

### 1. Wprowadzenie i cel pracy

Modyfikacja struktury ważnych związków biologicznie czynnych w sposób ograniczający ich swobodę konformacyjną jest obecnie przedmiotem dużego zainteresowania. Stanowi jedno z podejść do zrozumienia mechanizmu aktywności oraz wpływu poszczególnych konformacji na właściwości farmakologiczne. Jest także strategią poszukiwania doskonalszych leków. Przykładami z najnowszych badań tego ostatniego nurtu mogą być syntezy usztywnionych konformacyjnie modyfikowanych peptydów inhibitorów proteazy HIV<sup>1</sup> wywodzących się z kaprolaktamu, inhibitorów matrycowych metaloproteaz (MMP), enzymów zaangażowanych w szereg chorób m.in. artretyzm i parodontozę<sup>2</sup>, wywodzących się z Idrapilu, inhibitorów ACE (angiotensin converting enzyme), leku regulującego ciśnienie krwi<sup>3</sup> oraz analogów nikotyny i anabazyny, agonistów neuronalnych receptorów acetylocholin (nAChR), związków które na modelach zwierzęcych są aktywne przeciwbólowo i przeciw chorobom Alzheimera i Parkinsona.<sup>4,5</sup> W przykładach powyższych usztywnienie konformacji uzyskiwano głównie przez dodatkowe wiązania kowalentne, w jednym przypadku było ono wynikiem odpowiedniego podstawienia układu wyjściowego.<sup>2</sup>

Liczne dane krystalograficzne nukleozydów oraz ich modyfikowanych analogów wskazują na istnienie interesującej zdolności ich cząsteczek do przyjmowania różnorodnych struktur konformacyjnych w zależności od rodzaju modyfikacji. Natomiast w roztworach zaobserwowano istnienie mieszaniny konformerów będących w równowadze dynamicznej, której położenie może być więcej lub mniej przesunięte w jedną stronę. Stwierdzono drogą intensywnych badań struktur krystalicznych składników kwasów nukleinowych, że pewne stany konformacyjne występują znacznie częściej aniżeli pozostałe.<sup>6,7</sup> Wyniki tych obserwacji pozwoliły na przybliżone określenie czynników kształtujących konformację całej cząsteczki nukleozydu.

Modyfikacje nukleozydów można podzielić na dwa rodzaje:

- wprowadzenie dodatkowych podstawników lub wymiana na inne istniejących grup w obrębie części cukrowej lub/i zasadowej z zachowaniem swobody rotacji wokół wiązań;
- usztywnienie struktury dodatkowymi wiązaniami w obrębie części cukrowej lub pomiędzy częścią cukrową i zasadową (cyklonukleozydy).

Pełen opis kształtu przestrzennego nukleozydów wymaga określenia wartości trzech parametrów konformacyjnych, które można przedstawić za pomocą modeli zakładających stany graniczne. **(Rysunek 1)**

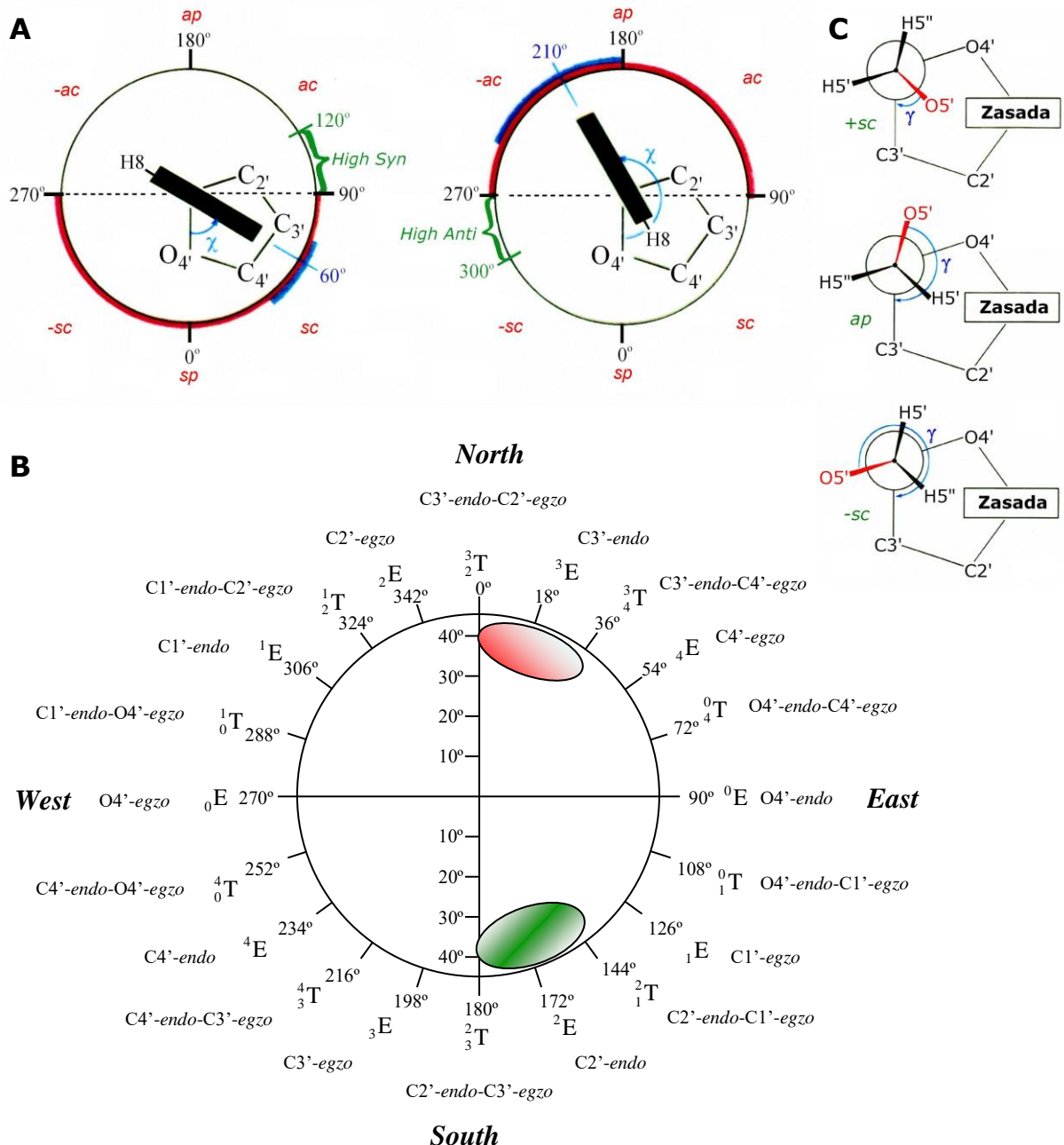
# 1. Wprowadzenie i cel pracy

Parametrami tymi są:

A: kąt torsyjny  $\chi$ , który określa położenie należącego do zasady wiązania N1-C2/C6 (pirymidyny) lub N9-C8/C4 (puryny) względem wiązania C1'-O4' należącego do części cukrowej. Płaszczyzna zasady może przyjmować względem części cukrowej dwie orientacje *syn* lub *anti*. (**Rysunek 1A**)

**Rysunek 1.** Opis kształtu przestrzennego nukleozydów.

A: Rodzaje orientacji zasady względem części cukrowej wokół wiązania glikozydowego. B: Koło pseudorotacji reprezentujące wszystkie stany konformacyjne rybozy. (obszary zacieniowane oznaczają najczęściej obserwowane stany konformacyjne części cukrowej) C: Rodzaje rotamerów wokół wiązania C4'-C5'.



- B: kąt fazowy pseudorotacji  $P$  określający typ pofałdowania pierścienia rybozy oraz amplituda pofałdowania  $\phi$  określająca stopień pofałdowania. Pierścień rybozy może przyjąć konformację kopertową (E, *envelope*) lub półskrzyconą (T, *twist*); wszystkie możliwe konformacje można przedstawić w formie koła pseudorotacji. (**Rysunek 1B**). Koncepcja pseudorotacji została wprowadzona przez C. Altonę i M. Sundaralingama w 1972<sup>6</sup> i do dziś stanowi powszechnie stosowany sposób opisu pofałdowania części cukrowej.
- C: kąt torsyjny  $\gamma$  definiowany przez O5'-C5'-C4'-C3' określający położenie wiązania O5'-C5' względem wiązania C4'-C3' reprezentowany przez trzy rodzaje rotamerów: +synklinalny (-*sc*), antyperiplanarny (*ap*), -synklinalny (-*sc*). (**Rysunek 1C**)

Wysokie prawdopodobieństwo występowania rzadko obserwowanych konformacji *East* (O4'-*endo*) rybozy w ważnych biologicznie układach sugeruje strukturę krystaliczną kompleksu adenozyliny z ludzką kinazą adenozynową.<sup>8</sup> W odróżnieniu, w kompleksie z kinazą adenozynową *Toxoplasma gondii* zaobserwowano bardziej powszechny konformer *North* (C3'-*endo*).<sup>9</sup> Innym przykładem roli konformacji nukleozydów w oddziaływaniu z enzymami jest wpływ orientacji *syn-anti* C2 i C8 podstawionych adenozyliny na aktywność receptora adenozynowego A<sub>3</sub>. Stwierdzono, że C2 pochodna (*anti*) działa jako agonista receptora natomiast C8 (*syn*) jako antagonistę.<sup>10</sup> Zakres badawczy wpływu wymuszonej konformacji nukleozydów/-tydów jest szeroki i ciągle aktualny.<sup>11,12</sup>

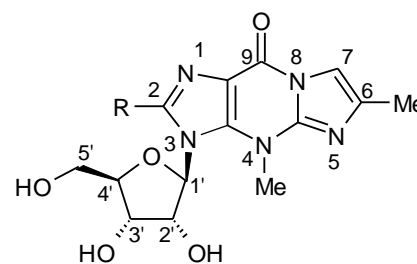
Cyklonukleozydy ze względu na ograniczoną swobodę konformacyjną stanowią od wielu lat interesujący obiekt badań właściwości konformacyjnych i stereochemii nukleozydów, nukleotydów i kwasów nukleinowych<sup>13-20</sup> oraz ich potencjalnej aktywności przeciwwirusowej.<sup>21-27</sup> W ostatnim czasie szczególną uwagę skupiono na wymuszaniu określonych typów pofałdowań części cukrowej za pośrednictwem dodatkowych wiązań spinających wybrane pozycje pierścienia.<sup>17-20</sup> W rezultacie tych badań stwierdzono istnienie zależności między aktywnością biologiczną a obecnością danej konformacji cukru. Wykazano to m.in. na przykładzie karbocyklicznych analogów 3'-azydo-2',3'-dideoksytymidyny (AZT), w której poprzez wprowadzenie dodatkowego mostka metylenowego zamrożono konformację w C2'-*egzo* lub C3'-*egzo*.<sup>21</sup> Stwierdzono silną selektywną czynność przeciwko odwrotnej transkryptazie *HIV-1* (ludzkiego wirusa niedoboru odporności) w przypadku analogu zawierającego konformację C2'-*egzo* w przeciwieństwie do braku aktywności drugiego analogu o konformacji C3'-*egzo*. Podobne wyniki zwiększonej aktywności przeciwko wirusom *herpes simplex* (opryszczki), ludzkiemu wirusowi cytomegalii oraz

## 1. Wprowadzenie i cel pracy

wirusowi Epsteina-Barra uzyskano dla pochodnych nukleozydów purynowych i pirymidynowych zawierających konformację C2'-*egzo* wymuszoną identyczną z w/w podanym przykładem modyfikacją w części cukrowej w przeciwieństwie do braku aktywności odpowiedników C3'-*egzo*.<sup>22-25</sup> Ponadto odnotowano, że oligonukleotydy zawierające usztywniony nukleozyd charakteryzują się zwiększonym powinowactwem do komplementarnych nici DNA i RNA (chimery) oraz stabilnością termodynamiczną.<sup>14-16</sup> Takie chimery mogą stanowić użyteczne narzędzie w badaniu regulacji ekspresji genów.

Jak dotąd brak w literaturze doniesienia o usztywnianiu konformacji części cukrowej nukleozydu drogą odpowiedniego podstawienia na zasadzie.

Do podjęcia badań możliwości takiego podejścia skłoniły mnie uzyskane wcześniej w Pracowni Chemii Nukleozydów Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN wstępne obserwacje poczynione w trakcie badań struktury i właściwości wyozyzny, unikalnego naturalnego nukleozydu z transferowych RNA specyficznych dla fenyloalaniny. Wyozyzna, tricykliczny analog guanozyny- 4,9-dihydro-4,6-dimetylo-9-okso-3-( $\beta$ -D-rybofuranosylo) imidazo[1,2-*a*]puryna (W) wyróżnia się zatłoczeniem przestrzennym w rejonie N4-CH<sub>3</sub> - ryboza i wysoką, w porównaniu z guanozyną ok. 5 rzędów wielkości wyższą, nietrwałością wiązania glikozydowego w warunkach hydrolizy kwasowej.



Wyozyzna R=H

2-Metylowyozyzna R=CH<sub>3</sub>

Wyozyzna jest wyjątkowym nukleozydem występującym w roztworze w zamrożonej konformacji *anti*. Zjawisko to, postulowane wcześniej na podstawie obliczeń<sup>28</sup> potwierdzono technikami NMR.<sup>29,30</sup> Następnie zsyntetyzowano jej analog, 2-metylowyozynę (2-MeW). Okazało się, że wprowadzenie elementu strukturalnego zwykle wymuszającego konformację *syn* nie powoduje znaczącej zmiany konformacji *anti* natomiast drastycznie zmienia konformację cukru. Zidentyfikowano ją jako bardzo rzadką konformację *East* na podstawie 3 dowodów doświadczalnych otrzymanych metodami 1D i 2D-NMR oraz obliczeń za pomocą programu PSEUROT; potwierdzono obliczeniami dynamiki molekularnej.<sup>31</sup> Wyniki dla samej wyozyzny wykazują typową równowagę konformerów *North* i *South*.<sup>30</sup> Z dotychczasowych badań krystalograficznych wiadomo, że zdecydowana większość nukleozydów posiada konformację *North* lub *South* a przykładów konformacji *East* znaleziono tylko ok. 1%. Według naszej wiedzy nie było dotąd w literaturze wzmianki na temat nukleozydu o tej konformacji cukru w roztworze.

Nie znalazłem w literaturze szerszego opracowania dotyczącego syntezy i właściwości konformacyjnych C2 podstawionych pochodnych wyozyiny, jedynie Chattopadhyaya i wsp przedstawili syntezę i dane  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR dla 2-acetylo-2',3',5'-triacetylowyozyiny.<sup>32</sup> Zdecydowana większość dotychczasowych prac koncentrowała się na syntezie i właściwościach C7-podstawionych analogów wyozyiny. W związku z powyższym podjąłem próbę posłużenia się układem imidazo[1,2-a]puryny jako modelem zmian konformacyjnych nukleozydu w roztworze pod wpływem modyfikacji części zasadowej nukleozydu, ze szczególnym uwzględnieniem warunków ograniczonej swobody rotacyjnej wokół wiązania glikozydowego.

Celem głównym, który pragnąłem osiągnąć, było określenie zakresu i ograniczeń nowego podejścia do usztywniającego manipulowania konformacją nukleozydów w roztworze. Planowana droga do jego realizacji wiodła przez rozwiązanie kolejnych zadań którymi były:

- 1: Synteza nowych, różnorodnie C2 podstawionych pochodnych wyozyiny. Zbadanie i optymalizacja różnych wariantów syntezy na kolejnych jej etapach.
2. Charakterystyka C2 podstawionych analogów wyozyiny za pomocą wysokorozdzielczej spektroskopii  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  NMR.
- 3: Zbadanie preferencji konformacyjnych otrzymanych związków w roztworze na podstawie pomiarów wicynalnych stałych sprzężeń, pomiarów efektu NOE oraz analizy zmian przesunięć  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR. Określenie wpływu modyfikacji części zasadowej i cukrowej oraz polarności rozpuszczalnika na parametry konformacyjne pochodnych wyozyiny i jej N4-dezmetyloanalogów.
- 4: Określenie trwałości wiązania glikozydowego C2 podstawionych pochodnych wyozyiny w środowisku kwasowym oraz czynników determinujących stopień trwałości wiązania.

W drodze do realizacji powyższych zamierzeń skupiłem się na poznaniu obecnego stanu wiedzy na następujące tematy:

- Szczegółowa charakterystyka parametrów konformacyjnych opisujących kształt przestrzenny nukleozydów.
- Preferencje konformacyjne niemodyfikowanych nukleozydów w ciele stałym.
- Analiza wpływu rodzaju modyfikacji nukleozydu na konformację w ciele stałym.

Ostatniemu z wymienionych wyżej tematów poświęciłem najwięcej uwagi starając się uwzględnić w analizie dużo najświeższych doniesień.