

---

## 4. Podsumowanie i wnioski

Rozprawa przedstawia wyniki badań nad syntezą, strukturą i właściwościami nowych C2 podstawionych pochodnych wyozyiny (4,9-dihydro-4,6-dimetylo-9-okso-3-( $\beta$ -D-rybofuranozyl)imidazo[1,2-*a*]puryny, **W**) oraz ich syntetycznych prekursorów, pochodnych układu N4-dezmetylowyozyiny (3,9-dihydro-6-metylo-9-okso-3-( $\beta$ -D-rybofuranozyl)-5*H*-imidazo[1,2-*a*]puryny, **V**).

Głównym celem mojej rozprawy było znalezienie odpowiedzi na pytanie jaki jest zakres wpływu modyfikacji części zasadowej wyozyiny na parametry konformacyjne w warunkach ograniczonej swobody rotacyjnej wokół wiązania glikozydowego, czy stwarza ona szersze perspektywy wymuszania w roztworze nukleozydu różnych konformacji części cukrowej. Rozwinięciem podstawowego celu było ustalenie wpływu udziału czynników elektronowych i sterycznych, zmian polarności rozpuszczalnika, obecności grup acetylowych w części cukrowej oraz braku grupy metylowej w pozycji N4.

2-Metylowyozyina, (2-MeW) to związek na którym wcześniej w Pracowni Chemii Nukleozydów stwierdzono nienotowane dotąd w literaturze wymuszenie usztywnienia konformacji części cukrowej nukleozydu pod wpływem odpowiedniego podstawienia na części zasadowej. Został on otrzymany z bardzo niską wydajnością (1% w stosunku do G) w wyniku uciążliwej procedury.<sup>31</sup> Część syntetyczną rozpocząłem więc od udoskonalenia preparatyki 2-MeW. Guanozynę przekształciłem w 8-bromoguanozynę, syntezę prowadziłem w dwóch zasadniczych wariantach:

- a) zastąpienie atomu bromu pożądanym podstawnikiem na poziomie układu purynowego, następnie alkilowanie-cyklizacja do 2-metylo-N4-dezmetylowyozyiny;
- b) alkilowanie-cyklizacja do 2-bromo-N4-dezmetylowyozyiny, następnie podstawienie atomu bromu na poziomie układu tricyklicznego, podejście nowe, dotąd nie odnotowane.

Korzystniejszy wariant b) dostarczył 2-MeW z wydajnością 3% w stos. do G. (**Schemat 3**)

Podobnie jak w przypadku 2-MeW, procedurę syntezy nowych C2 R-podstawionych analogów W starałem się zoptymalizować z punktu widzenia różnych szczegółów preparatywnych. Wymagały one modyfikacji ze względu na różny charakter podstawników.

Otrzymałem pięć nowych pochodnych wyozyiny podstawionych następującymi grupami: metylotio (2-MeSW, **34**), metoksy (2-MeOW, **35**), benzyloksy (2-BnOW, **38**) i okso (N1-Me-2-OW **36**, 2-OW **37**). Początkowo planowałem syntezę tylko 2-MeO i 2-BnOW. Pozostałe pochodne powstały wskutek przebiegu niektórych reakcji w nieoczekiwanym kierunku. Po ich identyfikacji i optymalizacji syntezy, 2-MeSW, N1-Me-2-OW i 2-OW okazały się bardzo

przydatne w dyskusji wpływu czynników elektronowych i przestrzennych na wymuszanie stanów konformacyjnych oraz trwałości wiązania glikozydowego. Związek 2-BnOW okazał się być najtrudniejszym do otrzymania spośród pozostałych pochodnych wyozyzny.

Wykorzystując doświadczenie uzyskane podczas syntezy 2-MeV sprawdziłem możliwość wprowadzenia podstawników na poziomie tricyklicznego układu 2-BrV (**10**). Otrzymałem cztery nowe pochodne N4-dezmetylowyozyzny: 2-BnOV (**21**), 2-MeSV (**22**), 2-MeOV (**23**) i 2-HSV (**25**). Określiłem optymalne warunki dla obu podejść syntezy pochodnych N4-dezmetylowyozyzny w DMF i DMSO. Zaletą przejścia przez 2-BrV jest mniejsza pracochłonność podczas izolacji oraz wyższa wydajność dla 2-MeV i 2-MeOV. Na każdym etapie syntezy strukturę związków przypisałem za pomocą widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR.

Uzyskane wyniki dotychczasowej optymalizacji wydajności syntez poszczególnych 2-R podstawionych pochodnych N4-dezmetylowyozyzny i wyozyzny były bardzo zróżnicowane co pokazuje poniższe zestawienie:

Związek	Wydajność <sup>a</sup>	Związek	Wydajność <sup>a</sup>
2-MeV	39%	2-MeW	3%
2-MeSV	21%	2-MeSW	6.5%
2-MeOV	38%	2-MeOW	10.4%
2-BnOV	47%	2-BnOW	6.1%
-----	-----	N1-Me-2-OW	1.8%
-----	-----	2-OW	6.1%

<sup>a</sup> Wydajność liczona względem guanozyny **1**.

Znaczny spadek wydajności między serią V i W to 3 etapy syntezy- acetylowanie, metylowanie i odblokowanie przebiegające z reakcjami ubocznymi. W przypadku stwierdzenia w ciągu dalszych badań szczególnie interesujących właściwości którejs z pochodnych wyozyzny, indywidualna optymalizacja jej wydajności może odbyć się przez modyfikację tych etapów.

Pochodne triacetylowe 2-RV<sub>ac3</sub> i 2-RW<sub>ac3</sub>, niezbędne etapy pośrednie stosowanej przeze mnie drogi syntetycznej, dostarczyły szeregu ważnych informacji w opisaną dalej analizie konformacyjnej.

Po raz pierwszy przedstawiłem dla C2 podstawionych analogów wyozyzny pełną charakterystykę spektralną za pomocą wysokorozdzielczej spektroskopii  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  NMR. Przypisania sygnałów  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{15}\text{N}$  dokonałem w oparciu o samodzielnie wykonane eksperymenty 2D NMR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$  HSQC,  $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$  HMQC,  $^{15}\text{N}$ , $^1\text{H}$  HMQC i HSQC) w Narodowym Instytucie Chemii w Ljubljanie (Słowenia). Odbyłem tam pod kierunkiem profesora Janeza Plaveca dwa 3-miesięczne staże naukowe wchodzące w skład

5-ego ramowego programu Unii Europejskiej. Strukturę nowych pochodnych N4-dezmetylowozyzny przypisałem na podstawie widm  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR. Przeanalizowałem zmiany przesunięć związane z obecnością podstawników w C2 oraz grupy metylowej w N4. Największe perturbacje obserwowałem w widmach  $^{13}\text{C}$  NMR pochodnych tlenowych wyozyzny (2-MeOW, 2-BnOW, N1-Me-2-OW, 2-OW) w obrębie fragmentu imidazolowego N1-C2-N3-C3a-C9a zasady oraz  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR części cukrowej. Dane spektroskopowe związków podstawionych grupą metylową i metyloiolową wykazują względem siebie wyraźne podobieństwo oraz nieznaczne różnice w porównaniu z wyozyzną. Stwierdziłem, że schemat zmian sekwencji sygnałów  $^{13}\text{C}$  części zasadowej analogów wyozyzny i N4-dezmetylowozyzny pozostaje zgodny z schematem ustalonym dla pary wyozyzna: N4-dezmetylowozyzna niezależnie od rodzaju podstawnika w C2. Uzyskane informacje pozwoliły na wytłumaczenie preferencji konformacyjnych oraz zmian trwałości wiązania glikozydowego.

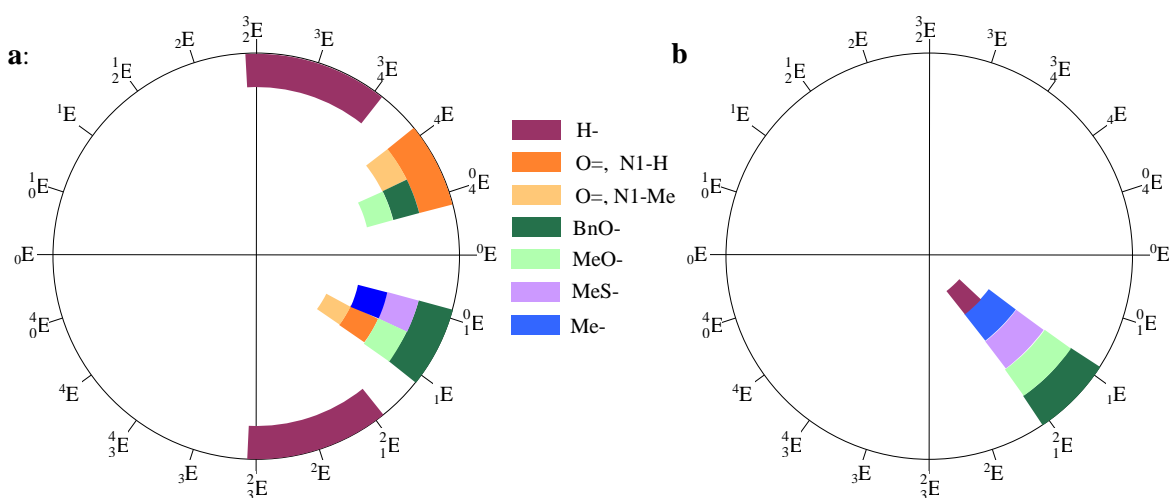
Konformacja wokół wiązania glikozydowego otrzymanych tricyklicznych pochodnych guanozyny wykazuje wyraźną zależność od obecności podstawników w C2 i N4. Na podstawie analizy przesunięć chemicznych  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR ustaliłem, że C2 podstawione pochodne N4-dezmetylowozyzny mają tendencję do przyjmowania orientacji *syn*. Obserwacja ta jest zbieżna z stwierdzonym w nukleozydach purynowych efektem wymuszania orientacji *syn* przez podstawniki w pozycji C8, (odpowiednik pozycji C2 tricyklicznych pochodnych guanozyny). Budowa układu heterocyklicznego tj. puryny *vs* N4-dezmetylowozyzna pozostaje bez wpływu na orientację *syn/anti*, zasadniczym czynnikiem determinującym przyjęcie konformacji *syn* jest obecność podstawnika w pozycji C8/2. Wprowadzenie grupy metylowej w pozycję N4 wyraźnie skierowuje płaszczyznę zasady w kierunku rejonu *anti*. Wynik ten uzyskałem na drodze pomiarów efektu NOE, heteronuklearnych stałych sprzężeń oraz analizy zmian przesunięć chemicznych  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR. Okazało się jednak, że pomimo istnienia zawady przestrzennej, jaką jest grupa metylowa w pozycji N4, hamującej swobodną rotację wokół wiązania glikozydowego, istnieje zróżnicowanie w usytuowaniu płaszczyzny zasady w regionie *anti*. Wraz ze wzrostem wielkości podstawnika w C2 obserwowałem zmniejszenie odległości pomiędzy H2' a protonami grupy metylowej N4, a więc przesunięcie płaszczyzny zasady w stronę regionu *high-syn*, największy efekt zaobserwowałem dla pochodnej 2-BnOWac<sub>3</sub>, najmniejszy dla 2-OWac<sub>3</sub>. Powyższa ocena zmian orientacji wokół wiązania glikozydowego jest dużym przybliżeniem, stąd ograniczam się tylko do stwierdzenia ich kierunku, bez podawania nawet zakresu wartości kąta  $\chi$ .

Przeprowadziłem analizę konformacyjną  $\beta$ -D-rybofuranozy otrzymanych C2 podstawionych pochodnych wyozyzny i N4-dezmetylowozyzny oraz ich triacetylowych odpowiedników na podstawie obliczeń programem PSEUROT. Na podstawie analiz

stwierdziłem, że na preferencje konformacyjne części cukrowej mają wpływ modyfikacje części zasadowej (obecność postawnika C2) jak i części cukrowej (grupy blokujące). Ograniczenie swobody rotacji wokół wiązania glikozydowego do rejonu *anti* w pochodnych wyożyny pozwoliło na ukazanie innej cechy podstawników w pozycji C2 obok znanej dotychczas cechy polegającej na wymuszaniu zmiany orientacji z *anti* na *syn*. Wyożyna wykazuje tendencje do występowania w dwóch typowych rejonach zgrupowanych wokół C3'-*endo* i C2'-*endo*. Stwierdziłem, że część cukrowa tlenowych pochodnych wyożyny (2BnOW, 2-MeOW, N1-Me-2-OW i 2-OW) wykazuje tendencję do zajmowania dwóch stanów konformacyjnych: C1'-*egzo*/C1'-*egzo*-O4'-*endo* oraz C4'-*egzo*/C4'-*egzo*-O4'-*endo*. Suma populacji wyżej wymienionych konformerów wynosi 51-61%. Konformer C1'-*egzo* występuje w największej przewadze w 2-MeOW (30,4%). W pozostałych omawianych pochodnych udział C1'-*egzo* jest mniejszy (19-23%), kosztem wzrostu udziału stanów konformacyjnych C1'-*egzo*-O4'-*endo*, C4'-*egzo*-O4'-*endo*, C4'-*egzo*. Grupa benzyloksy powoduje wyraźny, ok 1.5-2 krotny wzrost populacji konformerów O4'-*endo*-C4'-*egzo* i O4'-*endo*-C1'-*egzo* w porównaniu z pozostałymi tlenowymi analogami. W przypadku 2-MeW i 2-MeSW stwierdziłem zdecydowaną przewagę konformeru O4'-*endo*-C1'-*egzo*. Tak znaczące przesunięcie preferencji konformacyjnych względem wyożyny w C2 podstawionych pochodnych w stronę regionu *East* wynika z oddziaływań sterycznych pomiędzy podstawnikiem C2 a łańcuchem 5'-CH<sub>2</sub>OH. (**Rysunek 16a**)

**Rysunek 16.** Uproszczony opis preferencji konformacyjnych części cukrowej C2-R podstawionych pochodnych **a**: wyożyny, W; **b**: N4-dezmetylwyożyny, V.

Orientacja wokół wiązania glikozydowego **a**: *anti*; **b**: *syn* z wyjątkiem V. Zaznaczone stany konformacyjne dotyczą populacji powyżej 10%



Preferencje konformacyjne części cukrowej N4-dezmetylwyożyny i jej pochodnych (2-MeOV, 2-BnOV, 2-MeV i 2-MeSV) są do siebie zbliżone. Głównymi konformerami są C2'-

*endo-C1'-egzo* i *C1'-egzo* jednak ich sumaryczny udział jest niższy w N4-dezmetrylowoizynie (37%) aniżeli w jej C2 analogach (43-52%). Podobieństwo preferencji konformacyjnych części cukrowej C2 podstawionych analogów N4-dezmetrylowoizyny do odpowiednich pochodnych wyoizyny jest znaczące. Wskazuje to na zachowanie zdolności podstawnika C2 w układzie N4-dezmetrylowoizyny (odpowiednik pozycji C8 puryn) do wpływania na konformację cukru obok powodowania znanego efektu zmiany orientacji *anti* na *syn*. (**Rysunek 16b**) Okazuje się że wymuszanie przewagi określonych stanów konformacyjnych części cukrowej można osiągnąć również na drodze modyfikacji samej zasady bez konieczności zamrażania rotacji wzduż wiązania glikozydowego. Może mieć to znaczenie w badaniu właściwości strukturalnych i termodynamicznych kwasów nukleinowych po wprowadzeniu odpowiednio modyfikowanych nukleozydów.

W pochodnych acetylowych wyoizyny, zawierających podstawnik połączony mostkiem tlenowym, część cukrowa, niezależnie od polarności rozpuszczalnika przyjmuje konformację *C3'-endo-C4'-egzo* i *C4'-egzo*. Udział tego drugiego konformeru jest zdecydowanie większy w przypadku pochodnej zawierającej podstawnik benzyloksy. Wzrost polarności rozpuszczalnika spowodowany zmianą  $\text{CDCl}_3$  na  $\text{DMSO-d}_6$  skutkował wyraźnym wzrostem udziału konformeru *C4'-egzo*. Natomiast w przypadku acetylowych pochodnych zawierających grupę metylową (2-MeWac<sub>3</sub>), i metylotiolową (2-MeSWac<sub>3</sub>), zaobserwowałem niezmienną tendencję do przyjmowania konformerów z regionu *East*, czyli *O4'-endo/O4'-endo-C1'-egzo* w obu rozpuszczalnikach. W porównaniu z nieblokowanymi analogami wyoizyny, obecność grup acetylowych powoduje istotne zmiany pofałdowania z regionu *South* w kierunku *North*.

W przypadku acetylowych C2 podstawionych pochodnych N4-dezmetrylowoizyny (2-MeSVa<sub>3</sub>, 2-MeVa<sub>3</sub>, 2-MeOVA<sub>3</sub>, 2-BnOVA<sub>3</sub>) preferencje pofałdowania części cukrowej są znacząco odmienne od nieblokowanych analogów i są wyraźnie zróżnicowane w obu rozpuszczalnikach. Najczęściej występującymi stanami konformacyjnymi w  $\text{DMSO-d}_6$  są *C4'-egzo*, *O4'-endo-C4'-egzo* i *O4'-endo-C1'-egzo*. W mniej polarnym medium ( $\text{CDCl}_3$ ) preferencje pofałdowania są przesunięte w stronę konformerów zgrupowanych wokół *C3'-endo* i *C2'-endo*.

Powyższe wyniki pokazały, że na pofałdowanie części cukrowej można wpływać przez modyfikację części zasadowej, przy czym charakter oddziaływania zależy od charakteru podstawnika czyli jego właściwości elektronowych i przestrzennych. Drugim czynnikiem okazuje się być obecność grup acetylowych. W przypadku analogów tlenowych, obserwowałem znaczne zmiany w obrębie „lewego” imidazolowego fragmentu zasady wyoizyny, co skłoniło mnie do przypuszczenia odnośnie roli czynników elektronowych w

kształtowaniu pofałdowania. Natomiast konformacja pochodnych zawierających grupę metylową oraz metylotiolową wydaje się być raczej wymuszona czynnikami sterycznymi, a więc odpychaniem między podstawnikiem C2 a częścią cukrową.

Dokonałem także analizy konformacyjnej orientacji wokół wiązania C4'-C5'. Na podstawie stałych sprzężeń H4'-H5' oraz H4'-H5'' określiłem udziały procentowe wszystkich trzech rotamerów wszystkich badanych w niniejszej pracy tricyklicznych pochodnych guanozyny. Stwierdziłem, że obecność podstawnika w C2 znacząco wpływa na obniżenie populacji rotameru *sc* na rzecz wzrostu populacji rotamerów *ap* i *-sc*. Spadek ten jest największy w pochodnych wyożyny i N4-dezmetylowyożyny zawierających tlen lub siarkę w pozycji C2 i wynosi 22-36%. Mniej wyraźny efekt obniżenia populacji rotameru *sc* na rzecz *ap* obserwowałem dla acetylowanych pochodnych wyożyny w CDCl<sub>3</sub>, natomiast w DMSO-d<sub>6</sub> udziały procentowe poszczególnych rotamerów były zbliżone do macierzystego związku Wac<sub>3</sub>.

Przeprowadziłem porównanie trwałości wiązania glikozydowego wyożyny oraz jej pochodnych 2-MeW, 2-MeSW, 2-MeOW, 2-BnOW 2-OW i N1-Me-2-OW. Eksperyment ten polegał na wyznaczeniu czasu t<sub>0,5</sub> reakcji hydrolizy wiązania glikozydowego w środowisku kwaśnym metodą Vierordta wykorzystując różnice w widmach UV nukleozydu i zasady. Stwierdziłem zależność podatności na hydrolizę od charakteru elektronowego podstawnika. Różnica wyznaczonych czasów okazała się być bardzo duża, największą stwierdziłem dla pochodnych 2-oksowożyny (2-OW i N1-Me-2-OW), które były o ok dwa rzędy wielkości dłuższe od t<sub>0,5</sub> wyożyny. 2-Metoksywyożyna i 2-benzylksoxywyożyna okazały się być tylko nieznacznie trwalsze (2 krotnie). Najkrótszym czasem połówkowym charakteryzowały się pochodne z podstawnikiem metylotiolowym (2-MeSW) i metylowym (2-MeW), stosunek czasów t<sub>0,5</sub> W do t<sub>0,5</sub> wyżej wymienionych związków wynosił odpowiednio 4 i 14 (**Tabela 24**, str. 184). Wyniki te wnoszą istotną informację do dyskusji na temat charakteru przyczyn decydujących o nietrwałości wiązania glikozydowego wyożyny i innych nukleozydów typu Y. Przez długi okres przypisywano ją wyłącznie stłoczeniu przestrzennemu grupy N-4-metylowej i części rybozowej. Wyniki powyższych pomiarów w zestawieniu z danymi spektralnymi <sup>13</sup>C i <sup>15</sup>N dały odpowiedź na pytanie o rodzaj czynników decydujących o stabilności wiązania glikozydowego. Wzrost trwałości 2-OW i N1-Me-2-OW jest spowodowany zmianą natury elektronowej pierścienia imidazolowego N1-C2-N3-C3a-C9a. Dla związku 2-MeOW udział czynników elektronowych okazał się być mniejszy natomiast zdecydowany spadek trwałości 2-MeW, 2-MeSW przypisałem udziałowi czynników sterycznych.

W części literaturowej przeanalizowałem zmiany parametrów konformacyjnych 502 struktur krystalicznych nukleozydów (389 związków) w zależności od rodzaju modyfikacji w oparciu o uaktualniony zakres danych literaturowych. Określiłem zakres wpływu poszczególnych zmian strukturalnych na przyjmowane wartości  $P$ ,  $\chi$  i  $\gamma$ . Wykazałem istnienie pewnych zależności pomiędzy parametrami konformacyjnymi przy występowaniu określonych zmian w strukturze.

Kryterium wyboru publikacji była obecność pełnego opisu struktury przestrzennej związku za pomocą w/w parametrów konformacyjnych. W zależności od rodzaju modyfikacji obecnej w strukturze, każdą z nich przypisałem do jednej z trzech grup:

- modyfikacje części zasadowej nukleozydów purynowych i pirymidynowych
- modyfikacje części cukrowej nukleozydów purynowych i pirymidynowych
- modyfikacje polegające na obecności dodatkowych wiązań kowalencyjnych pomiędzy częścią cukrową a zasadową lub w obrębie części cukrowej

W powyższym zestawieniu istnieją nieliczne przykłady struktur, które można było zaliczyć do dwóch grup jednocześnie, wówczas przypisania dokonałem arbitralnie.

Poszczególne parametry konformacyjne zestawiałem w formie tabelarycznej dla ułatwienia analizy ich wzajemnej zależności. W niektórych przypadkach konieczne było obliczenie wartości kąta fazowego pseudorotacji oraz amplitudy pofałdowania na podstawie podanych w literaturze kątów torsyjnych pierścienia rybozy.

Uzyskane wyniki pokazują, że za pomocą odpowiedniego podstawienia na części zasadowej nukleozydu można, w znacznym zakresie, sterować preferencjami konformacyjnymi i doprowadzić do usztywnienia w roztworze części cukrowej układu. Duży wpływ na preferencje konformacyjne i możliwość usztywnienia mają nie tylko właściwości przestrzenne lecz także elektronowe podstawników.

Można mieć nadzieję, że to nowe podejście dostarczy analogów nukleozydów i nukleotydów pozwalających lepiej zrozumieć pewne procesy biologiczne i w pożądanym sposób je ukierunkować.