zhao, Y. H.; Abraham, M. H.; Zissimos, A. M. Fast Calculation of van Der Waals Volume as a Sum of Atomic and Bond Contributions and Its Application to Drug Compounds. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (19), 7368–7373. <https://doi.org/10.1021/jo034808o>.
- (36) Leroux, F. Atropisomerism, Biphenyls, and Fluorine: A Comparison of Rotational Barriers and Twist Angles. *ChemBioChem* **2004**, *5* (5), 644–649. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300906>.
- (37) G Kapustin, E.; M Bzhezovsky, V.; M Yagupolskii, L. Torsion Potentials and Electronic Structure of Trifluoromethoxy- and Trifluoromethylthiobenzene: An Ab Initio Study. *Journal of Fluorine Chemistry - J FLUORINE CHEM* **2002**, *113*, 227–237. [https://doi.org/10.1016/S0022-1139\(01\)00556-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1139(01)00556-5).
- (38) Tavasli, M.; O'Hagan, D.; Pearson, C.; Petty, M. C. The Fluorine Gauche Effect. Langmuir Isotherms Report the Relative Conformational Stability of (±)-Erythro- and (±)-Threo-9,10-Difluorostearic Acids. *Chem. Commun.* **2002**, No. 11, 1226–1227. <https://doi.org/10.1039/B202891C>.
- (39) Buissonneaud, D. Y.; van Mourik, T.; O'Hagan, D. A DFT Study on the Origin of the Fluorine Gauche Effect in Substituted Fluoroethanes. *Tetrahedron* **2010**, *66* (12), 2196–2202. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.01.049>.
- (40) Hodges, J. A.; Raines, R. T. Stereoelectronic Effects on Collagen Stability: The Dichotomy of 4-Fluoroproline Diastereomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (31), 9262–9263. <https://doi.org/10.1021/ja035881z>.
- (41) Van Roey, P.; Salerno, J. M.; Chu, C. K.; Schinazi, R. F. Correlation between Preferred Sugar Ring Conformation and Activity of Nucleoside Analogues against Human Immunodeficiency Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86* (11), 3929–3933. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.11.3929>.
- (42) Cavaliere, A.; Probst, K. C.; Westwell, A. D.; Slusarczyk, M. Fluorinated Nucleosides as an Important Class of Anticancer and Antiviral Agents. *Future Med Chem* **2017**, *9* (15), 1809–1833. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0095>.
- (43) Stepan, A. F.; Mascitti, V.; Beaumont, K.; Kalgutkar, A. S. Metabolism-Guided Drug Design. *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4* (4), 631–652. <https://doi.org/10.1039/C2MD20317K>.
- (44) Cnubben, N. H.; Peelen, S.; Borst, J. W.; Vervoort, J.; Veeger, C.; Rietjens, I. M. Molecular Orbital-Based Quantitative Structure-Activity Relationship for the Cytochrome P450-Catalyzed 4-Hydroxylation of Halogenated Anilines. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7* (5), 590–598.
- (45) Rosenblum, S. B.; Huynh, T.; Afonso, A.; Davis, H. R.; Yumibe, N.; Clader, J. W.; Burnett, D. A. Discovery of 1-(4-Fluorophenyl)-(3R)-[3-(4-Fluorophenyl)-(3S)-Hydroxypropyl]-(4S)-(4-Hydroxyphenyl)-2-Azetidinone (SCH 58235): A Designed, Potent, Orally Active Inhibitor of Cholesterol Absorption. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (6), 973–980. <https://doi.org/10.1021/jm970701f>.
- (46) Buhler, D. R.; Unlu, F.; Thakker, D. R.; Slaga, T. J.; Newman, M. S.; Levin, W.; Conney, A. H.; Jerina, D. M. Metabolism and Tumorigenicity of 7-, 8-, 9-, and 10-Fluorobenzo(a)Pyrenes. *Cancer Res.* **1982**, *42* (11), 4779–4783.
- (47) Ford, H.; Siddiqui, M. A.; Driscoll, J. S.; Marquez, V. E.; Kelley, J. A.; Mitsuya, H.; Shirasaka, T. Lipophilic, Acid-Stable, Adenosine Deaminase-Activated Anti-HIV Prodrugs for Central Nervous System Delivery. 2. 6-Halo and 6-Alkoxy Prodrugs of 2'-Beta-Fluoro-2',3'-Dideoxyinosine. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (7), 1189–1195. <https://doi.org/10.1021/jm00007a015>.
- (48) Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Kingston, D. G. I. Chapter 5 - Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures**Note: This Chapter Reflects the Opinions of the Authors, Not Necessarily Those of the US Government. In *The Practice*

- of Medicinal Chemistry (Fourth Edition)*; Wermuth, C. G., Aldous, D., Raboisson, P., Rognan, D., Eds.; Academic Press: San Diego, 2015; pp 101–139. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00005-5>.
- (49) Miao, Z.; Zhu, L.; Dong, G.; Zhuang, C.; Wu, Y.; Wang, S.; Guo, Z.; Liu, Y.; Wu, S.; Zhu, S.; et al. A New Strategy To Improve the Metabolic Stability of Lactone: Discovery of (20S,21S)-21-Fluorocamptothecins as Novel, Hydrolytically Stable Topoisomerase I Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (20), 7902–7910. <https://doi.org/10.1021/jm400906z>.
- (50) Edmondson, S. D.; Wei, L.; Xu, J.; Shang, J.; Xu, S.; Pang, J.; Chaudhary, A.; Dean, D. C.; He, H.; Leiting, B.; et al. Fluoroolefins as Amide Bond Mimics in Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18* (7), 2409–2413. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.02.050>.
- (51) Parlow, J. J.; Kurumbail, R. G.; Stegeman, R. A.; Stevens, A. M.; Stallings, W. C.; South, M. S. Design, Synthesis, and Crystal Structure of Selective 2-Pyridone Tissue Factor VIIa Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (22), 4696–4701. <https://doi.org/10.1021/jm0301686>.
- (52) Klettner, A.; Herdegen, T. The Immunophilin-Ligands FK506 and V-10,367 Mediate Neuroprotection by the Heat Shock Response. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *138* (5), 1004–1012. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705132>.
- (53) Dubowchik, G. M.; Vrudhula, V. M.; Dasgupta, B.; Ditta, J.; Chen, T.; Sheriff, S.; Sipman, K.; Witmer, M.; Tredup, J.; Vyas, D. M.; et al. 2-Aryl-2,2-Difluoroacetamide FKBP12 Ligands: Synthesis and X-Ray Structural Studies. *Org. Lett.* **2001**, *3* (25), 3987–3990. <https://doi.org/10.1021/ol0166909>.
- (54) Hoffmann, M.; Rychlewski, J. When, in the Context of Drug Design, Can a Fluorine Atom Successfully Substitute a Hydroxyl Group? *International Journal of Quantum Chemistry* **2002**, *89* (4), 419–427. <https://doi.org/10.1002/qua.10277>.
- (55) Appleby, T. C.; Perry, J. K.; Murakami, E.; Barauskas, O.; Feng, J.; Cho, A.; Fox, D.; Wetmore, D. R.; McGrath, M. E.; Ray, A. S.; et al. Structural Basis for RNA Replication by the Hepatitis C Virus Polymerase. *Science* **2015**, *347* (6223), 771–775. <https://doi.org/10.1126/science.1259210>.
- (56) O'Hagan, D. Understanding Organofluorine Chemistry. An Introduction to the C–F Bond. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (2), 308–319. <https://doi.org/10.1039/B711844A>.
- (57) Erickson, J. A.; McLoughlin, J. I. Hydrogen Bond Donor Properties of the Difluoromethyl Group. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (6), 1626–1631. <https://doi.org/10.1021/jo00111a021>.
- (58) Yerien, D. E.; Barata-Vallejo, S.; Postigo, A. Difluoromethylation Reactions of Organic Compounds. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (59), 14676–14701. <https://doi.org/10.1002/chem.201702311>.
- (59) Sardinha, J.; Guieu, S.; Deleuze, A.; Fernández-Alonso, M. C.; Rauter, A. P.; Sinaÿ, P.; Marrot, J.; Jiménez-Barbero, J.; Sollogoub, M. Gem-Difluoro-Carbasugars, the Cases of Mannopyranose and Galactopyranose. *Carbohydrate Research* **2007**, *342* (12), 1689–1703. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.05.021>.
- (60) Romanenko, V. D.; Kukhar, V. P. Fluorinated Phosphonates: Synthesis and Biomedical Application. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (9), 3868–3935. <https://doi.org/10.1021/cr051000q>.
- (61) Ivanova, M. V.; Bayle, A.; Besset, T.; Pannecoucke, X.; Poisson, T. New Prospects toward the Synthesis of Difluoromethylated Phosphate Mimics. *Chemistry – A European Journal* **2016**, *22* (30), 10284–10293. <https://doi.org/10.1002/chem.201601310>.
- (62) Halazy, S.; Ehrhard, A.; Eggenspiller, A.; Berges-Gross, V.; Danzin, C. Fluorophosphonate Derivatives of N9-Benzylguanine as Potent, Slow-Binding Multisubstrate Analogue Inhibitors of Purine Nucleoside Phosphorylase. *Tetrahedron* **1996**, *52* (1), 177–184. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00891-B](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00891-B).

- (63) Kirk, K. L. Fluorination in Medicinal Chemistry: Methods, Strategies, and Recent Developments. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12* (2), 305–321. <https://doi.org/10.1021/op700134j>.
- (64) Liang, T.; Neumann, C. N.; Ritter, T. Introduction of Fluorine and Fluorine-Containing Functional Groups. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**. <https://doi.org/10.1002/anie.201206566>.
- (65) Furuya, T.; Kuttruff, C. A.; Ritter, T. Carbon–Fluorine Bond Formation. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **2008**.
- (66) Sharma, P.; Sharma, N.; Kumar, A.; Bhagat, S. Electrophilic Fluorination with 1-Fluoro-2,4,6-Trimethylpyridinium Tetrafluoroborate and NFSI (N-Fluorobenzenesulfonimide) Reagents Directed towards the Synthesis of Heterocycles; Current Trends. *Organic & Medicinal Chem IJ.* *3* (4). <https://doi.org/10.19080/OMCIJ.2017.03.555620>.
- (67) Differding, E.; Lang, R. W. 2-Fluoro-3,3-Dimethyl-2,3-Dihydro-1,2-Benzisothiazole 1,1-Dioxide. In *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; American Cancer Society, 2001. <https://doi.org/10.1002/047084289X.rf006>.
- (68) Nyffeler, P. T.; Durón, S. G.; Burkart, M. D.; Vincent, S. P.; Wong, C.-H. Selectfluor: Mechanistic Insight and Applications. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44* (2), 192–212. <https://doi.org/10.1002/anie.200400648>.
- (69) Shibata, N.; Suzuki, E.; Takeuchi, Y. A Fundamentally New Approach to Enantioselective Fluorination Based on Cinchona Alkaloid Derivatives/Selectfluor Combination. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (43), 10728–10729. <https://doi.org/10.1021/ja002732x>.
- (70) Furuya, T.; Klein, J. E. M. N.; Ritter, T. Carbon-Fluorine Bond Formation for the Synthesis of Aryl Fluorides. *Synthesis* **2010**, *2010* (11), 1804–1821. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1218742>.
- (71) Wilkinson, J. A. Recent Advances in the Selective Formation of the Carbon-Fluorine Bond. *Chem. Rev.* **1992**, *92* (4), 505–519. <https://doi.org/10.1021/cr00012a002>.
- (72) Kim, D. W.; Jeong; Lim, S. T.; Sohn, M.-H.; Katzenellenbogen, J. A.; Chi, D. Y. Facile Nucleophilic Fluorination Reactions Using Tert-Alcohols as a Reaction Medium: Significantly Enhanced Reactivity of Alkali Metal Fluorides and Improved Selectivity. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (3), 957–962. <https://doi.org/10.1021/jo7021229>.
- (73) Sun, H.; DiMugno, S. G. Anhydrous Tetrabutylammonium Fluoride. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (7), 2050–2051. <https://doi.org/10.1021/ja0440497>.
- (74) *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations Vol. 29: Acetals: Hal/X and O/O, S, Se, Te*; Georg Thieme Verlag, 2014.
- (75) Middleton, W. J. New Fluorinating Reagents. Dialkylaminosulfur Fluorides. *J. Org. Chem.* **1975**, *40* (5), 574–578. <https://doi.org/10.1021/jo00893a007>.
- (76) Dykstra, K. D.; Ichiishi, N.; Krska, S. W.; Richardson, P. F. 1 - Emerging Fluorination Methods in Organic Chemistry Relevant for Life Science Application. In *Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals*; Haufe, G., Leroux, F. R., Eds.; Progress in Fluorine Science; Academic Press, 2019; pp 1–90. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812733-9.00001-5>.
- (77) Aminodifluorosulfonium Salts: Selective Fluorination Reagents with Enhanced Thermal Stability and Ease of Handling, | The Journal of Organic Chemistry <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jo100504x> (accessed Aug 15, 2019).
- (78) L’Heureux, A.; Beaulieu, F.; Bennett, C.; Bill, D. R.; Clayton, S.; LaFlamme, F.; Mirmehrabi, M.; Tadayon, S.; Tovell, D.; Couturier, M. Aminodifluorosulfonium Salts: Selective Fluorination Reagents with Enhanced Thermal Stability and Ease of Handling. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (10), 3401–3411. <https://doi.org/10.1021/jo100504x>.

- (79) Schimler, S. D.; Ryan, S. J.; Bland, D. C.; Anderson, J. E.; Sanford, M. S. Anhydrous Tetramethylammonium Fluoride for Room-Temperature S_NAr Fluorination. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (24), 12137–12145. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02075>.
- (80) Grushin, V. V.; Marshall, W. J. Fluorination of Nonactivated Haloarenes via Arynes under Mild Conditions, Resulting from Further Studies toward Ar–F Reductive Elimination from Palladium(II). *Organometallics* **2008**, *27* (19), 4825–4828. <https://doi.org/10.1021/om800520e>.
- (81) Clark, J. H.; Smith, D. K. Fluorodenitrations Using Tetrabutylammonium Fluoride. *Tetrahedron Letters* **1985**, *26* (18), 2233–2236. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)98970-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)98970-6).
- (82) Campbell, M. G.; Ritter, T. Modern Carbon–Fluorine Bond Forming Reactions for Aryl Fluoride Synthesis. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (2), 612–633. <https://doi.org/10.1021/cr500366b>.
- (83) Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. Advances in the Development of Nucleoside and Nucleotide Analogues for Cancer and Viral Diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **2013**, *12* (6), 447–464. <https://doi.org/10.1038/nrd4010>.
- (84) Liu, P.; Sharon, A.; Chu, C. K. Fluorinated Nucleosides: Synthesis and Biological Implication. *Journal of Fluorine Chemistry* **2008**, *129* (9), 743–766. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2008.06.007>.
- (85) Aoki, F. Y. 45 - Antivirals against Herpes Viruses. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*; Bennett, J. E., Dolin, R., Blaser, M. J., Eds.; Content Repository Only! Philadelphia, 2015; pp 546-562.e7. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00045-X>.
- (86) Benson, A. B.; Venook, A. P.; Cederquist, L.; Chan, E.; Chen, Y.-J.; Cooper, H. S.; Deming, D.; Engstrom, P. F.; Enzinger, P. C.; Fichera, A.; et al. Colon Cancer, Version 1.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* **2017**, *15* (3), 370–398. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2017.0036>.
- (87) De Clercq, E.; Li, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* **2016**, *29* (3), 695–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>.
- (88) WHO | WHO Model Lists of Essential Medicines <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/> (accessed Aug 19, 2019).
- (89) Frampton, J. E.; Perry, C. M. Emtricitabine: A Review of Its Use in the Management of HIV Infection. *Drugs* **2005**, *65* (10), 1427–1448. <https://doi.org/10.2165/00003495-200565100-00008>.
- (90) Yoon, J.-J.; Toots, M.; Lee, S.; Lee, M.-E.; Ludeke, B.; Luczo, J. M.; Ganti, K.; Cox, R. M.; Sticher, Z. M.; Edpuganti, V.; et al. Orally Efficacious Broad-Spectrum Ribonucleoside Analog Inhibitor of Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2018**, *62* (8), e00766-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00766-18>.
- (91) De Clercq, E. Ebola Virus (EBOV) Infection: Therapeutic Strategies. *Biochemical Pharmacology* **2015**, *93* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.11.008>.
- (92) Otto, M. J. New Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors for the Treatment of HIV Infections. *Current Opinion in Pharmacology* **2004**, *4* (5), 431–436. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.06.001>.
- (93) Block, T. M.; Rawat, S.; Brosgart, C. L. Chronic Hepatitis B: A Wave of New Therapies on the Horizon. *Antiviral Research* **2015**, *121*, 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.014>.

- (94) Bourlière, M.; Oules, V.; Ansaldi, C.; Adhoute, X.; Castellani, P. Sofosbuvir as Backbone of Interferon Free Treatments. *Dig Liver Dis* **2014**, *46 Suppl 5*, S212-220. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2014.09.024>.
- (95) Slusarczyk, M.; Serpi, M.; Pertusati, F. Phosphoramidates and Phosphonamidates (ProTides) with Antiviral Activity. *Antivir. Chem. Chemother.* **2018**, *26*, 2040206618775243. <https://doi.org/10.1177/2040206618775243>.
- (96) Pawlotsky, J.-M.; Najera, I.; Jacobson, I. Resistance to Mericitabine, a Nucleoside Analogue Inhibitor of HCV RNA-Dependent RNA Polymerase. *Antivir. Ther. (Lond.)* **2012**, *17* (3), 411–423. <https://doi.org/10.3851/IMP2088>.
- (97) Dousson, C. B. Current and Future Use of Nucleo(s)Tide Prodrugs in the Treatment of Hepatitis C Virus Infection. *Antivir. Chem. Chemother.* **2018**, *26*, 2040206618756430. <https://doi.org/10.1177/2040206618756430>.
- (98) Lam, A. M.; Espiritu, C.; Bansal, S.; Micolochick Steuer, H. M.; Zennou, V.; Otto, M. J.; Furman, P. A. Hepatitis C Virus Nucleotide Inhibitors PSI-352938 and PSI-353661 Exhibit a Novel Mechanism of Resistance Requiring Multiple Mutations within Replicon RNA. *J. Virol.* **2011**, *85* (23), 12334–12342. <https://doi.org/10.1128/JVI.05639-11>.
- (99) Lautens, M.; Maddess, M. L.; Sauer, E. L. O.; Ouellet, S. G. Enantioselective Allylation of β,γ -Unsaturated Aldehydes Generated via Lewis Acid Induced Rearrangement of 2-Vinylloxiranes. *Org. Lett.* **2002**, *4* (1), 83–86. <https://doi.org/10.1021/ol016946a>.
- (100) Biggadike, K.; Borthwick, A. D.; Evans, D.; Exall, A. M.; Kirk, B. E.; Roberts, S. M.; Stephenson, L.; Youds, P. Use of Diethylaminosulphur Trifluoride (DAST) in the Preparation of Synthons of Carbocyclic Nucleosides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, No. 3, 549–554. <https://doi.org/10.1039/P19880000549>.
- (101) Malik, G.; Guinchard, X.; Crich, D. Asymmetric Synthesis of Polyhydroxylated N-Alkoxypiperidines by Ring-Closing Double Reductive Amination: Facile Preparation of Isofagomine and Analogues. *Org. Lett.* **2012**, *14* (2), 596–599. <https://doi.org/10.1021/ol203213f>.
- (102) Jones, M. F.; Myers, P. L.; Robertson, C. A.; Storer, R.; Williamson, C. Total Synthesis of (–)-Carbovir. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, No. 10, 2479–2484. <https://doi.org/10.1039/P19910002479>.
- (103) Weising, S.; Dekiert, P.; Schols, D.; Neyts, J.; Meier, C. Synthesis of Enantiomerically Pure 1',2'-Cis-Dideoxy, -Dideoxydi-dehydro, -Ribo and -Deoxy Carbocyclic Nucleoside Analogues. *Synthesis* **2018**, *50* (11), 2266–2280. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1609493>.
- (104) Bisacchi, G. S.; Chao, S. T.; Bachard, C.; Daris, J. P.; Innaimo, S.; Jacobs, G. A.; Kocy, O.; Lapointe, P.; Martel, A.; Merchant, Z.; et al. BMS-200475, a Novel Carbocyclic 2'-Deoxyguanosine Analog with Potent and Selective Anti-Hepatitis B Virus Activity in Vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1997**, *7* (2), 127–132. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(96\)00594-X](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(96)00594-X).
- (105) Liu, X.; Guo, X.; Wang, F.; Lei, G.; Luo, D. Unusual β -Elimination of Carbocyclic Ketonucleosides Catalyzed by Silica Gel. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **2007**, *26* (1), 45–49. <https://doi.org/10.1080/15257770601052273>.
- (106) Belostotskii, A. M.; Genizi, E.; Hassner, A. Essential Reactive Intermediates in Nucleoside Chemistry: Cyclonucleoside Cations. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (33), 6624–6628. <https://doi.org/10.1039/C2OB25868D>.
- (107) Yoon, J.; Kim, G.; Jarhad, D. B.; Kim, H.-R.; Shin, Y.-S.; Qu, S.; Sahu, P. K.; Kim, H. O.; Lee, H. W.; Wang, S. B.; et al. Design, Synthesis, and Anti-RNA Virus Activity of 6'-Fluorinated-Aristeromycin Analogues. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (13), 6346–6362. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00781>.
- (108) Lewandowska, E.; Neschadimenko, V.; Wnuk, S. F.; Robins, M. J. Efficient Removal of Sugar O-Tosyl Groups and Heterocycle Halogens from Purine Nucleosides with

- Sodium Naphthalenide. *Tetrahedron* **1997**, *53* (18), 6295–6302. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)00313-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00313-X).
- (109) Castillon, S.; Dessinges, A.; Faghih, R.; Lukacs, G.; Olesker, A.; Ton That Thang. Synthesis of 2'-C-.Beta.-Fluorodaunomycin. An Example of Configurational Retention in Fluorodehydroxylation with Diethylaminosulfur Trifluoride. *J. Org. Chem.* **1985**, *50* (24), 4913–4917. <https://doi.org/10.1021/jo00224a052>.
- (110) Elhalem, E.; Comin, M. J.; Rodriguez, J. B. Synthesis of Conformationally Locked Carbocyclic Nucleosides Built on a Thiabicyclo[3.1.0]Hexane System as a Pseudosugar Surrogate. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2006* (19), 4473–4482. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200600488>.
- (111) Ye, W.; Schneller, S. W. The Enantiomers of the 1',6'-Isomer of Neplanocin A: Synthesis and Antiviral Properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22* (19), 5315–5319. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.07.051>.