

**Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk**



Rozprawa doktorska

**Poszukiwania nowych pochodnych 5'-difosforanów nukleozydów
o potencjalnej aktywności anti-HIV. Badania chemiczne
i biologiczne**

mgr Marta Rachwałak

Promotor: prof. dr hab. Jacek Stawiński

Promotor pomocniczy: dr Joanna Romanowska

Poznań 2019

Pracę tę dedykuję Rodzicom – moim najważniejszym nauczycielom...

Serdecznie dziękuję **prof. dr hab. Jackowi Stawińskiemu**
za promotorski trud, codzienne motywowanie do działania oraz cierpliwość.
Dziękuję również za przekazaną wiedzę oraz niezliczone chemiczne dyskusje,
których nie przerywała nawet odległość.

Dziękuję również:

Dr Joannie Romanowskiej za wszelką pomoc podczas realizowania niniejszej rozprawy oraz zawsze serdeczny uśmiech;

Prof. dr hab. Adamowi Kraszewskiemu za cenne uwagi dotyczące rozprawy oraz codzienną życzliwość;

Dr hab., prof. IChB PAN Michałowi Sobkowskemu za celne wskazówki podczas pisania rozprawy oraz serdeczność;

Wszystkim pracownikom **Zakładu Chemii Komponentów Kwasów Nukleinowych oraz Pracowni Syntezy Pochodnych Kwasów Nukleinowych** za miłą atmosferą i cierpliwość w odpowiadaniu na wszystkie moje naukowe i pozanaukowe pytania. W szczególności dziękuję **Justynie Gołębiewskiej** i **Tomkowi Jakubowskiemu** za długie godziny spędzone w laboratorium na dyskusjach, śmiechu i (a jakże!) pracy – dziękuję Wam za pomoc i uwagi, które od Was otrzymałam – bez Was by to się nie udało;

Wszystkim **Pracownikom Zakładu Biomolekularnego NMR** i **Pracowni NMR** za tworzenie przemiłej atmosfery oraz niebywałą troskę o to, by każde widmo było perfekcyjnie zarejestrowane;

Wszystkim zaprzyjaźnionym **doktorantom z roku (i nie tylko)** za tworzenie wspierającej się i wesołej grupy;

Dr Agnieszce Witkowskiej, dzięki której moja przygoda z IChB PAN się zaczęła, za wsparcie w każdej minucie oraz czas spędzony na rozmowach, nauce, śmiechu i chodzeniu po górach;

Tomkowi Czapikowi za niekończące się rozmowy o sprawach ważnych i mniej ważnych, śmiech do łez oraz niemieckie piosenki;

Wszystkim **przyjaciołom**, których zbieram na każdym etapie życia: **Martynie** za przyjaźń, dobro, akceptację i niekończącą się wiarę we mnie; **Magdzie** i **Marcinowi** za długie rozmowy, wsparcie i niebywałe poczucie humoru, które zawsze potrafi wprawić mnie w dobry nastrój; **Jackowi** za wszystkie przeprowadzki i remonty oraz za to, że umie mnie rozśmieszyć w każdej sytuacji; **Osie** za wspólne przycinanie drzew i wycieczki rowerowe; **Wojtkowi** za pokazywanie jak ważne są marzenia; **Hani**, **Justynie** i **Asi** za wspaniałe wspomnienia z czasów studenckich oraz za nieprzerwane kibicowanie mi; **Mateuszowi** za niezliczone rozmowy, grzybobrania i wycieczki, które zawsze otwierają mi nową perspektywę; **Kasi** za niebywałe dobro i ciepło, które przekazuje mi podczas każdego spotkania; **Żanecie**, bez której nic by się nie udało, za wszystko;

Mojej Rodzinie za nieustającą wiarę we mnie i wszelkie wsparcie, które otrzymałam - dziękuję!

Poszukiwania nowych pochodnych 5'-difosforanów nukleozydów o potencjalnej aktywności anti-HIV. Badania chemiczne i biologiczne

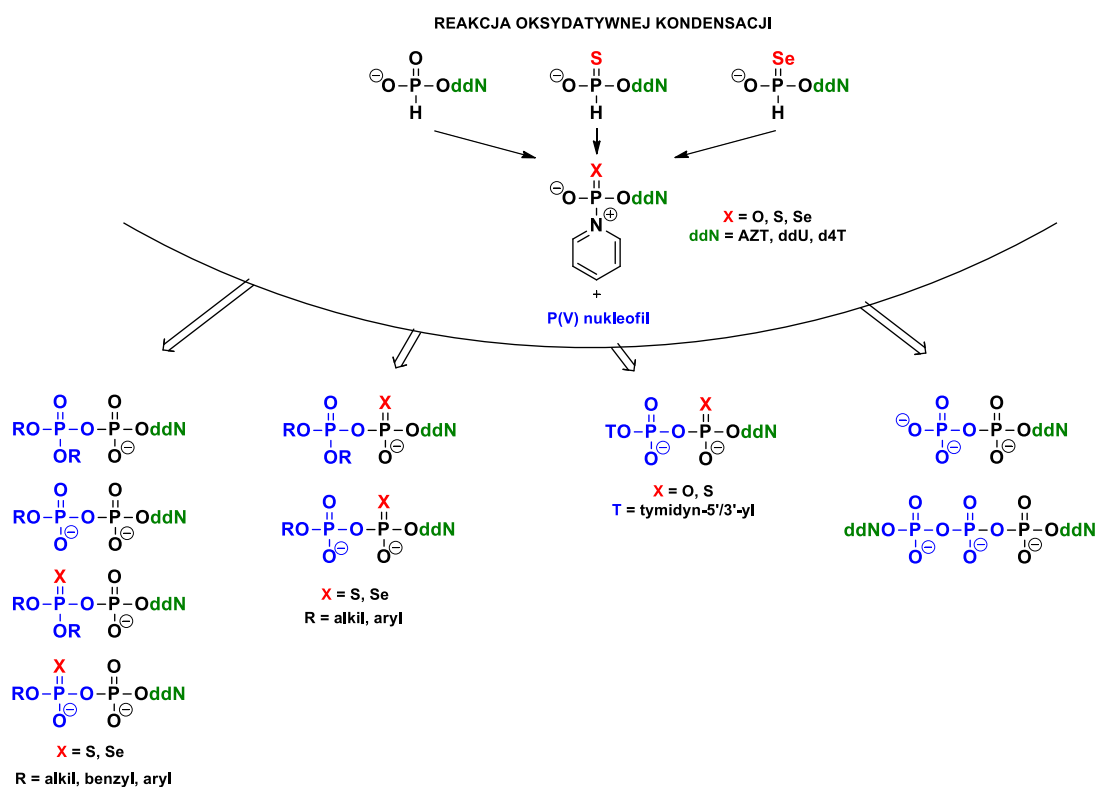
Marta Rachwałak

Na przestrzeni lat zaobserwować można stały postęp w leczeniu AIDS, a dzięki ogromnemu wysiłkowi wielu laboratoriów na świecie, wirus HIV obecnie nie stanowi zagrożenia epidemiologicznego. Pomimo tego, jak dotąd nie udało się stworzyć skutecznego leku całkowicie eliminującego wirusa z organizmu chorego. Stąd, istnieje pilna potrzeba poszukiwania nowych leków lub udoskonalania już istniejących, zwalczających tego niewątpliwie kłopotliwego terapeutycznie i ciągle niebezpiecznego wirusa.

Celem moich badań było zaprojektowanie i opracowanie metody syntezy nowych wariantów strukturalnych 5'-difosforanów nukleozydów i ich analogów o potencjalnej aktywności anti-HIV. Chcąc otrzymywać związki o różnorodnych modyfikacjach w obrębie reszt fosforanowych, postanowiłam wykorzystać reakcję oksydacyjnej kondensacji H-fosfonianomonoestrów z P(V) nukleofilami. Wykonałam szereg badań metodycznych pozwalających opracować optymalne warunki reakcji (m.in. wpływ czynnika silylującego, utleniacza, katalizatora nukleofilowego), najpierw dla wydajnego generowania reaktywnej fosfobetainy pirydyniowej, a następnie jej reakcji z wybranym P(V) nukleofilem. Korzystając z tej metodyki otrzymałam serie różnorodnie maskowanych na reszcie fosforanowej P_β 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów. Reakcję oksydacyjnej kondensacji stosowałam z powodzeniem także do syntezy pochodnych zawierających heteroatom (siarkę lub selen) w pozycjach niemostrkowych wiązania pirofosforanowego, co znacząco wzbogaciło różnorodność otrzymanych związków.

Wszystkie otrzymane pochodne (schemat zamieszczony poniżej) zostały przebadane we współpracy z laboratoriami mikrobiologicznymi pod kątem ich właściwości biologicznych (aktywności anti-HIV oraz cytotoksyczności). Większość z nich charakteryzowała się dobrymi lub bardzo dobrymi parametrami terapeutycznymi [aktywnością antywirusową (EC₅₀) rzędu nanomolarnego i niską toksycznością (CC₅₀)]. Dla wybranych związków wykonałam badania ich podatności na hydrolizę chemiczną w warunkach hodowli komórkowych (RPMI) oraz podatności na hydrolizę enzymatyczną w medium wzbogaconym w surowicę bydlęcą (RPMI/FBS, 9:1, v/v). W tych badaniach

używałam wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) jako metody analitycznej, wyznaczając $t_{1/2}$ rozpadu analizowanych difosforanów.



Trwałość badanych związków była następnie korelowana z ich strukturą, np. pozycją ładunku ujemnego w cząsteczce, położeniem i rodzajem heteroatomu, typem obecnych grup maskujących, oraz parametrami biologicznymi (cytotoksycznością i aktywnością anty-HIV). Badania pokazały, że decydujący wpływ na wysoką aktywność anty-HIV 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów ma obecność heteroatomu (siarki lub selenu) w części pirofosforanowej oraz występowanie ładunku ujemnego w reszcie fosforanowej związanej z nukleozydem. Stwierdzono też, że heteroatom w pozycji P_{α} zwiększa odporność difosforanów na hydrolizę enzymatyczną, natomiast w pozycji P_{β} nie zmienia znacząco ich trwałości w porównaniu do okso-difosforanów. Powyższe obserwacje mogą okazać się ważne przy projektowaniu nowych leków anty-HIV bazujących na 5'-difosforanach 2',3'-dideoksynukleozydów.

Uzyskane wyniki wskazały na 8 najbardziej aktywnych pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów jako potencjalnych struktur wiodących dla dalszych badań nad nowymi lekami w terapii anty-HIV.

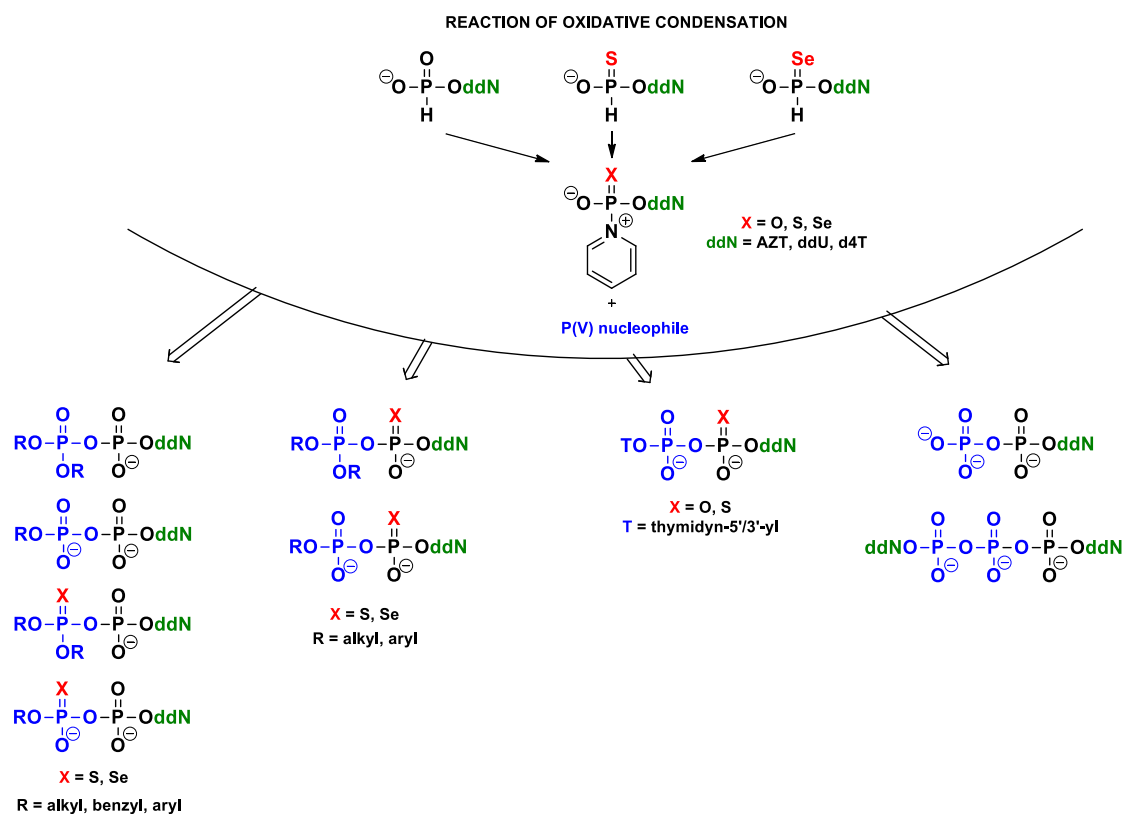
Exploring new derivatives of nucleoside 5'-diphosphates for potential anti-HIV activity. Chemical and biological studies

Marta Rachwalak

Over the years, a tremendous progress has been made in treatment of patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), and due to enormous effort of numerous laboratories around the world, the HIV virus is not any more an epidemiological threat. Despite this, there is no effective drug that could totally eradicate the virus from the patient's body. Thus, the quest for new drugs or improvements of the existing ones continues, kindled by the hope of finding therapeutics that could effectively cope with this troublesome and still dangerous virus.

The aim of this work was to design and to develop a synthetic method for new structural variants of 2',3'-dideoxynucleoside 5'-diphosphates with potential anti-HIV activity. To this end I investigated the oxidative condensation of H-phosphonate monoesters with P(V) nucleophiles as means for introduction of diverse modifications at the diphosphate moieties. The methodological studies permitted me to formulate an efficient synthetic protocol both for the generation of pyridinium phosphobetaine and its subsequent reactions with selected P(V) nucleophiles. Using this methodology, I synthesized 2',3'-dideoxynucleoside 5'-diphosphates with diverse substitution and charge pattern in the diphosphate moiety. The oxidative condensation was also found to be the method of choice for the preparation of derivatives containing heteroatoms (sulfur or selenium) in non-bridging positions of the pyrophosphate bond.

All of the synthesized diphosphate analogues (the scheme below) were tested for their biological properties (anti-HIV activity and cytotoxicity) in cooperation with microbiological laboratories. Most of them showed good or very good therapeutical properties [nanomolar antiviral activity (EC_{50}) and low cytotoxicity (CC_{50})]. For the selected compounds I investigated also their susceptibility to chemical hydrolysis in cell culture medium (RPMI) and susceptibility to enzymatic hydrolysis in medium enriched with fetal bovine serum (RPMI/FBS, 9:1, v/v). To conduct these studies I used high performance liquid chromatography (HPLC) as an analytical method to determine $t_{1/2}$ of the analysed diphosphate derivatives.



The obtained biological and chemical data (anti-HIV activity, cytotoxicity, hydrolytic stability) were then correlated with structural features of the synthesized diphosphates (*e.g.* a position of the negative charge in the molecule, kind of the masking group present, location and type of a heteroatom). These shown that a decisive factor for high antiviral activity of 2',3'-dideoxynucleoside 5'-diphosphates was the presence of at least one heteroatom (sulfur or selenium) in the pyrophosphate moiety, and one negative charge in the phosphate residue directly connected with the nucleoside. A heteroatom in the P_α position was found to significantly increase the resistance of the diphosphates to enzymatic hydrolysis, while in the P_β position, did not change significantly their stability in comparison to that of the oxo-diphosphates. These observations might be useful while designing of new anti-HIV drugs based on 2',3'-dideoxynucleoside 5'-diphosphates.

From the investigated compounds a group of 8, with the most favourable biological activity, was selected as potential lead structures for further studies on new drugs for the anti-HIV therapy.

SPIS TREŚCI

I. DOROBEK NAUKOWY POWSTAŁY W TRAKCIE WYKONYWANIA NINIEJSZEJ ROZPRAWY	17
II. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY.....	19
III. KONCEPCJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	21
IV. WSTĘP LITERATUROWY	23
1. POCHODZENIE ORAZ BUDOWA WIRUSA HIV	23
2. CYKL REPLIKACYJNY WIRUSA HIV.....	25
2.1. Przyłączenie i wnikanie wirusa do komórki	26
2.2. Synteza wirusowego DNA.....	26
2.3. Integracja wirusowego DNA	27
2.4. Regulacja ekspresji wirusowych genów.....	28
3. ZAKAŻENIE WIRUSEM HIV ORAZ LECZENIE.....	28
3.1. Zakażenie wirusem HIV i przebieg infekcji.....	28
3.2. Leczenie	29
3.2.1. Dostępne terapie anty-HIV	30
4. INHIBITORY ODWROTNEJ TRANSKRYPCJI WIRUSA HIV	31
4.1. Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji (NRTI)	31
4.2. Nukleotydydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji (pronukleotydy)	37
4.2.1. Estry fosforanowe analogów nukleozydów.....	39
4.2.1.1. Grupy maskujące hydrolizowane na drodze chemicznej	39
4.2.1.2. Grupy maskujące hydrolizowane z udziałem enzymów.....	43
4.2.1.3. Fosforany dinukleozydów	49
4.2.2. Amidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów	52
4.2.2.1. Amidofosforanowe diestry 2',3'-dideoksynukleozydów	52
4.2.2.2. Amidofosforanowe monoestry 2',3'-dideoksynukleozydów.....	57
4.2.3. Estry di- i trifosforanowe analogów nukleozydów	61
5. CHEMICZNA SYNTEZA POLIFOSFORANÓW NUKLEOZYDÓW	71
5.1. Pierwsze metody syntezy polifosforanów	71
5.2. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem karbodiimidów	74
5.3. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem amidofosforanów	75
5.4. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem 5'-O-tosylowanych nukleozydów	79
5.5. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem dichlorofosforanów	80
5.6. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem cyklicznych fosforotriestrów	81
5.7. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem cyklicznych fosforanotriestrów	83

5.8. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem mieszanych bezwodników fosforyno- fosforanowych P(III)-P(V)	84
5.9. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem fosfobetain.....	85
6. PODSUMOWANIE WSTĘPU LITERATUROWEGO	87
V. CEL BADAŃ.....	89
VI. WYNIKI I DYSKUSJA.....	93
1. PROJEKTOWANE NOWE WARIANTY STRUKTURALNE 5'-DIFOSFORANÓW NUKLEOZYDÓW .	93
2. CHEMIA H-FOSFONIANÓW. WYBÓR DROGI SYNTEZY 5'-DIFOSFORANÓW NUKLEOZYDÓW .	95
3. BADANIA METODYCZNE NAD REAKCJĄ OKSYDATYWNEJ KONDENSACJI	99
3.1. Układ modelowy do badań metodycznych	101
3.2. Wpływ czynnika sililującego	103
3.3. Wpływ utleniacza	111
3.4. Wpływ katalizatora nukleofilowego.....	113
3.5. Reaktywność fosfobetain wobec P(V) nukleofili	117
4. SYNTEZA 5'-DIFOSFORANÓW 2',3'-DIDEOKSYNUKLEOZYDÓW I ICH ANALOGÓW	124
4.1. Synteza związków wyjściowych.....	124
4.1.1. Synteza 5'-H-fosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów.....	124
4.1.2. Synteza 5'-H-(seleno/tio)fosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów.....	125
4.2. Otrzymywanie zaprojektowanych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów	126
4.2.1. Synteza zaprojektowanych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu A...	127
4.2.2. Synteza zaprojektowanych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu B...	134
4.2.3. Synteza zaprojektowanych 5'-difosforanów dinukleozydów typu C	138
4.2.4. Synteza zaprojektowanych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu D...	139
4.2.5. Synteza analogów 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów zawierających wiązanie P-N.....	142
5. OZNACZENIE POTENCJAŁU ANTY-HIV OTRZYMANYCH POCHODNYCH 5'-DIFOSFORANÓW 2',3'-DIDEOKSYNUKLEOZYDÓW	143
6. TRWAŁOŚĆ I ŚCIEŻKI ROZPADU NIEKTÓRYCH OTRZYMANYCH POCHODNYCH 5'-DIFOSFORANÓW 2',3'-DIDEOKSYNUKLEOZYDÓW	152
7. MOŻLIWE MECHANIZMY DZIAŁANIA OTRZYMANYCH POCHODNYCH 5'-DIFOSFORANÓW NUKLEOZYDÓW	160
7.1. Próba korelacji struktury i trwałości zsyntetyzowanych związków z ich aktywnością anty-HIV	161
7.2. Związki o najkorzystniejszych parametrach terapeutycznych	165
8. PODSUMOWANIE	171
VII. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA.....	175
1. Informacje ogólne	175
1.1. Odczynniki chemiczne i rozpuszczalniki	175

1.2. Techniki analityczne i preparatywne	175
1.2.1. Chromatografia kolumnowa i cienkowarstwowa (TLC)	175
1.2.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (RP-HPLC).....	176
1.2.3. Parametry farmakokinetyczne	176
1.3. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).....	176
2. Syntezy chemiczne	177
2.1. Synteza związków wyjściowych	177
2.1.1. Ogólna procedura otrzymywania 5'-H-fosfonianomonoestrów 2',3'- dideoksynukleozydów AZT, ddU i d4T	177
2.1.2. Ogólna procedura otrzymywania 5'-H-seleno/tiofosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów AZT, ddU i d4T	177
2.2. Ogólna procedura otrzymywania 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu A-D	178
2.3. Ogólna procedura otrzymywania 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów zawierających wiązanie P-N (związki typu N)	178
3. Charakterystyka spektralna	179
3.1. Charakterystyka spektralna związków wyjściowych	179
3.2. Charakterystyka spektralna pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu A.....	181
3.3. Charakterystyka spektralna pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu B.....	189
3.4. Charakterystyka spektralna pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu C.....	193
3.5. Charakterystyka spektralna pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu D.....	196
3.5. Charakterystyka spektralna pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów zawierających wiązanie P-N (związki typu N)	199
VIII. LITERATURA	201

I. DOROBK NAUKOWY POWSTAŁY W TRAKCIE WYKONYWANIA NINIEJSZEJ ROZPRAWY

Wykaz publikacji:

1. Justyna Gołębiewska, Marta Rachwałak, Tomasz Jakubowski, Joanna Romanowska, Jacek Stawinski, *Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines in the Presence of Iodine: The Case for the Intermediacy of H-phosphonate Derivatives*, Journal of Organic Chemistry, 83, 5496-5505 (2018).
2. Joanna Romanowska, Krystian Kolodziej, Michal Sobkowski, Marta Rachwałak, Tomasz Jakubowski, Justyna Golebiewska, Adam Kraszewski, Jerzy Boryski, Aleksandra Dabrowska, Jacek Stawinski, *Aryl H-phosphonates. 19. New anti-HIV pronucleotide phosphoramidate diesters containing amino- and hydroxypyridine auxiliaries*, European Journal of Medicinal Chemistry, 164, 47-58 (2019).

Artykuły monograficzne:

1. Marta Rachwałak, Tomasz Jakubowski, Joanna Romanowska, *Nowe trendy w projektowaniu pronukleotydów anty-HIV*, Na Pograniczu Chemii i Biologii, 2015, tom XXXIV, strony: 11-28.
2. Tomasz Jakubowski, Marta Rachwałak, Joanna Romanowska, *Chemia H-fosfonianów w syntezie związków biologicznie aktywnych*, Na Pograniczu Chemii i Biologii, 2015, tom XXXIV, strony: 101-112.
3. Marta Rachwałak, Małgorzata Roźniewska, Justyna Gołębiewska, Tomasz Jakubowski, Aleksandra Dąbrowska, Joanna Romanowska, *Nukleozydo 5'-difosforany i ich analogi – synteza i wybrane właściwości biologiczne*, Na Pograniczu Chemii i Biologii, 2017, tom XXXVII, strony: 211-223.

Zgłoszenie patentowe:

1. Zgłoszenie wynalazku pt.: *Nowy analog nukleozydo difosforanu, kompozycja farmaceutyczna zawierająca analog nukleozydo difosforanu, jego zastosowanie i sposób syntezy* (P.422 415, 31.07.2017r.), Joanna Romanowska, Justyna Gołębiewska, Marta Rachwałak, Tomasz Jakubowski.

II. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

- A – adenozyzna
- ABC – abakawir
- ACN – acetonitryl
- Ade – adenina
- AIDS – zespół nabytego niedoboru odporności (ang. *acquired immunodeficiency syndrome*)
- ANP – acykliczne C-fosfoniany nukleozydów (ang. *acyclic nucleoside phosphonates*)
- ART – terapia antyretrowirusowa (ang. *antiretroviral therapy*)
- AZT – 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
- AZTDP – 5'-difosforan AZT
- AZTMP – 5'-monofosforan AZT
- AZTTP – 5'-trifosforan AZT
- B – zasada pirymidynowa lub purynowa w nukleozydach
- BBB – bariera krew-mózg (ang. *blood brain barrier*)
- Bu – butyl
- Bn – benzyl
- C – cytydyna
- CC₅₀ – stężenie cytotoksyczne (ang. *cytotoxic concentration*)
- CDI – N,N'-karbonyldiimidazol
- CEM/0 – komórki zainfekowane wirusem HIV typu dzikiego
- CEM/dCK – komórki z deficytem kinazy deoksycytydynowej
- CEM/SS – komórki ludzkich limfoblastoidów T4
- CEM/TK – komórki z deficytem kinazy tymidynowej
- CEMX-174 – somatyczna linia komórkowa będąca hybrydą linii komórkowej CEM i linii komórkowej limfoblastoidów B-14
- Cyt – cytozyna
- d4T – 2',3'-didehydro-3'-deoksytymidyna
- dA – 2'-deoksyadenozyna
- DABCO – 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
- dC – 2'-deoksycytydyna
- DCC – -N,N'-dicykloheksylokarbodiimid
- DCI – 4,5-dicyjanoimidazol
- ddA – 2',3'-dideoksyadenozyna
- ddAMP – 5'-monofosforan adenozyzny
- ddADP – 5'-difosforan adenozyzny
- ddATP – 5'-trifosforan adenozyzny
- ddC – 2',3'-dideoksycytozyna, zalcytabina
- ddi – 2',3'-dideoksyinozyna
- ddN – 2',3'-dideoksynukleozyd
- ddNMP – 5'-monofosforan 2',3'-dideoksynukleozydu
- ddNDP – 5'-difosforan 2',3'-dideoksynukleozydu
- ddNTP – 5'-trifosforan 2',3'-dideoksynukleozydu
- ddU – 2',3'-dideoksyurydyna
- ddUMP – 5'-monofosforan ddU
- dG – 2'-deoksyguanozyna
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy
- DMF – dimetyloformamid
- DMSO – dimetylosulfotlenek
- DPHP – H-fosfonian difenylowy
- DTE – grupa dithioetylowa
- EC₅₀ – stężenie efektywne (ang. *effective concentration*)
- ekw. – ekwiwalent
- FBS/FCS – surowica z płodów bydłych/cielęcych (ang. *fetal bovine/calf serum*)
- FDA – Urząd ds. Leków i Żywności (*Food and Drug Administration*)
- FTC – emtrycytabina
- G – guanozyna
- Gua – guanina
- HAART – wysoce aktywna terapia antyretrowirusowa (ang. *highly active antiretroviral therapy*)
- HBV – wirus zapalenia wątroby typu B (ang. *hepatitis B virus*)
- HCV – wirus zapalenia wątroby typu C (ang. *hepatitis C virus*)
- HIV – ludzki wirus niedoboru odporności (ang. *human immunodeficiency virus*)
- HINT – białko triady histydynowej wiążącej nukleotyd (ang. *Histidine Triad Nucleotide-binding Protein*)

- HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High Performance Liquid Chromatography*)
- HR-MS – wysokorozdzielcza spektrometria mas (ang. *High Resolution Mass Spectrometry*)
- IN – integraza
- mRNA – matrycowy RNA (ang. *messenger RNA*)
- MT-2 – komórki ludzkich limfocytów T pochodzenia białaczkowego zainfekowane HTLV-1
- MT-4 – komórki ludzkich T-limfocytów
- NBS – *N*-bromosukcynimid
- NCS – *N*-chlorosukcynimid
- NDP – 5'-difosforan nukleozydu
- NIS – *N*-jodosukcynimid
- NMP – 5'-monofosforan nukleozydu
- NMR – magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *nuclear magnetic resonance*)
- NRTI – nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (ang. *nucleoside inhibitors of reverse transcriptase*)
- NTP – 5'-trifosforan nukleozydu
- PAOB – grupa *p*-acyloksybenzylowa
- PBMC – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*)
- PBS – bufor fosforanowy (ang. *phosphate buffered saline solution*)
- Ph – fenyl
- PLE – esteraza z wątroby świni (ang. *pig liver esterase*)
- PMEAs – 9-[2-(fosfonylometoksy)etylo]adenina
- PMPAs – (R)-9-[2-(fosfonylometoksy)propylo]adenina
- POC – grupa izopropyloksykarbonyloksymetylowa
- POM – grupa piwaloiloksymetylowa
- PR – proteaza
- PvCl – chlorek piwaloilu (chlorek trimetyloacetylu)
- Py – pirydyna
- RNA – kwas rybonukleinowy
- RPMI-1640 – medium hodowlane komórek (ang. *Roswell Park Memorial Institut*)
- RT – odwrotna transkryptaza (ang. *reverse transcriptase*)
- SATE – grupa *S*-acylo-2-tioetylowa
- SI – indeks selektywności (ang. *selectivity index*)
- SIV – małpi wirus niedoboru odporności (ang. *simian immunodeficiency virus*)
- $t_{1/2}$ – czas połowicznego rozkładu
- T – tymidyna
- *t*Bu – *tert*-butyl
- TasP – leczenie antywirusowe jako praktyka profilaktyczna (ang. *treatment as prevention*)
- TAF – fumaran alafenamidu tenofowiru
- TDF – fumaran dizoproksalu tenofowiru
- TEA – trietyloamina
- TEAH⁺ – kation trietyloamoniowy
- Thy – tymina
- TMSCI – chlorek trimetylosililu
- 3TC – lamiwudyna
- 3TCDP – 5'-difosforan 3TC
- 3TCMP – 5'-monofosforan 3TC
- 3TCTP – 5'-trifosforan 3TC
- TMP – 5'-monofosforan tymidyny
- TTP – 5'-trifosforan tymidyny
- U – urydyna
- Ura – uracyl
- UTP – 5'-trifosforan urydyny
- *v/v* – stosunek objętościowy (ang. *volume/volume*)

III. KONCEPCJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Ogólnym celem badań przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej było zaprojektowanie nowych wariantów strukturalnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów oraz opracowanie uniwersalnej i wygodnej metody syntezy tych związków, a następnie wyznaczenie ich parametrów biologicznych oraz trwałości. Oczekiwałam, że związki o najlepszych parametrach terapeutycznych będą mogły stanowić struktury wiodące (ang. *lead compounds*) w przyszłych badaniach nad opracowaniem nowych, skutecznych terapeutyków anty-retrowirusowych. Projekt ten składał się z dwóch części, obejmujących zarówno badania chemiczne (opracowanie metody syntezy, otrzymywanie zaprojektowanych molekuł), jak i biologiczne, dotyczące potencjalnych właściwości terapeutycznych otrzymanych związków.

Pierwszą część rozprawy stanowi *Wstęp literaturowy* wprowadzający w tematykę projektowania związków przeznaczonych do wykorzystywania w terapii anty-HIV, ze szczególnym uwzględnieniem pronukleotydów, ukierunkowanych na blokowanie procesu odwrotnej transkrypcji wirusa. W związku z potencjalnym zastosowaniem otrzymywanych związków dla hamowania cyklu replikacyjnego HIV na tym właśnie etapie, omówione zostały znane strategie pronukleotydowe. Założone cele badawcze niniejszej rozprawy dotyczą przede wszystkim chemicznej syntezy pochodnych polifosforanowych, stąd we *Wstępie literaturowym* znalazło się także wprowadzenie dotyczące najważniejszych podejść syntetycznych stosowanych do otrzymywania di- oraz trifosforanów.

W części poświęconej badaniom własnym (*Wyniki i dyskusja*) opisałam kolejne etapy chemicznej syntezy 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów, począwszy od zaprojektowania chemicznej struktury tych cząsteczek, poprzez badania metodyczne oraz optymalizację warunków syntezy, a skończywszy na opracowaniu wydajnego protokołu syntetycznego i otrzymywaniu konkretnych grup związków. Następnie opisałam oznaczanie wybranych parametrów pomocnych w dyskusji o potencjalnych właściwościach terapeutycznych zsyntetyzowanych pochodnych, m.in.: trwałość i ścieżki rozpadu, aktywność biologiczna, cytotoksyczność. Ten fragment rozprawy kończy zwięzłe podsumowanie efektów badań.

Ostatni fragment pracy doktorskiej stanowi *Część eksperymentalna*, w której przedstawiłam stosowane procedury doświadczalne oraz charakterystykę spektralną otrzymanych związków. Całość zamyka spis cytowanej literatury.

IV. WSTĘP LITERATUROWY

Początek lat 80. XX w. w medycynie kojarzony jest z groźbą wybuchu pandemii nowej, nieznanej i dotąd nieopisanej w literaturze choroby, charakteryzującej się zaawansowanym, a zarazem niezrozumiałym spadkiem odporności immunologicznej. Nową jednostkę chorobową nazwano zespołem nabytego upośledzenia odporności (AIDS, ang. *acquired immunodeficiency syndrome*). W ciągu dwóch lat od pierwszych doniesień dotyczących zidentyfikowania tego syndromu, kilka grup badawczych niezależnie od siebie wyizolowało patogen będący przyczyną rozwijania się tej tajemniczej choroby, który nazwano ludzkim wirusem upośledzenia odporności (HIV, ang. *human immunodeficiency virus*). Szacuje się, że dotychczas wirusem HIV zostało zakażonych ponad 77 milionów ludzi na całym świecie, z czego 37 milionów jest nosicielem tego wirusa, a tylko 22 miliony mają dostęp do terapii antywirusowej.¹

1. POCHODZENIE ORAZ BUDOWA WIRUSA HIV

Na początku roku 1983 grupa badaczy z paryskiego Instytutu Pasteura (Barre-Sinoussi, Chermann i Montagnier) wyizolowała retrowirusa otrzymanego podczas biopsji węzłów chłonnych pacjenta z upośledzoną odpornością, nazwanego pierwotnie LAV (ang. *lymphadenopathy-associated virus*).² Rok później, Gallo i współpracownicy z Laboratory of Tumor Cell Biology (Maryland, USA) opisali izolację retrowirusa z limfocytów krwi obwodowej pacjentów z AIDS, któremu nadano nazwę HTLV-III (ang. *human T-lymphotropic virus type III*).³ W ciągu roku kolejne grupy naukowców donosiły o izolacji wirusa z komórek pobranych od pacjentów umierających na AIDS.⁴ Analiza genomów LAV i HTLV-III ujawniła, że patogeny te są niemal identyczne (wykazywały tylko 1-2% rozbieżności w sekwencji). Co więcej, analiza sekwencji genomów potwierdziła przypuszczenie, że ludzkie retrowirusy izolowane od pacjentów z AIDS są powiązane, aczkolwiek odległe, z lentiwirusami występującymi u innych zwierząt.⁵

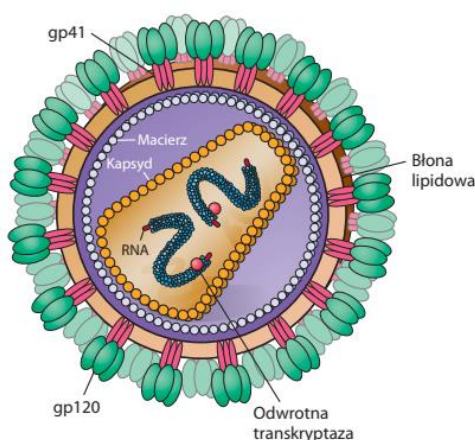
Odkrycie lentiwirusów u naczelnych innych niż ludzie dostarczyło ważnych informacji o znaczeniu biologicznym i związkach ewolucyjnych tych patogenów. W 1985 wyizolowano z azjatyckich makaków wirusa wywołującego chorobę o objawach podobnych do AIDS.⁶ W związku z dużym morfologicznym podobieństwem z HTLV-III,

wirus ten został nazwany STLV-III (ang. *simian T-lymphotropic virus type III*). Zauważono również, że STLV-III skutkuje śmiercią eksperymentalnie zakażonych małp z powodu skrajnego niedoboru odporności, co silnie podparło tezę o lentiwirusach jako o czynnikach wywołujących AIDS u ludzi.

Ustalenie przyczyn występowania AIDS wywołało wieloletni spór, który podzielił środowisko naukowe. Istniała spora grupa uczonych, która negowała koncepcję jakoby HIV prowadził do śmiertelnego niedoboru odporności. Źródeł AIDS doszukiwano się w stylu życia osób chorych oraz w dostępnych ówczesnie terapiach antyretrowirusowych, bazujących głównie na AZT.⁷ Te ostatnie hipotezy nie zyskały jednak szerokiej akceptacji środowiska naukowego.

Ludzki wirus niedoboru odporności został zakwalifikowany do rodzaju *Lentivirus* (lentiwirusy) z rodziny *Retroviridae* (retrowirusy).⁵ Na podstawie charakterystyki genetycznej oraz różnic w wirusowych antygenach wyróżniamy dwa szczepy: HIV-1 i HIV-2. HIV-1, bardziej powszechny i patogenny niż HIV-2, jest odpowiedzialny za większość infekcji HIV na świecie.⁸

Wirion HIV ma sferyczny kształt, o średnicy ok. 110 nm. Składa się z białkowo-lipidowej osłonki pokrytej glikoproteinowymi wypustkami białka otoczkowego (env), która okala stożkowy nukleokapsyd (**Rys. 1**).^{5,9} W rdzeniu kapsydu znajduje się materiał genetyczny wirusa, składający się z dwóch zazwyczaj identycznych jednoniciowych cząsteczek RNA. W skład rdzenia wirionu wchodzi również enzymy, które odgrywają kluczową rolę w procesie replikacji: odwrotna transkryptaza (RT), proteaza (PR) oraz integraza (IN).¹⁰



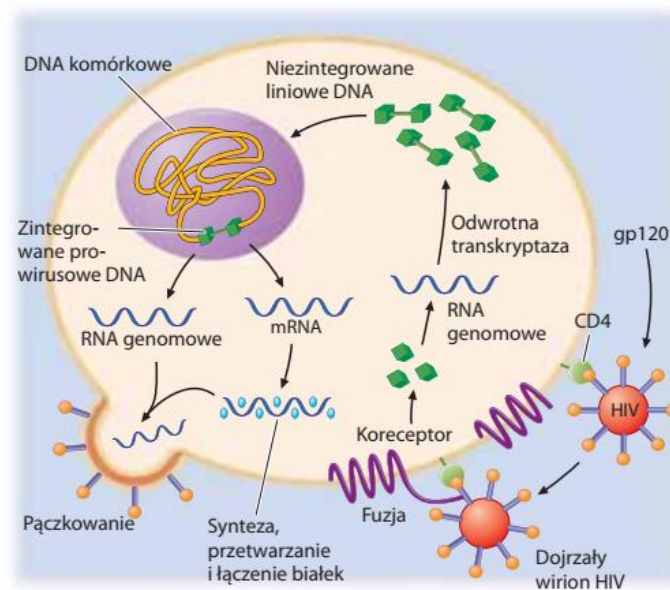
Rys. 1. Budowa wirionu HIV-1.

Rysunek zaadoptowano z Harrison. Neurologia w medycynie klinicznej.¹¹

2. CYKL REPLIKACYJNY WIRUSA HIV

Kiedy w połowie lat 80. XX wieku zdano sobie sprawę z grożącej epidemii AIDS, naukowcy przystąpili do studiowania procesów rządzących cyklem rozwojowym wirusa HIV, co pozwoliło zrozumieć mechanizm jego działania. Badania te zaowocowały nie tylko opracowaniem skutecznych terapii anty-HIV, ale również znacząco wpłynęły na poszerzenie naszej wiedzy dotyczącej innych infekcji wywołanych działaniem wirusów, głównie HBV i HCV.⁸

Cykl replikacyjny wirusa podzielony jest na fazę wczesną i późną.⁹ Na każdą z nich składa się kilka następujących po sobie etapów, których prawidłowe funkcjonowanie warunkują specyficzne oddziaływania pomiędzy białkami wirusowymi, kwasami nukleinowymi i czynnikami występującymi w komórce gospodarza (**Rys. 2**).



Rys. 2. Cykl replikacyjny HIV.

Rysunek zaadaptowano z Harrison. Neurologia w medycynie klinicznej.¹¹

Fazę wczesną rozpoczyna wniknięcie rdzenia wirionu do cytoplazmy komórki gospodarza, gdzie z pojedynczej nici RNA wirusa syntezowany jest dwuniciowy DNA. Następnie zostaje on przetransportowany do jądra, w którym integruje się z genomem gospodarza. W przebiegu tych etapów pośredniczą białka wirionu i zachodzą one bez ekspresji genów wirusowych. Faza późna rozpoczyna się transkrypcją i obróbką wirusowego RNA z zintegrowanej wirusowej matrycy, a kończy uwolnieniem nowo zsintetyzowanych (potomnych) wirionów, zdolnych do infekowania kolejnych zdrowych

komórek gospodarza. Co ważne, proces replikacji HIV zachodzi bez zakłócania cyklu życiowego komórki, w efekcie czego podczas podziału, produkuje ona i przekazuje materiał genetyczny patogenu.⁹

2.1. Przyłączanie i wnikanie wirusa do komórki

Początkowy etap infekcji opiera się na interakcjach białko-białko. Glikoproteina gp120 dojrzałej cząsteczki HIV rozpoznaje i specyficznie wiąże się do receptora CD4 komórki gospodarza.⁵ Na atak wirusa podatne są zatem wszystkie komórki zawierające tego typu białka receptorowe odpowiedzialne za odpowiedź immunologiczną organizmu, przede wszystkim limfocyty T pomocnicze, makrofagi oraz komórki dendrytyczne.¹² Wspomniane białko powierzchniowe powoduje nie tylko przyłączenie wirusa, ale również wywołuje konformacyjną zmianę, która umożliwia fuzję wirusowej otoczki z błoną komórkową gospodarza podczas procesu wnikania wirionu. Zmiana ta zachodzi na skutek przyłączenia wirusa do koreceptora (np. do receptorów chemokin: CCR5 oraz CXCR4) znajdującego się na powierzchni komórki.¹³ Proces fuzji prowadzi do wprowadzenia (przeniesienia) wirusowego kapsydu do cytoplazmy komórki gospodarza i w wyniku zmian w wartości pH zachodzi uwolnienie jego zawartości do cytozolu, co umożliwia inicjację procesu replikacji materiału genetycznego wirusa.¹²

2.2. Synteza wirusowego DNA

Po wniknięciu kapsydu do cytoplazmy i uwolnieniu genomu, następuje proces odwrotnej transkrypcji jednoniciowego RNA na dwuniciowy DNA, przy użyciu wprowadzonych w kapsydie wirusowych enzymów. Najistotniejszym dla całego procesu białkiem jest odwrotna transkryptaza (RT, ang. *reverse transcriptase*), która rozpoczyna syntezę DNA od starterowego tRNA^{Lys3}, który jest wiązany do wirusowego RNA, tworząc z nim specyficzny kompleks. Synteza pierwszej nici DNA, tzw. (-)DNA, postępuje w kierunku 5' końca cząsteczki wirusowego RNA, co prowadzi do utworzenia heterodupleksu RNA(matrycowy)-DNA(potomny). Gdy RT osiągnie 5' koniec wirusowego RNA, powstaje pierwszy produkt pośredni syntezy DNA, nazwany (-)ssDNA (ang. *strand strong-stop DNA*). Następnie RNaza H katalizuje proces degradacji RNA w kompleksie RNA-DNA.¹⁴ Powstająca nić (-)ssDNA jest komplementarna do rejonu R na końcu 5' wirusowego genomu. W wyniku pierwszego przeskoku rekombinacyjnego

następuje transfer (-)ssDNA, który hybrydyzuje z komplementarnymi sekwencjami regionu R na 3' końcu RNA wirusowego i umożliwia tym samym dalszą syntezę (-)DNA. Przeskok ten może odbywać się na drodze między- lub wewnątrzcząsteczkowej, ze względu na obecność w wirionie dwóch cząsteczek RNA.⁵

Aby otrzymać kompletną cząsteczkę DNA konieczne jest skopiowanie przez odwrotną transkryptazę zsyntetyzowanej nici (-)DNA. Etap ten, podobnie jak poprzedni, wymaga odpowiednich starterów do zainicjowania tego procesu. W syntezie nici (+)DNA lentiwirusy wykorzystują do tego celu dwa rejony bogate w puryny: PPT (ang. *polypurine track*) oraz cPPT (ang. *central polypurine track*), które są odporne na działanie RNazy H.¹⁵ Elongacja (+)DNA odbywa się w kierunku końca (-)DNA i prowadzi do (+)ssDNA. Następnie wymagany jest drugi przeskok rekombinacyjny, by kontynuować syntezę nici (+)DNA. Podczas tego procesu następuje wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie (+)DNA na 3' koniec (-)ssDNA, które możliwe jest dzięki komplementarności zasad i utworzony zostaje homodimer DNA-DNA. Po drugim przeskoku rekombinacyjnym, odwrotna transkryptaza kontynuuje elongację (+)DNA aż do miejsca terminacji, która następuje w obrębie CTS (ang. *central termination signal*). Co ważne, około 100 nukleotydów nici (+)DNA, pomiędzy cPPT a CTS, musi ulec przesunięciu, aby ostatecznie powstał pełnowymiarowy, dwuniciowy DNA, posiadający jednakowe końce LTR zawierające sekwencje sygnałowe niezbędne w kolejnych etapach replikacji wirusa.^{5,9}

2.3. Integracja wirusowego DNA

Otrzymany w wyniku odwrotnej transkrypcji wirusowy DNA tworzy wraz z integrazą (IN) oraz białkami matriksowymi (MA) kompleks preintegracyjny.¹⁶ Zostaje on przetransportowany przez nukleopory do jądra komórki, gdzie następnie odbywa się proces integracji wirusowego DNA z genomem gospodarza.¹² Już na etapie formowania kompleksu preintegracyjnego integraza odcina dwa terminalne nukleotydy na końcach 3' wirusowego DNA, co finalnie umożliwia łączenie się z końcami 5' DNA gospodarza. Procesy te zachodzą dzięki mechanizmom cięcia oraz przeniesienia nici (ST, ang. *strand transfer*). W obu przypadkach reakcja polega na bezpośrednim ataku grupy hydroksylowej na centrum fosforowe, co prowadzi do wymiany w obrębie wiązania internukleotydowego. Zazwyczaj podczas cięcia donorem -OH jest woda, chociaż inne cząsteczki z wolnymi grupami -OH (np. glicerol lub 3'-OH koniec tej samej cząsteczki

DNA) mogą uczestniczyć w tej reakcji. Natomiast w procesie przeniesienia nici, donorem funkcji -OH jest 3' koniec DNA wirusa, który w reakcji transestryfikacji włączony zostaje do genomu gospodarza.⁹

Po etapie integracji, w komórce uruchamiane są systemy naprawcze, które polegają na wypełnianiu powstałych przerw oraz przycięciu wystających odcinków 5' wirusowego DNA. Następnie oba końce są łączone, co finalizuje proces infekowania pojedynczej komórki – formowany jest prowirus, którego materiał genetyczny jest powielany wraz z DNA komórkowym.¹²

2.4. Regulacja ekspresji wirusowych genów

Fazę późną cyklu replikacyjnego HIV rozpoczyna transkrypcja prowirusowego DNA, podczas której zintegrowany genom wirusa i gospodarza służy jako matryca. Proces ten zachodzi w jądrze komórkowym i jest katalizowany przez komórkową polimerazę II.⁵ Sekwencja promotorowa zlokalizowana jest na końcu 5' LTR wirusowego DNA, który podzielony jest na kilka domen (U3, R, U5). Każda z nich odgrywa znaczącą rolę podczas transkrypcji. Transkrypty RNA są poliadenylowane i mogą ulegać splicingowi, po czym transportowane są do cytoplazmy.¹⁷ W pierwszym etapie ekspresji genów, syntezowane są wirusowe mRNA ulegające wielokrotnemu splicingowi, które kodują tzw. wczesne białka regulatorowe (Tat, Rev i Naf) oraz wirusowe mRNA nieulegające lub ulegające pojedynczemu splicingowi, które kodują białka włączane do wirionu – poliproteiny strukturalne (Gag, Pol, Env, Vpr, Vpu, Vif).^{5,18}

W ostatnim etapie fazy późnej cyklu replikacyjnego, prekursorowe białka strukturalne są transportowane w pobliże błony komórkowej, gdzie zostają związane przez Gag i Pol/Gag oraz wirusowy genom RNA. Następnie aktywowana jest wirusowa proteaza (PR), która przekształca prekursorowe polipeptydy w funkcjonalne składniki nukleokapsydu.^{5,9} Działanie enzymu poprzedza pączkowanie i formowanie wirionów potomnych, które rozpoczynają infekowanie kolejnych, zdrowych komórek gospodarza.

3. ZAKAŻENIE WIRUSEM HIV ORAZ LECZENIE

3.1. Zakażenie wirusem HIV i przebieg infekcji

Wirus HIV dostaje się do organizmu poprzez kontakt z zakażonymi płynami ustrojowymi organizmu, przede wszystkim krwią, limfą oraz spermą.¹² W przeciagu

dwóch dni od zakażenia wirus może zostać wykryty w tkance limfatycznej, po 5-6 dniach – w węzłach chłonnych, a rozprzestrzenienie patogenu w całym organizmie (włączając układ nerwowy) zaobserwować można już po 10-14 dniach.^{8,12}

Zainfekowane limfocyty T w większości ulegają zniszczeniu w ciągu 2-4 dni przez cytotoksyczne składniki HIV, lizę komórek produkujących wirusa lub przez cytotoksyczne działanie samych limfocytów T jako część odpowiedzi autoimmunologicznej.^{8,19} U części zainfekowanych limfocytów T nie dochodzi jednak do natychmiastowego namnażania wirusa i stają się one jego rezerwuarem. Mechanizm ten znacząco utrudnia całkowite usunięcie HIV z organizmu. W wyniku długotrwałej infekcji HIV obserwujemy ciągły spadek liczby limfocytów T, co skutkuje stopniowym wyniszczeniem układu immunologicznego chorego i prowadzi do rozwoju AIDS.

3.2. Leczenie

Z klinicznego punktu widzenia, izolacja cząsteczek RNA HIV oraz dokładniejsze poznanie mechanizmów molekularnych rządzących cyklem rozwojowym wirusa, przyczyniły się do znacznego postępu w terapiach antyretrowirusowych. Ponad trzydzieści lat temu, kiedy AIDS był diagnozowany u pierwszych pacjentów, oznaczał nieuchronną śmierć chorego. Dziś, zakażenie wirusem HIV, przy odpowiedniej kuracji, uważane jest raczej za chroniczne schorzenie, niż śmiertelną chorobę.²⁰ Jednak pomimo skutecznych metod zapobiegania rozwojowi AIDS oraz coraz wnikliwszego spojrzenia na replikację wirusa, całkowita jego eliminacja z organizmu jest nadal niemożliwa i po zaprzestaniu przyjmowania leków, odbudowuje się on w ciągu kilku tygodni.⁸

Niemożność całkowitego zwalczenia HIV jest związana z jedną z charakterystycznych cech tego wirusa, a mianowicie jego dużą zmiennością genetyczną.²¹ Do najważniejszych czynników wpływających na ewolucyjny potencjał patogenu należą:

- a) wysoki poziom replikacji – jeśli proces ten zachodzi w sposób niezaburzony, dziennie powstaje nawet 10^8 - 10^9 kopii wirusa;
- b) mutacje punktowe – nieprecyzyjna replikacja podczas procesu odwrotnej transkrypcji powoduje, że każdy z nukleotydów wirusowego genomu może być wymieniony 10^5 - 10^8 razy podczas jednego dnia infekcji;

- c) rekombinacje genetyczne – szacuje się, że 20-80% genomowego RNA wirusa to rekombinanty homologiczne; możliwe są również rekombinacje niehomologiczne, gdy obce sekwencje (pochodzące od innych patogenów lub komórek gospodarza) są wprowadzane do wirusowego genomu.

Powyżej przedstawione czynniki przyczyniają się do mnogości wariantów rekombinantów, które przez lata mogą rozwijać się u osoby zakażonej HIV.

Co do zasady, związki chemiczne projektowane jako potencjalne leki antywirusowe charakteryzować powinna przede wszystkim dobra aktywność biologiczna oraz niska cytotoksyczność. Odpowiednie parametry opisujące te właściwości to:

- EC_{50} – stężenie efektywne (ang. *effective concentration*), stężenie związku, które wywołuje 50% maksymalnego efektu terapeutycznego w danej jednostce czasu. W kontekście działania antywirusowego jest to takie stężenie, które powoduje zahamowanie namnażania wirusa w 50%;
- CC_{50} – stężenie cytotoksyczne (ang. *cytotoxic concentration*), stężenie związku, które wywołuje efekt cytotoksyczny u 50% traktowanych komórek w stosunku do komórek kontrolnych (nietraktowanych związkiem);
- SI – indeks selektywności (ang. *selectivity index*), obliczany jako stosunek pomiędzy cytotoksycznością a aktywnością antywirusową ($SI = CC_{50}/EC_{50}$). Wysokie wartości oznaczają pożądane właściwości biologiczne, a więc niską cytotoksyczność przy wysokiej aktywności antywirusowej.

3.2.1. Dostępne terapie anti-HIV

Dobre wyniki i korzystne prognozy w leczeniu osób zakażonych HIV spowodowane są coraz lepszą profilaktyką oraz większymi możliwościami dostępu do terapii. Pomimo to dotychczas nie zdołano opracować skutecznej szczepionki lub leku powodującego całkowitą eliminację wirusa z organizmu chorego. Zadanie to stanowi jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny i chemii medycznej, dlatego stale poszukuje się nowych leków, prowadząc równocześnie badania nad ulepszaniem związków już istniejących.^{20a}

Obecnie dostępnych jest 26 leków anti-HIV zatwierdzonych przez FDA,²² które formalnie podzielić możemy na sześć klas: (i) inhibitory wnikania, (ii) inhibitory fuzji,

(iii) nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji, (iv) nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy, (v) inhibitory integrazy, (vi) inhibitory proteazy.²³ W założeniu, każdy z tych typów związków blokuje konkretny etap cyklu replikacyjnego wirusa, uniemożliwiając tym samym jego dalszy rozwój i wzrost wirerii.

Aby wzmocnić efekt terapeutyczny, a zarazem zmniejszyć liczbę rekombinowanych, lekoopornych kopii wirusa, pod koniec lat 90. XX wieku zaproponowano nowy typ terapii antywirusowej oznaczonej skrótem HAART (ang. *highly active antiretroviral therapy*). Terapia HAART polega na przyjmowaniu przez pacjenta co najmniej trzech antywirusowych leków, najczęściej jako kombinację dwóch nukleozydowych/nukleotydocowych inhibitorów odwrotnej transkrypcji oraz jednego nienukleozydowego inhibitora odwrotnej transkryptazy albo inhibitora proteazy albo integrazy.²⁴ Poprawnie stosowana terapia HAART ma wiele zalet: jest mniej toksyczna, bardziej efektywna oraz mniej uciążliwa dla pacjenta (mniejsze dawki leku). Co ważne, skutecznie obniża ona również możliwość zarażenia innych osób, poprzez znaczne obniżenie ilości wirusa we krwi i innych płynach ustrojowych. W związku z tym stosowana jest także jako środek prewencyjny w środowiskach o dużym stopniu narażenia na infekcję, jako tzw. TasP (ang. *Treatment as Prevention*).²⁵ Niestety, również terapia HAART nie powoduje całkowitej eliminacji wirusa z organizmu, stąd musi być stosowana nieprzerwanie przez całe życie chorego. Powyższe generuje duże koszty i nie zapobiega efektom ubocznym związanym z cytotoksycznością stosowanych leków. Dodatkowo, leczenie nie odbudowuje w pełni układu odpornościowego pacjenta.^{20b}

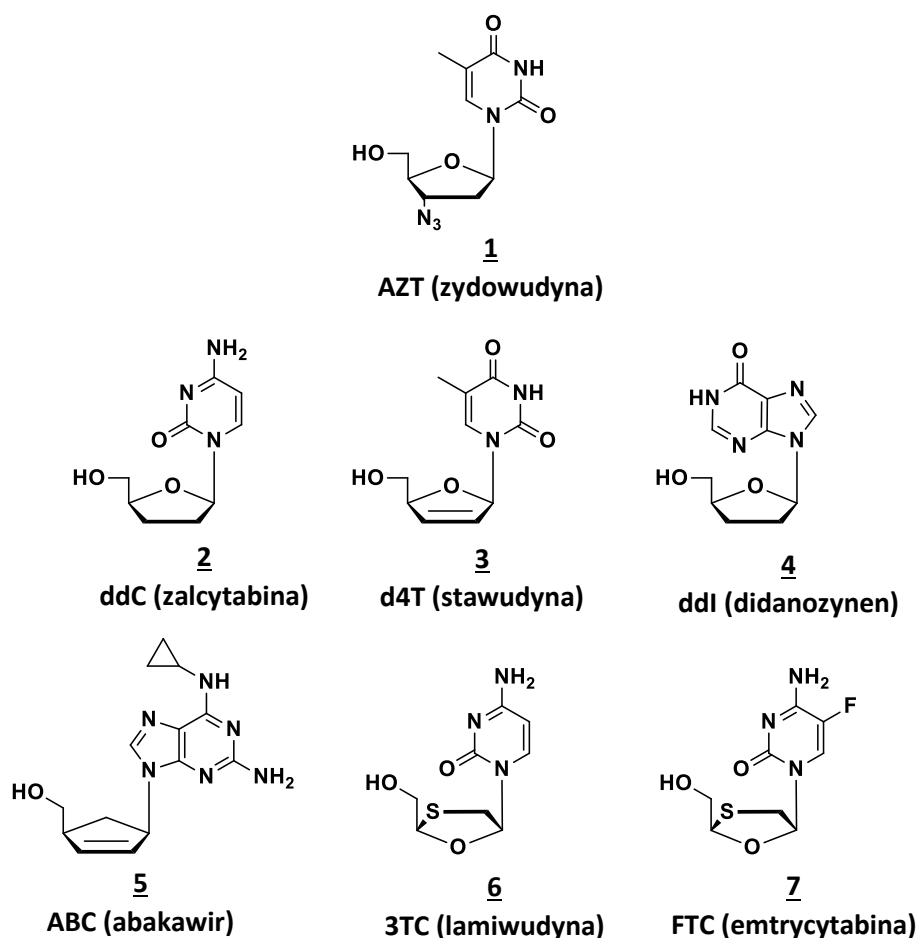
Przedmiotem badań prowadzonych w ramach mojej pracy doktorskiej były analogi odpowiednio maskowanych nukleotydoców, mogące potencjalnie działać jako inhibitory odwrotnej transkrypcji, dlatego też przegląd związków projektowanych do zwalczania HIV ograniczę do związków blokujących ten etap cyklu rozwojowego wirusa.

4. INHIBITORY ODWROTNEJ TRANSKRYPCJI WIRUSA HIV

4.1. Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji (NRTI)

Trzon tej klasy związków stanowią analogi nukleotydoców, głównie 2',3'-dideoksynukleotydy (ddN). Pierwszym zatwierdzonym do stosowania klinicznego

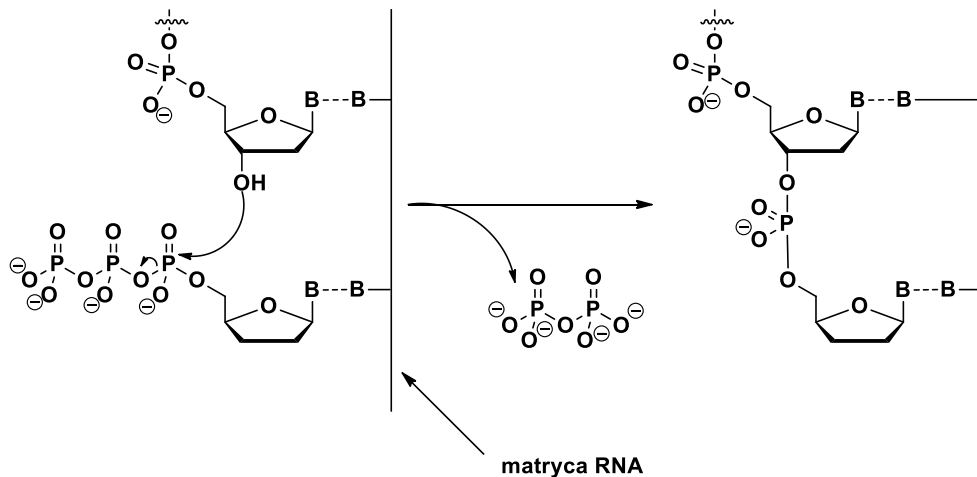
lekiem anty-HIV była 3'-azydo-3'-deoksytymidyna (AZT, Retrovir®), wprowadzona na rynek w 1987 r. Obecnie FDA (ang. *Food and Drug Administration*) dopuszcza w terapii anty-HIV siedem modyfikowanych nukleozydów (**1-7**, **Rys. 3**).²³



Rys. 3. Nukleozydowe inhibitory RT stosowane w terapii anty-HIV.

Spośród związków przedstawionych na **Rys. 3** AZT, d4T (2',3'-didehydro-3'-deoksytymidyna, Zerit®), ddC (2',3'-dideoksytydyna, Hivid®) oraz ddi (2',3'-dideoksyinozyna, Videx®) nie są już tak powszechnie stosowane w terapii antyretrowirusowej (ART), jak w ubiegłych dziesięcioleciach, chociaż odegrały bardzo ważną rolę w początkach terapii anty-HIV. Obecnie zastąpiły je analogi 2',3'-dideoksynukleozydów o mniejszej cytotoksyczności oraz niepowodujące lekooporności: 3TC [(L)-2'-deoksy-3'-tioctydydina, Epivir®], ABC (2',3'-didehydro-2',3'-dideoksy-2-amino-6-cyklopropyloaminopurynorybonukleozyd, Ziagen®), oraz FTC [(L)-2'-deoksy-5-fluoro-3'-tioctydydina, Emtriva®].⁸

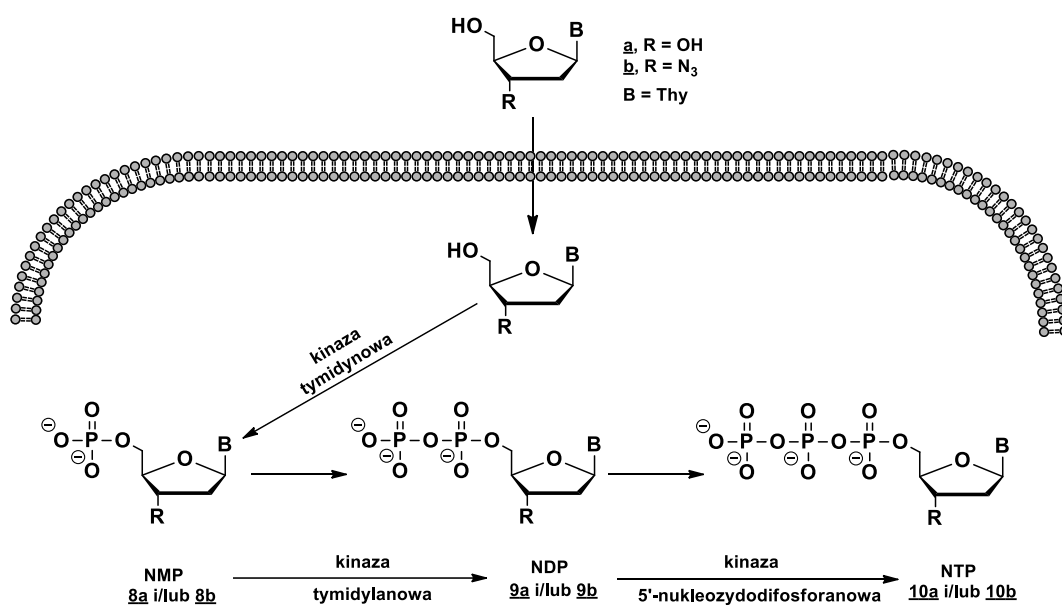
Aktywność antywirusowa NRTI opiera się głównie na inhibicji procesu odwrotnej transkrypcji poprzez włączenie odpowiedniego analogu nukleotydu w rosnący łańcuch wirusowego DNA. Brak funkcji 3'-OH w strukturze tych związków uniemożliwia dalszą syntezę łańcucha DNA, co w konsekwencji zatrzymuje proces replikacji (**Schemat 1**).²⁶ Modyfikowane nukleozydy przedstawione na **Rys. 3** są *de facto* prolekami, co oznacza, że nie są aktywne biologiczne jako takie i aby wywołać odpowiedni efekt terapeutyczny, muszą zostać ufosforylowane w komórce do odpowiednich 5'-trifosforanów.²⁷ Warto podkreślić, że możliwy jest również drugi mechanizm działania NRTI – inhibicja kompetycyjna, polegająca na oddziaływaniu 5'-trifosforanu 2',3'-dideoksynukleozydu z miejscem aktywnym odwrotnej transkryptazy (RT), co również hamuje replikację wirusa.²⁸



Schemat 1. Ogólny mechanizm inhibicji replikacji wirusa HIV na drodze terminacji elongacji łańcucha DNA.

Fosforylacja analogów 2',3'-dideoksynukleozydów, podobnie jak naturalnych nukleozydów, zachodzi trzystopniowo, z udziałem odpowiednich enzymów. Początkowo, odpowiednia kinaza nukleozydowa (np. kinaza tymidynowa w przypadku analogów tymidyny) przekształca analog nukleozydu (prolek) w 5'-monofosforan (NMP, **8a** i/lub **8b**). W kolejnych etapach, katalizowanych przez kinazę 5'-nukleozydomonofosforanową (np. kinazę tymidylianową) i kinazę 5'-nukleozydodifosforanową, powstają odpowiednio 5'-difosforan (NDP, **9a** i/lub **9b**) oraz 5'-trifosforan (NTP, **10a** i/lub **10b**) (**Schemat 2**).²⁷ Wewnątrzkomórkowy proces fosforylacji 2',3'-dideoksynukleozydów przedstawiono na przykładzie AZT na **Schemacie 2**.

Skuteczność działania analogów nukleozydów zależy od czterech czynników: (i) wydajności przenikania przez błonę komórkową, (ii) efektywności fosforylacji przez kinazy komórkowe, (iii) poziomu inhibicji kompetycyjnej, (iv) wydajności włączania odpowiedniego nukleotydu do wydłużającego się łańcucha DNA.²⁸ Większość analogów nukleozydów (np. ddC, 3TC) przenika przez błony komórkowe w wyniku transportu aktywnego, inne natomiast poprzez bardziej efektywną dyfuzję bierną (*casus* AZT i ddl).²⁸ W toku badań nad opracowaniem nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkrypcji okazało się, że szlaki metaboliczne analogów ddN nie są tak proste, jak to pierwotnie zakładano.



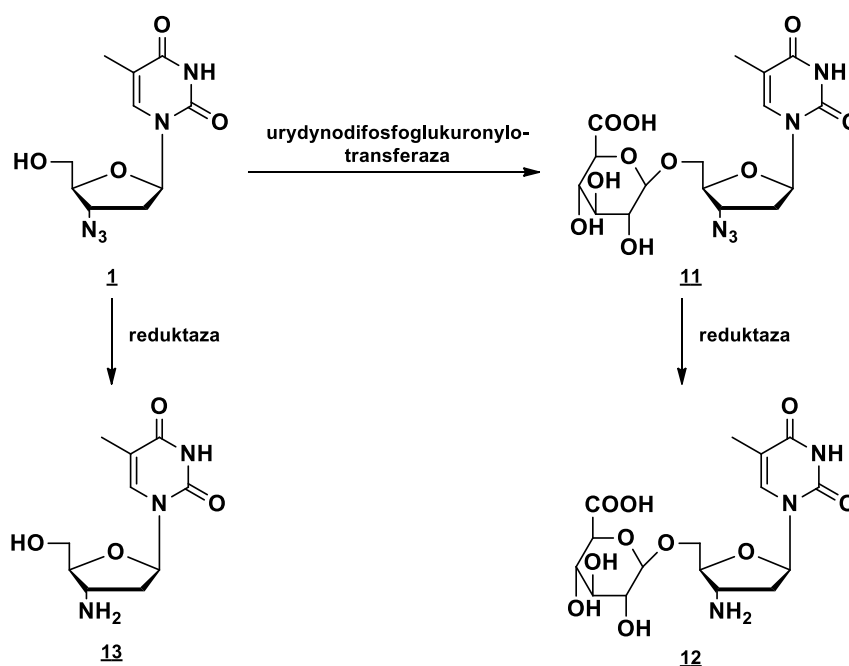
Schemat 2. Wewnątrzkomórkowy metabolizm nukleozydów.

AZT **1** (**Schemat 3**), modelowy związek anty-HIV, wykorzystuje do fosforylacji te same ścieżki syntetyczne co tymidyna (T). Konwersja AZT do AZTMP przez kinazę tymidynową przebiega podobnie efektywnie jak synteza TMP. Jednakże przekształcenie AZTMP w AZTDP przebiega znacznie wolniej, co powoduje akumulację AZTMP w komórce. Ponadto, wysokie powinowactwo tego związku do kinazy tymidylanowej hamuje fosforylację TMP do TDP, a dalej do TTP, niezbędnego do prawidłowego przebiegu syntezy DNA gospodarza. Efekt ten uważany jest za jeden z głównych czynników odpowiedzialnych za cytotoksyczność AZT.²⁹

Warto w tym miejscu podkreślić, że wysoka aktywność antywirusowa AZT ($EC_{50} = 0,002 \mu\text{M}$) koreluje dobrze z jego lipofilowością ($\log P = 0,08$ w układzie

n-oktanol/bufor fosforanowy, pH 7,4).³⁰ Jednakże pomimo korzystnych parametrów biologicznych AZT, istnieją ograniczenia w stosowaniu tego leku w terapii. Należy do nich m.in. jego szybkie wydalanie z organizmu ($t_{1/2} = 0,5$ h), stąd w celu utrzymania efektu terapeutycznego wymagane jest częste podawanie związku.³¹

Zydowudyna (AZT), po podaniu doustnym, zostaje szybko rozprowadzona w organizmie i dociera do płynu mózgowo-rdzeniowego.³⁰ Analizując produkty katabolizmu AZT w wątrobie, ustalono, że dominującym metabolitem tego leku jest 5'-*O*-glukoronian AZT **11**, częściowo wydalany z moczem, który ulega redukcji do 5'-*O*-glukoronianu 3'-amino-3'-deoksytymidyny **12**, podobnie jak w przypadku **1**, którego grupa azydkowa może być zredukowana do 3'-amino-3'-deoksytymidyny **13** (**Schemat 3**). Obydwa metabolity są silnie toksyczne i wpływają na obniżenie wartości terapeutycznej AZT.³²



Schemat 3. Szlaki katabolityczne AZT w wątrobie.

Inny analog tymidyny, d4T (**3**, stawudyna), w porównaniu z AZT charakteryzuje się metabolizmem o odmiennej kinetyce. W tym przypadku, etapem limitującym szybkość uzyskania formy aktywnej, tzn. odpowiedniego 5'-trifosforanu, jest pierwsza fosforylacja. Proces ten zachodzi wolno, a otrzymany d4TMP nie akumuluje się w komórce i natychmiast zostaje fosforylowany do d4TDP i dalej do d4TTP, co wskazuje, że 5'-monofosforan d4T nie jest inhibitorem kinazy TMP.²⁷⁻²⁹

Ścieżki metaboliczne ddi (**4**), są jeszcze bardziej złożone. W pierwszej kolejności, może on ulegać albo fosforylacji do ddIMP, albo aminacji przez deaminazę adenozykową, co prowadzi do utworzenia ddA. Powstały początkowo fosforan ddi ulegać może również enzymatycznej reakcji aminacji, następnie fosforylacji do ddADP i w końcu do ddATP. Ponieważ trifosforan ddi nie został wykryty *in vivo*, sugeruje się, że ddi wywołuje pożądany efekt biologiczny poprzez generowanie aktywnego ddATP.²⁷⁻²⁸ Zauważono jednak niekorzystną właściwość purynowych analogów 2',3'-dideoksynukleozydów, którą jest wysoka labilność w warunkach kwasowych. Ta cecha utrudnia biodostępność tych związków przy podaniu doustnym i dlatego ddi podawano zwykle wraz ze środkami zobojętniającymi, by zapobiec hydrolizie wiązania N-glikozydowego do hipoksantyny.²⁷

W przeciwieństwie do analogów tymidyny (AZT, d4T), zalcytabina (ddC **2**) metabolizowana jest w sposób odmienny. Szlak ten rozpoczyna aktywny transport przez błonę komórkową. Fosforylacja ddC do 5'-trifosforanu zachodzi stosunkowo szybko i nie następuje przy tym deaminacja do urydyny i jej odpowiednich fosforylowanych pochodnych.^{27,29b} Lek ten był stosowany zawsze w kombinacji z innymi ddN (głównie AZT) w celu wzmocnienia efektywności jego działania. Jednakże zaobserwowano negatywne skutki stosowania ddC w postaci różnych neurologicznych objawów (m.in. mrowienie oraz ból stóp i rąk), więc został on wyłączony z terapii antyretrowirusowej.³³

Abakawir (ABC **5**) należy do analogów dideoksynukleozydów stosowanych wyłącznie w strategii wielolekowej. Ograniczenie w stosowaniu tego leku w terapii anty-HIV związane jest z możliwością występowania nadwrażliwości na ten związek, związanej najprawdopodobniej z odpowiedzią immunologiczną organizmu na obcą substancję – dotyczy to 5-8% zakażonych. Do symptomów powikłań należą m.in. gorączka, wysypka oraz problemy z oddychaniem, które pogłębiają się, jeśli podawanie leku jest kontynuowane.³⁴

Lamiwudyna (3TC **6**), podobnie jak AZT czy d4T, wchodzi do komórki na drodze dyfuzji biernej, gdzie zostaje przekształcona w 5'-trifosforan przez kinazę deoksycytydynową do 3TCMP, a następnie przez inne kinazy komórkowe kolejno do 3TCDP i 3CTP. W toku badań nie zaobserwowano enzymatycznej deaminacji do urydynowych pochodnych czy hydrolizy wiązania glikozydowego. Związek ten cechuje stosunkowo niska cytotoksyczność oraz dość długi okres półtrwania, 10,5 – 15,5 h.

W monoterapii 3TC okazał się nieskutecznym ze względu na występowanie szybkiej lekooporności. Związek ten jest natomiast z powodzeniem stosowany w terapii HAART w kombinacji z AZT czy ABC.^{27,35}

Ostatnim zatwierdzonym do stosowania klinicznego przez FDA lekiem w tej klasie związków była emtrycytabina (FTC **Z**), która charakteryzuje się dobrymi parametrami terapeutycznymi oraz biodostępności, a co najważniejsze – niską cytotoksycznością. Podobnie jak w przypadku lamiwudyny (3TC) obawiano się możliwości enzymatycznej deglikozylacji, poprzedzonej przez deaminację, co w konsekwencji uwalniałoby toksyczny 5-fluorouracyl. Obawy te nie potwierdziły się, jednak podobnie jak w przypadku 3TC, w monoterapii zaobserwowano szybkie namnażanie się zmutowanych wirusów, odpornych na działanie leków. Stąd FTC znalazł zastosowanie w zwalczaniu HIV w połączeniu z innymi związkami – tak opracowano i wprowadzono na rynek w 2006 lek *Atripla*[®], który stanowi kombinację trzech związków: emtrycytabiny (FTC, nukleozydowy inhibitor RT), tenofowiru (nukleotydowy inhibitor RT) i efawirenzu (nienukleozydowy inhibitor odwrotnej transkryptazy).³⁶

Warto podkreślić, że leki bazujące na dwóch ostatnich omówionych przeze mnie NRTI stanowią obecnie trzon terapii HAART. Liotta i współpracownicy szacują, że 90% amerykańskich pacjentów zakażonych HIV przyjmuje leki, które zawierają w składzie 3TC lub FTC.³⁶

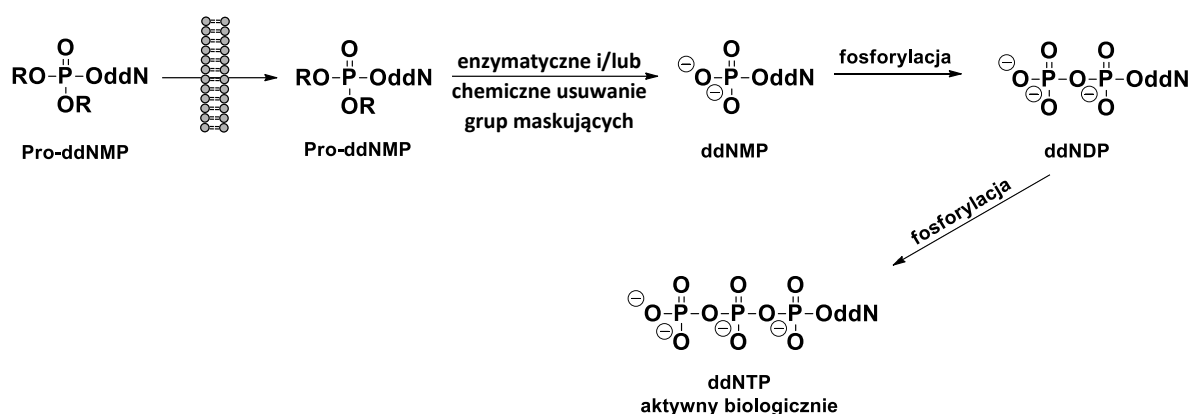
Omawiając tę klasę terapeutyków, nie można jednak nie zauważyć, że czynnikami ograniczającymi ich skuteczność są: ścisła zależność od kinaz komórkowych, powstawanie lekoopornych mutantów oraz niekorzystne efekty uboczne. Czynniki te powodują, że związki te, choć wykazują pożądaną aktywność biologiczną, nie są dostatecznie skuteczne w terapii anty-HIV.

4.2. Nukleotydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji (pronukleotydy)

Skuteczność 2',3'-dideoksynukleozydów w terapii antyretrowirusowej jest znacznie ograniczona przez ich niską biodostępność oraz złożone szlaki metaboliczne. Chcąc zwiększyć terapeutyczną użyteczność ddN, postanowiono wprowadzać je do organizmu w formie nukleotydu tak, aby ominąć pierwszy, często chimeryczny, etap fosforylacji. Niestety, w warunkach fizjologicznych fosforany nukleozydów występują w formie zjonizowanej, co znacznie obniża ich zdolność do przenikania przez obdarzoną

ładunkami błonę komórkową. Ponadto, krew oraz membrany biologiczne są bogate w fosfatazy, które szybko hydrolizują wiązania P-O-C generując nukleozyd, co niweczy koncepcję poprawy farmakokinetyki proponowanego rozwiązania.³⁷

W związku z tymi ograniczeniami zrodziła się idea pronukleotydów, a więc cząsteczek, w których ładunek ujemny reszty fosforanowej byłby zamaskowany, co miało w założeniu ułatwiać transport tych związków przez błonę komórkową. Pronukleotydy są rodzajem proleków, które *per se* nie wykazują aktywności biologicznej, ale po chemicznych i/lub enzymatycznych przemianach tworzą w komórce prekursor aktywnego biologicznie związku, odpowiedni ddNMP (**Schemat 4**).³⁸



Schemat 4. Ogólna zasada działania pronukleotydów.

Warto podkreślić, że w koncepcji tej potencjalny pronukleotyd musi spełnić kilka, często sprzecznych, kryteriów. Powinien charakteryzować się stabilnością do czasu wniknięcia do komórki, zdolnością łatwego pokonywania błon komórkowych, wysoką aktywnością biologiczną, niską toksycznością samego związku i jego metabolitów oraz, co najważniejsze, mieć należycie zrównoważony charakter lipofilowo-hydrofilowy, tzn. musi być wystarczająco lipofilowy, przy zachowaniu odpowiedniej hydrofilowości, która warunkuje dostateczną rozpuszczalność w wodzie i biodostępność związku.³⁹

Różnice w podejściach pronukleotydowych polegają na sposobach uwalniania nukleotydu (mono-, di- lub trifosforanu nukleozydu) w komórce. W dalszej części tego rozdziału opisane zostaną najlepiej przebadane pod kątem potencjału terapeutycznego pronukleotydy pochodne monofosforanów, zarówno estrowe, jak i amidowe oraz estrowe analogi difosforanów i trifosforanów.

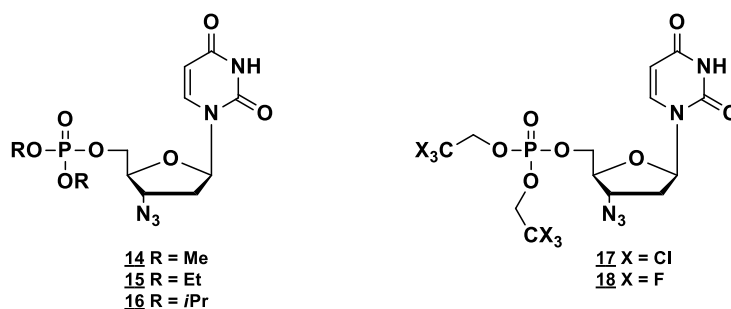
4.2.1. *Estry fosforanowe analogów nukleozydów*

Pochodne fosforanotriestrowe stanowią najlepiej zbadaną klasę pronukleotydów. Jednym z najczęściej używanych kryteriów odróżniającym poszczególne warianty strategii pronukleotydowych, jest sposób usuwania grup ochronnych w komórce. Pronukleotydy fosforanotriestrowe mogą ulegać hydrolizie do odpowiednich di- i monoestrów na drodze chemicznej i/lub enzymatycznej.

4.2.1.1. *Grupy maskujące hydrolizowane na drodze chemicznej*

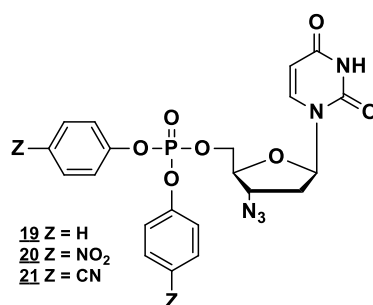
Idea fosforanotriestrowych pronukleotydów zakłada wprowadzenie do komórki fosforanotriestrów 2',3'-dideoksynukleozydów, które po stopniowej hydrolizie uwalniać mają odpowiedni fosforanomonoester. Warto nadmienić, że w naturze właściwie nie występują fosforanotriestry, stąd też brak w komórce czy w surowicy krwi enzymów, które mogłyby katalizować hydrolizę wiązania estrowego w tego typu strukturach. Po wnikięciu do komórki pronukleotydy fosforanotriestry muszą ulegać więc hydrolizie chemicznej do fosforanodiestrów, które z kolei wykazują dużą trwałość chemiczną i ich dalsze przekształcenie do monoestrów wymaga udziału fosfodiesteraz. Strategie, które bazują na uwalnianiu niemaskowanego nukleotydu tylko na drodze chemicznej są raczej rzadkie.^{38a}

Na początku lat 90. XX w. pojawiły się pierwsze publikacje dotyczące fosforanotriestrowych analogów nukleozydów zaprojektowanych jako potencjalne pronukleotydy anty-HIV. Grupa McGuigana zaproponowała początkowo proste alkilowe grupy maskujące resztę fosforanową, ale związki typu **14-16 (Rys. 4)** w testach *in vitro* nie wykazywały jednak żadnej aktywności anty-HIV. Wyniki tych eksperymentów tłumaczono wysoką stabilnością chemiczną trialkilowych pochodnych fosforanów.⁴⁰ Chcąc zwiększyć labilność grup maskujących resztę fosforanową, zsyntetyzowano również pochodne zawierające halogen (chlor lub fluor) w łańcuchu alkilowym. Analogi te (**17 i 18, Rys. 4**) wykazywały widoczną aktywność antywirusową, choć nadal stukrotnie niższą niż samo AZT ($EC_{50} = 0,4 \mu\text{M}$ dla **18**; $EC_{50} = 0,004 \mu\text{M}$ dla AZT).⁴¹



Rys. 4. Alkilowe fosforanotriestry zaproponowane przez McGuigana i wsp.⁴⁰⁻⁴¹

Szukając dalszych sposobów labilizacji wiązań estrowych, McGuigan i współpracownicy zaproponowali serię pochodnych arylowych fosforanotriestrów AZT (**19-21**, Rys. 5).⁴²

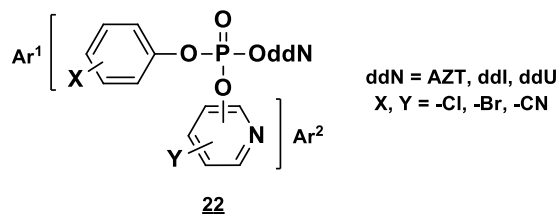


Rys. 5. Arylowe fosforanotriestry zaproponowane przez McGuigana i wsp.⁴²

W przypadku tych analogów nukleotydowych zaobserwowano korelację pomiędzy rodzajem podstawnika w pierścieniu aromatycznym a aktywnością anti-HIV. Związki zawierające silnie wyciągające grupy w pierścieniu arylowym (**20** i **21**, Rys. 5) charakteryzowały się aktywnością antywirusową zbliżoną do AZT ($\text{EC}_{50} \approx 0,0032 \mu\text{M}$ dla **20**; $\text{EC}_{50} = 0,008 \mu\text{M}$ dla AZT). Chcąc dowiedzieć ich pronukleotydowego mechanizmu działania, zbadano potencjał terapeutyczny tych związków w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej (CEM/TK⁻). Wyniki testów wykazały, że są one słabymi inhibitorami namnażania wirusa w środowisku pozbawionym kinazy tymidynowej, co wskazywało raczej na pozakomórkową chemiczno-enzymatyczną przemianę tych związków do odpowiedniego antywirusowego nukleozydu. Ponadto, analog **20** wykazywał wysoką toksyczność, co tłumaczono uwalnianiem szkodliwego *p*-nitrofenolu.⁴²

Koncepcję arylowych fosforanotriestrów rozszerzyła grupa Kraszewskiego.⁴³ Zastosowali oni dwa rodzaje ugrupowań arylowych maskujących reszty fosforanowe, mianowicie grupy pirydynylowe, których obecność wpłynęła korzystnie na rozpuszczalność takich związków w wodzie oraz ugrupowania aryłowe wnoszące

element lipofilowości. Te ostatnie zawierały różne podstawniki w pierścieniu aromatycznym (m.in. -Br, -Cl, -CN), co pozwalało modulować trwałość wiązania estrowego tych związków (typ **22**, *Rys. 6*).⁴³



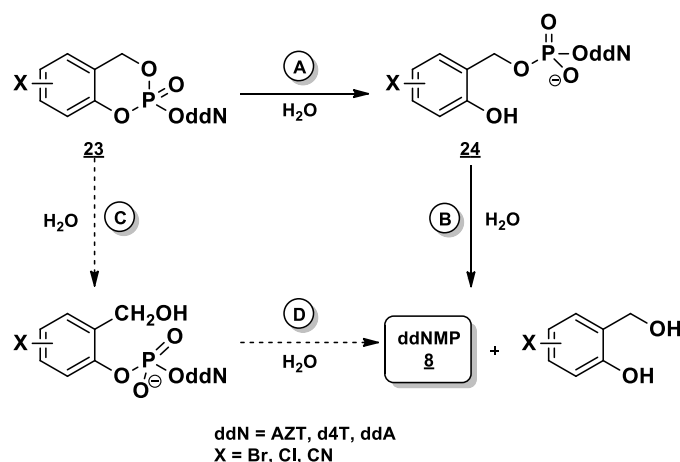
*Rys. 6. Pronukleotydy diarylowe zaproponowane przez Kraszewskiego i wsp.*⁴³

W podejściu tym zsyntetyzowano kilkanaście analogów fosforanotriestrów różniących się aranżacją grup arylowych wokół centrum fosforowego, które następnie zostały przebadane pod kątem trwałości wiązań estrowych oraz aktywności biologicznej. Badania w medium hodowlanym RPMI dowiodły, że związki typu **22** uwalniały na drodze hydrolizy chemicznej fosforanodiester, który następnie w wyniku hydrolizy enzymatycznej (RPMI/FBS, 9:1, v/v) mógł generować pożądany 5'-monofosforan nukleozydu. Najlepszymi parametrami biologicznymi charakteryzowały się pochodne AZTMP zawierające w swojej strukturze tylko fosforoestrowe grupy pirydynylowe. Stwierdzono, że najkorzystniejsze uwalnianie odpowiedniego fosforanodiestru następowało w cząsteczkach, w których wartość pK_a uwalnianego fenolu jest niższa od pK_a niepodstawionego fenolu. Ponadto, potwierdzono pronukleotydowy mechanizm działania tego typu pochodnych syntezując również odpowiednie analogi ddUMP, które wykazywały znaczną aktywność anti-HIV.⁴⁴ Nukleozyd ddU jako taki nie jest substratem dla kinazy tymidynowej i nie jest przekształcany w komórce do 5'-fosforanu ddU, i dalej do aktywnego biologicznie trifosforanu.⁴⁴ Jeśli pronukleotyd zawierający ddU wykazuje aktywność biologiczną oznacza to, że związek taki dostarcza do komórki odpowiedni nukleotyd, który przy udziale kinaz jest fosforylowany do ddUTP, inhibitora syntezy wirusowego DNA.

Całkiem nową i zupełnie niezależną od działania enzymów koncepcję podejścia pronukleotydowego opracowała grupa Meiera, proponując pochodne cyklosaligenylowe fosforanów nukleozydów (*cycloSal-NMP*, **23**, *Schemat 5*) jako potencjalne pronukleotydy.⁴⁵ W przeciwieństwie do większości fosforanotriestrowych koncepcji pronukleotydowych, podejście *cycloSal* zostało zaprojektowane tak, by

uwalniać nukleotydy w komórce, poprzez kontrolowaną stopniową hydrolizę chemiczną (**Schemat 5**).⁴⁶ Nukleofilowy atak wody na centrum fosforowe w **23** (etap **A**) prowadzi do rozerwania pierścienia 6-członowego i powstawania odpowiedniego estru benzyloвого **24**. Ten z kolei, ulega szybkiej hydrolizie do nukleotydu **g** (etap **B**), ułatwianej obecnością grupy hydroksylowej w pozycji *orto* pierścienia aromatycznego. Droga **C** wydaje się być mniej prawdopodobna biorąc pod uwagę wartości pK_a grupy opuszczającej (alkohol benzyłowy vs fenol).

Warto podkreślić, że w proponowanym podejściu *cycloSal* nie tworzą się cytotoksyczne metabolity ($CC_{50} > 250 \mu M$), a w przeciwieństwie do prawie wszystkich innych koncepcji, z cząsteczki pronukleotydu uwalniana jest tylko jedna grupa maskująca. Ponadto, *cycloSal*-NMP charakteryzują się lepszą lipofilowością w porównaniu do odpowiednich nukleozydów, co wpływa korzystnie na dyfuzję przez błony komórkowe oraz barierę krew-mózg (BBB, ang. *blood-brain barrier*), a jednocześnie wykazują dostateczną rozpuszczalność w wodzie.⁴⁶



Schemat 5. Uwalnianie monofosforanu ddN z pronukleotydu *cycloSal*.

Dodatkowym atutem pronukleotydów typu *cycloSal* jest możliwość wprowadzenia podstawników do pierścienia aromatycznego, co pozwala sterować podatnością całego układu na hydrolizę chemiczną (podstawniki elektroakceptorowe vs. elektronodonorowe). Umożliwiło to otrzymanie serii fosforanowych analogów nukleozydów o korzystnych parametrach terapeutycznych, m.in. pochodne AZT, d4T, ddA.

Efektywność podejścia *cycloSal* została przebadana *in vitro* dla pochodnych d4T, dla których widać było wyraźnie korelację pomiędzy strukturą a aktywnością

biologiczną. Im większa zdolność donowania elektronów do pierścienia aromatycznego przez podstawnik, tym obserwowana była wyższa aktywność anti-HIV. Pochodne 3- i 5-metylo-, podobnie jak 3,5-dimetylo-*cycloSal*-d4TMP wykazywały większą aktywność antywirusową ($EC_{50} = 0,09 \mu\text{M}$) niż d4T ($EC_{50} = 0,18 \mu\text{M}$). Dodatkowo, badania na liniach komórkowych z deficytem kinazy tymidynowej (CEM/TK⁻) dowiodły, że związki te uwalniają w komórce d4TMP, co potwierdza ich pronukleotydowy mechanizm działania. Stosując podobne grupy maskujące, otrzymano również serię pochodnych *cycloSal*-AZT. Jednakże niespodziewanie, analogi te okazały się nieaktywne lub słabo aktywne w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej.⁴⁷ Dalsze badania doprowadziły do wniosku, że obserwowane różnice w aktywności wspomnianych związków mogą być spowodowane większą podatnością AZTMP na defosforylację w porównaniu do d4TMP.⁴⁸

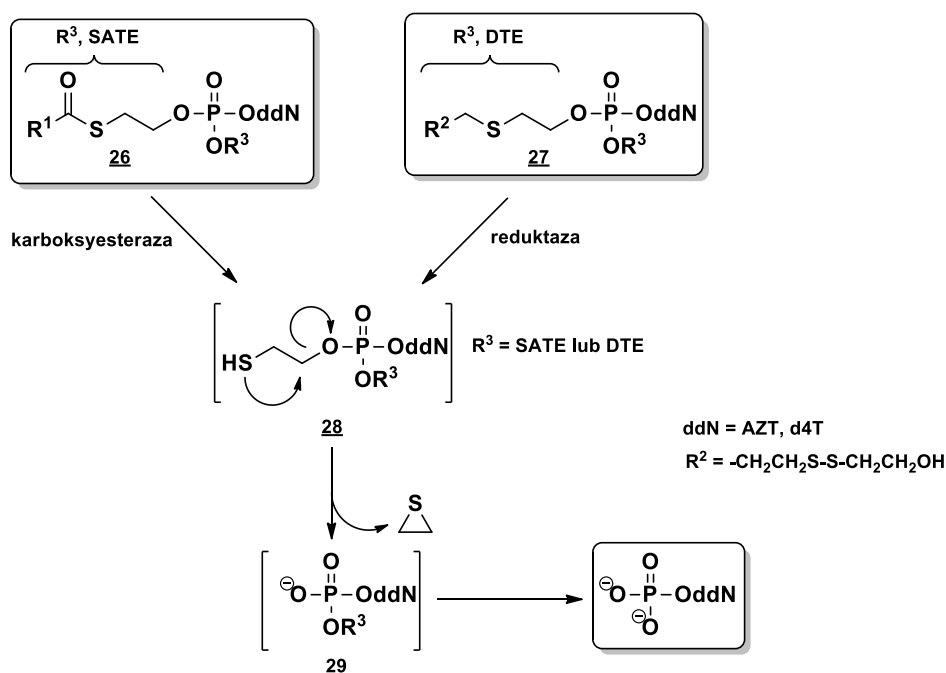
4.2.1.2. Grupy maskujące hydrolizowane z udziałem enzymów

Usuwanie grup maskujących funkcję fosforanową na drodze hydrolizy chemicznej zachodzi zwykle poprzez nukleofilowy atak cząsteczki wody na atom fosforu i zależy od reaktywności centrum fosforowego (m.in. zawady przestrzennej, rodzaju grupy opuszczającej). Ograniczeniem alkilowych fosforanotriestrów jako potencjalnych pronukleotydów jest ich wysoka trwałość, natomiast przy zastosowaniu arylowych grup maskujących (pochodnych fenoli o niskich wartościach pK_a) istnieje możliwość spontanicznej hydrolizy pronukleotydu przed wniknięciem do komórki. Prowadzi to do powstania ładunku na reszcie fosforanowej, co niekorzystnie wpływa na zdolność penetracji błony komórkowej przez związek. Aby przezwyciężyć te przeszkody, rozszerzono strategię pronukleotydową o grupy maskujące reszty fosforanowe podatne na działanie enzymów. Stosowane w tych podejściach ugrupowania w wyniku reakcji inicjowanych enzymami, uwalniają bezpośrednio odblokowany nukleotyd lub generują reaktywne związki pośrednie, które spontanicznie ulegają degradacji do odpowiedniego fosforanu.^{38a,39b}

Na początku lat 90. XX w. francuscy badacze z grupy Jean-Louis Imbacha zaproponowali nowe potencjalne pronukleotydy zawierające w swej strukturze ugrupowania tioestrowe: bis(*S*-acylo-2-tioetylo) [bis(SATE)] oraz bis(ditiodietanolo) [bis(DTE)], maskujące resztę fosforanową. Jednocześnie pokazali, że związki te

[bis(SATE) i bis(DTE), odpowiednio **26** i **27**, *Schemat 6*] mogą uwalniać w komórce, w wyniku serii przemian enzymatycznych i chemicznych, odpowiedni ddNMP.⁴⁹

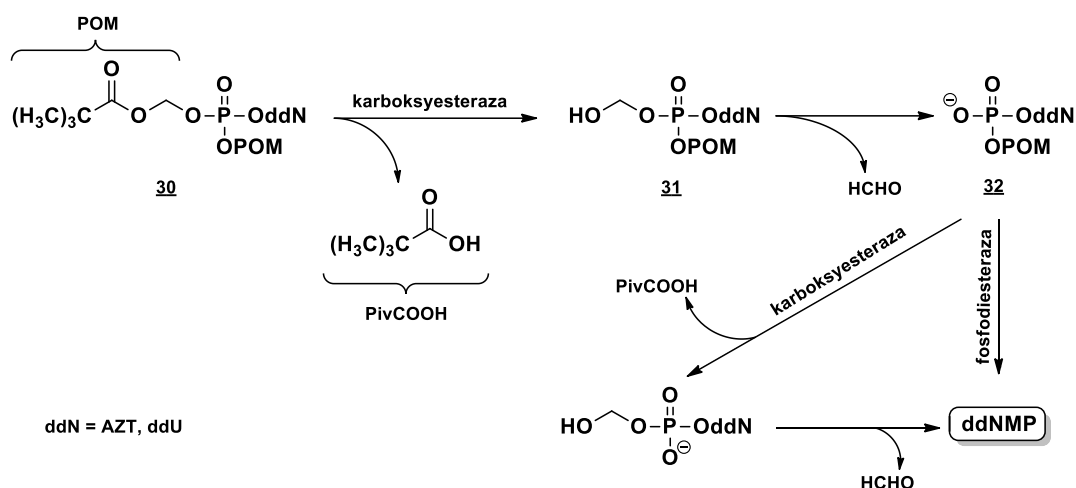
Wykazano, że rozpad fosforanotriestrów **26** i **27** inicjowany jest działaniem enzymów (w przypadku SATE – karboksyesterazy, DTE – reduktazy), w wyniku czego powstaje niestabilny 2-merkaptoetylofosforanotriester **28**. Następnie związek ten, w wyniku wewnątrzcząsteczkowego mechanizmu zakładającego nukleofilowy atak grupy tiolowej (miękkiego nukleofila) na tetraedryczny atom węgla α (miękkie centrum elektrofilowe) uwalnia fosforandiester **29**. Generowanie finalnego produktu (ddNMP) odbywać się może w wyniku kolejnego cyklu przemian enzymatyczno-chemicznych opisanych powyżej lub jako skutek działania obecnych w komórce fosfodiesteraz.⁵⁰ Jednakże, usuwanie drugiej grupy SATE lub DTE z fosforandiestru typu **29** zachodzi znacznie wolniej z powodu zwiększonej gęstości elektronowej na centrum fosforowym i może być uważane za etap limitujący szybkość całego procesu.⁵¹ Alternatywnie, fosforanotriestry **26** i **27** mogą rozpadać się do niestabilnego **28** w wyniku powolnej hydrolizy chemicznej jednej grupy SATE lub reszty acylowej. Prowadzi to do generowania tego samego produktu co na ścieżce enzymatycznej, jednak zachodzącego poza komórką. W związku z dużą stabilnością fosforanotriestrów alifatycznych szacuje się, że rozpad na tej drodze występuje w niedużym stopniu.^{49c}



*Schemat 6. Mechanizm aktywacji pronukleotydów SATE **26** i DTE **27**.*

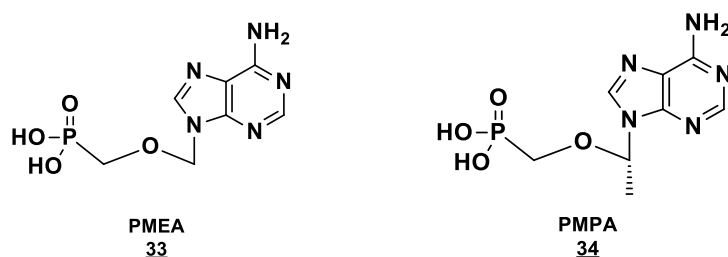
Otrzymano i zbadano właściwości biologiczne bis(SATE) i bis(DTE) fosforanotriestrów pochodnych AZT, ddA oraz d4T. Wszystkie one charakteryzowały się wysokimi aktywnościami antywirusowymi w różnych mediach komórkowych (CEM-SS, MT-4, PBMC, CEM/TK⁻).^{49a,49b} Związki zawierające d4T jako nukleozyd antywirusowy wykazywały nawet wyższą aktywność anty-HIV ($EC_{50} = 0,007 \mu\text{M}$) niż sam d4T ($EC_{50} = 0,05 \mu\text{M}$) [dane dla linii komórkowych PBMC oraz CEM-SS]. Wyjątkowo korzystną aktywność anty-HIV posiadała pochodna bis(metyl)SATE-ddAMP ($EC_{50} = 0,00056 \mu\text{M}$ w CEM-SS; ddA $EC_{50} = 0,54 \mu\text{M}$), która mimo znacznej cytotoksyczności ($CC_{50} = 24 \mu\text{M}$), posiadała wysoki indeks selektywności ($SI = 42\ 860$).^{49b} Warto podkreślić, że zarówno dla analogów AZT, jak i d4T, potwierdzony został pronukleotydowy mechanizm działania tego typu pochodnych w badaniach aktywności biologicznej w komórkach pozbawionych aktywności kinazy tymidynowej (CEM/TK⁻).^{49a,49b} Niemniej, ograniczone wykorzystanie grup SATE i DTE w terapii anty-HIV związane jest z toksycznością metabolitów – episiarczku i kwasów karboksylowych.^{49a}

Początek lat 90. ubiegłego wieku obfitował w kolejne propozycje pronukleotydów. Farquhar wraz z współpracownikami opracował piwaloiloksymetylowe (POM) grupy maskujące składające się z reszty hydroksymetoksylowej zestryfikowanej kwasem piwalowym (**Schemat 7**).⁵² Rozpad pochodnych bis(POM) inicjowany jest na drodze enzymatycznej przez karboksyesterazy, które hydrolizują wiązanie estrowe i powodują usunięcie z cząsteczki **30** kwasu piwalowego. Generuje to wysoce niestabilny hydroksymetylowy fosforanotriester **31**, który w wyniku spontanicznej reakcji następczej eliminuje formaldehyd, co prowadzi do analogu mono(POM) **32**. Związek ten w wyniku powtórnego cyklu przemian wywołanych przez karboksyesterazy lub alternatywnie przez obecne w komórce fosfodiesterazy, uwalnia ddNMP.⁴⁶ Badania kinetyki rozpadu pochodnej mono(POM) przeprowadzone przez grupę Farquhara wskazywały na duży udział fosfodiesteraz w procesie hydrolizy drugiej grupy maskującej – karboksyesterazy pełnią na tym etapie rolę marginalną.^{52a}



Schemat 7. Mechanizm hydrolizy fosforanotriestrów typu bis(POM).

Podjęcie z wykorzystaniem grup bis(POM) zostało zastosowane do syntezy odpowiednich pronukleotydów AZT, ddU oraz C-fosfonianów acyklicznych analogów nukleozydów (ANP) takich jak PMEa **33** oraz PMPA **34** (Rys. 7).



Rys. 7. C-Fosfoniany acyklicznych analogów nukleozydów wykorzystywane w terapii anty-HIV.

Badania na liniach komórkowych CEM/TK⁻ wykazały pronukleotydowy mechanizm działania związków typu **30**, jednakże należy podkreślić, że uwalnianiu ddNMP w komórce towarzyszy powstawanie dwóch toksycznych metabolitów – kwasu pivalowego oraz aldehydu mrówkowego, które odpowiedzialne są za wysoką cytotoksyczność tych pochodnych (CC₅₀ = 30-70 μM).⁵³ Ponadto, wykazano, że bis(POM) fosforanotriestry są niestabilne chemicznie i wysoce podatne na hydrolizę, co również przyczyniło się do ograniczonego wykorzystania ich w leczeniu.⁴⁶

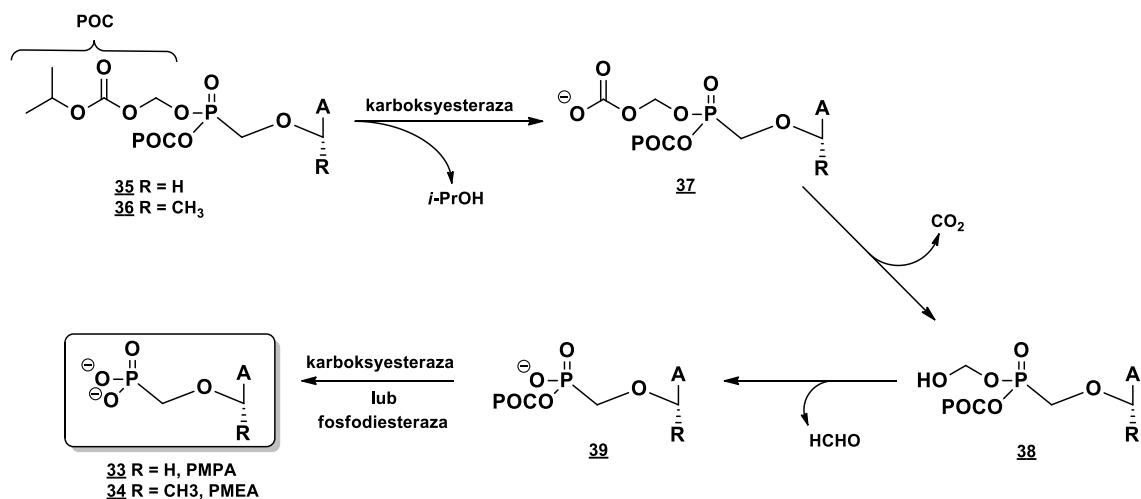
Warto w tym miejscu nadmienić, że pochodna bis(POM)-PMEa przeszła do fazy testów klinicznych jako potencjalny lek anty-HIV. Badania te zostały przerwane ze względu na generowaną dużą toksyczność podawanej substancji.⁵⁴ Jednakże, ten sam związek został w 2002 roku zatwierdzony przez FDA do terapii HBV pod nazwą handlową *Hespera*[®] (*adefovir dipivoxil*), gdyż przy zakażeniach tym wirusem stosowane są znacznie

mniejsze dawki leku, co nie powoduje tak dużej toksyczności jak w przypadku terapii anty-HIV.⁵⁰

Chcąc przezwyciężyć ograniczenia stosowania pronukleotydów typu bis(POM) Friedland i współpracownicy zaproponowali grupy *izopropyloksykarbonyloksymetylowe* (POC) jako grupy maskujące ładunek acyklicznych fosfonianów, pochodnych PMPA **35** oraz PMEAs **36** (*Schemat 8*).⁵⁵

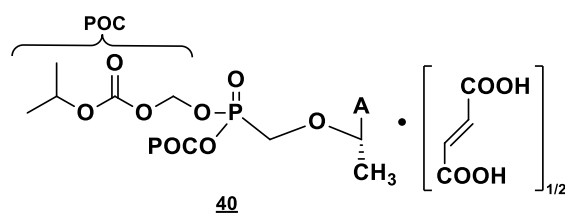
Mechanizm uwalniania odpowiedniego antywirusowego nukleotydu zakłada, podobnie jak dla pochodnych POM, reakcję inicjowaną karboksyesterazą, co prowadzi do uwolnienia *izopropanolu* i powstania nietrwałego układu monoestru kwasu węglowego **37**. Związek ten ulega spontanicznej dekarboksylacji z utworzeniem hydroksymetylowego diestru **38**, który podobnie jak pochodne POM, rozpada się do fosfonianomonoestru **39** z wydzieleniem formaldehydu. Podobnie jak w przypadku innych pronukleotydów, których rozpad inicjowany jest na drodze enzymatycznej, utworzony związek **39** może ulegać ponownemu cyklowi przemian opisanych powyżej lub działaniu fosfodiesteraz, generując w komórce finalny, całkowicie odblokowany fosforan nukleozydu.

W przeciwieństwie do strategii bis(POM), modyfikacja bis(POC) nie powoduje tworzenia toksycznego dla organizmu kwasu piwalowego, co wpłynęło korzystnie na parametry terapeutyczne proponowanych pronukleotydów.⁵⁵⁻⁵⁶ Bis(POC)-PMPA **36** jest stabilny nawet w niskim pH, a przez zwiększenie lipofilowości dzięki zastosowaniu odpowiednich grup maskujących, charakteryzuje się 35 razy większą aktywnością w ludzkich limfocytach krwi obwodowej niż PMPA. Ponadto, badania metabolizmu z zastosowaniem znakowanego izotopowo [³H]-bis(POC)-PMPA wykazały, że po podaniu jest on szybko transportowany do komórek, gdzie po hydrolizie grup maskujących, uwolniony PMPA podlega dalszemu procesowi fosforylacji.⁴⁶



Schemat 8. Mechanizm hydrolizy pronukleotydów typu bis(POC).

W związku z korzystnym profilem farmakokinetycznym (odpowiednia lipofilowość, trwałość, metabolizm, aktywność biologiczna oraz cytotoksyczność), po serii badań klinicznych, FDA dopuściło w 2001 roku do stosowania w terapii anty-HIV pierwszy lek typu pronukleotydowego – analog bis(POC)-PMEA w formie fumaranu dizoproksylu tenofowiru (TDF, nazwa handlowa: *Viread*[®], **40 Rys. 8**).²³ Bis(POC)-PMEA przeprowadzony w sól kwasu fumarowego charakteryzuje się lepszą biodostępnością – po podaniu doustnym i działaniu enzymów jelitowych uwalniany jest związek **36**, który następnie ulega hydrolizie enzymatycznej zgodnie z reakcjami przedstawionym na **Schemacie 8**.

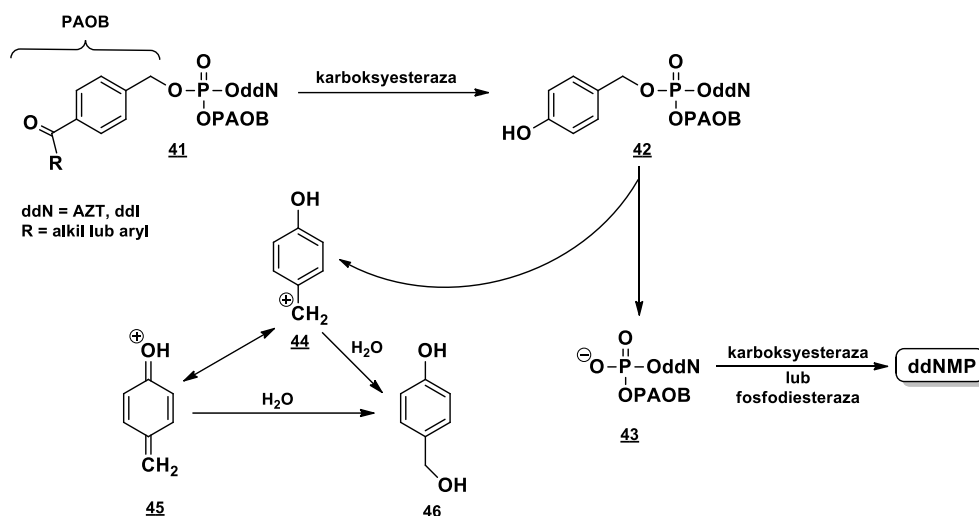


Rys. 8. *Viread*[®] - pierwszy pronukleotydowy lek anty-HIV zatwierdzony przez FDA.

Rozwinięciem pronukleotydów acyloksymetylowych jest podejście wykorzystujące reszty *p*-acyloksybenzylowe jako grupy maskujące w fosforanotriestrach, tzw. bis(PAOB) (**41**, **Schemat 9**), zaproponowane niezależnie w dwóch laboratoriach.⁵⁷

Mechanizm rozpadu związków typu **41** zakłada najpierw katalizowaną przez karboksylesterazę reakcję hydrolizy wiązania estrowego w pozycji *para* pierścienia aromatycznego, z utworzeniem fosforanotriestru 4'-hydroksybenzylowego **42**, którego

spontaniczna fragmentacja generuje najpierw fosforanodiester **43**, a w końcu ddNMP (*Schemat 9*).^{46,53}



Schemat 9. Mechanizm hydrolizy fosforanotriestrów typu bis(PAOB).

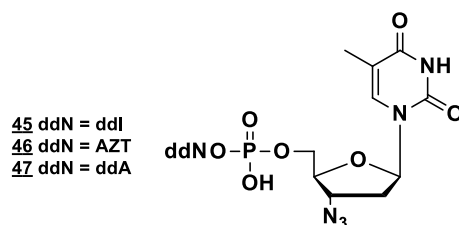
Wadą takich pronukleotydów jest generowanie podczas usuwania grup ochronnych, jonów karbeniowych typu **44**, które mogą reagować z DNA, białkami lub innymi nukleofilami obecnymi w komórce, powodując toksyczność tych związków.⁵³

Stosując grupy PAOB otrzymano pochodne bis(PAOB)-AZT oraz fosforotriestrowe homodimery AZT, jak również heterodimery AZT i ddi, zaprojektowane głównie w celu obniżenia toksyczności (generowany jest tylko jeden ekwiwalent jonu **44**) oraz podwyższenia aktywności antywirusowej. Estrowe analogi bis(PAOB) fosforanów dideoksynukleozydów charakteryzowała podobna aktywność antywirusowa do AZT. Grupa Freemana nie zbadała tego typu pronukleotydów w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej, przez co nie potwierdzono zakładanego uwalniania AZTMP w komórce.⁴⁶

4.2.1.3. Fosforany dinukleozydów

Kolejną ciekawą i wartą osobnego omówienia klasą pronukleotydów są fosforany dinukleozydów. Związki te zawierają dwie reszty nukleozydowe i w wyniku hydrolizy chemicznej i/lub enzymatycznej uwalniać mogą zarówno nukleotyd (ddNMP), jak i odpowiedni 2',3'-dideoksynukleozyd, oba o właściwościach anty-HIV. Dodatkowo, związki te ujawniły korzystne efekty jak poprawa aktywności biologicznej (synergizm działania, np. AZT i ddA oraz AZT i ddi) lub maskowanie cytotoksyczności (T i AZT).⁵³

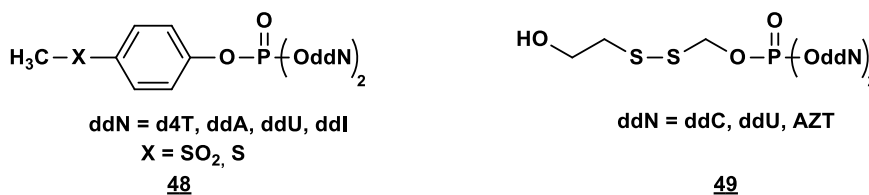
Homodimeryczne i heterodimeryczne 5'-5' dinukleozydowe diestry **45-47** (*Rys. 9*) były jednymi z pierwszych zaproponowanych pochodnych w tej klasie pronukleotydów.³⁰ Ich aktywność antywirusową oraz cytotoksyczność badano w zainfekowanych HIV komórkach MT-2, PBM oraz CEM.



Rys. 9. Przykładowe fosforanodiestry dinukleozydów.³⁰

Schinazi i współpracownicy stwierdzili, że względny potencjał antywirusowy związków **45-47** przedstawić można w następującym szeregu: AZT-P-ddA (**47**) > AZT-P-ddI (**45**) > AZT > AZT-P-AZT (**46**) > ddA > ddl. Co więcej, heterodimery były aktywniejsze niż mieszanina macierzystych ddN. Można zatem wnosić, że dużo korzystniejsze jest podawanie jako leku jednej cząsteczki **45** lub **47** niż osobno dwóch (np. AZT i ddl). Wykazano również, że AZT-P-ddI jest dziesięciokrotnie mniej toksyczny niż sam AZT.⁵⁸ Ponadto, Zhou i współpracownicy badając kinetykę rozpadu **45**, zaobserwowali brak NMP w osoczu. Na podstawie badań farmakokinetycznych, stosując różne drogi podawania związku (dożylnie lub doustnie) oraz testach trwałości stwierdzono, że tego typu pochodne prawdopodobnie nie przechodzą przez błonę komórkową, a w organizmie ulegają enzymatycznemu rozpadowi do dwóch nukleozydów antywirusowych, które następnie wchodzą w szlak metaboliczny przedstawiony na *Schemacie 2*.⁵⁹

Chcąc przezwyciężyć ograniczenia w stosowaniu fosforanodiestrów dinukleozydowych, zaproponowano fosforanotriestrowe dinukleozydy wykorzystując w celu ich otrzymania znane grupy maskujące ładunek ujemny reszty fosforanowej. Z założenia związki takie powinny łatwo przenikać do komórki, gdzie w cytozolu ulegałyby hydrolizie, z uwolnieniem ddNMP oraz nukleozydu antywirusowego. Zsyntetyzowano różnorodne strukturalnie pronukleotydy zawierające oprócz dwóch 2',3'-dideoksynukleozydów (AZT, d4T, ddA, ddU) różne warianty grup maskujących, m.in. związki **48** i **49** (*Rys. 10*).



Rys. 10. Wybrane przykłady fosforanotriestrów dinukleozydów.⁶⁰

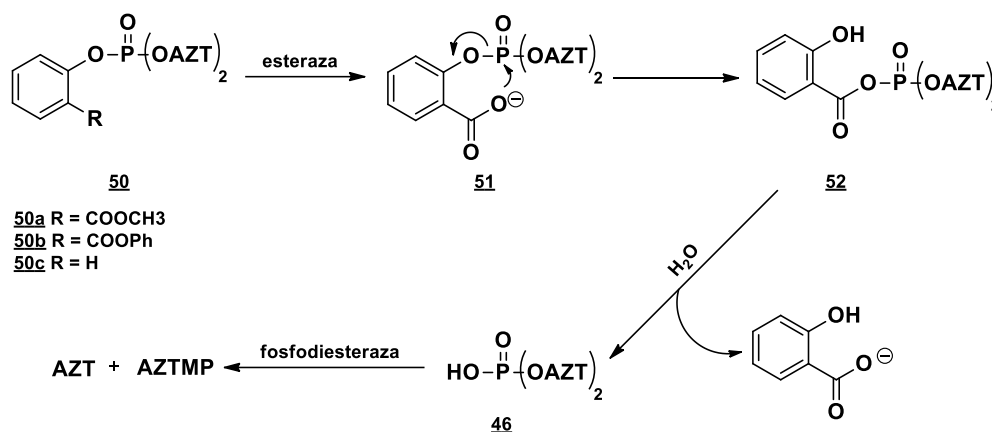
Shimizu i współpracownicy zaproponowali związki typu **48** (**Rys. 10**), spośród których pochodna zawierająca d4T wyróżniała się dobrą aktywnością antywirusową ($EC_{50} = 1,8 \mu\text{M}$) i niską cytotoksycznością ($CC_{50} > 250 \mu\text{M}$). Zaobserwowano również, że analogi ddA i d4T zawierające grupę sulfonową wykazywały wyższą aktywność antywirusową niż ich pochodne sulfidowe.^{60b}

Grupa Imbacha kontynuując badania nad pronukleotydami typu DTE, wprowadziła właśnie tę grupę maskującą do fosforanodiesterów dinukleozydowych otrzymując pochodne **49** (**Rys. 10**).^{60a} Związki te, podobnie jak analogi bis(DTE), miały uwalniać odpowiedni fosforanodiester dinukleozydu w wyniku reakcji aktywowanej enzymatycznie przez reduktazę. Potwierdzono pronukleotydowy mechanizm działania tego typu połączeń badając aktywność tych związków w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej (CEM/TK⁻) – pochodna AZT **49** wykazywała większy potencjał antywirusowy niż AZT. Jednocześnie związek ten cechowała podobna aktywność anty-HIV w komórkach MT-4, CEM-SS i CEMX-174.^{60a}

Inną propozycję fosforanotriestrów dinukleozydowych przedstawili Khamnei i Torrence.⁶¹ Wykorzystali oni salicylowe pochodne fosforanotriestrów typu **50** (**Schemat 10**), które w komórce, ulegały enzymatycznej hydrolizie z rozerwaniem wiązania karboksyestrowego, co prowadziło do związku **51**. Następnie w wyniku wewnątrzcząsteczkowego ataku anionu karboksylowego na centrum fosforowe, pękło wiązanie estrowe i utworzony nietrwały mieszany bezwodnik **52** łatwo ulegał hydrolizie do kwasu salicylowego oraz fosforanu dinukleozydu **46**. W wyniku działania fosfodiesterazy, związek **46** miałby ulegać rozpadowi do AZTMP oraz AZT.⁶¹⁻⁶² Opisany postulowany mechanizm uwalniania ddNMP i ddN przedstawiono na **Schemacie 10**.

Badając kinetykę pierwszej reakcji enzymatycznej (hydroliza estru kwasu salicylowego), stwierdzono, że szybkość tego procesu zależna jest od rodzaju alkoholu tworzącego ester. Co więcej, zauważono, że związek **50c**, prawdopodobnie ze względu na brak ugrupowania estrowego ulegał dużo wolniej hydrolizie niż pochodne **50a** czy

50b. Niestety, badania aktywności biologicznej wykazały ponad 35-krotnie większy potencjał AZT niż fosforanotriestrów typu **50**. Ponadto, testy w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej (CEM/TK⁻) pokazały, że wszystkie te analogi pozbawione były aktywności antywirusowej (EC₅₀ > 50 μM). Powyższe wyniki skłaniały do wniosku, że pochodne **50a** i **50b** były prawdopodobnie hydrolizowane poza komórką uwalniając AZT i nie działały jako pronukleotydy.^{60a}



Schemat 10. Postulowany mechanizm hydrolizy fosforanotriestrów salicylowych.

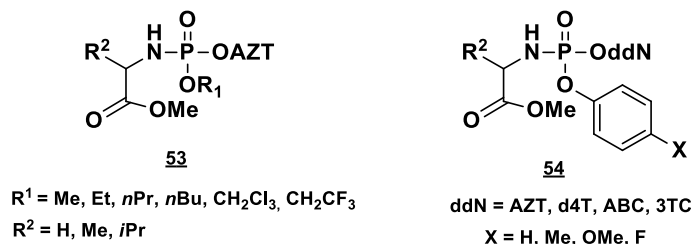
4.2.2. Amidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów

Odrębną klasę pronukleotydów stanowią amidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów. Podobnie jak w przypadku połączeń estrowych, zaproponowano wiele wariantów strukturalnych związków zawierających wiązanie amidowe, które na drodze chemicznych i/lub enzymatycznych przemian mogą uwalniać ddNMP w komórce. Punktem wyjścia do opracowywania tej koncepcji prolekowej były badania Smitha i Burrowa, którzy już pod koniec lat 50. XX w. wykazali, że związki zawierające wiązania P-N mogą ulegać hydrolizie enzymatycznej z udziałem fosfoamidaz.⁶³ Dalsze badania metabolizmu amidofosforanów pokazały, że enzymem odpowiedzialnym za rozpad wiązania amidowego jest rodzina białek HINT (ang. *Histidine Triad Nucleotide-binding Protein*), jednakże sam mechanizm aktywacji pronukleotydów nie został w pełni poznany.⁶⁴

4.2.2.1. Amidofosforanowe diestry 2',3'-dideoksynukleozydów

Pionierem w dziedzinie amidofosforanowych pronukleotydów był Christopher McGuigan. Na początku lat 90. XX w. zaproponował wprowadzenie reszt aminokwasowych jako grup maskujących ładunek ujemny w fosforanodiestrach

z założeniem, że związki te, zawierające naturalne aminokwasy będą mniej cytotoksyczne.



Rys. 11. Struktury amidofosforanowych pronukleotydów zaproponowanych przez McGuigana i wsp.⁶⁵

Początkowo zsyntetyzowano pochodne typu **53** (**Rys. 11**) zawierające oprócz 2',3'-dideoksynukleozydu i reszty aminokwasowej, prostą lub modyfikowaną halogenami (F lub Cl) grupę alkilową. Związki te wykazywały średnie parametry terapeutyczne (EC₅₀ = 3-50 μM), ale pozwoliły zaobserwować kilka prawidłowości, a mianowicie: (i) związki z bardziej zatłoczonymi sterycznie resztami aminokwasowymi wykazywały mniejszą aktywność antywirusową, (ii) długość łańcucha alifatycznego podstawnika miała wpływ na aktywność biologiczną związków.⁶⁵⁻⁶⁶ McGuigan i współpracownicy podczas opracowywania strategii pronukleotydów fosforotriestrowych, w celu zwiększenia podatności wiązań estrowych na hydrolizę, zastosowali grupy trichloroetylowe oraz trifluoroetylowe, co w rezultacie wpłynęło korzystnie na właściwości biologiczne badanych związków (*Rozdział IV.4.2.1.1.*). Podobne podejście zastosowano w przypadku diestrów amidofosforanów, jednakże w tym przypadku nie obserwowano poprawy parametrów biologicznych. Spośród tej klasy pochodnych, w kontekście aktywności antywirusowej, wyróżnić można jedynie L-alaninowy amidofosforan AZT z estrową grupą -CH₂CCl₃, którego aktywność antywirusowa była tylko o rząd mniejsza niż samego nukleozydu i wynosiła 0,08 μM. Związek ten był 50-krotnie bardziej aktywny od jego etylowego i trifluoroetylowego odpowiednika. Przyczyna tych niespodziewanych różnic nie została jednak wyjaśniona.⁶⁷

Kontynuując te badania zsyntetyzowano analogi posiadające w swojej strukturze fosforoestrowe grupy fenylowe (typ **54**, **Rys. 11**), co korzystnie wpłynęło na profil aktywności takich pochodnych i przyczyniło się do rozwinięcia pronukleotydowej strategii znanej dziś pod nazwą ProTide. Koncepcja ta została zastosowana do wielu

fosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów stosowanych w terapii anty-HIV (AZT, d4T, 3TC, ABC), a także dla C-fosfonianów acyklicznych nukleozydów (PMEA i PMPA).

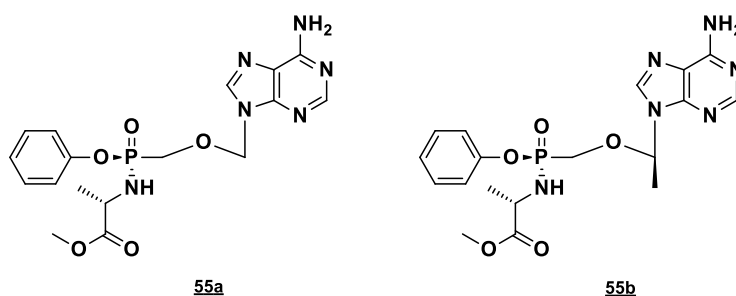
Jednymi z pierwszych analogów typu ProTide były pochodne AZT, których aktywność antywirusowa dla szczepów HIV-1 i HIV-2 była wyznaczona na zakażonych liniach komórkowych MT-4 i CEM. *In vitro* wszystkie zsyntetyzowane związki były efektywnymi inhibitorami wirusa. W tej grupie wyróżniał się analog zawierający niepodstawioną resztę fenylową oraz L-alaninę (**Rys. 11**), który w komórkach MT-4 wykazywał aktywność porównywalną ($EC_{50} = 0,006 \mu\text{M}$) z wolnym nukleozydem ($EC_{50} = 0,002 \mu\text{M}$). Wprowadzenie podstawników (-Me, -OMe, -F) w pozycję *para* pierścienia aromatycznego zmniejszyło 20-50-krotnie aktywność antywirusową wszystkich zsyntetyzowanych związków w porównaniu z AZT w komórkach MT-4. Zmiana w obrębie reszty aminokwasowej miała również duży wpływ na parametry biologiczne – wprowadzenie fenyloalaniny lub leucyny zamiast alaniny obniżało 40-70-krotnie parametry terapeutyczne tych pochodnych.⁶⁸

Grupa McGuigana udowodniła pronukleotydowy mechanizm działania zaproponowanych pochodnych fosforanów AZT typu **54** badając inhibicję replikacji wirusa HIV w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej CEM/TK⁻. Analogi zawierające alaninę i fenyloalaninę wykazywały aktywność antywirusową w tym medium (EC_{50} odpowiednio 3-12 μM oraz 10-13 μM), co wskazywało na uwalnianie monofosforanu nukleozydu w komórce.^{68a} Otrzymane związki charakteryzowała nie tylko dobra aktywność antywirusowa, ale również, niska cytotoksyczność. Mając na uwadze powyższe podjęto badania nad modyfikowanymi fosforanami innych 2',3'-dideoksynukleozydów oraz C-fosfonianami acyklicznych nukleozydów o analogicznej aranżacji grup maskujących resztę fosforanową.

Obiecujące wyniki otrzymano dla diestrów amidofosforanów d4T, pośród których wyróżniającą aktywność wykazywała pochodna L-alaniny, inhibująca 10-krotnie efektywniej replikację wirusa HIV w komórkach MT-4 niż wolny nukleozyd. Co więcej, ponad 5-krotnie zredukowana została toksyczność tej pochodnej d4T ($CC_{50} > 100 \mu\text{M}$), co prowadziło do 50-krotnej poprawy indeksu selektywności (SI) amidofosforanu nukleozydu w porównaniu z samym nukleozydem. Dodatkowo, pochodna d4T typu **54** zachowała pełny potencjał antywirusowy w komórkach CEM/TK⁻, wykazując 400-krotnie wyższą aktywność niż d4T.⁶⁹

Strategia ProTide była również rozwijana w kierunku syntezy oraz badania potencjału biologicznego pochodnej fenylowej L-alaniny 3TC typu **54**. Aktywność antywirusowa tego związku była jednak znacznie niższa ($EC_{50} = 2,5 \mu\text{M}$ vs $EC_{50} = 0,01 \mu\text{M}$ dla 3TC), a wyniki badań biologicznych w komórkach z deficytem kinazy 2'-deoksycytydnowej CEM/dCK ($EC_{50} = 65 \mu\text{M}$) dla wspomnianego analogu sugerowały, że prawdopodobnie nie działał on według pronukleotydowego mechanizmu.⁷⁰

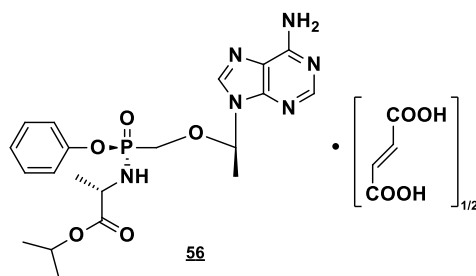
W 2001 roku grupa McGuigana opublikowała wyniki badań dotyczące syntezy oraz potencjału biologicznego pochodnych amidofosfonianowych acyklicznych nukleozydów PMEA i PMPA. Spośród tych analogów, **55a** i **55b** (**Rys. 12**) charakteryzowały się najbardziej korzystnymi parametrami terapeutycznymi.⁷¹ Obydwie pochodne typu **55** wykazywały zwiększoną aktywność antywirusową względem wyjściowych ANP. Amidofosfonian **55b** 50-100-krotnie lepiej inhibował replikację wirusa HIV-1 w komórkach MT-4 w porównaniu z PMPA, podczas gdy związek **55a** był 30-50-krotnie bardziej aktywny niż odpowiadający mu wyjściowy fosfonian. Jednocześnie, indeks selektywności wspomnianej pochodnej PMPA wzrósł 25-krotnie. Zaobserwowano również znacznie wyższą aktywność biologiczną analogów typu **55** zawierających naturalny enancjomer L-alaniny w porównaniu z izomerem D (5-30-krotny wzrost w przypadku PMPA i 30-60-krotny dla PMEA).^{68b,71}



Rys.12. Amidofosfonianowe diestry PMEA i PMPA typu ProTide.⁷¹

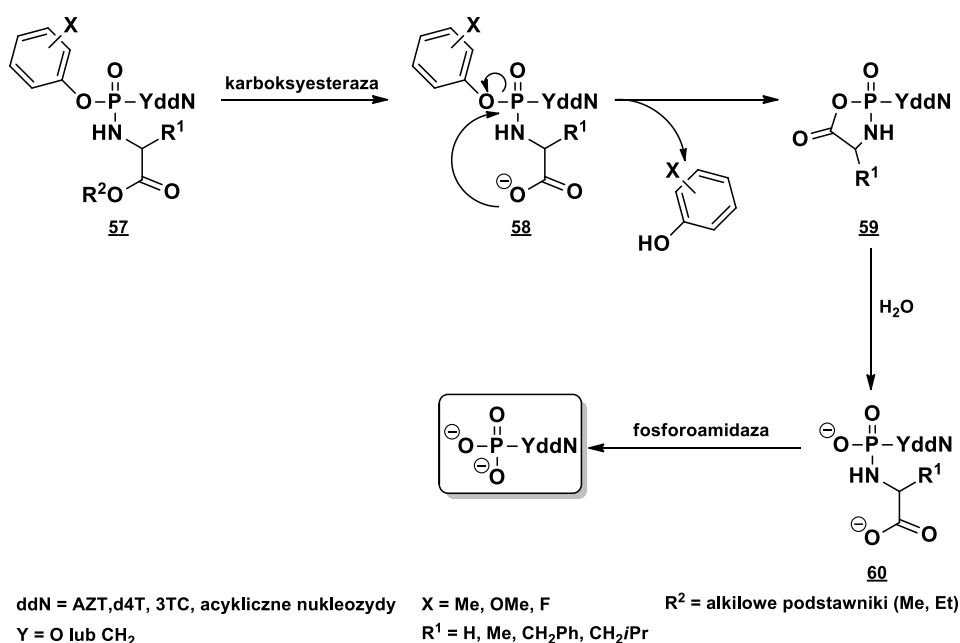
Ukoronowaniem strategii ProTide było zarejestrowanie przez FDA w 2015 roku fumaranu alafenamidu tenofowiru (TAF, **56**, **Rys. 13**), który jest drugim pronukleotydowym lekiem stosowanym w terapii anty-HIV. Razem z elwitegrawirem (inhibitor integrazy), kobicystatem (związek podawany w celu opóźnienia metabolizmu leków anty-HIV) oraz emtrycytabiną (nukleozydowy inhibitor RT) wchodzi w skład leku *Genvoya*[®]. TAF jest niejako ulepszoną wersją TDF, gdyż wykazuje mniejszą toksyczność, lepszą przenikalność przez błony komórkowe tkanek limfoidalnych oraz dostateczną

terapeutycznie efektywność inhibicji wirusa HIV przy stosowaniu mniejszych dawek leku.^{8,72}



Rys. 13. TAF – fumaran alafenamidu tenofowiru, amidofosfonian zatwierdzony do stosowania klinicznego przez FDA.

Postulowany mechanizm działania pronukleotydów typu ProTide (związków o wzorze ogólnym **57**) badany był przez różne grupy badawcze i przedstawiony jest na **Schemacie 11**.



Schemat 11. Postulowany mechanizm uwalniania NMP w strategii pronukleotydywej ProTide.

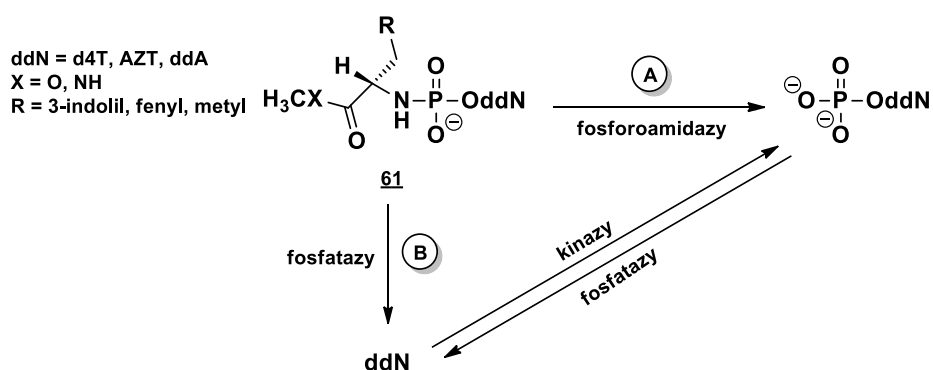
Zakłada się, że pronukleotyd **57** przenika w nienaruszonej formie do wnętrza komórki, gdzie następuje inicjowana przez karboksyesterazę hydroliza wiązania estrowego i wygenerowany zostaje nukleofilowy anion karboksylowy (pochodna **58**). Następnie w wyniku wewnątrzcząsteczkowego ataku na atom fosforu powstaje pochodna **59** zawierająca niestabilny pięciocłonowy pierścień oksazafosfolidyny, który ulega hydrolitycznemu otwarciu z utworzeniem dianionowego amidofosforanowego metabolitu **60**. Prawdopodobnie pod wpływem działania enzymu fosforoamidazy

(np. HINT-1), następuje hydroliza wiązania amidofosforanowego P-N w tym związku, co prowadzi do uwolnienia ddNMP lub ANP.^{49a,50,68b,73} Udowodniono, że labilność wiązania P-N w amidofosfonianach jest większa niż w odpowiednich amidofosforanach. Może to powodować, że w pochodnych PMEAs i PMPAs typu ProTide wiązanie amidofosforanowe ulega spontanicznej hydrolizie, co w połączeniu z reakcją enzymatyczną efektywniej generuje ANP w komórce, przekładając się wprost na lepsze parametry aktywności antywirusowej tego typu pronukleotydów.⁷¹

4.2.2.2. *Amidofosforanowe monoestry 2',3'-dideoksynukleozydów*

Grupa Wagnera zaproponowała amidofosforany monoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów jako kolejną klasę pronukleotydów zawierających wiązanie P-N. Co ciekawe, stanowią one grupę proleków z jedną grupą maskującą, a więc związków posiadających ładunek ujemny (**61**, *Schemat 12*). Strategia ta została wykorzystana do otrzymania szeregu pronukleotydów AZT, d4T czy ddA zawierających estry metylowe lub *N*-metyloamidy alifatycznych i aromatycznych aminokwasów.⁷⁴

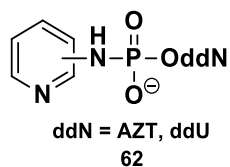
Proleki zaproponowane przez Wagnera i współpracowników posiadają jedną resztę aminokwasową jako grupę maskującą. Cząsteczki typu **61** według autorów powinny być wystarczająco lipofilowe, by przenikać przez błony komórkowe, ale też odpowiednio hydrofilowe (rozpuszczalne w wodzie), by zapewnić im należyłą biodostępność w organizmie. W komórce pod wpływem enzymów (fosforoamidaz) odpowiedzialnych za hydrolizę wiązań P-N, istnieje możliwość uwalniania ddNMP (ścieżka **A**, *Schemat 12*).⁷⁵ Możliwy jest również alternatywny, pronukleozydowy mechanizm działania tych związków, związany z działaniem wewnątrzkomórkowych fosfataz, które mogą przeprowadzać amidofosforan typu **61** w odpowiedni nukleozyd poprzez rozpad wiązania P-O (ścieżka **B**, *Schemat 12*). Grupa Wagnera udowodniła pronukleozydowy mechanizm działania odpowiedniego analogu AZT w ekstraktach komórkowych CEM i PBMC poprzez znakowanie izotopowe tlenem O¹⁸ reszty fosforanowej i analizę metabolitów za pomocą HPLC-ESI-MS/MS.⁷⁶



Schemat 12. Amidofosforanowe pronukleotydy zaproponowane przez Wagnera i wsp. oraz mechanizm ich rozpadu.

Warto podkreślić, że wszystkie otrzymane pochodne typu **61** charakteryzowały się niską cytotoksycznością ($CC_{50} > 100 \mu M$).⁷⁷ W niektórych przypadkach zaproponowane związki wykazywały większą aktywność antywirusową *in vitro* niż wyjściowe ddN. Na przykład analog typu **61** zawierający L-tryptofan i AZT, charakteryzował się 8-krotnie większą aktywnością biologiczną w porównaniu z macierzystym nukleozydem, nie będąc przy tym szkodliwym dla organizmu (ponad 10-krotnie mniejsza toksyczność w porównaniu do AZT). Ponadto, komórki PBMC zainfekowane wirusem HIV-1 traktowane w/w pochodną zawierały 4-krotnie więcej AZTMP niż te, którym podano AZT.^{77c,78} Warto również wspomnieć, że w medium RPMI/FCS, 9:1, v/v pochodne **61** były zaskakująco stabilne ($t_{1/2} = 6$ dni) i nie obserwowano degradacji do ddNMP lub wolnego nukleozydu.^{77a,78} Dodatkowo, zauważono wyraźny wpływ rodzaju wiązania w reszcie aminokwasowej (amidowe vs estrowe) na parametry biologiczne. Zastosowanie amidu metylowego fenyloalaniny w pochodnej amidofosforanu AZT wpływało bardzo korzystnie na aktywność antywirusową – była ona 60-166-krotnie większa niż dla estru metylowego. Natomiast ta sama pochodna zawierająca resztę tryptofanu jako grupę maskującą, charakteryzowała się 2-5-krotnie mniejszą aktywnością metylowego amidu w porównaniu z estrem.^{77b}

Grupa Kraszewskiego poszerzyła spektrum pronukleotydowych amidofosforanów monoestrów o kolejne pochodne zawierające różne aminy aromatyczne w cząsteczce **62** (**Rys. 14**), spośród których związki zawierające reszty 2-, 3-, 4-aminopirydyny wyróżniały się wyjątkowo wysoką aktywnością anti-HIV i bardzo niską cytotoksycznością.⁷⁹

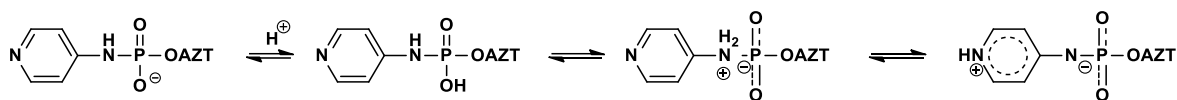


Rys. 14. Przykładowe amidofosforanowe monoestry 2',3'-dideoksynukleozydów zaproponowane przez Kraszewskiego i wsp.⁷⁹

W warunkach hydrolizy chemicznej (RPMI) związki typu **62** wykazywały dużą trwałość ($t_{1/2} > 6$ dni), natomiast w medium zawierającym aktywność enzymatyczną (RPMI/FBS, 9:1, v/v) ulegały one powolnemu rozpadowi (22 h do kilku dni). Podczas analizy HPLC obserwowano ddN jako główny metabolit oraz ddNMP (produkt mniejszościowy). Te wyniki zasugerowały, że związki typu **62** mogą być rozkładane poprzez hydrolizę chemiczną lub enzymatyczną wiązania amidofosforanowego, do odpowiednich fosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów, które w medium zawierającym aktywność fosfatazową były szybko przekształcane do odpowiedniego ddN. W związku z wysoką stabilnością proponowanych pronukleotydów w medium zawierającym aktywność enzymatyczną, postulowano, że prawdopodobnie związki te docierają do komórki w niezmienionej formie.⁷⁹

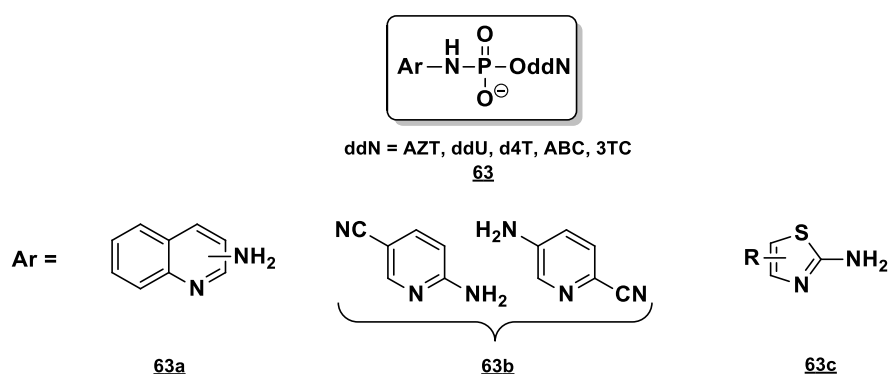
Wszystkie pochodne AZT typu **62** wykazywały wysoką aktywność antywirusową, a spośród nich na szczególną uwagę zasługuje analog 4-aminopirydynowy, którego indeks selektywności był niezwykle wysoki (SI > 182000; $EC_{50} = 0,0011 \mu\text{M}$; $CC_{50} > 200 \mu\text{M}$). Zsyntetyzowano również odpowiednie pochodne ddU, które poddano testom biologicznym, a ich obserwowana aktywność antywirusowa uprawdopodobniała pronukleotydowy mechanizm działania związków przedstawionych wzorem ogólnym **62** (**Rys. 14**).⁷⁹

Wysoka aktywność biologiczna otrzymanych związków wskazywała na możliwość ich przenikania przez błonę komórkową, pomimo obecnego formalnego ładunku ujemnego na reszcie fosforanowej. Autorzy tłumaczyli to możliwością występowania tych analogów w środowisku wodnym nie tylko w formie zjonizowanej **62**, ale również jako neutralne jony obojętne (**Rys. 15**). Wydaje się, że kluczową rolę odgrywać tu może również pierścień pirydyny, który jest zarówno lipofilowy (obecność układu aromatycznego), jak i hydrofilowy (obecność atomu azotu).⁸⁰



Rys. 15. Możliwe formy tautomeryczne protonowanych cząsteczek typu **62** na przykładzie pochodnej 4-aminopirydynylowej.

Zachęcona korzystnymi parametrami biologicznymi i fizykochemicznymi dla pochodnych pirydynylowych amidofosforanów monoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów, grupa Kraszewskiego postanowiła poszerzyć badania o inne heterocykliczne aminy (aminochinoliny, aminocyjanopirydyny oraz aminotiazole) jako grupy maskujące reszty fosforanowe **63a-63c** **Rys. 16.**⁸⁰



Rys. 16. Różne warianty strukturalne amidofosforanów monoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów wykorzystujące aminy heterocykliczne.⁸⁰

Zsyntetyzowane zostały pochodne typu **63** z różnymi nukleozydami stosowanymi w terapii anty-HIV (AZT, d4T, ABC, 3TC). Różne położenie atomu azotu w izomerach chinolin oraz aminoizochinolin w analogach typu **63a** wpływało znacząco na lipofilowość oraz stabilność chemiczną badanych amidofosforanów monoestrów. Warto zauważyć, że analogi te charakteryzują się dużo większą zawadą steryczną, co może mieć znaczący wpływ na ich aktywność biologiczną. Herdewijn i współpracownicy zaobserwowali, że niektóre 5'-amidofosforany nukleozydów mogą być używane jako substraty przez odwrotne transkryptazy HIV (RT) bez przekształcenia ich w odpowiednie trifosforany, a wariacje strukturalne w części amidowej mają fundamentalny wpływ na ich właściwości substratowe.⁸¹ Drugą grupę proponowanych heterocyklicznych amin stanowiły aminopirydyny z podstawnikiem nitrylowym **63b**, który znacząco obniżał zasadowość całego ugrupowania. Trzecia grupa **63c** (pochodne 2-aminotiazoli) została wybrana, by sprawdzić możliwości syntetyczne wybranej metody oraz wpływ tego rodzaju połączeń amidowych na parametry biologiczne.

Podobnie jak pochodne **62**, zsyntetyzowane analogi **63** charakteryzowały się dużą stabilnością w RPMI ($t_{1/2} > 5$ dni) oraz powolnym rozpadem w medium wzbogaconym w aktywność enzymatyczną (RPMI/FBS, 9:1, v/v) – okres półtrwania do kilku dni. Większość pochodnych d4T, ABC i 3TC charakteryzowała się dużą trwałością w tych warunkach. Analiza HPLC, podobnie jak w przypadku pirydynowych pronukleotydów, wykazywała powolną hydrolizę do ddNMP oraz ddN.⁸⁰

Badania biologiczne wykazały również bardzo niską cytotoksyczność związków typu **63**, przy jednoczesnej bardzo wysokiej aktywności anty-HIV rzędu nanomolarnego ($EC_{50} = 1-20$ nM). Najbardziej obiecującą grupę stanowiły pochodne izochinolin, cyjanopirydyn oraz 2-aminotiazolin ($EC_{90} < 25$ nM).⁸⁰ Bardzo dobre parametry biologiczne badanych amidofosforanów monoestrów ddN wskazują, że są one wartościowymi kandydatami do dalszych badań nad ich wykorzystaniem w terapii anty-HIV.

4.2.3. Estry di- i trifosforanowe analogów nukleozydów

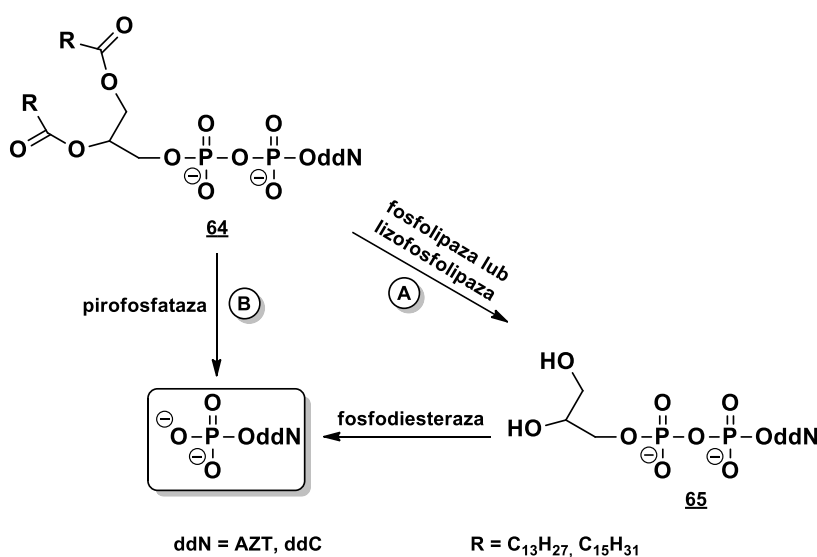
Początkowo koncepcja pronukleotydów zakładała dostarczanie do komórki odpowiednio maskowanych monofosforanów dideoksynukleozydów. W ciągu dwóch dekad zaproponowano i zweryfikowano eksperymentalnie wiele koncepcji pronukleotydów pozwalających ominąć pierwszą i najczęściej kluczową fosforylację ddN w komórce. Propozycje syntezy di- i trifosforanowych proleków pojawiały się wyjątkowo rzadko. Spowodowane było to głównie sprzecznymi wymogami strategii pronukleotydowej: dla umożliwienia wnikania pronukleotydów do komórki za konieczne uważano zneutralizowanie za pomocą grup ochronnych wszystkich ładunków ujemnych grup fosforanowych, natomiast uzyskanie wymaganej trwałości wiązania P-O-P w roztworze wodnym wymagało obecności ładunków ujemnych, chroniących polifosforan przed atakiem nukleofilowym.⁵⁰

Strategia di- i trifosforanowych proleków zaczęła być rozwijana głównie dla pochodnych AZT. W przypadku tego dideoksynukleozydu występuje problem na drugim etapie fosforylacji, a mianowicie konwersji AZTMP do AZTDP, co skutkuje akumulacją fosforanu AZT w organizmie i jest źródłem toksyczności tego związku (*Rozdział IV.4.1.*). Zakładano, że dostarczenie do komórki odpowiednio maskowanego di- lub trifosforanu AZT powinno skutkować (po hydrolizie grup maskujących) uwolnieniem związku

o lepszych parametrach antywirusowych – zachowana byłaby wysoka aktywność anti-HIV przy jednocześnie obniżonej toksyczności.

W latach 80. XX w. najpopularniejszą strategią w rozwoju di- i trifosforanowych pronukleotydów było wprowadzanie alkilowych lub acylowych reszt na terminalny atom fosforu (P_{β} dla difosforanów oraz P_{γ} dla trifosforanów).

Grupa Hostetlera zapoczątkowała badania nad syntezą i oceną potencjału anti-HIV fosfolipidowych analogów difosforanów nukleozydów antywirusowych, głównie AZT i ddC (związki typu **64**, *Schemat 13*).⁸²

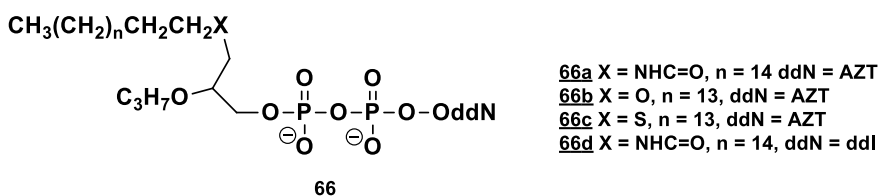


Schemat 13. Postulowane mechanizmy działania glicerydowych fosforanów nukleozydów.

Postulowano, że glicerydowe difosforany nukleozydów, w związku z obecnością silnie lipofilowymi grupami acylowymi, mogą łatwiej przenikać przez błonę komórkową. Przez analogię do naturalnych glicerolipidów, Hostetler i współpracownicy przewidywali dla tych związków wewnątrzkomórkowy metabolizm inicjowany enzymami (fosfolipazą lub lizofosfolipazą) początkowo do pochodnej typu **65**, która pod wpływem działania enzymu, tym razem fosfodiesterazy, mogłaby ulegać rozpadowi do odpowiedniego ddNMP (ścieżka **A**, *Schemat 13*). Alternatywnie, związek **64**, posiadający wiązanie bezwodnikowe P-O-P, może być bezpośrednio hydrolizowany przez komórkową pirofosfatazę, z utworzeniem monofosforanu nukleozydu oraz kwasu fosfatydowego (ścieżka **B**, *Schemat 13*).^{82c} Badania trwałości pirofosforanowego wiązania bezwodnikowego w warunkach hydrolizy enzymatycznej pokazały większy udział drogi **B** w powstawaniu NMP.^{82b} Wykonano również pomiary potencjału terapeutycznego otrzymanych difosforanów i stwierdzono niższą aktywność antywirusową pochodnej

AZTDP typu **64** ($R = C_{15}H_{31}$) w komórkach CEM niż samego AZT (odpowiednio: $EC_{50} = 7 \mu M$ vs $EC_{50} = 0,2 \mu M$).^{82c}

Piantadosi i współpracownicy zaproponowali etery lipidowe difosforanowych analogów nukleozydów (typ **66** *Rys. 17*) zawierające w swojej strukturze dodatkowe modyfikacje reszty glicerydowej, poprzez wprowadzenie atomu siarki lub grupy amidowej do cząsteczki.⁸³

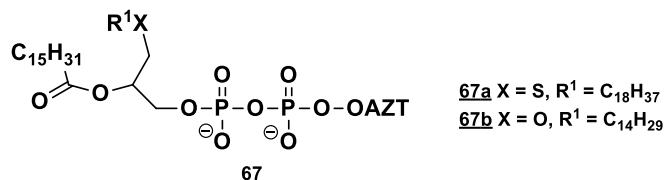


Rys. 17. Fosfolipidowe analogi NDP zaproponowane przez Piantadosi i wsp.⁸³

Wprowadzenie tego rodzaju grupy maskującej podyktowane było kilkoma czynnikami. Ze względu na ich lipofilową naturę, postulowano, podobnie jak w przypadku pochodnych **64**, dobrą przenikalność tych cząsteczek przez błonę komórkową. Po drugie, w związku z rozpadem **66** do NMP inicjowanym przez pirofosfatazy, spodziewano się powolnego uwalniania AZTMP w komórce, co mogłoby skutkować późniejszym pojawieniem się lekooporności na AZT w połączeniu z wydłużeniem działania terapeutyku. Po trzecie, podczas metabolizmu związku **66** może zostać uwolniona również druga aktywna cząsteczka – pochodna dialkylowa lub amidoalkilowa glicerolu, które są inhibitorami kinazy białkowej C i mogą przyczyniać się do spowolnienia rozwoju infekcji wirusowej.⁸³ Przebadano aktywność biologiczną otrzymanych związków i stwierdzono podobną efektywność inhibicji replikacji wirusa HIV dla pochodnych **66a-66c**, która była o jeden rząd wielkości wyższa niż dla samego AZT (odpowiednio: $EC_{50} = 0,02-0,03 \mu M$, $EC_{50} = 0,004 \mu M$). Wbrew oczekiwaniom analogi **66b** i **66c** okazały się być bardziej cytotoksyczne, co mogło być spowodowane mniejszą zdolnością do metabolizowania okso- i tioeterów w komórkach w porównaniu z możliwą hydrolizą karboksamidu przez fosforoamidazy.⁸³

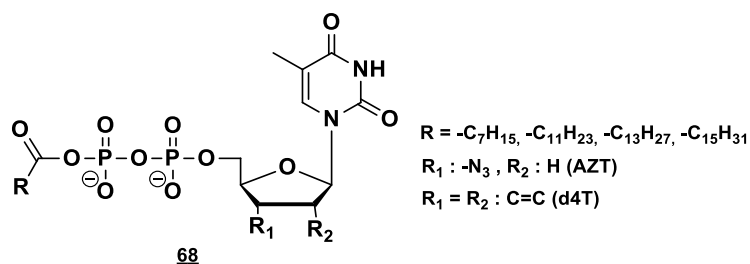
Kontynuując nurt fosfolipidowych difosforanów analogów nukleozydów, Hong i współpracownicy zsyntetyzowali alkilowe oraz tioalkilowe eterowe pochodne glicerydowe typu **67** (*Rys. 18*).⁸⁴ Lipofilowość otrzymanych związków zmierzona metodą podziału oktanol/bufor fosforanowy (pH 7,4), a wartości logP dla związków **67a** i **67b** wynosiły odpowiednio 0,22 i 0,245 i były około 4-krotnie wyższe niż dla samego AZT

(logP = 0,06). Zauważono również wpływ reszty lipidowej tych pochodnych na efektywność inhibicji replikacji wirusa HIV – pochodna tioeterowa **67a** wykazywała większą aktywność ($EC_{50} < 0,58 \mu M$) niż analog eterowy **67b** ($EC_{50} = 57 \mu M$). Związki te charakteryzowała także szczególnie niska cytotoksyczność ($CC_{50} > 200 \mu M$).⁸⁴



Rys. 18. Fosfolipidowe pochodne difosforanów nukleozydów zaproponowane przez Honga i wsp.⁸⁴

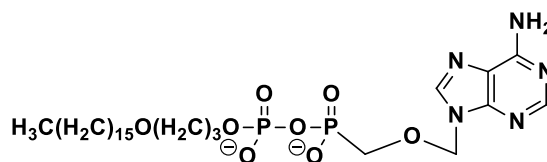
Kolejną grupę difosforanowych pronukleotydów stanowią mieszane bezwodniki karboksylowo-fosforanowe zawierające grupy acylowe o długich łańcuchach alkilowych (**68**, **Rys. 19**) zapewniające, podobnie jak wcześniej prezentowane analogi, odpowiednią lipofilowość (Huynh Dinh i współpracownicy).⁸⁵



Rysunek 19. Przykładowe pronukleotydy difosforanowe o strukturze mieszanych bezwodników karboksylowo-fosforanowych.⁸⁵

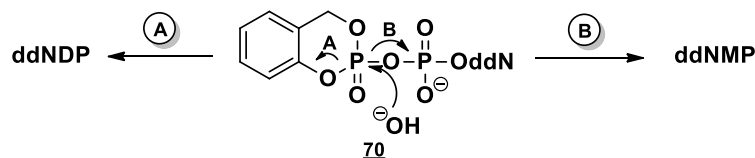
Pierwotnie zakładano penetrację błony komórkowej przez pochodne typu **68** i enzymatyczne, wewnątrzkomórkowe uwalnianie NDP. Niestety, wartości EC_{50} dla analogów AZT typu **68** były tego samego rzędu, co dla wolnego nukleozydu, a w przypadku pochodnych d4T, nawet 100 razy niższe niż dla d4T. Początkowo hipoteza Huynh Dinha i współpracowników zakładała dostarczenie difosforanowego pronukleotydu do komórki oraz preferowaną hydrolizę mieszanego karboksylowo-fosforanowego wiązania bezwodnikowego (C-O-P) w stosunku do wiązania pirofosforanowego. Jednakże, badania trwałości wykonane w RPMI wykazały niestabilność tych związków, które szybko ($t_{1/2}$ ok. 2 h) uwalniały odpowiednie nukleotydy. Wyniki tych eksperymentów świadczyć mogą o zbyt szybkiej hydrolizie acylowej grupy maskującej, prowadzącej do uwolnienia NDP w medium hodowlanym komórek.^{85b}

Strategia opierająca się na wprowadzaniu do cząsteczek długich łańcuchów alifatycznych została rozszerzona o pochodne alkoksyalikilowe w acyklicznych fosfonianach. Ruiz i współpracownicy zaproponowali pochodne typu **69** dla PMEAs (**Rys. 20**).⁸⁶

**69****Rys. 20.** Pochodne ANP zaproponowane przez Ruiza i wsp.⁸⁶

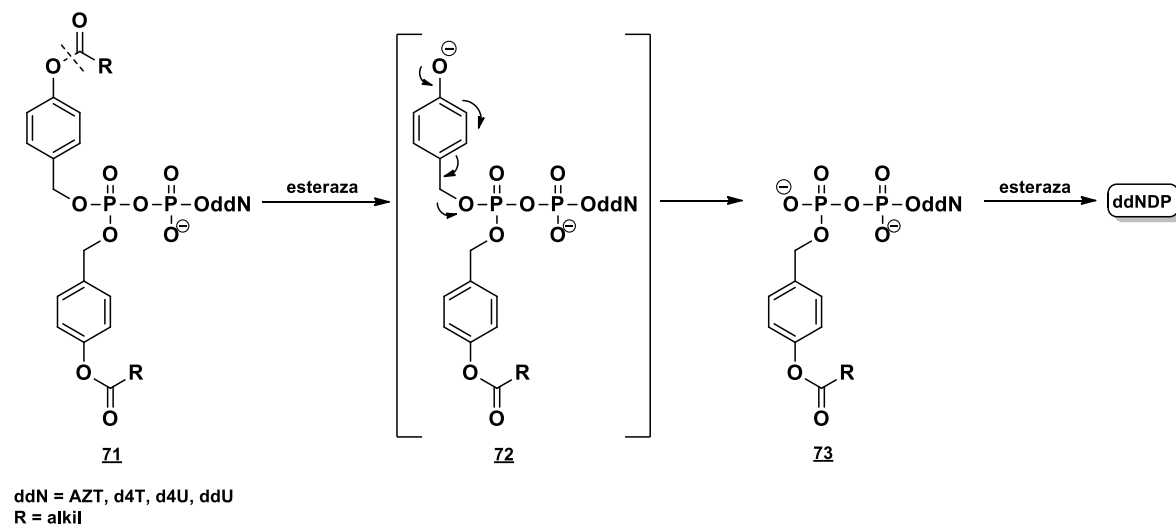
Dla wspomnianych związków wykonano badania aktywności antywirusowej i stwierdzono, że analog **69** dużo lepiej inhibował replikację wirusa HIV ($EC_{50} = 0,003 \mu M$) niż PMEAs ($EC_{50} = 1,3 \mu M$), natomiast posiadał dużo większą cytotoksyczność w komórkach MT-2 ($CC_{50} = 0,018 \mu M$ vs $CC_{50} = 157 \mu M$), co sprawiało, że indeks selektywności dla tego związku wynosił tylko 6.⁸⁶ Niestety, w literaturze brakuje dyskusji dotyczącej potencjalnego mechanizmu działania tego rodzaju pronukleotydów.

Grupa Meiera zachęcona pozytywnymi wynikami aktywności biologicznej dla pochodnej *cycloSal*-NMP,^{45b} postanowiła zastosować tę strategię również dla difosforanów. Po otrzymaniu serii związków typu **70** (**Schemat 14**) przeprowadzono badania trwałości wiązania pirofosforanowego, a przebieg reakcji śledzono za pomocą spektroskopii ³¹P NMR. Stwierdzono, że analogi **70** ulegały głównie hydrolytycznemu rozpadowi z rozerwaniem wiązania P-O-P (ścieżka **B**, **Schemat 14**) i w rezultacie otrzymywano NMP i fosforan *cycloSal*. W widmie ³¹P NMR obserwowano również sygnały pochodzące od NDP, ale o znacznie mniejszej intensywności.⁸⁷

**Schemat 14.** Hydroliza pronukleotydu *cycloSal*-NDP.

W związku z niekorzystnym przebiegiem hydrolizy *cycloSal*-NDP, Meier i współpracownicy opracowali inną strategię pronukleotydów, która zakładała całkowite maskowanie ładunków reszty fosforanowej P_β poprzez wprowadzenie lipofilowych grup acyloksybenzylowych (tzw. podejście DiPPro).⁸⁸ Początkowo syntezowano pochodne **71**

(**Schemat 15**) z dwoma identycznymi resztami acyloksybenzylowymi na reszcie P_{β} oraz niezamaskowanym ładunkiem na P_{α} . Związki te zostały zaprojektowane tak, by mechanizm uwalniania NDP w komórce był zależny od działania enzymów (esterazy lub lipazy).



Schemat 15. Postulowany mechanizm hydrolizy pronukleotydów DiPPro.

Postulowany ciąg reakcji uwalniania NDP w komórce (**Schemat 15**) zakładał inicjowaną enzymatycznie reakcję rozpadu wiązania estrowego w resztach benzylowych maskujących funkcję fosforanową P_{β} pronukleotydu. Powstający produkt przejściowy **72** w wyniku 1,6-eliminacji uwalniał monobenzylową pochodną **73**, a powtórzenie wyżej opisanego ciągu reakcji powodowało usuwanie drugiej grupy maskującej i w efekcie uwalnianie ddNDP. Warto podkreślić, że mechanizm ten na żadnym etapie nie zakładał reakcji zachodzących bezpośrednio na atomach fosforu wiązania bezwodnikowego, przez co układ pirofosforanowy powinien pozostać nienaruszony.⁸⁷

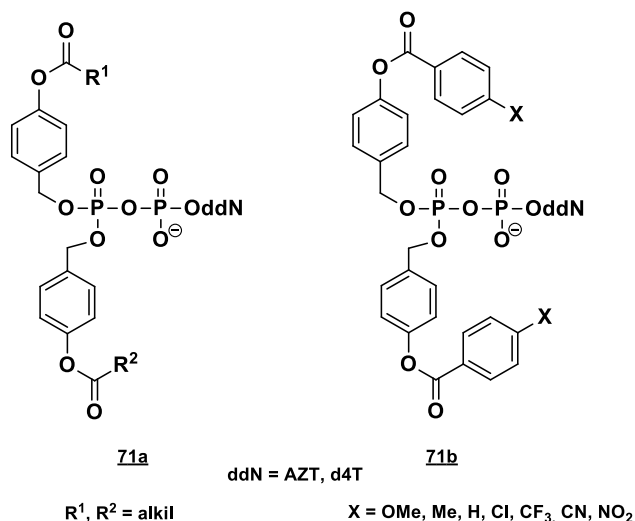
Początkowo, zsyntetyzowano pochodne z identyczną aranżacją obydwóch grup maskujących resztę P_{β} zawierających grupy acylowe o prostych lub rozgałęzionych łańcuchach alkilowych. Zgodnie z oczekiwaniami, czas połowicznego rozpadu w warunkach hydrolizy chemicznej (PBS pH 7,3) dla pochodnych AZT typu **71**, prowadzący do odpowiednich 5'-difosforanów nukleozydów, był dłuższy, jeśli R stanowiła grupa z bardziej rozgałęzionym łańcuchem alifatycznym (np. dla tBu, $t_{1/2} = 75$ h), niż dla analogów z prostymi resztami alkilowymi (np. dla Me, $t_{1/2} = 17$ h). W warunkach hydrolizy enzymatycznej (RPMI/FCS, 9:1, v/v), obserwowano znacznie szybsze uwalnianie ddNDP ($t_{1/2} = 2-3$ h).⁸⁷

Pomiary parametrów terapeutycznych dla pochodnych d4T typu **71** wykazały aktywność antywirusową zbliżoną do odpowiedniego nukleozydu. Ponadto, analogi zawierające heptyl oraz fenyl jako lipofilowe reszty estrowe wykazywały taką samą aktywność w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej, co było dowodem na pronukleotydowy mechanizm działania tych związków (R = heptyl, $EC_{50} = 2,6 \mu\text{M}$; R = fenyl, $EC_{50} = 0,85 \mu\text{M}$; d4T $EC_{50} = 70 \mu\text{M}$).⁸⁷

Podczas badań aktywności biologicznej pochodnych **71** z krótkimi łańcuchami węglowymi (R = Me, tBu) zauważono, że związki te w komórkach CEM/TK⁻ nie wykazywały aktywności antywirusowej, a wartości EC_{50} zbliżone były do d4T. Wyniki tych eksperymentów tłumaczono zbyt dużą polarnością tych cząsteczek, pomimo obecności dwóch grup maskujących P_{β} . Zdecydowano więc o wprowadzeniu do cząsteczek DiPPro długich łańcuchów alifatycznych (reszt kwasów tłuszczowych), które miałyby korzystnie wpłynąć na lipofilowość proponowanych związków, a nie wpływać na mechanizm hydrolizy tych pochodnych.^{88e} Aby potwierdzić hipotezę o zależności efektywności inhibicji replikacji wirusa od długości łańcucha reszty acylowej, oznaczono aktywność zsyntetyzowanych związków w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej. Wszystkie pochodne z grupami R > C₆H₁₃ wykazywały wysoką zdolność inhibicji namnażania wirusa HIV, o 2-3 rzędy wyższą niż d4T w tych samych warunkach.^{88e}

Podczas badań nad trwałością symetrycznych DiPPro-NDP zauważono, że produktem hydrolizy związków typu **71** był nie tylko pożądany difosforan, ale również odpowiedni ddNMP. Co więcej, zaobserwowano, że ilość powstającego monofosforanu ściśle korelowała z długością łańcucha reszty acylowej. Im był on dłuższy, tym mniejsza podatność na działanie enzymów, a większa na hydrolizę chemiczną układu bezwodnikowego, co skutkowało większą ilością powstającego monofosforanu.^{88b,88d} Zaprojektowano więc niesymetryczne pochodne DiPPro drugiej generacji **71a** (**Rys. 21**) zawierające w swojej strukturze dwie różne grupy maskujące centrum P_{β} , różniące się długością łańcuchów węglowych w reszcie acylowej. Pierwszą z nich (R¹) miały stanowić krótkie alifatyczne łańcuchy tworzące ester, które szybko ulegałyby hydrolizie w warunkach enzymatycznych. Podstawnik R² w drugiej grupie benzyłowej, przeciwnie – posiadał długie łańcuchy węglowe, które miały zapewniać należyłą lipofilowość cząsteczki.^{88b}

Ponownie, aby potwierdzić postawioną hipotezę, Meier i współpracownicy wykonali testy trwałości wiązania P-O-P w warunkach hydrolizy chemicznej (PBS, RPMI) i enzymatycznej (ekstrakt komórkowy). W buforze fosforanowym (pH 7,3) trwałość związków typu **71a** była dużo większa ($t_{1/2}$ wynosiła od kilkunastu do kilkudziesięciu godzin) oraz obserwowano powstawanie zarówno ddNDP, jak i ddNMP. W warunkach hydrolizy enzymatycznej natomiast, uwalniany był niemal wyłącznie difosforan – stosunek ilości ddNDP do ddNMP był wyraźnie korzystniejszy niż w przypadku symetrycznych pochodnych DiPPro. Większość niesymetrycznych analogów efektywnie inhibowała replikację HIV, a w niektórych przypadkach obserwowano nawet poprawę aktywności w stosunku do wolnego nukleozydu. Ponadto, stwierdzono również wysoką aktywność antywirusową w komórkach CEM/TK⁻.^{88b}



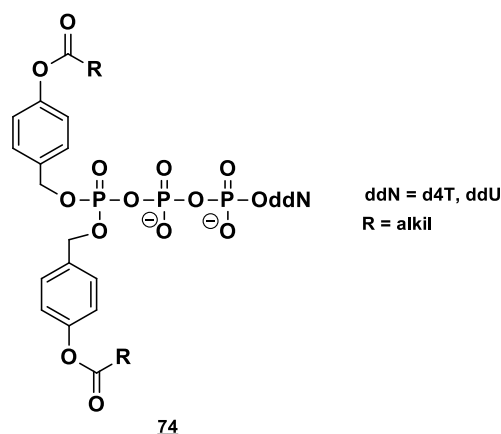
Rys. 21. Struktury proponowanych pronukleotydów w ramach koncepcji DiPPro.^{88b}

Grupa Meiera poszukując efektywnych grup maskujących, zsyntetyzowała również pochodne bis(benzyloksybenzylowe) typu **71b** (**Rys. 21**) zawierające w swojej strukturze podstawniki elektronoakceptorowe lub elektronodonorowe w pozycji *para* reszty benzoilowej. Podobnie jak w przypadku pochodnych **71** i **71a**, zbadano labilność wiązania bezwodnikowego w PBS i ekstrakcie komórkowym. Związki typu **71b** wykazywały większą trwałość w warunkach hydrolizy chemicznej niż analogi **71a**. Badania stabilności wiązania P-O-P w ekstrakcie komórkowym wykazały, że pochodne typu **71b** z silnie elektronoakceptorowymi grupami (np. CF_3 , CN, NO_2) uwalniały (całkowicie lub w większości) ddNDP. Natomiast w miarę wprowadzania coraz to silniejszych donorów elektronów do pierścienia aromatycznego obserwowano

uwalnianie, oprócz difosforanów, również ddNMP.^{88c} Testy aktywności antywirusowej analogów **71b** wykazały wysoką efektywność inhibicji replikacji wirusa dla wszystkich pochodnych tego typu. Ciekawą obserwacją poczyniono natomiast podczas oznaczania aktywności biologicznej w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej. Stwierdzono bowiem 60-krotnie wyższą efektywność inhibicji replikacji HIV dla pochodnych z podstawnikami elektronodonorowymi w porównaniu z d4T. Jednocześnie, pochodne z podstawnikami elektronoakceptorowymi (wydajniej generujące ddNDP w komórce, według testów trwałości w CEM) wykazywały praktycznie brak aktywności biologicznej. Wyniki te tłumaczono zbyt szybkim uwalnianiem difosforanów z cząsteczki pronukleotydu, co prawdopodobnie uniemożliwiło przejście tych ostatnich przez błonę komórkową.^{88c}

Przez wiele lat twierdzono, że dostarczenie do komórki trifosforanu jako proleku jest niemożliwe ze względu na naturalną labilność wiązania bezwodnikowego oraz dużą polarność takich cząsteczek. Dodatkowo, projektowane według koncepcji proleku, trifosforany powinny posiadać grupy maskujące, które potencjalnie mogą ulegać nieselektywnej hydrolizie. W związku z podatnością tych związków na działanie fosfataz istniało również ryzyko ich niskiej stabilności.^{88d} Pomimo tych obaw, grupa Meiera zachęcona pozytywnymi wynikami badań nad pronukleotydami DiPPro dokonała syntezy analogów trifosforanów o podobnej aranżacji grup maskujących, tym razem umieszczonych na reszcie fosforanowej P_γ. Strategię tę nazwano TriPPPro i jest ona, według mojej najlepszej wiedzy, jedyną dotychczas opublikowaną propozycją trifosforanowych proleków.⁸⁹

Meier i współpracownicy podjęli się syntezy serii trifosforanowych pronukleotydów typu **74** (**Rys. 22**), które w założeniu miałyby uwalniać pożądany ddNTP w podobny sposób jak ich difosforanowe odpowiedniki – najpierw poprzez proces inicjowany działaniem enzymów, a następnie spontaniczną 1,6-eliminacją zakończoną usunięciem pierwszej grupy maskującej. Poprzez powtórzenie cyklu przemian, w komórce miałyby być generowany odpowiedni trifosforan nukleozydu.



Rys. 22. Trifosforanowe pronukleotydy proponowane w strategii TriPPro.^{89c}

W celu sprawdzenia możliwych ścieżek rozpadu proponowanych pronukleotydów badano stabilność tych związków w buforze fosforanowym (pH 7,3), PBS wzbogaconym w esterazy z wątroby świni (PLE, ang. *pig liver esterase*) oraz w ekstrakcie komórkowym (CEM/0). W buforze fosforanowym o pH 7,3 obserwowano wzrost stabilności wiązania bezwodnikowego wraz ze wzrostem długości łańcucha R w grupie acylowej pronukleotydów TriPPPro-d4TTP. Jednakże, $t_{1/2}$ bardziej lipofilowych pochodnych był krótszy, co tłumaczono zmienioną rozpuszczalnością lub tworzeniem miceli. W obydwóch mediach wykazujących aktywność enzymatyczną stwierdzono znacznie szybszą hydrolizę grup maskujących, co wskazywało na katalizę enzymatyczną. Chcąc potwierdzić pronukleotydowy mechanizm działania cząsteczek TriPPPro, pochodna **74** z R = C₈H₁₇, została poddana działaniu PLE. Następnie, kiedy za pomocą HPLC stwierdzono całkowity zanik wyjściowego związku, hydrolizat PLE inkubowano z HIV RT i stwierdzono zahamowanie elongacji DNA, podczas gdy w próbie kontrolnej z TriPPPro-TTP następowało wydajne wydłużanie łańcucha. Eksperyment ten potwierdzał hipotezę generowania ddNTP w komórce. Badania w kolejnym medium wykazującym aktywność enzymatyczną (CEM/0) pokazały szybszą niż w PBS hydrolizę grup maskujących ($t_{1/2}$ = 1-2,5 h). Jednakże, w tych warunkach obserwowano również tworzenie się ddNDP powstającego najprawdopodobniej na drodze degradacji ddNTP przez fosfatazy znajdujące się w ekstrakcie.^{89c}

Dodatkowo, zbadano aktywność antywirusową otrzymanych pochodnych **74** i stwierdzono, że wszystkie wykazywały zbliżoną do wolnego nukleozydu efektywność inhibicji replikacji HIV. Ponadto, wszystkie pochodne d4T **74** zawierające R > C₈H₁₇ były wysoce aktywne w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej, a żaden z nich nie

wykazywał większej cytotoksyczności niż d4T.^{89c} Podczas oceny potencjału terapeutycznego pochodnych **74**, zauważono zaskakujący brak aktywności antywirusowej analogu TriPPPro-ddUTP. Jednakże po inkubacji tego związku w ekstrakcie komórkowym stwierdzono jego niezwykle szybką ($t_{1/2} < 1$ min) defosforylację do ddUDP i ddUMP, co tłumaczyło niezgodne z oczekiwaniami wyniki testów biologicznych.^{89d}

5. CHEMICZNA SYNTEZA POLIFOSFORANÓW NUKLEOZYDÓW

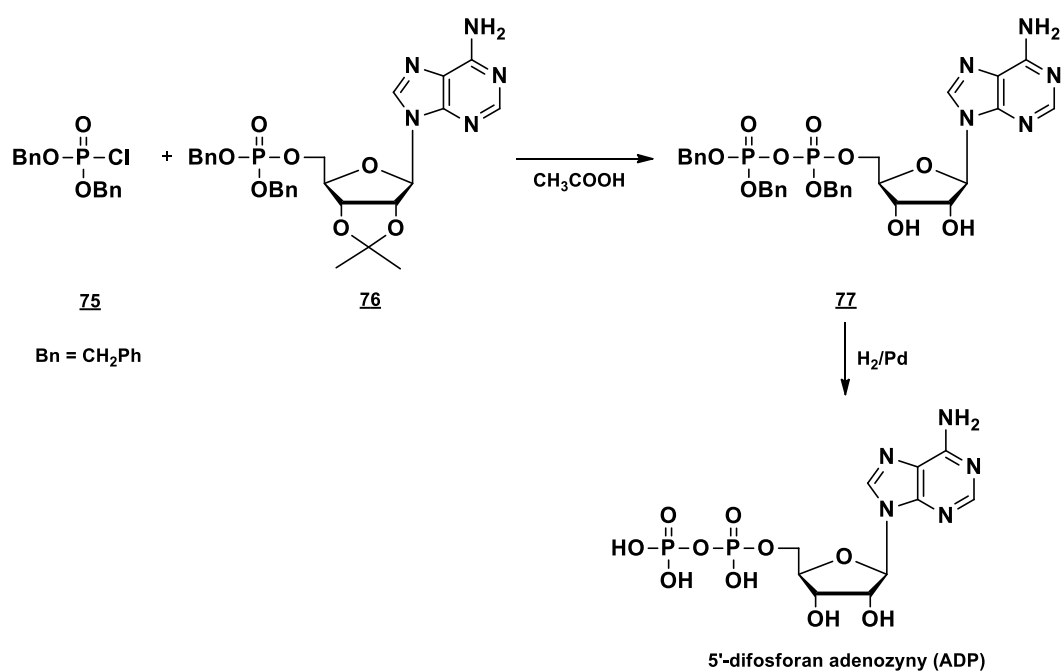
Nukleotydy pełnią ważne funkcje w systemach biologicznych oraz stanowią bloki budulcowe w syntezie kwasów nukleinowych. Naturalne nukleotydy oraz ich syntetyczne analogi od dawna znajdują się w kręgu zainteresowań zarówno biologów, jak i chemików, gdyż pozwalają badać różnorodne systemy biologiczne, stanowią źródło potencjalnych terapeutyków i czynników diagnostycznych. W związku z mnogością pełnionych funkcji, nie dziwi więc wieloletnie, duże zainteresowanie metodami syntetycznymi, które w sposób wydajny mogą dostarczać pożądany nukleotyd. Jednakże, ze względu na obecność wielu reaktywnych centrów w tych cząsteczkach, opracowanie efektywnego protokołu syntetycznego stanowi nadal spore wyzwanie.

Organiczna chemia fosforu ma do swojej dyspozycji dwa podstawowe podejścia syntetyczne pozwalające na otrzymanie polifosforanów. Pierwsze wykorzystuje chemię związków P(V) i polega na zwiększeniu elektrofilowości centrum fosforowego (poprzez aktywację czynnikami kondensującymi), a w efekcie jego podatności na atak nukleofilowy. W drugim podejściu podstawę stanowią bardziej reaktywne związki P(III), których oksydatywne przekształcenia do pochodnych P(V) otwierają nowe możliwości syntetyczne.

5.1. Pierwsze metody syntezy polifosforanów

Pierwsze chemiczne syntezy polifosforanów służyły głównie ustaleniu i potwierdzeniu struktury nukleotydów wyizolowanych z materiałów biologicznych. Pionierem badań w tej dziedzinie był Lord Alexander Todd, który wraz ze swoimi współpracownikami na przełomie lat 40. i 50. XX w. opublikował serię prac dotyczących syntezy fosforanowego wiązania bezwodnikowego.

Do otrzymania pierwszego pirofosforanu nukleozydu doprowadziły wieloletnie badania nad reakcją fosforylacji alkoholi i fenoli chlorofosforanem dibenzylowym **75** (**Schemat 16**). Ustalono wtedy, że ten czynnik fosforylujący może reagować m.in. z wolną grupą 5'-OH odpowiednio maskowanej adenozyiny, dając dibenzylowy 5'-monofosforan adenozyiny **76**. Postanowiono pójść o krok dalej tą drogą i sprawdzić możliwość tworzenia wiązania pirofosforanowego w reakcji dibenzylowego chlorofosforanu **75** z dibenzylowym 5'-fosforanem adenozyiny **76** (**Schemat 16**). Otrzymywanie maskowanego na resztach fosforanowych niesymetrycznego bezwodnika **77** zachodziło dzięki częściowej debenzylacji związku **76** w warunkach kwasowych, co skutkowało generowaniem nukleofilowego fosforanodiestru, z jednoczesnym usuwaniem grupy izopropylowej. Katalityczna hydrogenacja pochodnej **77** powodowała całkowite odblokowanie reszt fosforanowych z utworzeniem docelowego 5'-difosforanu adenozyiny (ADP), który wyizolowano jako sól akrydyniową.⁹⁰ Po wielu modyfikacjach tego protokołu syntetycznego, wydajność otrzymywania czystego produktu wynosiła 55%.⁹¹



Schemat 16. Synteza 5'-difosforanu adenozyiny zaproponowana przez Todd'a i wsp.⁹¹

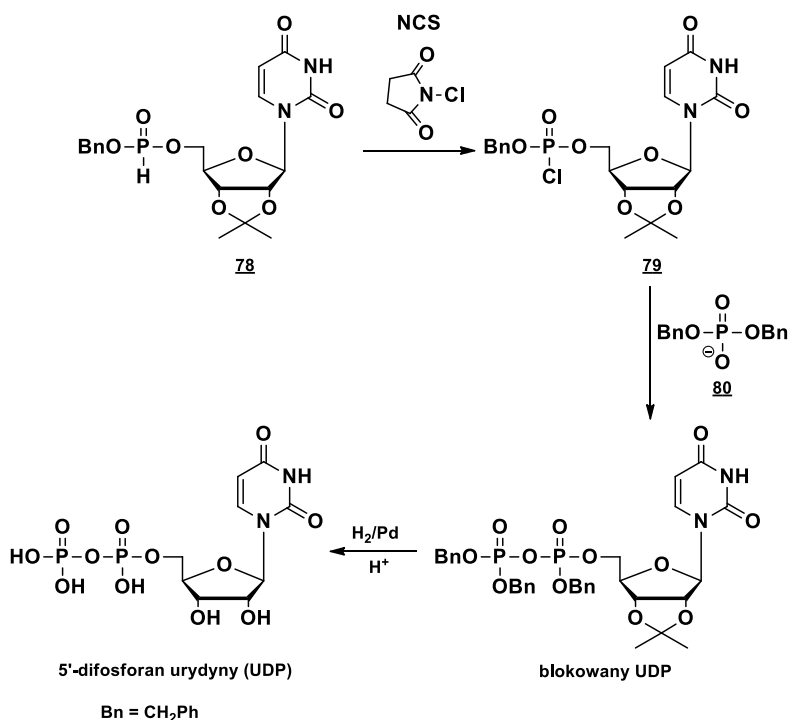
Wykorzystując metodę zaproponowaną dla otrzymywania 5'-difosforanów nukleozydów, Todd i współpracownicy opracowali protokół pozwalający *per analogiam* na syntezę 5'-trifosforanów nukleozydów. Pierwszym zsyntetyzowanym związkiem był 5'-trifosforan adenozyiny (ATP), który posłużył do potwierdzenia struktury wcześniej

wyzolowanych z ekstraktów mięśniowych cząsteczek uznawanych właśnie za ten nukleotyd. Podczas pierwszych prób otrzymywania ATP wspomnianą metodą, spodziewano się problemów z selektywną monodebenzylacją terminalnej reszty fosforanowej oraz z niestabilnością wiązania bezwodnikowego w neutralnej cząsteczce trifosforanu. Pomimo tych obaw, zastosowano tribenzylowy 5'-difosforan adenozyne oraz, podobnie jak poprzednio, dibenzylowy chlorofosforan **75** jako czynnik fosforylujący. Do selektywnego usunięcia jednej grupy benzylovej z reszty fosforanowej P_{β} wykorzystano *N*-metylomorfolinę i początkowo nie stwierdzono występowania niepożądanego monodebenzylacji na reszcie fosforanowej P_{α} . Otrzymany w reakcji kondensacji neutralny tetrabenzylowy ATP poddawano hydrogenacji w celu usunięcia pozostałych grup maskujących. Ostatecznie, ATP otrzymano w postaci soli akrydynowej. Dość niską wydajność tej metody (37%) tłumaczono szybką degradacją wiązania bezwodnikowego w całkowicie zablokowanej cząsteczce 5'-trifosforanu, a jako produkt uboczny obserwowano 5'-difosforan adenozyne.⁹¹

Kolejnym nukleotydem, którego strukturę udowodniono poprzez syntezę chemiczną, był 5'-difosforan urydyny (UDP). Początkowo, zastosowano taką samą metodę, jak przy syntezie pirofosforanu adenozyne, jednakże okazała się ona nieodpowiednia, gdyż prowadziła do tworzenia się dużej ilości produktów ubocznych na skutek pęknięcia wiązania *N*-glikozydowego.⁹² W związku z powyższym postanowiono opracować inną metodę tworzenia wiązania P-O-P dla tej właśnie cząsteczki. Najbardziej wydajnym rozwiązaniem okazało się zastosowanie w syntezie jako substratu benzylovego H-fosfonianu urydyny **78** (*Schemat 17*). Związek ten poddano reakcji utleniania z *N*-chlorosukcynimidem (NCS), generując odpowiedni chlorofosforan **79**, który bez izolacji kondensowano z solą trietyloamoniową dibenzylowego fosforanu **80**. Prowadziło to do powstawania 5'-difosforanu urydyny o całkowicie maskowanym ładunku na resztach fosforanowych. Podobnie jak w przypadku ADP i ATP, reszty benzylove usuwano na drodze hydrogenolizy, a grupę izopropylidenową, w warunkach kwasowych. Stosując metody strąceniowe, izolowano produkt jako sól barową z wydajnością całkowitą ok. 25%.

Pierwsze syntezы polifosforanów opracowane przez Todda i współpracowników nakierowane były przede wszystkim na otrzymanie i izolację odpowiednich di- lub trifosforanów naturalnych nukleozydów, w celu weryfikacji struktur przypisanych

nukleotodom wyodrębnionym z materiałów biologicznych. Jednakże w związku z powstawaniem wielu produktów ubocznych, niskimi wydajnościami oraz niedogodnościami syntetycznymi, podejścia te nie znalazły szerszego zastosowania w syntezie polifosforanów.



Schemat 17. Otrzymywanie UDP z wykorzystaniem H-fosfonianu jako substratu.

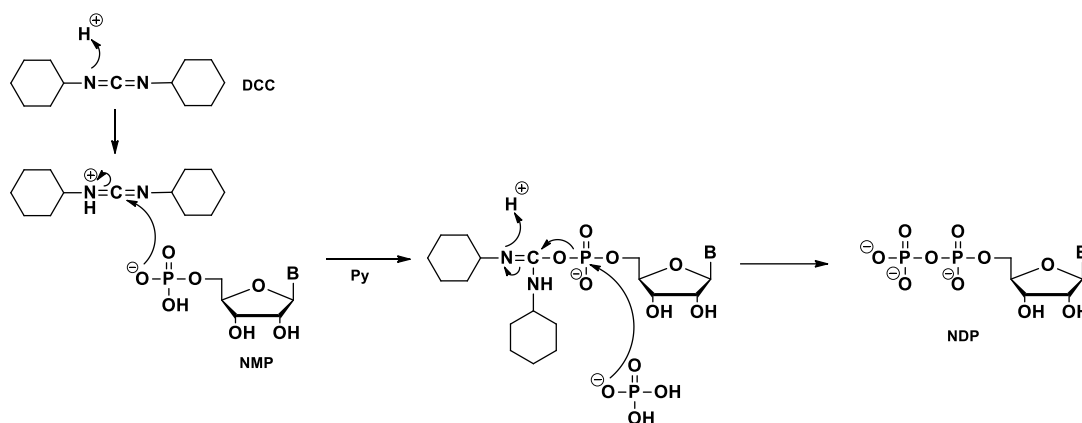
Dalszy kierunek badań koncentrował się na kilku kluczowych reagentach P(V) i P(III), którymi były: dichlorofosforany, monoestry amidofosforanów, fosforanotriestry, mieszane bezwodniki fosforynowo-fosforanowe typu P(III)-P(V) oraz fosforynotriestry. W dalszej części rozprawy przedstawiam krótko najważniejsze podejścia wykorzystywane w syntezie polifosforanów bazujące na ww. związkach.

5.2. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem karbodiimidów

Ograniczenia metody tworzenia polifosforanów poprzez chlorofosforany doprowadziły do rozwinięcia kolejnego podejścia. Khorana i współpracownicy zaproponowali karbodiimidy jako czynniki sprzęgające w reakcji kondensacji dwóch różnych fosforanów (**Schemat 18**). Wprowadzenie karbodiimidów do syntezy, a w szczególności *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), pozwoliło na opracowanie relatywnie prostej metody syntezy difosforanów nukleozydów (adenozyny, urydyny, guanozyny, tymidyny, deoksycytydyny).⁹³ Podczas wstępnych badań mechanizmu

reakcji stwierdzono tworzenie się pirofosforanów w układach, w których pirydyna stosowana była jako rozpuszczalnik, natomiast nie obserwowano powstawania pożądanego produktu, gdy w układzie reakcyjnym znajdowała się tri-*n*-butyloamina. Sugerowało to kluczową dla aktywacji cząsteczki DCC rolę jonów H^+ , które inicjowały ten proces. *N,N'*-Dicykloheksylokarbodiimid był wystarczająco zasadowy, by konkurować o proton z pirydyną, natomiast gdy w układzie znajdowała się mocniejsza zasada, – aktywacja DCC nie zachodziła, co uniemożliwiało reakcję kondensacji.⁹⁴ Przy stosowaniu nadmiaru czynnika sprzęgającego (50 ekw.) obserwowano powstawanie jako głównego produktu 5'-difosforanu nukleozydu (65%).⁹⁵ Postulowany mechanizm reakcji tworzenia 5'-difosforanów nukleozydów z użyciem DCC przedstawiono na **Schemacie 18**.

Niestety, przeszkodą w efektywnym otrzymywaniu di- i trifosforanów tą metodą był brak selektywności reakcji – obok pożądaných NDP postawały również symetryczne difosforany (difosforan nieorganiczny oraz difosforan dinukleozydu), co można tłumaczyć podobną nukleofilowością użytych do reakcji fosforanów. Wydajności otrzymywania 5'-difosforanów nukleozydów w tej reakcji były niezbyt wysokie i wynosiły 25-35%.



Schemat 18. Mechanizm reakcji tworzenia 5'-difosforanu nukleozydu z wykorzystaniem DCC jako czynnika kondensującego.

Pomimo optymalizacji opisanych powyżej metod otrzymania polifosforanów, nie znajdują one obecnie szerszego zastosowania.

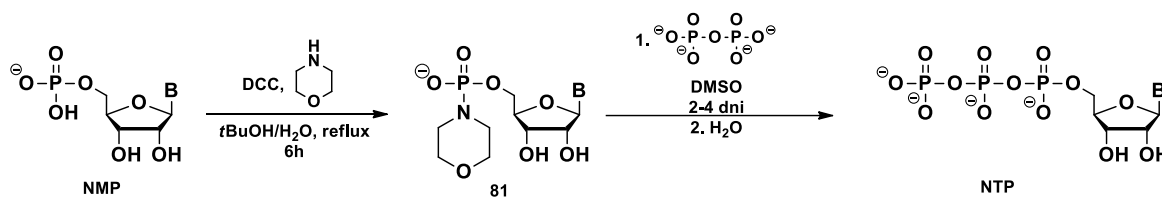
5.3. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem amidofosforanów

Podczas poszukiwania efektywnych sposobów aktywacji centrum fosforowego, zwrócono uwagę na amidofosforany. W trakcie wstępnych badań, Khorana i Chambers

zauważyli, że kwas amidofosforanowy w pH poniżej 7 ulega szybkiej hydrolizie do kwasu fosforowego. W tych warunkach protonizowanie przekształcało resztę amidkową w lepszą grupę odchodzącą (amoniak) oraz zwiększała znacząco elektrofilowość atomu fosforu. Zaletą stosowania amidofosforanów w syntezie polifosforanów, w porównaniu z metodą z wykorzystaniem chlorofosforanów, była możliwość stosowania tylko częściowo zablokowanych reszt fosforanowych w substratach, co wprost przekładało się na zmniejszenie udziału reakcji ubocznych spowodowanych hydrolizą wiązania bezwodnikowego w polifosforanach. Kolejną korzyścią stosowania tego podejścia była stosunkowo niska reaktywność amidofosforanów w reakcji z alkoholami, stąd też w proponowanych strategiach syntetycznych maskowanie grup 2'- i 3'-OH pierścienia rybozy okazywało się zwykle zbędne.⁹³

Pierwsze syntezy polifosforanów wykorzystujące takie podejście bazowały na prostych amidofosforanach z grupą amidkową (-NH₂). Jednak niska reaktywność tych związków ograniczyła ich zastosowanie jedynie do kilku przypadków, jak ADP, ATP i UDP.⁹⁶ Aby zwiększyć reaktywność amidofosforanów, a zarazem polepszyć ich rozpuszczalność w stosowanych rozpuszczalnikach organicznych, postanowiono sprawdzić użyteczność ich *N*-podstawionych analogów, 2° amin. W tej grupie wyróżnić można dwa główne rodzaje aktywacji funkcji fosforanowej – przez generowanie morfolidofosforanów i imidazolidofosforanów z odpowiednich NMP.

Pierwsza z nich polegała na zastosowaniu morfolidofosforanów typu **81** (**Schemat 19**) jako reaktywnych związków pośrednich generowanych *in situ*, które ulegały podstawieniu solami tetra-*n*-butyloamoniowymi mono- lub difosforanów, prowadząc odpowiednio do di- lub trifosforanów nukleozydów. Stosowanym rozpuszczalnikiem była zwykle pirydyna. Podczas dalszych prac nad rozwijaniem tej metody zauważono jednak, że wpływa ona niekorzystnie na przebieg tej reakcji, powodując m.in. równowagowanie między NTP a NDP. Zmiana rozpuszczalnika na DMSO zminimalizowała ilość reakcji ubocznych i pozwoliła otrzymywać różne NTP z wydajnościami 73-80% (**Schemat 19**).⁹⁷

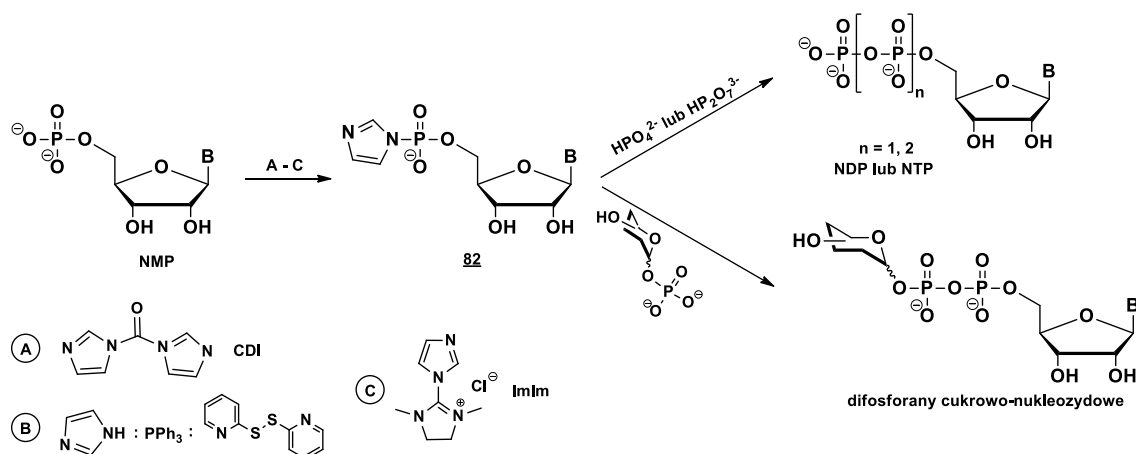


Schemat 19. Synteza NTP wg Khorany i wsp. poprzez morfolidofosforan jako związek przejściowy.

Opracowana przez Moffatta i Khoranę metoda syntezy polifosforanów poprzez aktywację centrum fosforowego w formie morfolidofosforanów jest uniwersalna i sprawdza się zarówno w syntezie analogów nukleotydów naturalnych, jak i nienaturalnych, włączając w ten szereg pochodne zawierające inne niż ryboza czy deoksyryboza reszty cukrowe.⁹⁸

Inny sposób aktywacji NMP opiera się na wprowadzeniu na centrum fosforowe grupy imidazolowej zamiast morfolidowej. Cramer i współpracownicy pokazali, że imidazolidofosforany **82** mogą być łatwo generowane w reakcji fosforanu nukleozydu z karbonyldiimidazolem (CDI) (**A**, **Schemat 20**) i są użytecznymi reagentami w syntezie pirofosforanów.⁹⁹ Generowane w ten sposób imidazolidofosforany typu **82** ulegają łatwo reakcji podstawienia z odpowiednimi fosforanami, co prowadzi do otrzymywania NDP lub NTP (**Schemat 20**). Reakcja zachodzi w łagodnych warunkach i nie wymaga stosowania grup ochronnych w resztach nukleozydowych. Ten protokół syntetyczny rozwinięty został następnie przez Hoarda i Otta, a wydajności izolowanych trifosforanów deoksyrybonukleozydów wynosiły od 20% do 70%.¹⁰⁰ Imidazolidofosforany **82** stosowano również do otrzymywania pochodnych nukleotydów zawierających różne naturalne lub nienaturalne reszty cukrowe przyłączone do grupy fosforanowej P_β (**Schemat 20**).¹⁰¹

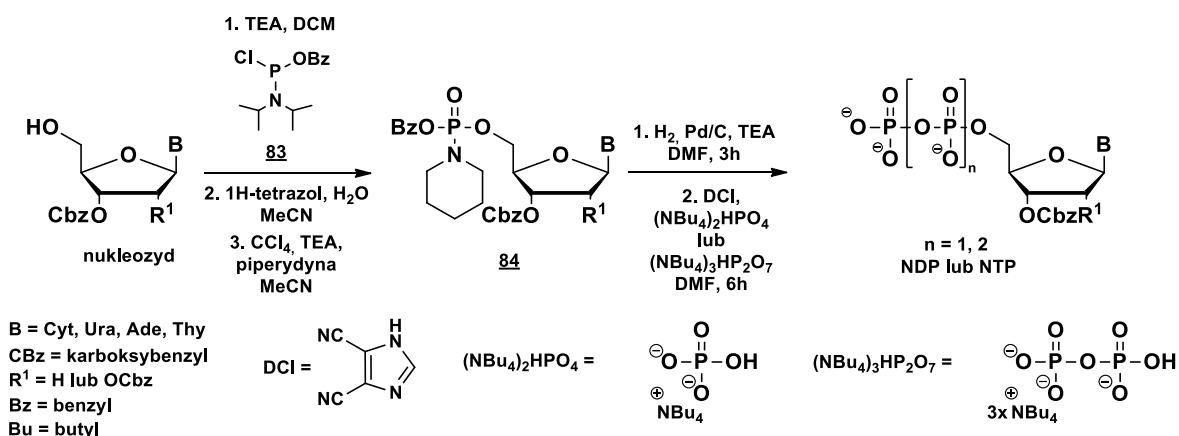
Efektywną modyfikację metody otrzymywania difosforanów rybonukleozydów przez imidazolidofosforany zaproponowali Kore i współpracownicy.¹⁰² Wykorzystali oni jako czynnik generujący amidofosforan **82** reagent imidazol/trifenylfosfina/2,2'-ditiopirydyna, wcześniej opracowany przez Mukaiyama i współpracowników (**B**, **Schemat 20**).¹⁰³ Po wygenerowaniu związku **82** dodawano do układu sól fosforanową oraz chlorek cynku(II), który pełnił rolę katalizatora reakcji kondensacji, zwiększając kwasowość grupy odchodzącej. Kondensacja do NDP była zwykle zakończona w ciągu kilku godzin, a finalne produkty tworzyły się z bardzo dobrymi wydajnościami (95-97%).¹⁰²



Schemat 20. Synteza pochodnych nukleotydydowych z wykorzystaniem imidazolidofosforanów jako związków pośrednich.

Warto podkreślić, że dotychczas opracowano wiele metod syntezy polifosforanów różniących się od siebie czynnikiem generującym imidazolidofosforan z odpowiedniego fosforanomonoestry.¹⁰⁴ Jedną z ostatnich propozycji jest zastosowanie chlorku 2-imidazoilo-1,3-dimetyloimidazolu (tzw. ImIm, **C**, **Schemat 20**), który z powodzeniem wykorzystano w syntezie difosforanów nukleozydów zawierających reszty cukrowe na atomie fosforu P_β .¹⁰⁵

W 2013 roku Sun i współpracownicy opisać inny wariant syntezy di- i trifosforanów rybo- oraz deoksynukleozydów oparty o aktywację centrum fosforowego w formie piperydyniowych amidofosforanów (**Schemat 21**). Wieloetapowy protokół syntetyczny zakładał najpierw reakcję odpowiednio maskowanego nukleozydu z chloroamidofosforanem **83**, która prowadziła do powstawania amidofosforanu nukleozydu. Związek ten hydrolizowany do odpowiedniego H-fosfonianu i poddany oksydatywnej kondensacji z piperydyną dawał diester piperydynylofosforanu nukleozydu **84** (**Schemat 21**). Następnie, w procesie hydrogenacji generowano odblokowany amidofosforan, który w reakcji substytucji grupy piperydyniowej przez sól tetrabutylamoniową mono- lub difosforanu, prowadził do otrzymania polifosforanów nukleozydów z dobrymi wydajnościami (68-81%).¹⁰⁶ Kluczowym reagentem w tym układzie był 4,5-dicyjanoimidazol (DCI), który jako donor protonu, katalizował reakcję substytucji na centrum fosforowym.

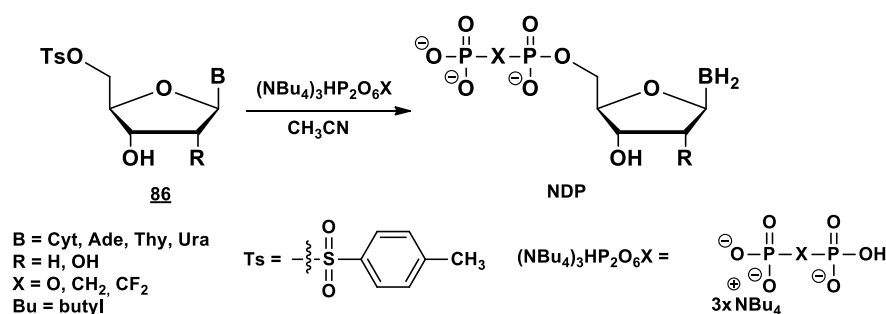


Schemat 21. Otrzymywanie polifosforanów z wykorzystaniem piperydinylofosforanu.

W większości wspomnianych powyżej metod opartych na aktywacji centrum fosforowego poprzez tworzenie amidofosforanów, przekształcenie substratu w pożądany produkt (NDP lub NTP) trwało dość długo (w niektórych przypadkach nawet kilka dni), a wydajności izolowanych związków nie zawsze były zadowalające.

5.4. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem 5'-O-tosylowanych nukleozydów

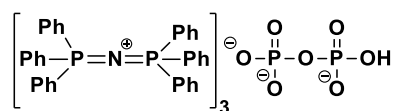
Całkowicie inne podejście syntetyczne zaproponowała w połowie lat 80. XX w. grupa Poultera, która opracowała metodę syntezy 5'-difosforanów nukleozydów bazującą na jednoetapowym podstawieniu nukleofilowym ($\text{S}_{\text{N}}2$) 5'-O-tosylowanych nukleozydów **86** w acetonitrylu przez sól tetrabutylamoniową pirofosforanu (**Schemat 22**). Reakcja pozwalała otrzymywać różne NDP z wydajnością 43% do 83% w zależności od rodzaju nukleozydu. Metoda ta została zastosowana również do syntezy analogów 5'-difosforanów zawierających grupę metylenową w pozycji mostkującej.¹⁰⁷



Schemat 22. Metoda Poultera syntezy 5'-difosforanów nukleozydów.

Dużym usprawnieniem omawianej strategii było zastosowanie specjalnej soli tris[bis(trifenylfosforanylideno)] (PPN) pirofosforanu (**Rys. 23**),¹⁰⁸ jako P(V) nukleofila. Związek ten zaproponowany przez Hodgsona i współpracowników, w porównaniu ze

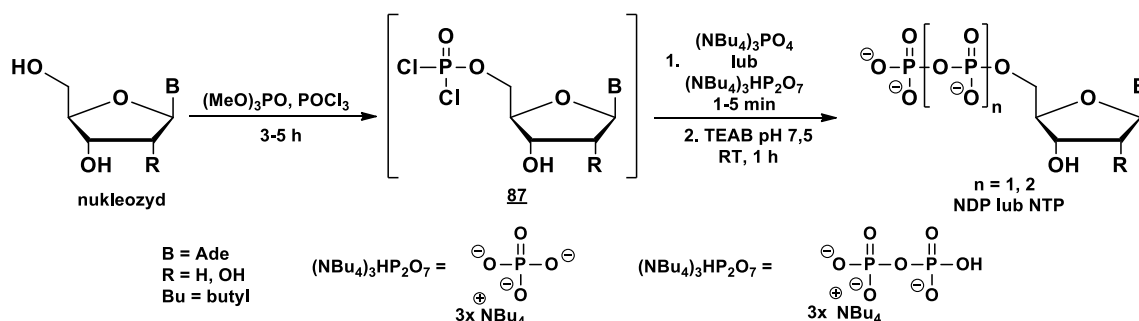
standardowo stosowanymi solami tetraalkiloamoniowymi, charakteryzował się dużo mniejszą higroskopijnością, co miało duże znaczenie w reakcjach wrażliwych na obecność wody. Reagent wykorzystano w metodzie Poultera i z dobrymi wydajnościami otrzymywano 5'-difosforany nukleozydów stosując metody strąceniowe do oddzielenia nadmiaru nukleofila, co znacznie ułatwiało izolację produktów.¹⁰⁸



Rys. 23. Pirofosforan PPN.

5.5. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem dichlorofosforanów

Kolejną wartą omówienia metodą jest podejście opisane przez Ludwiga, a jej zaletą jest stosowanie nieblokowanych nukleozydów jako substratów. Wykorzystując protokół Yoshikawy¹⁰⁹, tj. reakcję nieblokowanego nukleozydu z POCl_3 w fosforanie trimetylu jako rozpuszczalniku, generowano reaktywny dichlorofosforan **87**, który po dodaniu tetraalkiloamoniowych soli fosforanów, a następnie hydrolizie w buforze TEAB (pH 7,5), prowadził do powstawania di- lub trifosforanów nukleozydów (**Schemat 23**).¹¹⁰



Schemat 23. Synteza 5'-difosforanu nukleozydu z wykorzystaniem dichlorofosforanu.

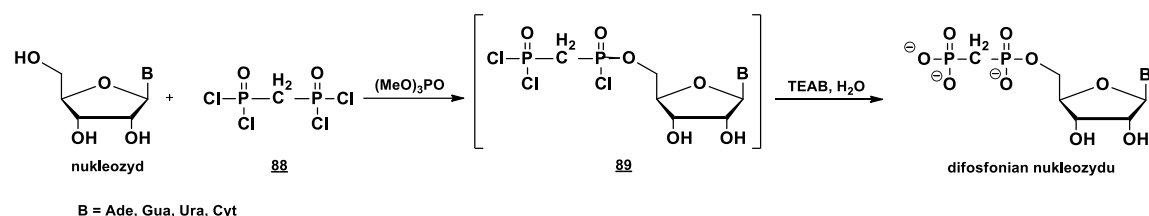
Niestety metoda zaproponowana przez Ludwiga, w związku z silną aktywacją centrum fosforowego, generowała szereg produktów ubocznych trudnych do rozdzielania, co znacząco obniżało wydajność syntezy.¹¹¹ Ponadto, jej wydajność była mocno zależna od rodzaju użytego nukleozydu. Aby zminimalizować te wady, Hodgson i współpracownicy postanowili sprawdzić możliwość wykorzystania w metodzie opracowanej przez Ludwiga, wspomnianej wcześniej soli PPN pirofosforanu (**Rys. 23**). Podobnie jak poprzednio, udowodniono, że zaproponowany reagent może stanowić

efektywną alternatywę dla najczęściej stosowanych soli tetraalkiloamoniowych fosforanów.¹¹²

Dalsza modyfikacja tej metody, polegająca na wykorzystaniu PSCl_3 w pierwszym etapie syntezy, pozwoliła na otrzymanie analogów α -tiotrifosforanów ($\text{dAZTP}_{\alpha}\text{S}$, $\text{dGTP}_{\alpha}\text{S}$, $\text{UTP}_{\alpha}\text{S}$, $\text{dTTP}_{\alpha}\text{S}$) z wydajnościami 26% - 60%.¹¹³

Darżynkiewicz i współpracownicy, bazując na wspomnianym już protokole syntetycznym Yoshikawy,¹⁰⁹ zaproponowali zastosowanie tetrachlorodifosfonianu z mostkiem metylenowym pomiędzy atomami fosforu **88** (*Schemat 24*) jako efektywnego odczynnika fosfonylującego w reakcji z nieblokowanymi nukleozydami. Stwierdzono, że związek **88** jest bardziej reaktywny niż POCl_3 , używany standardowo w metodzie Yoshikawy, co przekładało się wprost na szybkość fosfonylacji. Obecność w pozycji mostkującej grupy $-\text{CH}_2-$, która nie może donować elektronów w wyniku oddziaływania typu *back-donation*, przekształca centrum fosforowe w lepszy elektrofil, przez co reakcja przebiega szybciej i wydajniej. Po wygenerowaniu trichloropirofosforanu **89** i hydrolizie w buforze TEAB (pH 7,5) uzyskano z dobrymi wydajnościami (ok. 80%) trudne do otrzymania analogi (P- CH_2 -P) difosfonianów nukleozydów.¹¹⁴

Warto w tym miejscu nadmienić, że inny odczynnik stosowany w reakcji fosforylacji nukleozydów, tetrachloropirofosforan ($\text{P}_2\text{O}_3\text{Cl}_4$), na skutek obecności atomu tlenu w pozycji mostkującej difosforanu, wykazywał odmienną reaktywność. Odczynnik ten wykorzystywano mianowicie do wprowadzania grupy fosforanowej w pozycji 5'-OH nukleozydów poprzez generowanie reaktywnego dichlorofosforanu **87** (*Schemat 23*), który ulegając następnie hydrolizie, dawał odpowiedni 5'-monofosforan nukleozydu.¹¹⁵

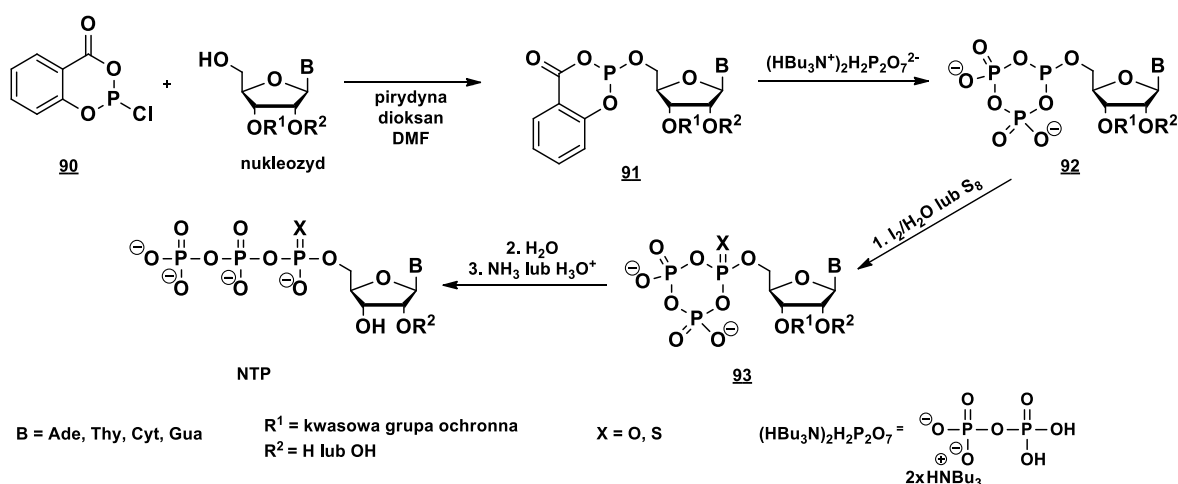


Schemat 24. Metoda otrzymywania analogów pirofosfonianów nukleozydów z grupą metylenową w pozycji mostkującej opracowana przez Darżynkiewicza i wsp.

5.6. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem cyklicznych fosforynotriestrów

Powyżej omawiane metody syntezy polifosforanów opierały się na wykorzystaniu reagentów zawierających atom fosforu na V stopniu utlenienia. Pod

koniec lat 80. XX w. Ludwig i Eckstein zaproponowali zupełnie nowe podejście syntetyczne do otrzymywania trifosforanów nukleozydów oraz ich α -tio-analogów, bazujące na reaktywności mieszanych bezwodników typu P(III)-P(V) (**Schemat 25**). W metodzie tej nukleozydy muszą być odpowiednio blokowane ze względu na nieregioselektywność fosfitylacji salicylochlorofosforem **90**. W pierwszym etapie syntezy powstaje cykliczny salicylofosforin nukleozydu **91**, który pod wpływem pirofosforanu (sól tributylamoniowa) przekształca się w kluczowy dla całego procesu mieszany bezwodnik P(III)-P(V) **92**, a następnie po utlenianiu i hydrolizie, daje finalny produkt, odpowiedni 5'-trifosforan nukleozydu (**Schemat 25**).¹¹⁶

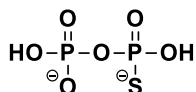


Schemat 25. Otrzymywanie NTP i NTP α S metodą Ludwiga i Ecksteina.¹¹⁷

Postulowano, że rozpad związku pośredniego **91** zachodzi poprzez atak nukleofilowy pirofosforanu na centrum fosforowe z odejściem karboksylanu, a następnie zamknięcie pierścienia w wyniku wewnątrzcząsteczkowego podstawienia grupy fenylowej.¹¹⁶ Następnie mieszany bezwodnik **92** utleniało jodem lub siarką, co prowadziło do cyklicznych trifosforanów nukleozydów **93** lub ich tio pochodnych. Po ich hydrolizie otrzymywano trifosforany nukleozydów w serii rybo oraz deoksy (utlenianie w układzie $\text{I}_2/\text{H}_2\text{O}$) lub ich α -tio analogi (utlenianie elementarną siarką) z wydajnościami 60-75%. W związku z dużą reaktywnością salicylochlorofosforanu **90** należy pamiętać, że omawiana reakcja jest wrażliwa na wodę i warunki bezwodne są konieczne dla zminimalizowania ilości powstających niepożądanych produktów ubocznych.^{104a}

W toku dalszych prac badawczych nad rozwinięciem możliwości syntetycznych tej metody, Ludwig i Eckstein zaproponowali wykorzystanie soli tiopirofosforanu (**Rys. 24**) jako nukleofila w reakcji z cyklicznym związkiem **91**. Pozwoliło to, w połączeniu

z utlenianiem centrum P(III) jodem lub siarką, na opracowanie metody otrzymywania tioanalogów 5'-trifosforanów nukleozydów z różnym umiejscowieniem heteroatomu w wiązaniu bezwodnikowym cząsteczki.¹¹⁸

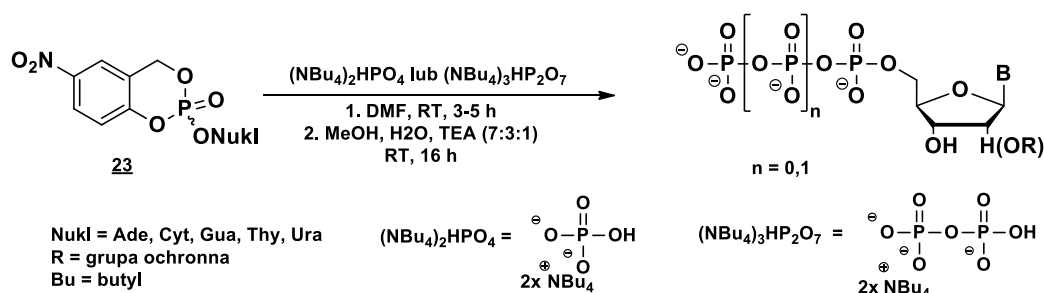


Rys. 24. Tiopirofosforan stosowany przez Ludwiga i Ecksteina.

Opracowana przez Ludwiga i Ecksteina metoda syntezy trifosforanów (tzw. *one-pot, three-steps*) jest jedną z powszechniej stosowanych współcześnie dla otrzymywania NTP oraz ich różnych analogów.¹¹⁷

5.7. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem cyklicznych fosforanotriestrów

W 2008 roku Meier i współpracownicy opracowali nową, efektywną metodę syntezy di- i trifosforanów nukleozydów. Wykorzystali do tego celu reakcję cyklicznych fosforanotriestrów nukleozydów typu *cycloSal* **23** (*Schemat 26*) z solą tetrabutylamoniovą monofosforanu lub difosforanu, co pozwalało na otrzymanie odpowiednio NDP lub NTP z wydajnościami od 40% do 80%. Odpowiednią reaktywność fosforanotriestru typu **23**, zapewniał podstawnik nitrowy w pierścieniu aromatycznym, który wyciągając elektrony, czynił centrum fosforowe bardziej elektrofilowym, a przez to bardziej podatnym na atak P(V) nukleofila. Wyjściowy związek **23** otrzymywano w reakcji chlorku fosforu(III) (PCl₃) i 2-(hydroksymetylo)-4-nitrofenolu, a powstały fosforyn poddawano reakcji oksydatywnej kondensacji z odpowiednim nukleozydem. Grupa Meiera wykorzystwała reaktywny fosforanotriester **23** również do otrzymywania analogów 5'-difosforanów nukleozydów z resztą cukrową na terminalnym atomie fosforu.¹¹⁹ Wadą tego podejścia jest dość długi czas reakcji (w zależności od stosowanego nukleozydu, około doby).¹²⁰

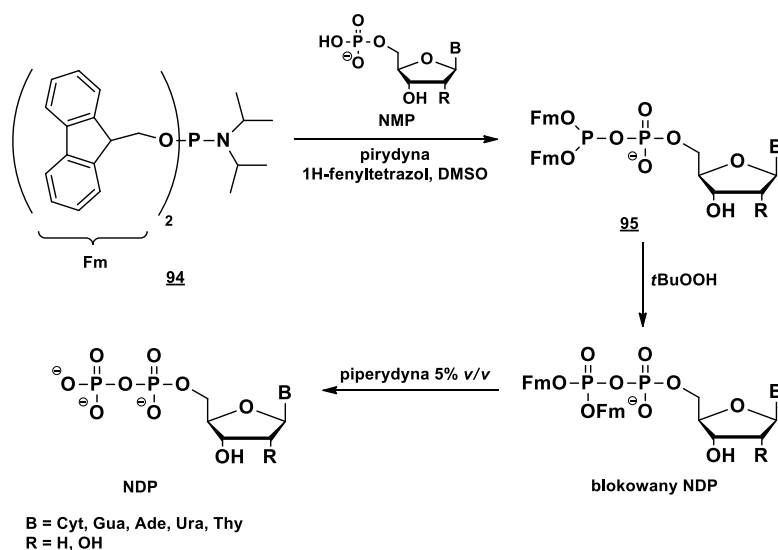


Schemat 26. Synteza polifosforanów poprzez związki typu *cycloSal* wg Meiera i wsp.¹²⁰

5.8. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem mieszanych bezwodników fosforyno-fosforanowych P(III)-P(V)

Jedną z ostatnio zaproponowanych metod syntezy polifosforanów została opisana w 2014 roku przez Jessena i współpracowników i bazuje na dużej reaktywności, generowanych *in situ*, mieszanych bezwodników fosforyno-fosforanowych [P(III)-P(V)] (**Schemat 27**). W pierwszym etapie następowała reakcja amidofosforynu **94** z fosforanem nukleozydu, prowadząca do mieszanego bezwodnika **95**, którego utleniano, a po usunięciu grup blokujących (β -eliminacja) otrzymywano z dobrymi wydajnościami (75-93%) 5'-difosforan nukleozydu w formie soli piperydyniowej (**Schemat 27**). Jeśli jako substrat był użyty NDP, metoda ta prowadziła do odpowiednich 5'-trifosforanów nukleozydów.¹²¹

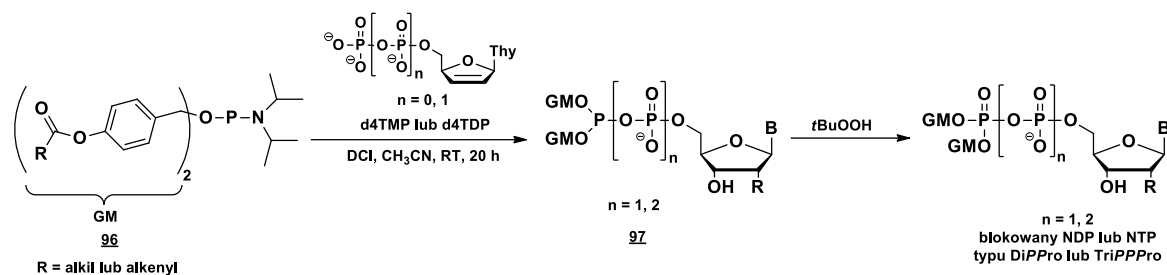
Dodatkowo, podobnie jak w innych metodach opierających się na chemii związków P(III), w reakcji tej kluczowe są bezwodne warunki, gdyż ślady wody prowadzą do powstawania różnych produktów ubocznych. Zaletami tej metody są krótki czas reakcji, łatwość oczyszczania produktu oraz względnie wysokie wydajności.^{104a}



Schemat 27. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem mieszanych bezwodników P(III)-P(V).

Podjęcie wykorzystujące mieszane bezwodniki P(III)-P(V) zastosował również Meier wraz ze współpracownikami do syntezy pronukleotydów typu DiPPro i TriPPPPro (*Rozdział IV.4.2.3.*). W reakcji odpowiednio blokowanego resztami acyloksybenzylowymi amidofosforynu **96** z solą tetraalkiloamoniową monofosforanu lub difosforanu nukleozydu antywirusowego (np. d4T) powstał mieszany bezwodnik **97**, który utleniano wodoronadtlenkiem *tert*-butylu (*t*BuOOH) i otrzymywano 5'-difosforany nukleozydów

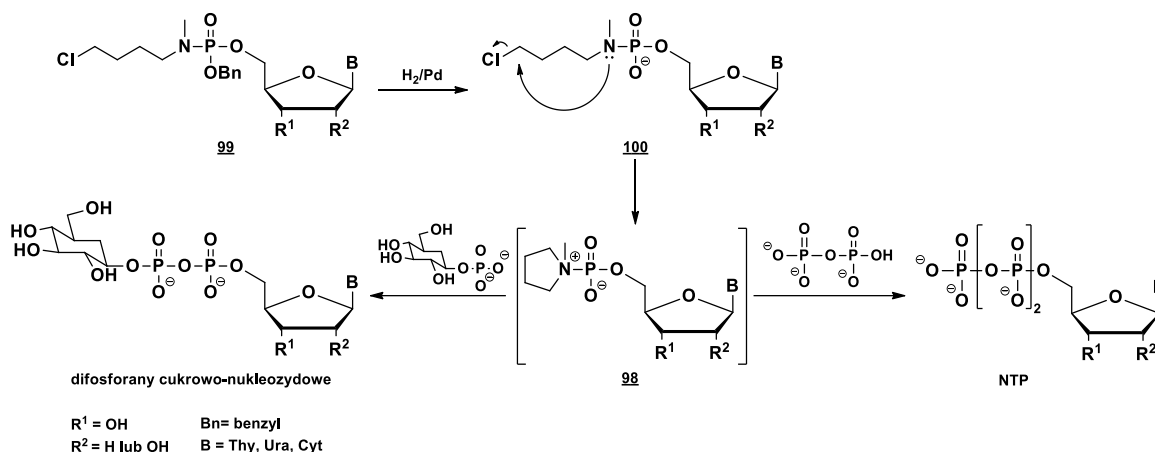
z grupami maskującymi na terminalnej reszcie fosforanowej (**Schemat 28**). Odpowiednio zablokowane NDP lub NTP otrzymywano z wydajnościami 31-41% i 26-70%.^{88a,89c}



Schemat 28. Synteza pronukleotydów DiPPro przez mieszany bezwodnik P(III)-P(V) zaproponowana przez Meiera i wsp.

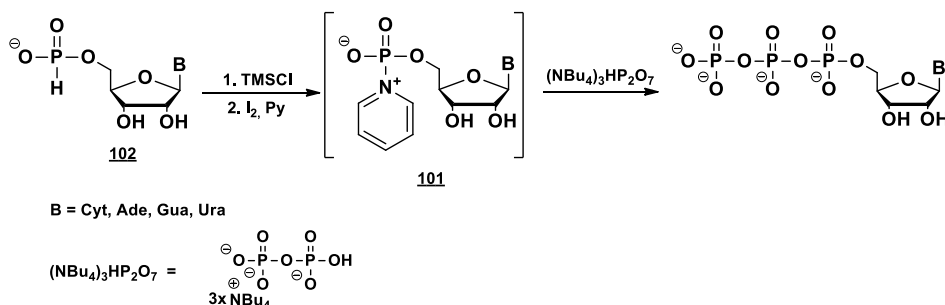
5.9. Synteza polifosforanów z wykorzystaniem fosfobetain

Na początku XXI w. Borch i współpracownicy, rozszerzając strategię amidofosforanową, zaproponowali nowy sposób aktywacji centrum fosforowego stosując fosfobetainowy związek pośredni – wysoce reaktywny piroldyniofosforan **98** (**Schemat 29**), który efektywnie ulegał reakcji podstawienia, prowadząc szybko do tworzenia zarówno 5'-di- i trifosforanów nukleozydów, jak i dipodstawionych 5'-difosforanów zawierających reszty cukrowe na funkcji fosforanowej P_β (**Schemat 29**).¹²² Wraz z generowaniem bardzo reaktywnego jonu obojnego **98**, wzrastała znacząco podatność centrum fosforowego na atak nukleofilowy, głównie poprzez obecność dobrej grupy opuszczającej przy atomie fosforu. Wpłynęło to korzystnie również na szybkość tworzenia finalnego produktu – 1h dla otrzymywania cukrowej pochodnej NDP oraz 10 minut dla tworzenia NTP. W przypadku analogów difosforanów obserwowano również powstawanie niewielkich ilości monofosforanów nukleozydów, co tłumaczono obecnością śladów wody w układzie reakcyjnym.^{122a} Pomimo dobrych wydajności, metoda ta nie została dotychczas wykorzystana na szerszą skalę. Może to być spowodowane długą i dość złożoną syntezą potrzebną do uzyskania wyjściowego amidofosforanu diestru **99**, który dopiero po usunięciu grupy benzylowej, a następnie cyklizacji powstałego związku **100**, generował reaktywny zwitterjon **98**.¹¹⁷



Schemat 29. Otrzymywanie polifosforanów z wykorzystaniem zwitterjonowego związku pośredniego (pirolidyniofosforanu).

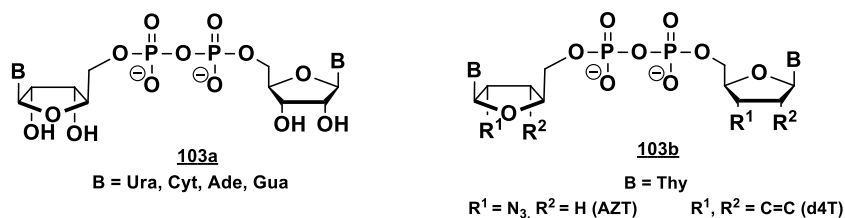
Innym typem fosfobetain, który potencjalnie może mieć zastosowanie w syntezie polifosforanów jest pirydyniofosforan nukleozydu **101** (**Schemat 30**). Możliwość tworzenia się takiego związku pośredniego w reakcji estru kwasu metafosforowego z pirydyną postulował Michelson już w latach 60. XX w.,¹²³ jednakże przez wiele lat nie znalazł on praktycznego zastosowania w syntezie wiązania bezwodnikowego. Niewielkie zainteresowanie związkami typu **101** spowodowane było brakiem efektywnej metody generowania tego typu zwitterjonów. Dopiero pod koniec lat 90. Stawiński i współpracownicy opracowali wydajny i prosty sposób tworzenia fosfobetainy typu **101** z H-fosfonianów monoestrów **102** i pokazali jego dużą reaktywność z różnymi nukleofilami, m.in. alkoholami, aminami, fluorkami.¹²⁴ W 2008 roku, Sun i współpracownicy wykorzystali omawianą fosfobetainę do otrzymywania NTP poprzez reakcję związku **101** z solą tetrabutylamoniową pirofosforanu (**Schemat 30**). Wydajności izolowanych produktów były umiarkowane i wynosiły 26-41%.¹²⁵



Schemat 30. Synteza NTP z wykorzystaniem pirydyniofosforanów.

Możliwość tworzenia *in situ* pirydyniofosforanu **101** oraz jego duża podatność na nukleofilowe podstawienie, została wykorzystana przez ten sam zespół badawczy do

otrzymywania symetrycznych difosforanów dinukleozydów. W tej metodzie, wygenerowany podobnie jak poprzednio zwitterjonowy związek **101** poddawano reakcji z 1 ekw. wody, co pozwalało otrzymywać z dobrymi wydajnościami (70-75%) homodinukleotydy w serii rybo **103a** oraz pochodne difosforanów zawierające nukleozydy o znanej aktywności antywirusowej – AZT oraz d4T **103b** (Rys. 25).¹²⁶



Rys. 25. Homodinukleotydy otrzymane przez Sun i wsp.

Reaktywność fosfobetainy **101** w stosunku do nukleofili typu fosforanowego [P(V) nukleofili] postanowiłam wykorzystać jako punkt wyjścia dla moich badań nad syntezą difosforanów dideoksynukleozydów, co zostało opisane w części *Wyniki i dyskusja*.

6. PODSUMOWANIE WSTĘPU LITERATUROWEGO

Dokładne poznanie mechanizmów cyklu życiowego HIV pozwoliło na racjonalne projektowanie leków ukierunkowanych na dobrze zdefiniowane cele molekularne. Obecnie stosowana terapia antyretrowirusowa pozwala wprawdzie utrzymać wiremę na poziomie niewywołującym AIDS, wymaga jednak ciągłego podawania kilku różnego typu leków, aby zredukować możliwości wystąpienia lekooporności wirusa.

Jednym z głównych celów biologicznych w terapii anti-HIV jest proces odwrotnej transkrypcji. W badaniach ukierunkowanych na inhibicję tego etapu cyklu replikacyjnego ogromnym przełomem było wprowadzenie koncepcji pronukleotydydów, w której komórki zarażone HIV traktowane są pronukleotydydami, z odpowiednio maskowaną resztą fosforanową. Wewnątrz komórki z pronukleotydydu zostaje uwolniony 5'-fosforan nukleozydu, który jest następnie fosforylowany do odpowiedniego 5'-trifosforanu, właściwego inhibitora syntezy wirusowego DNA. Jak dotąd, większość pronukleotydydowych strategii skupiała się głównie na wprowadzaniu do komórki różnorodnych pochodnych estrowych lub amidowych monofosforanów. Jednakże, w związku z ograniczeniami stosowania niektórych nukleotydydów w terapii

antywirusowej (*vide* problem z fosforylacją przez kinazy komórkowe do odpowiednich NTP), podjęto badania zmierzające do opracowania strategii pronukleotydowej również dla di- i trifosforanów nukleozydów. Biorąc pod uwagę szereg czasami sprzecznych wymagań stawianym tego typu prolekom (m.in. odpowiednia trwałość, lipofilowość, dostateczna rozpuszczalność w wodzie, wysoka aktywność antywirusowa, niska toksyczność związku i jego metabolitów), zadanie to stanowi niełatwe wyzwanie dla badaczy.

W kontekście powyższego, kluczowe jest opracowanie koncepcji efektywnego protokołu syntetycznego tworzenia szkieletu polifosforanowego. W tym rozdziale przedstawiłam podstawowe metody otrzymywania bezwodnikowego wiązania fosforanowego, bazujące na reaktywności dwóch klas związków fosforowych – P(V) i P(III). Chociaż praca ze związkami P(V) jest stosunkowo wygodna, to wadą tego podejścia jest ich relatywnie niska reaktywność (konieczność aktywacji), co przekłada się często na dość długi czas trwania reakcji. Chemia bardziej reaktywnych związków P(III) pozwala z kolei w znacznie krótszym czasie uzyskać zakładane produkty, jednakże kosztem dużej podatności tych związków na utlenianie i hydrolizę. Warto podkreślić, że niezależnie od wybranego podejścia otrzymane produkty końcowe są zwykle polarne i wymagają pracochłonnych metod oczyszczania. Wspomniane ograniczenia powodują, że dotychczas proponowane metody tworzenia polifosforanów wymagają dalszych ulepszeń.

Istniejąca potrzeba opracowania skutecznej i uniwersalnej metody tworzenia strukturalnie różnorodnych polifosforanowych (zwłaszcza pirofosforanowych) połączeń oraz chęć i ciekawość badań nad pronukleotydami kolejnych generacji (di- i trifosforanów) były bezpośrednimi powodami podjęcia tej tematyki w mojej rozprawie doktorskiej.

V. CEL BADAŃ

Głównymi celami moich badań przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej było (i) zaprojektowanie różnych wariantów strukturalnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów jako związków o potencjalnej aktywności anti-HIV, (ii) opracowanie uniwersalnej i wygodnej metody ich syntezy, (iii) oznaczenie parametrów aktywności anti-HIV dla otrzymanych difosforanów oraz (iv) wytypowanie związków o najlepszych parametrach terapeutycznych jako potencjalnych struktur wiodących (ang. *lead compounds*) do dalszych badań zmierzających do otrzymania nowych, skutecznych leków antyretrowirusowych.

Aby osiągnąć powyższe cele, przyjąłem następujące zadania cząstkowe mojej pracy:

- Zaprojektowanie nowych pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów, posiadających różny rozkład podstawników i ładunków elektrycznych w części fosforanowej, jako potencjalnych terapeutyków anti-HIV;
- Znalezienie optymalnej metody syntezy bazującej na chemii H-fosfonianów do otrzymania ww. związków oraz przeprowadzenie badań metodycznych w celu optymalizacji wybranej metody;
- Opracowanie metody syntezy dla wprowadzenia heteroatomów (S i Se) w pozycję P_{α} lub P_{β} wiązania bezwodnikowego w difosforanach;
- Synteza różnie maskowanych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów i ich analogów, zawierających niemostkowe heteroatomy przy atomach fosforu P_{α} lub P_{β} (analogi siarkowe i selenowe), według wybranej, zoptymalizowanej metodyki;
- Oznaczenie aktywności anti-HIV i cytotoksyczności otrzymanych pochodnych we współpracy z laboratoriami mikrobiologicznymi (Narodowy Instytut Leków, Warszawa oraz Rega Institute, Leuven);
- Określenie trwałości chemicznej otrzymanych związków oraz ścieżek ich rozkładu w medium hodowlanym komórek RPMI-1640;
- Określenie trwałości otrzymanych związków w medium hodowlanym komórek wzbogaconym w aktywność enzymatyczną surowicy bydlęcej (RPMI-1640/FBS, 9:1, v/v);
- Próba korelacji oznaczonej aktywności anti-HIV ze strukturą i właściwościami chemicznymi (trwałością) badanych związków w świetle znanych molekularnych mechanizmów antyretrowirusowych;
- Wytypowanie związków o korzystnych parametrach aktywności anti-HIV jako potencjalnych struktur wiodących do przyszłych badań.

Uzasadnienie podjętych badań

Właściwymi inhibitorami procesu odwrotnej transkrypcji podczas replikacji wirusa HIV są 5'-trifosforany odpowiednich 2',3'-dideoksynukleozydów.²⁷⁻²⁸ Bezpośrednie podawanie takich związków osobie zakażonej jest jednak bezcelowe, gdyż jako ujemnie naładowane cząsteczki nie są one efektywnie transportowane przez błony komórkowe, co znacznie ogranicza ich biodostępność.^{37a-c} Najprostszym rozwiązaniem mogłoby być podawanie dideoksynukleozydów, które *in vivo* ulegałyby fosforylacji do odpowiednich trifosforanów. Mimo, że takie podejście w wielu przypadkach faktycznie działa (np. AZT), okazało się jednak, że niektóre nukleozydy (np. ddU) będące fragmentem związków o bardzo wysokiej aktywności anti-HIV (np. 5'-trifosforan ddU), w komórkach praktycznie nie ulegają pierwszej fosforylacji do 5'-monofosforanu. Takie związki, podawane w formie wolnego nukleozydu, nie wykazują aktywności anti-HIV.²⁷⁻²⁹ Stąd zrodziła się idea pronukleotydów – elektrycznie obojętnych fosforanów biologicznie aktywnych nukleozydów, w których ładunek elektryczny został zneutralizowany poprzez wprowadzenie grup ochronnych na reszty fosforanowe. Zgodnie z tą koncepcją, po wniknięciu cząsteczki pronukleotydu do komórki, grupy ochronne ulegają usunięciu (np. na drodze hydrolizy chemicznej i/lub enzymatycznej), co prowadzi do uwolnienia odpowiedniego 5'-monofosforanu nukleozydu. Ten z kolei, pod wpływem kinaz komórkowych, ulega stopniowej fosforylacji do 5'-trifosforanu 2',3'-dideoksynukleozydu, właściwego związku anti-HIV.^{38a,39} Początkowo postulowano bezwzględną konieczność całkowitego maskowania ładunku w cząsteczce i w tym celu zaproponowano wiele strategii pronukleotydowych bazujących na estrach lub amidach jako grupach ochronnych dla funkcji 5'-fosforanowej 2',3'-dideoksynukleozydów (np. badania grupy McGuigana,⁴⁰⁻⁴² Imbacha,⁴⁹ Kraszewskiego,⁴³ Meiera⁴⁵ i innych). Jednakże, na przestrzeni lat, coraz częściej obserwowano, że pewne typy pronukleotydów obdarzone ładunkiem ujemnym także efektywnie przenikają przez błony komórkowe i wykazują wysoką aktywność biologiczną (np. prace grupy Wagnera,⁷⁵⁻⁷⁷ Kraszewskiego⁷⁹⁻⁸⁰). Z jednej strony podważało to słuszność ogólnie akceptowanego postulatu o konieczności neutralizacji ładunku elektrycznego jako podstawowego kryterium efektywnego transportu pronukleotydów przez błony biologiczne, ale z drugiej otworzyło możliwości poszerzenia spektrum projektowanych pronukleotydów o nowe, zjonizowane warianty.

Strategia pronukleotydoma polegająca na dostarczaniu do komórki monofosforylowanych nukleozydów o znanej aktywności antywirusowej, nie rozwiązywała jednak całkowicie problemu efektywnego generowania aktywnego metabolitu (odpowiedniego 5'-trifosforanu), ponieważ tworzące się w komórce monofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów muszą ulegać enzymatycznej fosforylacji kolejno do di- i w końcu do trifosforanów. Fosforylacja difosforanów do odpowiednich trifosforanów zachodzi zwykle szybko i efektywnie, natomiast przekształcenie monofosforylowanego nukleozydu w odpowiedni difosforan, nie zawsze zachodzi łatwo (*vide casus* konwersji AZTMP do AZTDP). Wydawało się więc racjonalne spróbować dostarczać do komórek odpowiednie difosforany nukleozydów antywirusowych. Niestety, w literaturze znaleźć można tylko nieliczne doniesienia o polifosforanowych (di- i trifosforanowych) pronukleotydach ukierunkowanych na zwalczanie wirusa HIV. Początkowo niewielkie zainteresowanie taką strategią związane było prawdopodobnie z trudnościami syntetycznymi i wysoką labilnością wiązania bezwodnikowego w polifosforanach zawierających grupy blokujące na każdej reszcie fosforanowej. Wspomniane powyżej wyniki badań grupy Wagnera^{75-76,77b} pozwoliły przypuszczać jednak, że polifosforanowe związki projektowane jako pronukleotydy zawierające ładunek elektryczny będą zarówno stabilne, jak i zdolne do przenikania przez błony komórkowe. Stąd też, wszystkie przedstawione w poprzednim rozdziale strategie polifosforanowych pronukleotydów dotyczyły związków posiadających co najmniej jeden ładunek ujemny w cząsteczce. Warto podkreślić, że pierwsze propozycje stosowania 5'-difosforanów nukleozydów jako potencjalnych proleków (np. badania grupy Hostetlera⁸² czy Huynh Dinha⁸⁵) zakładały, że związki te będą generować w komórce odpowiednie 5'-monofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów, a nie 5'-difosforany. Dopiero grupa Meiera zaproponowała systemy ochronne pozwalające na uwalnianie w komórce ddNDP i ddNTP z odpowiednich polifosforanów (pronukleotydy typu DiPPro i TriPPPPro)^{88b,88c,88e,89b}. Kluczowe w tych podejściach okazało się wprowadzenie grup maskujących ładunek na resztach fosforanowych P_β lub P_γ, które można było usuwać bez naruszania wiązania bezwodnikowego P-O-P.

Rozpoczynając realizację mojej pracy doktorskiej w Zakładzie Chemii Kwasów Nukleinowych IChB PAN, włączyłam się w badania nad projektowaniem nowych typów difosforanowych pronukleotydów jako potencjalnych terapeutyków anty-HIV.

Ponieważ, jak wspomniałam, enzymatyczna fosforylacja 5'-difosforanów nukleozydów do odpowiednich trifosforanów zachodzi łatwo, założyłam, że difosforany 2',3'-dideoksynukleozydów będą dobrymi związkami modelowymi dla moich badań. Ze względu na wieloletnie doświadczenie naszego laboratorium w chemii H-fosfonianów, do otrzymywania różnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów i ich analogów poszukiwałam nowych dróg syntetycznych opartych właśnie na tej metodologii.

VI. WYNIKI I DYSKUSJA

1. PROJEKTOWANE NOWE WARIANTY STRUKTURALNE 5'-DIFOSFORANÓW NUKLEOZYDÓW

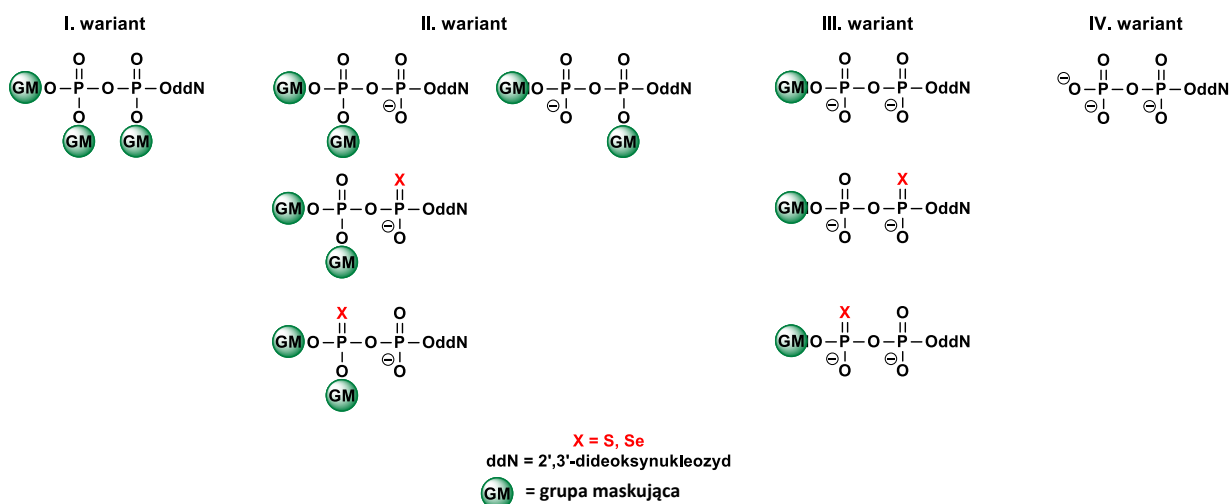
Moją pracę rozpoczęłam od zaprojektowania różnych typów 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów o potencjalnej aktywności anty-HIV. Na tym etapie nie zakładałam konkretnego mechanizmu działania anty-HIV tych związków, aby *a priori* nie odrzucać związków o nieznanym jeszcze farmakodynamicznie. Nasza uwaga skierowana była raczej na otrzymaniu strukturalnie różnych związków docelowych, w celu znalezienia nowych struktur wiodących. Poszukiwałam też możliwie uniwersalnego podejścia syntetycznego, które pozwoliłoby z dobrymi wydajnościami wprowadzać różnorodne modyfikacje nie tylko w obrębie grup maskujących ładunek reszt fosforanowych, ale również w samym szkielecie pirofosforanowym.

Zaprojektowane struktury podzieliłam na cztery grupy przedstawione na **Rys. 26** jako *warianty strukturalne I-IV*, gdzie GM oznacza wybrane grupy maskujące. *Wariant strukturalny I*, to całkowicie zablokowane 5'-difosforany 2',3'-dideoksynukleozydów. Mimo oczekiwanej dużej labilności wiązania bezwodnikowego P-O-P, zostały one włączone do badań jako związki referencyjne oraz w celu weryfikacji doniesień literaturowych na temat szybkiej hydrolizy tego typu pochodnych. *Wariant strukturalny II*, to wybrane pochodne 5'-difosforanów nukleozydów posiadające formalnie jeden ładunek ujemny przy atomie fosforu P_{α} lub P_{β} oraz dodatkowo jeden heteroatom (siarkę lub selen) w pozycji niemostrkowej ugrupowania difosforanowego. *Wariant strukturalny III*, to grupa pochodnych difosforanów posiadających dwa formalne ładunki ujemne oraz dodatkowo jeden heteroatom (siarkę lub selen) w pozycji niemostrkowej przy atomie fosforu P_{α} lub P_{β} . Wreszcie *wariant strukturalny IV*, to niezablokowane 5'-difosforany 2',3'-dideoksynukleozydów, posiadające formalnie trzy ładunki ujemne. Z założenia tego typu związki nie powinny przenikać przez błony komórkowe i w badaniach traktowałam je jako związki referencyjne.

Stosując wspomniane modyfikacje w części 5'-difosforanowej 2',3'-dideoksynukleozydów chciałam sprawdzić, jaki wpływ na właściwości fizykochemiczne tych związków (m.in. na trwałość, lipofilowość) oraz ich aktywność biologiczną (aktywność anty-HIV, cytotoksyczność) będą miały: pozycja ładunku

ujemnego w cząsteczce, położenie i rodzaj heteroatomu oraz typ wybranych grup maskujących. Należy zaznaczyć, że wprowadzenie heteroatomów przy atomie fosforu P_α lub P_β generuje centrum asymetrii i powoduje, że związki te występują w formie dwóch P-diastereoizomerów, mogących różnić się właściwościami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi. W ramach niniejszych badań nie planowano rozdzielenia takich związków na diastereoizomery lub prób ich stereospecyficznego syntezy. Byłoby to jednak wskazane w przypadku, gdyby mieszaniny diastereoizomerów wykazywały obiecującą aktywność biologiczną.

W sumie zaprojektowałam ok. 50 różnych difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów dla moich badań nad syntezy i właściwościami biologicznymi (aktywność anty-HIV) pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów. Przegląd literatury dotyczący otrzymywania polifosforanów wykazał, że do zrealizowania założonych celów można stosować różne strategie syntetyczne. Po zaprojektowaniu konkretnych wariantów strukturalnych 5'-difosforanów nukleozydów oraz analizie metod syntezy polifosforanów stwierdziłam, że najbardziej odpowiednim i efektywnym podejściem może okazać się wykorzystanie chemii H-fosfonianów. Jako dodatkowy atut potraktowałam wieloletnie doświadczenie naszego Zespołu w rozwijaniu właśnie tego obszaru chemii fosforu.

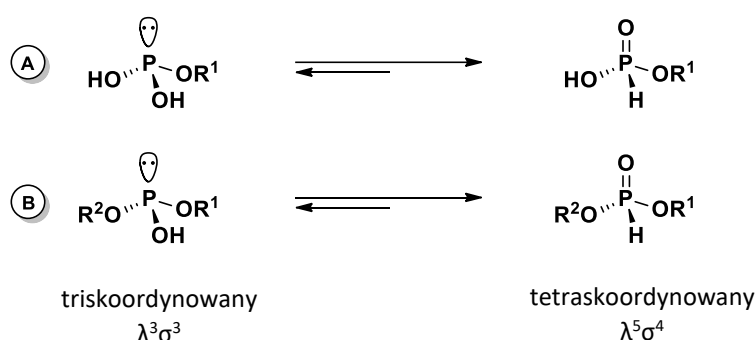


Rys. 26. Zaprojektowane warianty strukturalne 5'-difosforanów nukleozydów.

2. CHEMIA H-FOSFONIANÓW. WYBÓR DROGI SYNTEZY 5'-DIFOSFORANÓW NUKLEOZYDÓW

Pierwsze zastosowania H-fosfonianów w syntezie produktów naturalnych datujemy na lata 50. XX w., kiedy to grupa Todda opisała otrzymywanie fosforanodiestru dinukleozydu wykorzystując właśnie te związki.¹²⁷ Następnie przez szereg lat chemia H-fosfonianów nie budziła specjalnego zainteresowania i dopiero trzy dekady później dwa działające niezależnie od siebie laboratoria (Stawińskiego oraz Froehlera i Mateucciego) zapoczątkowały rozwój tej chemii jako kompleksowej metodologii w syntezie biologicznie ważnych związków zawierających atom fosforu.¹²⁸

Niewątpliwą zaletą chemii H-fosfonianów jest unikatowa możliwość wprowadzania różnorodnych modyfikacji na centrum fosforowe m.in. poprzez używanie różnych substratów (okso, tio, seleno) lub/i zmianę warunków utleniania. Kluczowe dla szerokiego zastosowania H-fosfonianów do otrzymywania organicznych związków fosforu są: (i) równowaga tautomeryczna pomiędzy formą fosforynową a fosfonianową (**Rys. 27**), (ii) duża elektrofilowość centrum fosforowego w aktywowanych monoestrach H-fosfonianów, (iii) łatwość otrzymywania odpowiednich H-fosfonianomonoestrów i ich seleno czy tio pochodnych jako substratów syntetycznych oraz ich duża trwałość podczas przechowywania, (iv) łatwe utlenianie do związków P(V) oraz szerokie możliwości otrzymywania różnych analogów fosforanów poprzez zmianę warunków utleniania.



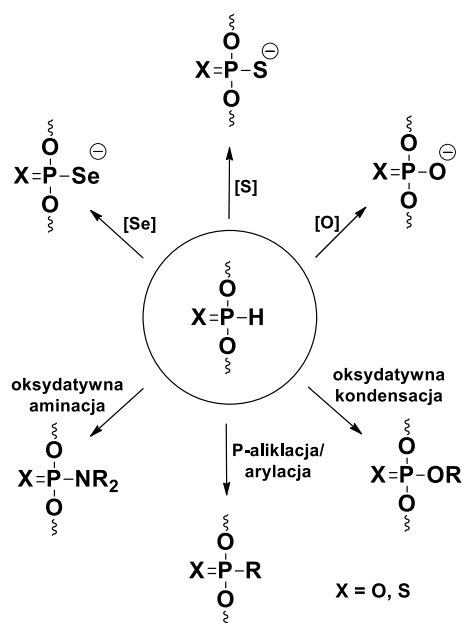
Rys. 27. Równowaga tautomeryczna H-fosfonianomono- (A) i diestrów (B).

Zdecydowanie najistotniejszą cechą wyróżniającą H-fosfoniany spośród innych związków fosforu jest możliwość ich występowania w postaci dwóch form tautomerycznych różniących się liczbą wiązań wokół centrum fosforowego (λ) oraz liczbą koordynacyjną (σ) (**Rys. 27**) i w konsekwencji zróżnicowaną reaktywnością

chemiczną. Przesuwanie równowagi układu daje możliwość wykorzystania zalet syntetycznych każdej z form tautomerycznych. Terwalentna forma fosforynowa na skutek obecności wolnej pary elektronowej na atomie fosforu, łatwo reaguje z elektrofilami, a wprowadzenie do cząsteczki elektrono-wyciągających podstawników może zwiększyć podatność atomu fosforu na atak nukleofila. Forma tetraskoordynowana (H-fosfonianowa), charakteryzująca się obecnością funkcji P=O i P-H, posiada bardzo silne centrum elektrofilowe na atomie fosforu i zwykle łatwo reaguje z nukleofilami. Tak więc mono- i diestry kwasu fosfonowego mogą reagować zarówno z elektrofilami jak i z nukleofilami, w zależności od tego, w którą stronę przesuniemy równowagę tautomeryczną.

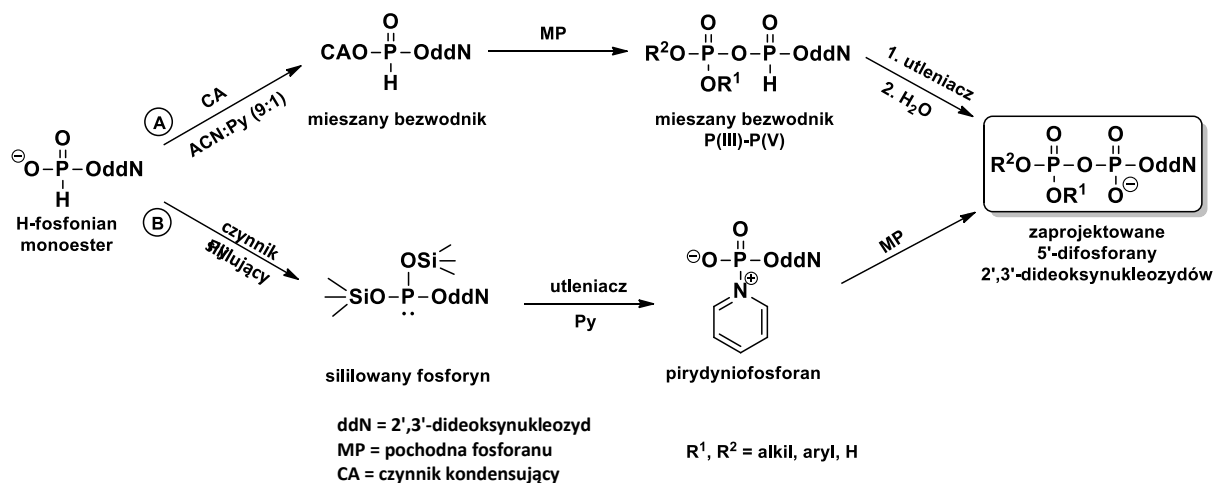
Ze względu na różną reaktywność obu form tautomerycznych oraz możliwość przesuwania równowagi pomiędzy nimi w roztworze, wyróżniamy dwa główne typy reakcji, którym ulegają mono- i diestry H-fosfonianów. W formie fosfonianowej, H-fosfonianomonoestry zaktywowane czynnikiem kondensującym łatwo tworzą diestry lub H-amidofosfoniany monoestry w reakcji z odpowiednimi alkoholami lub aminami. Ponieważ istnieje wiele prostych i wydajnych metod syntezy H-fosfonianomonoestrów oraz ich tio i seleno analogów, otwiera to drogę do otrzymywania różnych H-fosfoniano, H-tiofosfoniano- i H-selenofosfonianodiestrów, a z nich z kolei odpowiednich P(V) pochodnych.

Z formy fosforynowej H-fosfonianów korzystamy najczęściej chcąc otrzymać ze związku P(III) odpowiednią pochodną P(V). Zazwyczaj funkcja H-fosfonianowa wprowadzona zostaje do biomolekuł w celu późniejszego jej utlenienia (jodem lub siarką) lub oksydatywnej kondensacji z różnymi nukleofilami. Różnorodność związków pośrednich oraz możliwość zmiany warunków utleniania pozwala na otrzymanie różnych analogów biologicznie ważnych estrów fosforowych. Wybrane możliwości przekształcenia H-fosfonianodiestrów w odpowiednie pochodne i analogi fosforanów [związki P(V)] pokazuje **Schemat 31**.



Schemat 31. Wybrane oksydacyjne przekształcenia H-fosfonianodiestrów.¹²⁹

Szukając wydajnego i możliwie uniwersalnego podejścia syntetycznego do otrzymywania zaprojektowanych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów rozpatrywałam dwie możliwe strategie, obie z użyciem odpowiedniego 5'-H-fosfonianu nukleozydu jako wyjściowego substratu. W pierwszym podejściu (**Schemat 32, A**) rozważałam możliwość wykorzystania elektrofilowej formy H-fosfonianowej, powstałej w wyniku aktywacji odpowiedniego H-fosfonianomonoestru czynnikiem kondensującym, do wygenerowania mieszanego bezwodnika P(III)-P(V) poprzez atak obecnego w układzie reakcyjnym P(V) nukleofila [np. diestru kwasu ortofosforowego(V)] na centrum P(III) zaktywowanego H-fosfonianu, a następnie utlenienie utworzonego mieszanego bezwodnika do odpowiedniego 5'-difosforanu nukleozydu. Z kolei w drugim podejściu (**Schemat 32, B**) transformacja syntetyczna inicjowana jest utworzeniem terwalentnej formy fosforynowej przy zastosowaniu czynnika sililującego, a następnie utlenienie jodem wobec pirydyny powstałego estru sililowego oraz reakcję utworzonej betainy pirydyniowej z P(V) nukleofilem [np. diestrem kwasu ortofosforowego(V)].



Schemat 32. Rozważane strategie syntetyczne otrzymywania 5'-difosforanów nukleozydów bazujące na chemii H-fosfonianów.

Droga **A** wydawała się być bardziej racjonalna, ponieważ w zasadzie pozwalała, na otrzymanie wszystkich zaprojektowanych *wariantów strukturalnych I-IV (Rys. 26)* z jednego prekursora – monoestru 5'-H-fosfonianu 2',3'-dideoksynukleozydu, zmieniając jedynie rodzaj użytego P(V) nukleofila (etap pierwszy) i warunki utleniania (etap drugi). Niestety, wstępne badania prowadzone w celu ustalenia najkorzystniejszej drogi syntetycznej wykazały, że ścieżka **A** nie jest dobrym rozwiązaniem. Aktywacja H-fosfonianu czynnikiem kondensującym (chlurek piwaloilu) w obecności fosforanodiestru w różnych warunkach nie powiodła się, gdyż w widmie ³¹P NMR nie obserwowaliśmy sygnałów od mieszanego bezwodnika P(III)-P(V). Prawdopodobnie mogło to być spowodowane nieselektywną aktywacją 5'-H-fosfonianu nukleozydu. Próby przeprowadzenia reakcji dwuetapowo, tzn. najpierw preaktywacja H-fosfonianu monoestru czynnikiem kondensującym, a następnie dodanie nukleofila, również prowadziły do tworzenia się mieszaniny produktów.¹³⁰

Droga **B**, w przeciwieństwie do drogi **A**, wymagała przygotowania trzech, zamiast jednego, prekursorów do syntezy zaplanowanych 5'-difosforanów. Oprócz pokazanego na **Schemacie 32** 5'-H-fosfonianomonoestru nukleozydu, były to odpowiednie H-tio- i H-selenofosfoniany monoestry, potrzebne dla otrzymania analogów difosforanów zawierających siarkę lub selen na atomie fosforu P_α. Mimo większego nakładu pracy, zaletą drogi **B** był fakt, że nasza grupa badawcza miała już pewne rozeznanie we właściwościach pirydyniofosforanów. Dotychczas najlepiej (choć dość wybiórczo) poznano reaktywność fosfobetainy pirydyniowej wobec amin, alkoholi czy fluorków.¹²⁴ Dopiero stosunkowo niedawno zaczęto badać możliwość wykorzystania

pirydyniofosforanu w celu syntezy układów polifosforanowych,¹²⁵⁻¹²⁶ lecz były to nieliczne prace, w których brak było informacji na temat wpływu rodzaju czynnika sililującego, utleniacza, katalizatora nukleofilowego, nukleofila, itp. na przebieg oraz wydajność całej reakcji oksydatywnej kondensacji. Warto również podkreślić, że jedynym przebadanym dotychczas fosforanowym nukleofilem w reakcji oksydatywnej kondensacji H-fosfonianomonoestrów była sól tetrabutylamonowa pirofosforanu. Wstępne eksperymenty pokazały, że w reakcji tej możliwe jest otrzymywanie również 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów, a więc pochodnych, którymi byłam szczególnie zainteresowana.

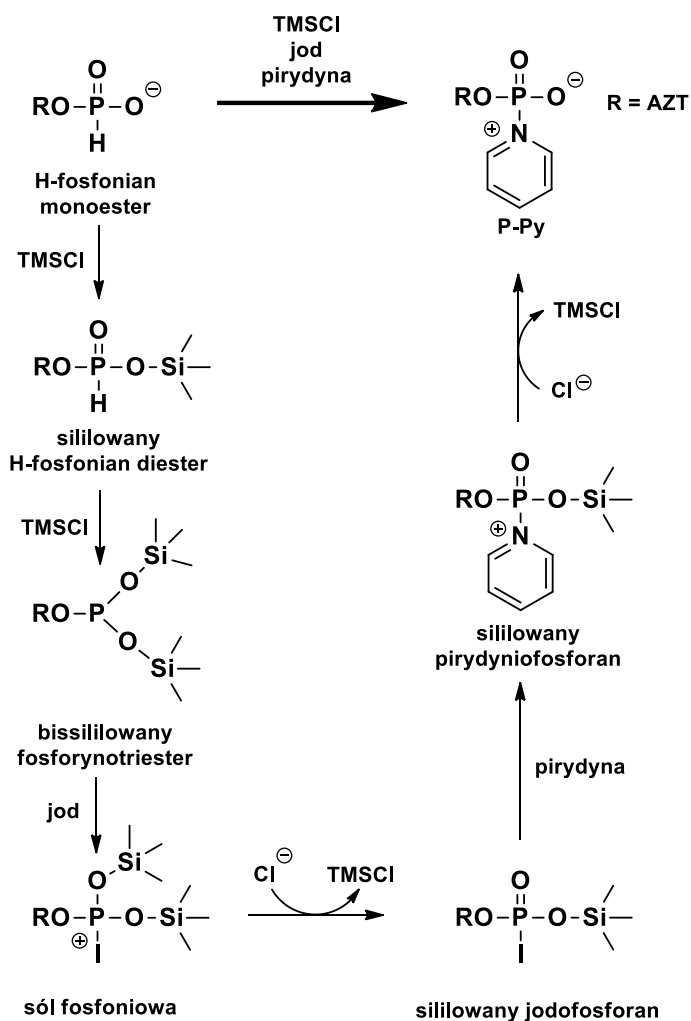
W związku z powyższym postanowiłam przyrzeć się bliżej możliwościom wykorzystania właśnie tej reakcji do otrzymania zaprojektowanych różnych wariantów strukturalnych dla 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów. Oprócz samej syntezy ważne było dla mnie również lepsze poznanie chemii reakcji oksydatywnej kondensacji, dlatego zaplanowałam badania metodyczne dotyczące optymalizacji warunków syntezy oraz poznanie wpływu poszczególnych reagentów na efektywność generowania pirydyniofosforanu i jego reakcji z wybranym P(V) nukleofilem. Chciałam zaznaczyć, że możliwości wykorzystania tio- i seleno-fosfobetain pirydyniowych nukleozydów w reakcji z różnymi P(V) nukleofilami do otrzymywania odpowiednich pochodnych posiadających heteroatom (siarkę lub selen) przy atomie fosforu P_{α} szkieletu difosforanowego, nie były do tej pory opisane.

3. BADANIA METODYCZNE NAD REAKCJĄ OKSYDATYWNEJ KONDENSACJI

Reakcje utleniania H-fosfonianów do odpowiednich pochodnych fosforanów [związków P(V)] prowadzone zwykle za pomocą jodu w obecności odpowiedniego nukleofila, nazywamy oksydacyjną kondensacją. Siłą napędową tej reakcji jest obecność lub generowanie w roztworze formy terwalentnej fosfonianu, która może reagować z elektrofilowymi utleniaczami. Dla diestrów H-fosfonianów reakcja ta zachodzi bardzo łatwo, natomiast H-fosfonianomonoestry, na skutek obecności ładunku ujemnego, są odporne na utlenianie jodem i wymagają uprzedniego przekształcenia ich w formy terwalentne.

Proces oksydatywnej kondensacji można podzielić na dwa etapy: generowanie pirydyniofosforanu P-Py (nazywanego również adduktem pirydyniowym metafosforanu lub fosfobetainą pirydyniową) oraz następujące po nim podstawienie nukleofilowe reszty pirydyny przyłączonej do atomu fosforu. Na **Schemacie 33** przedstawiono skrótowy (pogrubiona strzałka) i szczegółowy zapis tworzenia się tej kluczowej fosfobetainy w wyniku działania czynnika silylującego, utleniacza oraz katalizatora nukleofilowego na monoester H-fosfonianu. Przemiana ta, mimo iż zachodzi spontanicznie i szybko (<5 min.), jest dość skomplikowaną, wieloetapową transformacją. W pierwszym etapie reakcji monoester H-fosfonianu zostaje przeprowadzony, za pomocą odpowiedniego czynnika silylującego (np. TMSCl), w ester silylowy, co ułatwia dalsze silylowanie i utworzenie nukleofilowej formy terwalentnej z wolną parą elektronów na atomie fosforu. Pochodna ta reaguje następnie z jodem, co prowadzi do powstania czterowiązalnej soli fosfoniowej, która po odsilylowaniu daje odpowiedni jodofosforan, i w końcu, poprzez nukleofilowe podstawienie jodku (na centrum fosforowym) pirydyną, reaktywny pirydyniofosforan P-Py.

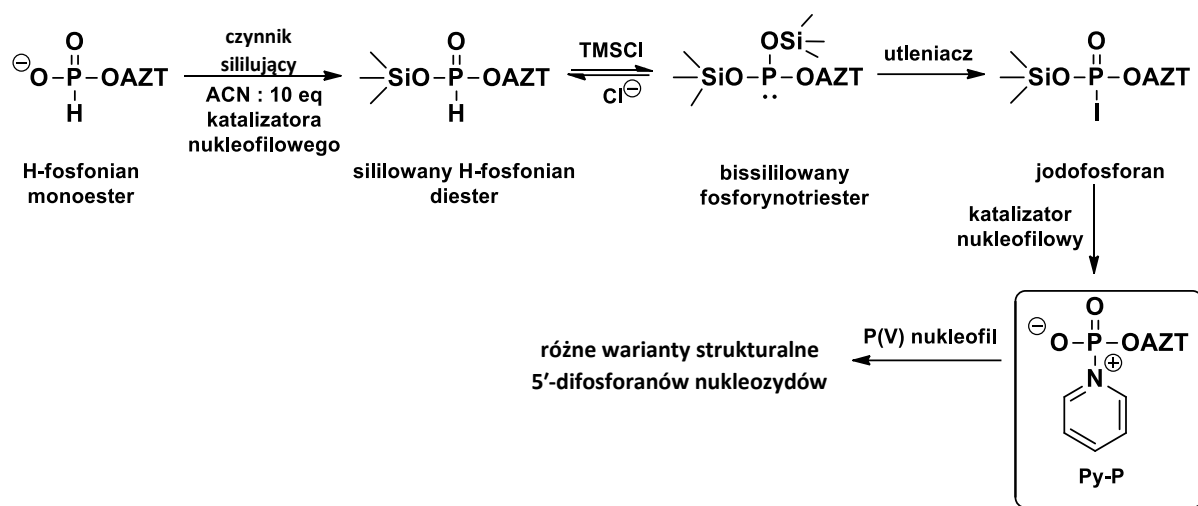
Moim celem było przeprowadzenie badań metodycznych nad reakcją oksydatywnej kondensacji monoestrów H-fosfonianów z P(V) nukleofilami dla (i) znalezienia optymalnych warunków generowania adduktu P-Py, a następnie (ii) sprawdzenia jego reaktywności w stosunku do różnych P(V) nukleofili. Chcąc zoptymalizować zaproponowaną metodę zaprojektowałam układ modelowy, który posłużył mi do zbadania wpływu poszczególnych reagentów na przebieg i wydajność generowania pirydyniofosforanu P-Py.



Schemat 33. Generowanie pirydyniofosforanu z H-fosfonianomonoestru.

3.1. Układ modelowy do badań metodycznych

Zaproponowany przeze mnie układ modelowy zakładał sprawdzenie wpływu każdego z użytych reagentów na szybkość i efektywność generowania odpowiedniego pirydyniofosforanu w zależności od zastosowanego: substratu, czynnika silylującego, utleniacza oraz katalizatora nukleofilowego, w kontekście jego reaktywności z P(V) nukleofilami. Modelową reakcję podzielić można na kilka etapów: silylowanie i tworzenie formy terwalentnej, utlenianie, substytucja katalizatorem nukleofilowym oraz reakcja z badanym nukleofilem, prowadząca do powstania finalnego produktu, w tym przypadku, różnych pochodnych 5'-difosforanów nukleozydów (**Schemat 34**).



Schemat 34. Układ modelowy do badań nad optymalizacją warunków oksydatywnej kondensacji H-fosfonianomonoestrów z P(V) nukleofilami.

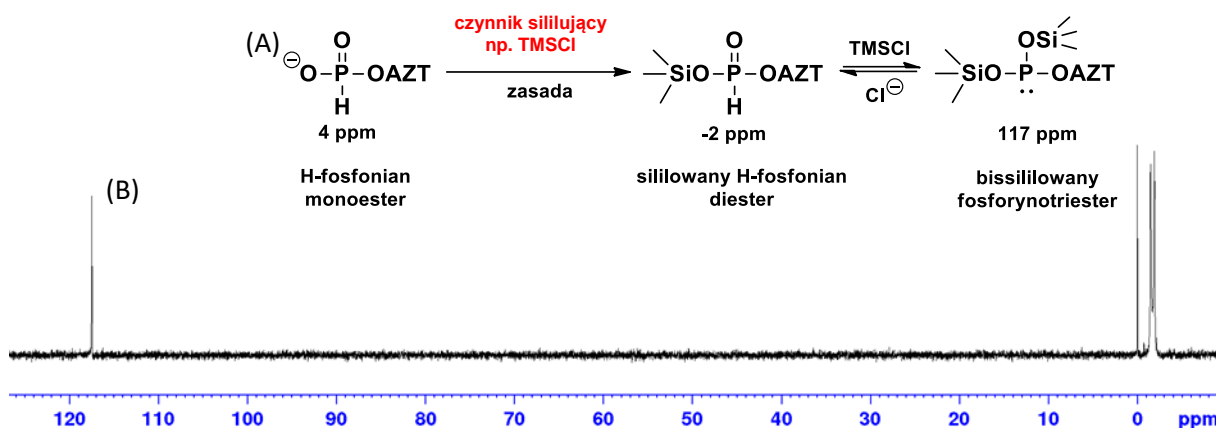
Do badań wybrałam 5'-H-fosfonian 3'-azydo-2',3'-dideoksytymidyny (HPAZT). Wybór ten był uzasadniony kilkoma czynnikami. (i) Względy merytoryczne – szeroko opisane zastosowania pochodnych AZT w strategii pronukleotydowej, co pozwalało porównywać właściwości otrzymanych przeze mnie pochodnych z danymi literaturowymi. Ponadto, jak już wspomniałam wcześniej, konwersja AZTMP do AZTDP jest etapem limitującym szybkość transformacji do aktywnego biologicznie AZTTP, stąd też, AZT wydawał się być bardzo dobrym kandydatem do sprawdzenia efektywności jego difosforanowych pochodnych w inhibicji procesu replikacji wirusa HIV. (ii) Względy praktyczne – HPAZT jest prosty w syntezie i wygodny w użyciu (ciężko rozpuszczalny, dobra rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, trwałość). (iii) Względy ekonomiczne – AZT to najtańszy z dostępnych komercyjnie dideoksynukleozydów antywirusowych, co miało istotne znaczenie przy dużej liczbie planowanych eksperymentów.

Zwykle reakcje oksydatywnej kondensacji prowadzone są w pirydynie, która pełni rolę zarówno rozpuszczalnika, jak i katalizatora nukleofilowego. Chcąc sprawdzić możliwość wykorzystania również innych katalizatorów nukleofilowych (np. różnie podstawione pirydyny lub aminy 3°) opracowałam ogólne warunki reakcyjne składające się z aprotycznego rozpuszczalnika (acetonitryl) zapewniającego homogenność całego medium oraz 10 ekw. (liczonych względem H-fosfonianomonoestru) badanego katalizatora nukleofilowego. Reakcję oksydatywnej kondensacji wykonywałam dodając do roztworu monoestru H-fosfonianu i katalizatora nukleofilowego w acetonitrylu kolejno: czynnik silylujący, utleniacz oraz badany nukleofil, a przebieg reakcji śledziłam

za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów oraz konkluzje dotyczące optymalnych warunków prowadzenia reakcji oksydatywnej kondensacji HPAZT z P(V) nukleofilami przedstawiam w następujących podrozdziałach.

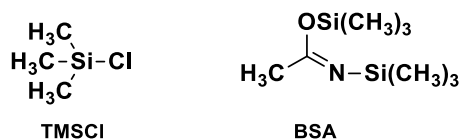
3.2. Wpływ czynnika silylującego

Czynnik silylujący pełni niezwykle ważną rolę w utlenianiu H-fosfonianomonoestrów umożliwiając, głównie ze względu na duże powinowactwo atomu krzemu do tlenu, szybkie przeprowadzenie zjonizowanej tetraskoordynowanej formy fosfonianowej w nukleofilowy, terwalentny, bissilylowany fosforynotriester (*Schemat 35*).



Schemat 35. (A) Reakcja silylowania HPAZT prowadząca do utworzenia kluczowej dla procesu utleniania formy terwalentnej; (B) Widmo ^{31}P NMR reakcji (A).

Standardowo stosowanym do tego celu odczynnikiem jest chlorek trimetylosililu (TMSCl, *Rys. 28*), ale do moich badań metodycznych postanowiłam włączyć również inny handlowo dostępny reagent – *N,O*-bis(trimetylosililo)acetamid (BSA, *Rys. 28*), który jak dotąd nie był używany jako czynnik silylujący w reakcji oksydatywnej kondensacji H-fosfonianomonoestrów z nukleofilami.



Rys. 28. Powszechnie stosowane w chemii nukleozydów i nukleotydów czynniki silylujące: TMSCl i BSA.

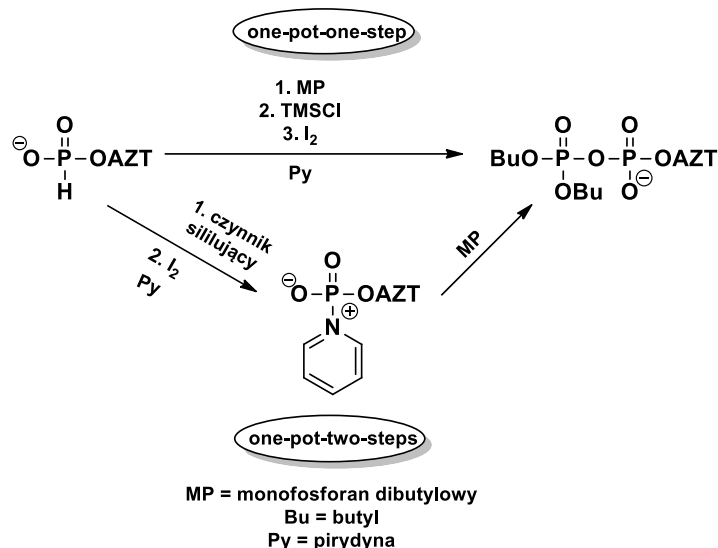
Czynnik silylujący pełni podczas reakcji oksydatywnej kondensacji podwójną rolę: (i) przekształca wyjściowe H-fosfonianomonoestry w aktywne i podatne na utlenianie bissilylowane fosforyny oraz (ii) zabezpiecza bezwodne warunki podczas całego procesu.

Na widmie ^{31}P NMR (**Schemat 35**) widać, że w zależności od ilości użytego czynnika sililującego tworzy się mieszanina diastereomerów – monosililowanego H-fosfonianu (dwa sygnały przy -2 ppm) i bissililowanego fosforynu. Ponieważ oba te związki są w równowadze chemicznej, a czynnik sililujący ulega regeneracji w czasie reakcji (**Schemat 33**), do całkowitego utlenienia H-fosfonianu i wygenerowania odpowiedniego pirydyniofosforanu wystarczają w zasadzie katalityczne ilości chlorku trimetylosililu. Jednakże ze względu na konieczność utrzymywania bezwodnych warunków w czasie oksydatywnej kondensacji, zaleca się stosowanie nadmiaru tego reagenta.^{124c}

Wybierając TMSCl i BSA (**Rys. 28**) chciałam sprawdzić wpływ rodzaju stosowanego czynnika sililującego oraz jego ilości na efektywność generowania pirydyniofosforanu, a następnie na jego reaktywność wobec wybranego P(V) nukleofila. Ciekawiło mnie, czy te dwa związki z uwagi na taką samą budowę ugrupowania krzemowego, ale różniące się grupą odchodzącą (chlorki w przypadku TMSCl oraz acetamid dla BSA), będą zachowywać się podobnie w układzie reakcyjnym. Jest to o tyle ważne, że reakcję sililowania prowadzimy *in situ* i produkty rozkładu użytego odczynnika pozostają w medium reakcyjnym w czasie następnych etapów syntezy. Kolejną istotną kwestią w rozważaniu wpływu czynników sililujących na przebieg reakcji oksydatywnej kondensacji jest ich duże powinowactwo do atomu tlenu. W przypadku planowanego użycia fosforanów jako nukleofili, rozważałam możliwość konkurencyjnego, względem H-fosfonianu, sililowania użytego nukleofila, co mogłoby prowadzić do obniżenia efektywności generowania pirydyniofosforanu lub znacznego obniżenia reaktywności nukleofila. W tym kontekście ważnym wydawał się również wybór sposobu wykonania oksydatywnej kondensacji – ścieżka syntetyczna *one-pot-one-step vs one-pot-two-steps* (**Schemat 36**).

Badania metodyczne rozpoczęłam od ustalenia optymalnej ścieżki syntetycznej dla oksydatywnej kondensacji HPAZT z handlowo dostępnym P(V) nukleofilem, fosforanem dibutylowym. Możliwe warianty reakcji różniły się od siebie jedynie kolejnością dodawania nukleofila. W reakcji typu *one-pot-one-step* fosforan dibutylowy znajdował się w układzie reakcyjnym przed rozpoczęciem utleniania, natomiast w drugim wariantcie, *one-pot-two-steps*, najpierw generowałam pirydyniofosforan, a następnie dodawałam nukleofil. W obu przypadkach stosowałam standardowe reagenty dla oksydatywnej kondensacji: TMSCl (2 ekw.) jako czynnik sililujący, jod

(1,5 ekw.) jako utleniacz oraz pirydynę pełniącą funkcję zarówno katalizatora nukleofilowego, jak i rozpuszczalnika. **Schemat 36** przedstawia dwie rozważane ścieżki syntezy 5'-difosforanów nukleozydów.



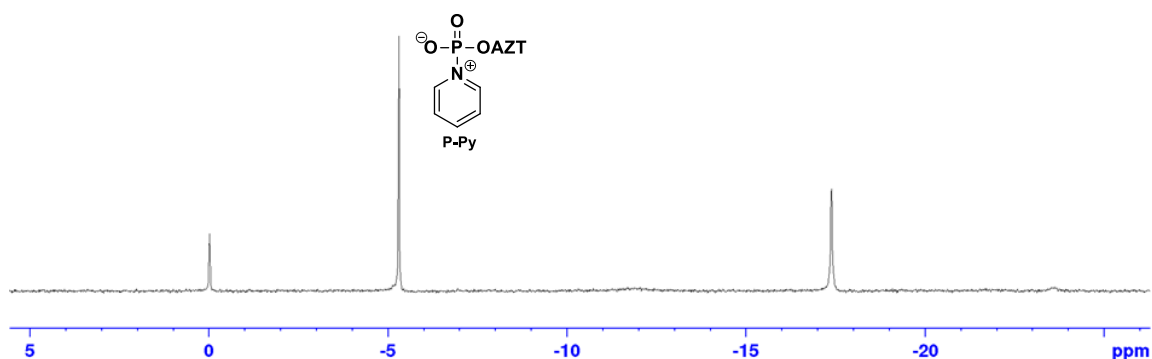
Schemat 36. Dwie ścieżki syntezy 5'-difosforanów nukleozydów: one-pot-one-step oraz one-pot-two-steps.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że w przypadku P(V) nukleofili pierwsza ścieżka syntezy (typu *one-pot-one-step*) nie była korzystnym rozwiązaniem ze względu na niewielką ilość tworzącego się produktu, niezależnie od rodzaju stosowanego czynnika silylującego. Spowodowane to było najprawdopodobniej dużym stopniem silylowania nukleofila (tworzenie silylo fosforanotriestru) i wobec zużycia czynnika silylującego, niepełnym utlenianiem H-fosfonianomonoestru. Natomiast ścieżka typu *one-pot-two-steps* pozwalała na efektywne generowanie pirydyniofosforanu i w konsekwencji, na wydajną syntezę odpowiedniego difosforanu.

Pierwszym badanym przeze mnie czynnikiem silylującym był chlorek trimetylosililu. Po wykonaniu serii reakcji różniących się ilością tego reagenta (0,25 ekw., 0,5 ekw., 1 ekw., 2 ekw., 5 ekw.) stwierdziłam, że generowanie pirydyniofosforanu ($\delta = -4.9$ ppm, ^{31}P NMR) z HPAZT w pirydynie wobec jodu (1,5 ekw.) przebiegało wydajnie we wszystkich przypadkach. Nie zaobserwowałam również istotnych różnic w reaktywności tak wygenerowanego adduktu P-Py w stosunku do dodanego P(V) nukleofila, fosforanu dibutyłowego (3 ekw.).

Badając możliwość wykorzystania BSA jako czynnika silylującego w oksydatywnej kondensacji, zaplanowałam serię porównawczych eksperymentów. Już przy użyciu

0,5 ekw. *N,O*-bis(trimetylosililo)acetamidu w widmie ^{31}P NMR zaobserwowałam sygnały pochodzące zarówno od pożądanej fosfobetainy P-Py, jak i produktu ubocznego, rezonującego przy $\delta_P = -17$ ppm (**Rys. 29**).

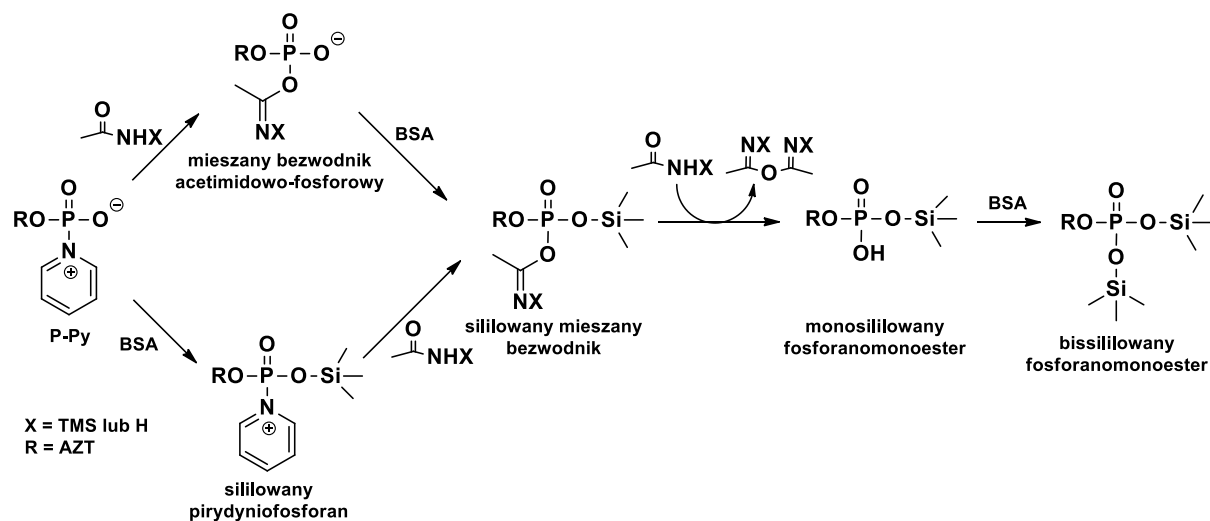


Rys. 29. Widmo ^{31}P NMR zarejestrowane podczas generowania pirydyniofosforanu P-Py z HPAZT z użyciem BSA (0,5 ekw.) i jodu (1,5 ekw.) w pirydynie.

Zwiększenie ilości BSA do 2 ekw. spowodowało powstawanie wyłącznie wspomnianego produktu ubocznego, który nie reagował z dodanym następnie do układu fosforanodiestrem. Przesunięcie chemiczne powstającego związku nie pozwalało na przypisanie mu prawdopodobnej struktury, stąd też konieczne było przeprowadzenie dodatkowych eksperymentów. Kiedy do wygenerowanego z użyciem TMSCl pirydyniofosforanu P-Py dodałam BSA (1 ekw.), zaobserwowałam ilościowe tworzenie się związku o przesunięciu chemicznym $\delta_P = -17$ ppm. Po przeanalizowaniu wielu opcji strukturalnych, wstępnie zidentyfikowałam ten produkt jako bissililowany fosforanomonoeoster AZT (**Schemat 37**). Zgodnie z postulowaną strukturą, dodanie nadmiaru wody do mieszaniny reakcyjnej zawierającej związek o $\delta_P = -17$ ppm prowadziło natychmiast do tworzenia się AZTMP. W przypadku ograniczonej ilości wody, w widmie fosforowym można było również zaobserwować powstawanie monosililowanej pochodnej ($\delta_P = -6,7$ ppm). Postulowana struktura została potwierdzona przez wygenerowanie identycznego związku w reakcji AZTMP z chlorkiem trimetylosililu (2 ekw.).

Pomimo identyfikacji tworzącego się produktu jako bissililowanego fosforanu AZT, mechanizm jego powstawania był wciąż niejasny. Ponieważ konwersja pirydyniofosforanu do bissililowanego fosforanu zachodziła bez tworzenia się produktów pośrednich widocznych w ^{31}P NMR, i obserwowana była tylko w przypadku BSA, możemy jedynie spekulować o kluczowej dla tego procesu roli produktów rozkładu

czynnika silylującego powstałych podczas silylowania H-fosfonianu. Postulowany mechanizm przedstawiony został na **Schemacie 37**.



Schemat 37. Postulowany mechanizm przemiany pirydyniofosforanu P-Py w bis-silylowany fosforan.

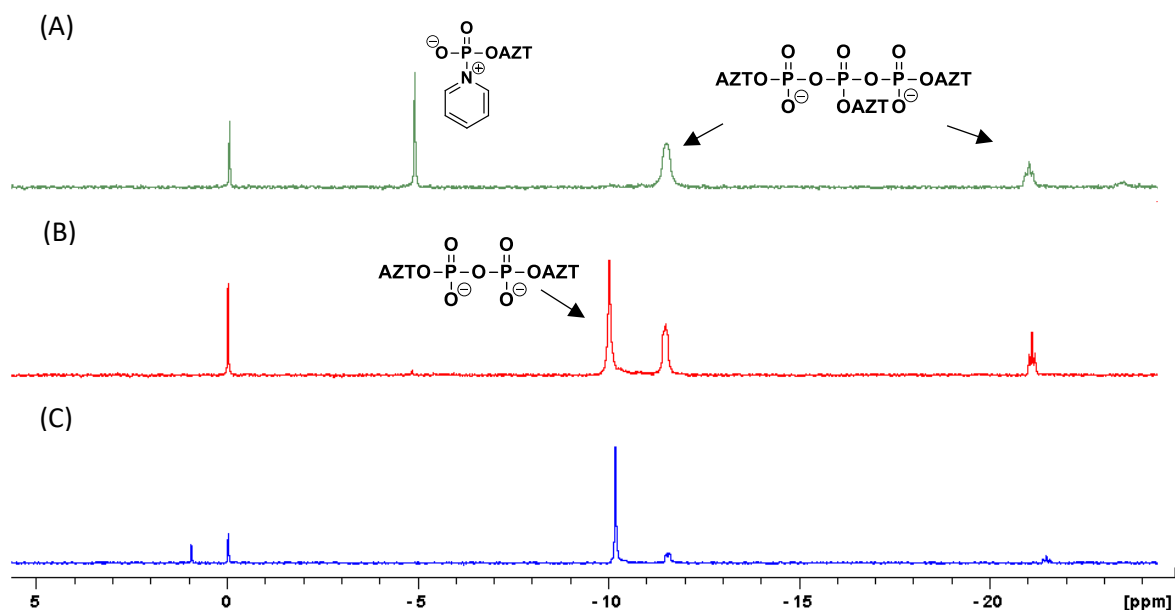
Przypuszczalnie reakcja ta zachodzi poprzez nukleofilowy atak acetamidu (lub jego *N*-silylowanej pochodnej powstałej z BSA) na elektrofilowe centrum fosforowe adduktu pirydyniowego P-Py, generując mieszany bezwodnik acetimidowo-fosforowy, który może ulegać silylowaniu dając w efekcie odpowiedni silylowany mieszany bezwodnik. Alternatywnie, ten sam związek mógłby powstawać w wyniku odwróconej sekwencji reakcji – najpierw silylowanie, a dopiero potem podstawienie nukleofilowe reszty pirydyniowej przez acetamid. Jednak, biorąc pod uwagę elektrofilową naturę centrum fosforowego w pirydyniofosforanie P-Py, pierwsza omawiana ścieżka wydaje się być bardziej prawdopodobna. Tworzenie się bis-silylowanego fosforanu zasadniczo zachodzić może na dwa sposoby: poprzez nukleofilowy atak trimetylosilanolu na centrum fosforowe silylowanego adduktu pirydyniowego lub ponowne silylowanie mieszanego bezwodnika acetimidowo-fosforowego. Jednakże w warunkach reakcyjnych, ze względu na możliwe tworzenie stabilnych disiloksanów, stężenie wspomnianego silanolu prawdopodobnie jest niskie, stąd też ścieżka reakcyjna może prawdopodobnie obejmować atak nukleofilowy acetamidu na silylowany mieszany bezwodnik, tym razem jednak na elektrofilowe centrum imidowe cząsteczki. Ten proces może generować wolną grupę hydroksylową (tworzenie monosilylowanego fosforanomonoeosteru), której silylowanie przez BSA prowadzi do utworzenia bis-silylowanej pochodnej fosforanomonoeosteru.

Różnice w stabilności pirydyniofosforanu P-Py wobec wybranych czynników sililujących tłumaczyć można najprawdopodobniej reakcjami następczymi produktów rozkładu TMSCl i BSA, wciąż obecnymi w medium reakcyjnym. Powstająca w wyniku utleniania fosfobetaina jest reaktywnym, elektrofilowym związkiem, który może być zaangażowany w wiele dynamicznych i często nieproduktywnych równowag. W pirydynie, w obecności chlorku trimetylosililu, generowany addukt pirydyniowy jest względnie stabilną cząsteczką, obserwowalną w widmach ^{31}P NMR. Natomiast w przypadku, gdy czynnikiem sililującym jest BSA, sytuacja jest zgoła inna ze względu na tworzenie się acetamidu (lub jego *N*-sililowanej pochodnej) jako produktu rozkładu czynnika sililującego. W tych warunkach możliwa jest ścieżka reakcyjna przedstawiona na **Schemacie 37** prowadząca do rozkładu P-Py i tworzenia najbardziej stabilnego w warunkach reakcyjnych związku – bissililowanego fosforanomonoestru. Warto jednakże nadmienić, że jeśli generowanie pirydyniofosforanu nie jest wymagane jako osobny krok syntetyczny (np. w przypadku gdy reagujący nukleofil może być obecny w układzie reakcyjnym w trakcie generowania fosfobetainy), to zarówno TMSCl, jak i BSA mogą być efektywnie stosowane jako czynniki sililujące.

Zakładając, że pierwszy etap reakcji P-Py z nadmiarem BSA powoduje tworzenie mieszanego bezwodnika acetimidowo-fosforowego (**Schemat 37**), można było przypuszczać, że w przypadku braku czynnika sililującego (lub jego bardzo ograniczonej ilości), związek ten będzie reagował z elektrofilowym pirydyniofosforanem, generując tym samym wiązanie P-O-P w formie symetrycznych di-, tri- i polifosforanów. Taka reakcja mogłaby otworzyć nowe możliwości syntetyczne przy projektowaniu różnych wariantów strukturalnych polifosforanów.

Aby to zbadać i jednocześnie uprawdopodobnić niektóre etapy mechanizmu zaproponowanego na **Schemacie 37**, przeprowadziłam serię reakcji adduktu pirydyniowego P-Py, generowanego w obecności minimalnej ilości czynnika sililującego, z acetamidem. Zgodnie z przewidywaniami, dodanie 2 ekw. acetamidu do pirydyniofosforanu generowanego z użyciem z 0,05 ekw. BSA, spowodowało widoczne w widmie ^{31}P NMR pojawienie się sygnałów pochodzących od symetrycznego trifosforanu ($\delta_P = -11$ ppm i -21 ppm, ok. 67%) obok nieprzereagowanego adduktu, ok. 33% (**Rys. 30**, widmo A). Po kilkunastu godzinach obraz ten zmienił się i mieszanina reakcyjna zawierała wówczas ekwimolarne ilości symetrycznego di- ($\delta_P = -10$ ppm)

i trifosforanu (**Rys. 30**, widmo B). Po dodaniu nadmiaru wody w widmie ^{31}P NMR obserwowaliśmy sygnał pochodzący od symetrycznego difosforanu bis-AZT oraz niewielki sygnał od trifosforanu tris-AZT (**Rys. 30**, widmo C). Kiedy do analogicznej mieszaniny reakcyjnej wygenerowanej z pirydyniofosforanu i 2 ekw. acetamidu dodałam 1 ekw. BSA, obydwa związki (addukt pirydyniowy P-Py i trifosforan, widmo A, **Rys. 30**) zostały przekształcone w bissililowany fosforan.

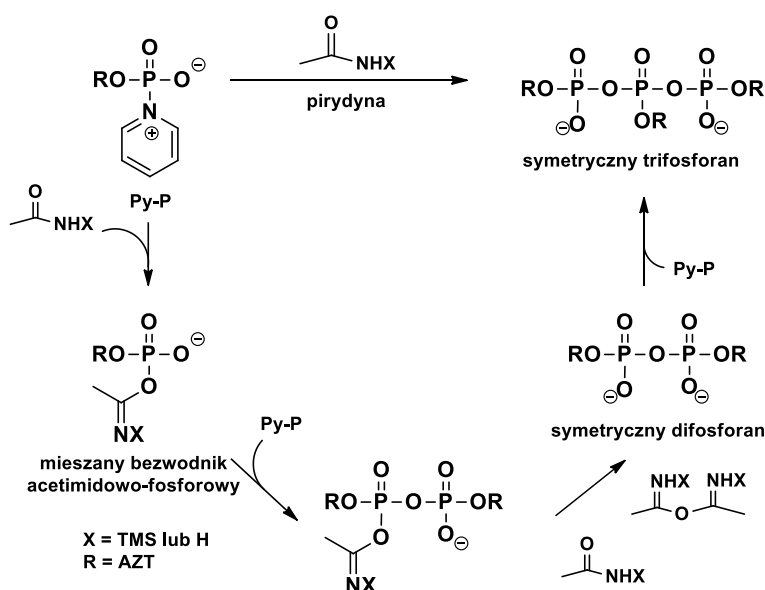


Rys. 30. (A) Widmo ^{31}P NMR po dodaniu 2 ekw. acetamidu do wygenerowanego P-Py z niewielką ilością czynnika sililującego; (B) Widmo ^{31}P NMR tej samej reakcji po kilkunastu godzinach; (C) Widmo ^{31}P NMR po hydrolizie.

W przypadku stosowania znacznego nadmiaru acetamidu (5-10 ekw.) można było zaobserwować uprzywilejowane tworzenie trifosforanu (81% i 10% nieprzereagowanego P-Py) oraz niewielkich ilości symetrycznego pirofosforanu (ok. 9%). Z kolei reakcja z 0,5 ekw. acetamidu przebiegała wolniej – w pierwszym zarejestrowanym widmie ^{31}P NMR zauważyłam ok. 54% trifosforanu i 46% difosforanu, a dopiero po 5 godzinach reakcja była bliska zakończeniu (20% difosforanu vs 77% trifosforanu). Opisanie eksperymenty sugerowały możliwość występowania stanu równowagi pomiędzy generowanymi difosforanem i trifosforanem, na którego zmianę miały wpływ inne związki obecne w mieszaninie reakcyjnej, np. acetamid powstały po sililowaniu BSA.

Wyniki powyższych eksperymentów pozwoliły postawić hipotezę dotyczącą mechanizmu tworzenia się polifosforanów w wyniku reakcji adduktu pirydyniowego

(generowanego z niewielką ilością BSA) z acetamidem w bezwodnych warunkach (**Schemat 38**). Podobnie jak w przypadku tworzenia bissililowanego fosforanu (**Schemat 37**) postulować można w pierwszym etapie nukleofilowy atak cząsteczki acetamidu (lub *N*-sililowanej pochodnej) na elektrofilowe centrum pirydyniofosforanu P-Py, co prowadzi do utworzenia mieszanego bezwodnika acetimidowo-fosforowego. Ponieważ układ reakcyjny zawiera jedynie ograniczoną ilość czynnika sililującego, istnieje duże prawdopodobieństwo reakcji pomiędzy tak powstałym mieszanym bezwodnikiem a fosfobetainą P-Py, generującej, w wyniku szybko następujących po sobie procesów, symetryczny difosforan. Związek ten ze względu na swoje nukleofilowe właściwości może atakować centrum elektrofilowe adduktu pirydyniowego P-Py, dając finalnie symetryczny trifosforan. Taki związek, ze względu na swoją strukturę mógłby stanowić ciekawy wariant pronukleotydowych polifosforanów projektowanych jako leki anty-HIV. Niestety, duża labilność wiązania P-O-P i podatność na hydrolizę (rozpad do odpowiednich symetrycznych disfosforanów i monoestrów fosforanowych) wyklucza te związki jako potencjalne terapeutyki.



Schemat 38. Możliwy mechanizm reakcji adduktu pirydyniowego (generowanego z niewielką ilością czynnika sililującego) z acetamidem.

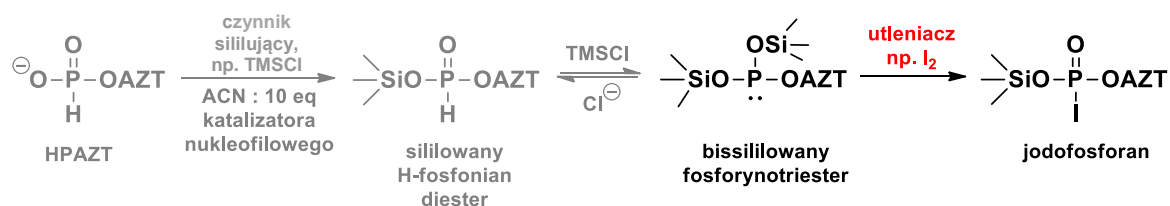
Przeprowadzone badania wyraźnie wskazywały na istotne znaczenie wyboru czynnika sililującego przy generowaniu pirydyniofosforanów P-Py. Zarówno rodzaj użytego czynnika sililującego, jak i jego ilość powinna być przeanalizowana dla każdej reakcji zachodzącej poprzez fosfobetainę P-Py. Chcąc stosować pochodne fosforanów

jako nukleofile podczas oksydatywnej kondensacji, wybrałam ścieżkę syntetyczną typu *one-pot-two-steps*, o czym wspominałam na początku rozważań dotyczących czynnika silylującego. Do silylowania H-fosfonianomonoestrów i przeprowadzania ich w reaktywną terwalentną formę, postanowiłam wykorzystać, ze względów praktycznych, chlorek trimetylosililu. Wynikiem szeregu procedur optymalizacyjnych był wniosek, że do generowania pirydyniofosforanu P-Py najlepiej stosować nadmiar (2 ekw.) tego odczynnika ze względu na zabezpieczenie warunków bezwodnych reakcji oraz możliwość częściowego zużywania się tego reagenta na silylowanie zasady azotowej w reszcie nukleozydowej.

3.3. Wpływ utleniacza

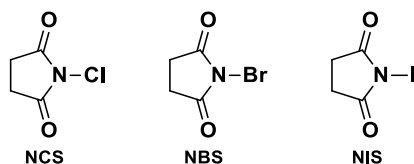
Estry H-fosfonianów są zwykle bardziej odporne na utlenianie niż fosforynotriestry. Przeprowadzenie zatem tetraskoordinowanych związków P(III) w formy terwalentne, posiadające wolną parę elektronową na triskoordinowanym atomie fosforu, zwiększa ich reaktywność wobec elektrofila (czynnika utleniającego). Opracowano wydajne, a zarazem łagodne procedury utleniania H-fosfonianomono- i diestrów do odpowiednich pochodnych P(V) z wykorzystaniem m.in. (i) dipirydylowego disiarczku,¹³¹ (ii) heksachloroacetonu¹³² oraz (iii) jodu w mieszaninie pirydyna/woda (98:2, v/v).¹³³ Ostatni z wymienionych układów jest obecnie najczęściej stosowanym utleniaczem w chemii organicznej związków P(III), głównie ze względów praktycznych, takich jak łatwa dostępność reagentów, możliwość przeprowadzania szybkich przekształceń typu *one-pot* oraz minimalna ilość tworzących się produktów ubocznych (pirofosforanów).

Przed utlenieniem H-fosfonianomonoestry, muszą zostać przeprowadzone najpierw w formę triskoordinowaną, najczęściej z wykorzystaniem czynnika silylującego. Następnie, po dodaniu utleniacza do układu, wolna para elektronowa w bisilylowanym fosforynotriestrze zostaje przeniesiona na elektrofil, zwiększając tym samym stopień utlenienia atomu fosforu z III na V, co przedstawiono na **Schemacie 39**. Przy utlenianiu jodem w medium reakcyjnym zawierającym katalizator nukleofilowy (np. pirydynę) zwykle nie obserwujemy w ³¹P NMR powstawania jodofosforanu, ze względu na szybką substytucję atomu jodu przez pirydynę z wytworzeniem reaktywnego związku, pirydyniofosforanu (P-Py), o czym mowa będzie w kolejnym podrozdziale.



Schemat 39. Schemat ogólny utleniania bissilylowanej pochodnej fosforynotriestrowej.

Do badań metodycznych nad reakcją oksydacyjnej kondensacji H-fosfonianomonoestrów z różnymi nukleofilami wybrałam grupę utleniaczy zawierających w swojej strukturze tzw. pozytywny halogen (*ang. positive halogen compounds*). Tę klasę związków organicznych stanowią cząsteczki, w których halogen (F, Cl, Br, I) jest związany z atomem węgla lub heteroatomem i może zostać przeniesiony, według różnych mechanizmów, na nukleofilowe związki.¹³⁴ W pierwszej kolejności do utleniania stosowałam jod oraz brom, które pozornie nie są polarne, jednakże w medium reakcyjnym, mogą tworzyć dipol indukowany, co umożliwia wspomniany transfer halogenu i w konsekwencji, utlenienie. Reaktywność jodu i bromu w tym procesie postanowiłam porównać z halogenopochodnymi *N*-sukcynimidu: NBS, NCS, NIS (**Rys. 31**).



Rys. 31. Halogenopochodne *N*-sukcynimidu stosowane w przeprowadzonych badaniach metodycznych.

Badania prowadziłam w acetonitrylu na układzie modelowym, wykorzystując 5'-H-fosfonian AZT (HPAZT) jako substrat, TMSCl (2 ekw.) jako czynnik silylujący, pirydynę (10 ekw.) jako katalizator nukleofilowy oraz fosforan dibutyłowy (3 ekw.) jako nukleofil. Ilości utleniacza, I₂, Br₂, NBS, NCS, NIS, wynosiły 1,1 ekw., 1,5 ekw. i 2 ekw. dla każdego z badanych związków. W tych eksperymentach, chciałam sprawdzić jaka jest minimalna ilość czynnika utleniającego potrzebna do wydajnego generowania pirydyniofosforanu (P-Py) oraz zbadać wpływ rodzaju utleniacza na ewentualne tworzenie się niepożądanych produktów ubocznych.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pozwoliły stwierdzić, że dla reakcji oksydacyjnej kondensacji HPAZT z badanym nukleofilem, każdy z zaproponowanych

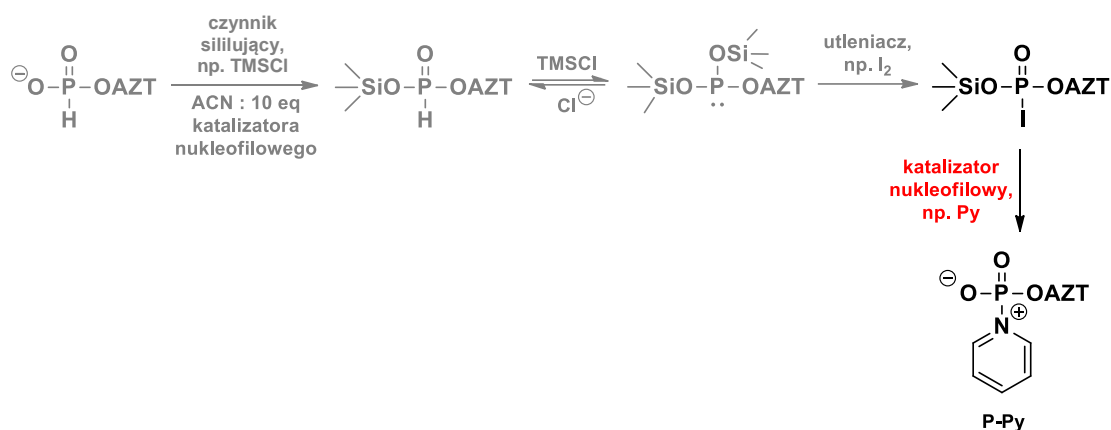
utleniaczy działał równie efektywnie. We wszystkich wariantach reakcyjnych, przed dodaniem P(V) nukleofila, obserwowałam w widmach ^{31}P NMR natychmiastowe i czyste generowanie adduktu pirydyniowego metafosforanu P-Py, bez śladów sygnałów pochodzących od odpowiednich bromo-, chloro- i jodofosforanów. Utworzona fosfobetaina P-Py po dodaniu dibutyłowego fosforanu, reagowała natychmiast dając odpowiedni β -P-di-butylo 5'-difosforan AZT oraz symetryczny difosforan bis-AZT jako produkt uboczny (< 10%). Nadmiar czynnika utleniającego nie wpływał na ilość powstającego związku ubocznego.

W związku z podobną reaktywnością wszystkich badanych utleniaczy, wybrałam jeden z nich do prowadzenia dalszych prac, zarówno metodycznych, jak i syntetycznych. Mając na uwadze opracowanie wydajnego protokołu, pozwalającego na otrzymywanie różnorodnych strukturalnie 5'-difosforanów nukleozydów, moja uwaga skupiona była przede wszystkim na odczynnikach możliwie łatwo dostępnych, trwałych, o dobrej rozpuszczalności w medium reakcyjnym oraz nietoksycznych (o ile to możliwe). Biorąc te wszystkie kryteria pod uwagę, wybrałam jod jako utleniacz, zarówno do kolejnych etapów badań metodycznych, jak i syntez projektowanych pochodnych 5'-difosforanów nukleozydów.

3.4. Wpływ katalizatora nukleofilowego

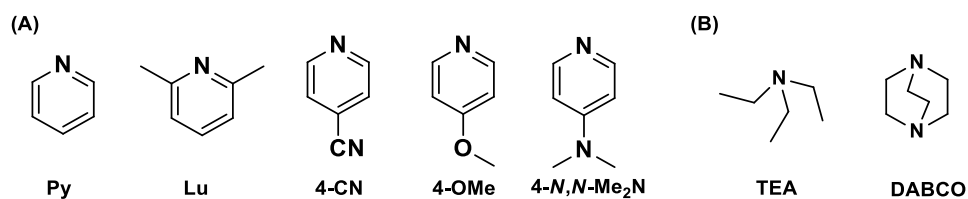
Kataliza nukleofilowa jest procesem dwustopniowym i obejmuje najpierw generowanie reaktywnego związku pośredniego z substratu i katalizatora nukleofilowego, a następnie jego reakcję z drugim substratem (nukleofilem), tworząc finalny produkt. Aby związek działał jako katalizator nukleofilowy energii aktywacji tworzenia związku pośredniego i jego reakcji z nukleofilem muszą być niższe niż energia aktywacji bezpośredniego ataku nukleofila na substrat. Szukając optymalnego katalizatora nukleofilowego należy brać pod uwagę dwa aspekty, tzn. (i) nukleofilowość katalizatora – zastosowany reagent musi być na tyle dobrym nukleofilem, by móc efektywnie generować reaktywny związek pośredni z substratem; (ii) jego zdolność jako grupy odchodzącej – katalizator nukleofilowy musi być lepszą grupą odchodzącą, niż ta, obecna w substracie, aby zapewnić efektywne podstawienie nukleofilem stosowanym w konkretnej reakcji. Wybór właściwego katalizatora nukleofilowego wymaga wyśrodkowania tych dwóch (często sprzecznych) właściwości.

Powszechnie stosowanym rozpuszczalnikiem w reakcjach utleniania i oksydatywnej kondensacji H-fosfonianów jodem jest pirydyna pełniąca również rolę katalizatora nukleofilowego. Reaguje ona natychmiast z wytworzonym *in situ* jodofosforanem prowadząc do generowania reaktywnego pirydyniofosforanu (P-Py, **Schemat 40**).



Schemat 40. Schemat ogólny generowania pirydyniofosforanu (P-Py) z H-fosfonianomonoestru, z zastosowaniem przejściowego silylowania.

Prowadząc badania metodyczne postanowiłam sprawdzić możliwość wykorzystania innych zasad heterocyklicznych (pochodnych pirydyny), jako potencjalnych katalizatorów nukleofilowych dla tej reakcji. I tak, oprócz powszechnie stosowanej pirydyny, użyłam również: 2,6-lutydynę, 4-cyjanopirydynę, 4-metoksypirydynę oraz 4-*N,N*-dimetyloaminopirydynę (**Rys. 32, A**).



Rys. 32. Zasady heterocykliczne (A) oraz aminy trzeciorzędowe (B) stosowane w badaniach metodycznych.

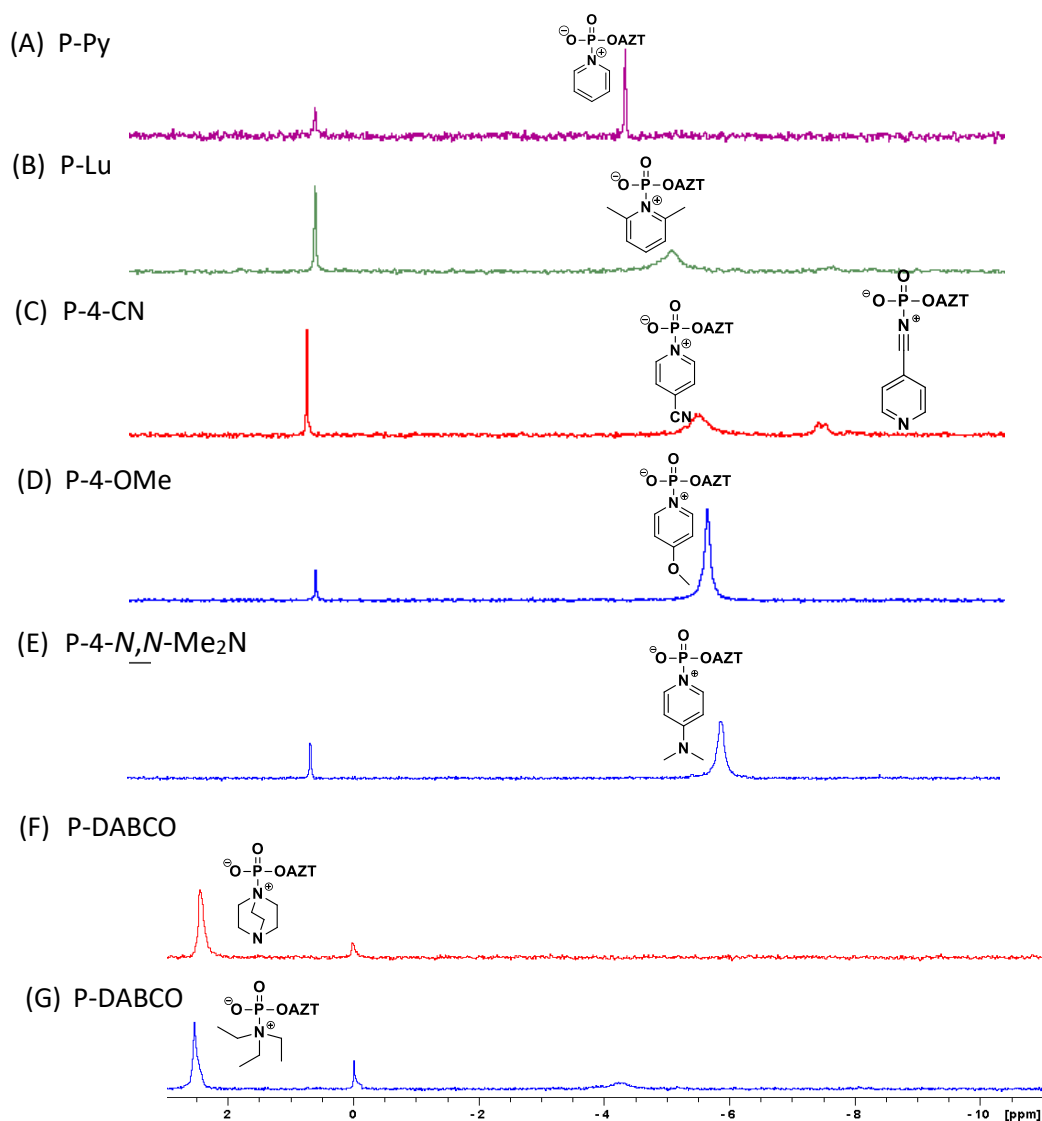
Ze względu na różnice w zawadzie przestrzennej, występowaniu podstawników elektronodonorowych i elektronoakceptorowych, spodziewałam się różnic w ich nukleofilowości względem centrum fosforowego oraz reaktywności generowanego pirydyniofosforanu. W związku z tym, że metafosforany mogą tworzyć stabilne addukty również z aminami trzeciorzędowymi,¹³⁵ do badań włączyłam także zasady alifatyczne: trietyloaminę (TEA) oraz 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (DABCO), przedstawione w punkcie B na **Rys. 32**, chcąc porównać ich reaktywność z pochodnymi zasad

heterocyklicznych. Wybrane aminy alifatyczne różnią się zawadą przestrzenną, co może mieć wpływ na możliwość ich podstawienia przez nukleofile w generowanych adduktach.

Jako standardowy układ reakcyjny do badań metodycznych wykorzystałam ponownie 5'-H-fosfonian AZT (HPAZT), TMSCl jako czynnik silylujący (2 ekw.), jod jako utleniacz (1,5 ekw.) oraz 10 ekw. katalizatora nukleofilowego (kolejno: Py, Lu, 4-CN, 4-OMe, 4-*N,N*-Me₂N, TEA, DABCO) w acetonitrylu. We wszystkich reakcjach użyty katalizator nukleofilowy pełnił również funkcję zasady neutralizującej powstające kwasowe produkty (HCl).

Eksperymenty wykazały, że wszystkie z badanych amin charakteryzowały się odpowiednimi właściwościami nukleofilowym, umożliwiającymi generowanie adduktów analogicznych do P-Py, o charakterystycznych przesunięciach chemicznych $\delta_P = -4,8$ do $-6,2$ ppm dla pirydyniofosforanów (**Rys. 33**, A-E) oraz $\delta_P = 2 - 2,5$ ppm dla pochodnych trzeciorzędowych amin alifatycznych (**Rys. 33**, F-G). 4-Metoksypirydyna oraz 4-*N,N*-dimetyloaminopirydyna, ze względu na silnie elektronodonorowy charakter podstawników w pozycji *para* pierścienia aromatycznego, wzmagający nukleofilowość atomu azotu pirydynowego, efektywnie tworzyły odpowiednie fosfobetainy, P-4-OMe i P-4-*N,N*-Me₂N. Interesującym był fakt, że również 2,6-lutydyna, pomimo znacznej zawady przestrzennej, okazała się działać jako nukleofil w tej reakcji, tworząc addukt P-Lu. Dla 4-cyjanopirydyny, prawdopodobnie w związku z elektronoakceptorowymi właściwościami grupy nitrylowej i związaną z tym zmniejszoną nukleofilowością (i zasadowością) atomu azotu pirydynowego, w widmie fosforowym ³¹P NMR reakcji zaobserwować można było, obok sygnału pochodzącego od adduktu P-4-CN, drugi sygnał przy $\delta_P = -8$ ppm. Powstawanie dwóch związków w reakcji z tą pochodną pirydyny przypisałam tworzeniu się w tym przypadku dodatkowo adduktu typu nitrylowego metafosforanu (**Rys. 33**, C). Można to tłumaczyć z jednej strony, zmniejszeniem gęstości elektronowej na endocyklicznym atomie azotu zasady heterocyklicznej i obniżeniem jego nukleofilowości, z drugiej zaś – obecnością nukleofilowego azotu egzocyklicznego grupy nitrylowej. W literaturze nie znalazłam jednak informacji na temat przesunięć chemicznych dla adduktów typu nitrylowego, przez co nie udało mi się uprawdopodobnić postulowanej struktury związku rezonującego przy -8 ppm. Aminy 3°, niezależnie od występującej zawady sterycznej (TEA vs DABCO) prowadziły do

wydajnego generowania fosfobetainy (P-TEA i P-DABCO) o odmiennych przesunięciach chemicznych w widmach ^{31}P NMR niż te powstałe w reakcji z zasadami heterocyklicznymi. Może to być spowodowane większą zasadowością amin alifatycznych i w konsekwencji odśłanianiem (ang. *deshielding*) jądra fosforu.



Rys. 33. Widma ^{31}P NMR generowanych fosfobetain w układach modelowych z użyciem 10 ekw. badanego katalizatora nukleofilowego: A-E – zasady heterocyklicznej oraz F-G – zasady alifatycznej.

Po stwierdzeniu odpowiednich właściwości nukleofilowych wszystkich badanych zasad, przeprowadziłam eksperymenty sprawdzające reaktywność wygenerowanych fosfobetain w reakcjach z różnymi nukleofilami. Pierwszym etapem badań była reakcja z *n*-butyloaminą, bardzo efektywnym nukleofilem w stosunku do elektrofilowego centrum P(V). Okazało się, że dodanie 3 ekw. *n*-butyloaminy do wygenerowanych

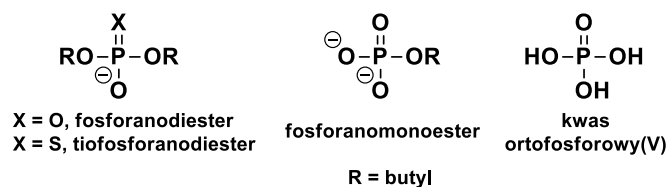
fosfobetain prowadziło we wszystkich przypadkach do praktycznie ilościowego tworzenia się *n*-butyloвого amidofosforanu AZT (widma ^{31}P NMR). Dotyczyło to również mieszaniny adduktów P-4-CN, co świadczyło, że dodatkowy produkt obserwowany w widmach ^{31}P NMR przy $\delta_P = -8$ ppm podczas generowania tej betainy, również przekształcany był w oczekiwany produkt. Potwierdzało to przypisaną wcześniej temu związkowi możliwą strukturę adduktu typu nitrylowego.

Pewne różnice w reaktywności generowanych betain ujawniły się natomiast w reakcji ze słabszym nukleofilem, etanolem. W tym przypadku, dla większości betain wymagana była większa ilość dodanego nukleofila (>10 ekw.) aby reakcja prowadziła czysto do estru etylowego AZT. Natomiast substytucja na centrum fosforowym w betainie P-4-*N,N*-Me₂N nie była obserwowana, co zgodne było z oczekiwaną wysoką stabilnością tej pochodnej pirydyniofosforanu, a więc niską reaktywnością wobec słabych nukleofili.

Podsumowując tę część badań metodycznych należy stwierdzić, że zmieniając rodzaj zasady w generowanej betainie, można modulować jej reaktywność. Dla silnych nukleofili (np. *n*-butyloaminy), różnice te były niezauważalne i zaczęły się ujawniać dopiero w reakcjach ze słabszymi nukleofilami (np. etanolem). Ponieważ najbardziej interesujące dla mnie były nukleofile fosforanowe, które należą do słabych nukleofili o zdelokalizowanym ładunku przypuszczałam, że różnice w reaktywności między poszczególnymi adduktami będą tu jeszcze bardziej wyraźne. Z tych powodów wszystkie wygenerowane przeze mnie betainy poddałam reakcjom z wybranymi P(V) nukleofilami, co opisane będzie w następnym podrozdziale.

3.5. Reaktywność fosfobetain wobec P(V) nukleofili

Efektywne generowanie adduktu pirydyniowego typu P-Py było konieczne dla wydajnej syntezy 5'-difosforanów nukleozydów. Kolejnym krokiem niezbędnym do realizacji tego celu było zbadanie reaktywności utworzonej betainy typu P-Py z różnymi P(V) nukleofilami, a mianowicie fosforanodiestrami, fosforanomonestrami, fosforanem nieorganicznym oraz ich siarkowymi odpowiednikami (**Rys. 34**). Wybór tych nukleofili podyktowany był zaprojektowanymi wariantami strukturalnymi 5'-difosforanów nukleozydów, o których dyskutowałam w *Rozdziale VI.1*.



Rys. 34. Przykładowe struktury P(V) nukleofili stosowanych w reakcji oksydatywnej kondensacji H-fosfonianów w celu otrzymywania zaprojektowanych pochodnych 5'-difosforanów nukleozydów.

Powyższe eksperymenty wykonane na układzie modelowym miały pomóc w znalezieniu optymalnych warunków otrzymywania zaplanowanych produktów w zależności od typu stosowanego nukleofila. Zarówno do badań metodycznych, jak i syntetycznych wykorzystywałam sole trietyloamoniowe fosforanów oraz tiofosforanów, które charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w układach organicznych. Ciekawiło mnie, czy będą zauważalne potencjalne różnice w nukleofilowości układów diestrowych i monoestrowych fosforanów, jak również, czy zauważalny będzie wpływ obecności heteroatomu na nukleofilowość tych cząsteczek.

Dyskutując o nukleofilowości należy pamiętać o kilku czynnikach, które mają na nią wpływ, m.in.: rozmiar nukleofilowego atomu, jego elektroujemność oraz polaryzowalność. Nie bez znaczenia są również zawada steryczna oraz rodzaj użytego rozpuszczalnika. W odróżnieniu od amin czy alkoholi, stosowanie P(V) nukleofili w reakcji z generowanymi betainami jest bardziej skomplikowane ze względu na różne warianty strukturalne fosforanu (fosforan nieorganiczny, monoestry i diestry fosforanowe) lub odpowiednich tiofosforanów. Dodatkowo, różny stopień jonizacji, zróżnicowana nukleofilowość poszczególnych form w roztworze oraz możliwości reakcji z czynnikiem silylującym stosowanym do generowania betainy powoduje, że fosforany są bardzo trudnymi do kontrolowania nukleofilami w reakcjach chemicznych.

Moje badania rozpoczęłam od oszacowania reaktywności różnych fosfobetain w stosunku do modelowego fosforanodiestru, a mianowicie fosforanu di-*n*-butylowego, który jest względnie dobrym P(V) nukleofilem (**Rys. 34**). Pierwszym przebadanym w tej serii związkiem był addukt P-Py ($\delta_P = -4,9$ ppm). Po dodaniu 1 ekw. fosforanodiestru w widmie ^{31}P NMR obserwowałam nadal sygnał pochodzący od adduktu P-Py, natomiast dodanie 2 ekw. P(V) nukleofila spowodowało całkowite zniknięcie tego związku ($\delta_P = -4,9$ ppm) i powstanie dwóch sygnałów (dwa dublety) przy $\delta_P = -11$ ppm i $-12,5$ ppm

pochodzących od pożądanego 5'-difosforanu nukleozydu. Oprócz nich, obserwowałam sygnał od AZTMP ($\delta_p = 0,7$ ppm) i jego silylowanej pochodnej ($\delta_p = -8,5$ ppm).

Addukt z lutydyną P-Lu, zachowywał się odmiennie i pomimo dodania większego nadmiaru (3 ekw.) fosforanu dibutylowego, nie prowadził do oczekiwanego produktu. Ten wynik można prawdopodobnie przypisać mniejszej reaktywności badanej betainy na skutek zawady przestrzennej przy centrum fosforowym. Sprawdzenie reaktywności pirydyniofosforanu P-4-CN wobec P(V) nukleofila było szczególnie interesujące, ze względu na korzystną labilizację wiązania P-N na skutek obecności egzocyklicznej grupy nitylowej. Niestety, addukt P-4-CN nie reagował jednokierunkowo ze stosowanym nukleofilem generując znaczne ilości produktów ubocznych, m.in. AZTMP oraz symetryczny difosforan AZT. Bardziej korzystne wyniki otrzymałam natomiast w reakcji fosfobetainy P-4-OMe, zawierającej 4-metoksypirydynę, z badanym P(V) nukleofilem. Pomimo obecności podstawnika donującego elektrony, a więc zwiększającego siłę wiązania P-N, 4-metoksypirydyna ulegała szybko i wydajnie podstawieniu po dodaniu 2 ekw. P(V) nukleofila. W pierwszym zarejestrowanym widmie ^{31}P NMR (ok. 3 min.) widać było wyłącznie sygnały pochodzące od 5'-difosforanu nukleozydu. Przy użyciu 1 ekw. fosforanu, reakcja zachodziła wolniej i dopiero po 20 minutach obserwowałam całkowity zanik sygnału od wyjściowej betainy. Warto podkreślić, że oksydacyjna kondensacja z użyciem tej pochodnej pirydyny zachodziła szybko i właściwie bez produktów ubocznych przy użyciu 2 ekw. dibutylowego fosforanu, co świadczyło o dużej aktywności katalitycznej 4-metoksypirydyny. Druga z pochodnych pirydyn zawierająca elektronodonorowy podstawnik (*N,N*-dimetyloaminowy) w pozycji *para* pierścienia aromatycznego okazała się być zbyt stabilna i nawet po dodaniu 10 ekw. fosforanodiestru nie obserwowałam w widmie ^{31}P NMR sygnałów pochodzących od oczekiwanego 5'-difosforanu.

W przypadku amin alifatycznych widać było wyraźną różnicę w reaktywności generowanych *in situ* fosfobetain. Ze względu na swobodę konformacyjną reszt alkilowych, a co jest z tym bezpośrednio związane – znaczną zawadą steryczną, spodziewałam się niższej reaktywności fosfobetainy P-TEA podczas substytucji fosforanodiestrem w porównaniu z mniej zawadzonym przestrzennie adduktem P-DABCO. Istotnie, w reakcji P-TEA z 1 ekw. nukleofila obserwowałam raczej silylowanie fosforanu i powolne przechodzenie adduktu w produkt (po 40 minutach nadal ok. 50%

nieprzereagowanej fosfobetainy). Widma ^{31}P NMR wyglądały podobnie, kiedy zastosowałam dwu- lub trzykrotny nadmiar nukleofila. W przypadku betainy P-DABCO, dodanie 2 ekw. badanego P(V) nukleofila, prowadziło natychmiast do powstania oczekiwanego produktu, tzn. odpowiedniego 5'-difosforanu AZT.

Na podstawie serii eksperymentów z betainami zawierającymi różne aminy jako katalizatory nukleofilowe, można wysunąć hipotezę, że największy wpływ na wydajne otrzymywanie 5'-difosforanów ma nukleofilowość zastosowanej aminy oraz zawada przestrzenna przy centrum fosforowym generowana przez aminę. Najmniej nukleofilowa pochodna pirydyny (4-cyjanopirydyna) okazała się być mało użyteczna jako katalizator nukleofilowy, a z kolei 4-*N,N*-dimetyloaminopirydyna, ze względu na dużą nukleofilowość, tworzyła zbyt stabilne połączenie z atomem fosforu, co również dyskwalifikowało ją jako efektywny katalizator nukleofilowy. Przeprowadzone badania ukazały także niekorzystny wpływ zawady sterycznej na reakcję betain z modelowym P(V) nukleofilem, stąd stosowanie fosfobetain P-Lu i P-TEA okazało się niekorzystne w reakcji z fosforanodiestrem, choć sprawdzało się podczas kondensacji z mniej zawadzonymi nukleofilami takimi jak butyloamina czy etanol. Odpowiednie właściwości katalizatorów nukleofilowych w badanym układzie okazały się mieć trzy aminy: pirydyna, 4-metoksypirydyna oraz DABCO.

Ostatecznie do dalszych badań nad reakcją oksydacyjnej kondensacji H-fosfonianów monoestrów z P(V) nukleofilami wybrałam pirydynę przede wszystkim przez wzgląd na czynniki chemiczne – odpowiednią reaktywność generowanego adduktu wobec stosowanego P(V) nukleofila. Nie bez znaczenia były również względy praktyczne, a więc możliwość stosowania pirydyny także jako rozpuszczalnika oraz czynnik ekonomiczny – jest to najtańsza z wybranych amin, co było istotne, biorąc pod uwagę dużą liczbę planowanych syntez.

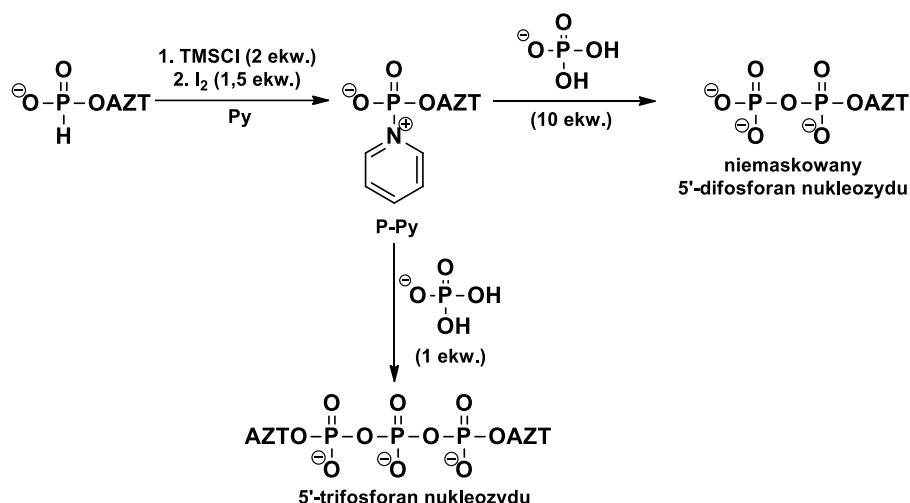
Kontynuując moje badania nad P(V) nukleofilami, chciałam porównać reaktywność fosforanu dibutylowego z jego siarkowym odpowiednikiem (**Rys. 34**) w stosunku do ostatecznie wybranej betainy, a mianowicie adduktu pirydyniowego P-Py. Po dodaniu 1 ekw. tiofosforanu dibutylowego do wygenerowanej fosfobetainy P-Py po 24 godzinach obserwowałam tylko niewielką ilość powstającego produktu (< 10%). Natomiast reakcja z 2 ekw. tiofosforanu, podobnie jak w przypadku fosforanu dibutylowego, powodowała natychmiastowe tworzenie się 5'-difosforanu. Tak więc,

zastąpienie jednego z atomów tlenu siarką w diestrze fosforowym, nie wpłynęło zauważalnie na jego nukleofilowe właściwości.

Ponieważ oczekiwałam, że nukleofilowość fosforanomonoestrów będzie pośrednia pomiędzy nukleofilowością fosforanodiestrów a fosforanem nieorganicznym, wybrałam najpierw ten ostatni jako mój następny obiekt badawczy. Zwykle, aby otrzymać analogi polifosforanów używa się soli tetrabutylamonowych, co znacząco poprawia rozpuszczalność fosforanu nieorganicznego. Jednakże w trakcie badań postanowiłam sprawdzić możliwość wykorzystania krystalicznego kwasu fosforowego jako nukleofila w badanej reakcji kondensacji. Kwas ortofosforowy(V) rozpuszczałam w niewielkiej ilości bezwodnego dimetyloformamidu (DMF) i w takiej formie dodawałam do mieszaniny reakcyjnej.

Stosując 3 molowy nadmiar kwasu fosforowego w stosunku do betainy P-Py, w widmie ^{31}P NMR obserwowałam tworzenie dwóch produktów: sygnały o intensywności 1:1 przy $\delta_P = -8$ ppm i -10 ppm (dwa dublety) odpowiadające pożądanemu produktowi (5'-difosforan AZT, ok. 40%) oraz dwa sygnały w stosunku 2:1 przy $\delta_P = -10$ ppm oraz -23 ppm (kolejno, dublet i tryplet) pochodzące najprawdopodobniej od 5'-trifosforanu dinukleozydu (ok. 60%). Otrzymanie takiej mieszaniny produktów skłoniło mnie do przeanalizowania dokładniej potencjalnych ścieżek ich powstawania (**Schemat 41**).

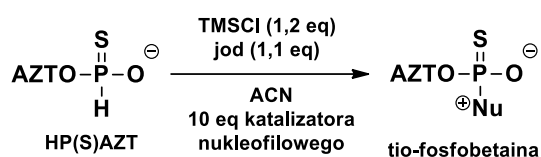
Ze względu na słabą nukleofilowość niepodstawionego fosforanu było prawdopodobne, że utworzony początkowo 5'-difosforanu nukleozydu może reagować z pirydyniofosforanem P-Py wciąż obecnym w mieszaninie, tworząc 5'-trifosforan dinukleozydu. Zgodnie z tym założeniem, aby wydajnie otrzymywać pożądaną produkt, 5'-difosforan AZT, zastosowałam duży nadmiar P(V) nukleofila (10 ekw.). Zgodnie z oczekiwaniem, w takich warunkach 5'-difosforan AZT tworzył się jako główny produkt (ok. 90%). Struktura otrzymanego 5'-trifosforanu dinukleozydu została potwierdzona po izolacji związku za pomocą ^{31}P NMR, ^1H NMR oraz MS. Zbadana została również aktywność anti-HIV oraz cytotoksyczność tego związku.



Schemat 41. Wykorzystanie P-Py w syntezie pochodnych 5'-difosforanów nukleozydów oraz 5'-trifosforanów dinukleozydów w reakcjach z kwasem ortofosforowym(V).

Jeśli chodzi o wspomniany wyżej fosforanomonooester *n*-butylowy, użycie 1 lub 2 ekw. tego P(V) nukleofila w reakcji z betainą P-Py dawało złożoną mieszaninę produktów. Natomiast zastosowanie większego nadmiaru fosforanu *n*-butylowego (5 ekw.), dawało pożądany 5'-difosforan jako główny produkt (ok. 80%).

Ponieważ oczekiwałam, że dla syntezy niektórych wariantów 5'-difosforanów konieczne będzie użycie fosfobetain zawierających heteroatom (siarkę lub selen) w pozycji niemostrkowej, podjęłam próby wygenerowania odpowiednich tio-fosfobetain stosując H-tiofosfonianomonooester AZT jako związek wyjściowy (**Schemat 42**).



Nu - katalizator nukleofilowy jak na Rys. 32

Schemat 42. Generowanie tio-fosfobetainy z odpowiedniego monoestru H-tiofosfonianu.

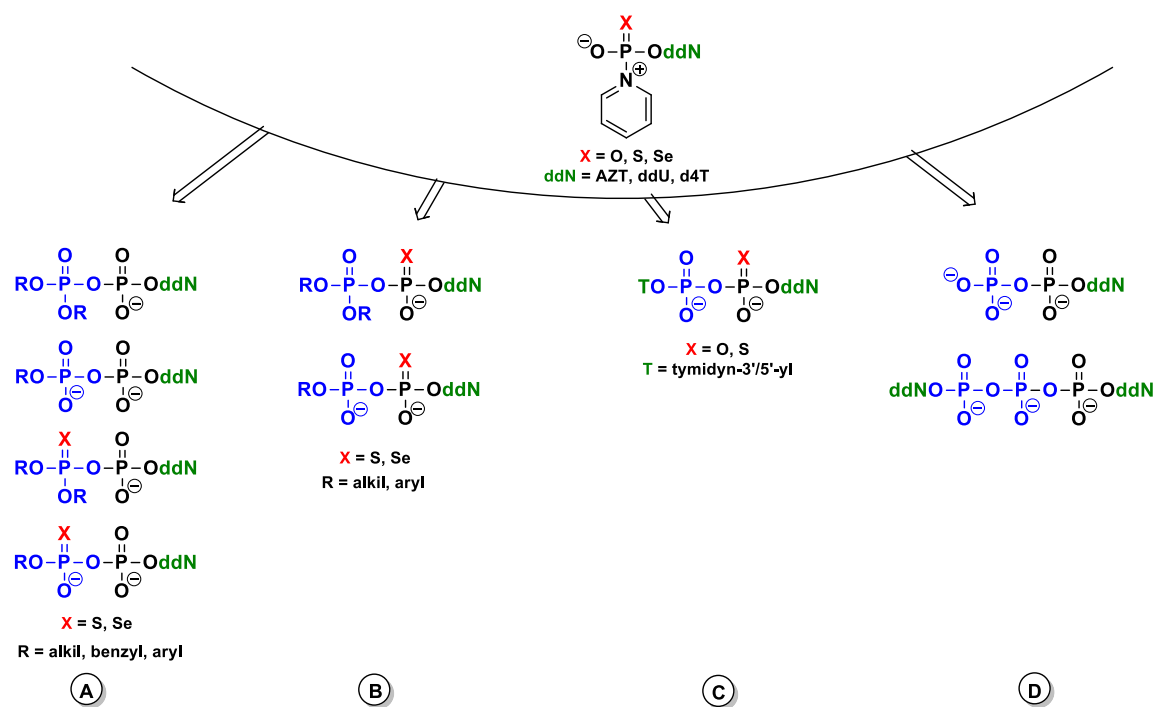
W trakcie badań udało mi się wygenerować serię w większości nieopisanych jeszcze tio-fosfobetain, analogiczną do serii okso-fosfobetain (**Tabela 1**). Wszystkie one, reagowały z odpowiednimi nukleofilami (patrz wyżej) podobnie do swoich tlenowych odpowiedników. Na tej podstawie zdecydowałam, że do prac syntetycznych z użyciem tio-fosfobetain, podobnie jak w przypadku okso-fosfobetain, będę używać pirydynę jako katalizator nukleofilowy.

Tabela 1. Zestawienie przesunięć chemicznych ^{31}P NMR okso- i tio-fosfobetain.

	δ_{P} [ppm]						
X = O	-4,9	-5,9	-6,1	-6,2	-6,5	2,6	2,4
X = S	55,2 55,7	56,9 57,1	57,9 58,1	53,3 53,8	51,81 52,01	66,9 67,2	65,3 65,6

Powyższe badania metodyczne dotyczące reaktywności P(V) nukleofili względem okso- i tiofosfobetain pozwoliły wstępnie oszacować możliwości syntezy zaprojektowanych wariantów strukturalnych I-IV 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów (**Rys. 26**). Biorąc pod uwagę drogi syntezy wymienionych wariantów difosforanów, typ substratu nukleotydowego oraz rodzaj użytego nukleofila, podzieliłam interesujące mnie związki na 4 klasy: **(A)** – pochodne difosforanów otrzymywane z okso-fosfobetain i odpowiedniego P(V) nukleofila, **(B)** – pochodne difosforanów otrzymywane z tio- lub selenofosfobetain, **(C)** – związki otrzymywane z okso- lub tio-fosfobetain oraz **(D)** – związki, w których substratem były okso-fosfobetainy i nieorganiczny fosforan jako nukleofil (**Rys. 35**).

Chemiczną syntezę analogów **A-D** będę skrótowo omawiać w kolejnym rozdziale oznaczając każdy z syntezowanych związków wielką literą alfabetu określającą grupę, do której przynależy oraz cyfrą przypisaną konkretnemu związkowi.



Rys. 35. Różne typy 5'-difosforanów nukleozydów podzielone wg metod ich syntezy.

4. SYNTEZA 5'-DIFOSFORANÓW 2',3'-DIDEOKSYNUKLEOZYDÓW I ICH ANALOGÓW

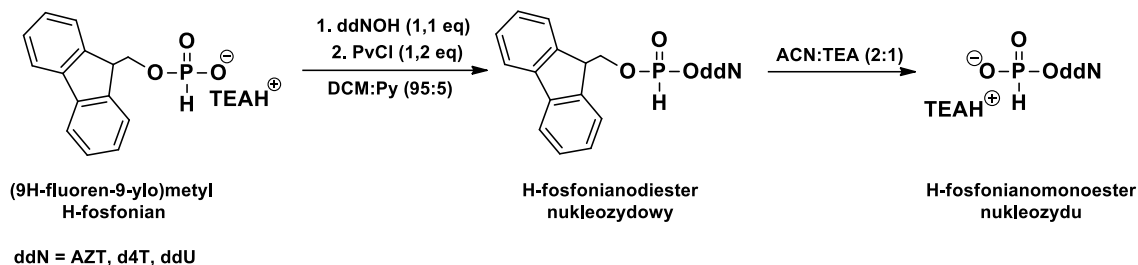
4.1. Synteza związków wyjściowych

Chemia H-fosfonianów oferuje szereg metod syntezy H-fosfonianomonoestrów i ich tio i seleno analogów, planowanych substratów w reakcji oksydatywnej kondensacji. Przez lata rozwinięto wiele metod fosfonylacji nukleozydów, a do najważniejszych czynników fosfonylujących należą: układ $\text{PCl}_3/\text{imidazol}$, salicylochlofosforyn, H-pirofosfonian oraz H-fosfonian difenylowy (DPHP).¹³⁶ Analogi seleno i tio H-fosfonianomonoestrów są natomiast najczęściej otrzymywane w łagodnych warunkach poprzez selenizację lub sulfuryzację generowanych *in situ* odpowiednich fosfinianów nukleozydów.¹³⁶⁻¹³⁷

4.1.1. Synteza 5'-H-fosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów

Do otrzymania wyjściowych związków, 5'-H-fosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów, wykorzystałam metodę opracowaną w Zakładzie Chemii Kwasów Nukleinowych, w której czynnik fosfonylujący stanowił aktywowany (9H-fluoren-9-yl)metylo H-fosfonian (**Schemat 43**).¹³⁸ W wyniku reakcji kondensacji z nukleozydem wobec chlorku piwaloilu (PvCl) jako aktywatora powstaje

H-fosfonianodiester nukleozydu, dający w widmie ^{31}P NMR dwa sygnały pochodzące od dwóch P-diastereomerów, przy δ_p ok. 8 ppm. Po wykonaniu ekstrakcji celem usunięcia nieprzereagowanego nukleozydu oraz czynnika kondensującego, całość rozpuszczono w mieszaninie ACN:TEA (2:1, v/v), w celu usunięcia grupy (9H-fluoren-9-ylo)metylowej (reakcja β -eliminacji). Po oczyszczaniu na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żel krzemionkowym otrzymałam 5'-H-fosfonianomonoestry 2',3'-dideoksynukleozydów (pochodne HPAZT, HPd4T, HPddU) z wydajnościami 87-91%. Zsyntetyzowane H-fosfoniany wykorzystywałam początkowo do badań metodycznych, a następnie jako substraty w syntezie bardziej złożonych związków o aktywności anti-HIV.

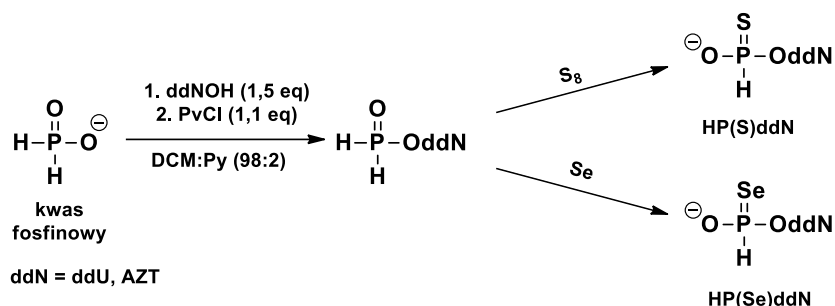


Schemat 43. Schemat otrzymywania 5'-H-fosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów.

4.1.2. Synteza 5'-H-(seleno/tio)fosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów

Do syntezy tio i seleno analogów H-fosfonianomonoestrów wykorzystałam metodę znaną z literatury, która polega odpowiednio na siarkowaniu lub selenizacji generowanych *in situ* odpowiednich fosfinianów nukleozydów.¹³⁹ Korzystając z tej metody stosowałam jako substrat sól trietyloamoniową kwasu fosfinowego, która podczas reakcji kondensacji z nukleozydem w obecności chlorku piwaloilu (PvCl) jako aktywatora, generowała odpowiednie fosfiniany, o przesunięciu chemicznym $\delta_p = 18$ ppm i charakterystycznym rozszczepieniu sygnału na tryplet o dużej stałej sprzężenia ($J_{P-H} = 570$ Hz). Po dodaniu do mieszaniny elementarnej siarki lub selenu z trietyloaminą w widmie ^{31}P NMR obserwowałam dwa singlety pochodzące od dwóch diastereoizomerów przy $\delta_p = 54-55$ ppm (H-tiofosfonian) lub $\delta_p = 48-49$ ppm (H-selenofosfonian), **Schemat 44**. Po izolacji na żelu krzemionkowym otrzymywałam odpowiednie tio lub seleno 5'-H-fosfonianomonoestry 2',3'-dideoksynukleozydów [HP(S/Se)AZT, HP(S)d4T, HP(S)ddU] z wydajnościami 81-95%, które wykorzystałam jako substraty do syntezy różnych wariantów 5'-difosforanów nukleozydów zawierających

heteroatom w niemostrkowej pozycji, w reszcie fosforanowej α względem antywirusowego nukleozydu.



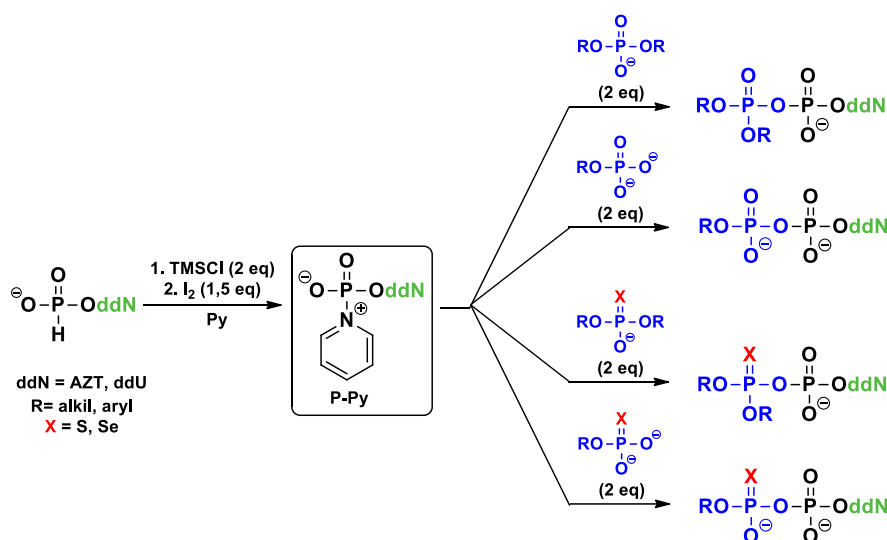
Schemat 44. Schemat reakcji otrzymywania analogów siarkowych oraz selenowych 5'-H-fosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów.

4.2. Otrzymywanie zaprojektowanych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów

Po otrzymaniu 5'-H-fosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów i odpowiednich tio i seleno H-fosfonianów, rozpoczęłam realizację celów syntetycznych mojej pracy doktorskiej. W *Rozdziale VI.1.* przedstawiłam planowane syntezy 4 grup wariantów strukturalnych 5'-difosforanów nukleozydów (**Rys. 26**). Nieudane próby izolowania związków z całkowicie zamaskowanym ładunkiem na obu resztach fosforanowych (*wariant I*) potwierdziły doniesienia literaturowe o dużej labilności wiązania P-O-P w tego typu pochodnych. W tych reakcjach jako substrat stosowałam 5'-H-fosfonian AZT-etylowy, który podczas utleniania jodem kondensowałam z fosforanem dibutylowym. Obserwowałam szybkie i wydajne powstawanie produktu, czteropodstawionego difosforanu zawierającego AZT, grupę etylową i dwie grupy *n*-butylowe, jednak po dodaniu wody związek ten w ciągu godziny rozpadał się do odpowiednich fosforanodiestrów. Podobnie dużą niestabilnością wiązania bezwodnikowego P-O-P charakteryzowały się niektóre analogi z *wariantu II* z całkowicie zamaskowanym ładunkiem na reszcie fosforanowej P_α . Na tej podstawie odrzuciłam te związki z dalszych badań nad potencjalnymi inhibitorami HIV i swoją uwagę skupiłam na oksydatywnej kondensacji 5'-H-fosfonianomonoestrów (lub tio i seleno analogów) z odpowiednimi P(V) nukleofilami, aby otrzymać związki z jednym formalnym ładunkiem ujemnym na reszcie fosforanowej P_α (*wariant II*), dwoma ładunkami (*wariant III*) lub trzema ładunkami ujemnymi (*wariant IV*).

4.2.1. Synteza zaprojektowanych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu A

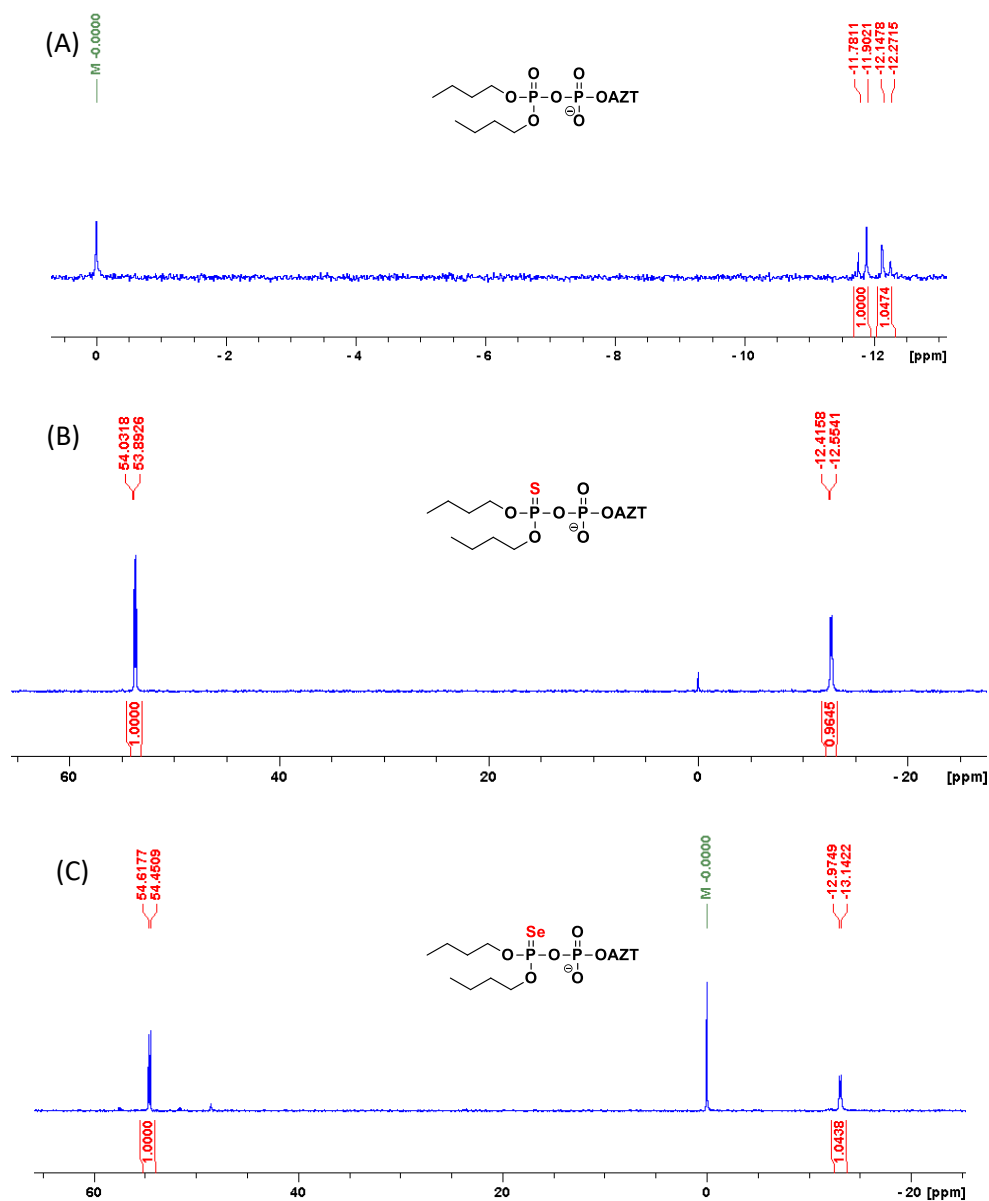
Po badaniach metodycznych nad reakcją oksydacyjnej kondensacji H-fosfonianomonoestrów z P(V) nukleofilami ustaliłam optymalne, standardowe warunki do przeprowadzania tej reakcji na skalę preparatywną, które pozwoliły na otrzymanie szeregu pochodnych 5'-difosforanów nukleozydów o zadanej strukturze (**Rys. 35**, związki grupy **A**). We wszystkich tego typu syntezach, kluczowym związkiem była generowana *in situ* okso-betaina P-Py. Substratem do reakcji był odpowiedni 5'-H-fosfonianomonoester 2',3'-dideoksynukleozydu, który przeprowadzałam za pomocą czynnika silylującego (TMSCl, 2 ekw.) w bissilylowany fosforyntriester. Utleniaczem był jod (1,5 ekw.), a katalizatorem nukleofilowym i zarazem rozpuszczalnikiem, pirydyna. Generowany addukt P-Py poddawałam następnie reakcji z odpowiednio przygotowanymi P(V) nukleofilami (2 ekw.) (**Schemat 45**).



Schemat 45. Ogólny schemat syntezy pochodnych 5'-difosforanów nukleozydów grupy **A**.

Po dodaniu P(V) nukleofila do P-Py w widmie ^{31}P NMR bardzo szybko (< 5 min) pojawiały się sygnały pochodzące od oczekiwanych produktów (odpowiednich 5'-difosforanów lub ich tio i seleno analogów) o charakterystycznym przesunięciu chemicznym w przedziale od -11 ppm do -18 ppm (dla 5'-difosforanów nukleozydów typu **A**, **Rys. 36**) oraz w przedziale od 55 ppm do -18 ppm, (dla pochodnych difosforanów typu **A**, zawierających heteroatom przy P_β , **Rys. 36**). Po dodaniu wody, nadmiar jodu rozkładałam etanotiolem (EtSH), a następnie stosując chromatografię kolumnową, izolowałam 5'-difosforany nukleozydów typu **A** z wydajnościami 30-70% (**Schemat 45**).

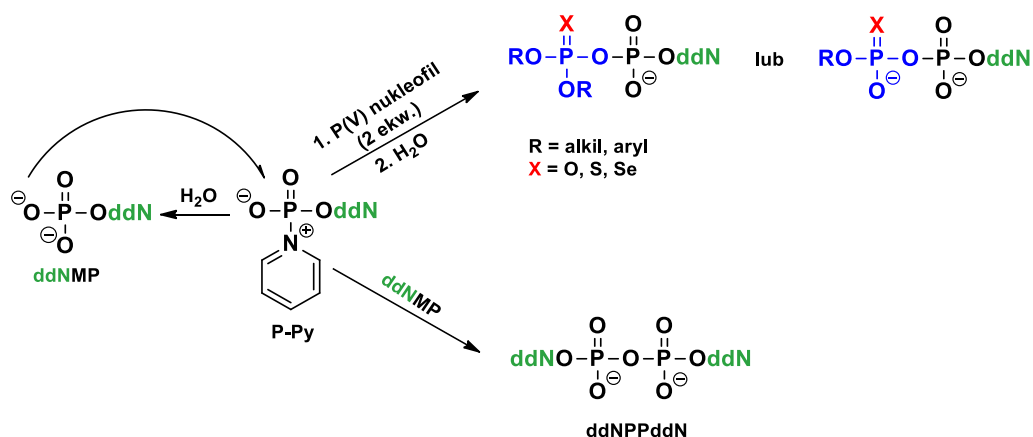
W zależności od stosowanego P(V) nukleofila zsyntetyzowane związki zawierały jeden lub dwa ładunki ujemne oraz heteroatom (siarkę lub selen) przy reszcie fosforanowej P β .



Rys. 36. Przykładowe widma ^{31}P NMR otrzymanych 5'-difosforanów nukleozydów grupy **A**: (A) związek **A1**, (B) związek **A16**, (C) związek **A17**.

Do otrzymywania wszystkich pochodnych 5'-difosforanów nukleozydów typu **A** stosowałam standardowy protokół opisany powyżej. Bardzo ważne dla efektywnego przeprowadzania tych reakcji było zachowanie bezwodnych warunków. Oprócz stosowania ogólnych procedur pracy w warunkach bezwodnych, dodatkowo pomagało zastosowanie nadmiaru chlorku trimetylosililu, o czym wspominałam w części poświęconej czynnikowi silylującemu. W praktyce nie zawsze udawało się utrzymać

całkowicie bezwodne środowisko, o czym świadczyło powstawanie niewielkiej ilości (zwykle ok. 10%) symetrycznego difosforanu ddN (ddNPPddN). Najbardziej prawdopodobną przyczyną tworzenia się tej pochodnej była częściowa hydroliza wygenerowanej fosfobetainy P-Py, wodą wprowadzoną do medium reakcyjnego wraz z dodanym nukleofilem. Utworzony w ten sposób monoester ddNMP reagował dalej jako konkurencyjny nukleofil dając niepożądany, stabilny ddNPPddN (**Schemat 46**). Ten produkt uboczny utrudniał izolację pożądanego 5'-difosforanu z mieszaniny reakcyjnej.



Schemat 46. Powstawanie 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów i ich tio/seleno analogów oraz produktu ubocznego ddNPPddN w reakcji P-Py z P(V) nukleofilami.

Otrzymane pochodne 5'-difosforanów nukleozydów typu **A** zestawiałam w **Tabeli 2**, w której podałam oznaczenie związku, wzór strukturalny produktu oraz rodzaj P(V) nukleofila użytego do otrzymywania konkretnego analogu.

Tabela 2. Zsyntetyzowane pochodne 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu **A**.

Oznaczenie związku	Wzór strukturalny produktu, sól TEAH ⁺	P(V) nukleofil
A1		
A2		
A3		
A4	$\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}-\overset{\text{O}}{\text{P}}(\text{O}^-)-\text{O}-\overset{\text{O}}{\text{P}}(\text{O}^-)-\text{O}-\text{AZT}$ $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}$	$\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}-\overset{\text{O}}{\text{P}}(\text{O}^-)-\text{O}^-$ $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}$

A5		
A6		
A7		
A8		
A9		
A10		
A11		
A12		
A13		
A14		
A15		
A16		
A17		
A18		
A19		

A20		
A21		
A22		
A23		
A24		
A25		

Wybór nukleofili do reakcji podyktowany był zamysłem, aby otrzymać pochodne difosforanów o najbardziej zróżnicowanej strukturze, a nie serię związków, w których systematycznie zmieniano tylko jeden element. Takie podejście powinno zwiększyć szansę na znalezienie struktur wiodących do przyszłych badań nad nowymi związkami o aktywności anty-HIV. Spośród stosowanych przeze mnie nukleofili, fosforandiester dibutyłowy, bis(etyl-heksylowy), dibenzylowy oraz diheksadecylowy były preparatami dostępnymi handlowo. Pozostałe z nich syntezowałam wykorzystując preparatykę związków fosforu bazującą na metodologii H-fosfonianowej. W tym celu difenylowy H-fosfonian poddawałam transestryfikacji odpowiednim alkoholem i po hydrolizie zasadowej izolowałam odpowiednie H-fosfonanomonoestry. Związki te następnie utleniałam jodem w pirydynie z dodatkiem wody (98:2, v/v), otrzymując różne pochodne kwasu fosforowego. Pochodne fosforandiestrów [dibutyłowy, dietyłowy, bis(etyl-heksylowy), dibenzylowy] zawierające heteroatom na atomie fosforu otrzymywane były poprzez utlenianie siarką lub selenem odpowiednich H-fosfonandiestrów. Natomiast w syntezie tiofosforanomonoestru (**B13**) zastosowałam ponownie sól trietyloamoniową kwasu fosfinowego i odpowiedni alkohol

do utworzenia fosfinianomonoestru, który następnie poddawałam utlenianiu siarką, otrzymując finalnie zaplanowany tiofosforanomonoester.

W syntezie 5'-difosforanów nukleozydów typu **A** stosowałam jako P(V) nukleofile fosforanodiestry (**A1-A4**, **A7**) oraz fosforanomonoestry (**A5**, **A6**, **A8-A10**) zawierające jako grupy maskujące ładunek ujemny reszty fosforanowej, grupy benzytowe oraz alkilowe o różnej długości i stopniu rozgałęzienia łańcucha węglowego. Wykorzystując w reakcji z okso-fosfobetainą P-Py fosforanodiestery dibenzylowy (np. dla **A20** i **A21**) zaobserwowałam tworzenie się pochodnej z jedną grupą benzylową na reszcie fosforanowej P_β jako jedyne produktu nukleotydowego. Niekontrolowane usuwanie grupy benzylowej spowodowane było dużą podatnością tworzącego się początkowo oczekiwanego *P,P*-dibenzylu difosforanu na debenzylację w warunkach reakcyjnych, prawdopodobnie katalizowaną przez pirydynę (mechanizm S_N2) lub zachodzącą samorzutnie (mechanizm S_N1). Stosowane grupy alkilowe miały służyć jako trwałe sposoby maskowania ładunku ujemnego na reszcie fosforanowej P_β, co powinno korzystnie wpływać na trwałość wiązania P-O-P i właściwie eliminować możliwość uwalniania w komórce przez te związki niemaskowanego 5'-difosforanu nukleozydu. To ostatnie było ważne w aspekcie określenia źródła pochodzenia ewentualnej aktywności biologicznej tego typu związków.

Kolejną grupę P(V) nukleofili stanowiły fosforanomonoestry aryłowe (**A11-A13**). Pomimo obecności elektronoakceptorowych podstawników fenyłowych czy pirydynowych, nie obserwowałam dla tych nukleofili obniżenia reaktywności w stosunku do okso-fosfobetainy P-Py. Grupy aryłowe obecne w difosforanach potencjalnie mogłyby być usuwane w komórce na drodze chemicznej lub enzymatycznej hydrolizy, generując odpowiedni difosforan.

Wybór dwóch kolejnych fosforanomonoestrów jako P(V) nukleofili (synteza związków **A14**, **A15**) podyktowany był chęcią sprawdzenia możliwości efektywnego usuwania grupy maskującej z reszty fosforanowej P_β, ale zachodzącego według innego mechanizmu. Nukleofil użyty w syntezie **A14**, *S*-metylmerkaptoetanol, w latach 80. XX wieku został zaproponowany przez Stawińskiego i Kraszewskiego jako potencjalna grupa ochronna reszty fosforanowej w syntezie oligonukleotydów.¹⁴⁰ Postulowano, że usuwanie tej grupy może zachodzić poprzez utworzenie cyklicznego związku pośredniego zawierającego ładunek dodatni na atomie siarki, co w przypadku **A14**

proceeding to the elimination of 5'-diphosphate nucleoside. Searching for groups that could mask the negative charge, which could be effectively removed in the cellular environment, my attention was attracted to thermolabile protecting groups (ang. *thermolabile protecting groups*, TPG).¹⁴¹ The proposed mechanism of deprotection of phosphorus residues substituted with TPG in compound **A15** would also involve intramolecular elimination.

Compounds designated as **A16-A23** were obtained in the reaction of oxo-phosphobetaine with corresponding thio- or selenophosphonodiesters, which led to analogs of previously obtained 5'-diphosphate nucleosides containing heteroatoms (sulfur or selenium) in the P_{β} position. For example, compounds **A18** and **A19** were thio and seleno analogs of 5'-diphosphate **A1**, compounds **A20** and **A21** were thio and seleno analogs of 5'-diphosphate **A7**, and compound **A22** was a thio analog of compound **A3**. Nucleophilic groups in the P(V) group reacted with the phosphorus center of the generated pyridinophosphate P-Py and served as a source of structural diversity, which should also be reflected in differences in biological activity or lipophilicity.

In this class of obtained analogs, it is worth paying attention to the benzyloxy derivative (**A21**), which despite the effective generation of 5'-diphosphate AZT (signals in the ^{31}P NMR spectrum), immediately upon addition of water decomposed into two phosphates, which indicated a high instability of the P-O-P bond, possibly caused by the steric hindrance of the benzyloxy group, which was introduced by the selenium atom in the neighborhood of the benzyloxy group. Isolation of this compound was therefore impossible. Interestingly, the analogous derivative containing sulfur instead of selenium in the P_{β} position (compound **A20**) was stable during isolation.

Compound **A24** (dimethyl derivative) was synthesized in order to compare the influence of the substituent and the presence of a heteroatom on the phosphorus residue P_{β} (comparison with **A16** and **A23**) on biological activity.

The last compound in this class was 5'-diphosphate **A25** containing sulfur and an amide bond P-N. I obtained it via the condensation of phosphobetaine P-Py with a nucleophile – phosphorothioamide. This nucleophile showed a strong preference for the electrophilic phosphorus center of the betaine and generated the expected product. The obtained derivative was interesting due to the presence of two modifications on a single phosphorus atom, the P=S bond.

i P-N, co powinno wpływać na trwałość wiązania bezwodnikowego oraz parametry aktywności biologicznej tego związku.

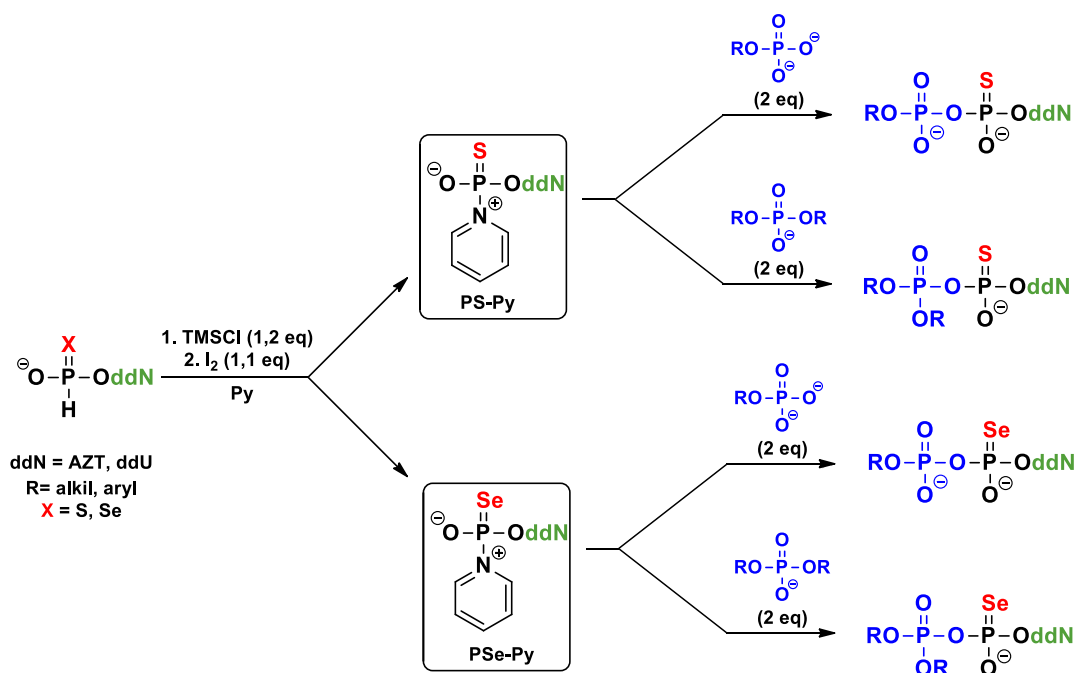
Dla wybranych pochodnych z całkowicie zamaskowanym ładunkiem na reszcie fosforanowej P_{β} [dibutyłowej i bis(etył-heksylowej)] zsyntetyzowałam również analogi 5'-difosforanów zawierające jako komponent nukleozydowy ddU zamiast AZT (odpowiednio **A2**, **A23**, **Tabela 2**). Związki te zostały otrzymane w celu ewentualnego potwierdzenia pronukleotydogo charakteru działania tego typu pochodnych, co zostanie omówione w rozdziale poświęconym dyskusji aktywności biologicznej zsyntetyzowanych analogów.

4.2.2. Synteza zaprojektowanych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu B

Synteza pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu **B** (**Rys. 35**) zawierających siarkę lub selen w pozycji P_{α} opierała się na reakcji generowanej *in situ* tio- lub seleno-fosfobetainy z odpowiednim P(V) nukleofilem: fosforanodiestrem lub fosforanomonoeestrem.

Zanim przystąpiłam do otrzymywania tych związków na skalę preparatyczną, przeprowadziłam badania metodyczne, o których częściowo wspominałam w części ogólnej poświęconej P(V) nukleofilom (**Rozdział VI.3.5**). Badania wykonałam tylko dla tio-fosfobetainy używając jako związek modelowy 5'-H-tiofosfonianomonoester AZT [HP(S)AZT], zakładając, że ze względu na zbliżoną elektroujemność i rozmiary atomów siarki i selenu, reaktywność tio- i seleno-fosfobetain będzie podobna. Dla H-tiofosfonianomonoestrów, w związku z większą kwasowością ugrupowania P-H, utlenianie jodem zachodzi łatwiej niż dla ich tlenowych odpowiedników i właściwie nie wymaga stosowania czynnika sililującego. Dodatkowo, znane są przypadki, że podczas utleniania, ze względu na duże powinowactwo atomu siarki do jodu (teoria twardych i miękkich kwasów i zasad) następowała desulfuryzacja tiofosforanodiestrów.¹³⁵ Chcąc zachować bezwodne warunki procesu, postanowiłam stosować jednak niewielki nadmiar chlorku trimetylosililu (1,2 ekw.) jako czynnika niwelującego formalny ładunek ujemny obecny w substracie oraz zapewniającego bezwodne środowisko. Zbadałam również wpływ ilości utleniacza na efektywność generowania oczekiwanego produktu. Zaobserwowałam, że niewielki nadmiar jodu (1,1 ekw.) był wystarczający, by otrzymywać wydajnie 5'-difosforany z atomem siarki w pozycji P_{α} ,

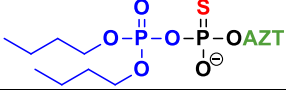
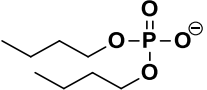
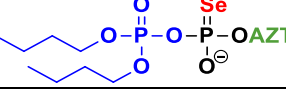
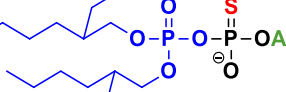
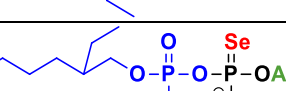
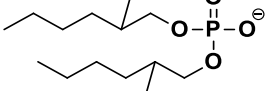
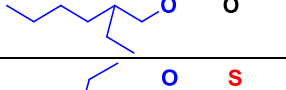
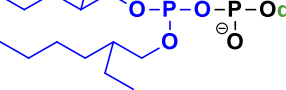
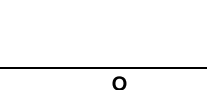
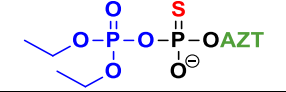
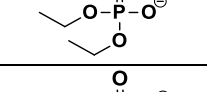
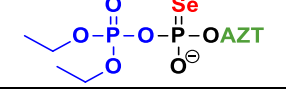
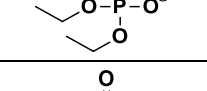
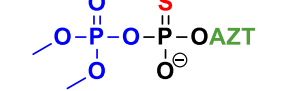
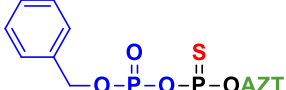

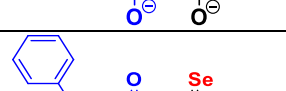
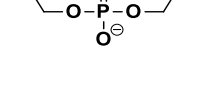
a zwiększenie jego nadmiaru powodowało tworzenie okso-fosfobeaniny P-Py, co najprawdopodobniej związane było ze wspomnianą wcześniej możliwą desulfuryzacją i prowadziło do niepożądanych produktów okso. Po przeprowadzeniu badań wstępnych i wytypowaniu pirydyny jako katalizatora nukleofilowego i rozpuszczalnika dla tej reakcji (*vide Rozdział VI.3.5.*), mogłam wydajnie generować tio-fosfobetainę PS-Py, którą poddawałam reakcjom z dwoma rodzajami P(V) nukleofilami, mono- i diestrami fosforanów (**Schemat 47**). Zaobserwowałam, że analogi S-P_α oraz Se-P_α difosforanów charakteryzowały się wyraźnie większą lipofilowością niż izomeryczne związki z heteroatomami przy atomie fosforu β, co znacząco ułatwiało ich izolację z mieszaniny reakcyjnej oraz wskazywało na możliwości wystąpienia różnic w oznaczanych później parametrach biologicznych. Otrzymane tą drogą związki zestawione zostały w **Tabeli 3**.



Schemat 47. Ogólny schemat syntezy pochodnych 5'-difosforanów nukleozydów typu B zawierających heteroatomy (siarkę lub selen) w pozycji P_α.

Tabela 3. Zsyntetyzowane pochodne 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu B.

Oznaczenie związku	Wzór strukturalny produktu, sól TEAH ⁺	P(V) nukleofil
B1		
B2		

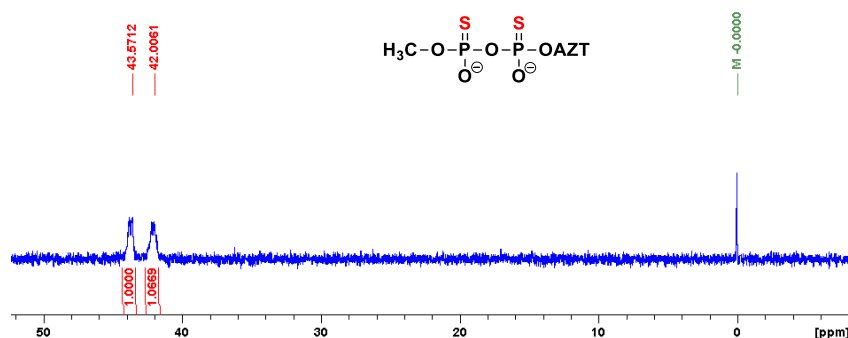
B3		
B4		
B5		
B6		
B7		
B8		
B9		
B10		
B11		
B12		
B13		

Większość P(V) nukleofili stosowanych do otrzymywania pochodnych difosforanów typu **B** (**B3-B7**, **B11**, **B12**) stanowiły fosforandistry, analogiczne do tych wykorzystywanych w syntezie pochodnych typu **A**. W ten sposób otrzymałam serię 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów o podobnych motywach strukturalnych na reszcie fosforanowej P_β, a różniących się jedynie obecnością heteroatomu (S lub Se) w pozycjach niemostkowych wiązania bezwodnikowego. Spodziewałam się, że związki takie powinny dostarczyć ważnych informacji o wpływie S i Se na trwałość oraz aktywność biologiczną badanych analogów 5'-difosforanów. Używając dibenzylowego fosforanu w reakcjach z fosfobetainami PS-Py i PSe-Py (synteza **B11** i **B12**)

obserwowałam spontaniczną utratę jednej grupy benzylowej, a pochodna Se-P α (**B12**), analogicznie do związku z atomem selenu w pozycji P β **A21**, była niestabilna i szybko hydrolizowała po dodaniu wody do odpowiednich związków P(V). Podobnie jak w serii związków **A**, odpowiedni analog S-P α (**B11**) okazał się trwały. Wykorzystując inny fosforanodiester jako nukleofili, zsyntetyzowałam analogi siarkowe i selenowe 5'-difosforanów (**B8**, **B9**) z grupami etylowymi maskującymi ładunek ujemny reszty fosforanowej P β . Analogi te, wraz z **B10**, zostały zsyntetyzowane w celu sprawdzenia czy czynniki steryczne podstawników mają wpływ na parametry aktywności biologicznej i trwałość wiązania pirofosforanowego.

Nieco niższa reaktywność tio- i seleno-fosfobetain w stosunku do nukleofili uwidoczniła się, gdy do reakcji używałam słabszych P(V) nukleofili, a mianowicie fosforanomonoestrów. Dla tej klasy pochodnych otrzymałam dwa związki zawierające siarkę jako heteroatom w pozycji P α . Związek **B1** zsyntetyzowałam jako siarkowy odpowiednik pochodnej **A12**, korzystając z tego samego nukleofila, a jedyną różnicą był typ fosfobetainy stosowany w tej reakcji (PS-Py). Efektywność tworzenia tych dwóch analogów nie różniła się w sposób znaczący. W poszukiwaniu innych grup maskujących ładunek ujemny na reszcie fosforanowej P β , do reakcji z tio-fosfobetainą PS-Py wykorzystywałam fosforanomonoester trifluoroetylowy, wzorując się na pracach McGuigana, który stosował tego typu blokady w pierwszych otrzymywanych przez siebie związkach ukierowanych na pronukleotydy.

Zupełnie nowym wariantem strukturalnym był ostatni wymieniony w **Tabeli 3** związek (**B13**), który powstawał w wyniku reakcji tio-pirydyniofosforanu PS-Py z tiofosforanomonoestrem. Ze względu na obecność dwóch atomów siarki, spodziewałam się znaczących różnic w trwałości oraz aktywności biologicznej i cytotoxycywności proponowanego analogu. Zgodnie z oczekiwaniem, pochodna ta w widmach ^{31}P NMR dawała dwie grupy sygnałów w rejonie $\delta_p = 45 - 40$ ppm (**Rys. 37**).



Rys. 37. Widmo ^{31}P NMR dla otrzymanego 5'-difosforanu nukleozydu B13.

4.2.3. Synteza zaprojektowanych 5'-difosforanów dinukleozydów typu C

Trzecią klasę zaprojektowanych pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów stanowiły dinukleozydowe analogi difosforanów grupy C, zestawione w **Tabeli 4**. Związki te syntezowałam albo z wykorzystaniem okso-fosfobetainy (**C1**, **C3**, **C5**, **C6**) albo tio-fosfobetainy (**C2**, **C4**). Stosowanym P(V) nukleofilem był 5'-fosforan 3'-acetylotymidyny (dla pochodnej **C1-C4**) oraz AZTMP (dla **C5**) i jego siarkowy analog AZT(S)MP (dla związku **C6**).

Włączenie tego typu analogów do moich badań miało na celu sprawdzenie możliwości wykorzystania metodologii H-fosfonianowej do otrzymywania heterodimerycznych difosforanów dinukleozydów. Związki te, w wyniku hydrolizy wiązania pirofosforanowego, powinny generować w komórce dwa różne nukleotydy, 5'- lub 3'-fosforan tymidyny i aktywny monofosforan antywirusowy (AZTMP lub ddUMP). Związki te otrzymywane były z wykorzystaniem standardowych warunków opracowanych dla analogów 5'-difosforanów grupy A. Podczas badań stwierdzono, że reakcja przebiegała wydajnie, niezależnie od komponentu nukleozydowego, jaki wykorzystano w 5'-H-fosfonianomonoestrze. Ze względów praktycznych, wybrano 5'-fosforan 3'-O-acetylotymidyny jako P(V) nukleofil, który posłużył do otrzymania także siarkowych odpowiedników (**C2**, **C4**). Analogi **C5** i **C6** zostały natomiast otrzymane przez okso-fosfobetainy P-Py z 3'-H-fosfonianomonoestru tymidyny, a następnie poprzez podstawienie reszty pirydyny w wygenerowanej betainie odpowiednim nukleofilem [AZTMP i AZTMP(S)].

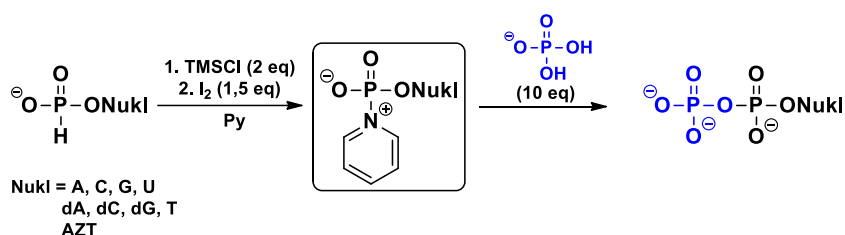
Tabela 4. Zsyntetyzowane pochodne difosforanów dinukleozydów typu C.

Oznaczenie związku	Wzór strukturalny produktu, sól TEAH ⁺	P(V) nukleofil
C1		
C2		
C3		
C4		
C5		
C6		

4.2.4. Synteza zaprojektowanych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu D

Zaprojektowane pochodne w grupie D (*Rys. 35*) należą do niepodstawionych 5'-difosforanów nukleozydów i traktowałam je w moich badaniach jako związki referencyjne podczas określania parametrów biologicznych oraz w badaniach trwałości otrzymanych analogów. Jak wspominałam w części metodycznej (*Rozdział VI.3.5.*), wśród grupy P(V) nukleofili, których reaktywność wobec okso-fosfobetainy P-Py była sprawdzana, znalazł się także nieorganiczny kwas ortofosforowy(V). Okazało się, że

zastosowanie dużego nadmiaru (10 ekw.) tego kwasu w reakcji z fosfobetainą P-Py prowadziło do wydajnego powstawania niepodstawionego 5'-difosforanu nukleozydu. Fakt ten wykorzystałam początkowo tylko w syntezie pochodnej AZT (**D5**), która stanowiła związek referencyjny. Zachęcona pozytywnym wynikiem dla tego analogu, postanowiłam rozszerzyć spektrum możliwych produktów o pochodne nukleozydów w serii rybo i deoksy (**D1-D4**, **D6-D9**, *Tabela 5*) potwierdzając tym samym ogólny charakter metody otrzymywania niepodstawionych 5'-fosforanów nukleozydów w reakcji pirydyniofosforanu P-Py z kwasem fosforowym (*Schemat 49*). W związku z obecnością w nukleozydach reaktywnych grup hydroksylowych oraz egzoaminowych, istniała konieczność zablokowania tych reszt, także z uwagi na polepszenie rozpuszczalności H-fosfonianomonoestrów nukleozydów w medium reakcyjnym. Otrzymane 5'-difosforany zablokowanych nukleozydów oczyszczałam na kolumnie wypełnionej żelazem krzemionkowym stosując jako fazę ruchomą układ izopropanol : woda : trietyloamina (7:2:1, v/v/v). Wyizolowane związki rozpuszczałam następnie w wodnym roztworze amoniaku celem usunięcia zasado-labilnych blokad, po czym wykonywałam powtórne oczyszczenie wykorzystując ten sam układ eluuujący. Wszystkie otrzymane związki miały przesunięcia chemiczne w widmach ^{31}P NMR w przedziale od - 9 ppm do - 12 ppm, a wydajności po oczyszczaniu wynosiły od 30% do 60%.



Schemat 49. Ogólny schemat syntezy pochodnych 5'-difosforanów nukleozydów grupy D.

Niewątpliwie do zalet powyższego podejścia należy jego uniwersalność (nukleozydy w serii rybo i deoksy) oraz możliwość używania P(V) nukleofila w formie kwasowej, a nie standardowo używanej soli tetrabutylamoniowej, która co prawda poprawia homogenność mieszaniny, ale z drugiej strony – wprowadza do układu trudny do usunięcia lipofilowy kation. Wadą tej strategii jest natomiast żmudne preparatywnie oddzielenie nadmiaru nieorganicznego fosforanu od pożądanego produktu.

Tabela 5. Zsyntetyzowane pochodne 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów grupy **D**.

Oznaczenie związku	Wzór strukturalny produktu, sól TEAH ⁺	Oznaczenie związku	Wzór strukturalny produktu, sól TEAH ⁺
D1		D6	
D2		D7	
D3		D8	
D4		D9	
D5		D10	

Jak wspominałam w części poświęconej badaniom metodycznym, podczas eksperymentów z niewielkim nadmiarem kwasu ortofosforowego(V) (1,5 ekw.) obserwowałam powstawanie niemal wyłącznie 5'-trifosforanu dinukleozydu (**D10**), który pomimo odmiennej struktury, postanowiłam włączyć do tej grupy związków, ze względu na rodzaj stosowanego nukleofila.

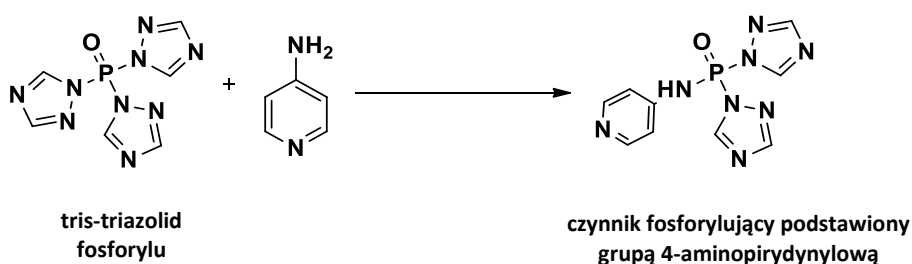
W czasie prac metodycznych, podjęłam także próby otrzymania analogów 5'-difosforanów AZT typu **D** zawierających siarkę lub selen w pozycji P_α. Jednakże wykorzystanie tio- (PS-Py) i seleno-fosfobetainy (PSe-Py) w reakcji z dużą ilością kwasu fosforowego nie przyniosło oczekiwanych efektów, bowiem w mieszaninach reakcyjnych obserwowałam tworzenie się wielu polifosforanowych produktów, również tych powstałych w wyniku desulfuryzacji lub deselenizacji, co w połączeniu z pracochłonną procedurą oczyszczania spowodowało, że nie udało mi się wyizolować

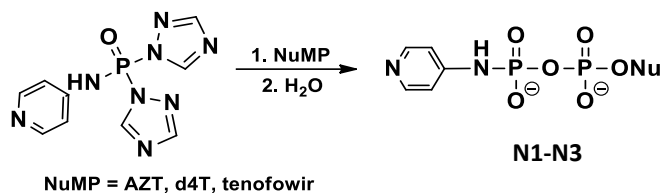
pożądanych związków. Wyniki te potwierdziły moje wcześniejsze obserwacje o mniejszej reaktywności tio- i seleno-fosfobetain w stosunku do słabych nukleofili, w porównaniu do okso-fosfobetain.

4.2.5. Synteza analogów 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów zawierających wiązanie P-N

Wcześniejsze badania prowadzone w Zakładzie Chemii Kwasów Nukleinowych doprowadziły do rozwinięcia amidofosforanowej strategii pronukleotydurowej bazującej na arylowych grupach maskujących ujemne ładunki w resztach fosforanowych. Spośród tych analogów, pochodne zawierające grupę 4-aminopirydynową wyróżniały się wyjątkowo dobrymi parametrami biologicznymi (*vide Wstęp literaturowy*). Postanowiłam więc wprowadzić tę samą grupę do szkieletu 5'-difosforanów nukleozydów, oczekując jej korzystnego wpływu na właściwości biologiczne, a szczególnie na niską cytotoksyczność badanych związków (związki **N1-N3**, *Tabela 6*). Interesował mnie także możliwy wpływ grupy 4-aminopirydynowej na aktywność biologiczną związków zawierających inne niż AZT nukleozydy o znanej aktywności antywirusowej, np. tenofowir (**N2**) i d4T (**N3**). Związek **N2**, oprócz wiązania bezwodnikowego P-O-P, zawierał także odporne na hydrolizę enzymatyczną wiązanie P-C.

Niestety, wykorzystanie w celach syntetycznych oksydatywnej kondensacji dla tych pochodnych nie powiodło się. Dlatego też poszukiwałam innej drogi syntezy i tym razem skupiłam moją uwagę na chemii związków P(V). Do otrzymania analogów **N1-N3** wykorzystałam fosforylo tris-triazolid,¹⁴² z którego wygenerowałam czynnik fosforylujący zawierający interesującą mnie grupę 4-aminopirydynową.⁷⁹ Związek ten, w reakcji z odpowiednimi fosforanami (AZTMP, d4TMP oraz tenofowirem) posłużył mi do syntezy zaplanowanych analogów 5'-difosforanów zawierających wiązanie P-N (*Schemat 50*).





Schemat 50. Ogólny schemat otrzymywania analogów 5'-difosforanów zawierających resztę 4-aminopirydyny.

Tabela 6. Zsyntetyzowane analogi 5'-difosforanów zawierające wiązanie P-N.

Oznaczenie związku	Wzór strukturalny
N1	
N2	
N3	

5. OZNACZENIE POTENCJAŁU ANTY-HIV OTRZYMANYCH POCHODNYCH 5'-DIFOSFORANÓW 2',3'-DIDEOKSYNUKLEOZYDÓW

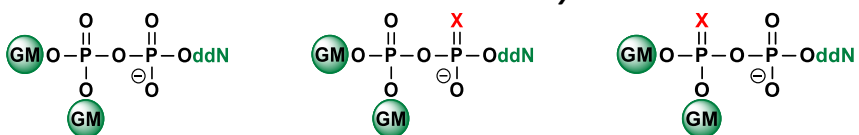
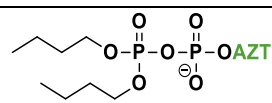
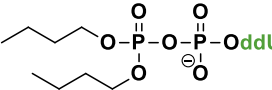
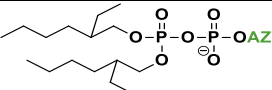
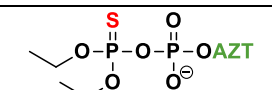
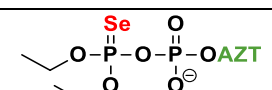
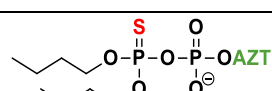
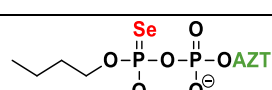
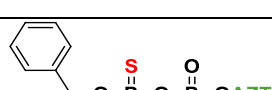
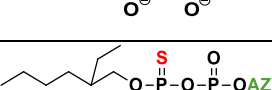
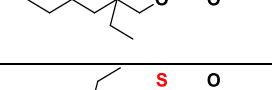
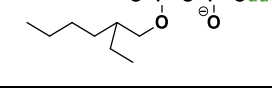
Po zaprojektowaniu i zsyntetyzowaniu szeregu pochodnych 5'-difosforanów nukleozydów o różnych motywach strukturalnych, otrzymane związki zostały poddane badaniom biologicznym w celu określenia ich potencjalnej przydatności terapeutycznej. Aktywność anty-HIV i cytotoksyczność oznaczono w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie (współpraca z mgr A. Dąbrowską) oraz w Rega Institute for Medical Research w Leuven w Belgii (współpraca z prof. L. Neasens).

Oznaczenie wybranych parametrów biologicznych wykonane zostało według powszechnie stosowanych procedur.⁷⁹ Ocena cytotoksyczności badanych związków prowadzona była w ustalonych hodowlach limfoidalnych linii komórkowych CEMT4. Komórki hodowane były w szeregu znanych rozcieńczeń badanych preparatów. Po 7 dniach hodowli oznaczona została żywotność komórek przy zastosowaniu metody MTT.

Badania aktywności antywirusowej przeprowadzone zostały na tych samych liniach komórkowych, które najpierw inkubowane były przez 24 h w medium (RPMI/FBS, 9:1, v/v) wzbogaconym w znane stężenia testowanych 5'-difosforanów. Następnie komórki zakażane były dzikim szczepem wirusa HIV-1 i po 7 dniach oceniana była zdolność hamowania namnażania HIV poprzez pomiar wirusowego białka p24 w medium z nad komórek. Inhibowanie powielania kopii wirusa mierzone było obniżeniem ilości białka p24 w hodowlach wzbogaconych w badane związki w odniesieniu do ilości p24 w hodowli prowadzonej w medium standardowym. Do testów wykorzystano także nukleozydy antywirusowe (AZT, d4T i ddU), jako związki referencyjne.

Wyniki oznaczonej aktywności antywirusowej oraz cytotoksyczności postanowiłam zestawić według projektowanych *wariantów strukturalnych II-III*, co okazało się pomocne w dyskusji o ogólnych tendencjach wyznaczonych eksperymentalnie parametrów biologicznych w otrzymanych grupach 5'-difosforanów. W **Tabelach 7A-7D** przedstawiam wartości aktywności biologicznej (EC_{50} i EC_{90}) i cytotoksyczności (CC_{50} i CC_{90}) dla wyizolowanych pochodnych 5'-difosforanów, jak również obliczony dla każdej z nich indeks selektywności (SI).

Tabela 7A. Aktywność *anti*-HIV (EC_{50} , EC_{90}) i cytotoksyczność (CC_{50} i CC_{90}) wraz z obliczonym indeksem selektywności (SI) dla otrzymanych pochodnych 5'-difosforanów w II. wariacie strukturalnym; * - parametry oznaczone w Rega Institute.

II. wariant strukturalny						
 $ddN = AZT, ddU$ $X = S, Se$ $GM = \text{grupa maskująca}$						
Oznaczenie związku	Wzór strukturalny	EC_{50} [μM]	EC_{90} [μM]	CC_{50} [μM]	CC_{90} [μM]	SI
A1		<0,01	0,6	>234	>234	23 400
A2*		>250	>250	>250	>250	1
A3		0,09	4,6	>70,3	>70,3	781
A4	$C_{16}H_{33}O-P(=O)(O-C_{16}H_{33})-O-P(=O)(O^-)-OAZT$	0,062	9,7	>53,5	>53,5	863
A16		0,005	0,37	>251	>251	50 200
A17		0,006	0,28	>229	>229	38 167
A18		0,004	0,026	>300	>>300	75 000
A19		0,003	0,05	>330	>>330	110 000
A20		0,006	0,078	165	225	27 500
A22		0,02	0,2	>190	>>190	9 500
A23		4,4	9,3	310	>390	70
A24		0,005	0,012	>258	>258	51 600

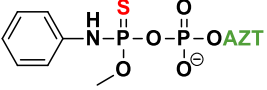
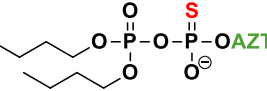
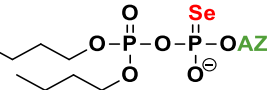
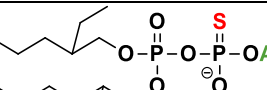
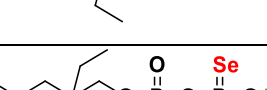
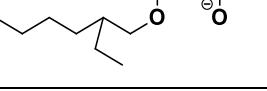
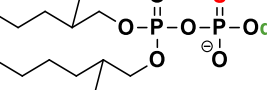
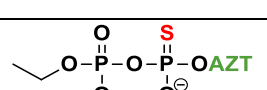
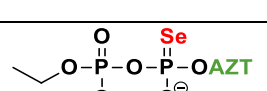
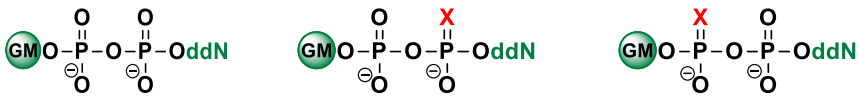
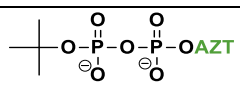
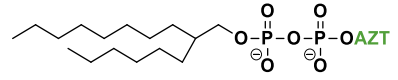
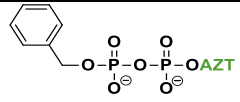
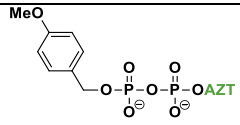
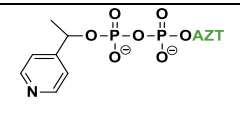
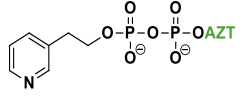
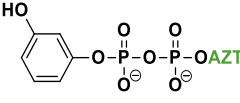
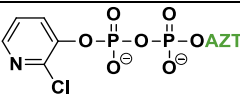
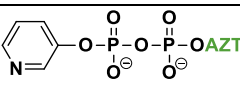
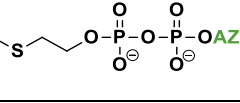
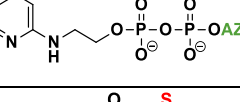
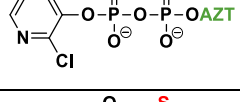
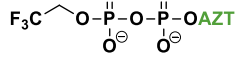
A25*		0,03	-	>250	-	8 333
B3		0,004	0,12	>190	>190	47 500
B4		0,02	0,08	>180	>180	9 000
B5		0,035	>0,5	>450	>450	12 857
B6		0,005	0,03	25	88	20 000
B7		3,7	8	160	330	43
B8		0,02	>0,5	>250	>250	12 500
B9		0,015	0,07	12	40	800
B10		0,007	0,027	>240	>240	34 286

Tabela 7B. Aktywność anti-HIV (EC_{50} , EC_{90}) i cytotoksyczność (CC_{50} i CC_{90}) wraz z obliczonym indeksem selektywności (SI) dla otrzymanych pochodnych 5'-difosforanów w III. wariacie strukturalnym; * - parametry oznaczone w Rega Institute.

III. wariant strukturalny						
 ddN = AZT, ddU X = S, Se GM = grupa maskująca						
Oznaczenie związku	Wzór strukturalny	EC_{50} [μ M]	EC_{90} [μ M]	CC_{50} [μ M]	CC_{90} [μ M]	SI
A5		0,4	2,3	70	>94	175
A6		0,21	>5	>130	>>13 0	619
A7		<0,01	0,05	>145	>145	14 500
A8*		0,004	-	69	-	17 250
A9*		0,0074	-	>250	-	33 784
A10		0,004	0,016	>197	>197	49 250
A11*		0,0058	-	120	-	20 690
A12		0,1	2,5	190	>780	1 900
A13		0,43	>5	142	>820	330
A14		0,006	0,25	>104	>>10 4	17 333
A15		0,012	0,8	>97	>97	8 083
B1		<0,004	0,03	>226	>226	56 500
B2		0,025	0,19	>238	>238	9 520

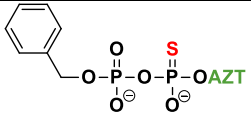
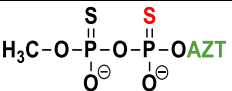
B11		0,007	0,02	>212	>212	30 286
B13*		0,044	-	>250	-	5 682

Tabela 7C. Aktywność anti-HIV (EC_{50} , EC_{90}) i cytotoksyczność (CC_{50} i CC_{90}) wraz z obliczonym indeksem selektywności (SI) dla otrzymanych pochodnych 5'-difosforanów w III. wariacie strukturalnym – di- i trifosforanów dinukleozydów.

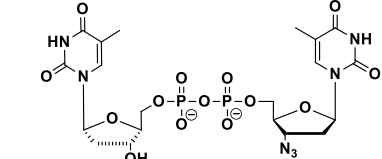
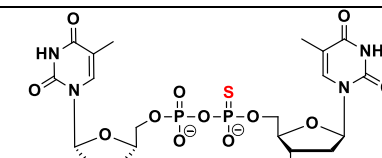
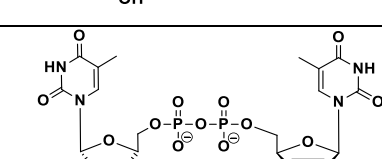
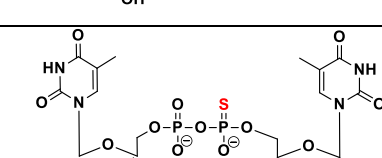
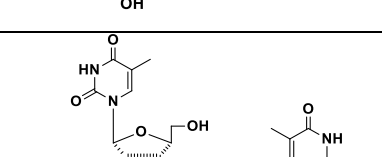
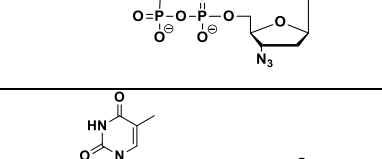
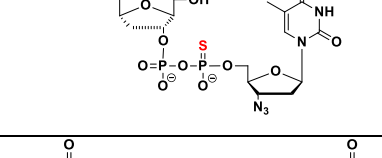
III. wariant strukturalny – di- i trifosforany dinukleozydów						
$\text{TO}-\overset{\text{O}}{\underset{\ominus}{\text{P}}}-\text{O}-\overset{\text{X}}{\underset{\ominus}{\text{P}}}-\text{OddN}$ <p>T = tymidyn-5'/3'-yl ddN = AZT, d4T X = O, S</p>						
Oznaczenie związku	Wzór strukturalny	EC_{50} [μM]	EC_{90} [μM]	CC_{50} [μM]	CC_{90} [μM]	SI
C1		0,021	0,04	130	>133	6 190
C2		0,007	0,015	45	>195	6 429
C3		0,135	0,48	132	>140	500
C4		0,19	0,45	95	>210	500
C5		0,032	0,22	158	>172	4 938
C6		0,007	0,013	70	>325	10 000
D10		<0,004	0,006	>208	>208	52 000

Tabela 7D. Aktywność anti-HIV (EC_{50} , EC_{90}) i cytotoksyczność (CC_{50} i CC_{90}) wraz z obliczonym indeksem selektywności (SI) dla otrzymanych pochodnych 5'-difosforanów w III. wariantcie strukturalnym – amidofosforanów i amidofosfonianów.

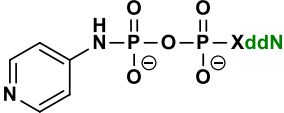
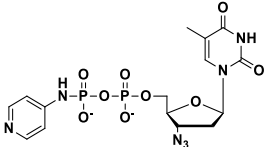
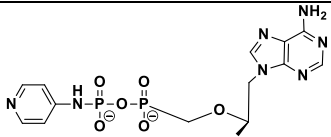
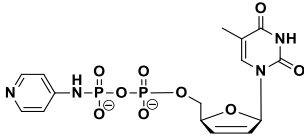
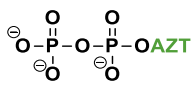
III. wariant strukturalny – amidofosforany i amidofosfoniany						
 <p>X = O, ddN = AZT lub d4T X = CH₂ ddN = tenofowir</p>						
Oznaczenie związku	Wzór strukturalny	EC_{50} [μ M]	EC_{90} [μ M]	CC_{50} [μ M]	CC_{90} [μ M]	SI
N1		<0,01	4,3	>356	>356	35 600
N2		2,3	4,2	>92	>92	40
N3		0,12	0,2	>71	>71	592

Tabela 7E. Aktywność anti-HIV (EC_{50} , EC_{90}) i cytotoksyczność (CC_{50} i CC_{90}) wraz z obliczonym indeksem selektywności (SI) dla związków referencyjnych; no - nieoznaczalne.

związki referencyjne					
Oznaczenie związku	EC_{50} [μ M]	EC_{90} [μ M]	CC_{50} [μ M]	CC_{90} [μ M]	SI
AZTPP 	0,005	-	no	no	-
AZT	0,004	-	>380	-	95 000
d4T	0,7	3,7	170	360	243
ddU	>10	-	-	-	-

Po przeanalizowaniu oznaczonych aktywności biologicznych otrzymanych 5'-difosforanów, związki podzieliłam według rosnącej wartości EC_{50} na trzy grupy (oznaczone kolorami w **Tabelach 7A-7D**): (i) $EC_{50} > 0,1 \mu M$ – związki o aktywności zdecydowanie gorszej niż AZT (10 analogów); (ii) $EC_{50} = 0,01-0,1 \mu M$ – związki o dobrej aktywności, nieco gorszej niż AZT (14 analogów); (iii) $EC_{50} < 0,01 \mu M$ – związki o bardzo dobrej aktywności antywirusowej, porównywalnej z AZT (22 analogi). Wiele z otrzymanych pochodnych zawierających AZT okazało się być znakomitymi inhibitorami replikacji HIV, efektywnymi już w stężeniach nanomolowych. Dla najbardziej aktywnych biologicznie związków wartość EC_{50} mieściła się w zakresie 3-10 nM (0,003-0,01 μM), przy $EC_{90} = 10-200$ nM (0,01-0,2 μM) (**Tabela 7A-7D**) i była porównywalna z aktywnością antywirusową samego AZT (**Tabela 7E**). Dość liczną grupę stanowiły także związki o aktywności o rząd wielkości mniejszej od AZT, mieszczącej się w przedziale 0,01 - 0,1 μM (kolor żółty, **Tabela 7A-7D**). Również analogi dinukleozydowe zawierające jako komponent nukleozydowy d4T (**C3**, **C4**) wykazywały porównywalną z d4T aktywność biologiczną (**Tabela 7C**), jednakże niższą znacząco od analogicznych związków zawierających w strukturze AZT.

Istotne znaczenie dla określenia potencjału biologicznego związków projektowanych jako potencjalne leki ma cytotoksyczność. Większość z otrzymanych pochodnych 5'-difosforanów nie wykazywała toksyczności względem komórek CEMT4 ($CC_{50} > 200 \mu M$), nawet przy maksymalnych stężeniach, które ograniczała jedynie ich rozpuszczalność. Często niemożliwe było wyznaczenie CC_{50} dla testowanego związku, a podane w **Tabelach 7A-7D** wartości w wielu przypadkach oznaczają jedynie maksymalną wartość stężenia związku, która została przebadana (C_{max}). Z tych względów obliczony indeks selektywności (SI) dla wielu związków należy traktować jako wartość szacunkową, która w rzeczywistości może być prawdopodobnie wyższa niż ta podana w **Tabelach 7A-7D**.

Z przeprowadzonych badań wynika, że niektóre z otrzymanych pochodnych mogą być traktowane jako obiecujące związki wiodące dla badań nad znalezieniem efektywnych terapeutyków o aktywności anty-HIV. Szczegółowa dyskusja dotycząca zależności pomiędzy strukturą (ilością ładunków ujemnych, obecnością i pozycją heteroatomu w cząsteczce, etc.) a oznaczoną aktywnością i cytotoksycznością przeprowadzona będzie w *Rozdziale VI.7*.

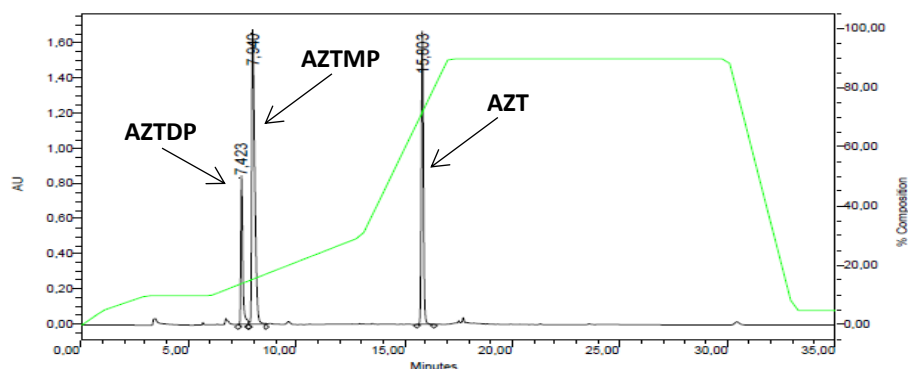
6. TRWAŁOŚĆ I ŚCIEŻKI ROZPADU NIEKTÓRYCH OTRZYMANYCH POCHODNYCH 5'-DIFOSFORANÓW 2',3'-DIDEOKSYNUKLEOZYDÓW

Dostarczenie terapeutycznego do zainfekowanej wirusem komórki stanowi ogromne wyzwanie. Przy opracowywaniu nowych leków bardzo ważną rolę odgrywa farmakokinetyka związku, a więc jego absorpcja, dystrybucja tkankowa lub narządową, metabolizm, sposoby eliminacji z organizmu oraz toksyczność. Procesy te opisują losy substancji leczniczej w organizmie, pozwalając tym samym oszacować przydatność danego związku w terapii. Sposób podawania leku wpływa na szybkość jego wchłaniania, co z kolei przekłada się wprost na sposób i jakość jego dystrybucji w organizmie. Dlatego też projektowane terapeutyki powinny charakteryzować się nie tylko odpowiednimi parametrami biologicznymi (aktywnością i cytotoksycznością), ale również odpowiednią stabilnością chemiczną oraz zrównoważonym charakterem lipofilowo-hydrofilowym.¹⁴³

Po otrzymaniu serii 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów projektowanych jako pronukleotydy, szczególnie ważne było dla mnie zbadanie trwałości tych pochodnych w warunkach hydrolizy chemicznej i enzymatycznej, co pozwoliło mi rozeznaczyć możliwe sposoby działania tych związków w organizmie i przewidywać w jakiej formie, i czy w ogóle, będą one mogły docierać do wnętrza komórki. Wyniki tych eksperymentów są więc ważne w ocenie przydatności terapeutycznej tych analogów.

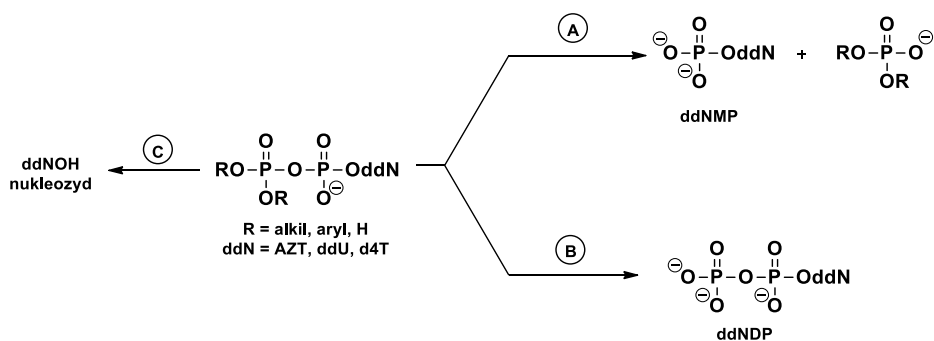
Wszystkie testy stabilności prowadziłam w inkubatorze w temperaturze 37°C, a jako metodę analityczną wykorzystywałam wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), wyznaczając $t_{1/2}$ rozpadu związków z użyciem kolumny z fazą odwróconą RP-18. Jako standardowy układ do sprawdzania trwałości otrzymanych pochodnych stosowałam medium komórkowe RPMI-1640 (ang. *Roswell Park Memorial Institute*), które pozbawione jest aktywności enzymatycznej, a więc pozwalało ocenić stabilność chemiczną badanych związków. Natomiast możliwą podatność zsyntetyzowanych analogów na działanie różnych enzymów hydrolitycznych badałam w roztworze RPMI wzbogaconym w surowicę z płodów bydłych (RPMI/FBS, 9:1, v/v). Biorąc pod uwagę czasochłonność tych badań nie wyznaczyłam czasu połowicznego rozkładu ($t_{1/2}$) dla wszystkich otrzymanych pochodnych, a jedynie najbardziej aktywnych związków ($EC_{50} < 10$ nM, $SI_{50} > 50$ 000) oraz dla wybranych związków posiadających interesujący mnie motyw strukturalny, który mógł znacząco zmieniać kinetykę oraz sposób ich rozpadu. W celu identyfikacji tworzących się produktów rozkładu, porównywałam ich

czasu retencji z substancjami wzorcowymi lub dodawałam do analizowanych próbek wzorce odpowiednich związków (ddN, ddNMP, ddNDP). Spodziewając się metabolitów o podobnej polarności (i czasach retencji), opracowałam odpowiedni protokół i profil elucji do analizy otrzymywanych mieszanin, co pozwalało na dobry rozdział powstających produktów (**Rys. 38**, patrz również *Część Eksperymentalna*).



Rys. 38. Przykładowy chromatogram przedstawiający możliwe produkty rozpadu 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów.

Zakładając różne trwałości i ścieżki rozpadu otrzymanych pochodnych, spodziewałam się trzech głównych produktów ich rozkładu: odpowiednie nukleozydy ddN, ich monofosforany ddNMP i difosforany ddNDP (**Schemat 51**). Oczekiwałam, że również produkty zawierające częściowo odblokowane funkcje mono- lub difosforanowe, mogą pojawiać się jako produkty przejściowe (lub finalne) badanego procesu hydrolizy chemicznej lub enzymatycznej. Ponieważ skład chemiczny RPMI i RPMI/FBS odbiega znacząco od warunków panujących w żywym organizmie, prezentowane przeze mnie poniżej wyniki należy traktować jedynie jako szacunkową ocenę oczekiwanej trwałości w żywych komórkach.

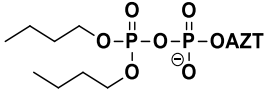
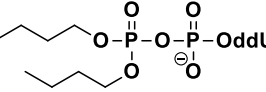
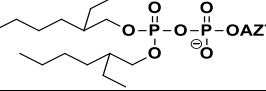


Schemat 51. Prawdopodobne, główne ścieżki rozpadu 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów.

Wszystkie z badanych pochodnych, niezależnie od wariantu strukturalnego (ilości ładunków ujemnych) oraz obecności i pozycji heteroatomu w cząsteczce były bardzo trwałe w samym RPMI (do 7 dni). Znaczące różnice obserwowałam natomiast w medium symulującym aktywność enzymatyczną środowiska komórkowego (RPMI/FBS, 9:1, v/v) i dalsze badania stabilności 5'-difosforanów prowadziłam właśnie w tym medium.

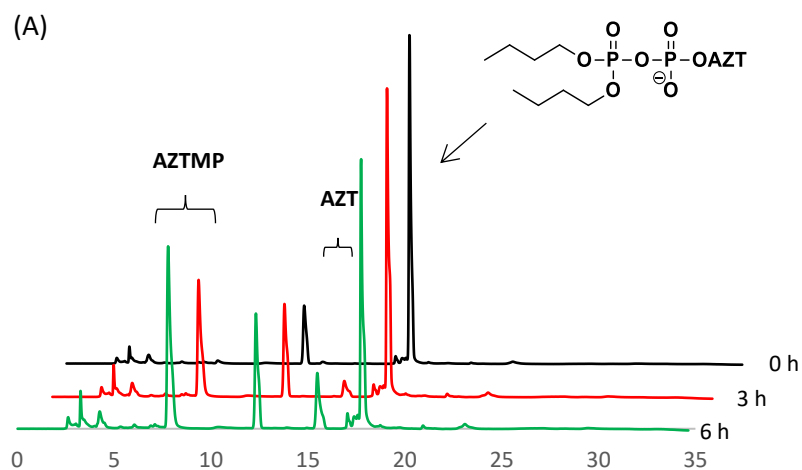
Analizę trwałości otrzymanych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów rozpoczęłam od analogów nie zawierających heteroatomów. Spośród zaprojektowanych wariantów strukturalnych II i III, wybrałam kilka związków (**Tabela 8A**) różniących się wielkością i rozkładem ładunków ujemnych oraz rodzajem grup maskujących (alkil, benzyl, aryl). W tej serii eksperymentów nie stwierdziłam większych różnic w czasie połowicznego rozkładu badanych pochodnych – dla większości z tych analogów $t_{1/2}$ wynosiły od 2 h do 9 h, a głównym produktem rozpadu był odpowiedni fosforan nukleozydu (AZTMP lub ddUMP). Podobne $t_{1/2}$ dla związków o tak zróżnicowanej strukturze chemicznej mogą wskazywać, że ulegają one przekształceniom głównie enzymatycznym, a nie chemicznym. Najwyższą stabilnością wiązania pirofosforanowego odznaczał się analog **A3**, co tłumaczyłam utrudnionym atakiem cząsteczki wody na atom fosforu P_{β} , spowodowanym zwiększoną zawadą steryczną wytwarzaną przez rozgałęzione grupy alifatyczne. W tej grupie pochodnych najbardziej labilnym był trifosforan bis-AZT (**D10**) zawierający funkcję trifosforanową – jego czas połowicznego rozkładu był dużo krótszy od innych analogów i wynosił 22 minuty. Po upływie godziny w mieszaninie inkubacyjnej tego związku obserwowałam tylko dwa metabolity: AZTMP i AZTDP, a po 2,5 h pojawił się również nukleozyd AZT.

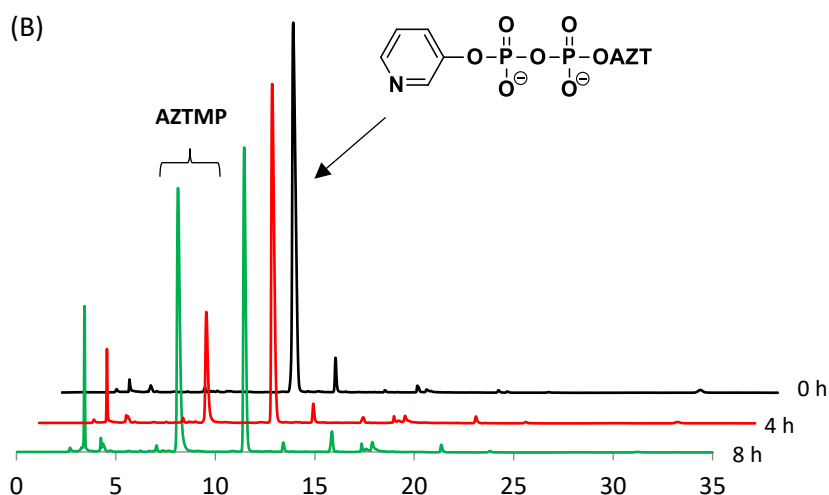
Tabela 8A. Czasy połowicznego rozkładu $t_{1/2}$ dla wybranych pochodnych difosforanów w RPMI/FBS, 9:1, v/v.

Oznaczenie związku	Wzór strukturalny	Wariant strukturalny	EC ₅₀ [μM]	Trwałość, $t_{1/2}$ (RPMI/FBS, 9:1, v/v)
A1		II	<0,01	6 h
A2		II	>250	3 h
A3		II	0,09	>2 dni

A7		III	<0,01	4 h
A9		III	0,0074	2 h
A10		III	0,004	>11 h
A11		III	0,0058	9 h
A12		III	0,1	6 h
A13		III	0,43	8 h
A14		III	0,006	4 h
D10		-	<0,004	22 min.

Na **Rys. 39** przedstawiam chromatogramy dla wybranych związków reprezentujących *II* i *III*. *wariant strukturalny* obrazujące przebieg ich rozpadu.





Rys. 39. Chromatogramy przedstawiające $t_{1/2}$ oraz produkty rozpadu pochodnej **A1** (A) i **A13** (B).

Po wykonaniu analizy trwałości dla analogów tlenowych otrzymanych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów postanowiłam sprawdzić jak obecność heteroatomu, jego rodzaj (siarka lub selen) oraz miejsce w cząsteczce (P_{α} vs P_{β}) wpływają na trwałość wiązania pirofosforanowego. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów zamieściłam w **Tabeli 8B**. Okazało się, że rodzaj heteroatomu (siarka lub selen) nie ma większego wpływu na trwałość wiązania P-O-P, natomiast jego położenie w cząsteczce miało niezwykle duże znaczenie dla trwałości badanych związków w środowiskach niosących aktywność enzymatyczną (**Rys. 40**). Analogi związku **A1** zawierające siarkę lub selen w pozycji P_{α} (**B3** i **B4**) wykazywały dużą stabilność w warunkach hydrolizy enzymatycznej (brak produktów hydrolizy w czasie inkubacji do 7 dni), w przeciwieństwie do pochodnych zawierających heteroatom w pozycji P_{β} (**A18** i **A19**), które charakteryzowały się podobnymi czasami połowicznego rozkładu, co odpowiednie tlenowe pochodne. Taką samą zależność zaobserwowałam dla serii mniej zawadzonych sterycznie dietylowych pochodnych **B8-B9** i **A16-A17**.

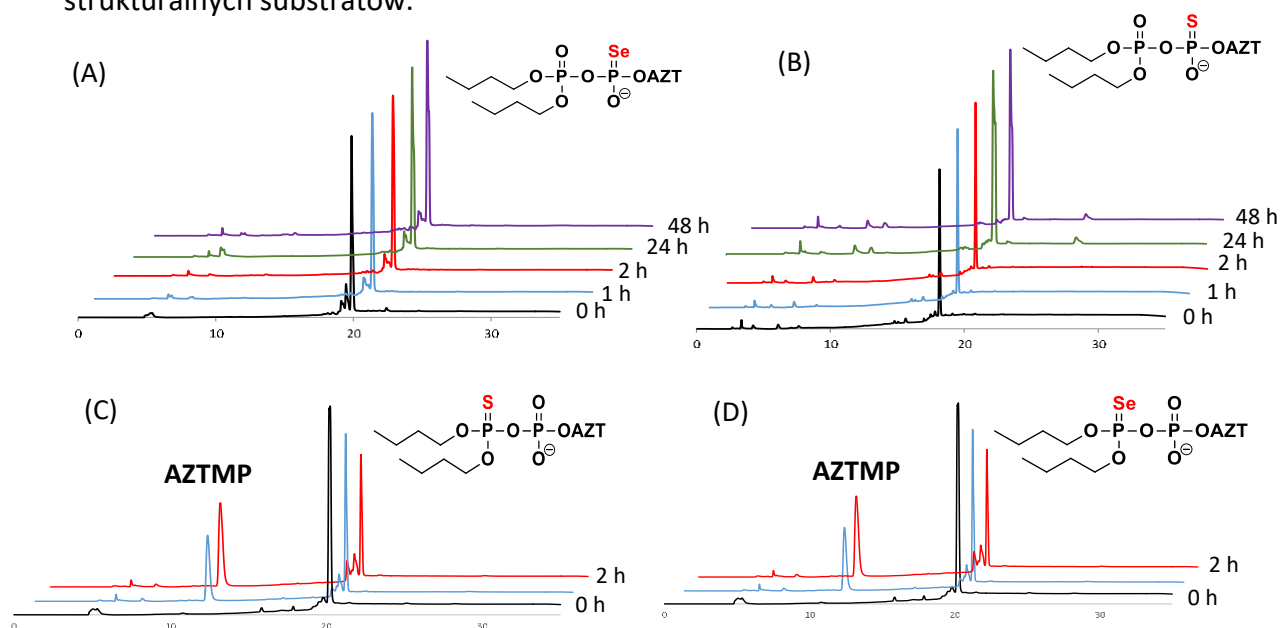
Tabela 8B. Wyznaczone czasy $t_{1/2}$ dla otrzymanych analogów tio i seleno difosforanów w RPMI/FBS, 9:1, v/v.

Oznaczenie związku	Wzór strukturalny	Wariant strukturalny	EC ₅₀ [μM]	Trwałość, $t_{1/2}$ (RPMI/FBS, 9:1, v/v)
B3		II	0,004	>7 dni
B4		II	0,02	>7 dni

A18		II	0,004	1 h
A19		II	0,003	2 h
B8		II	0,02	>7 dni
B9		II	0,015	>7 dni
A16		II	0,005	3 h
A17		II	0,006	4 h
B7		II	3,7	>7 dni
A22		II	0,02	>2 dni
A24		II	0,005	3 h
A25		II	0,03	24 h
B1		III	<0,004	>7 dni
B13		III	0,044	>7 dni

Tiodifosforany **B7** i **A22**, zawierające siarkę odpowiednio w pozycjach P_α i P_β , wykazywały podobny trend, a obserwowane mniejsze różnice w podatności na hydrolizę można prawdopodobnie przypisać zawadzie sterycznej, jaką wywołują dwie rozgałęzione grupy alifatyczne (patrz również niżej). Ciekawym analogiem w aspekcie trwałości była pochodna **B13** z dwoma atomami siarki (po jednym na każdej reszcie fosforanowej). Wykazywała ona dużą trwałość ($t_{1/2} > 7$ dni), podobną do monotio analogów, co wskazywało na dominujący efekt modyfikacji heteroatomem w pozycji P_α na odporność na hydrolizę enzymatyczną wiązania pirofosforanowego. Dla związku **A25**, posiadającego dwa heteroatomy w pozycji P_β (siarkę i azot), dość długi czas połowicznego rozkładu ($t_{1/2} = 24$ h) świadczy, że labilność hydrolytyczna jest zjawiskiem

złożonym i wymaga uwzględnienia dodatkowych czynników przy znacznych zmianach strukturalnych substratów.



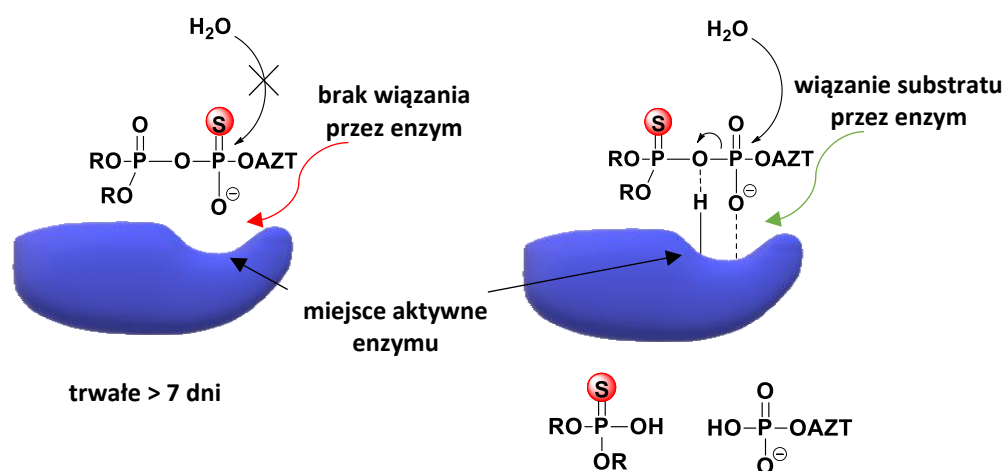
Rys. 40. Chromatogramy przedstawiające różnice w trwałości wiązania pirofosforanowego dla pochodnych tio i seleno 5'-difosforanów: **B4** (A), **B3** (B), **A19** (C), **A18** (D).

Próbując zrozumieć przyczynę różnic w trwałości wiązania pirofosforanowego pomiędzy analogami zawierającymi heteroatom w pozycji P_{α} i P_{β} w warunkach hydrolizy enzymatycznej (RMPI/FBS, 9:1, v/v), rozważałam możliwe oddziaływania tych pochodnych z dostępnymi w środowisku komórkowym enzymami (np. fosfatazami czy pirofosfatazami). Uproszczony (ogólny) schemat tych interakcji zamieściłam na **Rys. 41**.

Postulowany przeze mnie możliwy mechanizm rozpadu tych związków zakłada najpierw wiązanie cząsteczki przez enzym. Ponieważ tylko zjonizowane fosforany (np. fosforanomono- i fosforandistry, ale nie fosforotriestry) są substratami w reakcjach enzymatycznych, można założyć, że zjonizowana część difosforanów (reszta fosforanowa P_{α}) będzie wiązana przez centrum aktywne enzymu, a niezjonizowana reszta P_{β} będzie grupą opuszczającą. Hydroliza 5'-difosforanu nukleozydu będzie więc zachodziła poprzez atak nukleofilowy cząsteczki wody (wolnej lub związanej z enzymem) na atom fosforu P_{α} , wspomagany prawdopodobnie protonowaniem mostkowego atomu tlenu, z odejściem fosforandiustru. W przypadku pochodnych zawierających heteroatom w pozycji α , ze względu na zawadę steryczną stworzoną przez atom siarki lub selenu, grupa P_{α} może nie mieścić się w centrum aktywnym enzymu. Związki takie nie będą ulegały więc hydrolizie enzymatycznej, lecz hydrolizie chemicznej. Jest to

zgodne z obserwacją, że badane difosforany z atomem siarki na P_α wykazywały podobną trwałość w RPMI (hydroliza chemiczna) i RMPI/FBS (hydroliza enzymatyczna). Ponieważ P_α w **B3** i **B4** jest centrum stereogenicznym, związki takie występują jako dwa P-diastereomery i jeden z nich potencjalnie może być substratem dla enzymu. W związku z tym, że nie obserwowałam częściowej hydrolizy badanych związków w RMPI/FBS, przypuszczam, że prawdopodobnie żaden z diastomerów nie jest substratem dla enzymów hydrolitycznych w badanych warunkach, przypuszczalnie ze względu na małe rozmiary centrum aktywnego danego enzymu.

Zupełnie inna sytuacja występuje dla difosforanów zawierających heteroatom w pozycji β . Związki te powinny być wiązane przez enzymy hydrolityczne podobnie jak okso-difosforany i ulegać szybkiej hydrolizie do odpowiednich fosforanomono- i fosforanodiestrów. Takie zachowanie rzeczywiście obserwowałam dla pochodnych **A16** i **A17** oraz **A18** i **A19** w czasie inkubacji w RMPI/FBS (hydroliza enzymatyczna). Ponieważ tio oraz selenofosfoniany stanowią lepsze grupy odchodzące niż fosforany, stąd też hydroliza enzymatyczna i chemiczna tych związków powinny zachodzić łatwiej.



Rys. 41. *Możliwe różnice w oddziaływaniach tio i seleno pochodnych w zależności od położenia heteroatomu z dostępnymi w środowisku komórkowym enzymami.*

Z kolei związki **B7** i **A22** wykazywały zbliżone czasy połowicznego rozpadu w RMPI/FBS, spowodowane prawdopodobnie zawadą przestrzenną na centrum P_β . Dla związku **B7** posiadającego heteroatom na reszcie fosforanowej P_α stłoczenie steryczne nie powinno wpływać na tworzenie kompleksu z enzymem, ponieważ jest to uwarunkowane przede wszystkim obecnością lub brakiem heteroatomu na atomie P_α . Dla związku **A22**, sytuacja może być bardziej złożona. Gdyby wiązanie difosforanu do

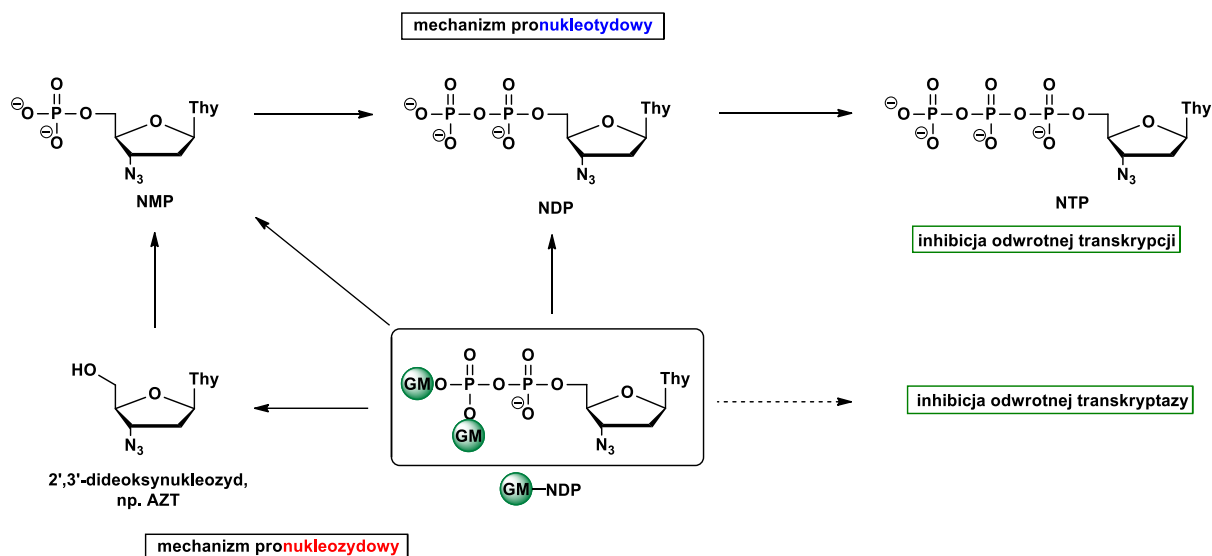
centrum aktywnego zależało tylko od charakteru grupy P_{α} , związek **A22** powinien ulegać hydrolizie enzymatycznej z kinetyką podobną do związku **A18**. Duże różnice w czasach połowicznego rozpadu dla tych związków ($t_{1/2} = 2$ dni dla **A22** i $t_{1/2} = 1$ h dla **A18**) wskazują, że objętościowo duża grupa P_{β} może utrudniać wiązanie grupy P_{α} do centrum aktywnego enzymu, czyniąc hydrolizę enzymatyczną mniej efektywną. Wpływ wielkości grupy P_{β} na efektywność działania enzymu w dużym stopniu może zależeć od położenia grupy P_{β} w kompleksie z enzymem (wewnątrz lub na zewnątrz). W przypadku usytuowania grupy odchodzącej na zewnątrz kompleksu, enzym powinien wykazywać większą tolerancję na wielkość takiej grupy.

Wpływ obserwowanej trwałości na możliwy mechanizm działania otrzymanych pochodnych w kontekście ich struktury oraz oznaczonych parametrów biologicznych, dyskutowany będzie w kolejnym rozdziale.

7. MOŻLIWE MECHANIZMY DZIAŁANIA OTRZYMANYCH POCHODNYCH 5'-DIFOSFORANÓW NUKLEOZYDÓW

Przedstawione na *Schemacie 51* możliwe ścieżki rozpadu (**A-C**) pochodnych 5'-difosforanów zgodne są z powszechnie postulowanymi mechanizmami aktywności antywirusowej tych związków. Zaproponowane drogi rozpadu **A** i **B** zakładają mechanizm pronukleotydowy, poprzez hydrolizę wiązania pirofosforanowego i uwolnienie monofosforanu nukleozydu (**A**) albo hydrolizę grup maskujących ładunek ujemny reszty fosforanowej P_{β} i generowanie difosforanu nukleozydu (**B**). Każda z tych dróg, po ufosforylowaniu przez kinazy komórkowe generowanego prekursora (monofosforanu lub difosforanu) prowadzi do pożądanego 5'-trifosforanu nukleozydu, właściwego inhibitora procesu odwrotnej transkrypcji. Aktywność biologiczna proleku może być także obserwowana na skutek defosforylacji 5'-difosforanu do nukleozydu (mechanizm pronukleotydowy, ścieżka **C**) w medium hodowlanym, który na drodze dyfuzji biernej przenika do wnętrza komórki i tam, po ponownym ufosforylowaniu, może wywoływać odpowiedni efekt biologiczny. Dyskutując potencjalne mechanizmy działania pronukleotydów nie można wykluczyć także możliwości bezpośredniego oddziaływania badanego związku z odwrotną transkryptazą, co przekładałoby się na inhibicję działania enzymu, a w konsekwencji hamowałoby replikację wirusa HIV. Można uznać za prawdopodobne, że opisane możliwe mechanizmy działają w organizmie

jednocześnie, a obserwowany efekt biologiczny jest wypadkową udziału poszczególnych mechanizmów. Omawiane powyżej procesy przedstawia **Schemat 52**.



Schemat 52. Postulowane sposoby działania 5'-difosforanów nukleozydów.

7.1. Próba korelacji struktury i trwałości zsyntetyzowanych związków z ich aktywnością anty-HIV

Znając prawdopodobne sposoby działania 5'-difosforanów nukleozydów postanowiłam poszukać korelacji pomiędzy strukturą i trwałością otrzymanych związków a ich aktywnością biologiczną. Pierwsze z zsyntetyzowanych analogów (**A1**, **A3**, **A4**), zawierające w swojej strukturze dwie grupy alkilowe maskujące ładunek ujemny reszty fosforanowej P_{β} (*wariant strukturalny II*) charakteryzowały się dobrymi parametrami biologicznymi, niezależnie od długości łańcuchów węglowych i stopnia ich rozgałęzienia (**Tabela 7A**). Natomiast związki z jedną alifatyczną grupą maskującą i dwoma ujemnymi ładunkami (**A5**, **A6**; *wariant strukturalny III*) wykazywały aktywność biologiczną o rząd wielkości mniejszą, co można tłumaczyć ich utrudnionym przenikaniem przez błony komórkowe i przez to – zmniejszonym efektem antywirusowym (**Tabela 7B**). W związku z tym, że omawiane grupy alkilowe maskujące ładunek elektryczny nie są łatwe do usunięcia, nie spodziewałam się efektywnego rozpadu takich difosforanów do NDP (droga **B**, **Schemat 52**). Potwierdziły to badania trwałości w medium RPMI/FBS (9:1, v/v) dla wybranej pochodnej **A1** (**Tabela 8A**) i jej dość szybki rozpad ($t_{1/2} = 6$ h) do AZTMP (główny produkt). Jedynie dla związku **A3** obserwowałam zwiększoną trwałość wiązania P-O-P, o czym wspominałam

w poprzednim rozdziale. Kolejną grupę związków stanowiły analogi zawierające grupy benzytowe na reszcie fosforanowej P_{β} w ramach *wariantu strukturalnego III (A7-A9, Tabela 7B)*, które okazały się bardzo aktywne w inhibicji wirusa (porównywalne z AZT). Tak wysoką aktywność tych związków można tłumaczyć obecnością pierścienia aromatycznego, który zwiększając lipofilowość cząsteczek może ułatwiać ich przenikanie do wnętrza komórki. Trwałość tych pochodnych w medium wykazującą aktywność enzymatyczną wynosiła również kilka godzin i przebiegała także z rozerwaniem wiązania pirofosforanowego i utworzeniem AZTMP jako większościowego metabolitu.

Pochodne arylowe (**A11-A13, Tabela 7B**) wykazywały natomiast zdecydowanie bardziej zróżnicowaną aktywność anty-HIV. Mimo obecności dobrych grup opuszczających, badania trwałości tych związków wskazywały na pęknięcie wiązania P-O-P z kinetyką niezależną od charakteru podstawników w pierścieniu aromatycznym (grupy elektronodonorowe lub elektronoakceptorowe). Związek **A14** był szczególnie interesujący w kontekście badań trwałości, ze względu na obecność grupy S-merkptoetylowej i postulowany dla niej mechanizm wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, mogący prowadzić do uwolnienia niemaskowanego AZTDP. Jednakże i dla tej pochodnej obserwowano dość szybki ($t_{1/2} = 4$ h) rozpad do AZTMP.

Pochodne difosforanów zawierające heteroatom (**A16-A25 i B1-B13, Tabela 7A i 7B**) zsyntetyzowane były w większości przypadków jako struktury analogiczne do otrzymanych wcześniej związków **A1-A15**. Analizując wpływ pozycji siarki lub selenu w cząsteczce na jej aktywność biologiczną zaobserwowałam, że większość związków *wariantu strukturalnego II*, zawierających heteroatom w pozycji P_{β} (**A16-A19, A24, Tabela 7A**), wykazywała wysoką zdolność inhibicji replikacji wirusa HIV (rzędu nanomolarnego, $EC_{50} = 1 - 10$ nM). Jednocześnie analogi te w medium RPMI/FBS (9:1, v/v) dość szybko rozpadały się do AZTMP ($t_{1/2} < 4$ h), co wskazywało na możliwy pronukleotydowy mechanizm ich działania. Wśród związków w omawianym wariantcie strukturalnym wyjątek stanowiły pochodne **A22** (tiodifosforan z dwoma rozgałęzionymi grupami alkilowymi) oraz **A25** (tiodifosforan z dodatkowym wiązaniem P-N), których aktywność biologiczna okazała się być mniejsza przy zwiększonej trwałości wiązania pirofosforanowego ($t_{1/2} = 24$ h - 2 dni). Prawdopodobne przyczyny większej odporności tych pochodnych na hydrolizę enzymatyczną dyskutowałam już wcześniej, a w tym miejscu odnotowuję, że dłuższy czas ich połowicznego rozkładu wpływał niekorzystnie

na ich aktywność antywirusową. Nie jest to jednak ogólna prawidłowość. Difosforany zawierające heteroatom w pozycji P_{α} (**B1-B13**, *Tabela 7A* i *7B*) wykazywały również wysoką aktywność anty-HIV, niekiedy zbliżoną do AZT (**B3**, **B6**, **B10**, **B11**), będąc jednocześnie bardzo odpornymi na hydrolizę enzymatyczną ($t_{1/2} > 7$ dni). Zakładając, że środowisko RPMI/FBS jest zbliżone do komórkowego, obserwowaną wysoką trwałość tych związków z jednoczesnym zachowaniem korzystnych parametrów biologicznych, dopuszczam możliwość działania tych związków w niezmienionej formie jako inhibitorów odwrotnej transkryptazy wirusa. Wprowadzenie atomu siarki na resztę fosforanową P_{α} pochodnej **B1** skutkowało zwiększeniem aktywności anty-HIV o 2 rzędy wielkości w porównaniu do okso analogu **A12** (*Tabela 7B*) oraz zwiększeniem stabilności cząsteczki w warunkach hydrolizy enzymatycznej. Zważając na diametralnie różną trwałość 5'-difosforanów zawierających heteroatom w pozycji niemostrzanej reszty fosforanowej P_{α} lub P_{β} , szczególnie interesujący był ditiofosforan **B13**, zawierający siarkę w pozycji P_{α} i P_{β} . Wyniki badań w medium RPMI/FBS (9:1, v/v) wykazały, że $t_{1/2}$ dla tego związku wynosił więcej niż 7 dni, a jego parametry terapeutyczne były umiarkowane. Świadczy to o prawdopodobnie dość złożonej zależności między strukturą chemiczną a obserwowaną aktywnością i wskazuje, że zależności przypisywane pewnym fragmentom strukturalnym nie są addytywne.

Oprócz pochodnych AZT, do moich badań włączyłam również difosforany zawierające ddU jako komponent nukleozydowy (**A2**, **A23**, **B7**; *Tabela 7A*). W tej serii związki różniły się alifatycznymi grupami maskującymi ładunek ujemny reszty fosforanowej P_{β} oraz obecnością i pozycją heteroatomu (siarki) w cząsteczce. Parametry aktywności antywirusowej dla tych pochodnych były dla mnie szczególnie interesujące w aspekcie możliwych mechanizmów ich działania. Ponieważ ddU nie jest dobrym substratem dla kinazy tymidynowej, dlatego nie obserwujemy wewnątrzkomórkowej fosforylacji ddU do odpowiedniego mononukleotydu (ddUMP). Stąd sam nukleozyd ddU nie wykazuje aktywności anty-HIV, gdyż nie może być przekształcony w komórce do odpowiedniego trifosforanu,⁴⁴ a ewentualnie obserwowalną aktywność biologiczną dla analogów zawierających w swojej strukturze ddU możemy przypisywać ich pronukleotydomu charakterowi działania (uwalnianie w komórce niemaskowanego ddUMP lub ddUDP). W przeciwieństwie do okso-difosforanu **A2**, pochodne 5'-difosforanów ddU mające w cząsteczce heteroatom, niezależnie od jego pozycji,

wykazywały znaczącą aktywność antywirusową (**A21**: $EC_{50} = 4,4 \mu\text{M}$, **B7**: $EC_{50} = 3,7 \mu\text{M}$ vs ddU: $EC_{50} > 10 \mu\text{M}$), co może silnie wskazywać na pronukleotydowy mechanizm ich działania.

Większość otrzymanych analogów tlenowych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów nie wykazywała toksyczności względem komórek CEMT4. Pojedyncze przypadki podwyższonej szkodliwości dla komórek (np. dla **A8**, **A11**, **A13**, **A15**) tłumaczyć można potencjalnym rozpadem tych cząsteczek do arylowych metabolitów, które najprawdopodobniej stanowią źródło ich toksyczności. Generalny trend niskiej toksyczności można uzasadnić powolnym uwalnianiem przez badane analogi w komórce AZTMP, co jest korzystnym zjawiskiem, gdyż w przeciwieństwie do AZT i jego bardzo szybkiej fosforylacji do AZTMP, nie powoduje wysycenia komórkowej kinazy tymidylanowej i w konsekwencji zahamowania fosforylacji TMP do TTP, niezbędnego do prawidłowego przebiegu syntezy DNA gospodarza.²⁹ Niektóre z analogów zawierające atom selenu na reszcie fosforanowej P_{α} (**B6**, **B9**, **Tabela 7A**), mimo dobrej aktywności anty-HIV były jednocześnie zabójcze dla testowanych niezainfekowanych komórek ($CC_{50} < 25 \mu\text{M}$). Zjawisko to tłumaczyłam możliwą deselenizacją, co wiąże się z wydzieleniem w komórce toksycznego H_2Se , jako analogicznego procesu dla opisanego w literaturze desulfuryzacji przez białko HINT1 tiomonofosforanów nukleozydów oraz cząsteczek PS-oligonukleotydów.¹⁴⁴

Wśród badanych pochodnych difosforanów dinukleozydów (**C1-C6**) widać było wyraźnie wyższą aktywność anty-HIV analogów zawierających AZT od tych zawierających d4T jako nukleozyd antywirusowy. Dodatkowo, badania biologiczne wykazały, że obecność atomu siarki w związkach **C2** i **C6** poprawiała ich aktywność względem pochodnych nie zawierających heteroatomu (**C1**, **C5**), jednak jednocześnie obserwowano niekorzystny wpływ na toksyczność badanych związków ($CC_{50} < 100 \mu\text{M}$). Tę ostatnią można przypisać prawdopodobnej desulfuryzacji tych związków i uwalnianiu szkodliwego H_2S .

Szczególnie interesująca pod względem aktywności biologicznej okazała się być pochodna **D10**, symetryczny trifosforan bis-AZT, dla której wyznaczone parametry biologiczne były zbliżone do AZT. Biorąc pod uwagę strukturę związku (cząsteczka zjonizowana), wyjątkowo krótki czas połowicznego rozkładu ($t_{1/2} = 22 \text{ min.}$) i generowane metabolity (AZTMP i AZTDP), wykluczyłam możliwość wnikania tego

związku w niezmienionej postaci do komórki. W przypadku analogu **D10**, najbardziej prawdopodobny mechanizm działania polega na szybkim rozkładzie związku poza komórką do AZTMP i AZTDP, a następnie defosforylacji powstających metabolitów, które już w postaci elektrycznie obojętnej 2',3'-dideoksynukleozydu (AZT) wnikały do wnętrza komórki na drodze dyfuzji biernej i tam ulegały ponownej fosforylacji do aktywnego biologicznie 5'-trifosforanu AZT.

Znając korzystny wpływ obecności grupy 4-aminopirydynowej na parametry biologiczne analogów amidofosforanowych projektowanych jako pronukleotydy anty-HIV,⁷⁹ zsyntetyzowałam związki **N1-N3** (*Tabela 7D*). W tej grupie, analog **N1** zdecydowanie wyróżniał się aktywnością anty-HIV oraz niską cytotoksycznością. Związek **N3** odznaczał się podobną do d4T aktywnością biologiczną, jednakże jego cytotoksyczność okazała się być większa od toksyczności samego nukleozydu. Dla analogu **N2** przypuszczałam, że będzie on wykazywał dobrą aktywność biologiczną ze względu na obecność PMPA, acyklicznego nukleotydu antywirusowego oraz oczekiwaną niską cytotoksyczność (obecność 4-aminopirydyny). Otrzymane wyniki testów biologicznych potwierdziły, że związek **N2** charakteryzował się podobną aktywnością antywirusową do PMPA, natomiast gorszą cytotoksycznością.¹⁴⁵ W celu sprawdzenia możliwych ścieżek działania tej grupy związków poddałam jeden z nich (**N1**, o najlepszych parametrach biologicznych) testom stabilności w warunkach hydrolizy chemicznej (RPMI) i enzymatycznej (RPMI/FBS, 9:1, v/v). Niestety, czasy retencji pochodnej **N1** były zbliżone do czasów retencji AZTDP i AZTMP (*Rys. 38*), co uniemożliwiło wyznaczenie $t_{1/2}$.

7.2. Związki o najkorzystniejszych parametrach terapeutycznych

Pod koniec lat 90. XX wieku badania statystyczne na grupie 2 tysięcy zarejestrowanych leków prowadzone przez Lipinskiego¹⁴⁶ pokazały, że stosowane doustnie leki mieszczą się w określonych zakresach wartości masy molowej, lipofilowości oraz liczby miejsc będących donorami lub akceptorami wiązań wodorowych. Parametry te uznano za istotne dla predykcji farmakokinetyki proponowanej substancji leczniczej i ustalono, że spełnienie co najmniej trzech kryteriów tzw. reguły Lipinskiego zwiększa znacząco szanse danego związku na stanie się w przyszłości lekiem. Według tej klasyfikacji, potencjalna substancja aktywna (i) nie

powinna zawierać więcej niż 5 miejsc donorowych oraz 10 miejsc akceptorowych dla wiązania wodorowego, (ii) jej masa molowa powinna być niższa niż 500, a (iii) współczynnik podziału oktanol/woda nie powinien być większy niż 5. Mimo że wiele zarejestrowanych i stosowanych terapeutyków nie spełnia opisanych powyżej kryteriów, nie zmienia to jednak faktu, że reguła Lipinskiego nadal traktowana jest jako użyteczne narzędzie w ocenie przydatności terapeutycznej związków projektowanych jako potencjalne leki.

Jednym z istotniejszych czynników w predykcji farmakokinetyki proponowanego leku jest lipofilowość. Pozwala ona oszacować zdolność substancji do przenikania przez błonę komórkową, poziom jej dystrybucji w różnych tkankach organizmu, jej metabolizm oraz toksyczność.¹⁴⁷ Lipofilowość może być oznaczana eksperymentalnie, a jej miarą jest współczynnik podziału P niezjonizowanego związku pomiędzy fazę oktanol/woda (wyrażany często jako logarytm dziesiętny LogP)¹⁴⁸ zgodnie z równaniem Hanscha:

$$P = \frac{[\text{związek}]_{\text{oktanol}}}{[\text{związek}]_{\text{woda}}}$$

Stosowanymi metodami pomiarowymi są najczęściej: wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) oraz elektroforeza kapilarna (CE).¹⁴⁹ Współcześnie, dla przewidywania lipofilowości coraz częściej bazuje się także na metodach *in silico*. Podejście to ma sporą przewagę nad badaniami *in vitro*, gdyż pozwala niewielkim nakładem sił i czasu, na obliczenie tego parametru dla serii związków bez konieczności ich syntezy. Obecnie dostępnych jest wiele komercyjnych oprogramowań umożliwiających obliczenie LogP lub ich różnych wariantów (cLogP). Przewidywaną lipofilowość oblicza się, np. poprzez rozbicie cząsteczki na mniejsze fragmenty o znanej lipofilowości, a następnie na sumowaniu udziału poszczególnych składników.¹⁴⁹ Niestety, zgodność z danymi eksperymentalnymi często jest daleka od zadowalającej. Ponadto należy pamiętać, że zjonizowane związki mogą występować w różnej formie w zależności od pH roztworu, dlatego też dla tego typu cząsteczek bardziej odpowiednim deskryptorem opisującym lipofilowość jest współczynnik dystrybucji (D), zwyczajowo przedstawiany w skali logarytmicznej LogD . Pozwala on przewidywać w jakich organach, różniących się pH środowiska, dany lek będzie się akumulować. Metody *in silico* określania LogD są dużo

mniej powszechne i bardziej pracochłonne, stąd też w wielu przypadkach stosuje się LogP również dla związków zjonizowanych (obliczany dla formy sprotonizowanej), który pozwala odnotować istniejące trendy w lipofilowości.

Poszukując potencjalnych struktur wiodących wśród otrzymanych 5'-difosforanów wyselekcjonowałam spośród przebadanych pod względem parametrów biologicznych te, które charakteryzowały się najwyższą aktywnością przy jednocześnie niskiej toksyczności – wartości te przekładały się na wysoki indeks selektywności dla tych związków (**Tabela 9**). Dane z **Tabeli 9** pokazują, że 75% tych związków stanowią pochodne zawierające heteroatom (siarkę lub selen) przy centrum fosforowym. Zwiększenie aktywności biologicznej analogów tio lub seleno w porównaniu z ich tlenowymi odpowiednikami może być po części związane ze zwiększeniem lipofilowości tych związków, a przez to korzystnym wpływem na możliwość ich przenikania przez błony komórkowe. Cztery spośród wytypowanych związków (**A19**, **A18**, **A24** i **A16**) stanowią pochodne zawierające atom siarki lub selenu w pozycji P_β, przez co charakteryzują się dość szybkim rozpadem do fosforanu AZT, który zgodnie z mechanizmem pronukleotydowym, po ufosforylowaniu do trifosforanu AZT, mógłby tłumaczyć ich wysoką aktywność biologiczną. Związki **B1** i **B3**, zawierające siarkę w pozycji P_α, również wykazywały wysoką aktywność anti-HIV, ale biorąc pod uwagę ich dużą stabilność w medium RPMI/FBS, są one bardzo odporne na hydrolizę enzymatyczną. Prawdopodobnie tak trwałe difosforany dostają się do komórki w formie niezmienionej, a ich mechanizm działania być może zachodzi poprzez inhibicję ważnych dla wirusa enzymów. Większość najbardziej biologicznie aktywnych difosforanów z **Tabeli 9** należy do *wariantu strukturalnego II*. Są to więc związki mniej polarne (obecność tylko jednego ładunku ujemnego w cząsteczce), bardziej lipofilowe, przez co prawdopodobnie łatwiej dostają się do wnętrza komórki, co jest podstawowym wymogiem aktywności biologicznej, niezależnie od mechanizmu działania.

Dla otrzymanych pochodnych 5'-difosforanów o najwyższym indeksie selektywności (przedstawionych w **Tabeli 9**) przeprowadziłam wstępną analizę w kontekście spełniania przez nie kryteriów dobrego kandydata na lek, tzw. *drug likeness*. W tej analizie brałam pod uwagę: masę molową związków, lipofilowość (cLogP), liczbę miejsc akceptorowych i donorowych dla wiązania wodorowego oraz topologiczną powierzchnię polarną (parametr pozwalający na określenie możliwości transportu

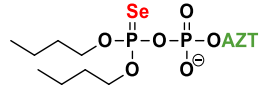
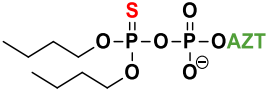
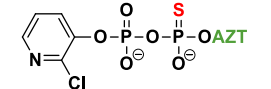
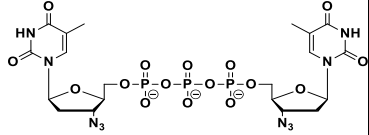
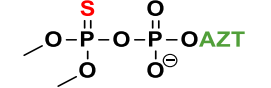
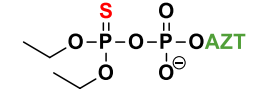
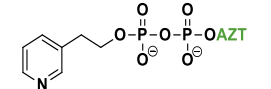
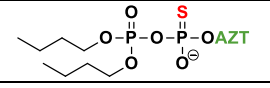
cząsteczek przez błony komórkowe). Zdając sobie sprawę, że platforma ta nie będzie stanowiła idealnego narzędzia w określeniu spełnienia reguł Lipińskiego przez badane związki (ze względu na ich zjonizowaną naturę), uznałam więc otrzymane dane jako pomocne w poszukiwaniu korelacji pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną. Po analizie otrzymanych parametrów zauważyłam, że (i) większość wyselekcjonowanych pochodnych spełnia lub tylko nieznacznie przekracza kryterium dotyczące masy molowej ($MW < 500$), (ii) dla wszystkich z nich obliczony $\log P$ wynosił poniżej 5, (iii) wszystkie posiadają odpowiednią ilość donorów wiązania wodorowego ($HBD < 5$) oraz nieco za dużą ilość akceptorów wiązania wodorowego ($HBA > 10$), (iv) obliczona topologiczna powierzchnia polarna (TPSA) dla wszystkich testowanych analogów jest dużo większa niż wartość uznawana za odpowiednią do efektywnego transportu przez błony komórkowe ($TPSA < 140 \text{ \AA}^2$) lub przez barierę krew-mózg ($TPSA < 90 \text{ \AA}^2$), co świadczyłoby o utrudnionym przenikaniu tych związków przez warstwy lipidowe.

Analiza danych w **Tabeli 9** pokazuje, że zastosowanie obliczonych parametrów fizykochemicznych takich jak MW, cLogP, HBA, HBD, TPSA, dla predykcji aktywności biologicznej czy korelacji aktywności biologicznej ze strukturą chemiczną, należy traktować z ostrożnością, jeśli chodzi o grupę związków o bardzo podobnym motywie strukturalnym. W przypadku 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów, wszystkie one mają zbliżoną masę cząsteczkową, podobną powierzchnię polarną oraz porównywalną liczbę miejsc protonoceptorowych i protonodonorowych. Tak więc, parametry te będą podobne dla całej klasy związków i trudna jest korelacja z występującymi różnicami w aktywności biologicznej między poszczególnymi związkami.

Z moich badań wynika, że duży wpływ na aktywność biologiczną 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów ma obecność w cząsteczce jednego heteroatomu (siarki lub selenu) w pozycji niemostrkowej. Warunkiem koniecznym jest również obecność ładunku ujemnego na grupie fosforanowej P_α połączonej z nukleozydem (*wariant strukturalny II*). Pochodne difosforanów zawierające dwa ładunki ujemne, przy centrum P_α i P_β , (*wariant strukturalny III*) są również aktywne, ale głównie wtedy, jeśli posiadają jednocześnie heteroatom w cząsteczce. Grupy maskujące pozycję P_β mają mniejszy wpływ na obserwowaną aktywność biologiczną chyba, że są to grupy wprowadzające dużą zawadę przestrzenną. W takich przypadkach obserwowałam spadek aktywności biologicznej difosforanu. Wymienione wyżej cechy strukturalne 5'-difosforanów

2',3'-dideoksynukleozydów przekładają się na ich podatność na hydrolizę enzymatyczną oraz na ich mechanizm działania, który może być różny, w zależności od pozycji P_{α} lub P_{β} heteroatomu.

Tabela 9. Wybrane najlepsze pod względem aktywności anty-HIV oraz cytotoksyczności pochodne 5'-difosforanów (uszeregowane wraz ze zmniejszającymi się wartościami indeksu selektywności).

Nr związku	Wzór strukturalny	EC ₅₀ [μM]	CC ₅₀ [μM]	SI	Wariant strukturalny	Heteroatom	t _{1/2}	MW [g/mol]	cLogP	HBA	HBD	TPSA [Å] ²
A19		0,003	>330	110 000	II	P _β -Se	2 h	602,38	2,31	14	2	188,09
A18		0,004	>300	75 000	II	P _β -S	1 h	555,49	3,44	14	2	188,09
B1		<0,004	>226	56 500	III	P _α -S	>7 dni	554,8	1,72	15	3	211,98
D10		<0,004	>208	52 000	III	brak	22 min.	756,41	-2,28	26	5	376,55
A24		0,005	>258	51 600	II	P _β -S	3 h	471,32	0,56	14	2	188,09
A16		0,005	>254	50 200	II	P _β -S	3 h	499,38	1,32	14	2	188,09
A10		0,004	>197	49 250	III	brak	>11 h	532,34	-0,93	16	3	229,05
B3		0,004	>190	47 500	II	P _α -S	>7 dni	555,49	3,44	14	2	188,09

MW – masa molowa; HBA – liczba akceptorów wiązania wodorowego, HBD – liczba donorów wiązania wodorowego, TPSA – topologiczna powierzchnia polarna.

8. PODSUMOWANIE

Głównym celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było zaprojektowanie różnych wariantów strukturalnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów oraz opracowanie uniwersalnej i wygodnej metody ich syntezy. Związki te, ze względu na obecność nukleozydów antywirusowych, otrzymywane były z myślą o potencjalnym wykorzystaniu w terapii anty-HIV.

Po zaprojektowaniu wariantów strukturalnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów posiadających różne podstawniki i heteroatomy (S i Se), a także różny rozkład ładunków elektrycznych w części fosforanowej, spośród możliwych ścieżek syntetycznych układów polifosforanowych, wybrałam H-fosfoniany jako związki wyjściowe. Częściowo intuicyjnie zakładałam, że reakcja oksydatywnej kondensacji H-fosfonianomonoestrów z odpowiednimi P(V) nukleofilami może stanowić uniwersalną metodę syntetyczną pozwalającą otrzymywać różnorodne warianty strukturalne 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów o potencjalnej aktywności anty-HIV. Zaletą stosowania metodologii H-fosfonianów jest korzystanie ze stabilnych substratów, które aktywowane w medium reakcyjnym tworzą reaktywne formy, pozwalające na otrzymywanie różnych pochodnych P(III), a potem P(V).

Na początku przeprowadziłam badania metodyczne w celu optymalizacji wybranej metody syntetycznej. Oksydacyjna kondensacja przebiega z wytworzeniem reaktywnej fosfobetainy, która następnie zostaje poddana reakcji z badanym P(V) nukleofilem, tworząc odpowiedni polifosforan. Badania metodyczne podzieliłam na dwa etapy, odpowiadające kolejno na pytania: (i) jak poszczególne komponenty układu reakcyjnego (czynnik silylujący, utleniacz, katalizator nukleofilowy) wpływają na efektywność generowania fosfobetainy oraz (ii) czy istnieją różnicę w reaktywności fosfobetain względem różnych P(V) nukleofili, które miałam zamiar stosować w syntezie zaprojektowanych związków.

Stwierdziłam, że duży wpływ na tworzenie fosfobetainy (pirydyniofosforanu, P-Py) miał rodzaj zastosowanego czynnika silylującego (TMSCl vs BSA). Podczas badań okazało się, że zarówno jego rodzaj, jak i ilość są niezwykle istotne w tego typu reakcjach. Obserwowałam różnice w stabilności fosfobetainy P-Py w zależności od użytego czynnika silylującego, co wyjaśniłam reakcjami następczymi katalizowanymi produktami

rozkładu tych reagentów. W przypadku stosowania nadmiaru BSA następowały spontaniczne przemiany, które ostatecznie prowadziły do otrzymywania niepożądanego produktu – bisililowanego monofosforanu nukleozydu. Sprawdziłam również wpływ zastosowanego utleniacza na wydajność generowania fosfobetainy, jednakże w przypadku stosowanych czynników utleniających nie zaobserwowałam znaczących różnic. W kontekście badań metodycznych interesujące było dla mnie zweryfikowanie czy inne, obok powszechnie stosowanej pirydyny, zasady heterocykliczne oraz 3° aminy alifatyczne, mogą być wykorzystane jako katalizatory nukleofilowe dla tej reakcji. Badane przeze mnie aminy różniły się od siebie zawadą przestrzenną oraz obecnością podstawników elektronoakceptorowych lub elektronodonorowych. Czynniki te, jak się okazało, nie miały większego wpływu na generowanie samej fosfobetainy, były jednak niezwykle istotne podczas reakcji betainy ze słabymi nukleofilami, np. pochodnymi kwasu fosforowego (mono- i diestry) oraz nieorganicznym fosforanem. Po przeprowadzeniu serii eksperymentów wybrałam pirydynę jako optymalny katalizator nukleofilowy do otrzymywania 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów. Użycie różnych fosfobetain (okso, seleno, tio) w połączeniu z różnymi P(V) nukleofilami (fosforany mono i diestry oraz ich siarkowe i selenowe odpowiedniki) pozwoliło, między innymi, na wprowadzenie heteroatomów (S i Se) w wybrane pozycje P_α lub P_β wiązania bezwodnikowego.

Przeprowadzone prace metodyczne doprowadziły do opracowania skutecznej metody dla otrzymania z dobrymi wydajnościami pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów o różnych motywach strukturalnych na reszcie fosforanowej P_β, jak również ich analogów zawierających niemostrkowe heteroatomy (siarkę i selen) na resztach fosforanowych P_α lub P_β. Strukturę otrzymanych związków potwierdziłam za pomocą spektrometrii mas oraz spektroskopii ¹H, ¹³C, ³¹P NMR.

Zsyntetyzowane pochodne 5'-difosforanów zostały następnie przebadane pod kątem ich aktywności anty-HIV oraz cytotoksyczności we współpracy z laboratoriami mikrobiologicznymi (Narodowy Instytut Leków w Warszawie, Rega Institute w Leuven, Belgia). Duża grupa analogów zawierająca AZT okazała się być bardzo dobrymi inhibitorami replikacji wirusa HIV, efektywnymi już w stężeniach nanomolowych (EC₅₀ < 10 nM). Co bardzo istotne, zdecydowana większość z nich nie wykazywała mierzalnej cytotoksyczności w badanych zakresach stężeń. Przypadki toksyczności

w badanych liniach komórkowych wykazywały głównie związki zawierające selen, co można przypisać możliwej deselenizacji z utworzeniem szkodliwego selenowodoru. Dodatkowo, obiecujące wyniki aktywności antywirusowej dla analogu nukleotydu ddU, wskazywała na pronukleotydowy mechanizmu działania tego typu pochodnych.

Kolejnym etapem badań było określenie trwałości chemicznej otrzymanych związków w medium hodowlanym komórek (RPMI) oraz w warunkach hydrolizy enzymatycznej w medium hodowlanym komórek wzbogaconym w aktywność enzymatyczną surowicy bydlęcej (RPMI/FBS, 9:1, v/v). Do badań wybrałam najbardziej aktywne biologicznie pochodne oraz takie, które zawierały interesujący mnie fragment strukturalny, mogący wpływać na kinetykę i sposób rozkładu danego związku. Eksperymenty te pozwoliły określić możliwe ścieżki rozpadu 5'-difosforanów w warunkach symulujących środowisko komórkowe, a otrzymane wyniki wskazują możliwe mechanizmy ich działania. Wszystkie z przebadanych analogów okazały się odporne na hydrolizę chemiczną (RPMI). Znaczące różnice w stabilności tych związków zaobserwowałam dopiero w układzie RPMI/FBS (9:1, v/v). Wszystkie pochodne tlenowe 5'-difosforanów wykazywały podobne czasy połowicznego rozkładu (w zakresie od 2 h do 9 h), natomiast duże różnice zanotowałam dla związków zawierających heteroatom w pozycji P_{α} i P_{β} . Zaobserwowałam generalną tendencję wzmożonej trwałości wiązania pirofosforanowego dla związków, w których siarka lub selen znajdowały się w pozycji α (stabilne nawet po 7 dniach inkubacji), w przeciwieństwie do analogów zawierających heteroatom w pozycji β , których trwałość była zbliżona do analogów tlenowych difosforanów.

Otrzymane wyniki aktywności w połączeniu z przeprowadzonymi badaniami trwałości pozwoliły na próbę korelacji ich struktury z możliwymi mechanizmami molekularnymi działania tych związków. Badane związki mogą działać w zasadzie według trzech mechanizmów: pronukleozydowego (generowanie AZT), pronukleotydowego (generowanie AZTMP lub AZTDP) lub bezpośredniej inhibicji odwrotnej transkryptazy przez niezmieniony związek. Patrząc na ścieżki rozpadu wybranych 5'-difosforanów nie możemy zakładać jednego mechanizmu ich działania w komórce. Można przypuszczać, że dla związków z krótkim czasem połowicznego rozkładu w RPMI/FBS (kilka godzin), najbardziej prawdopodobny mechanizm działania to mechanizm pronukleozydowy lub pronukleotydowy. Wyniki eksperymentów z użyciem difosforanów ddU wskazują, że

udział tego ostatniego, może być znaczny. Dla hydrolytycznie trwałych związków ($t_{1/2}$ kilka dni w RPMI/FBS), nie można wykluczyć inhibicji odwrotnej transkryptazy albo innego ważnego dla wirusa enzymu, jako mechanizmu działania.

Moje badania pokazały, że z punktu widzenia struktury, decydujący wpływ na wysoką aktywność anty-HIV 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów ma obecność heteroatomu (siarki lub selenu) w części pirofosforanowej oraz obecność ładunku ujemnego na reszcie fosforanowej P_{α} . W tym kontekście wpływ grup maskujących funkcję fosforanową P_{β} jest z reguły mały, chyba, że grupa taka wprowadza znaczną zawadę przestrzenną. Obecność heteroatomu w pozycji niemostkowej funkcji fosforanowej P_{α} zwiększa odporność difosforanów nukleozydów na hydrolizę enzymatyczną, natomiast związki posiadające heterotom w pozycji P_{β} , mają zwykle czasy połowicznego rozkładu w RPMI/FBS porównywalne do okso-difosforanów. Powyższe obserwacje mogą być użyteczne przy projektowaniu nowych leków anty-HIV w oparciu o 5'-difosforany 2',3'-dideoksynukleozydów.

Na koniec pragnę podkreślić, że reakcja oksydatywnej kondensacji H-fosfonianomonoestrów z P(V) nukleofilami stanowi szczególnie użyteczne narzędzie w syntezie 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów. Opracowana metoda zapewniła wydajne otrzymywanie różnorodnych strukturalnie pochodnych, co po wykonaniu badań biologicznych i trwałości pozwoliło na wyselekcjonowanie związków o największym potencjale terapeutycznym. Związki te stanowią obiecującą grupę kandydatów na nowe leki anty-HIV w terapii AIDS.

VII. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. Informacje ogólne

1.1. Odczynniki chemiczne i rozpuszczalniki

Rozpuszczalniki do chromatografii kolumnowej o czystości cz.d.a. zakupiono w POCh lub ChemPur: acetonitryl, 2-propanol, chlorek metylenu, metanol, toluen, trietyloamina. Rozpuszczalniki niezbędne do przeprowadzenia syntez (chlorek metylenu, acetonitryl, pirydyna, trietyloamina) suszono, a zawartość wody mierzono na kulometrze Titroline[®] 7500KF, uznając jako suche rozpuszczalniki zawierające poniżej 20 ppm wody. Pirydyna osuszana była przez destylację z nad P₂O₅ i przechowywana nad sitami molekularnymi 4 Å. Acetonitryl i chlorek metylenu były przechowywane nad sitami molekularnymi 4 Å. Trietyloamina była osuszana przez destylację z nad wodoru wapnia i przechowywana nad tym reagentem. Większość odczynników niezbędnych do syntez [kwas fosfonowy, kwas fosfinowy, kwas fosforowy, (9H-fluoren-9-yl)metanol, H-fosfonian difenylowy (DPHP), jod, etanotiol, chlorek piwaloilu] zakupiono w Sigma-Aldrich[®] (Merck) lub Fluka i użyto bez dodatkowego oczyszczania, za wyjątkiem chlorku trimetylosililu (TMSCl), który destylowano przed użyciem. Nukleozydy (T, G, A, C, U, dG, dA, dC, AZT, d4T) zakupiono w ChemGenes lub Carbosynth, natomiast ddU zsyntetyzowano w Zespole prof. dr hab. J. Boryskiego (IChB PAN). Medium hodowlane komórek (RPMI-1640) oraz surowicę płodów bydłych (FBS) zakupiono w Sigma-Aldrich[®] (Merck). Bufory do HPLC sporządzano z odczynników o czystości HPLC firmy Sigma-Aldrich[®] (Merck) i filtrowano pod zmniejszonym ciśnieniem na sączkach 0,45 µm (bufor A) lub teflonowych 10 µm x 47 mm (bufor B).

1.2. Techniki analityczne i preparatywne

1.2.1. Chromatografia kolumnowa i cienkowarstwowa (TLC)

Chromatografię cienkowarstwową przeprowadzano na płytkach z żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄ (Merck) stosując następujące fazy rozwijające [v/v]: A – chlorek metylenu : metanol (90:10); B – acetonitryl : woda : trietyloamina (85:10:5); C – 2-propanol : woda : trietyloamina (70:20:10). Do chromatografii kolumnowej używano żelu krzemionkowego Merck 60 (0,063-0,200 mm). Rozpuszczalniki odparowywano na próżniowej wyparce rotacyjnej stosując łaźnię wodną o temperaturze 40°C.

1.2.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (RP-HPLC)

Analizy HPLC wykonywano na aparacie Waters 2487, stosując kolumnę Lichrospher RP18-5 (25cm x 4.6mm, 5 μ m), przy przepływie 1 ml/min o temperaturze kolumny 37°C, z detekcją UV przy 254 nm. Stosowano elucję gradientową dwóch rozpuszczalników: Bufor A – 0,01 M octan trietyloamoniowy pH 7,4 i bufor B – bufor A : acetonitryl, 1:4 (v/v). Do analizy poszczególnych difosforanów wykorzystano program 35-minutowy: 0-3 min: 5% \rightarrow 10% bufor B; 3-6 min: 10% bufor B; 6-13 min: 10% \rightarrow 30% bufor B; 13-17 min: 30% \rightarrow 90% bufor B; 17-30 min: 90% bufor B; 30-33 min: 90% \rightarrow 5% bufor B; 33-35 min: 5% bufor B.

1.2.3. Parametry farmakokinetyczne

W celu wyznaczenia wybranych parametrów farmakokinetycznych (masy molowej, lipofilowości, liczby miejsc akceptorowych i donorowych dla wiązania wodorowego oraz topologicznej powierzchni polarnej) korzystano z serwera Molinspiration LogP.

1.3. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Otrzymane 5'-difosforany nukleozydów scharakteryzowano za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego. Standardowy zestaw eksperymentów NMR obejmował widma ^1H , ^{13}C , ^{31}P (widma rozprężone od ^1H). „*” Oznacza przypadek, gdy nie było możliwe jednoznaczne przypisanie sygnałów do konkretnych atomów fosforu. Sygnały w ^1H i ^{13}C NMR przypisano na podstawie znanych i oczekiwanych przesunięć chemicznych dla 2',3'-dideoksynukleozydów (widma 2D COSY i HSQC). W widmach ^1H oraz ^{13}C NMR związków zawierających stereogeniczne centrum na atomie fosforu obserwowano wielokrotność niektórych sygnałów ze względu na występowanie P-diastereoizomerów. Pomiarów wykonywano w temperaturze 25°C korzystając ze spektrometrów: (i) Bruker Avance II 400 zaopatrzonego w sondę o częstotliwości rezonansowej 400,1 MHz (^1H NMR), 162 MHz (^{31}P NMR) i 100,6 MHz (^{13}C NMR); (ii) Bruker Avance III 500 zaopatrzonego w sondę o częstotliwości rezonansowej 500,3 MHz (^1H NMR), 202,5 MHz (^{31}P NMR) i 125,8 MHz (^{13}C NMR); (iii) Bruker Avance III 700 zaopatrzonego w sondę o częstotliwości rezonansowej 700,5 MHz (^1H NMR), 283,6 MHz (^{31}P NMR) i 176,1 MHz (^{13}C NMR) lub (iv) Varian Unity 300 zaopatrzonego

w sondę o częstotliwości rezonansowej 299,9 MHz (^1H NMR) i 121,4 MHz (^{31}P NMR) i 75,5 MHz (^{13}C NMR).

Próbki do charakterystyki spektralnej przygotowywano przez rozpuszczenie związku w 600 μL deuterowanego rozpuszczalnika (D_2O , CDCl_3 lub MeOD-d_4), w probówce o średnicy 5 mm. Podczas rejestrowania widm ^{31}P NMR stosowano wzorzec zewnętrzny 2% H_3PO_4 w D_2O . Sygnał FID opracowywano za pomocą oprogramowanie TopSpin 3.0.

Wysokorozdzielcze widma masowe (HRMS) zarejestrowano za pomocą techniki ESI (ang. *Electrospray Ionization*) z dokładnością do 5 ppm w trybie analizy jonów ujemnych na spektrometrze Thermo Fisher Scientific Q-Exactive Orbitrap firmy Bruker.

2. Syntezy chemiczne

2.1. Synteza związków wyjściowych

Syntezy związków wyjściowych przeprowadzone zostały według zmodyfikowanych procedur literaturowych.¹³⁸⁻¹³⁹

2.1.1. *Ogólna procedura otrzymywania 5'-H-fosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów AZT, ddU i d4T*

Sól amoniową H-fosfonianu (9H-fluoren-9-ylo)metylu (10 mmoli) rozpuszczono w mieszaninie Py:TEA (4:1, v/v) i roztwór odparowano do sucha na wyparce próżniowej. Do kolby dodano odpowiedni 2',3'-dideoksynukleozyd (1,1 ekw.), rozpuszczono w bezwodnej pirydynie, odparowano i suszono na pompie próżniowej przez noc. Tak przygotowane reagenty rozpuszczono w 100 mL mieszaniny DCM:Py (95:5, v/v) i dodano chlorku piwaloilu (1,5 ekw.). Po upływie ok. godziny kondensacja była zakończona (kontrola ^{31}P NMR). Mieszaninę reakcyjną rocieńczono 100 mL DCM i przemyto trzykrotnie solanką. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym siarczanem(VI) magnezu i odparowano. Następnie całość rozpuszczono w mieszaninie ACN:TEA (2:1, v/v, 60mL) i mieszano przez 20 minut. Po zakończeniu reakcji (kontrola ^{31}P NMR) rozpuszczalnik odparowano. Produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelalem krzemionkowym, stosując gradient MeOH (0-35%) w DCM. Wydajność izolacji H-fosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów wynosiła 87-91%.

2.1.2. *Ogólna procedura otrzymywania 5'-H-seleno/tiofosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów AZT, ddU i d4T*

Sól trietyloamoniową kwasu fosfinowego (15 mmoli) i odpowiedni 2',3'-dideoksynukleozyd (1,5 ekw.), suszono poprzez dwukrotne odparowanie dodanej bezwodnej pirydyny i pozostawiono na pompie próżniowej przez noc. Tak przygotowane reagenty rozpuszczono w 100 mL mieszaniny DCM:Py (98:2, v/v) i dodano chlorku piwaloilu (1,3 ekw.). Po upływie około godziny kondensacja była zakończona (kontrola ^{31}P NMR). Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 3 ekw. elementarnej siarki lub

seleniu (uprzednio suszonych poprzez odparowanie z bezwodną pirydyną) oraz 5 ekw. TEA. Po zakończeniu reakcji (ok. 1 h, kontrola ^{31}P NMR) rozpuszczalnik odparowano. Produkt oczyszczano na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelami krzemionkowym, stosując gradient MeOH (0-20%) w DCM. Wydajność otrzymanych H-tio- lub H-selenofosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów wynosiła 81-95%.

2.2. Ogólna procedura otrzymywania 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu A-D

H-Fosfonianomonoester 2',3'-dideoksynukleozydu (0,5 mmol, 1 ekw.) oraz odpowiedni fosforan (2 ekw.) osuszono oddzielnie poprzez dwukrotne odparowanie z bezwodnej pirydyny i pozostawiono na pompie olejowej przez noc. Tak przygotowany H-fosfonian rozpuszczono następnie w bezwodnej pirydynie (ok. 10 mL) i dodano TMSCl (2 ekw.). Przebieg wszystkich etapów kontrolowano za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR. Po wygenerowaniu bissililowanego fosforynotriestru (ok. 1 min.) utleniano go elementarnym jodem (1,5 ekw.), a do utworzonego *in situ* pirydyniofosforanu (<5 min.) dodawano przygotowany wcześniej fosforan rozpuszczony w bezwodnej pirydynie. W celu otrzymywania związków typu **B** wyjątkowo stosowano 1,2 ekw. nadmiaru TMSCl i 1,1 ekw. jodu. Natomiast do otrzymania pochodnych typu **D** stosowano 10 ekw. nadmiaru kwasu fosforowego, rozpuszczonego w bezwodnym DMF. Po zakończeniu reakcji do układu dodano wody (ok. 2 mL) oraz etanotolu (ok. 100 μL). Następnie rozpuszczalnik odparowano, a oleistą pozostałość rozpuszczano w acetonitrylu i oczyszczano na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelami krzemionkowym. Jako układ eluujący wykorzystano mieszaninę acetonitryl : woda : trietyloamina (85:10:5, v/v/v). Dla pochodnych typu **D** stosowano dodatkowe oczyszczanie na żelu krzemionkowym w układzie 2-propanol : woda : trietyloamina (70:20:10, v/v).

2.3. Ogólna procedura otrzymywania 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów zawierających wiązanie P-N (związki typu N)

1,2,4-Triazol (30 mmoli, 3 ekw.) oraz 4-aminopirydynę (10 mmoli, 1 ekw.) w osobnych kolbach osuszano poprzez dwukrotne odparowanie z bezwodnego dioksanu oraz suszenie przez noc na pompie próżniowej. Następnie 1,2,4-triazol rozpuszczono w bezwodnym dioksanie (ok. 100 mL), dodano POCl_3 (10 mmoli, 1 ekw.) i mieszaninę pozostawiono mieszając na mieszadle magnetycznym przez około 20 minut. Po tym czasie stopniowo dodawano roztwór trietyloaminy (30 mmoli, 3 ekw.), a po upływie około 40 minut mieszaninę przesączono. Produkt – tritriazolid fosforylu znajdował się w przesączu. Tak przygotowany odczynnik fosforylujący zmieszano z uprzednio przygotowaną 4-aminopirydyną (10 mmoli, 1 ekw.) i pozostawiono na noc, ciągle mieszając. Następnie zdekantowano roztwór z nad osadu i przemywano go bezwodnym eterem etylowym. Czynność dekantacji powtarzano aż uzyskano kremowy osad. Resztki eteru odparowano na wyparce rotacyjnej, a otrzymany związek (czynnik fosforylujący podstawiony grupą 4-aminopirydynylową) suszono na pompie próżniowej.

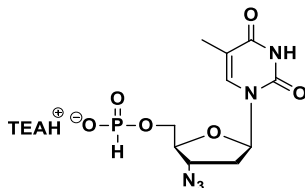
W celu otrzymania 5'-difosforanu nukleozydu, zmieszano uprzednio przygotowany czynnik fosforylujący (0,5 mmola) z 1 ekw. soli trietyloamoniowej odpowiedniego 5'-fosforanu 2',3'-dideoksynukleozydu (suszonego poprzez dwukrotne odparowanie z bezwodnej pirydyny). Reakcja prowadzona była w pirydynie (ok. 10 mL), a jej postęp

kontrolowano za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR. W celu wygaszenia reakcji do układu dodawano wody (2 mL) i całość odparowywano. Tak otrzymaną mieszaninę oczyszczano na kolumnie chromatograficznej wypełnionej żelalem krzemionkowym a jako układ eluujący wykorzystano mieszaninę acetonitrylu : woda : trietyloamina (85:10:5, v/v/v).

3. Charakterystyka spektralna

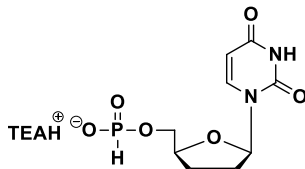
3.1. Charakterystyka spektralna związków wyjściowych

5'-H-fosfonianomonoester 3'-azydo-3'-deoksytymidyny (HPAZT), sól trietyloamoniowa



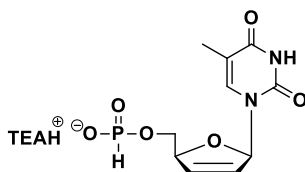
^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.3 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 9H), 1.94 (s, 3H), 2.53 (m, 2H), 3.22 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.31$ Hz, 6H), 4.12 (m, 2H), 4.21 (m, 1H), 4.52 (br, 1H), 6.28 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 1H), 6.81 (d, $^1J_{\text{P,H}} = 638$ Hz, 1H), 7.72 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.21, 11.59, 36.25, 46.66, 60.47, 63.02, 82.93, 84.93, 111.62, 137.21, 151.61, 166.48. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) 6.36 (dt, $^1J_{\text{P,H}} = 638$ Hz, 1P). HRMS ESI(-): m/z 330.0610 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$ [M-H] $^-$: 330.0603). Wydajność: 90%.

5'-H-fosfonianomonoester 2',3'-dideoksyurydyny (HPddU), sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.28 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 9H), 1.92-2.0 (m, 1H), 2.02-2.11 (m, 2H), 2.42-2.52 (m, 1H), 3.2 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 6H), 3.97-4.03 (m, 1H), 4.13-4.18 (m, 1H), 4.36 (br, 1H), 5.88 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.12$ Hz, 1H), 6.11 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$ Hz, 1H), 6.76 (d, $^1J_{\text{P,H}} = 639$ Hz, 1H), 7.95 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.12$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.23, 24.77, 31.21, 46.64, 64.33, 80.49, 86.41, 101.71, 142.09, 151.59, 166.31. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) 6.58 (dt, $^1J_{\text{P,H}} = 639$ Hz, 1P). HRMS ESI(-): m/z 275.0440 (obliczone dla $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}^-$ [M-H] $^-$: 275.0433). Wydajność: 87%.

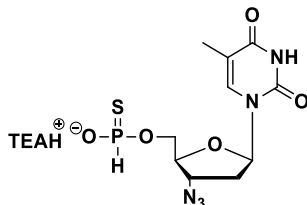
5'-H-fosfonianomonoester 2',3'-didehydro-3'-deoksytymidyny (HPd4T), sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 9H), 1.89 (s, 1H), 3.21 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 6H), 4.06-4.09 (m, 2H), 5.09 (br, 1H), 5.96-6.00 (br, 1H), 6.48-6.51 (br, 1H), 6.69 (d, $^1J_{\text{P,H}} = 638$ Hz, 1H), 6.95 (br, 1H), 7.59 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.22,

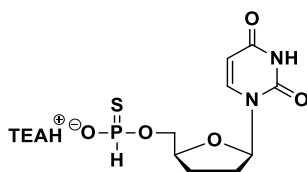
11.46, 46.63, 63.92, 85.87, 89.99, 111.14, 125.39, 134.27, 138.19, 152.16, 166.57. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 6.22 (dt, $^1J_{P,H} = 638$ Hz, 1P). HRMS ESI(-): m/z 287.0440 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 287.0433). Wydajność: 91%.

5'-H-tiofosfonianomonoester 3'-azydo-3'-deoksytymidyny [HP(S)AZT], sól trietyloamoniowa



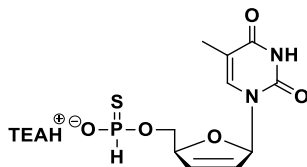
^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.32 (t, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 9H), 1.96 & 1.97 (2s, 3H), 2.53 (m, 2H), 3.24 (q, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 6H), 4.23 (m, 3H), 4.55 (m, 1H), 6.27 (t, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.96 (dd, $^1J_{P,H} = 591$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.32, 11.82, 36.48, 46.69, 60.64, 63.84, 82.98, 84.95, 111.52, 137.2, 151.43, 166.24. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 55.16 & 55.24 (2dm, $^1J_{P,H} = 590$ Hz, 1P). HRMS ESI(-): m/z 346.0381 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_5\text{PS}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 346.0375). Wydajność: 90%.

5'-H-tiofosfonianomonoester ddU [HP(S)ddU], sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.31 (t, $^3J_{H,H} = 7.30$ Hz, 9H), 1.94-2.06 (m, 1H), 2.11-2.25 (m, 2H), 2.43-2.55 (m, 1H), 3.23 (q, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 6H), 4.01-4.15 (m, 1H), 4.18-4.31 (m, 1H), 4.4 (br, 1H), 5.91 (d, $^3J_{H,H} = 8.08$ Hz, 1H), 6.14 (br, 1H), 7.91 (d, $^1J_{P,H} = 591$ Hz, 1H), 8.04 (m, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.28, 24.81, 24.83, 31.34, 46.68, 65.13, 65.19, 80.45, 80.52, 86.52, 101.67, 101.72, 142.33, 142.36, 151.61, 166.35. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 55.35 (dt, $^1J_{P,H} = 592$ Hz, 1P), 55.15 (dt, $^1J_{P,H} = 592$ Hz, 1P). HRMS ESI(-): m/z 291.0212 (obliczone dla $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5\text{PS}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 291.0205). Wydajność: 84%.

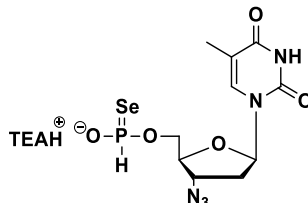
5'-H-tiofosfonianomonoester 2',3'-didehydro-3'-deoksytymidyny [HP(S)d4T], sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.34 (t, $^3J_{H,H} = 7.38$ Hz, 9H), 1.95 (s, 3H), 3.26 (q, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 6H), 4.08-4.26 (m, 2H), 5.16 (br, 1H), 6.03-6.07 (br, 1H), 6.53-6.57 (br, 1H), 6.97 (br, 1H), 7.64 (br, 1H), 7.86 (d, $^1J_{P,H} = 589$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.45, 11.79, 11.88, 46.77, 64.59, 64.66, 85.79, 85.87, 90.09, 90.13, 110.99, 111.04, 125.51, 125.52, 134.50, 138.37, 138.39, 152.08, 166.43. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm)

54.81 & 54.66 (dm, $^1J_{P,H} = 589$ Hz, 1P). **HRMS ESI(-):** m/z 303.0214 (obliczone dla $C_{10}H_{12}N_2O_5PS^-$ [M-H] $^-$ 303.0205). Wydajność: 81%.

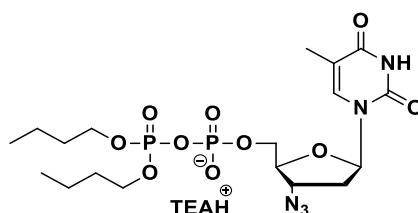
5'-H-selenofosfonianomonoester 3'-azydo-3'-deoksytymidyny [HP(Se)AZT], sól trietyloamoniowa



1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.32 (t, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 9H), 1.97 & 1.98 (2s, 3H), 2.54 (m, 2H), 3.24 (q, $^3J_{H,H} = 7.31$ Hz, 6H), 4.13-4.34 (br, 3H), 4.56 (m, 1H), 6.27 (t, $^1J_{P,H} = 6.54$ Hz, 1H), 7.05 (dd, $^1J_{P,H} = 578$ Hz), 7.76 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.32, 11.85, 11.89, 36.42, 46.73, 60.59, 60.64, 64.21, 82.81, 82.86, 85.01, 111.57, 137.23, 151.51, 166.36. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 48.09 (dt, $^1J_{P,H} = 577.37$ Hz, 1P). **HRMS ESI(-):** m/z 393.9825 (obliczone dla $C_{10}H_{13}N_5O_5PSe^-$ [M-H] $^-$ 393.9819). Wydajność: 95%.

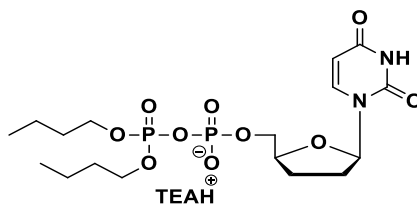
3.2. Charakterystyka spektralna pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu A

Związek A1, sól trietyloamoniowa



1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 0.96 (m, 6H), 1.33 (t, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 9H), 1.44 (m, 4H), 1.7 (m, 4H), 1.99 (s, 3H), 2.57 (m, 2H), 3.26 (q, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 6H), 4.22 (m, 5H), 4.32 (m, 2H), 4.56 (m, 1H), 6.33 (t, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, 1H), 7.77 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.28, 11.67, 12.79, 18.11, 31.51, 36.45, 46.69, 60.29, 65.83, 69.23, 82.73, 84.84, 111.66, 137.38, 151.56, 166.41. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) -12.8 (d, $^2J_{P,P} = 19.95$ Hz, P_α), -13.22 (d, $^2J_{P,P} = 19.91$ Hz, P_β). **HRMS ESI(-):** m/z 538.1472 (obliczone dla $C_{18}H_{30}N_5O_{10}P_2^-$ [M-H] $^-$ 538.14734). Wydajność: 65%.

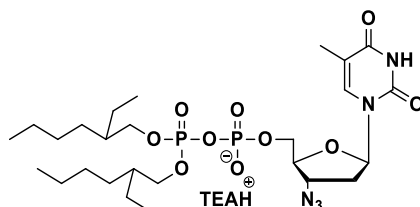
Związek A2, sól trietyloamoniowa



1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 0.96 (t, $^3J_{H,H} = 7.42$ Hz, 6H), 1.34 (t, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 9H), 1.44 (m, 4H), 1.73 (m, 4H), 2.21 (m, 2H), 2.53 (m, 2H), 3.26 (q, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 6H), 4.22 (m, 4H), 4.34 (m, 2H), 4.44 (m, 1H), 5.97 (d, $^3J_{H,H} = 8.08$ Hz, 1H), 6.18 (dd, $^3J_{H,H} = 6.97$ Hz, 1H), 8.03 (d, $^3J_{H,H}$

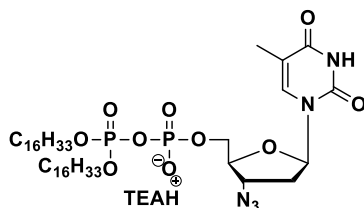
= 8.08 Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_c (ppm) 8.24, 12.77, 18.09, 24.57, 31.36, 31.49, 46.70, 67.12, 69.28, 80.26, 86.45, 101.83, 142.18, 151.63, 166.39. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_p (ppm) -11.72 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.81$ Hz, P_α), -11.85 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.74$ Hz, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 483.1304 (obliczone dla $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 483.129749). Wydajność: 53%.

Związek A3, sól trietyloamoniowa



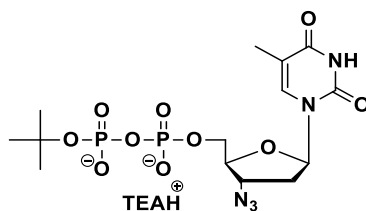
$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ_H (ppm) 0.63 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.18$ Hz, 12H), 1.02 (m, 16H), 1.16 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 9H), 1.31 (m, 2H), 1.7 (s, 3H), 2.13 (m, 2H), 2.92 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$, 6H), 3.77 (m, 5H), 3.97 (m, 2H), 4.28 (m, 1H), 6.03 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.68$ Hz, 1H), 7.51 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ_c (ppm) 8.57, 10.66, 12.18, 13.82, 22.73, 22.92, 28.63, 29.6, 37.14, 39.79, 45.86, 60.86, 65.46, 70.02, 83.01, 84.32, 111.07, 135.9, 150.29, 163.74. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, CDCl_3 , H_3PO_4 , 25°C): δ_p (ppm) -11.2 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 16.04$ Hz, P_α), -12.06 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 15.97$ Hz, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 650.2711 (obliczone dla $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 650.2725). Wydajność: 62%.

Związek A4, sól trietyloamoniowa



$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, MeOD-d_4 , 25°C): δ_H (ppm) 2.27 (br, 3H), 2.59 (br, 56H), 2.78 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 9H), 3.01 (br, 2H), 3.24 (s, 3H), 3.35 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.33$, 6H), 4.52 (br, 4H), 5.35-5.60 (br, 4H), 5.79 (br, 1H), 7.55 (br, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, MeOD-d_4 , 25°C): δ_c (ppm) 9.26, 12.49, 14.49, 23.75, 26.67, 30.31, 30.82, 33.09, 38.07, 38.13, 48.39, 62.20, 62.51, 66.65, 67.17, 69.67, 84.26, 84.35, 85.86, 86.06, 112.09, 112.22, 137.64, 137.79, 152.34, 166.38. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, MeOD-d_4 , H_3PO_4 , 25°C): δ_p (ppm) -11.62 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.79$ Hz, P_α), -11.77 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.5$ Hz, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 874.5294 (obliczone dla $\text{C}_{42}\text{H}_{78}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 874.5224). Wydajność: 34%.

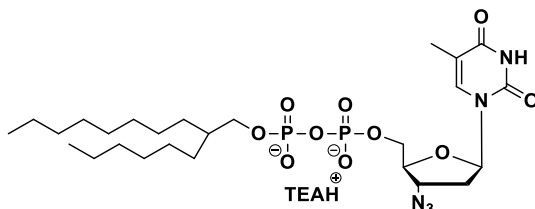
Związek A5, sól trietyloamoniowa



$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.19 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.00$ Hz, 9H), 1.33 (s, 9H), 1.84 (s, 3H), 2.42 (m, 2H), 3.11 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 6.98$, 6H), 4.11 (m, 3H), 4.46 (m, 1H), 6.17 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.68$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_c (ppm) 8.22, 11.69, 29.17, 36.17, 46.62, 60.81, 65.49,

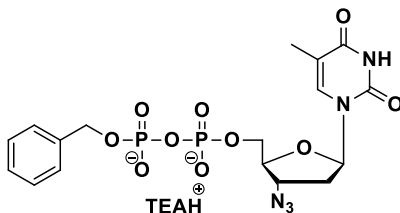
80.20, 82.96, 84.90, 111.72, 137.39, 151.59, 166.45. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3 , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) -12.18 (br, P_α), -15.21 (br, P_β). HRMS ESI(-): m/z 482.0837 (obliczone dla $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 482.0842). Wydajność: 36%.

Związek A6, sól trietyloamoniowa



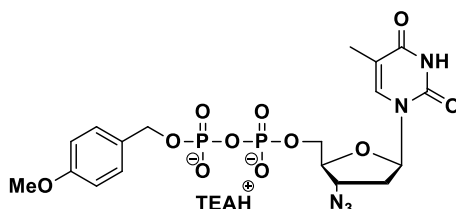
^1H NMR (400,1 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ_H (ppm) 0.87 (m, 6H), 1.24 (br, 24H), 1.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.8$ Hz, 9H), 1.56 (br, 1H), 1.97 (s, 3H), 2.32 (m, 1H), 2.43 (m, 1H), 3.15 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$, 6H), 3.83 (m, 2H), 4.04 (m, 1H), 4.25 (m, 2H), 4.60 (br, 1H), 6.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.60$ Hz, 1H), 7.82 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ_C (ppm) 6.02, 9.84, 11.58, 20.15, 24.16, 24.22, 26.84, 27.12, 27.24, 27.60, 28.24, 29.36, 34.78, 36.31, 43.11, 48.13, 50.90, 55.18, 58.83, 62.91, 66.58, 80.92, 82.07, 108.75, 133.92, 147.81, 161.19. ^{31}P NMR* (162 MHz, CDCl_3 , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) -10.3 (br, 1P), -11.42 (br, 1P). HRMS ESI(-): m/z 650.2708 (obliczone dla $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 650.2720). Wydajność: 29%.

Związek A7, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.31 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.18$ Hz, 9H), 1.85 (s, 3H), 2.42 (m, 2H), 3.22 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.12$ Hz, 6H), 4.19 (m, 2H), 4.26 (m, 1H), 4.48 (m, 1H), 4.99 (m, 2H), 6.23 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.23$ Hz, 1H), 7.42 (m, 5H), 7.62 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 10.79, 14.22, 38.91, 49.24, 63.00, 68.00, 70.29, 85.47, 87.24, 114.17, 129.84, 130.30, 130.66, 131.02, 139.73, 154.01, 168.78. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) -11.19 (br d, P_α), -11.58 (br d, P_β). HRMS ESI(-): m/z 516.0697 (obliczone dla $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 516.0685). Wydajność: 37%.

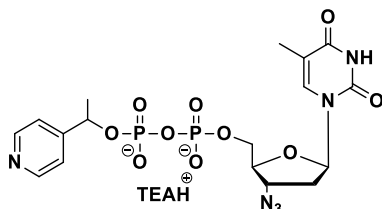
Związek A8, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.38$ Hz, 9H), 1.93 (s, 3H), 2.31 (m, 1H), 2.48 (m, 1H), 3.22 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.39$ Hz, 6H), 3.83 (s, 3H), 4.24 (m, 3H), 4.52 (m, 1H), 4.93 (m, 2H), 6.23 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.23$ Hz, 1H), 7.16 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.42$ Hz, 1H), 7.28 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.72$ Hz, 1H), 7.69 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.24, 11.73, 36.28, 46.66, 60.35, 60.50, 65.44, 67.65,

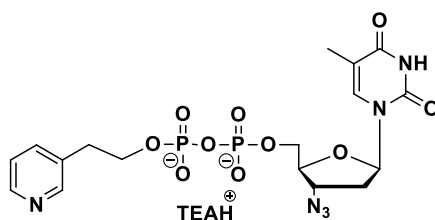
82.94, 84.71, 111.57, 111.76, 127.57, 128.92, 137.37, 151.67, 166.33, 166.61. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) -11.18 (br d, P_α), -11.59 (br d, P_β). HRMS ESI(-): m/z 546.0798 (obliczone dla $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}_2^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 546.0791). Wydajność: 41%.

Związek A9, sól trietyloamoniowa



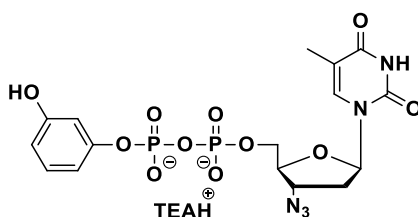
^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 9H), 1.58 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.56$ Hz, 3H), 1.85 (s, 3H), 2.41 (m, 2H), 3.22 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 6H), 4.04 (m, 1H), 4.14 (m, 1H), 4.39 (m, 1H), 5.42 (m, 1H), 6.23 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, 1H), 7.49 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 8.46 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.72$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.23, 11.71, 23.32, 36.39, 46.66, 60.48, 65.30, 73.27, 82.85, 84.81, 111.59, 121.05, 137.13, 148.61, 151.81, 153.34, 166.76. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) -11.75 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.21$ Hz, P_α), -12.08 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 17.28$ Hz, P_β). HRMS ESI(-): m/z 531.0806 (obliczone dla $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 531.0794). Wydajność: 35%.

Związek A10, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.30$ Hz, 9H), 1.84 (s, 3H), 2.44 (m, 2H), 3.00 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.64$ Hz, 2H), 3.21 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.31$ Hz, 6H), 4.16 (m, 5H), 4.48 (m, 1H), 6.23 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.68$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.79 (m, 1H), 8.37 (br, 1H), 8.42 (br, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.20, 11.60, 33.21, 36.30, 46.64, 60.32, 65.34, 66.15, 82.81, 84.68, 111.51, 124.05, 134.69, 137.13, 138.23, 146.38, 148.66, 151.42, 166.22. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) -11.28 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.78$ Hz, P_α), -11.72 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.83$ Hz, P_β). HRMS ESI(-): m/z 531.0789 (obliczone dla $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 531.0794). Wydajność: 34%.

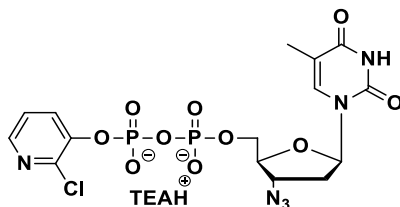
Związek A11, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.31 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 9H), 1.85 (s, 3H), 2.43 (m, 2H), 3.22 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 6H), 4.19 (m, 3H), 4.43 (m, 1H), 6.24 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.74$ Hz, 1H), 6.65 (dd,

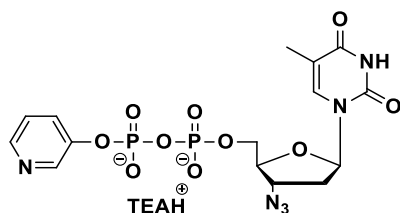
$^3J_{H,H} = 8.24$ Hz, 1H), 6.74 (br, 1H), 6.76 (dd, $^3J_{H,H} = 8.24$ Hz, 1H), 7.19 (t, $^3J_{H,H} = 8.16$ Hz, 1H), 7.63 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.21, 11.63, 36.38, 46.65, 60.56, 65.51, 82.91, 84.86, 107.39, 111.12, 111.61, 112.03, 130.24, 137.14, 151.57, 152.70, 156.48, 166.39. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) -11.74 (br d, P_α), -16.79 (br d, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 518.0492 (obliczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 518.0478). Wydajność: 46%.

Związek A12, sól trietyloamoniowa



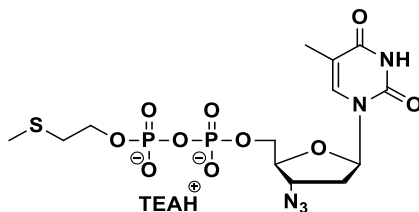
$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.31 (t, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 9H), 1.83 (s, 3H), 2.49 (m, 2H), 3.22 (q, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 6H), 4.20 (m, 2H), 4.29 (m, 1H), 4.53 (m, 1H), 6.25 (t, $^3J_{H,H} = 6.74$ Hz, 1H), 7.41 (dd, $^3J_{H,H} = 8.2$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.9 (d, $^3J_{H,H} = 8.16$ Hz, 1H), 8.12 (d, $^3J_{H,H} = 4.64$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.24, 11.59, 36.35, 46.69, 60.56, 65.58, 82.92, 84.86, 111.59, 124.15, 130.39, 137.23, 142.38, 143.82, 145.28, 151.53, 166.21. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) -11.66 (d, $^2J_{P,P} = 20.86$ Hz, P_α), -17.22 (d, $^2J_{P,P} = 20.23$ Hz, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 537.0110 (obliczone dla $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{ClO}_{10}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 537.0092). Wydajność: 39%.

Związek A13, sól trietyloamoniowa



$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.31 (t, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 9H), 1.84 (s, 3H), 2.47 (m, 2H), 3.23 (q, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 6H), 4.17 (m, 2H), 4.26 (m, 1H), 4.49 (m, 1H), 6.27 (t, $^3J_{H,H} = 6.76$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $^3J_{H,H} = 8.64$ Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.72 & 7.75 (m, 1H), 8.30 (br, 1H), 8.4 (br, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.22, 11.56, 36.33, 46.67, 60.54, 65.52, 82.88, 84.77, 111.56, 124.86, 128.95, 137.22, 141.12, 144.05, 149.1, 151.54, 166.29. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) -11.64 (d, $^2J_{P,P} = 20.88$ Hz, P_α), -16.52 (d, $^2J_{P,P} = 20.25$ Hz, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 503.0497 (obliczone dla $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_6\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 503.048145). Wydajność: 47%.

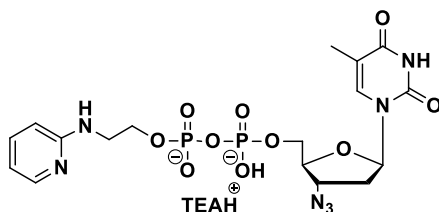
Związek A14, sól trietyloamoniowa



$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.32 (t, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 9H), 1.96 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.52 (m, 2H), 2.81 (t, $^3J_{H,H} = 6.62$ Hz, 2H), 3.24 (q, $^3J_{H,H} = 7.31$ Hz, 6H), 4.17 (m, 5H), 4.59 (m, 1H),

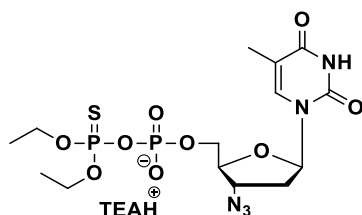
6.32 (t, $^3J_{H,H} = 6.76$ Hz, 1H), 7.79 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_c (ppm) 8.24, 11.69, 14.53, 33.41, 36.28, 46.67, 60.74, 64.86, 65.52, 82.93, 84.78, 111.81, 137.37, 151.67, 166.77. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_p (ppm) -11.40 (br d, P_α), -11.62 (br d, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 500.0423 (obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 500.0406). Wydajność: 30%.

Związek A15, sól trietyloamoniowa



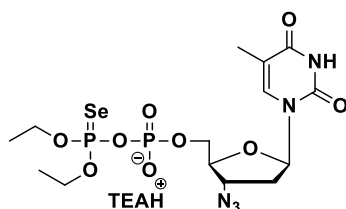
$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.32 (t, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 9H), 1.91 (s, 1H), 2.45 (m, 2H), 3.24 (q, $^3J_{H,H} = 7.31$ Hz, 6H), 3.57 (m, 2H), 4.22 (m, 5H), 4.53 (m, 1H), 6.22 (t, $^3J_{H,H} = 6.72$ Hz, 1H), 6.75 (m, 2H), 7.63 (t, $^3J_{H,H} = 7.5$ Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.88 (d, $^3J_{H,H} = 5.6$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (125.8 MHz, D_2O , 25°C): δ_c (ppm) 8.12, 11.59, 36.37, 41.95, 46.56, 60.39, 64.49, 65.38, 82.84, 84.68, 110.53, 111.49, 112.89, 136.97, 140.01, 142.19, 151.34, 156.29, 166.19. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_p (ppm) -11.40 (br d, P_α), -11.62 (br d, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 546.0912 (obliczone dla $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 546.0903). Wydajność: 31%.

Związek A16, sól trietyloamoniowa



$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.31 (t, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 9H), 1.36 (t, $^3J_{H,H} = 7.10$ Hz, 6H), 1.97 (s, 3H), 2.55 (m, 2H), 3.23 (q, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 6H), 4.25 (m, 7H), 4.57 (m, 1H), 6.29 (t, $^3J_{H,H} = 6.64$ Hz, 1H), 7.74 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_c (ppm) 8.23, 11.74, 15.12, 36.35, 46.69, 60.38, 65.77, 65.91, 82.78, 84.94, 111.64, 137.35, 151.61, 166.49. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_p (ppm) 54.50 (d, $^2J_{P,P} = 24.60$ Hz, P_β), -12.85 (d, $^2J_{P,P} = 24.34$ Hz, P_α). **HRMS ESI(-)**: m/z 498.0620 (obliczone dla $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 498.0614). Wydajność: 63%.

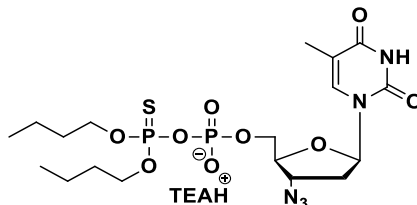
Związek A17, sól trietyloamoniowa



$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ_H (ppm) 1.09 (t, $^3J_{H,H} = 7.02$ Hz, 6H), 1.16 (t, $^3J_{H,H} = 7.30$ Hz, 9H), 1.71 (s, 3H), 2.14 (m, 2H), 3.96 (m, 7H), 4.32 (m, 1H), 6.04 (t, $^3J_{H,H} = 6.6$ Hz, 1H), 7.47 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ_c (ppm) 8.59, 12.31, 15.57, 37.19, 45.86, 60.97, 64.96, 65.52,

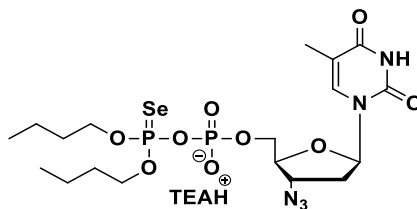
82.99, 84.30, 111.03, 135.76, 150.29, 163.77. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 54.46 (d, $^2J_{P,P} = 26.14$ Hz, P_β), -13.48 (d, $^2J_{P,P} = 26.45$ Hz, P_α). HRMS ESI(-): m/z 546.0065 (obliczone dla $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2\text{Se}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 546.0058). Wydajność: 64%.

Związek A18, sól trietyloamoniowa



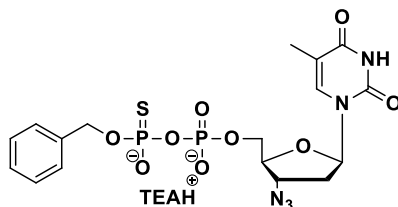
^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 0.94 (t, $^3J_{H,H} = 7.38$ Hz, 6H), 1.32 (t, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 9H), 1.41 (m, 4H), 1.69 (k, $^3J_{H,H} = 6.93$ Hz, 4H), 1.97 (s, 1H), 2.52 (m, 2H), 3.24 (q, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 6H), 4.22 (m, 7H), 4.58 (m, 1H), 6.30 (t, $^3J_{H,H} = 6.58$ Hz, 1H), 7.79 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.33, 11.86, 13.14, 18.43, 31.64, 36.76, 46.66, 60.47, 65.65, 68.98, 82.89, 84.79, 111.61, 137.19, 151.34, 166.20. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 53.75 (d, $^2J_{P,P} = 22.55$ Hz, P_β), -12.69 (d, $^2J_{P,P} = 22.40$ Hz, P_α). HRMS ESI(-): m/z 554.1233 (obliczone dla $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2\text{S}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 554.1239). Wydajność: 68%.

Związek A19, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 0.91 (t, $^3J_{H,H} = 7.38$ Hz, 6H), 1.29 (t, $^3J_{H,H} = 7.28$ Hz, 9H), 1.39 (m, 4H), 1.69 (k, $^3J_{H,H} = 6.57$ Hz, 4H), 1.95 (s, 1H), 2.49 (m, 2H), 3.21 (q, $^3J_{H,H} = 7.26$ Hz, 6H), 4.21 (m, 7H), 4.58 (m, 1H), 6.27 (t, $^3J_{H,H} = 6.42$ Hz, 1H), 7.76 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.28, 11.58, 13.14, 18.43, 31.52, 36.72, 46.64, 60.49, 65.68, 69.38, 82.86, 84.76, 111.51, 137.18, 151.27, 166.11. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 54.54 (d, $^2J_{P,P} = 27.02$ Hz, P_β), -13.05 (d, $^2J_{P,P} = 27.09$ Hz, P_α). HRMS ESI(-): m/z 602.0645 (obliczone dla $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2\text{Se}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 602.0684). Wydajność: 63%.

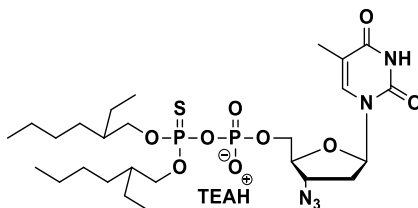
Związek A20, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.29 (t, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 9H), 1.84 (s, 6H), 2.40 (m, 4H), 3.21 (q, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 6H), 4.23 (m, 3H), 4.52 (m, 1H), 5.03 (m, 2H), 6.22 (t, $^3J_{H,H} = 6.76$ Hz, 2H), 7.29-7.45 (m, 5H), 7.64 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.22, 11.73, 36.39, 46.64, 60.48, 65.41, 67.96, 82.93, 84.65, 111.58, 127.41, 127.53, 128.01, 128.42, 137.19, 157.41,

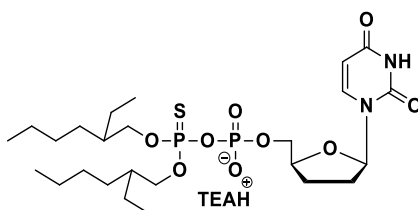
166.26. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 43.22 (br d, P_β), -12.54 (br d, P_α). HRMS ESI(-): m/z 532.0468 (obliczone dla $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2\text{S}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 532.0457). Wydajność: 41%.

Związek A22, sól trietyloamoniowa



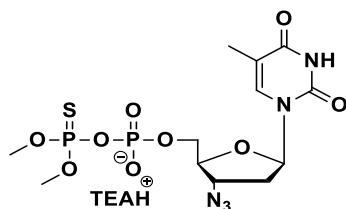
^1H NMR (400,1 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ_H (ppm) 0.72 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.92$ Hz, 12H), 1.11 (br, 16H), 1.22 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 9H), 1.4 (br, 2H), 1.79 (s, 3H), 2.21 (m, 2H), 2.98 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$, 6H), 3.87 (m, 6H), 4.09 (m, 1H), 4.4 (m, 1H), 6.15 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.40$ Hz, 1H), 7.59 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ_C (ppm) 8.58, 10.76, 12.37, 13.91, 22.82, 23.11, 28.72, 29.76, 37.31, 39.75, 45.83, 61.05, 65.50, 70.52, 83.15, 84.37, 111.16, 135.88, 150.54, 164.07. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 54.61 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.72$ Hz, P_β), -12.06 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20$ Hz, P_α). HRMS ESI(-): m/z 650.2711 (obliczone dla $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 650.2725). Wydajność: 63%.

Związek A23, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ_H (ppm) 0.84 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.36$ Hz, 12H), 1.25 (br, 16H), 1.34 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 9H), 1.52 (m, 2H), 2.01 (m, 2H), 2.32 (m, 2H), 3.09 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.27$, 6H), 3.98 (m, 4H), 4.1 (m, 1H), 4.25 (m, 2H), 5.69 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.12$ Hz, 1H), 7.98 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ_C (ppm) 8.59, 10.88, 14.02, 22.94, 23.22, 25.29, 28.85, 29.89, 32.66, 39.85, 45.79, 66.79, 70.59, 80.05, 86.31, 101.76, 140.93, 150.39, 163.48. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 54.37 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.83$ Hz, P_β), -12.56 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.52$ Hz, P_α). HRMS ESI(-): m/z 611.2345 (obliczone dla $\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2\text{S}^-$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 611.2321). Wydajność: 62%.

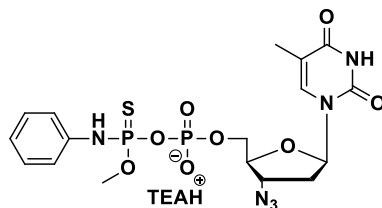
Związek A24, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.30 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 9H), 1.96 (s, 3H), 2.53 (m, 2H), 3.22 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 6H), 3.68 & 3.71 (2d, $^3J_{\text{H,H}} = 13.42$ Hz, 6H), 4.25 (m, 3H), 4.63 (m, 1H), 6.31 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.86$ Hz, 1H), 7.78 (s, 1H). ^{13}C NMR (125.8 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.21, 11.69, 36.29, 46.66, 53.26, 60.81, 60.84, 65.54, 82.98, 84.94, 111.78, 137.30, 151.74, 166.64. ^{31}P NMR (162

MHz, D₂O, H₃PO₄, 25°C): δ_P (ppm) 48.57 (br d, P _{β}), -11.72 (br d, P _{α}). **HRMS ESI(-)**: m/z 470.0308 (obliczone dla C₁₂H₁₈N₅O₉P₂S⁻ [M-H]⁻ 470.0301). Wydajność: 38%.

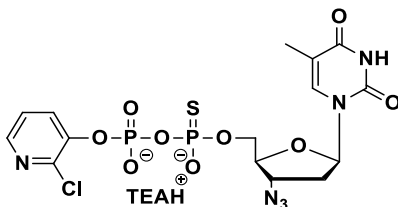
Związek A25, sól trietyloamoniowa



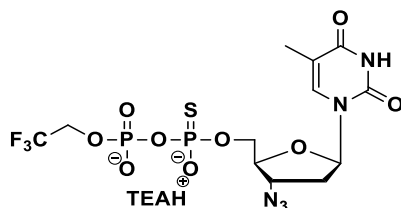
¹H NMR (400,1 MHz, D₂O, 25°C): δ_H (ppm) 1.31 (t, ³J_{H,H} = 7.34 Hz, 9H), 1.78 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 2.36-2.55 (m, 4H), 3.23 (q, ³J_{H,H} = 7.34 Hz, 6H), 3.78 (d, ³J_{H,H} = 14.6 Hz, 3H), 3.82 (d, ³J_{H,H} = 14.56 Hz, 3H), 4.1-4.34 (m, 6H), 4.42 (m, 1H), 4.51 (m, 1H), 6.2 (t, ³J_{H,H} = 6.56 Hz, 1H), 6.27 (t, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, 1H), 6.9-7.46 (m, 10H), 7.48 (s, 1H), 7.59 (s, 1H). **¹³C NMR** (100,6 MHz, D₂O, 25°C): δ_C (ppm) 8.27, 11.66, 11.72, 36.47, 36.63, 46.70, 53.49, 53.79, 60.28, 60.49, 65.51, 65.80, 82.77, 82.87, 84.39, 84.98, 111.40, 117.98, 118.54, 120.21, 129.28, 129.36, 137.02, 137.08, 139.19, 151.42, 151.42, 151.55, 166.15, 166.28. **³¹P NMR** (162 MHz, D₂O, H₃PO₄, 25°C): δ_P (ppm) 55.06 (d, ²J_{P,P} = 13.27 Hz, 1P _{β}), 54.92 (d, ²J_{P,P} = 13.01 Hz, 1P _{β}), -12.67 (br d, P _{α}). **HRMS ESI(-)**: m/z 531.0609 (obliczone dla C₁₇H₂₁N₆O₈P₂S⁻ [M-H]⁻ 531.0617). Wydajność: 35%.

3.3. Charakterystyka spektralna pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu B

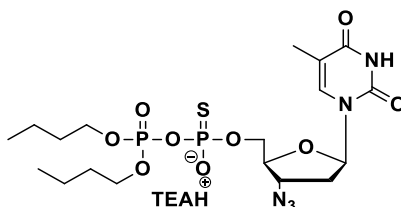
Związek B1, sól trietyloamoniowa



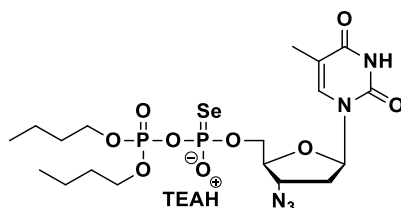
¹H NMR (400,1 MHz, D₂O, 25°C): δ_H (ppm) 1.31 (t, ³J_{H,H} = 7.34 Hz, 9H), 1.84 & 1.85 (2s, 3H), 2.50 (m, 2H), 3.24 (q, ³J_{H,H} = 7.32 Hz, 6H), 4.28 (m, 3H), 4.56 (m, 1H), 6.27 (t, ³J_{H,H} = 6.82 Hz, 1H), 7.41 (m, 1H), 7.69 & 7.71 (2s, 1H), 7.94 (m, 1H), 8.12 (m, 1H). **¹³C NMR** (125.8 MHz, D₂O, 25°C): δ_C (ppm) 7.77, 11.16, 11.19, 35.93, 46.20, 60.29, 60.42, 65.37, 82.40, 82.48, 84.36, 84.46, 111.14, 111.17, 123.59, 123.62, 129.82, 129.99, 136.70, 141.77, 141.91, 143.19, 143.31, 144.77, 144.83, 151.07, 165.71, 165.76. **³¹P NMR** (162 MHz, D₂O, H₃PO₄, 25°C): δ_P (ppm) 47.34 (br d, P _{α}), -18.45 (br d, P _{β}). **HRMS ESI(-)**: m/z 552.9889 (obliczone dla C₁₅H₁₆N₆ClO₉P₂S⁻ [M-H]⁻ 552.9863). Wydajność: 41%.

Związek B2, sól trietyloamoniowa

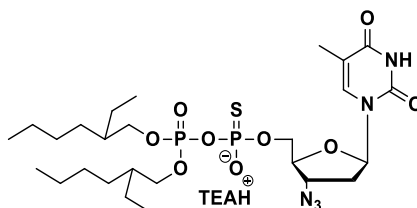
$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.32 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.28$ Hz, 9H), 1.99 (s, 3H), 2.55 (m, 2H), 3.24 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.31$ Hz, 6H), 4.28 (m, 3H), 4.43 (m, 2H), 4.62 (m, 1H), 6.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.82$ Hz, 1H), 7.82 (s, 1H). **$^{13}\text{C NMR}$** (125.8 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.21, 11.67, 36.24, 46.65, 60.73, 60.69, 62.69, 62.95, 65.66, 65.80, 82.82, 82.92, 84.83, 111.87, 122.29, 137.29, 151.73, 166.64. **$^{31}\text{P NMR}$** (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) 43.19 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 28$ Hz, P_α), -13.23 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 27$ Hz, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 524.0024 (obliczone dla $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 524.0018). Wydajność: 43%.

Związek B3, sól trietyloamoniowa

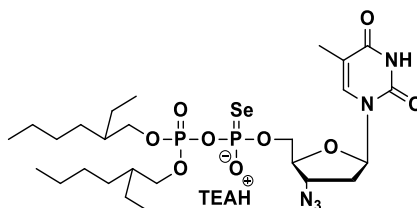
$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ_{H} (ppm) 0.88 (br, 6H), 1.28 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.30$ Hz, 9H), 1.36 (m, 4H), 1.62 (m, 4H), 1.88 (s, 3H), 2.41 (m, 2H), 3.14 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 6H), 4.05 (m, 3H), 4.24 (m, 4H), 4.52 (m, 1H), 6.1 (br, 1H), 7.59 (s, 1H). **$^{13}\text{C NMR}$** (100,6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ_{C} (ppm) 10.87, 12.26, 13.47, 18.53, 31.94, 37.01, 38.67, 60.81, 65.99, 68.52, 82.92, 86.23, 111.39, 137.29, 150.76, 164.56. **$^{31}\text{P NMR}$** (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) 46.68 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 24.81$ Hz, P_α) & 46.53 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 24.67$ Hz, P_α), -12.75 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 22.87$ Hz, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 554.1245 (obliczone dla $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 554.1239). Wydajność: 42%.

Związek B4, sól trietyloamoniowa

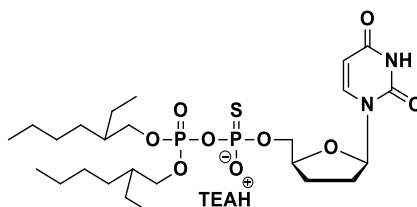
$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 0.98 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.38$ Hz, 6H), 1.37 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 9H), 1.49 (m, 4H), 1.76 (m, 4H), 2.05 (s, 3H), 2.60 (m, 2H), 3.30 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 6H), 4.26 (m, 4H), 4.36 (m, 3H), 4.62 (m, 1H), 6.37 (m, 1H), 7.84 (s, 1H). **$^{13}\text{C NMR}$** (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.84, 12.26, 13.26, 18.50, 31.82, 36.84, 47.14, 60.81, 66.56, 69.67, 82.85, 85.24, 112.00, 137.67, 151.77, 166.69. **$^{31}\text{P NMR}$** (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) 35.74 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 32.26$ Hz, P_α) & 35.54 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 33.06$ Hz, P_α), -13.38 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 3.86$ Hz, P_β) & -13.58 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 4.09$ Hz, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 602.0693 (obliczone dla $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2\text{Se}^-$ [M-H] $^-$ 602.0684). Wydajność: 59%.

Związek B5, sól trietyloamoniowa

¹H NMR (400,1 MHz, CDCl₃, 25°C): δ_H (ppm) 0.85 (br, 12H), 1.24 (br, 16H), 1.35 (t, 1.73, $^3J_{H,H} = 7.20$, 9H), 1.52 (br, 2H), 1.94 (br, 3H), 2.33 (m, 1H), 2.43 (m, 1H), 3.17 (br, 6H), 3.94 (m, 1H), 4.04 (m, 2H), 4.29 (m, 2H), 4.53 (br, 1H), 6.20 (t, $^3J_{H,H} = 6.44$ Hz, 1H), 7.69 (s, 1H). **¹³C NMR** (100,6 MHz, CDCl₃, 25°C): δ_C (ppm) 8.67, 10.82, 10.89, 12.37, 13.99, 14.01, 22.90, 22.93, 23.08, 23.19, 28.83, 29.76, 29.79, 37.38, 39.89, 39.98, 46.08, 60.81, 61.08, 65.83, 69.14, 69.19, 70.23, 70.50, 70.56, 83.07, 83.17, 85.17, 111.29, 136.53, 150.59, 150.65, 164.16, 164.20. **³¹P NMR** (162 MHz, CDCl₃, H₃PO₄, 25°C): δ_P (ppm) 47.18 (d, $^2J_{P,P} = 23.42$ Hz, P _{α}), 12.23 (d, $^2J_{P,P} = 22.66$ Hz, P _{β}) & 12.36 (d, $^2J_{P,P} = 20.34$ Hz, P _{β}). **HRMS ESI(-)**: m/z 666.2520 (obliczone dla C₂₆H₄₆N₅O₉P₂S⁻ [M-H]⁻ 666.2491). Wydajność: 57%.

Związek B6, sól trietyloamoniowa

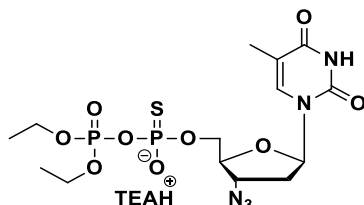
¹H NMR (400 MHz, MeOD-d₄, 25°C): δ_H (ppm) 1.05 (m, 12H), 1.48 (m, 16H), 1.73 (m, 2H), 2.04 (br, 3H), 2.11 (br, 3H), 2.52 (m, 1H), 2.62 (m, 1H), 3.39 (q, $^3J_{H,H} = 7.31$, 6H), 3.94 (m, 2H), 4.07 & 4.20 (2m, 2H), 4.27 (m, 2H), 4.43 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 6.32 (t, $^3J_{H,H} = 6.52$ Hz, 1H), 6.39 (t, $^3J_{H,H} = 4.52$ Hz, 1H), 7.94 (br, 1H), 7.95 (br, 1H). **¹³C NMR** (100,6 MHz, MeOD-d₄, 25°C): δ_C (ppm) 9.66, 11.58, 12.67, 14.58, 24.12, 24.49, 30.12, 31.16, 38.29, 41.41, 48.23, 61.87, 67.76, 72.02, 84.26, 86.14, 111.87, 138.34, 152.42, 166.47. **³¹P NMR** (162 MHz, MeOD-d₄, H₃PO₄, 25°C): δ_P (ppm) 39.61 (d, $^2J_{P,P} = 25.62$ Hz, P _{α}) & 39.12 (d, $^2J_{P,P} = 25.62$ Hz, P _{α}), -12.67 (d, $^2J_{P,P} = 22.74$ Hz, P _{β}) & 12.81 (d, $^2J_{P,P} = 21.3$ Hz, P _{β}). **HRMS ESI(-)**: m/z 714.1948 (obliczone dla C₂₆H₄₆N₅O₉P₂Se⁻ [M-H]⁻ 714.1936). Wydajność: 63%.

Związek B7, sól trietyloamoniowa

¹H NMR (400,1 MHz, CDCl₃, 25°C): δ_H (ppm) 0.88 (m, 12H), 1.27 (br, 16H), 1.35 (t, $^3J_{H,H} = 7.30$ Hz, 9H), 1.56 (m, 2H), 1.95-2.21 (m, 4H), 3.19 (q, $^3J_{H,H} = 7.34$, 6H), 4.01 (br, 2H), 4.13 (br, 2H), 4.29 (br, 1H), 5.83 (br, 1H), 6.03 (br, 1H), 8.10 (br, 1H). **¹³C NMR** (100,6 MHz, CDCl₃, 25°C): δ_C (ppm) 8.67, 10.88, 14.03, 22.94, 23.04, 25.17, 28.83, 29.74, 32.76, 39.91, 45.82, 67.11, 70.77, 80.17,

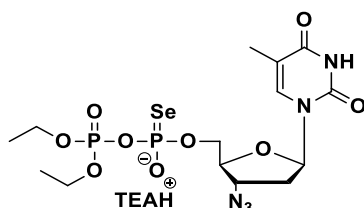
86.56, 101.58, 141.67, 150.34, 164.24. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 46.68 (d, $^2J_{P,P} = 24.09$ Hz, P_α), -12.54 (d, $^2J_{P,P} = 24.04$ Hz, P_β). HRMS ESI(-): m/z 611.2320 (obliczone dla $\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_9\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 611.2321). Wydajność: 25%.

Związek B8, sól trietyloamoniowa



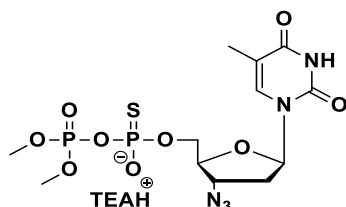
^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.39 (m, 9H), 1.36 (m, 6H), 2.05 (s, 3H), 2.63 (m, 2H), 3.33 (q, $^3J_{H,H} = 7.31$ Hz, 6H), 4.35 (m, 7H), 4.63 (m, 1H), 6.36 (br, 1H), 7.83 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.72, 12.04, 15.61, 15.68, 36.67, 46.92, 60.47, 60.63, 65.85, 66.23, 82.81, 84.99, 111.63, 137.39, 151.47, 166.28. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 44.60 (d, $^2J_{P,P} = 27.19$ Hz, P_α), -13.31 (d, $^2J_{P,P} = 26.99$ Hz, P_β). HRMS ESI(-): m/z 498.0573 (obliczone dla $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 498.0614). Wydajność: 66%.

Związek B9, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.33 (t, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 9H), 1.39 (m, 6H), 2.01 (br, 3H), 2.56 (m, 2H), 3.26 (q, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 6H), 4.26-4.36 (br, 7H), 4.59 (m, 1H), 6.32 (br, 1H), 7.78 (br, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ_C (ppm) 8.36, 11.86, 15.31, 15.37, 36.42, 46.76, 60.49, 60.64, 65.98, 66.25, 82.60, 84.99, 111.69, 137.30, 151.59, 166.49. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 38.53 (d, $^2J_{P,P} = 30.29$ Hz, P_α) & 38.07 (d, $^2J_{P,P} = 35.80$ Hz, P_α), -13.49 (d, $^2J_{P,P} = 6.20$ Hz, P_β) & -13.68 (d, $^2J_{P,P} = 5.73$ Hz, P_β). HRMS ESI(-): m/z 546.0067 (obliczone dla $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2\text{Se}^-$ [M-H] $^-$ 546.0058). Wydajność: 61%.

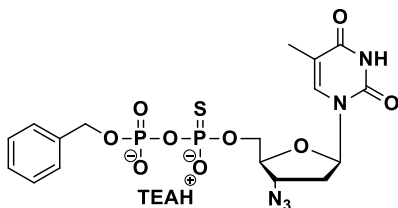
Związek B10, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.31 (t, $^3J_{H,H} = 7.28$ Hz, 9H), 1.97 (s, 3H), 2.54 (m, 2H), 3.23 (q, $^3J_{H,H} = 7.27$ Hz, 6H), 3.87 (d, $^3J_{H,H} = 4.08$ Hz, 3H) & 3.89 (d, $^3J_{H,H} = 4.24$ Hz, 3H), 4.29 (br, 3H), 4.56 (br, 1H), 6.29 (t, $^3J_{H,H} = 6.486$ Hz, 1H), 7.75 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.25, 11.69, 36.38, 46.68, 55.33, 60.41, 60.55, 66.17, 82.64, 82.73, 84.93, 84.98, 111.64, 137.19, 151.58, 166.47. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 45.31 (d, $^2J_{P,P} = 11.26$

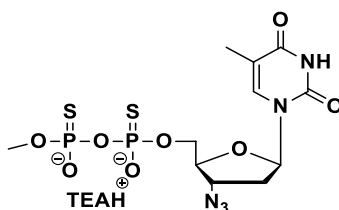
Hz, P_α) & 45.15 (d, $^2J_{P,P} = 10.98$ Hz, P_α), -10.47 (d, $^2J_{P,P} = 6.20$ Hz, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 470.0308 (obliczone dla $C_{12}H_{18}N_5O_9P_2S^-$ $[M-H]^-$ 470.0301). Wydajność: 52%.

Związek B11, sól trietyloamoniowa



1H NMR (500,2 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.29 (t, $^3J_{H,H} = 7.33$ Hz, 9H), 1.84 & 1.85 (2s, 3H), 2.40 (m, 2H), 3.21 (q, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 6H), 4.22 (m, 2H), 4.28 (m, 1H), 4.49 (m, 1H), 4.99 (m, 2H), 6.22 (t, $^3J_{H,H} = 6.35$ Hz, 1H), 7.31-7.43 (m, 5H), 7.65 (br, 1H). **^{13}C NMR** (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.25, 12.42, 36.37, 36.41, 46.71, 60.66, 65.66, 67.75, 82.89, 84.65, 84.71, 111.72, 127.19, 127.36, 128.09, 128.46, 137.19, 151.51, 166.27. **^{31}P NMR** (202,5 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 43.00 (br, P_α), -12.14 (br, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 532.0422 (obliczone dla $C_{17}H_{20}N_5O_9P_2S^-$ $[M-H]^-$ 532.0457). Wydajność: 40%.

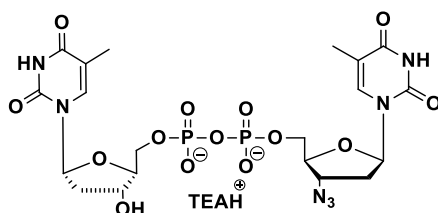
Związek B13, sól trietyloamoniowa



1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.33 (t, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 9H), 2.01 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 2.55 (m, 2H), 3.25 (q, $^3J_{H,H} = 7.31$ Hz, 6H), 3.71 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 4.32 (m, 3H), 4.69 (m, 1H), 6.33 (t, $^3J_{H,H} = 6.84$ Hz, 1H), 7.85 (s, 1H). **^{13}C NMR** (125.8 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.28, 11.83, 36.32, 46.73, 53.35, 53.41, 65.75, 65.97, 82.99, 84.93, 111.86, 137.38, 151.77, 166.67. **^{31}P NMR** (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 43.58 (br, 1P), 42.01 (br, 1P). **HRMS ESI(-)**: m/z 471.9908 (obliczone dla $C_{11}H_{16}N_5O_8P_2S_2^-$ $[M-H]^-$ 471.9916). Wydajność: 42%.

3.4. Charakterystyka spektralna pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu C

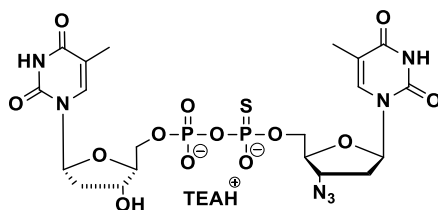
Związek C1, sól trietyloamoniowa



1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.31 (t, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 9H), 1.92 (s, 6H), 2.36 (m, 2H), 2.48 (m, 2H), 3.22 (q, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 6H), 4.20 (br, 6H), 4.51 (m, 1H), 4.59 (m, 1H), 6.22 (t, $^3J_{H,H} = 6.40$ Hz, 1H), 6.29 (t, $^3J_{H,H} = 6.82$ Hz, 1H), 7.70 (s, 2H). **^{13}C NMR** (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C

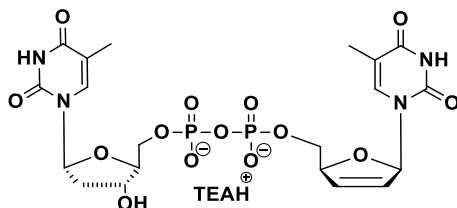
(ppm) 8.22, 11.63, 11.68, 36.24, 38.57, , 46.23, 60.46, 60.51, 65.39, 70.77, 82.75, 84.67, 84.75, 111.64, 111.69, 137.39, 137.44, 151.48, 151.57, 166.38. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_p (ppm) -11.35 (br, 2P). HRMS ESI(-): m/z 650.1030 (obliczone dla $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 650.1013). Wydajność: 40%.

Związek C2, sól trietyloamoniowa



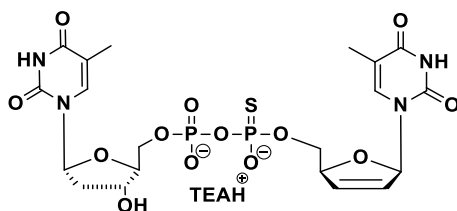
^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.31 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 9H), 1.95 (br, 6H), 2.37 (m, 2H), 2.49 (m, 2H), 3.22 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.23$ Hz, 6H), 4.12-4.34 (br, 6H), 4.56 (br, 1H), 4.65 (br, 1H), 6.25 (m, 1H), 6.32 (m, 1H), 7.76 (br, 2H). ^{13}C NMR (125,8 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.21, 11.76, 36.24, 36.29, 38.58, 38.60, 46.66, 60.53, 60.72, 65.38, 65.59, 70.87, 70.91, 82.74, 82.81, 84.64, 84.74, 85.22, 85.29, 111.69, 111.78, 111.81, 137.35, 137.47, 137.50, 151.58, 151.64, 166.49. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_p (ppm) 42.81 (br, 1P), -12.43 (br, 1P). HRMS ESI(-): m/z 666.0802 (obliczone dla $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_{13}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 666.0785). Wydajność: 42%.

Związek C3, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.30 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.26$ Hz, 9H), 1.87 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 2.35 (m, 2H), 3.22 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.22$ Hz, 6H), 4.16 (m, 5H), 4.60 (m, 1H), 5.08 (m, 1H), 5.94 (br, 2H), 6.31 (br, 1H), 6.49 (br, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.72 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.22, 11.46, 11.48, 11.68, 11.71, 38.58, 38.63, 46.62, 65.27, 65.36, 66.46, 66.55, 70.84, 84.77, 85.25, 85.82, 89.84, 111.32, 111.33, 111.65, 125.48, 134.08, 134.10, 137.38, 137.42, 138.23, 138.26, 151.58, 152.06, 166.38, 166.40, 166.55. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_p (ppm) -11.52 (br, 2P). HRMS ESI(-): m/z 607.0854 (obliczone dla $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_{14}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 607.0843). Wydajność: 64,5%.

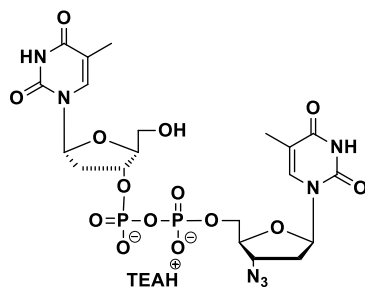
Związek C4, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.30 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 9H), 1.91 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 2.36 (m, 2H), 3.22 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 6H), 4.2 (br, 5H), 4.63 (br, 1H), 5.12 (br, 1H), 5.95 (br, 1H),

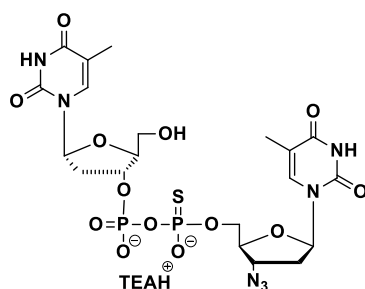
6.33 (t, $^3J_{H,H} = 6.7$ Hz, 1H), 6.51 (t, $^3J_{H,H} = 5.96$ Hz, 1H), 6.94 (br, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.73 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.23, 11.65, 11.69, 11.81, 11.84, 38.65, 46.64, 65.29, 65.38, 66.51, 66.57, 66.91, 66.98, 70.94, 84.78, 84.83, 85.21, 85.31, 85.59, 85.69, 89.88, 89.93, 111.39, 111.45, 111.68, 125.43, 134.11, 134.15, 137.35, 137.38, 138.15, 138.22, 151.94, 152.32, 166.83, 166.92. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 43.19 (d, $^2J_{P,P} = 34.73$ Hz, 1P) & 43.00 (d, $^2J_{P,P} = 28.17$ Hz, 1P), 12.41 (d, $^2J_{P,P} = 27.76$ Hz, 1P). HRMS ESI(-): m/z 623.0626 (obliczone dla $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 623.0614). Wydajność: 32%.

Związek C5, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.28 (t, $^3J_{H,H} = 6.96$ Hz, 9H), 1.89 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 2.47 (m, 2H), 2.61 (m, 2H), 3.85 (m, 2H), 4.14-4.27 (m, 4H), 4.52 (m, 1H), 4.91 (br, 1H), 6.23-6.38 (m, 2H), 7.61 (s, 1H), 7.67 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.39, 11.93, 12.08, 36.30, 36.45, 37.44, 37.61, 60.37, 60.56, 61.15, 65.31, 65.37, 75.47, 82.66, 82.74, 84.77, 85.08, 85.53, 111.61, 111.81, 136.87, 137.14, 153.93, 153.98, 162.37. ^{31}P NMR* (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) -11.71 (d, $^2J_{P,P} = 20.94$ Hz, 1P), -12.29 (d, $^2J_{P,P} = 21.38$ Hz, 1P). HRMS ESI(-): m/z 650.1030 (obliczone dla $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 650.1013). Wydajność: 37%.

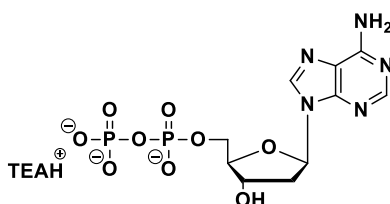
Związek C6, sól trietyloamoniowa



^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_H (ppm) 1.31 (t, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 9H), 1.90 (s, 3H), 1.95 (br, 3H), 2.43 (br, 1H), 2.51 (m, 2H), 2.67 (br, 1H), 3.23 (q, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 6H), 3.87 (br, 2H), 4.27 (br, 4H), 4.56 (m, 1H), 4.98 (br, 1H), 6.26 (t, $^3J_{H,H} = 6.68$ Hz, 1H), 6.30 (t, $^3J_{H,H} = 6.84$ Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.78 (s, 1H). ^{13}C NMR (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_C (ppm) 8.28, 11.58, 11.79, 36.47, 37.55, 46.67, 60.35, 60.62, 61.61, 65.56, 75.51, 82.79, 82.88, 84.79, 85.00, 85.68, 111.47, 111.60, 137.23, 137.44, 151.44, 166.23. ^{31}P NMR (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_P (ppm) 42.94 (br, 1P), -13.37 (br, 1P). HRMS ESI(-): m/z 666.0800 (obliczone dla $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_{13}\text{P}_2\text{S}^-$ [M-H] $^-$ 666.0785). Wydajność: 42%.

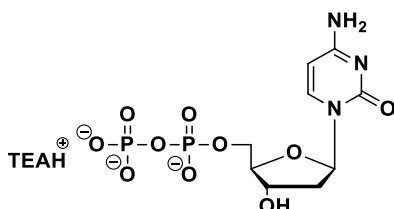
3.5. Charakterystyka spektralna pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów typu D

5'-difosforan deoksyadenozyny (D1), sól trietyloamoniowa



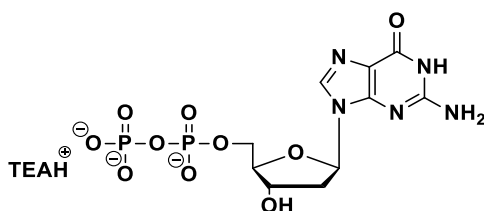
$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.21 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.26$ Hz, 9H), 2.54 (m, 1H), 2.75 (m, 1H), 3.13 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.26$ Hz, 6H), 4.1 (m, 2H), 4.23 (m, 1H), 4.72 (m, 1H), 6.39 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.54$ Hz, 1H), 8.1 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.05, 38.91, 46.44, 65.01, 70.94, 83.45, 85.6, 118.18, 139.77, 148.28, 152.1, 154.98. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) -10.11 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.93$ Hz, P_{β}), -11.19 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.20$ Hz, P_{α}). **HRMS ESI(-)**: m/z 410.0271 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 410.0267). Wydajność: 51%.

5'-difosforan deoksycytozyny (D2), sól trietyloamoniowa

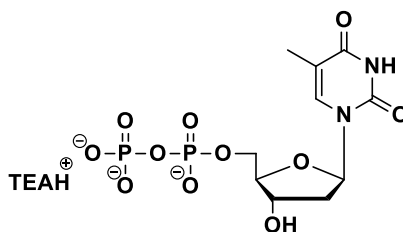


$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 9H), 2.32 (m, 1H), 2.43 (m, 1H), 3.21 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.31$ Hz, 6H), 4.19 (m, 3H), 4.61 (m, 1H), 6.14 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.56$ Hz, 1H), 6.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.64$ Hz, 1H), 7.98 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.15, 39.24, 46.58, 64.89, 70.48, 85.36, 85.86, 96.36, 141.78, 156.74, 165.51. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) -10.35 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.54$ Hz, P_{β}), -11.28 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.39$ Hz, P_{α}). **HRMS ESI(-)**: m/z 386.0150 (obliczone dla $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 386.015448). Wydajność: 47%.

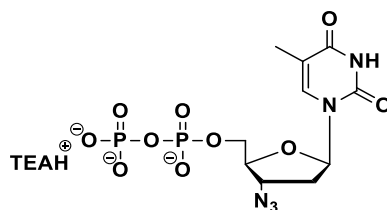
5'-difosforan deoksyguanozyny (D3), sól trietyloamoniowa



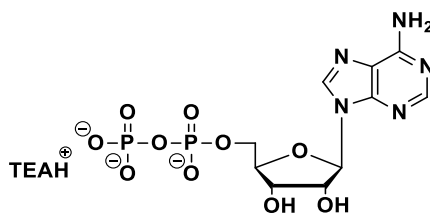
$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.28 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.33$ Hz, 9H), 2.53 (m, 1H), 2.8 (m, 1H), 3.2 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 6H), 4.16 (m, 2H), 4.26 (m, 1H), 4.76 (m, 1H), 6.31 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.34$ Hz, 1H), 8.1 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.19, 38.57, 46.63, 65.28, 71.25, 83.54, 85.6, 116.02, 137.58, 151.31, 153.81, 158.81. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) -10.46 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.93$ Hz, P_{β}), -11.2 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.93$ Hz, P_{α}). **HRMS ESI(-)**: m/z 426.0203 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 426.0216). Wydajność: 33%.

5'-difosforan deoksytymidyny (D4), sól trietyloamoniowa

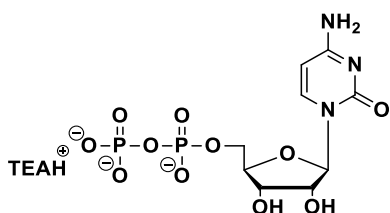
^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.28$ Hz, 9H), 1.93 (s, 3H), 2.38 (m, 2H), 3.21 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 6H), 4.18 (m, 3H), 4.63 (m, 1H), 6.35 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.94$ Hz, 1H), 7.74 (s, 1H). **^{13}C NMR** (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.19, 11.6, 38.45, 46.61, 48.84, 65.22, 70.86, 84.94, 85.3, 111.72, 137.36, 151.7, 166.53. **^{31}P NMR** (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) -10.13 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.13$ Hz, P_{β}), -11.24 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.59$ Hz, P_{α}). **HRMS ESI(-)**: m/z 401.0137 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 401.0151). Wydajność: 58%.

5'-difosforan 3'-azydo-3'-deoksytymidyny (D5), sól trietyloamoniowa

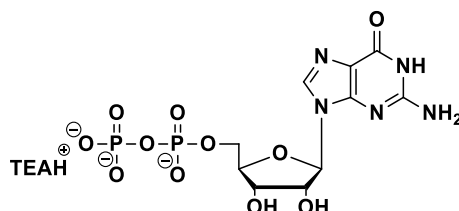
^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 9H), 1.94 (s, 3H), 2.51 (m, 2H), 3.21 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.34$ Hz, 6H), 4.21 (m, 2H), 4.23 (m, 1H), 4.58 (m, 1H), 6.28 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.86$ Hz, 1H), 7.75 (s, 1H). **^{13}C NMR** (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.15, 11.57, 36.095, 46.56, 60.79, 65.28, 82.88, 84.84, 111.72, 137.27, 151.59, 166.45. **^{31}P NMR** (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) -9.17 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 19.44$ Hz, P_{β}), -11.235 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 21.06$ Hz, P_{α}). **HRMS ESI(-)**: m/z 426.0209 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 426.0221). Wydajność: 58%.

5'-difosforan adenozyzny (D6), sól trietyloamoniowa

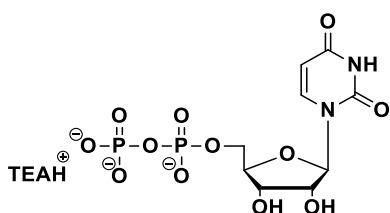
^1H NMR (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.27 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 9H), 3.29 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.24$ Hz, 6H), 4.24 (m, 2H), 4.39 (m, 1H), 4.58 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 4.54$ Hz, 1H), 4.76 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.34$ Hz, 1H), 6.11 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.52$ Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.5 (s, 1H). **^{13}C NMR** (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.17, 46.58, 64.71, 70.1, 74.29, 83.78, 86.91, 118.36, 139.87, 148.83, 152.64, 155.33. **^{31}P NMR** (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) -9.28 (br d, P_{β}), -11.09 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.44$ Hz, P_{α}). **HRMS ESI(-)**: m/z 426.0216 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 426.0216). Wydajność: 46%.

5'-difosforan cytozyny (D7), sól trietyloamoniowa

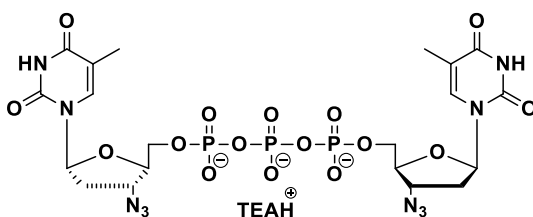
$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 9H), 3.21 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.30$ Hz, 6H), 4.23 (m, 1H), 4.28 (m, 2H), 4.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 4.63$ Hz, 1H), 4.38 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5$ Hz, 1H), 6.00 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 4.1$ Hz, 1H), 6.15 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 1H), 8.01 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.2, 46.63, 64.37, 69.17, 74.21, 82.73, 89.22, 96.45, 141.7, 156.97, 165.58. $^{31}\text{P NMR}$ (121,4 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) -10.35 (br d, P_{β}), -11.28 (br d, P_{α}). **HRMS ESI(-)**: m/z 402.0095 (obliczone dla $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 402.0104). Wydajność: 40%.

5'-difosforan guanozyny (D8), sól trietyloamoniowa

$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.22 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 9H), 3.13 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 6H), 4.19 (m, 2H), 4.31 (m, 1H), 4.5 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 4.48$ Hz, 1H), 4.69 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 5.42$ Hz, 1H), 5.85 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 5.64$ Hz, 1H), 8.06 (s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.16, 46.51, 65.02, 70.23, 73.84, 83.58, 87.01, 115.79, 137.3, 151.46, 153.73, 158.41. $^{31}\text{P NMR}$ (121,4 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) -10.46 (br d, P_{β}), -11.2 (br d, P_{α}). **HRMS ESI(-)**: m/z 442.0177 (obliczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 442.0165). Wydajność: 34%.

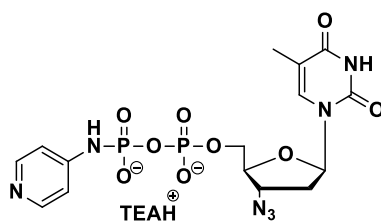
5'-difosforan urydyny (D9), sól trietyloamoniowa

$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.30$ Hz, 9H), 3.22 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.30$ Hz, 6H), 4.24 (m, 2H), 4.29 (m, 1H), 4.39 (m, 2H), 5.9 (br, 1H), 5.99 (br, 1H), 7.97 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 8.12$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.21, 46.62, 64.65, 69.52, 73.74, 83.18, 88.49, 102.59, 141.70, 151.77, 166.21. $^{31}\text{P NMR}$ (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) -9.22 (br d, P_{β}), -10.94 (br d, P_{α}). **HRMS ESI(-)**: m/z 402.9933 (obliczone dla $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_{12}\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 402.9944). Wydajność: 59%.

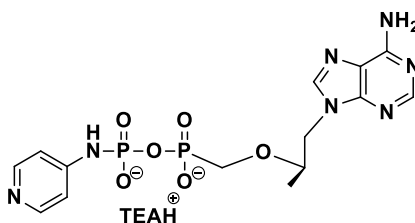
Związek D10, sól trietyloamoniowa

$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.29 (m, 9H), 1.94 (s, 6H), 2.49 (m, 4H), 3.22 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.07$ Hz, 6H), 4.21 (m, 6H), 4.52 (m, 2H), 6.23 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, 2H), 7.69 (s, 2H). **$^{13}\text{C NMR}$** (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.22, 11.68, 36.28, 46.65, 60.66, 65.68, 82.74, 84.82, 111.72, 137.24, 151.49, 166.38. **$^{31}\text{P NMR}$** (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) -11.25 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 15.42$ Hz, P_α , P_γ), -22.07 (t, $^2J_{\text{P,P}} = 16.29$ Hz, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 755.0747 (obliczone dla $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_{10}\text{O}_{16}\text{P}_3^-$ [M-H] $^-$ 755.0741). Wydajność: 38%.

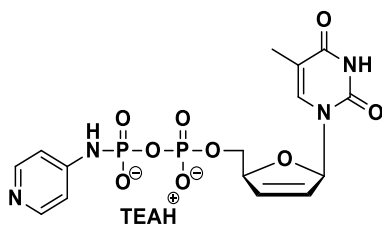
3.5. Charakterystyka spektralna pochodnych 5'-difosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów zawierających wiązanie P-N (związki typu N)

Związek N1, sól trietyloamoniowa

$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.33 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.28$ Hz, 9H), 1.86 (s, 3H), 2.46 (m, 2H), 3.25 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.29$ Hz, 6H), 4.17 (m, 2H), 4.29 (m, 1H), 4.48 (m, 1H), 6.29 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 6.68$ Hz, 1H), 7.25 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.68$ Hz, 2H), 7.66 (s, 1H), 8.22 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.48$ Hz, 2H). **$^{13}\text{C NMR}$** (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.25, 11.60, 36.47, 46.71, 60.49, 65.31, 82.93, 84.71, 111.55, 112.41, 137.23, 143.63, 151.59, 154.87, 166.37. **$^{31}\text{P NMR}$** (162 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) -11.78 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.12$ Hz, P_α), -15.97 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 20.38$, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 502.0653 (obliczone dla $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_7\text{O}_9\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 502.0641). Wydajność: 17%.

Związek N2, sól trietyloamoniowa

$^1\text{H NMR}$ (400,1 MHz, D_2O , 25°C): δ_{H} (ppm) 1.07 (br, 3H), 1.25 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 9H), 3.16 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.32$ Hz, 6H), 3.59-3.0 (br, 2H), 3.91 (br, 1H), 4.03-4.29 (br, 2H), 7.05 (d, $^3J_{\text{H,H}} = 6.36$ Hz, 2H), 8.01 (s, 1H), 8.05 (d, 2H). **$^{13}\text{C NMR}$** (100,6 MHz, D_2O , 25°C): δ_{C} (ppm) 8.17, 15.94, 46.57, 63.53, 65.17, 75.64, 112.27, 117.51, 141.17, 142.32, 143.08, 148.68, 152.01, 155.42. **$^{31}\text{P NMR}$** (121,4 MHz, D_2O , H_3PO_4 , 25°C): δ_{P} (ppm) 8.84 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 14.57$ Hz, P_α), -16.09 (d, $^2J_{\text{P,P}} = 26.10$ Hz, P_β). **HRMS ESI(-)**: m/z 442.0815 (obliczone dla $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_7\text{O}_6\text{P}_2^-$ [M-H] $^-$ 442.0794). Wydajność: 11%.

Związek N3, sól trietyloamoniowa

¹H NMR (400,1 MHz, D₂O, 25°C): δ_H (ppm) 1.31 (t, $^3J_{H,H} = 7.32$ Hz, 9H), 1.79 (s, 3H), 3.23 (q, $^3J_{H,H} = 7.34$ Hz, 6H), 4.19 (m, 3H), 5.08 (br, 2H), 5.89 (d, $^3J_{H,H} = 5.80$ Hz, 1H), 6.45 (br, 2H), 6.95 (br, 2H), 7.52 (s, 1H). **¹³C NMR** (100,6 MHz, D₂O, 25°C): δ_C (ppm) 8.20, 11.38, 46.62, 66.35, 85.77, 89.62, 111.23, 112.48, 125.56, 133.89, 138.24, 145.36, 152.05, 153.12, 166.48. **³¹P NMR** (162 MHz, D₂O, H₃PO₄, 25°C): δ_P (ppm) -11.69 (d, $^2J_{P,P} = 19.59$ Hz, P _{α}), -14.44 (d, $^2J_{P,P} = 17.33$, P _{β}). **HRMS ESI(-)**: m/z 459.0479 (obliczone dla C₁₅H₁₇N₄O₉P₂⁻ [M-H]⁻ 459.0471). Wydajność: 14%.

VIII. LITERATURA

- (1) <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>, dostęp z dnia: 01.04.2019.
- (2) Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; F., R., Isolation of a T-lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS); *Science* **1983**, *220*, 868-871.
- (3) Gallo, R. C.; Salahuddin, S. Z.; Popovic, M., Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS; *Science* **1984**, *224*, 500-503.
- (4) Levy, J. A.; Hoffman, A. D.; Kramer, S. M.; Landis, J. A.; Shimabukuro, J. M.; Oshiro, L. S., Isolation of Lymphocytopathic Retroviruses from San Francisco Patients with AIDS; *Science* **1984**, *225*, 840-842.
- (5) Luciw, P. A., Chapter 60: Human Immunodeficiency Viruses and Their Replication; *Fields Virology. Third Edition* **1996**, 1881-1952.
- (6) Daniel, M. D.; Letvin, N. L.; King, N. W., Isolation of T-cell Tropic HTLV-III-like Retrovirus from Macaques; *Science* **1985**, *228*, 1201-1204.
- (7) Duesberg, P. H., AIDS Acquired by Drug Consumption and Other Noncontagious Risk Factors; *Pharmac. Ther.* **1992**, *55*, 201-277.
- (8) Deeks, S. G.; Overbaugh, J.; Phillips, A.; Buchbinder, S., HIV infection; *Nat. Rev.* **2015**, *1*, 1-22.
- (9) Coffin, J. M. In *Fields Virology. Third edition*; B.N. Fields, D. M. K., P. M. Howley, et al., Ed.; Lippincott - Raven Publishers: Philadelphia, **1996**, 1767-1847.
- (10) Collier, L.; Oxford, J.; Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa, **1993**.
- (11) Praca zbiorowa pod redakcją S. L. Hausnera Współredaktorzy: S.A. Josephson, J. D. In *Harrison. Neurologia w medycynie klinicznej*. **2008**.
- (12) Human Immunodeficiency Virus (HIV); *Transfusion Medicine and HEmotherapy* **2016**, *43*, 203-222.
- (13) Chan, D. C.; Kim, P. S., HIV Entry and Its Inhibition; *Cell* **1998**, *93*, 681-684.
- (14) DeStefano, J. J.; Buiser, R. G.; Mallaber, L. M.; Myers, T. W.; Bambara, R. A.; Fay, P. J., Polymerization and RNase H Activities of the Reverse Transcriptases from Avian Myeloblastosis, Human Immunodeficiency, and Moloney Murine Leukemia Viruses are Functionally Uncoupled; *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7423-7431.
- (15) Charneau, P.; Alizon, M.; Clavel, F., A Second Origin of DNA Plus-Strand Synthesis is Required for Optimal Human Immunodeficiency Virus Replication; *J. Virol.* **1992**, *66*, 2814-2820.
- (16) Fujiwara, T.; Mizuuchi, K., Retroviral DNA Integration: Structure of an Integration Intermediate; *Cell* **1988**, *54*, 497-504.

- (17) Turner, B. G.; Summers, M. F., Structural Biology of HIV; *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1-32.
- (18) Wu, Y., HIV-1 Gene Expression: Lessons from Provirus and Non-Integrated DNA; *Retrovirology* **2004**, *1*, 13.
- (19) Herbein, G.; Van Lint, C.; Lovett, J. L.; Fenyo, E. M., Distinct Mechanisms Trigger Apoptosis in Human Immunodeficiency Virus Type 1- infected and in Uninfected Bystander T lymphocytes *J. Virol.* **1998**, *72*, 660-670.
- (20) (a) Barré-Sinoussi, F.; Ross, A. L.; Delfraissy, J.-F., Past, present and future: 30 years of HIV research; *Nat. Rev.* **2013**, *11*, 877-883; (b) Deeks, S. G.; Lewin, S. R.; Havlir, D. V., The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease; *Lancet* **2013**, *382*, 1525-1533.
- (21) Figlerowicz, M.; Alejska, M.; Kurzyńska-Kokorniak, A.; Figlerowicz, M., Genetic Variability: The Key Problem in the Prevention and Therapy of RNA-Based Virus Infections; *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 488-518.
- (22) Bertoletti, N.; Chan, A. H.; Schinazi, R. F.; Yin, Y. W.; K.S., A., Structural Insights into the Recognition of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs) by HIV-1 Reverse Transcriptase: First Crystal Structures with RT and the Active Triphosphate Forms of Lamivudine and Emtricitabine; *Protein Sci.* **2019**, 1664-1675.
- (23) <https://www.fda.gov/ForPatients/Illness/HIVAIDS/Treatment/ucm118915.htm>, dostęp z dnia: 03.04.2019.
- (24) Maartens, G.; Celum, C.; Lewin, S. R., HIV Infection: Epidemiology, Pathogenesis, Treatment, and Prevention; *Lancet* **2014**, *384*, 258-271.
- (25) Fauci, A. S.; Folkers, G. K., Toward an AIDS-Free Generation; *JAMA* **2012**, *308*, 343-344.
- (26) Tarrago-Litvak, L.; Andreola, M. L.; Fournier, M.; Nevinsky, G. A.; Parissi, V.; de Soultrait, V. R.; Litvak, S., Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase and Integrase: Classical and Emerging Therapeutical Approaches; *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 125-133.
- (27) Balzarini, J., Metabolism and Mechanism of Antiretroviral Action of Purine and Pyrimidine Derivatives; *Pharm. World Sci.* **1994**, *16*, 113-126.
- (28) Arts, E. J.; Wainberg, M. A., Mechanisms of Nucleoside Analog Antiviral Activity and Resistance during Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcription; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *20*, 527-540.
- (29) (a) Mansuri, M. M.; Hitchcock, M. J. M.; Buroker, R. A.; Bregman, C. L.; Ghazzouli, I.; Desiderio, J. V.; Starrett, J. E.; Sterzycki, R. Z.; Martin, J. C., Comparison of In Vitro Biological Properties and Mouse Toxicities of Three Thymidine Analogs Active against Human Immunodeficiency Virus; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 637-641; (b) Tan, X.; Chu, C. K.; Boudinot, F. D., Development and Optimization of anti-HIV Nucleoside Analogs and Prodrugs: A Review of Their Cellular Pharmacology, Structure-Activity Relationships and Pharmacokinetics; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *39*, 117-151.
- (30) Parang, K.; Wiebe, L. I.; Knaus, E. E., Novel Approaches for Designing 5'-O-Ester Prodrugs of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT); *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 995-1039.

- (31) Manouilov, K. K.; Pedorov, I. I.; Boudinot, F. D.; White, C. A.; Kotra, L. P.; Schinazi, R. F.; Hong, C. I.; Chu, C. K., Lymphatic Targeting of anti-HIV Nucleosides: Distribution of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) and 3'-azido-2',3'-dideoxyuridine (AZdU) After Administration of Dipalmitoylphosphatidyl Prodrugs to Mice; *Antivir. Chem. Chemother.* **1995**, *6*, 230-238.
- (32) (a) Good, S. S.; de Miranda, P., Species Differences in the Metabolism and Disposition of Antiviral Nucleoside Analogues: 2. Zidovudine; *Antivir. Chem. Chemother.* **1992**, *3*, 65-77; (b) Cretton, E. M.; Xie, M.-Y.; Bevan, R. J.; Goudgaon, N. M.; Schinazi, R. F.; Sommadossi, J.-P., Catabolism of 3'-Azido-3'-deoxythymidine in Hepatocytes and Liver Microsomes, with Evidence of Formation of 3'-Amino-3'-deoxythymidine, a Highly Toxic Catabolite for Human Bone Marrow Cells; *Mol. Pharmacol.* **1990**, *39*, 258-266.
- (33) Dubinsky, R. M.; Yarchoan, R.; Dalakas, M.; Broder, S., Reversible Axonal Neuropathy from the Treatment of Aids and Related Disorders with 2',3'-Dideoxycytidine (DDC); *Muscle Nerve* **1989**, *12*, 856-860.
- (34) (a) Mallal, S., HLA-B*5701 Screening for Hypersensitivity to Abacavir; *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 568; (b) Hetherington, S.; McGuirk, S.; Powell, G.; Cutrell, A.; Naderer, O.; Spreen, B.; Lufon, S.; Pearce, G.; Steel, H., Hypersensitivity Reactions During Therapy with the Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Abacavir *Clin. Ther.* **2001**, *23*, 1603-1614.
- (35) (a) Perry, C. M.; Faulds, D., Lamivudine. A Review of its Antiviral Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy in the Management of HIV Infection *Drugs* **1997**, *53*, 657-680; (b) Gray, N. M.; Marr, C. L. P.; Penn, C. R.; Cameron, J. M.; Bethell, R. C., The Intracellular Phosphorylation of (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine (3TC) and the Incorporation of 3TC 5'-Monophosphate Into DNA by HIV-I Reverse Transcriptase and Human DNA Polymerase γ ; *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 1043-1051.
- (36) Liotta, D. C.; Painter, G. R., Discovery and Development of the Anti-Human Immunodeficiency Virus Drug, Emtricitabine (Emtriva, FTC); *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 2091-2098.
- (37) (a) Cohen, S. S., Commentary on the Therapeutic Use of Nucleosides and the Penetrability of Phosphorylated Compounds; *Biochem. Pharmacol.* **1975**, *24*, 1929-1932; (b) Leibman, K. C.; Heidelberger, C., The Metabolism of P³²-labeled Ribonucleotides in Tissue Slices and Cell Suspensions; *J. Biol. Chem.* **1955**, 823-830; (c) Lichtenstein, J.; Barner, H. D.; Cohen, S. S., The Metabolism of Exogenously Supplied Nucleotides by Escherichia Coli; *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 457-465; (d) Iglesias, L. E.; Lewkowicz, E. S.; Medici, R.; Bianchi, P.; Iribarren, A. M., Biocatalytic Approaches Applied to the Synthesis of Nucleoside Prodrugs; *Biotechnol. Adv.* **2015**, 412-434.
- (38) (a) Schultz, C., Prodrugs of Biologically Active Phosphate Esters; *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 885-898; (b) Zawilska, J. B.; Wojcieszak, J.; Olejniczak, A. B., Prodrugs: A Challenge for the Drug Development; *Pharmacol. Rep.* **2013**, *65*, 1-14.
- (39) (a) Anastasi, C.; Quéléver, G.; Burlet, S.; Garino, C.; Suard, F.; Kraus, J.-L., New Antiviral Nucleoside Prodrugs Await Application; *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1825-1843; (b) Wiemer, A. J.; Wiemer, D. F., Prodrugs of Phosphonates and Phosphates: Crossing the Membrane Barrier; *Top. Curr. Chem.* **2015**, *360*, 115-160.

- (40) McGuigan, C.; Nicholls, S. R.; O'Connor, T. J.; Kinchington, D., Synthesis of Some Novel Dialkyl Phosphate Derivatives of 3'-Modified Nucleosides as Potential anti-AIDS Drugs; *Antivir. Chem. Chemother.* **1990**, *1*, 25-33.
- (41) McGuigan, C.; O'Connor, T. J.; Nicholls, S. R.; Nickson, C.; Kinchington, D., Synthesis and anti-HIV Activity of Some Novel Substituted Dialkyl Phosphate Derivatives of AZT and ddCyd; *Antivir. Chem. Chemother.* **1990**, *1*, 355-360.
- (42) (a) McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Mahmood, N.; Devine, K. G.; Hay, A. J., Aryl Phosphate Derivatives of AZT Retain Activity Against HIV1 in Cell Lines which are Resistant to the Action of AZT; *Antivir. Res.* **1992**, *17*, 311-321; (b) McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Davies, M. P. H.; Balzarini, J.; De Clercq, E., Diaryl Phosphate Derivatives Act As Pro-drugs of AZT with Reduced Cytotoxicity Compared to the Parent Nucleoside *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 427-430.
- (43) Romanowska, J.; Szymańska-Michalak, A.; Boryski, J.; Stawiński, J.; Kraszewski, A., Aryl Nucleoside H-phosphonates. Part 16: Synthesis and anti-HIV-1 Activity of Di-aryl Nucleoside Phosphotriesters; *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3489-3498.
- (44) Hao, Z.; Cooney, D. A.; Farquhar, D.; Perno, C. F.; Zhang, K.; Masood, R.; Wilson, Y.; Hartman, N. R.; Balzarini, J.; Johns, D. G., Potent DNA Chain Termination Activity and Selective Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase by 2',3'-dideoxyuridine-5'-triphosphate; *Mol. Pharmacol.* **1990**, *37*, 157-163.
- (45) (a) Meier, C., 2-Nucleos-5'-O-yl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphinin-2-oxide - ein neues Konzept für lipophile, potentielle Prodrugs biologisch aktiver Nucleosidmonophosphate; *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 77-79; (b) Meier, C.; Lorey, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J., cycloSal-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydrothymidine Monophosphate (cycloSal-d4TMP): Synthesis and Antiviral Evaluation of a New d4TMP Delivery System; *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1417-1427.
- (46) Meier, C., Pro-Nucleotides - Recent Advances in the Design of Efficient Tools for the Delivery of Biologically Active Nucleoside Monophosphates; *Synlett* **1998**, 233-242.
- (47) Meier, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J., Nucleotide Delivery from cycloSaligenyl-3'-azido-3'-deoxythymidine Monophosphates (cycloSal-AZTMP); *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 837-846.
- (48) Balzarini, J.; Naesens, L.; Aquaro, S.; Knispel, T.; Perno, C.-F.; de Clercq, E.; Meier, C., Intracellular Metabolism of CycloSaligenyl 3'-Azido-3'-dideoxythymidine Monophosphate, a Prodrug of 3'-Azido-3'-dideoxythymidine (Zidovudine); *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 1354-1361.
- (49) (a) Peyrottes, S.; Egron, D.; Lefebvre, I.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L.; Périgaud, C., SATE Pronucleotide Approaches: An Overview; *Mini-Reviews w Med. Chem.* **2004**, *4*, 395-408; (b) Gosselin, G.; Girardet, J. L.; Perigaud, C.; Benzaria, S.; Lefebvre, I.; Schlienger, N.; Pompon, A.; Imbach, J.-L., New Insights Regarding the Potential of the Pronucleotide Approach in Antiviral Chemotherapy *Acta Biochim. Pol.* **1996**, *43*, 195-208; (c) Lefebvre, I.; Perigaud, C.; Pompon, A.; Aubertin, A.-M.; Girardet, J.-L.; Kim, A.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L., Mononucleoside Phosphotriester Derivatives with S-Acyl-2-thioethyl Bioreversible Phosphate-Protecting Groups: Intracellular Delivery of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine 5'-Monophosphate; *J. Med. Chem.* **1995**, *38*; (d) Perigaud, C.; Gosselin, G.; Lefebvre, I.; Girardet, J.-L.; Benzaria, S.; Barber, I.; Imbach, J.-L., Rational Design for Cytosolic Delivery

- of Nucleoside Monophosphates: "SATE" and "DTE" as Enzym-Labile Transient Phosphate Protecting Groups; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 2521-2526.
- (50) Pradere, U.; Garnier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F., Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs; *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154-9218.
- (51) Schlienger, N.; Peyrottes, S.; Kassem, T.; Imbach, J.-L.; Gosselin, G.; Aubertin, A.-M.; Perigaud, C., S-Acyl-2-thioethyl Aryl Phosphotriester Derivatives as Mononucleotide Prodrugs; *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4570-4574.
- (52) (a) Pompon, A.; Lefebvre, I.; Imbach, J.-L.; Kahn, S.; Farquhar, D., Decomposition Pathways of the mono- and bis(pivaloyloxymethyl) Esters of Azidothymidine 5'-monophosphate in Cell Extract and in Tissue Culture Medium: an Application of the 'on-line ISRP-cleaning' HPLC Technique; *Antivir. Chem. Chemother.* **1994**, *5*, 91-98; (b) Farquhar, D.; Nowak, B.; Khan, S.; Plunkett, W., A Strategy to Introduce Therapeutic Nucleoside 5'-Phosphates Into Cells; *Antivir. Res.* **1991**, *15 (Suppl. 1)*: 143.
- (53) Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J., Pronucleotides: Toward the InVivo Delivery of Antiviral and Anticancer Nucleotides *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417-451.
- (54) Committee, A. I. S., A randomized placebo-controlled trial of adefovir dipivoxil in advanced HIV infection: the ADHOC trial; *HIV Medicine* **2002**, *3*, 229-238.
- (55) (a) Robbins, B. L.; Srinivas, R. V.; Kim, C.; Bischofberger, N.; Fridland, A., Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity and Cellular Metabolism of a Potential Prodrug of the Acyclic Nucleoside Phosphonate 9-R-(2-Phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA), Bis(isopropylloxymethylcarbonyl) PMPA; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 612-617; (b) Srinivas, R. V.; Fridland, A., Antiviral Activities of 9-R-2-Phosphonomethoxypropyl Adenine (PMPA) and Bis(isopropylloxymethylcarbonyl) PMPA against Various Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Strains; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 1484-1487.
- (56) Naesens, L.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Neyts, J.; De Clercq, E., HPMPC (cidofovir), PMEA (adefovir) and Related Acyclic Nucleoside Phosphonate Analogues: a Review of their Pharmacology and Clinical Potential in the Treatment of Viral Infections; *Antivir. Chem. Chemother.* **1996**, *8*, 1-23.
- (57) (a) Routledge, A.; Walker, I.; Freeman, S.; Hay, A.; Mahmood, N., Synthesis, Bioactivation and Anti-HIV Activity of 4-Acyloxybenzyl bis(Nucleosid-5'-yl) Phosphates; *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **1995**, *14*, 1545-1558; (b) Glazier, A.; Buckheit, M.; Yanachkova, M.; Yanachkov, I.; Wright, G. E., *Antivir. Res.* **1994**, *19 (Suppl. 1)*.
- (58) Schinazi, R. F.; Sommandossi, J. P.; Saalman, V.; Cannon, D. I.; Xie, M. Y.; Hart, G. C.; Smith, G. A.; Hahn, E. F., Activities of 3'-Azido-3'-Deoxythymidine Nucleotide Dimers in Primary Lymphocytes Infected with Human-Immunodeficiency-Virus Type-1; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 1061-1067.
- (59) Zhou, X.-J.; Squires, K.; Pan-Zhou, X.-R.; Bernhard, S.; Agrofoglio, L.; Kirk, M.; Duchin, K. L.; Sommadossi, J.-P., Phase I Dose-Escalation Pharmacokinetics of AZT-P-ddI (IVX-E-59) in Patients with Human Immunodeficiency Virus; *J. Clin. Pharmacol.* **1997**, *37*, 201-213.
- (60) (a) Puech, F.; Gosselin, G.; Lefebvre, I.; Pompon, A.; Aubertin, A.-M.; Kirn, A.; Imbach, J.-L., Intracellular Delivery of Nucleoside Monophosphates Through a Reductase-Mediated

- Activation Process *Antivir. Res.* **1993**, 22 155-174; (b) Shimizu, S. I.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Walker, R. T., The Synthesis and Biological Properties of some Aryl bis(Nucleosid-5'-yl) Phosphates Using Nucleosides with Proven Anti-HIV Activity; *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **1992**, 11, 583-594.
- (61) Khamnei, S.; Torrence, P. F., Neighboring Group Catalysis in the Design of Nucleotide Prodrugs; *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 4109-4115.
- (62) Chanley, J. D.; Gindler, E. M.; Sobotka, H., The Mechanism of the Hydrolysis of Salicyl Phosphate; *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 4347-4352.
- (63) Smith, R. A.; Burrow, D. J., Enzymic Cleavage of Phosphoramidic Acid *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, 34, 274-276.
- (64) Kulik, K.; Baraniak, J., Pronukleotydy o Strukturze Amidofosforanów i ich Wewnątrzkomórkowy Mechanizm Aktywacji; *Wiadomości Chemiczne* **2014**, 68, 811-831.
- (65) McGuigan, C.; Devine, K. G.; O'Connor, T. J.; Galpin, S. A.; Jeffries, D. J.; Kinchington, D., Synthesis and Evaluation of Some Novel Phosphoramidate Derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) as Anti-HIV Compounds; *Antivir. Chem. Chemother.* **1990**, 1, 107-113.
- (66) Devine, K. G.; McGuigan, C.; O'Connor, T. J.; Nicholls, S. R.; Kinchington, D., Novel Phosphate Derivatives of Zidovudine as Anti-HIV Compounds; *AIDS* **1990**, 4, 371-373.
- (67) McGuigan, C.; Devine, K. G.; O'Connor, T. J.; Kinchington, D., Synthesis and Anti-HIV Activity of Some Haloalkyl Phosphoramidate Derivatives of 3'-azido-3'- deoxythymidine (AZT): Potent Activity of the Trichloroethyl Methoxyalaninyl Compound; *Antivir. Res.* **1991**, 15, 255-263
- (68) (a) McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Balzarini, J.; De Clercq, E., Intracellular Delivery of Bioactive AZT Nucleotides by Aryl Phosphate Derivatives of AZT; *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 1048-1052; (b) Cahard, D.; McGuigan, C.; Balzarini, J., Aryloxy Phosphoramidate Triesters as Pro-Tides; *Mini-Reviews w Med. Chem.* **2004**, 4, 371-381.
- (69) McGuigan, C.; Cahard, D.; Sheeka, H. M.; De Clercq, E.; Balzarini, J., Aryl Phosphoramidate Derivatives of d4T Have Improved Anti-HIV Efficacy in Tissue Culture and May Act by the Generation of a Novel Intracellular Metabolite; *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1748-1753.
- (70) Balzarini, J.; Wedgwood, O.; Kruining, J.; Pelemans, H.; Heijntink, R.; De Clercq, E.; McGuigan, C., Anti-HIV and Anti-HBV Activity and Resistance Profile of 2,3-Dideoxy-3-Thiacytidine (3TC) and Its Arylphosphoramidate Derivative CF 1109; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 225, 363-369.
- (71) Ballatore, C.; McGuigan, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J., Synthesis and Evaluation of Novel Amidate Prodrugs of PMEA and PMPA; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1053-1056.
- (72) Krecmerova, M., Amino Acid Ester Prodrugs of Nucleoside and Nucleotide Antivirals; *Mini-Reviews w Med. Chem.* **2017**, 17, 818-833.
- (73) (a) Mehellou, Y., The ProTides Boom; *ChemMedChem* **2016**, 11, 1114-1116; (b) Thornton, P. J.; Kadri, H.; Miccoli, A.; Mehellou, Y., Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrug Clinical Candidates; *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 10400-10410.

- (74) Abraham, T. W.; Wagner, C. R., A Phosphoramidite-Based Synthesis of Phosphoramidate Amino Acid Diesters of Antiviral Nucleosides; *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **1994**, *13*, 1891-1903.
- (75) McIntee, E. J.; Remmel, R. P.; Schinazi, R. F.; Abraham, T. W.; Wagner, C. R., Probing the Mechanism of Action and Decomposition of Amino Acid Phosphomonoester Amidates of Antiviral Nucleoside Prodrugs *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3323-3331.
- (76) (a) Kim, J.; Chou, T.; Griesgraber, G. W.; Wagner, C. R., Direct Measurement of Nucleoside Monophosphate Delivery from a Phosphoramidate Pronucleotide by Stable Isotope Labeling and LC-ESI-MS/MS; *Molecular Pharmaceutics* **2004**, *1*, 102-111; (b) Drontle, D. P.; Wagner, C. R., Designing a Pronucleotide Stratagem: Lessons from Amino Acid Phosphoramidates of Anticancer and Antiviral Pyrimidines; *Mini-Reviews w Med. Chem.* **2004**, *4* 409-419.
- (77) (a) Chang, S.-I.; Griesgraber, G.; Wagner, C. R., Comparison of the Antiviral Activity of Hydrophobic Amino Acid Phosphoramidate Monoesters of 2',3'-Dideoxyadenosine (ddA) and 3'-Azido-3'-Deoxythymidine (AZT); *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, *20*, 1571-1582; (b) Wagner, C. R.; Chang, S.-I.; Griesgraber, G. W.; Song, H.; McIntee, E. J.; Zimmerman, C. L., Antiviral Nucleoside Drug Delivery via Amino Acid Phosphoramidates; *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **1999**, *18*, 913-919; (c) Wagner, C. R.; McIntee, E. J.; Schinazi, R. F.; Abraham, T. W., Aromatic Amino Acid Phosphoramidate and Triesters of 3'-Azido-3'-Deoxythymidine (AZT) are Non-Toxic Inhibitors of HIV-1 Replication; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 1819-1824.
- (78) Abraham, T. W.; Kalman, T. I.; McIntee, E. J.; Wagner, C. R., Synthesis and Biological Activity of Aromatic Amino Acid Phosphoramidates of 5-Fluoro-2'-deoxyuridine and 1- β -Arabinofuranosylcytosine: Evidence of Phosphoramidase Activity; *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4569-4575.
- (79) Romanowska, J.; Sobkowski, M.; Szymańska-Michalak, A.; Kołodziej, K.; Dąbrowska, A.; Lipniacki, A.; Piasek, A.; Pietrusiewicz, Z. M.; Figlerowicz, M.; Guranowski, A.; Boryski, J.; Stawiński, J.; Kraszewski, A., Aryl H-Phosphonates 17: (N-Aryl)phosphoramidates of Pyrimidine Nucleoside Analogues and Their Synthesis, Selected Properties, and Anti-HIV Activity; *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6482-6491.
- (80) Kolodziej, K.; Romanowska, J.; Stawinski, J.; Boryski, J.; Dąbrowska, A.; Lipniacki, A.; Piasek, A.; Kraszewski, A.; Sobkowski, M., Aryl H-Phosphonates 18. Synthesis, Properties, and Biological Activity of 2',3'-dideoxynucleoside (N-Heteroaryl)phosphoramidates of Increased Lipophilicity; *J. Med. Chem.* **2015**, *100*, 77-88.
- (81) Adelfinskaya, O.; Herdewijn, P., Amino Acid Phosphoramidate Nucleotides as Alternative Substrates for HIV-1 Reverse Transcriptase; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4356-4358.
- (82) (a) van Wijk, G. M. T.; Hostetler, K. Y.; Schlame, M.; van den Bosch, H., Cytidine Diphosphate Diglyceride Analogs of Antiretroviral Dideoxynucleosides: Evidence for Release of Dideoxynucleoside-Monophosphates by Phospholipid Biosynthetic Enzymes in Rat Liver Subcellular Fractions; *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1086*, 99-105 ; (b) van Wijk, G. M. T.; Hostetler, K. Y.; van den Bosch, H., Lipid Conjugates of Antiretroviral Agents: Release of Antiretroviral Nucleoside Monophosphates by a Nucleoside Diphosphate Diglyceride Hydrolase Activity from Rat Liver Mitochondria; *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1084*, 307-310; (c) Hostetler, K. Y.; Stuhmiller, L. M.; Lenting, H. B. M.; van den Bosch, H.;

- Richman, D. D., Synthesis and Antiretroviral Activity of Phospholipid Analogs of Azidothymidine and Other Antiviral Nucleosides *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6112-6117.
- (83) Piantadosi, C.; Marasco, J., C. J.; Morris-Natschke, S. L.; Meyer, K. L.; Gumus, F.; Surles, J. R.; Ishaq, K. S., Synthesis and Evaluation of Novel Ether Lipid Nucleoside Conjugates for Anti-HIV-1 Activity; *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1408-1414.
- (84) Hong, C. I.; Nechaev, A.; Kirisits, A. J.; Vig, R.; West, C. R.; Manouilov, K. K.; Chu, C. K., Nucleoside Conjugates. 15. Synthesis and Biological Activity of Anti-HIV Nucleoside Conjugates of Ether and Thioether Phospholipids; *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1771-1777.
- (85) (a) Bonnaffe, D.; Dupraz, B.; Ughetto-Monfrin, J.; Namane, A.; Huynh Dinh, T., Synthesis of Acyl Pyrophosphates. Application to the synthesis of nucleotide lipophilic prodrugs.; *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 531-534; (b) Bonnaffe, D.; Dupraz, B.; Ughetto-Monfrin, J.; Namane, A.; Henin, Y.; Huynh Dinh, T., Potential Lipophilic Nucleotide Prodrugs: Synthesis, Hydrolysis, and Antiretroviral Activity of AZT and d4T Acyl Nucleotides; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 895-902.
- (86) Ruiz, J. C.; Beadle, J. R.; Aldern, K. A.; Keith, K. A.; Hartline, C. B.; Kern, E. R.; Hostetler, K. Y., Synthesis and Antiviral Evaluation of Alkoxyalkyl-Phosphate Conjugates of Cidofovir and Adefovir; *Antivir. Res.* **2007**, *75*, 87-90.
- (87) Jessen, H. J.; Schulz, T.; Balzarini, J.; Meier, C., Bioreversible Protection of Nucleoside Diphosphates; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8719 -8722.
- (88) (a) Pertenbreiter, F.; Balzarini, J.; Meier, C., Nucleoside Mono- and Diphosphate Prodrugs of 2',3'-Dideoxyuridine and 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrouridine *ChemMedChem* **2015**, *10*, 94-106; (b) Weinschenk, L.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C., Nucleoside Diphosphate Prodrugs: Nonsymmetric DiPPro-Nucleotides; *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 6114; (c) Weinschenk, L.; Gollnest, T.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C., Bis(benzoyloxybenzyl)-DiPPro Nucleoside Diphosphates of Anti-HIV Active Nucleoside Analogues; *ChemMedChem* **2015**; (d) Meier, C., Nucleoside diphosphate and triphosphate prodrugs – An unsolvable task?; *Antivir. Chem. Chemother.* **2017**, *25*, 69-82; (e) Schulz, T.; Balzarini, J.; Meier, C., The DiPPro Approach: Synthesis, Hydrolysis, and Antiviral Activity of Lipophilic d4T Diphosphate Prodrugs; *ChemMedChem* **2014**, *9*, 762-775.
- (89) (a) Camarasa, M.-J., Prodrugs of Nucleoside Triphosphates as a Sound and Challenging Approach: A Pioneering Work That Opens a New Era in the Direct Intracellular Delivery of Nucleoside Triphosphates; *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1885-1889; (b) Weising, S.; Sterrenberg, V.; Schols, D.; Meier, C., Synthesis and Antiviral Evaluation of TriPPPro-AbacavirTP, TriPPProCarbovirTP and their 1',2'-cis-disubstituted Analogues; *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1771-1778; (c) Gollnest, T.; de Oliveira, T. D.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C., Lipophilic Prodrugs of Nucleoside Triphosphates as Biochemical Probes and Potential Antivirals; *Nat. Comm.* **2015**, *6*, 8716-8731; (d) Gollnest, T.; de Oliveira, T. D.; Rath, A.; Hauber, I.; Schols, D.; Balzarini, J.; Meier, C., Membrane-permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5255-5258.
- (90) Baddiley, J.; Todd, A. R., Nucleotides. Part I. Muscle Adenylic Acid and Adenosine Diphosphate; *J. Chem. Soc.* **1947**, 648-651.
- (91) Baddiley, J.; Michelson, A. M.; Todd, A. R., Nucleotides. Part II. A Synthesis of Adenosine Triphosphate; *J. Chem. Soc.* **1949**, 582-586.

- (92) Anand, N.; Clark, V. M.; Hall, R. H.; Todd, A. R., Nucleotides. Part XV. A synthesis of Uridine-5' Pyrophosphate, a Breakdown Product of the Coenzyme "Uridine-diphosphateglucose." *J. Chem. Soc.* **1952**, 3665-3669.
- (93) Baddiley, J.; Hughes, N. A., The Synthesis of Nucleotide Coenzymes; *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **1960**, 22, 157-203.
- (94) Smith, M.; Moffat, J. G.; Khorana, H. G., Carbodiimides. VIII. Observations on the Reactions of Carbodiimides with Acids and Some New Applications in the Synthesis of Phosphoric Acid Esters; *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 6204-6212.
- (95) Smith, M.; Khorana, H. G., Nucleoside Polyphosphates. VI. An Improved and General Method for the Synthesis of Ribo- and Deoxyribonucleoside 5'-Triphosphates; *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 1141-1145.
- (96) (a) Moffatt, J. G.; Khorana, H. G., Nucleoside Polyphosphates. VIII. New and Improved Syntheses of Uridine Diphosphate Glucose and Flavin Adenine Dinucleotide Using Nucleoside-5'-Phosphoramidates; *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 3756-3761; (b) Clark, V. M.; Kirby, G. W.; Todd, A. R., Studies on Phosphorylation. Part XV. The Use of Phosphoramidic Esters in Acylation. A New Preparation of Adenosine-5'-Pyrophosphate and Adenosine-5'-Triphosphate. ; *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 1497-1501.
- (97) (a) Moffatt, J. G.; Khorana, H. G., Nucleoside Polyphosphates. X. The Synthesis and Some Reactions of Nucleoside-5'-Phosphoromorpholidates and Related Compounds. Improved Methods for the Preparation of Nucleoside-5' Polyphosphates; **1961**, 649-658; (b) Moffatt, J. G., A General Synthesis of Nucleoside 5'-Triphosphates; *Can. J. Chem.* **1964**, 599-604.
- (98) (a) Hamilton, C. J.; Roberts, S. M.; Shipitsin, A., Synthesis of a Potent Inhibitor of HIV Reverse Transcriptase; *Chem. Commun.* **1998**, 1087-1088; (b) Hebei, D.; Kirk, K. L.; Kinjo, J.; Kovacs, T.; Lesiak, K.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Torrence, P. F., Synthesis of a Difluoroethylenephosphonate Analogue of AZT 5'-Triphosphate and its Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, 1, 357-360; (c) Kosma, P., Occurrence, Synthesis and Biosynthesis of Bacterial Heptoses; *Curr. Org. Chem.* **2008**, 12, 1021-1039.
- (99) (a) Schaller, H.; Staab, H. A.; Cramer, F., Phosphorylierungsreaktionen mit Salzen der Imidazolylphosphonate und Diimidazolylphosphinate; *Chem. Ber.* **1961**, 1621-1633; (b) Cramer, F.; Schaller, H.; Staab, H. A., Darstellung von Imidazoliden der Phosphorsäure; *Chem. Ber.* **1964**, 1612-1621; (c) Cramer, F.; Neunhoffer, H., Reaktionen von Adenosin-5'-phosphorsäure-imidazolid - eine neue Synthese von Adenosindiphosphat und Flavin-adenin-dinucleotid; *Chem. Ber.* **1965**, 1664-1669.
- (100) Hoard, D. E.; Ott, D. G., Conversion of Mono- and Oligodeoxyribonucleotides to 5'-Triphosphates; *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 1785-1788.
- (101) Cramer, F.; Neunhoffer, H.; Scheit, K. H.; Schneider, G.; Tennigkeit, J., New Phosphorylation Reactions and Protecting Groups for Nucleotides; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, 1, 331.
- (102) Kore, A. R.; Parmar, G., Convenient Synthesis of Nucleoside-5'-Diphosphates from the Corresponding Ribonucleoside-5'-phosphoroimidazole; *Synth. Commun.* **2006**, 36, 3393-3399.

- (103) Mukaiyama, T.; Hashimoto, M., Phosphorylation by Oxidation-Reduction Condensation. Preparation of Active Phosphorylating Reagents; *Bull. chem. Soc. Jpn.* **1971**, *44*, 2284.
- (104) (a) Roy, B.; Depaix, A.; Périgaud, C.; Peyrottes, S., Recent Trends in Nucleotide Synthesis; *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 7854-7897; (b) Burgess, K.; Cook, D., Syntheses of Nucleoside Triphosphates; *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2047-2059.
- (105) Tanaka, H.; Yoshimura, Y.; Jorgensen, M. R.; Cuesta-Seijo, J. A.; Hindsgaul, O., A Simple Synthesis of Sugar Nucleoside Diphosphates by Chemical Coupling in Water; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11531-11534.
- (106) Sun, Q.; Gong, S.; Sun, J.; Liu, S.; Xiao, Q.; Pu, S., A P(V)-N Activation Strategy for the Synthesis of Nucleoside Polyphosphates; *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8417-8426.
- (107) Davisson, V. J.; Davis, D. R.; Dixit, V. M.; Poulter, C. D., Synthesis of Nucleotide 5'-Diphosphates from 5'-O-Tosyl Nucleosides; *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1794-1801.
- (108) Korhonen, H. J.; Bolt, H. L.; Hodgson, D. R. W., A Procedure for the Preparation and Isolation of Nucleoside-5'-Diphosphates; *J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 469-472.
- (109) Yoshikawa, M.; Kato, T.; Takenishi, T., A Novel Method for Phosphorylation of Nucleosides to 5'-Nucleotides; *Tetrahedron Lett.* **1967**, *50*, 5065-5068.
- (110) Ludwig, J., A New Route to Nucleoside 5'-triphosphate; *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *16*, 131-133.
- (111) Gillerman, I.; Fischer, B., An Improved One-pot Synthesis of Nucleoside 5'-Triphosphate Analogues; *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2010**, *29*, 245-256.
- (112) Korhonen, H. J.; Bolt, H. L.; Vicente-Gines, L.; Perks, D. C.; Hodgson, D. R. W., PPN Pyrophosphate: A New Reagent for the Preparation of Nucleoside Triphosphates; *Phosphorus, Sulfur, and Silicon* **2015**, *190*, 758-762.
- (113) (a) Arabshahi, A.; Frey, P. A., A Simplified Procedure for Synthesizing Nucleoside 1-Thiotriphosphates: dATPS, dGTPS, UTPS, and dTTPS *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 150-155; (b) Goody, R. S.; Isakov, H., Simple Synthesis and Separation of the Diastereomers of α -Thio Analogs of Ribo- and Deoxyribo- Di- and Triphosphates; *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3599-3602.
- (114) Kalek, M.; Jemielity, J.; Stepinski, J.; Stolarski, R.; Darzynkiewicz, E., A Direct Method for the Synthesis of Nucleoside 5-methylenebis(phosphonate)s from Nucleosides; *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2417-2421.
- (115) Grunze, H.; Koransky, W., Phosphorylierung von Nucleosiden mit Dichlor-phosphorsäure-anhydrid; *Angew. Chem.* **1959**, *12*, 407.
- (116) Ludwig, J.; Eckstein, F., Rapid and Efficient Synthesis of Nucleoside 5'-O-(1-Thiotriphosphates), 5'-Triphosphates and 2',3'-Cyclophosphorothioates Using 2-Chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one; *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 631-635.
- (117) Hollenstein, M., Nucleoside Triphosphates - Building Blocks for the Modification of Nucleic Acids; *Molecules* **2012**, *17*, 13569-13591.

- (118) Ludwig, J.; Eckstein, F., Synthesis of Nucleoside 5'-O-(1,3-Dithiotriphosphates) and 5'-O-(1,1-Dithiotriphosphates) *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1777-1783.
- (119) Wendicke, S.; Warnecke, S.; Meier, C., Efficient Synthesis of Nucleoside Diphosphate Glycopyranoses; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1500-1502.
- (120) Warnecke, S.; Meier, C., Synthesis of Nucleoside Di- and Triphosphates and Dinucleoside Polyphosphates with cycloSal-Nucleotides; *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3024-3030.
- (121) Cremosnik, G. S.; Hofer, A.; Jessen, H. J., Iterative Synthesis of Nucleoside Oligophosphates with Phosphoramidites; *Angew. Comm.* **2014**, *53*, 286-289.
- (122) (a) Meyers, C. L. F.; Borch, R. F., A Novel Method for the Preparation of Nucleoside Diphosphates; *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3765-3768; (b) Wu, W.; Meyers, C. L. F.; Borch, R. F., A Novel Method for the Preparation of Nucleoside Triphosphates from Activated Nucleoside Phosphoramidates; *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2257-2260.
- (123) Michelson, A. M., The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides (Chapter 3: Chemistry of Nucleotides); **1963**, 98-152.
- (124) (a) Bollmark, M.; Stawinski, J., A Facile Access to Nucleoside Phosphorofluoridate, Nucleoside Phosphorofluoridothioate, and Nucleoside Phosphorofluoridodithioate Monoesters; *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5739-5742; (b) Garegg, P. J.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Stromberg, R., Nucleoside Phosphonates: Part 7. Studies on the Oxidation of Nucleoside Phosphonate Esters; *J. Chem. Soc.* **1987**, *1*, 1269-1273; (c) Kers, I.; Stawinski, J.; Kraszewski, A., A New Synthetic Method for the Preparation of Nucleoside Phosphoramidate Analogues with the Nitrogen Atom in Bridging Positions of the Phosphoramidate Linkage *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1219-1222.
- (125) Sun, Q.; Edathil, J. P.; Wu, R.; Smidansky, E. D.; Cameron, C. E.; Peterson, B. R., One-Pot Synthesis of Nucleoside 5'-Triphosphates from Nucleoside 5'-H-Phosphonates; *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1703-1706.
- (126) (a) Sun, Q.; Liu, S.; Sun, J.; Gong, S. S., An H-Phosphonate Strategy for the Synthesis of 2',3'-dideoxynucleoside Triphosphates and Homodinucleotides; *Chin. Chem. Lett.* **2014**, *25*, 427-430; (b) Sun, Q.; Liu, S.; Sun, J.; Gong, S. S.; Xiao, Q.; Shen, L., One-pot Synthesis of Symmetrical P¹,P²-Dinucleoside-5'-Diphosphates from Nucleoside-5'-H-Phosphonates: Mechanistic Insights Into Reaction Path; *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3842-3845.
- (127) Michelson, A. M.; Todd, A. R., Nucleotides. 32. Synthesis of a Dithymidine Dinucleotide Containing a 3'-5'-Internucleotidic Linkage; *J. Chem. Soc.* **1955**, 2632-2638.
- (128) Sobkowski, M.; Kraszewski, A.; Stawinski, J., Recent Advances in H-Phosphonate Chemistry. Part 1. H-Phosphonate Esters: Synthesis and Basic Reactions; *Top Curr. Chem.* **2015**, *361*, 137-178.
- (129) Stawinski, J.; Kraszewski, A., How To Get the Most Out of Two Phosphorus Chemistries. Studies on H-Phosphonates; *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 952-960.
- (130) Garegg, P. J.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R., Nucleoside H-Phosphonates. V. The Mechanism of Hydrogenphosphonate Diester Formation Using Acyl Chlorides as Coupling Agents in Oligonucleotide Synthesis by the Hydrogenphosphonate Approach; *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **1987**, *6*, 655-662.

- (131) Hata, T.; Sekine, M., Oxidation of Nucleoside Phosphites by Means of 2,2'-Dipyridyl Disulfide via Nucleoside Silylphosphite Intermediates; *Tetrahedron Lett.* **1974**, *45*, 3943 - 3946.
- (132) Holy, A.; Smrt, J.; Sorm, F., Nucleic Acids Components and Their Analogues. LXXI. Oxidation of Nucleoside 5'-Phosphites on Treatment with Halo Acid Derivatives and Hexachloroacetone *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1965**, *30*, 3309-3320.
- (133) Matteucci, M. D.; Caruthers, M. H., The Synthesis of Oligodeoxypyrimidines on a Polymer Support; *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 719-722.
- (134) Lufti, H. G.; Meyers, C. Y., PATAI's Chemistry of Functional Groups. Positive Halogen Compounds; *John Wiley & Sons, Ltd.* **2009**, 1-51.
- (135) Bartoszewicz, A.; Kalek, M.; Stawinski, J., The Case for the Intermediacy of Monomeric Metaphosphate Analogues during Oxidation of H-Phosphonothioate, H-Phosphonodithioate, and H-Phosphonoselenoate Monoesters: Mechanistic and Synthetic Studies; *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5029-5038.
- (136) Stawinski, J., Some Aspects of H-Phosphonate Chemistry; *Handbook of Organophosphorus Chemistry* **1992**, 377-434.
- (137) Kraszewski, A.; Stawinski, J., H-Phosphonates: Versatile Synthetic Precursors to Biologically Active Phosphorus Compounds; *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 2217-2227.
- (138) Romanowska, J.; Szymańska-Michalak, A.; Pietkiewicz, M.; Sobkowski, M.; Boryski, J.; Stawiński, J.; Kraszewski, A., A New, Efficient Entry to Non-Lipophilic H-Phosphonate Monoesters – Preparation of Anti-HIV Nucleotide Analogues *Lett. Org. Chem.* **2009**, *6*, 496-499.
- (139) Stawinski, J.; Thelin, M.; Westman, E.; Zain, R., Nucleoside H-Phosphonates. 12. Synthesis of Nucleoside 3-(Hydrogen-phosphonothioate) Monoesters via Phosphinate Intermediates; *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3503-3506.
- (140) Kraszewski, A.; Stawinski, J., Studies on the New Phosphate Protective Groups; *Nucleic Acid Research (Symposium Series No. 9)* **1981**, 135-139.
- (141) Chmielewski, M. K., Protecting of a Thermolabile Protecting Group "Click-Clack" Approach; *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3742-3745.
- (142) Kraszewski, A.; Stawinski, J., Phosphoryl Tristriazole - A New Phosphorylating Reagent; *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 2935-2936.
- (143) (a) Stoner, C. L.; Troutman, M. D.; Laverty, C. E. In *Cancer Drug Design and Discovery*; Neidle, S., Ed.; Elsevier Ltd.: **2008**, 131-153; (b) Winiwarter, S.; Ridderstroem, M.; Ungell, A.-L.; Andersson, T. B.; Zamora, I. In *Com. Med. Chem. II*; Elsevier Ltd.: **2007**; *5*, 531-554.
- (144) (a) Krakowiak, A.; Fryc, I., Rodzina Białek Triady Histydynowej (HIT) — Aktywność Enzymatyczna a Funkcja Biologiczna; *Postępy Biochemii* **2012**, *58*, 302-313; (b) Krakowiak, A.; Piotrkowska, D.; Kocon-Rebowska, B.; Kaczmarek, R.; Maciaszek, A., The Role of the Hint1 Protein in the Metabolism of Phosphorothioate Oligonucleotides Drugs and Prodrugs, and the Release of H₂S Under Cellular Conditions; *Biochem. Pharmacol.* **2019**, *163*, 250-259.

- (145) Barral, K.; Weck, C.; Payrot, N.; Roux, L.; Durafour, C.; Zoulim, F.; Neyts, J.; Balzarini, J.; Canard, B.; Priet, S.; Alvarez, K., Acyclic Nucleoside Thiophosphonates as Potent Inhibitors of HIV and HBV Replication; *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4281-4288.
- (146) (a) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3-25; (b) Lipinski, C. A., Drug-like Properties and the Causes of Poor Solubility and Poor Permeability *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2000**, *44* 235- 249.
- (147) Caron, G.; Ermondi, G.; Scherrer, R. A. In *Com. Med. Chem. II*; Elsevier Ltd.: **2007**; *5*, 425-452.
- (148) Silverman, R. B. In *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*; Academic Press, Inc.: **1992**.
- (149) Kerns, E. H.; Di, L. In *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*; Elsevier Ltd.: **2016**, 299-306.

Badania opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej prowadzone były w ramach grantu LIDER 4 Narodowego Centrum Badań i Rozwoju: „*Nukleozydo difosforany – nowatorska koncepcja pro-nukleotydów anty-HIV*”, LIDER/041/711/L-4/12/NCBR/2013.



Narodowe Centrum
Badań i Rozwoju

