



GRZEGORZ FRAMSKI

BADANIA NAD MECHANIZMEM CHEMICZNEJ
GLIKOZYLACJI ADENINY

Praca przedstawiona Radzie Naukowej
Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych

BIBLIOTEKA
INSTYTUTU CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ul. Noskowskiego 12/14
51-701 Wrocław, Polska

D-127

Praca wykonana w Pracowni Chemii Nukleozydów
Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Boryskiego

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań, tel. 52-85-03
Regon 000849327
-9-

Mojemu Promotorowi

Panu Profesorowi dr hab. Jerzemu Boryskiemu

za wskazanie interesującego tematu badań

oraz za okazaną pomoc podczas realizacji pracy doktorskiej,
wrozumiałość i cierpliwość

składam podziękowania



Mojej żonie za cierpliwość

dziękuję.



SPIS TREŚCI

1. METODY I MECHANIZMY WYTWARZANIA WIĄZANIA N-GLIKOZYDOWEGO W CHEMII NUKLEOZYDÓW	1
1.1. Wstęp.....	1
1.2. Przegląd metod stosowanych w glikozylacji zasad heterocyklicznych.....	3
1.2.1. Metoda metalu ciężkiego	3
1.2.2. Metoda Hilberta-Johnsona	14
1.2.3. Metoda sililowa	21
1.2.4. Metoda stapiana (fuzji)	28
1.2.5. Metoda glikozylacji anionowej	33
1.2.6. Metoda wymiany (transpurynacja, transglikozylacja)	35
1.2.7. Metody enzymatyczne	46
1.3. Stereoselektywność w syntezie nukleozydów	49
1.3.1. Glikozylacja w serii rybofuranozy	49
1.3.2. Glikozylacja w serii 2-deoksycukrów	53
1.3.3. Stereochemia glikozylacji anionowej	54
1.4. Tautomeria a regioselektywność glikozylacji	55
2. CEL PRACY	58
3. BADANIA WŁASNE	60
3.1. Wstęp.....	60
3.2. Próby wyodrębnienia kinetycznych produktów glikozylacji adeniny	61
3.2.1. Rybozylacja w warunkach silnie kwasowych.....	61
3.2.2. Rybozylacja metodą stapiania.....	66
3.2.3. Rybozylacja wobec kwasu <i>p</i> -toluenosulfonowego	68
3.2.4. Rybozylacja wobec kwasu Lewisa.....	70
3.2.5. Glikozylacja adeniny eterem (2-acetoksyetylo)acetoksymetylowym.....	72
3.2.6. Podsumowanie	77
3.3. Badanie przebiegu reakcji rybozylacji adeniny metodą sililową.....	78
3.3.1. Wstęp.....	78
3.3.2. Reakcje rybozylacji nieblokowanej adeniny.....	79
3.3.2.1. Reakcja 7-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny w warunkach transglikozylacji	82
3.3.2.2. Mechanizm reakcji glikozylacji nieblokowanej adeniny	83

THE HISTORY OF THE UNITED STATES

1. The first part of the book is devoted to the early history of the United States, from the discovery of the continent by Christopher Columbus in 1492 to the establishment of the first permanent English colonies in the early 17th century. This period is characterized by the struggle for survival in a hostile environment, the development of a distinct American identity, and the gradual expansion of the colonies across the continent.

THE REVOLUTION

2. The second part of the book covers the American Revolution, from the outbreak of hostilities in 1775 to the signing of the Treaty of Paris in 1783. This period is marked by the fight for independence from British rule, the drafting of the Constitution, and the establishment of a new form of government. The Revolution is a pivotal moment in American history, as it led to the birth of a new nation.

THE WESTERN FRONTIER

3. The third part of the book discusses the westward expansion of the United States, from the early 18th century to the late 19th century. This period is characterized by the discovery of gold, the opening of the transcontinental railroads, and the settlement of the West. The Western Frontier is a period of great exploration and discovery, as well as conflict and conquest.

3.3.3. Reakcje rybozylacji N ⁶ -acylowanych pochodnych adeniny	86
3.3.3.1. Otrzymywanie i charakterystyka strukturalna 1-rybofuranozyloadeniny	93
3.3.3.2. Reakcje N ⁶ -izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny w warunkach transglikozylacji	96
3.3.3.3. Badanie procesu dekompozycji N ⁶ -izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetyloribo- furanozylo)adeniny w warunkach transglikozylacji	99
3.3.3.4. Mechanizm reakcji rybozylacji metodą siliową	100
4. WNIOSKI KOŃCOWE	103
5. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	105
5.1. Metody ogólne	105
5.2. Szczegółowe dane eksperymentalne	107
5.2.1. N ⁶ -Acetyloadenina (206)	107
5.2.2. N ⁶ -Benzoiloadenina (109)	107
5.2.3. N ⁶ -Izobutyryloadenina (197)	108
5.2.4. Synteza 9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adeniny (195) oraz 3-(2',3',5'- tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adeniny (196)	109
5.2.5. Reakcja izomeryzacji 3-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adeniny (196) w warunkach transglikozylacji	111
5.2.6. Synteza N ⁶ -izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)-adeniny (198) oraz N ⁶ -izobutyrylo-3-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adeniny (199)	111
5.2.7. N ⁶ -Izobutyrylo-3-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adenina (199) i 3-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adenina (196)	112
5.2.8. Synteza N ⁶ -benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-benzoilo-β-D-rybofuranozylo)adeniny (204) i 9-(2',3',5'-tri-O-benzoilo-β-D-rybofuranozylo)adeniny (205) wobec 2,4-dinitrofenolu	113
5.2.9. Synteza N ⁶ -izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adeniny (198) i 9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adeniny (195) wobec 2,4-dinitrofenolu	114
5.2.10. Synteza N ⁶ -benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adeniny (110) wobec 2,4-dinitrofenolu	114
5.2.11. Próba kondensacji 1,2,3,5-tetra-O-acetylo-β-D-rybofuranozy (91) z adeniną (194) wobec 2,4-dinitrofenolu	115
5.2.12. Próba kondensacji adeniny (194) z 1,2,3,5-tetra-O-acetylo-β-D-rybofuranozą (91) wobec <i>p</i> -TsOH	115
5.2.13. N ⁶ -Benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adenina (110)	115
5.2.14. 9-Rybofuranozyloadenina (1)	116
5.2.15. Synteza N ⁶ -izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adeniny (198) wobec <i>p</i> -TsOH	117
5.2.16. Synteza N ⁶ -acetylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adeniny (207) wobec <i>p</i> -TsOH	117

5.2.17. Synteza N ⁶ -benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (110) wobec HgCl ₂	117
5.2.18. Synteza 9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (195) wobec SnCl ₄ ..	118
5.2.19. Synteza N ⁶ -izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (198) wobec SnCl ₄	118
5.2.20. Synteza 9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeniny (211) i 1,1'-metyleno-bis-N ⁶ ,N ⁶ - {9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeniny} (212)	119
5.2.21. Synteza N ⁶ -benzoilo-9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeniny (220).....	120
5.2.22. Synteza N ⁶ -izobutyrylo-9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeniny (221) oraz N ⁶ -izobutyrylo-9,N ⁶ -bis-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeniny (222)	121
5.2.23. Synteza 9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (195) w warunkach sililujących z zastosowaniem BSA	122
5.2.24. Synteza 9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (195) oraz 7-(2',3',5'- tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (224) w warunkach sililujących z zastosowaniem HMDS	122
5.2.25. 7-Rybofuranozyladenina (4)	123
5.2.26. Izomeryzacja 7-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (224) wobec kwasu <i>p</i> -TsOH	124
5.2.27. Synteza N ⁶ -izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (198), N ⁶ -izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (231) oraz N ⁶ -izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (232) z zastosowaniem czynnika sililującego BSA.....	125
5.2.28. Synteza N ⁶ -izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (198) oraz N ⁶ -izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (232) z zastosowaniem czynnika sililującego HMDS	127
5.2.29. Synteza N ⁶ -benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (110) i N ⁶ -benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (236) z zastosowaniem BSA.....	128
5.2.31. Synteza N ⁶ -acetylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (207) i N ⁶ -acetylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (235) z zastosowaniem czynnika sililującego BSA	129
5.2.32. 1-Rybofuranozyladenina (2)	130
2.5.33. Próba odblokowania N ⁶ -izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)- adeniny (231)	132
5.2.34. Próba odblokowania N ⁶ -benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)- adeniny (236)	132
5.2.35. Reakcje N ⁶ -izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (231) w warunkach transglikozylacji.....	133
5.2.36. Reakcje N ⁶ -benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (236) w warunkach transglikozylacji.....	134
5.2.37. Dekompozycji N ⁶ -izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)- adeniny (232) w warunkach transglikozylacji	135

1. Metody i mechanizmy wytwarzania wiązania N-glikozydowego w chemii nukleozydów

1.1. Wstęp

Nukleozydy to związki chemiczne, które składają się z dwóch zasadniczych fragmentów: części cukrowej i zasady heterocyklicznej. Oba te elementy połączone są ze sobą wiązaniem N-glikozydowym. Związki te są jednostkami budulcowymi kwasów nukleinowych; kwasu rybonukleinowego (RNA), który składa się z rybozy i odpowiedniej zasady: adeniny, guaniny, cytozyny i uracylu; oraz kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) zbudowanego z deoksyrybozy i zasady heterocyklicznej: adeniny, guaniny, cytozyny lub tyminy.

Nukleozydy purynowe i pirymidynowe są przedmiotem badań naukowców już prawie od 100 lat. Pierwszą udaną chemiczną syntezę nukleozydu przeprowadzili w 1914 roku Fischer i Helferich¹. Otrzymali oni pochodną adeniny w reakcji pochodnej srebrowej zasady heterocyklicznej z acetylobromoglukozą.

Dopiero Hilbert i Johnson³ jako pierwsi przeprowadzili udaną syntezę nukleozydów pirymidynowych, w oparciu o wcześniejsze badania Knorra⁴. W latach 50-tych Davoll i Lowy^{5,6} zmodyfikowali metodę metalu ciężkiego stosując zamiast soli srebrowych pochodne rtęciowe. W 1956 Helferich⁷ zaproponował nową, udaną drogę syntezy wychodząc z nieblokowanych pirymidyn w nitrometanie, w obecności $\text{Hg}(\text{CN})_2$. W latach 60-tych Sato i jego współpracownicy⁸⁻¹¹ oraz grupa Robinsa^{12,13} otrzymali nukleozydy metodą stapiania – fuzji. Następnie w 1969 roku Shimizu i Miyaki¹⁴ przeprowadzili nukleozydy pirymidynowe w purynowe za pomocą metody wymiany zwanej też transglikozylacją. Umożliwiło to syntezywanie nowych nukleozydów purynowych i pirymidynowych oraz innych zasad heterocyklicznych. Od tego momentu chemiczna synteza nukleozydów zaczęła się szybko rozwijać.

Nukleozydy oraz ich analogi zaczęły zdobywać dużą popularność jako potencjalne terapieutyki. Także duży wpływ na rozwój chemii nukleozydów miał szybki postęp badań biotechnologicznych, medycznych i inżynierii genetycznej.

Szerokie możliwości syntezy nowych analogów nukleozydowych mają ogromny wpływ na rozwój medycyny, gdzie mogą być wykorzystywane jako nowa klasa chemoterapeutyków. Wiele chemicznie otrzymanych nukleozydów posiada wysoką aktywność przeciwwirusową, przeciwnowotworową i przeciwgrzybiczną. Do grupy takich związków można zaliczyć między innymi: acyklowir, gancyklowir, abakawir (ABC), 3'-azydotymidynę (AZT).

1. Theory and Methodology
2. Literature Review

3. Results

3.1. Descriptive Statistics
3.2. Regression Analysis
3.3. Robustness Checks

4. Discussion
4.1. Implications
4.2. Limitations
4.3. Future Research

5. Conclusion
References
Appendix

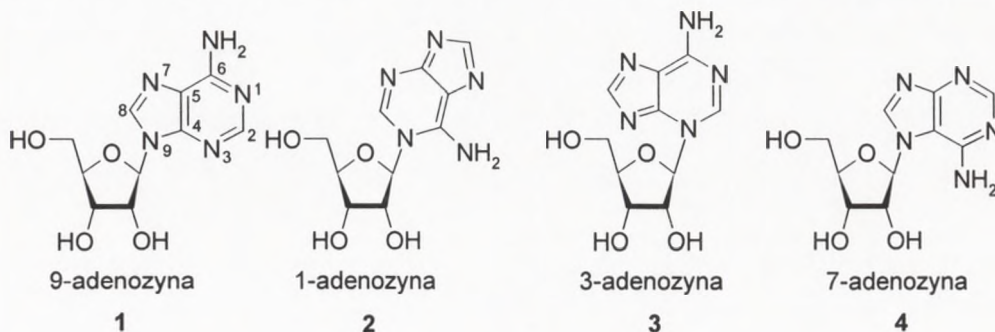
Nukleozydy i ich analogi wykorzystuje się także w badaniach przebiegu reakcji oraz poznawania ich mechanizmów, które mają kluczowy aspekt w wykorzystaniu ich do celów leczniczych. Za ich pomocą można wprowadzać zmiany konformacji kwasów nukleinowych. Związki te można wykorzystać jako nieradioizotopowe znaczniki oligonukleotydów i kwasów nukleinowych.

Istnieją dwa zasadnicze podejścia w syntezie analogów nukleozydów. Pierwszym z nich jest modyfikacja naturalnie występujących związków np.: alkiłowanie adenozyne jodkiem metylu, w wyniku czego otrzymujemy 1-metyloadenozyne. Natomiast innym podejściem w celu otrzymania nowych związków jest wytwarzanie wiązania N-glikozydowego, czego przykładem może być reakcja 1-metyloadeniny z rybozą i otrzymanie 1-metyloadenozyne. W obu przypadkach otrzymujemy ten sam finalny związek, natomiast wybór drogi reakcji zależy przede wszystkim od struktury zaplanowanego związku. W przypadku otrzymywania pochodnych pirymidynowych lub purynowych najlepiej jest modyfikować naturalne nukleozydy. Jednak w przypadku, gdy związek docelowy ma posiadać inny typ zasady heterocyklicznej lub inny typ cukru, jedyną słuszną drogą jest glikozylacja. Także bardzo ważną rolę odgrywa cena stosowanych do syntezy substratów, ich dostępność oraz sumaryczna wydajność całej syntezy.

Ze względu na duży pośpiech badaczy w celu otrzymania nowych nukleozydów o zaplanowanej strukturze, zaniebane zostały systematyczne badania nad mechanizmem ich syntezy. Poznanie takiego mechanizmu jest w większości przypadków kluczową sprawą w opracowaniu nowej drogi syntezy, która poza dobrymi wydajnościami powinna być również wysoce stereo- i regioselektywna.

W niniejszej pracy postanowiono skupić uwagę na mechanizmie rybozylacji adeniny. Przegląd literaturowy zaprezentowany w niej będzie w szczególności uwzględniał syntezę nukleozydów purynowych, ponieważ obiektem moich badań była synteza adenozyne.

Dzięki zastosowaniu różnych warunków reakcji otrzymano cztery N-podstawione izomery adenozyne (schemat 1), które zostaną omówione w następnych częściach pracy.

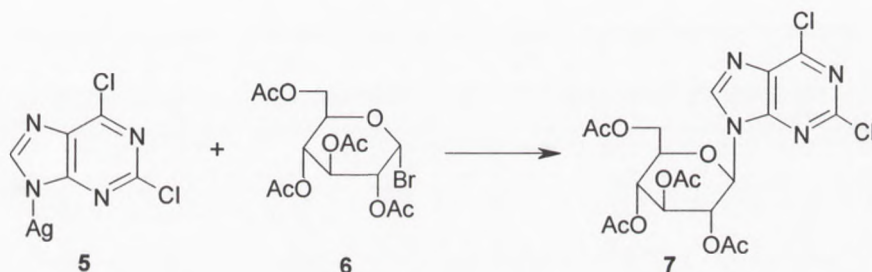


Schemat 1

1.2. Przegląd metod stosowanych w glikozylacji zasad heterocyklicznych

1.2.1. Metoda metalu ciężkiego

Jest to jedna z najstarszych metod wytwarzania wiązania N-glikozydowego. E. Fisher i B. Helferich¹ w 1914 zaproponowali pierwszą chemiczną syntezę nukleozydów. Metoda ta opierała się na reakcji srebrowej (5) lub rtęciowej pochodnej zasady heterocyklicznej z tetraacetylo-1-bromoglucozą (6), w obecności katalizatorów: Ag_2CO_3 , HgCl_2 , HgBr_2 lub $\text{Hg}(\text{CN})_2$ (schemat 2). Stosowana była przede wszystkim do otrzymywania nukleozydów purynowych, w przypadku których dawała dobre rezultaty. Okazała się natomiast mało efektywna podczas syntezy pochodnych pirymidynowych¹.

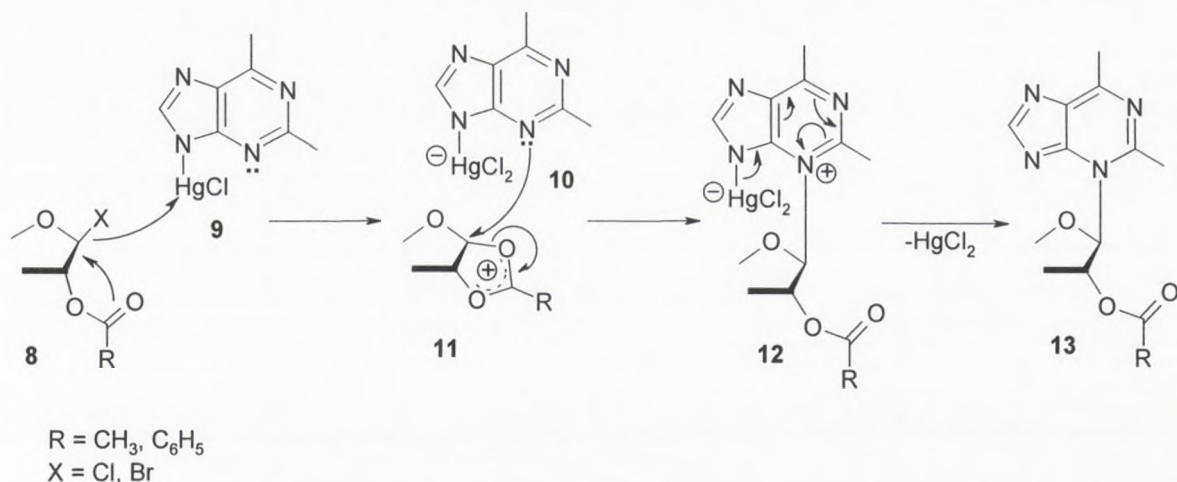


Schemat 2

Metoda ta opiera się na wytworzeniu wiązania kowalencyjnego spolaryzowanego (N-HgX lub N-Ag, gdzie $\text{X}=\text{Cl}$, Br, CN) i otrzymaniu tzw. „soli halogenortęciowych” lub „soli srebrowych”. Zaobserwowano, że podczas reakcji metodą metalu ciężkiego powstają 3- i 9-podstawione pochodne rybonukleozydów.

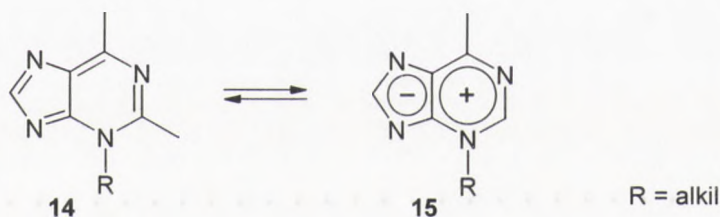
Montgomery i Thomas¹⁵ zaproponowali, że podczas syntezy nukleozydów purynowych metodą rtęciową, halogenocukier atakuje bezpośrednio atom azotu podstawiony rtęcią. Jednak wkrótce pogląd ten został zweryfikowany przez Shimizu i Miyaki^{14,16}, którzy stwierdzili, na podstawie licznych badań, że w obrębie atomu N3 występuje największa gęstość elektronowa. Powoduje to, że atom ten staje się silnym centrum nukleofilowym, a to z kolei prowadzi do utworzenia kinetycznego produktu 3-podstawionego.

Fox, Hollenberg i Watanabe¹⁷ na podstawie eksperymentalnych prac Shimizu i Miyaki zaproponowali następujący mechanizm reakcji (schemat 3).



Schemat 3

W przedstawionym mechanizmie w wyniku dysocjacji halogenu od halogenozy (8) powstaje kation acyloksoniowy cukru (11), na który następuje nukleofilowy atak azotu N3 zasady purynowej z wytworzeniem nietrwałej soli czwartorzędowej (12). W wyniku jej rozpadu otrzymujemy 3-podstawioną pochodną adeniny (13), która ma znacznie zmieniony układ elektronowy w stosunku do adeniny. Posiada nadmiar elektronów w pierścieniu imidazolowym i ich niedobór w pirymidynowym.



Schemat 4

Ten niekorzystny układ elektronowy 3-podstawionej puryny jest według Shimizu i Miyaki siłą napędową nieodwracalnego przegrupowania N3 → N9, w wyniku którego powstaje bardziej trwały 9-izomer.

Jeżeli w pozycjach 2 i/lub 6 znajdują się podstawniki elektrodonorowe to następuje stabilizacja układu (15), natomiast podstawniki elektroakceptorowe przyspieszają proces migracji z atomu N3 w kierunku bogatego w elektrony pierścienia imidazolowego. Miyaki i Shimizu^{14,16} na podstawie eksperymentalnych prac zaproponowali kolejność podstawników jakie przyspieszają transglikozylację 3→9 dla puryn, która wygląda następująco: N²HCOCH₃ i C₆=O > N⁶HCOC₆H₅ > N⁶H₂ ≥ N⁶(CH₃)₂. Tak więc tri-O-benzoiloizoadenozyna i jej N⁶,N⁶-dimetylowa pochodna ulegają dużo wolniej transglikozylacji niż N⁶-benzoilo-tri-O-benzoiloadenozyna. Okazało się też, że gdy w pozycji C8 pierścienia imidazolowego znajduje



Wykres 1

Wzrost i rozwój zwierząt w różnych warunkach hodowli jest procesem złożonym, który zależy od wielu czynników. W tym celu należy przeanalizować wpływ różnych warunków hodowli na rozwój zwierząt. W tym celu należy przeanalizować wpływ różnych warunków hodowli na rozwój zwierząt.



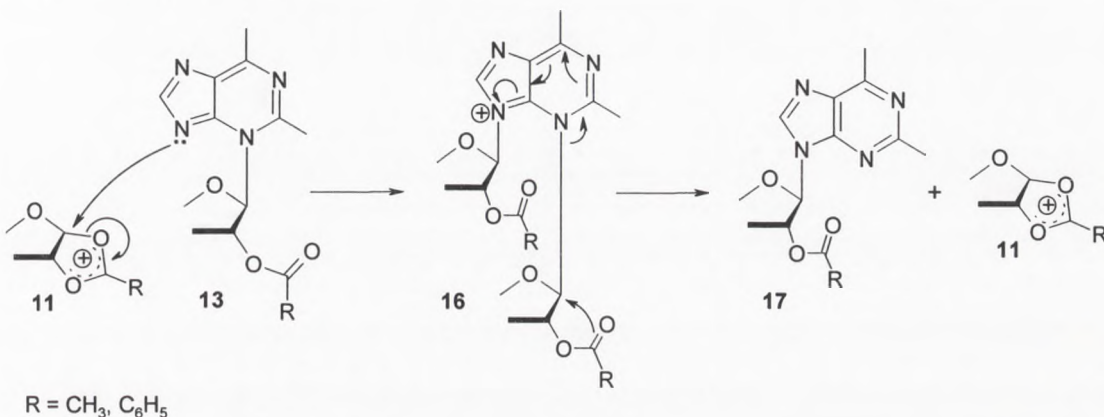
Wykres 2

Wzrost i rozwój zwierząt w różnych warunkach hodowli jest procesem złożonym, który zależy od wielu czynników. W tym celu należy przeanalizować wpływ różnych warunków hodowli na rozwój zwierząt. W tym celu należy przeanalizować wpływ różnych warunków hodowli na rozwój zwierząt.

Wzrost i rozwój zwierząt w różnych warunkach hodowli jest procesem złożonym, który zależy od wielu czynników. W tym celu należy przeanalizować wpływ różnych warunków hodowli na rozwój zwierząt. W tym celu należy przeanalizować wpływ różnych warunków hodowli na rozwój zwierząt.

się objętościowy podstawnik, powoduje to zwiększenie wydajności powstawania 3-izomeru. Także obecność grup elektroakceptorowych (Br, Cl, I) w tej pozycji powoduje, poprzez zmniejszenie gęstości elektronowej w pierścieniu imidazolowym, powstanie większych ilości 3-pochodnej w stosunku do 9-izomeru. Jest to wynikiem wolniejszego procesu transglikozylacji¹⁶.

Niekorzystny układ elektronowy 3-podstawionej puryny prowadzi do nieodwracalnego przegrupowania N3→N9, którego mechanizm zaproponowany został przez Foxa, Hollenberga i Watanabe¹⁷ (schemat 5).

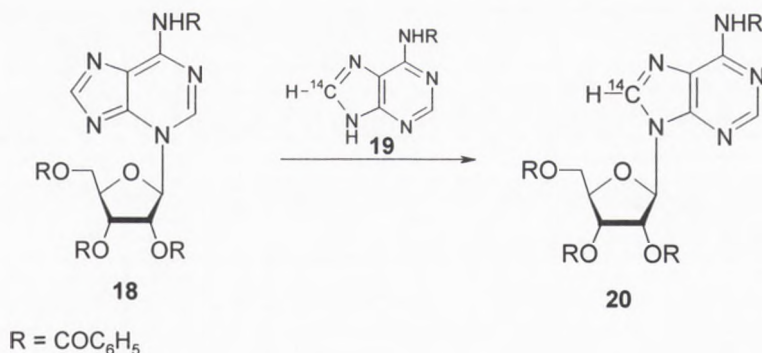


Schemat 5

W postulowanym przez nich mechanizmie kluczową rolę odgrywa kation acyloksoniowy (**11**), na którego atom C1 następuje atak nukleofilowego centrum N9 3-podstawionej pochodnej (**13**), co w efekcie prowadzi do powstania nietrwałej czwartorzędowej soli (**16**) 3,9-diglikozylpuryny. Ten nietrwały produkt przejściowy ulega rozpadowi do trwalszego termodynamicznie 9-podstawionego nukleozydu (**17**) z odtworzeniem kationu cukrowego (**11**). W rezultacie ostatecznym miejscem rybozylacji jest ta sama pozycja, do której uprzednio przyłączony był atom metalu ciężkiego.

Międzycząsteczkowy charakter transglikozylacji N3→N9 został potwierdzony przez Shimizu i Miyaki¹⁴, którzy przeprowadzili reakcję tri-O-benzoilo-N⁶-benzoiloizoadenozyny (**18**) w mieszaninie N,N-dimetyloformamidu (DMF) i ksyłenu w obecności HgBr₂ i dodatku N⁶-benzoiloadeniny-8-¹⁴C (**19**) otrzymując w rezultacie 51% znakowanej izotopowo tetrabenzoiloadenozyny (**20**) (schemat 6).





Schemat 6

W prowadzonych przez siebie badaniach zaobserwowali, że wykorzystując różne komponenty cukrowe w tych samych warunkach prowadzenia glikozylacji uzyskuje się różny stosunek izomeru 3 i 9. Miyaki i Shimizu zaproponowali, że szybkość przejścia podstawników z pozycji N3 w N9 rośnie w następującym szeregu: alkil, cukier sześciocząłowy, cukier pięciocząłowy^{16,18}. Tak więc w przypadku rybozylacji chlorortęciowej pochodnej N⁶-dimetyloadeniny we wrzącym ksylenie otrzymywali praktycznie wyłącznie 9-rybozyd (bardzo szybka transrybozylacja 3→9), podczas gdy w wyniku glikozylacji tego samego związku otrzymywany jest tylko 3-glukozyd (nie zauważono praktycznie przejścia 3→9).

Fox, Hollenberg i Watanabe¹⁷ uogólnili mechanizm transglikozylacji 3→9, który został dobrze udokumentowany dla pochodnych adeniny, na inne nukleozydy purynowe. Sądzone, że proces ten będzie miał również miejsce w przypadku guaniny.

Prace Shimizu i Miyaki¹⁸ rzuciły nowe światło na proces tego przegrupowania. Przeprowadzając reakcję glikozylacji pochodnej chlorortęciowej N²-acetyloguaniny z 1-bromo-2,3,5-tri-O-benzoilo-D-rybofuranozą w DMA w temperaturze 60°C przez 40 godzin otrzymali oni zamiast spodziewanego 3-izomeru tylko 7- i 9-regioizomery guanozyny. Udało im się jednak uzyskać śladowe ilości (0.2%) 3-benzylowej pochodnej obok 7- i 9-izomerów (wydajności odpowiednio 22% i 16%) podczas reakcji alkilowania N²-acetyloguaniny bromkiem benzyłu, w takich samych warunkach jak w poprzednim eksperymencie. Także reakcja 3-benzylo-N²-benzoiloguaniny w temperaturze 100°C prowadzona przez 24 godziny dawała tylko 7- i 9-izomery.

Na podstawie powyższych eksperymentów Shimizu i Miyaki wysnuli przypuszczenie, że w przypadku pochodnych guaniny ma miejsce transglikozylacja 3→9, według już przyjętego wcześniej schematu. Jednak proces ten będzie o wiele szybciej niż w przypadku serii adeniny. Reakcja ta jest na tyle szybka, że 3-podstawiony nukleozyd występuje w ilościach śladowych. Natomiast obserwowanie powstającego 7-izomeru jest wynikiem odwracalnej transglikozylacji 7⇌9 w obecności katalizatora HgBr₂ i prowadzi do otrzymania 7- i 9-nukleozydów w stosunku

1:2. Wykazali oni także, że 9-izomer jest trwalszy termodynamicznie, a cały proces izomeryzacji dla 6-oksopuryn przebiega według schematu $3 \rightarrow 7 \rightleftharpoons 9$.

Jednak dalsze badania procesu glikozylacji nukleozydów 6-oksopurynowych¹⁹⁻²³ nie potwierdziły zaproponowanego przez Shimizu i Miyaki mechanizmu.

W przypadku pochodnych pirymidynowych przebieg reakcji glikozylacji metodą metalu ciężkiego wygląda nieco inaczej niż w serii purynowej.

Podczas reakcji kondensacji srebrowej lub chlorortęciowej pochodnej pirymidynowej z blokowanym halogenocukrem jako pierwszy powstaje O-glikozyd. Związek ten ulega następnie dalszemu przegrupowaniu do trwalszego termodynamicznie N-nukleozydu^{17,24}. Początkowo rezultat ten tłumaczono występowaniem tautomerii w układzie laktam-laktim w przypadku nieblokowanej pochodnej pirymidynowej. Fox⁶ przeprowadzając reakcję dityminortęciowej pochodnej z acetylobromoglukożą we wrzącym toluenie otrzymał z dobrą wydajnością (60%) blokowany N-nukleozyd. Stwierdzono zatem, że to nie tautomeria jest przyczyną tworzenia się O-glikozydów, ale wpływają na to warunki, w których prowadzona jest reakcja. Duże znaczenie w syntezie nukleozydów pirymidynowych ma forma kompleksu metalu z pirymidyną. Dla pochodnych rtęciowych reakcja może zachodzić inaczej niż w przypadku pochodnych srebrowych.

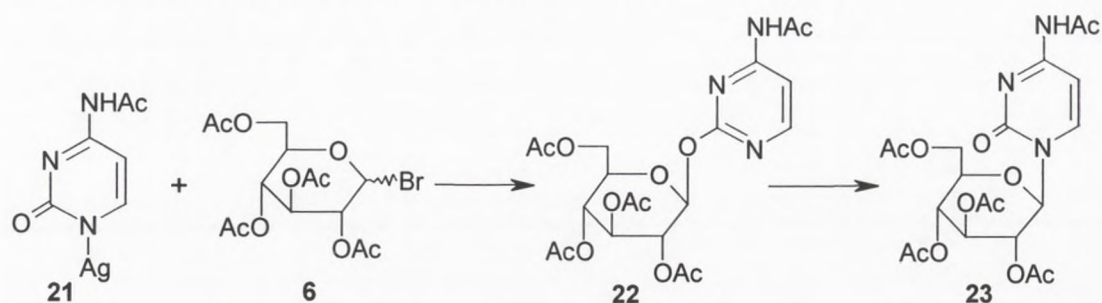
W przypadku reakcji kondensacji dityminortęciowej pochodnej z blokową halogenozą otrzymywano z dobrą wydajnością 1-nukleozyd. Stosując w tych samych warunkach jako komponent cukrowy 2-deoksyrybozę, powstaje mieszanina α - i β -O-deoksyrybozydów²⁵. Deoksyrybozylacja tyminy²⁶ wymaga użycia monortęciowych pochodnych. Natomiast w przypadku cytozyny²⁷ poza wymienionym poprzednio warunkiem, konieczne jest zablokowanie grupy egzoaminowej. Jeżeli oba te warunki nie zostaną spełnione, w wyniku reakcji otrzymuje się O-glikozyd nieblokowanej cytozyny, który poddawany transglikozylacji we wrzącym ksylenie wobec HgBr_2 ulega dekompozycji, bez uzyskania N-nukleozydu.

Powstawanie O-glikozydu zaobserwowano także w reakcji chlorortęciowej soli 4-etoksy-2(1H)-pirymidynonu z acetylobromoglukożą. Powstający O-podstawiony związek był głównym produktem reakcji, który następnie przeprowadzano w 1-glukozyd w wyniku ogrzewania w ksylenie w obecności HgBr_2 .

Tak więc synteza nukleozydów pirymidynowych z pochodnych rtęciowych powoduje powstawanie praktycznie zawsze O-glikozydów, które następnie można przeprowadzić w N-podstawione pochodne pod wpływem działania katalizatora. Niestety często się zdarzało, że powstające w reakcji O-glikozydy były pomijane przez badaczy, którzy zwracali uwagę przede wszystkim na N-podstawione pochodne.



Ulbricht²⁸ badając reakcję kondensacji soli srebrowej N-acetylocytozyny (**21**) z tetra-acetylobromoglukozą (**6**) uzyskał jako główny produkt O-glikozyd (**22**) i niewielką ilość N-podstawionego związku. Następnie wyizolowany O-glikozyd przeprowadził w N-nukleozyd (**23**) w toluenie wobec HgBr₂ lub SnCl₄ jako katalizatora.



Schemat 7

Jednak w wyniku reakcji acetylobromoglukopiranozy z srebrową pochodną uracylu lub tyminy we wrzącym ksylenie, otrzymano obok 1- i 3-nukleozydów także dipodstawione związki: 1,3, O²,O⁴ oraz 1,O⁴. Zarówno związek O²,O⁴ jak i 1,O⁴ udało się w łatwy sposób przeprowadzić w 1-nukleozyd w warunkach transglikozylacji. Stwierdzono więc, że te dipodstawione pochodne są związkami pośrednimi²⁹ na drodze do otrzymania bardziej trwałych termodynamicznie N-glikozydów. Obserwowanie powstawania O- i N-nukleozydów w reakcji ze srebrowymi pochodnymi można wytłumaczyć istnieniem jonu ambidentnego w układzie O²-C2-N1. Powoduje to, że kation cukrowy może przyłączyć się do jednego z dwóch centrów nukleofilowych¹⁷. Zaobserwowano również, że w przypadku transglikozylacji O-glikozydów, które otrzymano w reakcji z pochodnymi srebrowymi trzeba było użyć silniejszych katalizatorów. Nie potrzebowały tego związki otrzymywane w reakcjach pirymidynowych soli rtęciowych. Schmidt i Farkaš³⁰ zaproponowali następujący szereg aktywności katalizatorów (typu kwasu Lewisa) wykorzystywanych do tego typu reakcji: SnCl₄ >> HgBr₂ ≈ HgCl₂ >> HgI₂ > AgClO₄. Jak widać katalizator srebrowy znajduje się na samym końcu tego szeregu. Pozwoliło to na potwierdzenie rezultatów eksperymentów przeprowadzonych przez Ulbrichta²⁸, któremu nie udało się otrzymać z O-glikozydów N-podstawionych pochodnych pirymidynowych w obecności AgBr. Nastąpiło to dopiero, gdy do środowiska reakcyjnego poza katalizatorem AgBr wprowadzono wolną halogenozę²⁹. Obserwacje migracji podstawnika cukrowego przeprowadzone przez Ulbrichta^{2,31} dla pirymidyn, zostały potwierdzone także przez Ukietę²⁴. Otrzymał on O-glikozydy z 2-etoksy-4-etoksypirymidyn przeprowadzając reakcję w różnych warunkach, po czym przeprowadził je w N-podstawione pochodne we wrzącym ksylenie wobec HgBr₂. Uzyskane przez niego N-nukleozydy były termodynamicznie trwałe i nie ulegały już dalszym procesom transglikozylacji.

Let Ω be a domain in \mathbb{R}^n . We consider the boundary value problem for the Laplace equation in Ω :

$$\Delta u = 0 \text{ in } \Omega, \quad u = f \text{ on } \partial\Omega$$

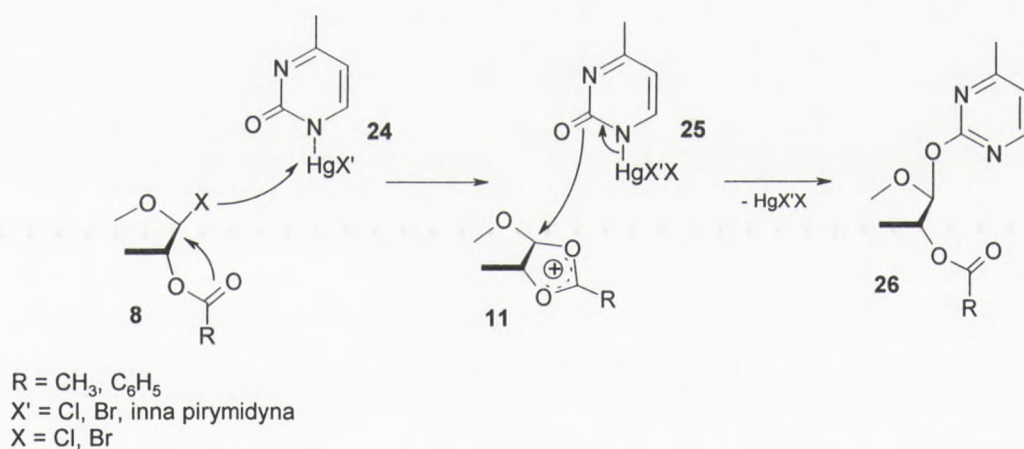
where f is a given function on the boundary $\partial\Omega$. The Dirichlet problem is solvable if f is continuous and Ω is a regular domain.

The maximum principle states that the maximum of u is attained on the boundary $\partial\Omega$. This principle is fundamental in the study of elliptic equations.

For a more detailed treatment of the theory of elliptic partial differential equations, see the book by Gilkey.

W 1962 roku Ulbricht^{28,31} zaproponował mechanizm reakcji O-glikozylacji i migracji podstawnika cukrowego O→N w obecności katalizatora. Dalsze badania nad tym zagadnieniem prowadzili także Schmidt i Farkaš³². Przeprowadzili oni reakcję 2,4-di-O-(2,3,4,6-tetraacetylo-β-D-glukopiranozylo)tyminy wobec HgBr₂ w acetonitrylu i obserwowali, że związek ten w tych warunkach jest stabilny, nie ulegając przegrupowaniu nawet po prowadzeniu reakcji przez kilka dni. Dopiero po dodaniu niewielkich ilości HCl w tetrahydrofuranie udało się im przeprowadzić transglikozylację z wytworzeniem N-nukleozydu. Stwierdzili więc, że poprzez atak katalizatora następuje rozerwanie wiązania O-glikozydowego z powstaniem acyloksoniowego kationu cukrowego. Produkt ten ulega następnie atakowi pary elektronowej z atomu N1 z wytworzeniem wiązania N-glikozydowego. Taki 1,O⁴-dipodstawiony związek ulega następnie atakowi kolejnej cząsteczki katalizatora z oderwaniem kationu cukrowego, który może reagować ze związkiem O²,O⁴-dipodstawionym.

Mechanizm glikozylacji pirymidyn metodą metalu ciężkiego dla pochodnych rtęciowych został przedstawiony przez Foxa, Hollenberga i Watanabe¹⁷ (schemat 8). Zaproponowali go w oparciu o zaobserwowany fakt powstawania kinetycznych produktów reakcji o strukturze O-glikozydów i O,N-bispodstawionych pochodnych.



Schemat 8

Pierwszym etapem prezentowanego mechanizmu jest oddysocjowanie halogenu od halogenozy (8) z wytworzeniem acyloksoniowego kationu cukrowego (11). Kolejnym etapem jest powstanie wiązania O-glikozydowego poprzez atak pary elektronowej atomu tlenu z cząsteczki pirymidyny na kation cukrowy (11). Jednocześnie powstaje sól rtęciowa typu HgX'X oraz następuje odtworzenie grupy acylowej w pozycji C2' w części cukrowej.

Podobny mechanizm otrzymywania O-glikozydów metodą „nitrometanową”³⁷ został zaproponowany także przez Foxa, Hollenberga i Watanabe (schemat 9).

1970s

1975

1980

1985

1990

1995

2000

2005

2010

2015

2020

2025

2030

2035

2040

2045

2050

2055

2060

2065

2070

2075

2080

2085

2090

2095

2100

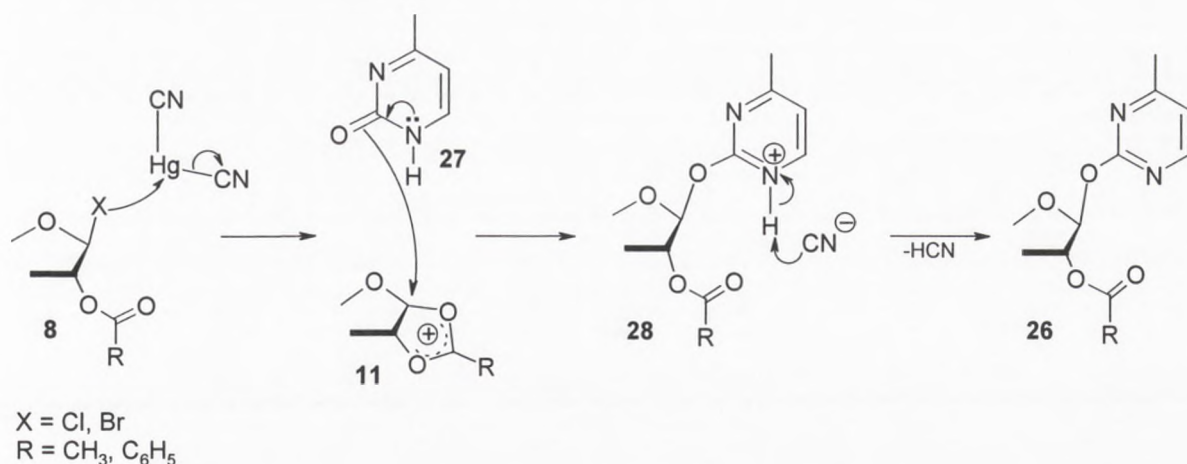
2105

2110

2115

2120

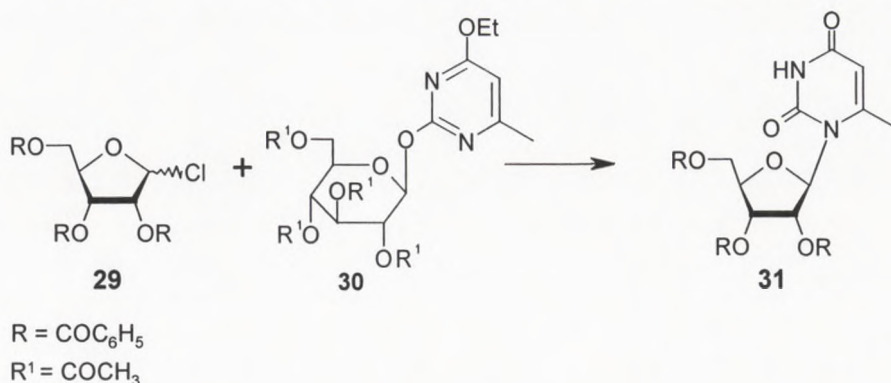
2125



Schemat 9

Reakcja ta została przeprowadzona w nitrometanie w obecności katalizatora $\text{Hg}(\text{CN})_2$. Pierwszym etapem proponowanego mechanizmu jest powstanie kationu cukrowego (11), przez oderwanie halogenu od halogenozy (8) przez atom rtęci katalizatora. Utworzony acyloksoniowy kation jest atakowany przez parę elektronową atomu tlenu O2 z powstaniem czwartorzędowej soli pirymidyny (28), a następnie przez atak anionu cyjankowego oderwany zostaje proton (H1) z wytworzeniem HCN i powstaniem O^2 -glikozydu.

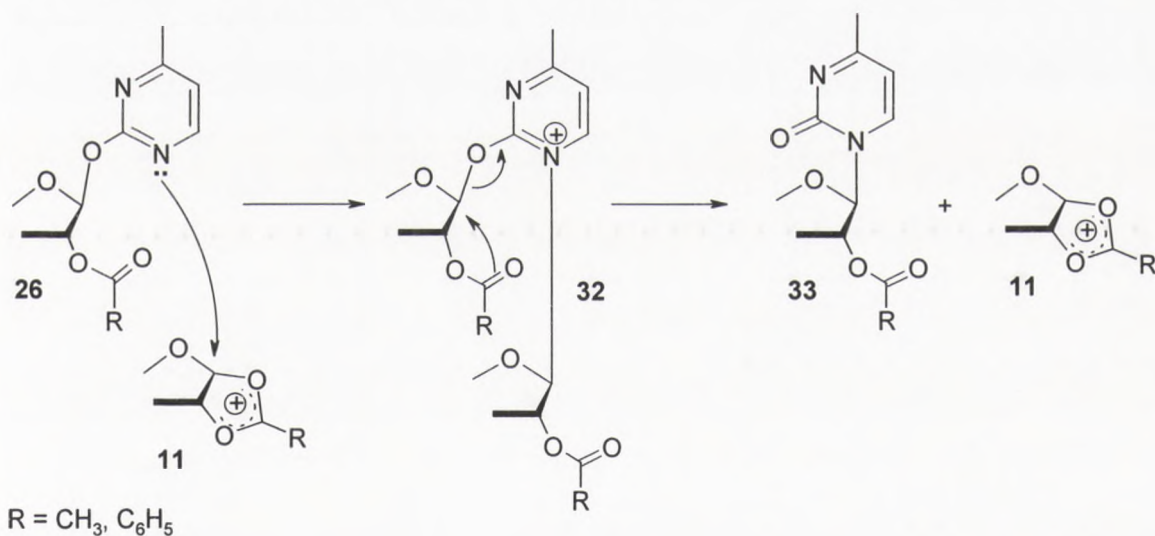
O-Nukleozyd jak już wcześniej wspomniano, ulega przegrupowaniu do bardziej trwałej, termodynamicznej formy. Reakcję transglikozylacji $\text{O} \rightarrow \text{N}$ jako pierwszy zaobserwował Ulbricht³¹, jego badania zostały następnie potwierdzone przez Ukite²⁴, który donosił o nieodwracalnej migracji podstawnika cukrowego z wytworzeniem 1-nukleozydu. Badania procesu wymiany glikozyłu przeprowadzone przez Pryštasa i Šorma³⁴ ostatecznie wykazały intermolekularny charakter tego procesu (schemat 10). W wyniku reakcji kondensacji 2-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetylo- β -D-glukopiranozylo)-4-etoksy-6-metylpirymidyny (30) z 1-chloro-2,3,5-tri-O-benzoilo-D-rybofuranazy (29) w acetonitrylu wobec HgBr_2 otrzymali 2',3',5'-tri-O-benzoilo-6-metylourydyne (31) oraz blokowany 1,3-dirybozylo-6-metylouracyl.



Schemat 10

Natomiast Schmidt i Farkaš³² badając trwałość 2,4-di-O-(2,3,4,6-tetra-O-acetylo-β-D-glukopiranozylo)tyminy w acetonitrylu w obecności HgBr₂ zaobserwowali, że związek ten jest bardzo trwały w tych warunkach, mimo prowadzenia reakcji przez kilka dni. Migracja podstawnika cukrowego nastąpiła dopiero po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej niewielkich ilości HCl w tetrahydrofuranie. Zaproponowali więc, że rolą katalizatora w tym procesie jest rozerwanie wiązania O-glikozydowego i utworzenie kationu cukrowego, który następnie przyłącza się w pozycję N1 zasady pirymidynowej z wytworzeniem wiązania N-glikozydowego. Powstaje więc związek pośredni o strukturze N,O-dipodstawionej. Następnie odrywany jest O-podstawnik cukrowy przez katalizator z wytworzeniem acyloksoniowego kationu cukrowego, który może uczestniczyć w dalszym procesie transglikozylacji.

Mechanizm transglikozylacji opiera się na powstawaniu czwartorzędowej soli pirymidyniowej (**32**), która została zaproponowana przez Rabinowitza i Gurna³⁵. Strukturę takiego związku pośredniego potwierdzili Ueda i Nishino³⁶, którym jako pierwszym udało się wyizolować i scharakteryzować tę 1,O²-diglikozydową nietrwałą formę. Związek ten powstaje w wyniku nukleofilowego ataku azotu N1 O²-glikozydu (**26**) na kation cukrowy (**11**), a przez jego rozpad otrzymujemy trwałe termodynamicznie N1-nukleozyd (**33**), oraz odtworzony zostaje kation cukrowy (**11**) (schemat 11).



Schemat 11

Po przeprowadzeniu wielu eksperymentów okazało się, że na proces transglikozylacji O→N ma także duży wpływ zastosowany rozpuszczalnik, który powoduje powstawanie różnych stosunków O-glikozydów do N-podstawionych pochodnych. Pryštas i Šorm^{38,39} badając przebieg reakcji kondensacji ręciovych pochodnych 4-benzyl-6(1H)-pirymidynonów oraz ich 2-metylo analogów z różnymi halogenocukrami zauważyli, że polarność zastosowanego w reakcji

The first part of the paper discusses the importance of positioning in the market. It highlights how a firm's position relative to its competitors can significantly impact its performance and profitability. The second part of the paper focuses on the role of the firm in the market, exploring how a firm can create value for its stakeholders and contribute to the overall economy. The third part of the paper discusses the challenges of positioning and the role of the firm in the market, and provides some practical advice for firms looking to improve their market position.

The first part of the paper discusses the importance of positioning in the market. It highlights how a firm's position relative to its competitors can significantly impact its performance and profitability. The second part of the paper focuses on the role of the firm in the market, exploring how a firm can create value for its stakeholders and contribute to the overall economy. The third part of the paper discusses the challenges of positioning and the role of the firm in the market, and provides some practical advice for firms looking to improve their market position.



The diagram illustrates the relationship between the firm and its stakeholders. It shows a central point representing the firm, with lines radiating outwards to different points representing various stakeholders. This suggests that the firm is interconnected with its stakeholders and that its actions can have a significant impact on them.

The diagram illustrates the relationship between the firm and its stakeholders. It shows a central point representing the firm, with lines radiating outwards to different points representing various stakeholders. This suggests that the firm is interconnected with its stakeholders and that its actions can have a significant impact on them.

rozpuszczalnika ma wpływ na końcowy produkt reakcji. Z ich badań wynika, że w mało polarnym rozpuszczalniku podstawnik cukrowy przyłącza się do bardziej elektroujemnego centrum zasady pirymidynowej jakim jest egzocykliczny atom tlenu. Wynikiem tego jest powstanie większych ilości związków O-podstawionych. Natomiast w przypadku bardziej polarnego rozpuszczalnika, elektroujemne centrum O2 może ulec solwatowaniu, co prowadzi do tego, że reakcja biegnie poprzez nukleofilowy atom azotu (N1). Pryštas i Šorm zauważyli, że stosując rozpuszczalniki o różnej polarności, można uzyskać różne proporcje O- i N-glikozydów. Jednak taka sugestia wydaje się mało prawdopodobna, ponieważ jak wiadomo O-glikozydy pirymidynowe są kinetycznymi produktami reakcji, a N-podstawione pochodne produktami termodynamicznymi.

Dalsze badania przeprowadzone przez Pryštasa i Šorma, pokazały, że polarność zastosowanego rozpuszczalnika wpływa na szybkość procesu migracji podstawnika cukrowego O→N. Wynika stąd, że transglikozylacja z atomu tlenu na atom azotu przebiega o wiele szybciej w polarnym rozpuszczalniku (np.: acetonitryl) niż niepolarnym (np.: toluen, ksylen). Mały wpływ na powstawianie O- lub N-podstawionych nukleozydów ma więc solwatowanie substratu przez rozpuszczalnik.

Dopiero Vorbrüggen i Höfle⁴⁰ wytłumaczyli zależność między szybkością transglikozylacji O→N a rozpuszczalnikiem. Według nich decydującą rolę w tym procesie odgrywa trwałość σ -kompleksu między katalizatorem a centrum N1 pirymidyny. W przypadku rozpuszczalników niepolarnych, takich jak toluen, kompleks ten jest dość stabilny a jego siła zwiększa się w miarę wzrostu zasadowości pirymidyny, która rośnie wraz z obecnością podstawników elektronodonorowych w pozycji 5 i/lub 6. Natomiast w miarę zwiększania polarności rozpuszczalnika trwałość kompleksu zostaje obniżona.

Przebieg reakcji transglikozylacji O→N zależy więc od zastosowanego katalizatora, rozpuszczalnika, temperatury oraz od użytego komponentu cukrowego. Ulbricht^{28,33} zaobserwował, że w przypadku transglikozylacji acetylowanego O-rybozydu cytozyny wobec HgBr₂ w toluenie, reakcja biegnie szybciej do 1-nukleozydu niż stosując O-glukozyd w tych samych warunkach. Obserwacje takie można wytłumaczyć większą trwałością powstającego w wyniku reakcji kationu rybofuranozylowego w porównaniu z kationem glukopiranozylowym⁴¹. Reakcja kondensacji 1-bromo-3,4,6-O-acetylo-2-deoksy-2-[(2,4-dinitro)fenylo]amino- α -D-glukopiranozy z pochodną rtęciową cytozyny daje obok O-glukozydu z wydajnością 5-10% N-nukleozyd. Główny produkt reakcji nie ulega reakcji transglikozylacji we wrzącym ksylenie wobec HgBr₂. W przypadku analogicznej O-podstawionej pochodnej tyminy, reakcja transglikozylacji zachodzi z 7,5% wydajnością we wrzącym toluenie

The following table shows the results of the experiment. The values are given in nm. The error in the measurement is about 1 nm.

Wavelength of the incident light (λ)	Wavelength of the diffracted light (λ')
400	400
450	450
500	500
550	550
600	600
650	650
700	700
750	750
800	800
850	850
900	900

i w obecności tego samego katalizatora. Takie zachowanie pochodnych rybo- oraz deoksyrybo-O-nukleozydów można wytłumaczyć tym, że w przypadku związków 2'-deoksy nie może powstać dość trwały kation cukrowy.

Metoda metalu ciężkiego jest obecnie rzadko stosowana, a otrzymywane w jej wyniku wydajności są raczej umiarkowane. Najczęściej spotykanym wariantem tej metody jest metoda nitrometanowa. Jak już wspomniano reakcja ta prowadzona jest w nitrometanie w obecności katalizatora HgBr_2 . Innymi często stosowanymi nazwami metody metalu ciężkiego są: Koenigsa-Knorra, Fishera-Helfericha, metoda srebrowa, chloro-, bromo- lub cyjanortęciowa oraz nitrometanowa.

Zasadniczym etapem w tej metodzie jest wytworzenie acyloksoniowego kationu cukrowego poprzez oddziaływanie „soli halogenortęciowej” z halogenozą.

Reakcja ta ma w większości przypadków mechanizm dwuetapowy i przebiega przez kinetyczne produkty: O-podstawione w przypadku pirymidyny lub 3-glikozylowe pochodne dla puryny. Końcowym produktem są natomiast trwale termodynamicznie N-nukleozydy odpowiednio: N1-podstawione pirymidyny i N9-podstawione pochodne purynowe. Stwierdzono także, że reakcja glikozylacji metodą metalu ciężkiego ma charakter międzycząsteczkowy. W obu przypadkach reakcja biegnie przez nietrwałe związki pośrednie: 1,O²-dipodstawione pirymidyny i 3,9-diglikozylpuryny.

Warto też zauważyć, że w produkcie termodynamicznym reszta cukrowa znajduje się w tej samej pozycji, w której znajdował się atom metalu ciężkiego w wyjściowym związku.

W przypadku otrzymywania rybonukleozydów powstają praktycznie tylko β -anomery, natomiast podczas syntezy 2'-deoksyrybonukleozydów otrzymujemy mieszaninę α - i β -anomerów, co spowodowane jest brakiem możliwości powstania cyklicznego kationu cukrowego.

The first part of the report deals with the general situation of the country, and the progress of the war. It is a very interesting and valuable document, and one which should be read by every student of the history of the United States. The author's views are very liberal and enlightened, and his language is clear and concise. The report is a model of good writing, and one which should be read by every student of the history of the United States.

The second part of the report deals with the military operations of the war. It is a very interesting and valuable document, and one which should be read by every student of the history of the United States. The author's views are very liberal and enlightened, and his language is clear and concise. The report is a model of good writing, and one which should be read by every student of the history of the United States.

The third part of the report deals with the political situation of the country. It is a very interesting and valuable document, and one which should be read by every student of the history of the United States. The author's views are very liberal and enlightened, and his language is clear and concise. The report is a model of good writing, and one which should be read by every student of the history of the United States.

The fourth part of the report deals with the financial situation of the country. It is a very interesting and valuable document, and one which should be read by every student of the history of the United States. The author's views are very liberal and enlightened, and his language is clear and concise. The report is a model of good writing, and one which should be read by every student of the history of the United States.

The fifth part of the report deals with the social situation of the country. It is a very interesting and valuable document, and one which should be read by every student of the history of the United States. The author's views are very liberal and enlightened, and his language is clear and concise. The report is a model of good writing, and one which should be read by every student of the history of the United States.

The sixth part of the report deals with the foreign relations of the country. It is a very interesting and valuable document, and one which should be read by every student of the history of the United States. The author's views are very liberal and enlightened, and his language is clear and concise. The report is a model of good writing, and one which should be read by every student of the history of the United States.

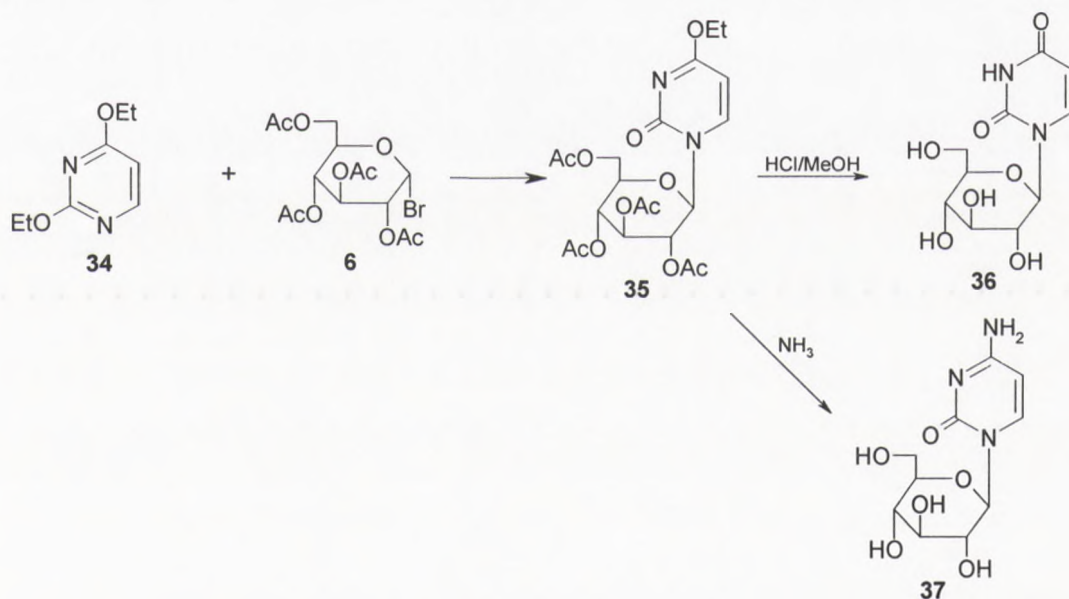
The seventh part of the report deals with the internal affairs of the country. It is a very interesting and valuable document, and one which should be read by every student of the history of the United States. The author's views are very liberal and enlightened, and his language is clear and concise. The report is a model of good writing, and one which should be read by every student of the history of the United States.

The eighth part of the report deals with the future of the country. It is a very interesting and valuable document, and one which should be read by every student of the history of the United States. The author's views are very liberal and enlightened, and his language is clear and concise. The report is a model of good writing, and one which should be read by every student of the history of the United States.

1.2.2. Metoda Hilberta-Johnsona

Hilbert i Johnson³ jako pierwsi przeprowadzili udaną syntezę nukleozydów pirymidynowych. Substratem w ich badaniach były 2,4-dialkoksypirymidyny. Opierali się oni na wcześniejszych badaniach przeprowadzonych przez Knorra⁴, który zajmował się przegrupowaniami z przeniesieniem podstawników alkilowych w układzie laktam-laktim.

W 1930 roku Hilbert i Johnson⁴² przeprowadzili reakcję 2,4-dimetoksyuracylu z jodkiem metylu w temperaturze pokojowej, otrzymując 4-metoksy-1-metylopiryd-2-on. Następnie związek ten pod wpływem kwasu przeprowadzili w 1-metylouracyl. Kontynuując swoje badania przeprowadzili reakcję kondensacji 2,4-dietoksyuracylu (34) z acetylobromoglukozą (6) bez użycia katalizatora, otrzymując 4-etoksy-1-(tetraacetylo-β-D-glukopiranozylo)uracyl (35). Produkt ten udało się im przekształcić w 1-glukozylouracyl (36) pod wpływem działania kwasu (HCl/MeOH) lub w pochodną cytozyny (37) po potraktowaniu związku 35 amoniakiem. Była to pierwsza udana synteza cytozyny, jednak całkowita wydajność reakcji była bardzo niska.



Schemat 12

Znaczne polepszenie wydajności otrzymano przez zastosowanie odpowiedniego rozpuszczalnika. Rabinowitz i Gurin⁴³ uzyskali 20-50% wzrost wydajności bloowanego 4-etoksy nukleozydu, przeprowadzając reakcję w mieszaninie chloroformu z pirydyną. W wykonanych licznych eksperymentach stosowane były także inne rozpuszczalniki jak: benzen, toluen, nitrometan, acetonitryl oraz chlorek metylenu, które były mieszane w różnych proporcjach, poprawiając wydajność reakcji⁴⁴⁻⁴⁸.

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

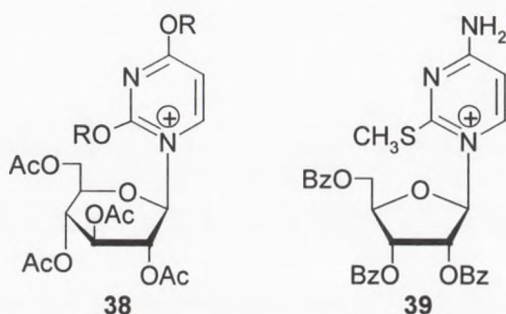
...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

Hilbert i Johnson sugerowali, że reakcja ta zachodzi przez produkt pośredni, czwartorzędową sól nukleozydu 2,4-dialkoksypirymidynowego (**38**). Związek o takiej strukturze został wyizolowany przez Rabinowitza i Gurina⁴³, jednak jego struktura nie została dobrze udokumentowana. Dopiero Udea i Nishino³⁶ w pełni scharakteryzowali czwartorzędową sól (**39**) otrzymaną w reakcji 4-amino-2-metylotiopirymidyny z tribenzoilochlororybozą. W wyniku działania na ten wiążek mieszaniną H₂S w pirydynie uzyskano, tak jak się spodziewano, 2-tiocytydynę. Natomiast w przypadku użycia amoniaku otrzymywano 2,4-diamino-1-(β-D-rybofuranosylo)pirymidynę.

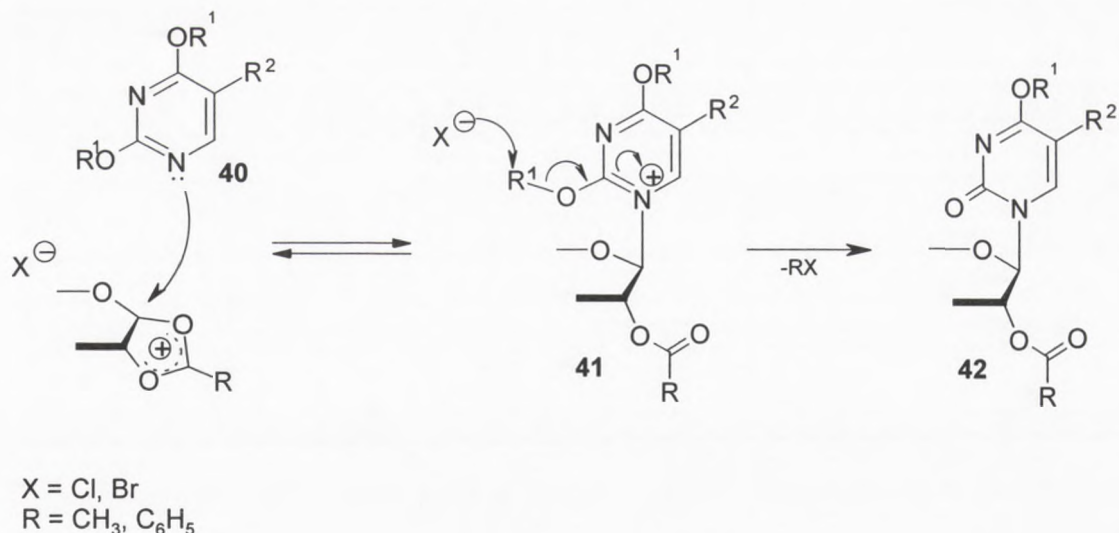


Schemat 13

Pryštas i Šorm^{45,48,49} badając wpływ podstawników znajdujących się w pozycji C5 na reakcje przeprowadzane metodą Hilberta-Johnsona zaobserwowali, że wydajność reakcji kondensacji zmniejsza się ze zwiększaniem elektronosącego charakteru tego podstawnika w następującym szeregu: Me > H > p-metoksybenzyl > I > Br > Cl > F > CN > NO₂. Pryštas i Šorm⁵⁰ przeprowadzili także badania efektu jaki wywiera zastosowanie różnego rodzaju grup alkoksylowych na wydajność reakcji kondensacji. Najlepsze wyniki otrzymano w przypadku 2,4-dibenzyloksypirymidym, natomiast 2,4-di-t-butoksypirymidyny nie ulegały reakcji. Po przeprowadzeniu serii kondensacji zauważyli, że wydajności powstających nukleozydów w metodzie Hilberta-Johnsona malała w następującej kolejności: PhCH₂ > p-MeOPhCH₂ > Me > Et > o,p-(MeO)₂PhCH₂ > i-Pr >> t-Bu.

Watanabe, Hollenberg i Fox¹⁷ na podstawie powyższych danych zaproponowali mechanizm procesu glikozylacji pirymidyn metodą Hilberta-Johnsona (schemat 14).

Faint, illegible text covering the majority of the page, possibly bleed-through from the reverse side.



Schemat 14

Obecność podstawników elektronoakceptorowych w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego zmniejsza wydajność reakcji przez obniżenie nukleofilowości atomu azotu N1.

Pierwszym etapem przedstawionego mechanizmu jest nukleofilowy atak atomu N1 na anomeryczny atom węgla C1 kationu cukrowego, powstałego wskutek dysocjacji halogenu od halogenozy. Prowadzi to do powstania czwartorzędowej soli 2,4-dialkoksypirymidynowej (41). Kolejnym etapem jest nukleofilowy atak anionu halogenkowego z oderwaniem grupy alkilowej R^1 , prowadzący do powstania ugrupowania 2-karbonylowego, z wytworzeniem związku o strukturze (42).

Krokiem determinującym szybkość reakcji w tym przypadku będzie przejście związku 41 w 42. Wyizolowanie względnie trwałej czwartorzędowej soli nukleozydu (39) (Ueda i Nishino³⁶) pozwoliło na potwierdzenie zaproponowanego przez Watanabe, Hollenberga i Foxa mechanizmu.

Ważnym aspektem w dyskutowanym mechanizmie jest to, że reakcja halogenozy z pirymidyną posiadającą podstawnik 2-alkoksyłowy, powoduje powstanie najczęściej mieszaniny α - i β -anomerów nukleozydu. Pod tym względem reakjom przeprowadzonym metodą Hilbeta-Johnsona brakuje generalnie stereospecyficzności, jaką można było obserwować w przypadku metody metalu ciężkiego. W większości opisywanych eksperymentów, w których używano chlorku tri-O-acetylo-D-pentafuranozy otrzymywano w wyniku reakcji kondensacji mieszaninę anomerów. Najprostszym wyjaśnieniem takiego braku specyficzności może więc być to, że dominującym mechanizmem jest dwucząsteczkowa substytucja S_N2 . Jednak mechanizm ten nie odpowiada pewnym obserwacjom.

Pryštas^{46,48} przeprowadzając reakcję kondensacji chlorku 3,5-O-acetylo-2-deoksy- α -D-

The present study was designed to investigate the effects of a brief, structured, and self-paced program on the self-esteem of college students. The program was based on the principles of cognitive-behavioral therapy and was designed to be easily implemented in a classroom setting.

The program consisted of a series of self-paced modules that focused on identifying and challenging negative self-beliefs, setting realistic goals, and developing positive coping strategies. The program was delivered through a series of self-paced modules that could be completed at the student's own pace.

The results of the study indicated that the program had a significant positive effect on the self-esteem of the students. The students who completed the program showed a significant increase in self-esteem scores compared to the control group.

The program was found to be effective in increasing self-esteem, and the results suggest that such programs can be used as a valuable tool for promoting mental health and well-being in college students.

The program was designed to be self-paced and self-directed, allowing students to work at their own pace and to focus on the areas that were most relevant to their needs. The program was also designed to be easily implemented in a classroom setting.

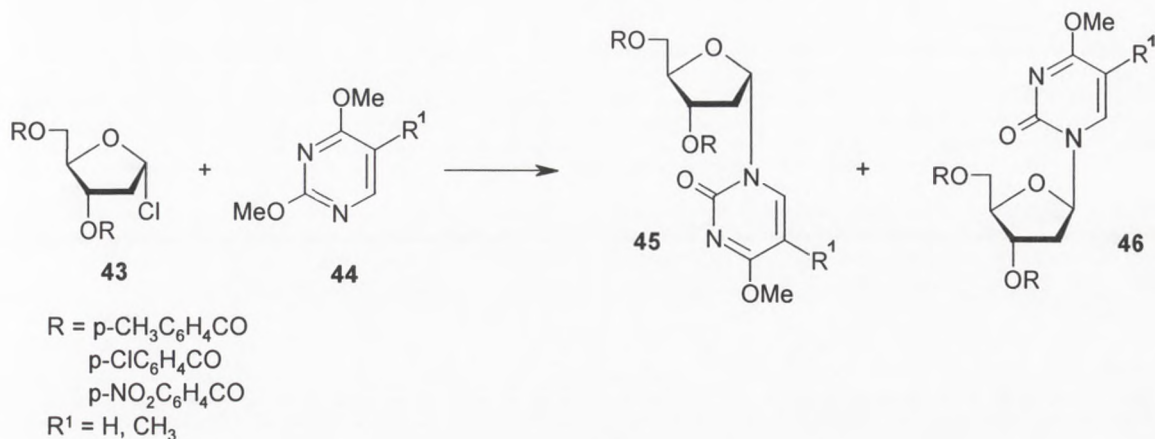
The program was found to be effective in increasing self-esteem, and the results suggest that such programs can be used as a valuable tool for promoting mental health and well-being in college students.

The program was designed to be self-paced and self-directed, allowing students to work at their own pace and to focus on the areas that were most relevant to their needs. The program was also designed to be easily implemented in a classroom setting.

The program was found to be effective in increasing self-esteem, and the results suggest that such programs can be used as a valuable tool for promoting mental health and well-being in college students.

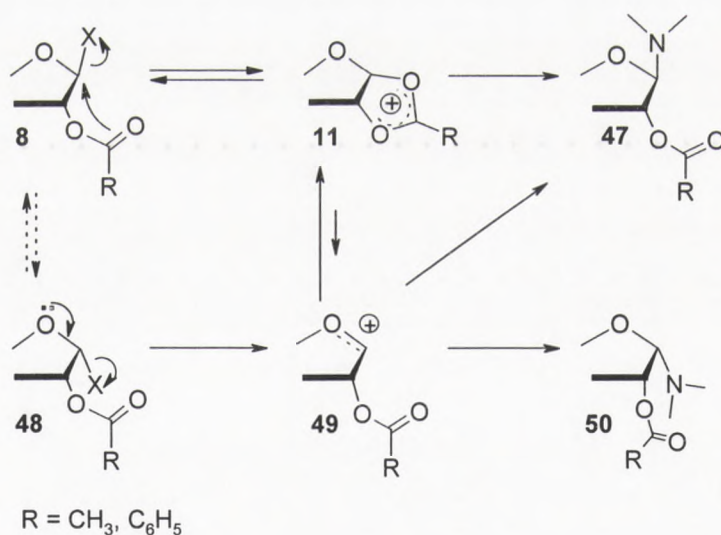
The program was designed to be self-paced and self-directed, allowing students to work at their own pace and to focus on the areas that were most relevant to their needs. The program was also designed to be easily implemented in a classroom setting.

pentafuranozy (**43**) z 2,4-dialkoksypirymidyną (**44**) w mieszaninie benzenu z acetonitrylem otrzymał mieszaninę anomerów, w której α -anomer (**45**) był głównym produktem reakcji (schemat 15).



Schemat 15

Warto zaznaczyć, że w klasycznej metodzie Hilberta-Johnsona dysocjacja halogenu od halogenozy z wytworzeniem 1,2-acykloksoniowego jonu nie jest wspomagana przez żadne sole metalu, jak miało to miejsce w przypadku metody metalu ciężkiego. Watanabe, Hollenberg i Fox¹⁷ zaproponowali stereochemiczny przebieg tego procesu:



Schemat 16

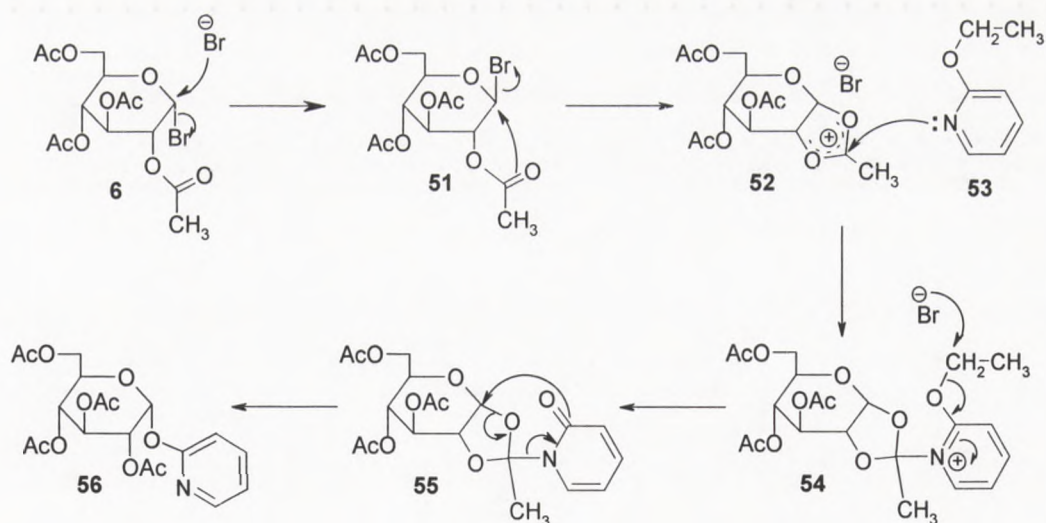
W przypadku 1,2-*trans* halogenocukru (**8**) oddysocjowanie halogenu prowadzi do otrzymania jonu acyloksoniowego (**11**), powstającego w wyniku nukleofilowego, wewnątrzcząsteczkowego ataku na atom C1 przez grupę 2-acyloksylową. Powstały w tym przypadku nukleozyd posiada konfigurację β (**47**). Natomiast odłączenie halogenu z 1,2-*cis*



halogenozy (**48**) może nastąpić przez atak wolnej pary elektronowej atomu tlenu znajdującego się w pierścieniu cukrowym. W wyniku tego powstaje płaski jon karboksoniowy (**49**). Może on oczywiście przejść w bardziej trwały cykliczny jon z powstaniem β -anomeru nukleozydu. Kation taki może także ulec bezpośrednio reakcji z pirymidyną dając α -anomer (**50**). W wyniku reakcji otrzymujemy więc mieszaninę anomerów. Takie założenie wyjaśniłoby więc powstawanie mieszaniny α - i β -anomerów, które były otrzymywane w reakcji Hilberta-Johnsona, nawet gdy obecna była grupa 2-acyloksylowa w cząsteczce cukru. Jednak w większości przypadków izolowany był tylko β -anomer⁵¹.

Fox⁶ prowadząc reakcję kondensacji metodą metalu ciężkiego otrzymał 1- β -D-rybofuranozylotyminę. Jednak związek ten różnił się od związku otrzymanego przez Roberta i Vissera⁵² metodą Hilberta-Johnsona. Dalsze badanie tej reakcji pokazały, że w wyniku reakcji powstają oba anomery, a wyizolowany α -anomer okazał się identyczny ze związkiem otrzymanym przez Roberta i Vissera. Otrzymywanie obu anomerów z dialkoksypirymidyn zostało dobrze udokumentowane^{45,50,53,54}.

Hilbert i Rist⁵⁵ donosili także o otrzymaniu O-glikozydów. W wyniku kondensacji bromku tetra-O-acetylo- β -rybofuranozy z 2,4-dietoksyprymidyną otrzymali poza spodziewanym 1-nukleozydem dodatkowy produkt, O²-rybofuranozylo-4-etoksyprymidynę. Analogiczne obserwacje przeprowadzone były też przez Vissera, Goodmana i Dittmera⁵⁶. Mechanizm procesu powstawania O-glikozydów w metodzie Hilberta-Johnsona został zaproponowany przez Lemieuxa i Morgana⁵⁷ (schemat 17).



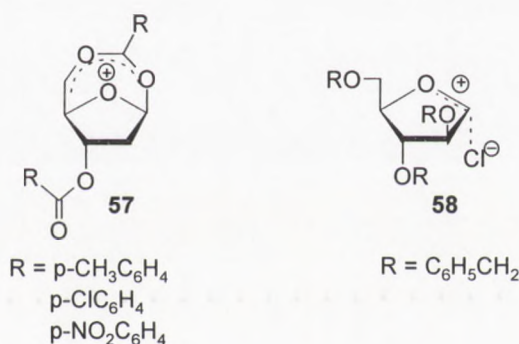
Schemat 17

W wyniku kondensacji bromku tetraacetylo- α -D-glukopiranozy (**6**) z 2-etoksyprymidyną (**53**) w obecności bromku butyloaminy otrzymali oni związek **56**. Sugerowali, że pod wpływem



anionu bromkowego α -halogenoza przechodzi w β -anomer. Umożliwia to powstanie cyklicznego kationu cukrowego (**52**), który ulega następnie atakowi pirydyny z wytworzeniem czwartorzędowej soli (**54**). Usunięcie grupy etoksyłowej pod wpływem anionu bromkowego prowadzi do powstania grupy karboksylowej. Następnie po wewnątrzcząsteczkowym ataku pary elektronowej tlenu karbonyłowego powstaje α -glukozyd (**56**). Lemieux i Morgan⁵⁷ sugerowali, że preferowany atak 2-etoksypirymidyny na pierścień dioksolanowy spowodowany jest istnieniem pary anion – kation (**52**), która utrudnia bezpośredni atak pirymidyny na anomeryczny atom węgla.

Pryštas^{46,48} obserwując powstawanie 2'-deoksy- α -nukleozydu (**45**) jako głównego produktu reakcji (schemat 15) stwierdził, że ani mechanizm S_N2 , ani możliwość istnienia pary anion – kation nie wyjaśnia retencji konfiguracji i powstawania w przewadze α -anomeru. Zasugerował on, że proces ten może zachodzić przez 1,5-cykliczny jon (**57**), co ułatwia atak na atom C1 „od dołu”. Ta hipoteza znalazła poparcie w fakcie, że w reakcji anomerycznej mieszaniny chlorku 3,5-di-O-benzylo-2-deoksy-D-pentafuranozy z 2,4-dimetoksypirymidyną powstają α - i β -anomery w równych proporcjach⁵⁸.



Schemat 18

Pryštas⁴⁸ uważał, że powstanie 1,5-cyklicznego jonu powoduje powstanie większej ilości 2'-deoksy- α -nukleozydu. Jednak może to być też spowodowane czynnikami sterycznymi, powodujące przysłanianie centrum anomerycznego przez objętościowy podstawnik 5-acyloksylowy.

Natomiast w reakcji kondensacji dialkoksypirymidyny z chlorkiem tribenzylo- α -D-arabinofuranozy przeprowadzonej w chlorku metylenu otrzymano z dobrą wydajnością tylko β -anomer nukleozydu. Jego konfiguracja została wyznaczona przez Glaudemansa i Fletchera⁵⁹. Jeżeli efekty steryczne miałyby tu odgrywać decydującą rolę, to należało by się spodziewać powstania przede wszystkim α -nukleozydu z powodu dużej zawady przestrzennej, jaką jest grupa O^2 -benzyłowa. Powstanie β -anomeru może być racjonalnie wytłumaczone tym, że taki

The following is a list of the names of the persons who were present at the meeting held on the 15th day of June, 1900, at the residence of the undersigned, in the city of New York, New York.

1. Mr. J. P. Morgan

2. Mr. C. D. Conover

3. Mr. W. A. Rorer

4. Mr. J. B. Condit

5. Mr. J. B. Condit

6. Mr. J. B. Condit

7. Mr. J. B. Condit

8. Mr. J. B. Condit

9. Mr. J. B. Condit

10. Mr. J. B. Condit

11. Mr. J. B. Condit

12. Mr. J. B. Condit

13. Mr. J. B. Condit

14. Mr. J. B. Condit

15. Mr. J. B. Condit

16. Mr. J. B. Condit

17. Mr. J. B. Condit

18. Mr. J. B. Condit

19. Mr. J. B. Condit

20. Mr. J. B. Condit

21. Mr. J. B. Condit

22. Mr. J. B. Condit

23. Mr. J. B. Condit

24. Mr. J. B. Condit

25. Mr. J. B. Condit

26. Mr. J. B. Condit

27. Mr. J. B. Condit

28. Mr. J. B. Condit

29. Mr. J. B. Condit

30. Mr. J. B. Condit

31. Mr. J. B. Condit

32. Mr. J. B. Condit

33. Mr. J. B. Condit

34. Mr. J. B. Condit

35. Mr. J. B. Condit

36. Mr. J. B. Condit

37. Mr. J. B. Condit

38. Mr. J. B. Condit

39. Mr. J. B. Condit

40. Mr. J. B. Condit

41. Mr. J. B. Condit

42. Mr. J. B. Condit

43. Mr. J. B. Condit

44. Mr. J. B. Condit

45. Mr. J. B. Condit

46. Mr. J. B. Condit

47. Mr. J. B. Condit

48. Mr. J. B. Condit

49. Mr. J. B. Condit

50. Mr. J. B. Condit

51. Mr. J. B. Condit

52. Mr. J. B. Condit

53. Mr. J. B. Condit

54. Mr. J. B. Condit

55. Mr. J. B. Condit

56. Mr. J. B. Condit

57. Mr. J. B. Condit

58. Mr. J. B. Condit

59. Mr. J. B. Condit

60. Mr. J. B. Condit

61. Mr. J. B. Condit

62. Mr. J. B. Condit

63. Mr. J. B. Condit

64. Mr. J. B. Condit

65. Mr. J. B. Condit

66. Mr. J. B. Condit

67. Mr. J. B. Condit

68. Mr. J. B. Condit

69. Mr. J. B. Condit

70. Mr. J. B. Condit

71. Mr. J. B. Condit

72. Mr. J. B. Condit

73. Mr. J. B. Condit

74. Mr. J. B. Condit

75. Mr. J. B. Condit

76. Mr. J. B. Condit

77. Mr. J. B. Condit

78. Mr. J. B. Condit

79. Mr. J. B. Condit

80. Mr. J. B. Condit

81. Mr. J. B. Condit

82. Mr. J. B. Condit

83. Mr. J. B. Condit

84. Mr. J. B. Condit

85. Mr. J. B. Condit

86. Mr. J. B. Condit

87. Mr. J. B. Condit

88. Mr. J. B. Condit

89. Mr. J. B. Condit

90. Mr. J. B. Condit

91. Mr. J. B. Condit

92. Mr. J. B. Condit

93. Mr. J. B. Condit

94. Mr. J. B. Condit

95. Mr. J. B. Condit

96. Mr. J. B. Condit

97. Mr. J. B. Condit

98. Mr. J. B. Condit

99. Mr. J. B. Condit

100. Mr. J. B. Condit

The following is a list of the names of the persons who were present at the meeting held on the 15th day of June, 1900, at the residence of the undersigned, in the city of New York, New York.

101. Mr. J. B. Condit

102. Mr. J. B. Condit

103. Mr. J. B. Condit

104. Mr. J. B. Condit

105. Mr. J. B. Condit

106. Mr. J. B. Condit

107. Mr. J. B. Condit

108. Mr. J. B. Condit

109. Mr. J. B. Condit

110. Mr. J. B. Condit

111. Mr. J. B. Condit

112. Mr. J. B. Condit

113. Mr. J. B. Condit

114. Mr. J. B. Condit

115. Mr. J. B. Condit

116. Mr. J. B. Condit

117. Mr. J. B. Condit

118. Mr. J. B. Condit

119. Mr. J. B. Condit

120. Mr. J. B. Condit

121. Mr. J. B. Condit

122. Mr. J. B. Condit

123. Mr. J. B. Condit

124. Mr. J. B. Condit

125. Mr. J. B. Condit

126. Mr. J. B. Condit

127. Mr. J. B. Condit

128. Mr. J. B. Condit

129. Mr. J. B. Condit

130. Mr. J. B. Condit

131. Mr. J. B. Condit

132. Mr. J. B. Condit

133. Mr. J. B. Condit

134. Mr. J. B. Condit

135. Mr. J. B. Condit

136. Mr. J. B. Condit

137. Mr. J. B. Condit

138. Mr. J. B. Condit

139. Mr. J. B. Condit

140. Mr. J. B. Condit

141. Mr. J. B. Condit

142. Mr. J. B. Condit

143. Mr. J. B. Condit

144. Mr. J. B. Condit

145. Mr. J. B. Condit

146. Mr. J. B. Condit

147. Mr. J. B. Condit

148. Mr. J. B. Condit

149. Mr. J. B. Condit

150. Mr. J. B. Condit

α -halogenocukier może posiadać ładunki cząstkowe (58). Wtedy nukleofilowy atak następuje z przeciwnej strony do miejsca, w którym znajduje się podstawnik chlorowy.

Pryštas^{45,46} obserwował, że dodanie HgBr₂ do reakcji prowadzonej metodą Hilberta-Johnsona powodowało nie tylko zwiększanie wydajności, ale także wpływało na stereochemię produktów. Reakcja 5-benzylksymetylo-2,4-dimetoksyperyminy z chlorkiem tribenzyl-D-rybofuranozy w benzenie dawało mieszaninę α - i β -anomerów w stosunku 1:4. Po dodaniu do reakcji katalizatora (HgBr₂), ilość powstającego w wyniku reakcji α -nukleozydu bardzo się obniżyła (α/β 1:11). Rola HgBr₂ w reakcji Hilberta-Johnsona może mieć dwa aspekty. Halogenoza posiadająca grupę 2-acyloksylową pod wpływem rtęci może tworzyć kation 1,2-acyloksoniowy. Wtedy preferowana będzie reakcja prowadząca do powstania 1',2'-*trans*-nukleozydu. Natomiast w przypadku 2-deoksyhalogenozy HgBr₂ uczestniczy w oddysocjowaniu halogenu z wytworzeniem płaskiego jonu karboksoniowego, w wyniku czego powstaje mieszanina anomerów. Kolejnym zagadnieniem jakie trzeba rozważyć jest możliwość utworzenia kompleksu, który może powstawać w wyniku oddziaływania czwartorzędowej soli nukleozydu z katalizatorem. Powodowałyby to wyciąganie elektronów z pierścienia pirymidynowego i osłabienie wiązania 2-alkoksyalkilowego, ułatwiając usunięcie alkilu.

Otrzymywanie nukleozydów metodą Hilberta-Johnsona ma zastosowanie tylko w przypadku syntezy pochodnych pirymidynowych, w serii purynowej nie stosuje się tego typu podejścia. W przypadku syntezy nukleozydów pirymidynowych występują jednak pewne ograniczenia. Jeżeli w pozycji 6 pierścienia znajduje się podstawnik to reakcja kondensacji nie zachodzi^{42,60,61}. Także otrzymanie substratu – dialkoksypirymidyny nie jest proste. Związki te nie są dostępne komercyjnie, a ich synteza jest często wieloetapowa. Ponadto wydajność kondensacji przeprowadzonej tą metodą nie jest zbyt wysoka.

W reakcji tej nie obserwuje się procesu transglikozylacji. Reszta cukrowa przyłącza się bezpośrednio w pozycję N1 pirymidyny. Głównym produktem reakcji metoda Hilberta-Johnsona jest N1-podstawiony nukleozyd, a produktami ubocznymi są 3- i O²-podstawione pochodne.

W przypadku serii rybonukleozydów powstają głównie β -anomery. Czasem jednak obserwuje się brak stereoselektywności, który prowadzi do powstania mieszaniny anomerów. Natomiast w przypadku otrzymywania 2'-deoksynukleozydów zawsze tworzą się α - i β -anomery.

Metoda ta obecnie jest rzadko stosowana, jej rozwinięcie stanowi metoda glikozylacji Vorbrüggena.



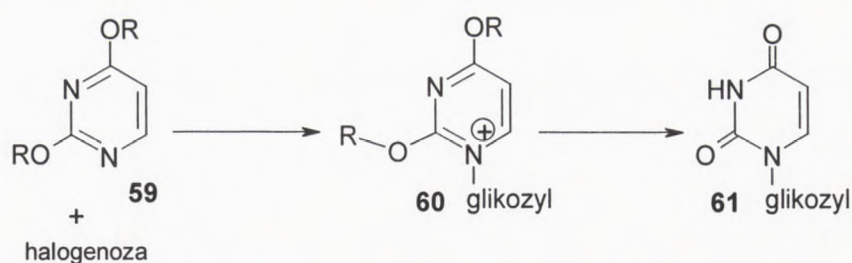
1.2.3. Metoda sililowa

Metoda sililowa jest rozwinięciem metody Hilberta-Johnsona. Grupy alkoksylowe zastąpione są grupami trimetylosililowymi^{62,63}, takie pochodne otrzymuje się znacznie łatwiej niż alkoksylowe analogi. Także ich usunięcie jest o wiele prostsze i zachodzi podczas przerobu mieszaniny po zakończeniu reakcji, na skutek kontaktu z wodą lub alkoholem. Metoda ta nie ma ograniczeń do określonej grupy zasad heterocyklicznych, można ją stosować w przypadku różnych zasad (pirymidyn, puryn, imidazoli). Pochodne sililowe otrzymywane są w łatwy sposób przez traktowanie zasad heterocyklicznych odczynnikami sililującymi takimi jak: heksametylodisilazan (HMDS), chlorek trimetylosililowy (TMSCl), trimetyloaminosilan, N,O-bis(trimetylosililo)acetamid (BSA).

Wittenburg⁶⁴ badał reakcję kondensacji halogenozy z 2,4-bis-(trimetylosililo)-5-metylopirymidyną w różnych warunkach: ogrzewanie w suchych rozpuszczalnikach (toluen, benzen, DMF, nitrometan); w próżni, w warunkach fuzji 90-110°C; w suchym, obojętnym rozpuszczalniku w obecności nadchloranu srebra i temperaturze pokojowej; w obojętnym rozpuszczalniku wobec różnych soli rtęci (HgBr₂, HgCl₂, Hg(OAc)₂, HgO) i różnych temperaturach. Najlepsze rezultaty uzyskał w przypadku zastosowania nadchloranu srebra^{65,66} oraz w obecności soli rtęci⁶⁴⁻⁶⁶.

Z powodu niższej elektroujemności atomu krzemu w stosunku od atomu węgla, grupa sililowa jest bardziej podatna na atak nukleofilowy. Powoduje to, że grupa ta jest łatwiejsza do usunięcia niż grupa alkoksylowa. Ponadto efekt indukcyjny grup metylowych powoduje, że sililowane zasady heterocykliczne są lepszymi nukleofilami niż pochodne alkoksylowe.

Schemat powstawania nukleozydów w metodzie sililowej jest podobny do mechanizmu reakcji Hilberta-Johnsona.



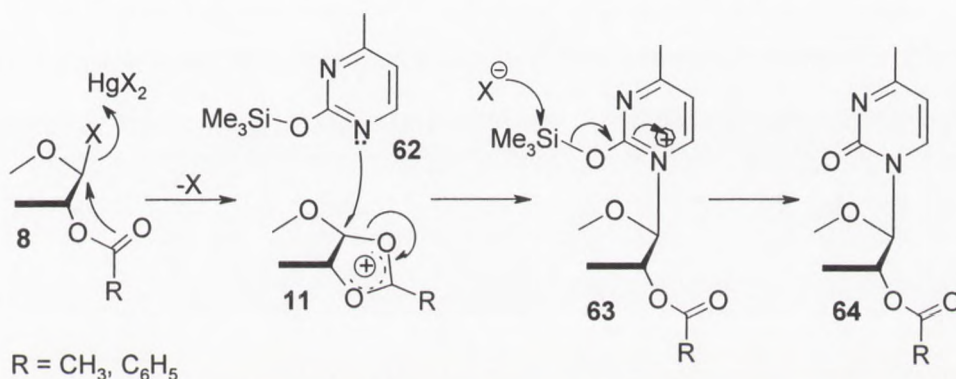
Schemat 19



Różnica polega na tym, że w tym przypadku grupą opuszczającą nie jest grupa alkilowa. Krokiem determinującym szybkość reakcji jest najprawdopodobniej powstawanie wiązania glikozydowego C-N, natomiast w klasycznej metodzie Hilberta-Johnsona była to reakcja de-O-alkilacji. W wyniku reakcji kondensacji otrzymujemy mieszaninę anomerów nukleozydów z przewagą β -anomeru, nawet gdy obecna jest grupa 2-alkoksylowa w cząsteczce cukru. Powstawanie mieszaniny anomerów można wyjaśnić w taki sam sposób jak miało to miejsce w przypadku reakcji Hilberta-Johnsona.

Reakcje kondensacji z wykorzystaniem siliolowych pochodnych były także prowadzone, jak już wspomniano, w obecności soli rtęci. W takim podejściu reakcja syntezy nukleozydu przebiega w bardziej łagodnych warunkach z osiągnięciem wyższych wydajności.

Mechanizm reakcji powstawania nukleozydu pirymidynowego metodą siliolową w obecności HgX_2 został zaproponowany przez Watanabe, Hollenberga i Foa¹⁷ (schemat 20)



Schemat 20

Mechanizm ten jest analogiczny do mechanizmu reakcji Hilberta-Johnsona prowadzonej z użyciem alkoksypirymidyn w obecności HgX_2 .

Ciekawych obserwacji dokonał Bardos⁶⁷, który badał wpływ siliłowania zasad heterocyklicznych na przebieg reakcji. W wyniku kondensacji chlorku 3,5-di-O-chlorobenzyl-2-deoxy- α -D-pentafuranozy z 5-acetylotio-2,4-bis(trimetylosililo)pirymidyną w benzenie lub bez rozpuszczalnika oraz w wysokiej temperaturze otrzymał tylko β -anomer. Natomiast w łagodniejszych warunkach (temperatura pokojowa) obserwowano powstawanie tylko α -anomeru.

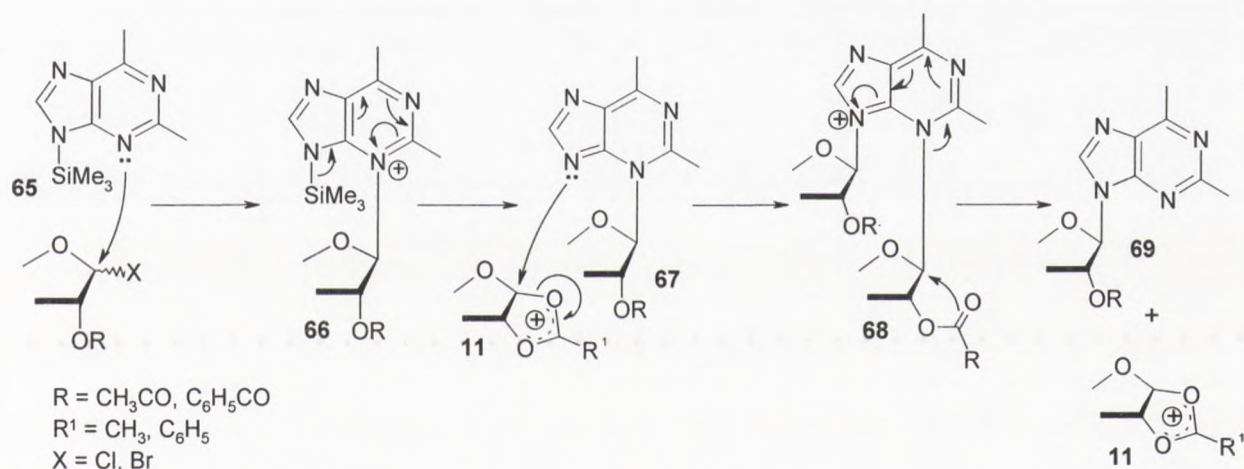
W kolejnych pracach Bardos⁶⁸ pokazał, że to jednak nie temperatura miała wpływ na stereochemię reakcji. Zaobserwował, on że powstawanie α - lub β -anomeru zależy od obecności w mieszaninie reakcyjnej chlorku trimetylosililu. Podczas reakcji prowadzonych w temperaturze wrzenia benzenu lub reakcji fuzji, lotny chlorek szybko odparowywał z mieszaniny, co



prowadziło do powstawania β -anomeru. Natomiast jeżeli reakcję przeprowadzono w niższej temperaturze, w której chlorek nie zdołał odparować, jako główny produkt uzyskiwano α -anomer nukleozydu.

Bardos⁶⁸ sugerował, że β -anomer powstaje w wyniku nukleofilowego ataku S_N2 na α -halogenozę przez silylowaną pirymidynę. Natomiast powstawanie α -nukleozydu było rezultatem anomeryzacji α -halogenozy z wytworzeniem mniej stabilnego, przez co bardziej reaktywnego β -anomeru cukru. Według Koticka dopiero ten związek ulega nukleofilowemu atakowi zasady z powstaniem α -nukleozydu. Zaobserwowanie wysokiej stereospecyficzności w tej reakcji^{65,68} względem reakcji prowadzonych przez Pryštasa^{46,48} wynika z faktu, że grupa trimetylosilylowa powoduje zwiększenie nukleofilowości zasady bardziej niż grupa alkoksylowa.

Metoda silylowa znalazła również zastosowanie w przypadku otrzymywania nukleozydów purynowych. Mechanizm tego procesu został przedstawiony przez Watanabe, Hollenberga i Foxa¹⁷.

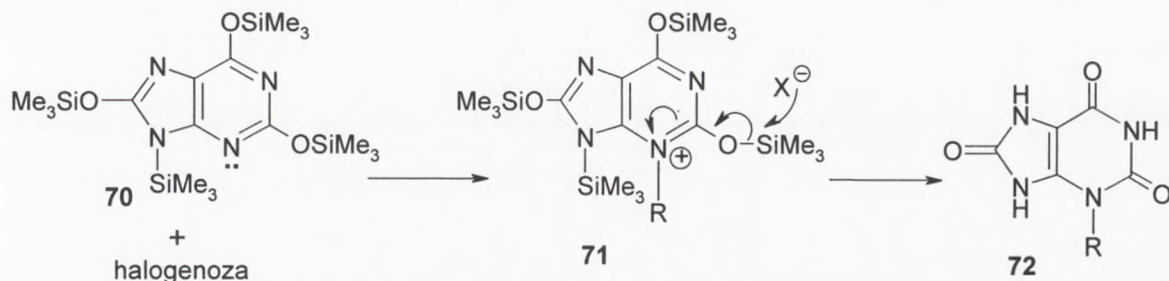


Schemat 21

W wyniku reakcji jako pierwszy powstaje kinetyczny 3-podstawiony produkt reakcji (67), który następnie w wyniku transglikozylacji 3→9 przechodzi w termodynamicznie bardziej trwałe 9-glikozyd (69). Powstanie od razu 9-podstawionego związku (69) nie jest możliwe, ponieważ w tej pozycji pierścienia purynowego znajduje się grupa silylowa. Siłą napędzającą przegrupowanie podstawnika cukrowego z pozycji 3 do 9 jest to, że w pierścieniu imidazolowym występuje nadmiar elektronów, natomiast w pirymidynowym ich niedomiar. Reakcja ta przebiega przez nietrwałą pochodną 3,9-diglikozylopurynę. Mechanizm ten jest analogiczny do mechanizmu jaki zaproponowano dla metody metalu ciężkiego.



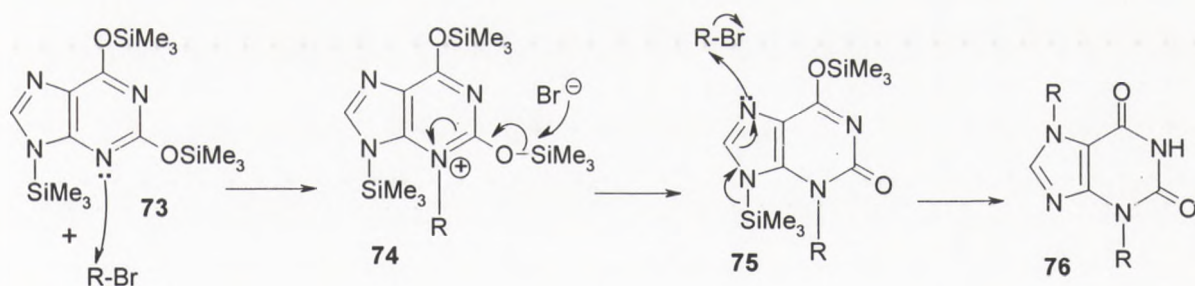
Znane są jednak przypadki, gdzie otrzymany 3-izomer jest jednym i głównym produktem reakcji. Birkhofer⁶⁹ obserwował powstawanie 3-podstawionego nukleozydu w reakcji halogenozy z tetrametylosililową pochodną kwasu moczowego (70) w obecności nadchloranu srebra. Dla tego 3-nukleozydu nie jest obserwowana migracja reszty cukrowej w pozycję N9, ponieważ związek ten posiada stabilną budowę odpowiadającą urydynie (72).



R = glikozyl

Schemat 22

W reakcji trimetylosililowej pochodnej ksantyny (73) z bromkiem tri-O-benzylo-D-rybofuranozy w mieszaninie toluenu z nitrometanem otrzymano 3-podstawiony nukleozyd (75). Natomiast ta sama reakcja przeprowadzona w acetonitrylu dawała 3,7-diglikozyłową pochodną (76)⁷⁰. Mechanizm tego procesu został zaproponowany przez Watanabe, Hollenberga oraz Foa¹⁷ i wygląda następująco:



R = glikozyl

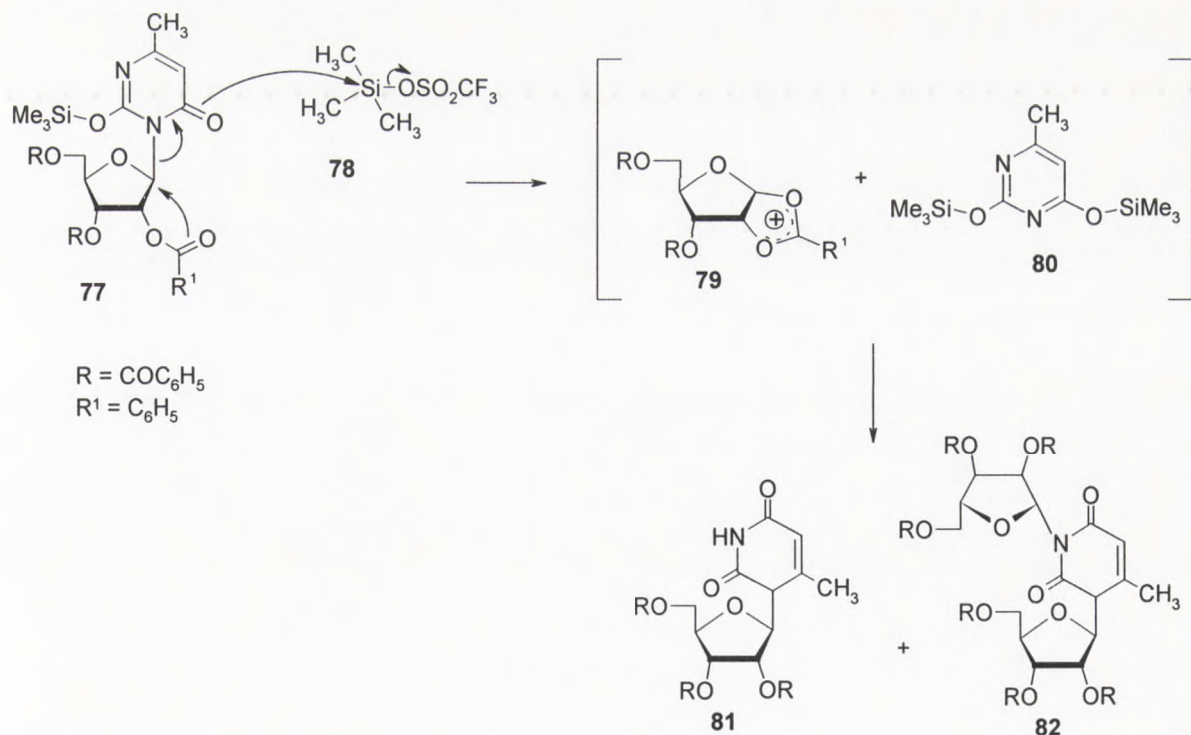
Schemat 23

Vorbrüggen^{40,71} otrzymując nukleozydy pirymidynowe metodą sililową stwierdził, że powstawanie poza 1-nukleozydem także nienaturalnych 3-izomerów oraz 1,3-dipodstawionych pochodnych spowodowane jest charakterem podstawnika znajdującego się w pozycji 5 i 6 pirymidyny. Także duży wpływ na strukturę otrzymanego produktu ma zastosowany rozpuszczalnik oraz katalizator. W przypadku wzrostu zasadowości pochodnej



pirymidynowej wywołanej przez obecność podstawników elektronodonorowych: $-\text{OCH}_3 > -\text{CH}_3 > -\text{H} > \text{NO}_2$, wzrostu kwasowości katalizatora: $\text{TiCl}_4 > \text{SnCl}_4 > \text{HgBr}_2 > (\text{CH}_3)_3\text{SiOS}_3\text{CF}_3$ oraz przez obniżenie polarności rozpuszczalnika: toluen $>$ 1,2-dichloroetan $>$ acetonitryl wzrasta trwałości σ -kompleksu, przez co wydłuża się czas reakcji i zwiększa się ilość niepożądanych 3- oraz 1,3-pochodnych. Poprzez obniżenie trwałości tego kompleksu zwiększa się ilość zasady, która może uczestniczyć w reakcji, reagując z kationem cukrowym z uzyskaniem 1-nukleozydu. Według Vorbrüggena 1- oraz 3-podstawione nukleozydy mogą dawać w reakcji z kolejnym kationem cukrowym pochodne 1,3-dipodstawione. Przy założeniu, że reakcja ta jest odwracalna 3-pochodne oraz 1,3-dipodstawione związki można przeprowadzić w pożądaną 1-nukleozydy w wyniku transglikozylacji.

W wyniku reakcji benzoilowanej pochodnej 2-O-trimetylosililo-6-metylo-3-rybouracylu (**77**) wobec katalizatora $(\text{CH}_3)_3\text{SiOS}_3\text{CF}_3$ (**78**) w acetonitrylu otrzymano 1-nukleozyd (**81**) z wydajnością 53% oraz 1,3-dipodstawiony związek (**82**). Wyizolowana i oczyszczona bispodstawiona pochodna została poddana następnie dalszej reakcji w obecności $(\text{CH}_3)_3\text{SiOS}_3\text{CF}_3$ oraz dodatku sililowej pochodnej 6-metylouracylu (**80**) w 1,2-dichlorometanie. W wyniku przegrupowania otrzymano 1-podstawiony nukleozyd (**81**) z wydajnością 25%. Poddanie działaniu katalizatora **78** benzoilowanego nukleozydu 6-metylouracydiny (**81**) w 1,2-dichloroetanie przez 5 dni dawało po około 24% 1,3-dipodstawionego związku (**82**) i 3',5'-di-benzoil-2,2'-anhydro pochodnej.

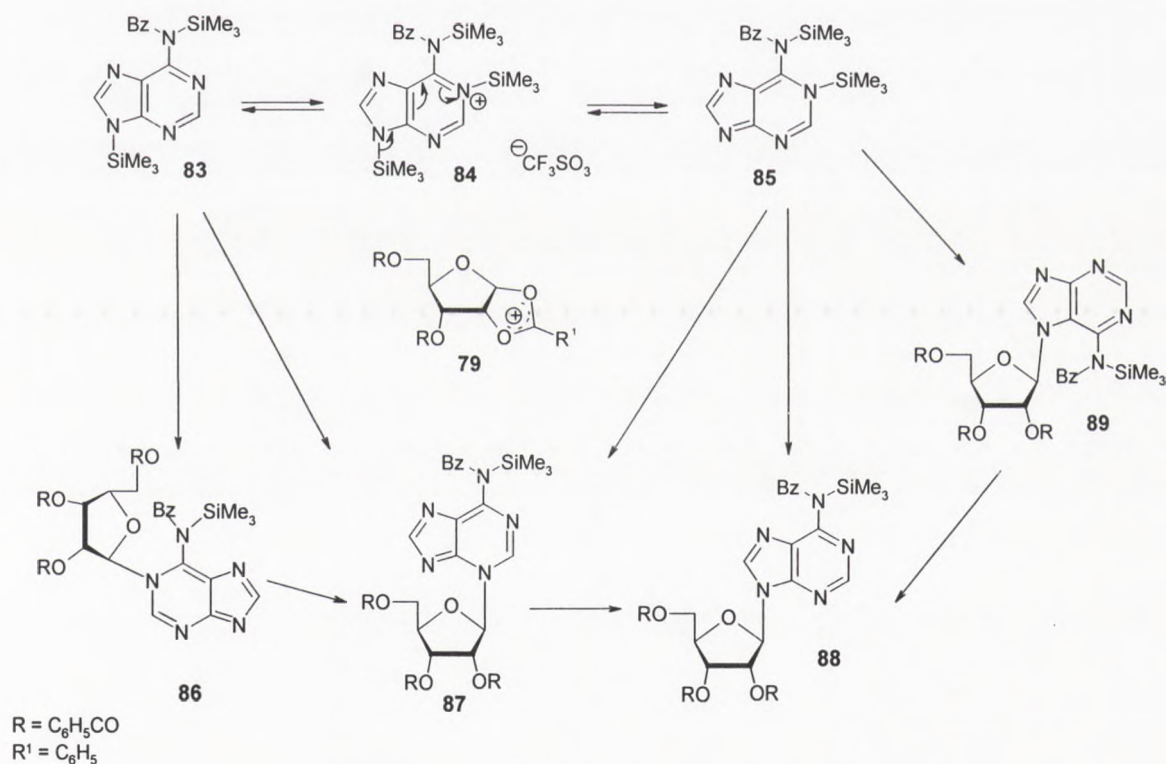


Schemat 24



Obserwowana przez Vorbrüggena transglikozylacja 3→1 prowadzi do otrzymania termodynamicznego produktu o strukturze 1-nukleozydu. Proces ten powinien zachodzić przez związek przejściowy jakim jest 1,3-dipodstawiony nukleozyd, jednak przypuszczenia te nie zostały sprecyzowane przez autora. Z obserwacji przeprowadzonych przez Vorbrüggena wynika, że silylowane nukleozydy pirymidynowe ulegają reakcji transglikozylacji N3→N1 oraz transformacji N1,N3 ⇌ N1.

Vorbrüggen i Höfle⁴⁰ badając mechanizm syntezy nukleozydów z silylowych pochodnych adeniny zaproponowali, że w przypadku rybozylacji persilylowanej N⁶-benzoiloadeniny mogą powstawać 1-, 3- i 7-regioizomery adenozyiny (**86**, **87**, **89**), które mają charakter produktów kinetycznych. Mechanizm tego procesu okazał się więc bardziej skomplikowany niż w przypadku pochodnych pirymidynowych. Vorbrüggen i Höfle tłumaczyli możliwość powstawania kilku kinetycznych produktów tym, że w wyniku silylowania adeniny możliwe jest otrzymanie mieszaniny kilku pochodnych silylowych (**83**, **84**, **85**). Przeprowadzając kondensację persilylowej pochodnej adeniny z komponentem cukrowym, po dłuższym czasie reakcji, otrzymali jako główny produkt termodynamicznie trwały 9-nukleozyd (**88**).



Schemat 25

Ryan, Acton i Goodman⁷⁴ zaobserwowali, że w wyniku reakcji kondensacji 1-chloro-2-S-benzylo-3,5-di-O-benzoilo-2-tiorybofuranoy z bis-(trimetylosililo)-N⁶-benzoiloadeniną w obecności katalizatora HgBr₂ w benzenie, powstaje 7-nukleozyd adeniny, który następnie

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

In the second section, the author outlines the various methods used to collect and analyze the data. This includes both manual and automated processes. The goal is to ensure that the information is both reliable and up-to-date.

The third part of the document provides a detailed breakdown of the results. It shows that there has been a significant increase in sales over the period covered. This is attributed to several factors, including improved marketing strategies and better customer service.

Finally, the document concludes with a series of recommendations for future actions. It suggests that the company should continue to invest in its marketing efforts and focus on building long-term relationships with its customers.

20

ulega transglikozylacji 7→9. Zmiana struktury elektronowej zasad heterocyklicznych w przypadku metody siliłowej prowadzi do otrzymania nienaturalnych produktów reakcji.

Itoh i Mizuno⁷² przeprowadzając reakcję kondensacji siliłowej pochodnej nieblokowanej adeniny z 1,2,3,5-tetra-O-acetylo-β-D-rybofuranozą w temperaturze pokojowej wobec tetrachlorku cyny w acetonitrylu, zaobserwowali tworzenie się 7-nukleozydu adeniny (α- i β-anomerów) oraz 9-podstawionego regioizomeru.

W serii pirymidyn reakcja kondensacji metodą siliłową może przebiegać dwiema drogami. Jednoetapowo, prowadząc do otrzymania 1-nukleozydu, w wyniku równoczesnego ataku nukleofilowego na centrum anomeryczne i usunięcie grupy 2-O-siliłowej z powstaniem termodynamicznego produktu reakcji. Drugą możliwością jest reakcja dwuetapowa poprzez czwartorzędową sól nukleozydu. W tym przypadku najpierw następuje glikozylacja i powstanie soli, a następnie poprzez jej przekształcenie otrzymujemy wolny nukleozyd. W przypadku pirymidyn nie mamy do czynienia z transglikozylacją. Reszta cukrowa przyłącza się bezpośrednio do centrum N1. Głównym produktem reakcji jest 1-nukleozyd, a produktami ubocznymi są 3- oraz 1,3-dipodstawione pochodne.

W przypadku syntezy nukleozydów purynowych metodą siliłową postulowanym produktem kinetycznym według Vorbrüggen i Höfle jest 1-, 3- lub 7-izomer, które następnie przechodzi podczas transglikozylacji w trwalszy termodynamicznie 9-podstawiony związek (w przypadku otrzymywania adenozyne). Proces ten biegnie przez nietrwale diglikozylpuryny i jest podobny do metody metalu ciężkiego.

The text on this page is extremely faint and illegible. It appears to be a standard academic article layout with a header, a main body of text, and a footer. The content is too light to transcribe accurately.

1.2.4. Metoda stapiana (fuzji)

Klasyczna metoda stapiania polega na bezpośredniej reakcji peracetylowanego komponentu cukrowego z zasadą heterocykliczną bez rozpuszczalnika, w obecności kwasowego katalizatora.

Sato i współpracownicy⁸ zastosowali reakcję Helfericha⁷⁵⁻⁷⁷ do syntezy nukleozydów purynowych. Otrzymywali oni nukleozydy w wyniku stapiania tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozy z różnymi zasadami heterocyklicznymi w próżni, w obecności katalitycznych ilości kwasu *p*-toluenosulfonowego w czasie od 10 do 20 minut. Uzyskane przez nich wydajności wahały się od 3% do 74% w zależności od rodzaju użytej zasady. W przeprowadzonych reakcjach otrzymali oni mieszaniny anomerów⁸.

W reakcji fuzji najczęściej używane są katalityczne ilości kwasów Lewisa takich jak: kwas *p*-toluenosulfonowy, $ZnCl_2$, $TiCl_4$, kwas dichlorooctowy, ester trimetylosililowy kwasu trifluorometanosulfonowego ($CF_3SO_3Si(CH_3)_3$), które są analogiczne do używanych w metodzie sililowej.

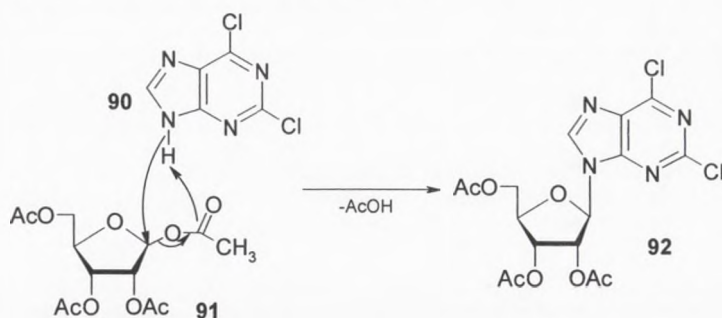
W przypadku stosowania puryn o niskich temperaturach topnienia, w wyniku stapiania ich z peracetylowanym komponentem cukrowym otrzymywane były nukleozydy z wydajnością od 40% do 80%. Natomiast zasady posiadające grupy aminowe lub hydroksylowe, których temperatury topnienia były bardzo wysokie okazały się praktycznie niereaktywne⁷⁸. W przypadku stapiania zasad takich jak: adenina, guanina, hipoksantyna, ksantyna lub kwas moczowy związki użyte do reakcji odzyskiwane były w niezmienionej formie⁷⁸. Dopiero acetylowe pochodne adeniny i guaniny prowadziły do otrzymania oczekiwanych nukleozydów.

Według Watanabe, Hollenberga i Foxa¹⁷ użycie katalitycznych ilości kwasu Lewisa powoduje aktywację zasady purynowej. Pierwszym etapem jest tworzenie się kompleksu katalizatora z zasadą. Postulowanym miejscem przyłączenia się katalizatora jest pozycja N3. W reakcjach przeprowadzonych tą metodą nie ma eksperymentalnych dowodów na powstawanie 3-glikozylopuryn jako kinetycznych lub termodynamicznych produktów reakcji.

Ishido⁸⁰ w swoich pracach pokazał, że w przypadku stapiania niektórych puryn obecność katalizatora nie była wymagana do zajścia reakcji i powstania nukleozydu.

Hosono i współpracownicy⁷⁹ badając reakcję fuzji rzucili nowe światło na możliwy przebieg tego procesu. W wyniku reakcji stapiania 2,6-dichloropuryny z tetraacetylo- β -D-rybofuranozą w temperaturze 152-154°C bez użycia katalizatora uzyskali 9- β -D-rybofuranozylo-2,6-dichloropurynę. Na podstawie przeprowadzonej reakcji sformułowali następujące wnioski: reakcja ta jest reakcją autokatalityczną i zachodzi według mechanizmu bimolekularnego;

crokiem determinującym szybkość reakcji jest eliminacja cząsteczki kwasu octowego. Mechanizm tego procesu został zaproponowany przez Hosono⁷⁹.

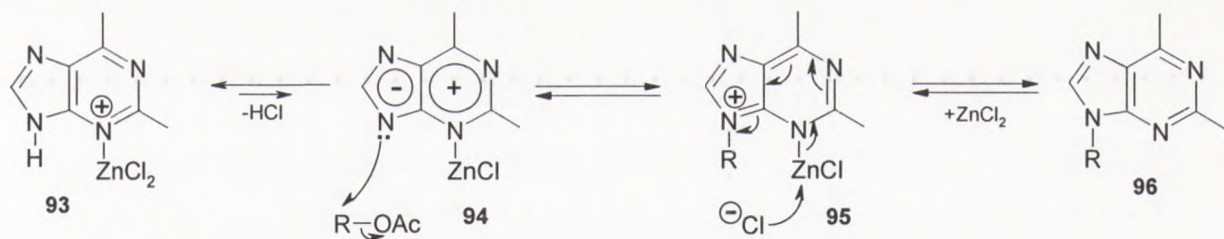


Schemat 26

Reakcja fuzji 6-chloro-, 6-jodo-, 6-cyjano-, 2,6-dichloro- lub 2,6,8-trichloropuryny z peracetylowanym komponentem cukrowym prowadzi do otrzymania nukleozydu. Natomiast zastosowanie do reakcji puryn takich jak: teofilina, 6-metoksyuryna nie prowadziło do uzyskania nukleozydu.

Hosono⁷⁹ sugerował, że mechanizm reakcji katalitycznej jak i autokatalitycznej jest podobny. W wyniku katalizy aktywowana jest puryna, która następnie ulega reakcji z komponentem cukrowym, co prowadzi do otrzymania nukleozydu.

Mechanizm aktywowania puryn przez katalizator został zaproponowany przez Watanabe, Hollenberga i Foxa¹⁷.



R = acetylowana reszta cukrowa

Schemat 27

Pierwszym krokiem w postulowanym mechanizmie jest powstanie kompleksu między puryną a kwasem Lewisa (**93**). Watanabe, Hollenberg i Fox sugerują, że kwas Lewisa przyłącza się w pozycję N3 pierścienia zasady purynowej, ponieważ gęstość elektronowa tego atomu jest największa, przez co zwiększa się jego podatność na elektrofilowy atak. Autorzy nie wykluczali, że możliwe jest też powstanie analogicznych kompleksów kwasu Lewisa z atomami azotu N1 lub N7 puryny. Powstały związek **93** może pozostawać w równowadze ze strukturą **94**. Ta ostatnia forma przypomina swoją budową 3-glikozylowaną purynę. Struktura ta posiada

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

In the second section, the author outlines the various methods used to collect and analyze the data. This includes both primary and secondary data collection techniques. The analysis focuses on identifying trends and patterns over time, which is crucial for making informed decisions.

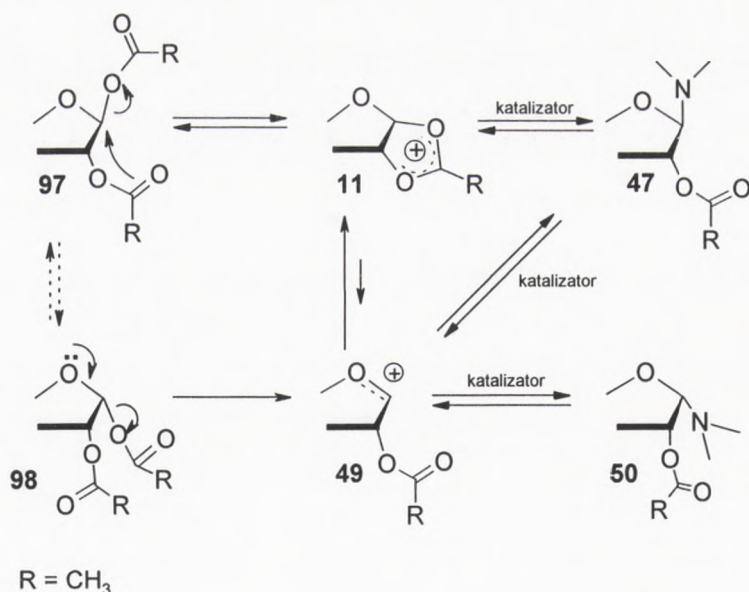
The third part of the report details the results of the study. It shows that there has been a significant increase in sales volume over the past year, particularly in the online market. This is attributed to several factors, including improved marketing strategies and a user-friendly website interface.

Finally, the document concludes with a series of recommendations for future actions. It suggests that the company should continue to invest in digital marketing and explore new product lines to further expand its market reach. Regular monitoring of key performance indicators is also advised to ensure ongoing success.

niekorzystny układ elektronowy, który jest siłą napędzającą przyłączenie kationu cukrowego, w wyniku czego powstaje chlorocynkowa pochodna 9-nukleozydu (**95**). Następnie w wyniku ataku anionu chlorkowego następuje oderwanie cząsteczki katalizatora i powstanie wolnego nukleozydu (**96**). Mechanizm ten jest analogiczny do procesu transglikozylacji zaproponowanego przez Watanabe, Hollenberga i Foxa dla metody metalu ciężkiego.

W podobny sposób można także przedstawić katalizę pod wpływem kwasu: *p*-toluenosulfonowego, dichlorooctowego lub amidosulfonowego. W tym przypadku następuje protonowanie atomu azotu N3 i powstanie związku typu **93**, a następnie przez przyłączenie reszty cukrowej i oderwanie protonu z pozycji N3 uzyskiwany jest 9-podstawiony nukleozyd oraz odtworzona zostaje cząsteczka katalizatora.

Ciekawe obserwacje przeprowadził Hosono⁷⁹ badając reakcję kondensacji 2,6-dichloropuryny z tetraacetylo- β -rybofuranozą w próżni, w temperaturze 150°C bez obecności katalizatora. W wyniku reakcji otrzymał on tylko β -anomer N9-podstawionego nukleozydu. Natomiast zastosowanie do kondensacji α -anomeru cukru prowadziło do otrzymania α - i β -anomerów w stosunku 2:3. Podobna reakcja 2,6-dichloropuryny z α -anomerem cukru przeprowadzona metodą stapiania wobec kwasu amidosulfonowego w czasie 1 minuty prowadzi do otrzymania jedynie β -nukleozydu. Jeżeli jednak synteza prowadzona była przez dłuższy czas (10 minut) dostarczała mieszaninę anomerów. W wyniku ogrzewania β -nukleozydu przez 10 minut, w temperaturze 150°C i obecności katalitycznych ilości kwasu amidosulfonowego otrzymano mieszaninę anomerów. Mechanizm tego procesu został zaproponowany przez Watanabe, Hollenberga i Foxa¹⁷.



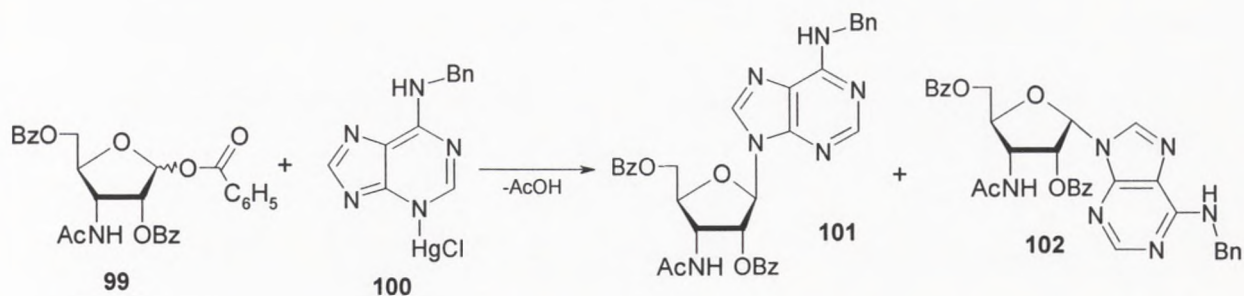
Schemat 28



W przypadku reakcji autokatalizy, w wyniku stapiania tetraacetylowanej rybozy z puryną w pierwszym etapie następuje przesunięcie pary elektronowej z wiązania C-O na atom tlenu (pozycja C1 rybozy), z równoczesnym atakiem pary elektronowej tlenu karbonylowego z grupy acetylowej z pozycji C2 na atom węgla C1 z wytworzeniem acyloksoniowego kationu cukrowego (11). Jon ten jest następnie atakowany przez anion purynowy z powstaniem β -nukleozydu.

Jeżeli jednak do reakcji użyty jest acetylowany α -cukier (98) to otrzymuje się kation karboksoniowy (49). Jon taki jest wynikiem przesunięcia pary elektronowej z atomu tlenu z jednoczesnym oderwaniem grupy acylowej i prowadzi do otrzymania α - i β -anomerów nukleozydu. Powstanie mieszaniny anomerów jest spowodowane tym, że taki płaski kation karboksoniowy (49) może być atakowany przez purynę z obu stron (z „góry” lub z „dołu”). Jon ten może też przejść w kation 1,2-acyloksoniowy dając w reakcji z puryną β -nukleozyd.

Nukleozyd typu 47 w wysokiej temperaturze i w obecności kwasowego katalizatora może ulec odwracalnemu procesowi rozerwania wiązania glikozydowego z powstaniem jonu cukrowego 11 lub 49 i aktywnej 2,6-dichloropuryny (analogicznej do związku 94). Następnie w wyniku rekombinacji komponentu cukrowego z aktywną puryną otrzymywana jest mieszanina α - i β -anomerów. Tak więc przekształcenie β -nukleozydów w α -pochodne w obecności kwasu amidosulfonowego staje się jasne. Zjawisko to może więc wyjaśnić obserwacje dokonane przez Bakera⁸², który przeprowadzając kondensację pochodnej chlorortęciowej N⁶-benzamidopuryny (100) z 1-O-acetylo-2,5-di-O-benzoilo-3-acetamido-3-deoksy-D-rybofuranozą (99) w obecności TiCl₄ otrzymał mieszaninę anomerów (schemat 29). Podobne obserwacje dokonał też Goldman⁸³, który prowadził reakcję tego samego komponentu cukrowego 99 z chlorortęciową pochodną 6-chloropuryny wobec TiCl₄ także otrzymując mieszaninę α - i β -anomerów.



Schemat 29

Jeżeli w reakcji bez użycia TiCl₄ zastosowano zamiast całkowicie blokowanej rybozy 1-halogenocukier obserwowano otrzymywanie tylko β -nukleozydów. Przyjęto więc, że obecność



TiCl₄ w reakcji puryny ze związkiem **99** powoduje powstanie β-nukleozydu, a następnie jego izomeryzację do α-pochodnej.

Powstawanie mieszaniny anomerów acetylowanych cukrów może być spowodowane reakcją autokatalizy. O takich przypadkach donoszono już wcześniej⁸⁵. Anomeryzacja może być więc odpowiedzialna za powstawanie mieszaniny anomerów w obecności pewnych kwasów Lewisa. Jednak Hosono badając proces anomeryzacji acetylowanych cukrów typu **97** lub **98** w obecności kwasu sulfaminowego nie obserwował przechodzenia anomeru α w β. Dopiero w wyniku reakcji przeprowadzonej wobec ZnCl₂ lub TiCl₄ otrzymywano oba anomery.

Metoda fuzji znalazła też zastosowanie do otrzymania nukleozydów pirymidynowych. Pfleiderer i Robins⁸⁶ przeprowadzając reakcję kondensacji 4-hydroksypirymidyny z acetylowaną pochodną rybofuranozy w obecności kwasowego katalizatora otrzymali 4-oxo-3-β-D-rybofuranozylo-dihydropirymidynę.

Metodę ta może być zastosowana tylko w przypadku, jeżeli wszystkie komponenty użyte do reakcji (zasada heterocykliczna, cukier, katalizator) będą ulegały stopieniu. Często stosuje się więc blokowane zasady, co powoduje, że temperatura topnienia tak modyfikowanego związku ulega obniżeniu w porównaniu z nieblokowanymi zasadami.

W wyniku reakcji kondensacji powstaje związek z przyłączonym cukrem w tej samej pozycji, w której znajdował się proton w trwałym termodynamicznie tautomerze zasady heterocyklicznej.

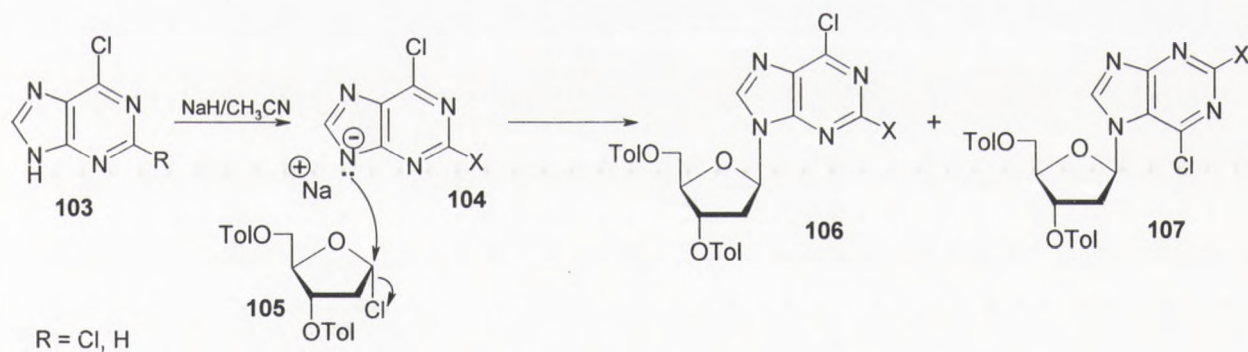


1.2.5. Metoda glikozylacji anionowej

Metoda ta została opracowana przez Kazimierczuka i współpracowników⁸¹. Znalazła zastosowanie w syntezie 2'-deoksynukleozydów, jest natomiast rzadko stosowana do otrzymywania rybonukleozydów. W reakcjach przeprowadzonych tą metodą uzyskiwane są praktycznie tylko β -anomery.

Wcześniej stosowane metody glikozylacji biegnące przez kation cukrowy, nie dawały dobrej stereoselektywnej kontroli w przypadku 2-deoksycukrów. W wyniku takich reakcji otrzymywano mieszaniny α - i β -anomerów.

W wyniku reakcji 1-chloro-2-deoksy-3,5-di-O-*p*-toluilo- α -D-erytro-pentafuranozy z sodową solą 6-chlorpuryny (**104**) w bezwodnym acetonitrylu Kazimierczuk⁸¹ otrzymał mieszaninę dwóch nukleozydów: 6-chloro-9-(2-deoksy-3,5-di-O-*p*-toluilo- β -D-erytro-pentafuranozylo)puryny (**106**) oraz N7-izomeru tego związku (**107**) (wydajności odpowiednio: 59% i 11%). Także w reakcji komponentu cukrowego **105** z solą sodową 2,6-dichlorpuryny uzyskał mieszaninę 7- i 9-regioizomerów (13%, 59%). Związki te zostały wyizolowane, oczyszczone na kolumnie chromatograficznej i odblokowane (MeOH/NH₃) dając wolne nukleozydy.



Schemat 30

Sól sodowa zasady heterocyklicznej otrzymywana jest w wyniku jej reakcji z wodorkiem sodu w acetonitrylu. Do tak przygotowanej soli dodawany jest α -halogenocukier. Atak anionu zasady na halogenozę powoduje wytworzenie wiązania N-glikozydowego z równoczesnym odejściem anionu chlorkowego. W wyniku reakcji powstają regioizomery, co spowodowane jest tym, że ładunek ujemny w części imidazolowej może być zdelokalizowany pomiędzy różnymi atomami azotu. Tak więc regioselektywność w tego typu reakcjach (dla pochodnych



purynowych) jest znacznie niższa niż w przypadku reakcji przebiegających przez kation cukrowy.

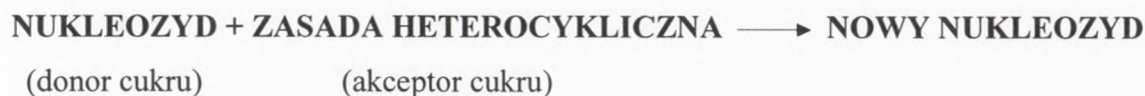
Zastosowanie tej metody w syntezie 2'-deoksynukleozydów nie wymaga stosowania wieloetapowych procedur, co znacznie przyspiesza pracę. Jednak istotną wadą jest to, że czyste α -halogenocukry są dość nietrwałe, a ich cena jest stosunkowo wysoka.

Metoda ta ma głównie zastosowanie w reakcjach puryn oraz deazapuryn. Jest to klasyczny przykład reakcji jednoetapowej S_N2 zachodzącej z inwersją konfiguracji na centrum anomerycznym.



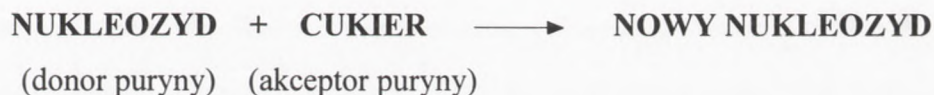
1.2.6. Metoda wymiany (transpurynacja, transglikozylacja)

W metodzie wymiany możemy wyróżnić dwa zasadnicze podejścia: transpurynacja i transglikozylacja. Ogólny schemat transglikozylacji można przedstawić następująco:



Przykładem takiej reakcji jest kondensacja N²,2',3',5'-tetraacetyloguanozyny z puryną. Migracja podstawnika cukrowego prowadzi do otrzymania nowego związku, 2',3',5'-triacetyloribozylpuryny.

Kolejnym podejściem w metodzie wymiany, na drodze otrzymania nukleozydu jest transpurynacja, gdzie „wymienianym” komponentem jest część cukrowa.



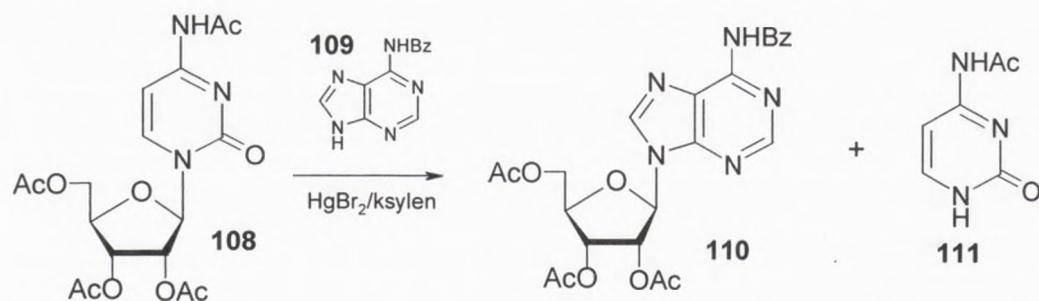
W obu przypadkach wymiana katalizowana jest przez kwasy: protonujące (np. *p*-TsOH) lub Lewisa (np. HgBr₂). Reakcja taka może też zachodzić pod wpływem rozpuszczalnika lub wysokiej temperatury (stapianie).

Zarówno w podejściu transpurynacji jak i transglikozylacji mamy do czynienia z powstawaniem nowego wiązania N-glikozydowego.

Zwiększające się zapotrzebowanie na naturalne nukleozydy jak i ich analogi sprawiły, że z szeregu dostępnych metod, synteza nukleozydów metodą wymiany staje się coraz częściej stosowana.

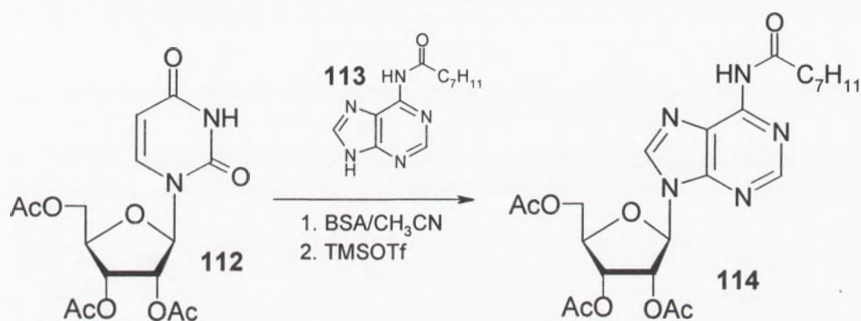
Pewnym jednak jej ograniczeniem jest to, że jako substrat stosowane mogą być nukleozydy o niskiej trwałości termodynamicznej. Przykładem tego typu reakcji jest transglikozylacja przeprowadzona przez Shimizu i Miyaki⁷³. W wyniku ogrzewania N⁴,2',3',5'-tetraacetylocytydyny (**108**) wobec HgBr₂ w obecności N⁶-benzoiloadeniny (**109**) otrzymano 2',3',5'-tri-O-acetylo-N⁶-benzoiloadenozyne (**110**) oraz acetylowaną pochodną cytozyny (**111**).





Schemat 31

Innym przykładem wymiany wychodzącej z nukleozydów pirymidynowych jest reakcja przeprowadzona przez Ecksteina i Imazawę⁸⁷. W wyniku transglikozylacji blokowanej urydyny (112) w obecności blokowanej adeniny i katalizatora TMSTF otrzymali oni, z dobrą wydajnością, odpowiednio blokową adenozyne (114).



Schemat 32

Jak już wcześniej wspomniano, początkowo sądzono, że zaproponowany i dobrze udokumentowany mechanizm transglikozylacji 3→9 dla pochodnych adeniny (wg Fox, Hollenberg i Watanabe¹⁷) może zostać uogólniony na inne nukleozydy purynowe. Przypuszczano więc, że proces ten będzie zachodził podobnie także w przypadku pochodnych guaninowych.

Shimizu i Miyaki¹⁸ przeprowadzając reakcję glikozylacji pochodnej chlorortęciowej N²-acetyloguaniny z 1-bromo-2,3,5-tri-O-benzoilo-D-rybofuranozą (50°C, 40 godzin) dostali zamiast oczekiwanego 3-izomeru tylko 7- i 9-regioizomery guanozyny. Śladowe ilości (0,2%) 3-benzylowej pochodnej obok 7- i 9-izomerów (wydajności odpowiednio 22% i 16%) otrzymali w reakcji alkilowania N²-acetyloguaniny bromkiem benzylu. W wyniku ogrzewania 3-benzyl-N²-benzoiloguaniny w temperaturze 100°C przez 24 godziny uzyskali tylko 7- i 9-izomery.

Na tej podstawie Shimizu i Miyaki wysnuli przypuszczenie, że w przypadku pochodnych guaniny ma miejsce transglikozylacja 3→9, zgodnie z wcześniej już przyjętym schematem.

The following table shows the results of the experiments conducted during the year 1901-02. The data is presented in a tabular format, with columns representing different experimental conditions and rows representing the results of individual trials. The table is organized into several sections, each corresponding to a different aspect of the study. The first section deals with the general characteristics of the material being tested, while the subsequent sections focus on the effects of various factors such as temperature, humidity, and time on the material's properties. The data is presented in a clear and concise manner, allowing for easy comparison and analysis of the results. The table is organized into several sections, each corresponding to a different aspect of the study. The first section deals with the general characteristics of the material being tested, while the subsequent sections focus on the effects of various factors such as temperature, humidity, and time on the material's properties.

Section	Condition	Result 1	Result 2	Result 3
General Characteristics	Temperature	25°C	30°C	35°C
	Humidity	50%	60%	70%
	Time	1 hour	2 hours	3 hours
Effect of Temperature	Temperature	25°C	30°C	35°C
	Humidity	50%	60%	70%
	Time	1 hour	2 hours	3 hours
Effect of Humidity	Temperature	25°C	30°C	35°C
	Humidity	50%	60%	70%
	Time	1 hour	2 hours	3 hours
Effect of Time	Temperature	25°C	30°C	35°C
	Humidity	50%	60%	70%
	Time	1 hour	2 hours	3 hours

The results of the experiments show that the material's properties are significantly affected by temperature, humidity, and time. The data indicates that the material's strength and durability decrease as temperature increases, humidity increases, and time increases. These findings are consistent with the theoretical expectations and provide valuable insights into the material's behavior under various conditions. The experiments were conducted under controlled conditions to ensure the accuracy and reliability of the results. The data is presented in a clear and concise manner, allowing for easy comparison and analysis of the results.

Według autorów proces ten zachodzi jednak znacznie szybciej niż w serii adeniny. Reakcja ta jest na tyle szybka, że 3-podstawiony nukleozyd występuje tylko w ilościach śladowych. Natomiast obserwowane powstawanie w wyniku reakcji 7-izomeru jest wynikiem odwracalnej transglikozylacji $7 \rightleftharpoons 9$ w obecności katalizatora i prowadzi do otrzymania mieszaniny 7- i 9-nukleozydów w stosunku 1:2. Shimizu i Miyaki wykazali, że 9-izomer jest trwalszym termodynamicznie izomerem i założyli, że cały proces w przypadku 6-oksopuryn przebiega według schematu $3 \rightarrow 7 \rightleftharpoons 9$.

Jednak dalsze badania procesu glikozylacji nukleozydów 6-oksopurynowych¹⁹⁻²³ nie potwierdziły zaproponowanego przez Shimizu i Miyaki mechanizmu.

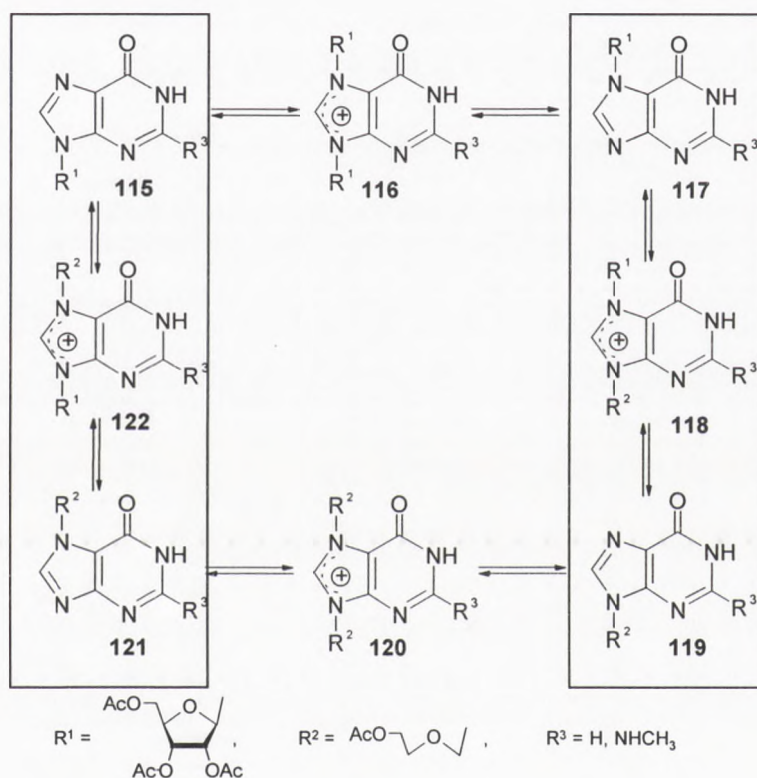
Kolejnym etapem na drodze poznania mechanizmu glikozylacji były badania przeprowadzone przez Dudycza i Wighta⁸⁸. Obserwowali oni, że podczas syntezy nukleozydów 6-oksopurynowych powstaje tylko mieszanina 7- i 9-regioizomerów. Przeprowadzając reakcję tetraacetyloribozy z persililowanymi zasadami: N²-acetyloguaniną i N²-bromhipoksantyną w acetonitrylu wobec estru trimetylosililowego kwasu trifluorosulfonowego (TMSOTf) jako katalizatora, otrzymali tylko odpowiednie 7- i 9-podstawione nukleozydy, nie obserwując tworzenia się 3-regioizomeru. Dudycz i Wight przeprowadzając swoje badania przy użyciu wysokorozdzielczej chromatografii ciekowej HPLC (ang. High Performance Liquid Chromatography) pokazali, że powstający w reakcji jako pierwszy 7-izomer, jest kinetycznym produktem tej reakcji. Związek ten ulega następnie transglikozylacji do odpowiedniego 9-podstawionego produktu. Także badania McGee, Martina i Verheydena⁸⁹, którzy przeprowadzili reakcję kondensacji 1,3-dipiwaloiolo-2-[(metylosulfinylo)metoksy]propanu z 9,N²-diacetyloguaniną w mieszaninie dimetylosulfotlenku (DMSO) z dimetyloformamidem (DMF) oraz obecności kwasu *p*-toluenosulfonowego (*p*-TsOH) jako katalizatora potwierdziły obserwacje, że powstający 7-izomer jest kinetycznym produktem reakcji, który następnie ulega transglikozylacji do trwalszego termodynamicznie 9-nukleozydu.

Dudycz i Wight⁸⁸ obserwowali także powstawanie dodatkowego produktu reakcji z wydajnością około 10%, który udało im się wyizolować i scharakteryzować jego strukturę jako 7,9-diribozylopurynę. Związek ten jest według autorów produktem pośrednim w reakcji transglikozylacji $7 \rightleftharpoons 9$. Mimo, że nie obserwowali oni podstawienia w pozycję N3, nie wykluczyli bardzo szybkiej transglikozylacji $3 \rightarrow 7$.

Dopiero Boryski⁹⁰ wyjaśnił i udowodnił mechanizm transglikozylacji nukleozydów 6-oksopurynowych. Przeprowadził on kondensację 2',3',5'-tri-O-acetylo-N²-acetyloguanozyny z eterem (2-acetoksyetylo)acetoksymetylowym, użytym w 10-krotnym nadmiarze. Reakcja prowadzona była w chlorobenzenie wobec kwasu *p*-TsOH jako katalizatora, w jej wyniku



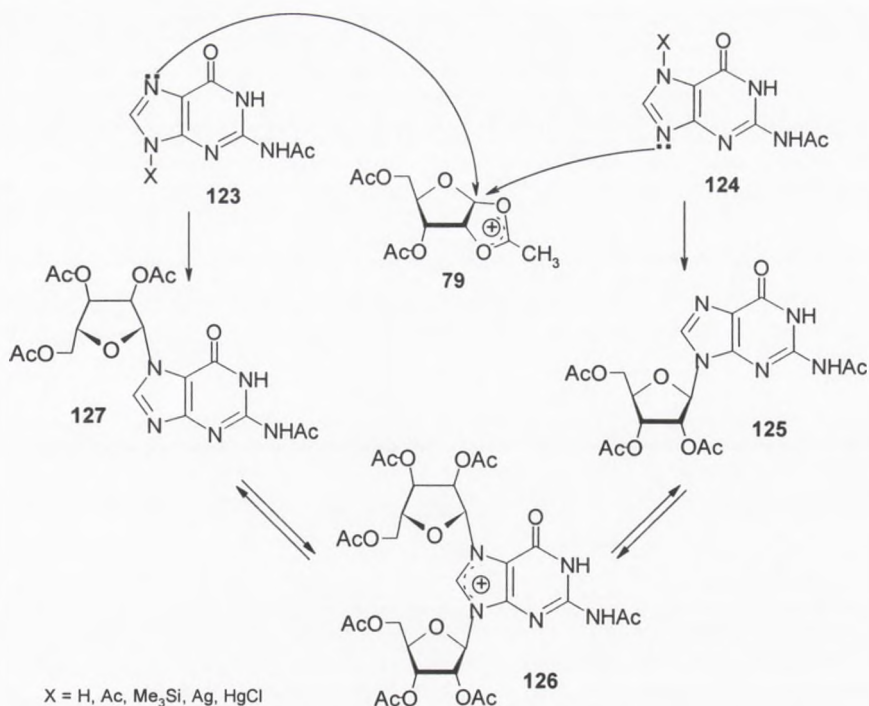
Boryski otrzymał jako główny produkt izomery 7- i 9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]-N²-acetyloguaniny oraz niewielkie ilości 7- i 9-peracetylowanych rybonukleozydów guaninowych (schemat 33). Badania kinetyczne przebiegu reakcji prowadzone były przy użyciu HPLC. Boryski zauważył, że jeśli prowadzi się reakcję przez krótki czas (około 2 minut) i wychodzi z 7-tetraacetyloguanozyny (**117**), produktem kinetycznym jest 9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]-N²-acetyloguanina (**119**). Natomiast jeżeli substratem jest 9-izomer tetraacetyloguanozyny (**115**) wtedy jako produkt kinetyczny tworzy się 7-podstawiona pochodna acyklowiru (**121**). Dalsze ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej przez 1,5 godziny prowadziło do otrzymania mieszaniny 7- i 9-regioizomerów acyklowiru z przewagą 9-podstawionego związku, bez względu na użyty jako substrat 7- czy 9-rybonukleozyd. Także i w tym przypadku nie obserwowano powstawania 3-izomeru.



Schemat 33

W oparciu o przeprowadzone przez siebie obserwacje Boryski^{90,91} zaproponował nowy mechanizm syntezy nukleozydów 6-oksopurynowych (schemat 34).

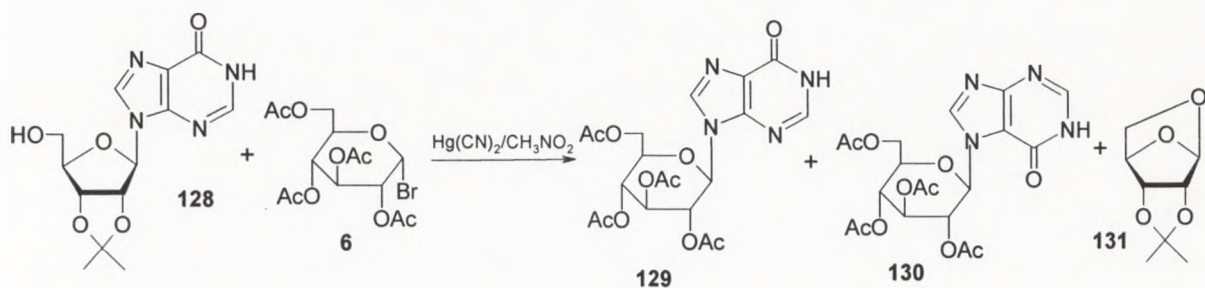




Schemat 34

Struktura kinetycznego produktu rybozylacji lub transglikozylacji zależy od podstawienia atomu azotu w heterocyklicznym substracie. Mechanizm zaproponowany przez Boryskiego opiera się na założeniu, że tylko atomy N7 i N9 pierścienia imidazolowego biorą udział w wymianie podstawnika. Wyłącznie one mogą służyć jako akceptory i donory reszt cukrowych⁹⁰.

Ważnym elementem w proponowanym mechanizmie jest nietrwały związek pośredni o strukturze 7,9-dirybozylpuryny (**126**). Taka forma czwartorzędowej soli zaproponowana została po raz pierwszy przez Lichtenthallera i Kitaharę⁹². W wyniku reakcji pochodnej inozyny (**128**) z tetraacetylobromoglukopiranozą (**6**) wobec Hg(CN)₂ w nitrometanie (metoda nitrometanowa), otrzymali oni 7- i 9-regioizomery tetraacetyloglukopiranozy (wydajności: 39%, 20%), co jest charakterystyczne dla nukleozydów 6-oksopurynowych. Był to pierwszy przykład wymiany reszty cukrowej w nukleozydzie (transpurynacji).



Schemat 35

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records for all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice to ensure transparency and accountability.

Furthermore, it is noted that regular audits are essential to identify any discrepancies or errors in the accounting system. This process helps in maintaining the integrity of the financial data and ensures compliance with relevant regulations.

In addition, the document highlights the need for clear communication between all stakeholders involved in the financial process. Regular meetings and reports should be conducted to keep everyone informed about the current financial status and any upcoming challenges.

It is also stressed that the financial team should always stay updated with the latest market trends and economic indicators. This knowledge is crucial for making informed decisions and adjusting the financial strategy accordingly.

Finally, the document concludes by stating that a strong financial foundation is key to the long-term success of any organization. By following these guidelines, the company can ensure its financial health and stability in the future.

The following table provides a summary of the key financial metrics for the current quarter, showing a steady increase in revenue and a decrease in expenses, which is a positive sign for the company's performance.

Overall, the financial report for this quarter is highly satisfactory. The company has successfully managed its resources and achieved its financial goals. We are confident that these trends will continue in the coming months.

We look forward to continuing our growth and success in the future. Thank you for your attention and support.

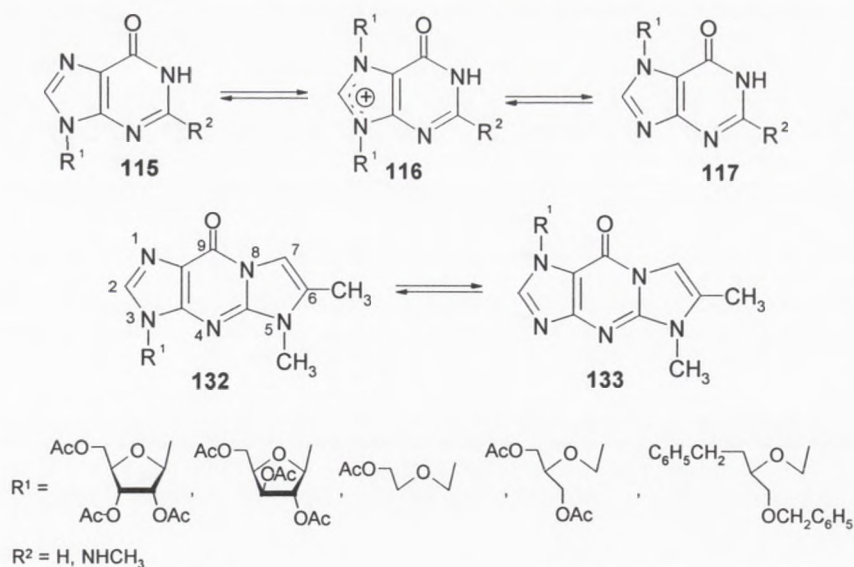
Lichtenthaller i Kitahara⁹² postulują, że w wyniku ataku nukleofilowego atomu azotu N7 puryny na kation cukrowy, powstaje 7,9-diglikozylopuryna, która jest produktem pośrednim, będącym czwartorzędową solą. Forma ta następnie ulega rozpadowi do 7-podstawionej pochodnej nukleozydu, który izomeryzuje do 9-regioizomeru. Wynikiem tej transformacji jest powstanie mieszaniny izomerów. Rozerwanie pierwotnego wiązania N-glikozydowego między rybozą a atomem azotu N9 ułatwia wewnątrzcząsteczkowy atak pary elektronowej nieblokowanej grupy 5'-hydroksylowej. Zaproponowany przez autorów mechanizm jest pierwszą tego typu interpretacją, gdzie zakładanym produktem pośrednim jest 7,9-diglikozylopuryna, a nie 3,9-dipodstawiony związek, jak uważano dotychczas.

Taki związek o strukturze czwartorzędowej soli został wyizolowany i scharakteryzowany przez Dudycza i Wrighta²¹ dla pochodnych rybonukleozydów. Natomiast Boryskiemu i Manikowskiemu⁹¹ udało się w pełni scharakteryzować dipodstawiony związek przejściowy w serii pochodnych acykloguanozyny.

Proces transglikozylacji $3 \rightarrow 9$ jak i $7 \rightleftharpoons 9$ zachodzi pod wpływem katalizatorów takich jak: kwas Lewisa (HgBr_2 , ZnCl_2 , FeCl_3); Friedla-Craftsa ($(\text{CH}_3)_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) lub też kwasów protonujących (monohydrat kwasu *p*-TsOH, HBr, H_2SO_4).

Zaobserwowana przez Boryskiego i Golankiewicz^{19,93,94} migracja podstawnika cukrowego pomiędzy atomami azotu N7 i N9 puryny podczas stapiania całkowicie blokowanych nukleozydów 6-oksopurynowych ma charakter procesu międzycząsteczkowego. W wyniku ogrzewania 7-izomeru acyklowiru w 230°C przez 5 minut otrzymano 9-nukleozyd z wydajnością 55%. Proces ten przebiega przez związek przejściowy 7,9-diglikozylopurynę (**120**). Blokowane nukleozydy 6-oksopurynowe ulegają w wysokiej temperaturze ($190\text{-}250^\circ\text{C}$) odwracalnej $7 \rightleftharpoons 9$ izomeryzacji bez użycia katalizatora. Reakcja ta w większości przypadków ma charakter całkowicie odwracalny, w wyniku czego ustala się stan równowagi między 7- i 9-izomerami w przybliżeniu 1:1.





Schemat 36

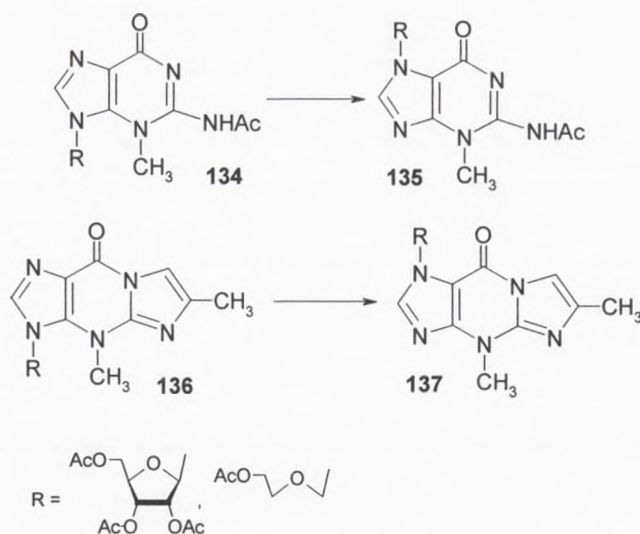
Niestety w przypadku odwracalnej transglikozylacji $7 \rightleftharpoons 9$ występuje brak regioselektywności. Wydajność powstawania pożądanego 9-nukleozydu zależy od zastosowanego katalizatora, rozpuszczalnika, temperatury oraz czasu reakcji. Także duży wpływ na regioselektywność ma zastosowany komponent cukrowy.

Boryski²³ zaproponował następującą systematykę typów reakcji transglikozylacji nukleozydów purynowych, którą można podzielić na dwie grupy:

- „typ adeniny” – mechanizm tego typu reakcji przebiega według mechanizmu zaproponowanego przez Watanabe, Hollenberga i Foxa¹⁷. Produktem kinetycznym w tym przypadku jest 3-glikozylpuryna, a termodynamicznym 9-nukleozyd. Proces transglikozylacji $3 \rightarrow 9$ zachodzi w sposób nieodwracalny przez 3,9-diglikozylpurynę.
- „typ guaniny” – tego typu reakcje są charakterystyczne dla związków 6-oksopurynowych. Struktura produktu kinetycznego zależy od podstawienia w substracie. W wyniku transglikozylacji powstaje mieszanina regioizomerów w stosunku około 1:1, a cały odwracalny proces zachodzi przez nietrwałą formę 7,9-diglikozylpuryny.

Proces transglikozylacji w przypadku nukleozydów 6-oksopurynowych może mieć też charakter nieodwracalny. Przykładem tego typu reakcji jest termiczna transglikozylacja $9 \rightarrow 7$ pochodnych 3-podstawionych 6-oksopuryn^{95,96} (schemat 37).



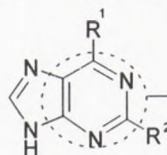


Schemat 37

Z badań przeprowadzonych przez Boryskiego i Golankiewicz wynika, że w przypadku całkowicie blokowanych pochodnych 3-metyloguanozyny (**134**) i wyozyzny (rybonukleozyd zasady Y) (**136**) podczas izomeryzacji 9-nukleozyd przechodzi ilościowo w 7-regioizomer. Można więc wnioskować, że 3-podstawione pochodne guanozyny są znacznie bardziej trwałe jako 7-nukleozydy niż 9-izomery.

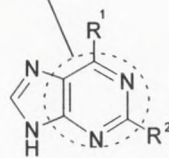
W przypadku adeniny mamy do czynienia z pełną aromatycznością pierścienia pirymidynowego. W tego typu związkach następuje nieodwracalna transglikozylacja 3 \rightarrow 9. Natomiast w przypadku pochodnych guaninowych, pierścień pirymidynowy nie posiada pełnego układu aromatycznego i ma tu miejsce odwracalna transglikozylacja 7 \leftrightarrow 9.

Pochodne adeniny

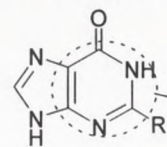


- 138** $R^1 = \text{NH}_2, R^2 = \text{H}$
139 $R^1 = \text{CH}_3, R^2 = \text{H}$
140 $R^1 = \text{NH}_2, R^2 = \text{NH}_2$
141 $R^1 = R^2 = \text{Cl}$

Pełna aromatyczność.
Nieodwracalna transglikozylacja N3 \rightarrow N9



Pochodne guaniny



- 144** $R = \text{NH}_2$
145 $R = \text{H}$

- 142** $R^1 = \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2, R^2 = \text{F}$
143 $R^1 = \text{CON}(\text{C}_6\text{H}_5)_2, R^2 = \text{NH}_2$

Brak pełnej aromatyczności.
Odwracalna transglikozylacja N7 \leftrightarrow N9

Schemat 38



Przez modyfikację struktury elektronowej części pirymidynowej można spowodować, że pierścień ten w pochodnej guanozynowej będzie posiadał pełną aromatyczność. Robins i współpracownicy⁹⁷ zmieniając układ karbonylowy guaniny w pozycji C6 na enolowy (143) uzyskali pochodną adeniny. Mechanizm transglikozylacji w tym przypadku zachodził będzie według „typu adeniny”. Tak więc proces ten odnosi się do wszystkich związków, które posiadają pełen układ aromatyczny w części pirymidynowej.

Jednak taka grupa blokująca powinna posiadać szereg właściwości: odporność na warunki reakcyjne, łatwość wprowadzania a następnie usuwania. Znalezienie i wprowadzenie odpowiedniej grupy w pozycje C6=O nukleozydów 6-oksopurynowych okazało się niezbyt proste.

Hata i współpracownicy⁹⁸ zastosowali do zablokowania grupy C6=O chlorek difenylokarbamoilowy w obecności diizopropylloetyloaminy. Spowodowało to wprowadzenie trwałej modyfikacji i zmianę układu elektronowego w purynie. Przez zastosowanie takiej modyfikacji uzyskuje się wysoką regioselektrywność, powstaje praktycznie tylko 9-izomer.

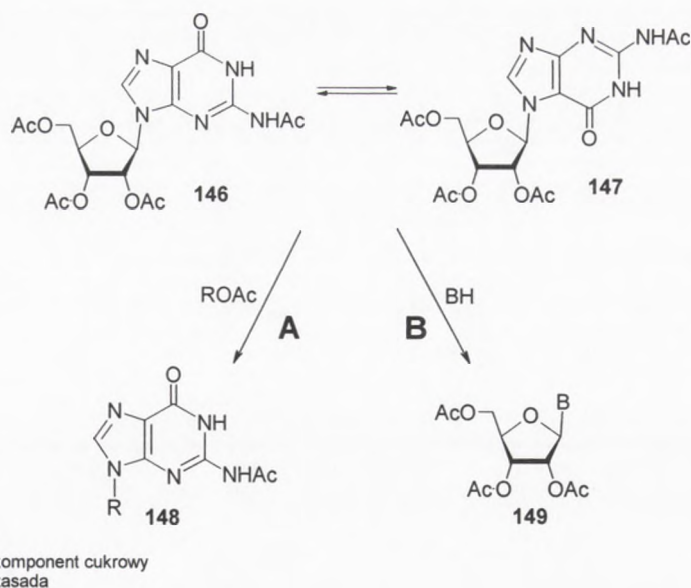
Można zatem wnioskować, że to struktura elektronowa części zasadowej nukleozydu decyduje o przebiegu procesu transglikozylacji, co daje możliwość kontrolowania reakcji przez wprowadzenie odpowiedniej modyfikacji.

Jeżeli w wyniku reakcji powstanie niepożądany 7-izomer tetraacetyloguanozyny to przy pomocy chlorku difenylokarbamoilowego można go szybko przeprowadzić w pochodną 6-difenylokarbamoilową. Następnie po silylowaniu i ogrzewaniu w toluenie (80°C) wobec TMSOTf związek ten można przekształcić w 9-nukleozyd. Dla tego typu pochodnej proces wymiany zachodzi w sposób nieodwracalny przez transglikozylację 7→9.

Jak już wcześniej wspomniano, w metodzie wymiany jako substrat może być zastosowany nukleozyd o stosunkowo niskiej trwałości termodynamicznej. Do tego typu związków zaliczane są nukleozydy 6-oksopurynowe (np. guanozyna, hiopksantyna). Jednak niezbędnym czynnikiem, aby taka wymiana mogła zajść jest utworzenie kationu cukrowego, który może powstać w wyniku działania katalizatora lub wysokiej temperatury.

Tak więc najczęściej stosowanym substratem w metodzie wymiany jest tetraacetyloguanozyna, której dodatkowym atutem jest też stosunkowo niska cena. Związek ten może być z powodzeniem stosowany zarówno w transpurynacji jak i transglikozylacji (schemat 38).

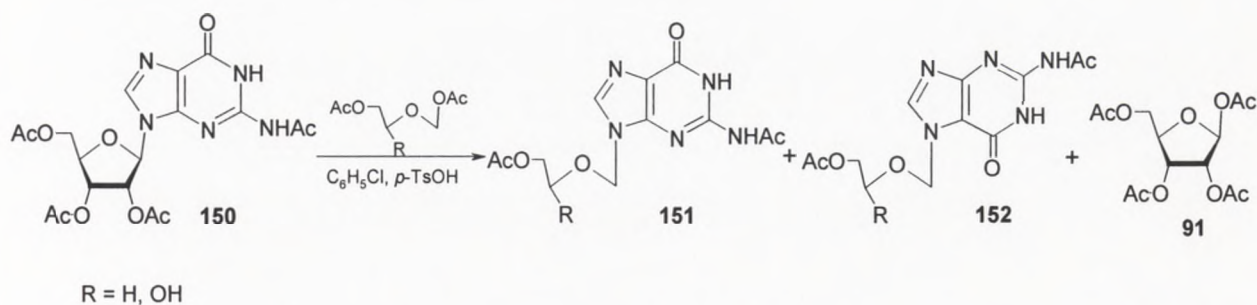




Schemat 39

Jeżeli do mieszaniny 7- i 9-izomerów tetraacetyloguanozyny, które znajdują się w termodynamicznej równowadze dodany zostanie nowy całkowicie acetylowany komponent cukrowy (ROAc), to uzyskany zostanie nowy nukleozyd guaninowy (transpurynacja – droga **A**). Natomiast przez dodanie nowej zasady heterocyklicznej (BH) uzyskany zostaje nowy rybonukleozyd (transglikozylacja – droga **B**).

Niestety, jeżeli peracetylowaną guanozynę podda się transpurynacji to jako produkt otrzymana będzie zawsze mieszanina izomerów zarówno produktów jak i substratów, która jest trudna do rozdzielenia metodami chromatograficznymi. Dopiero zastosowanie nadmiaru nowego komponentu cukrowego przesuną równowagę reakcji w kierunku 7- i 9-regioizomerów nowego nukleozydu. Przykładem tego typu podejścia jest reakcja tetraacetyloguanozyny (**150**) z nadmiarem estru (2-acetoksyetylo)acetoksymetylowego w obecności monohydratu kwasu *p*-toluenosulfonowego w chlorobenzenu (temperatura wrzenia).



Schemat 40



Produktami ubocznymi w tym przypadku są: 7-izomer (**152**) i tetraacetyloriboza (**91**). Niepożądany związek **152** można przeprowadzić w 9-izomer przez ogrzewanie w 230°C przez 5 minut, proces ten zachodzi z wydajnością 51%.

W celu stosowania mniej drastycznych warunków reakcji Azuma i Isono⁹⁹ używali do reakcji wymiany katalizatorów typu Friedla-Craftsa oraz siliowanych zasad heterocyklicznych, które są lepszymi akceptorami reszt cukrowych niż same zasady.

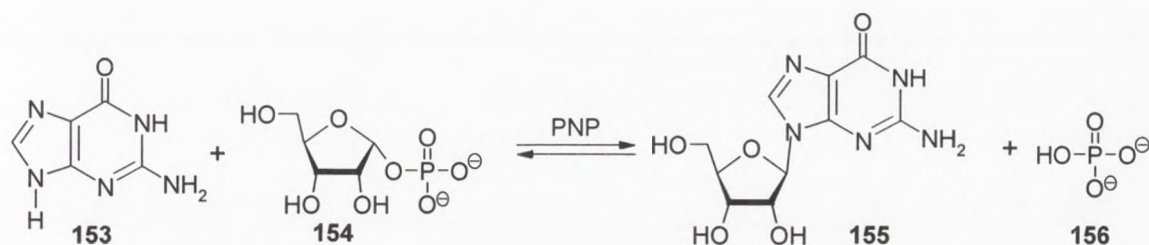
Wydajność transglikozylacji jest zazwyczaj większa jeżeli proces wymiany podstawnika zachodzi z puryny na pirymidynę, niż pirymidyna → puryna. Zjawisko to można wytłumaczyć tym, że trwałość wiązania N-glikozydowego jest większa w przypadku pirymidyn.

Jak więc widać, aby utworzyć nowy nukleozyd nie trzeba jedynie przeprowadzać kondensacji komponentu cukrowego z „wolną” zasadą heterocykliczną, także dobrym donorem kationu cukrowego lub zasady heterocyklicznej może być inny nukleozyd.



1.2.7. Metody enzymatyczne

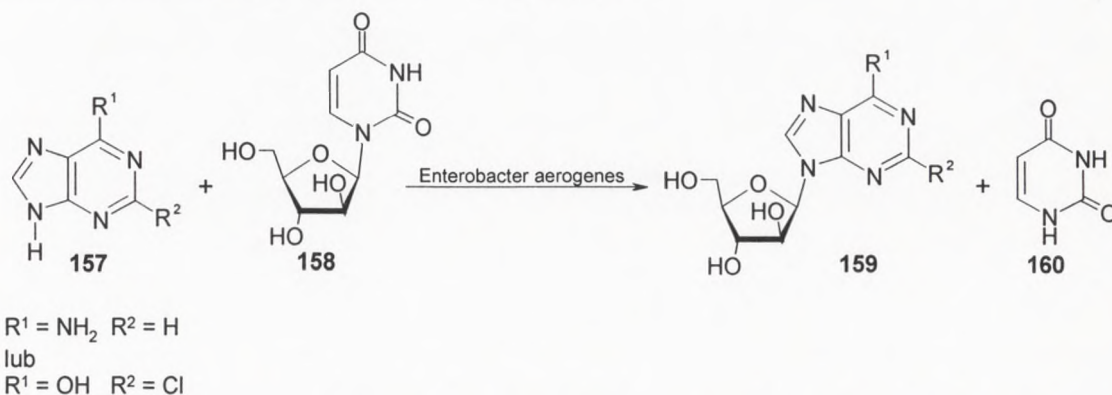
Pierwszym podejściem w syntezie nukleozydów metodami enzymatycznymi była reakcja przeprowadzona przez Kalckara¹⁰⁰ w 1947 roku (schemat 41). W wyniku reakcji nieblokowanej guaniny (**153**) z 1- α -fosforanem-D-rybozy (**154**) katalizowanej fosforylazą nukleozydów purynowych (PNP) otrzymał nieblokowaną guanozynę (**155**).



Schemat 41

Reakcja przeprowadzona w takich warunkach zachodzi z bardzo dużą regio- i stereoselektywnością. Jednak możliwość katalizowania przez PNP reakcji odwrotnej do tworzenia pożądanego nukleozydu powoduje, że uzyskiwane wydajności są stosunkowo niskie.

Kolejnym podejściem wykorzystującym reakcje enzymatyczne w syntezie nukleozydów była praca Morisawy¹⁰¹ opublikowana w roku 1980. W latach 80-tych metody enzymatyczne rozwijały się głównie jako metody wymiany, w których nukleozydy stosowane były jako donory reszt cukrowych. Grupa Morisawy¹⁰⁶ przeprowadzała reakcje enzymatycznej wymiany zasad heterocyklicznych (schemat 42). W wyniku reakcji nieblokowanego arabinouracylu (**158**) z adeniną przeprowadzonej w buforze fosforanowym (KH_2PO_4) o pH 7 wobec fosforylasy nukleozydów purynowych ze szczepu bakteryjnego *Enterobacter aerogenes* (temperatura 60°C), otrzymali arabinoadenozynę (**159**) z 92% wydajnością.

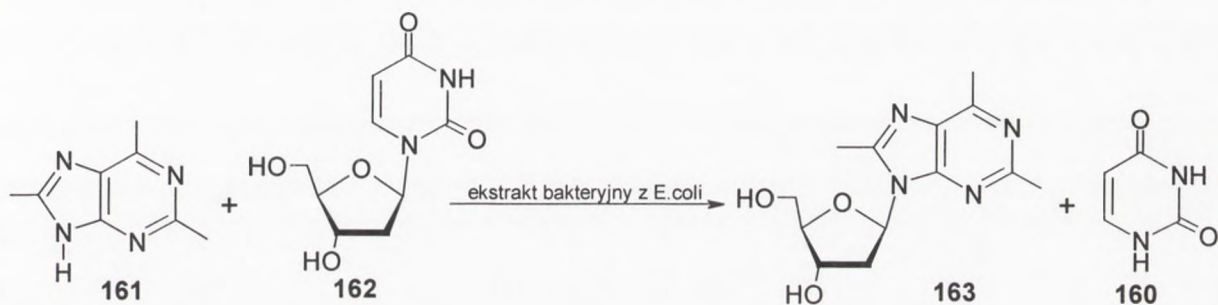


Schemat 42

[The following text is extremely faint and illegible due to the quality of the scan. It appears to be a list of articles or a table of contents, but the specific content cannot be transcribed.]

Stosowane w takich reakcjach enzymy typu PNP posiadają różną specyficzność w zależności od ich pochodzenia. Zaobserwowano, że enzym PNP pochodzący z *Enterobacter aerogenes*, który używany jest z powodzeniem do transarabinozylacji okazał się nieaktywny w przypadku, jeżeli komponent cukrowy posiadał grupę aminową w pozycji 2'. W reakcji transglikozylacji 2'-amino-2'-deoksyguanozyny z hipoksantyną aktywny okazał się ekstrakt bakteryjny z *Erwina herbicola*¹⁰².

Holy i Votruba^{103,104} przeprowadzili szereg reakcji transglikozylacji enzymatycznych, katalizowanych enzymem z ekstraktu bakteryjnego uzyskanego z mutantów *Escherichia coli*. W wyniku reakcji 2'-deoksyurydyny (162) z zasadami purynowymi odpowiednio podstawionymi w pozycjach 2, 6 i 8 (161) badacze otrzymali nowe nukleozydy (163) oraz „wolny” uracyl.



Schemat 43

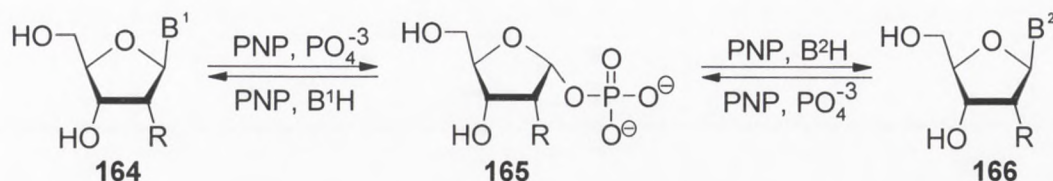
2'-Deoksyurydyna jak i jej analogi okazały się dobrymi donorami reszt cukrowych. Stwierdzono, że są one bardzo dobrymi substratami w tego typu reakcjach enzymatycznych. Uzyskiwane wydajności w wyniku transglikozylacji z większością zasad purynowych były dość wysokie (50-70%). Także metoda z wykorzystaniem 2'-deoksyurydyny charakteryzowała się dużą regio- i stereoselektywnością, w wyniku której otrzymywano wyłącznie N9-β-nukleozydy. Tylko dla nielicznych związków typu eteno lub dezaanalogów puryn wydajności enzymatycznej transglikozylacji były niższe lub też reakcja nie zachodziła, a czasem powstawał 7-izomer.

Holy i Votruba przeprowadzili także enzymatyczne reakcje transglikozylacji otrzymując jako produkty 2'-deoksynukleozydy pirymidynowe. Również w tym przypadku jako substrat badacze użyli deoksyurydyny. W wyniku reakcji otrzymywali wyłącznie β-anomery z wydajnością około 60%. Jeżeli jednak zasada pirymidynowa posiadała objętościowy podstawnik lub grupę elektronoszącą w pozycji 5 wówczas reakcja nie zachodzi. Zauważyli oni, że poza 2'-deoksyurydynam także 2',3'-dideoksyurydyna jest dobrym substratem. Natomiast w przypadku arabinonukleozydów, azydotymidyny (AZT) i związków, które



w pozycji 2' posiadały podstawniki takie jak -OMe, -NH₂ i -Cl nie obserwowano transglikozylacji katalizowanej ekstraktem z *Escherichia coli*. Także wprowadzenie w pozycje 2 i 3 rybozy innego podstawnika ma duży wpływ na wydajność reakcji.

Mikhailopulo¹⁰⁵ i Morisawa¹⁰¹ zaproponowali dwuetapowy mechanizm transglikozylacji enzymatycznej zachodzący wobec fosforylasy nukleozydów purynowych (schemat 44).



R = H, OH
B = zasada heterocykliczna

Schemat 44

Pierwszym etapem proponowanego mechanizmu jest degradacja wyjściowego nukleozydu (**164**) do wolnej zasady (B¹H) i 1-α-fosforanu cukru (**165**). Niezbędnym elementem w tym procesie jest obecność fosforanów, reakcje tego typu najczęściej przeprowadza się w buforach fosforanowych. W drugim etapie związek **165** reaguje z nową zasadą heterocykliczną (B²H), w wyniku czego powstaje nukleozyd **166**. Transglikozylacja tego typu ma charakter całkowicie odwracalny, co powoduje, że wydajność reakcji tworzenia pożądanego nukleozydu jest niezbyt wysoka i zależna od stanu równowagi między związkami **164** i **166**. Powstający w wyniku reakcji 1-α-fosforan cukru jest związkiem pośrednim, stanowiącym cenne źródło reszty cukrowej w innych reakcjach enzymatycznych.

Tak jak w każdej innej metodzie i w tym przypadku występują pewne ograniczenia. Dużą trudność sprawia uzyskanie odpowiednio czystych i aktywnych preparatów enzymatycznych, które nie są dostępne komercyjnie. Sprawia to, że ich otrzymanie jest pracochłonne i dość drogie.

Holy i Votruba¹⁰³ zaobserwowali, że reakcje transglikozylacji z udziałem enzymów zachodzą łatwiej w przypadku puryn niż pirymidyn.

Reakcje prowadzone metodą enzymatyczną cechują się jednak bardzo wysoką stereo- i regioselektywnością. Niestety jej ograniczeniem jest wysoka specyficzność substratowa enzymów w stosunku do pewnych tylko nukleozydów, co utrudnia wykorzystanie jej do syntezy analogów nukleozydowych.



1.3. Stereoselektywność w syntezie nukleozydów

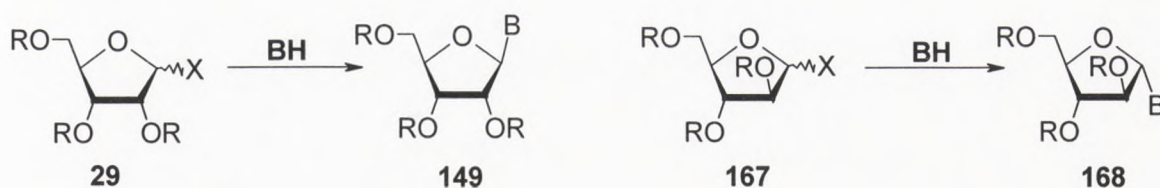
1.3.1. Glikozylacja w serii rybofuranozy

Ważnym aspektem podczas przeprowadzania reakcji glikozylacji jest otrzymanie zaplanowanego nukleozydu z wysoką wydajnością oraz regio- i stereoselektywnością. Niestety często zdarza się, że w wyniku reakcji chemicznej otrzymywane są mieszaniny nie tylko różnych regioizomerów, ale również α - i β -anomerów produktów.

Badacze przez długi czas zastanawiali się nad przyczyną oraz mechanizmem powstawania nienaturalnych α -nukleozydów.

W 1949 roku Bristow i Lythgoe¹⁰⁷ przedstawili pierwsze próby wytłumaczenia powstawania głównie β -anomerów w serii rybonukleozydów. Według nich 1-halogenowe pochodne cukrów stosowane do reakcji posiadają konfigurację α na atomie anomerycznym, a cały proces kondensacji zasady heterocyklicznej z komponentem cukrowym zachodzi według mechanizmu S_N2 . W wyniku tego następuje inwersja konfiguracji prowadząc do powstania β -nukleozydów. Jednak jak się okazało, założenie to było błędne, ponieważ stosowane w reakcji glikozylacji 1-halogenozy są najczęściej mieszaniną α - i β -anomerów.

Dopiero Baker¹⁰⁸ po przeprowadzeniu szeregu reakcji zaobserwował, że główną rolę w końcowej dystrybucji anomerów ma konfiguracja na atomie C2 komponentu cukrowego. Zauważył, że zasada heterocykliczna przyłącza się po przeciwnej stronie pierścienia cukrowego w stosunku do podstawnika acyloksylowego znajdującego się w pozycji C2. Jest to więc synteza stereokontrolowana. Struktura substratu determinuje stereoselektywny przebieg reakcji. Reguła 1,2-*trans*-podstawienia w przypadku 2-O-acylowych cukrów nosi nazwę zasady Bakera.



R = CH₃CO, C₆H₅CO

X = chalogen

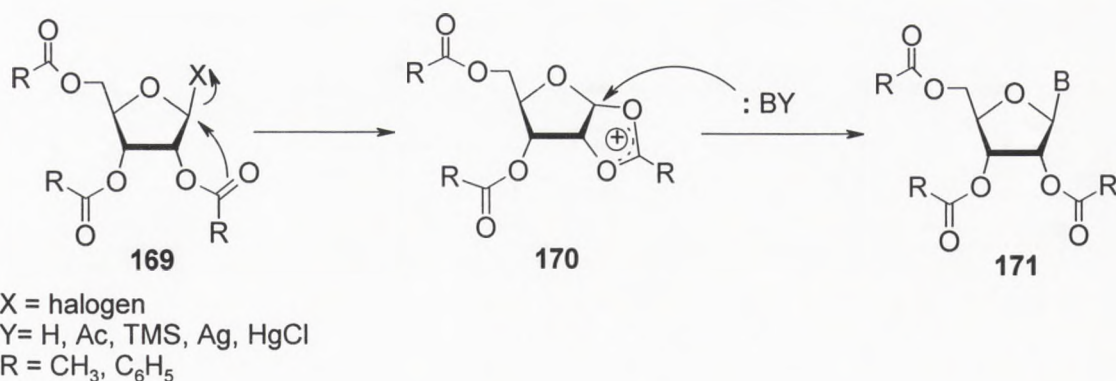
B = zasada heterocykliczna

Schemat 45



Tak więc jeżeli do kondensacji użyty jest komponent cukrowy z podstawnikiem na atomie węgla C2 skierowanym „w dół” (29), wówczas otrzymywany jest β -nukleozyd (149). Jeżeli natomiast do reakcji zastosujemy cukier z podstawnikiem na atomie C2 skierowanym „w górę” (167) to jako główny produkt otrzymamy α -anomer (168).

Jak już wcześniej wspomniano, powstający kation cukrowy ma zasadniczy wpływ na stereochemię reakcji. Według interpretacji Watanabe, Hollenberga i Foxa¹⁷ z 1974 roku, w wyniku oddysocjowania anionu halogenkowego od 1-halogenorybozy zostaje utworzony kation cukrowy, co przedstawiono w rozdziale 1.2.2. (schemat 16). W przypadku β -anomeru cukru (169) pod wpływem wewnątrzcząsteczkowego oddziaływania grupy acylowej powstaje cykliczny 1,2-acyloksoniowy kation cukrowy (170). Ze względów sterycznych kation ten może być zaatakowany przez atom azotu zasady heterocyklicznej tylko „z góry”, co prowadzi do otrzymania β -anomeru nukleozydu. Natomiast w przypadku α -anomeru halogenozy w wyniku dysocjacji halogenu od halogenozy powstaje płaski kation cukrowy (49). Ze względów stereoelektronowych nie jest możliwe powstanie acyloksoniowego kationu cukrowego. Kation karboksoniowy powstaje w wyniku ataku wolnej pary elektronowej, pochodzącej z atomu tlenu z pierścienia rybozy. Ten płaski kation może być atakowany z równym prawdopodobieństwem „z góry” jak i „z dołu”. W wyniku tego powstaje mieszanina anomerów. Kation karboksoniowy może jednak ulec przegrupowaniu do 1,2-acyloksoniowego kationu cukrowego, który ma bardziej stabilną strukturę, dodatni ładunek jest rozmyty na większą liczbę atomów. Cykliczna forma kationu cukrowego znajduje się więc w przewadze co prowadzi do powstawania w większej ilości β -anomeru nukleozydu. Ilość formy 49 decyduje o powstaniu produktu przyłączenia zasady heterocyklicznej typu 1,2-*cis*-podstawionej. Istnienie kationu cukrowego jako jonu acyloksoniowego (170) dobrze tłumaczy regułę Bakera. Struktura przestrzenna uniemożliwia więc atak zasady heterocyklicznej z powstaniem α -nukleozydu.



Schemat 46

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

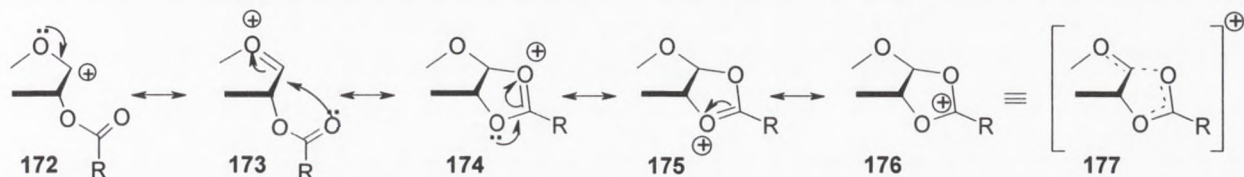
In the second section, the author outlines the various methods used to collect and analyze the data. This includes both primary and secondary data collection techniques. The primary data was gathered through direct observation and interviews with key personnel. Secondary data was obtained from internal company reports and industry publications.

The third section details the statistical analysis performed on the collected data. Various tests were conducted to determine the significance of the findings. The results indicate a strong correlation between the variables studied, suggesting that the observed trends are not merely coincidental.

Finally, the document concludes with a series of recommendations based on the research findings. These suggestions are aimed at improving operational efficiency and reducing costs. The author believes that implementing these measures will lead to a more streamlined and profitable organization.

Jednak cykliczny jon acyloksoniowy może powstać tylko jeżeli w pozycji C2 komponentu cukrowego znajduje się grupa acylowa.

Według Boryskiego¹¹² kation cukrowy w przypadku 2-acylocukrów powinien być rozpatrywany jako hybryda rezonansowa (177) kilku struktur granicznych (172-176), gdzie ładunek dodatni zlokalizowany jest na 5 atomach równocześnie. Tak więc kation karboksoniowy reprezentowany jest przez struktury 172-173, natomiast kation acyloksoniowy przedstawiają struktury 174-176.



R = CH₃, C₆H₅

Schemat 47

W serii 2-acylocukrów stereochemia glikozylacji wymuszona jest więc przez przestrzenną strukturę kationu cukrowego. W przypadku rybozydów w wyniku 1,2-*trans*-podstawienia powstają β-anomery, natomiast dla arabinocukrów otrzymywane są α-anomery. Zasada heterocykliczna przyłącza się więc po przeciwnej stronie do znajdującej się w pozycji C2 grupy acylowej.

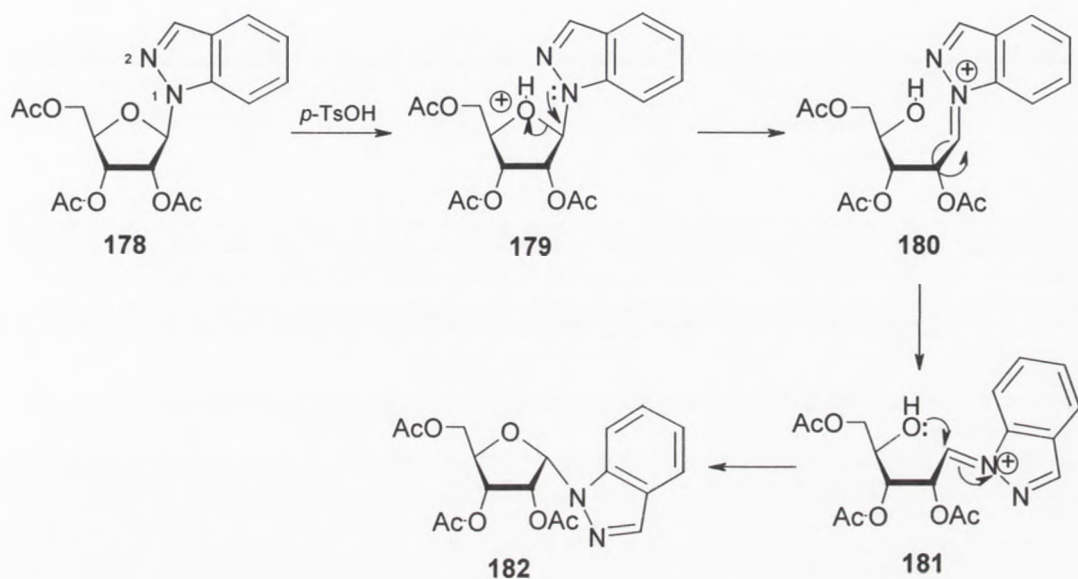
Zaobserwowano, że trwałość acyloksoniowego kationu cukrowego wzrasta, jeżeli w pozycji C2 znajduje się podstawnik zwiększający efekt indukcyjny według następującej kolejności: -COCH₃ < -COC₆H₅ < -COC₆H₄CH₃¹⁰⁹. Z badań przeprowadzonych przez Bakera, Kissmana i Pidacksa¹¹⁰ wynika, że reakcja kondensacji tetrabenzoilowej pochodnej rybofuranozy z blokową adeniną zachodzi z większą wydajnością niż w przypadku użycia do reakcji tetraacetylorybofuranozy.

Także wielkość pierścienia cukrowego ma pewien wpływ na przebieg reakcji¹¹¹. Zauważono, że w miarę zwiększania pierścienia proces tworzenia kationu cukrowego jest wolniejszy, co wpływa na szybkość i wydajność reakcji.

Czasem jednak obserwuje się powstawanie produktów ubocznych o strukturze 1,2-*cis* nukleozydów, nawet gdy komponent cukrowy posiada podstawnik acylowy w pozycji C2. Tego typu reakcje prowadzące do powstania α-anomerów w serii pochodnych rybofuranozydowych są rezultatem anomeryzacji, która uważana jest jako reakcja wtórna^{23,11}. Mechanizm takiej reakcji został zaproponowany przez Boryskiego¹¹³ na przykładzie anomeryzacji rybonukleozydów indazolowych (schemat 48). Anomeryzacja ta jest procesem, który zachodzi



już po przyłączeniu podstawnika cukrowego, a katalizowana jest przez kwasy stosowane jako katalizatory do wytwarzania kationu cukrowego. Proces ten zachodzi przez otwartopierścieniowe związki pośrednie. W wyniku protonowania tlenu znajdującego się w pierścieniu rybozy następuje rozerwanie wiązania C1'-O i otwarcie pierścienia z powstaniem zasady Shiffa (**180**). Następnie przez rotację wokół wiązania C1'-C2' oraz recyklizację pierścienia cukrowego powstaje produkt 1,2-*cis* podstawiony, czyli α -anomer nukleozydu (**182**).



Schemat 48

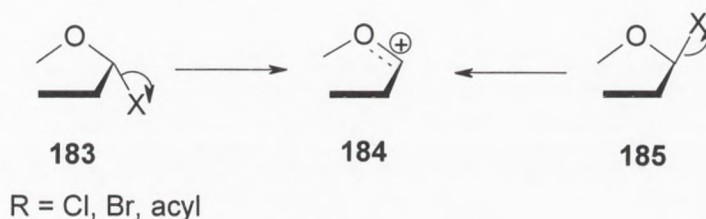
Zaobserwowano, że anomeryzacja związana jest z zasadowością aglikonu, w przypadku 1-ryboindazoli mamy do czynienia z zasadami o trzy rzędy słabszymi niż guanozyna. Tak więc im wyższa zasadowość nukleozydu tym mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia anomeryzacji. W przypadku 1-ryboindazolu, który jest słabszą zasadą, następuje protonacja na atomie tlenu, natomiast w przypadku guanozyny protonowany jest atom azotu N7, co nie prowadzi do anomeryzacji.



1.3.2. Glikozylacja w serii 2-deoksycukrów

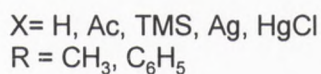
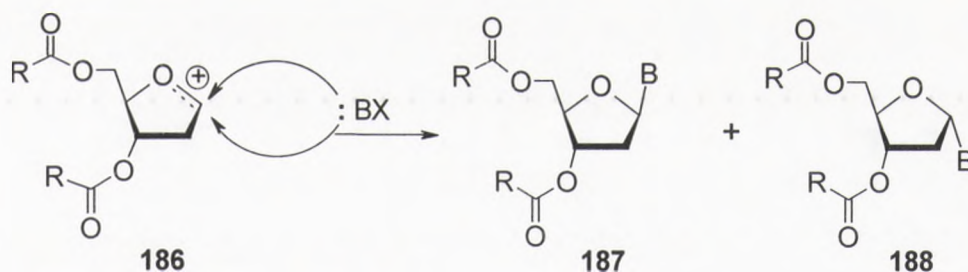
Jeżeli w pozycji C2 cukru nie ma podstawnika acylowego, to podczas syntezy nukleozydu z udziałem takiego komponentu cukrowego reakcja nie zachodzi stereoselektywnie, a w jej wyniku powstaje mieszanina anomerów.

W tym przypadku położenie podstawnika przy atomie węgla C1 nie ma większego znaczenia. W wyniku odejścia podstawnika z pozycji C1 otrzymywany jest płaski kation cukrowy (184).



Schemat 49

W przypadku 2-deoksyrybozylacji atak na kation cukrowy może następować z równym prawdopodobieństwem „z góry” jak i „z dołu” prowadząc do otrzymania mieszaniny anomerów (schemat 50).

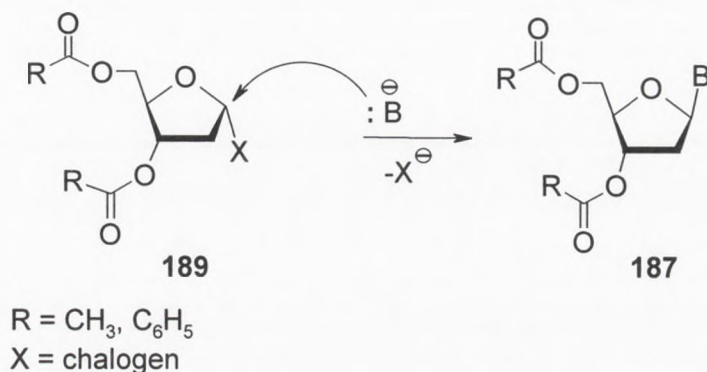


Schemat 50



1.3.3. Stereochemia glikozylacji anionowej

W tym przypadku mamy do czynienia z mechanizmem reakcji typu S_N2 , prowadzącym do inwersji konfiguracji na centrum anomerycznym.



Schemat 51

Stereoselektywność reakcji determinowana jest konfiguracją na atomie C1 cukru. Z α -halogenocukrów otrzymywane są tylko β -nukleozydy, natomiast wychodząc z β -halogenozy uzyskiwane są α -anomery nukleozydu.

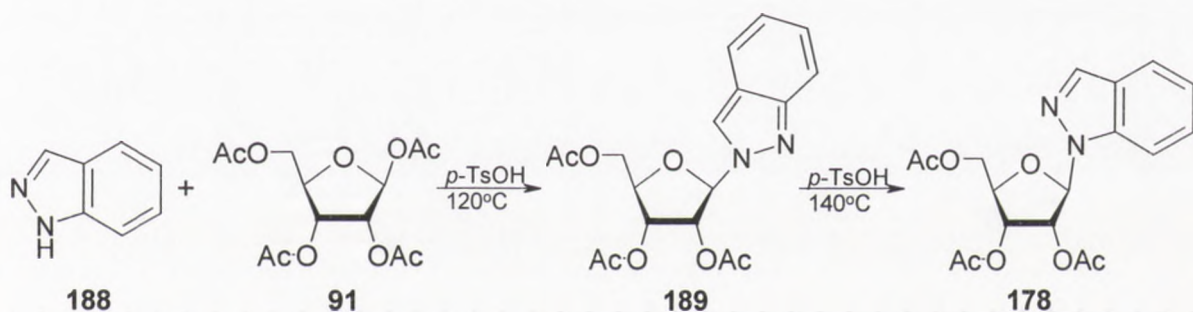
Regioselektywność w tego typu reakcjach jest jednak mniejsza niż w przypadku reakcji przebiegających przez kation cukrowy, ponieważ ładunek ujemny występujący w zasadzie heterocyklicznej (np. w pierścieniu imidazolowym zasady purynowych) może być zdelokalizowany, co może prowadzić do otrzymania różnych izomerów nukleozydów.



1.4. Tautomeria a regioselektywność glikozylacji

W przypadku rybozylacji zasad heterocyklicznych można zauważyć ścisłą zależność między tautomerem substratu a powstałym w wyniku reakcji trwałym termodynamicznie produktem.

Prostym przykładem tego typu zależności jest reakcja glikozylacji indazolu wobec protonującego katalizatora, przeprowadzona przez Boryskiego¹¹⁴. W wyniku reakcji termodynamicznie trwałego tautomeru N¹H indazolu (**188**) z tetraacetylorybofuranozą (**91**) powstaje N2 podstawiony, kinetyczny produkt reakcji. Substrat nie posiada podstawnika na atomie azotu N2, dzięki czemu może on zaatakować kation cukrowy. Podczas prowadzenia reakcji w kinetycznych warunkach powstaje z dużą wydajnością 2-ryboindazol (**189**). Związek ten posiada jednak niekorzystną strukturę elektronową w porównaniu do niepodstawionego rybozyl indazolu. Pierścień benzenowy nie posiada pełnej aromatyczności, ten niekorzystny układ jest siłą napędową nieodwracalnej transglikozylacji 1→2.

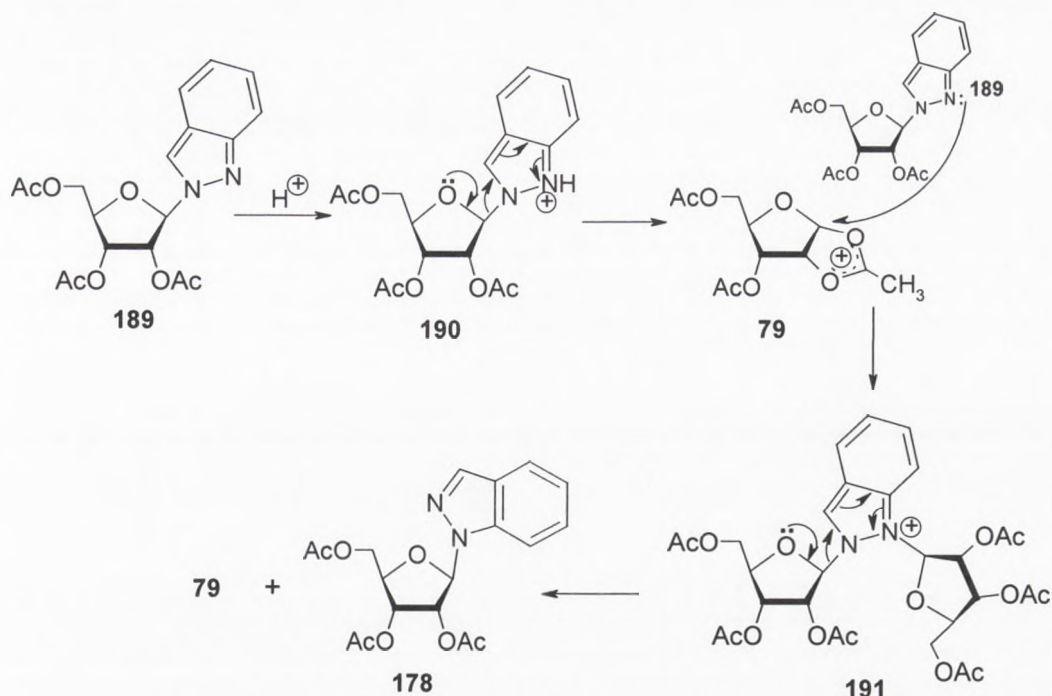


Schemat 52

Jeżeli reakcja prowadzona jest przez dłuższy czas oraz w wyższej temperaturze, to obserwuje się zanikanie kinetycznego produktu reakcji (**189**), natomiast otrzymywany jest tylko produkt termodynamiczny, 1-rybozylindazol (**178**). Produkt ten posiada taki sam układ elektronowy z jakim mamy do czynienia w przypadku substratu. Widma UV wykonane dla obu związków (**188**, **178**) wyglądają identycznie. W wyniku ogrzewania 2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylindazolu wobec kwasu *p*-toluenosulfonowego otrzymano poza β-anomerem nukleozydu także α-podstawiony produkt (13%).

Szczegółowy mechanizm nieodwracalnego procesu transglikozylacji 1→2 w serii indazolowej został zaproponowany przez Boryskiego¹¹⁴ (schemat 53).





Schemat 53

W wyniku protonowania atomu N1 następuje rozerwanie wiązania N-glikozydowego z utworzeniem kationu cukrowego oraz „wolnego” indazolu. Następnie proces biegnie przez stadium 1,2-dipodstawionego produktu przejściowego (**191**), który powstaje w wyniku nukleofilowego ataku atomu azotu N1 na atom C1 kationu cukrowego (**79**). Ten nietrwały produkt ulega degradacji, w wyniku czego powstaje N1-nukleozyd indazolowy oraz odtworzony zostaje kation cukrowy. Ważnym aspektem w tym przypadku jest zachowanie reguły *trans* podstawienia, prowadzącego do powstania głównie β -anomeru.

Glikozylację indazolu można więc porównać do glikozylacji adeniny. W obu przypadkach powstają kinetyczne produkty reakcji, w przypadku indazolu N2-podstawione pochodne natomiast dla adeniny 3- lub 7-pochodne. Związki te są nietrwałe i szybko przechodzą w termodynamiczne produkty, 1-glikozyloindazol i 9-glikozyloadeninę. Struktura końcowych, trwałych produktów reakcji, odpowiada najbardziej trwałym termodynamicznie tautomerom wyjściowych zasad heterocyklicznych.

Natomiast glikozylacja N²-acetyloguaniny, jak już wcześniej wspomniano, prowadzi do otrzymania mieszaniny 7- i 9-regioizomerów. Powodem tego jest fakt, że związek ten występuje jako mieszanina dwóch stosunkowo trwałych tautomerów (schemat 54)¹¹⁵, co wykazano na podstawie widm ¹H NMR.

The following information is provided for your reference:

1. The total number of items is 100.

2. The number of items in each category is as follows:

Category	Number of Items
Category A	20
Category B	30
Category C	15
Category D	10
Category E	10
Category F	15

3. The total number of items in each category is 100.

4. The number of items in each category is 100.

5. The number of items in each category is 100.

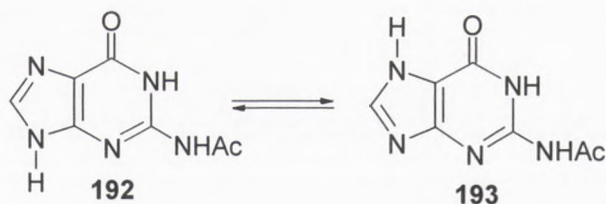
6. The number of items in each category is 100.

7. The number of items in each category is 100.

8. The number of items in each category is 100.

9. The number of items in each category is 100.

10. The number of items in each category is 100.



Schemat 54

Każdy z tautomerów reaguje indywidualnie z kationem cukrowym. Tak więc glikozylacja tautomeru 7-H (**192**) prowadzi bezpośrednio do otrzymania 9-izomeru nukleozydu, natomiast z 9-H tautomeru (**193**) otrzymywana jest 7-podstawiona pochodna. Prowadzi to do powstania mieszaniny regioizomerów, których ostateczny stosunek ilościowy jest wynikiem ustalenia się stanu równowagi w reakcji $7 \rightleftharpoons 9$ transglikozylacji. Ilości poszczególnych izomerów guanozyny odpowiadają stosunkowi tautomerów w substracie¹¹⁷.

Jeżeli trwały tautomer użyty do reakcji posiada proton przyłączony do atomu tlenu lub azotu, to miejsce takie należy traktować jako centrum zablokowane. Tak więc atak nukleofilowy na kation cukrowy musi być wyprowadzony z innego centrum nukleofilowego. W przypadku indazolu jest to atom N2, w serii puryn atomy N1, N3 lub N7, natomiast w przypadku pirymidyn jest to tlen O2. Produkty kinetyczne posiadają glikozyl w innej pozycji niż atom wodoru w trwałym tautomerze, a co za tym idzie układ taki jest mniej stabilny i jest to siłą napędową do izomeryzacji. Wynikiem tego procesu jest wytworzenie termodynamicznego produktu reakcji, w którym podstawnik cukrowy znajduje się w tej samej pozycji co proton w substracie.



2. Cel pracy

Jak już wcześniej wspomniano mechanizm glikozylacji zasad heterocyklicznych składający się z dwóch etapów zaproponowany został przez Watanabe, Hollenberga i Foxa¹⁷ w latach siedemdziesiątych. Autorzy założyli, że w przypadku zasad purynowych proces ten biegnie przez kinetyczny produkt, N3-podstawiony nukleozyd, który następnie ulega przegrupowaniu do trwałego termodynamicznie N9-nukleozydu. Mechanizm ten, który opracowano na podstawie rybozylacji adeniny, został powszechnie zaakceptowany, a następnie rozszerzony na inne zasady purynowe np. guaninę. Ważnym aspektem tych założeń było to, że cały ten proces biegnie z udziałem kationu cukrowego i przechodzi przez nietrwałe stadium 3,9-dipodstawionych pochodnych.

Jednak z wykonanych w naszej Pracowni badań wynika, że mechanizm glikozylacji zasad 6-oksopurynowych różni się od mechanizmu glikozylacji adeniny. W przypadku takich zasad jak guanina czy hipoksantyna tylko atomy pierścienia imidazolowego N7 i N9 (a nie atom N3) są akceptorami lub donorami kationu cukrowego.

Całkowicie blokowane nukleozydy 6-oksopurynowe takie jak guanozyna czy inozyna, ulegają w pełni odwracalnej transglikozylacji 7 \rightleftharpoons 9 wobec katalizatora lub wysokiej temperatury (bez stosowania katalizatora). Kluczowym aspektem w procesie transglikozylacji jest migracja podstawnika cukrowego w obrębie danej cząsteczki. Jednak proces ten jest procesem intermolekularnym oraz łańcuchowym, do którego niezbędna jest obecność kationu cukrowego. Jon tego typu może powstać w wyniku dysocjacji wiązania N-glikozydowego w nukleozydzie pod wpływem oddziaływania z katalizatorem kwasowym lub wysokiej temperatury.

Postanowiliśmy więc dokładniej sprawdzić, jak wygląda proces glikozylacji w serii adeniny, wiedząc już, że w przypadku pochodnych 6-oksopurynowych mechanizm okazał się inny niż uważano wcześniej. W doniesieniach literaturowych dotyczących glikozylacji adeniny można znaleźć informacje, że produktem kinetycznym jest 3- lub 7-regioizomer nukleozydu. Postanowiliśmy więc bliżej przyjrzeć się temu zagadnieniu.

Niniejsza praca jest kontynuacją badań procesów migracji podstawników cukrowych prowadzonych w Pracowni Chemii Nukleozydów Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Dotyczy zagadnień związanych z mechanizmem glikozylacji i transglikozylacji



nukleozydów purynowych ze szczególnym uwzględnieniem pochodnych adeninowych.

Głównym celem pracy miało być zweryfikowanie mechanizmu glikozylacji i transglikozylacji pochodnych adeniny. Dla realizacji tego celu należało rozwiązać zasadnicze zadania badawcze:

1. Otrzymanie substratów i związków modelowych do dalszych badań.
2. Przeprowadzenie reakcji transglikozylacji związków modelowych.
3. Wyizolowanie związków pośrednich powstających w wyniku procesu izomeryzacji.
4. Badanie procesów ubocznych zachodzących podczas transglikozylacji.
5. Określenie struktury otrzymanych produktów metodami spektroskopowymi i rentgenograficznymi.
6. Badanie wpływu zastosowanych warunków reakcji (środowisko, grupy blokujące) na powstawanie kinetycznych i termodynamicznych produktów reakcji.
7. Zaproponowanie mechanizmu glikozylacji adeniny i jej pochodnych w zależności od warunków reakcyjnych.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that proper record-keeping is essential for the integrity of the financial system and for the ability to detect and prevent fraud. The text also mentions the need for regular audits and the role of independent auditors in ensuring the reliability of financial statements.

The second part of the document focuses on the internal controls that should be implemented to minimize the risk of errors and fraud. It outlines the key components of an effective internal control system, including the segregation of duties, the establishment of clear policies and procedures, and the use of physical and technological safeguards. The text also discusses the importance of training employees and fostering a culture of ethical behavior.

The third part of the document addresses the external controls that are imposed by regulatory bodies and the public. It discusses the role of government agencies in monitoring and enforcing financial regulations, and the impact of these regulations on the behavior of financial institutions. The text also mentions the importance of transparency and the role of the media and investors in holding financial institutions accountable.

The fourth part of the document discusses the role of the financial system in the economy. It explains how the financial system facilitates the flow of capital and the growth of businesses, and how it helps to stabilize the economy. The text also mentions the importance of maintaining a sound financial system to ensure the well-being of the country and its citizens.

The fifth part of the document discusses the challenges facing the financial system in the 21st century. It mentions the impact of globalization, technological advances, and the increasing complexity of financial products. The text also discusses the need for reform and the role of international organizations in promoting financial stability and development.

The sixth part of the document discusses the role of the financial system in the future. It mentions the potential of new technologies and the need for continued innovation and reform. The text also discusses the importance of maintaining a strong and resilient financial system to meet the challenges of the future.

3. Badania własne

3.1. Wstęp

W niniejszej pracy postanowiono zbadać mechanizm glikozylacji adeniny oraz scharakteryzować powstające w wyniku reakcji produkty.

Mechanizm glikozylacji adeniny nie był do tej pory dobrze poznany. Powszechnie przyjęty model tego procesu zaproponowany przez Watanabe, Hollenberga i Foxa¹⁷ na podstawie eksperymentalnych prac grupy Leonadra i Laursena¹¹⁷ oraz Shimizu i Myaki^{14,16,18} zakłada nieodwracalną transglikozylację 3→9. Według autorów tego mechanizmu proces przebiega przez stadium 3,9-dipodstawionych związków pośrednich, co jednak w świetle badań przeprowadzonych w naszej Pracowni nad mechanizmem transglikozylacji nukleozydów 6-oksopurynowych wydaje się mało prawdopodobne. Mechanizm glikozylacji/transglikozylacji w przypadku 6-oksopuryn wyjaśniony został przez Boryskiego⁹⁰ i zakłada, że tylko wolne pary elektronowe atomów azotu N7 lub N9 zasady purynowej biorą udział w ataku nukleofilowym. Wynikiem tego jest powstanie mieszaniny 7- i 9-regioizomerów nukleozydu, a odwracalny proces transglikozylacji 7⇌9 zachodzi przez 7,9-dipodstawioną purynę.

Na tej podstawie postanowiono dokładniej przyjrzeć się procesowi syntezy adenozyiny, gdzie zakładanym produktem kinetycznym glikozylacji jest N3-glikozyloadenina.

Wartym przypomnienia jest też fakt, że niezbędnym elementem do inicjacji reakcji glikozylacji jest wysoka temperatura lub katalizator typu kwasu Lewisa (HgBr₂, ZnCl₂), lub kwas protonujący (HBr, *p*-TsOH). Rolą tych czynników jest wytworzenie kationu cukrowego, który następnie może ulec nukleofilowemu atakowi.

W literaturze znaleźć można szereg doniesień o otrzymaniu kinetycznych produktów w glikozylacji adeniny. Jednym z pierwszych jest praca grupy Leonarda i Laursena⁸⁴ gdzie ubocznym produktem w syntezie adenozyiny był N3-podstawiony nukleozyd. Natomiast grupa Ishido¹¹⁶ donosiła o otrzymaniu 7-podstawionych pochodnych adenozyiny w wyniku rybozylacji blokowanych pochodnych adeniny z komponentem cukrowym.

Łącząc powyższe fakty postanowiono zweryfikować doniesienia literaturowe oraz znaleźć odpowiednią korelację między procesem glikozylacji a warunkami reakcji.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy auditing of the accounts.

Secondly, it is advised to reconcile the books regularly. This involves comparing the internal records with the bank statements to identify any discrepancies. Promptly addressing these differences helps in preventing errors from accumulating and ensures the financial statements remain accurate.

Another key point is the separation of personal and business finances. Using a dedicated bank account for business transactions makes it easier to track expenses and income related to the business. This practice is essential for calculating the correct profit and loss for the business.

Furthermore, the document highlights the need for proper categorization of expenses. Each expense should be recorded under the appropriate account code to facilitate budgeting and financial analysis. This systematic approach provides a clear overview of where the business's money is being spent.

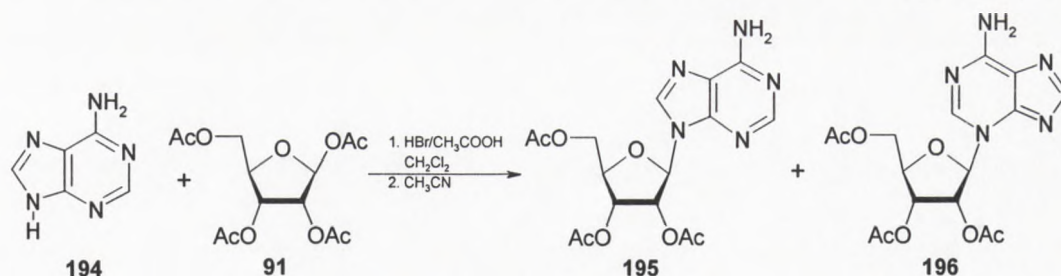
Finally, it is recommended to keep all financial documents in a secure and organized manner. Regular backups of digital records and the safe storage of physical documents are crucial for protecting the business's financial data from loss or theft.

3.2. Próby wyodrębnienia kinetycznych produktów glikozylacji adeniny

3.2.1. Rybozylacja w warunkach silnie kwasowych

W celu otrzymania kinetycznego produktu rybozylacji adeniny sięgnięto do jednej z najstarszych metod syntezy adenozyiny, zaproponowanej przez Leonarda i Laursena⁸⁴, gdzie produktem ubocznym reakcji była 3-(2',3',5'-triacetyloribofuranozylo)adenina (izoadenozyina).

Synteza nukleozydu według tej metody jest procesem dwuetapowym. W pierwszym etapie 1,2,3,5-tetra-O-acetylo-β-D-rybofuranosa (**91**) poddawana jest reakcji bromowania w roztworze chlorku metylenu i 30% kwasu bromowego w kwasie octowym. W wyniku tego otrzymywana jest 1-bromopochodna wyjściowego cukru, a proces ten zachodzi ilościowo. Następnie po zagęszczeniu, produkt ten poddaje się reakcji kondensacji z nieblokowaną adeniną (**194**) w suchym acetonitrylu, co w efekcie prowadzi do otrzymywania mieszaniny 9- i 3-(tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny (**195**, **196**) (schemat 55) oraz nieprzereagowanych substratów. Szacunkowa wydajność 9- i 3-regioizomerów według TLC wyniosła odpowiednio ok. 50% i 10% po 19 godzinach. W celu usunięcia z mieszaniny nieprzereagowanej adeniny odparowano rozpuszczalnik, a pozostałą suchą masę rozpuszczono w chloroformie i ekstrahowano zimnym 5% roztworem kwaśnego węgla sodu. Adenina przechodzi do warstwy wodnej. W celu wyodrębnienia produktów reakcji (3- i 9-regioizomerów adenozyiny) stosowano dwa podejścia: wytrącanie lub rozdział chromatograficzny.



Schemat 55

Wytrącanie izoadenozyiny (**196**) prowadzono bezpośrednio z roztworu po ekstrakcji z kwaśnym węglanem sodu. Warstwę chloroformową pozostawiano na kilka godzin w temperaturze 5°C, w wyniku czego 3-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adenina wypadała z roztworu w formie bezpostaciowego żelu, natomiast w roztworze pozostawał 9-izomer.



Niestety w wyniku wytrącania nie udało się otrzymać czystych regioizomerów. Dopiero po przeprowadzeniu krystalizacji z gorącego etanolu uzyskano chromatograficznie czysty 3-nukleozyd z wydajnością 6,9%, natomiast związku **195** nie udało się oczyścić przez krystalizację, ze względu na jego skłonność do tworzenia oleju.

Podobne rezultaty otrzymano w wyniku rozdziłu chromatograficznego mieszaniny reakcyjnej bezpośrednio po usunięciu nieprzereagowanej adeniny przez ekstrakcję roztworem kwaśnego węgla sodu. Po odparowaniu, warstwa organiczna (chloroformowa) rozdzielona była na kolumnie chromatograficznej, stosując jako eluent mieszaninę: chloroform-metanol. Rozdział prowadzono w gradiencie stężenia od 98:2 do 9:1. Po odparowaniu frakcji zawierających związek **196** uzyskano wydajność 7,83%, natomiast po krystalizacji z etanolu wydajność zmalała do 5,7%. W przypadku 9-izomeru uzyskana po rozdziale wydajność wyniosła 17,2%.

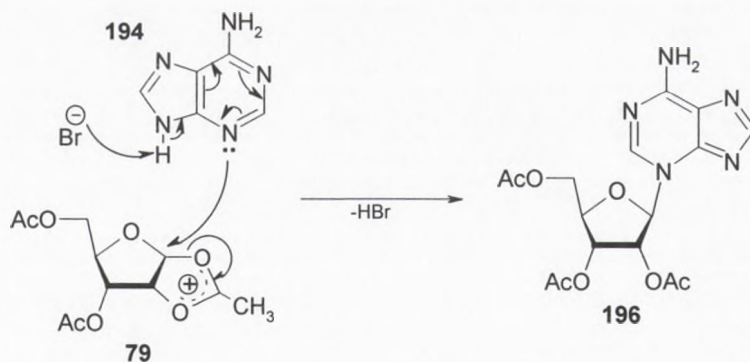
Wykonane widmo 3-izomeru w ultrafiolecie (λ_{\max} 283.0 nm, λ_{\min} 247.6 nm) zdecydowanie różniło się od widma 9-izomeru (λ_{\max} 259.2 nm, λ_{\min} 227.2 nm), co stanowiło dowód na inne podstawienie rybozą pierścienia purynowego. Także widma ^1H NMR obu produktów wykonane w DMSO- d_6 mocno się różnią. W przypadku związku **195** obserwowano jeden ostry sygnał pochodzący od dwóch protonów grupy egzoaminowej (7.40 ppm), natomiast związek **196** posiadał dwa sygnały pochodzące od protonów N^6H (8.20 ppm i 8.35 ppm). Jednak obserwowanie dwóch sygnałów może być wynikiem szybkiej tautomerii $\text{N}^6\text{H} \rightleftharpoons \text{N}^1\text{H}$. Ciekawe informacje otrzymano także po porównaniu widm węglowych obu związków. W przypadku widma 3-izomeru triacetyloadenozyny obserwowano zmianę zakresu sygnałów pochodzących od atomów C-8 (153.11 ppm) oraz C-2 (143.83 ppm) w stosunku do 9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny: C-8 (140.04 ppm) i C-2 (152.8 ppm), co także potwierdzało inne podstawienie rybozą pierścienia adeninowego w obu przypadkach.

Przeprowadzona w analogicznych warunkach reakcja z zastosowaniem dłuższego czasu, prowadzi do zwiększenia wydajności 9-regioizomeru adenozyiny (**195**) w stosunku do 3-nukleozydu (**196**).

Także podczas ogrzewania 3-adenozyny (**196**) w warunkach transglikozylacji, wobec 10% molowych kwasu *p*-toluenosulfonowego we wrzącym chlorobenzenu przez 2 godziny otrzymano związek **195** z około 10% wydajnością (według TLC).

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów potwierdzono fakt tworzenia się 3- i 9-rybonukleozydów w reakcji 1-bromo pochodnej cukrowej z nieblokowaną adeniną (**194**). Mechanizm tworzenia 3-adenozyny powinien więc być zgodny z mechanizmem zaproponowanym przez Watanabe, Hollenberga i Foxa¹⁷ i wyglądać jak na schemacie 56.





Schemat 56

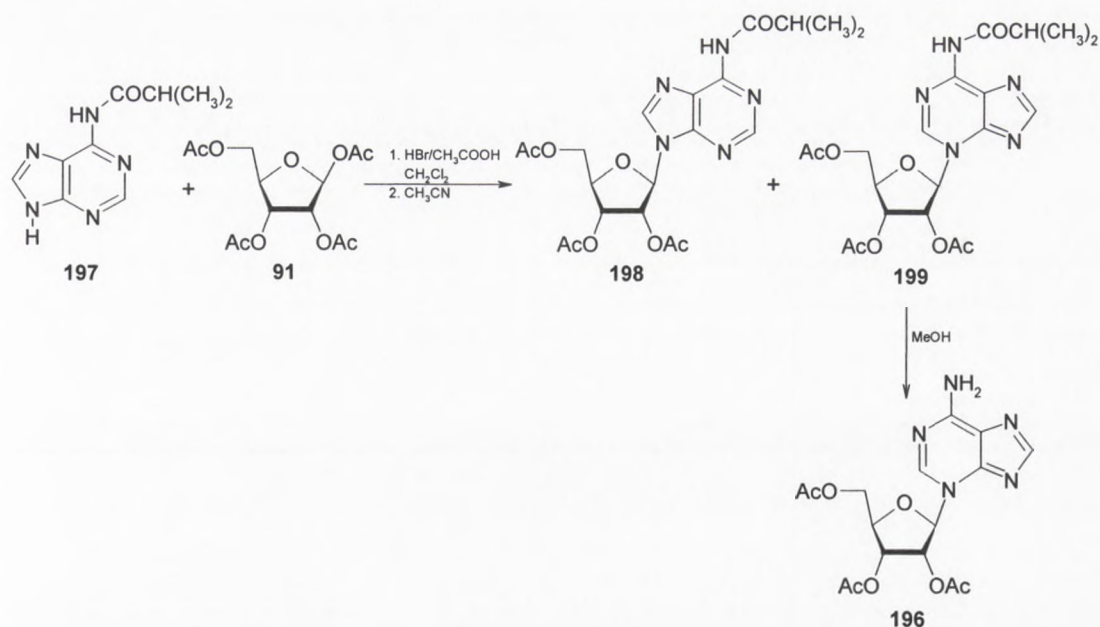
Podobny rezultat uzyskano w wyniku reakcji N⁶-izobutyryloadeniny (**197**) z pochodną 1-bromotriacetyloribozy, gdzie w wyniku przeprowadzonej kondensacji w acetonitrylu (1 godzina, 45°C) otrzymano dwa główne produkty. Analiza TLC wykazała, że produkt o wyższym R_f to N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adenina (według chromatografii) (**198**), natomiast drugi związek poruszał się w kilku układach chromatograficznych (chloroform-metanol 9:1, chlorek metylenu-etanol 95:5) podobnie do N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny (**232**), której otrzymywanie opisano w rozdziale 3.3.3. Oba związki udało się wyizolować i poddać charakterystyce w ultrafiolecie. Analiza widm UV potwierdziła, że produkt o wyższym R_f to 9-izomer (**198**) (λ_{\max} 272.2 nm, λ_{\min} 231.0 nm), natomiast drugi związek charakteryzował się widmem w ultrafiolecie o λ_{\max} 295.2 nm, λ_{\min} 253.2 nm, które różniło się od 1-regioizomeru (**232**) (λ_{\max} 313.2 nm, λ_{\min} 255.2 nm). Związek o niższym R_f krystalizowano z metanolu, jednak jak się okazało, w wyniku krystalizacji uzyskano produkt posiadający widmo w ultrafiolecie o λ_{\max} 283.2 nm oraz λ_{\min} 247.6 nm, co wykazało, że otrzymano 3-(triacetyloribofuranozylo)adeninę (λ_{\max} 283.4 nm, λ_{\min} 247.8 nm). Tak więc próba krystalizacji doprowadziła do usunięcia grupy izobutyrylowej z pozycji N⁶, strukturę związku potwierdzono przy pomocy ¹H NMR. Widmo protonowego rezonansu jądrowego było identyczne z widmem 3-izomeru triacetyloadenozyny (**196**), posiadało charakterystyczne sygnały przy 8.20 ppm oraz 8.34 ppm pochodzące do protonów N⁶H. Schemat syntezy związku **198** i **199** oraz odblokowania 3-izomeru (**196**) przedstawiono na schemacie 57.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It is essential to ensure that every entry is properly documented and verified. This process helps in identifying any discrepancies or errors early on, allowing for prompt correction and ensuring the integrity of the financial data.

Furthermore, the document emphasizes the need for transparency and accountability. All stakeholders should have access to the relevant information, and any changes or updates should be clearly communicated. This fosters trust and ensures that everyone is working with the most current and accurate data available.

In addition, the document outlines the procedures for handling any potential issues or disputes. It is crucial to have a clear and fair process in place to resolve any conflicts that may arise. This involves thorough investigation, open communication, and a commitment to finding a mutually beneficial solution.

Overall, the document serves as a comprehensive guide for managing financial records and ensuring the highest standards of accuracy and transparency. It provides a clear framework for all operations, from data entry to dispute resolution, and is an essential tool for any organization looking to optimize its financial management processes.

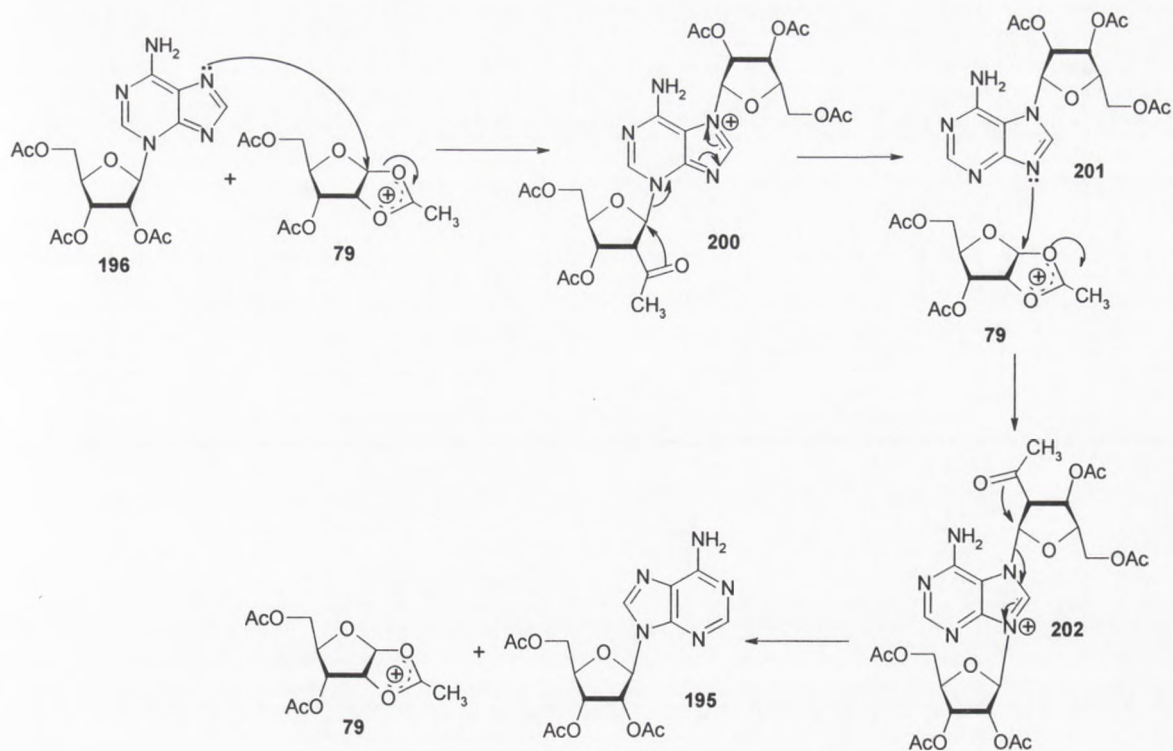


Schemat 57

Observacje dotyczące odblokowania grupy egzoaminowej potwierdzono też w eksperymencie, gdzie 3-izomer triacetyloadenozyny (**196**) poddano reakcji z bezwodnikiem izobutyrylowym w pirydynie otrzymując N^6 -izobutyrylo-3-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**199**), co potwierdzono wykonując widmo UV (λ_{max} 295.2 nm, λ_{min} 253.2 nm). Następnie związek poddano działaniu metanolu w temperaturze pokojowej przez noc otrzymując 3-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**196**), co potwierdzono w TLC i UV (λ_{max} 283.2 nm, λ_{min} 247.6 nm).

Na podstawie przeprowadzonych badań zaproponowano mechanizm procesu transglikozylacji 3-izomeru triacetyloadenozyny do 9-regioizomeru, który różni się od mechanizmu 3→9 izomeryzacji przedstawionego przez Watanabe, Hollenberga i Foxa¹⁷ (schemat 5). Według autorów proces ten przebiega przez stadium 3,9-diglikozyloadeniny i wydaje się on niezbyt poprawny ze względów sterycznych. Obecność dwóch dużych podstawników cukrowych w tak bliskiej odległości wydają się być mało prawdopodobne. Tak więc mechanizm izomeryzacji 3→9 może wyglądać jak przedstawiono na schemacie 58.





Schemat 58

Proces ten według zaproponowanego mechanizmu przebiega według schematu 3→7→9 przez dwa związki pośrednie o strukturze dipodstawionej: 3,7-diglikozyloadeninę (**200**) oraz 7,9-diglikozyloadeninę (**202**). W wyniku nukleofilowego ataku atomu N7 na atom C1 kationu cukrowego 3-nukleozydu (**196**) powstaje 3,7-dipodstawiona pochodna (**200**), która ulega dekompozycji do 7-podstawionego produktu (**201**), jednak związek tego typu w tych warunkach może być nietrwały, przez co nie obserwowano go podczas reakcji. Powstanie związku 3,7-dipodstawionego jest bardziej prawdopodobne niż otrzymanie 3,9-dipodstawionego. Następnie nukleofilowy atak atomu N9 związku **201** na kation cukrowy (**79**), prowadzi do powstania 7,9-dipodstawionej pochodnej adenosyny (**202**), której rozpad prowadzi do otrzymania trwałego termodynamicznie 9-izomeru (**195**).

10/10/10

Faint, illegible text covering the majority of the page, possibly bleed-through from the reverse side.

3.2.2. Rybozylacja metodą stapiania

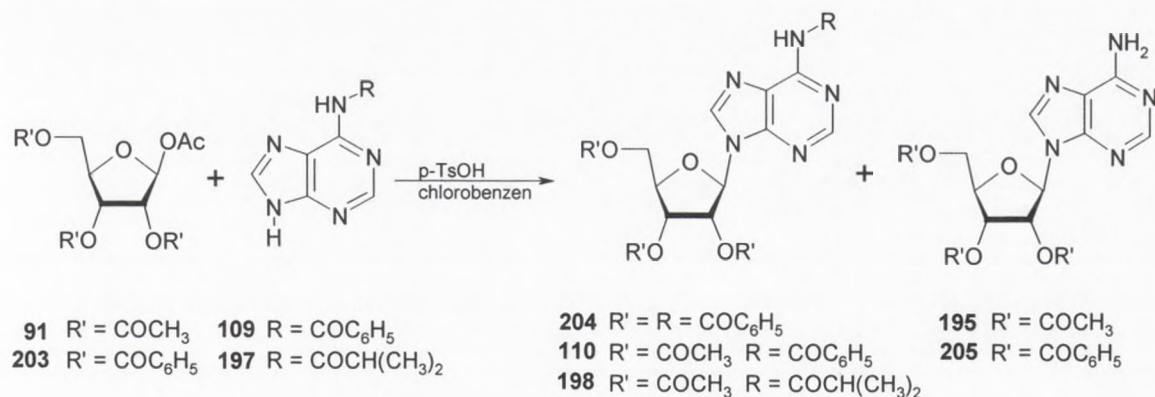
W dalszych badaniach podjęto także próby syntezy 7-regioizomeru adenozyiny. W celu otrzymania takiego izomeru przeprowadzono reakcję kondensacji N⁶-blokowanej adeniny wobec 2,4-dinitrofenolu (pełniącego rolę rozpuszczalnika oraz katalizatora kwasowego) z komponentem cukrowym.

Reakcje prowadzono w temperaturze 140-145°C (temperatura łaźni olejowej), podczas gdy temperatura topnienia 2,4-dinitrofenolu wynosi 108-112°C.

W wyniku kondensacji N⁶-benzoiloadeniny (**109**) z 1-O-acetylo-2,3,5-tri-O-benzoilorybofuranozą (**203**) otrzymano mieszaninę dwóch produktów (schemat 59). Reakcja kontrolowana była chromatograficznie i zakończono ją po 2 godzinach przez ochłodzenie, w wyniku czego otrzymano stałą, twardą masę. Analiza TLC pokazała, że związek o wyższym R_f porusza się chromatograficznie jak N⁶,2',3',5'-tetrabenzoiloadenozyina. Substraty (**203**, **109**) nie przereagowały ze sobą całkowicie. Krótki czas reakcji miał na celu wychwycenie wszystkich powstających produktów. Uzyskaną twardą masę rozpuszczono w chloroformie, a następnie ekstrahowano wodnym roztworem NaHCO₃ w celu pozbycia się dinitrofenolu. Fazę organiczną suszono bezwodnym siarczanem sodu i odparowano, otrzymując gęsty olej, który rozdzielono na kolumnie chromatograficznej, stosując jako eluent fazę toluen-etanol w gradiencie stężenia 95:5 do 6:1.

Analiza widm ¹H NMR oraz UV potwierdziły, że produkt w wyższym R_f to 9-izomer N⁶,2',3',5'-tetrabenzoiloadenozyiny (**204**) (wydajność 26,8%), natomiast widmo drugiego związku poruszającego się chromatograficznie wolniej posiadało dwuprotonowy sygnał przy 7.48 ppm charakterystyczny dla protonów grupy egzoaminowej, który pojawił się w rejonie sygnałów pochodzących od grup benzoilowych. W widmie protonowego rezonansu jądrowego obserwowano także sygnały pochodzące tylko od trzech grup benzoilowych (15 protonów). Struktura związku scharakteryzowana została jako 2',3',5'-tri-O-benzoiloadenozyina (**205**), czyli związek bez grupy benzoilowej w pozycji N⁶; jego wydajność wyniosła 5,1%. Tak więc w tym przypadku nie zaobserwowano tworzenia się kinetycznych produktów reakcji, jednak nie wyklucza to ich powstawania. Nieodwracalna transglikozylacji 7→9 może być na tyle szybka w warunkach reakcji (temperatura 140°C), że produkty te mogą być niezauważalne.





Schemat 59

Podobne rezultaty uzyskano także w reakcji N⁶-izobutyryloadeniny (**197**) z 1,2,3,5-tetra-O-acetylo-β-D-rybofuranozą (**91**) wobec 2,4-dinitrofenolu w temperaturze 140°C, prowadzonej przez 2 godziny, otrzymując w jej wyniku dwa produkty. Związki te wyizolowano i scharakteryzowano jako: N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**198**) powstającą z wydajnością 25% oraz 9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**195**) otrzymaną z wydajnością 9,9%. Analogiczna reakcja przeprowadzona w niższej temperaturze (123°C) doprowadziła do powstania tylko związku **198**.

Natomiast w reakcji 1,2,3,5-tetra-O-acetylo-β-D-rybofuranozy (**91**) z N⁶-benzoiloadeniną (**109**) wobec 2,4-dinitrofenolu otrzymany został tylko związek **110**. W tym przypadku nie zaobserwowano odblokowania pozycji N⁶, nawet po 2 godzinach prowadzenia reakcji. Produkt kondensacji nie był izolowany, reakcje kontrolowano tylko chromatograficznie (TLC).

W kolejnym eksperymencie przeprowadzono próbę reakcji nieblokowanej adeniny (**194**) z 1,2,3,5-tetra-O-acetyloribofuranozą (**91**) wobec 2,4-dinitrofenolu w 140°C. Jednak adenina w tych warunkach nie uległa rozpuszczeniu, otrzymano mętną zawiesinę. Nie obserwowano powstawania żadnych produktów rybozylacji.

W serii reakcji w 2,4-dinitrofenolu nie zaobserwowano powstawania kinetycznych 7-podstawionych produktów reakcji. Wysoka temperatura w jakiej prowadzono rybozylację mogła wpłynąć na szybkość reakcji transglikozylacji 7→9, co doprowadziło do powstania tylko 9-nukleozydu. Proces izomeryzacji zachodzi więc w tych warunkach z dużą szybkością, co uniemożliwiło uzyskanie kinetycznych produktów kondensacji.



Die Synthese von Nucleotiden ist ein wichtiger Schritt in der Zellatmung. In der Matrix der Mitochondrien wird Pyruvat zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches dann in den Citratzyklus eintritt. Ein zentraler Schritt ist die Bildung von Nucleotiden aus Nucleosiden und Phosphat. Diese Reaktion wird durch die Enzyme Nucleotidyltransferasen katalysiert. Die freigesetzte Pyrophosphat (PPi) wird durch die Pyrophosphatase zu zwei Phosphatmolekülen (Pi) abgebaut, was die Reaktion energetisch begünstigt.

Die Nucleotidsynthese ist ein hochreguliertes Prozess. Die Verfügbarkeit von Nucleosiden und Phosphat sowie die Aktivität der beteiligten Enzyme bestimmen die Rate der Synthese. In der Zellatmung sind Nucleotide als Energieträger (ATP, GTP) und als Cofaktoren für verschiedene Enzyme erforderlich.

Die Nucleotidsynthese ist ein zentraler Bestandteil der Zellatmung. In der Matrix der Mitochondrien wird Pyruvat zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches dann in den Citratzyklus eintritt. Ein zentraler Schritt ist die Bildung von Nucleotiden aus Nucleosiden und Phosphat. Diese Reaktion wird durch die Enzyme Nucleotidyltransferasen katalysiert. Die freigesetzte Pyrophosphat (PPi) wird durch die Pyrophosphatase zu zwei Phosphatmolekülen (Pi) abgebaut, was die Reaktion energetisch begünstigt.

Die Nucleotidsynthese ist ein hochreguliertes Prozess. Die Verfügbarkeit von Nucleosiden und Phosphat sowie die Aktivität der beteiligten Enzyme bestimmen die Rate der Synthese. In der Zellatmung sind Nucleotide als Energieträger (ATP, GTP) und als Cofaktoren für verschiedene Enzyme erforderlich.

3.2.3. Rybozylacja wobec kwasu *p*-toluenosulfonowego

Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie kondensacji adeniny lub jej pochodnej z komponentem cukrowym wobec kwasu protonującego (*p*-TsOH).

Reakcję rybozylacji nieblokowanej adeniny prowadzono we wrzącym chlorobenzenie wobec kwasu *p*-toluenosulfonowego jako katalizatora (schemat 60). W wyniku przeprowadzonej kondensacji adeniny (**194**) z 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozą (**91**) obserwowano (TLC) bardzo niskie przereagowanie substratów, które wynosiło około 2% po 24 godzinach. Reakcja przebiegła cały czas w fazie heterogennej, mimo stosowania wysokiej temperatury. Słaba rozpuszczalność adeniny zmusiła nas do zastosowania grup blokujących w pozycji N⁶ zasady heterocyklicznej, zwiększających jej rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych.

W pierwszym wariantcie wybrano grupę benzoilową. W celu otrzymania N⁶-benzoilowej pochodnej adeniny stosowano dwie procedury benzoilowania adeniny: reakcję prowadzono w pirydynie wobec chlorku benzoilu lub w samym bezwodniku benzoesowym bez stosowania rozpuszczalnika. Druga procedura okazała się bardziej wydajna (wydajności rzędu 87%) i mniej pracochłonna.

W wyniku przeprowadzonej kondensacji N⁶-benzoiloadeniny (**109**) z 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozą (**91**) wobec *p*-TsOH we wrzącym chlorobenzenie otrzymano N⁶-benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**110**) z wydajnością 24,3%. Reakcja prowadzona była przez 22 godziny, a przereagowanie blokowanej adeniny wyniosło 50%. Jednak także i w tym przypadku nie obserwowano powstawania kinetycznego produktu reakcji. Produkt kondensacji krystalizowano z gorącego 40% roztworu etanolu. Kolejnym etapem było usunięcie grup blokujących (O-acetylowych i N⁶-benzoilu), co osiągnięto przez reakcję związku **110** z wodnym roztworem amoniaku w metanolu. W wyniku odblokowania otrzymano 9-adenozynę (**1**), co potwierdzono za pomocą widma UV (λ_{\max} 260.0 nm, λ_{\min} 228.0 nm) oraz temperatury topnienia.

THE HISTORY OF THE

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

of the

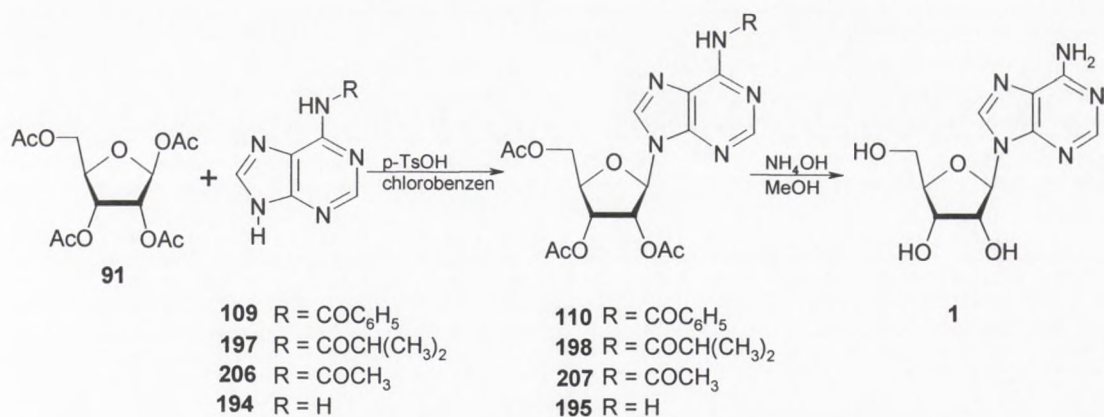
of the

of the

of the

of the

of the



Schemat 60

Podobną reakcję wykonano stosując N⁶-izobutyrylową pochodną adeniny (**197**) otrzymując z 62% wydajnością N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**198**), której strukturę potwierdzono za pomocą NMR. Reakcję kontrolowano chromatograficznie, obserwując powstawanie także niewielkich ilości produktu o niższym R_f od związku **198**, którego jednak nie udało się wyizolować. Próba krystalizacji związku **198** nie powiodła się.

Przeprowadzono także reakcję kondensacji N⁶-acetyloadeniny (**206**) z tetraacetyloribofuranozą (**91**), którą prowadzono przez 52 godziny. Jednak słaba rozpuszczalność związku **206** spowodowała powstanie w niewielkiej ilości 9-pochodnej adenozyiny (**207**), co widoczne było podczas kontroli chromatograficznej reakcji. R_f powstałego produktu był identyczny ze wzorcem tetraacetyloadenozyiny (**207**).

Tak więc w reakcji rybozylacji N⁶-acylowych pochodnych adeniny z użyciem kwasu *p*-toluenosulfonowego jako katalizatora nie udało się zaobserwować kinetycznych produktów.

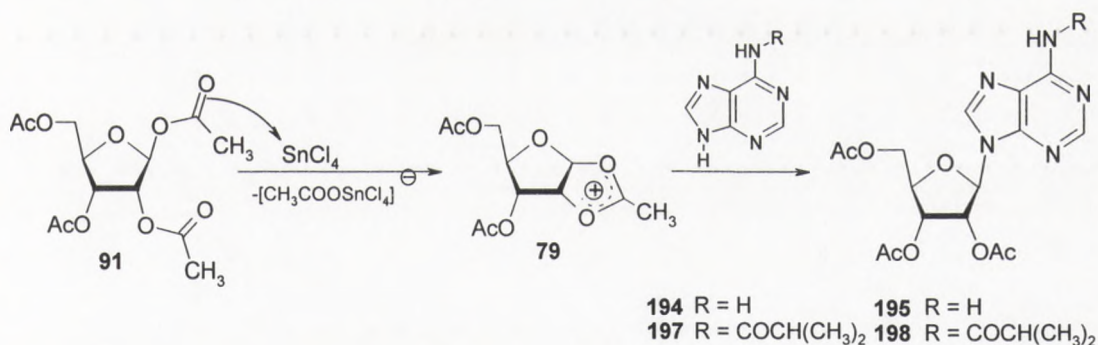


3.2.4. Rybozylacja wobec kwasu Lewisa

Kolejnymi zaplanowanymi eksperymentami były reakcje z zastosowaniem kwasów Lewisa: SnCl_4 i HgCl_2 .

W wyniku przeprowadzonej kondensacji N^6 -benzoiloadeniny (**109**) z tetraacetylo-rybofuranozą (**91**) we wrzącym chlorobenzenu wobec HgCl_2 , otrzymano zawiesinę, która do końca reakcji nie uległa rozpuszczeniu. Przyczyniło się to do uzyskania bardzo niskiego stopnia przereagowania, który po 20 godzinach wynosił ok. 1-2%. Analiza TLC pokazała, że w wyniku reakcji otrzymano tylko niewielką ilość związku o identycznym R_f jak N^6 -benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-rybofuranozylo)adenina (**110**).

Następnie do reakcji użyto nieblokowanej adeniny (**194**) oraz komponentu cukrowego **91**. Kondensację prowadzono w suchym acetonitrylu i temperaturze pokojowej przez 96 godzin. Jako katalizatora użyto tetrachlorku cyny, po którego dodaniu substraty całkowicie się rozpuściły. Analiza TLC wykazała powstawanie tylko jednego produktu reakcji o takim samym R_f jak 9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-rybofuranozylo)adenina (**195**), którego wydajność po 25 godzinach wyniosła ok. 40% i nie uległa zmianie aż do końca reakcji. Mimo zastosowania łagodnych warunków reakcji nie zaobserwowano powstawania kinetycznych produktów reakcji. Schemat przeprowadzonej reakcji oraz mechanizm działania katalizatora (SnCl_4), który inicjuje powstanie kationu cukrowego, przedstawiono na schemacie 61.



Schemat 61

Analogiczna reakcja kondensacji **91** z **194** przeprowadzona w temperaturze wrzenia acetonitrylu przez 3 godziny, wobec SnCl_4 doprowadziła do otrzymania 9-adenozyny (**195**) z wydajności ok. 60% według TLC.



Natomiast w reakcji N⁶-izobutyryloadeniny (**197**) z komponentem cukrowym **91** we wrzącym acetonitrylu wobec SnCl₄ otrzymano N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribo-furanozylo)adeninę z blisko 80% wydajnością.

Niestety poza termodynamicznym produktem reakcji, 9-podstawionym nukleozydem, nie obserwowano powstawania innych związków. Mechanizm tego typu rybozylacji powinien jednak najprawdopodobniej przebiegać według schematu 7→9 transglikozylacji, gdzie kinetycznym produktem powinien być 7-nukleozyd. Jednak powstawanie takiego produktu nie zostało potwierdzone eksperymentalnie.

Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły wcześniejsze obserwacje Itoha i Mizuno⁷², którzy w wyniku reakcji nieblokowanej adeniny (**194**) ze związkiem **91** wobec SnCl₄ otrzymywali tylko 9-nukleozyd.

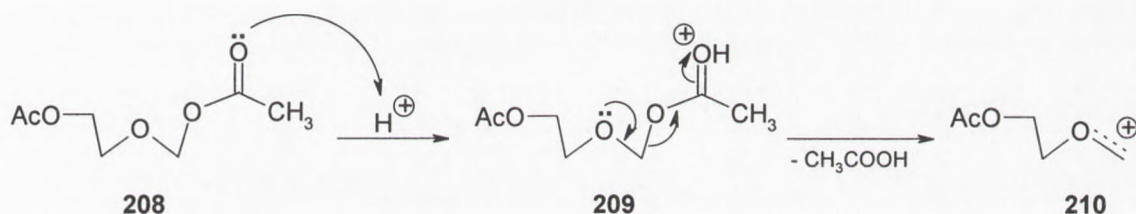
The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This not only helps in tracking expenses but also ensures compliance with tax regulations. The second part of the document provides a detailed breakdown of the company's financial performance over the past year. It includes a comparison of actual results against the budget and identifies areas where the company has exceeded expectations. The final part of the document outlines the company's strategic goals for the upcoming year and the steps that will be taken to achieve them. It also mentions the need for continued communication and collaboration between all departments to ensure the success of these initiatives.

3.2.5. Glikozylacja adeniny eterem (2-acetoksyetylo)acetoksymetylowym

W dalszych badaniach procesu glikozylacji postanowiono zastosować inny komponent cukrowy, pseudocukier. Jako prosty model wybrano eter (2-acetoksyetylo)acetoksymetylowy (**208**), a reakcje prowadzono wobec kwasu protonującego (kwas *p*-toluenosulfonowy) w chlorobenzenie.

Tak jak w innych reakcjach glikozylacji tak i w tym przypadku kluczowym etapem całego procesu jest powstanie kationu pseudocukrowego (schemat 62), który jest niezbędny do zainicjowania kondensacji.

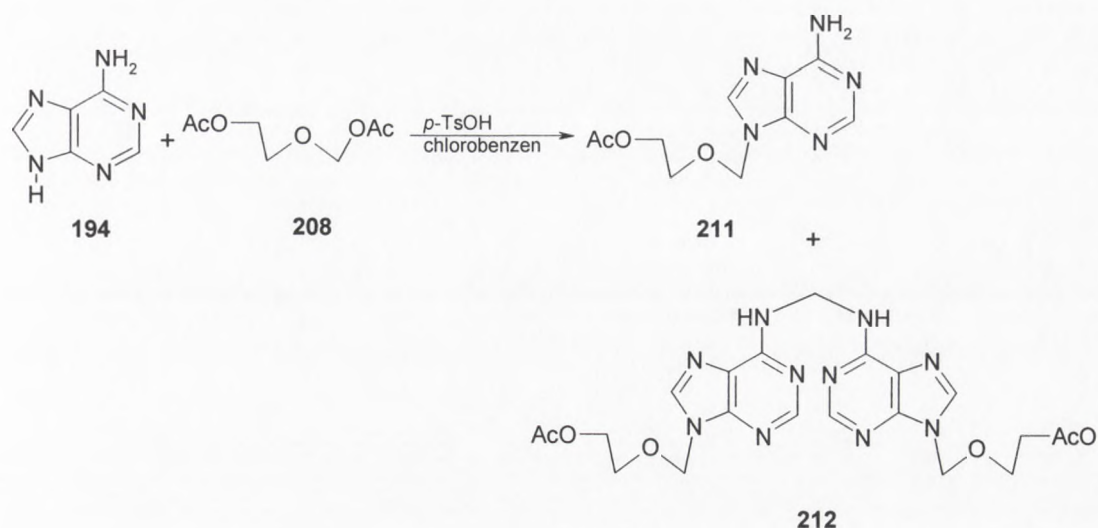
Oddziaływanie katalizatora z komponentem cukrowym (**209**), prowadzi do protonacji tlenu karboksylowego, a następnie w wyniku eliminacji cząsteczki kwasu octowego powstaje karboksoniowy kation pseudocukrowy (**210**), który może ulec nukleofilowemu atakowi atomu azotu zasady heterocyklicznej.



Schemat 62

Reakcja glikozylacji adeniny (**194**) eterem **208** przebiegała w fazie heterogennej, co spowodowane jest słabą rozpuszczalnością substratu. Do reakcji użyto dwukrotnego nadmiaru komponentu **208** w stosunku do adeniny, otrzymując w jej wyniku mieszaninę dwóch związków (schemat 63), które obserwowano w TLC. Przereagowanie po 3 godzinach reakcji wyniosło zaledwie około 45%. Nieprzereagowaną adeninę odsączono na lejku piankowym. Przesącz odparowano otrzymując mętny, biały olej, który rozdzielono na kolumnie chromatograficznej, jako eluent stosując fazę chloroform-metanol w gradiencie stężenia od 9:1 do 6:1. Po wyizolowaniu obu związków wykonano widma 1H i ^{13}C NMR. W wyniku ich analizy produkt o niższym R_f zidentyfikowano jako 9-[(2-acetoksyetylo)metylo]adeninę (**211**) powstającą z wydajnością 22,7%. Także widmo UV wykonane w metanolu potwierdziło strukturę związku (λ_{max} 259.6 nm, λ_{min} 226.2 nm), uzyskany kształt krzywej jest charakterystyczny dla N9-podstawionych pochodnych adeniny np.: 9-(2',3',5'-tri-O-acetylofuranozylo)adeniny (λ_{max}

259.2 nm, λ_{\min} 227.0 nm). Acykliczny 9-nukleozyd krystalizowano z etanolu otrzymując duże, płaskie kryształy.

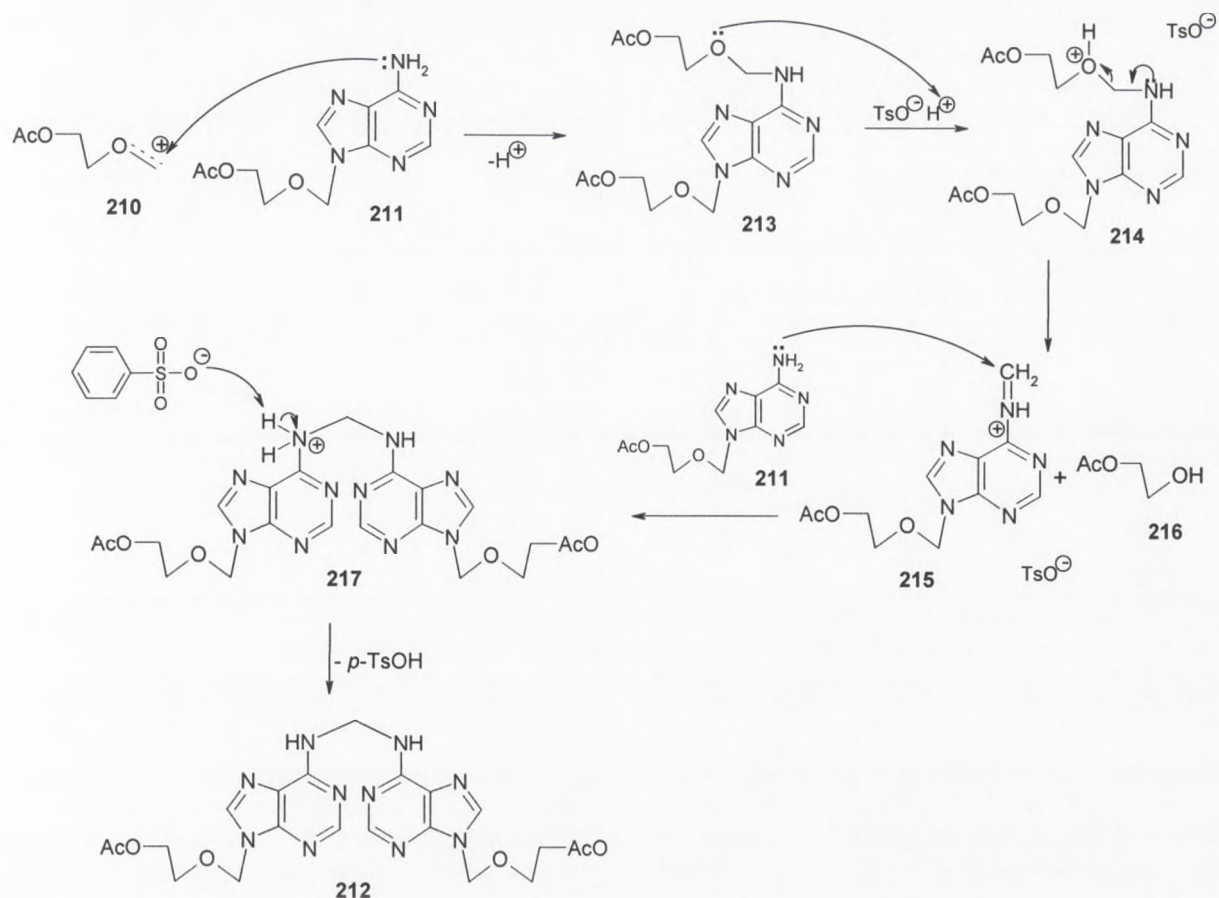


Schemat 63

Natomiast związek o wyższym R_f po wyizolowaniu krystalizowano z gorącego etanolu otrzymując białe kryształy. Początkowo wydawało się, że może to być produkt kinetyczny 3- lub 7-podstawiony, jednak związki takie powinny poruszać się chromatograficznie wolniej. Widmo UV tego produktu (λ_{\max} 271.8 nm, λ_{\min} 229.2 nm), nie przypominało kształtem widma żadnego otrzymanego dotąd związku. Dalszych informacji dostarczyła dopiero analiza widm ^1H , ^{13}C NMR, prowadząc do przypuszczenia, że mamy do czynienia z symetryczną strukturą składającą się z dwóch identycznych części połączonych mostkiem metylenowym. O takiej budowie świadczyła podwójna integracja sygnałów w analizowanych widmach rezonansu jądrowego poza jednym przy 5.37 ppm. Po wnikliwej interpretacji widm NMR (^1H - ^{13}C HMBC) oraz wykonaniu analizy elementarnej i widm masowych strukturę związku scharakteryzowano jako 1,1'-metyleno-bis-N⁶,N⁶-{9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeninę} (**212**). Dimer ten powstaje z 1,25% wydajnością.

Po scharakteryzowaniu struktury związku zaproponowano mechanizm jego powstawania (schemat 64).





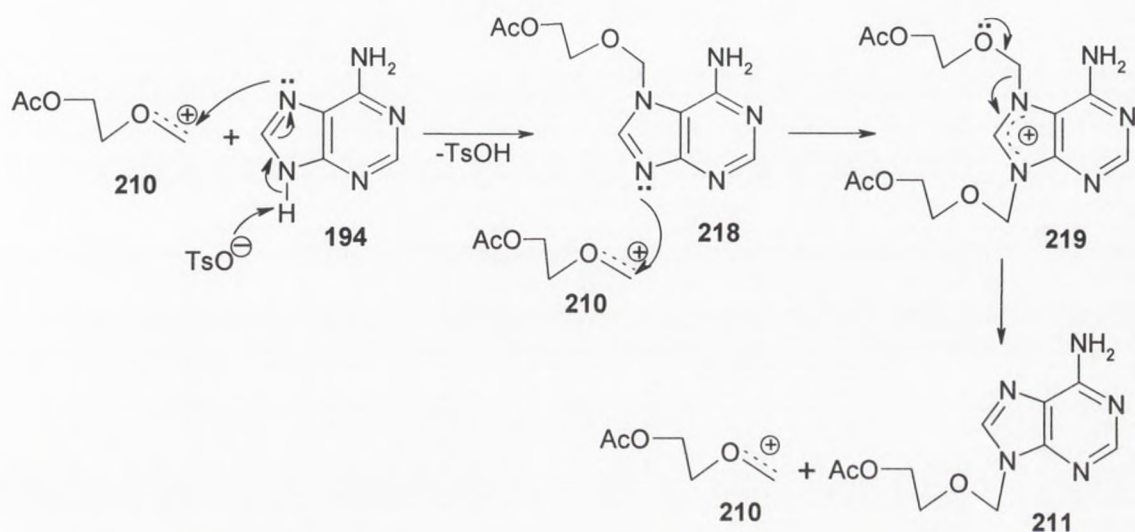
Schemat 64

Kluczowym elementem zaproponowanego mechanizmu jest istnienie w mieszaninie reakcyjnej karboksoniowego kationu cukrowego (**210**), który może ulec nukleofilowemu atakowi atomu azotu nieblokowanej grupy egzoaminowej, powstałego już wcześniej acyklicznego 9-nukleozydu (**211**). Ponieważ komponent pseudocukrowy użyty jest w dużym nadmiarze, kation cukrowy powinien występować w dużym stężeniu, dzięki czemu nukleofilowy atak azotu z pozycji N^6 nie jest konkurencyjny do tworzenia 9-nukleozydu. Z powstałego z przyłączenia kationu cukrowego związku zostaje następnie oderwany proton przez znajdujący się w roztworze anion tosyłowy, co prowadzi do otrzymania związku **213**. W wyniku protonowania mostkowego tlenu w strukturze **214**, rozerwaniu ulega wiązanie C-O, co prowadzi do wytworzenia reaktywnej zasady Schiffa (**215**) ulegającej nukleofilowemu atakowi kolejnej cząsteczki 9-podstawionego nukleozydu (**211**). Prowadzi to do powstania struktury **217**, z której w wyniku oderwania protonu przez jon tosyłowy otrzymywana jest cząsteczka dimeru (**212**) oraz odtworzony zostaje katalizator ($p\text{-TsOH}$). Analogiczną dimeryzację zaobserwowano już wcześniej w przypadku acyklonukleozydów indazolowych¹¹³.

W przeprowadzonym eksperymencie nie zaobserwowano powstawania kinetycznego produktu N^7 - lub N^3 -podstawionego. Wysoka temperatura, w której prowadzono reakcję mogła

[The text in this section is extremely faint and illegible. It appears to be a list or a series of entries, possibly a table of contents or a list of names and titles. The text is too light to transcribe accurately.]

powodować szybkie przejście produktu kinetycznego w trwały termodynamiczny związek N9-podstawiony. Jednak istnienie kinetycznych produktów jest niezbędne do zajścia reakcji i powstania 9-nukleozydu, ponieważ bezpośrednia glikozylacja w pozycję N9 jest niemożliwa z powodu zablokowania przez proton. Tak więc nukleofilowy atak na kation cukrowy musi być wyprowadzony z innego centrum nukleofilowego niż atom azotu N9. Pozostają więc pozycje N1, N3 lub N7. Najbardziej prawdopodobny wydaje się atak atomu azotu N7, ponieważ tylko w tym przypadku nie zostaje zaburzona aromatyczna struktura elektronowa w sześciocłonowym pierścieniu pirymidynowym. Proponowany mechanizm powstawania 9-podstawionego produktu w tej reakcji przedstawiono na schemacie 65.



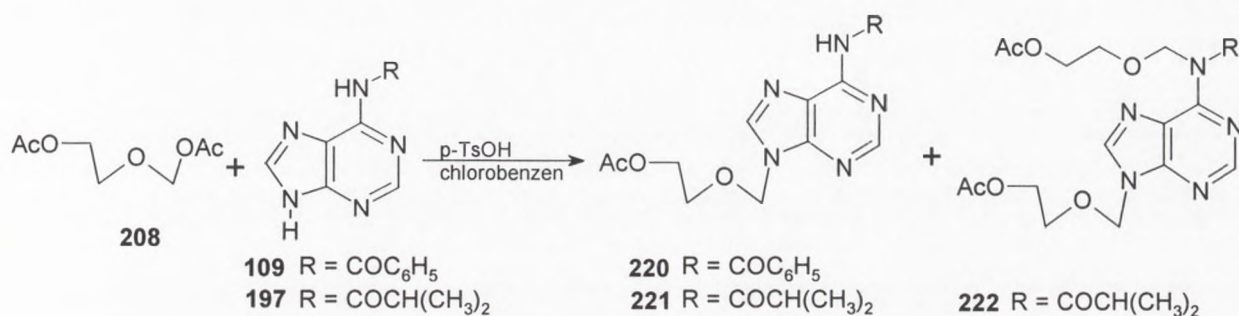
Schemat 65

W pierwszym etapie proponowanego mechanizmu nukleofilowy atak atomu N7 na pozycję C1 kationu cukrowego, z równoczesnym oderwaniem protonu przez jon tosyłowy, prowadzi do powstawania związku **218**. Następnie w wyniku ataku nukleofilowego atomu azotu N9 na kolejny kation cukrowy, wytworzony zostaje nietrwały 7,9-dipodstawiony związek (**219**), którego dekompozycja prowadzi do otrzymania acyklicznego 9-nukleozydu (**211**) oraz odtworzenia kationu cukrowego (**210**).

Na podstawie powyższego eksperymentu postanowiono przeprowadzić reakcje N⁶-blokowanych pochodnych adeniny z eterem (2-acetoksyetylo)acetoksymetylowym wobec *p*-TsOH w chlorobenzenie.

W wyniku reakcji N⁶-benzoiloadeniny (**109**) ze związkiem **208** w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika (temperatura łaźni 154°C) prowadzonej przez 3 godziny uzyskano klarowny roztwór. Analiza TLC wykazała, że w wyniku kondensacji otrzymano dwa związki o R_f wyższych od substratu. Produkt o najwyższym współczynniku R_f powstawał z niewielką,

kilkuprocentową wydajnością. Substraty użyte do reakcji nie przereagowały całkowicie (przereagowało ok. 50% związku **109**). Mieszaninę reakcyjną odparowano do sucha, a następnie rozdzielono chromatograficznie na kolumnie, stosując jako eluent układ chloroform-metanol w gradiencie stężenia. W wyniku rozdziału otrzymano tylko związek o niższym R_f w formie białego osadu z wydajnością 62%, który następnie krystalizowano na gorąco z 40% etanolu. Związku o wyższym R_f nie udało się wyizolować z powodu jego bardzo niskiej wydajności. Po przeprowadzonej analizie krystalicznego produktu metodami spektroskopowymi (UV, ^1H NMR) strukturę związku scharakteryzowano jako N^6 -benzoilo-9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeninę (**220**).



Schemat 66

Natomiast w wyniku podobnej reakcji N^6 -izobutyrylowej pochodnej adeniny (**197**) z komponentem pseudocukrowym otrzymano dwa produkty. Analiza TLC pokazała, że związek o niższym R_f porusza się analogicznie jak N^9 -acyklo pochodna adenozyiny (**221**), produkt ten powstaje z dużą wydajnością. Natomiast produkt o wyższym R_f powstaje z niewielką wydajnością. Oba związki udało się wyizolować po przeprowadzeniu rozdziału na kolumnie chromatograficznej. Analiza widm UV oraz ^1H NMR związku poruszającego się chromatograficznie wolniej potwierdziły jego strukturę jako N^6 -izobutyrylo-9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeninę (**221**) powstającą z wydajnością 67%. Natomiast drugi związek scharakteryzowano po wnikliwej analizie widm UV, ^1H i ^{13}C NMR jako N^6 -izobutyrylo-9, N^6 -di-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeninę (**222**); powstaje on z wydajnością 0.8%.

W tym przypadku nie obserwowano tworzenia się dimeru jak miało to miejsce w przypadku glikozylacji nieblokowanej adeniny. Przyczyną uniemożliwiająca dimeryzację jest obecność drugiego podstawnika w pozycji N^6 , który uniemożliwia przegrupowanie, prowadzące do utworzenia podwójnego wiązania C=N, jak miało to miejsce w odpowiedniej zasadzie Schiffa (schemat 64).

3.2.6. Podsumowanie

W żadnym z przeprowadzonych eksperymentów we wrzącym chlorobenzenu wobec kwasu protonującego (p-TsOH) nie zaobserwowano powstawania kinetycznych produktów (N7-, N3- lub N1-podstawionych). Wyizolowane zostały tylko termodynamiczne produkty reakcji, 9-nukleozydy. Prawdopodobnie wysoka temperatura wpływa na szybką transformację kinetycznych produktów w trwalsze N9-podstawione regioizomery. Natomiast powstawanie dimeru (**212**) w reakcji kondensacji komponentu pseudocukrowego **208** z adeniną (**194**) czy też w przypadku N⁶-blokowanej adeniny związku N⁶,N⁶-dipodstawionego **222** spowodowane może być stosowaniem dużych nadmiarów substratu **208**.

In 1951, the *Journal of the History of Biology* was founded as a quarterly journal of the American Society for the History of Biology. The journal's primary focus is on the history of biology in the United States and Canada, but it also publishes articles on the history of biology in other countries. The journal is required reading for all biologists and historians of biology. The journal is published by the American Society for the History of Biology, 11 Dupont Circle, N.W., Washington, D.C. 20036. The journal is published quarterly, in January, April, July, and October. The journal is published in English. The journal is published in print and online. The journal is published in print and online. The journal is published in print and online.

3.3. Badanie przebiegu reakcji rybozylacji adeniny metodą sililową

3.3.1. Wstęp

W rozdziale 1.2.3. niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad reakcjami syntezy nukleozydów metodą sililową, która znalazła zastosowanie zarówno do otrzymywania nukleozydów pirymidynowych^{64,67} jak i purynowych^{40,70,71}. W zależności od użytego rozpuszczalnika, rodzaju zastosowanej zasady heterocyklicznej oraz katalizatora, w wyniku reakcji otrzymać można różne N-podstawione nukleozydy. Mechanizm tych procesów zaproponowany został przez Watanabe, Hollenberga i Foxa¹⁷ i według autorów rybozylacja puryny przebiega przez kinetyczne produkty 3- lub 7-podstawione pochodne w przypadku nukleozydów 6-oksopurynowych. Natomiast Vorbrüggen i Höfle⁴⁰ zaproponowali schemat reakcji w przypadku pochodnych N⁶-benzoilowych adeniny, gdzie rybozylacja prowadzi do powstawania N1, N3 lub N7 regioizomeru adenozyiny (schemat 25). Według przewidywań autorów, które jednak nie zostały potwierdzone eksperymentalnie, możliwe jest otrzymywanie różnych kinetycznych produktów, ponieważ w wyniku reakcji sililowania adeniny powstawać mogą różne sililowe pochodne, które indywidualnie reagują z kationem cukrowym, prowadząc do otrzymania różnych N-podstawionych izomerów nukleozydu. Natomiast dłuższy czas reakcji prowadzi do powstania termodynamicznego produktu N9-podstawionego nukleozydu.

Sililowe pochodne zasad heterocyklicznych otrzymywane są w łatwy sposób przez potraktowanie zasady heterocyklicznej odczynnikiem sililującym takim jak: trimetylochlorosilan (TMSCl), heksametylodisilazan (HMDS) lub N,O-bis(trimetylosililo)acetamid (BSA). Grupy sililowe stosowane w syntezie nukleozydów polepszają rozpuszczalność związku i są także łatwe do usunięcia. Natomiast niższa elektroujemność atomu krzemu w stosunku do atomu węgla sprawia, że grupy te są podatne na atak nukleofilowy. Efekt indukcyjny wywołany przez grupy metylowe podstawnika trimetylosililowego sprawiają, że sililowana zasada heterocykliczna staje się lepszym nukleofilem.

Tak więc na podstawie powyższych faktów postanowiono zbadać przebieg reakcji glikozylacji metodą sililową adeniny oraz N⁶-blokowanych pochodnych adeniny.

3.3.2. Reakcje rybozylacji nieblokowanej adeniny

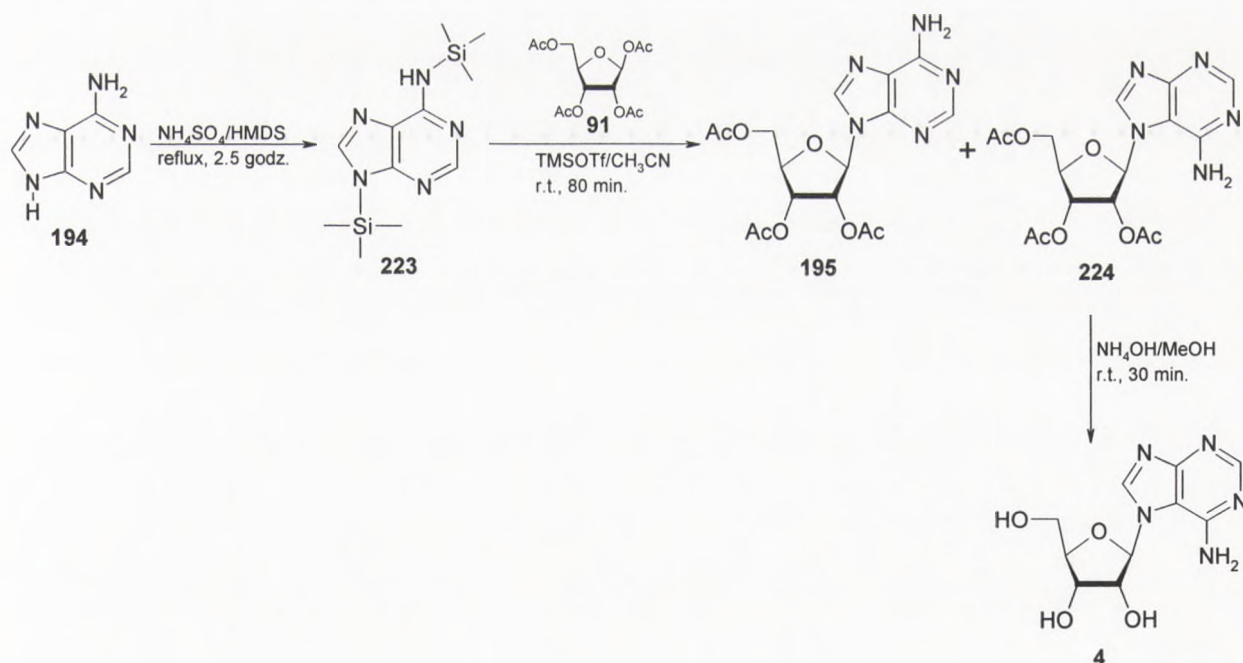
Reakcja syntezy adenozyiny z nieblokowanej adeniny i komponentu cukrowego przeprowadzili Itoh i Mizuno⁷² w 1976 roku. Autorzy do kondensacji wykorzystali metodę siliłową, stosując jako katalizator tetrachlorek cyny, otrzymując w jej wyniku 7- i 9-regioizomery adenozyiny.

Postanowiliśmy więc sprawdzić poprawność uzyskanych wcześniej wyników przeprowadzając reakcję syntezy nukleozydu z zastosowaniem następujących czynników siliłujących: N,O-bis(trimetylosililo)acetamid (BSA) oraz heksametylodisilazan (HMDS). Natomiast jako katalizator zastosowano ester trimetylosililowy kwasu trifluorometano-sulfonowego (TMSOTf).

W celu syntezy 7-izomeru adenozyiny przeprowadzono reakcję siliłowania adeniny (**194**) w bezwodnym acetonitrylu stosując jako odczynnik siliłujący BSA, w wyniku czego substrat **194** uległ całkowitemu rozpuszczeniu. Następnie do uzyskanej mieszaniny dodano 1,2,3,5-tetra-O- β -D-rybofuranozy (**91**) i TMSOTf. Komponent cukrowy **91** rozpuścił się całkowicie po kilku minutach; otrzymano klarowny roztwór. Reakcję kondensacji prowadzono w temperaturze 70°C przez 21 godzin. Analiza TLC pokazała tworzenie się z niewielką wydajnością dwóch produktów. Przereagowanie substratu było stosunkowo niskie i wynosiło około 20-30%. Związek o wyższym R_f poruszał się chromatograficznie jak triacetyloadenozyina (**195**), natomiast plamka o niższym R_f składała się prawdopodobnie z dwóch innych produktów. Mieszaninę reakcyjną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie poddano rozdzielaniu na kolumnie chromatograficznej, otrzymując związek **195** z wydajnością 18.6%. Związek ten posiadał widmo UV o λ_{\max} =258.8 nm i λ_{\min} =227.4 nm, co potwierdziło strukturę produktu jako 9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranosylo)adeninę. Natomiast związek o niższym R_f uległ całkowitemu rozpadowi, co uniemożliwiło jego charakterystykę.

W celu zwiększenia wydajności reakcji syntezy nukleozydu, postanowiono zastosować inną procedurę siliłowania. W tym celu adeninę (**194**) poddano bezpośrednio reakcji z heksametylodisilazaniem, w atmosferze argonu wobec siarczanu (VI) amonu w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. W wyniku reakcji substrat **194** rozpuścił się całkowicie. Następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując biały, gęsty osad, który rozpuszczono w suchym acetonitrylu i w atmosferze argonu dodano tetraacetyloribofuranozę (**91**) oraz katalizator (TMSOTf). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 80 minut. Analiza TLC mieszaniny reakcyjnej pokazała tworzenie się dwóch głównych produktów

poruszających się chromatograficznie szybciej od **194**. Związek o wyższym R_f poruszał się chromatograficznie jak triacetyloadenozyna (**195**) i powstawał z wydajnością ok. 5-10%, natomiast związek o R_f nieco wyższym od substratu **194** powstawał z szacunkową wydajnością ok. 30-40%. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując białą pianę, którą poddano wstępnemu oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent układ chloroform-metanol 5:1. Umożliwiło to usunięcie nieprzereagowanych substratów (**194**, **91**) oraz kilku produktów reakcji powstających z niewielką wydajnością (1-3%). Frakcje zawierające oba główne produkty połączono razem i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie poddano rozdzielowi na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent chloroform-metanol w gradiencie stężenia 95:5 → 9:1. W wyniku rozdzielu otrzymano 9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**195**) z wydajnością 5.3%. Strukturę związku potwierdzono wykonując widmo UV (λ_{\max} = 259.4 nm, λ_{\min} = 226.6 nm). Natomiast produkt o niższym R_f posiadał widmo w ultrafiolecie o λ_{\max} = 274.4 nm i λ_{\min} = 232.2 nm. Po wnikliwej analizie widm ^1H i ^{13}C NMR związek ten scharakteryzowano jako 7-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**224**). Widmo węglowe tego produktu posiadało sygnał pochodzący od węgla C-5 przy 110.20 ppm, charakterystyczny dla N7-podstawionych pochodnych puryn. Znając strukturę związku obliczono jego wydajność, która wyniosła 35.7%. Syntezę obu regioizomerów (**195**, **224**) przedstawiono na schemacie 67.



Schemat 67

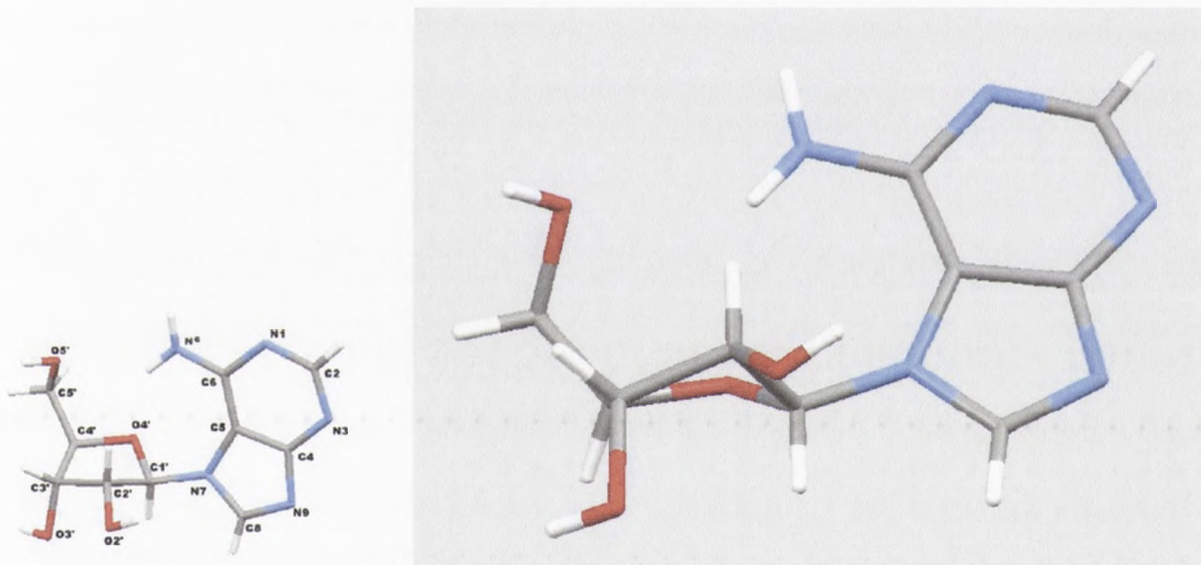
The first part of the report deals with the general situation of the country. It is noted that the weather has been very dry and hot, and that the crops are suffering. The government has taken measures to provide relief to the people, and it is hoped that these measures will be successful.

The second part of the report deals with the financial situation of the country. It is noted that the government has a large deficit, and that the public debt is increasing. It is suggested that the government should take measures to reduce its expenditure, and to increase its revenue.

The third part of the report deals with the social situation of the country. It is noted that there is a large amount of poverty and distress, and that the people are suffering from lack of food and clothing. It is suggested that the government should take measures to provide relief to the people, and to improve the social conditions of the country.

The fourth part of the report deals with the political situation of the country. It is noted that there is a large amount of corruption and mismanagement in the government, and that the people are suffering from the consequences. It is suggested that the government should take measures to reform itself, and to improve the political situation of the country.

Następnie związek **224** rozpuszczono w metanolu i poddano reakcji z 25% wodnym roztworem amoniaku. Usunięcie grup acetylowych prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Analiza TLC wykazała tworzenie się głównego produktu o niższym R_f od substratu (chloroform-metanol 4:1, izopropanol-amoniak-woda 7:1:2) powstającego z około 80-90% wydajnością. Następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując biały osad, który mieszano w roztworze chloroform-metanol 95:5 przez 1 godzinę w celu usunięcia ubocznych produktów odblokowania. Produkt krystalizowano z metanolu, otrzymując drobnokrystaliczny osad, który poddano charakterystyce spektroskopowej (UV, NMR) oraz analizie rentgenograficznej. Analiza widm NMR pozwoliła na potwierdzenie struktury związku jako 7-adenozyny (**4**). Widmo ^{13}C NMR posiadało charakterystyczny sygnał przy 110.05 ppm pochodzące od węgla C5. Także badania rentgenograficzne potwierdziły, że otrzymany związek to 7-rybofuranozyloadenina (**4**). Przestrzenną strukturę otrzymanego związku przedstawiono na rysunku 1 (rzut wzdłuż wiązania C3'-C4').

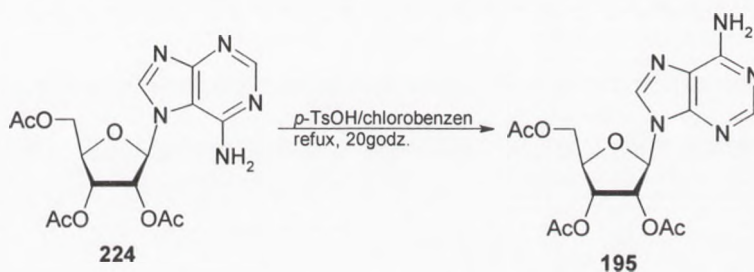


Rysunek 1

W wyniku analizy krystalograficznej związek **4** zaklasyfikowano do grupy przestrzennej $P 2_1,2_1,2$, gdzie w komórce elementarnej znajduje się jedna cząsteczka związku **4**. Na podstawnie kątów torsyjnych: (ν_0) C4'-O4'-C1'-C2' (-41.22°), (ν_1) O4'-C1'-C2'-C3' (49.52°), (ν_2) C1'-C2'-C3'-C4' (-37.42°), (ν_3) C2'-C3'-C4'-O4' (14.94°), (ν_4) C3'-C4'-O4'-C1' (16.32°), obliczono kąt fazowy pseudorotacji $P=141.38^\circ$, z czego wynika, że pierścień rybozy znajduje się w konformacji 2_1T , czyli C2'-endo-C1'-egzo. Szczegółowe dane analizy krystalograficznej zostały przedstawione w części eksperymentalnej.

3.3.2.1. Reakcja 7-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny w warunkach transglikozylacji

Chcąc potwierdzić tezę, że 7-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adenina (**224**) jest kinetycznym produktem reakcji syntezy 9-nukleozydu, przeprowadzono izomeryzację związku **224** w bezwodnym chlorobenzenu wobec 10% molowych kwasu *p*-toluenosulfonowego jako katalizatora (schemat 68). Reakcję prowadzono przez 20 godzin, ogrzewając mieszaninę do temperatury wrzenia rozpuszczalnika. Analiza TLC (chloroform-metanol 9:1, toluen-etanol 4:1) wykazała, że już po 2,5 godziny nastąpiła konwersja związku **224** z wydajnością 50% do triacetyloadenozyny (**195**), natomiast po 20 godzinach w mieszaninie reakcyjnej obserwowano już tylko związek **195**; 7-regioizomer uległ całkowitej izomeryzacji do 9-nukleozydu.



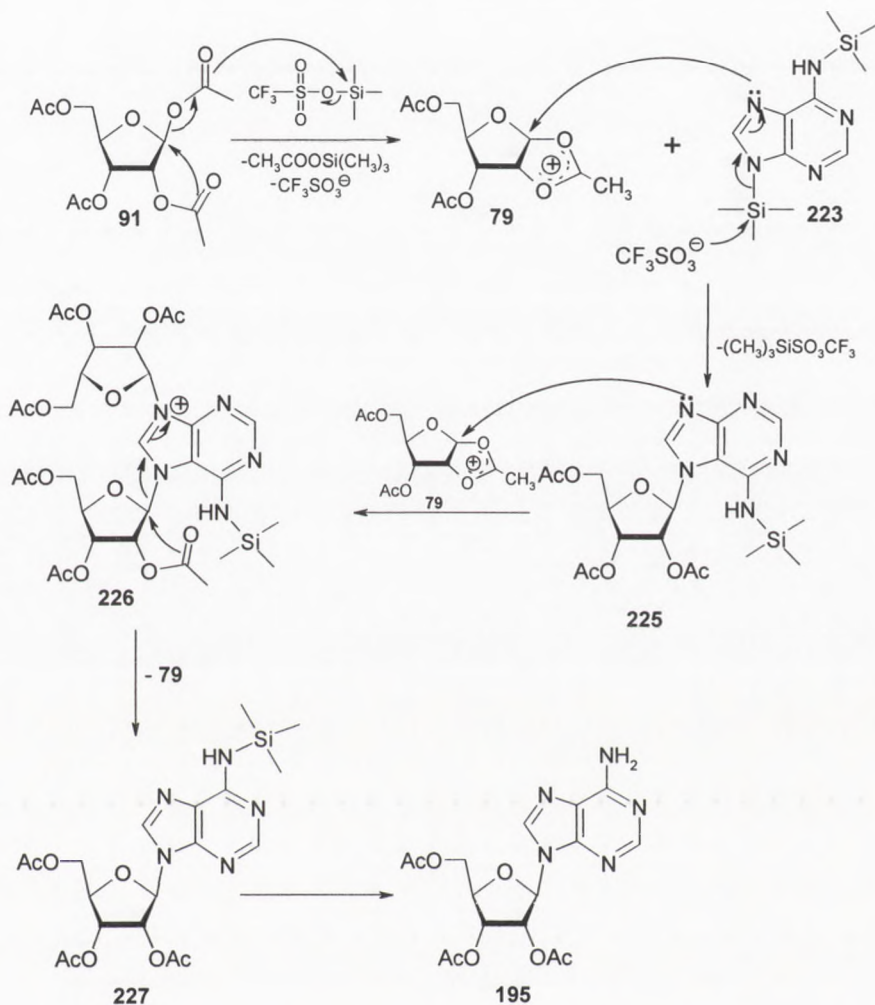
Schemat 68

Przeprowadzona reakcja pozwoliła potwierdzić, że związek **224** ulega izomeryzacji do odpowiedniego 9-nukleozydu (**195**), który jest termodynamicznie bardziej uprzywilejowany. Wykazano więc, że 7-izomer triacetyloadenozyny jest kinetycznym produktem reakcji przeprowadzonej metodą siliową, a obserwowany proces ma charakter nieodwracalnej 7→9 transglikozylacji.



3.3.2.2. Mechanizm reakcji glikozylacji nieblokowanej adeniny

Na podstawie przeprowadzonych badań reakcji rybozylacji nieblokowanej adeniny (**194**) zaproponowano mechanizm jej glikozylacji z wytworzeniem kinetycznego N7-podstawionego nukleozydu oraz jego izomeryzację do termodynamicznie trwałego 9-nukleozydu. Mechanizm tego procesu może więc wyglądać jak przedstawiony na schemacie 69.



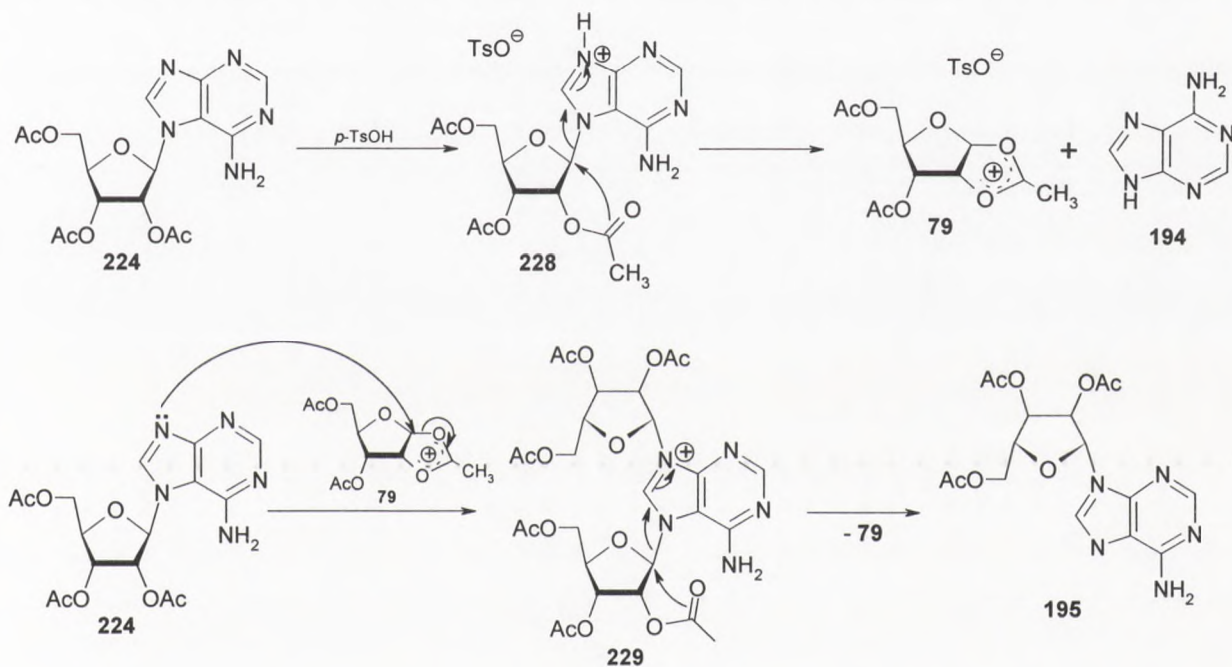
Schemat 69

Proces syntezy 9-(2',3',5'-tri-O-acetylrybofuranosyl)adeniny (**195**) metodą silylową można podzielić na kilka etapów. Pierwszym i kluczowym etapem jest wytworzenie 1,2-acyloksoniowego kationu cukrowego (**79**) w wyniku reakcji tetraacetylrybofuranosy (**91**) z estrem trimetylosililowym kwasu trifluorometanosulfonowego. Powstały kation **79** ulega następnie nukleofilowemu atakowi atomu N7 silylowej pochodnej adeniny (**223**) z równoczesnym usunięciem grupy silylowej z pozycji N9 przez resztę kwasu trifluorometanosulfonowego, w wyniku czego powstaje N⁶-silylowa pochodna 7-(triacetylrybo-



furanozylo)adeniny (**225**) oraz odtworzona zostaje cząsteczka katalizatora (TMSOTf). Atak bezpośredni z pozycji N9 jest niemożliwy, ponieważ w związku **223** w tej pozycji znajduje się grupa trimetylosililowa, uniemożliwiająca wyprowadzenie nukleofilowego ataku na atom C1 kationu cukrowego **79**. W kolejnym etapie, w wyniku ataku pary elektronowej atomu N9 związku **225** na kation cukrowy **79**, otrzymana zostaje 7,9-diglikozyłowa pochodna adeniny **226**, której rozpad prowadzi do otrzymania sililowej pochodnej triacetyloadenozyny (**227**) oraz odtworzenia kationu cukrowego **79**. Następnie przez usunięcie grupy sililowej z pozycji N⁶ otrzymana zostaje triacetyloadenozyna **195**.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji reakcji izomeryzacji 7-(triacetyloribofuranozylo)adeniny (**224**) do 9-nukleozydu (**195**) w warunkach transglikozylacji (10% molowych *p*-TsOH, wrzący chlorobenzen) zaproponowano także mechanizm 7→9 izomeryzacji, zachodzącej wobec kwasu protonującego.



Schemat 70

W tym przypadku donorem kationu cukrowego jest sam 7-nukleozyd (**224**). W wyniku protonowania atomu N9 następuje rozerwanie wiązania N7-glikozydowego z powstaniem adeniny (**194**) oraz kationu **79**. Oczywiście możliwa jest ponowna kondensacja obu komponentów z odtworzeniem wyjściowego 7-nukleozydu, jednak proces rearanżacji wiązania N7-glikozydowego można uznać za mało znaczący, ponieważ równowaga reakcji rozpadu kinetycznego produktu oraz syntezy termodynamicznego powinna być przesunięta w kierunku tworzenia trwalszego nukleozydu. Powstały 1,2-acyloksoniowy kation cukrowy (**79**) atakowany

jest następnie przez parę elektronową atomu N9 cząsteczki 7-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny (**224**), wynikiem czego jest otrzymanie związku o strukturze 7,9-dipodstawionej adeniny (**229**). Rozpad związku **229** prowadzi do otrzymania triacetyloadenozyny (**195**) oraz odtworzenia kationu **79**, który może uczestniczyć w dalszej reakcji izomeryzacji, ulegając nukleofilowemu atakowi kolejnej cząsteczki 7-nukleozydu (**224**).

Badanie procesu izomeryzacji 7-nukleozydu (**224**) pokazało więc, że związek ten jest rzeczywiście kinetycznym produktem reakcji prowadzonej metodą sililową, z zastosowaniem N⁶-nieblokowanej adeniny. Transglikozylacja ta ma charakter nieodwracalny i zachodzi według schematu 7→9 izomeryzacji przez produkt pośredni o strukturze 7,9-dirybozyloadeniny. Końcowym rezultatem tego procesu jest otrzymanie trwałego termodynamicznie związku, 9-nukleozydu **195**.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

In the second section, the author outlines the various methods used to collect and analyze the data. This includes both primary and secondary data collection techniques. The primary data was gathered through direct observation and interviews with key personnel. Secondary data was obtained from existing reports and databases.

The analysis of the data revealed several key trends and patterns. One significant finding was the correlation between certain variables, which suggests a causal relationship. This insight is crucial for understanding the underlying factors influencing the outcomes.

Finally, the document concludes with a series of recommendations based on the findings. These suggestions are aimed at improving efficiency and reducing costs. It is hoped that these measures will lead to a more streamlined and effective process.

3.3.3. Reakcje rybozylacji N⁶-acylowanych pochodnych adeniny

Badanie procesu rybozylacji N⁶-acylowanych pochodnych adeniny prowadzono dwoma metodami stosując jako odczynnik silylujący BSA w acetonitrylu lub HMDS, który stanowił także rozpuszczalnik. Do reakcji kondensacji użyto pochodnych adeniny z grupami blokującymi w pozycji N⁶ takimi jak: acetyl, benzoil lub izobutyryl.

W pierwszym eksperymencie przeprowadzono rybozylację N⁶-izobutyryloadeniny (**197**) w warunkach silylujących. Bezwodną mieszaninę tej pochodnej adeniny i 1,2,3,5-tetra-O-acetyloribofuranozy (**91**) w acetonitrylu potraktowano BSA. Reakcję prowadzono w atmosferze argonu w temperaturze 75°C do otrzymania klarownego roztworu (30 minut). Następnie dodano katalizator, ester trimetylosililowy kwasu trifluorometanosulfonowego (TMSOTf) i reakcję prowadzono dalej w tej samej temperaturze. Analiza TLC wykonana w układzie chromatograficznym chloroform-metanol 9:1 pokazała, że w wyniku kondensacji otrzymano trzy produkty o współczynnikach R_f wyższych od substratu (R_f=0.80, 0.70, 0.54). Szacunkowy stopień przereagowania substratu według TLC wyniósł około 60%. Związek o R_f=0.70 poruszał się chromatograficznie identycznie jak N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)-adenina (**198**). Reakcję zakończono po trzech godzinach ochładzając mieszaninę do temperatury pokojowej, dodając chlorku metylenu i ekstrahując nasyconym roztworem kwaśnego węgla sodu. Osuszoną nad bezwodnym siarczanem sodu i odparowaną pod zmniejszonym ciśnieniem mieszaninę reakcyjną rozdzielano następnie za pomocą chromatografii kolumnowej, jako eluent stosując układ chloroform-acetonitryl w gradiencie stężenia 2:1 → 1:1. Wszystkie trzy produkty reakcji wyizolowano i poddano charakterystyce za pomocą metod spektroskopowych (UV, NMR). Związek o najniższym R_f charakteryzował się widmem w ultrafiolecie o λ_{max} 313.2 nm i λ_{min} 255.2 nm, produkt o R_f=0.70 miał widmo o λ_{max} 272.4 nm i λ_{min} 233.6 nm, odpowiadające N⁶-izobutyrylowej pochodnej triacetyloadenozyny (**198**), natomiast związek o najwyższym R_f wykazywał λ_{max} przy 293.8 nm oraz λ_{min} 240.4 nm.

Dalszych danych strukturalnych dostarczyły widma ¹H i ¹³C NMR, które wykazały że w przypadku wszystkich produktów występują sygnały pochodzące zarówno od części cukrowej jak i zasady heterocyklicznej. W przypadku związku o najniższym R_f w widmie protonowym wykonanym w DMSO-d₆ zaobserwowano zanik sygnału w stosunku do substratu (**197**) przy 11.15 ppm, charakterystycznego dla protonu znajdującego się przy atomie azotu N⁶. Widoczny był też bardzo szeroki sygnał 12.36 - 13.13 ppm pochodzący najprawdopodobniej od protonu w pozycji N9. Nie jest jednak wykluczone, że powstanie tak szerokiego sygnału spowodowane

3.4. Purification of the Enzyme

The enzyme was purified from the culture supernatant by a series of steps. The culture supernatant was first filtered through Whatman No. 1 filter paper and then concentrated by ultrafiltration using a Millipore ultrafilter. The concentrate was then dialyzed into 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The dialysate was then concentrated by ultrafiltration and the concentrate was then dialyzed into 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The dialysate was then concentrated by ultrafiltration and the concentrate was then dialyzed into 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride.

The enzyme was then purified by ion exchange chromatography using a DEAE Sepharose column. The column was equilibrated with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then applied to the column and the column was washed with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then eluted with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride.

The enzyme was then purified by size exclusion chromatography using a Sepharose 6B column. The column was equilibrated with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then applied to the column and the column was washed with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then eluted with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride.

The enzyme was then purified by affinity chromatography using a Sepharose 6B column. The column was equilibrated with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then applied to the column and the column was washed with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then eluted with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride.

The enzyme was then purified by size exclusion chromatography using a Sepharose 6B column. The column was equilibrated with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then applied to the column and the column was washed with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then eluted with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride.

The enzyme was then purified by affinity chromatography using a Sepharose 6B column. The column was equilibrated with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then applied to the column and the column was washed with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then eluted with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride.

The enzyme was then purified by size exclusion chromatography using a Sepharose 6B column. The column was equilibrated with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then applied to the column and the column was washed with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then eluted with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride.

The enzyme was then purified by affinity chromatography using a Sepharose 6B column. The column was equilibrated with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then applied to the column and the column was washed with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride. The enzyme was then eluted with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.1 M sodium chloride.

jest szybką tautomerią N7-H \rightleftharpoons N9-H. Także sygnały pochodzące od protonów H-2, H-8 oraz C1'-H były szerokie. Dopiero wykonanie widma w CDCl₃ pozwoliło na uzyskanie ostrych, wyraźnych sygnałów zarówno w przypadku protonowego jak i węglowego rezonansu jądrowego. Jednak nie wystarczyło to na jednoznaczne określenie pozycji podstawienia pierścienia adeniny rybozą. Wykonano więc dodatkowo widma dwuwymiarowe (¹H-¹³C HMBC i MSQC, ¹H-¹⁵N HMBC, ¹H-¹H COSY) oraz NOE, na których podstawie określono strukturę związku jako N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**231**). Analiza widm ¹H NMR wykazała, że najprawdopodobniej podstawieniu uległ pierścień pirymidynowy, a nie imidazolowy, na co wskazywał sygnał przy 12.94 ppm charakterystyczny dla protonu znajdującego się w pozycji N9. Nie obserwowano natomiast sygnału pochodzącego od protonu N⁶-H, co jest wynikiem powstania ugrupowania iminowego. Na podstawie widm korelacyjnych ¹³C, ¹H HMQC przypisano poszczególnym protonom powiązane z nimi bezpośrednio atomy węgla.

Dowodem potwierdzającym podstawienie zasady heterocyklicznej w pozycji N1 rybozą były widma NOE, za pomocą których wykazano, że w pobliżu protonu 1'-H znajdują się: grupy metylowe pochodzące od grupy izobutyrylowej w pozycji N⁶ oraz protony 2-H i 2'-H. Natomiast w bliskiej odległości od protonu w pozycji N9 lub N7 (dokładnego położenia protonu nie udało się ustalić) znajduje się proton 8-H, analogicznie naświetlenie charakterystyczną częstotliwością protonu 8-H (8.13 ppm) wykazało bliskość protonu N9-H/N7-H (12.49 ppm). Selektywne naświetlenie protonu 2-H (8.82 ppm) pokazało wzmocnienie sygnałów pochodzących od protonów rybozy. Widma te jednoznacznie potwierdziły podstawienie pierścienia adeniny rybozą w pozycji N1.

Dzięki poznaniu struktury związku stało się możliwe obliczenie wydajności powstałego N1-podstawionego rybozą produktu (**231**), która wyniosła 32.5%. Związek ten następnie krystalizowano z 40% roztworu etanolu, otrzymując drobnokrystaliczny osad.

Analiza widm spektroskopowych (UV, ¹H i ¹³C NMR) związku o R_f=0.70 poruszającego się chromatograficznie jak N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-O-acetyloribofuranozylo)adenina (**198**) potwierdziła jego strukturę jako 9-nukleozydu (**198**). Uzyskane widma były identyczne z widmami związku otrzymanego w wyniku reakcji N⁶-izobutyryloadeniny (**197**) z tetraacetyloribofuranozą (**91**) wobec kwasu *p*-TsOH (rozdział 3.2.3.). Obliczona wydajność syntezy związku **198** wyniosła 10%.

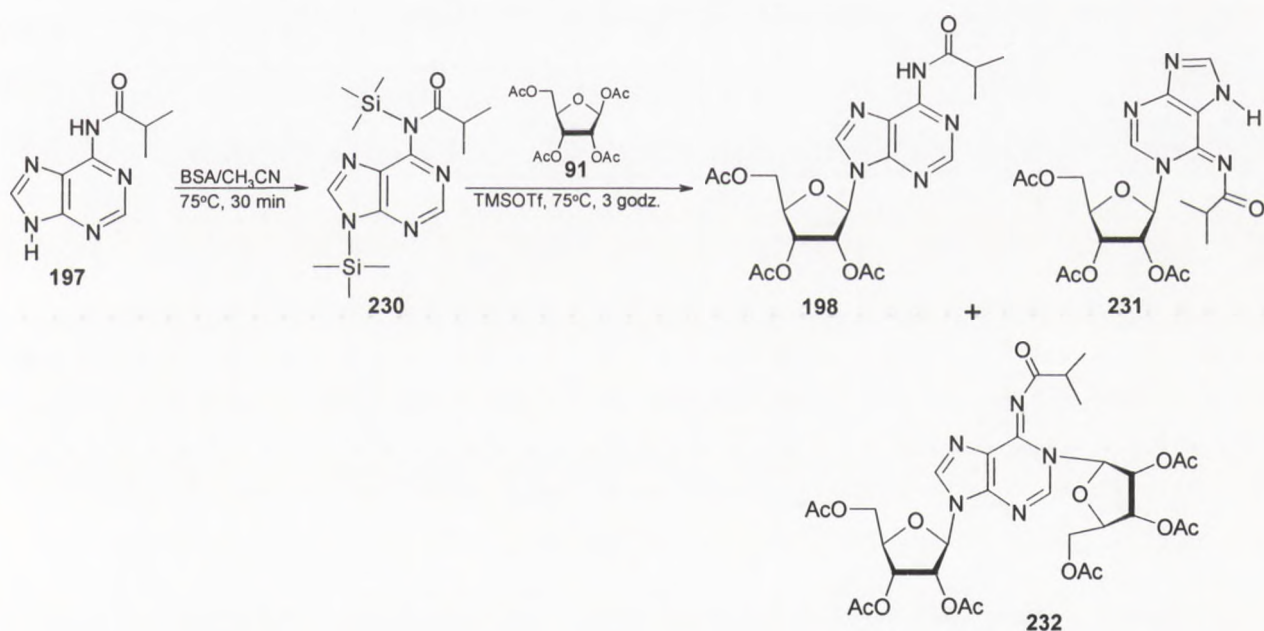
Natomiast w przypadku związku o najwyższym R_f określenie struktury okazało się bardziej skomplikowane. Wykonane widma ¹H i ¹³C NMR sygnalizowały, że związek posiada w swojej strukturze dwie reszty cukrowe. Pewnych informacji dostarczyły także widma protonowego rezonansu jądrowego, z których wynikało, że związek nie posiada protonu N9-H

co świadczy o podstawieniu rybozą w pozycji N9, nie obserwowano także sygnału od protonu N⁶-H.

Szczegółowe dane strukturalne otrzymano po wykonaniu widm ¹H-¹³C HMBC oraz TOSCY. Analiza widm TOCSY, gdzie obserwowano korelację wszystkich protonów należących do jednego układu spinowego, pozwoliła na wyodrębnienie poszczególnych sygnałów pochodzących od jednej jak i drugiej rybozy. Natomiast na podstawie widm ¹H-¹³C HMBC oraz NOE ustalono, że zasada podstawiona jest w pozycji N9 oraz N1. Zatem otrzymany produkt jest związkiem o strukturze N⁶-izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofozanozyl)-adeniny. Znając masę związku (**232**) obliczono procentową wydajność jego otrzymywania, która wyniosła 5%.

Tak więc udało się wyizolować dwa powstające w wyniku reakcji regioizomery adenozyiny oraz związek 1,9-dipodstawiony, który był przewidywanym związkiem pośrednim w procesie transglikozylacji 1→9.

Syntezę obu regiomerów (**231**, **198**) oraz związku 1,9-podstawionego (**232**) przedstawiono na schemacie 71.



Schemat 71

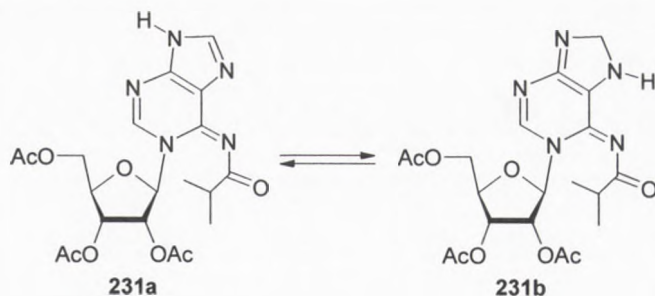
Omawiając szczegółowo strukturę kinetycznego produktu rybozylacji, 1-regioizomeru adenozyiny (**231**) należy dodać, że metodami NMR nie udało się ostatecznie ustalić położenia protonu N-H w pierścieniu imidazolowym. Widmo ¹H NMR wykonane w DMSO-d₆ może sugerować, że w tym rozpuszczalniku mamy do czynienia z mieszaniną tautomerów N9-H (**231a**) i N7-H (**231b**).

The first part of the paper discusses the general approach to the study of the structure of the atom. It is shown that the structure of the atom is determined by the interaction of the electrons with the nucleus. The second part of the paper discusses the structure of the nucleus. It is shown that the structure of the nucleus is determined by the interaction of the nucleons with each other. The third part of the paper discusses the structure of the nucleus. It is shown that the structure of the nucleus is determined by the interaction of the nucleons with each other. The fourth part of the paper discusses the structure of the nucleus. It is shown that the structure of the nucleus is determined by the interaction of the nucleons with each other. The fifth part of the paper discusses the structure of the nucleus. It is shown that the structure of the nucleus is determined by the interaction of the nucleons with each other.



Figure 1

The diagrams illustrate the structure of the atom and nucleus. The first diagram shows the general structure of the atom, with a central nucleus and orbiting electrons. The second diagram shows the structure of the nucleus, with nucleons arranged around a central point. The third diagram shows the structure of the nucleus, with nucleons arranged around a central point. The fourth diagram shows the structure of the nucleus, with nucleons arranged around a central point. The fifth diagram shows the structure of the nucleus, with nucleons arranged around a central point.



Schemat 72

Przesunięcie chemiczne tego protonu $\delta = 12.36\text{-}13.13$ ppm wyklucza raczej tautomer $N^6\text{-H}$, który występuje przy niższych częstościach, np. proton $N^6\text{-H}$ w związku **198** ma przesunięcie chemiczne 10.73 ppm. Do podobnych wniosków może prowadzić analiza widm w ultrafiolecie. Widmo związku **231** różni się bowiem wyraźnie od widma 1,9-dipodstawionej pochodnej **232**, jak to przedstawiono już wcześniej. Fakty te świadczą, że związek **231** może występować w roztworze jako tautomer $N^7\text{H}$ (**231b**), albo jako mieszanina tautomerów (**231a** i **231b**).

W wyniku analogicznej reakcji kondensacji N^6 -izobutyryloadeniny (**197**) z komponentem cukrowym **91** wobec BSA i TMSOTf prowadzonej przez 4 godziny, w temperaturze 70°C otrzymano także mieszaninę trzech związków (**198**, **231** i **232**). Jednak ich wydajności były różne w stosunku do poprzedniej reakcji: związek **231** wyizolowano z wydajnością 16.3%, 9-regioizomer (**198**) z wydajnością 23.1%, natomiast produkt 1,9-dipodstawiony (**232**) z wydajnością 7.6%.

Z przeprowadzonych badań wynika, że prowadzenie reakcji przez dłuższy czas powoduje zwiększenie wydajności 9-podstawionego związku (**198**), natomiast wydajność syntezy 1-regioizomeru (**232**) ulega zmniejszeniu, co może świadczyć o kinetycznym charakterze tego związku oraz o tendencji do przechodzenia w trwalszy 9-nukleozyd.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono syntezę nukleozydu metodą siliową z zastosowaniem HMDS. N^6 -izobutyryloadeninę (**197**) rozpuszczono w HMDS wobec katalitycznych ilości siarczanu (VI) amonu w temperaturze 135°C i atmosferze argonu. Otrzymany klarowny roztwór odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu i dodano 1,2,3,5-tetra-O-acetyloribofuranozy (**91**) oraz TMSOTf jako katalizatora. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Analiza TLC przeprowadzona w fazie chloroform-metanol 9:1 pokazała fakt powstawania trzech związków o $R_f=0.81$, 0.7, 0.58, takich samych jak w poprzednich eksperymentach. Główny produkt o $R_f=0.7$ powstawał z szacunkową wydajnością około 30% natomiast pozostałe dwa produkty z wydajnością po około 5%. Mieszaninę reakcyjną po

odparowaniu pod zmniejszonym ciśnieniem poddano rozdzielni z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej, jako eluent stosując fazę chloroform-acetonitryl 2:1 → 1:1. Produktu o najniższym R_f nie udało się wyizolować, natomiast pozostałe dwa związki po wyizolowaniu poddano charakterystyce UV i ^1H NMR. Analiza widm potwierdziła, że wyizolowane związki to: N^6 -izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adenina (**232**) powstająca z wydajnością 4.3% oraz N^6 -izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)-adenina (**198**) otrzymana z wydajnością 21%.

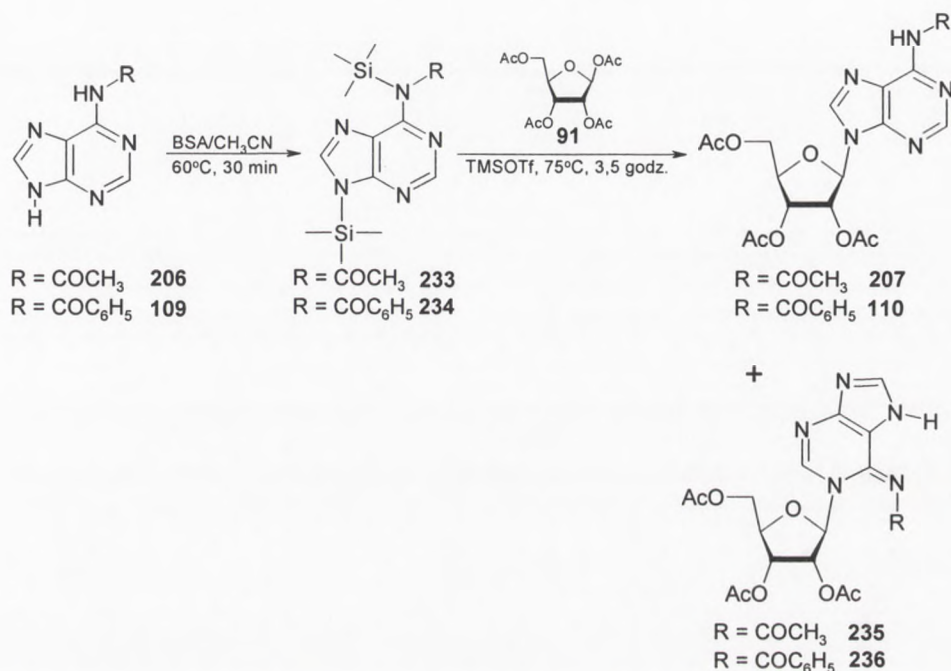
Na podstawie przeprowadzonych badań reakcji syntezy nukleozydów metodą sililową, można wyciągnąć wniosek, że związek **231** jest kinetycznym produktem reakcji przechodzącym w termodynamicznie trwałe N^9 -nukleozyd **198**, a proces 1→9 transglikozylacji zachodzi przez związek 1,9-dipodstawiony **232**. Jednak potwierdzenie tych założeń wymagało dalszych badań, które opisano w kolejnych rozdziałach.

Następnie przeprowadzono próbę glikozylacji N^6 -benzoiloadeniny (**109**), jako czynnik sililujący zastosowano BSA w suchym acetonitrylu i atmosferze argonu, a jako katalizator użyto TMSOTf (3.5 godziny, 60°C). Analiza TLC pokazała tworzenie się dwóch głównych produktów reakcji. Związek o wyższym R_f poruszał się analogicznie jak N^6 -benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adenina (**110**) w układzie chloroform-metanol 9:1 oraz toluen-etanol 4:1 i powstawał z szacowaną wydajnością około 10%. Natomiast produkt o nieco wyższym R_f od substratu powstawał z wydajnością około 30-40%. Przereagowanie N^6 -benzoiloadeniny (**109**) wyniosło około 50%. Reakcję zakończono przez ochłodzenie, dodanie chlorku metylenu i ekstrahowano kwaśnym węglanem sodu. Po wysuszeniu bezwodnym siarczanem warstwy organicznej i odparowaniu pod zmniejszonym ciśnieniem przeprowadzono rozdział mieszaniny reakcyjnej na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent fazę chloroform-metanol w gradiencie stężenia 98:2 → 9:1. W wyniku rozdziału odzyskano 62.2% nieprzereagowanej N^6 -benzoiloadeniny (**109**), wyizolowano N^6 -benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)-adeninę (**110**) z wydajnością 7.9% oraz związek o niższym R_f . Analiza spektroskopowa (UV, ^1H i ^{13}C NMR) potwierdziła fakt otrzymania 9-podstawionego nukleozydu (**110**), pozwoliła także na scharakteryzowanie struktury drugiego związku jako N^6 -benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**236**), której wydajność syntezy wyniosła 30.2%. Otrzymane widma ^1H NMR obu związków były podobne do odpowiednich widm pochodnych w serii izobutyrylowej. Widmo protonowego rezonansu jądrowego produktu **236** także i w tym przypadku wykonane w DMSO-d_6 posiadało niewyraźne, rozmyte sygnały pochodzące od protonów N-H, 8-H, 2-H oraz C1'-H. Dopiero zmiana rozpuszczalnika na CDCl_3 spowodowała wyostrenie tych sygnałów, dzięki czemu jednoznacznie potwierdzono, że mamy do czynienia ze związkiem podstawionym w pozycji N1 rybozą. W widmie występował



charakterystyczny sygnał występujący przy 12.65 ppm pochodzący od protonu w pozycji N9-H lub N7-H (dokładnej pozycji proton nie udało się ustalić). Natomiast w przypadku związku **110** występował sygnał charakterystyczny dla protonu w pozycji N⁶-H (10.73 ppm).

Analogiczna reakcja prowadzona przez 66 godzin doprowadziła do 90% przereagowania związku **236** i powstania z dużą wydajnością 9-regioizomeru adenozyiny (**110**). Proces syntezy 1- i 9-podstawionych produktów przedstawiono na schemacie 73.



Schemat 73

Kolejny eksperyment wykonano z zastosowaniem grupy acetylowej w pozycji N⁶ adeniny. Reakcję wykonano podobnie jak z przypadku pochodnej izobutyrylowej czy benzoilowej.

Suchą N⁶-acetyloadeninę (**206**) oraz 1',2',3',5'-tetra-O-acetyloribofuranozę (**91**) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu i w atmosferze argonu dodano BSA, ogrzewając całość do 80°C przez 30 minut, a następnie dodano TMSOTf. Reakcję prowadzono przez 90 minut. Analiza TLC prowadzona w fazie chloroform-metanol 9:1 pokazała, że po tym czasie szacunkowe przereagowanie substratu (**206**) wynosiło około 60-70%. W wyniku reakcji powstały dwa główne produkty o podobnych wydajnościach około 20-30%, zaobserwowano także powstawanie z niewielką wydajnością związku poruszającego się chromatograficznie szybciej niż **207**. Reakcję zakończono ochładzając mieszaninę reakcyjną oraz dodając chlorku metylenu. Następnie całość ekstrahowano kwaśnym węglanem sodu i suszono nad siarczanem sodu. Po odparowaniu pod zmniejszonym ciśnieniem, wyizolowano produkty reakcji przy

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a title or introductory paragraph.

Second block of faint, illegible text.

Third block of faint, illegible text.

Fourth block of faint, illegible text.

Fifth block of faint, illegible text.

Sixth block of faint, illegible text.

Seventh block of faint, illegible text.

Eighth block of faint, illegible text.

Ninth block of faint, illegible text.

pomocy kolumny chromatograficznej jako eluent stosując gradient stężenia chloroform-acetonitryl 2:1 → 1:1. Główne produkty reakcji po wyizolowaniu poddano charakterystyce za pomocą spektroskopii (UV i NMR). Związek o wyższym R_f charakteryzował się widmem w ultrafiolecie o λ_{\max} 271.2 nm, λ_{\min} 233.0 nm i λ_{\max} 214.6 nm, a jego kształt był identyczny jak w przypadku N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny. Natomiast związek o niższym R_f posiadał widmo o λ_{\max} 312.6 nm, λ_{\min} 252.6 nm oraz λ_{\max} 212.4 nm, co świadczyło o podstawieniu w innej pozycji niż N3 (λ_{\max} 295.6 nm, λ_{\min} 253.4 nm) i N9. Dalszych danych strukturalnych dostarczyły widma protonowego rezonansu jądrowego, które pozwoliły określić strukturę związku o niższym R_f jako N⁶-acetylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**235**), a drugiego jako N⁶-acetylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**207**).

The first part of the report deals with the general situation in the country. It is noted that the economy is still in a state of stagnation, and that the government has failed to implement the necessary reforms. The report then goes on to discuss the various sectors of the economy, including agriculture, industry, and services. It is concluded that the government must take urgent action to address these issues.

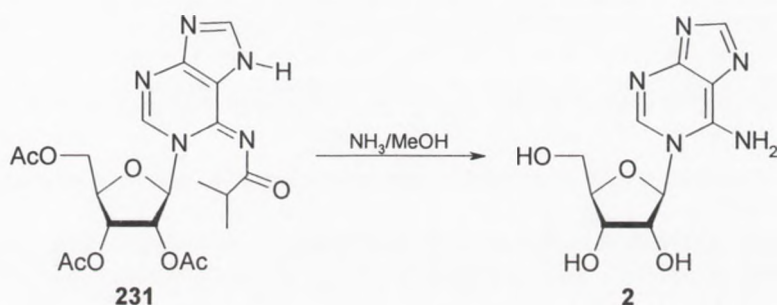
The second part of the report provides a detailed analysis of the economic data. It shows that the growth rate has been negative for several years, and that inflation is running at a high level. The report also examines the balance of payments and the foreign exchange reserves. It is clear that the country is facing a serious economic crisis, and that the government must take immediate steps to stabilize the economy.

The third part of the report discusses the social and political situation. It is noted that there is widespread dissatisfaction with the government, and that there are calls for reform. The report also examines the role of the military and the judiciary. It is concluded that the government must address these issues in order to restore confidence and stability.

The final part of the report provides recommendations for the government. It is suggested that the government should implement a series of reforms, including privatization, liberalization of trade, and strengthening of the legal system. It is also recommended that the government should improve its financial management and reduce its budget deficit.

3.3.3.1. Otrzymywanie i charakterystyka strukturalna 1-rybofuranozyloadeniny

Krystaliczny związek **231** poddano reakcji odblokowania metanolanem sodu w metanolu w temperaturze pokojowej, jednak w tych warunkach nie udało się uzyskać całkowitego odblokowania, nawet po 58 godzinach prowadzenia reakcji. Dopiero potraktowanie związku **231** metanolem nasyconym amoniakiem przez 23 godziny doprowadziło do powstania produktu odblokowania, który wypadał z roztworu jako drobnokrystaliczny proszek (wydajność procesu 93%). Produkt krystalizowano z wody, a następnie poddano charakterystyce spektroskopowej (UV, ^1H , ^{13}C NMR) oraz analizie rentgenograficznej, które potwierdziły strukturę związku jako 1-(rybofuranozylo)adeninę (**2**). Reakcję odblokowania przedstawiono na schemacie 74.



Schemat 74

W reakcji odblokowania związku **231** stwierdzono więc nieoczekiwaną trudność w usunięciu grupy N^6 -acylowej, w porównaniu z odblokowaniem izomerów 9-podstawionych. Podobne trudności zostały zauważone wcześniej przez Ryana, Actona i Godmana⁷⁴ w przypadku odblokowania produktu analogicznej rybozylacji N^6 -benzoiloadeniny metodą sililową o domniemanej strukturze N^6 -benzoilo-7-(2',3',5'-tri-O-benzoilorybofuranozylo)adeniny. Odblokowanie tego związku z użyciem metanolanu sodu w metanolu doprowadziło do końcowego produktu z wydajnością zaledwie 5%. Ta niska wydajność odblokowania, kłopoty z wyodrębnieniem końcowego produktu, a także fakt, że do określenia struktury tego związku autorzy użyli jedynie spektroskopii w podczerwieni i ultrafiolecie, mogło spowodować prawdopodobnie błędne określenie tej struktury jako 7-izomeru adenozyliny.

Widmo ^1H NMR związku **2** wykonane w DMSO-d_6 posiadało bardzo szeroki sygnał pochodzący od dwóch protonów grupy egzoaminowej N^6 (6.2 ppm - 7.7 ppm), natomiast wszystkie inne sygnały pochodzące od protonów pierścienia purynowego i rybozy były wyraźne.

Krystaliczną 1-(rybofuranozylo)adeninę (**2**) uzyskaną w wyniku odblokowania poddano analizie rentgenograficznej, w wyniku której związek zakwalifikowano do grupy przestrzennej $P 2_1$, gdzie w komórce elementarnej znajdują się dwie cząsteczki nukleozydu. Z uzyskanych

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data. The second part of the document provides a detailed breakdown of the financial data for the quarter. It includes a table showing the revenue generated from various sources, as well as the associated costs and expenses. The final part of the document concludes with a summary of the overall financial performance and a recommendation for future actions.

The following table provides a detailed overview of the financial data for the quarter. It is organized into three main sections: Revenue, Expenses, and Net Income. Each section contains a list of items with their respective values and a running total. The revenue section shows that the majority of income was derived from sales of our primary product line. The expenses section details the costs of goods sold, marketing, and administrative overhead. The net income section shows a positive result, indicating that the company's operations were profitable during the period.

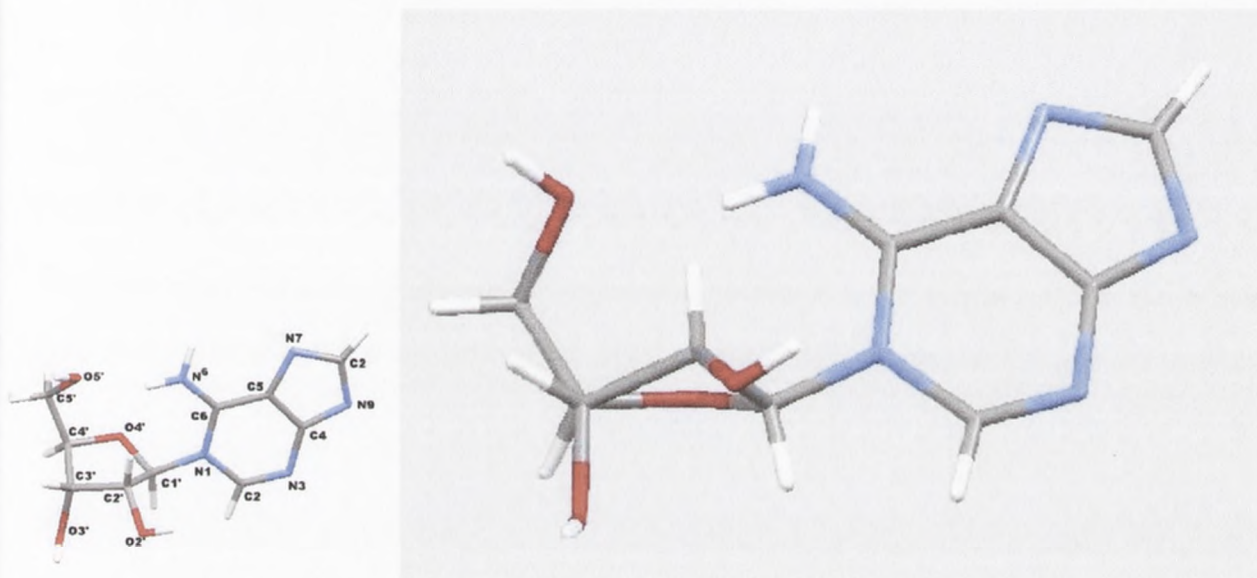
The data indicates that our marketing efforts were effective in driving sales, particularly in the latter half of the quarter. However, there were some areas where costs were higher than expected, such as in the area of logistics. This suggests that we may need to re-evaluate our supply chain strategy to reduce these costs. Overall, the company's performance was strong, and we are confident that we can continue to grow and improve in the coming quarters.

In conclusion, the financial data for the quarter shows a clear trend of growth and profitability. The company's ability to manage its costs while increasing its revenue is a key factor in its success. We will continue to monitor our financial performance closely and make adjustments as needed to ensure long-term success.

3. Badania własne

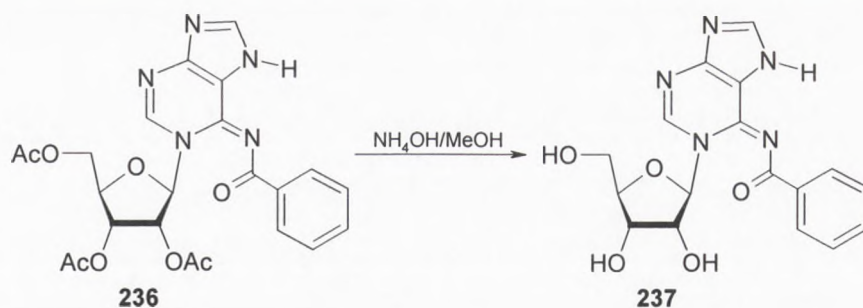
danych krystalograficznych obliczono kąty torsyjne obu cząsteczek: (ν_0) C4'-O4'-C1'-C2' (-28.85° i -28.18°), (ν_1) O4'-C1'-C2'-C3' (42.16° i 42.13°), (ν_2) C1'-C2'-C3'-C4' (-38.52° i -38.93°), (ν_3) C2'-C3'-C4'-O4' (23.42° i 23.86°), (ν_4) C3'-C4'-O4'-C1' (3.10° i 2.46°), a na ich podstawie wyznaczono kąty fazowe pseudorotacji P=156.84° oraz P=157.79°. Tak więc ryboza znajduje się w konformacji ²E czyli C2'-endo. Szczegółowe dane krystalograficzne przedstawiono w części eksperymentalnej.

Przestrzenną strukturę otrzymanej 1-(rybofuranozylo)adeniny (**2**) przedstawiono na rysunku 2 (rzut wzdłuż wiązania C3'-C4').



Rysunek 2

Duże trudności przy usuwaniu grupy benzoilowej z atomu N⁶ zaobserwowano także w przypadku próby odblokowywania N⁶-benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny (**236**). Związek ten po rozpuszczeniu w metanolu potraktowano 25% roztworem amoniaku w wodzie. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Analiza TLC pokazała tworzenie się jednego, głównego produktu reakcji powstającego z około 50% wydajnością, który posiadał jednak R_f wyższy od całkowicie odblokowanego 1-nukleozydu (**2**). Wyizolowany produkt poddano charakterystyce NMR. Widmo protonowego rezonansu jądrowego wykazało, że związek ten posiada grupę benzoilową w pozycji N⁶. Strukturę otrzymanego produktu określono jako N⁶-benzoilo-9-(rybofuranozylo)adeninę (**237**), powstającego z wydajnością 44%.



Schemat 75

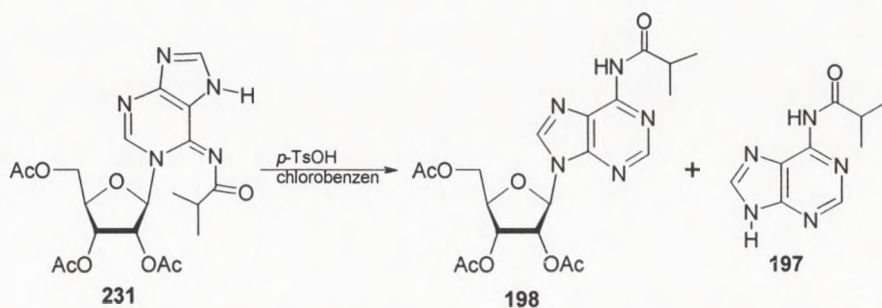
Postanowiono zastosować więc podobne warunki jak w przypadku odblokowywania N⁶-izobutyrylo-1-(triacetyloribofuranozylo)adeniny (**231**). Związek **236** rozpuszczono w metanolu nasyconym amoniakiem, reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 43 godziny. Analiza TLC wykazała, powstawanie kilku produktów. Związek o najniższym R_f poruszał się chromatograficznie jak 1-(rybofuranozylo)adenina **2**, jednak jego wydajność była stosunkowo niewielkiego rzędu 5-8%.



3.3.3.2. Reakcje N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloburanozylo)adeniny w warunkach transglikozylacji

Chcąc potwierdzić wcześniejszą tezę, że N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-O-acetyloburanozylo)adenina (**231**) jest produktem kinetycznym reakcji syntezy 9-nukleozydu przeprowadzono reakcję jej izomeryzacji w bezwodnym chlorobenzenu wobec kwasu *p*-toluenosulfonowego jako katalizatora oraz metodą stapiania (220°C, bez stosowania rozpuszczalnika i katalizatora).

Izomeryzację związku **231** prowadzono w chlorobenzenu wobec 10% molowych kwasu *p*-TsOH ogrzewając mieszaninę do temperatury wrzenia rozpuszczalnika przez 8 minut. Analiza TLC reakcji prowadzona w fazie chloroform-metanol 95:5 pokazała tworzenie się dwóch głównych produktów reakcji ($R_f=0.35$ i 0.61) oraz trzeciego związku, który widoczny był tylko przez pierwsze minuty reakcji, o najwyższym R_f (0.77), a powstający z bardzo małą wydajnością. Produkt o najniższym R_f poruszał się chromatograficznie analogicznie do N⁶-izobutyryloadeniny (**197**), związek o $R_f=0.61$ jak 9-izomer **198**, natomiast produkt o najwyższym R_f poruszał się jak N⁶-izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetyloburanozylo)-adenina (**232**), którego wydajność oszacowano na około 1-2%. W trakcie prowadzenia reakcji na płycie TLC obserwowano stopniowe przybywanie produktów o $R_f=0.35$ i 0.61 oraz zmniejszanie stężenia substratu (**231**), który po 8 minutach zanikł całkowicie. Po ogrzaniu płytki obserwowano także rybozę o $R_f=0.72$. Powstające w reakcji związki (**197** i **198**) wyizolowano przy pomocy chromatografii kolumnowej stosując jako eluent fazę chloroform-metanol w gradiencie stężenia 98:2 → 95:5, a następnie scharakteryzowano przy pomocy spektroskopii w ultrafiolecie. Strukturę związku o $R_f=0.35$ określono jako N⁶-izobutyryloadeninę (wydajność 45.1%), natomiast produkt o $R_f=0.61$ jako N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloburanozylo)adeninę (wydajność 45.6%). Produktu o najwyższym R_f nie udało się wyizolować ze względu na jego całkowite przereagowanie po 8 minutach. Oba otrzymane w reakcji związki (**197**, **198**) przedstawiono na schemacie 76.



Schemat 76

THE HISTORY OF THE UNITED STATES

The history of the United States is a story of growth and change. From the first European settlers to the present day, the nation has evolved through various stages of development. The early years were marked by exploration and the establishment of colonies. The American Revolution led to the birth of a new nation, and the subsequent years saw the expansion of territory and the growth of industry. The Civil War was a pivotal moment in the nation's history, leading to the abolition of slavery and the strengthening of the federal government. The late 19th and early 20th centuries were characterized by rapid industrialization and the rise of a new middle class. The Great Depression of the 1930s led to significant government intervention in the economy. The mid-20th century saw the United States emerge as a superpower, leading to the Cold War and the Vietnam War. The latter half of the 20th century was marked by social movements for civil rights and environmental protection. The 21st century has seen technological advances and global challenges such as climate change and terrorism. The history of the United States is a testament to the resilience and adaptability of the American people.

Tak więc w wyniku ogrzewania N1-postawionego związku (**231**) otrzymano 9-podstawioną pochodną (**198**) oraz „wolną” N⁶-blokowaną adeninę (**197**), powstającą w wyniku rozerwania wiązania N-glikozydowego w N1-podstawionym związku, który jest w tym przypadku donorem reszty cukrowej niezbędnym do zajścia transglikozylacji, która zachodzi według schematu 1→9.

W kolejnym etapie badań izomeryzacji związku **231** przeprowadzono analogiczną reakcję do przedstawionej powyżej, z zastosowaniem dłuższego czasu i niższej temperatury (30 minut, 112°C). Analiza TLC pokazała, że w wyniku reakcji substrat **231** całkowicie przereagował, a obserwowana szacunkowa wydajność powstawania 9-izomeru (**198**) jest dużo niższa niż w reakcji przeprowadzonej w temperaturze wrzenia chlorobenzenu. W tym przypadku otrzymano znacznie większe ilości związku **197**. Przyczyną tego jest najprawdopodobniej zbyt niska temperatura, która ma istotny wpływ na dostarczenie reagentom odpowiedniej energii aktywacji do przeprowadzenia nukleofilowego ataku pary elektronowej atomu azotu na kation cukrowy.

Przypuszczenie to zostało potwierdzone po przeprowadzeniu podobnej reakcji w temperaturze 60°C, w wyniku której obserwowano tylko dekompozycję związku **231** do N⁶-izobutyryloadeniny (**197**), w tym przypadku nie zauważono powstawania 9-nukleozydu (**198**). W niskiej temperaturze zostaje rozerwane jedynie wiązanie N-glikozydowe w wyjściowym N1-podstawionym związku, dostarczona energia jest zbyt niska do zainicjowania reakcji tworzenia nowego wiązania N-glikozydowego. Nie zachodzi więc nukleofilowy atak na kation cukrowy.

Postanowiono także przeprowadzić próbę izomeryzacji N1-podstawionej pochodnej adenozyiny metodą stapiania. Związek **231** ogrzewano przez 3 minuty w temperaturze 220°C bez rozpuszczalnika oraz katalizatora. Analiza TLC reakcji pokazała powstawanie także i tym przypadku 9-nukleozydu (**198**) oraz N⁶-izobutyryloadeniny.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że N1-podstawiony związek **231** jest kinetycznym produktem reakcji rybozylacji N⁶-blokowanej adeniny, który w warunkach transglikozylacji przechodzi w termodynamicznie trwalszy 9-nukleozyd **198**. Zaproponowany mechanizm tego procesu przedstawiono w rozdziale 3.3.3.4.

Analogiczną reakcję izomeryzacji przeprowadzono także w przypadku N⁶-benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny (**236**). Związek ten ogrzewano wobec kwasu *p*-toluenosulfonowego we wrzącym chlorobenzenu przez 15 minut, w wyniku czego otrzymano z wydajnością około 70% (według TLC) N⁶-benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**110**) oraz N⁶-benzoiloadeninę (**109**) z wydajnością około 20% (schemat 77).

The first part of the paper discusses the importance of the curriculum in the context of the current educational reforms in the United Kingdom. It highlights the need for a more coherent and integrated curriculum that reflects the values and goals of the education system.

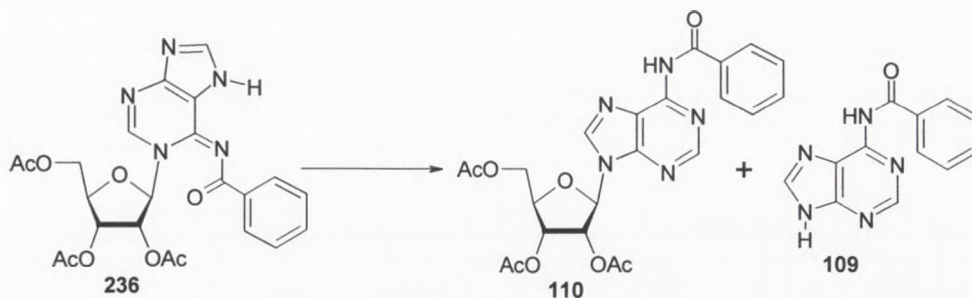
The second part of the paper examines the role of the curriculum in promoting social and moral education. It argues that the curriculum should be designed to foster a sense of social responsibility and ethical values among students. This is achieved through the selection of appropriate content and the use of effective teaching methods.

The third part of the paper discusses the challenges of implementing a new curriculum. It identifies the need for adequate resources, training, and support for teachers. It also highlights the importance of involving parents and the community in the curriculum development process to ensure its success.

The fourth part of the paper discusses the role of the curriculum in promoting lifelong learning. It argues that the curriculum should be designed to provide students with the skills and knowledge they need to continue their learning throughout their lives. This is achieved through the use of inquiry-based learning and the development of self-learning skills.

The fifth part of the paper discusses the role of the curriculum in promoting the development of the individual. It argues that the curriculum should be designed to provide students with the opportunity to develop their own interests and talents. This is achieved through the use of differentiated instruction and the provision of a range of learning activities.

Także w wyniku ogrzewania N⁶-benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)-adeniny (**236**) w temperaturze 220°C przez 5 minut bez katalizatora i rozpuszczalnika, otrzymano około 50% związku **110** oraz około 10% N⁶-benzoiloadeniny (**109**).



Schemat 77

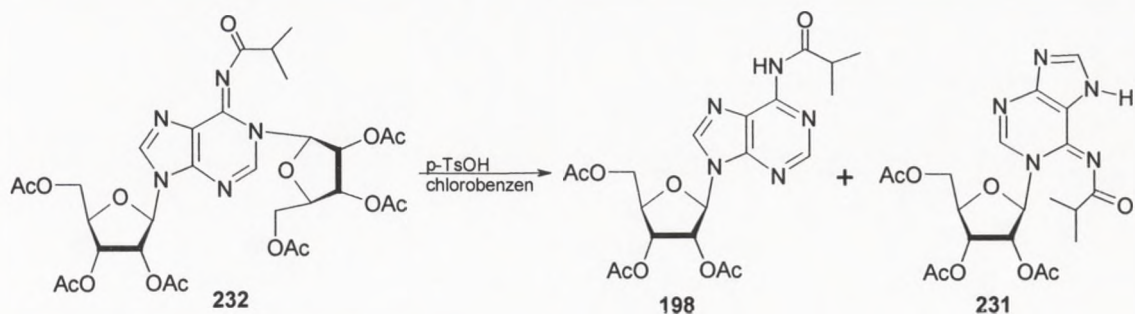
Przeprowadzone reakcje izomeryzacji pozwoliły potwierdzić tezę, że związek podstawiony rybozą na atomie N1 jest kinetycznym produktem reakcji kondensacji N⁶-acylowej pochodnej adeniny z komponentem cukrowym przy zastosowaniu metody silylowej. Produkt ten następnie ulega przemianie do odpowiedniego 9-nukleozydu, termodynamicznie bardziej trwałego. Proces ten ma charakter nieodwracalnej 1→9 transglikozylacji i zachodzi przez związek pośredni 1,9-dipodstawiony rybozą.



3.3.3.3. Badanie procesu dekompozycji N⁶-izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny w warunkach transglukozylacji

Badanie procesu dekompozycji N⁶-izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-O-acetyloribofuranozylo)adeniny (**232**) prowadzono tak jak w przypadku izomeryzacji N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-O-acetyloribofuranozylo)adeniny (**231**). Związek **232** rozpuszczono w bezwodnym chlorobenzenu wobec 10% molowych *p*-TsOH jako katalizatora. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 10 minut. Analiza TLC reakcji dekompozycji związku 1,9-dipodstawionego prowadzona w układzie chloroform-metanol 9:1 oraz chloroform-acetonitril 2:1 pokazała tworzenie się dwóch produktów reakcji o R_f niższych od substratu. Szacunkowa wydajność związku o najniższym R_f wyniosła około 10%, natomiast wydajność związku o wyższym R_f około 60%. Produkt poruszający się chromatograficznie szybciej posiadał R_f identyczny z N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-O-acetyloribofuranozylo)adeniną (**198**), natomiast R_f drugiego związku odpowiadał N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-O-acetyloribofuranozylo)adeninie (**231**). Produkt o wyższym R_f wyizolowano i scharakteryzowano za pomocą UV i ¹H NMR jako związek **198**, niestety drugiego związku nie udało się wyizolować ze względu na jego niewielką wydajność. Widmo w ultrafiolecie wyizolowanego związku o λ_{max} 272.2 nm i λ_{min} 232.6 nm wykazało, że jest to rzeczywiście 9-izomer, co potwierdzono także wykonując widma protonowego rezonansu jądrowego, gdzie zaobserwowano charakterystyczny sygnał pochodzący od N9-podstawionego związku o przesunięciu 10.73 ppm, który odpowiada protonowi w pozycji N⁶-H. Dzięki przeprowadzonej reakcji potwierdzono, że głównym produktem rozpadu związku **232** jest N9-podstawiony nukleozyd **198**.

Reakcja rozerwania wiązania N1-glikozydowego w 1,9-dipodstawionym związku zachodzi w tych warunkach (wysoka temperatura, katalizator) bardzo szybko, a tylko w niewielkim stopniu dotyczy to wiązania N9-glikozydowego. Na schemacie 78 przedstawiono produkty dekompozycji związku **232**.



Schemat 78

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be clearly documented and dated to ensure transparency and accountability.

Furthermore, it is noted that regular audits are essential to identify any discrepancies or errors in the accounts. This process helps in maintaining the integrity of the financial data and provides a clear overview of the organization's financial health.

In addition, the document highlights the need for strict adherence to financial regulations and standards. This includes ensuring that all reporting is done in a timely and accurate manner, and that all necessary documentation is kept up-to-date.

It is also stressed that effective communication is key to successful financial management. Regular meetings and reports should be held to discuss the current financial status and to address any issues that may arise.

The document concludes by stating that a strong financial foundation is crucial for the long-term success of any organization. By following these guidelines, it is possible to achieve financial stability and growth.

Finally, it is recommended that all financial records be stored securely and backed up regularly to prevent any loss of data. This ensures that the information is always available when needed.

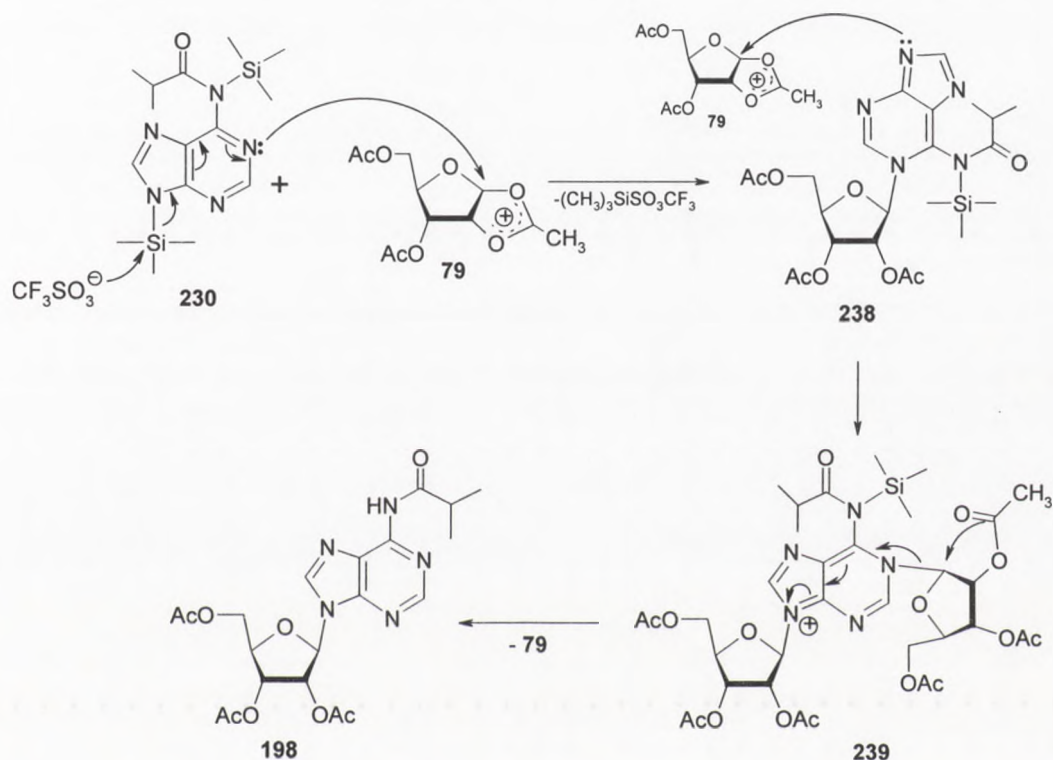
The document is intended to serve as a guide for anyone responsible for managing the finances of an organization. It provides a comprehensive overview of the key principles and practices that should be followed.

For more information on financial management, please refer to the attached documents and reports. We are committed to providing the highest quality of service and support to our clients.

Thank you for your attention and interest in our financial services. We look forward to continuing our partnership with you.

3.3.3.4. Mechanizm reakcji rybozylacji metodą siliową

Łącząc przedstawione w powyższych rozdziałach fakty dotyczące reakcji rybozylacji N^6 -acylowanej adeniny zaproponowano mechanizm powstawania produktu kinetycznego 1-nukleozydu i jego izomeryzację do termodynamicznego 9-podstawionego nukleozydu, który przedstawiono na schemacie 79 (dla pochodnej N^6 -izobutyrylowej). Proces ten wygląda analogicznie przypadku N^6 -benzoilowej pochodnej adeniny.



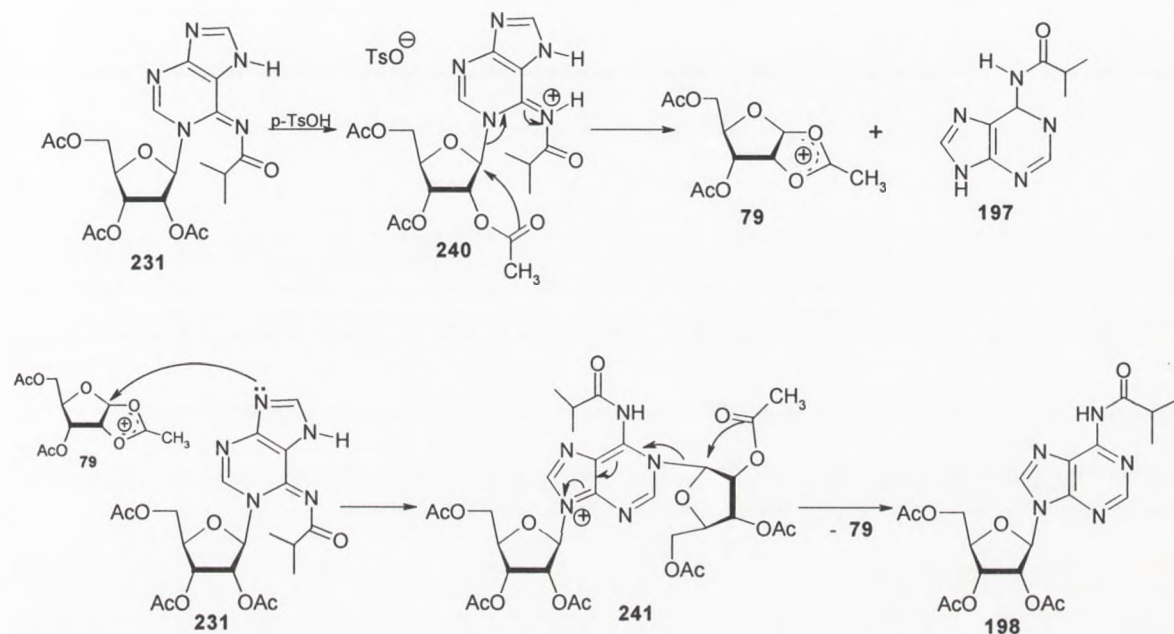
Schemat 79

W przypadku siliowych pochodnych adeniny posiadających grupę N^6 -acylową nukleofilowy atak na kation cukrowy (**79**) wyprowadzony zostaje z pozycji $N1$ adeniny (**230**). Równocześnie w wyniku ataku anionu kwasu trifluorosulfonowego usunięta zostaje grupa trimetylosililowa z pozycji $N9$. W tym przypadku nie jest możliwe zaatakowanie kationu cukrowego przez parę elektronową atomu azotu $N7$, tak jak to miało miejsce dla nieblokowanej w pozycji N^6 grupą acylową pochodnej siliowej adeniny (**223**). W przypadku związku **230** atom $N7$ jest przysłonięty przez grupę izobutyrylową. W wyniku przyłączenia cząsteczki rybozy otrzymany zostaje związek o strukturze **238** posiadający „wolną” pozycję $N9$, co umożliwia atak na atom $C1$ kationu **79**, prowadzący do powstania związku 1,9-dipodstawionego rybozą **239**. Dekompozycja tego produktu, usunięcie rybozy z pozycji $N1$ i grupy N^6 -siliowej, prowadzi do



otrzymania finalnego, termodynamicznego 9-nukleozydu (**198**) oraz odtworzenia kationu cukrowego.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów izomeryzacji wyizolowanego 1-nukleozydu do 9-podstawionego rybozą związku w warunkach transglikozylacji (kwas protonujący, temperatura wrzenia chlorobenzenu) zaproponowano także mechanizm procesu nieodwracalnej 1→9 izomeryzacji, który przedstawiono na schemacie 80.



Schemat 80

W tym przypadku donorem reszty cukrowej jest N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adenina (**231**). W wyniku protonowania tego związku następuje rozerwanie wiązania N1-glikozydowego, co prowadzi do powstania kationu cukrowego **79** oraz N⁶-izobutyryloadeniny (**197**). Wytworzony w ten sposób kation cukrowy ulega nukleofilowemu atakowi atomu N9 cząsteczki 1-nukleozydu **231**, w wyniku czego powstaje pochodna 1,9-diglikozyladeniny (**241**). Rozpad tego związku prowadzi do otrzymania 9-nukleozydu (**198**) oraz odtworzenia kationu **79**, który może uczestniczyć w dalszej reakcji izomeryzacji.

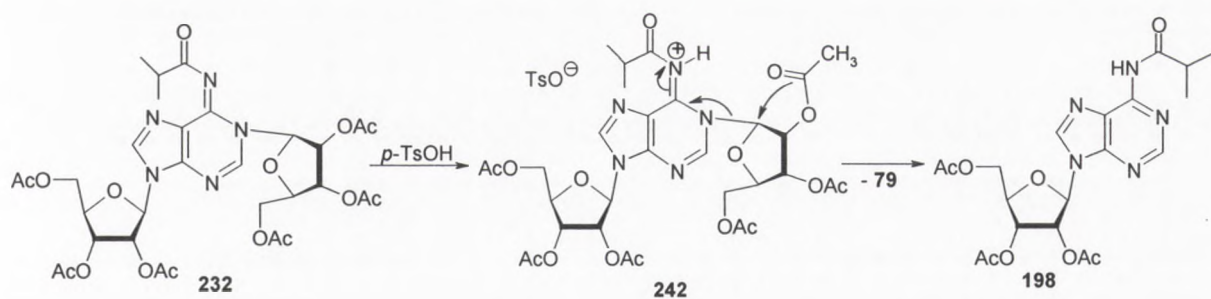
Podobny mechanizm zaproponować można dla reakcji dekompozycji N⁶-izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny (**232**) zachodzącej wobec kwasu protonującego (*p*-TsOH) we wrzącym chlorobenzenu. Mechanizm ten przedstawiono na schemacie 81.

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.

Main body of faint, illegible text, appearing to be several paragraphs of a document.

Lower section of faint, illegible text, possibly a conclusion or a separate section.

Faint text at the bottom of the page, possibly a footer or a signature area.



Schemat 81

Pierwszym etapem w proponowanym mechanizmie jest protonowanie atomu N⁶ w związku **232**, w wyniku czego otrzymana zostaje posiadająca ładunek dodatni cząsteczka o strukturze **242**, której rozpad prowadzi do otrzymania 9-nukleozydu **198** oraz kationu cukrowego **79**. Oczywiście możliwy jest też rozpad wiązania N9-glikozydowego, co obserwowano w TLC, z powstaniem kinetycznego 1-nukleozydu (**231**) oraz kationu **79**. Jednak proces dekompozycji związku **232** zachodzi w niewielkim stopniu w kierunku produktu **231**.

Analogiczne mechanizmy można także zaproponować dla N⁶-benzoiłowych oraz N⁶-acetylowych pochodnych adeniny.

Przeprowadzone badania reakcji kondensacji N⁶-acylowych pochodnych adeniny z komponentem cukrowym, obserwacja procesu 1→9 izomeryzacji i rozpadu 1,9-diglikozyłowej pochodnej adeniny, a także przedstawione mechanizmy reakcji, w jednoznaczny sposób wykazują, że kinetycznym produktem reakcji jest w tym przypadku 1-nukleozyd. Natomiast proces nieodwracalnej 1→9 transglikozylacji zachodzi przez 1,9-dipodstawioną pochodną adeniny.

[The text on this page is extremely faint and illegible. It appears to be a list or a series of entries, possibly a table of contents or a list of references, but the specific content cannot be discerned.]

4. Wnioski końcowe

Cel główny niniejszej pracy, czyli weryfikacja mechanizmu glikozylacji adeniny, został zrealizowany. Ponadto przeprowadzone obserwacje reakcji transglikozylacji nukleozydowych pochodnych adeniny pozwoliły na wyciągnięcie bardziej generalnych wniosków.

1. W wyniku przeprowadzonych reakcji uzyskano wszystkie cztery możliwe regioizomery adenozyiny, to jest 1-, 3-, 7- oraz 9-rybofuranozyladeninę. Eksperymentalnie potwierdzono, że trzy pierwsze z nich są kinetycznymi produktami reakcji rybozylacji adeniny, które następnie ulegają nieodwracalnej transglikozylacji do 9-nukleozydu. W wyniku przeprowadzonych badań określono warunki rybozylacji, w których powstają poszczególne regioizomery:

- w warunkach silnie kwasowych, gdzie prawdopodobnie pozycja N7 adeniny jest protonowana, obserwowane jest powstawanie N3-podstawionego produktu, który następnie ulega nieodwracalnej transglikozylacji 3→9 do 9-nukleozydu, jednak możliwy jest tu bardziej złożony proces izomeryzacji;
 - w reakcji rybozylacji prowadzonej z zastosowaniem odczynnika silującego oraz nieblokowanej adeniny powstający kinetyczny produkt reakcji ma strukturę 7-nukleozydu, ulega on następnie 7→9 transglikozylacji;
 - reakcja rybozylacji N⁶-acylowych pochodnych adeniny prowadzona metodą sililową prowadzi do uzyskania jako produktu kinetycznego 1-adenozyiny, która następnie ulega 1→9 transglikozylacji;
 - w przypadku prowadzenia reakcji glikozylacji wobec kwasu protonującego we wrzącym chlorobenzenu obserwowano tylko powstawanie termodynamicznego produktu reakcji, 9-podstawionego nukleozydu, wysoka temperatura jest prawdopodobnie przyczyną szybkiej izomeryzacji kinetycznego produktu do trwalszego termodynamicznie w tych warunkach związku.
2. Podczas prowadzenia reakcji kondensacji N⁶-izobutyryloadeniny (**197**) z tetraacetylo-rybofuranozą (**91**) z zastosowaniem metody sililowej, zaobserwowano tworzenie się poza 1- i 9-regioizomerami nukleozydu, także N⁶-izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetyloribo-furanozyl)adeniny. W wyniku przeprowadzenia dekompozycji tego dipodstawionego związku otrzymano głównie 9-nukleozyd. Tak więc otrzymany związek 1,9-dipodstawiony rybozą jest ważnym elementem popierającym zaproponowany mechanizm nieodwracalnej 1→9 transglikozylacji. Kluczowym elementem w proponowanym mechanizmie jest istnienie



kationu cukrowego, cały proces glikozylacji ma charakter łańcuchowy. W wyniku rozerwania wiązania N1-glikozydowego, z „uwolnieniem” kationu cukrowego, w 1,9-dirybonukleozydzie możliwe jest powstanie nowego wiązania N1- lub N9-glikozydowego dzięki atakowi atomu azotu na atom C1 powstałego kationu cukrowego.

3. Przeprowadzone reakcje transglikozylacji związków 3-, 7-, 1-regioizomerów (**196**, **224**, **231**) wobec katalizatorów o charakterze kwasu protonującego we wszystkich trzech przypadkach doprowadziły do uzyskania odpowiedniego 9-nukleozydu. Wykazano więc, że związki te są kinetycznymi produktami reakcji w syntezie termodynamicznie trwałego 9-podstawionego nukleozydu, który posiada najbardziej trwałe wiązanie N-glikozydowe.
4. W trakcie prowadzenia reakcji glikozylacji adeniny nadmiarem estru (2-acetoksyetylo)-acetoksymetylowego wobec kwasu *p*-toluenosulfonowego obserwowano powstawanie poza 9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeniną (**211**), także 1,1'-metyleno-bis-N⁶,N⁶-{9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeniny} (**212**). Natomiast reakcja N⁶-izobutyryloadeniny (**197**) z estrem (2-acetoksyetylo)acetoksymetylowym prowadziła do otrzymania N⁶-izobutyrylo-9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeniny oraz związku 9,N⁶-dipodstawionego.
5. Przeprowadzone reakcje glikozylacji adeniny pozwoliły na zaobserwowanie pewnej zależności tego procesu od rodzaju użytego komponentu cukrowego. W przypadku syntezy rybonukleozydów podstawieniu rybozą ulegają wyłącznie atomy azotu pierścienia purynowego (N1, N3, N7 lub N9), natomiast podczas syntezy acyklonukleozydów otrzymywane są także 9,N⁶-dipodstawione pochodne.



5. Część doświadczalna

5.1. Metody ogólne

- **Temperaturę topnienia (t.t.)** oznaczano w otwartych kapilarach przy użyciu aparatu Laboratory Devices Mel-Temp II w przypadku otrzymania krystalicznych związków.
 - **Analizy elementarne (anal.)** wykonywano w Pracowni Mikroanalizy Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie na analizatorze Perin-Elmer 240.
 - **Spektroskopia:**
 - **widma w ultrafiolecie (UV)** wykonywano przy pomocy spektrofotometru Perkin-Elmer Lambda EZ 201 używając metanolu lub wody jako rozpuszczalnika.
 - **widma magnetycznego rezonansu jądrowego:**
 - ^1H , ^{13}C (^1H i ^{13}C NMR)** rejestrowano na aparacie Varian Unity 300 FT (częstotliwość robocza dla ^1H NMR 299.949 MHz, dla ^{13}C NMR 75.429 MHz). Wartości przesunięć chemicznych wyrażono w skali δ (ppm) wobec tetrametylosilanu (TMS) jako wzorca wewnętrznego. Widma wykonano w DMSO- d_6 , CDCl_3 lub D_2O . Stałe sprzężenia (J) podano w Hz.
 - ^1H , ^{13}C i ^{15}N (^1H , ^{13}C i ^{15}N NMR)** rejestrowano na aparacie Bruker Avance 600 MHz (częstotliwość robocza dla ^1H NMR 600.310 MHz, ^{13}C NMR 150.963 MHz, ^{15}N NMR 60.057 MHz). Wartości przesunięć chemicznych wyrażono w skali δ (ppm) wobec tetrametylosilanu (TMS) jako wzorca wewnętrznego. Widma wykonano w DMSO- d_6 , CDCl_3 lub D_2O . Stałe sprzężenia (J) podano w Hz.
- stosowano następujące techniki NMR:**
- **COSY** (COrelation SpectroscopY),
 - **HMQC** (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence),
 - **HMBC** (Heteronuclear Multiple Bond Coherence),
 - **TOCSY** (TOtally Correlated SpectroscopY),
 - **NOE** (Nuclear Overhauser Effect).
- **widma masowe (MS)** wykonano w Środowiskowym Laboratorium Unikalnych Analiz Chemicznych UAM w Poznaniu przy użyciu spektrometru AMD 604 wykorzystującą metodę LSIMS (Cs^+ 12 keV, NBA).

A Child's Developmental

2.1. Introduction

The purpose of this study is to investigate the developmental process of children with specific language impairment (SLI) and to compare their performance with that of typically developing children. The study focuses on the acquisition of syntax and semantics, and the role of phonological processing in language development. The research is based on a longitudinal design, following a group of children from the age of 2;0 to 5;0. The children were assessed at regular intervals, and their language performance was recorded. The results show that children with SLI exhibit significant delays in the acquisition of syntax and semantics, and that these delays are associated with phonological processing deficits. The study also found that children with SLI show a greater reliance on context and non-verbal cues when understanding language. The findings have important implications for the development of educational and clinical interventions for children with SLI.

The study was conducted in a laboratory setting, and the children were assessed individually. The tasks used in the study were designed to measure the children's ability to understand and produce language. The tasks included a word recognition task, a sentence comprehension task, and a word production task. The children were also assessed on their phonological processing skills, using a series of tasks that required them to identify and repeat words. The data were analyzed using statistical methods, and the results were compared to those of a group of typically developing children. The study was approved by the local ethics committee, and all participants gave informed consent.

The results of the study are presented in the following sections. First, the results of the word recognition task are discussed, followed by the results of the sentence comprehension task. The results of the word production task are then presented, and finally, the results of the phonological processing tasks are discussed. The study concludes with a discussion of the implications of the findings for the development of educational and clinical interventions for children with SLI.

- **Analizy krystalograficzne (dane kryst.)** wykonywano na Dyfraktometrze KM4CCD firmy Oxford Diffraction.
- **Chromatografia:**
 - **Chromatografię cienkowarstwową analityczną (TLC)** wykonywano techniką wstępującą na szklanych płytkach o długości 7 cm, pokrytych żelom krzemionkowym F₂₅₄ typu 60 firmy Merck o grubości żelu 0.25 mm.
 - **Chromatografię preparatywną kolumnową** prowadzono na krótkich kolumnach szklanych na żelu krzemionkowym do chromatografii cienkowarstwowej firmy Merck typ 60 H.
- **Używane mieszaniny rozpuszczalników** (odmierzone w stosunkach objętościowych):
 - **A1:** chloroform-metanol 98:2
 - **A2:** chloroform-metanol 95:5
 - **A3:** chloroform-metanol 9:1
 - **A4:** chloroform-metanol 6:1
 - **A5:** chloroform-metanol 4:1
 - **B1:** toluen-etanol 9:1
 - **B2:** toluen-etanol 6:1
 - **B3:** toluen-etanol 4:1
 - **C1:** chloroform-acetonitryl 2:1
 - **C2:** chloroform-acetonitryl 1:1
 - **D1:** izopropanol-amoniak-woda 7:1:2
 - **E1:** kwas octowy-*n*-butanol-woda 5:3:2
 - **F1:** chlorek metylenu-etanol 98:2
 - **F2:** chlorek metylenu-etanol 95:5
 - **F3:** chlorek metylenu-etanol 9:1
- **Bezwodne rozpuszczalniki** przygotowywano przez destylację oraz suszenie nad sitami molekularnymi o rozmiarach: 4A (chlorobenzen, pirydyna, toluen), 3A (acetonitryl).
- **Etanol, metanol absolutny** otrzymywano przez osuszanie alkoholu w wyniku reakcji z alkoholanem magnezu.



5.2. Szczegółowe dane eksperymentalne

5.2.1. N⁶-Acetyloadenina (206)

Do wysuszonej w pistolecie próżniowym (78°C, 5 godzin, P₂O₅) adeniny (**194**) (1.0 g, 7.4 mmol) dodano 10 mL pirydyny i 10 mL (10.82 g, 10.6 mmol) bezwodnika octowego. Powstałą zawiesinę intensywnie mieszano magnetycznie w temperaturze 70-80°C przez 24 godziny. Po tym czasie mieszaninę ochłodzono do temperatury pokojowej i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując biały, gęsty olej, który kilkakrotnie współodparowano z absolutnym metanolem, a następnie z toluenem. Mieszaninę reakcyjną poddano rozdzielaniu na kolumnie chromatograficznej (12 cm x 4.5 cm) w układzie chloroform-metanol 95:5 → 6:1, w wyniku czego uzyskano 0.368 g (2.07 mmol, wydajność 28%) N⁶-acetyloadeniny w postaci białego osadu, który krystalizowano z gorącej wody, otrzymując drobnokrystaliczny osad (0.244 g).

R_f: 0.25 (A3)

t.t.: nie topi się do 320°C (300-310°C brązowieje)

UV (MeOH): λ_{max} 280.0 nm, λ_{min} 234.4 nm, przegięcie 288.8 nm i 256.4 nm

¹H NMR (DMSO-d₆): 2.24 (s, 3, OCOCH₃), 8.41 (s, 1, 2-H), 8.62 (s, 1, 8-H), 11.15 (s, 1, N⁶-H), 12.21 (s, 1, N⁹-H)

5.2.2. N⁶-Benzoiloadenina (109)

Do wysuszonej w pistolecie próżniowym adeniny (**194**) (3.0 g, 22.2 mmol) dodano bezwodnika benzoowego (12.0 g, 53.0 mmol) i umieszczono w łaźni olejowej o temperaturze 140°C, otrzymując po kilku minutach bezbarwny, klarowny roztwór. Reakcję prowadzono przez 2 godziny z intensywnym mieszaniem magnetycznym. Następnie całość ochłodzono, otrzymując stałą, twardą masę, wypełniającą całą objętość mieszaniny reakcyjnej, do której porcjami dodano 270 mL absolutnego metanolu i pozostawiono do krystalizacji. Po kilku minutach z roztworu zaczęły wypadać białe, drobne kryształki N⁶-benzoiloadeniny (**109**) (4.6 g, 19.3 mmol, wydajność 86.9%).

R_f: 0.43 (A3), 0.32 (B3)

t.t.: 236-237°C

The first part of the history of the county of ... is ...

The second part of the history of the county of ... is ...

UV (MeOH): λ_{\max} 286.8 nm, λ_{\min} 261.6 nm, λ_{\max} 235.2 nm, λ_{\min} 224.8 nm,

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): 7.59 (t, 2, Ph), 7.69 (t, 1, Ph), 8.13 (d, 2, Ph) 8.53, 8.76 (2s, 2x1, 2-H, 8-H), 11.95 (s, 1, N9-H)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl $_3$): 7.59 (t, 2, Ph), 7.69 (t, 1, Ph), 8.01 (d, 2, Ph) 8.37, 8.79 (2s, 2x1, 2-H, 8-H), 9.03 (2, 1, N 6 -H), 11.66 (s, 1, N9-H)

5.2.3. N 6 -Izobutyryloadenina (197)

Do wysuszonej w pistolecie próżniowym adeniny (**194**) (6.7 g, 49.58 mmol) dodano 160 mL bezwodnika izobutyrylowego otrzymując zawiesinę, którą intensywnie mieszano magnetycznie i ogrzewano w temperaturze 70°C. Po 2.5 godziny całą objętość roztworu wypełnił biały, galaretowaty osad. Analiza TLC wykazała powstawanie dwóch produktów. Reakcję prowadzono przez 4 godziny. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano 170 mL absolutnego metanolu i przez 2 godziny ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, aż do całkowitego zaniknięcia produktu o wyższym R $_f$. Następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując biały, oleisty osad, który krystalizowano na gorąco z etanolu otrzymując 12.0 g kryształów w formie waty o białoróżowym zabarwieniu i zapachu kwasu izobutyrylowego. Zanieczyszczoną N 6 -izobutyryloadeninę rekrytalizowano z etanolu otrzymując 9.15 g (44.6 mmol) kryształów w postaci białej waty. Wydajność całego procesu wyniosła 98.9%.

R $_f$: 0.38 (A3), 0.28 (B3)

t.t.: 231-233°C (213°C mięknięcie)

UV (MeOH): λ_{\max} 290.6 nm, λ_{\min} 289.2 nm, λ_{\max} 280.8 nm, λ_{\min} 233.2 nm,

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): 1.17 (d, 6, CH(CH $_3$) $_2$), 2.92 (septet, 1, CH(CH $_3$) $_2$), 8.39, 8.63 (2s, 2x1, 2-H, 8-H), 11.15 (s, 1, N 6 -H), 12.21 (s, 1, N9-H)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl $_3$): 1.33 (d, 6, CH(CH $_3$) $_2$), 2.76 (septet, 1, CH(CH $_3$) $_2$), 8.32 (s, 1, 8-H), 8.54 (s, 1, N 6 -H), 8.76 (s, 1, 2-H), 11.59 (s, 1, N9-H)



5.2.4. Synteza 9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl)adeniny (**195**) oraz 3-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl)adeniny (**196**)

Metoda A

1,2,3,5-Tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozę (**91**) (4.71 g, 14.8 mmol) trzykrotnie odparowano z 15 mL suchego toluenu, a następnie rozpuszczono w 22 mL bezwodnego chlorku metylenu i dodano 70 mL 30% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej z intensywnym mieszaniem przez 1.5 godziny, po czym odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując gęsty czerwono-brązowy olej, który 4-krotnie odparowano z suchym toluenem (do zaniku zapachu kwasu octowego). Tak przygotowany komponent cukrowy, 1-bromo-2,3,5-tri-O-acetyloribofuranozę rozpuszczono w 104 mL suchego acetonitrylu i dodano adeniny (**194**) (2.0 g, 14.8 mmol) wysuszonej w piśtolecie próżniowym (78°C, 5 godzin, P₂O₅). Powstałą zawiesinę mieszano magnetycznie przez 21 godzin w temperaturze 50°C. Analiza TLC, prowadzona podczas syntezy, wykazała powstawanie dwóch produktów. Reakcję zakończono przez odparowanie rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem, uzyskując suchą pozostałość, którą rozpuszczono w 150 mL chloroformu i kilkakrotnie wytrząsano z zimnym, nasyconym roztworem kwaśnego węgla sodu (250 mL). Czynność tę powtarzano do całkowitego usunięcia z warstwy chloroformowej nieprzereagowanej adeniny. Warstwę organiczną suszono nad siarczanem sodu, a następnie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując brązowy, nieprzeźroczysty olej. Rozdział mieszaniny poreakcyjnej przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej z żelu krzemionkowego (14.5 cm x 5 cm), stosując jako eluent chloroform-metanol w gradiencie stężenia 98:2 → 9:1. W wyniku rozdziału otrzymano 0.49 g (1.16 mmol, 7.83% wydajności) związku **196** oraz 1.03 g (2.6 mmol, 17.17% wydajnością) związku **195** w formie brązowego oleju. Związek **196** krystalizowano na gorąco z etanolu otrzymując biały, drobnokrystaliczny osad, natomiast związek **195** krystalizowano z gorącego etanolu otrzymując białe, duże kryształy.

Metoda B

Kilkukrotnie współodparowaną z suchym toluenem 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozę (**91**) (3.53 g, 11.1 mmol) rozpuszczono w 11 mL suchego chlorku metylenu. Całość intensywnie mieszano magnetycznie, a następnie dodano 36 mL 30% roztworu kwasu



bromowodorowego w kwasie octowym. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 120 minut, po czym rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując ciemnopomarańczowy olej, który 3-krotnie odparowano z suchym toluenem (3 x 10 mL). Następnie olej rozpuszczono w 52 mL suchego acetonitrylu i dodano wysuszoną w pistolocie próżniowym (78°C, 5 godzin, P₂O₅) adeninę (**194**) (1.0 g, 7.4 mmol). Uzyskaną zawiesinę mieszało magnetycznie w temperaturze 50°C. Analiza chromatograficzna wykazała powstawanie dwóch produktów. Po 19 godzinach rozpuszczalnik odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując brązowy olej, który rozpuszczono w 250 mL chloroformu i ekstrahowano 250 mL zimnego roztworu kwaśnego węgla sodu. Warstwę chloroformową zagęszczono do ok. 50% objętości i pozostawiono w temperaturze 5°C, otrzymując bezpostaciowy osad, który zawierał w przewodzie związek **196**. Osad przesączono i przemyto zimnym chloroformem. Jednak w wyniku wytrącenia nie udało się otrzymać bezpośrednio czystego chromatograficznie związku **196**. Dopiero w wyniku krystalizacji z etanolu otrzymano drobnokrystaliczny osad w formie igieł (0.20 g, 0.5 mmol, 6.9%). Natomiast 9-izomeru (**195**) nie udało się oczyścić przez krystalizację, zawierał duże ilości nieprzereagowanego komponentu cukrowego (**91**), co prawdopodobnie przyczyniło się do otrzymania oleju po odparowaniu.

Związek 195

R_f: 0.48 (A3), 0.32 (B3)

t.t.: 167-169°C

UV (MeOH): λ_{max} 259.2 nm, λ_{min} 227.2 nm

¹H NMR (DMSO-d₆): 2.01, 2.04, 2.12 (3s, 3x3, OCOCH₃), 4.24 (dd, J_{Hb,Ha}=11.3, 1, 5'b-H), 4.34-4.49 (m, 1, 4'-H), 4.42 (dd, J_{Ha,Hb}=11.3, 1, 5'a-H), 5.63 (t, 1, 3'-H), 6.04 (t, J=5.7, 1, 2'-H), 6.21 (d, J_{1',2'}=5.4, 1, 1'-H), 7.40 (s, 2, NH₂), 8.17 (s, 1, 2-H), 8.36 (s, 1, 8-H)

¹³C NMR (DMSO-d₆): 20.17, 20.34, 20.45 (3 x OCOCH₃), 63.49 (C-5'), 70.06 (C-3'), 71.86 (C-2'), 79.37 (C-4'), 85.56 (C-1'), 119.19 (C-5), 140.04 (C-8), 149.08 (C-4), 152.84 (C-2), 156.16 (C-6), 169.26, 169.44, 170.02 (3 x OCOCH₃)

¹⁵N NMR (DMSO-d₆): 82.40 (N-6), 165.85 (N-9), 223.97 (N-3), 237.67 (N-1), 243.33 (N-7)

Związek 196

R_f: 0.34 (A3), 0.14 (B3)

t.t.: 210-213.5°C (205°C brązowienie)

UV (MeOH): λ_{max} 283.0 nm, λ_{min} 247.6 nm

¹H NMR (DMSO-d₆): 2.00, 2.07, 2.10 (3s, 3x3, OCOCH₃), 4.29 (dd, J_{Hb,Ha}=11.4, 1, 5'b-H), 4.34-4.40 (m, 1, 4'-H), 4.49 (dd, J_{Ha,Hb}=11.7, 1, 5'a-H), 5.28 (t, J_{3',2'}=6.3, 1, 3'-H), 6.10 (dd,



$J_{2',3'}=6.3$, $J_{2',1'}=3.9$, 1, 2'-H), 6.24 (d, $J_{1',2'}=3.9$, 1, 1'-H), 7.79 (s, 1, 8-H), 8.20, 8.35 (2s, 2x1, NH₂), 8.50 (s, 1, 2-H)

¹H NMR (CDCl₃): 2.11, 2.13, 2.15 (3s, 3x3, OCOCH₃), 4.43-4.55 (m, 3, 5'a,b-H, 4'-H), 5.67 (t, 1, 3'-H), 5.87 (dd, J=4.2, 1, 2'-H), 6.35 (d, J=3.9, 1, 1'-H), 8.04 (s, 1, 8-H), 8.36 (s, 1, 2-H)

¹³C NMR (DMSO-d₆): 20.94, 20.99, 21.18 (3 x OCOCH₃), 63.49 (C-5'), 70.61 (C-3'), 72.73 (C-2'), 80.51 (C-4'), 92.98 (C-1'), 121.02 (C-5), 143.83 (C-2), 148.56 (C-4), 153.11 (C-8), 156.00 (C-6), 170.73, 170.07, 170.07 (3 x OCOCH₃)

¹⁵N NMR (DMSO-d₆): 95.56 (N-6), 163.13 (N-3), 230.73 (N-1), 233.83 (N-9), 244.41 (N-7)

5.2.5. Reakcja izomeryzacji 3-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)-adeniny (196) w warunkach transglukozytacji

3-(2',3',5'-Tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeninę (196) (0.050 g, 0.127 mmol) i kwas *p*-toluenosulfonowy (0.005 g, 0.025 mmol) rozpuszczono w 1 mL suchego chlorobenzenu i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. W tych warunkach reakcję prowadzono przez 90 minut z intensywnym mieszaniem. Analiza TLC mieszaniny prowadzona w układach chloroform-metanol 9:1 i toluen-etanol 4:1 pokazały, że w wyniku reakcji z około 10% wydajnością powstaje związek 195.

5.2.6. Synteza N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)-adeniny (198) oraz N⁶-izobutyrylo-3-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)adeniny (199)

Suchą 1,2,3,5-tetra-O-acetylo-β-D-rybofuranozę (91) (0.60 g, 1.88 mmol) rozpuszczono w 6 mL suchego chlorku metylenu. Całość intensywnie mieszano magnetycznie, a następnie dodano 4 mL 30% roztworu kwasu bromowodorowego w kwasie octowym, otrzymując jasnożółty, klarowny roztwór. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 120 minut, po czym rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, w wyniku czego uzyskano ciemnopomarańczowy olej, który kilkakrotnie odparowano z suchym toluenem. Następnie olej rozpuszczono w 15 mL suchego acetonitrylu i dodano wysuszoną w pistolecie próżniowym (78°C, 4 godziny, P₂O₅) N⁶-izobutyryloadeninę (197) (0.36 g, 1.75 mmol). Uzyskaną zawiesinę mieszano magnetycznie w temperaturze 45°C. Analiza chromatograficzna wykazała powstawanie dwóch produktów. Po 1 godzinie rozpuszczalnik odparowano do sucha pod



zmniejszonym ciśnieniem otrzymując jasnobrązową pianę, którą poddano rozdzielni na kolumnie chromatograficznej z żelu krzemionkowego (7 cm x 4.5 cm), stosując jako eluent chlorek metylenu-etanol w gradiencie stężenia 98:2 → 9:1. W wyniku rozdzielni otrzymano 0.285 g (0.61 mmol, wydajność 26.20%) związku **198**, jako jasnożółty olej oraz 0.066 g (0.14 mmol, wydajność 8.12%) związku **199** w formie bezbarwnego oleju. N⁶-izobutyrylo-3-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adeninę (**199**) krystalizowano z metanolu (bez ogrzania) otrzymując drobnokrystaliczny, biały osad, którym okazała się 3-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adenina (**196**), co stwierdzono na podstawie widm UV i ¹H NMR oraz temperatury topnienia, które były identyczne ze związkiem otrzymanym w syntezie **5.2.4**.

Związek 198

R_f: 0.7 (A3), 0.46 (B3)

UV (MeOH): λ_{max} 272.2 nm, λ_{min} 231.0 nm,

¹H NMR (DMSO-d₆): 1.13 (d, 6, CH(CH₃)₂), 2.01, 2.04, 2.13 (3s, 3x3, COCH₃), 2.94 (septet, 1, CH(CH₃)₂), 4.22-4.29 (m, 1, 5'b-H), 4.38-4.45 (m, 2, 5'a-H, 4'-H), 5.65 (t, 1, 3'-H), 6.06 (t, J=5.4, 1, 2'-H), 6.32 (d, J=5.1, 1, 1'-H), 8.67, 8.69 (2s, 2x1, 2-H i 8-H), 10.73 (s, 1, N⁶-H)

Związek 199

R_f: 0.55 (A1), 0.40 (F2)

UV (MeOH): λ_{max} 295.2 nm, λ_{min} 253.2 nm

¹H NMR (CDCl₃): 1.31 (d, 6, CH(CH₃)₂), 2.10, 2.14, 2.15 (3s, 3x3, OCOCH₃), 3.00 (septet, 1, CH(CH₃)₂), 4.46-4.60 (m, 3, 5'a,b-H, 4'-H), 5.67 (t, 1, 3'-H), 5.90 (t, J=4.5, 1, 2'-H), 6.45 (d, J=4.5, 1, 1'-H), 8.21 (s, 1, 8-H), 8.69 (s, 1, 2-H)

5.2.7. N⁶-Izobutyrylo-3-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adenina (**199**) i 3-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adenina (**196**)

Do suchej 3-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)adeniny (**196**) (0.004 g, 0.01 mmol) dodano 0.4 mL bezwodnej pirydyny i 0.2 mL bezwodnika izobutyrylowego. Uzyskaną zawiesinę intensywnie mieszano, ogrzewając w temperaturze 60°C przez 100 minut. Analiza TLC wykazał powstanie tylko jednego produktu reakcji o R_f identycznym do pochodnej **199**. Następnie rozpuszczalnik odparowano, a otrzymany olej kilkukrotnie współodparowano z toluenem do zaniku zapachu pirydyny. Otrzymany produkt posiadał R_f oraz widmo



UV identyczne z widmem N⁶-izobutyrylo-3-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranosylo)adeniny (199). Następnie związek ten rozpuszczono w metanolu i pozostawiono w nim przez 20 godzin, w wyniku czego z wydajnością ok. 90% otrzymano 3-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranosylo)adeninę (196).

5.2.8. Synteza N⁶-benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-benzoilo-β-D-rybofuranosylo)-adeniny (204) i 9-(2',3',5'-tri-O-benzoilo-β-D-rybofuranosylo)adeniny (205) wobec 2,4-dinitrofenolu

Kilkukrotnie odparowaną z toluenem 1-O-acetylo-2,3,5-tri-O-benzoilorybofuranosę (203) (0.484 g, 0.96 mmol), suchą N⁶-benzoiloadeninę (109) (0.30 g, 1.25 mmol) oraz suchy 2,4-dinitrofenol (1.150 g, 6.25 mmol) ogrzewano na łaźni olejowej o temperaturze 140°C przez 2 godziny. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną ochłodzono i rozpuszczono w 100 mL chloroformu i ekstrahowano nasyconym roztworem kwaśnego węgla sodu. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu przez 60 minut, a następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując 0.665 g gęstego oleju. Mieszaninę reakcyjną poddano rozdzielaniu na kolumnie chromatograficznej (15 cm x 2.5 cm) jako eluent stosując fazę toluen-etanol w gradiencie stężenie 95:5 → 6:1. W wyniku rozdzielania otrzymano 0.230 g (0.34 mmol) N⁶-benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-benzoilo-β-D-rybofuranosylo)-adeninę (204), powstającą z 26.8% wydajnością oraz 0.038 g (0.065 mmol, wydajność 5.1%) 9-(2',3',5'-tri-O-benzoilo-β-D-rybofuranosylo)adeniny (205).

Związek 204

R_f: 0.68 (B1)

UV (MeOH): λ_{max} 281.0 nm, λ_{min} 255.6 nm, λ_{max} 230.6 nm

Związek 205

R_f: 0.26 (B1)

UV (MeOH): λ_{max} 258.8 nm, λ_{min} 251.5 nm, λ_{max} 231.0 nm

¹H NMR (DMSO-d₆): 4.62-4.87 (m, 3, 5'a,b-H, 4'-H), 6.28 (t, 1, 3'-H), 6.51 (t, J=4.5, 1, 2'-H), 6.21 (d, J=5.1, 1, 1'-H), 7.36-7.53 (m, 8, Ph, NH₂), 7.66 (q, 3, Ph), 7.88-8.01 (m, 6, Ph), 8.07 (s, 1, 2-H), 8.39 (s, 1, 8-H)



^{13}C NMR (DMSO- d_6): 63.12 (C-5'), 70.59 (C-3'), 72.90 (C-2'), 78.99 (C-4'), 86.30 (C-1'), 119.25 (C-5), 128.26, 128.66, 129.27, 133.40, 133.90 (Ph), 140.31 (C-8), 148.95 (C-4), 152.77 (C-2), 156.11 (C-6), 164.41, 164.60, 165.36 (3 x OCOPh)

5.2.9. Synteza N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl)-adeniny (198) i 9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl)adeniny (195) wobec 2,4-dinitrofenolu

Kilkukrotnie odparowaną z toluenem z 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozę (91) (0.318 g, 1.0 mmol), suchą N⁶-izobutyryloadeninę (197) (0.205 g, 1.0 mmol) oraz suchy 2,4-dinitrofenol (1.3 g, 7.06 mmol) ogrzewano na łaźni olejowej o temperaturze 140°C przez 2 godziny. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną ochłodzono i rozpuszczono w 150 mL chloroformu i ekstrahowano nasyconym roztworem kwaśnego węgla sodu (150 mL). Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu przez 50 minut, a następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując ciemnobrązowy olej. Mieszaninę reakcyjną poddano rozdzielni na kolumnie chromatograficznej (11 cm x 3.5 cm) jako eluent stosując układ chloroform-metanol w gradiencie stężenia 98:2 \rightarrow 9:1. W wyniku rozdzielni otrzymano 0.116 g (0.25 mmol) N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl)adeninę (198) z wydajnością 25% (R_f , UV, ^1H NMR identyczny ze związkami otrzymanymi w preparatyce 5.2.6.) oraz 0.039 g (0.099 mmol, wydajność 9.9%) 9-(2',3',5'-tri-O-benzoilo- β -D-rybofuranozyl)adeniny (195).

5.2.10. Synteza N⁶-benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl)-adeniny (110) wobec 2,4-dinitrofenolu

Kilkukrotnie odparowaną z toluenem z 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozę (91) (0.082 g, 0.26 mmol), suchą N⁶-benzoiloadeninę (109) (0.062 g, 0.26 mmol) oraz suchy 2,4-dinitrofenol (0.239 g, 1.3 mmol) ogrzewano na łaźni olejowej o temperaturze 140°C przez 100 minut. Analiza TLC prowadzona w układzie toluen-etanol 6:1 oraz chloroform-metanol 9:1 wykazała powstawanie tylko jednego produktu o współczynniku R_f identycznym z pochodną 110.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
1100 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
1100 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
1100 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
1100 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
1100 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
1100 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
1100 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
1100 EAST 58TH STREET
CHICAGO, ILLINOIS 60637

5.2.11. Próba kondensacji 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozy (91) z adeniną (194) wobec 2,4-dinitrofenolu

Wysuszoną w pistolecie próżniowym 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozę (91) (0.235 g, 0.74 mmol), suchą adeninę (194) (0.10 g, 0.74 mmol) oraz suchy 2,4-dinitrofenol (0.240 g, 1.3 mmol) ogrzewano na łaźni olejowej o temperaturze 135°C przez 2 godziny, w wyniku czego otrzymano zawiesinę. Analiza TLC prowadzona w układzie chloroform-metanol 6:1 wykazała, że reakcja kondensacji nie zachodziła. W mieszaninie reakcyjnej widoczne są tylko substraty 91 i 194.

5.2.12. Próba kondensacji adeniny (194) z 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozą (91) wobec *p*-TsOH

Do wysuszonej w pistolecie próżniowym (78°C, 2 godziny, P₂O₅) adeniny (194) (0.03 g, 0.22 mmol) i 1,2,3,5-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozy (91) (0.106 g, 0.33 mmol) dodano 3 mL bezwodnego chlorobenzenu i intensywnie mieszano. Reakcję prowadzono pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 24 godziny. Analiza TLC prowadzona w układzie chloroform-metanol (4:1) oraz toluen-etanol (9:1) wykazała niewielkie przereagowanie substratu i powstanie z ok. 2% wydajnością produktu o współczynniku R_f identycznym z pochodną 195.

5.2.13. N⁶-Benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozylu)adenina (110)

Do wysuszonej w pistolecie próżniowym (78°C, 5 godzin, P₂O₅) N⁶-benzoiloadeniny (109) (0.5 g, 2.1 mmol) i odparowanej kilkakrotnie z toluenem 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozy (91) (0.987 g, 3.1 mmol) dodano kwas *p*-toluenosulfonowy (0.036 g, 0.19 mmol) oraz 30 mL suchego chlorobenzenu otrzymując zawiesinę, którą intensywnie mieszano. Reakcję prowadzono pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 22 godziny. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując ciemnobrązowy, gęsty olej, który poddano rozdzielaniu na kolumnie chromatograficznej (10 cm x 4.5 cm) jako eluent stosując toluen-etanol w gradiencie stężenie 95:5 → 4:1. W wyniku przeprowadzonego rozdzielania otrzymano N⁶-benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylu)-



adeninę (**110**) (0.253 g, 0.51 mmol) z wydajnością 24.3% oraz nieprzereagowany substrat N⁶-benzoiloadeninę (**109**) (0.255 g, 0.51 mmol). Produkt **110** krystalizowano z gorącego 40% wodnego roztworu etanolu otrzymując biały, drobnokrystaliczny osad.

Związek 110

R_f: 0.80 (A3), 0.50 (B3)

UV (MeOH): λ_{max} 279.8 nm, λ_{min} 247.0 nm, λ_{max} 231.8 nm

¹H NMR (DMSO): 2.02, 2.06, 2.14 (3s, 3x3, OCOCH₃), 4.25-4.31 (m, 1, 5'^b-H), 4.40-4.47 (m, 2, 5'^a-H, 4'-H), 5.67 (t, 1, 3'-H), 6.10 (t, J=5.4, 1, 2'-H), 6.36 (d, J=5.4, 1, 1'-H), 7.56 (t, 2, Ph), 4.66 (t, 1, Ph), 8.05 (d, 1, Ph), 8.71, 8.80 (2s, 2x1, 2-H, 8-H), 11.30 (s, 1, N⁶-H)

¹³C NMR (DMSO): 20.12, 20.28, 20.39 (3 x OCOCH₃), 62.63 (C-5'), 69.92 (C-3'), 71.81 (C-2'), 79.48 (C-4'), 85.68 (C-1'), 125.80 (C-5), 128.40, 132.43 133,14 (C-Ph), 143.50 (C-8), 150.62 (C-4), 151.76, 151.84 (C-2, C-6), 165.57 (NCOPh), 169.22, 169.38, 169.96 (3 x OCOCH₃)

5.2.14. 9-Rybofuranozyloadenina (**1**)

Suchą N⁶-benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**110**) (0.02 g, 0.04 mmol) rozpuszczono w 20 mL metanolu, a następnie dodano 20 mL 25% wodnego roztworu amoniaku. Całość intensywnie mieszano, prowadząc reakcję w temperaturze pokojowej przez 12 godzin. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano, a otrzymany osad rozpuszczono na gorąco w wodzie, w wyniku czego otrzymano białą, drobnokrystaliczną 9-rybofuranozyloadeninę (**1**) (0.005 g 0.017 mmol) z wydajnością 31.6%.

R_f: 0.65 (D1), 0.56 (E1)

t.t.: 227-228°C

UV (MeOH): λ_{max} 260.0 nm, λ_{min} 228.0 nm

¹H NMR (DMSO-d₆): 3.51 (m, 2, 5'^{a,b}-H), 3.96 (q, 1, 4'-H), 4.14 (q, 1, 3'-H), 4.61 (q, 1, 2'-H), 5.20 (d, 1, 3'-OH), 5.46 (d, 2, 2'-OH, 5'-OH), 5.88 (d, J=6.3, 1, 1'-H). 7.37 (s, 2, NH₂), 8.14 (s, 1, 8-H), 8.35 (s, 1, 2-H)



5.2.15. Synteza N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)-adeniny (198) wobec *p*-TsOH

Suchą N⁶-izobutyryloadeninę (**197**) (0.10 g, 0.49 mmol), wysuszoną 1,2,3,5-tetra-O-acetylo-β-D-rybofuranozę (**91**) (0.312 g, 0.98 mmol) oraz kwas *p*-toluenosulfonowy (0.093 g, 0.05 mmol) rozpuszczono w 5 mL suchego chlorobenzenu otrzymując zawiesinę, która po kilku minutach intensywnego mieszania rozpuściła się całkowicie. Reakcję prowadzono pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 20 godzin. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując ciemnobrązowy, gęsty olej, który poddano rozdzielowi na kolumnie chromatograficznej (8 cm x 3.5 cm) jako eluent stosując w gradiencie stężenie chloroform-metanol 98:2 → 9:1. W wyniku rozdziału otrzymano produkt (0.142 g, 0.31 mmol) posiadający identyczny R_f, UV i ¹H NMR z N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozyl)adeniną (**198**), powstający z wydajnością 62%.

5.2.16. Synteza N⁶-acetylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)-adeniny (207) wobec *p*-TsOH

Do suchej N⁶-acetyloadeniny (**206**) (0.177 g, 1.0 mmol), wysuszonej 1,2,3,5-tetra-O-acetylo-β-D-rybofuranozy (**91**) (0.41 g, 1.23 mmol) oraz kwasu *p*-toluenosulfonowego (0.19 g, 0.1 mmol) dodano 12 mL suchego chlorobenzenu otrzymując zawiesinę, którą intensywnie mieszano. Reakcję prowadzono pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 52 godziny. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując ciemnobrązowy, gęsty olej. Analiza TLC wykonana w układzie chloroform-metanol 9:1 oraz toluen-etanol 4:1 wykazała powstanie produktu posiadającego identyczny współczynnik R_f jak N⁶-acetylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozyl)adenina (**207**) (rozdział 5.2.31.), która powstaje z wydajnością ok. 2-5%.

5.2.17. Synteza N⁶-benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)-adeniny (110) wobec HgCl₂

Do intensywnie mieszanej zawiesiny suchej N⁶-benzoiloadeniny (**109**) (0.052 g, 0.22 mmol) w 5 mL bezwodnego chlorobenzenu dodano kilkakrotnie odparowanej z toluenem

1,2,3,5-tetra-O-acetyloribofuranozy (**91**) (0.10 g, 0.33 mmol) oraz chlorku rtęci (II) (0.027 g, 0.1 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 20 godzin. Analiza TLC wykazała powstawanie z niewielką wydajnością związku o identycznym R_f jak N⁶-benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozylu)adenina (**110**).

5.2.18. Synteza 9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozylu)adeniny (**195**) wobec SnCl₄

Metoda A

Do suchej adeniny (**194**) (0.033 g, 0.24 mmol) oraz kilkakrotnie odparowanej z toluenem 1,2,3,5-tetra-O-acetyloribofuranozy (**91**) (0.099 g, 0.31 mmol) dodano 3.7 mL suchego chlorobenzenu. Otrzymaną zawiesinę intensywnie mieszano, a następnie dodano tetrachlorku cyny (0.117 g, 0.45 mmol), w wyniku czego substraty po kilku minutach rozpuściły się. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 96 godzin. Analiza TLC prowadzona w układzie chloroform-metanol 4:1, wykazała powstawanie z około 30-40% wydajnością produktu o współczynniku R_f identycznym jak 9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozylu)adenina (**195**).

Metoda B

Analogiczna reakcja do przedstawionej w metodzie A, prowadzona przez 3 godziny w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika doprowadziła do otrzymania z ok. 60% wydajnością związku o R_f identycznym jak pochodna **195**.

5.2.19. Synteza N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozylu)-adeniny (**198**) wobec SnCl₄

Do suchej N⁶-izobutyryloadeniny (**197**) (0.06 g, 0.44 mmol) oraz kilkakrotnie odparowanej z toluenem 1,2,3,5-tetra-O-acetyloribofuranozy (**91**) (0.140 g, 0.44 mmol) dodano 5.5 mL suchego chlorobenzenu, a następnie tetrachlorku cyny (0.132 g, 0.51 mmol) uzyskując klarowny roztwór. Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 3 godziny. Analiza TLC, prowadzona w układzie chloroform-metanol 9:1, wykazała



powstawanie z około 60% wydajnością produktu o identycznym R_f jak N^6 -izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozylo)adenina (**198**).

5.2.20. Synteza 9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeniny (**211**) i 1,1'-metyleno-bis- N^6, N^6 -{9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeniny} (**212**)

Do intensywnie mieszanej zawiesiny suchej adeniny (**194**) (0.97 g, 14.1 mmol) w 25 mL bezwodnego chlorobenzenu dodano kwas *p*-TsOH (0.136 g, 0.72 mmol) oraz eter (2-acetoksyetylo)acetoksymetylowy (**208**) (2.485 g, 14.1 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, pod chłodnicą zwrotną, przez 24 godziny. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując biały osad, który umieszczono na lejku piankowym i przemyto roztworem chloroform-metanol 9:1, otrzymując 0.529 g nieprzereagowanej adeniny (**194**). Następnie przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i poddano rozdzielowi na kolumnie chromatograficznej (14.5 cm x 3.5 cm) jako eluent stosując fazę chloroform-metanol 9:1, otrzymując w jego wyniku: 1,1'-metyleno-bis- N^6, N^6 -{9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeninę} (**212**) (0.068 g, 13 mmol) z wydajnością 1.25% oraz 9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeninę (**211**) (0.410 g, 1.63 mmol) powstającą z wydajnością 22.7%. Oba związki krystalizowano na gorąco z etanolu otrzymując drobnokrystaliczny, biały osad.

Związek 212

R_f : 0.49 (A3), 0.18 (B3)

t.t.: 152-154°C

UV (MeOH): λ_{max} 271.8 nm, λ_{min} 229.2 nm

1H NMR ($CDCl_3$): 2.04 (s, 6, $OCOCH_3$), 3.78, 4.20 (2bs, 2x4, 4'-H, 5'-H), 5.62 (bs, 6, 1'-H, CH_2), 7.30 (bs, 2, N^6 -H), 8.02, 8.48 (2bs, 2x2, 2-H, 8-H)

1H NMR (DMSO): 1.91 (s, 6, $OCOCH_3$), 3.71, 4.06 (2bs, 2x4, 4'-H, 5'-H), 5.34 (bs, 2, CH_2), 5.60 (s, 4, 1'-H), 8.11 (bs, 2, 8-H), 8.36 (bs, 2, 2-H)

anal.: obliczono dla $C_{21}H_{26}N_{10}O_6$ (514.50): C: 49.02%, H: 5.09%, N: 27.22% znaleziono: C: 49.26%, H: 5.14%, N: 26.97%

MS: Widmo LSIMS POS w NBA dla: $(ES^-) C_{21}H_{25}N_{10}O_6$ obliczono: 513.5; znaleziono 513

$(M^+Na) C_{21}H_{26}N_{10}O_6Na$ obliczono: 537.5; znaleziono 537



Związek 211**R_f**: 0.44 (A3), 0.17 (B3)**t.t.**: 144-146°C**UV (MeOH)**: λ_{\max} 259.6 nm, λ_{\min} 226.2 nm**¹H NMR (DMSO)**: 1.94 (s, 3, OCOCH₃), 3.71, 4.07 (2t, 2x2, 4'-H, 5'-H), 5.62 (s, 2, 1'-H), 7.31 (s, 2, NH₂), 8.17, 8.29 (2bs, 2x1, 2-H, 8-H)**¹³C NMR (DMSO)**: 21.2 (OCOCH₃), 63.46 (C-5'), 67.60 (C-4'), 72.71 (C-1'), 119.19 (C-5), 141.83 (C-8), 150.45 (C-4), 153.63 (C-2), 156.45 (C-6), 170.01 (OCOCH₃)**¹⁵N NMR (DMSO)**: 81.36 (N-6), 168.66 (N-9), 224.60 (N-3), 236.93 (N-1), 242.44 (N-7)**5.2.21. Synteza N⁶-benzoilo-9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeniny (220)**

Do zawiesiny suchej N⁶-benzoiloadeniny (**109**) (0.50 g, 2.09 mmol) w eterze (2-acetoksyetylo)acetoksymetylowy (**208**) (0.736 g, 4.18 mmol) dodano kwas *p*-TsOH (0.039 g, 0.20 mmol) oraz 20 mL suchego chlorobenzenu. Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika pod chłodnicą zwrotną przez 2.5 godziny uzyskując klarowny roztwór. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie mieszaninę poddano rozdzielowi na kolumnie chromatograficznej (10.5 cm x 4.5 cm) jako eluent stosując chloroform-metanol w gradiencie stężenia 98:2→6:1. W wyniku rozdzielu otrzymano N⁶-benzoilo-9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeninę (**220**) (0.440 g, 1.30 mmol) powstającą z wydajnością 62%. Związek **220** krystalizowano na gorąco z 40% wodnego roztworu etanolu, otrzymując białe, drobne kryształy.

R_f: 0.62 (A3), 0.38 (B3)**t.t.**: 139-141°C**UV (MeOH)**: λ_{\max} 280.0 nm, λ_{\min} 247.2 nm, λ_{\max} 231.8 nm**¹H NMR (DMSO)**: 1.93 (s, 3, OCOCH₃), 3.77, 4.09 (2t, 2x2, 4'-H, 5'-H), 5.71 (s, 2, 1'-H), 7.55 (t, 2, Ph), 7.64 (t, 1, Ph), 8.05 (d, 1, Ph), 8.64, 8.79 (2bs, 2x1, 2-H, 8-H), 11.23 (s, 1, N⁶-H)**¹³C NMR (DMSO)**: 20.42 (OCOCH₃), 62.67 (C-5'), 67.10 (C-4'), 72.34 (C-1'), 125.08 (C-5), 128.36, 132.38, 133.26 (Ph), 144.76 (C-8), 150.23 (C-4), 151.88 (C-2), 165.57 (C-6), 170.20 (OCOCH₃)



5.2.22. Synteza N⁶-izobutyrylo-9-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeniny (221) oraz N⁶-izobutyrylo-9,N⁶-bis-[(2-acetoksyetoksy)metylo]adeniny (222)

Do intensywnie mieszanej zawiesiny suchej N⁶-izobutyryloadeniny (**197**) (0.30 g, 1.46 mmol) w 15 mL suchego chlorobenzenu dodano eter (2-acetoksyetylo)acetoksymetylowy (**208**) (0.507 g, 2.87 mmol) oraz kwas *p*-TsOH (0.027 g, 0.14 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika pod chłodnicą zwrotną przez 3 godziny uzyskując klarowny roztwór o jasnobrązowym kolorze. Następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i poddano rozdzielaniu na kolumnie chromatograficznej (9.5 cm x 3.5 cm) jako eluent stosując chlorek metylenu-metanol w gradiencie stężenia 98:2→9:1. W wyniku rozdzielania otrzymano: N⁶-izobutyrylo-9,N⁶-bis-[(2-acetoksy-etoksy)metylo]adeninę (**222**); (0.005 g, 0.11 mmol) powstającą z wydajnością 0.8% oraz N⁶-izobutyrylo-9-[(2-acetoksyetoksy)-metylo]adeninę (**221**) (0.315 g, 0.98 mmol, wydajność 67%).

Związek 221

R_f: 0.70 (A3), 0.41 (B3)

UV (MeOH): λ_{max} 272.6 nm, λ_{min} 234.8 nm

¹H NMR (DMSO): 1.03 (d, 6, CH(CH₃)₂), 1.89, 1.91 (2s, 2x3, OCOCH₃), 2.94 (septet, 1, CH(CH₃)₂), 3.69, 3.79, 3.99, 4.09 (4t, 4x2, 4'-H, 5'-H, 4''-H, 5''-H), 5.53, 5.73 (2s, 2x2, 1'-H, 1''-H), 8.17, 8.29 (2s, 2x1, 2-H, 8-H)

¹³C NMR (DMSO): 21.2 (OCOCH₃), 63.46 (C-5'), 67.60 (C-4'), 72.71 (C-1'), 119.19 (C-5), 141.83 (C-8), 150.45 (C-4), 153.63 (C-2), 156.45 (C-6), 170.01 (OCOCH₃)

¹⁵N NMR (DMSO): 147.05 (N-6), 170.30 (N-9), 240.66 (N-7), 249.27 (N-3), 267.25 (N-1)

Związek 222

R_f: 0.60 (A3), 0.34 (B3)

UV (MeOH): λ_{max} 272.6 nm, λ_{min} 230.8 nm

¹H NMR (DMSO-d₆): 1.13 (d, 2x3, CH(CH₃)₂), 1.92 (s, 3, COCH₃), 2.95 (septet, 1, CH(CH₃)₂), 3.74, 4.07 (2t, 2x2, 4'-H, 5'-H), 5.68 (s, 1, 1'-H), 8.61, 8.68 (2s, 2x1, 2-H i 8-H), 10.67 (s, 1, N⁶-H)



5.2.23. Synteza 9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl)adeniny (195) w warunkach sililujących z zastosowaniem BSA

Przez intensywnie mieszaną zawiesinę suchej adeniny (**194**) (0.10 g, 0.74 mmol) w acetonitrylu (2 mL) przepuszczano przez 30 minut argon, a następnie dodano BSA (0.376 g, 1.85 mmol) i ogrzewano w temperaturze 70°C przez 30 minut. Do otrzymanego klarownego roztworu dodano 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozę (**91**) oraz TMSOTf (0.082 g, 0.360 mmol). Komponent cukrowy rozpuścił się całkowicie. Reakcję kontrolowano chromatograficznie i prowadzono w temperaturze 70°C przez 20 godzin. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a mieszaninę poddano rozdziałowi na kolumnie chromatograficznej (11 cm x 3.5 cm) jako eluent stosując mieszaninę chloroform-metanol w gradiencie 95:5 \rightarrow 9:1, co pozwoliło na uzyskanie 0.054 g (0.14 mmol, wydajność 18.6%) 9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozyl)adeniny (**195**). Związek ten był identyczny (TLC, UV, ^1H NMR) z próbką otrzymaną w preparatyce 5.2.4.

5.2.24. Synteza 9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl)adeniny (195) oraz 7-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl)adeniny (224) w warunkach sililujących z zastosowaniem HMDS

Do intensywnie mieszanej zawiesiny suchej adeniny (**194**) (0.20 g, 1.48 mmol) w HMDS (6 mL) dodano siarczanu (VI) amonu (0.01 g, 0.087 mmol) i w atmosferze argonu ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 2.5 godziny. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem do uzyskania gęstego oleju, który odparowano do sucha przy pomocy pompy olejowej otrzymując biały, gęsty olej. Następnie w atmosferze argonu olej rozpuszczono w 6 mL bezwodnego acetonitrylu i dodano suchej 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozę (**91**) (0.470 g, 1.47 mmol) oraz katalizatora TMSOTf (0.328 g, 1.47 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 80 minut, a następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując białą pianę. Mieszaninę reakcyjną poddano wstępnemu oczyszczeniu za pomocą chromatografii kolumnowej (12 cm x 3.5 cm) jako eluent stosując fazę chloroform-metanol 5:1. Następnie frakcje zawierające produkty odparowano i poddano rozdziałowi na kolumnie chromatograficznej (12 cm x 3.5 cm) stosując fazę chloroform-metanol w gradiencie stężenie 95:5 \rightarrow 9:1, co pozwoliło na otrzymanie: 0.031 g (0.078 mmol, 5.3%) triacetyloadenozyny (**195**), która była identyczna (TLC, UV, ^1H NMR) z próbką otrzymaną



w preparatyce **5.2.4.**; 0.208 g (0.530 mmol) 7-izomeru triacetyloadenozyny (**224**) powstającej z wydajnością 35.7%.

Związek 224

R_f: 0.37 (A3), 0.1 (B3)

UV (MeOH): λ_{\max} 274.4 nm, λ_{\min} 232.2 nm

¹H NMR (DMSO-d₆): 2.02, 2.04, 2.11 (3s, 3x3, OCOCH₃), 4.32 (d, 2, 5'a,b-H), 4.48 (q, 1, 4'-H), 5.38 (t, 1, 3'-H), 5.55 (t, J=6.4, 1, 2'-H), 6.35 (d, J=6.3, 1, 1'-H), 6.94 (s, 2, NH₂), 8.32 (s, 1, 2-H), 8.63 (s, 1, 8-H)

¹H NMR (CDCl₃): 2.04, 2.10, 2.16 (3s, 3x3, OCOCH₃), 4.36 (m, 3, 5'a,b-H, 4'-H), 4.48 (dd, 1, 3'-H), 5.59 (t, J=6.3, 1, 2'-H), 5.70 (bs, 2, NH₂), 6.02 (d, J₁=6.6, 1, 1'-H), 8.14 (s, 1, 2-H), 8.54 (s, 1, 8-H)

¹³C NMR (DMSO-d₆): 20.11, 20.32, 20.39 (3 x OCOCH₃), 62.43 (C-5'), 68.74 (C-3'), 72.49 (C-2'), 79.65 (C-4'), 86.41 (C-1'), 110.19 (C-5), 143.94 (C-8), 151.30 (C-6), 152.89 (C-2), 160.43 (C-4), 169.10, 169.48, 169.99 (3 x OCOCH₃)

5.2.25. 7-Rybofuranozyloadenina (4)

Do roztworu 7-(2',3',5'-tri-O-acetylorybofuranozylo)adeniny (**224**) (0.122 g, 0.310 mmol) w metanolu (4 mL) dodano 2 mL 25% roztworu amoniaku w wodzie. Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując biały osad, który mieszano w roztworze chloroform-metanol 95:5 przez 1 godzinę. Następnie biały osad odsączono i przemyto roztworem chloroform-metanol 95:5, uzyskując 0.060 g (0.22 mmol) 7-rybofuranozyloadeniny (**4**) z wydajnością 72.4%. Związek krystalizowano z metanolu uzyskując biały, drobnokrystaliczny osad.

R_f: 0.57 (D1), 0.45 (E1)

t.t.: 207-210°C (200°C brązowienie)

UV (MeOH): λ_{\max} 270.0 nm, λ_{\min} 233.0 nm

¹H NMR (DMSO-d₆): 3.68 (q, 2, 5'a,b-H), 3.99 (q, 1, 4'-H), 4.07 (bq, 1, 2'-H), 4.12 (bs, 1, 3'-H), 5.31 (d, 1, 3'-OH), 5.36 (t, 1, 5'-OH), 5.62 (d, 1, 2'-OH), 5.82 (d, J=7.2, 1, 1'-H), 6.99 (s, 2, NH₂), 8.22 (s, 1, 2-H), 8.52 (s, 1, 8-H)

¹³C NMR (DMSO-d₆): 60.34 (C-5'), 68.79 (C-3'), 74.83 (C-2'), 86.19 (C-4'), 89.21 (C-1'), 110.07 (C-5), 144.42 (C-8), 151.51 (C-6), 152.6 (C-2), 160.68 (C-4)



^{15}N NMR (DMSO- d_6): 82.25 (N-6), 160.73 (N-7), 238.24 (N-1), 244.41 (N-3), 245.65 (N-9)

anal.: obliczono dla $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ (267.25): C: 44.94%, H: 4.90%, N: 26.21% znaleziono: C: 44.86%, H: 4.79%, N: 26.17%

dane kryst.: grupa przestrzenna $P 2_1 2_1 2$

$a = 8.2006(7) \text{ \AA}$, $b = 17.8347(14) \text{ \AA}$, $c = 7.7064(7) \text{ \AA}$

$\alpha = 90.00^\circ$, $\beta = 90.00^\circ$, $\gamma = 90.00^\circ$

objętość komórki: 1127.1 \AA^3

Długości wiązań w Å :

O4'-C1' 1.408	C4'-O4' 1.475	C8-N9 1.327	N1-C6 1.538
C1'-C2' 1.528	C4'-C5' 1.506	N9-C4 1.379	C6-C5 1.400
C2'-C3' 1.523	C5'-O5' 1.427	C4-C5 1.400	C6-N ⁶ 1.342
C2'-O2' 1.414	C1'-N7 1.452	C4-N3 1.352	
C3'-O3' 1.428	N7-C8 1.350	N3-C2 1.317	
C3'-C4' 1.536	N7-C5 1.399	C2-N1 1.346	

Kąty torsyjne:

(v_0) C4'-O4'-C1'-C2' (-41.22°)

(v_3) C2'-C3'-C4'-O4' (14.94°)

(v_1) O4'-C1'-C2'-C3' (49.52°)

(v_4) C3'-C4'-O4'-C1' (16.32°)

(v_2) C1'-C2'-C3'-C4' (-37.42°)

5.2.26. Izomeryzacja 7-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranosylo)adeniny (224) wobec kwasu *p*-TsOH

Do zawiesiny 7-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranosylo)adeniny (**224**) (0.0042 g, 0.0107 mmol) w chlorobenzenie (0.4 mL) dodano kwas *p*-TsOH (0.0004 g, 0.0021 mmol) i mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Reakcję w tych warunkach prowadzono przez 2.5 godziny. R_f otrzymanego produktu w fazie chloroform-metanol 9:1 był identyczny z triacetyloadenozyną (**195**), a wydajność tego procesu według TLC wynosiła około 90%.



5.2.27. Synteza N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranosylo)-adeniny (198), N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranosylo)-adeniny (231) oraz N⁶-izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranosylo)adeniny (232) z zastosowaniem czynnika sililującego BSA**Metoda A**

Przez zawiesinę N⁶-izobutyryloadeniny (**197**) (0.9 g, 4.38 mmol) wysuszonej w pistolecie próżniowym (78°C, 8 godzin, P₂O₅) i kilkakrotnie odparowanej z toluenem 1,2,3,5-tetra-O-acetylo-β-D-rybofuranosy (**91**) (1.79 g, 5.63 mmol) w 20 mL bezwodnym acetonitrylu przepuszczano argon (30 minut). Następnie do intensywnie mieszanego roztworu dodano BSA (1.646 g, 8.09 mmol) i całość ogrzewano w temperaturze 75°C przez 30 minut. Do uzyskanego klarownego roztworu dodano TMSOTf (0.484 g, 2.17 mmol). Reakcję prowadzono przez 3 godziny w temperaturze 75°C, w wyniku czego otrzymano jasnożółty roztwór. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej i dodano 180 mL chlorku metylenu, a następnie wytrząsano ze 150 mL nasyconego roztworu kwaśnego węgla sodu. Fazę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem sodu przez 40 minut, po czym rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując jasnożółtą pianę (2.36 g). Rozdział mieszaniny poreakcyjnej przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej (12 cm x 4.5 cm), stosując jako eluent układ chloroform-acetonitryl w gradiencie stężenia 2:1 → 1:1. W wyniku rozdziału otrzymano (w kolejności elucji): N⁶-izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranosylo)-adeninę (**232**) (0.16 g, 0.2 mmol) z wydajnością 5%, w formie bezbarwnego, gęstego oleju; N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranosylo)adeninę (**198**) (0.21 g, 0.46 mmol) z wydajnością 10% jako bezbarwny, gęsty olej (związek identyczny R_f, UV oraz ¹H NMR z otrzymanym w 5.2.6.); N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranosylo)adeninę (**231**) (0.66 g, 1.42 mmol) w formie białego osadu, z wydajnością 32.5%. Związek **231** krystalizowano z gorącego 40% roztworu etanolu, otrzymując białe, drobne kryształy w formie igieł, które odsączono i przemyto zimnym 40% etanolem otrzymując po wysuszeniu 0.59 g kryształów (89.4% wydajność krystalizacji).

Metoda B

W wyniku przeprowadzenia analogicznej reakcji przedstawionej w metodzie A, jednak z zastosowaniem dłuższego czasu reakcji (4 godziny) oraz niższej temperatury (70°C), po



rozdziela mieszaniny reakcyjnej na kolumnie chromatograficznej (13 cm x 4.5 cm) w gradiencie stężenia chloroform-metanol 2:1 → 1:1, otrzymano związek **232** (0.242 g, 0.34 mmol) z wydajnością 7.6%, **198** (0.474 g, 1.02 mmol) z wydajnością 23.1% oraz produkt **231** (0.335 g, 0.72 mmol) z wydajnością 16.3%.

Związek 232

R_f : 0.80 (A3), 0.50 (B3)

UV (MeOH): λ_{max} 293.8 nm, λ_{min} 240.4 nm

1H NMR (CDCl₃): 1.22, 1.24 (2d, 2x3, CH(CH₃)₂), 2.08, 2.09, 2.10, 2.12, 2.14, 2.20 (6s, 6x3, OCOCH₃), 2.75 (septet, 1, CH(CH₃)₂), 4.41-4.45 (m, 6, 5'a,b-H, 5''a,b-H, 4'-H, 4''-H), 5.33 (q, 1, 3''-H), 5.69 (d, 1, 3'-H), 5.60 (dd, 1, J=2.4, 2''-H), 5.88 (t, J=5.4, 1, 2'-H), 6.03 (d, J=5.4, 1'-H), 6.28 (d, J=2.4, 1, 1''-H), 7.81 (s, 1, 8-H), 8.35 (s, 1, 2-H)

^{13}C NMR (CDCl₃): 18.97, 19.06 (2 x CH(CH₃)₂), 20.21, 20.31, 20.44 (OCOCH₃), 37.41 (CH(CH₃)₂), 62.43 (C-5'), 62.76 (C-5''), 68.96 (C-3''), 69.88 (C-3'), 72.23 (C-2'), 72.42 (C-2''), 78.76 (C-4''), 79.54 (C-4'), 85.83 (C-1'), 90.04 (C-1''), 120.84 (C-5), 139.87 (C-8), 141.73 (C-6), 143.35 (C-4), 146.22 (C-2), 169.24, 169.28, 2 x 169.39, 2 x 170.01 (6 x OCOCH₃), 187.60 (NCOCH)

Wartości dotyczące części cukrowej przyłączonej w pozycję N1 oznaczono jako „bis”.

^{15}N NMR (DMSO-d₆): 164.18 (N-1), 171.59 (N-9), 212.49 (N-3), 251.25 (N-7), dla atomu N-6 nie obserwowano korelacji z protonem

Związek 231

R_f : 0.54 (A3), 0.47 (B3)

t.t.: 159-161°C

UV (MeOH): λ_{max} 313.2 nm, λ_{min} 255.2 nm

1H NMR (DMSO-d₆): 1.20 (d, 6, CH(CH₃)₂), 2.05, 2.07, 2.10 (3s, 3x3, OCOCH₃), 2.64 (septet, 1, CH(CH₃)₂), 4.28-4.43 (m, 3, 5'b,a-H, 4'-H), 5.40 (t, 1, 3'-H), 5.69 (dd, 1, 2'-H), 6.33 (bs, 1, 1'-H), 8.12, 8.48 (2bs, 2x1, 8-H, 2-H), 12.67 (b, 1, N9-H lub/i N7-H)

1H NMR (CDCl₃): 1.18 (dd, 6, CH(CH₃)₂), 2.06, 2.18, 2.24 (3s, 3x3, OCOCH₃), 2.65 (septet, 1, CH(CH₃)₂), 4.41 (d, 1, 5'b-H), 4.51-4.55 (m, 2, 5'a-H, 4'-H), 5.34 (t, 1, 3'-H), 5.63 (d, J=4.8, 1, 2'-H), 6.65 (s, 1, 1'-H), 8.13 (s, 1, 8-H), 8.82 (s, 1, 2-H), 12.49 (s, 1, N7-H)

^{13}C NMR (CDCl₃): 19.55, 19.84 (2 x CH(CH₃)₂), 20.26, 20.30, 20.72 (3 x OCOCH₃), 39.51 (CH(CH₃)₂), 61.05 (C-5'), 67.67 (C-3'), 74.51 (C-2'), 78.86 (C-4'), 90.31 (C-1'), 114.27 (C-5), 141.53 (C-8), 142.17 (C-2), 148.02 (C-6), 157.05 (C-4), 168.93, 169.20, 170.23 (3 x OCOCH₃), 188.87 (NCOCH)



^{15}N NMR (DMSO- d_6): 161.65 (N-9), 170.66 (N-1), 209.50 (N-6), 241.06 (N-3), 249.30 (N-7)

MS: Widmo LSIMS POS w NBA dla: (M^+H) $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_8$ obliczono: 464.4 znaleziono 464.3

(M^+Na) $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_8\text{Na}$ obliczono: 486.4; znaleziono 486.2

anal.: obliczono dla $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_8$ (463.447): C: 51.83%, H: 5.44%, N: 15.11% znaleziono: C: 51.74%, H: 5.23%, N: 15.01%

5.2.28. Synteza N^6 -izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl)-adeniny (198) oraz N^6 -izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl)adeniny (232) z zastosowaniem czynnika siliującego HMDS

Do zawiesiny suchej N^6 -izobutyryloadeniny (197) (0.302 g, 1.47 mmol) w HMDS (10 mL) dodano siarczanu (VI) amonu (0.010 g, 0.087 mmol). Całość umieszczono w łaźni olejowej i ogrzewano w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika pod chłodnicą zwrotną (temperatura łaźni 135°C), w atmosferze argonu przez 2.5 godziny. Uzyskany klarowny roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem do uzyskania gęstego oleju, który odparowano do sucha przy pomocy pompy olejowej otrzymując biały, gęsty olej, który następnie w atmosferze argonu rozpuszczono w 6 mL bezwodnego acetonitrylu. Do otrzymanej zawiesiny dodano suchej 1,2,3,5-tetraacetyloribofuranozy (91) (0.500 g, 1.57 mmol) oraz katalizatora TMSOTf (0.278 g, 1.25 mmol), w wyniku czego oba komponenty rozpuściły się całkowicie. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując białą, suchą pianę. Następnie mieszaninę reakcyjną poddano rozdzielaniu na kolumnie chromatograficznej (7.5 cm x 3.5 cm) stosując fazę chloroform-acetonitryl w gradiencie stężenia 2:1 \rightarrow 1:1, co pozwoliło na otrzymanie 0.148 g (0.32 mmol, wydajność 21%) N^6 -izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozyl)adeniny (198) identycznej (R_f , UV, ^1H NMR) z próbką otrzymaną w preparatyce 5.2.6. oraz 0.044 g (0.06 mmol) N^6 -izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozyl)adeniny (232) powstającej z wydajnością 4.3% o identycznym R_f , UV i ^1H NMR z próbką otrzymaną w preparatyce 5.2.27.



5.2.29. Synteza N⁶-benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)-adeniny (110) i N⁶-benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozyl)-adeniny (236) z zastosowaniem BSA

Metoda A

Do N⁶-benzoiloadeniny (**109**) (0.600 g, 2.50 mmol) wysuszonej w pistolecie próżniowym (78°C, 5 godzin, P₂O₅) oraz kilkakrotnie odparowanej z toluenem 1,2,3,5-tetra-O-acetylo-β-D-rybofuranozy (**91**) (0.955 g, 3.00 mmol) dodano 24 mL suchego acetonitrylu otrzymując zawiesinę, przez którą przepuszczano argon (30 minut). Następnie do intensywnie mieszanego roztworu dodano BSA (1.006 g, 4.90 mmol) i całość ogrzewano w temperaturze 60°C przez 30 minut uzyskując klarowny roztwór, do którego dodano TMSOTf (0.280 g, 1.30 mmol). Reakcję prowadzono przez 3.5 godziny w temperaturze 60°C. Mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej i dodano 40 mL chlorku metylenu, a następnie wytrząsano z 80 mL nasyconego roztworu kwaśnego węgla sodu. Fazę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem (VI) sodu przez 40 minut, po czym rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując białą pianę. Rozdział mieszaniny reakcyjnej przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej (16 cm x 4.5 cm), stosując jako eluent układ chloroform-metanol w gradiencie stężenia 98:2 → 9:1. W wyniku rozdziału otrzymano (w kolejności elucji): N⁶-benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozyl)adeninę (**110**) (0.99 g, 0.20 mmol) z wydajnością 7.9% w postaci bezbarwnego, gęstego oleju, identyczną ze związkiem otrzymanym w 5.2.13.; N⁶-benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozyl)adeninę (**236**) (0.377 g, 0.76 mmol) w formie bezbarwnego oleju, z wydajnością 30.2% oraz 0.373 g nieprzereagowanej N⁶-benzoiloadeniny (**109**) (1.56 mmol, 62.2%). Związek **236** krystalizowano z gorącego etanolu, otrzymując białe, drobne kryształy, które odsączono i przemyto zimnym etanolem otrzymując po wysuszeniu 0.312 g kryształów.

Metoda B

Suchą N⁶-benzoiloadenię (**109**) (0.040 g, 0.16 mmol) i suchą 1,2,3,5-tetra-O-acetylo-β-D-rybofuranozę (**91**) (0.064 g, 0.20 mmol) rozpuszczono w 2 mL suchego acetonitrylu otrzymując zawiesinę, przez którą w czasie 30 minut przepuszczano argon. Następnie do intensywnie mieszanego roztworu dodano BSA (0.067 g, 0.3 mmol) i całość ogrzewano w temperaturze 60°C przez 30 minut. Do uzyskanego klarownego roztworu dodano TMSOTf (0.019 g, 0.08 mmol).



Reakcję prowadzono przez 66 godzin w temperaturze 60°C. W wyniku przeprowadzonej reakcji uzyskano z ok. 95% (TLC) wydajnością produkt posiadający identyczny współczynnik R_f do pochodnej **110** (5.2.13.).

Związek 236

R_f : 0.62 (A3), 0.49 (B3)

t.t.: 202-205°C (200°C mięknięcie)

UV (MeOH): λ_{\max} 331.5 nm, λ_{\min} 280.0 nm, λ_{\max} 227.5 nm

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 2.07, 2.08, 2.25 (3s, 3x3, OCOCH_3), 4.41-4.60 (m, 3, 5'a,b-H, 4'-H), 5.38 (dd, 1, 3'-H), 5.64 (d, $J=2.1$, 1, 2'-H), 6.70 (d, $J=2.1$, 1, 1'-H), 7.42 (t, 2, Ph), 7.52 (t, 1, Ph), 8.17 (s, 1, 8-H), 8.22 (d, 2, Ph), 8.90 (s, 1, 2-H), 12.65 (s, 1, N7-H)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): 20.31, 20.41, 20.80 (3 x OCOCH_3), 61.26 (C-5'), 68.09 (C-3'), 74.90 (C-2'), 79.29 (C-4'), 89.93 (C-1'), 114.61 (C-5), 128.03, 128.17, 129.75, 137.25 (C-Ph), 141.95 (C-8), 142.20 (C-2), 148.81 (C-6), 157.60 (C-4), 168.88, 169.21, 170.24 (3 x OCOCH_3), 175.18 (NCOPh)

5.2.31. Synteza N^6 -acetylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl)-adeniny (207) i N^6 -acetylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozyl)-adeniny (235) z zastosowaniem czynnika sililującego BSA

Do wysuszonej w pistolecie próżniowym (78°C, 8 godzin, P_2O_5) N^6 -acetyloadeniny (**206**) (0.160 g, 0.90 mmol) i 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozy (**91**) (0.465 g, 1.46 mmol) dodano 4 mL suchego acetonitrylu otrzymując zawiesinę, przez którą w czasie 30 minut przepuszczano argon. Do intensywnie mieszanego roztworu dodano BSA (0.517 g, 2.53 mmol) i całość ogrzewano w temperaturze 80°C do uzyskanego klarownego roztworu, a następnie dodano TMSOTf (0.108 g, 0.48 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze 80°C przez 90 minut. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej i dodano 10 mL chlorku metylenu i kilkakrotnie wytrząsano z 10 mL nasyconego roztworu kwaśnego węgla sodu. Fazę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem (VI) sodu przez 60 minut, po czym rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując jasnożółtą pianę (0.620 g). Rozdział mieszaniny reakcyjnej przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej (5 cm x 3.5 cm), stosując jako eluent układ chloroform-acetonitryl w gradiencie stężenia 2:1 \rightarrow 1:1. W wyniku rozdzielania otrzymano: N^6 -acetylo-9-(2',3',5'-tri-O-



acetyloribofuranozylo)adeninę (**207**) (0.062 g, 0.14 mmol) z wydajnością 15.7%, w formie jasnożółtego, gęstego oleju; N⁶-acetylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**235**) (0.089 g, 0.20 mmol) z wydajnością 22.6% jako bezbarwny, gęsty olej.

Związek 207

R_f: 0.50 (A3)

UV (MeOH): λ_{max} 271.2 nm, λ_{min} 233.0 nm, λ_{max} 214.6 nm

¹H NMR (CDCl₃): 2.02, 2.08, 2.12, 2.16 (4s, 4x3, COCH₃), 4.35-4.49 (m, 3, 5'a,b-H, 4'-H), 5.67 (t, 1, 3'-H), 5.95 (d, J=5.4, 1, 2'-H), 6.21 (d, J=5.4, 1, 1'-H), 8.13 (s, 1, 8-H), 8.61 (s, 1, N⁶-H), 8.69 (s, 1, 2-H)

¹H NMR (DMSO): 2.01, 2.04, 2.13 (3s, 3x3, OCOCH₃), 2.25 (s, 3, NCOCH₃), 4.22-4.29 (m, 1, 5'b-H), 4.38-4.45 (m, 2, 5'a-H, 4'-H), 5.65 (t, 1, 3'-H), 6.06 (d, J=5.6, 1, 2'-H), 6.32 (d, J=5.1, 1, 1'-H), 8.68, 8.69 (2s, 1, 2-H, 8-H), 10.78 (s, 1, N⁶-H)

Związek 235

R_f: 0.46 (A3), 0.36 (B3)

UV (MeOH): λ_{max} 312.6 nm, λ_{min} 252.6 nm, λ_{max} 212.4 nm

¹H NMR (CDCl₃): 2.07, 2.20, 2.21 (3s, 3x3, OCOCH₃), 2.24 (s, 3, NCOCH₃), 4.38 (dd, 1, 5'b-H), 4.51 (dt, 2, 5'a-H, 4'-H), 5.35 (dd, 1, 3'-H), 5.71 (d, J=1.8, 1, 2'-H), 6.44 (d, J=1.8, 1, 1'-H), 8.11 (s, 1, 8-H), 8.74 (s, 1, 2-H), 12.38 (s, 1, N7-H)

5.2.32. 1-Rybofuranozyloadenina (2)

Suchą N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (**231**) (0.222 g, 0.48 mmol) rozpuszczono w metanolu nasyconym amoniakiem (10 mL) otrzymując klarowny roztwór. Reakcję prowadzono przez 23 godziny w temperaturze 25°C. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując osad, który mieszano w roztworze chloroform-metanol 1:1 przez 2 godziny. Następnie biały osad odsączono i przemyto roztworem chloroform-metanol 1:1, uzyskując 0.10 g (0.45 mmol) 1-rybofuranozyloadeniny (**2**) z wydajnością 93%. Związek krystalizowano z wody uzyskując bezbarwne kryształy.

R_f: 0.53 (D1), 0.42 (E1)

t.t.: 169°C brązowienie, 178-195°C czernienie



UV (MeOH): λ_{\max} 274.8 nm, λ_{\min} 247.6 nm, λ_{\max} 228.4 nm

^1H NMR (DMSO- d_6): 3.38 (bs, 3, 2'-OH, 3'-OH, 5'-OH), 3.72 (q, 2, 5'a,b-H), 4.07 (d, 1, 4'-H), 4.12 (d, 1, 3'-H), 4.12 (t, $J=5.4$, 1, 2'-H), 5.95 (d, $J=6.0$, 1, 1'-H), 6.80 (b, 2, NH₂), 7.83 (s, 1, 8-H), 8.39 (s, 1, 2-H)

^1H NMR (D₂O): 4.05 (q, 2, 5'a,b-H), 4.46 (d, 1, 4'-H), 4.49 (d, 1, 3'-H), 4.79 (t, $J=6.0$, 1, 2'-H), 6.15 (d, $J=6.0$, 1, 1'-H), 8.21 (s, 1, 8-H), 8.60 (s, 1, 2-H)

^{13}C NMR (DMSO- d_6): 60.55 (C-5'), 69.90 (C-3'), 72.74 (C-2'), 86.27 (C-4'), 92.23 (C-1'), 118.99 (C-5), 140.54 (C-2), 148.68 (C-6), 150.73 (C-8), 154.70 (C-4)

^{15}N NMR (DMSO- d_6): 164.72 (N-1), 232.51 (N-3), dla pozostałych atomów azotu nie obserwowano sygnałów korelacyjnych (^{15}N - ^1H)

anal.: obliczono dla C₁₀H₁₃N₅O₄ (267.25): C: 44.94%, H: 4.90%, N: 26.21% znaleziono: C: 44.47%, H: 4.69%, N: 26.15%

Dane kryst.: grupa przestrzenna P 2₁

$a = 6.7737(4)$ Å, $b = 16.7201(8)$ Å, $c = 9.7134(4)$ Å

$\alpha = 90.00^\circ$, $\beta = 90.895^\circ$, $\gamma = 90.00^\circ$

objętość komórki: 1099.98 Å³

Długości wiązań w Å (dla dwóch cząsteczek w komórce elementarnej):

O4'-C1' 1.415, 1.411	C4'-C5' 1.514, 1.512	C4-C5 1.391, 1.396
C1'-C2' 1.529, 1.532	C5'-O5' 1.429, 1.435	C4-N9 1.356, 1.355
C2'-C3' 1.529, 1.535	C1'-N1 1.478, 1.473	N9-C8 1.368, 1.353
C2'-O2' 1.417, 1.413	N1-C6 1.377, 1.379	C8-N7 1.339, 1.348
C3'-O3' 1.420, 1.417	N1-C2 1.393, 1.396	N7-C5 1.375, 1.380
C3'-C4' 1.534, 1.534	C2-N3 1.288, 1.288	C5-C6 1.401, 1.401
C4'-O4' 1.473, 1.466	N3-C4 1.367, 1.368	C6-N ⁶ 1.322, 1.324.

Kąty torsyjne:

(ν_0) C4'-O4'-C1'-C2' (-28.85° i -28.18°)	(ν_3) C2'-C3'-C4'-O4' (23.42° i 23.86°)
(ν_1) O4'-C1'-C2'-C3' (42.16° i 42.13°)	(ν_4) C3'-C4'-O4'-C1' (3.10° i 2.46°)
(ν_2) C1'-C2'-C3'-C4' (-38.52° i -38.93°)	



5.2.33. Próba odblokowania N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranosylo)adeniny (231)

N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranosylo)adeninę (**231**) (0.065 g, 0.14 mmol) rozpuszczono w 9 mL metanolanu sodu. Reakcję prowadzono przez 58 godzin w temperaturze pokojowej. Analiza TLC wykazała powstawanie kilku produktów reakcji o podobnych stężeniach.

5.2.34. Próba odblokowania N⁶-benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranosylo)adeniny (236)**Metoda A**

N⁶-Benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranosylo)adeninę (**236**) (0.200 g, 0.40 mmol) rozpuszczono w 25 mL metanolu. Następnie dodano 25 mL 25% wodnego roztworu amoniaku i intensywnie mieszano przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując osad, który krystalizowano z wody, otrzymując drobnokrystaliczny, biały osad; N⁶-benzoilo-1-(β-D-rybofuranosylo)adeninę (**237**) (0.066 g, 0.18 mmol, wydajność 44%).

Metoda B

N⁶-Benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranosylo)adeninę (**236**) (0.048 g, 0.1 mmol) rozpuszczono w 9 mL metanolu nasyconego amoniakiem. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 48 godzin. Jednak związek **236** nie uległ całkowitemu rozpuszczeniu i odblokowaniu, otrzymano mieszaninę kilku produktów o podobnych stężeniach.

Związek 237

t.t.: 134-137°C

R_f: 0.18 (A4)UV (MeOH): λ_{max} 332.5 nm, λ_{min} 281.5 nm, λ_{max} 231.0 nm



¹H NMR (DMSO-d₆): 3.80 (bq, 2, 5'a,b-H), 4.04 (d, 1, 4'-H), 4.17 (d, 1, 3'-H), 4.25 (bq, 1, 2'-H), 5.20, 5.39, 5.55 (2d i s, 3, 3'-OH, 5'-OH, 2'-OH), 6.01 (bs, 1, 1'-H), 7.45-7.60 (m, 3, Ph), 8.12 (d, ~2, Ph), 8.31 (bs, ~1, 8-H), 9.15 (bs, 1, 2-H), 12.52 (s, 1, N7-H)

5.2.35. Reakcje N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranosylo)-adeniny (231) w warunkach transglikozylacji

Metoda A (temperatura wrzenia rozpuszczalnika)

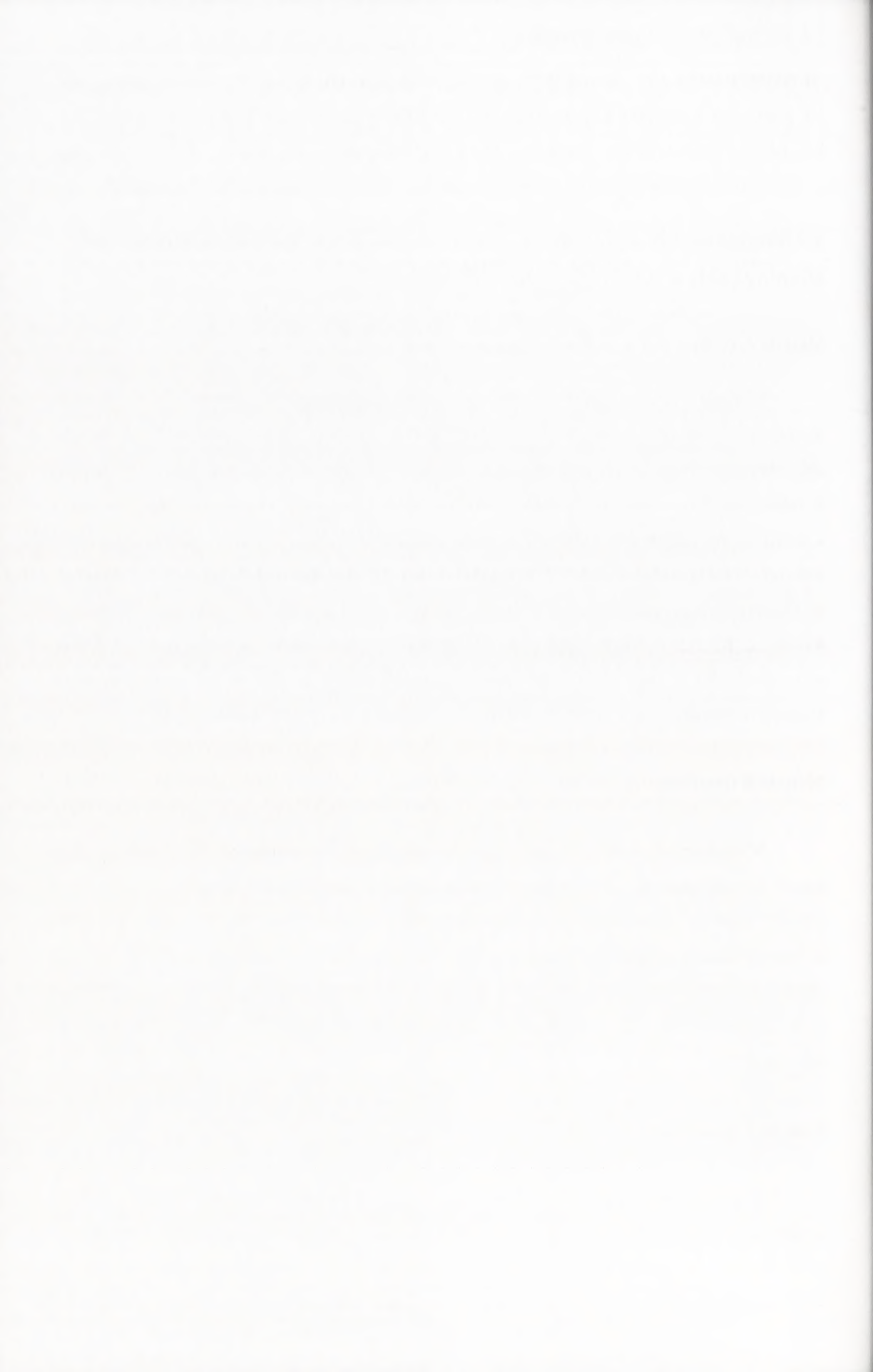
N⁶-Izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranosylo)adeninę (231) (0.042 g, 0.09 mmol) oraz kwas *p*-toluenosulfonowy (0.0017 g, 0.009 mmol) rozpuszczono w 2 mL suchego chlorobenzenu. Reakcję prowadzono pod chłodnicą zwrotną (temperatura łaźni 160°C) przez 8 minut. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie rozdzielono na kolumnie chromatograficznej (4 cm x 2 cm) w gradiencie stężenia chloroform-metanol 98:2 → 95:5. W wyniku rozdzielania otrzymano: N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranosylo)adeninę (198) (0.019 g, 0.041 mmol), powstającą z wydajnością 45.6%, o R_f i UV identycznym ze związkiem otrzymanym w wyniku reakcji opisanej w rozdziale 5.2.6. oraz N⁶-izobutyryloadeninę (197) (0.008 g, 0.004 mmol), identyczną ze związkiem otrzymanym w rozdziale 5.2.3., a powstającą z 45.1% wydajnością.

Metoda B (temperatura 112°C)

N⁶-Izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranosylo)adeninę (231) (0.010 g, 0.02 mmol) rozpuszczono w 1 mL suchego chlorobenzenu i dodano kwasu *p*-TsOH (0.0004 g, 0.002 mmol). Reakcję prowadzono na łaźni olejowej o temperaturze 112°C przez 30 minut z intensywnym mieszaniem. Analiza TLC wykonywana w trakcie reakcji, w układzie chloroform-metanol 95:5, pokazała tworzenie się dwóch głównych produktów o R_f identycznym z N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranosylo)adeniną (198) oraz N⁶-izobutyryloadeniną (197).

Metoda C (temperatura 60°C)

N⁶-Izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranosylo)adeninę (231) (0.006 g, 0.013 mmol) rozpuszczono w 1 mL suchego chlorobenzenu i dodano kwasu *p*-TsOH 0.00025 g,



0.0013 mmol). Reakcję prowadzono na łaźni olejowej o temperaturze 60°C przez 120 minut z intensywnym mieszaniem. Analiza TLC wykonana w trakcie reakcji, w układzie chloroform-metanol 95:5, pokazała tworzenie się z dużą wydajnością, około 80-90% produktu o R_f identycznym z N^6 -izobutyryloadeniną (197).

Metoda D (stapianie 220°C)

N^6 -Izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (0.005 g, 0.01 mmol) (231) ogrzewano w temperaturze 220°C przez 3 minuty. Analiza TLC wykonana w układzie chloroform-metanol 95:5 wykazała powstanie z wydajnością około 60% produktu o współczynniku R_f identycznym z N^6 -izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)-adeniną (198).

5.2.36. Reakcje N^6 -benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetylo- β -D-rybofuranozylo)-adeniny (236) w warunkach transglizozylacji

Metoda A (temperatura wrzenia rozpuszczalnika)

N^6 -Benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (236) (0.0015 g, 0.003 mmol) oraz kwas *p*-toluenosulfonowy (0.0001 g, 0.0005 mmol) rozpuszczono w 0.5 mL suchego chlorobenzenu. Reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 15 minut z intensywnym mieszaniem. Analiza TLC reakcji prowadzona w układzie chloroform-metanol 95:5 wykazała, że z wydajnością około 70% powstaje produkt o współczynniku R_f identycznym z R_f N^6 -benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny (110).

Metoda B (stapianie 220°C)

N^6 -Benzoilo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeninę (236) (0.001 g, 0.002 mmol) ogrzewano przez 5 minut w temperaturze 220°C. Analiza TLC prowadzona w układzie chloroform-metanol 95:5 wykazała, że z wydajnością około 50% nastąpiła konwersja związku 236 do produktu o współczynniku R_f identycznym z R_f N^6 -benzoilo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranozylo)adeniny (110).



5.2.37. Dekompozycji N⁶-izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranosylo)adeniny (232) w warunkach transglikozylacji

N⁶-Izobutyrylo-1,9-bis-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranosylo)adeninę (**231**) (0.090 g, 0.12 mmol) rozpuszczono w 5 mL suchego chlorobenzenu, a następnie dodano kwasu *p*-TsOH (0.0022 g, 0.012 mmol). Reakcję prowadzono pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 10 minut z intensywnym mieszaniem. Analiza TLC wykonywana w trakcie reakcji, w układzie chloroform-acetonitryl (2:1, 1:1), toluen-etanol 9:1 oraz chloroform-metanol 9:1, pokazała tworzenie się dwóch produktów o współczynnikach R_f identycznych z R_f N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranosylo)adeniny (**198**) oraz N⁶-izobutyrylo-1-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranosylo)adeniny (**236**) powstających odpowiednio z wydajnościami około: 60% i 10%. Następnie rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymując jasnożółtą pianę, którą poddano rozdzielowi przy pomocy kolumny chromatograficznej (5.5 cm x 2 cm) jako eluent stosując chloroform-acetonitryl w gradiencie stężenia 2:1 → 1:1, co pozwoliło na otrzymanie 0.030 g (0.065 mmol) N⁶-izobutyrylo-9-(2',3',5'-tri-O-acetyloribofuranosylo)adeniny z wydajnością 51.3%. Produkt ten posiadał identyczny współczynnik R_f oraz widma UV i ¹H NMR z pochodną **198**.

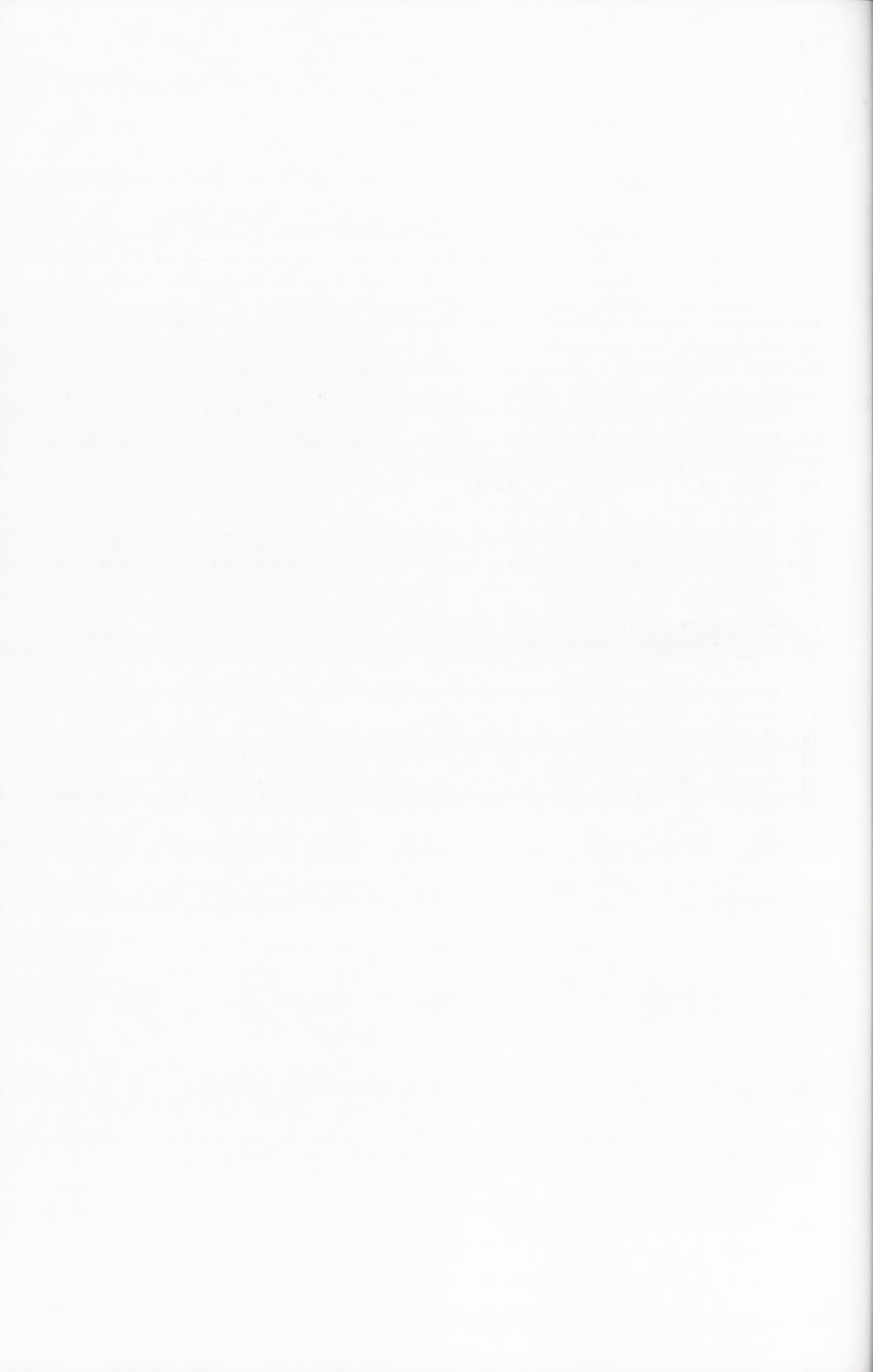


6. Literatura

1. Fischer, E.; Helferich, B. *Chem. Ber.*, **47**, 210 (1914).
2. Ulbricht, T.L.V. *Angew. Chem.*, **74**, 767 (1962).
3. Hilbert, G.E.; Johnson, T.B. *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 4489 (1930).
4. Knorr, E. *Ber.*, **30**, 937 (1897).
5. Davoll, J.; Lowy, B.A. *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1650 (1951).
6. Fox, J.J.; Young, N.; Davoll, J.; Brown, G.B. *J. Chem. Soc.*, **78**, 2117 (1956).
7. Helferich, B.; Weis, K. *Chem. Ber.*, **89**, 314 (1956).
8. Sato, T., Shimadate, T.; Ishido, Y. *Nippon Kagaku Zashi*, **81**, 1440 (1960).
9. Ishido, Y.; Sato, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **34**, 1347 (1961).
10. Shimidate, T.; Ishido, Y.; Sato, T. *Nippon Kagaku Zashi*, **82**, 938, (1961).
11. Ishido, Y.; Matsuba, T.; Hosono, A.; Fujii, K.; Sato, T.; Isome, S.; Maruyama, A.; Kikuchi, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **40**, 1007 (1967).
12. Robins, M.J.; Robins, R.K. *J. Am. Chem. Soc.*, **37**, 4935 (1965).
13. Robins, M.J.; Robins, R.K. *J. Org. Chem.*, **34**, 2160 (1969).
14. Shimizu, B.; Miyaki, M. *Chem. Ind.*, 664 (1966).
15. Montgomey, J.A.; Thomas, H.J. *J. Org. Chem.*, **31**, 1411 (1966).
16. Shimizu, B.; Miyaki, M. *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 732 (1970).
17. Watanabe, K.; Hollenberg, D.H.; Fox, J.J. *Carbohydr. Nucleosides & Nucleotides*, **1**, 1 (1974).
18. Miyaki, M.; Shimizu, B. *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1446 (1970).
19. Boryski, J.; Golankiewicz, B. *Nucleosides & Nucleotides*, **8**, 529 (1989).
20. Jenkins, S.R.; Holy, F.W.; Walton, E. *J. Org. Chem.*, **30**, 2851 (1965).
21. Wright, G.E.; Dudycz, L.W. *J. Med. Chem.*, **27**, 175 (1984).
22. Rogers, G.T.; Ulbricht, T.L.V. *J. Chem. Soc.* 1929 (1968).
23. Boryski, J. *Nucleosides & Nucleotides*, **15**, 771 (1996).
24. Ukita, T.; Hayatsu, H.; Tomita, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **11**, 1068 (1963).
25. Hoffer, M. *Chem. Ber.*, **93**, 2777 (1960).
26. Hoffer, M.; Duschinsky, R.; Fox, J.J.; Yung, N. *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4112 (1959).
27. Fox, J.J.; Young, N.C.; Wempen, I.; Hoffer, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 4066 (1961).
28. Ulbricht, T.L.V.; Rogers, G.T. *J. Chem. Soc.*, 6125 (1965).
29. Rogers, G.T.; Shadbolt, R.S.; Ulbricht, T.L.V. *J. Chem. Soc. (C)*, 203, (1969).
30. Schmidt, G.; Farkaš, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **31**, 417 (1975).
31. Ulbricht, T.L.V. *Proc. Chem. Soc.*, 298 (1962).
32. Schmidt, G.; Farkaš, J. *Tetrahedron Lett.*, **34**, 4251 (1967).
33. Ulbricht, T.L.V.; Rogers, G.T. *J. Chem. Soc.*, 6130 (1965).
34. Pryštas, M.; Šorm, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **29**, 2809 (1964).
35. Rabinowitz, J.L.; Gurin, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5785 (1953).
36. Ueda, T.; Nishino, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 1678 (1968).
37. Yamaoka, N.; Aso, K.; Matsuda, K. *J. Org. Chem.*, **30**, 149 (1965).
38. Pryštas, M.; Šorm, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **33**, 210 (1968).
39. Pryštas, M.; Šorm, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **29**, 1813 (1968).
40. Vorbrüggen, H.; Höfle, G. *Chem. Ber.*, **114**, 1256 (1981).
41. Vorbrüggen, H.; Benna, B. *Chem. Ber.*, **114**, 2757 (1981).
42. Hilbert, G.E.; Johnson, T.B. *J. Am. Chem. Soc.*, **52**, 2001 (1930).
43. Rabinowitz J.L.; Gurin, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 5758 (1953).
44. Farkaš, J.; Kaplan, L.; Fox, J.J. *J. Org. Chem.*, **29**, 1469 (1964).
45. Pryštas, M.; Šorm, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **31**, 1053 (1966).
46. Pryštas, M.; Šorm, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **30**, 2960 (1965).
47. Pryštas, M.; Šorm, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **33**, 131 (1964).



48. Pryštas, M.; Farkaš, J.; Šorm, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **30**, 3123 (1965).
49. Pryštas, M.; Šorm, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **31**, 3990 (1966).
50. Pryštas, M.; Šorm, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **31**, 1035 (1966).
51. Fox, J.J.; Goodman, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3256 (1964).
52. Roberts, M.; Visser, D.H. *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 668 (1952).
53. Walton, E.; Holly, F.; Boxer, G.E.; Nutt, R.F. *J. Org. Chem.*, **31**, 1163 (1966).
54. Nito, T.; Kawakami, T. *Chem. Pharm. Bull.*, **10**, 627 (1962).
55. Hilbert, G.E.; Rist, C.E. *J. Biol. Chem.*, **117**, 371 (1937).
56. Visser, D.W.; Goodman, I.; Dittmer, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1926 (1948).
57. Lemieux, R.U.; Morgan, A.R.; *Can. J. Chem.*, **43**, 2214 (1965).
58. Smejkal, J.; Farkaš, J.; Šorm, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **31**, 291 (1966).
59. Glaudemans, C.P.J.; Fletcher, H.C. *J. Org. Chem.*, **28**, 3004 (1963).
60. Pryštas, M.; Šorm, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **34**, 331 i 2316 (1969).
61. Newmark, P.; Goodman, I. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 6446 (1957).
62. Nishimura, T.; Shimizu, B.; Iwai, I. *Chem. Pharm. Bull.*, **11**, 1470 (1963).
63. Nishimura, T.; Iwai, I. *Chem. Pharm. Bull.*, **12**, 1471 (1964).
64. Wittenburg, E. *Chem. Ber.*, **101**, 1095 (1968).
65. Wittenburg, E. *Chem. Ber.*, **101**, 1614 (1968).
66. Wittenburg, E.; Etzold, G.; Langen, P. *Chem. Ber.*, **101**, 494 (1968).
67. Bardos, T.J.; Kotick, M.P.; Szantay, C. *Tetrahedron Letters*, 1759 (1966).
68. Kotick, M.P.; Szantay, C.; Bardos, T.J. *J. Org. Chem.*, **34**, 3806 (1969).
69. Birkofer, L.; Ritter, A.; Kuhlthau, H.P. *Chem. Ber.*, **79**, 934 (1964).
70. Covill, M.J.; Garg, H.G.; Ulbricht, T.L.V. *Tetrahedron Letters*, 1033 (1968).
71. Vorbrüggen, H.; Królikiewicz, K.; Bennua, B. *Chem. Ber.*, **114**, 1234 (1981).
72. Itoh, T.; Mizuno, Y. *Heterocycles*, **5**, 285, (1976).
73. Shimizu, B.; Miyaki, M. *Tetrahedron*, **7**, 855 (1967).
74. Ryan, K.J.; Acton, E.M.; Goodman, L. *J. Org. Chem.*, **38**, 2646 (1971).
75. Helferich, B.; Gootz, R.; *Ber.*, **62**, 2788 (1929).
76. Helferich, B.; Lampert, U. *Ber.*, **67**, 1167, (1934).
77. Helferich, B.; Forstoff, L. *Ber.*, **94**, 158, (1961).
78. Ishido, Y.; Kikuchi, Y.; Sato, T. *Nippon Kagaku Zasshi*, **86**, 240 (1965).
79. Hosono, A.; Fujii, K.; Tada, T.; Tanaka, H.; Ohgo, Y.; Ishido, Y.; Sato. *Bull. Chem. Soc., Japan*, **64**, 2818 (1973).
80. Ishido, Y.; Matsuba, T.; Hosono, A.; Fujii, K.; Tanaka, H.; Iwabuchi, S.; Isome, S.; Maruyama, A.; Kikuchi, Y.; Sato, T. *Bull. Chem. Soc., Japan*, **38**, 2019 (1965).
81. Kazimierzczuk, Z.; Cottam, H.W.; Revankar, G.R.; Robins, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 6379 (1984).
82. Baker, R.B.; Schaub, R.E.; Kissman, H.M. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 5911 (1955).
83. Goldman, L.; Marsico, J.W.; Angier, R.B. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4173 (1956).
84. Leonard, N. J.; Laursen, R.A. *Biochemistry*, **4**, 354 (1965).
85. Lemieux, R.U. *Adv. Carbohyd. Chem.*, **9**, 1 (1955).
86. Pfleiderer, W.; Robins, R.K. *Chem. Ber.*, **98**, 1511 (1965).
87. Imazawa, M.; Eckstein, F. *J. Org. Chem.*, **43**, 3043 (1978).
88. Dudycz, L.W.; Wright, G.E. *Nucleosides & Nucleotides*, **3**, 33 (1984).
89. McGee, D.P.C.; Martin, J.C.; Verheyden, J.P.H. *Synthetic Commun.*, **18**, 1651 (1988).
90. Boryski, J. *J. Chem. Perkin Trans.*, **2**, 649 (1997).
91. Boryski, J.; Manikowski, A. *Nucleosides & Nucleotides*, **18**, 1057 (1999).
92. Lichtenthaler, F.W.; Kitahara, K. *Angew. Chem. Inter. Edit.*, **14**, 815 (1975).
93. Boryski, J.; Golankiewicz, B. *Nucleosides & Nucleotides*, **6**, 385 (1987).
94. Boryski, J.; Golankiewicz, B. *Nucleic Acids Res. Symp. Series*, **18**, 45 (1987).
95. Boryski, J.; Ostrowski, T.; Golankiewicz, B. *Nucleosides & Nucleotides*, **8**, 1271 (1989).



96. Glemarec, C.; Wu, J.C.; Remaud, G.; Bazin, H.; Oivanen, M.; Lönnberg, H.; Chattopadhyaya, J. *Tetrahedron*, **44**, 1273 (1988).
97. Robins, M.J.; Zou, R.; Hansske, F.; Madej, D.; Tyrrell, L.J. *Nucleosides & Nucleotides*, **8**, 725 (1989).
98. Kamimura, T.; Tsuchiya, M.; Koura, K.; Sekine, M.; Hata, T. *Tetrahedron Lett.*, **27**, 2775 (1983).
99. Azuma, T.; Isono, K. *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 3347 (1977).
100. Kalckar C. *J. Biol. Chem.*, **167**, 477 (1947).
101. Utegawa, T.; Morisawa, H.; Miyoshi, T.; Yoshinaga, F.; Yamazaki, A.; Mitsugi, K. *FEBS Lett.*, **109**, 261 (1980).
102. Utagawa, T.; Morisawa, H.; Nakamtsu, T.; Yamazaki, A.; Yamanaka, S.; *FEBS Letters*, **119**, 101 (1980).
103. Holy, A.; Votruba, I. *Nucl. Acids. Res. Symp. Ser.*, **18**, 69 (1987).
104. Holy, A.; Votruba, I.; Dworakova, H.; Günter, J.; Hockova, D.; Hrabecky, H.; Cihlar, T.; Masojidkova, M. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **10**, 2303 (1994).
105. Zinchenko, A.I.; Eroshevskaya, L.A.; Barai, V.N.; Mikhailopulo, I.A. *Nucleosides & Nucleotides*, **14**, 477 (1995).
106. Morisawa, H.; Utagawa, T.; Miyoshi, T.; Yoshinaga, F.; T.; Yamazaki, A.; Mitsugi, K. *Tetrahedron Letters*, **21**, 479 (1980).
107. Bristow, N.W.; Lythgoe, B. *J. Chem. Soc.*, 2306 (1949).
108. Baker, B.R.; Joseph, J.P.; Schaub, R.E.; Williams, J.H. *J. Org. Chem.*, **19**, 1786 (1954).
109. Nakazaki, N.; Tekeda, T.; Yoshino, T.; Sekiya, M.; Ishido, Y. *Carbohydr. Res.*, **44**, 215 (1975).
110. Kissman, H.M.; Pidacks, C.; Baker, B.R. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 18, (1955).
111. Wagner, G. *Z. Chem.*, **6**, 367 (1966).
112. Boryski, J. Wykład: „Synteza nukleozydów – metody wytwarzania wiązania glikozydowego”, styczeń 2005.
113. Boryski, J. *Polish J. Chem.*, **73**, 1019 (1999).
114. Boryski., J. *Nucleoside & Nucleotides*, **14**, 77 (1995).
115. Boryski., J.; Manikowski, A. *Nucleosides & Nucleotides*, **14**, 287 (1995).
116. Nakazaki, N.; Sekiya, M.; Yoshino, T.; Ishido, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **46**, 3858 (1973).