

**Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk**



Rozprawa doktorska

**Badania syntetyczne i aplikacyjne
nukleozydo (*N*-arylo)amidofosforanów
– potencjalnych pronukleotydów anti-HIV**

mgr Krystian Kołodziej

Promotor: dr hab. Michał Sobkowski, prof. ICHB PAN

Poznań, 2017

Składam serdeczne podziękowania dr. hab. Michałowi Sobkowskiemu za promotorski trud, cenne wskazówki naukowe, życzliwość i wsparcie okazane mi w trakcie powstawania pracy.

Dziękuję również prof. dr. hab. Adamowi Kraszewskiemu, prof. dr. hab. Jackowi Stawińskiemu, dr Joannie Romanowskiej oraz pozostałym pracownikom Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk za możliwość realizacji badań, za wsparcie merytoryczne i praktyczne.

Pracę dedykuję mojej rodzinie, a w szczególności Żonie, Córce, Rodzicom i Dziadkom, za to, że do końca we mnie wierzyli, wspierali i motywowali.

Badania syntetyczne i aplikacyjne nukleozydo (*N*-arylo)amidofosforanów – potencjalnych pronukleotydów anty-HIV

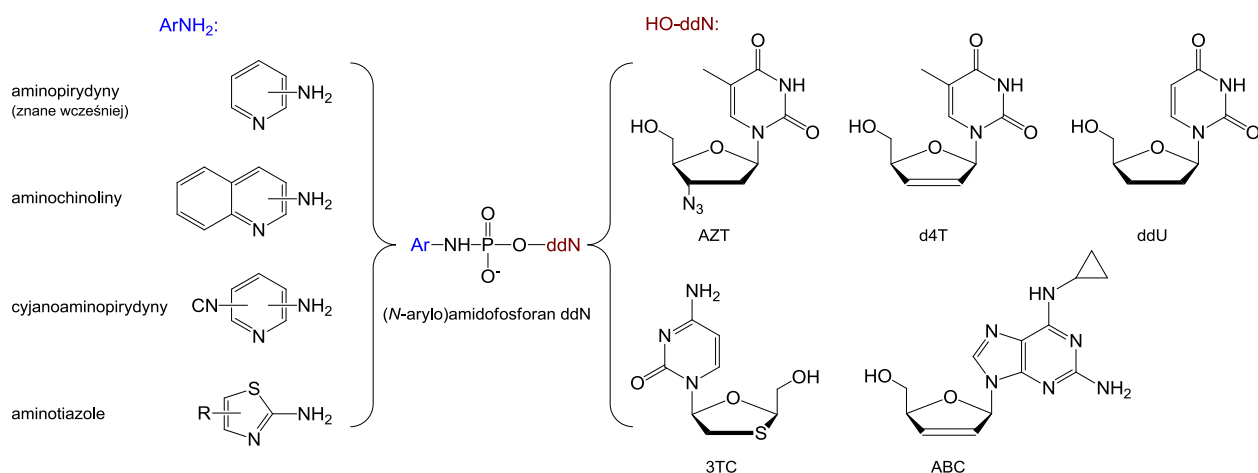
Krystian Kołodziej

Ludzki wirus niedoboru odporności (HIV) należy do niezwykle groźnych patogenów człowieka. Szacuje się, że jest nim zakażonych blisko 40 mln ludzi na świecie, a spośród nich rocznie umiera ok. milion chorych. Jest on wirusem bardzo trudnym do zwalczenia m.in. ze względu na zdolność do szybkiego nabywania oporności na podawane leki. Preparaty stosowane w terapii anty-HIV trzeba przyjmować do końca życia, niezwykle istotne jest więc, aby powodowały one jak najmniejsze skutki uboczne. Z tej przyczyny w wielu laboratoriach od wielu lat trwają prace nad opracowaniem nowych, skuteczniejszych i bezpieczniejszych leków przeciwko temu wirusowi.

W tym aspekcie za szczególnie interesujące uznałem związki o charakterze pronukleotydów, tj. będące nieaktywne w chwili podania, a dopiero wewnątrz komórek ulegające przemianie do związków zdolnych hamować replikację wirusa HIV. Co istotne, produktami komórkowych przekształceń pronukleotydów są przeciwwirusowe analogi nukleotydów, a nie nukleozydów (które są standardowymi lekami przeciw HIV). Umożliwia to osiągnięcie wyższej skuteczności przy jednoczesnym obniżeniu szkodliwości leku.

Celem moich badań były (*N*-arylo)amidofosforany dideoksynukleozydów (takich jak np. AZT), zaprojektowane jako potencjalne pronukleotydy anty-HIV. Są to związki interesujące nie tylko od strony chemicznej, ale też wykazujące obiecujące właściwości przeciwwirusowe (co zostało wykazane wcześniej w grupie prof. Kraszewskiego dla kilku pochodnych pirydynowych). Ze względu na fakt, że kluczowe znaczenie dla aktywności biologicznej danej substancji ma jej zdolność do pokonywania komórkowych błon lipidowych, postawiłem hipotezę, że modyfikacje grupy aryłowej zmieniające parametry fizykochemiczne powiązane z pokonywaniem tej bariery, takie jak pK_a , trwałość, a przede wszystkim lipofilowość, mogą w istotny sposób poprawić aktywność przeciwwirusową tego typu związków.

W tym celu do amidofosforanów dideoksynukleozydów wprowadziłem reszty aromatyczne o szkieletach aminochinolin, cyjanoaminopirydyn i aminotiazolu, wykorzystując jako komponent nukleozydowy AZT, d4T, ddU, 3TC i ABC. Uzyskałem w ten sposób grupę związków umożliwiającą podjęcie prób skorelowania parametrów elektronowo-strukturalnych z własnościami biologicznymi:



Syntezy prowadziłem dwiema podstawowymi metodami, z zastosowaniem chemii *H*-fosfonianów lub wykorzystując fosforanotriamid tristriazolowy. Pracom syntetycznym towarzyszyły badania mechanistyczne, dzięki czemu zidentyfikowałem nową, istotną syntetycznie ścieżkę reakcyjną prowadzącą do produktu. Ponadto dokładna analiza uzyskanych produktów ujawniła nieznane wcześniej zjawisko utraty lotnych komponentów niektórych soli, co – jak się okazało – wpływa znacząco na właściwości produktów. W ramach prowadzonych badań określiłem też progowe wartości zasadowości wyjściowych amin, przy których należy dokonać zmiany strategii syntetycznej na adekwatną dla danej grupy amin.

Dzięki powyższym wynikom możliwa była racjonalna modyfikacja procedur syntetycznych, pozwalająca na istotne skrócenie preparatyki, zwiększenie czystości produktów oraz podwyższenie wydajności, a w niektórych przypadkach w ogóle umożliwiającą otrzymanie nieosiągalnych wcześniej związków.

Otrzymane związki zostały w pełni scharakteryzowane metodami analizy instrumentalnej. Określiłem też ich trwałość, zarówno chemiczną (bufor RPMI i inne), jak i enzymatyczną (wobec surowicy FBS) oraz wyznaczyłem współczynnik podziału woda-oktanol. Ostatnim etapem ich badań były testy biologiczne w celu określenia cytotoksyczności i skuteczności w hamowaniu replikacji wirusa HIV. Zidentyfikowałem w ten sposób kilka związków charakteryzujących się bardzo niską cytotoksycznością oraz niezwykle silną aktywnością przeciwwirusową, w niektórych wypadkach przekraczającą znacznie aktywność AZT. Uważam, że związki te są znakomitymi kandydatami na nowe leki przeciwwirusowe.

Synthetic and application studies on nucleoside (*N*-aryl)phosphoramidates – potential anti-HIV pro-nucleotides

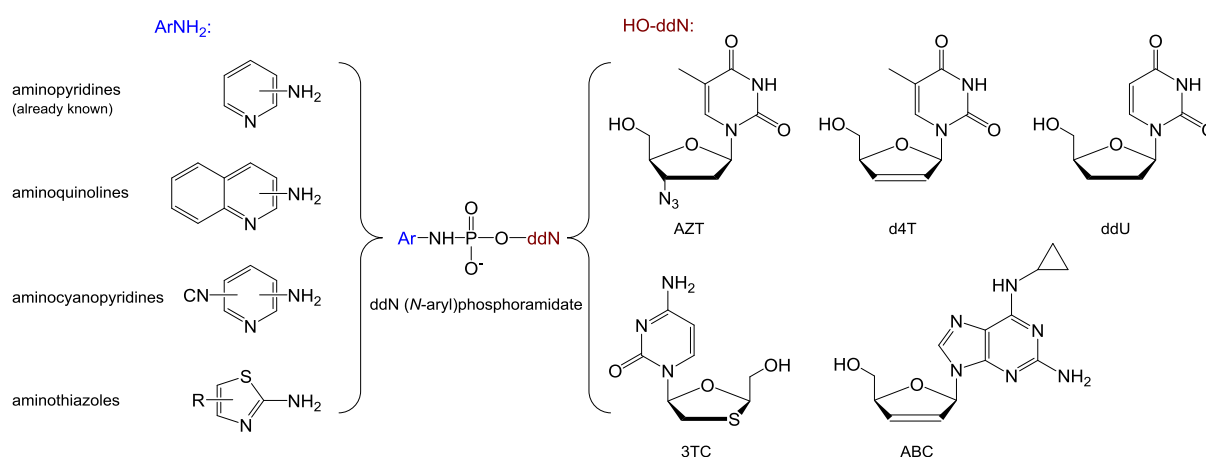
Krystian Kołodziej

Human immunodeficiency virus (HIV) is one of the most dangerous human pathogens. It is estimated that nearly 40 million people worldwide are infected by this virus, with about one million deaths each year. Fighting HIV is very difficult, e.g., due to its ability to acquire rapidly resistance to administered drugs. The preparations used in anti-HIV therapy must be taken life-long, so it is of an utmost importance to keep their side effects as low as possible. For this reason, many labs have been working for many years on developing new, more efficient and safe drugs against this virus.

Taking these into account, I consider that compounds which are particularly worth to be studied are those of pro-nucleotide type, i.e., being inactive at the time of administration, and only within the cells transforming into compounds that are capable to inhibit HIV replication. Importantly, the products of cellular transformations of pro-nucleotides are antiviral analogs of nucleotides, not of nucleosides (as the standard anti-HIV drugs are). This makes it possible to achieve higher efficiency of the drug while its harmfulness is lower.

The topic of my research were studies on (*N*-aryl)phosphoramidates of dideoxynucleosides (such as AZT), designed as potential anti-HIV pro-nucleotides. These are interesting compounds from the chemical point of view as well as showing promising antiviral properties, as demonstrated earlier by the group of prof. Kraszewski for several pyridyl derivatives. Since passing lipid cellular membranes is crucial for biological activity of a given substance, I have formulated a hypothesis that modifications of the aryl group of dideoxynucleoside (*N*-aryl)phosphoramidates that would alter the physicochemical parameters associated with permeation of the lipid barrier, such as pK_a , chemical stability, and, most of all, lipophilicity, may significantly improve the antiviral activity of this type of compounds.

For this purpose, I have designed dideoxynucleoside (*N*-aryl)phosphoramidates bearing aminoquinoline, cyanoaminopyridine, and aminothiazole aryl skeletons, using AZT, d4T, ddU, 3TC, and ABC as the dideoxynucleoside moiety. In this way, I have obtained a group of compounds that allowed attempts to correlate electron and structural parameters with biological properties:



For the syntheses, I have used two general methods, using *H*-phosphonate chemistry or using trisriazolyl phosphate triamide. The synthetic work was accompanied by mechanical studies, which allowed for identification of a new, synthetically significant reaction pathway to the product. In addition, thorough analysis of the obtained products revealed the previously unknown phenomenon of the loss of volatile components of some salts, which – as it turned out – significantly affected the properties of the products. As part of my research, I have also determined the threshold values of the amine basicity at which the synthetic strategy should be changed to be appropriate for a given group of amines.

The above results allowed a rational modification of the synthetic procedures, which resulted in significantly shorter procedures, higher purity of the products, and improved efficiency, or in some cases even the possibility to obtain the so far unreachable compounds. The compounds obtained were fully characterized by instrumental analysis. I have also determined their stability, both chemical (in RPMI and other buffers), and enzymatic (against FBS), and I have determined the water-octanol partition coefficient. The final stage of the studies were biological tests to determine the cytotoxicity and efficacy in inhibiting replication of HIV. I have identified several compounds with very low cytotoxicity and extremely strong antiviral activity, in some cases exceeding significantly AZT activity. In my opinion, these compounds are excellent candidates for new antiviral drugs.

Spis treści

I. PRACE NAUKOWE OPUBLIKOWANE W TRAKCIE WYKONYWANIA NINIEJSZEJ ROZPRAWY.....	9
II. SKRÓTY STOSOWANE W PRACY.....	10
III. WSTĘP LITERATUROWY	12
1. Wprowadzenie.....	12
2. Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji wirusa HIV	12
3. Pronuklotydy	16
4. Estry fosforanowe analogów nukleozydów	19
4.1 Wprowadzenie.....	19
4.2 Grupy maskujące usuwalne na drodze chemicznej	19
4.2.1 Fosforanotriestry z grupami alifatycznymi i aryłowymi	20
4.2.2 Fosforanotriestry cyklosalidenianowe (cycloSal)	22
4.3 Grupy maskujące usuwalne na drodze enzymatycznej	24
4.3.1 Fosforanotriestry S-acylo-2-tioetylowe (SATE)	24
4.3.2 Fosforanotriestry ditiodietylowe (DTE).....	27
4.3.3 Fosforanotriestry piwaloksymetylowe (POM).....	28
4.3.4 Fosfonianodiestry izopropylksykarbonyloksymetylowe (POC)	29
4.3.5 Fosforanotriestry para-acyloksybenzylowe (PAOB).....	30
4.3.6 Mieszane fosforanotriestry arylo-SATE.....	32
4.4 Amidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów.....	34
4.4.1 Diestry amidofosforanowe typu $(ddNO)(R^1O)P(O)NR^2$ ($R_1 =$ alkil; $R^2 =$ reszta aminokwasu)	34
4.4.2 Diestry amidofosforanowe typu $(ddNO)(R^1O)P(O)NR^2$ ($R^1 =$ aryl; $R^2 =$ reszta aminokwasu)	37
4.4.3 Diestry amidofosforanowe typu $(ddNO)(R^1O)P(O)NR^2$ ($R^1 =$ tBuSATE; $R^2 =$ reszta aminokwasu lub aminy)	46
4.4.4 Diestry amidofosforanowe typu $(ddNO)(R^1O)P(O)NR^2$ ($R^3 =$ [utleniacz]; $R^2 =$ chloroalkil)	49
4.4.5 Monoestry amidofosforanowe typu $(ddNO)P(O_2^-)NR$ ($R =$ reszta aminokwasu lub aminy)	50
4.5 Fosforanodiestry zawierające grupy lipofilowe	56
4.6 Podsumowanie	58
VI. WYNIKI I DYSKUSJA.....	59
1. Wprowadzenie.....	59
(a) [<i>N</i> -(Chinolinylo)]amidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów	61

(b) [<i>N</i> -(Cyjanopirydylo)]amidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów	63
(c) [<i>N</i> -(Tiazylo)]amidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów	63
2. Metody syntezy <i>N</i> -arylowych amidofosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów	66
2.1 Synteza 5'- <i>H</i> -fosfonianów 2',3'-dideoksynukleozydów	68
2.1.1 Fosfonylacja nukleozydów za pomocą <i>H</i> -fosfonianu difenylu (metoda A)	68
2.1.2 Fosfonylacja nukleozydów za pomocą <i>H</i> -fosfonianu (9 <i>H</i> -fluoren-9-yl)metylu (metoda B) .	70
2.2 Kondensacja <i>H</i> -fosfonianów typu 81 z aminami heteroaromatycznymi. Badania mechanistyczne	71
2.3 Synteza amidofosforanów typu 78 z <i>H</i> -fosfonianów typu 82. Rozwiązania syntetyczne	75
2.4 Potencjalne zastosowania mieszanych pirofosforanów typu 93	76
2.5 Kondensacja <i>H</i> -fosfonianów typu 81 z aminami heteroaromatycznymi o dużej zasadowości.	78
2.6 Synteza amidofosforanów typu 78 z zastowaniem fosforanotriamidu tristriazolowego.	81
2.7 Utrata kanionu trietyloamoniowego w nukleozydo (<i>N</i> -aryloamido)fosforanach.	83
2.8 Trwałość i ścieżki rozpadu amidofosforanów	94
2.9 Lipofilowość i współczynnik podziału – wprowadzenie	100
2.10 Lipofilowość (<i>N</i> -arylo)amidofosforanów dideoksynukleozydów	102
2.11 Aktywność biologiczna (<i>N</i> -arylo)amidofosforanów dideoksynukleozydów	106
2.12 Podsumowanie	113
V. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	117
VI. LITERATURA	132

I. PRACE NAUKOWE OPUBLIKOWANE W TRAKCIE WYKONYWANIA NINIEJSZEJ ROZPRAWY.

1. Romanowska, J.; Sobkowski, M.; Szymanska-Michalak, A.; **Kolodziej, K.**; Dabrowska, A.; Lipniacki, A.; Piasek, A.; Pietrusiewicz, Z. M.; Figlerowicz, M.; Guranowski, A.; Boryski, J.; Stawinski, 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.
2. **Kolodziej, K.**; Romanowska, J.; Stawinski, J.; Boryski, J.; Dabrowska, 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”, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *100*, 77–88.
3. **Kolodziej, K.**; Romanowska, J.; Stawinski, J.; Kraszewski, A.; Sobkowski, M., “The case of triethylammonium cation loss during purification of certain nucleotide analogues: a cautionary note”, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 1775–1780.

II. SKRÓTY STOSOWANE W PRACY

- AIDS – zespół nabytego niedoboru odporności (ang. *acquired immunodeficiency syndrome*)
- ABC – abakawir
- ABCMP – 5'-monofosforan abakawiru
- AZT – 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
- AZTDP – 5'-difosforan AZT
- AZTMP – 5'-monofosforan AZT
- AZTTP – 5'-trifosforan AZT
- cycloSal – grupa cyklosalidenianowa
- CEM-SS – komórki szpiku kostnego, krwi, układu krwiotwórczego i tkanki limfatycznej
- CEM/O – komórki zainfekowane wirusem HIV typu dzikiego
- CEM/dCK⁻ – komórki z deficytem kinazy deoksycytydynamy
- CEM/TK⁻ – komórki z deficytem kinazy tymidynamy
- CBVMP – 5'-monofosforan karbowiru
- CBVTP – 5'-trifosforan karbowiru
- CC₅₀ – stężenie cytotoksyczne (ang. *cytotoxic concentration*) powodujące zmiany cytopatogeniczne w 50% zdrowych komórek
- d4T – 2',3'-didehydro-3'-deoksytymidyna
- d4TTP – 5'-trifosforan 2',3'-didehydro-3'-deoksytymidyna
- ddA – 2',3'-dideoksyadenozyna
- ddI – 2',3'-dideoksyinozyna
- ddNMP – 5'-monofosforan 2',3'-dideoksynukleozydu
- ddU – 2',3'-dideoksyurydyna
- DPCP – chlorofosforan difenylu
- DTE – grupa ditioetylowa
- EC₅₀ – stężenie efektywne (ang. *effective concentration*) powodujące 50% zahamowanie replikacji wirusa
- FBS/FCS – surowica z płodów bydłych/cielęcych (ang. *fetal bovine/calf serum*)
- FluMe – (9H-fluoren-9-yl)ometyl

- HAART – wysoce aktywna terapia antyretrowirusowa (ang. *highly active antiretroviral therapy*)
- HBV – wirus zapalenia wątroby typu B (ang. *hepatitis B virus*)
- HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High Performance Liquid Chromatography*)
- HRMS – wysokorozdzielcza spektrometria mas (ang. *High Resolution Mass Spectrometry*)
- NMP – 5'-monofosforan nukleozydu
- NTP – 5'-trifosforan nukleozydu
- FUdR – 3'-deoksy-5-fluorourydyna
- PBMC – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (*peripheral blood mononuclear cells*)
- PLE – esteraza z wątroby świńskiej (ang. *pig liver esterase*)
- PMPA – (R)-9-[2-(fosfonylometoksy)propylo]adenina (ang. *(R)-9-[2-(phosphonyl-methoxy)propyl]adenine*)
- PMEAs – 9-[2-(fosfonylometoksy)etylo]adenina (ang. *(R)-9-[2-(phosphonylmethoxy)-ethyl]adenine*)
- PvCl – chlorek piwaloilu (chlorek trimetyloacetylu)
- Py – pirydyna
- RPMI-1640 – pożywka wg standardu *Roswell Park Memorial Institut*
- RT – odwrotna transkryptaza (ang. *reverse transcriptase*)
- SATE – grupa S-acylo-2-tioetylowa
- SI – indeks selektywności (ang. *selectivity index*); $SI = CC/EC$
- SIV – małpi wirus niedoboru odporności (ang. *Simian Immunodeficiency Virus*)
- $t_{1/2}$ – czas połowicznego rozkładu
- 3TCTP – 5'-trifosforan lamiwuidyny
- TDF – fumaran dizoproksalu tenofowiru
- TFV – alafenamid tenofowiru (ang. *tenofovir alafenamide*)
- TFVp – 5'-monofosforan TFV
- TFVpp – 5'-difosforan TFV

III. WSTĘP LITERATUROWY

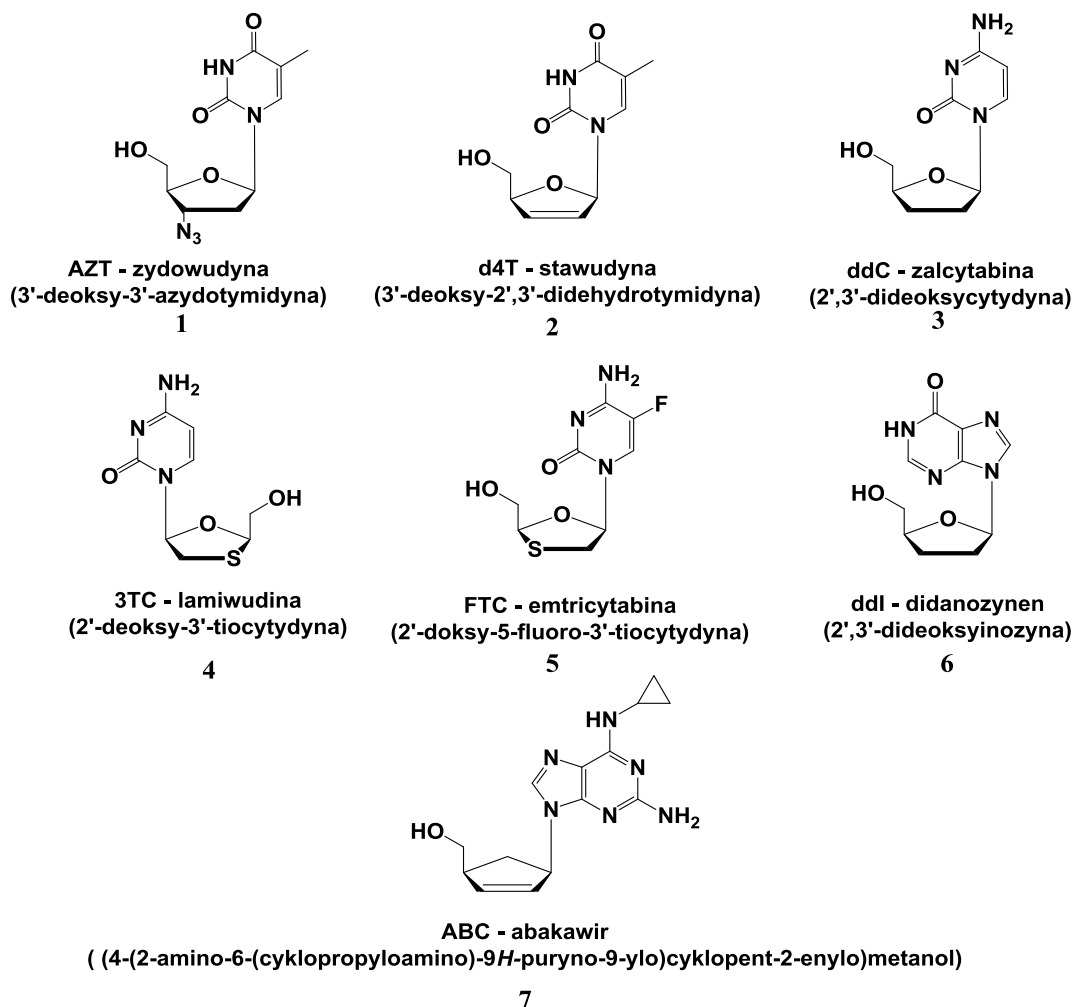
1. Wprowadzenie

Ludzki wirus niedoboru odporności (HIV, z ang. *human immunodeficiency virus*) należy do rodziny retrowirusów. Jego materiał genetyczny stanowi jednoniciowy RNA, który w trakcie namnażania wirusa zostaje przepisany na DNA dzięki obecności wirusowej odwrotnej transkryptazy. Proces ten nie występuje w zdrowych komórkach i jest dość oczywistym celem terapii przeciw temu wirusowi. Jego cechą jest jednak szybka replikacja i duża zmienność genetyczna, co sprawia, że jest on patogenem wyjątkowo trudnym do zwalczania. Pierwszym lekiem zastosowanym w terapii AIDS, który prowadził do wyraźnego polepszenia stanu zdrowia chorych, była 3'-deoksy-3'-azydotymidyna (AZT). Terapia z użyciem tego związku miała jednak istotne mankamenty, z których najpoważniejszymi było stosunkowo szybkie powstawanie lekoopornych form wirusa w wyniku jego dużej zmienności genetycznej, a także występowanie poważnych efektów ubocznych. Z kolei inne leki nie dorównywały skutecznością AZT. Przełomem w leczeniu pacjentów zakażonych wirusem HIV okazała się terapia HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*), która umożliwiła długofalowe zahamowanie replikacji wirusa HIV. W podejściu tym stosuje się jednocześnie leki przeciwretrowirusowe o odmiennym mechanizmie działania. Najczęściej są to dwa nukleozydowe inhibitory syntezy DNA oraz nienukleozydowy inhibitor proteazy lub inhibitor odwrotnej transkryptazy (RT, z ang. *Reverse Transcriptase*). Efektem tej terapii jest nie tylko zahamowanie namnażania wirusa, lecz także uniemożliwienie powstawania jego lekoopornych form. Dodatkowo, na skutek synergicznego działania podawanych leków, uzyskuje się podwyższenie aktywności anty-HIV, co pozwala na ograniczenie dawki leku. Pomimo znacznie lepszych wyników w stosunku do monoterapii, metoda HAART jest ciągle daleka od doskonałości. Dużą niedogodnością jest konieczność przyjmowania leków do końca życia chorego. Pojawiają się również powikłania i działania niepożądane, takie jak zespół lipodystrofii, kwasica mleczanowa, zaburzenia w gospodarce glukozą, zmiany hepatotoksyczne. Dlatego też w dalszym ciągu poszukiwane są leki bardziej aktywne i mniej szkodliwe, które można by stosować w niższych dawkach i podawać je z mniejszą częstotliwością.

2. Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji wirusa HIV

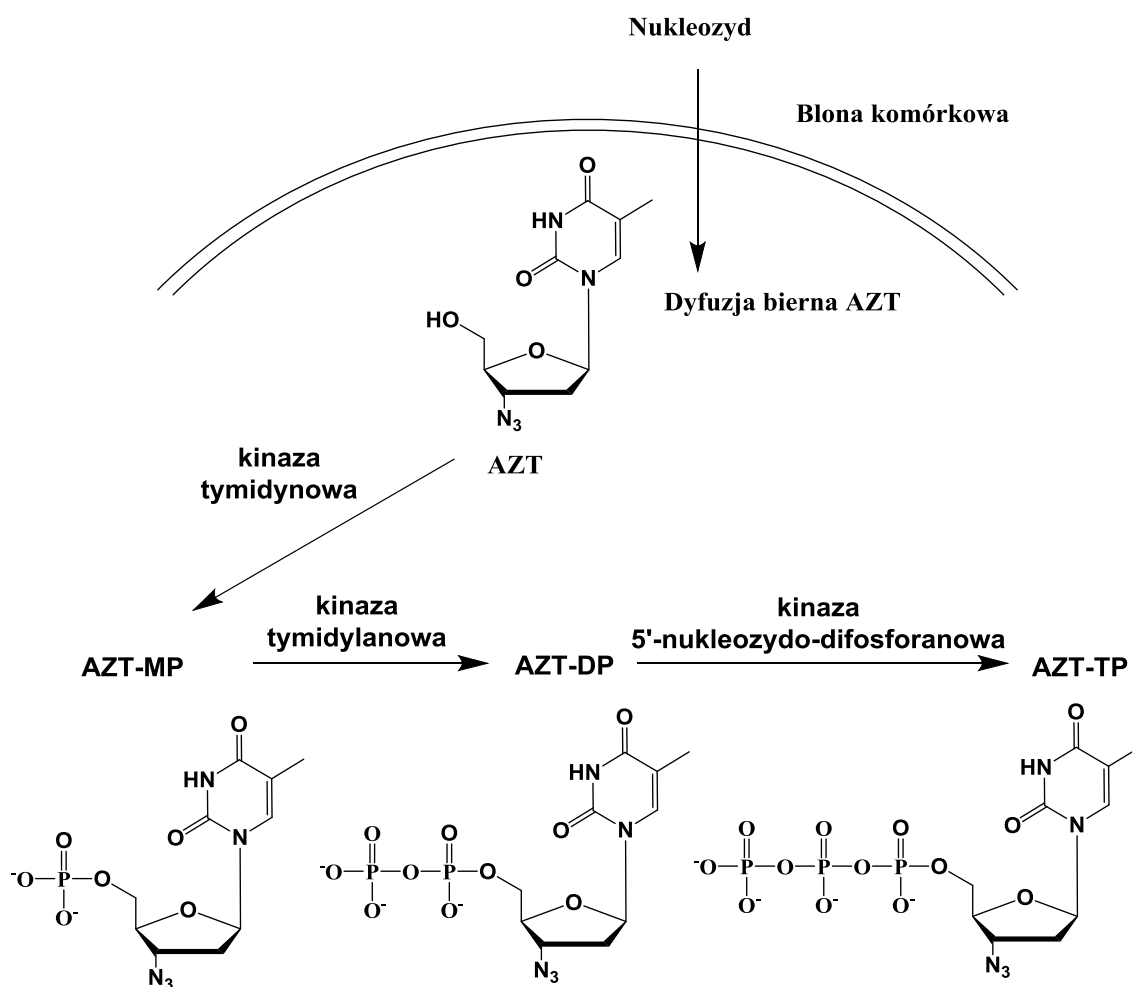
Obecnie amerykański FDA (*Food and Drug Administration*) dopuścił do zastosowania klinicznego w terapii anty-HIV siedem modyfikowanych nukleozydów (1–7, Rys. 1)^{1, 2}.

Wszystkie one mają strukturę 2',3'-dideoksynukleozydów i po fosforyzacji są mylnie rozpoznawane przez wirusową odwrotną transkryptazę jako nukleotydy i włączane do rosnącego łańcucha DNA, po czym, ze względu na brak grupy 3'-hydroksylowej, powodują jego przedwczesną terminację¹. Aby analogi nukleozydów stały się substratami dla maszyny genetycznej, muszą ulegać trzystopniowej fosforylacji w komórkach gospodarza przy udziale odpowiednich kinaz komórkowych, kolejno do 5'-monofosforanów, 5'-difosforanów i wreszcie do 5'-trifosforanów, które są właściwymi inhibitorami odwrotnej transkrypcji, gdyż to one są włączane przez wirusową odwrotną transkryptazę na koniec rosnącego łańcucha DNA, co blokuje jego dalszą syntezę, a tym samym uniemożliwia namnażanie wirusa (co niezwykle istotne, związki te nie są natomiast substratami dla ludzkiej polimerazy DNA). Możliwy jest również drugi sposób działania, czyli inhibicja kompetycyjna, polegająca na blokowaniu centrum aktywnego HIV RT przez 5'-trifosforan analogu nukleozydu, co ogranicza dokowanie właściwego nukleotydu i hamuje proces odwrotnej transkrypcji³.



Rysunek 1. Nukleozydowe inhibitory RT stosowane w terapii HIV

Pierwszym wprowadzonym do leczenia analogiem nukleozydów typu 2',3'-dideoksy była wspomniana już 3'-deoksy-3'-azydotymidyna. Zawiera ona zamiast grupy 3'-hydroksylowej grupę azydkową i jest tzw. prolekiem, gdyż aby mogła działać jako inhibitor replikacji wirusa HIV-1, musi zostać wstępnie ufosforylowana do formy aktywnej biologicznie, czyli trifosforanu (AZTTP). Jej skuteczność zależy od czterech głównych czynników: zdolności wnikania do komórki, ufosforylowania przez odpowiednie kinazy do trifosforanu oraz inhibicji kompetycyjnej i inkorporacji w wirusowy DNA.



Schemat 1. Wewnątrzkomórkowy metabolizm AZT

AZT wnika do komórki łatwo na drodze dyfuzji biernej⁴ co nie jest zaskakujące ze względu na brak ładunku i obecność lipofilowej grupy azydkowej (współczynnik podziału oktanol-woda, $\log P = 1,26$ dla AZT, podczas gdy dla niemodyfikowanej tymidyny $\log P = 0,064^4$). Wewnątrz komórki musi ulec trzystopniowej fosforylacji przez enzymy komórkowe⁵

(Schemat 1). W pierwszym, stosunkowo szybkim etapie utworzony zostaje 5'-monofosforan AZT (AZTMP) przy udziale kinazy tymidynowej (TK, z ang. *thymidine kinase*), która jest normalnie odpowiedzialna za syntezę 5'-monofosforanu naturalnie występującej w komórce tymidyny (TMP). Kolejny krok, przekształcenie AZTMP w 5'-difosforan AZT (AZTDP) przez kinazę tymidylanową, jest bardzo powolne i jest to etap limitujący tworzenie 5'-trifosforanu AZT (AZTTP), gdyż ostatni etap, tj. fosforylacja AZTDP jest ponownie stosunkowo szybki. Kinetyka ta sprawia, że następuje gromadzenie się monofosforanu w komórce i szybkie wysycenie nim kinazy tymidylanowej, czego skutkiem jest sytuacja, w której zwiększenie stężenia AZT powoduje jedynie wzrost stężenia AZTMP, ale nie AZTTP. Szkodliwe efekty uboczne przyjmowania AZT są między innymi wynikiem wysokiego stężenia AZTMP w komórkach i zablokowania przez niego kinazy, co powoduje zahamowanie naturalnego procesu fosforylacji 5'-monofosforanu tymidyny⁶.

AZT jest jednym z najczęściej stosowanych analogów nukleozydowych wykorzystywanych w terapii anty-HIV, gdyż ma najwyższą aktywność ($EC_{50} \approx 0,002 \mu M$) spośród 2',3'-dideoksynukleozydów. Korzystny efekt jego działania ujawnia się jednak dopiero po dłuższym czasie, a co gorsza, wykazuje on toksyczność dla komórek szpiku kostnego, skutkującą wywoływaniem anemii, neuropatii oraz miopatii⁷. Ponadto ze względu na krótki okres półtrwania leku w organizmie ($t_{1/2} \sim 1$ h) wymagane jest częste jego podawanie. Szczególnie szybko AZT eliminowany jest z mózgowia, w efekcie czego nie jest on w stanie osiągnąć w tkance mózgowej stężenia koniecznego dla skutecznej inhibicji wirusa⁸.

W przypadku 2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidyny (d4T), etapem limitującym jego aktywność jest proces pierwszej fosforylacji do 5'-monofosforanu, który przebiega ok. 500 razy wolniej niż w przypadku AZT. W efekcie stężenie 5'-trifosforanu d4T jest stosunkowo niskie, co w konsekwencji powoduje, że aktywność leku nie jest tak wysoka jak AZT^{9, 10}.

2'-Deoksy-3'-tiocytydyna (lamiwudyna, 3TC), podobnie jak AZT, jest metabolizowana wewnątrzkomórkowo do 5'-trifosforanu, którego $t_{1/2}$ jest jednak znacznie większe, gdyż wynosi 10,5–15,5 h. Jest on substratem dla RT i terminuje syntezę wirusowego DNA, jest jednak stosunkowo słabym inhibitorem odwrotnej transkryptazy HIV¹¹. 3TC w badaniach *in vitro* wykazuje małą cytotoksyczność wobec limfocytów krwi obwodowej i komórek szpiku. Jest wykorzystywana do zwalczania nie tylko HIV, ale i HBV (odpowiedzialnego za wirusowe zapalenie wątroby typu B¹²). Ponieważ monoterapia prowadzi do szybkiego namnożenia lekoopornych form wirusa HIV^{13, 14}, dlatego 3TC jest podawany zwykle w terapii wielolekowej HART, w kombinacji z AZT lub ABC¹⁵.

Mechanizmy aktywności przeciwwirusowej pozostałych analogów nukleozydowych, nie różnią się znacząco, jednak trzeba zwrócić uwagę na fakt, że każdy związek ma swoiste właściwości metaboliczne i farmakologiczne

3. Pronukleotydy

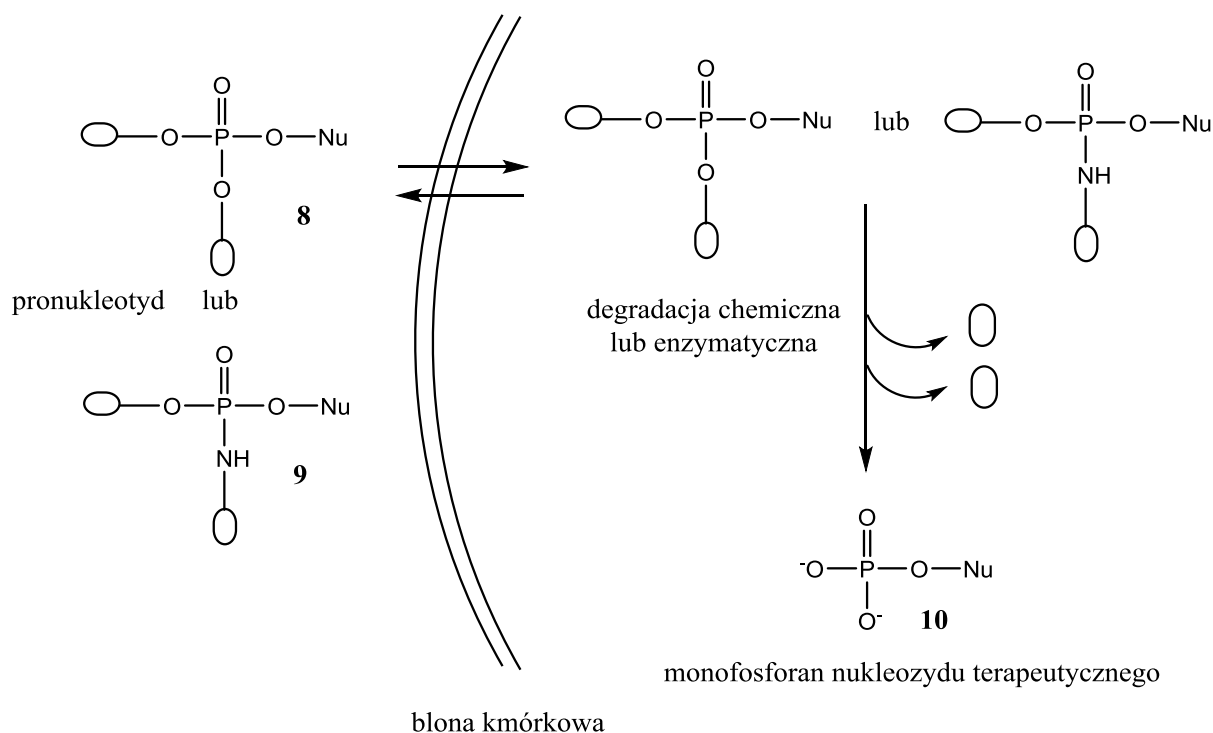
Czynnikiem ograniczającym skuteczność 2',3'-dideoksynukleozydów jako inhibitorów odwrotnej transkryptazy jest ich zależność od kinaz komórkowych. Powstanie aktywnej formy zależy w dużej mierze od enzymów fosforylujących nukleozydy, zwłaszcza kinazy tymidynowej. W organizmach część komórek wykazuje jednak niską aktywność TK (tzw. komórki TK⁻) i w nich aktywność analogów tymidyny jest bardzo słaba. Jedną z koncepcji zwiększenia efektywności działania dideoksynukleozydów jest ominiecie pierwszego etapu fosforylacji, zależnego od kinaz komórkowych, i stosowanie ich w formie ufosforylowanej. W medium fizjologicznym (krew, pH = 7,4), fosforany nukleozydów występują jako aniony i są zbyt hydrofilowe, by pokonać bogatą w lipidy błonę komórkową. Ponadto obecność fosfataz we krwi i na powierzchni komórek powoduje ich szybką hydrolizę do nukleozydów. Pokonanie tych problemów jest jednak możliwe poprzez podawanie ich w formie proleków, noszących w tym wypadku nazwę *pronukleotydów*.

Pronukleotydy to analogi nukleotydów, których reszta fosforanowa zmodyfikowana jest różnymi grupami ochronnymi. W takiej formie są one nieaktywne biologicznie. Po chemicznych i enzymatycznych przemianach w organizmie chorego przekształcane są one w związki typu nukleotydów, będącymi substratami dla enzymów i wywołującymi pożądany efekt terapeutyczny (Schemat 2).

Zastosowanie pronukleotydów pozwala na wyeliminowanie pierwszego etapu aktywowania proleku – fosforylacji analogu nukleozydu, często decydującego o efektywnym przekształcaniu w docelowy 5'-trifosforan, który może zostać następnie wbudowany w rosnący łańcuch kwasu nukleinowego. Warto zwrócić uwagę, że zjonizowana grupa fosforanowa, której obecność uniemożliwia wnikanie nukleotydu do komórki, w strategii pronukleotydowej generowana jest w jej wnętrzu i nie pozwala na eliminację leku na drodze dyfuzji poza komórkę.

Klasycznymi typami pronukleotydów są obojętne elektrycznie triestry (8) lub amidoestry (9) fosforanowe, dla których opisano szeroką gamę grup maskujących. W takiej postaci mają one szanse przenikać przez błonę komórkową, a wewnątrz komórki mogą ulegać chemicznym lub enzymatycznym przemianom do odpowiednich 5'-fosforanów monoestrów (10). Idealny pronukleotyd powinien być stabilny w środowisku fizjologicznym, dobrze

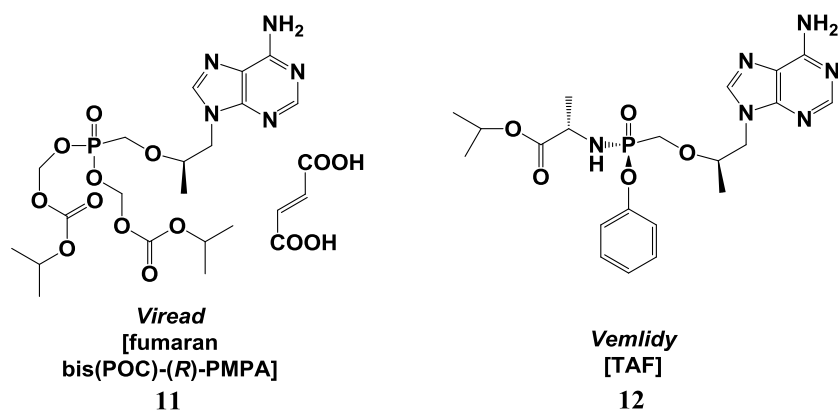
rozpuszczalny w wodzie, a także na tyle lipofilowy, aby penetrować błonę komórkową, natomiast po wnikięciu do komórki powinien ulegać efektywnemu przekształceniu do formy aktywnej biologicznie. Ponadto grupy maskujące muszą być tak dobrane, aby produkty uboczne hydrolizy nie były toksyczne¹⁶.



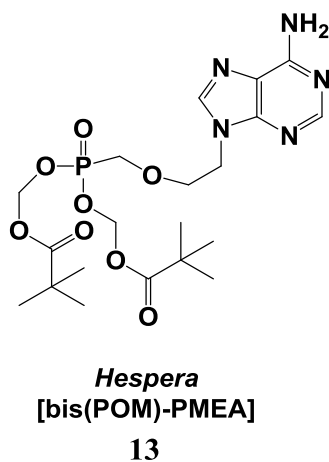
Schemat 2. Mechanizm pronukleotydu

Nieliczne są związki typu pronukleotydu zatwierdzone do stosowania klinicznego. W roku 2001 FDA zezwoliła na stosowanie przeciw HIV fumaranu dizoproksalu tenofowiru (TDF, nazwa zarejestrowana: *Viread*), czyli fosfonianu acyklicznego analogu adenozyiny chronionego dwiema grupami estrowymi (jest on także lekiem przeciwko infekcjom HBV) (**11**, Rys. 2)^{1, 2}. Ten sam analog nukleotydu, zawierający jednak inne grupy chroniące resztę fosfonianową, czyli alafenamid tenofowiru (TAF, **12**) został dopuszczony przez FDA do stosowania przeciwko HIV w kombinacji typu HAART w roku 2015¹⁷. Wykazuje on lepszą aktywność przeciwwirusową i zwiększoną dystrybucję formy aktywnej leku do tkanek limfatycznych TDF (**11**), co zostało dokładniej opisane w dalszej części pracy.

Zbliżony strukturalnie do *Vireadu* pronukleotyduowy inhibitor RT *Hespera* (**13**) jest dopuszczony do stosowania w leczeniu jedynie przeciwko HBV, natomiast nie jest skuteczny przeciwko HIV¹⁸.



Rysunek 2. Acykliczne pronukleotydyde inhibitory RT stosowane w terapii HIV



Rysunek 3. Struktura pronukleotydu anty-HBV, *Hespera*

Wszystkie przedstawione powyżej leki pronukleotydyde charakteryzują się znacznym stopniem modyfikacji części cukrowej nukleozydu (acyklonukleozydy) oraz obecnością reszty fosfonianowej w miejsce grupy 5'-fosforanowej. Do tej pory nie zostały zatwierdzone do stosowania klinicznego pronukleotydyde zawierające naturalny szkielet cukrowy (np. pochodne AZT).

Należy przy tym zwrócić uwagę, że potencjalne pronukleotydyde, nawet jeśli wykazują aktywność antywirusową, niekoniecznie są rzeczywiście pronukleotydyde – zawsze możliwy jest bowiem ich degradacja w układzie biologicznym do macierzystego nukleozydu, a nie do pożądanego 5'-fosforanu. W przypadku pochodnych AZT, jedną z metod potwierdzających pronukleotydyde charakter związku, jest jego aktywność we wspomnianych już komórkach z deficytem kinazy tymidynowej (linia komórkowa CEM/TK⁻), w których macierzysty analog nukleozydu nie wykazuje aktywności antywirusowej. Innym podejściem umożliwiającym wykazanie charakteru pronukleotydydego danego układu jest badanie aktywności

antywirusowej pochodnych 2',3'-dideoksyurydyny, która nie jest substratem dla kinaz i nie ulega fosforylacji¹⁹. Podstawowe różnice w koncepcjach pronukleotydów anti-HIV polegają na sposobie dostarczania i uwalniania 5'-monofosforanu nukleozydu w komórce, nad czym chciałbym się skupić w dalszej części tego rozdziału. Triestry, diestry i amidoestry to trzy najpowszechniej badane typy pronukleotydów, które zostaną przedstawione w dalszej części dysertacji.

4. Estry fosforanowe analogów nukleotydów

4.1 Wprowadzenie

Pronukleotydy fosforanotriestrowe są jednymi z najlepiej poznanych związków wprowadzających do komórki nukleozydo 5'-monofosforany, a literatura dotycząca możliwości wykorzystania jako pronukleotydów jest bardzo obszerna. Sprawą najwyższej wagi jest dobór odpowiednich grup maskujących resztę fosforanową. Z jednej strony zwiększają one lipofilowość wyjściowych związków i umożliwiają ich wchłanianie do wnętrza komórki przez dyfuzję bierną, z drugiej jednak strony nie mogą one doprowadzić do zbyt słabej rozpuszczalności związku. Powinny mieć trwałość na tyle dużą, aby nienaruszone pronukleotydy mogły wnikać do komórki, a jednocześnie być na tyle labilne, aby w jej wnętrzu rozpadać się z szybkością gwarantującą uzyskanie skutecznych stężeń monoestrów, które w kolejnych fosforylacjach tworzyłyby formy aktywne biologicznie, tj. trifosforany analogów nukleotydów. Pronukleotydy fosforanotriestrowe mogą ulegać dwóm różnym ścieżkom rozpadu, chemicznej i enzymatycznej, w zależności od zastosowanych grup maskujących.

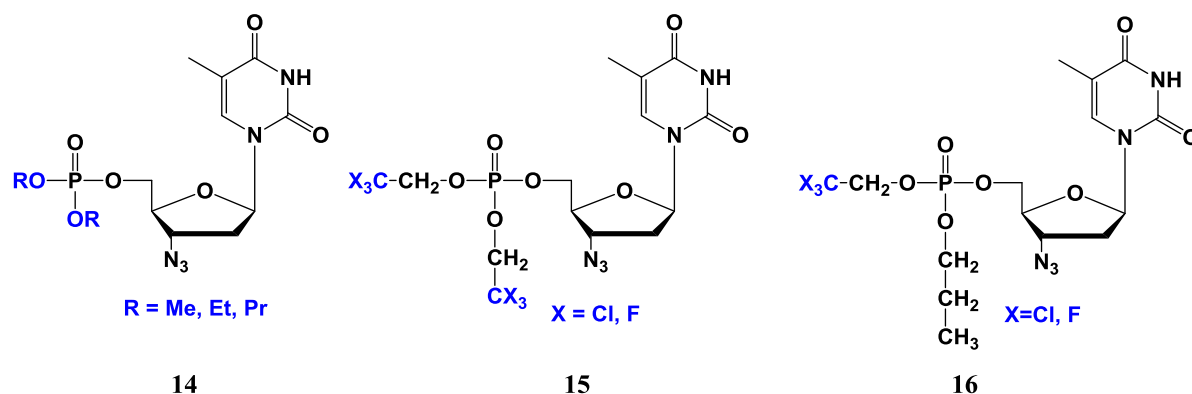
4.2 Grupy maskujące usuwalne na drodze chemicznej

Przekształcenie fosforanotriestru do fosforanodiestru, a następnie do niemaskowanego monofosforanu, decyduje o sukcesie całej koncepcji pronukleotydowej. Projektowane fosforanotriestry muszą być odpowiednio stabilne w medium fizjologicznym, aby jako takie mogły wnikać do zakażonych komórek, gdzie powinny ulegać przemianie do formy aktywnej biologicznie. Ponieważ ani wewnątrz komórki, ani w surowicy nie istnieje jakakolwiek aktywność enzymatyczna mogąca hydrolizować fosforanotriestry, proste związki tego typu w pierwszym etapie muszą ulegać hydrolizie chemicznej. W koncepcji tej wykorzystuje się fakt, że w przeciwieństwie do niezwykle odpornych na hydrolizę chemiczną (w warunkach fizjologicznych) mono- i diestrów fosforanowych, stabilność hydrolityczna fosforanotriestrów jest umiarkowana. Szybkość hydrolizy fosforanodiestrów jest ok. 10 000 razy mniejsza od

triestrów²⁰, co oznacza, że hydroliza drugiej grupy ochronnej fosforanu wymaga zwykle udziału enzymów (fosfodiesteraz), które uwalniają selektywnie 5'-fosforan nukleozydu i alkohol lub fenol. Jest to okoliczność kluczowa dla omawianej strategii, gdyż hydroliza do nukleozydu i ufosforylowanego alkoholu/fenolu oznaczałaby, że związki te byłyby pronukleozydami, a nie pronukleotydami (warto przy tej okazji napomknąć, że *fosfatyd*, czyli 5'-*H*-fosfonian AZT, jest właśnie takim pronukleozydem; w organizmie ulega on stopniowej hydrolizie do AZT, dzięki czemu zmniejszone są problemy z toksycznością tego nukleozydu i wydłużony jest okres jego stężenia terapeutycznego²¹). W niektórych podejściach powstające diestry mogą rozpadać się na drodze chemicznej dzięki generowaniu w pierwszym etapie reakcji wewnątrzcząsteczkowego układu katalitycznego wspomagającego deestryfikację.

4.2.1 Fosforanotriestry z grupami alifatycznymi i aryłowymi

Pierwsze próby zastosowania potencjalnych pronukleotydów zabezpieczonych prostymi grupami estrowymi opisał na przełomie lat 80. i 90. XX w. C. McGuigan ze współpracownikami²²⁻²⁴. Otrzymali oni triestrowe pochodne AZTMP zawierające alkilowe (Rys. 4) i aryłowe (Rys. 5) grupy maskujące.

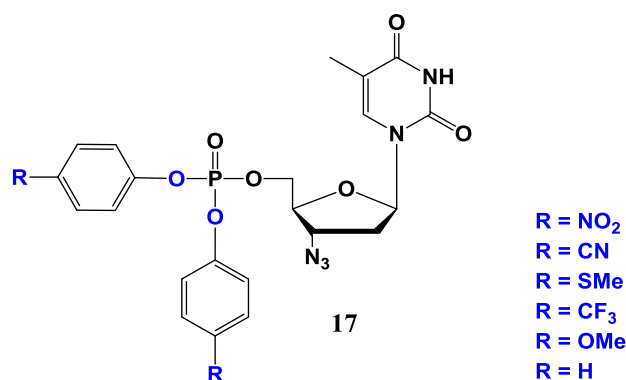


Rysunek 4. Dialkilowe pronukleotydy McGuigana

Żaden z przebadanych dialkilowych fosforanotriestrów typu **14** nie wykazał oczekiwanego działania przeciwko HIV. Powodem takiego braku aktywności mogła być ich bardzo wolna hydroliza i duża trwałość. Związki typu **15–16** zawierają wyciągające elektrony podstawniki halogenowe, w efekcie czego są one podatniejsze na hydrolizę. Rzeczywiście, wykazują one wyraźną aktywność przeciwwirusowa, ale są nadal znacznie mniej skuteczne od wyjściowego AZT, np. dla fosforanotriestru **15** zawierającego dwie grupy

2,2,2-trichloretylowe stwierdzono $EC_{50} = 0,7 \mu M$, wobec $EC_{50} = 0,004 \mu M$ dla macierzystego AZT^{*25}.

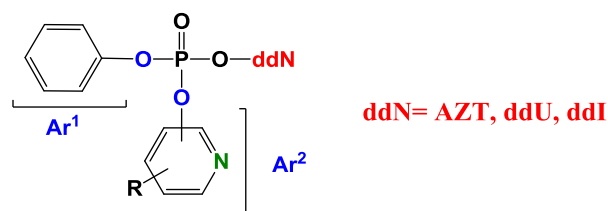
Bardziej obiecującymi pochodnymi okazały się triestry diarylowe typu **17** (Rys. 5). Charakteryzowały się one wyraźnie lepszym parametrem $EC_{50} \approx 0,003 \mu M$ od wyjściowego AZT $EC_{50} = 0,008 \mu M$ ²⁶. Aktywność w dużej mierze zależna była od grup funkcyjnych znajdujących się w pierścieniu fenyłowym triestru. Podstawniki wyciągające elektrony, takie jak grupa nitrowa czy nitrylowa, zwiększały aktywności triestrów diarylowych, gdyż stały się one mniej trwałe i bardziej podatne na hydrolizę. Uwalnianie 5'-monofosforanu było więc uzależnione od labilności wprowadzonych grup ochronnych i było odwrotnie proporcjonalne do pK_a fenolu. Okazało się jednak, że w badaniach na liniach komórkowych z deficytem kinazy tymidynowej (CEM/TK⁻) aryłowe triestry AZT były słabymi inhibitorami replikacji wirusa HIV $EC_{50} > 100$. Słaba aktywność sugeruje, że związki tego typu nie działają jako pronukleotydy. Uważa się, że triestry te zanim dotrą do komórki, są przekształcane do nukleozydów w przemianach chemicznych i enzymatycznych i działają jako pronukleozydy, a nie pronukleotydy²⁷.



Rysunek 5. Diaryłowe pronukleotydy McGuigana

Inną koncepcję pronukleotydowych diaryłowych fosforanotriestrów AZT, ddU i ddI typu **18** przedstawił A. Kraszewski i współpracownicy¹⁹ (Rys. 6). Istotą tej koncepcji było zastosowanie nie tylko podstawionych grup fenyłowych, ale także ligandów aromatycznych innego typu – grup pirydylowych. Wprowadzenie atomu azotu do pierścienia aromatycznego wraz z różnymi podstawnikami w znaczący sposób zwiększyło możliwości kontrolowania hydrolizy triestrów do 5'-monofosforanów nukleozydów.

*Wartości EC_{50} dla AZT przytaczane w różnych publikacjach różnią się między sobą dość znacząco. Z tej przyczyny aktywność przeciwwirusowa nowych pochodnych może być porównywana tylko z aktywnością AZT ustaloną w tym samym teście, a porównywanie wyników pochodzących z różnych badań może mieć jedynie charakter orientacyjny.



18

- Ar¹ = fenyl
 Ar¹ = 4-chlorofenyl
 Ar¹ = 4-bromofenyl
 Ar¹ = 4-cyjanofenyl
 Ar¹ = 2,3-dichlorofenyl
- Ar² = pirydyn-3-yl
 Ar² = pirydyn-4-yl
 Ar² = 2-metylopirydyn-3-yl
 Ar² = 6-metylopirydyn-3-yl
 Ar² = 2-chloropirydyn-3-yl
 Ar² = 5-chloropirydyn-3-yl

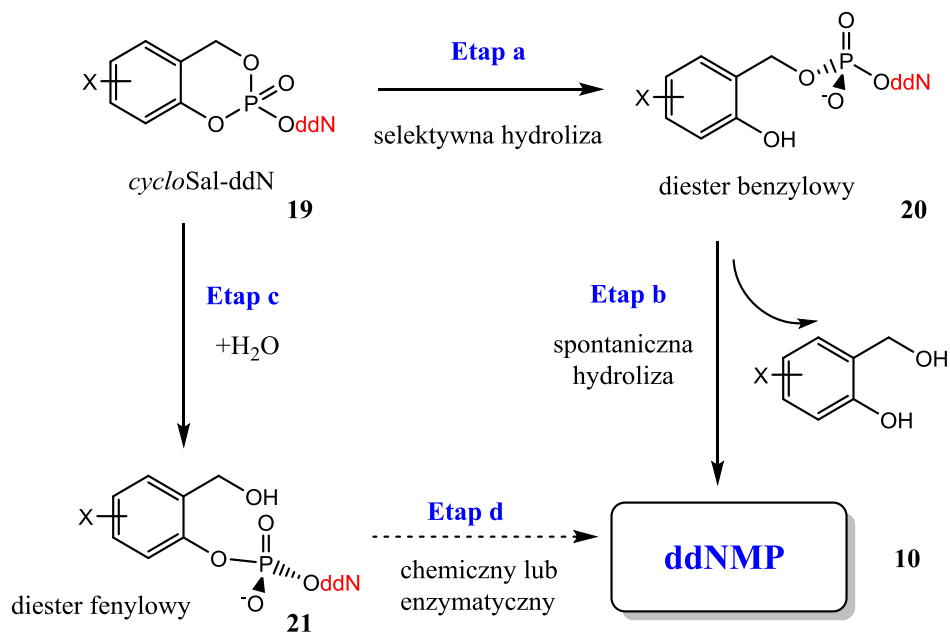
Rysunek 6. Diarylowe pronukleotydy Kraszewskiego

Triestry dipirydylowe były bardziej podatne na hydrolizę (przy zachowaniu zerowego ładunku) w porównaniu z triestrami difenyłowymi, a produkty ich hydrolizy nie generowały toksycznych dla komórki metabolitów. Przebadane związki miały aktywność anti-HIV porównywalną z wyjściowym nukleozydem AZT. Badania w medium hodowlanym komórek RPMI/FBS dowiodły, że potencjalne pronukleotydy typu **18** mogą zostać przekształcane na drodze chemicznej hydrolizy do diestrów, które znajdujące się w komórce enzymy przekształcają do 5'-monofosforanów. O pronukleotydowym mechanizmie działania powyższych związków wywnioskowano na podstawie zaobserwowanej aktywności pochodnych, w których komponentem nukleozydowym była dideoksyurydyna (nukleozyd ten nie wykazuje aktywności anti-HIV, gdyż nie ulega fosforylacji; inhibicja wirusa wskazywała więc na generowanie w komórkach 5'-fosforanu ddU).

4.2.2 Fosforanotriestry cyklosalidenianowe (cycloSal)

Chris Meier²⁸⁻³⁰ i współpracownicy opracowali triestrowe pronukleotydy „cycloSal” typu **19** (Schemat 3), zawierające dwufunkcyjną grupę ochronną o szkielecie kwasu salicylowego, dzięki czemu znajdowały się w nich dwa rodzaje maskujących wiązań estrowych, jedno typu grupy benzylowej, a drugie typu grupy fenylowej. Ze względu na znacznie większą podatność estrów aromatycznych na hydrolizę chemiczną, w pierwszym etapie ich rozpadu powstają diestry nukleozydowo-benzylowe **20**, które w pozycji orto pierścienia benzenowego niosą grupę hydroksylową (Etap a). Grupa ta działa jako katalizator wewnątrzcząsteczkowy, zwiększający znacząco podatność fosforanodiestru **20** na hydrolizę chemiczną, dzięki czemu można oczekiwać wydajnego tworzenia się monoestru **10** bez

udziału enzymów (Etap b). Alternatywna ścieżka reakcyjna obejmuje powolną hydrolizę benzyłowego wiązania estrowego (Etap c), po którym powstały ester aryłowy **21** może hydrolizować na drodze chemicznej lub katalizowanej przez fosfodiesterazy (Etap d).



ddN = AZT, ABC, ddA, d4T, tenofowir

X = 5-Cl, 6-Cl, H, 3-Me, 3,5-Me, 3-*t*-Bu, 3,5-*t*-Bu, 6-F

Schemat 3. Hydroliza fosforanotriestru *cycloSal*²⁸

Porównywalna trwałość tych związków w RPMI i RPMI/FBS sugeruje, że ich rozkład ma charakter chemiczny (bufor RPMI/FBS wykazuje aktywność enzymatyczną, sam RPMI jest jej pozbawiony). Dodatkowym ich atutem jest możliwość sterowania ich właściwościami poprzez wprowadzenie podstawników w pierścieniu benzenowym. Powstało dzięki temu kilka generacji pronukleotydów z różnymi modyfikacjami w części aromatycznej dla różnych nukleotydów. Cyklosalidenianowe fosforanotriestry ddA, AZT, d4T, ABC i tenofowiru wykazywały wysoką aktywność antywirusową wobec HIV-1 i HIV-2 dla różnych linii komórkowych, a jednocześnie miały nieznaczną cytotoksyczność ($CC_{50} > 100$ dla większości pochodnych). Potwierdzeniem pronukleotydowego charakteru omawianej koncepcji była wysoka aktywność estrów *cycloSal*-d4T w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej. Wyniki te nie były jednak jednoznaczne, gdyż w przypadku *cycloSal*-AZT, wysoka aktywność tej pochodnej obserwowana w komórkach dzikich, nie była zachowana w komórkach TK⁻³¹. Późniejsze badania wskazały, że obserwowane różnice mogą wynikać z znacznie większej podatności AZTMP na defosforylację w porównaniu do d4TMP³².

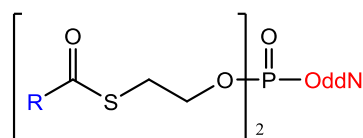
4.3 Grupy maskujące usuwalne na drodze enzymatycznej

Ponieważ triestry alkilowe i aryłowe przenikały bardzo dobrze przez błonę komórkową, były one rozważane jako potencjalne proleki. Ich aktywność uzależniona była jednak od trudnej do kontrolowania hydrolizy chemicznej na pierwszym i – w niektórych przypadkach – drugim etapie deestryfikacji. Istotnym mankamentem takiej strategii jest możliwość hydrolizy proleku przed wniknięciem do komórki. W takim przypadku powstaje wprawdzie pożądaný analog nukleotydu, ale poza komórką, do której nie ma już szans na wniknięcie ze względu na ładunek grupy fosforanowej. W efekcie staje się on zbędnym, potencjalnie szkodliwym balastem dla organizmu. Ponadto zbyt wczesny rozkład proleku implikuje konieczność stosowania jego wyższych dawek, aby zapewnione było właściwe stężenie terapeutycznego w komórkach.

Aby zapobiec tej niekorzystnej sytuacji zaprojektowano pronukleotydy triestrowe, których rozkład ulega znacznemu przyspieszeniu w obecności enzymów. Strategia ta, opracowana przez zespół J.L. Imbacha, wykorzystuje układy fosforanotriestrowe zawierające tzw. chronione grupy ochronne. Aplikowane triestry niosą chemicznie trwałe grupy maskujące zawierające ugrupowania podatne na działanie enzymów obecnych tylko wewnątrz komórki. W wyniku reakcji enzymatycznych, w grupach chroniących fosforan pojawiają się reaktywne centra wywołujące spontaniczną wewnątrzcząsteczkową degradację grupy maskującej i uwolnienie fosforanu.

4.3.1 Fosforanotriestry *S*-acylo-2-tioetylowe (SATE)

Pierwszymi pronukleotydami, w których zastosowano chronione grupy ochronne usuwane enzymatycznie, były triestry **22** zawierające oprócz nukleozydu dwie grupy *S*-acylo-2-tioetylowe, tzw. SATE, gdzie grupami acylowymi były acetyl ($R = \text{Me}$), izobutyryl ($R = i\text{Pr}$) i piwaloil ($R = t\text{Bu}$), natomiast jako komponenty nukleozydowe wykorzystano ddA, ddI, AZT, d4T i ddU (Rys. 7)³³⁻³⁵. Pronukleotydy bis(SATE) po pokonaniu błony komórkowej powinny zostać przekształcone przez obecne w komórce karboksyesterazy do pochodnych z wolną grupą tiolową, które powinny spontanicznie rozpadać się z uwolnieniem 5'-fosforanów nukleozydów, które następnie przekształcone zostają do 5'-trifosforanów, będących właściwymi inhibitorami HIV-RT.



22

MeSATE, R = Me

*i*PrSATE, R = *i*Pr

*t*BuSATE, R = *t*Bu

ddN = ddA, ddi, AZT, d4T, ddU

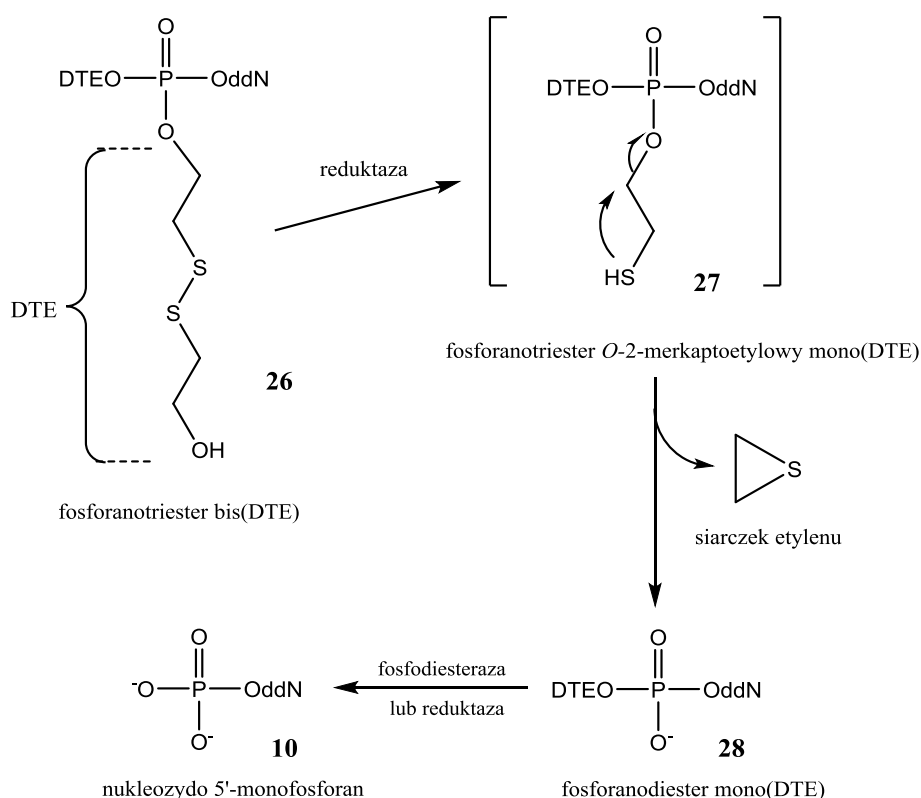
Rysunek 7. Fosforanotriestry bis(SATE)

Badania potwierdziły zakładany mechanizm. Główna droga (A, Schemat 4) uwalniania 5'-monofosforanu **10** z pronukleotydu **22** obejmuje w pierwszym etapie katalizowaną przez karboksylazy komórkowe hydrolizę biolabilnej grupy maskującej, co prowadzi do powstania fosforanotriestru **23** zawierającego jedno ugrupowanie 2-merkптоetylowe. Powstały tiol w wewnątrzcząsteczkowym ataku na elektrofilowy atom węgla tworzy episiarczek i fosforanodiester mono(SATE) **24**, który przekształcany jest dalej do fosforanu **10** albo na drodze analogicznej, tj. deacylacji i eliminacji drugiej grupy SATE poprzez diester **25**, albo w wyniku bezpośredniej hydrolizy wiązania fosfodiesterowego katalizowanej przez fosfodiesterazy. Alternatywną drogą rozpadu triestru **22** jest powolna chemiczna hydroliza jednej grupy SATE (B) lub grupy acylowej (C). Prowadzi to do tego samego produktu **24**, co ścieżka enzymatyczna, lecz może zachodzić także poza komórką. Ze względu na omawianą już dużą trwałość fosforanotriestrow alifatycznych, reakcje te mają jednak małe znaczenie³³. Z powodu znacznie większej aktywności karboksyesteraz niż fosfodiesteraz w badanych układach, jedynie niewielka część diestru **24** jest hydrolizowana bezpośrednio do monoestru **10**, a ok. 90–100% przekształca się w diester **25**. W efekcie etapem limitującym szybkość tworzenia fosforanu 2',3'-deoksynukleozydu (**10**) jest ostatni etap procesu – eliminacja episiarczku z diestru **25**, która zachodzi wolniej niż dla triestru z powodu zwiększonej gęstości elektronowej na centrum fosforowym w ujemnie naładowanym diestrze^{33, 36}.

Wszystkie potencjalne pronukleotydy typu SATE dowiodły swej wysokiej aktywności antywirusowej w różnych mediach komórkowych (CEM-SS, MT4, PBMS), a także w linii komórkowej CEM/TK⁻. Triestry bis(SATE) d4T wykazywały znacznie wyższą aktywność (EC₅₀ = 0,006–0,0012 μM) w porównaniu do macierzystego d4T (EC₅₀ = 0,28–0,058 μM) we wszystkich ww. liniach komórkowych³⁸. Fosforanotriestry bis(SATE) AZT były wprawdzie mniej aktywne w komórkach CEM-SS i MT-4 w porównaniu do AZT, ale wykazywały znacznie większą aktywność w komórkach CEM/TK⁻, co wskazuje na prawdopodobny

4.3.2 Fosforanotriestry ditiodietylowe (DTE)

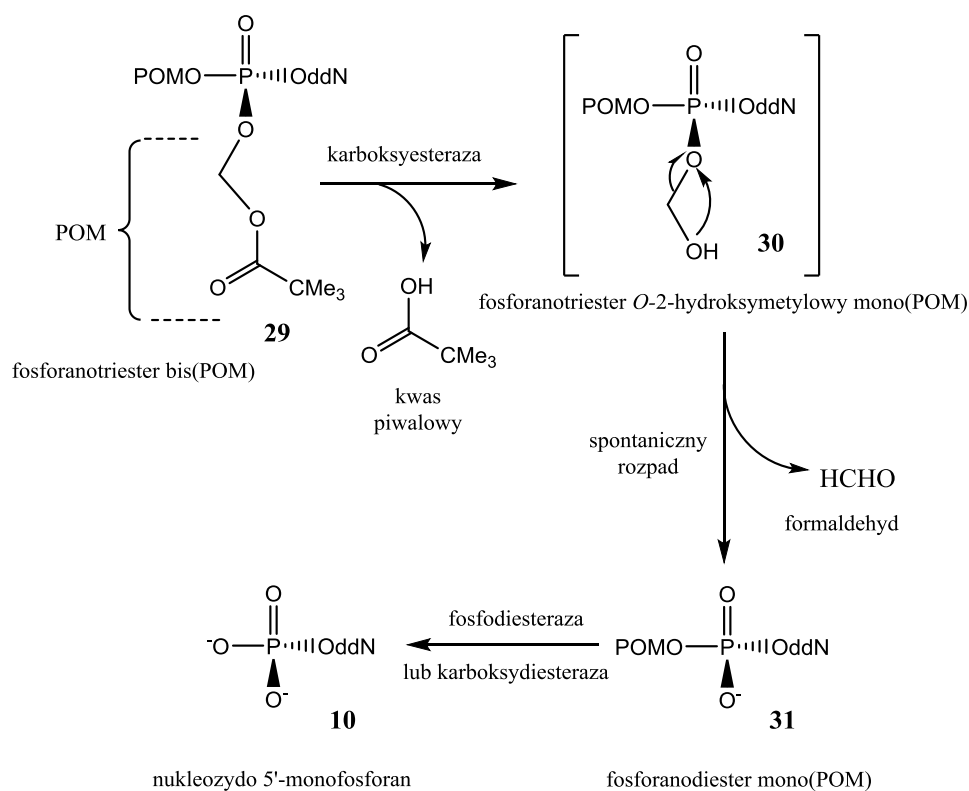
Inny typ grup usuwanych enzymatycznie uzyskano przez zestyfikowanie fosforanu dwiema resztami ditiodietanolu (DTE). Jako potencjalne pronukleotydy badano fosforanotriestry bis(DTE) zawierające AZT i ddU (**26**, Schemat 5)^{33, 34, 40}. Postulowany mechanizm rozpadu tych związków w komórce zakłada w pierwszej kolejności uczestnictwo odpowiednich reduktaz, które tną wiązanie disulfidowe. W ten sposób zostaje uwolniony niestabilny fosforanotriester 2-merkptoetylowy mono(DTE) **27**, który rozpada się do mono(DTE) fosforanodiestru **28** i episiarczku w wewnątrzcząsteczkowym ataku atomu siarki na atom węgla w pozycji α względem reszty fosforanowej (podobnie jak ma to miejsce podczas rozpadu grup SATE omówionych powyżej). Powstały fosforanodiestru **28** zostaje przekształcony do 5'-monofosforanu nukleozydowego przy udziale fosfodiesteraz lub reduktaz obecnych w komórce. Fosforotriestry bis(DTE) wykazują zbliżone właściwości przeciwwirusowe i cytotoksyczne jak analogiczne pochodne SATE, jednak zwykle są od nich nieco mniej aktywne¹⁶.



Schemat 5. Mechanizm hydrolizy triestrów bis(DTE)^{40, 41}

4.3.3 Fosforanotriestry piwaloksymetylowe (POM)

Grupy piwaloksymetylowe (POM) zbudowane są z reszty hydroksymetoksyłowej zestyfikowanej kwasem piwalowym (Schemat 6). Pierwszym, który je zastosował w fosforanotriestrach był Farquhar ze współpracownikami¹⁶. Wykazali oni, że triestry AZT, ddU i FUDR zawierające dwie grupy maskujące POM (**29**) mogą zostać przekształcone w medium wewnątrzkomórkowym do 5'-trifosforanów (później podobne wyniki uzyskano dla pronukleotydów PMPA⁴² i PME¹⁸). Pochodne bis(POM) AZT były znacznie mniej aktywne od bis(MeSATE) i bis(DTE) AZT dla wirusa HIV-1 w różnych mediach komórkowych (CEM-SS, MT-4, PBMS), natomiast wykazywały znacznie wyższą aktywność w komórkach CEM/TK⁻ w porównaniu do triestrów bis(DTE), co wskazuje na pronukleotydowy charakter tych związków. Po wniknięciu triestru bis(POM) (**29**) do komórki, jedna z grup estrowych zostaje zhydrolizowana przez karboksyesterazy komórkowe do fosforanotriesteru **30**, zawierającego grupę hydroksymetylową. Jest to nietrwały układ hemiacetalowy, który rozpada się do diestru **31** i formaldehydu. Fosforandiester mono(POM) **31** jest rozkładany dalej przez karboksyesterazę lub fosfodiesterazę dając ostatecznie 5'-monofosforan **10**.

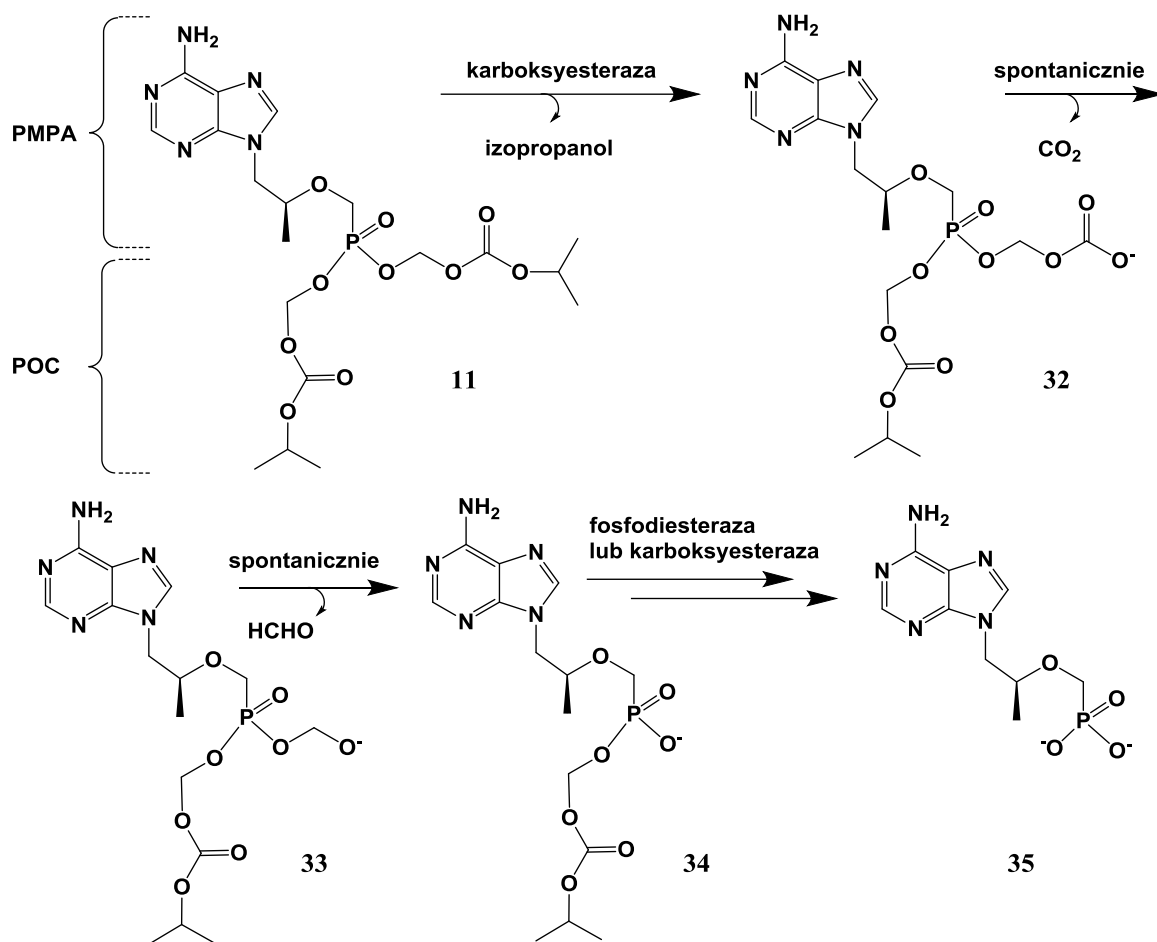


Schemat 6. Mechanizm hydrolizy triestrów bis(POM)^{15, 40}

Produkty rozpadu grup POM, zwłaszcza formaldehyd, mogą być odpowiedzialne za pewną cytotoksyczność tych związków, $CC_{50} = 30\text{--}70 \mu\text{M}^{16}$ (szkodliwość formaldehydu dla komórek jest dobrze znana – może on uszkadzać zarówno białka, jak i kwasy nukleinowe). Skuteczności tego podejścia dowodzi fakt, że jeden z dwóch leków pronukleotydowych działających jako inhibitory RT, o nazwie handlowej *Hespera*, to {[2-(6-amino-9*H*-puryn-9-yl)etoksy]metylo}fosfonian bis(piwaloksymetylu) (bis(POM) PMEA **12**, Rys. 2), czyli acykliczny fragment adenozyiny niosący w pozycji *quasi*-5' grupę fosfonianową chronioną dwiema grupami POM. Związek ten został opracowany z myślą o zwalczaniu wirusa HIV, był on jednak zbyt szkodliwy, aby można go wykorzystywać w tym celu⁴³. Okazał się natomiast wartościowym lekiem przeciwko HBV, gdyż przy zakażeniach tym wirusem jest skuteczny w znacznie mniejszych dawkach, przy których jego stosowanie jest bezpieczniejsze⁴⁴.

4.3.4 Fosfonianodiestry izopropyloksykarbonyloksymetylowe (POC)

Pierwszym zastosowanym w leczeniu inhibitorem odwrotnej transkryptazy HIV typu pronukleotydu został dizoproksyl tenofowiru (**11**, Rys. 2), czyli maskowany fosfonian acyklicznego analogu adenozyiny (jest on także zdolny do hamowania replikacji HBV)⁴⁵⁻⁴⁷. Związek ten zbudowany jest z (*R*)-9-(2-fosfometoksypropylo)adeniny (tenofowiru, PMPA) zestryfikowanej dwiema resztami izopropyloksykarbonyloksymetylowymi (POC), których wprowadzenie miało na celu zwiększenie lipofilowości i biodostępności. Badania wykonane na liniach komórkowych MT-2 i PBMC dowiodły, że prolek bis(POC)-PMPA był ok. 100 razy bardziej aktywny niż macierzysty PMPA i nie był cytotoksyczny⁴². Podobnie jak dla omówionych powyżej estrów kwasów karboksylowych, związek **11** pod wpływem karboksyesteraz komórkowych ulega deestryfikacji (Schemat 7). Produktem tej reakcji jest pochodna **32**, zawierająca nietrwały układ monoestru węglanowego. W efekcie dwóch kolejnych eliminacji, tj. dekarboksylacji związku **32** i rozpadu hemiacetalu **33**, tworzy się monoester **34**, który może być substratem zarówno dla karboksyesterazy, jak i fosfodiesterazy. Niezależnie od ścieżki rozkładu, tworzy się PMPA (**35**)^{18, 48}.

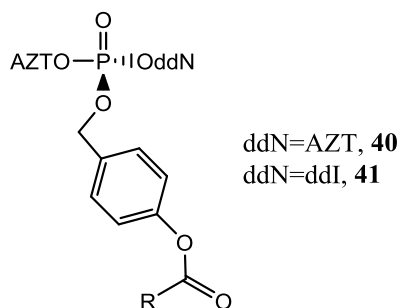


Schemat 7. Mechanizm hydrolizy triestrów bis(POC) PMPA

4.3.5 Fosforanotriestry para-acyloksybenzylowe (PAOB)

Innym typem grup maskujących chronionych przez estryfikację są grupy *para*-acyloksybenzylowe (PAOB), zastosowane w pronukleotydowych fosforanotriestrach AZT i ddI typu **36** (Schemat 8A)⁴⁹. Mechanizm hydrolizy tych związków obejmuje w pierwszej kolejności hydrolizę estru acylowego przez obecne w komórce karboksyesterazy, w wyniku czego zostaje uwolniony nietrwały układ *p*-hydroksybenzylowy (**37**). Ulega on samorzutnemu rozpadowi na fosforanodiestr **39** i karbokation **38**. Po ponownej deacylacji fenolu cykl zostaje powtórzony z wytworzeniem analogu nukleotydu **10** (Schemat 8A). Niekorzystnym produktem ubocznym tego procesu są stabilizowane przez rezonans *p*-hydroksybenzylowe jony karbeniowe **38**, które są czynnikami alkilującymi (Schemat 8B), mogącymi reagować z DNA, białkami i innymi nukleofilami komórkowymi⁵¹. Otrzymane potencjalne proleki

produktem defosforylacji AZTMP. Wskazuje to na poprawność mechanizmu przedstawionego na Schemacie 8A i potwierdza pronukleotydowy charakter fosforanotriestrów zawierających te grupy⁵⁰.

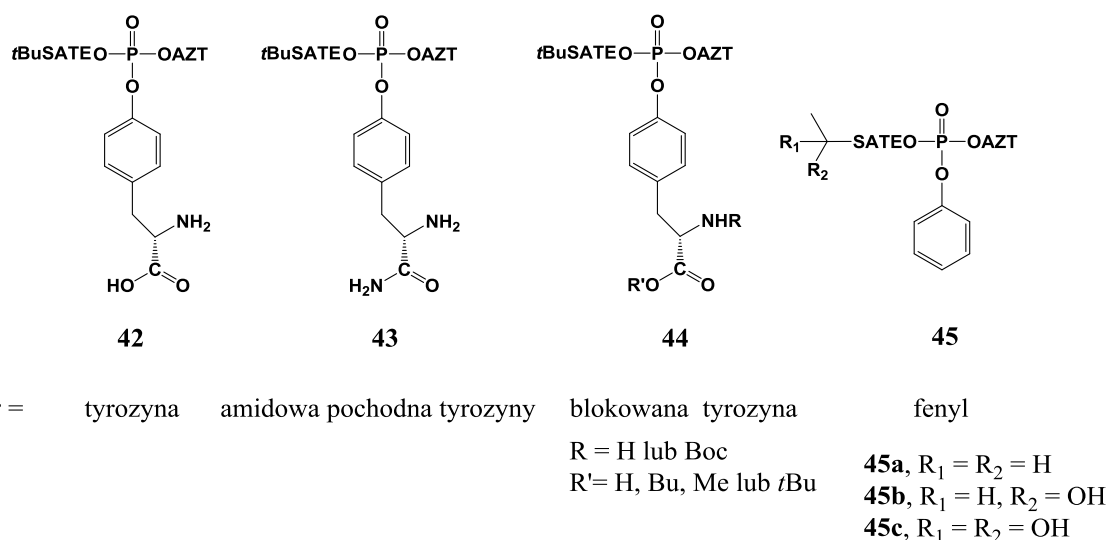


Rysunek 8. Fosforanotriestry niosące dwie reszty ddN i grupę PAOB

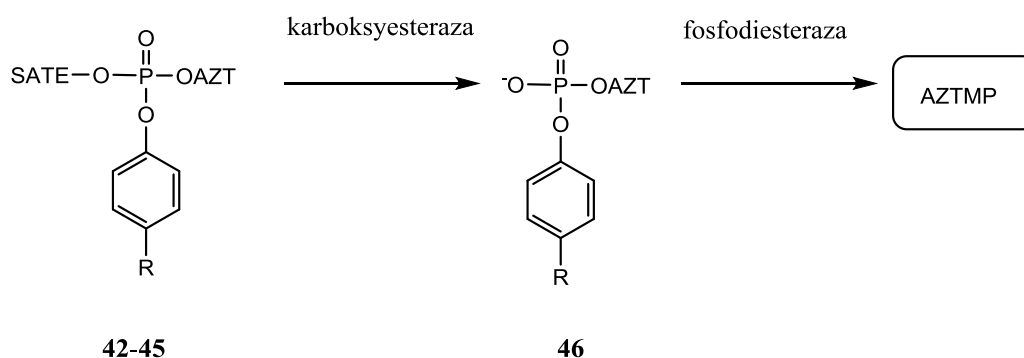
4.3.6 Mieszane fosforanotriestry arylo-SATE

Jak już wspomniano, aktywność triestrów typu bis(SATE) była limitowana przez szybkość końcowego, chemicznego etapu usuwania drugiej grupy maskującej. Ponieważ fosforanodiestry są substratami dla fosfodiesteraz komórkowych, druga grupa SATE może zostać zastąpiona innymi grupami. C. Perigaud i współpracownicy zaproponowali wykorzystanie w tym celu estrów arylowych^{52, 53}. Podejście to daje dostęp do szerokiej gamy potencjalnych związków terapeutycznych ze względu na dużą różnorodność grup funkcyjnych, które można wprowadzać do pierścienia aromatycznego. Jest to cecha bardzo korzystna ze względu na możliwość doboru podstawników dających najlepsze wyniki aktywności antywirusowej i cytotoksyczności dla danego układu biologicznego. Niektóre z uzyskanych triestrów przedstawione są na Rys. 9 (**42–44**). Do badań włączono też estry **45** z prostą grupą fenylową w części aromatycznej, lecz modyfikowane przez wprowadzenie jednej lub dwóch grup hydroksylowych do reszty piwaloilowej chroniącej SATE.

Pierwszy etap ich przekształcenia do AZTMP jest identyczny jak dla pochodnych bis(SATE) i wymaga obecności karboksyesteraz (Schemat 9). Powstający diester arylo-nukleozydowy **46** jest hydrolizowany przez fosfodiesterazy do monofosforanu AZT, co potwierdzono za pomocą analizy HPLC/MS.



Rysunek 9. Przykłady badanych arylowych fosforanotriestrów AZT – *t*BuSATE⁵⁴



Schemat 9. Mechanizm hydrolizy arylowych triestrów mono(SATE).

Aktywność anti-HIV estrów **42–45** została przebadana w różnych mediach komórkowych^{55, 56}. Ich efektywność w standardowych liniach komórkowych CEM-SS, MT4 była porównywalna z AZT, były one jednak w większości aktywne także w linii CEM/TK⁻, potwierdzając, że są one pronukleotydami. Nie wykazywały cytotoksyczności w możliwym do uzyskania zakresie stężeń (CC₅₀ > 10 μM dla związków silnie lipofilowych, > 100 μM dla lepiej rozpuszczalnych w wodzie). Dodatkowe grupy hydroksylowe w związkach **45b–c** zwiększyły ich odporność na hydrolizę enzymatyczną, w efekcie czasy połowicznego zaniku **45a, b i c** w ekstrakcie komórkowym miały się do siebie jak 1 : 10 : 100; jednocześnie spadała ich aktywność anti-HIV w linii CEM/TK⁻. Za szczególnie obiecujący autorzy uznali związek monohydroksylowy (**45b**), który jest wystarczająco rozpuszczalny w wodzie, ma wyraźny charakter pronukleotydowy i jest zdolny do efektywnego przenikania

w nienaruszonej formie przez monowarstwę komórek Caco-2 (co jest wyznacznikiem podatności na wchłanianie jelitowe)⁵⁶.

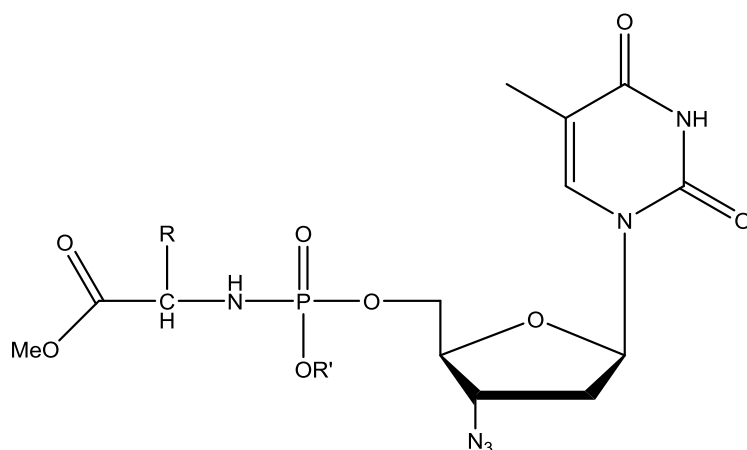
4.4 Amidofosforany 2',3'-dideoksynuklozydów

Nową grupą związków zaproponowaną w chemii pronukleotydów były amidofosforany 2',3'-deoksynukleozydów. W większości przypadków podczas hydrolizy triestrów anty-HIV generowane są toksyczne, reaktywne metabolity (episiarczek, formaldehyd, karbokationy), które w znaczący sposób obniżają wartość opracowanego pronukleotydu do zastosowania w terapii. Grupa badawcza McGuigena zaproponowała więc wprowadzenie jako grup ochronnych naturalnych aminokwasów, oczekując obniżenia toksyczności uzyskanych pronukleotydów. W ten sposób zainicjowany został nowy nurt badawczy, obejmujący tematykę alkilo i arylo amidofosforanów 2',3'-deoksynukleozydów, a także chemię wiązania P–N w kontekście przemian metabolicznych zaprojektowanych związków. Podobnie jak pronukleotydy triestrowe, nowe związki amidofosforanowe muszą zostać przekształcone wewnątrz komórek na drodze hydrolizy chemicznej lub enzymatycznej do biologicznie czynnych 5'-monofosforanów dideoksynukleozydów.

4.4.1 Diestry amidofosforanowe typu (ddNO)(R¹O)P(O)NR²

(R₁ = alkil; R² = reszta aminokwasu)

Pierwsze opisane diestry amidofosforanowe jako komponent amidowy zawierały resztę aminokwasową w postaci estru metylowego, a jako grupy estrowe – resztę AZT i proste grupy alkilowe (**47**, Rys. 10)⁵⁷⁻⁵⁹. W porównaniu do wcześniej opisanych alkilowych triestrów **9**, amidodiestry te wykazały słabą aktywność anty HIV. Zależna była ona w dużej mierze od użytego aminokwasu i nawet niewielkich ich modyfikacji. Najbardziej znaczące różnice były widoczne w aktywności pochodnej zawierającej resztę alaniny (**47a**), która była 16 razy bardziej aktywna niż jej odpowiednik niosący resztę izoleucyny (**47e**). Przeprowadzone badania wskazywały, że aktywność była odwrotnie proporcjonalna do zawady sterycznej wnoszonej przez łańcuch boczny aminokwasu. Badania na amidoestrach **47f-i**, zawierających resztę waliny i P-estrowe grupy alkilowe różnej długości pokazały, że modyfikacje te nie mają zbyt dużego wpływu na aktywność (EC₅₀ ~3–10 μM).



47a) R = Me, R' = Et

47b) R = iPr, R' = Et

47c) R = H, R' = Et

47d) R = CH₂iPr, R' = Et

47e) R = CH(Me)Et, R' = Et

47f) R = iPr, R' = Me

47g) R = iPr, R' = nPr

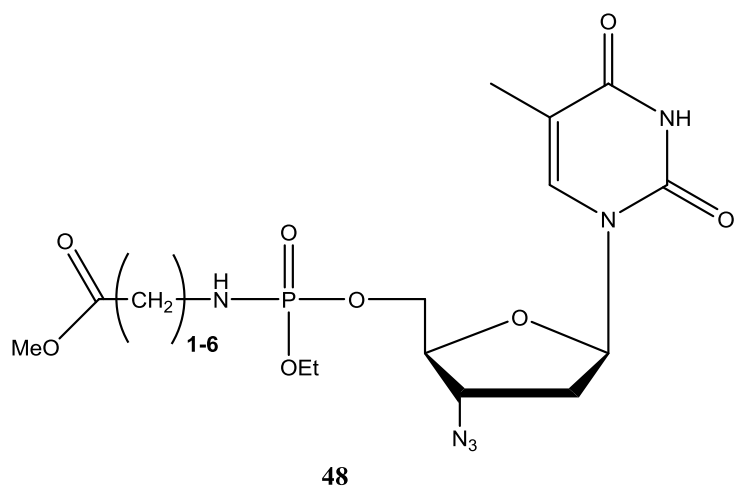
47h) R = iPr, R' = nBu

47i) R = iPr, R' = nHex

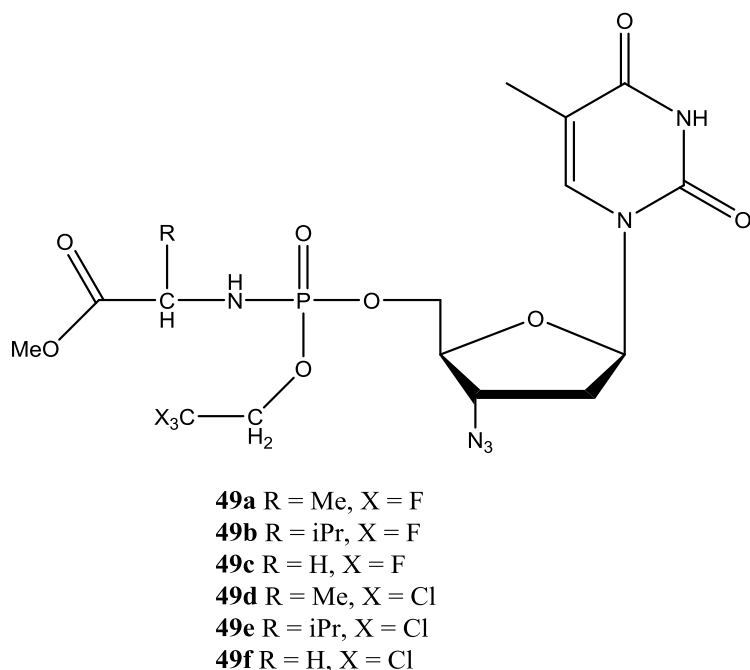
Rysunek 10. Alkilowe amidofosforany AZT

Kolejnym typem modyfikacji było zastąpienie reszt α -aminokwasów ich homologami zawierającymi 2–6 grup metylenowych pomiędzy grupą aminową a karboksylową (**48**, Rys. 11). Takie wydłużanie głównego łańcucha węglowego reszty aminokwasowej prowadziło jednak do zmniejszenia aktywności badanych amidofosforanów AZT⁶⁰.

Dalsze prace prowadzone przez grupę McGuigana dotyczyły zastosowania grup β -halogenoetylowych w miejsce prostych fosfoestrowych grup alkilowych (**49a–f**, Rys. 12)⁶¹. McGuigan w swoich wcześniejszych badaniach stwierdził bowiem zdecydowany wzrost aktywności anty-HIV prostych triestrów z dwiema grupami alifatycznymi po wprowadzeniu do nich grup trihalogenoalkilowych (por. rozdział 4.2.1). Wykorzystanie tego podejścia nie dało jednak oczekiwanego wzrostu aktywności anty-HIV dla większości badanych pochodnych aminokwasowych, które pozostały nadal znacznie gorsze ($EC_{50} = 3\text{--}10 \mu\text{M}$) w porównaniu z wyjściowym nukleozydem AZT ($EC_{50} = 0,004 \mu\text{M}$). Zaskakująco odmienny rezultat uzyskano dla związku zawierającego grupę trichloroetylową i resztę alaninową (**49d**), dla którego stwierdzono $EC_{50} = 0,08 \mu\text{M}$, tj. wartość o 2 rzędy wielkości niższą od pozostałych amidofosforanów z tej grupy. Przyczyny tego wyniku nie zostały wyjaśnione. Wszystkie przebadane związki nie były toksyczne dla niezainfekowanych komórek przy stężeniach do $100 \mu\text{M}$.

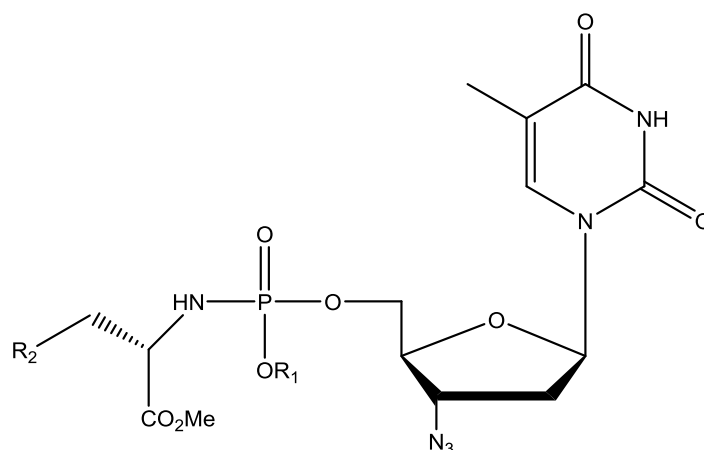


Rysunek 11. Etylowe amidofosforany AZT zawierające wyższe homologie α -aminokwasów



Rysunek 12. Amidofosforany AZT zawierające grupy β -halogenoetylowe

Obiecujące rezultaty uzyskał później C.R. Wagner, który wprowadził do tego typu amidofosforanów reszty aminokwasów aromatycznych, tryptofanu i fenyloalaniny, a jako ochronne grupy fosfoestrowe zastosował grupy metylową i cyjanoetylową (**50**, Rys. 13)⁶². Charakteryzowały się one niską toksycznością ($CC_{50} > 100 \mu M$) i były już tylko około 5 razy mniej aktywne niż wyjściowy AZT, gdy grupą maskującą była grupa cyjanoetylowa (**50a–b**). Lepsze parametry w hamowaniu replikacji wirusa HIV wykazywały pochodne zawierające grupę metylową: aktywność pochodnej tryptofanowej **50d** była 4x niższa od AZT, a dla pochodnej fenyloalaninowej **50j** uzyskano wyniki porównywalne z wyjściowym nukleozydem.



50a R₁ = cyjanoetyl, R₂ = Ph

50b R₁ = cyjanoetyl, R₂ = 3-indolil

50c R₁ = Me, R₂ = Ph

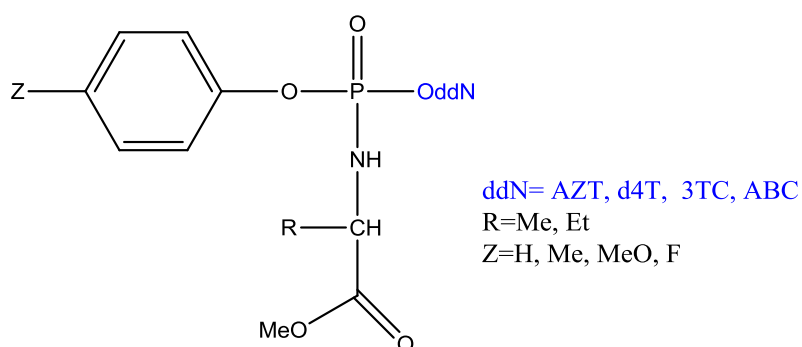
50d R₁ = Me, R₂ = 3-indolil

Rysunek 13. Amidofosforany AZT zawierające reszty aminokwasów aromatycznych

4.4.2 Diestry amidofosforanowe typu (ddNO)(R¹O)P(O)NR²

(R¹ = aryl; R² = reszta aminokwasu)

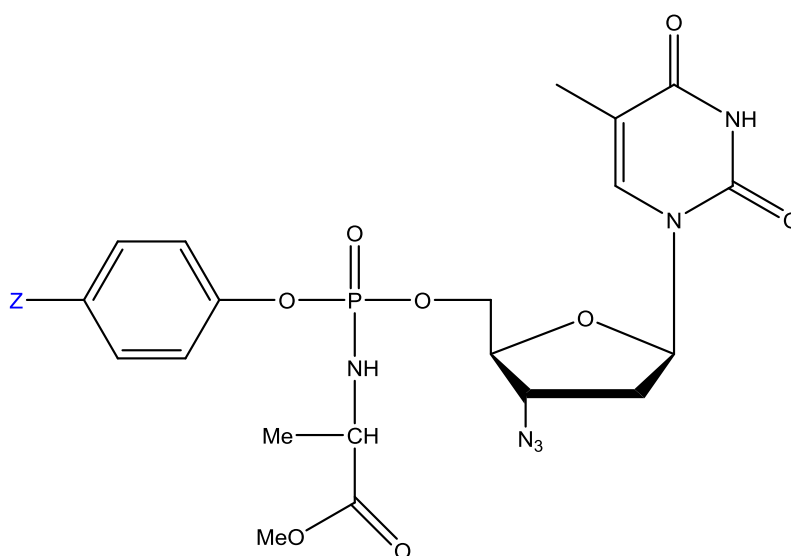
Żadne estry alifatyczne typu **47–49** badane przez grupę McGuigana nie dały wyników lepszych niż wyjściowy AZT. Kolejnym celem badawczym tego zespołu stały się analogiczne amidofosforany aminokwasowe, w których fosforanoestrowa grupa alifatyczna została zastąpiona grupą fenyłową lub jej pochodnymi zawierającymi w pozycji para podstawniki o charakterze elektronoakceptorowym lub elektronodonującym. Przebadane zostały pochodne AZT^{63, 64}, d4T^{62, 65}, 3TC⁶⁶, ABC⁶⁷ (Rys. 14).



Rysunek 14. Wzór ogólny najczęściej badanych amidofosforanów dideoksynukleozydowych **51–59** zawierających grupy *O*-arylowe i *N*-aminokwasowe

Wprowadzenie takich zmian miało na celu doprowadzenie do uwalniania 5'-monofosforanu nukleozydu przez kontrolowaną hydrolizę grupy arylovej, której labilność można modyfikować za pomocą podstawników. Wszystkie przebadane potencjalne pronukleotydy AZT wykazały aktywność biologiczną dla wirusa HIV-1 i HIV-2 w badaniach *in vitro* na komórkach MT4, CEM/0 i CEM/TK⁻.

W przypadku pochodnych AZT (**51**, Rys. 15) efektywne stężenie EC₅₀ było w każdym przypadku poniżej 0,5 μM. Najbardziej aktywnym inhibitorem HIV-1 i HIV-2 w komórkach MT4 (EC₅₀=0,006 μM) był niepodstawiony analog fenylovej **51a**, który był tylko 3 razy mniej aktywny w porównaniu do macierzystego AZT. W linii komórkowej CEM/0 wynik był słabszy, gdyż związek ten był ~17 razy mniej aktywny niż AZT. Wprowadzenie w pierścieniu fenylovej podstawników *p*-alkilowych, metoksylovego lub atomu fluoru (związki **51b–g**) nie zmieniły lub obniżyły aktywność produktów. Tym niemniej, w komórkach CEM/TK⁻, w których AZT nie hamuje wzrostu wirusa HIV, aktywność związków typu **51** była wyraźna (EC₅₀ = 3–12 μM). Wynik ten dowodzi, że związki te zostały przekształcone w 5'-monofosforan, a więc są one pronukleotydami⁵⁸. Badany był też wpływ typu aminokwasu na aktywność antywirusową. Podobnie jednak jak dla omówionych wyżej pochodnych alifatycznych, także w serii aromatycznej zmiana reszty alaniny na glicynę, leucynę lub fenyloalaninę w amidofosforanie **51a** spowodowała obniżenie aktywności.

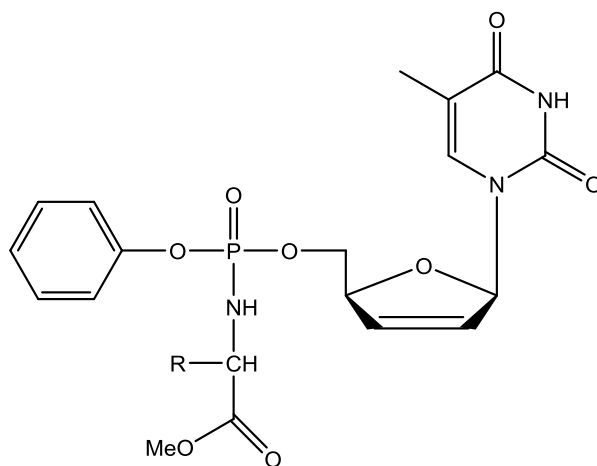


- 51a** Z = H,
51b, c, d, e Z = Me, Et, n-Pr, n-pentyl
51f Z = OMe
51g Z = F

Rysunek 15. Arylowe *N*-alaninowe amidofosforany AZT

Ponieważ wszystkie przebadane aryłowe amidofosforany AZT wykazywały znaczną aktywność anty-HIV przy niskiej cytotoksyczności oraz miały charakter pronukleotydów, podjęto badania nad analogicznymi pochodnymi innych dideoksynukleozydów inhibujących odwrotną transkryptazę: d4T, 3TC, ABC, a także tenofowiru.

Dla amidofosforanów d4T (**52**, Rys. 16) stwierdzono znaczącą inhibicję HIV-1 i HIV-2 w liniach komórkowych MT-4, CEM/0, CEM/TK⁻⁶⁵. Najbardziej obiecujący związek **52b** był w komórkach MT-4 i CEM/0 4–10 razy bardziej aktywny i około 5 razy mniej cytotoksyczny niż macierzysty d4T. Wykazywał też wysoką aktywność ($EC_{50} = 0,075 \mu M$) w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej. Przeprowadzone badania metabolitów związków **52a–e** wykazały obecność d4TTP, którego powstawanie było całkowicie niezależne od kinazy tymidynowej.



- 52a** R = H
52b R = Me
52c R = iPr
52d R = CH₂iPr
52e R = CH₂Ph

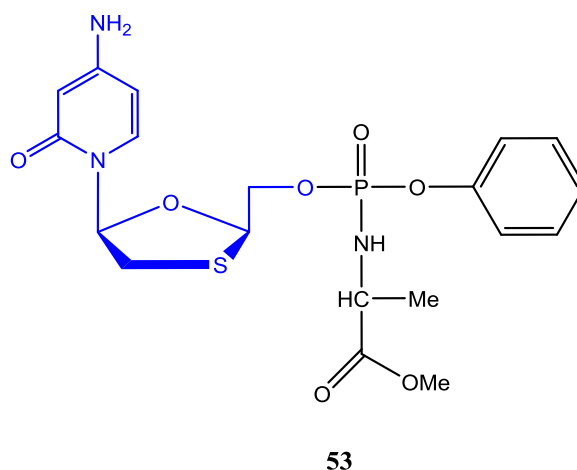
Rysunek 16. Fenyłowe *N*-aminokwasowe amidofosforany d4T

Kolejnym badanym amidofosforanem tego typu była pochodna 2',3'-dideoksy-3'-tiocytydyny (3TC). Dideoksynukleozyd ten jest inhibitorem RT wirusa HBV i jest stosowany klinicznie w zapaleniu wątroby typu B. W komórkach przekształcany jest przez komórkową kinazę 2'-deoksycytydynową w 5'-monofosforan, 3TCMP, i – podobnie jak w przypadku AZT – jest to etap limitujący tworzenie 5'-trifosforanu nukleozydu, czyli właściwego inhibitora syntezy wirusowego DNA. Potencjalnym pronukleotydem 3TC, którego aktywność przeciwko wirusom HIV-1 i HIV-2 badano w komórkach CEM/0, CEM/TK⁻ i CEM/dCK⁻, była pochodna metoksyalaninowa **53** (Rys. 17). Stwierdzone aktywności w komórkach

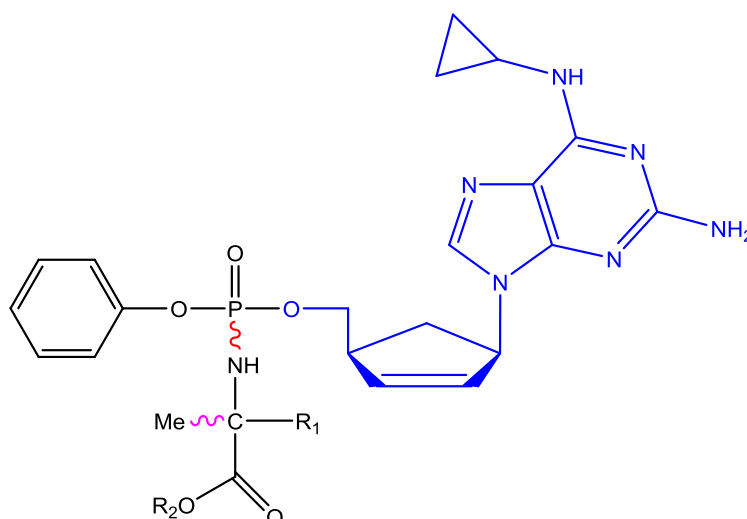
CEM/0 były jednak znacznie niższe ($EC_{50} = 2,5 \mu M$) niż dla wyjściowego nukleozydu ($EC_{50} = 0,01 \mu M$)⁶⁶. Wyraźnie niższa aktywność pochodnej **53** ($EC_{50} = 65 \mu M$) w komórkach z deficytem kinazy 2'-deoksycytydynamowej CEM/dCK⁻ sugeruje, że nie ma ona charakteru pronukleotydu, tj. nie zostaje przekształcona do 3TCMP, lecz do wolnego nukleozydu, 3TC. Zgodnie z oczekiwaniami zarówno 3TC, jak i jej pochodna **53**, zachowały hamujący potencjał w komórkach z deficytem kinazy tymidynamowej CEM/TK⁻ (3TC: $EC_{50} = 0,07 \mu M$, **53**: $EC_{50} = 5,5 \mu M$).

Znacznie lepsze wyniki uzyskano dla analogicznego amidofosforanu alaninowego, w którym komponentem nukleozydowym był abakawir (**54a**, Rys. 18). Związek ten był 25–30x bardziej aktywny od nukleozydu w stosunku do wirusów HIV-1 i HIV-2 w komórkach MT4, PBL i CEM. Wykazywał wprawdzie nieco większą cytotoksyczność, tym niemniej jego indeks selektywności był lepszy ok. 5x od wolnego ABC⁶⁷.

Dla amidofosforanów alaninowych **54a–b** zbadano wpływ konfiguracji chiralnego węgla α aminokwasu na aktywność przeciwko HIV. Okazało się, że zmiana reszty L-alaniny (naturalnego aminokwasu) na jej enancjomer D (związek **54b**) powodowała niezmiennie spadek inhibicji wirusów HIV-1 i HIV-2. Największą różnicę (28x) stwierdzono dla HIV-1 w komórkach CEM.



Rysunek 17. Fenyłowy *N*-alaninowy amidofosforan 3TC



- 54a** $R_1 = H$ (konfiguracja L), $R_2 = Me$
54b $R_1 = H$ (konfiguracja D), $R_2 = Me$
54c $R_1 = H$, $R_2 = Et$
54d $R_1 = H$, $R_2 = iPr$
54e $R_1 = H$, $R_2 = t-Bu$
54f $R_1 = Me$, $R_2 = Me$

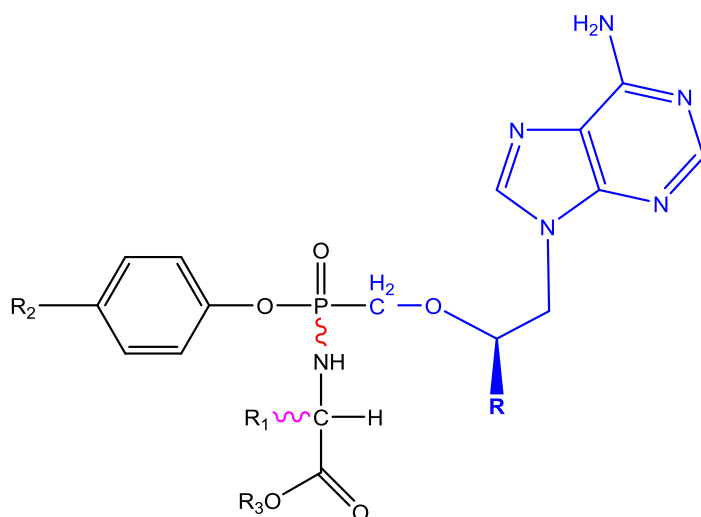
Rysunek 18. Fenylowe *N*-aminokwasowe amidofosforany ABC

Badano także wpływ stereochemii atomu fosforu, który dla tego typu związków także stanowi centrum stereogeniczne. Amidofosforany *N*-aminokwasowe otrzymywane są bowiem z analogów nukleozydów i aminokwasów o zdefiniowanej konfiguracji, natomiast centrum fosforowe jest wynikiem reakcji niekontrolowanych stereochemicznie. W efekcie uzyskuje się produkty w postaci mieszaniny diastereoizomerów o konfiguracji R_P i S_P . Diastereoizomery pochodnych **54a** i **c** rozdzielono za pomocą chromatografii nadkrytycznej. Pomimo że w zakładanym mechanizmie metabolizmu komórkowego (omówionego w dalszej części obecnego podrozdziału) reakcje z udziałem karboksyesteraz zachodzą z dala od atomu fosforu, a te z udziałem fosforoamidaz dotyczą produktów pośrednich, w których centrum fosforowe nie jest już chiralne, stwierdzono bardzo dużą zależność aktywności biologicznej omawianych pronukleotydów od konfiguracji atomu fosforu. W obu przypadkach frakcje diastereoizomerów migrujące szybciej („fast”) były o rząd wielkości bardziej aktywne (HIV-1, CEM) od izomerów migrujących wolniej („slow”), ale jednocześnie były bardziej cytotoksyczne, co sprawiło, że ich indeksy selektywności były zbliżone. Co ciekawe, mieszaniny diastereoizomeryczne wykazywały aktywność zbliżoną do izomerów „fast”, a toksyczność podobną jak izomery „slow”. W efekcie okazały się znacznie lepszymi

inhibitorami HIV-1 niż wyizolowane diastereoizomery (ich indeks selektywności był 3–4 razy wyższy).

Dla pochodnej L-alaninowej porównano także różne warianty estryfikacji grupy karboksylowej komponentu aminokwasowego alkoholami o różnej zawadzie przestrzennej (metyl, etyl, izopropyl, *tert*-butyl; związki **54a**, **c–e**). Stwierdzono, że wyraźnym trendem jest spadek aktywności związków w miarę wzrostu rozgałęzienia tego ugrupowania. Np. w przypadku HIV-1/CEM wartości EC₅₀ wynosiły odpowiednio 0,05, 0,07, 0,48 i 3,7 μM. Natomiast cytotoksyczność w tym szeregu związków nie różniła się znacząco (CC₅₀ ~13 ±4 μM). Zarówno w kontekście różnic w aktywności epimerów L i D, jak i związków o różnej zawadzie przestrzennej, interesujące jest, że pochodna **54f**, zawierająca dwie grupy metylowe przy atomie węgla α, miała aktywność zbliżoną do najaktywniejszego związku **54a**, wykazując przy tym praktycznie zupełny brak cytotoksyczności dla komórek CEM (natomiast dla komórek MT4 wszystkie związki typu **54** miały wartość CC₅₀ na poziomie kilku μM).

Analogiczny układ grup ochronnych (*O*-fenyl, *N*-aminokwas) wprowadzono do omawianych już wcześniej fosfonianów acyklicznych analogów adenozy, tenofowiru (PMPA) i adefowiru (PMEA), uzyskując amidofosfoniany, odpowiednio **55a–e** i **56a–c** (Rys. 19)^{68, 69}. Podobnie jak w przypadku związków **54**, wprowadzenie aminokwasu o konfiguracji D (pochodne **55c/56c**) znacznie pogorszyło aktywność związków wobec HIV-1 w stosunku do amidofosfonianów zawierających resztę naturalnej L-alaniny (**55b/56b**). Dla związku **55f**, przeznaczonego do I fazy badań klinicznych, zbadano wpływ konfiguracji atomu fosforu na aktywność (zgodnie z zaleceniami FDA w badaniach klinicznych należy badać poszczególne stereoizomery, a nie ich mieszaniny). Diastereoizomery zostały rozdzielone w skali wielokilogramowej za pomocą chromatografii HPLC na chiralnej fazie stacjonarnej Chiralpak AS, a ich konfiguracja absolutna została określona za pomocą analizy rentgenograficznej pojedynczego kryształu. Podobnie jak dla pronukleotydów o strukturze **54**, jeden z diastereoizomerów (o konfiguracji *S*_P; **57**, Schemat 10) był o rząd wielkości lepszym inhibitorem HIV i właśnie on został wybrany do kolejnych etapów badań klinicznych^{70, 71}. Związek **57** (alafenamid tenofowiru, TAF) w 48 tygodniowym badaniu porównującym dotąd stosowany fumaran dizoproksalu tenofowiru (TDF) **11** i TAF okazał się znacznie lepszym inhibitorem HIV w terapii HAART. Wyższa aktywność TAF przy niższych dawkach (25 mg vs 300 mg)⁷² z jednocześnie zmniejszoną ilością występowania działań niepożądanych (zaburzenia czynności nerek) w porównaniu do TDF, to główne atuty tego pronukleotydu. W roku 2015 został on zarejestrowany przez FDA jako składnik leku *Genvoya*¹⁷.



R = Me

55a R₁ = H, R₂ = H, R₃ = Me

55b R₁ = L-Me, R₂ = H, R₃ = Me

55c R₁ = D-Me, R₂ = H, R₃ = Me

55d R₁ = CH₂Ph, R₂ = Cl, R₃ = Me

55e R₁ = L-Me, R₂ = Cl, R₃ = Me

55f R₁ = L-Me, R₂ = H, R₃ = iPr

R = H

56a R₁ = H, R₂ = H, R₃ = Me

56b R₁ = L-Me, R₂ = H, R₃ = Me

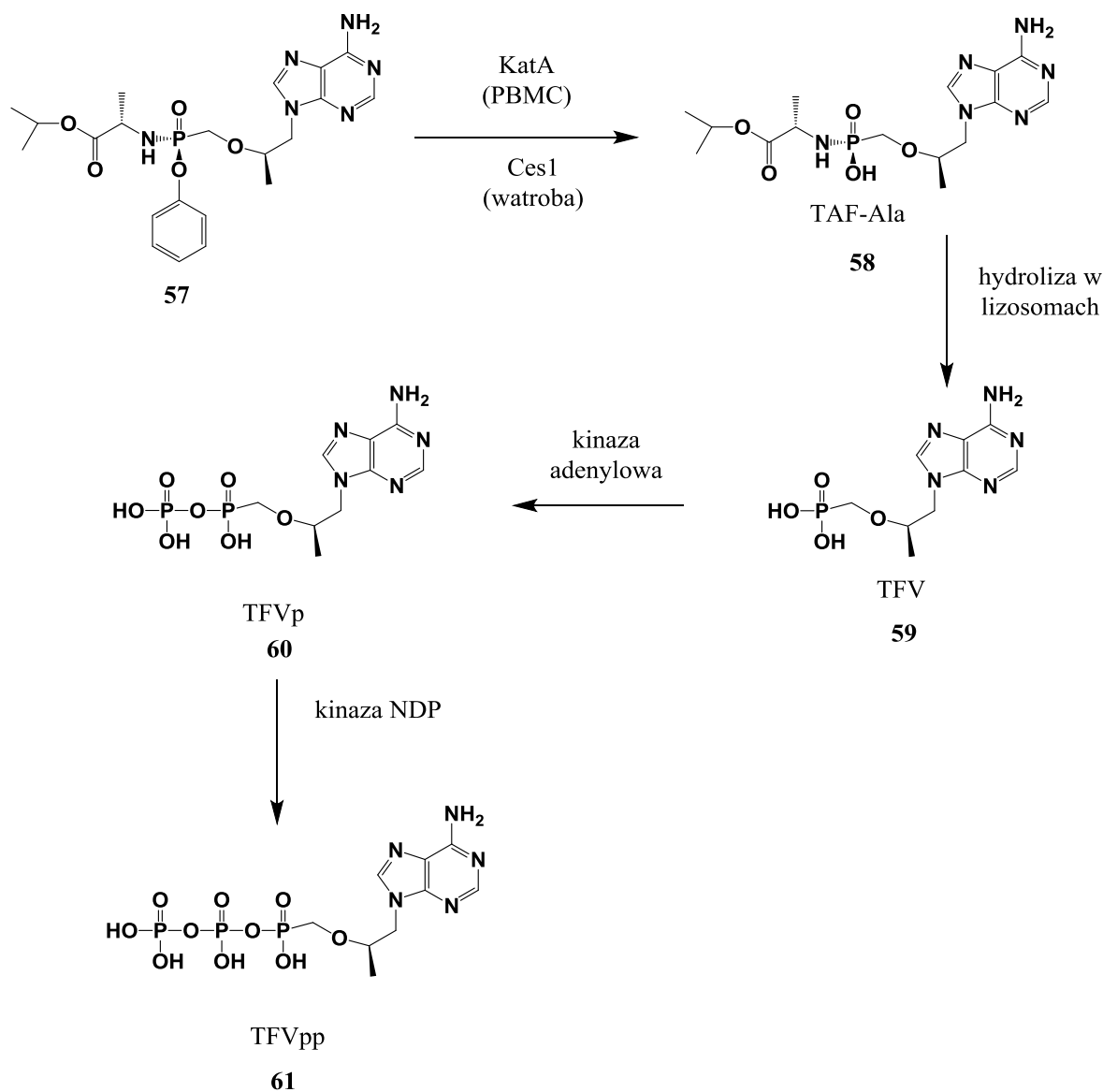
56c R₁ = D-Me, R₂ = H, R₃ = Me

Rysunek 19. Fenylowe *N*-aminokwasowe amidofosforany PMPA

Kluczowym elementem wewnątrzkomórkowej aktywacji TAF w komórkach PBMC są dwa enzymy: lizosomalna proteaza katepsyny A i karboksyesteraza Ces1 w komórkach wątroby, które przekształcają pronukleotyd TAF w amidofosfonian **58**. TAF-Ala jest następnie hydrolizowany do TFV **59** w lizosomach a następnie fosforylowany do TFVp **60** przez kinazę adenylową (AMP). Ostatni etap to utworzenie formy aktywnej TAFpp (**61**) z TAFp przy udziale kinazy NDP (Schemat. 10)⁷²⁻⁷⁴.

W serii tenofowiru, spośród pochodnych glicyny, alaniny i fenyloalaniny (odpowiednio **55a**, **55b** i **55d**) pierwsza z nich była o rząd wielkości gorsza od dwóch pozostałych, dla których uzyskano porównywalne, obiecujące wyniki – były one ok. 70 razy lepszymi inhibitorami HIV-1 i HIV-2 w komórkach MT4 i CEM od niemodyfikowanego tenofowiru. Dla analogicznych pochodnych adefowiru **56a** i **56b** uzyskano bardzo zbliżone rezultaty. Zmiana fosfoestrowej grupy fenolowej (**55b**) na bardziej labilną *p*-chlorofenyłową (**55e**) spowodowała umiarkowane obniżenie aktywności^{68, 69}.

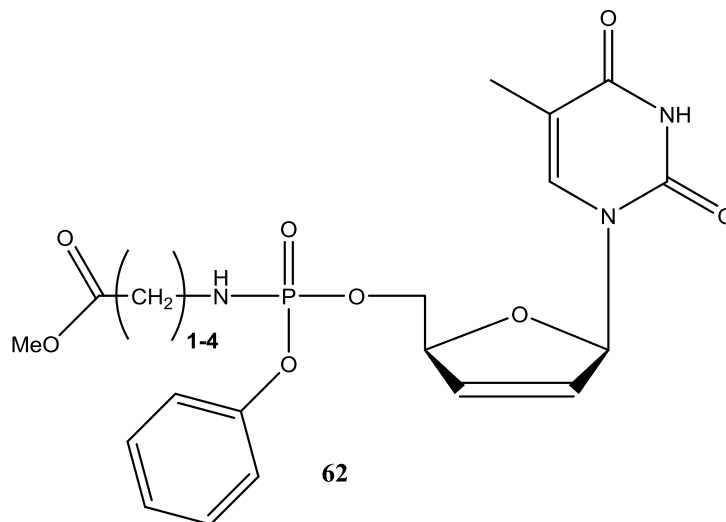
Podobnie jak dla alifatycznych pronukleotydów aminokwasowych typu **48**, także w serii estrów fenolowych zbadano wpływ długości aminokwasowego łańcucha metylenowego na aktywność anti-HIV. W serii amidofosforanów d4T typu **62** (Rys. 20) jedynie pochodna naturalnej glicyny (n = 1) wykazywała inhibicję wirusów, natomiast pozostałe związki (n = 2–4) były całkowicie nieaktywne⁷⁵.



Schemat 10. Wewnątrzkomórkowy metabolizm TAF

Na zakończenie omówienia *N*-aminokwasowych amidodiestrów arylo–dideoksynukleozydowych **46–51** chciałbym przedstawić wspólny dla wszystkich tych związków postulowany szlak metaboliczny, prowadzący do produktów aktywnych biologicznie (Schemat 11)^{62, 75-79}. Po wnikięciu związku do komórki, obecne w niej karboksyesterazy hydrolizują wiązanie estrowe w aminokwasie do anionu karboksylanowego (związek **63**), który w wewnątrzcząsteczkowym nukleofilowym ataku na atom fosforu powoduje eliminację grupy fenolowej i utworzenie pośredniej oksazafosolidyny **67**, będącej mieszanym bezwodnikiem wewnątrzcząsteczkowym. Związek ten jest nietrwały i w wyniku ataku cząsteczki wody na atom fosforu lub karbonylowy atom węgla szybko hydrolizuje do amidofosforanu **65** (nie zostało ustalone, która ze ścieżek, A czy B, jest dominująca⁷⁶, natomiast wykluczono pękanie wiązania P–N i tworzenie przejściowego mieszanego

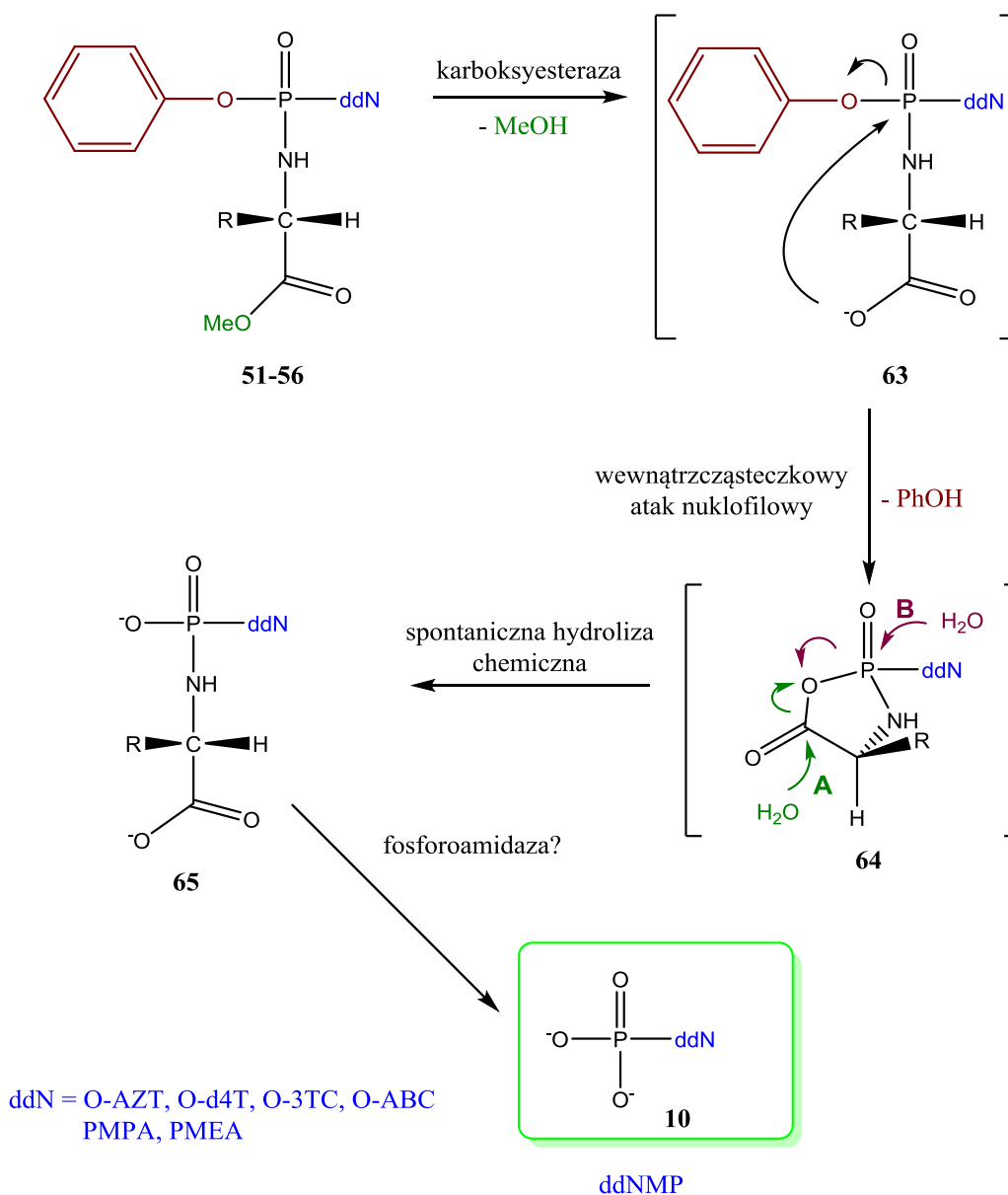
bezwodnika o budowie acyklicznej⁸⁰). Zgodnie z tym mechanizmem uwolniona w pierwszym etapie grupa karboksylowa działa jako wewnątrzcząsteczkowy katalizator nukleofilowy przyspieszający hydrolizę grupy fenolowej.



Rysunek 20. Fenylove amidofosforany d4T zawierające wyższe homologi α -aminokwasów

Mechanizm metabolizmu przedstawiony na Schemacie 11 jest zgodny z badaniami *in vitro* przeprowadzonymi przez grupę badawczą Luigiego Agrofoglio^{82, 83}, które wykazały, że *O*-fenylove *N*-alaninowe amidofosforany AZT, d4T, 3TC, i ddA były hydrolizowane do amidofosforanów ddNMP **65** przez PLE (esterazę z wątroby świńskiej, ang. *pig liver esterase*), która jest często wykorzystywana jako model aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych w badaniach pronukleotydów. Analiza HPLC i MS mieszanin reakcyjnych wykazała powstawanie amidofosforanów typu **65**, nie stwierdzono natomiast obecności produktów pośrednich będących wynikiem hydrolizy wyłącznie grupy metylowej lub wyłącznie grupy fenolowej.

W dodatkowych eksperymentach stwierdzono całkowity brak tworzenia amidoestrów analogicznych do produktów **65**, jeśli substratami były związki typu **62** o $n = 2-4$. W układach tych produktami końcowymi były amidofosforany z dezestryfikowaną grupą karboksylową reszty aminokwasowej (analogiczne do związków **63**); nie zaobserwowano natomiast hydrolizy grupy fenolowej⁷⁵. Ponieważ reaktywność układów, w których grupa fosforanowa tworzy pierścień 5-członowy jest znacznie większa niż gdy powstają pierścienie większe^{84, 85}, wynik ten jest dobrym potwierdzeniem zaproponowanego mechanizmu.



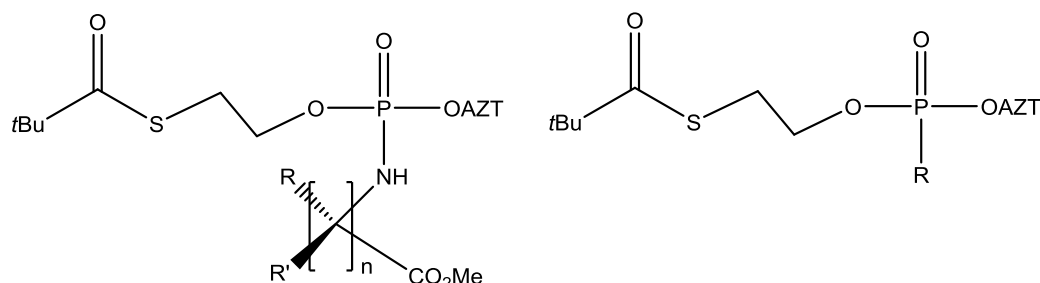
Schemat 11. Proponowany szlak rozpadu *N*-aminokwasowych amidofosforanów arylowo – nukleozydowych w komórce^{62, 81}

W medium komórkowym amidofosforan **65** nie jest produktem końcowym, gdyż ulega kolejnej hydrolizie, do ddNMP **10**, prawdopodobnie katalizowanej przez fosforoamidazy. Jak dotąd nie zostało jednoznacznie wyjaśnione czy rozerwanie wiązania P–N jest katalizowane przez jedną czy kilka specyficznych fosforoamidaz^{79, 86}.

4.4.3 Diestry amidofosforanowe typu (ddNO)(R¹O)P(O)NR² (R¹ = tBuSATE; R² = reszta aminokwasu lub aminy)

Odmianą koncepcję amidofosforandiestrów pronukleotydoczych zaproponował Perigaud ze współpracownikami, zastępując grupę arylową grupą *S*-piwaloilo-2-tioetylową

*t*BuSATE (**66**, Rys. 21)⁸⁷. Miało to na celu ominięcie problemu małej możliwości manewrowania resztami aminokwasowymi w omówionych powyżej amidofosforanach arylowych, których aktywność biologiczna była silnie uzależniona od struktury tego komponentu i w praktyce była ograniczona do pochodnych L-alaniny (Schemat 12, ścieżka A; por. Schemat 11). Obecność grupy SATE otwierała alternatywną ścieżkę metabolizmu związaną z eliminacją tej grupy w obecności karboksyesteraz (Schemat 12, ścieżka B). O powstających w takim wypadku przejściowych amidofosforanach monoestrowych **65** (Schemat 11) wiadomo już było, że w obecności enzymów komórkowych ulegają hydrolizie do monoestrów **10**.



66a $n = 1$ $R = R' = H$

66b $R = H, R' = Me$

66c $R = H, R' = CH_2Ph$

66d $R = H, R' = CH_2PhOH$

66e $R = H, R' = CH_2OTBDMS$

66f $R = H, R' = CH_2Ac$

66g $R = CH_3, R' = H$


66h $R = CH_3, R' = CH_3$

66i $n = 2$ $R = R' = H$

66j $n = 3$ $R = R' = H$

67a $R = -NH*i*Pr$

67b $-NHPh$

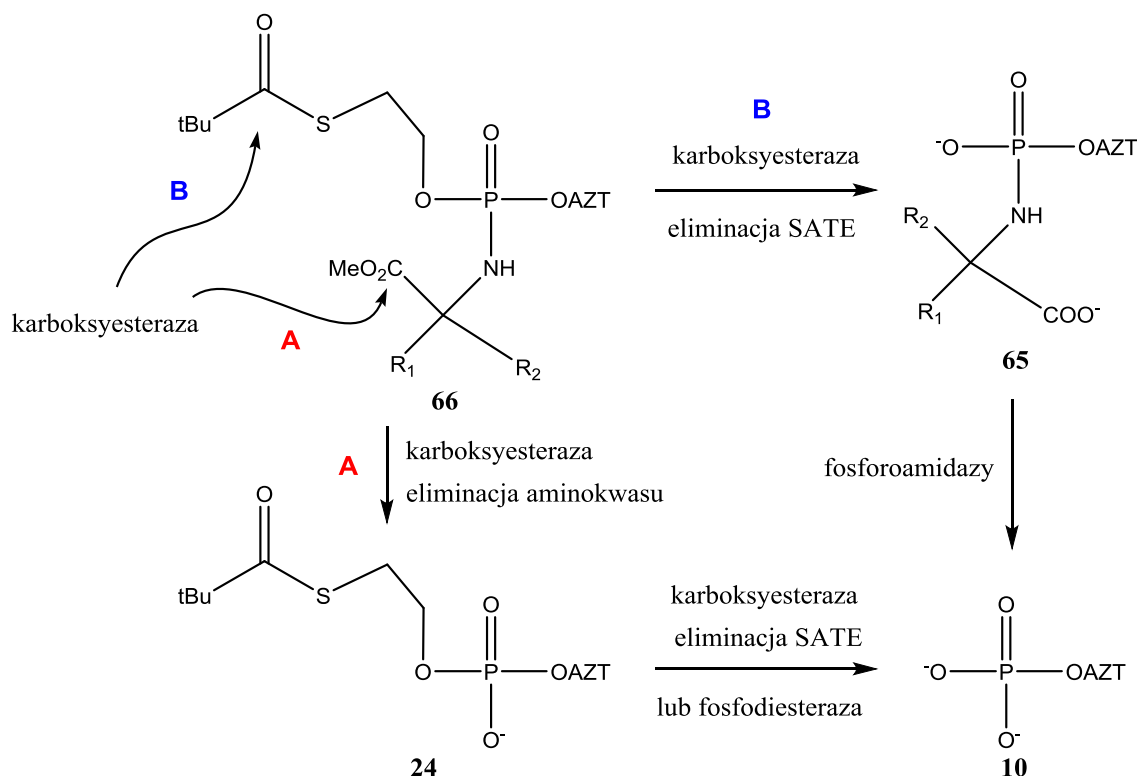
67c $-N$ 

Rysunek 21. Amidofosforany AZT zawierające grupę *t*BuSATE

W celu zbadania wpływu modyfikacji reszty aminokwasowej na aktywność otrzymano serię pochodnych AZT typu **66** (w formie mieszanin P-diastereoizomerów) niosących różne łańcuchy boczne, o różnej konfiguracji i różnej odległości między grupą aminową a karboksylową. Ich zdolność do inhibicji wirusa HIV-1 została przebadana na trzech różnych liniach komórkowych CEM-SS, MT4 i CEM/TK⁻, a jako związki odniesienia użyto wyjściowego nukleozydu AZT i alaninowego pronukleotydu fenyłowego **51a** (Rys. 15).

Okazało się, że aktywności wszystkich badanych związków w komórkach MT4 i CEM-SS były wysokie, w większości porównywalne ze związkiem **51a** ($EC_{50} = 0,05 \mu\text{M}$ dla CEM i $0,34 \mu\text{M}$ dla MT4) i nieznacznie niższe od AZT ($EC_{50} = 0,006 \mu\text{M}$ dla CEM i $0,017 \mu\text{M}$ dla MT4). Szczególnie silną inhibicję wirusa w komórkach CEM stwierdzono dla pochodnych **66f** i, co ciekawe, **66j** ($EC_{50} = 0,006\text{--}0,007 \mu\text{M}$). Związek **66f** był też bardzo aktywny w komórkach MT4 ($EC_{50} = 0,05 \mu\text{M}$). Są to wyniki całkowicie odmienne od uzyskanych dla analogów arylowych **51–62**. Zwłaszcza wysoka aktywność amidofosforanu zawierającego resztę kwasu 3-aminopropanowego (**66j**) świadczy, że rzeczywiście uzyskane związki metabolizowane są poprzez eliminację grupy SATE.

Stosunkowo dużą aktywność związków **66** zaobserwowano też w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej (w których AZT nie jest zdolny do inhibicji HIV), gdzie wartość EC_{50} mieściła się zwykle w granicach $1\text{--}5 \mu\text{M}$ – było to zgodne z oczekiwanym pronukleotydowym charakterem badanych związków. W układzie tym związek **66f** (najaktywniejszy w komórkach dzikich) okazał się być najslabszym inhibitorem wirusa ($EC_{50} = 16 \mu\text{M}$), co sugeruje, że ulegał on znaczącej defosforylacji do wolnego AZT.



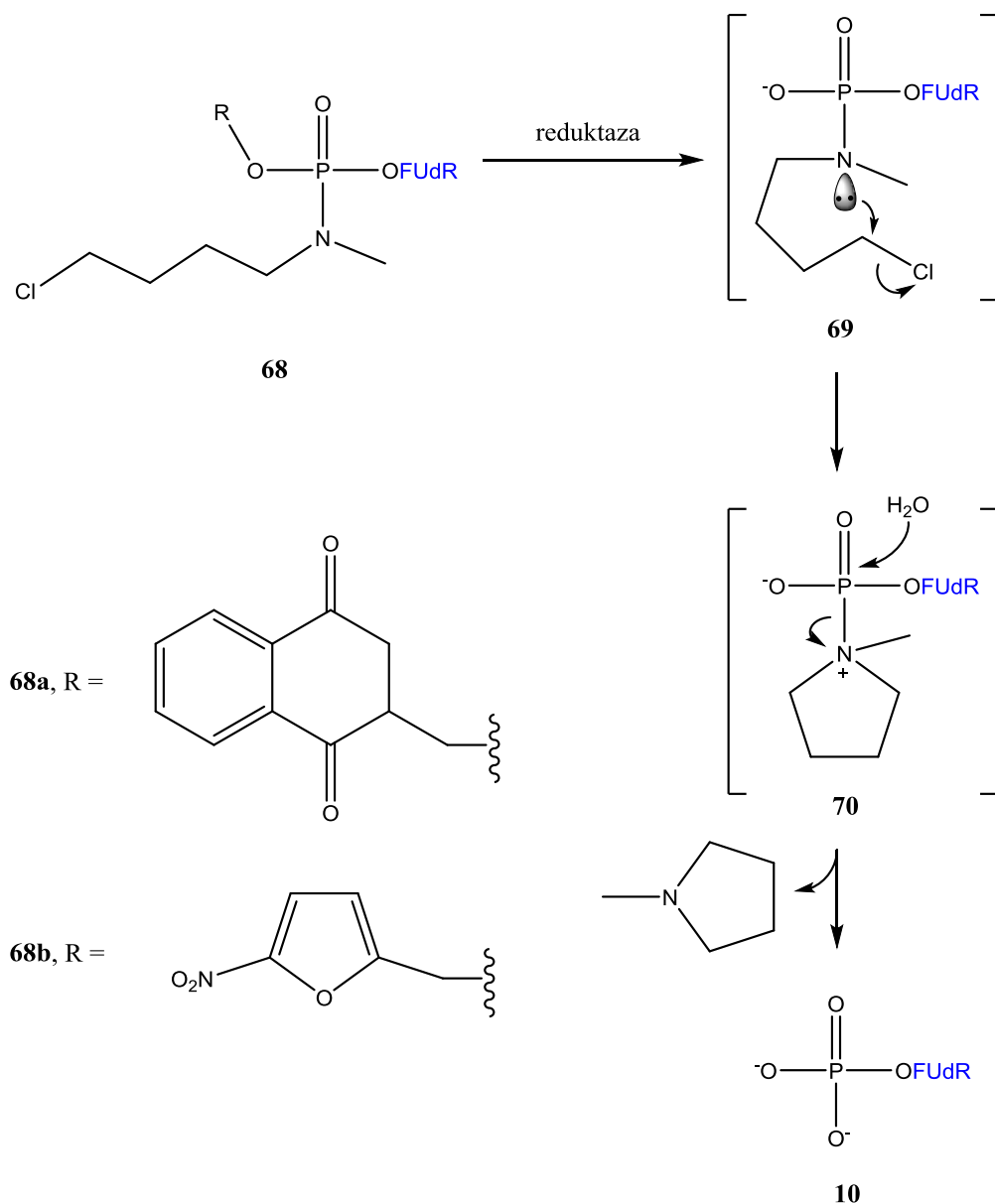
Schemat 12. Możliwe mechanizmy hydrolizy amidofosforanów *t*BuSATE

Zgodnie z postulowanym mechanizmem metabolizmu przedstawionym na Schemacie 12, obecność reszty aminokwasowej nie jest konieczna dla efektywnego działania pronukleotydowego amidofosforanów SATE i można je zastąpić innymi grupami amidowymi. Do badań w tym kierunku wykorzystano amidofosforany *t*BuSATE typu **67**, w których aminokwas został zastąpiony przez proste aminy: alifatyczną (**67a**), aromatyczną (**67b**) i alicykliczną (**67c**). Okazało się, że związki te nie tylko nie ustępują aktywności amidofosforanom aminokwasowym typu **66**, ale w niektórych układach je przewyższają (**67b**: $EC_{50} = 0,005 \mu\text{M}/\text{CEM}$; **67a**: $EC_{50} = 0,75 \mu\text{M}/\text{CEM}/\text{TK}^-$). Pochodna izopropylaminy (**67a**) wykazała najwyższą aktywność w komórkach CEM/TK⁻ ($EC_{50} = 0,75 \mu\text{M}$), w pełni potwierdzając spekulacje teoretyczne. Ze względu na możliwości modyfikowania grup aminokwasowych w amidofosforanach *t*BuSATE lub też ich zastąpienie różnymi aminami aryłowymi czy alkilowymi, istnieje duży potencjał dostosowywania właściwości farmakokinetycznych tych związków do wybranych celów terapeutycznych.

4.4.4 Diestry amidofosforanowe typu (ddNO)(R¹O)P(O)NR² (R³ = [utleniacz]; R² = chloroalkil)

Od połowy lat 90. XX wieku R.F. Borch rozwija koncepcję pronukleotydów typu **68**, zawierających trwale chemicznie estrowe grupy ochronne, np. nitrofurylową lub naftochinylową, które po wnikięciu do komórki powinny być redukowane przez obecne tam reduktazy i eliminowane (Schemat 13)⁸⁸⁻⁹¹.

W zaproponowanym mechanizmie w wyniku tej transformacji amidowa grupa chloroalkilowa staje się niestabilna (związek **69**) i w reakcji wewnątrzcząsteczkowej tworzy czwartorzędową grupę 1-metylotetrahydrofuran-1-ylową (związek **70**), która jako dobra grupa odchodząca jest szybko podstawiana cząsteczką wody. W efekcie powstaje nukleotyd typu **10**. Badania nad tego typu prolekami ukierunkowane były na terapię nowotworów, a uzyskane związki jako komponent nukleozydowy zawierały resztę 5-fluoro-2'-deoksyurydyny. W testach inhibicji syntetazy tymidylanowej związek **68a** miał profil aktywności bardzo zbliżony do macierzystego nukleozydu, co wyjaśniono jego bardzo szybkim rozkładem chemicznym do nukleotydu (który następnie ulegał prawdopodobnie także szybkiej defosforylacji) w badanych warunkach. Natomiast związek **68b** był ok. 2x mniej aktywny od **68a** i FudR w komórkach TK⁺, natomiast wykazywał stosunkowo niewielki spadek aktywności w komórkach TK⁻, co świadczyło o jego charakterze pronukleotydowym i było zgodne z postulowanym mechanizmem.



Schemat 13. Postulowany mechanizm metabolizmu amidofosforanów podatnych na działanie reduktaz

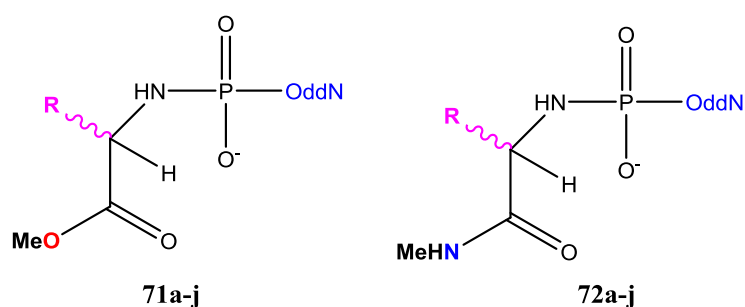
4.4.5 Monoestry amidofosforanowe typu (ddNO)P(O₂⁻)NR

(R = reszta aminokwasu lub aminy)

W niektórych z przedstawionych powyżej strategiach pronukleotydocywnych związków pośrednim były monoestrowe amidofosforany typu **65**. Związki tego typu (z zablokowaną grupą karboksylową) zostały także przebadane jako takie w kierunku wykorzystania ich jako pronukleotydy. Było to podejście niezgodne z wcześniejszymi założeniami koncepcji pronukleotydocywności, przyjmującymi, że przez błonę komórkową mogą skutecznie migrować

jedynie pochodne z w pełni blokowaną grupą fosforanową. Autorzy prac oczekiwali jednak, że zjonizowana reszta fosforanowa polepszy rozpuszczalność w wodzie i zwiększy stabilność hydrolityczną w osoczu, a przenikanie przez błonę komórkową będzie wystarczające dzięki hydrofobowym resztom dideoksynukleozydu i blokowanego aminokwasu. Należy też zwrócić uwagę, że kwas amidofosforowy jest znacznie słabszy od kwasu fosforowego, co oznacza, że większy jego odsetek znajduje się w formie obojętnej, sprotonowanej. Istotną zaletą monoestrów amidofosforanowych jest brak centrum stereogenicznego na atomie fosforu, dzięki czemu znika problem P-diastereoizomerów.

Pionierem tych badań był C.R. Wagner ze współpracownikami^{62, 77, 92-95}. Zaprojektowali oni i otrzymali aminofosforany AZT i ddA zawierające reszty aminowasowe z grupą karboksylową blokowaną jako ester (**71**), a także jako amid (**72**; Rysunek 22)^{77, 93, 95}. Dla pochodnych AZT określono lipofilowość, ich współczynniki podziału oktanol-woda (log P) oscylowały wokół -1,5, co oznaczało wprawdzie znaczący wzrost hydrofilowości w stosunku do AZT (log P = 0,2), ale nie wykluczało migracji przez błonę. W każdej serii badano wpływ struktury i konfiguracji łańcucha bocznego reszty aminokwasowej na aktywność anti-HIV i cytotoksyczność, przy czym dla pochodnych AZT do badań włączono komórki raka piersi w celu oceny potencjalnych możliwości wykorzystania amidofosforanów **71** i **72** w terapii nowotworów⁹⁵.



ddN = AZT:

- a** R = L-3-indolil-CH₂
- b** R = D-3-indolil-CH₂
- c** R = L-PhCH₂
- d** R = D-PhCH₂
- e** R = L-Me
- f** R = L-*i*Pr
- g** R = L-*i*Bu

ddN = ddA:

- h** R = L-3-indolil-CH₂
- i** R = L-PhCH₂
- j** R = L-Me

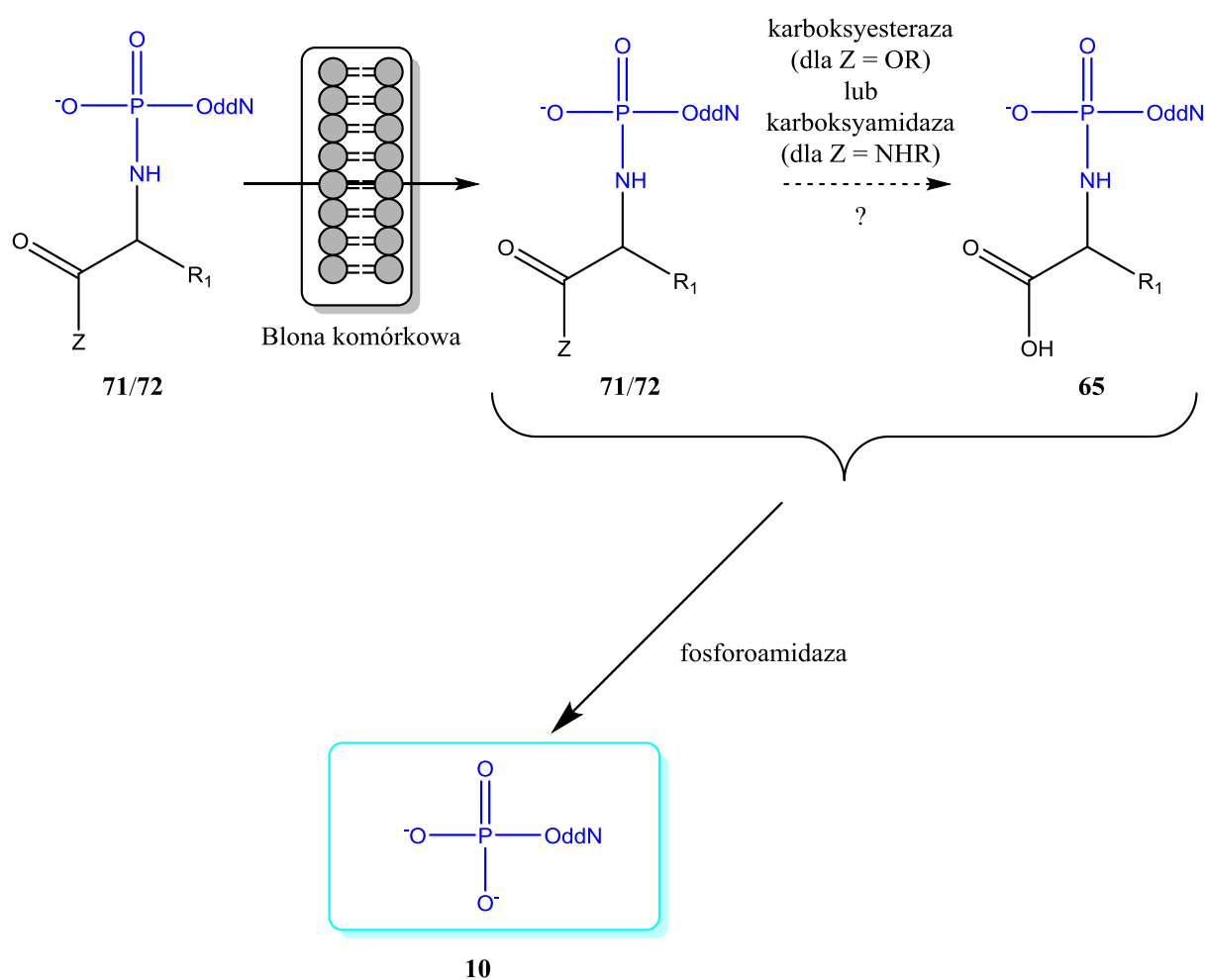
Rysunek 22. Amidofosforanowe monoestry AZT i ddA

Badania biologiczne przeprowadzono głównie na liniach komórkowych PBMC zainfekowanych wirusem HIV-1. Pochodne ddA **71h** i **71i** wykazywały zwykle aktywność zbliżoną do macierzystego nukleozydu, natomiast związek **71j** i wszystkie amidy **72** były o ok. rząd wielkości mniej aktywne. W przypadku amidoestrów AZT ($EC_{50} = 0,007 \mu\text{M}$ dla wolnego AZT) wyniki były mniej obiecujące, jedynie pochodna L-alaniny **71e** i D-feniloalaniny **71d** miały EC_{50} poniżej 0,1 mM. Intrygująca była bardzo niska aktywność estrowej pochodnej L-feniloalaniny **71c**, zwłaszcza, że zarówno jej wspomniany wyżej epimer D (**71d**) i wersja amidowa (**72c**) należały do grupy związków najaktywniejszych. Co więcej, w komórkach CEM ta sama estrowa pochodna L-feniloalaniny **71c** była bardzo dobrym inhibitorem HIV-1 (aktywność na poziomie wolnego AZT). Poza wymienionymi pochodnymi, różnice aktywności w komórkach PBMC były stosunkowo niewielkie, nie widać było ani wpływu konfiguracji węgla α , ani typu zabezpieczenia grupy karboksylowej (jako estry **71** lub amidy **72**). Wskazuje to, że za tworzenie AZTMP z badanych związków odpowiada hydrolaza amidofosforanowa (nie została ona jednak zidentyfikowana), a nie odblokowanie grupy karboksylowej i następująca po nim katalizowana wewnątrzcząsteczkowo hydroliza chemiczna wiązania P–N w amidofosforanie **71**. Hydrolizie katalizowanej fosforoamidazą ulegać mogą prawdopodobnie równie skutecznie zarówno pronukleotydy **71/72**, jak i częściowo odblokowane produkty przejściowe **65** (Schemat 14, por. Schematy 11/12). Żaden z badanych związków nie wykazywał cytotoksyczności ($CC_{50} > 100 \mu\text{M}$) wobec komórek PBMC i CEM (natomiast dla wolnego AZT w komórkach CEM stwierdzono $CC_{50} = 14 \mu\text{M}$)^{77, 93}, co czyni je obiecującymi obiektami do dalszych badań.

Skuteczność antyrakowa aminokwasowych amidofosforanomonoestrów **71** i **72** była testowana na komórkach nowotworowych MCF-7 (raka piersi)⁹⁵. W przeciwieństwie do aktywności antywirusowej, cytotoksyczność wobec MCF-7 była silnie uzależniona od struktury i stereochemii łańcucha bocznego, choć jedyną widoczną regularnością był brak aktywności pochodnych D-aminokwasów. Najlepsze wyniki uzyskano dla pochodnych L-tryptofanu **71a** i **72a**, których CC_{50} wobec MCF-7 wyznaczono jako odpowiednio 0,059 i 0,016 μM . Jak już wspomniano, wobec komórek CEM związki te są nietoksyczne.

Na Schemacie 14 przedstawiono prawdopodobny metabolizm amidofosforanów nukleozydowych zgodny z koncepcją pronukleotydotową. Nie można jednak wykluczyć, że związki te są pronukleozydami i są hydrolizowane przez fosfatazy do dideoksynukleozydów, które następnie są fosforyzowane przez odpowiednie kinazy do

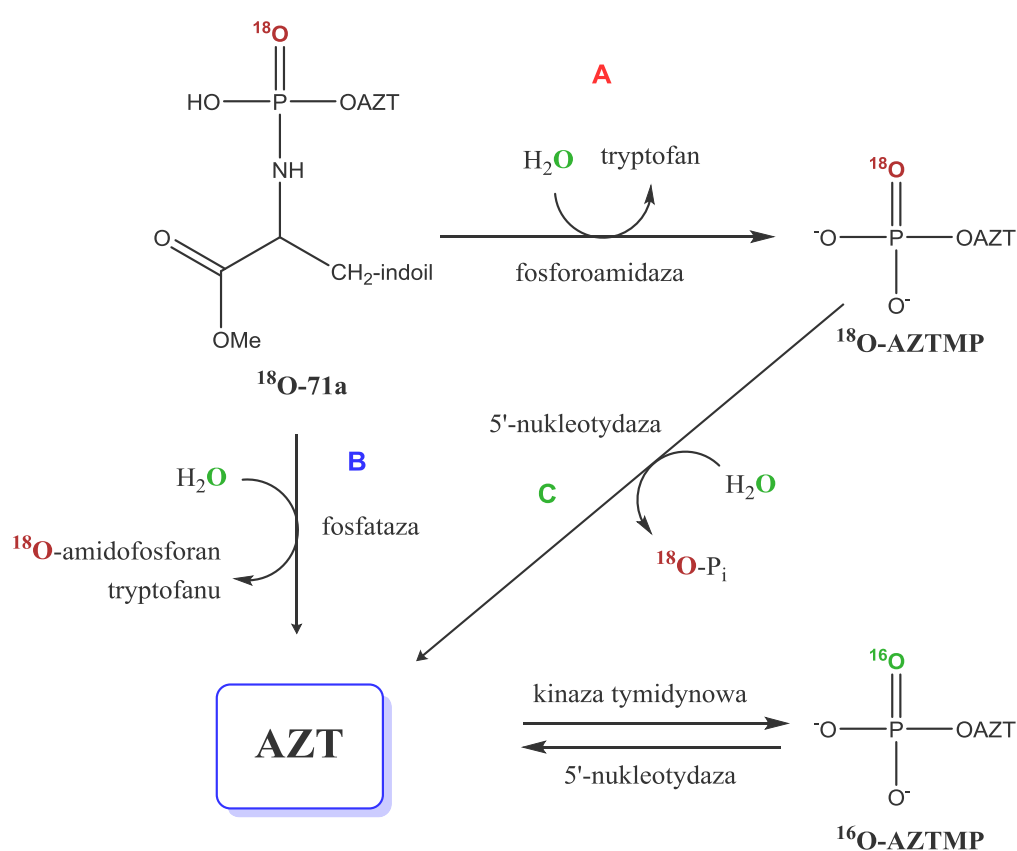
monofosforanów. Standardową procedurą weryfikacji charakteru pronukleotydowego związków są badania ich aktywności w komórkach TK⁻. Są to jednak procedury trudne i nie zawsze dające jednoznaczne wyniki. W badaniach mechanistycznych metabolizmu amidofosforanów typu **71** w ekstraktach komórkowych CEM i PBMC, wykorzystana została odmienna metoda, bazująca na badaniu składu izotopowego (HPLC-ESI-MS/MS) metabolitów pochodnej **71a**, w której fosforylowy atom tlenu został zastąpiony izotopem ¹⁸O (Schemat 15)⁹⁶.



Schemat 14. Mechanizm rozpadu amidofosforano monoestrów do ddNMP

W przypadku PBMC wewnątrzkomórkowy poziom ¹⁸O-AZTMP utrzymywał stałą wartość, a AZT był wykrywany jedynie w minimalnym stężeniu. Jednocześnie stosunkowo wolno rosło stężenie ¹⁶O-AZTMP. Wynika z tego, że rzeczywiście ma tu miejsce mechanizm pronukleotydowy (ścieżka A), a AZT powstający stopniowo w wyniku defosforylacji

^{18}O -AZTMP (ścieżka C) jest szybko fosforylowany do ^{16}O -AZTMP. Z eksperymentu nie wynikał znaczący udział drogi B. W komórkach CEM kinetyka procesu była inna. ^{18}O -AZTMP powstał wprawdzie początkowo w porównywalnej ilości jak w PBMC, lecz jego stężenie szybko spadło z jednoczesnym wzrostem ilości AZT i ^{16}O -AZTMP. Wynika to prawdopodobnie z wysokiej aktywności 5'-nukleotyduazy w tych komórkach, generującej nukleozyd z obu form AZTMP (^{18}O i ^{16}O). Podobnie jak dla komórek PBMC, droga B nie była prawdopodobnie istotna. W komórkach CEM badany związek **71a** działał więc jako pronukleotyd, ale jedynie w dość ograniczonym stopniu, a główny szlak metaboliczny przebiegał z udziałem nukleozydu.

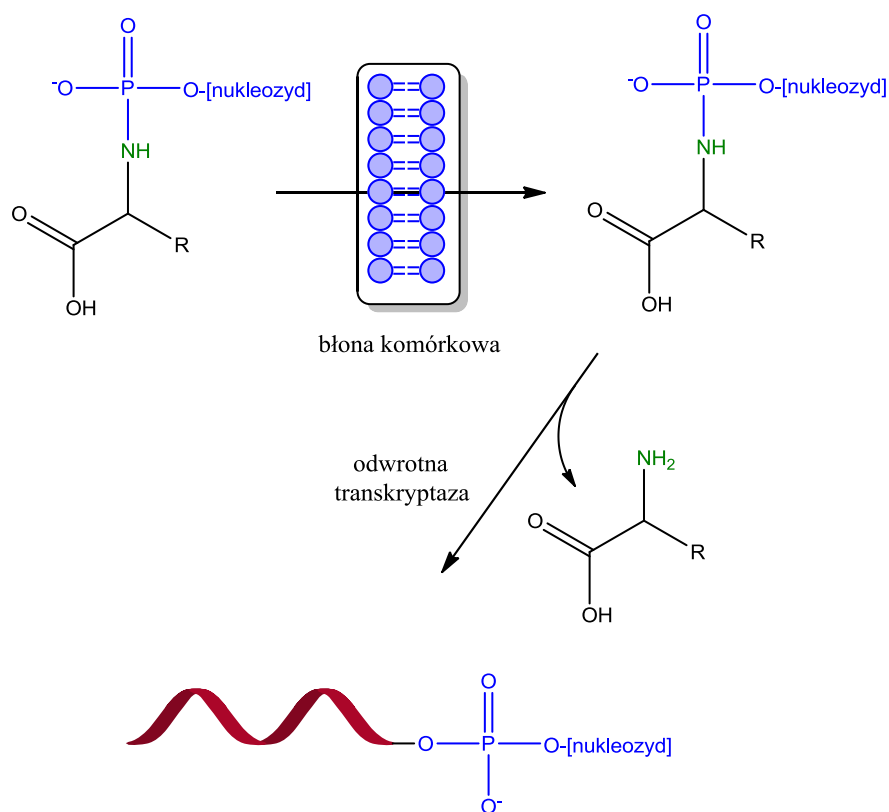


Schemat 15. Ścieżki metaboliczne amidofosforanu ^{18}O -71a.

W dotychczasowych rozważaniach mechanizmu metabolizmu proleków opartych o blokowane fosforany dideoksynukleozydów brano pod uwagę ich działanie jako pronukleotydy (czyli związki generujące odpowiednie 5'-fosforany dideoksynukleozydów), ewentualnie jako pronukleozydy (czyli związki uwalniające dideoksynukleozydy). W latach 2007/2008 Piet Herdewijn ze współpracownikami opublikowali natomiast prace wskazujące, że niektóre aminokwasowe amidofosforany nukleozydów mogą służyć bezpośrednio,

w niezmienionej formie, jako substraty odwrotnej transkryptazy HIV i innych polimeraz DNA, konkurując z naturalnymi NTP. Reszta aminokwasowa staje się wówczas grupą odchodzącą (zamiast pirofosforanu, powstającego gdy substratami są NTP), a nukleotyd zostaje włączony do syntetyzowanego łańcucha DNA (Schemat 16)⁹⁷⁻⁹⁹.

Powyższe badania prowadzono wprawdzie na pochodnych naturalnych nukleozydów, można jednak spekulować, że podobny mechanizm może dotyczyć także dideoksynukleozydów. Miałyby to bardzo istotne konsekwencje, gdyż związki tego typu działałyby – przynajmniej częściowo – jako leki, a nie jako proleki. Pożądana byłaby ich wysoka trwałość, nie tylko chemiczna, ale i enzymatyczna. Hydroliza enzymatyczna, która jest kluczowym elementem w strategii pronukleotydu, stałaby się zbędna, a być może nawet niepożądana. W efekcie w fazie projektowania potencjalnych inhibitorów wirusowej RT należałoby skupiać się na zdolności tego enzymu do włączania danego związku do DNA. Herdewijn zauważył znaczące różnice pomiędzy amidofosforanami niosącymi różne reszty aminokwasowe i przedyskutował ten fakt w kontekście dopasowania sterycznego i elektronowego do miejsc aktywnych enzymów oraz jakości grupy odchodzącej, wyjaśniając w ten sposób szczególnie dobre właściwości substratowe amidofosforanowych pochodnych kwasu L-asparaginowego.

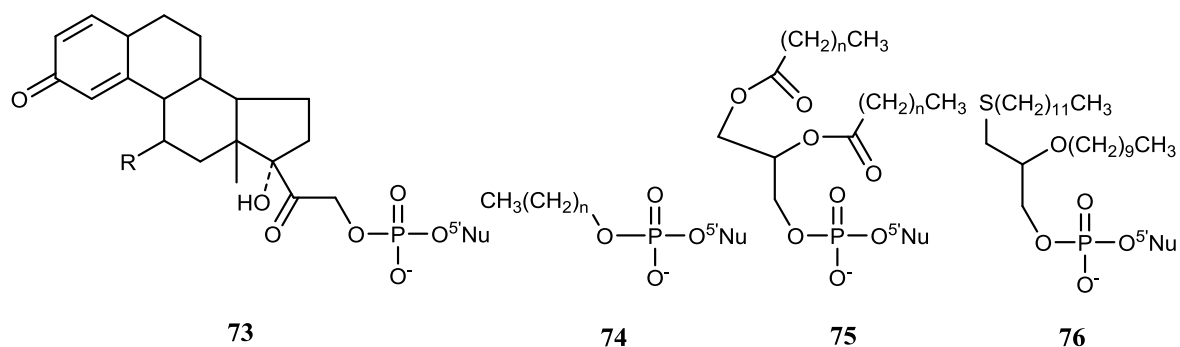


Schemat 16. Amidofosforany nukleozydów jako substraty RT

Podsumowując tę sekcję należy zwrócić uwagę, że wszystkie omówione amidofosforanomonoestry dideoksynukleozydów wykazywały inhibicję przeciwwirusową, a w niektórych przypadkach także przeciwnowotworową; mogą więc one stać się wartościowymi narzędziami molekularnymi w walce z HIV i rakiem. Mechanizm ich działania nie jest do końca poznany, a sytuację skomplikowały dodatkowo niedawne wyniki Herdewijna, wskazujące na możliwość występowania zupełnie odmiennej aktywności biologicznej. Dlatego uważam tę klasę inhibitorów RT za szczególnie ciekawą i wartą dalszych badań.

4.5 Fosforanodiestry zawierające grupy lipofilowe

Jednym z pierwszych podejść mających na celu zwiększenia efektywności leków nukleozydowych było przeprowadzenie ich w fosforanodiestry zawierających grupę silnie lipofilową, np. pochodne cholesterolu (**73**, Rys. 23)¹⁰⁰, długi łańcuch alifatyczny (**74**)¹⁰¹, czy też pochodne fosfatydyloglicerolu zestryfikowanego wyższymi kwasami tłuszczowymi (**75**)^{8, 102, 103} lub niosącego długie łańcuchy alifatyczne związane eterowo i tioeterowo (**76**)¹⁰⁴.

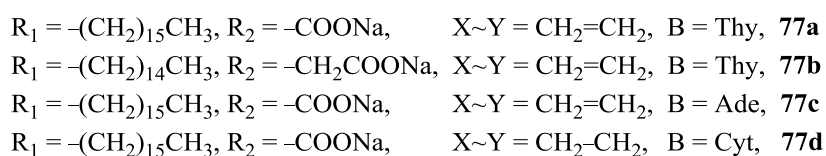
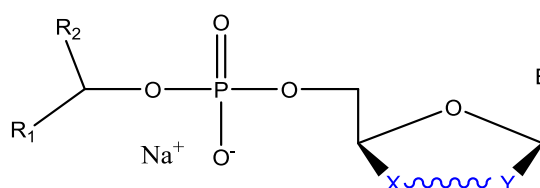


Rysunek 23. Fosforanodiestry niosące grupy lipofilowe

Wprowadzenie grupy lipofilowej miało na celu umożliwienie przenikania związków przez błonę komórkową, natomiast dzięki zjonizowanej reszcie fosforanowej były one nadal rozpuszczalne w wodzie. Zakładano, że we wnętrzu komórek fosfodiesterazy uwolnią pożądaną monoester dideoksynukleozydu. Związek ten rzeczywiście był generowany, jednak w wypadku związków z łańcuchem alifatycznym typu **74** mechanizm okazał się być bardziej skomplikowany – łańcuch boczny jest stopniowo utleniany i skracany o dwa atomy węgla w peroksydomach aż do całkowitej degradacji¹⁰⁵. Diestry z grupami lipofilowymi badano zarówno jako potencjalne leki przeciwnowotworowe, jak i antywirusowe. W testach

biologicznych badane pochodne AZT i d4T były jednak zazwyczaj mniej lub tak samo aktywne jak wyjściowe nukleozydy i są one zazwyczaj uważane jako słabe nośniki nukleotydów terapeutycznych⁴¹. Tym niemniej związek typu **74** (n = 17, Nu = arabinoza) został zatwierdzony przez FDA jako lek przeciwbiałaczkowy, a pochodna **76** AZT (tidoksil foziwudyny) w fazie II badań klinicznych wykazała lepsze właściwości farmakologiczne niż sam AZT¹⁰⁶; była ona też badana jako lek weterynaryjny przeciwko zakażeniom kocim wirusom niedoboru odporności (FIV)¹⁰⁷. W badaniach w komórkach CEM stwierdzono, że pochodne AZT typu **76** ulegają hydrolizie enzymatycznej do AZTMP i eteru/tioeteru glicerolu; wykazują więc charakter pronukleotydowy¹⁰⁸.

W powyższy nurt wpisują się niedawne badania grupy Herdewijna¹⁰⁹ nad fosfolipidowymi diestrami d4T, d4A i ddC niosącymi reszty kwasów (+/-)- α -hydroksystearynowego i (+/-)- β -hydroksystearynowego (**77**, Rys. 24).



Rysunek 24. Lipofilowe fosforanodiestry badane przez grupę Herdewijna¹⁰⁹

Otrzymane fosfodiestrowe pochodne dideoksynukleozydów były testowane na aktywność wobec wirusów HIV-1 i HIV-2 w komórkach MT-4, CEM/0 oraz CEM/TK⁻. Pochodna d4T z resztą α -hydroksykwasu (**77a**) hamowała namnażanie wirusa HIV-1 i HIV-2 w komórkach MT4 (na poziomie zbliżonym do AZT), ale nie w komórkach CEM, natomiast w układzie β -hydroksykwasu (**77b**) aktywność była znacznie słabsza. Dla pochodnej ddC (**77d**) wszystkie wyniki były gorsze w porównaniu z wyjściowym nukleozydem. W przypadku fosforanu d4A (**77c**) aktywność była znacznie wyższa (ok. 500x) od macierzystego nukleozydu. Było to dość intrygujące, gdyż sama d4A jest bardzo słabym inhibitorem HIV. Autorzy spekulują, że wyjątkowo korzystne właściwości przeciwwirusowe

pochodnej **77c** mogły wynikać z jej szczególnej podatności na hydrolizę enzymatyczną w komórkach.

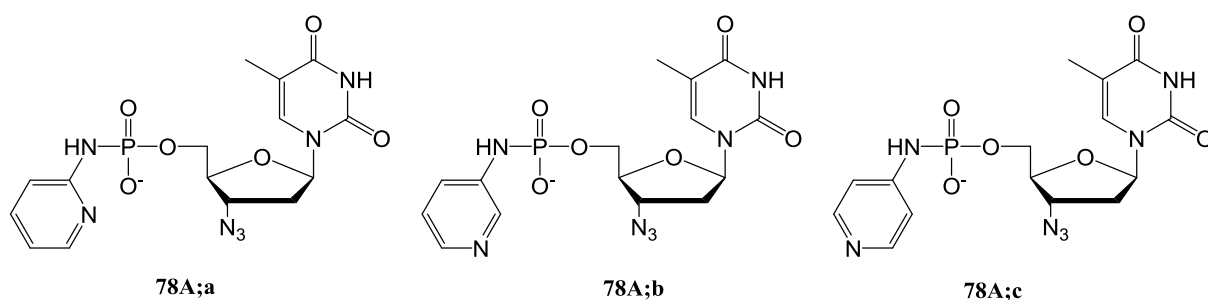
4.6 Podsumowanie

Opisane – z konieczności w syntetyczny sposób – w części literaturowej różnorodne podejścia do otrzymania pronukleotydów terapeutycznych obrazują skalę problemów, z jakimi trzeba się zmierzyć w celu uzyskania produktu farmaceutycznego o właściwościach na tyle interesujących, aby mógł stać się kandydatem do badań klinicznych. Pomimo otrzymania i zbadania bardzo dużej liczby potencjalnych pronukleotydów anty-HIV, są one ciągle na etapie badań i cały czas opracowywane są nowe koncepcje uzyskania pochodnych o lepszych parametrach. Omówione przykłady przedstawiają kilka reprezentatywnych strategii modyfikacji grupy fosforanowej (diestry, triestry, amidoestry, amidodiestry), które niosą różnego typu grupy ochronne. Grupami maskującymi mogą być zarówno proste grupy alkilowe i aryłowe, jak i grupy rozbudowane, niosące różne grupy funkcyjne. Pozwala to na kontrolowanie i sterowanie właściwościami fizykochemicznymi (takimi jak rozpuszczalność, zdolność do biernego przenikania przez membrany lipidowe lub stabilność chemiczna) oraz biochemicznymi i biologicznymi (np. podatnością na degradację enzymatyczną, metabolizmem, aktywnością antywirusową czy cytotoksycznością).

VI. WYNIKI I DYSKUSJA

1. Wprowadzenie

Podjmując studia doktoranckie w Pracowni Analogów Nukleotydów i Oligonukleotydów (obecnie Zakład Chemii Kwasów Nukleinowych) IChB, włączyłem się w prace nad nowymi analogami nukleotydów typu amidofosforanów. Jak opisano to szerzej w części literaturowej, badania monoestrów amidofosforanowych jako potencjalnych pronukleotydów o aktywności antywirusowej zainicjował w roku 1997 Carston R. Wagner⁶². Pochodne zaproponowane przez grupę Wagnera zawierały w części amidowej blokowane reszty aminokwasowe, a ich wysoka aktywność anti-HIV była raczej zaskakująca w świetle pierwotnej koncepcji pronukleotydowej, zgodnie z którą dążono do całkowitej eliminacji ładunku z reszty fosforanowej w celu ułatwienia przenikania przez błony komórkowe. W amidofosforanach zaprojektowanych w zespole A. Kraszewskiego (IChB PAN) grupa amidowa miała inny charakter – do ich konstrukcji wykorzystane zostały bowiem aminy aromatyczne. Wybór tego typu układów był kontynuacją wcześniejszych badań nad potencjalnymi pronukleotydami zawierającymi ligandy aromatyczne¹¹¹⁻¹¹³. Wśród przebadanych związków szczególnie wysoką aktywność anti-HIV ($EC_{50} = 0,001 \mu M$) i jednocześnie bardzo niską cytotoksyczność (CC_{50} nie zostało osiągnięte nawet przy maksymalnych stężeniach) wykazały pochodne AZT zawierające ugrupowania (*N*-pirydylo)amidofosforanowe. W publikacji¹¹⁰ i patencie¹¹¹ będących efektem tych prac opisano wszystkie trzy możliwe izomery tego typu pochodnych AZT, tj. związki zawierające resztę 2-, 3- i 4-aminopirydyny*:

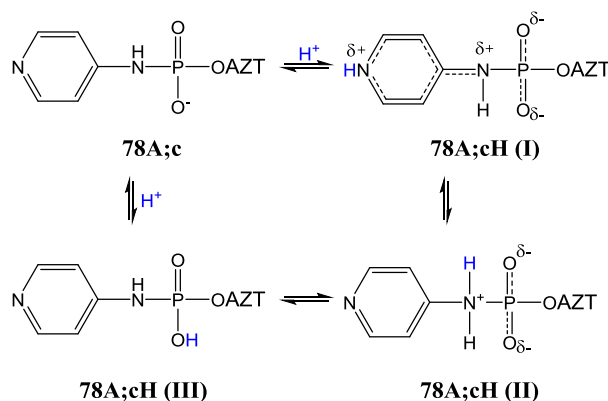


Rysunek 25. Struktury (*N*-pirydylo)amidofosforanów AZT

*W numeracji amidofosforanów typu **78** oznaczenia literowe wskazują typ 2',3'-dideoksynukleozydu (duże litery **A–E**) i aminy heteroaromatycznej (małe litery **a–p**). Zob. Rys. 30, s. 65.

Amidofosforany te wydały mi się szczególnie interesujące, gdyż oprócz bardzo obiecujących parametrów biologicznych, mają one szereg korzystnych cech fizykochemicznych, takich jak wysoka trwałość chemiczna, odporność na degradację enzymatyczną i dobra rozpuszczalność w wodzie. Ta ostatnia cecha ułatwia aplikację w układach żywych i umożliwia transport w środowisku fizjologicznym, a odporność na hydrolizę enzymatyczną gwarantuje dotarcie związku do wnętrza komórki w formie niezmienionej, gdzie mogą zostać przekształcone do reaktywnych metabolitów (przede wszystkim 5'-trifosforanu AZT). Co ważne, dla związków tych zostały wykonane badania toksykologiczne na modelach zwierzęcych, które dowiodły ich niskiej szkodliwości.

Warto tu zwrócić uwagę na lipofilowo-hydrofilowy charakter związku chemicznego badanego w kontekście zastosowań medycznych. Jest on bowiem niezwykle istotny dla aktywności biologicznej substancji chemicznej: powinien być zrównoważony, w taki sposób, aby dana substancja była dobrze rozpuszczalna w wodzie, ale jednocześnie musi mieć ona jak najlepszą zdolność do przenikania przez lipidowe błony komórkowe. (*N*-Pirydylo)-amidofosforanowe pochodne AZT są dobrze rozpuszczalne w wodzie (czyli są one hydrofilowe), a jednocześnie ich wysoka aktywność anti-HIV świadczy o skutecznym pokonywaniu błony komórkowej, a więc o lipofilowości. Te dwie przeciwstawne cechy można wytłumaczyć występowaniem związku w układzie równowagowym, w którym jedna forma jest bardziej hydrofilowa, a druga bardziej lipofilowa. Realnym w warunkach fizjologicznych, bardzo szybkim układem tego typu jest równowaga kwasowo-zasadowa. Omawiane związki charakteryzują się obecnością aż trzech potencjalnych miejsc protonowania fragmentu amidofosforanowego zawierającego heterocykliczny pierścień aromatyczny z atomem azotu. Przedstawić to można na przykładzie pochodnej [*N*-(pirydyn-4-ylo)]amidofosforanowej AZT:



Rysunek 26. Możliwe formy tautomeryczne proponowanego [*N*-(pirydyn-4-ylo)]amidofosforanu AZT

Forma anionowa **78A;c** jest przypuszczalnie formą najlepiej rozpuszczalną w wodzie. Spośród trzech form protonowanych **78A;cH (I), (II) i (III)**, których udział w warunkach fizjologicznych można uznać za prawdopodobnie znaczący, najwyższej lipofilowości można oczekiwać dla obojętnej elektrycznie formy **(III)**. Właściwości form zwitterjonowych **(I)** i **(II)** są trudniejsze do przewidzenia. Za szczególnie korzystną energetycznie należy uznać formę **(I)**, w której zarówno ładunek ujemny, jak i dodatni są zdelokalizowane. Wielość protonowanych form tautomerycznych i mezomerycznych prowadzić powinna do przesuwania równowagi w kierunku związku protonowanego, a w efekcie do podwyższenia jego pK_a do poziomu umożliwiającego efektywne protonowanie w warunkach fizjologicznych.

W mojej ocenie amidofosforany heteroaromatyczne można uznać za bardzo ciekawe związki, zarówno od strony fizykochemicznej, jak i biochemicznej, a w dalszej perspektywie, być może także medycznej. Uwagę moją zwrócił fakt, że omówione powyżej amidofosforany *N*-pirydylowe nie są jedynymi amidofosforanami heteroaromatycznymi tego typu. Poza bowiem trzema aminopirydynami znanych jest wiele innych amin heterocyklicznych i – co ważne – są one łatwo dostępne handlowo. Stwarzało to możliwość prawdopodobnie stosunkowo łatwego uzyskania całej gamy nowych pochodnych amidofosforanowych AZT i innych 2',3'-dideoksynukleozydów, w których aromatyczny fragment amidowy byłby w różny sposób rozbudowywany i modyfikowany dla uzyskania zróżnicowanych właściwości nie tylko hydrofilowo-lipofilowych, ale także kwasowo-zasadowych, ze zmienionym rozkładem ładunków czy niosących zawadę przestrzenną.

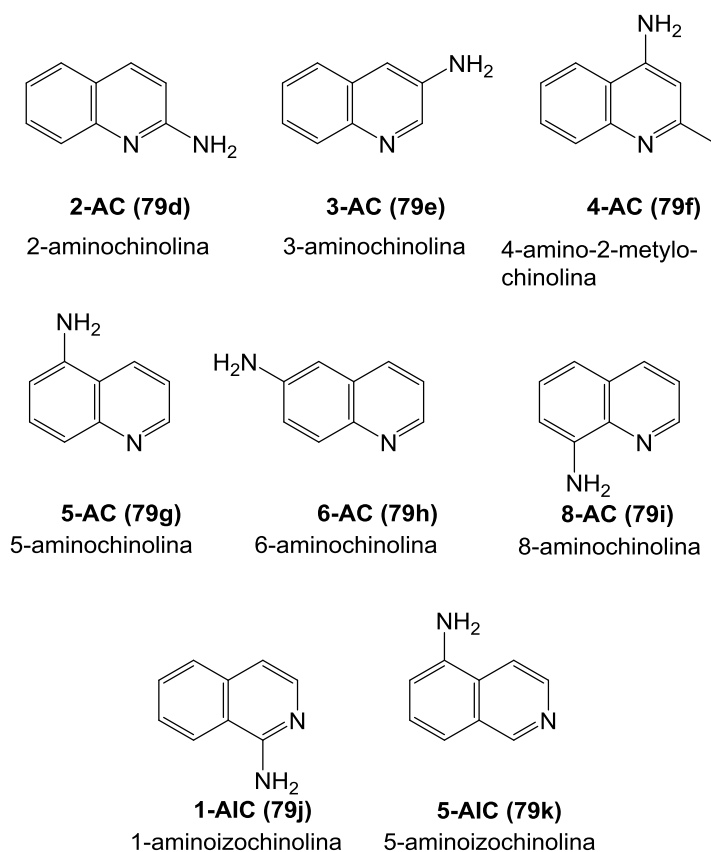
Ze względu na złożoność procesu transportu transbłonowego i przekształcenia do formy aktywnej jonowych proleków nukleotydowych, trudno jest przewidzieć wpływ danej modyfikacji na aktywność produktu. Z tej przyczyny do badań swoich włączyłem trzy grupy strukturalnie i elektronowo zróżnicowanych amin heterocyklicznych: aminochinoliny, aminocyjanopirydyny i aminotiazole.

(a) [*N*-(Chinolinyl)]amidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów

Opisane w pracy Kraszewskiego i współpracowników pochodne (*N*-pirydyl)-amidofosforanowe mają szereg korzystnych cech i są niewątpliwie atrakcyjnymi kandydatami na leki zwalczające wirusy HIV (a być może także inne renowirusy). Można jednak postawić tezę, że możliwe jest podwyższenie aktywności biologicznej tego typu związków poprzez zastosowanie struktur silniej lipofilowych – aminochinolin, które różnią się od aminopirydyn

dodatkowym, skondensowanym pierścieniem benzenowym. Warunkiem koniecznym do antywirusowych zastosowań tego typu bardziej lipofilowych analogów jest zachowanie dobrej rozpuszczalności w wodzie.

Jako substraty aminowe w tej grupie wybrałem osiem izomerycznych związków **79d-k** (amina 4-AC nie jest izomerem pozostałych związków w ścisłym znaczeniu tego słowa, gdyż zawiera dodatkową grupę metylową w pozycji 2):



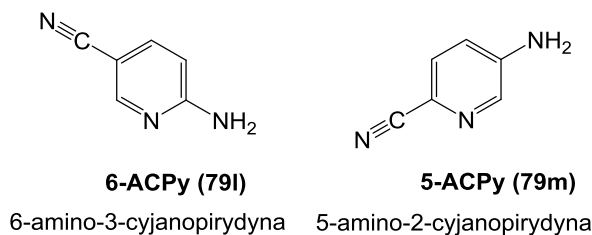
Rysunek 27. Aminochinoliny i aminoizochinoliny wykorzystane w pracy

W zestawie tym znajduje się sześć aminochinolin i dwie aminoizochinoliny, przy czym w czterech związkach grupa aminowa jest przyłączona do pierścienia heterocyklicznego, a w pozostałych do pierścienia benzenowego. Cztery aminy, 2-AC, 4-AC, 5-AC i 1-AIC mają możliwość szczególnie korzystnej delokalizacji ładunku z udziałem egzocyklicznego atomu azotu. Jednocześnie w związkach 2-AC, 8-AC i 1-AIC obydwa atomy azotu położone są w swoim bezpośrednim sąsiedztwie. Oczekiwać można, że duże zróżnicowanie steryczne i elektronowe amidofosforanów otrzymanych z przedstawionych

powyżej aminochinolin da wskazówki co do kierunku, w którym należy podążać w poszukiwaniu związków o najwyższej aktywności przeciwwirusowej.

(b) [*N*-(Cyjanopirydylo)]amidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów

Inny kierunek możliwych modyfikacji pierścienia pirydynowego, to wprowadzenie dodatkowego podstawnika zmieniającego charakter elektronowy związku. Uwagę moją zwróciły aminocyjanopirydyny **79l-m**:

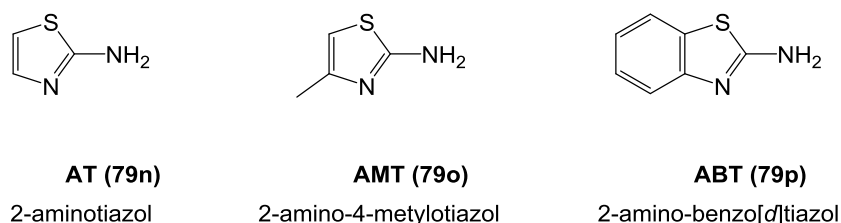


Rysunek 28. Aminocyjanopirydyny wykorzystane w pracy

Ponieważ grupa cyjanowa znacznie obniża zasadowość pierścienia pirydynowego, można spodziewać się, że podstawniki cyjanowe zmienią wyraźnie kwasowość docelowego amidofosforanu, a jednocześnie wpływać będą na jego stabilność chemiczną. Także dla tej grupy związków zróżnicowane położenie podstawników może pozwolić na uzyskanie informacji o wpływie czynników przestrzennych i elektronowych na właściwości biologiczne produktów.

(c) [*N*-(Tiazylo)]amidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów

Wszystkie dotąd przedstawione aminy zawierały pierścień pirydynowy. Interesujące jest jednak także, czy aktywność biologiczna badanych amidofosforanów jest związana z obecnością tego pierścienia, czy też można go zastąpić innym układem heterocyklicznym. Dlatego jako trzecią grupę związków wybrałem trzy aminotiazole **79n-p**:



Rysunek 29. Aminotiazole wykorzystane w pracy

Podstawnik metylowy, a jeszcze bardziej skumulowany pierścień benzenowy, zwiększają lipofilowość, natomiast zasadowość AMT jest większa niż AT, podczas gdy zasadowość ABT jest mniejsza. Poza zasadniczą kwestią możliwości zastosowania tak odmiennego układu heterocyklicznego, zestaw ten powinien dać kolejne odpowiedzi na pytania o wpływ lipofilowości i zasadowości podstawnika amidowego na aktywność przeciwwirusową odpowiednich amidofosforanów 2',3'-dideoksynukleozydowych. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę, że pierścień tiazolowy występuje w wielu związkach aktywnych biologicznie. Czyni to projektowane amidofosforany ciekawymi potencjalnymi nośnikami związków o uzupełniającej lub ważnej roli biologicznej.

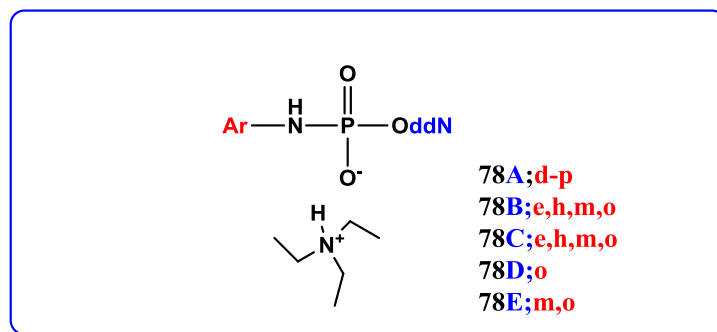
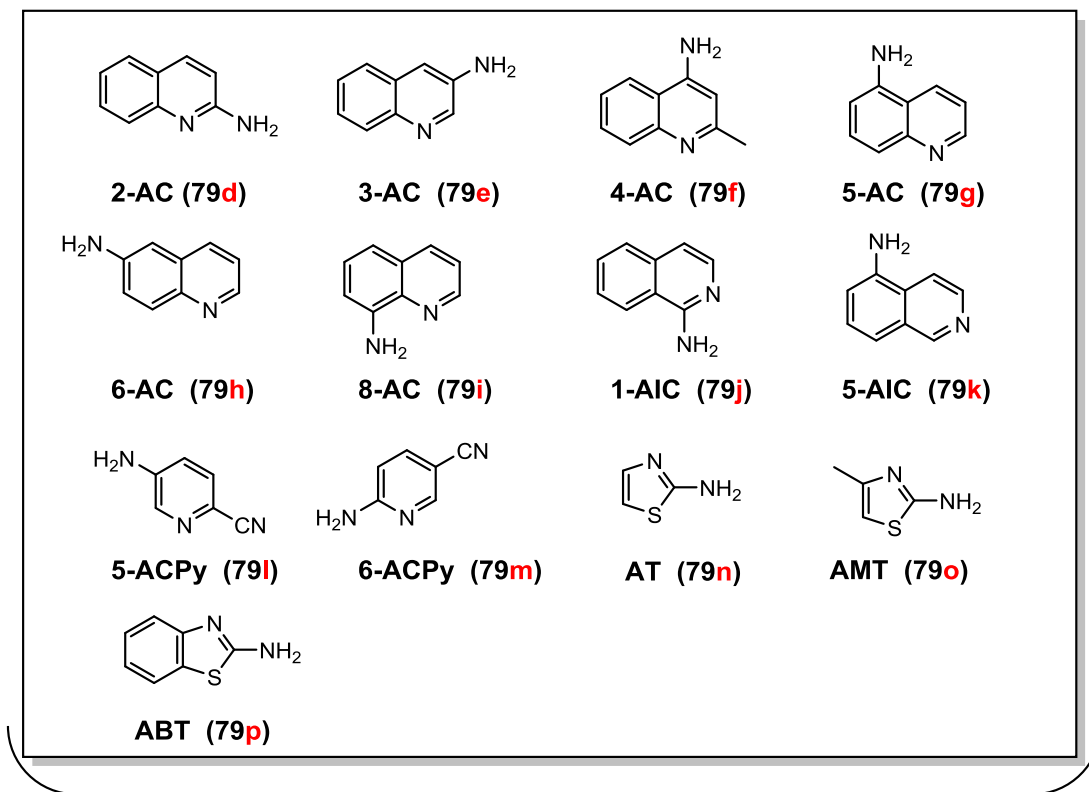
W celach porównawczych wykorzystywałem też wcześniej przebadane aminopirydyny: 2-APy (**78A;a**), 3-APy (**78A;b**) i 4-APy (**78a;c**).

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania, jako główny cel moich badań postawiłem sobie opracowanie możliwie uniwersalnych metod syntezy (*N*-arylo)amidofosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów (Rys. 30), następnie określenie ich właściwości fizykochemicznych i biochemicznych oraz ustalenie ich podstawowych parametrów biologicznych jako potencjalnych związków w terapii przeciwko wirusowi HIV. Zaplanowane badania miały więc charakter multidyscyplinarny. Dość znaczące w mojej opinii zróżnicowanie chemiczne zaprojektowanych amidofosforanów, a jednocześnie możliwość ich racjonalnego pogrupowania ze względu na różnorodne kryteria klasyfikacji reszt amidowych, dało szansę na podjęcie próby skorelowania efektów sterycznych i elektronowych z aktywnością biologiczną produktów.

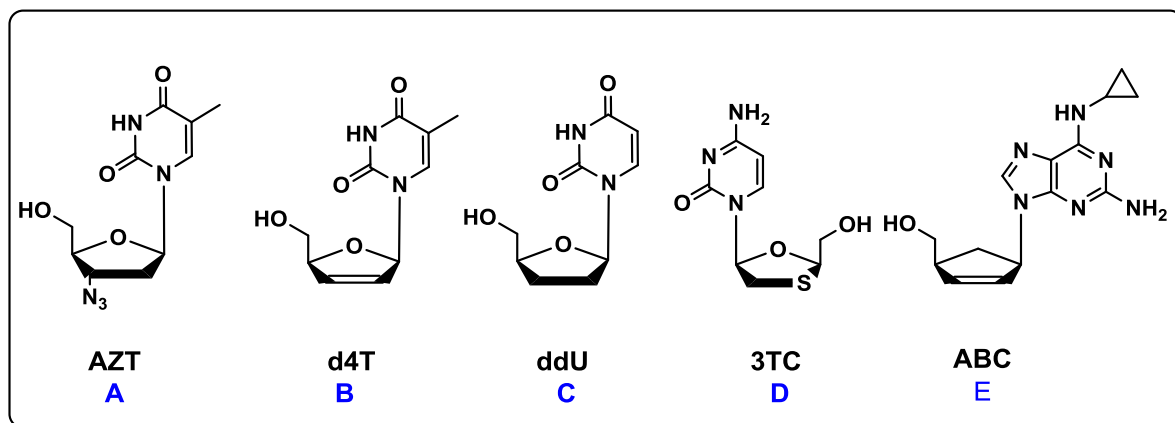
Do badań wstępnych i metodycznych jako modelowy komponent nukleozydowy wybrałem 3'-azydo-3'-deoksytymidynę (AZT). Uzasadnione to było względami ekonomicznymi – jest to najtańszy spośród komercyjnie dostępnych 2',3'-dideoksynukleozydów (był to istotny czynnik z powodu konieczności przeprowadzenia dużej liczby doświadczeń rozpoznawczych) – oraz praktycznymi i merytorycznymi. AZT jest związkiem dobrze poznanym i opisanym w literaturze, wygodnym w użyciu ze względu na stosunkowo dobrą rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, a przede wszystkim jest silnym inhibitorem HIV i umożliwia najszersze porównywanie właściwości jego pochodnych pronukleotydocznych z danymi literaturowymi. Po zebraniu danych odnośnie parametrów syntetycznych, fizykochemicznych i biologicznych dla uzyskanych związków modelowych opartych o AZT, dla przypadków najbardziej obiecujących farmakologicznie lub interesujących z innych powodów zaplanowałem syntezę i przebadanie analogicznych

amidofosforanów innych 2',3'-dideoksynukleozydów o znanym potencjale antywirusowym (Rys. 30.).

Ar:



HOddN:



Rysunek 30. Zestawienie struktur zaprojektowanych związków

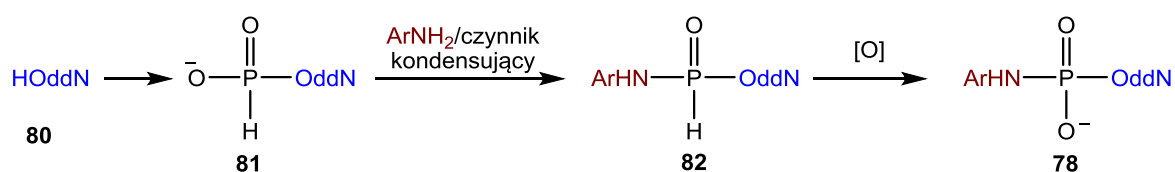
W kolejnych rozdziałach niniejszej rozprawy omówione zostały kwestie związane z syntezą i oczyszczaniem zaplanowanych związków, a następnie przedstawiono ich badania biologiczne w kontekście cytotoksyczności i aktywności przeciwko wirusowi HIV-1. Przedyskutowane zostały też możliwe korelacje między strukturą uzyskanych analogów nukleotydów a ich właściwościami.

2. Metody syntezy *N*-arylowych amidofosforanów

2',3'-dideoksynukleozydów

Istnieje duża liczba teoretycznie możliwych strategii otrzymywania tytułowych związków. Estryfikację nukleozydu można przeprowadzić stosując związki P^{III} (np. chlorofosforyny, amidofosforyny lub *H*-fosfoniany) oraz P^V (np. chlorofosforany, azolidy fosforanowe lub fosforany w obecności czynników kondensujących). W przypadku podejść z pochodnymi P^{III} konieczne jest ich utlenienie, w wyniku którego można otrzymać bezpośrednio amidofosforany (kondensacja oksydatywna) lub fosforany, które przekształca się w amidofosforany w kolejnych etapach procesu. We wszystkich podejściach, na różnych etapach stosować można rozmaite grupy ochronne, o większej lub mniejszej trwałości i aktywujące lub dezaktywujące centrum fosforowe.

Za najbardziej obiecującą metodę wprowadzania grupy amidofosforanowej do 2',3'-dideoksy nukleozydów uznałem wykorzystanie chemii *H*-fosfonianów (Schemat 17).



Schemat 17. Szkic syntezy (*N*-arylo)amidofosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów z wykorzystaniem chemii *H*-fosfonianów

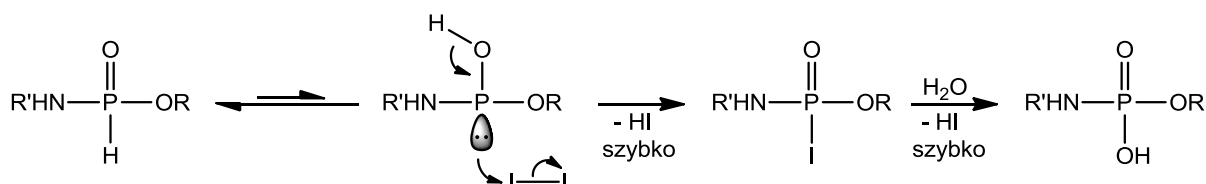
Było to podyktowane dostępnością tanich substratów (co jest istotne przy możliwym zastosowaniu produktów w medycynie), spodziewaną łatwością otrzymania i oczyszczenia związków przejściowych i przekształcania ich w produkty końcowe. Istotne znaczenia miało także długoletnie doświadczenie zespołu prof. Kraszewskiego w pracach na tej grupie

związków. Warto zwrócić uwagę, że estry *H*-fosfonianowe są szczególnie szeroko wykorzystywane w syntezie fosforanów biomolekuł, w tym nukleotydów i oligonukleotydów oraz ich różnorodnych analogów. Ta klasa związków jest szczególnie wartościowa w podejściach syntetycznych ze względu na dobrze poznane metody kontrolowania ich reaktywności, małą wrażliwość na ślady wilgoci, dużą odporność na działanie tlenu z powietrza, a jednocześnie możliwość utleniania w łagodnych warunkach oraz łatwość w przeprowadzaniu ich w rozmaite pochodne grupy fosforanowej^{112, 113}.

Omawiane podejście obejmuje następujące kroki syntetyczne (ddN = 2',3'-dideoksynukleozyd):

1. ddN **80** → 5'-*H*-fosfonian ddN **81**
2. 5'-*H*-fosfonian ddN **81** → 5'-*H*-(*N*-arylo)amidofosfonian ddN **82**
3. 5'-*H*-(*N*-arylo)amidofosfonian ddN **82** → 5'-(*N*-arylo)amidofosforan ddN **78**.

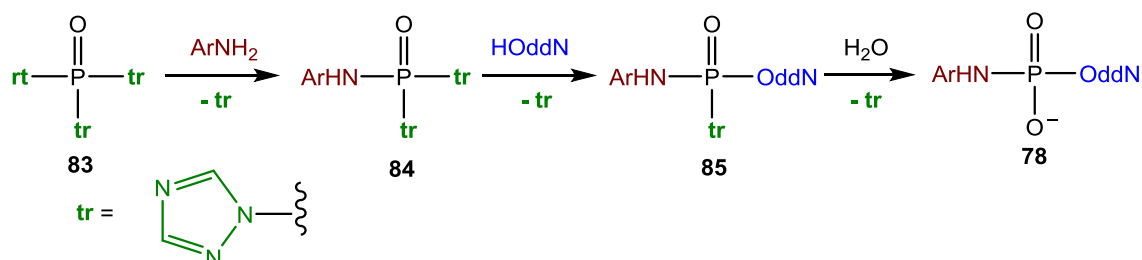
Etap 1, tj. synteza odpowiednich *H*-fosfonianów 2',3'-dideoksynukleozydów, wymagał zaadaptowania znanych metod fosfonylacji nukleozydów do wybranych analogów. Planowane przeprowadzenie *H*-fosfonianów w amidofosforany obejmowało kondensację z aminami heteroaromatycznymi w celu uzyskania *H*-amidofosfonianów (etap 2), które po utlenieniu przekształcone miały być w produkty docelowe (etap 3). Ostatni etap w tej strategii jest szczególnie interesujący, gdyż *H*-amidofosfoniany uważane były dawniej za związki wyjątkowo trudne do utlenienia (dla porównania, diestry *H*-fosfonianowe utleniają się jodem w ciągu kilku-kilkudziesięciu sekund, natomiast amidoestry wymagają typowo kilkudziesięciu godzin). Okazało się jednak, że powyższy brak reaktywności dotyczy tylko pochodnych, w których część amidowa ma charakter alifatyczny. W przypadku *H*-amidofosfonianów *N*-aromatycznych utlenianie przebiega natomiast szybko i praktycznie ilościowo¹¹⁴. Różnice te wynikają prawdopodobnie z większego udziału tautomerycznej formy terwalentnej w związkach zawierających elektronoakceptorowe grupy aryłowe (utlenianie *H*-fosfonianów jodem przebiega właśnie poprzez tę formę):



- R' = alkil ⇒ bardzo mały udział formy terwalentnej, reakcja bardzo wolna
 R' = arył ⇒ wystarczający udział formy terwalentnej, reakcja szybka

Schemat 18. Mechanizm utleniania *H*-amidofosfonianów

Przedstawione powyżej podejście zostało już wcześniej z powodzeniem wykorzystane do syntezy kilku (*N*-pirydylo)amidofosforanów nukleozydów. W przypadku niektórych amin heteroaromatycznych o szczególnie wysokiej zasadowości metoda ta nie zdała jednak egzaminu. W takich przypadkach możliwe jest wykorzystanie fosforanotriamidu tristriazolowego jako czynnika fosforylującego, zgodnie ze Schematem 19¹¹⁰:



Schemat 19. Szkic syntezy (*N*-arylo)amidofosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów z wykorzystaniem fosforanotriamidu tristriazolowego

Przydatność powyższych strategii do wprowadzania zaprojektowanych amin heteroaromatycznych musiała zostać zweryfikowana eksperymentalnie. Dotychczasowa wiedza o przyczynach słabych wydajności stwierdzonych w metodzie *H*-fosfonianowej dla reakcji z 4-aminopirydyną była dość uboga i nie pozwalała na ustalenie zakresu stosowalności tego podejścia. Można jednak było żywić nadzieję, że zróżnicowanie elektronowe i strukturalne amin wybranych do niniejszych badań umożliwi wyciągnięcie ogólniejszych wniosków.

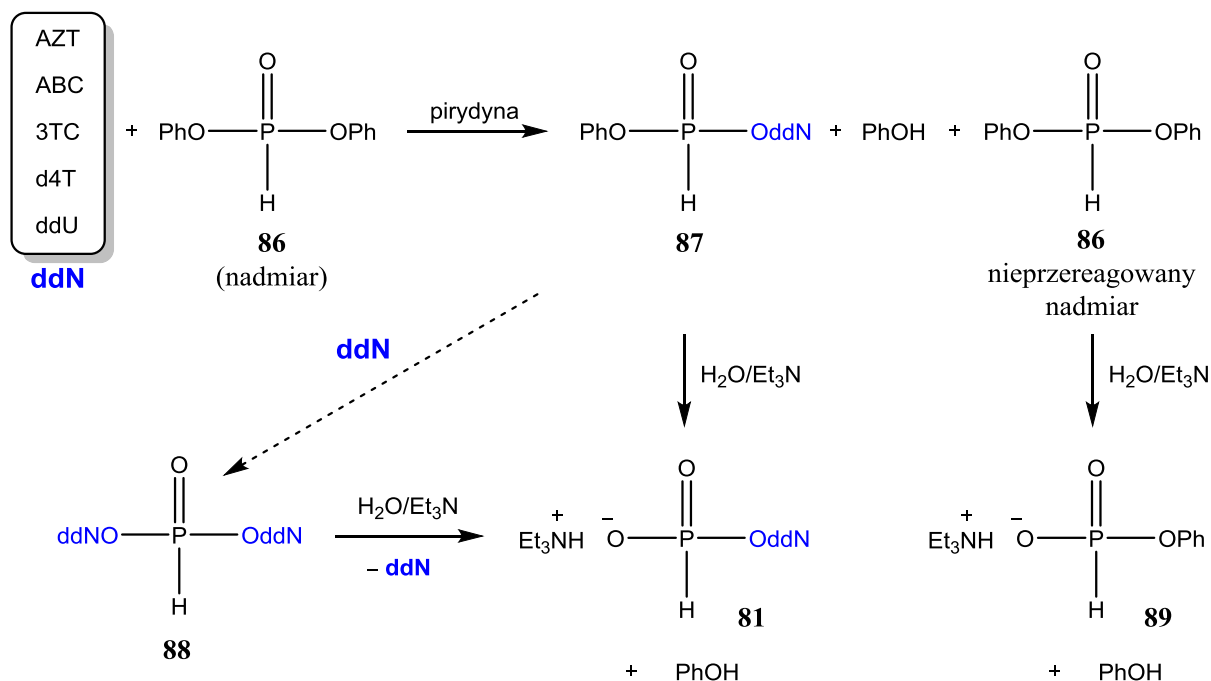
W kolejnych sekcjach rozprawy omówione zostaną szczegóły poszczególnych etapów zastosowanych podejść i uzyskane wyniki.

2.1 Synteza 5'-*H*-fosfonianów 2',3'-dideoksynukleozydów

2.1.1 Fosfonylacja nukleozydów za pomocą *H*-fosfonianu difenyłu (metoda A)

H-Fosfonian difenyłowy (**86**, DPP, z ang. *diphenyl phosphite*) jest łatwo dostępnym, tanim i łagodnym czynnikiem fosfonylującym, niewymagającym stosowania dodatkowych aktywatorów¹¹⁴. Jego skuteczność została wykazana przy otrzymywaniu *H*-fosfonianów 2',3'-dideoksynukleozydów 4-oksopirymidynowych (AZT i ddU)^{19, 110}. Co więcej, sprawdził

się on także znakomicie przy fosforylacji innych nukleozydów, zawierających niechronione funkcje egzoaminowe¹¹⁵. Można więc było spodziewać się, że da też dobre rezultaty przy syntezie *H*-fosfonianów ABC, d4T i 3TC (listę tę należy uzupełnić o *H*-fosfoniany AZT i ddU, których otrzymanie z użyciem DPP zostało wprowadzone już wspomniane¹⁹, lecz nie opisano procedury eksperymentalnej). Metodę tę przedstawia Schemat 20.



Schemat 20. Synteza *H*-fosfonianów 2',3'-dideoksynukleozydów z użyciem DPP

W oryginalnej metodzie fosforylacji¹¹⁴ nukleozydy zawierały silnie lipofilową ochronną grupę dimetoksytrytylową, co umożliwiło przeprowadzenie po reakcji przerobu polegającego na kilkukrotnej ekstrakcji w układzie chlorek metylenu – wodny roztwór węgla, dzięki czemu w fazie organicznej pozostawał pożądaný *H*-fosfonian nukleozydu, a większość zanieczyszczeń i produktów ubocznych przechodziła do fazy wodnej. W takiej sytuacji nie było problemem stosowanie znacznych nadmiarów DPP (3–7 ekw.) w celu uniknięcia powstawania symetrycznego *H*-fosfonianu dinukleozydowego **88**. Przy fosforylacji 2',3'-dideoksynukleozydów przerób taki jest niemożliwy, gdyż powstałe *H*-fosfoniany są zbyt hydrofilowe i preferencyjnie lub w znacznej mierze przechodzą do roztworu wodnego. Z kolei ich bezpośrednie, tj. bez przerobu, oczyszczanie chromatograficzne od znacznych ilości *H*-fosfonianu fenylowego **86** i fenolu jest trudne i mało wydajne. W toku przeprowadzonych badań stwierdziłem, że metodę tę można jednak

wykorzystać do wydajnego otrzymywania *H*-fosfonianów 2',3'-dideoksynukleozydów **81**. W tym celu zmniejszyłem nadmiar czynnika fosfonylującego do niewiele przekraczającego ilość stechiometryczną, tj. do 1,2 ekwiwalenta molowego, przedłużając jednocześnie czas reakcji z 15 do 30 min. Wiązało się to wprawdzie z ryzykiem powstawania zwiększonych ilości *H*-fosfonianu dinukleozydowego **88**, jednak w rzeczywistości nie obserwowałem tego związku, a końcowe oczyszczanie docelowych produktów z uzyskanych mieszanin reakcyjnych przebiegało bezproblemowo. Należy przy tym zwrócić uwagę, że *H*-fosfonian dinukleozydowy **88** także ulega hydrolizie w ostatnim etapie procesu, do docelowego monoestru **81**, dzięki czemu ewentualne straty materiału nukleozydowego w wyniku jego tworzenia są zmniejszone o 50%.

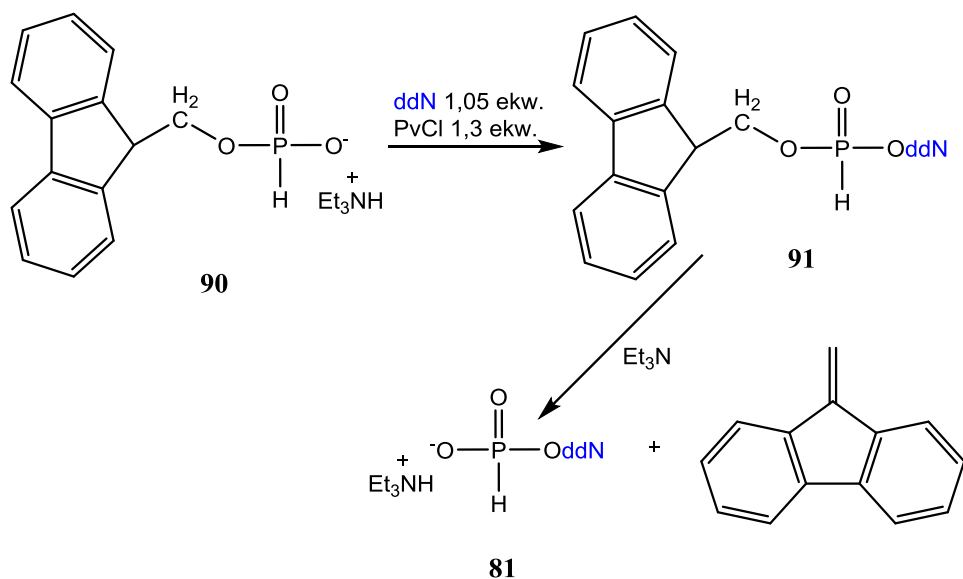
Reakcje kontrolowałem za pomocą TLC i ^{31}P NMR. Po chromatografii na silikażelu z fazą mobilną w gradiencie 0–20% MeOH w DCM-Et₃N 99:1 (v/v) otrzymałem *H*-fosfoniany **81** o czystości >97% (HPLC). Analiza spektralna (^{31}P NMR, ^1H NMR, ^{13}C NMR i MS) potwierdziła budowę i czystość otrzymanych produktów.

2.1.2 Fosfonylacja nukleozydów za pomocą *H*-fosfonianu

(9*H*-fluoren-9-yl)metylu (metoda B)

Jako alternatywną metodę syntezy *H*-fosfonianów 2',3'-dideoksynukleozydów nie zawierających grup egzoaminowych zaplanowałem wykorzystanie podejścia, w którym czynnikiem fosfonylującym jest *H*-fosfonian (9*H*-fluoren-9-yl)metylu **90** (Schemat 21)^{116, 117}. Związek ten otrzymałem metodą literaturową z (9*H*-fluoren-9-yl)metanolu i kwasu fosfonowego¹¹⁷. Synteza obejmowała kondensację nukleozydu z *H*-fosfonianem **90** wobec chlorku piwaloilu (PvCl; 1,3 ekw.) jako czynnika kondensującego w roztworze CH₂Cl₂/Py 95:5. Diestry typu **91** powstawały praktycznie ilościowo w formie dwóch diastereoizomerów, obserwowanych na widmach ^{31}P NMR przy $\delta_{\text{P}} \sim 8$ ppm.

Otrzymane produkty pośrednie oczyszczałem przez ekstrakcję w układzie chlorek metylenu : woda, po czym usuwałem ochronną grupę (9*H*-fluoren-9-yl)metylową za pomocą trietyloaminy rozpuszczonej w acetonitrylu (1:2 v/v). Reakcja ta przebiega ilościowo i bardzo szybko (< 1 min). Docelowy produkt oczyściłem za pomocą chromatografii na żelu krzemionkowym i scharakteryzowałem za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR, ^1H NMR, ^{13}C NMR i MS.



Schemat 21. Synteza *H*-fosfonianów 2',3'-dideoksynukleozydów z użyciem *H*-fosfonianu (9*H*-fluoren-9-yl)metylu (**90**)

Reakcje w obu metodach (A i B) przebiegały z bardzo dobrymi wydajnościami, a ich dobór był dokonywany dla każdego nukleozydu indywidualnie. Metoda A ma szerszy zakres stosowalności i jest szybsza, natomiast w nieco bardziej praco- i czasochłonnej metodzie B wydajności obserwowane na poziomie widm ^{31}P NMR mieszanin reakcyjnych były zazwyczaj wyższe. W efekcie najistotniejszym etapem okazał się proces końcowego rozdzielania chromatograficznego. W większości przypadków lepsze rezultaty całego procesu uzyskiwałem dla metody A. Wyjątkiem był AZT, gdyż czasy retencji *H*-fosfonianu AZT były zbliżone do czasów retencji ubocznych produktów fenylowych powstających z DPP, co utrudniało uzyskanie produktu o zadowalającej czystości. W efekcie był to jedyny *H*-fosfonian typu **81**, dla którego metoda B pozwalała na osiągnięcie wyższej wydajności niż metoda A.

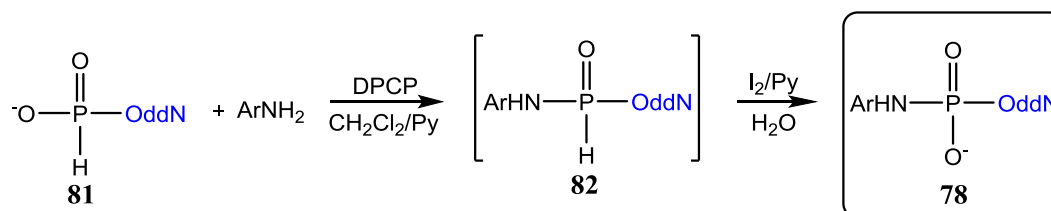
2.2 Kondensacja *H*-fosfonianów typu **81** z aminami heteroaromatycznymi.

Badania mechanistyczne

W celu przekształcenia uzyskanych *H*-fosfonianów 2',3'-dideoksynukleozydów typu **81** w odpowiednie *H*-(*N*-arylo)amidofosfoniany **82** zaadaptowałem metodę ich kondensacji z odpowiednimi aminami heteroaromatycznymi wykorzystującą chlorofosforan difenyłowy (DPCP, z ang. *diphenyl chlorophosphate*) jako czynnik kondensujący¹¹⁰. W przeciwieństwie do powszechnie stosowanego w chemii *H*-fosfonianów chlorku piwaloilu¹¹⁸, DPCP wykazuje

mniejsze powinowactwo do amin – przynajmniej tych o niższej zasadowości – i można było oczekiwać wydajnej syntezy docelowych związków.

Reakcje prowadziłem w mieszaninie chlorek metylenu–pirydyna [9:1 v/v] stosując pewien nadmiar czynnika kondensującego DPCP (1,7 ekw.) i aminy (1,1 ekw.). Powstające *H*-amidofosfoniany nukleozydowe **82** (Schemat 22) są związkami nietrwałymi i nie udało mi się ich wyizolować. Z tej przyczyny utleniałem je *in situ* za pomocą jodu w pirydynie z dodatkiem wody (10 ekw.), otrzymując docelowe (*N*-arylomido)fosforany nukleozydów **78**.



Schemat 22. Synteza (*N*-arylomido)fosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów **78** poprzez kondensację *H*-fosfonianów **81** z aminami heteroaromatycznymi i utlenianie *in situ* pośrednich produktów **82** w warunkach hydrolytycznych

Reakcje te przebiegały zazwyczaj z dobrymi wydajnościami, jednak w niektórych przypadkach obserwowałem powstawanie produktów ubocznych lub odtwarzanie wyjściowego *H*-fosfonianu **81**. Te niepożądane z syntetycznego punktu widzenia zjawiska można było pogrupować w zależności od zasadowości komponentu aminowego:

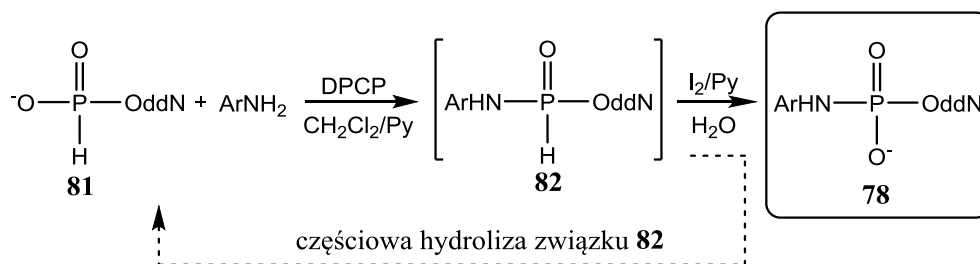
1. Reakcje, w których *H*-amidofosfonian typu **82** powstawał ilościowo, lecz podczas utleniania do amidofosforanu **78** następowało częściowe odtwarzanie substratu **81**. Problemy te obserwowane były sporadycznie dla amin o umiarkowanej zasadowości, a dla amin o najniższej zasadowości nie występowały.
2. Reakcje, w których *H*-amidofosfonian typu **82** powstawał niskimi wydajnościami, a docelowego produktu **78** nie dawało się uzyskać w czystej postaci. Wyniki takie obserwowałem dla amin o najwyższej zasadowości.

Niemożliwość wydajnej syntezy amidofosforanów **78** z użyciem amin heteroaromatycznych o najwyższych wartościach pK_a nie była zaskoczeniem, gdyż taki przebieg reakcji obserwowaliśmy już wcześniej dla szczególnie silnie zasadowej 4-aminopirydyny (**79c**)¹¹⁰. Rozwiązaniem syntetycznym problemu było zastosowanie całkowicie innej strategii otrzymywania amidofosforanów **78**¹¹⁰, jednak podstawy mechanistyczne niepożądanego przebiegu reakcji nie zostały dotąd wyjaśnione. Natomiast

niecałkowite utlenianie *H*-amidofosfonianów typu **82** zawierających reszty amin umiarkowanie zasadowych było zjawiskiem do tej pory nieopisanym. W dalszym etapie pracy podjąłem badania podstawowe zmierzające do wyjaśnienia przyczyn powyższych obserwacji. Było to w mojej opinii konieczne dla zdefiniowania kryteriów stosowalności podejścia *H*-fosfonianowego i optymalizacji procedury syntetycznej.

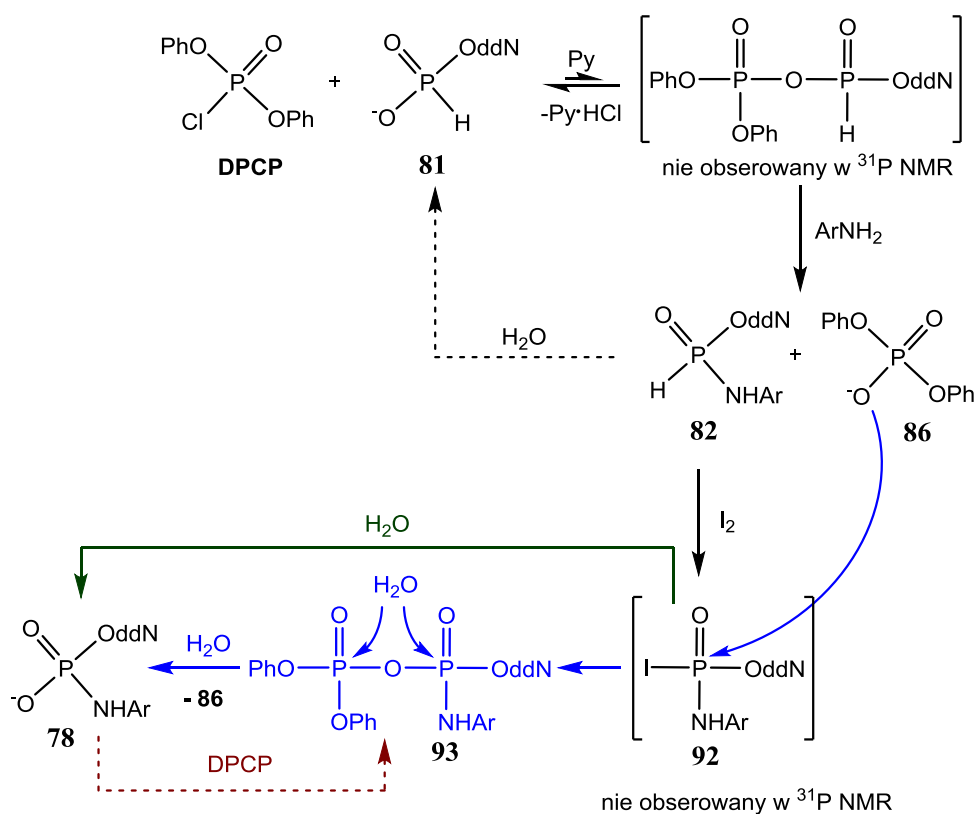
Śledzenie poszczególnych etapów utleniania *H*-fosfonianów jodem za pomocą ^{31}P NMR jest zadaniem wyjątkowo trudnym za względu na niezwykle reaktywność związków pośrednich, zwłaszcza w obecności pirydyny, której stosowanie jako katalizatora nukleofilowego gwarantuje odpowiednią szybkość i czystość reakcji. Ponieważ niemożliwe było wyizolowanie produktów pośrednich, tj. *H*-amidofosfonianu typu **82** i hipotetycznego amidojodofosforanu (**92**), konieczne było oparcie wnioskowania o dowody pochodzące z analizy korelacyjnej widm ^{31}P NMR.

Jako hipotezę roboczą dla wyjaśnienia odtwarzania się *H*-fosfonianu **81** podczas utleniania *H*-amidofosfonianu typu **82** jodem w pirydynie w obecności wody przyjąłem, że szybkość hydrolizy związku **82** jest na tyle szybka, że może konkurować z jego utlenianiem (Schemat 23).



Schemat 23. Odtwarzanie substratu **81** w wyniku hydrolizy związku pośredniego **82** podczas utleniania jodem w obecności wody

W trakcie prowadzonych badań, na widmach ^{31}P NMR rejestrowanych natychmiast po dodaniu jodu i wody zaobserwowałem powstawanie dwóch dodatkowych grup sygnałów przy δ_{P} -7 i -24 ppm o takiej samej, umiarkowanej intensywności, które zanikały w tym samym tempie w ciągu kilku minut. Na widmach z odsprężeniem jąder ^1H w każdej z tych grup możliwe było zidentyfikowanie 4 sygnałów. Na podstawie tych wyników i porównania ich z danymi literaturowymi, przyjąłem, że sygnały te pochodzą od mieszanego pirofosforanu typu **93**, którego powstawanie i rozpad można wyjaśnić reakcjami przedstawionymi na Schemacie 24 (w schemacie tym dla uproszczenia nie ująłem możliwych reaktywnych adduktów pirydyniowych jako związków pośrednich, których udział wynika z katalitycznej roli pirydyny w tej reakcji).



Schemat 24. Uproszczony mechanizm tworzenia amidofosforanów typu **78** z udziałem mieszanego pirofosforanu typu **93**

Tak więc w wyniku kondensacji monoestrów typu **81** z aminami w obecności DPCP jako czynnika kondensującego i pirydyny jako zasady i katalizatora nukleofilowego powstają *H*-amidofosfoniany typu **82** oraz kwas difenylofosforowy **86** jako pozostałość po czynniku kondensującym. Po dodaniu do tego układu jodu i wody powstaje hipotetyczny amidojodofosforan **92**, który ulega szybkiej hydrolizie (zielona strzałka) do produktu **78** (jak już wspomniano, możliwa jest też konkurencyjna reakcja hydrolizy amidu **82**, prowadząca do częściowego odtworzenia substratu **81**). Amidojodofosforan **92** może reagować nie tylko z wodą, ale także z obecnym w roztworze kwasem difenylofosforowym **86**, tworząc mieszaną pirofosforan **93**. (Schemat 24, ścieżka oznaczona kolorem niebieskim). Nie jest to reakcja niepożądana, gdyż niezależnie od kierunku ataku cząsteczki wody, produktami hydrolizy związku **93** są oczekiwany amidofosforan **78** i kwas difenylofosforowy **86**. Związek pośredni **93** obserwowany jest na widmach $^{31}\text{P}\{-^1\text{H}\}$ NMR jako układ 2 grup czterech sygnałów w wyniku obecności w cząsteczce dwóch atomów fosforu sprzęgających się skalarnie ($^2J_{\text{PP}} = 17,48 \text{ Hz}$ i $16,51 \text{ Hz}$) oraz obecności centrum asymetrycznego na amidowym atomie fosforu. Ponieważ jednym z ligandów jest reszta 2',3'-dideoksynukleozydu zawierającego

asymetryczną resztę D-rybozy, związek **93** występuje w postaci dwóch diastereoizomerów różniących się przesunięciami chemicznymi obu atomów fosforu i ich stałymi sprzężeń. Dla potwierdzenia poprawności przypisania sygnałów przy δ_P -7 i -24 ppm do mieszanego pirofosforanu **93**, związek ten otrzymałem w dwóch niezależnych reakcjach. Po pierwsze powtórzyłem procedurę przedstawioną na Schemacie 24, w której utlenianie przeprowadziłem bez obecności wody, obserwując na widmie ^{31}P NMR ilościowe powstanie sygnałów przy δ_P -7 i -24 ppm. Drugą procedurą była reakcja wyizolowanego wcześniej amidofosforanu **78** z DPCP (Schemat 24, bordowa strzałka). Zaobserwowałem wówczas podobne dwie grupy sygnałów, choć różniące się nieco przesunięciami chemicznymi i stałymi sprzężeń. Różnice te można wyjaśnić wpływem różnego środowiska koniecznego do przeprowadzenia obu reakcji. Ponieważ po zmieszaniu obu mieszanin reakcyjnych sygnały ^{31}P NMR pochodzące od domniemanego związku **93** pokryły się, można to uznać za bardzo silną przesłankę potwierdzającą jego strukturę i założony przebieg reakcji.

2.3 Synteza amidofosforanów typu **78** z *H*-fosfonianów typu **81**.

Rozwiązania syntetyczne

Wyniki omówione w poprzednim podrozdziale, poza wiedzą podstawową, mają też znaczenie praktyczne, gdyż wskazują, że utlenianie *H*-amidofosfonianu **82** i hydrolizę prowadzącą do amidofosforanu **78** można przeprowadzić jako osobne procesy, unikając w ten sposób częściowej hydrolizy *H*-amidofosfonianu **82** do substratu **81**. Nie jest to procedura oczywista, gdyż utlenianie diestrów *H*-fosfonianowych do diestrów fosforanowych jodem przeprowadza się zazwyczaj w obecności wody, aby uniknąć rozmaitych reakcji ubocznych, którym ulegają niezwykle reaktywne przejściowe jodofosforany. W badanej reakcji w chwili dodawania jodu w mieszaninie reakcyjnej znajduje się jednak kwas difenylofosforowy **86** i obecność wody nie jest konieczna, gdyż mieszany pirofosforan **93** (powstający w reakcji amidojodofosforanu **92** z kwasem difenylofosforowym **86**) jest stosunkowo stabilny. Reakcja jego tworzenia jest bardzo szybka, a hydroliza przebiega w ciągu kilku minut. Zmodyfikowaną procedurę syntezy amidofosforanów typu **78** obejmują następujące etapy:

1. Kondensacja *H*-fosfonianu **81** z aminą heteroaromatyczną wobec DPCP (5 min).
2. Utlenianie jodem w warunkach bezwodnych (1 min).
3. Hydroliza (10 min).

Metodą tą otrzymałem wydajnie większość amidofosforanów typu **78**, z wyjątkiem pochodnych zawierających reszty amin o największej zasadowości (są one omówione w kolejnym podrozdziale). W przypadku pochodnych AZT otrzymałem w ten sposób związki **78A;d-p**. Na podstawie przeprowadzonych z ich udziałem testów biologicznych (przedstawionych w dalszej części rozprawy) za najbardziej obiecujące uznałem amidofosforany zawierające reszty 3-aminochinoliny (**79e**), 6-aminochinoliny (**79h**), 2-amino-5-metylotriazolu (**79o**) i 6-amino-3-cyjanopirydyny (**79m**), i podjąłem próby syntezy tego typu związków dla innych 2',3'-dideoksynukleozydów o właściwościach antyretrowirusowych (Rys. 30). Celem tych doświadczeń było przetestowanie uniwersalności powyżej przedstawionego podejścia syntetycznego oraz uzyskanie danych biologicznych, na podstawie których można by wyciągać ogólniejsze konkluzje o wpływie reszty heteroaromatycznej na właściwości fizykochemiczne i biologiczne badanych amidofosforanów.

W przypadku 2',3'-didehydro-3'-deoksytymidyny (d4T) udało mi się otrzymać wszystkie 4 zaplanowane analogi (**78B;e,h,m,o**). Trzy z nich wyizolowałem z wydajnością 60–70%, a w jednym przypadku (dla **6-AC**) wydajność ta była znakomita (97%). Także dla 2',3'-dideoksyurydyny (ddU) uzyskałem wszystkie 4 amidofosforany (**78C;e,h,m,o**), choć z nieco niższą wydajnością (50–70%). Dla pozostałych 2',3'-dideoksynukleozydów syntezę ograniczyłem do pochodnych AMT i 6-ACPy ze względu na wysoką cenę substratów nukleozydowych i ograniczenia czasowe. W przypadku ABC otrzymałem oba amidofosforany **78E;m,o**, lecz z umiarkowaną wydajnością 35–50%, co wynikało z trudności z uzyskaniem czystych produktów metodami chromatograficznymi. Natomiast dla 3TC wyizolowałem w czystej formie jedynie pochodną AMT **78D;o** (wydajność 70%), gdyż podczas syntezy pochodnej 6-ACPy **78D;m**, jako produkt uboczny w ilości ok. 10% powstawał fosforan tego nukleozydu, którego nie udało mi się usunąć. W tej sytuacji wykluczyłem ten związek z dalszych badań. Warto zwrócić uwagę, że w celu otrzymania związków **78D** konieczna była zmiana środowiska reakcyjnego na *N,N*-dimetyloacetamid ze względu na słabą rozpuszczalność wyjściowego *H*-fosfonianu 3TC (**81D**) w standardowym układzie DCM-pirydyna 9:1 (v/v).

2.4 Potencjalne zastosowania mieszanych pirofosforanów typu 93

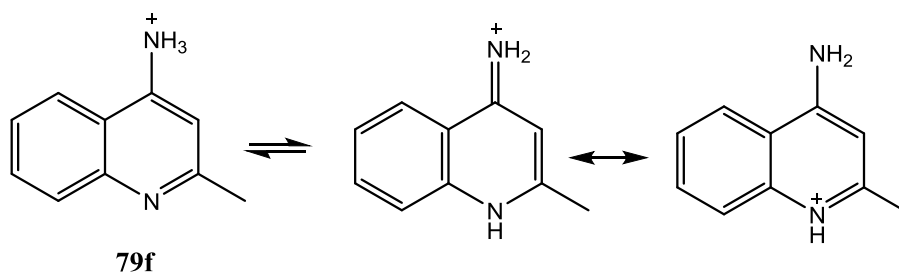
Mieszane pirofosforany typu **93** można otrzymywać wydajnie przynajmniej na dwóch ścieżkach syntetycznych opisanych w podrozdziale 2.2. W dotychczas przeprowadzonych eksperymentach były one poddawane hydrolizie, w wyniku której powstawały takie same

hydrolizy. W celu ustalenia rzeczywistego przebiegu powyższych reakcji wygenerowałem mieszany pirofosforan **93A;e** (ddN = AZT, Ar = 3-AC) i poddałem go reakcji z metanolem i propyloaminą. W mieszaninach poreakcyjnych na widmach ^{31}P NMR obserwowałem sygnały, które można było przypisać do wszystkich związków przedstawionych na schemacie (reakcja a: $\delta_{\text{P}} = -9,96$ ppm, **86**; $\delta_{\text{P}} = 0,15$ ppm, **78A;e**; $\delta_{\text{P}} = -10,43$ ppm, **94**; $\delta_{\text{P}} = 4,95$ i $4,86$ ppm, **95A;e**; reakcja b: $\delta_{\text{P}} = -10,75$ ppm, **86**; $\delta_{\text{P}} = -1,74$ ppm, **78A;e**; $\delta_{\text{P}} = 1,31$ ppm, **96**; $\delta_{\text{P}} = 10,18$ ppm, **97A;e**). Analiza integracji powyższych sygnałów wykazała, że oba kierunki reakcji zachodzą w przybliżeniu w tym samym stopniu, a więc przydatność syntetyczna przedstawionego podejścia jest ograniczona i wymaga dalszych badań, które jednak są poza tematyką niniejszej rozprawy.

2.5 Kondensacja *H*-fosfonianów typu **81** z aminami heteroaromatycznymi **79** o dużej zasadowości.

Analizując przebieg kondensacji *H*-fosfonianu AZT z aminochinolinami o zróżnicowanej zasadowości ($\text{p}K_{\text{a}}$ 4,0–9,6) zaobserwowałem, że w przypadku 1-amino-izochinoliny (**79j**; $\text{p}K_{\text{a}} = 7,6$), 2-aminochinoliny (**79d**; $\text{p}K_{\text{a}} = 8,9$) i 4-amino-2-metylochinoliny (**79f**; $\text{p}K_{\text{a}} \sim 9,6$) *H*-amidofosfoniany typu **82** powstawały z obniżoną wydajnością i towarzyszyły im różne produkty uboczne. Podobne zjawisko obserwowaliśmy wcześniej dla 4-aminopirydyny **79c** ($\text{p}K_{\text{a}} = 9,2$)¹¹⁰.

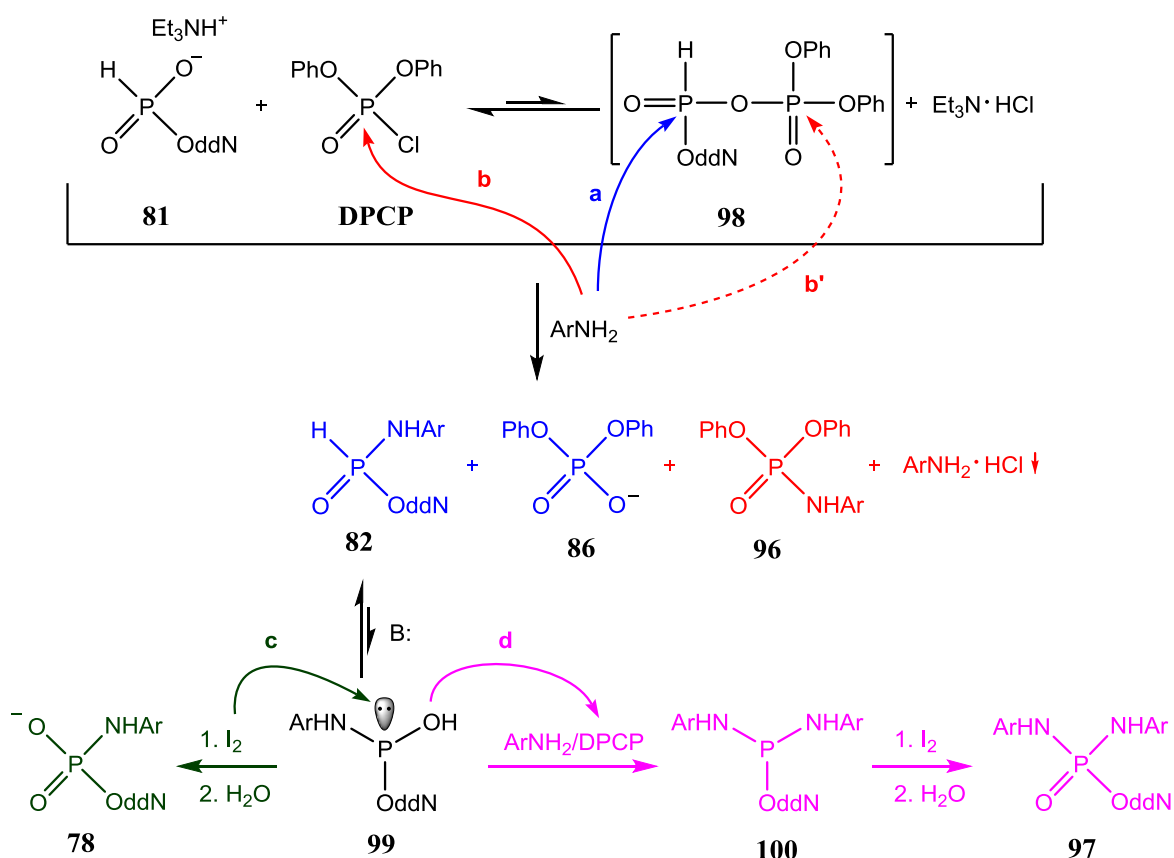
Wysoka zasadowość chinolin zawierających grupę aminową w pozycji *para* lub *orto* (w porównaniu do izomeru *meta*) wynika z dodatkowej stabilizacji formy protonowanej przez rezonans, np.:



Schemat 26. Wybrane formy tautomeryczne i mezomeryczne protonowanej 4-amino-2-metylochinoliny **79f**

Ponadto aminochinoliny wykazują silniejszą zasadowość od odpowiednich aminopirydyn w wyniku efektu indukcyjnego wywołanego obecnością skondensowanego pierścienia benzenowego (por. $pK_a = 8,9$ dla 2-aminochinoliny vs $pK_a = 6,8$ dla 2-aminopirydyny).

Niskie wydajności kondensacji *H*-fosfonianów z powyższymi aminami mają kilka przyczyn. Po pierwsze, w przeciwieństwie do amin o niższej zasadowości, reagują one w sposób konkurencyjny z czynnikiem kondensującym, chlorofosforanem difenyłowym (DPCP) tworząc amidofosforan difenyłowy **96** (Schemat 27, ścieżka **b**). Amid ten może powstawać także w wyniku niechemoselektywnej aminolizy mieszanego bezwodnika **98** (ścieżka **b'**), choć mechanizm ten wydaje się mniej prawdopodobny, gdyż dla mniej zasadowych amin reakcja ta jest w pełni chemoselektywna w kierunku powstania *H*-amidofosfonianu **82**.



Schemat 27. Reakcje uboczne zachodzące podczas kondensacji *H*-fosfonianu z aminami heteroaromatycznymi o $pK_a > 7$

Niezależnie od tego, który mechanizm zachodzi w rzeczywistości, w efekcie w mieszaninie reakcyjnej spada stężenie zarówno aminy, jak i czynnika kondensującego. Wydajność reakcji można nieco podwyższyć dodając kolejne porcje aminy i DPCP, prowadzi to jednak do powstawania dodatkowych ilości chlorowodoru, który nie tylko dezaktywuje aminę przez protonowanie, ale także obniża jej stężenie w środowisku reakcji poprzez wytrącanie w postaci chlorowodoru. W takim wysoce niehomogennym układzie występują trudności z efektywnym mieszaniem, a nawet dochodzi do zestalenia mieszaniny reakcyjnej. Co więcej, przeprowadzenie skutecznego oczyszczenia produktu z takiej mieszaniny staje się problematyczne.

Innym zjawiskiem obserwowanym podczas kondensacji *H*-fosfonianów i silnie zasadowych amin heteroaromatycznych jest tworzenie nowego produktu ubocznego, widocznego na widmach ^{31}P NMR jako sygnał przy $\delta_{\text{P}} \sim 95$ ppm, który po utlenieniu zastępowany jest sygnałem przy ok. -5 ppm. Na podstawie przesunięć chemicznych, braku diastereoizomerów i właściwości chemicznych założyłem, że obserwowanymi związkami są odpowiednio bis(*N*-heteroarylo)diamidofosforan AZT **100** i bis(*N*-heteroarylo)diamidofosforan AZT **97**, a ich powstawanie jest efektem rzadko spotykanej powtórnej aktywacji *H*-amidofosfonianu przez DPCP (Schemat 27, ścieżka **d**). Prawdopodobnie wynika to ze zwiększonego udziału tautomerycznej formy terwalentnej (**99**) *H*-amidofosfonianu **82**, co można przypisać z jednej strony obecności elektronoakceptorowego podstawnika arylowego, a z drugiej – podwyższonej zasadowości środowiska spowodowanej silnie zasadową aminą heteroaromatyczną. W warunkach tych ułatwiona jest też jonizacja kwasu **99** do anionu, co może w istotny sposób wpływać na możliwość jego reakcji z czynnikiem kondensującym. Ponieważ dla mniej zasadowych amin forma fosforynoamidowa **99** także musi występować w stopniu wystarczającym dla obserwowanego eksperymentalnie szybkiego utlenienia (ścieżka **c**), o wydajności całej reakcji tworzenia lub nie produktów drugiej aktywacji decydują zapewne wszystkie wspomniane czynniki, składające się na skomplikowany układ wzajemnych zależności (zasadowość i reaktywność amin, efekty indukcyjne i rezonansowe amin i grup amidowych, tautomeria $\mathbf{82} \rightleftharpoons \mathbf{99}$, podatność związku **99** na powtórna aktywację). Z analizy kondensacji *H*-fosfonianów z różnymi aminami wynika, że reakcje te przebiegają w pożądanym kierunku dla amin o $\text{p}K_{\text{a}} < 7$, natomiast dla amin bardziej zasadowych reakcje uboczne uniemożliwiają wydajne otrzymanie amidofosforanów typu **78**.

Przykładowy diamid typu **97** (ddN = AZT, Ar = 4-aminopirydyna) został wyizolowany i jego struktura została potwierdzona za pomocą widm MS oraz ^1H i ^{13}C NMR. Wstępne badania wykazały jego niezwykłą trwałość w środowisku zasadowym: czas

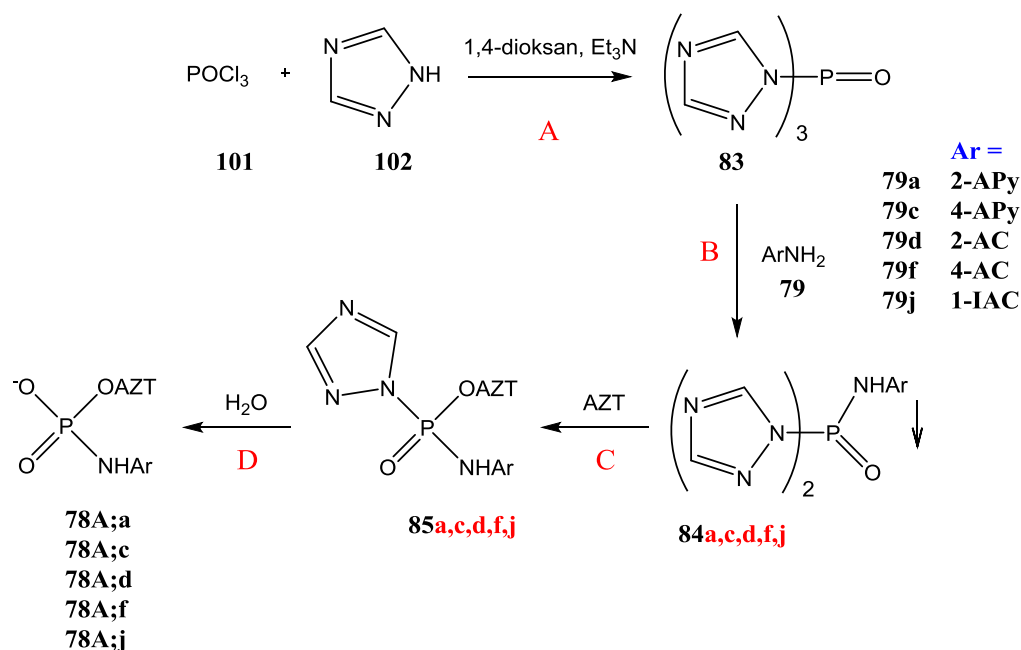
połowicznego rozkładu w pH 13 wynosi ok. 10 dni. W środowisku silnie kwasowym (pH 1) następuje natomiast bardzo szybki rozkład związku. Diamidofosforany tego typu wydają się być interesującymi obiektami do dalszych badań, jednak wykraczało to poza ramy niniejszej rozprawy.

2.6 Synteza amidofosforanów typu **78** z zastowaniem fosforanotriamidu tristriazolowego.

Opisana i przedstawiona we wcześniejszym rozdziale metoda syntezy (*N*-aryloamidofosforanów nukleozydów z wykorzystaniem chemii *H*-fosfonianów nie sprawdziła się w przypadku amin o wysokim *pK*_a. Wysoka reaktywność amin i towarzyszące reakcje uboczne w znaczny sposób obniżały wydajność reakcji lub uniemożliwiały otrzymanie czystych (*N*-aryloamido)fosforanów nukleozydów. W celu rozwiązania tego problemu podjąłem próby użycia innego czynnika fosforylującego – fosforanotriamid tristriazolidowego. Został on wcześniej z powodzeniem wykorzystany w syntezie [*N*-(pirydyn-4-yl)]amidofosforanu AZT (**78A;c**)¹¹⁰. Szlak syntetyczny prowadzący do końcowego amidofosforanu obejmuje 3 podstawowe etapy (Schemat 28), a możliwość zastosowania tej procedury do syntezy nowych pochodnych aminoaromatycznych wymagała weryfikacji doświadczalnej. Kluczowymi kwestiami były tu zarówno aspekty chemiczne (wydajny przebieg etapów B i C), jak i fizyczne – wytrącanie się triamidu typu **84a,c,d,f,j**.

Etap pierwszy (A) to otrzymanie czynnika fosforylującego z 1,2,4-triazolu (**102**) i trichlorku fosforu (**101**) w warunkach bezwodnych, którego tworzenie śledziłem za pomocą ³¹P NMR, obserwując sygnał przy -20 ppm świadczący o powstaniu fosforanotriamid tristriazolidowego **83**. Związek ten oczyściłem zgrubnie za pomocą sączenia, usuwając wytrącony chlorowodorek trietyloamoniowy, a uzyskany przesącz bezpośrednio poddałem kolejnej reakcji z aryloaminą (**79a, 79c, 79d, 79f, 79j**; etap B). Dla reakcji z aminami 2-APy, 4-APy, 2-AC, 4-AC i 1-IAC po około 10 minutach z roztworu wypadał osad (bistriazolido)amidofosforanu **84a,c,d,f,j**, który po kilkukrotnym przemyciu bezwodnym eterem był suszony pod obniżonym ciśnieniem i izolowany w postaci białego krystalicznego proszku. W przypadku użycia amin mniej zasadowych, np. 3-APy (**79b**) osad nie wytrącał się, co uniemożliwiało dalszą syntezę (podjęte próby reakcji z AZT prowadziły do skomplikowanych mieszanin produktów). Etap C to podstawienie jednej z reszt triazolowych nukleozydem AZT, podczas którego stosowałem nadmiar czynnika fosforylującego w celu zapobiegnięcia podwójnej estryfikacji. Ze względu na słabą

rozpuszczalność związków typu **84** w pirydynie, reakcje prowadziłem w temperaturze 75°C. W takich warunkach przebiegały one szybko i po 10 min kończyłem je dodając do mieszaniny H₂O. Powodowało to hydrolizę ostatniej reszty triazolowej i powstanie docelowego produktu **78A;a,c,d,f,j** (etap D). Produkty reakcji oczyściłem za pomocą chromatografii kolumnowej, a czystość potwierdziłem za pomocą HPLC i metod spektroskopowych (¹H NMR ¹³C NMR, ³¹P NMR i HR MS). W przypadku pochodnych 2-AC **79a** i 1-AC **79j** otrzymałem amidofosforany typu **78A;a** i **78A;j** z wydajnością 40–60%, czyli podobną do opisanych wcześniej dla pochodnych 4-APy (**78A;c**)¹¹⁰.



Schemat 28. Synteza z wykorzystaniem nowego czynnika fosforylującego (fosforanotriamidu tris-triazolidowego)

Natomiast w przypadku pochodnej 4-AC, oprócz pożądanego amidoestru typu **78A;f** powstawało około 50% fosforanodiestu zawierającego 2 reszty AZT, a w którym usunięta była reszta aminochinolinowa. Struktura tego związku została potwierdzona za pomocą technik NMR i MS, natomiast mechanizm jego powstawania pozostaje nieznan, można jedynie domniemywać, że przyczyną zachodzenia reakcji ubocznych może być szczególnie wysoka zasadowość 4-amino-2-metylochinoliny. Pomimo wielu prób i starań nie udało się otrzymać czystego amidofosforanu 4-AC.

Warto zwrócić uwagę, że metoda tris-triazolidowa nie jest wprawdzie metodą uniwersalną, jednak doskonale uzupełnia metodę *H*-fosfonianową, dzięki czemu możliwe jest

uzyskanie prawie wszystkich amidofosforanów nukleozydowych typu **78**. Wśród jej zalet można wymienić:

- a) selektywne podstawienie jednej grupy triazolidowej aminą aromatyczną (**79**) prowadziło do otrzymania krystalicznych związków (**84a,c,d,f,j**), które można było w łatwy sposób oczyścić i zanalizować za pomocą ^1H NMR;
- b) można wykorzystać ją jako alternatywną ścieżkę syntezy amidofosforanów w przypadku amin, których $\text{p}K_a > 8$ i metoda *H*-fosfonianowa nie prowadzi do docelowych produktów;
- c) użycie takiego czynnika fosforylującego ograniczyło powstawanie niepożądanych produktów ubocznych i związanych z tym etapów oczyszczania

Pomimo trudności syntetycznych udało się otrzymać szereg zaplanowanych izomerów, które będą stanowiły integralną część całej pracy.

2.7 Utrata kanionu trietyloamoniowego w nukleozydo (*N*-aryloamido)fosforanach.

Syntetyczne estry fosfonianowe i fosforanowe nukleozydów otrzymuje się typowo jako zliofilizowane sole trietyloamoniowe. W takiej formie związki te są zazwyczaj trwałe i dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych, w przeciwieństwie do słabo rozpuszczalnych soli amonowych czy bardzo słabo rozpuszczalnych soli sodowych. Kation trietyloamoniowy wprowadzany jest zazwyczaj podczas oczyszczania chromatograficznego z użyciem faz mobilnych zawierających trietyloaminę. W takiej właśnie formie izolowałem czyste (*N*-aryloamido)fosforany AZT i innych 2',3'-dideoksynukleozydów. Podczas analizy widm ^1H NMR uzyskanych produktów zaobserwowałem jednak, że pola powierzchni sygnałów pochodzących od protonów trietyloamoniowych były mniejsze, niż wynikałoby to ze stosunku stechiometrycznego 1:1 części kationowej i anionowej tych soli. Była to obserwacja zupełnie nieoczekiwana, a w literaturze nie udało mi się znaleźć opisu takiego zjawiska (sytuacja przeciwna, tj. większa zawartość Et_3N lub kationu Et_3NH^+ , zdarza się sporadycznie i może być łatwo wyjaśniona niecałkowitym usunięciem aminy podczas suszenia produktu lub obecnością chlorowodoru trietyloaminy, jako produktu neutralizacji chlorowodoru z rozpuszczalników typu chlorowanych węglowodorów, np. CHCl_3 , CH_2Cl_2 lub $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$).

Niestechiometryczny skład produktu przy braku świadomości tego faktu może prowadzić do błędów w naważaniu próbek do eksperymentów. Błąd ten może być istotny, gdyż kation trietyloamoniowy może stanowić nawet kilkadziesiąt procent masy molowej nukleotydu. Co więcej, utrata części kationowej oznacza przekształcenie się soli w kwas, czego skutkiem może być przyspieszony rozkład związku, zwłaszcza podatnych na katalizę kwasową amidofosforanów lub zawierających kwasolabilne grupy ochronne. Może także dochodzić do obniżenia rozpuszczalności – problemy takie były faktycznie obserwowane we wczesnych fazach naszych prac z (*N*-pirydylo)amidofosforanami i były one wówczas trudne do wyjaśnienia.

Najbardziej racjonalnym wytłumaczeniem zaobserwowanej obniżonej zawartości komponentu kationowego jest przyjęcie, że badane sole znajdują się w roztworze w stanie równowagi



o znaczącym udziale komponentów po prawej stronie równania oraz że w trakcie uzyskiwania czystego związku zachodzą procesy eliminujące wolną aminę z układu. W procedurze laboratoryjnej zidentyfikowałem dwa potencjalne etapy odpowiadające powyższemu schematowi:

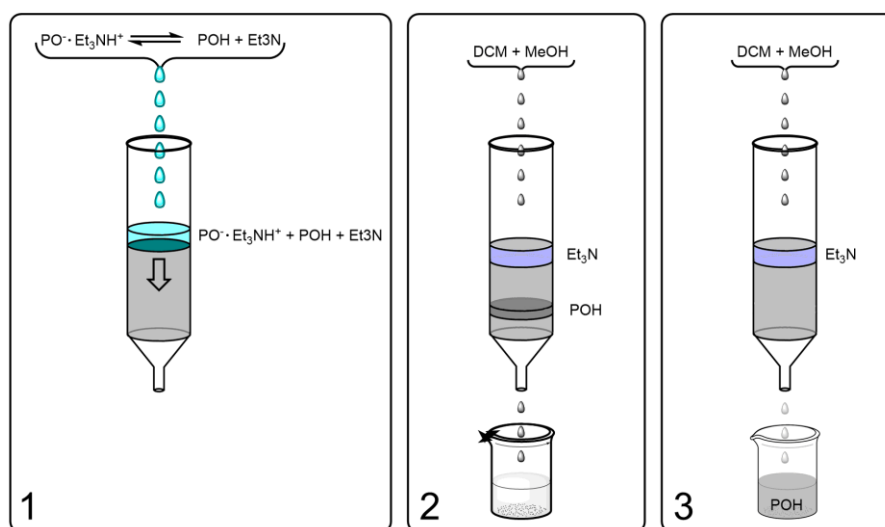
- 1) rozdział chromatograficzny;
- 2) zateżanie roztworu.

Utrata kationu Et_3NH^+ podczas rozdziału chromatograficznego jest możliwa pod warunkiem zastosowania fazy mobilnej niezawierającej trietyloaminy. W wyniku równowagi (1) przez kolumnę transportowane są w rzeczywistości 3 związki: sól, kwas i zasada, które mogą różnić się mobilnością chromatograficzną. Uproszczony, hipotetyczny przebieg takiego procesu przedstawia Rys. 31.

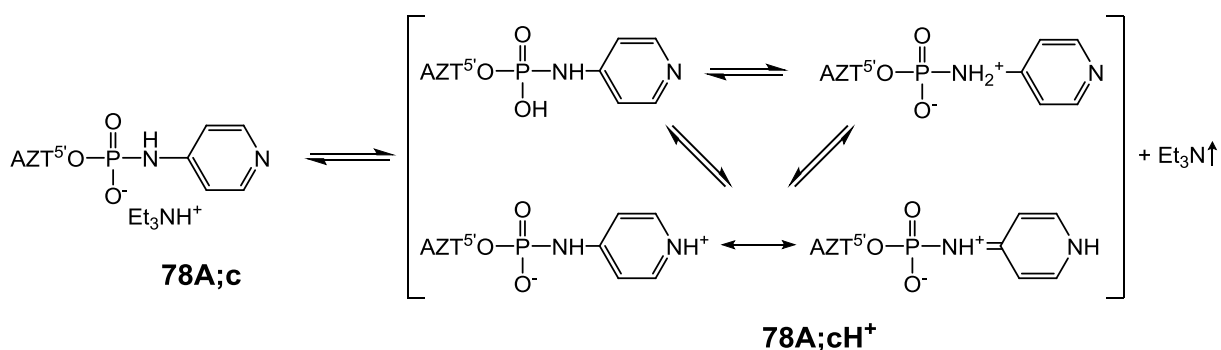
Aby mogło dojść do utraty części kationowej soli podczas odparowania rozpuszczalnika, zasada musi być na tyle lotna, aby w trakcie procesu była usuwana wraz z rozpuszczalnikiem.

W obu procesach warunkiem koniecznym jest znacząca dysocjacja soli na zasadę i kwas w danym rozpuszczalniku. Można więc domniemywać, że zjawisko to może występować zwłaszcza dla słabych kwasów, dla których równowaga (1) będzie przesunięta w prawo w stopniu znacznie większym, niż dla soli kwasów silnych. Wprawdzie kwasowość badanych amidofosforanów nie jest znana, jednak na podstawie danych literaturowych dla pokrewnych związków, można oczekiwać dla nich wartości pK_a rzędu 3–4 w porównaniu do

pK_a 1–2 dla estrów fosforanowych¹¹⁹. Oznacza to, że amidofosforany powinny być znacznie bardziej podatne na utratę kationu niż estry fosforanowe. Wniosek ten jest zgodny z pierwszymi obserwacjami tego zjawiska, które zarejestrowano dla [*N*-(pirydyn-4-ylo)]-amidofosforanu AZT (**78A;c**). Można spodziewać się, że związek ten wykazywać powinien szczególnie niską kwasowość ze względu na obecność dodatkowego zasadowego atomu azotu w pierścieniu, i to w pozycji *para*, w której forma protonowana jest szczególnie stabilizowana przez efekt rezonansu, a w efekcie odejście wolnej aminy może zachodzić szczególnie łatwo (Schemat 29).

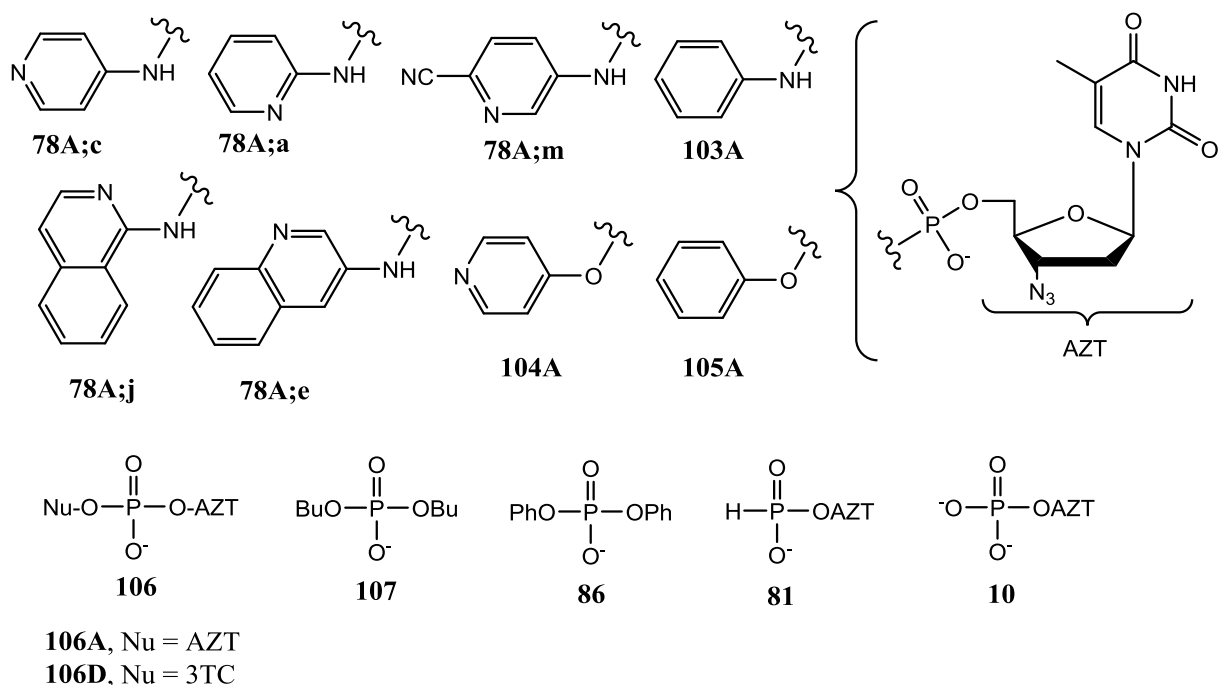


Rysunek 31. Hipotetyczny schemat rozdzielania części kwasowej (POH) i zasadowej (Et_3N) podczas chromatografii soli $\text{PO}\cdot\text{Et}_3\text{NH}^+$. 1. Załadowanie kolumny. 2. Przemycanie kolumny i rozdzielanie soli na kwas i zasadę. 3. Wymycie kwasu z kolumny.



Schemat 29. Możliwe formy tautomeryczne i rezonansowe kwasowej formy amidofosforanu **78A;c**

Biorąc pod uwagę, jak ważny jest dokładny skład substancji w badaniach chemicznych, biochemicznych, a zwłaszcza farmakologicznych oraz zaskakujący brak jakichkolwiek doniesień literaturowych o możliwości utraty części kationowej nietlotnych soli, uznałem za bardzo ważne bliższe zbadanie zaobserwowanego zjawiska. Do badań tych wykorzystałem szereg soli tritetyloamoniowych analogów fosforanu AZT (**10**) typu amidoestrów (**78A;a**, **78A;c**, **78A;m**, **103A**, **78A;j**, **78A;c**) i diestrów (**104A**, **105A**, **106**), a także *H*-fosfonian AZT (**81**) i proste diestry **107** i **86** (Rys. 32). W części aromatycznej różniły się one obecnością i pozycją atomu azotu w pierścieniu oraz obecnością podstawników.



Rysunek 32. Struktury diestrów i amidofosforanów użytych w badaniach

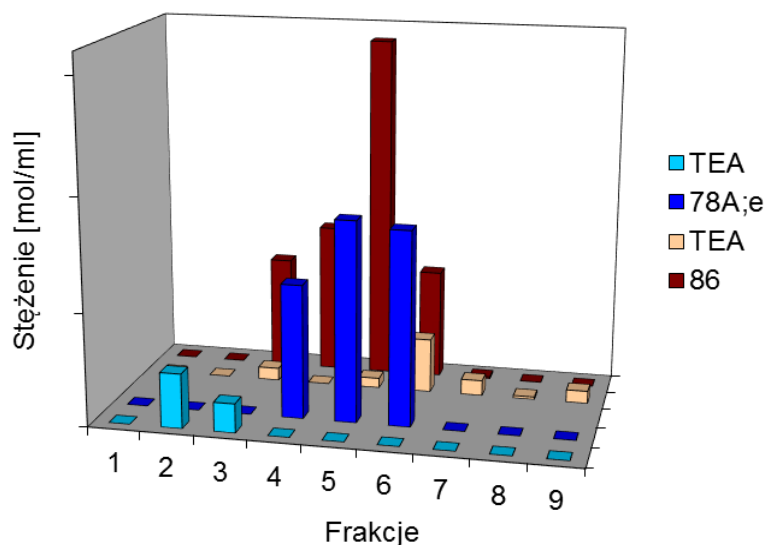
Aby badania te były wiarygodne i dokładne, zwróciłem szczególną uwagę na stechiometryczną ilość kationu i anionu, by ich stosunek wynosił dokładnie 1:1 w wyjściowych związkach. W niektórych przypadkach wymagało to zastosowania specjalnych technik, które opracowałem w tym celu, gdyż standardowe procedury były nieskuteczne. Podczas oczyszczania amidofosforanów najważniejszą część stanowiło usunięcie nadmiaru TEA·HCl, będącego pozostałością z reakcji kondensacji. W przypadku

estrów (**105A**, **106**, **107**, **86**, **81**) zastosowałem wstępne sączenie ich wodnych roztworów przez złożę z silnym kationitem (Dowex) w formie kwasowej (H^+). W efekcie w eluacie znajdowały się odpowiednie diestry w formie kwasowej oraz HCl, który był usuwany podczas odparowywania rozpuszczalnika. Uzyskane w ten sposób związki rozpuszczałem ponownie w wodzie, dodawałem niewielki nadmiar molowy trietyloaminy i liofilizowałem, otrzymując trietyloamoniowe sole (*N*-arylo)amidofosforanów AZT ze stechiometryczną ilością kationu. Było to możliwe, gdyż podczas liofilizacji nie może zachodzić równowagowanie opisane równaniem (1), a więc układ anion-kation zostaje zamrożony (w sensie dosłownym i przenośnym) i usuwany jest jedynie nadmiar niesprotonowanej aminy.

Nieco inne postępowanie zastosowałem w przypadku amidoestrów **78A;a**, **78A;c**, **78A;l**, **104A**, **78A;j**, **78A;e**, gdyż użycie silnie kwasowej żywicy Dowex powodowało częściowy rozkład tych związków. Po zbadaniu szeregu układów chromatograficznych opracowałem metodę usuwania niepożądanego TEA·HCl na żelu krzemionkowym stosując jako eluent octan etylu z 5% zawartością TEA i 0–20% gradient MeOH. W układzie tym TEA·HCl migrował szybciej niż oczyszczany amidofosforan, co pozwalało na jego uzyskanie w formie czystej, choć zazwyczaj w postaci mieszaniny soli i kwasu (czyli z niedoborem TEA w porównaniu do układu o stosunku stechiometrycznym). Po rozpuszczeniu w wodzie z niewielkim dodatkiem trietyloaminy i liofilizacji otrzymywałem pożądane produkty, podobnie jak dla estrów opisanych powyżej.

Badania możliwości chromatograficznego rozdzielania soli na kwas i aminę przeprowadziłem dla amidofosforanów **78A;a**, **78A;c**, **78A;l**, **105A**, **78A;j**, **78A;e**, oraz diestrów **106A** i **86**, wszystkie w postaci soli trietyloamoniowych. Związki te nanosiłem na kolumnę chromatograficzną i wymywałem produkt używając fazy ruchomej toluen : metanol (1:1). Zebrane równe frakcje zakwaszałem HCl w celu związania trietyloaminy w nielotny chlorowodorek i oznaczałem ilości aminy i kwasu w poszczególnych frakcjach poprzez analizę integracji sygnałów w 1H NMR. Najbardziej charakterystyczne wyniki przedstawione są na Wykresie 1. Z przeprowadzonych obserwacji i badań mogłem wyciągnąć kilka ogólnych wniosków:

- a) usunięcie kationu trietyloamoniowego nie ogranicza się do amidofosforanów heteroaromatycznych, lecz obejmuje także diestry fosforanowe;
- b) zawartość fosforanów i aminy różniła się wyraźnie w poszczególnych frakcjach, co wskazuje, że owe komponenty migrują przynajmniej częściowo niezależnie;
- c) większa część trietyloaminy (lub całość w niektórych przypadkach) była wiązana przez żel krzemionkowy i nie ulegała wymywaniu



Wykres 1. Zawartość fosforanów **78A,e** i **86** oraz kationu trietyloamoniowego w poszczególnych frakcjach rozdziału chromatograficznego soli o składzie stechiometrycznym. Wysokość słupków odpowiada stężeniu molowemu (którego wartość bezwzględna nie została ustalona)

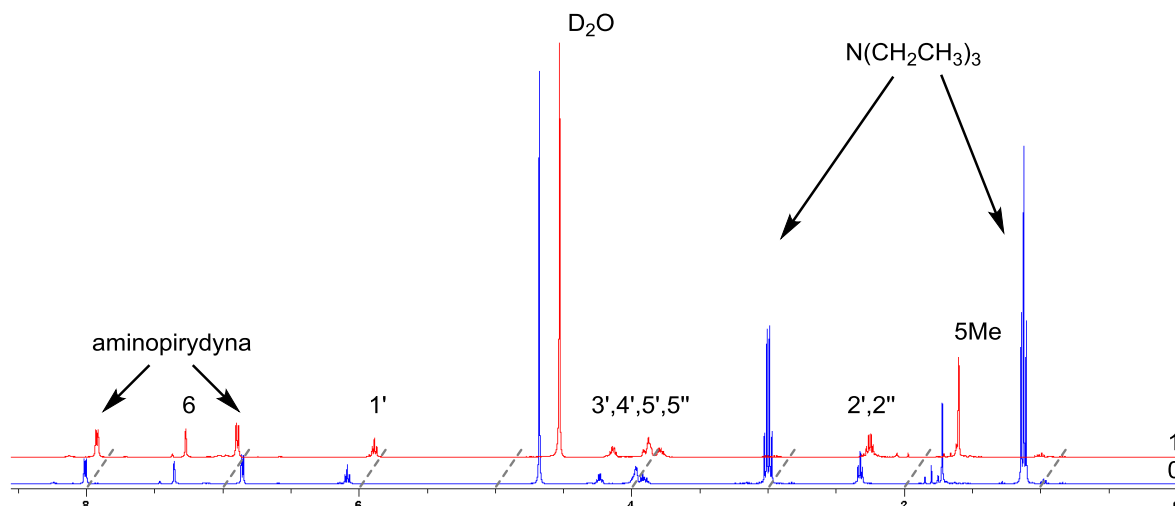
Założenie, że żel krzemionkowy częściowo lub w całości wychwytuje składnik zasadowy soli (tj. kation trietyloamoniowy), potwierdzają wyniki eksperymentów, w których na standardową kolumnę chromatograficzną nanosiłem różne ilości związków. Przy większych ilościach naniesionego materiału stosunek molowy kwas:zasada w sumarycznym eluacie zmniejszał się, co wskazywało na wysycenie żelu trietyloaminą. Podobne zjawisko obserwowałem, jeśli nanoszony związek wzbogacałem kontrolowaną ilością TEA.

Eksperymenty chromatograficzne wykazały więc, że jest możliwe częściowe usunięcie kationu trietyloamoniowego podczas chromatografii w warunkach obojętnych, co oznacza, że żel krzemionkowy może zachowywać się jak słaby wymiennicz jonowy. Ponieważ jednak w żadnym wypadku połączone frakcje eluatu nie były w pełni pozbawione trietyloaminy w wyniku samej chromatografii, a dla niektórych amidofosforanów obserwowałem wcześniej całkowite usunięcie zasady po oczyszczeniu, prawdopodobnie zachodził tu dodatkowy proces usuwania kationu.

Procesem tym mogło być wspomniane wcześniej odejście aminy podczas odparowywania soli z rozpuszczalników organicznych. Było to jeszcze bardziej nieoczekiwane niż opisana powyżej utrata kationu podczas chromatografii. Aby zweryfikować te spekulacje i ocenić skalę tego zjawiska, przebadalem je dla szeregu estrów fosforanowych i amidofosforanów, z których część (Rys. 32) poddałem systematycznym badaniom w ściśle zdefiniowanych warunkach eksperymentalnych. W tym celu próbki testowanych związków rozpuszczałem w układzie toluen : metanol 1:1 (v/v)

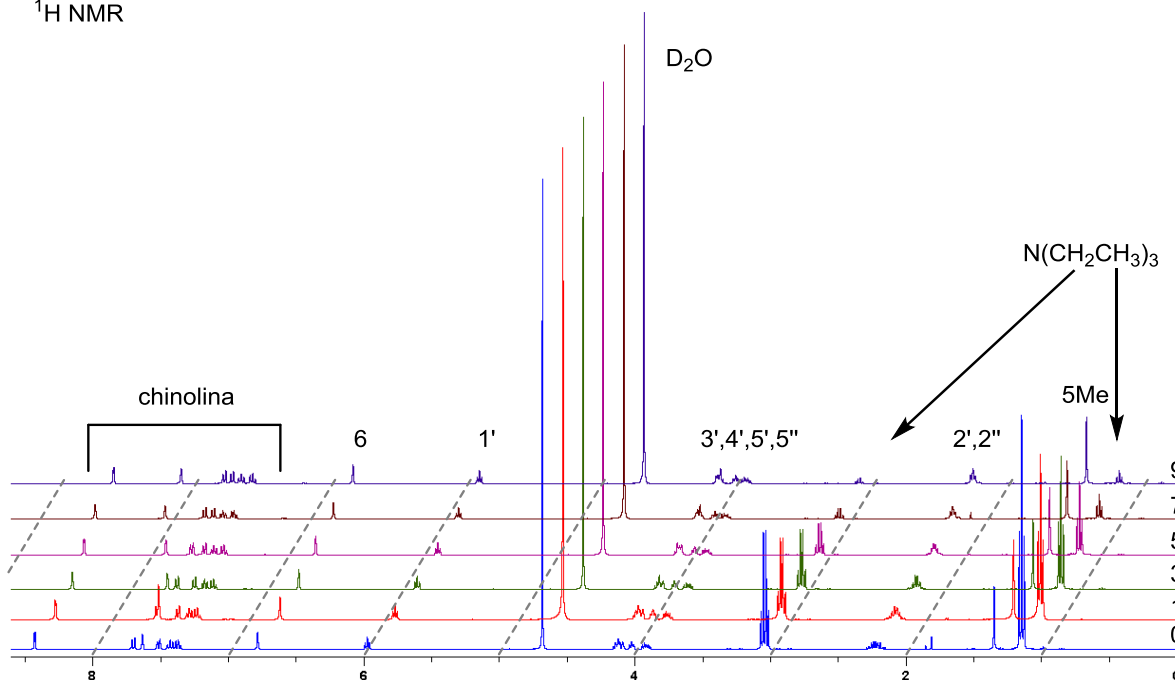
i odparowywałem do sucha w ściśle określonych warunkach ciśnienia i temperatury oraz stosując taki sam sprzęt. Procedurę rozpuszczenie–odparowanie powtórzyłem wielokrotnie dla wszystkich badanych związków, analizując skład roztworu za pomocą ^1H NMR. Przykładowe wyniki takiej analizy przedstawione są na Rys. 33 i 34.

^1H NMR



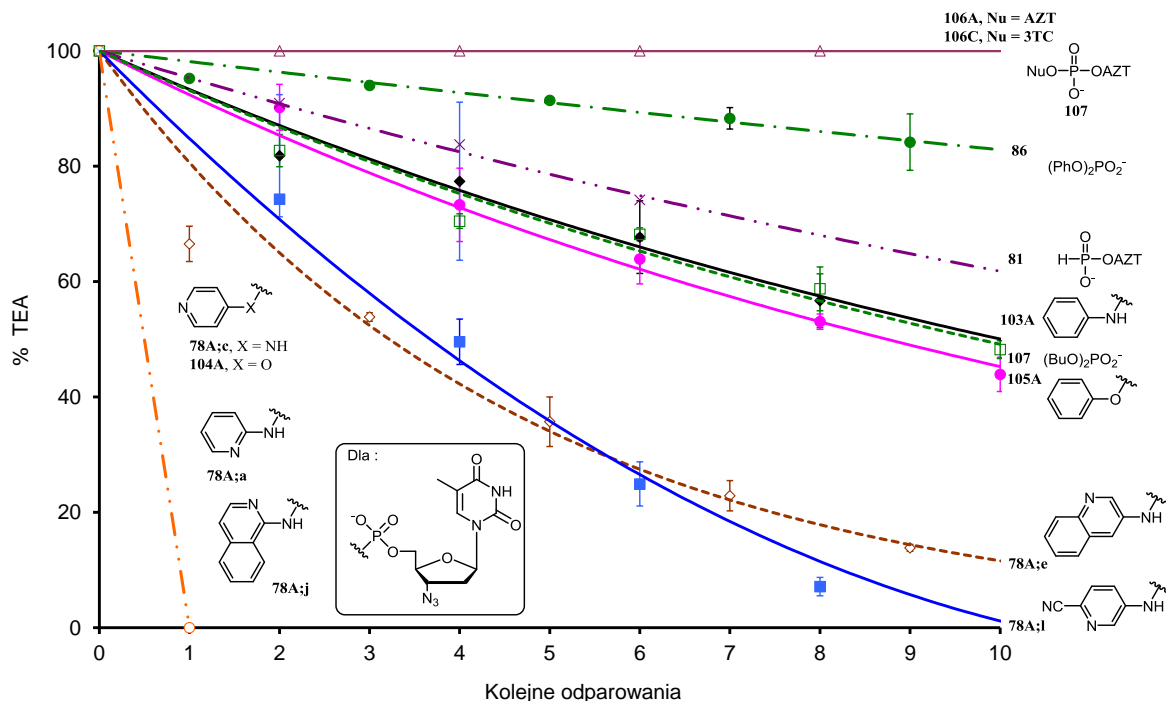
Rysunek 33. Widmo ^1H NMR amidofosforanu **78A;c** (sól TEAH⁺) przed i po 1 odparowaniu z układu metanol : toluen 1:1 (v/v).

^1H NMR



Rysunek 34. Widmo ^1H NMR amidofosforanu **78A;e** (sól TEAH⁺) przed i po 1, 3, 5, 7 i 9 odparowaniach z układu metanol : toluen 1:1 (v/v).

Ilość TEAH⁺ w stosunku do fosforanu została oszacowana przez porównanie wartości integracji sygnałów ¹H NMR. Wyniki tych badań przedstawiono na Wykresie 2 (każdy punkt jest średnią z 3 doświadczeń).

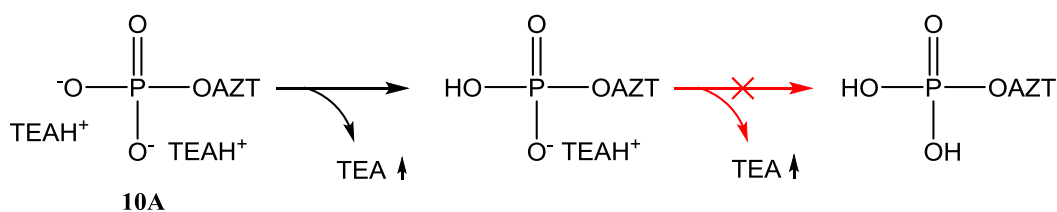


Wykres 2. Ilość kationu trietylamoniowego podczas wielokrotnego odparowywania rozpuszczalnika z roztworów soli trietyloamoniowych amidoestrów fosforanowych **78A:c**, **78A:a**, **78A:i**, **103A**, **78A:j**, **78A:e**, diestrów fosforanowych **104A**, **105A**, **106**, **107**, **86** i *H*-fosfonianu **81**

Oprócz fosforanów dinukleozydowych (**AZT** i **3TC**), wszystkie z przebadanych związków traciły TEAH⁺ w większym lub mniejszym stopniu. Zjawisko to było widoczne dla szeregu estrów (tj. fosforanu fenyloowo-nukleozydowego (**105A**), fosforanu dibutyłowego (**107**), fosforanu difenylowego (**86**) i *H*-fosfonianu **AZT** (**81**) i wszystkich (*N*-arylo)amido-fosforanów. Zbadane związki można podzielić na 4 grupy: (i) nie tracące kationu, (ii) tracące 20–50% kationu po 10 odparowaniach, (iii) tracące całość lub prawie całość kationu po 10 odparowaniach i (iv) tracące całość kationu po 1 odparowaniu. Podjęta analiza korelacji pomiędzy kwasowością ugrupowania P-O-H i skłonnością do utraty kationu tylko częściowo wyjaśniła powyższe obserwacje. Wartości p*K*_a badanych związków nie są znane, zostały jednak oszacowane przez porównanie z danymi literaturowymi dla zbliżonych układów na około 1–2 dla diestrów kwasu fosforowego (**105A**, **106A**, **106D**, **107**, **86**)^{119, 120} i 3–4 dla amidoestru **103A**¹²¹. W tym kontekście zaskakująca jest obecność amidoestru **103A** w grupie

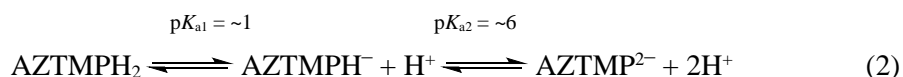
(i), razem z estrami, oraz stosunkowo duże różnice pomiędzy diestrami pomimo prawdopodobnie bardzo zbliżonej kwasowości, np. fosforany dinukleozydowe **106** w porównaniu do fosforanu dibutylowego **107**. Wyraźne zwiększenie podatności na utratę kationu widoczne jest dla amidoestrów zawierających dodatkowy atom azotu w pierścieniu aromatycznym. Stanowi on centrum zasadowe, a więc dogodne miejsce wiązania protonu z kationu TEAH^+ , co oznacza generowanie większych ilości wolnej trietyloaminy. Zjawisko to jest silniejsze w przypadku układów typu *orto* i *para* (grupa iv) niż *meta* (grupa iii). Bardzo duża nietrwałość pochodnych *orto*, plasująca je razem z pochodnymi *para*, a nie *meta* nie odzwierciedla wartości $\text{p}K_a$ wyjściowych amin (6,0, 6,8 i 9,2 dla odpowiednio *m*-, *o*- i *p*-aminopirydyny^{122, 123}). Wskazuje to, że opisywane zjawisko jest prawdopodobnie wypadkową różnych efektów, a nie prostą zależnością od $\text{p}K_a$. Interesująca jest także zbliżona nietrwałość soli pochodnej 4-aminopirydyny (**78A;c**) i 4-hydroksypirydyny (**104A**), zwłaszcza w kontekście podobnego podobieństwa wspomnianej wcześniej pary **103A** (amid fenyłowy) i **105A** (ester fenyłowy). Można tu pokusić się o uogólnienie, że dominujący wpływ na zjawisko utraty kationu ma struktura ligandu, a nie budowa centrum fosforanowego (amid vs ester).

Powyższy wniosek nie oznacza jednak, że kwasowość centrum fosforowego nie ma znaczenia. Wyraźnie uwidoczniły to właściwości bis(trietyloamoniowej) soli fosforanu AZT (**10A**, Schemat 30).



Schemat 30. Utrata kationu 5'-monofosforanu AZT (**10A**)

W tym wypadku utrata pierwszego przeciwjonu zachodzi tak łatwo, że samo uzyskanie soli bis(trietyloamoniowej) było wyzwaniem i wymagało szczególnie ostrożnej liofilizacji z układu zawierającego nadmiar trietyloaminy. Natomiast drugi przeciwjon był niezwykle stabilny i nie był eliminowany w zauważalnym stopniu nawet podczas wielokrotnego odparowywania. Odzwierciedla to niewątpliwie różnice w kwasowości poszczególnych protonów kwasu azydotymidyłowego: $\text{p}K_{a1} = \sim 1$, $\text{p}K_{a2} = \sim 6$ ¹²⁴.

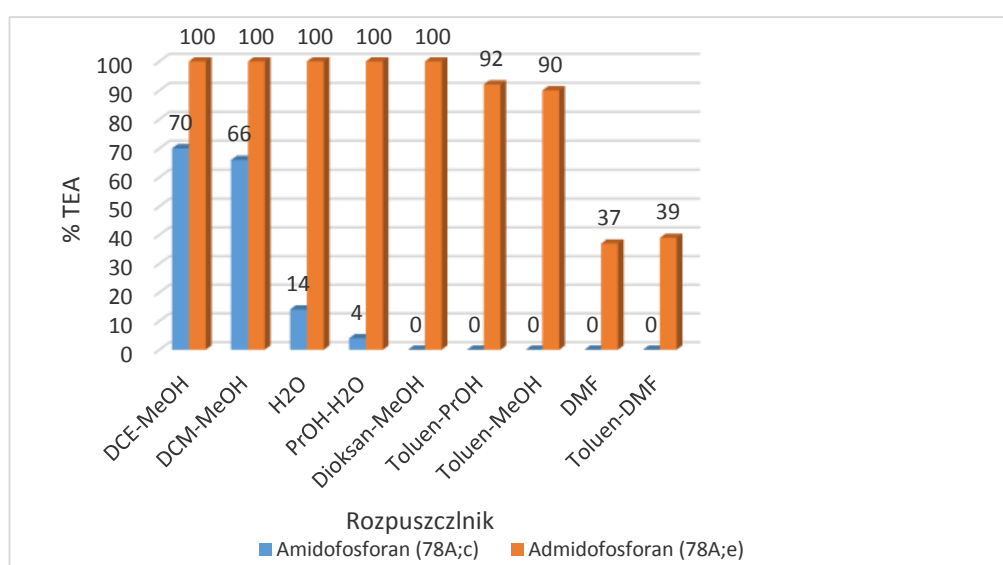


W celu ustalenia, czy zjawisko utraty kationu jest ograniczone tylko do fosforanów, przeprowadziłem odparowanie dużej ilości rozpuszczalnika (400 ml układu toluen – metanol 1:1, v/v) z roztworu 20 mg soli trietyloamoniowych kwasu solnego, benzenosulfonowego i benzoowego. Dwie pierwsze sole były trwałe, natomiast benzoosan trietyloamoniowy stracił ok. 20% kationu (pK_a kwasu benzoowego wynosi 4,2). Także w tych eksperymentach ujawniła się więc zależność trwałości soli od pK_a sprzężonego kwasu. Z analizy zbadanych związków wynika, że wartością graniczną pK_a , poniżej której sól trietyloamoniowa nie jest podatna na utratę kationu jest 1. Jest to szacowana wartość pK_a dla diestrów fosforanowych. Można spekulować, że w zależności od ligandów, pK_a dla niektórych estrów (np. dinukleozydowych **AZT** i **3TC**) ma wartość poniżej tej granicy i nie tracą one kationu podczas odparowywania, natomiast dla innych jest ona wyższa i obserwuje się utratę kationu.

W świetle dotychczasowych wyników jest rzeczą oczywistą, że na trwałość soli podczas odparowywania rozpuszczalnika może wpływać także zasadowość i lotność aminy. Zbadałem to dla soli amidofosforanu **78A;c** z silnie zasadowym i nielotnym DBU (1,8-diazabicyklo[7.1.0]heks-7-enem) oraz z zasadami lotnymi – amoniakiem i metyloaminą. Jak można było oczekiwać, sól DBU była w pełni trwała, natomiast dwie pozostałe straciły całość kationu po jednym odparowaniu 50 ml rozpuszczalnika. Nie oznacza to jednak, że wszystkie sole zbudowane z lotnych składników ulegają podobnemu rozpadowi, gdyż np. $\text{NH}_3\cdot\text{HCl}$ i $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ były całkowicie trwałe w badanych warunkach.

Ostatnim zagadnieniem tej części badań było zbadanie wpływu składu odparowywanego rozpuszczalnika. Badania te przeprowadziłem dla soli TEAH^+ amidofosforanu **78A;c** (który we wcześniejszych eksperymentach wykazywał się bardzo dużą labilnością) i znacznie trwalszego amidofosforanu **78A;e**. Do porównania użyłem 9 układów rozpuszczalników różniących się znacznie polarnością i temperaturami wrzenia: DCM: 40 °C; MeOH: 65 °C; DCE (1,2-dichloroetan): 84 °C; PrOH: 97 °C; woda: 100 °C; 1,4-dioksan: 101 °C; toluen: 111 °C; DMF: 153 °C. Dobór rozpuszczalników i ich mieszanin (w stosunku 1:1 v/v) podyktowany był rozpuszczalnością badanych amidofosforanów. Wyniki zebrane są na Wykresie 3. Ogólny trend wskazywał na łatwiejszą utratę kationu z rozpuszczalników wyżej wrzących. Na uwagę zasługuje szczególnie silna zdolność do usuwania kationu układu toluen–metanol, który był efektywniejszy od układów wodnych. Polarny metanol pełnił tu

prawdopodobnie rolę składnika umożliwiającego całkowite rozpuszczenie związku (słabo rozpuszczalnego w samym toluenie), natomiast toluen był składnikiem o wysokiej temperaturze wrzenia i niskiej polarności, sprzyjającej formom obojętnym, tj. występującym po prawej stronie równania (1). Stosunkowo słaba efektywność wody w eliminowaniu kationu wynika prawdopodobnie z jej wysokiej polarności, która sprzyja formie zjonizowanej po lewej stronie równania (1) w wyniku zysku energetycznego z solwatacji. Natomiast DMF ma temperaturę wrzenia na tyle wysoką, że trietyloamina jest usuwana efektywnie nawet biorąc pod uwagę niekorzystne dla tego procesu prawdopodobnie silne przesunięcie równowagi (1) w lewą stronę, wynikające z solwatacji jonów.



Wykres 3. Zawartość kationu trietyloamoniowego w amidofosforanach **78A;c** i **78A;e** po jednokrotnym odparowaniu rozpuszczalnika lub mieszaniny 1:1 (v/v) dwóch rozpuszczalników (20 mg związku w 50 ml roztworu).

Podsumowując tę część badań, udało mi się wykazać że:

- a) zarówno podczas oczyszczania chromatograficznego, jak i odparowywania rozpuszczalnika może dochodzić do utraty przeciwjonu, jeśli jest nim protonowana lotna amina;
- b) formy kwasowe niektórych fosforanów i amidofosforanów można otrzymać z soli trietylamoniowych podczas
 - (i) chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym,
 - (ii) odparowania rozpuszczalnika;

- c) kation trietyloamoniowy w proporcji stechiometrycznej można wprowadzić do labilnych amidofosforanów przez liofilizację formy kwasowej z niewielkim nadmiarem molowym trietyloaminy.

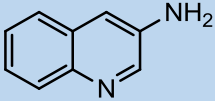
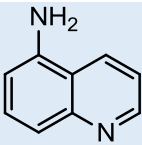
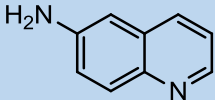
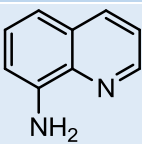
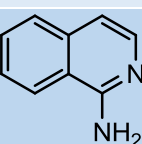
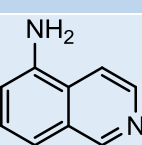
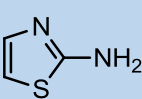
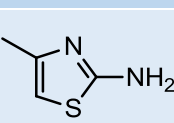
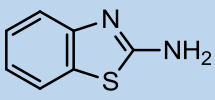
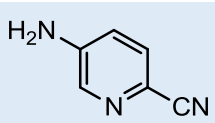
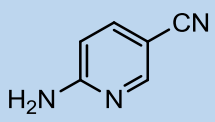
Warto też zwrócić uwagę, że o ile z przeprowadzonych badań wynika duża stabilność przeciwnonu trietyloamoniowego w dinukleotydach, to utrata tego kationu była obserwowana podczas oczyszczania syntetycznych tiofosforanów oligonukleotydów produkowanych na skalę setek gramów z przeznaczeniem do badań medycznych jako oligonukleotydy antysensowe (dr Yogesh S. Sanghvi, Rasayan Inc., informacja ustna). Wskazuje to na istotne znaczenie problemu utraty kationu, który może prowadzić do błędnego naważania obliczonej ilości związku. Zaobserwowanie błędnego składu preparatu nie jest trywialne, gdyż wymaga dokładnej analizy integracji sygnałów na widmie NMR. Na widmach nie pojawiają się natomiast żadne nowe sygnały czy wyraźne przesunięcia sygnałów przeciwnonu, a w efekcie fakt utraty części kationu może zostać łatwo przeoczony. Z analizy publikacji zawierających materiały eksperymentalne w postaci zintegrowanych widm ^1H NMR wynika, że rzeczywiście uzyskiwano produkty o niestechiometrycznej, obniżonej zawartości kationu trietyloamoniowego¹¹⁰.

2.8 Trwałość i ścieżki rozpadu amidofosforanów

Istotnym elementem, który należy brać pod uwagę podczas projektowania pronukleotydów jako potencjalnych proleków jest ich trwałość. Decyduje ona o formie, w jakiej związek dotrze do miejsca działania, a także czy jest w stanie pokonać chemiczną i enzymatyczną degradację zachodzącą w żywym organizmie. Poznanie mechanizmu i produktów rozkładu amidofosforanów jest jednym z ważniejszych kryteriów mojej pracy, które pozwolą mi ocenić i zrozumieć przydatność tych związków w terapii anty-HIV. Całą serię otrzymanych związków przebadalem pod kątem ich stabilności chemicznej i enzymatycznej.

Jako standardowy układ do badania trwałości chemicznej w roztworze stosowałem inkubację związków w pożywce do hodowli komórkowych RPMI-1640 (standard *Roswell Park Memorial Instytut*). Ponadto dla wybranych związków określiłem ich trwałość na warunki zasadowe i kwasowe. Odporność na działanie enzymów hydrolitycznych badałem w roztworze RPMI zawierającym 10% surowicę z płodów bydłych (FBS, z ang. *fetal bovine serum*). Wszystkie te testy prowadziłem w inkubatorze w temperaturze 37,0 °C.

Wszystkie otrzymane amidofosforany typu **78A**, **78B**, **78C**, **78D**, **78E** niezależnie od budowy komponentu nukleozydowego (AZT, d4T, ddU, 3TC, ABC) i aminoarylowego wykazały wysoką odporność chemiczną, co było zgodne z wynikami wcześniejszych badań kilku pochodnych aminopirydylowych¹¹⁰. W buforze RPMI były one trwałe powyżej 30 dni (całkowity brak śladów degradacji; analiza mieszanin reakcyjnych za pomocą HPLC i ³¹P NMR). Co więcej, przykładowa pochodna 3AQ-AZT (**78A;e**) wykazała pełną trwałość w $pH = 4$ i $pH = 10$ (7 dni). W jeszcze drastyczniejszych warunkach zasadowych ($pH = 13$) czas połowicznego rozkładu pochodnej 4APy-AZT (**78A;e**) wynosił ok. 10 dni, natomiast w warunkach silnie kwasowych ($pH = 1$) była ona nietrwała ($t_{1/2} < 3$ min). Znaczna odporność na hydrolizę chemiczną jest cechą bardzo korzystną w kontekście wykorzystania farmaceutycznego, gdyż wskazuje na możliwość długotrwałego przechowywania związku. Warto zauważyć, że szybki rozkład w warunkach silnie kwasowych nie wyklucza potencjalnego przyjmowania doustnego leku, gdyż kontakt z kwasowym środowiskiem żołądka można wyeliminować stosując tabletki powlekane (dojelitowe). Istotniejszym problemem jest odporność związku na enzymy hydrolityczne, obecne zarówno w układzie pokarmowym, jak i we krwi. Jako wstępne oszacowanie zachowania uzyskanych amidofosforanów w organizmie przeprowadziłem badanie ich trwałości środowisku wykazującym aktywność enzymatyczną, tj. w medium hodowlanym RPMI z 10% surowicą z płodów bydłych. W przeciwieństwie do buforu RPMI bez aktywności enzymatycznej, w warunkach tych dla większości związków obserwowałem hydrolizę, choć zwykle była ona bardzo powolna – jedynie dla kilku związków $t_{1/2}$ było niższe niż 7 dni. W kilku przypadkach stwierdziłem natomiast całkowitą odporność na rozkład w badanych warunkach (Tabela 1). Ponieważ 50% rozkładu w wielu przypadkach nie zostało osiągnięte w badanym przedziale czasowym, w celu porównania podatności amidofosforanów na hydrolizę wobec FBS, dodatkowo określiłem stopień degradacji wyjściowego związku po 3 dniach inkubacji.

Numery związków	Aktywny nukleozyd ddN	Amina	$t_{1/2}$ dni	Po 3 dniach (% 78)	Produkty rozpadu
78A;e	AZT		>7	78	AZTMP ArNH ₂ AZT
78A;g	AZT		>7	77	AZTMP ArNH ₂ AZT
78A;h	AZT		>7	99	AZTMP ArNH ₂ AZT
78A;i	AZT		7	73	AZTMP ArNH ₂ AZT
78A;j	AZT		>7	86	AZTMP ArNH ₂ AZT
78A;k	AZT		>7	97	AZTMP ArNH ₂ AZT
78A;n	AZT		2,5	45	AZTMP ArNH ₂ AZT
78A;o	AZT		7	65	AZTMP ArNH ₂ AZT
78A;p	AZT		24 h	23	AZTMP ArNH ₂ AZT
78A;i	AZT		>7	68	AZTMP ArNH ₂ AZT
78A;j	AZT		4	40	AZTMP ArNH ₂ AZT

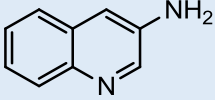
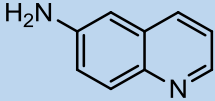
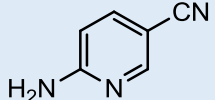
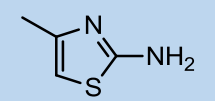
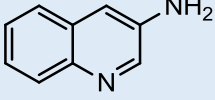
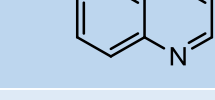
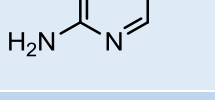
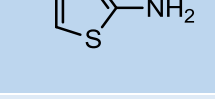
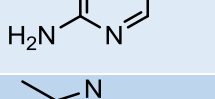
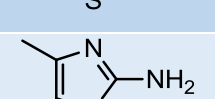
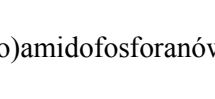
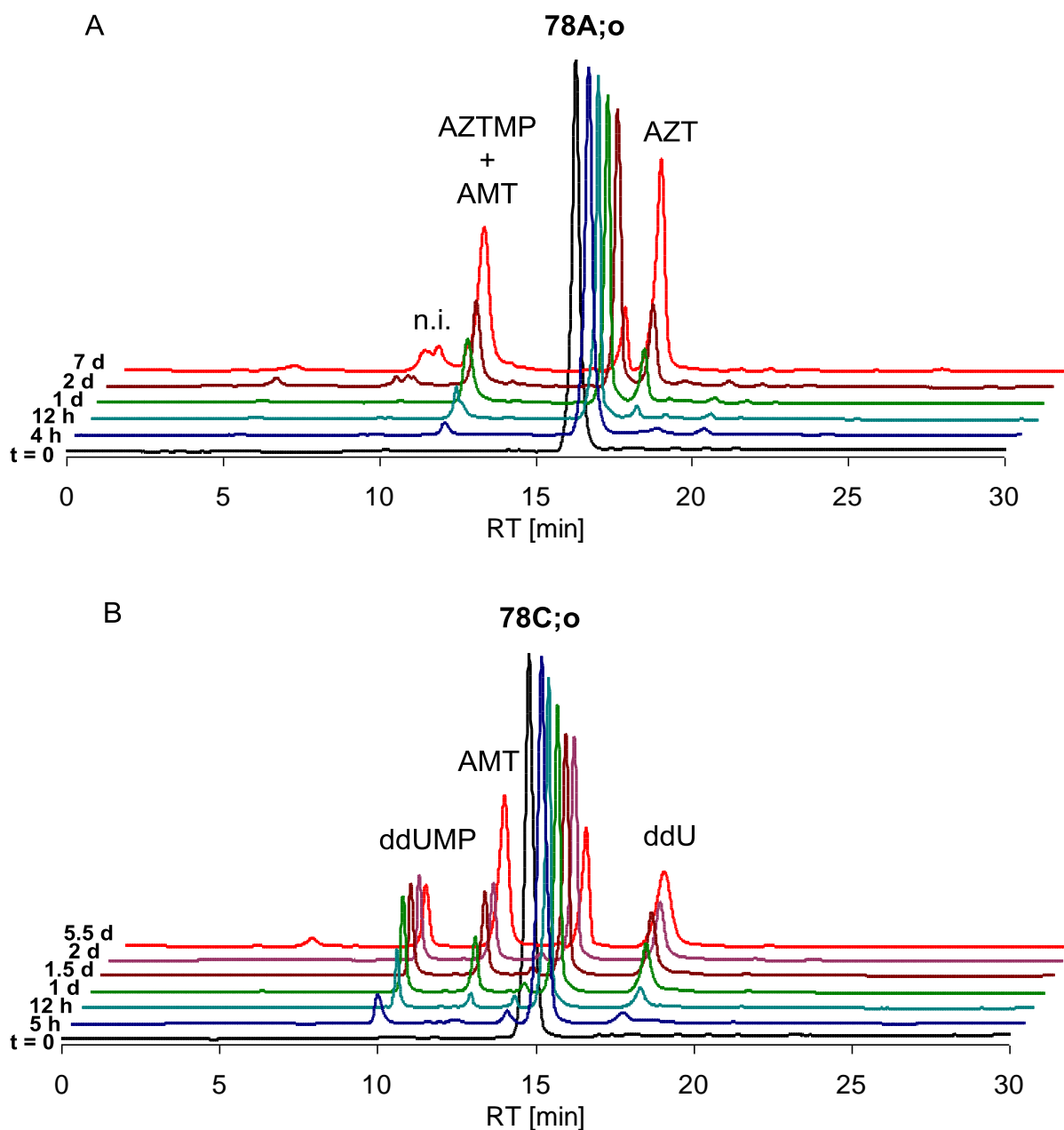
78C;e	ddU		1,5	36	ddUMP ArNH ₂ ddU
78C;h	ddU		6	74	ddUMP ArNH ₂ ddU
78C;m	ddU		3,5	53	ddUMP ArNH ₂ ddU
78C;o	ddU		1,5	40	ddUMP ArNH ₂ ddU
78B;e	d4T		trwały	100	-
78B;h	d4T		trwały	100	-
78B;m	d4T		>>7	88	d4TMP ArNH ₂ d4T
78B;o	d4T		>7	72	d4TMP ArNH ₂ d4T
78E;m	ABC		trwały	100	-
78E;o	ABC		trwały	100	-
78D;o	3TC		trwały	100	-

Tabela 1. Trwałość (*N*-arylo)amidofosforanów dideoksynukleozydów typu **78** w RPMI/FBS.

Dzięki przeprowadzonym badaniom można zaobserwować znaczną różnicę w stabilności amidofosforanów w zależności od reszty nukleozydowej, która wahała się od $t_{1/2} = 24$ h do całkowitej trwałości w ciągu 7 dni inkubacji. Odporność amidofosforanów

dideoksynukleozydów na działanie enzymów można uszeregować w zależności od reszty nukleozydowej następująco: ddU < AZT < d4T < ABC = 3TC.

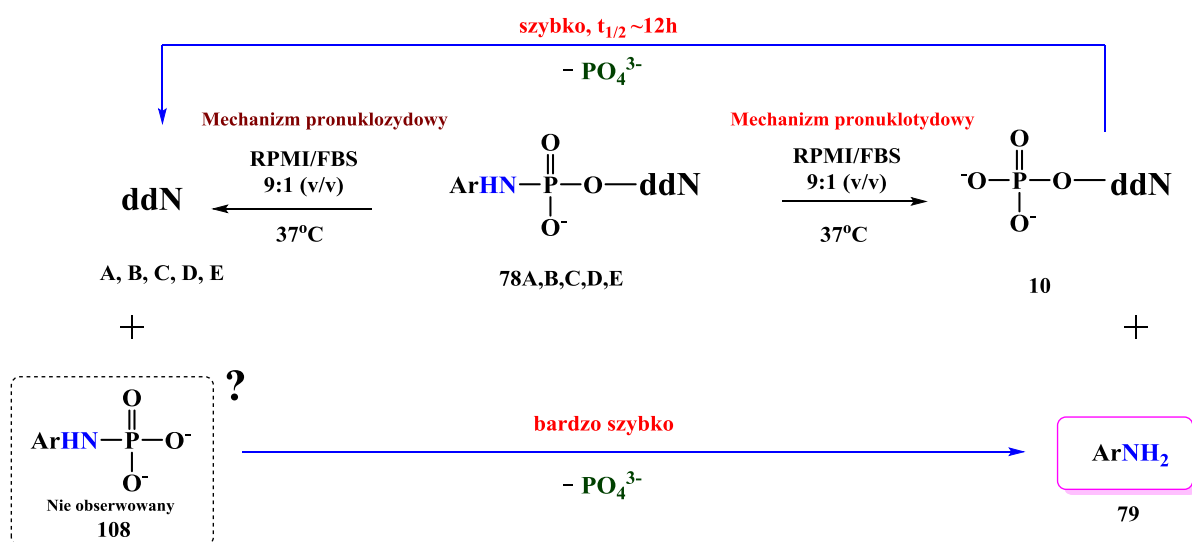
Dla kilku wybranych amidofosforanów **78** przeprowadziłem dokładniejszą analizę przebiegu rozkładu w RPMI/FBS. Najbardziej reprezentatywne wyniki przedstawione są na Rys. 35.



Rysunek 35. Analiza HPLC rozpadu amidofosforanów **78A;o** i **78C;o** w RPMI/FBS.

Analizę przebiegu reakcji prowadziłem za pomocą HPLC na kolumnie z fazą odwróconą RP-18 dla każdego związku indywidualnie, określając produkty rozkładu poprzez porównanie czasów retencji z substancjami wzorcowymi. W niektórych przypadkach rozdzielanie mieszaniny produktów było bardzo trudne lub niemożliwe, gdyż czasy retencji poszczególnych produktów były praktycznie takie same, natomiast w innych analiza przebiegu reakcji nie nastąpiła problemów. I tak, o ile w przypadku amidofosforanu **78A;o** (AZT – AMT) powstające AZTMP i aminotiazol mają tak zbliżone czasy retencji, że dają jeden wspólny sygnał na chromatografach, to ddUMP i aminometylotiazol powstające z rozkładu amidofosforanu **78C;o** (ddU – AMT) są dobrze rozdzielone, co pozwala na uzyskanie znacznie dokładniejszych informacji o przebiegu reakcji.

Na tej podstawie można stwierdzić, że hydroliza amidofosforanów dideoksynukleozydów **78A-E** może przebiegać dwukierunkowo: (i) ścieżka pronukleozydowa – powstaje dideoksynukleozyd (**A-E**) i amidofosforan **108** (który w następnym etapie rozkłada się do aminy **79** i jonu fosforanowego); (ii) ścieżka pronukleotydydowa – powstaje amina **79** i nukleotyd ddNMP (**10**), hydrolizujący dalej do dideoksynukleozydu **A-E** i jonu fosforanowego (Schemat 31). Szybkość degradacji monofosforanów dideoksynukleozydów w buforze RPMI/FBS wyznaczyłem w osobnych eksperymentach; $t_{1/2}$ wyniósł ok. 12 h dla wszystkich ddNMP.



Schemat 31. Potencjalne ścieżki rozpadu amidofosforanów typu (A).

Jak widać na Rys. 35B, rozpad amidofosforanu **78C;o** prowadzi – przynajmniej częściowo – do powstania analogu nukleotydu ddNMP, co dowodzi pronukleotydogo charakteru tego związku w badanych warunkach. Mechanizm pronukleotydogo nie został natomiast ani potwierdzony, ani wykluczony. Pomimo że w żadnym przypadku amidofosforan **108** nie został wykryty w mieszaninach reakcyjnych, istnieje możliwość, że w badanych warunkach ulega on bardzo szybkiej hydrolizie do wolnej aminy i jonu fosforanowego. Z kolei nukleozyd **A-E** może pochodzić zarówno bezpośrednio z rozkładu wyjściowego amidofosforanu **78A-E** (mechanizm pronukleotydogo), jak i z nukleotydu **10** (mechanizm pronukleotydogo). W celu określenia trwałości amidofosforanów typu **108** podjąłem próby ich uzyskania w osobnych eksperymentach, jednak zakończyły się one niepowodzeniem. Tym niemniej najważniejszą informacją otrzymaną podczas przedstawionych powyżej eksperymentów był fakt, że amidofosforany **78A;o** i **78C;o** mogą ulegać rozpadowi według zakładanego mechanizmu pronukleotydogo. Co ciekawe, w eksperymencie przedstawionym na Rys. 35B wytworzył się stan stacjonarny – szybkość powstawania i rozkładu ddUMP była praktycznie taka sama, a jego ilość utrzymywała się przez długi okres na poziomie ok. 15%. Tego typu kinetyka – stałe utrzymywanie określonego stężenia związku aktywnego jest bardzo korzystne dla potencjalnych zastosowań terapeutycznych. Należy jednak mieć na uwadze, że bufor RPMI/FBS znacząco odbiega od warunków panujących w żywym organizmie, więc przedstawione badania należy traktować jedynie jako wstępny sondaż trwałości i mechanizmu rozkładu badanych związków.

2.9 Lipofilowość i współczynnik podziału – wprowadzenie

W podejściu zmierzającym do zaprojektowania leków o jak najwyższej aktywności – w przedstawianej tu pracy (*N*-arylo)amidofosforanów dideoksynukleozydów – istotną rolę odgrywa ich lipofilowość i hydrofobowość.

Lipofilowość jest podstawowym czynnikiem fizykochemicznym wpływającym na różne właściwości biologiczne, takie jak biodostępność, wchłanianie, dystrybucja i metabolizm. Termin ten można zdefiniować jako powinowactwo, skłonność związków chemicznych (leków) do przechodzenia do fazy organicznej (lipidowej, tłuszczowej). Determinuje ona zdolność związku do przekroczenia błony komórkowej, a jednocześnie w znaczny sposób wpływa na rozpuszczalność w wodzie. Jedną z częściej stosowanych miar lipofilowości jest różnica stężeń równowagowych danej substancji w układzie dwufazowym ciec:ciecz, za który odpowiedzialne są głównie oddziaływania molekularne zachodzące między cząsteczkami rozpuszczalnika i substancji rozpuszczonej. Najczęściej do ilościowego

pomiaru stanu równowagi takiego procesu wykorzystuje się współczynnik podziału P , zazwyczaj w formie logarytmicznej, $\log P$. Współczynnik podziału opisuje procesy podziałowe między dwiema fazami, niepolarną (organiczną) a polarną. Tradycyjnie i najczęściej stosowanym układem ekstrakcyjnym stosowanym w celu wyznaczenia współczynnika podziału jest układ oktanol-woda:

$$P = \frac{C_{oktanol}}{C_{woda}}$$

Dla układu tego obecnie dostępna jest duża ilość danych doświadczalnych, umożliwiającą porównywanie związków o zbliżonych motywach strukturalnych. Ponadto dobrze modeluje on i odwzorowuje zachowanie substancji w układach biologicznych. Każda substancja chemiczna w żywym organizmie poddana zostaje kilku procesom, zarówno biofizycznym, jak i biochemicznym, które generalnie można podzielić na 3 fazy. Pierwsza – farmaceutyczna, mówi w jakiej formie i w jaki sposób zostaje podany i uwalniany potencjalny lek. Druga – farmakokinetyczna, jest związana z losami leku w organizmie, tj. jego transportem i przemianom (metabolizm i eliminacja). Trzecia – farmakodynamiczna, obejmuje oddziaływanie z farmakoreceptorem, w efekcie czego występuje właściwy efekt farmakologiczny. Każdy z wymienionych etapów związany jest do pewnego stopnia z lipofilowością substancji. Zbyt duża lipofilowość, a co za tym idzie słaba rozpuszczalność w wodzie, może powodować nadmierne powinowactwo leku do lipidów i wybiórczą absorpcję w błonach biologicznych. Mamy wówczas do czynienia z ujemnym wpływem lipofilowości na aktywność biologiczną. W praktyce projektując potencjalne leki dąży się do kompromisu i tak dobiera ich strukturę, aby lipofilowość była optymalna, nie za wysoka ani za niska.

Hydrofobowość dotyczy natomiast oddziaływań pomiędzy grupami niepolarnymi (pierścień lub łańcuch węglowodorowy) a wodą i jest ona pewnym integralnym, ale nie jedynym elementem lipofilowości. Miarą hydrofobowości może być zdolność do agregacji substancji w środowisku wodnym. Terminy lipofilowości i hydrofobowości bywają używane zamiennie, jednak dotyczą one różnych aspektów tego samego zjawiska i tylko częściowo się pokrywają. W różnych dziedzinach badań preferuje się jeden lub drugi termin do opisu oddziaływań. Np. w badaniach chromatograficznych z niepolarną fazą stacjonarną stosuje się tradycyjnie pojęcie hydrofobowości, natomiast w przypadku opisu zjawisk transportu substancji (leku) w organizmie żywym ugruntował się termin lipofilowości.

2.10 Lipofilowość (*N*-arylo)amidofosforanów dideoksynukleozydów

Jednym z założeń prezentowanej tu pracy było przyjęcie, że racjonalne zwiększenie lipofilowości badanych (*N*-arylo)amidofosforanów dideoksynukleozydów może pozytywnie wpłynąć na ich parametry farmakologiczne dzięki ułatwionej migracji przez lipidową błonę komórkową. Z tej przyczyny dla wszystkich otrzymanych związków wyznaczyłem współczynnik podziału woda-oktanol w celu skorelowania go z aktywnością biologiczną. Należy tu zwrócić uwagę, że dla związków obdarzonych ładunkiem trzeba uwzględnić stopień ich jonizacji przy różnych pH fazy wodnej, co realizuje się przez zastąpienie współczynnika podziału P bardziej złożoną funkcją dystrybucji D^{125} . W celu oszacowania zasadności takiego podejścia dla badanych amidofosforanów, dla jednego z nich (**78A;e**, AZT – 3AC) wykonałem pomiary podziału oktanol–woda przy różnych wartościach pH (Tabela 2). Ponieważ w badanym zakresie wpływ pH na uzyskane wyniki okazał się niewielki, przyjąłem, że dla amidofosforanów **78A;e** równanie $\log P \approx \log D$ jest spełnione w sposób wystarczający dla celów niniejszej pracy i pozostałem przy wyznaczeniu wartości współczynnika podziału $\log P$, jako fazę wodną stosując bufor o fizjologicznym pH 7,4.

pH	$\log P$
4,0	-1,45
7,4	-1,72
11,0	-1,40

Tabela 2. Współczynniki podziału amidofosforanu (**78A;e**, AZT – 3AC) przy różnych pH

Do wyznaczenia współczynnika podziału stosowałem początkowo konwencjonalną ekstrakcję w układzie woda-oktanol (tzw. *shake-flask*) i pomiar absorbancji w obu fazach za pomocą spektrofotometru UV-VIS. Metoda ta stosowana była w naszym laboratorium we wcześniejszych pracach. W trakcie moich badań stwierdziłem jednak, że o ile pozwalała ona na zadowalające wyznaczenie współczynnika podziału dla pochodnych AZT, to w przypadku amidofosforanów zawierających inne reszty nukleozydowe (ddU, d4T, ABC, 3TC) okazała się ona nieskuteczna. Wynikało to ze zbyt dużej hydrofilowości tej grupy związków i związanej z tym ich bardzo niskiego stężenia w fazie organicznej, co uniemożliwiało wiarygodne wyznaczenie absorbancji w tej fazie. Wadą tej techniki jest także podatność na błędy podczas pomiarów, zwłaszcza w oktanolu.

Z tych powodów w dalszych badaniach zastosowałem inną metodę – ekstrakcję w skali mikro połączoną z określeniem stężeń związków za pomocą HPLC. Metoda ta okazała się wysoce powtarzalna i pozwoliła na określenie $\log P$ nawet dla najbardziej hydrofilowych związków w badanej grupie. Podejście to zastosowałem ostatecznie dla wszystkich uzyskanych pochodnych (Tabela 3) oraz wyjściowych dideoksynukleozydów (Tabela 4). Ponadto, korzystając z modułu ChemProp w programie ChemBioDraw, dla związków tych określiłem też wartość współczynników podziału obliczoną semiempiryczną metodą fragmentacji na licencji firmy BioByte (Clog P). W Tabeli 5 zestawione są natomiast literaturowe i/lub obliczone wartości pK_a i $\log P$ wyjściowych amin heterocyklicznych.

Nr	Amina	$\log P$ eksp.	$\log P$ obl.
AZT			
78A;c	4-APy	-0,94	-0,11
78A;e	3-AC	-1,72	1,27
78A;g	5-AC	-1,23	1,72
78A;h	6-AC	-1,64	1,27
78A;i	8-AC	-1,47	1,27
78A;j	1-AIC	-0,69	1,06
78A;k	5-AIC	-1,28	1,06
78A;n	AT	-2,10	-0,27
78A;o	AMT	-2,06	0,23
78A;p	ABT	-1,22	1,32
78A;l	5-ACPy	-1,67	-0,28
78A;m	6-ACPy	-1,92	-0,48

Nr	Amina	$\log P$ eksp.	$\log P$ obl.
ddU			
78C;e	3-AC	-2,62	0,20
78C;h	6-AC	-2,35	0,20
78C;m	6-ACPy	-1,99	-1,55
78C;o	AMT	-1,71	-0,84
d4T			
78B;e	3-AC	-3,36	0,95
78B;h	6-AC	-2,61	0,95
78B;m	6-ACPy	-1,99	-0,81
78B;o	AMT	-2,39	-0,10
ABC			
78E;m	6-ACPy	-1,94	0,43
78E;o	AMT	-1,62	1,15
3TC			
78D;o	AMT	-2,27	-1,07

Tabela 3. Eksperymentalne (metoda HPLC w skali mikro) i obliczone (za pomocą modułu ChemProp w programie ChemBioDraw Ultra, wersja 13.0, Clog P) współczynniki podziału (N -arylo)amidofosforanów dideoksynukleozydów **78A;d-p**, **78B;e,h,m,o**, **78C; e,h,m,o**, **78D;o**, **78E;m,o**.

Nr	Symbol	log <i>P</i> eksp.	log <i>P</i> obl.	log <i>P</i> lit.
A	AZT	0,06	0,04	-0,01–0,1 ¹²⁶
C	ddU	-0,96	-1,23	-1,0 ¹²⁷
B	d4T	-0,79	-0,49	-0,6 ^{128, 129}
E	ABC	1,16	0,76	0,85 ¹³⁰
D	3TC	-0,94	-1,46	-0,93 ¹³⁰

Tabela 4. Eksperymentalne i obliczone (za pomocą modułu ChemProp w programie ChemBioDraw Ultra, wersja 13.0, Clog *P*) współczynniki podziału dideoksynukleozydów **A-E**¹²⁶

Nr	Symbol	p <i>K</i> _a	log <i>P</i> ^a
79a	2-APy	6,8 ¹²⁶	0,5 ^b (0,6 ^c)
79b	3-APy	6,0 ¹²⁶	0,2 ^b (-0,1 ^c)
79c	4-APy	9,2 ¹²⁶	0,3 ^b (-0,1 ^c)
79e	3-AC	5,0 ¹²⁶	1,6 ^b (1,3 ^c)
79g	5-AC	5,5 ¹²⁶	1,2 ^b (1,3 ^c)
79h	6-AC	5,6 ¹²⁶	1,3 ^b (1,3 ^c)
79i	8-AC	4,0 ¹²⁶	1,8 ^b (1,3 ^c)
79j	1-AIC	7,6 ¹²⁶	1,9 ^b (1,6 ^c)
79k	5-AIC	5,6 ¹²⁶	~0,9 ^c
79n	AT	5,4 ¹²⁶	0,4 ^b (1,0 ^c)
79o	AMT	5,6 ¹²⁶	~1,7 ^c
79p	ABT	4,5 ¹²⁶	~2,4 ^c
79l	5-ACPy	~0,5 ^d	~0,4 ^c
79m	6-ACPy	~3 ^d	~0,6 ^c

^aDane eksperymentalne i obliczone pochodzą z modułu ChemProp w programie ChemBioDraw Ultra, wersja 13.0). ^bWartości eksperymentalne. ^cWartości obliczone. ^dWartości oszacowane na podstawie zmian zasadowości pirydyny (p*K*_a 5,2) powodowanych przez wprowadzenie pojedynczych podstawników w pozycjach *orto* i *meta* (ΔpK_a : *o*CN, -5,5; *m*CN, -3,8; *o*NH₂, +1,5; *m*NH₂, +0,8)¹²⁶

Tabela 5. Wartości p*K*_a (w wodzie) i współczynniki podziału amin **79a-p**¹²⁶

Z analizy tak zestawionych danych można wyciągnąć kilka istotnych wniosków:

1. Wprowadzenie dodatkowego pierścienia benzenowego do pierścienia aminopirydyny powoduje znaczący wzrost lipofilowości aminy, o ok. jedną jednostkę log *P*, tj. ok. 10x (Tabela 5).
2. Brak jest globalnej korelacji między zasadowością amin a ich lipofilowością, choć wewnątrz danej grupy strukturalnej (aminopirydyny, aminochinoliny) widoczny jest pewien trend wzrostu log *P* przy spadku p*K*_a (Tabela 5). Są to jednak niewielkie różnice, a badane grupy związków są zbyt nieliczne, aby można wyciągać tu istotne konkluzje. Co więcej, 1-aminoizochinolina, pomimo wyraźnie większej zasadowości od aminochinolin z zestawienia jest bardziej od nich lipofilowa.

3. Dla dideoksynukleozydów **A-E** i amin **78d-p** obliczone wartości $\log P$ zazwyczaj dość dobrze oddają wartości eksperymentalne (Tabele 4 i 5).
4. W przypadku amidofosforanów **78A;d-p, 78B;e,h,m,o, 78C;e,h,m,o, 78D;o, 78E;m, o** obliczone wartości $\log P$ znacznie odbiegają od wartości rzeczywistych i ich przydatność wydaje się nikła. Np. dla pochodnej **78B;e** (d4T – 3-AC) różnica przekracza 4 jednostki \log (eksp. -3,36 vs obl. 0,95).
5. W przypadku amidofosforanów **78A;d-p, 78B; e,h,m,o, 78C; e,h,m,o, 78D;o, 78E;m,o** wprowadzenie reszty bardziej lipofilowej aminochinoliny w miejsce reszty aminopirydyny spowodowało wyraźny spadek lipofilowości produktu (Tabela 3). Stanowiło to znaczne zaskoczenie, gdyż oczekiwany był wynik przeciwny, na co wskazywały także semiempiryczne dane obliczeniowe (Tabela 3, panel lewy). Z kolei porównanie lipofilowości pochodnych aminotiazolu i amino benzotiazolu wykazało trend zgodny z oczekiwaniami.
6. Lipofilowość amidofosforanów **78A;d-p, 78B;e,h,m,o, 78C;e,h,m,o, 78D;o, 78E;m,o** nie wykazywała jednoznacznej korelacji z lipofilowością części nukleozydowej. Wprawdzie widoczny był ogólny trend – choć z wyjątkami – niższej lipofilowości amidofosforanów zawierających reszty ddU, d4T i 3TC (bardziej hydrofilowych niż AZT), jednak lipofilowość amidofosforanów AZT i ABC była zbliżona, pomimo zdecydowanie większej lipofilowości wolnego ABC niż AZT.

Uzyskane wyniki mogą odzwierciedlać wysoką złożoność procesu podziału międzyfazowego badanych (*N*-arylo)amidofosforanów i wskazują na konieczność zachowania dużej ostrożności przy przewidywaniu własności fizycznych złożonych układów ambifilowych. Pomimo że obniżona lipofilowość (*N*-arylo)amidofosforanów zawierających reszty amin o wyższej lipofilowości była sprzeczna z oczekiwaniami, nie wykluczyło to jednak możliwości uzyskania bardzo dobrych wyników testów biologicznych. Można bowiem spekulować, że tak jak nie sprawdziły się przewidywania co do właściwości badanych związków w układzie oktanol–woda, tak samo trudno ocenić *a priori* ich zachowanie się w znacznie bardziej złożonych układach biologicznych.

2.11 Aktywność biologiczna (*N*-arylo)amidofosforanów dideoksynukleozydów

Otrzymana seria (*N*-aryloamido)fosforanów dideoksynukleozydów **78A;d-p**, **78B;e,h,m,o**, **78C;e,h,m,o**, **78D;o**, **78E;m,o** została przekazana do Narodowego Instytutu Leków w Warszawie w celu określenia ich zdolności do inhibicji namnażania wirusów HIV i cytotoksyczności. Niezwykle istotna w takich badaniach jest znajomość aktywności biologicznej potencjalnych produktów metabolizmu związków wyjściowych, aby ustalić, czy efekty obserwowane po zastosowaniu badanego związku nie są wynikiem aktywności produktów powstających w organizmie podczas ich rozkładu. Jak stwierdziłem podczas testów trwałości w układach modelowych (omówionych w rozdziale 2.8 *Trwałość i ścieżki rozpadu amidofosforanów*), końcowymi metabolitami amidofosforanów są odpowiednie aminy i dideoksynukleozydy (z przejściowo powstającymi fosforanami dideoksynukleozydów, które poza komórką nie są jednak związkami aktywnymi z powodu niemożności pokonania błony komórkowej). W badaniach biologicznych uwzględniłem obie grupy produktów końcowych (aktywność biologiczna dideoksynukleozydów jest wprawdzie dobrze znana, jednak z analizy danych literaturowych wynika, że ilościowa powtarzalność tego rodzaju badań nie jest zbyt wysoka).

Wolne aminy **79d-p** nie generowały mierzalnej aktywności anty-HIV do stężenia 10 μM i nie wykazywały żadnej lub znaczącej cytotoksyczności (Tabela 6). Z dużym prawdopodobieństwem można więc było przyjąć, że stwierdzenie aktywności amidofosforanów na poziomie wyższym niż dla wyjściowych dideoksynukleozydów związane będzie z ich działaniem biologicznym (w założeniu – pronukleotydowym), a nie z aktywnością amin powstających w trakcie ich metabolizowania w organizmie (bez szczegółowych badań nie można jednak wykluczyć scenariusza, w którym właśnie aminy są związkami aktywnymi, a zawierające je amidofosforany są jedynie wehikulami dostarczającymi je do wnętrza komórki, do którego w postaci wolnej nie są w stanie wnikać; z analizy obecnej wiedzy na temat pronukleotydów taka koncepcja jest jednak mało prawdopodobna).

Wyniki biologiczne uzyskane dla dideoksynukleozydów wykorzystane zostały jako wartości referencyjne do porównania z aktywnością amidofosforanów **78A;d-p**, **78B;e,h,m,o**, **78C;e,h,m,o**, **78D;o**, **78E;m,o** i ujęte są w Tabelach 7 i 8.

Nr	Amina	EC ₅₀ [μM]	CC ₅₀ [μM]	CC ₉₀ [μM]
79a	2-APy	> 10	>1060	>1060
79b	3-APy	> 10	>1060	>1060
79c	4-APy	> 10	>1060	>1060
79e	3-AC	> 10	1000	1400
789g	5-AC	> 10	115	160
79h	6-AC	> 10	270	350
79i	8-AC	> 10	250	500
79j	1-AIC	> 10	210	350
79k	5-AIC	> 10	350	1050
79n	AT	> 10	1890	>1890
79o	AMT	> 10	600	>1750
79p	ABT	> 10	500	1000
79l	5-ACPy	> 10	>1670	>1670
79m	6-ACPy	> 10	1675	>1830

Tabela 6. Aktywność biologiczna amin **79a-p**

Wszystkie przebadane amidofosforany AZT okazały się znakomitymi inhibitorami HIV, efektywnymi już w stężeniach nanomolowych. Ich wartość EC₅₀ mieściła się w zakresie 1–20 nM, a EC₉₀ w zakresie 10–200 nM (Tabela 7). Najwyższą aktywność (EC₅₀ ≤ 2 nM, EC₉₀ ≤ 15 nM) wykazały pochodne zawierające reszty 1-aminoizochinoliny (**78A;j**), aminocyjanopirydyny (**78A;l,m**) i aminotiazolu (**78A;n,o**). Aktywność pozostałych związków była nieco niższa (lecz nadal bardzo wysoka). Niezwykle istotne było także to, że żaden z tej grupy amidofosforanów nie wykazał toksyczności dla komórek MT-4, nawet przy maksymalnych stężeniach, które ograniczała jedynie ich rozpuszczalność. Z tej przyczyny niemożliwe było określenie wartości CC₅₀, a co za tym idzie, indeksu selektywności, o którym można jedynie powiedzieć, że jest niewątpliwie niezwykle wysoki – prawdopodobnie SI₅₀ przekracza 10⁶. Warto zwrócić uwagę, że dla prawie wszystkich (z jednym tylko wyjątkiem) związków, nawet w ich maksymalnych stężeniach nie zaobserwowano żadnego spadku przeżywalności komórek w porównaniu do kontroli. Uzyskane wyniki były zbliżone do stwierdzonych wcześniej aktywności pochodnych aminopirydyn. Z badań tych wynika, że pronukleotydy AZT mogą być cennymi kandydatami brany pod uwagę w terapii anty-HIV.

Identyfikacja			Fizykochemia			Aktywność biologiczna			
Nr	Nu	Amina	log P	$t_{1/2}$	% 78 po 3 d	EC ₅₀ [nM]	EC ₉₀ [nM]	C _{max} ^a [μM]	V _{Cmax} ^b
A	AZT	–	0,06	–	–	10	>500	300	100%
78A;a	AZT	2-APy	0,5	5 d	b.d.	2,4	29	200	100%
78A;b	AZT	3-APy	0,2	3 d	b.d.	2,3	9	200	100%
78A;c	AZT	4-APy	0,3	>5 d	b.d.	1,1	6	200	100%
78A;e	AZT	3-AC	-1,72	>7 d	78%	8	185	435	100%
78A;g	AZT	5-AC	-1,23	>7 d	77%	9	30	571	100%
78A;h	AZT	6-AC	-1,64	>7 d	99%	2,5	115	454	100%
78A;i	AZT	8-AC	-1,47	7 d	73%	20	220	487	100%
78A;j	AZT	1-AIC	-0,69	>7 d	86%	2	15	218	100%
78A;k	AZT	5-AIC	-1,28	>7 d	97%	7	15	356	100%
78A;n	AZT	AT	-2,10	2,5 d	45%	1,3	9	377	70%
78A;o	AZT	AMT	-2,06	7 d	65%	1,5	15	1100	100%
78A;p	AZT	ABT	-1,22	24 h	23%	7	25	219	100%
78A;l	AZT	5-ACPy	-1,67	4 d	40%	1,1	8	364	100%
78A;m	AZT	6-ACPy	-1,92	>7 d	68%	1,2	15	418	100%

^aMaksymalne stężenie związku użyte w badaniu. ^bPrzeżywalność komórek przy C_{max}

Tabela 7. Właściwości i aktywność biologiczna (N-arylo)amidofosforanów AZT **78A;a-p**

Należy tu zwrócić uwagę, że wyniki uzyskane w eksperymentach *in vitro* są jedynie przesłanką wskazującą, że dane substancje mogą mieć korzystne parametry farmakologiczne *in vivo*, a dopiero badania na modelach zwierzęcych mogą potwierdzić możliwość ich potencjalnego zastosowania jako leków. Wziąłem aktywny udział w syntezie w skali wielogramowej trzech aminopirydynowych pochodnych AZT **78A**, przygotowanych w celu zbadania ich szkodliwości dla szczurów. Wszystkie one wykazały niską szkodliwość¹³¹:

- **78A;a** (2-APy): LD₅₀ 2500 mg/kg, doustnie (5 klasa GHS)
- **78A;b** (3-APy): poza klasyfikacją, brak śmiertelności przy 2000 mg/kg, doustnie (5 klasa GHS)
- **78A;c** (4-APy): LD₅₀ 50 mg/kg, doustnie (2 klasa GHS) i LD₅₀ 200 mg/kg, dożylnie (3 klasa GHS).

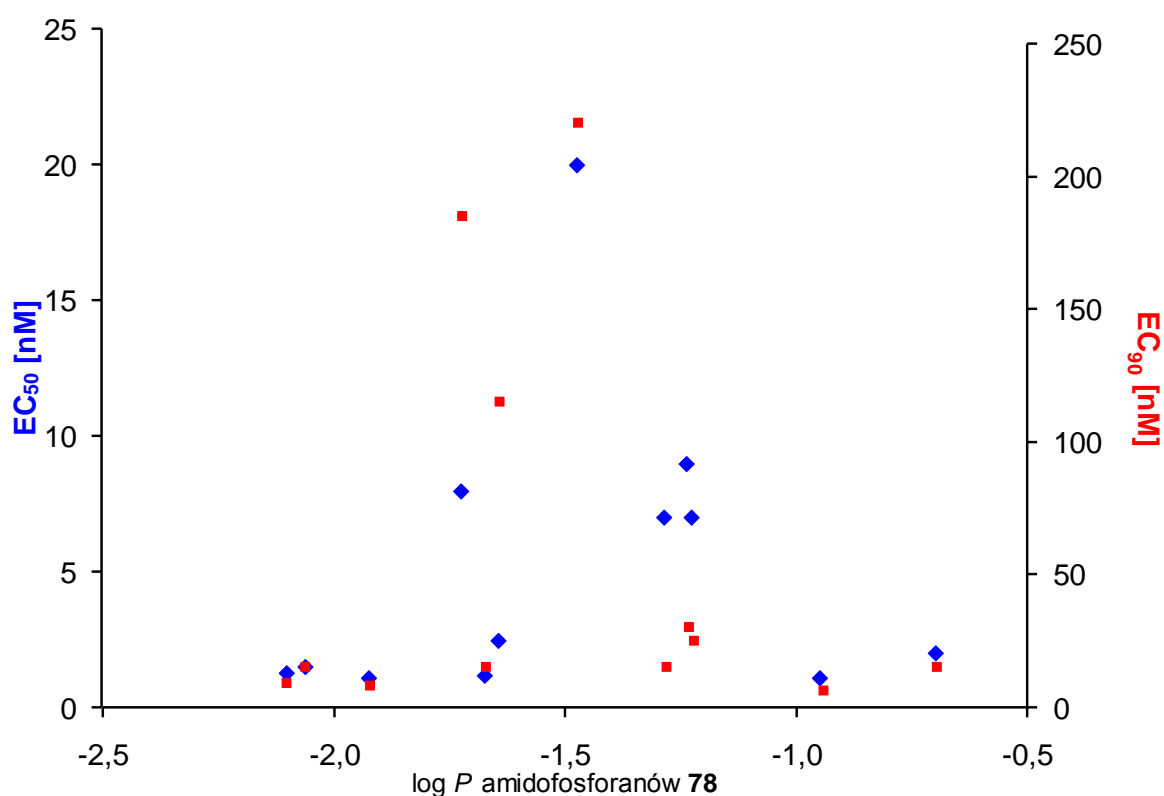
W tym samym badaniu wolny AZT wykazał LD₅₀ 2500 mg/kg (doustnie) i 500 mg/kg (dożylnie). Tak korzystne wyniki wskazują, że dalsze badania biologiczne amidofosforanów są w pełni uzasadnione.

Badaniom biologicznym poddałem także amidofosforany zawierające dideoksynukleozydy inne niż AZT. Wyniki dla tych związków zebrane są w Tabeli 8 łącznie z wcześniej uzyskanymi danymi dla pochodnych ddU zawierających reszty aminopirydyny¹¹⁴ (należy zwrócić uwagę, że ze względu na niższą aktywność, wartości EC w Tabeli 8 podane są w mikromolach/l, podczas gdy w Tabeli 7 były to stężenia nanomolowe). W tej grupie związków rezultaty były mniej korzystne niż dla pochodnych AZT. Amidofosforan 3TC (**78D;o**) był wyraźnie mniej aktywny od wolnego 3TC. Dla pochodnych d4T i ABC wyniki były korzystniejsze i obserwowana aktywność była zbliżona do wyjściowych nukleozydów.

Identyfikacja			Fizykochemia			Aktywność biologiczna					
Nr	Nu	Amina	log P	t _{1/2}	% 78 po 3 d	EC ₅₀ [μM]	CC ₅₀ [μM]	SI ₅₀	EC ₉₀ [μM]	CC ₉₀ [μM]	SI ₉₀
C	ddU	–	-0,96	–	–	>10	–	–	–	–	–
78C;e	ddU	3-AC	-2,62	1,5 d	36%	4,2	50	2,5	>10	>200	–
78C;h	ddU	6-AC	-2,35	6 d	74%	>10	>>200	–	–	>>200	–
78C;m	ddU	6-ACPy	-1,99	3,5 d	53%	>10	>>200	–	–	>>200	–
78C;o	ddU	AMT	-1,71	1,5 d	40%	>10	>>200	–	–	>>200	–
78a ¹¹⁰	ddU	2-APy	b.d.	1 d	b.d.	>10	>>30	–	–	>>30	–
78b ¹¹⁰	ddU	3-APy	b.d.	1 d	b.d.	>10	>>30	–	–	>>30	–
78c ¹¹⁰	ddU	4-APy	b.d.	1,5 d	b.d.	0,2	>>30	>>250	1,35	>>30	>>22
B	d4T	–	-0,79	–	–	0,7	170	243	3,7	360	97
78B;e	d4T	3-AC	-3,36	trwały	100%	2,5	>>200	>160	>10	>>200	–
78B;h	d4T	6-AC	-2,61	trwały	100%	>10	>>200	–	–	>>200	–
78B;m	d4T	6-ACPy	-1,99	>>7 d	88%	6,2	>>200	>65	>10	>>200	–
78B;o	d4T	AMT	-2,39	>7 d	72%	1,2	>>200	>300	9,2	>>200	>>40
E	ABC	–	1,16	–	–	6	>200	38	>10	>>200	–
78E;m	ABC	6-ACPy	-1,94	trwały	100%	8,5	>200	>23	>10	>>200	–
78E;o	ABC	AMT	-1,62	trwały	100%	>10	>200	–	–	>>200	–
D	3TC	–	-0,94	–	–	0,035	>>200	>11400	0,2	>>200	>>1000
78D;o	3TC	AMT	-2,27	trwały	100%	6,85	>200	>29	>10	>>200	–

Tabela 8. Właściwości i aktywność biologiczna (*N*-arylo)amidofosforanów dideoksynukleozydów **78B;e,h,m,o**, **78C;e,h,m,o**, **78D;o**, **78E;m,o**

Z danych zebranych w Tabeli 7 nie widać oczywistego związku pomiędzy wartościami $\log P$ a aktywnością antywirusową amidofosforanów AZT (dla pochodnych innych dideoksynukleozydów obraz jest podobny (Tabela 8), aczkolwiek liczba związków, które wykazały aktywność anti-HIV była zbyt mała do przeprowadzenia głębszej analizy). I tak, bardzo niskie wartości $EC_{50} = 1-2$ uzyskano dla najmniej hydrofilowego związku **78A;j** (AZT 1-AIC; $\log P = -0,7$) i dla najbardziej hydrofilowych **78A;n** (AZT-AT) i **78A;o** (AZT AMT), $\log P = -2,1$ w obu przypadkach. Natomiast najmniej aktywny **78A;i** (AZT 8AC) ma pośrednią wartość $\log P = -1,5$. Biorąc pod uwagę zarówno wcześniej omówione niepowodzenia podczas prób znalezienia prawidłowości pomiędzy poszczególnymi parametrami fizykochemicznymi, jak i wzrost skomplikowania układu badawczego (układy buforowe *vs* żywe organizmy), nie był to wniosek zaskakujący. Dla łatwiejszego zaobserwowania ewentualnych zależności, wyniki te przedstawiłem w formie graficznej (Wykres 4).



Wykres 4. Zależność aktywności przeciwwirusowej (punkty niebieskie – EC_{50} , czerwone – EC_{90}) amidofosforanów **78A;d-p**, **78B;e,h,m,o**, **78C;e,h,m,o**, **78D;o**, **78E;m,o** od ich lipofilowości ($\log P$)

Uzyskany obraz nie wykazał jednak żadnych prawidłowości. Niskie wartości EC obserwowane są dla całego zakresu $\log P$, a związki o praktycznie takiej samej lipofilowości

($\log P \approx 1,3$) wykazują zróżnicowaną aktywność. Z Tabel 7 i 8 nie daje się również zaobserwować zależności pomiędzy aktywnością biologiczną a trwałością związku w środowisku RPMI-FBS. Był to ponownie nieoczekiwany wynik, gdyż można było się spodziewać, że związki bardzo trwałe powinny być inertne biologicznie, a związki rozkładające się szybko nie powinny różnić się aktywnością od wolnego AZT. Także zasadowość macierzystej aminy, która teoretycznie powinna wpływać znacząco na równowagę kwasowo-zasadową amidofosforanów, nie wykazała uporządkowanego powiązania z aktywnością produktów.

Szczególnie interesujące było stwierdzenie aktywności antywirusowej pochodnej ddU (**78C;e**). Wolna dideoksyurydyna nie jest związkiem aktywnym przeciw HIV – nie jest ona substratem dla kinaz komórkowych, w związku z czym nie ulega fosforylacji do ddUMP. Warto przy tym zwrócić uwagę, że nawet odpowiednio chronione mono- i difosforany ddU (które dzięki grupom maskującym powinny wnikać do komórek, gdzie powinny być transformowane w wolne mono/difosforany ddU) okazały się słabymi substratami do tworzenia ddUTP, będącego właściwym inhibitorem odwrotnej transkrypcji¹²⁶. W tym kontekście aktywność związku **78C;e** oraz wcześniej analizowanego **78C**¹¹⁰ nabiera szczególnie dużego znaczenia. Świadczy ona bowiem, że dla niektórych z przebadanych (*N*-arylo)amidofosforanów ddU muszą istnieć komórkowe mechanizmy umożliwiające przekształcenie ich w ddUTP. Najprostsze wyjaśnienie, przekształcenie amidofosforanu ddU w ddUMP i dalej w ddUDP i ddUTP ma potwierdzenie w przedstawionej wcześniej analizie rozkładu amidofosforanów ddU wobec FBS, podczas którego produktem pośrednim procesu był ddUMP, potencjalny substrat do dalszej fosforylacji. Taki mechanizm nie jest jednak zgodny z wskazaną powyżej nieefektywną fosforylacją ddUMP. Ponadto kinetyka rozkładu dwóch aktywnych pochodnych **78C;e** i **78C** nie różni się znacząco od pozostałych, niewykazujących aktywności amidofosforanów **78C;h,m,o**, można więc oczekiwać, że we wszystkich tych przypadkach ddUMP generowany jest ze zbliżoną wydajnością. Za lepsze wyjaśnienie uzyskanych wyników uważam zasugerowaną przez P. Herdewijna możliwość wykorzystywania przez odwrotną transkryptazę amidofosforanów dideoksynukleozydów jako bezpośrednich substratów. W takim przypadku różnice w aktywności pomiędzy poszczególnymi pochodnymi mogłyby wynikać z ich różnego powinowactwa do odwrotnej transkryptazy, a co za tym idzie, zróżnicowaną efektywnością włączania jednostek dideoksynukleotydowych do łańcucha DNA. Wyniki te i wnioski z nich płynące uważam za bardzo ciekawe i warte dalszych badań metodycznych, co jednak wykracza poza zakres niniejszej rozprawy.

Podsumowując ten podrozdział, należy podkreślić, że przeprowadzone badania znacząco wzbogaciły wiedzę dotyczącą właściwości biologicznych (*N*-arylo)amidofosforanów dideoksynukleozydów. Dla przebadanej wcześniej i obecnie grupy pochodnych AZT można dostrzec zaskakująco małe zróżnicowanie w aktywności anti-HIV pomiędzy poszczególnymi związkami, pomimo dość znacznego zróżnicowania grupy amidowej, zarówno pod względem sterycznym, jak i elektronowym. Różnice te wpływają niewątpliwie na lipofilowość, kwasowość, trwałość, rozkład ładunku w pierścieniu heterocyklicznym i zawadę przestrzenną, nie zmieniają natomiast w sposób szczególnie istotny aktywności biologicznej (zbliżone parametry EC i brak cytotoksyczności). Wyniki te jednak w dalszym ciągu nie były wystarczające do udzielenia zdecydowanej odpowiedzi na pytanie o mechanizm działania badanych związków. Dla pochodnych AZT nie można wykluczyć mechanizmu pronukleozydowego (stopniowe uwalnianie AZT w komórce), na który wskazuje stwierdzony wcześniej brak aktywności przeciwwirusowej pochodnych aminopirydynowych w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej (TK⁻)¹¹⁰. Przeczą temu z kolei wyniki uzyskane dla pochodnych ddU, wśród których zidentyfikowane zostały związki hamujące namnażanie HIV, pomimo że sama dideoksyurydyna nie ulega fosforylacji enzymatycznej i nie wykazuje aktywności anti-HIV. Zaobserwowana aktywność wskazuje na mechanizm pronukleotydu lub na bezpośrednie wykorzystanie (*N*-arylo)amidofosforanów ddN jako substratów dla odwrotnej transkryptazy. Ten ostatni mechanizm może także wyjaśniać zróżnicowaną aktywność pochodnych innych dideoksynukleozydów, charakteryzujących się bardzo dużą odpornością na hydrolizę enzymatyczną. Stopień złożoności problemu zwiększa dodatkowo możliwość równoczesnego występowania wszystkich trzech wspomnianych mechanizmów, a obserwowany efekt biologiczny byłby wypadkową poszczególnych ścieżek, podlegającą fluktuacjom w zależności od właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych konkretnej pochodnej. Tak skomplikowany układ jest niezwykle trudny do precyzyjnej analizy, a dane literaturowe i uzyskane podczas wykonywania niniejszej pracy nie pozwalają jeszcze na sformułowanie jednoznacznych konkluzji.

Sytuację komplikują dodatkowo trudności napotkane podczas analizy korelacyjnej, zarówno pomiędzy różnymi parametrami fizykochemicznymi badanych amidofosforanów, jak i pomiędzy tymi parametrami a właściwościami biologicznymi.

Pomimo napotkanych problemów z interpretacją danych, nie ulega wątpliwości, że (*N*-arylo)amidofosforany AZT charakteryzują się bardzo wysoką skutecznością w hamowaniu replikacji wirusa HIV przy jednoczesnym całkowitym braku cytotoksyczności

nawet w stężeniach przekraczających 1 mM. W swojej pracy uzyskałem szereg atrakcyjnych produktów zawierających szeroki wachlarz grup heteroaromatycznych. Tak dobre wyniki *in vitro* czynią z tej grupy związków bardzo obiecujących kandydatów do dalszych badań biologicznych, mogących wyłonić nowe terapeutyki przeciwwirusowe. Zaobserwowana aktywność antywirusowa pochodnych ddU może z kolei pozwolić na wykorzystanie także tego dideoksynukleozydu (w postaci amidofosforanu) do zwalczania HIV.

2.12 Podsumowanie

Głównym celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było racjonalne zaprojektowanie, otrzymanie i zbadanie właściwości nowych (*N*-arylo)amidofosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów jako potencjalnych pronukleotydów hamujących rozwój wirusa HIV.

Koncepcja szerokich badań związków takiego typu zrodziła się po stwierdzeniu przez zespół prof. A. Kraszewskiego, że pilotowe (*N*-pirydylo)amidofosforany AZT wykazują obiecujące właściwości anty-HIV przy niskiej toksyczności i dużej odporności na degradację chemiczną i enzymatyczną (J. Romanowska *et al.*, *J. Med. Chem.* 2011). Zdolność do zwalczania wirusów oznaczała, że muszą one mieć zdolność skutecznego pokonywania lipidowej błony komórkowej, co nie było oczywiste, gdyż mają one charakter jonowy i wykazują dobrą rozpuszczalność w wodzie. Rozpoczynając pracę doktorską postawiłem hipotezę roboczą, że cechy te wynikają przede wszystkim z obecności grupy (*N*-pirydylo)amidowej, a poprzez jej modyfikacje można uzyskać produkty o jeszcze lepszych parametrach farmakologicznych. W tym celu postanowiłem wprowadzić do amidofosforanów trzy grupy analogów aminopirydyn:

- aminochinoliny, które zawierają dodatkowy skondensowany pierścień benzenowy, wskutek czego uzyskane produkty powinny charakteryzować się większą lipofilowością;
- aminocyjanopirydyny, które są znacznie mniej zasadowe od aminopirydyn, co powinno sprzyjać neutralizacji ładunku ujemnego amidofosforanów, ułatwiając penetrację błony lipidowej;
- aminotiazol, jako związki heteroaromatyczne o strukturze zdecydowanie odmiennej w stosunku do aminopirydyn, aby stwierdzić, jak głębokie modyfikacje części aryłowej amidofosforanów będą wpływać na ich właściwości.

Jako modelowy komponent dideoksynukleozydowy zastosowałem 3'-deoksy-3'-azydotymidynę (AZT). W późniejszym etapie otrzymałem też pochodne innych dideoksynukleozydów (d4T, ddU, 3TC i ABC).

Aby zrealizować ten cel zaadoptowałem dwa odmienne podejścia syntetyczne. W celu otrzymania związków zawierających reszty stosunkowo słabo zasadowych amin, wykorzystałem chemię *H*-fosfonianów, natomiast dla amin silnie zasadowych korzystniejsze było podejście z zastosowaniem fosforylacji za pomocą fosforanotriamidu tristriazolowego. Metody te doskonale uzupełniają się. Dysponując stosunkowo dużym zestawem amin o zróżnicowanej zasadowości określiłem, że graniczną wartością zasadowości, przy której należy zmienić metodę jest $pK_a = 7$ (K. Kołodziej, *Eur. J. Med. Chem.* 2015).

W trakcie badań zoptymalizowałem warunki reakcji i procedury syntetyczne oraz metody izolowania produktów, co często stanowiło duże wyzwanie. Dzięki prowadzonej dokładnej analizie przebiegu reakcji za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR udało mi się stwierdzić, że w warunkach reakcji typu „one-pot” w metodzie *H*-fosfonianowej, etap utleniania przebiega nieoczekiwanie z wytworzeniem pośrednich mieszanych pirofosforanów zawierających fragment amidofosforanowy i resztę fosforanu difenyłowego (pochodzącego z czynnika kondensującego użytego we wcześniejszym etapie syntezy). Obserwacja ta miała bezpośrednie przełożenie praktyczne, gdyż pozwoliła na zmodyfikowanie procedury syntetycznej i wyeliminowanie niepożądanych reakcji ubocznych. Warto zwrócić uwagę, że w podejściu tym uzyskuje się mieszaniny reakcyjne zawierające wspomniane pirofosforany jako czyste produkty pośrednie (analiza ^{31}P NMR). Otwierało to drogę do potencjalnych nowych metod syntetycznych, jednak podjęte badania wykazały, że reakcje te nie zachodzą z oczekiwaną wydajnością (K. Kołodziej, *Eur. J. Med. Chem.* 2015).

Inną interesującą i ważną obserwacją było stwierdzenie, że (*N*-arylo)amidofosforany uzyskane w formie soli trietyloamoniowych, podczas oczyszczania łatwo tracą swój komponent kationowy i izolowane są jako produkty niestechiometryczne lub w formie kwasowej. Ponieważ jest to bardzo istotny problem preparatywny, a jednocześnie zjawisko dotąd nigdzie nie opisane, podjąłem dokładniejsze badania tego aspektu. Stwierdziłem, że proces utraty kationu zachodzi zarówno podczas oczyszczania chromatograficznego na żelu krzemionkowym, jak i podczas odparowywania rozpuszczalników, i że dotyczy on nie tylko (*N*-arylo)amidofosforanów, ale i szeregu innych soli fosforowych zawierających jako kation proponowaną lotną aminę. Ustaliłem też, że układ rozpuszczalników toluen-metanol 1:1 (v/v), w którym (*N*-arylo)amidofosforany szczególnie dobrze rozpuszczają się, sprzyja też eliminacji komponentu kationowego. Opracowałem także procedurę uzyskiwania

amidofosforanów o składzie stechiometrycznym, która polega na liofilizacji związku z układu zawierającego niewielki nadmiar lotnej aminy stanowiące przeciwjon (K. Kołodziej, *Anal. Bioanal. Chem.* 2015).

Przeprowadzone prace syntetyczne zaowocowały otrzymaniem, zazwyczaj z dobrymi wydajnościami, jedenastu amidofosforanów AZT, czterech amidofosforanów ddU i czterech d4T, dwóch amidofosforanów ABC i jednego amidofosforanu 3TC. Ich czystość potwierdziłem za pomocą widm masowych, spektroskopii ^1H , ^{13}C i ^{31}P NMR oraz z użyciem HPLC (K. Kołodziej, *Eur. J. Med. Chem.* 2015).

Kolejnym etapem badań było określenie właściwości uzyskanych produktów. Dla wszystkich uzyskanych związków oraz dla ich potencjalnych produktów rozpadu (tj. amin i nukleozydów) wyznaczyłem współczynniki podziału woda-oktanol ($\log P$). Stwierdziłem przy tym całkowitą nieprzydatność metod obliczeniowych stosowanych w programach komputerowych do wyznaczania wartości $\log P$ dla badanych amidofosforanów. Zaobserwowałem też zaskakujący brak korelacji pomiędzy wartościami $\log P$ amin i zawierających je amidofosforanów. Wskazuje to na złożoność procesu podziału międzyfazowego badanych (*N*-arylo)amidofosforanów i wskazują na konieczność zachowania dużej ostrożności przy przewidywaniu własności fizycznych złożonych układów ambifilowych (K. Kołodziej, *Eur. J. Med. Chem.* 2015).

W badaniach trwałości amidofosforanów na hydrolizę chemiczną stwierdziłem ich niezwykle stabilność – po 30 dniach inkubacji w buforze RPMI w 37 °C nie obserwowałem żadnych produktów rozkładu. Związki te wykazują też dużą odporność na hydrolizę enzymatyczną, $t_{1/2}$ w układzie RPMI/FBS wynosiło zwykle kilka dni, a w niektórych przypadkach nie obserwowałem żadnych produktów rozkładu po 7 dniach inkubacji (K. Kołodziej, *Eur. J. Med. Chem.* 2015).

Otrzymane (*N*-arylo)amidofosforany dideoksynukleozydów zostały przekazane do Narodowego Centrum Leków w Warszawie, gdzie przeprowadzone zostały ich badania biologiczne. Wszystkie amidofosforany AZT okazały się znakomitymi inhibitorami HIV, efektywnymi w stężeniach nanomolowych; wykazywały też praktyczny brak cytotoksyczności. Najaktywniejsze okazały się pochodne zawierające reszty 1-aminoizochinoliny, aminocyjanopirydyny i aminotiazolu, dla których stwierdzono wartości $\text{EC}_{50} \leq 2 \text{ nM}$ i $\text{EC}_{90} \leq 15 \text{ nM}$, znacznie przewyższając aktywność macierzystego AZT ($\text{EC}_{50} = 10 \text{ nM}$, $\text{EC}_{90} > 500 \text{ nM}$). (*N*-Arylo)amidofosforany pozostałych dideoksynukleozydów nie dały tak dobrych rezultatów i w najlepszym wypadku ich aktywność dorównywała jedynie macierzystym nukleozydom. Podkreślić jednak należy, że także one nie były cytotoksyczne.

Warto jednak zwrócić uwagę na jeden z amidofosforanów ddU (pochodna 3-aminochinoliny), który wykazał niezbyt dużą, ale wyraźną aktywność anty-HIV. Jest to ciekawa obserwacja, gdyż wolny nukleozyd ddU nie ulega fosforylacji, wobec czego nie wykazuje aktywności biologicznej. Wynik ten można interpretować dwojako: (i) (*N*-arylo)amidofosforany dideoksynukleozydów są pronukleotydami i generują w komórce fosforany dideoksynukleozydów lub (ii) związki te są bezpośrednimi substratami odwrotnej transkryptazy. Na obecnym etapie badań trudno jest jednak wyrokować, który z tych mechanizmów zachodzi w rzeczywistości (K. Kołodziej, *Eur. J. Med. Chem.* 2015).

Reasumując, opracowałem wydajne procedury otrzymywania (*N*-arylo)amidofosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów i określiłem ich istotne właściwości fizykochemiczne. Testy biologiczne wykazały, że związki te stanowią ciekawą i obiecującą grupę kandydatów na leki hamujące wirusa HIV i warto kontynuować ich dalsze badania.

V. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Materialy i metody

Widma ^1H , ^{13}C i ^{31}P NMR zarejestrowane zostały na aparatach Varian Unity BBVT 300 MHz, Bruker Avance II 400 MHz i Avance III 500 MHz. Eksperymenty zostały wykonane w temperaturze 25°C , w probówkach o średnicy 5 mm przy stężeniach związków 0.1 mmol/ml. Dla widm ^{31}P NMR wzorcem zewnętrznym był 2% H_3PO_4 w D_2O . Wysokorozdzielcze widma masowe zarejestrowane zostały za pomocą techniki ESI (Electrospray Ionization) z dokładnością do 5 ppm w trybie analizy jonów ujemnych. Ilość wody w bezwodnych rozpuszczalnikach organicznych była monitorowana za pomocą kulometru Metrohm 684 KF (miareczkowanie Karla-Fischer). Analizy HPLC wykonywane były używając kolumn Nucleosil 100-5C18 (ziarno $5\ \mu\text{m}$, wymiary $4,6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$) na aparatach Shimadzu Prominence UFLC i Waters Breeze HPLC, przy przepływie $1,0\ \text{ml/min}$ i temperaturze kolumny 36°C . Stosowana była technika gradientowa dwóch rozpuszczalników: A – $0,01\ \text{M}$ octan trietyloamoniowy $\text{pH} = 7,4$ i B – roztwór A + acetonitryl 1:4 [v/v]. Do analizy poszczególnych amidofosforanów **78A;d-p**, **78B;e,h,m,o**, **78C;e,h,m,o**, **78D;o**, **78E;m,o** wykorzystano program 42-minutowy: 0–25 min 0→50% B, 25–30 min 50→100% B, 30–32 min 100→0% B, 32–42 min 100% A. Chromatografię cienkowarstwową (TLC) wykorzystywano do wstępnej analizy czystości otrzymanych związków, stosując szklane płyty pokryte żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄ (Merck) i następujące fazy mobilne: A – octan etylu/metanol/trietyloamina 85:10:5, B – acetonitryl/metanol/trietyloamina 85:10:5 i C – chlorek metylenu/metanol/trietyloamina 85:10:5. Związki oczyszczane były za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym 60 z ziarnami $0,063\text{--}0,2\ \text{mm}$ o porach $60\ \text{Å}$ (Aldrich). Rozpuszczalniki odparowywano na próżniowej wyparce rotacyjnej stosując łąźnię wodną o temperaturze 40°C .

Współczynnik podziału P został wyznaczony za pomocą HPLC metodą „*micro-shake*”. Oktanol i bufor trietyloamoniowy $0,01\ \text{M}$ o $\text{pH} = 7,4$ mieszane były przez 48 godzin w stosunku 1:1 (v/v) w celu nasycenia faz, a następnie zwirowane i rozdzielone. Po przygotowaniu roztworu badanego związku ($40\ \text{mmol/l}$) pobierano z niego $20\ \mu\text{l}$ i rozcieńczono $0,01\ \text{M}$ buforem do $500\ \mu\text{l}$. Następnie dodano $500\ \mu\text{l}$ oktanolu i wytrząsano przez 24 h w temperaturze $22\ ^\circ\text{C}$ z prędkością $1500\ \text{drgań/min}$ w termomikserze (Mixing Block MB-102 firmy BIOER). Po tym czasie zwirowano w celu odseparowania warstw i pobrano po $15\ \mu\text{l}$ roztworu buforu i oktanolu, które analizowano za pomocą HPLC.

Pirydyna (Aldrich) osuszana była przez destylację nad P_2O_5 i przechowywana była nad sitami molekularnymi 4Å. Chlorek metylenu cz.d.a (POCH) przechowywany był nad sitami 4Å. Wszystkie rozpuszczalniki organiczne użyte w reakcjach zawierały wodę w ilości poniżej 20 ppm. Eter dietylowy (Chempur), 1,4-dioksan (Chempur), chlorek piwaloilu (Aldrich) i chlorek trimetylosililu (Fluka) były destylowane przed użyciem. Pozostałe odczynniki (Aldrich i Fluka) były używane bez oczyszczania. Trwałość chemiczna otrzymanych nukleozydo (*N*-aryloamido)fosforanów była badana poprzez inkubację związków w pożywce do hodowli komórkowych RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) (standard *Roswell Park Memorial Instytut*). Odporność na działanie enzymów hydrolitycznych była badana w roztworze RPMI zawierającym 10% surowicę z płodów bydłych (RPMI/FBS; Sigma-Aldrich). Dideoksynukleozydy ABC, AZT, 3TC i d4T zakupiono w firmie Carbosynth. ddU zsyntezowane zostało w Zespole Chemii Nukleozydów IChB PAN. Postęp reakcji chemicznych zachodzących na centrum fosforowym monitorowano za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR. Przesunięcia chemiczne ^{31}P NMR i stałe sprzężeń produktów pośrednich i końcowych zostały umieszczone w Tabeli 9 na stronie (130).

Widma NMR i MS wszystkich opisanych związków są dostępne w *Supplementary material* prac opublikowanych w trakcie wykonywania niniejszej pracy doktorskiej (zawartej na dołączonej płycie CD).

Ogólna procedura otrzymywania 5'-*H*-fosfonianomonoestrów typu 81

H-fosfonian AZT (**81A**) i ddU (**81C**), zostały otrzymane w sposób opisany wcześniej¹¹⁰. *H*-fosfoniany d4T (**81B**), 3TC (**81D**), ABC (**81E**) zostały otrzymane według zmodyfikowanej procedury literaturowej¹¹⁴. Nukleozyd (1 mmol), po osuszeniu przez dwukrotne odparowanie z bezwodną pirydyną, został rozpuszczony w 5 ml tego samego rozpuszczalnika. Do otrzymanego roztworu dodano *H*-fosfonian difenylowy (3 ekw. mol) i mieszano na mieszadle magnetycznym przez około 0,5 h. Reakcję zakończono dodając 1 ml wody i 1 ml trietyloaminy. Po 15 min odparowano rozpuszczalnik i lotne składniki, a pożądaný produkt reakcji oczyszczono chromatograficznie stosując gradient metanolu 0–30% w octanie etylu z 5% (v/v) dodatkiem trietyloaminy. Frakcje zawierające czysty związek połączono, odparowano rozpuszczalnik i pozostałość suszono pod wysoką próżnią (pompa olejowa) przez 12 h, otrzymując produkt w postaci piany.

2',3'-Didehydro-3'-deoksytymidyn-5'-ylo-*H*-fosfonian, sól TEAH⁺ (81B). Wydajność 72%. RP HPLC R_f 12,78 min. ¹H NMR (400 MHz) δ_H (D₂O) 1,21 (9H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 1,89 (3H, d, *J* = 1 Hz, Me-5); 3,21 (6H, k, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 4,07 (2H, m, H-5',5'"); 5,09 (1H, s, H-4'); 5,98 (1H, m, H-3'); 6,49 (1H, m, H-2'); 6,69 (1H, d, *J* = 637,4 Hz, P-H); 6,95 (1H, m, H-1'); 7,60 (1H, d, *J* = 1,2 Hz, H-6). ¹³C NMR (100 MHz) δ_c (D₂O) 7,7 (CH₂CH₃); 11 (5-Me); 46,2 (CH₂CH₃); 63,4 (d, *J*_{PC} = 4,7 Hz, C-5'); 85,4 (d, *J*_{PC} = 7,5 Hz, C-4'); 89,5 (C-1'); 110,7 (C-5); 124,9 (C-2'); 133,8 (C-3'); 137,7 (C-6); 151,7 (C-2); 166,2 (C-4). HRMS *m/z* 287,1864 [M – H][–], obliczone C₁₀H₁₂N₂O₆P[–] 287,0438.

2',3'-Dideoksy-3'-tiacytydyn-5'-ylo-*H*-fosfonian, sól TEAH⁺ (81D). Wydajność 93%. RP HPLC R_f 12,03 min. ¹H NMR (400 MHz) δ_H (D₂O) 1,30 (9H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 3,21 (6H, k, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 3,26 (1H, m, H-2'"); 3,58 (1H, dd, *J* = 12,3 Hz, H-2'); 4,18 (1H, m, H-5'"); 4,31 (1H, m, H-5'); 5,47 (1H, t, *J* = 7,2 Hz, H-4'); 6,09 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, H-5); 6,36 (1H, t, *J* = 9,9 Hz, H-1'); 6,82 (1H, d, *J* = 642,4 Hz, P-H); 8,06 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, H-6); ¹³C NMR (100 MHz) δ_c (D₂O) 7,7 (CH₂CH₃); 36,2 (C-2'); 46,2 (CH₂CH₃); 63,6 (d, *J*_{PC} = 4,2 Hz, C-5'); 83,9 (d, *J*_{PC} = 7,2 Hz, C-4'); 86,9 (C-5); 95,4 (C-1'); 141,5 (C-6); 156 (C-2); 165,2 (C-4). HRMS *m/z* 292,0085 [M – H][–], obliczone C₈H₁₁N₃O₅PS[–] 292,0162.

(1S)-4-[2-Amino-6-(cyklopropyloamino)-9*H*-puryn-9-ylo]-2-cyklopentano-1-metylo-*H*-fosfonian, sól TEAH⁺ (81E). Wydajność 47%. RP HPLC R_f 17,68 min. ¹H NMR (400 MHz) δ_H (D₂O) 0,49 (2H, m, cyklopropan); 0,76 (2H, m, cyklopropan); 1,17 (9H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 1,42 (1H, m, cyklopropan); 2,66 (2H, m, H-5 cyklopenten); 3,02 (1H, m, H-4 cyklopenten) 3,06 (6H, k, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 3,76 (2H, m, H-4 cyklopenten); 5,22 (1H, t, *J* = 6,2 Hz, H-1 cyklopenten); 5,77 (1H, m, H-2 cyklopenten); 6,10 (1H, m, H-3 cyklopenten); 6,61 (1H, d, *J* = 630,8 Hz, P-H); 7,63(1H, s, H-8). ¹³C NMR (100 MHz) δ_c (D₂O) 6,2 (C-cyklopropan); 7,6 (CH₂CH₃); 22,8 (C-cyklopenten); 33,8 (C-cyklopropan); 45,1 (d, *J*_{PC} = 7,0 Hz, C-4); 46 (CH₂CH₃); 58,6 (C-1); 65,4 (d, *J*_{PC} = 7,0 Hz, C-5); 112,6 (C-5 puryna); 128,9 (C-2); 136,4 (C-8 puryna); 137,4 (C-3); 148,9 (C-4); 155,1 (C-6); 159 (C-2). HRMS *m/z* 349,1162 [M – H][–], obliczone C₁₄H₁₈N₆O₃P[–] 349,1183.

Procedury otrzymania nukleozydo (*N*-heteroarylo)amidofosforanów typu 78

Metoda A

Arylo nukleozydo amidofosforany **78A-D** otrzymano zmodyfikowaną metodą literaturową¹¹⁰. *H*-Fosfonian nukleozydu (1 mmol) i aminę aromatyczną (1,1 ekw. mol) zmieszano i osuszono przez odparowanie z 3 x 10 ml bezwodnej pirydyny. Następnie substraty rozpuszczono w mieszaninie chlorku metylenu i pirydyny (9:1 v/v, 1 mmol/10 ml) i dodano DPCP (1,7 ekw. mol). W przypadku *H*-fosfonianu 3TC **78D;o** reakcja prowadzona była w bezwodnym *N,N*-dimetyloformamidzie (DMA) ze względu na rozpuszczalność. Powstawanie nukleozydo amido-*H*-fosfonianów monitorowano za pomocą spektroskopii ³¹P NMR. Po zakończeniu reakcji 5 min do mieszaniny dodano jod (2 ekw. mol) rozpuszczony w 1 ml pirydyny, a po 10 minutach wodę (50 ekw. mol) w 1 ml pirydyny. Nieprzereagowany jod rozłożyłono za pomocą etanotolu i powstałą mieszaninę odparowano do oleju. Surowy produkt rozpuszczono w minimalnej ilości metanolu i oczyszczono na żelu krzemionkowym stosując gradient metanolu (0–20% v/v) w octanie etylu z 5% (v/v) dodatkiem trietyloaminy. Frakcje zawierające czysty związek połączono, odparowano rozpuszczalnik. Pozostałość rozpuszczono w minimalnej ilości wody zawierającej ok. 2 ekw. mol trietyloaminy i liofilizowano. W przypadku związku **78D;o** zamiast wody użyto wody z dodatkiem MeOH. Produkt otrzymano w postaci bezpostaciowych białych ciał stałych.

3'-Azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [*N*-(chinolin-3-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78A;e**). Wydajność 78%. RP HPLC R_f 20,32 min. ¹H NMR (400 MHz) δ_H (D₂O) 1,21 (9H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 1,45 (3H, s, Me-5); 2,27 (2H, m, H-2',2''); 3,10 (6H, k, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 3,99 (1H, m, H-5'); 4,08 (1H, m, H-5''); 4,18 (2H, m, H-4', H-3'); 6,01 (1H, t, *J* = 5,6 Hz, H-1'); 6,89 (1H, m, Ar-H); 7,45 (2H, m, Ar-H); 7,56 (1H, m, Ar-H); 7,69 (1H, d, *J* = 2,6 Hz, Ar-H); 7,75 (1H, d, *J* = 8,3 Hz, Ar-H); 8,50 (1H, d, *J* = 2,6 Hz, H-6). ¹³C NMR (100 MHz) δ_c (D₂O) 7,7 (CH₂CH₃); 11,1 (5-Me); 35,3 (C-2'); 46 (CH₂CH₃); 59,2 (C-3'); 64,5 (d, *J*_{PC} = 4,7 Hz, C-5'); 81,9 (d, *J*_{PC} = 9,6 Hz, C-4'); 84 (C-1'); 110,5 (C-5); 119,2 (d, *J*_{PC} = 3,5 Hz, C-4 Q); 125,9 (C-5 Q); 126,4 (C-7 Q); 126,6 (C-6 Q); 126,8 (C-8Q); 127,8 (C-10 Q); 135,3 (C-9 Q); 135,9 (C-6); 140,9 (C-2 Q); 143,1 (d, *J*_{PC} = 10,5 Hz, C-3 Q); 151,5 (C-2); 166,2 (C-4). HRMS *m/z* 472,1258 [M – H][–], obliczone C₁₉H₁₉N₇O₆P[–] 472,1140.**

3'-Azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [*N*-(chinolin-5-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78A;g**). Wydajność 77%. RP HPLC R_f 19,26 min. ¹H NMR (400 MHz) δ_H (D₂O) 1,15 (9H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 1,51 (3H, s, Me-5); 2,18 (2H, m, H-2',2''); 3,01 (6H, k, *J* = 7,3 Hz,**

$\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 3,96 (2H, m, H-5', 5''); 4,03 (1H, m, H-4'); 4,15 (1H, m, H-3'); 5,97 (1H, t, $J = 6,6$ Hz, H-1'); 7,22 (1H, s, Ar-H); 7,31 (1H, m, Ar-H); 7,38 (1H, m, Ar-H); 7,43 (2H, m, Ar-H); 8,44 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, Ar-H); 8,63 (1H, m, H-6). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_{c} (D_2O) 7,7 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 10,8 (5-Me); 35,3 (C-2'); 46,1 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 59,8 (C-3'); 64,2 (d, $J_{\text{PC}} = 4,9$ Hz, C-5'); 82,4 (d, $J_{\text{PC}} = 9$ Hz, C-4'); 84,6 (C-1'); 110,4 (C-5); 113,6 (d, $J_{\text{PC}} = 2$ Hz, C-6 Q); 119,7 (C-9 Q); 119,9 (C-8 Q); 120 (C-3 Q); 129,5 (C-4 Q); 130,8 (C-7); 136,6 (C-6); 137,2 (C-5 Q); 146,7 (C-8 Q); 149,3 (C-2 Q); 150,9 (C-2); 165,6 (C-4). HRMS m/z 472,1172 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6\text{P}^+$ 472,1140.

3'-Azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [N-(chinolin-6-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78A;h). Wydajność 73%. RP HPLC R_f 19,14 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_{H} (D_2O) 1,14 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 1,51 (3H, s, Me-5); 2,18 (2H, m, H-2',2''); 3,01 (6H, k, $J = 7,3$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 3,94 (2H, m, H-5', 5''); 4,06 (1H, m, H-4'); 4,13 (1H, m, H-3'); 5,98 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, H-1'); 7,07 (1H, m, Ar-H); 7,23 (1H, dd, $J = 4,4; 8,4$ Hz, Ar-H); 7,26 (1H, d, $J = 2,3$ Hz, Ar-H); 7,4 (1H, dd, $J = 2,4; 9,1$ Hz, Ar-H); 7,7 (1H, d, $J = 9,1$ Hz, Ar-H); 7,87 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, Ar-H) 8,43 (1H, m, H-6). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_{c} (D_2O) 7,7 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 10,9 (5-Me); 35,2 (C-2'); 46,2 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 53,4 (C-3'); 64 (d, $J_{\text{PC}} = 5$ Hz, C-5'); 82,3 (d, $J_{\text{PC}} = 9,9$ Hz, C-4'); 84,6 (C-1'); 110,3 (C-5); 110,5 (C-5 Q); 121,2 (C-3 Q); 123,7 (C-8 Q); 126,4 (C-10 Q); 128 (C-7 Q); 128,6 (C-4 Q); 136,5 (C-9 Q); 136,7 (C-6); 140,3 (C-2 Q); 145,7 (C-6 Q); 150,5 (C-2); 164,9 (C-4). HRMS m/z 472,1131 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6\text{P}^+$ 472,1140.

3'-Azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [N-(chinolin-8-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78A;i). Wydajność 69%. RP HPLC R_f 22,35 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_{H} (D_2O) 1,28 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 1,46 (3H, s, Me-5); 2,37 (2H, m, H-2',2''); 3,20 (6H, k, $J = 7,3$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 4,06 (1H, m, H-5'); 4,16 (2H, m, H-5', H-4'); 4,31 (1H, m, H-3'); 6,03 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, H-1'); 7,24 (1H, s, Ar-H); 7,37 (1H, m, Ar-H); 7,41 (2H, m, Ar-H); 7,53 (1H, dd, $J = 4,3; 8,2$ Hz, Ar-H); 8,26 (1H, m, Ar-H); 8,76 (1H, m, H-6). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_{c} (D_2O) 7,7 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 10,7 (5-Me); 35,2 (C-2'); 46,2 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 59,7 (C-3'); 64,5 (d, $J_{\text{PC}} = 5$ Hz, C-5'); 82,5 (d, $J_{\text{PC}} = 8,9$ Hz, C-4'); 84,6 (C-1'); 110,3 (C-5); 112,9 (C-7 Q); 118,5 (C-5 Q); 121,5 (C-3 Q); 126,5 (C-6Q); 128 (C-10 Q); 136,7 (C-6); 136,8 (C-4 Q); 136,9 (C-9 Q); 150,7 (C-2); 165,2 (C-4). HRMS m/z 472,1138 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6\text{P}^+$ 472,1140.

3'-Azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [N-(izochinolin-5-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78A;k). Wydajność 69%. RP HPLC R_f 20,07 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_{H} (D_2O) 1,26 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 1,45 (3H, s, Me-5); 2,34 (2H, m, H-2',2''); 3,17 (6H, k, $J =$

7,3 Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 4,03 (1H, m, H-5'); 4,12 (2H, m, H-5'', H-4'); 4,27 (1H, m, H-3'); 6,00 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, H-1'); 7,23 (1H, s, Ar-H); 7,44 (2H, m, Ar-H); 7,73 (1H, m, Ar-H); 7,92 (1H, d, $J = 6,2$ Hz, Ar-H); 8,35 (1H, d, $J = 6,2$ Hz, Ar-H); 9,04 (1H, s, H-6). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_{c} (D_2O) 7,7 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 10,7 (5-Me); 35,1 (C-2'); 46,1 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 59,8 (C-3'); 64,4 (d, $J_{\text{PC}} = 4,7$ Hz, C-5'); 82,4 (d, $J_{\text{PC}} = 9$ Hz, C-4'); 84,6 (C-1'); 110,4 (C-5); 114,7 (C-6 Q); 117,4 (C-8 Q); 120 (C-4 Q); 127,3 (C-9 Q); 128 (C-10 Q); 128,3 (C-7 Q); 136 (C-3 Q); 136,6 (C-6); 139,7 (C-5 Q); 150,6 (C-1 Q); 151,3 (C-2); 165,1 (C-4). HRMS m/z 472,1040 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6\text{P}^-$ 472,1140.

3'-Azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [N-(5-cyjanopirydyn-2-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78A;l). Wydajność 74%. RP HPLC R_f 18,84 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_{H} (D_2O) 1,29 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 1,85 (3H, d, $J = 1$ Hz, Me-5); 2,51 (2H, m, H-2',2''); 3,21 (6H, k, $J = 7,3$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 4,07 (1H, m, H-5'); 4,12 (1H, m, H-5''); 4,18 (1H, m, H-4'); 4,40 (1H, m, H-3'); 6,13 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, H-1'); 7,06 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-5 Py); 7,50 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-6); 7,85 (1H, dd, $J = 2,3; 8,9$ Hz, H-4 Py); 8,41 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-2 Py). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_{c} (D_2O) 7,7 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 11,1 (5-Me); 35,4 (C-2'); 46,2 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 59,6 (C-3'); 64,4 (d, $J_{\text{PC}} = 5$ Hz, C-5'); 82,3 (d, $J_{\text{PC}} = 9,3$ Hz, C-4'); 84,8 (C-1'); 99,2 (C-5 Py); 110,7 (C-2 Py); 117,8 (C-5); 128 (C-CN); 137,2 (C-6); 140,4 (C-4 Py); 150,9 (C-2); 151,7 (C-6 Py); 157,1 (d, $J_{\text{PC}} = 5$ Hz, C-2 Py); 165,7 (C-4). HRMS m/z 447,0983 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_6\text{P}^-$ 447,0935.

3'-Azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [N-(6-cyjanopirydyn-3-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78A;m). Wydajność 76%. RP HPLC R_f 18,59 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_{H} (D_2O) 1,30 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 1,84 (3H, s, Me-5); 2,51 (2H, m, H-2',2''); 3,22 (6H, k, $J = 7,3$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 4,03 (1H, m, H-5'); 4,14 (2H, m, H-5'', H-4'); 4,36 (1H, m, H-3'); 6,12 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, H-1'); 7,39 (1H, s, H-6); 7,48 (1H, dd, $J = 2,6; 8,6$ Hz, H-4 Py); 7,67 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, H-5 Py); 8,27 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-2 Py). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_{c} (D_2O) 7,7 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 11,8 (5-Me); 35,8 (C-2'); 46,6 ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$); 59,5 (C-3'); 64,8 (d, $J_{\text{PC}} = 4,8$ Hz, C-5'); 82,4 (d, $J_{\text{PC}} = 9,3$ Hz, C-4'); 85,3 (C-1'); 111,2 (C-5); 117,8 (C- $\underline{\text{CN}}$ Py); 121,3 (C-6 Py); 123,4 (d, $J_{\text{PC}} = 5,6$ Hz, C-4); 129,7 (C-5 Py); 137,3 (C-6); 139,9 (d, $J_{\text{PC}} = 8,6$ Hz, C-2); 143,1 (C-3 Py); 152,9 (C-2); 168,2 (C-4). HRMS m/z 447,0845 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_8\text{O}_6\text{P}^-$ 447,0935.

3'-Azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [N-(tiazol-2-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78A;n). Wydajność 72%. RP HPLC R_f 17,46 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_{H} (D_2O) 1,28 (9H, t,

$J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 1,88 (3H, d, $J = 0,8$ Hz, Me-5); 2,49 (2H, m, H-2',2''); 3,20 (6H, k, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 4,06 (1H, m, H-5'); 4,13 (2H, m, H-5'', H-4'); 4,40 (1H, k, $J = 4,8$ Hz, H-3'); 6,18 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, H-1'); 6,84 (1H, d, $J = 3,8$ Hz, H-4 T); 7,16 (1H, d, $J = 3,8$ Hz, H-5 T); 7,63 (1H, d, $J = 1,1$ Hz, H-6). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_c (D_2O) 8,2 (CH_2CH_3); 11,7 (5-Me); 36,1 (C-2'); 46,6 (CH_2CH_3); 60,3 (C-3'); 64,5 (d, $J_{\text{PC}} = 4,8$ Hz, C-5'); 82,9 (d, $J_{\text{PC}} = 9,1$ Hz, C-4'); 84,9 (C-1'); 111,2 (C-5); 125,4 (C-4 T); 133,5 (C-6); 137,3 (C-5 T); 151,3 (C-2); 163,9 (d, $J_{\text{PC}} = 4,8$ Hz, C-2 T); 166,1 (C-4). HRMS m/z 428,0424 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_7\text{O}_6\text{PS}^-$ 428,0547.

3'-Azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [N-(4-metylotiazol-2-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78A;o). Wydajność 75%. RP HPLC R_f 18,96 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_H (D_2O) 1,27 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 1,86 (3H, s, Me-5); 2,23 (3H, s, Me-5 T); 2,47 (2H, m, H-2',2''); 3,18 (6H, k, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 4,04 (1H, m, H-5'); 4,11 (2H, m, H-5'', H-4'); 4,40 (1H, m, H-3'); 6,14 (1H, t, $J = 6,6$ Hz, H-1'); 6,77 (1H, d, $J = 1,1$ Hz, H-4 T); 7,60 (1H, d, $J = 1,1$ Hz, H-6). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_c (D_2O) 8,2 (CH_2CH_3); 10,8 (5-Me); 11,7 (5-Me T); 36,2 (C-2') 46,6 (CH_2CH_3); 60,4 (C-3'); 64,5 (d, $J_{\text{PC}} = 4,9$ Hz, H-5'); 82,8 (d, $J_{\text{PC}} = 9,1$ Hz, H-4'); 85 (C-1'); 111,2 (C-5); 111,4 (C-4 T); 136,9 (H-6); 137,3 (C-5 T); 151,4 (C-2); 165,6 (d, $J_{\text{PC}} = 5,1$ Hz, C-2 T); 166,3 (C-4). HRMS m/z 442,0618 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_7\text{O}_6\text{PS}^-$ 442,0704.

3'-Azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [N-(benzo[d]tiazol-2-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78A;p). Wydajność 69%. RP HPLC R_f 21,78 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_H (D_2O) 1,27 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 1,75 (3H, s, Me-5); 2,40 (2H, m, H-2',2''); 3,17 (6H, k, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 4,07 (2H, m, H-5', 5''); 4,17 (1H, m, H-4'); 4,36 (1H, m, H-3'); 6,02 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, H-1'); 7,17 (1H, t, $J = 7,6$ Hz, H-5 BT); 7,32 (1H, t, $J = 7,7$ Hz, H-6 BT); 7,38 (1H, s, C-6); 7,49 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-4 BT); 7,64 (1H, d, $J = 7,9$ Hz, H-7 BT). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_c (D_2O) 7,7 (CH_2CH_3); 11,1 (5-Me); 35,5 (C-2'); 46,2 (CH_2CH_3); 59,3 (C-3); 64,4 (d, $J_{\text{PC}} = 4,9$ Hz, C-5'); 82,1 (d, $J_{\text{PC}} = 8,4$ Hz, C-4'); 84,4 (C-1'); 110,6 (C-5); 118,1 (C-4 BT); 120,7 (C-7 BT); 122,7 (C-6 BT); 125,8 (C-5 BT); 130,3 (C-8 BT) 136,7 (C-6); 148,5 (C-2); 150,7 (C-9 BT); 164,7 (C-2 BT) 165,4 (C-4). HRMS m/z 478,0542 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_7\text{O}_6\text{PS}^-$ 478,0704.

2',3'-Didehydro-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [N-(chinolin-3-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78B;e). Wydajność 67%. RP HPLC R_f 16,46 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_H (D_2O) 1,25 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 1,39 (3H, s, Me-5); 3,16 (6H, t, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 3,77

(1H, m, H-5'); 4,19 (1H, d, $J = 11,1$ Hz, H-5''); 5,16 (1H, d, $J = 7,7$ Hz, H-4'); 5,71 (1H, d, $J = 5,8$ Hz, H-3'); 6,37 (1H, d, $J = 6,1$ Hz, H-2'); 6,77 (2H, m, H-1', H-Q); 7,55 (2H, m, Q-H); 7,66 (1H, m, Q-H); 7,68 (1H, m, H-Q); 7,79 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H-Q); 8,46 (1H, d, $J = 2,6$ Hz, H-6). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_c (D_2O) 7,7 (CH_2CH_3); 10,5 (Me-5); 46,1 (CH_2CH_3); 66,2 (d, $J_{\text{PC}} = 5,0$ Hz, C-5'); 85 (d, $J_{\text{PC}} = 11,1$ Hz, C-4'); 89,3 (C-1'); 110 (C-5); 119 (d, $J_{\text{PC}} = 3,3$ Hz, C-2 Q); 125,2 (C-2'); 126 (C-Q); 126,2 (C-Q); 126,9 (C-Q); 127 (C-Q); 127,7 (C-Q); 132,6 (C-3'); 135,2 (C-Q); 136 (C-6); 140,4 (C-Q); 142,5 (d, $J_{\text{PC}} = 11,2$ Hz, C-3 Q); 150,7 (C-2); 164,3 (C-4). HRMS m/z 429,0933 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{P}^-$ 429,0969.

2',3'-Didehydro-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [N-(chinolin-6-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78B;h). Wydajność 97%. RP HPLC R_f 15,78 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_H (D_2O) 1,19 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 1,36 (3H, s, Me-5); 3,06 (6H, k, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 3,74 (1H, m, H-5'); 4,10 (1H, m, H-5''); 5,05 (1H, m, H-4'); 5,65 (1H, m, H-3'); 6,63 (1H, m, H-2'); 6,84 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, H-Q); 7,15 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-1'); 7,32 (2H, m, H-Q); 7,61 (1H, d, $J = 9,8$ Hz, H-Q); 7,98 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-Q); 8,47 (1H, m, H-6). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_c (D_2O) 7,7 (CH_2CH_3); 10,7 (Me-5); 46 (CH_2CH_3); 65,8 (d, $J_{\text{PC}} = 4,9$ Hz, C-5'); 85,1 (d, $J_{\text{PC}} = 10,8$ Hz, C-4'); 89,3 (C-1'); 109,7 (C-5); 110 (d, $J_{\text{PC}} = 4,9$ Hz, C-Q); 121,1 (C-2'); 123,2 (d, $J_{\text{PC}} = 9,4$ Hz, C-Q); 124,8 (C-Q); 126,2 (C-Q); 128,4 (C-Q); 133,1 (C-3'); 136,1 (C-Q); 136,3 (C-6); 139,8 (C-Q); 140,3 (C-Q); 145,5 (C-Q); 150,6 (C-2); 164,3 (C-4). HRMS m/z 429,0838 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{P}^-$ 429,0969.

2',3'-Didehydro-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [N-(5-cyjanopirydył-2-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78B;m). Wydajność 63%. RP HPLC R_f 15,47 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_H (D_2O) 1,28 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 1,73 (3H, d, $J = 0,8$ Hz, Me-5); 3,20 (6H, k, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 3,87 (1H, m, H-5'); 4,15 (1H, m, H-5''); 5,09 (1H, m, H-4'); 5,89 (1H, m, H-3'); 6,44 (1H, m, H-2'); 6,81 (1H, m, H-1'); 6,98 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H-3 Py); 7,30 (1H, d, $J = 1,1$ Hz, H-6 Py); 7,79 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-4 Py); 8,35 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-6). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_c (D_2O) 7,8 (CH_2CH_3); 10,9 (Me-5); 46,1 (CH_2CH_3); 65,9 (d, $J_{\text{PC}} = 5,2$ Hz, C-5'); 85 (d, $J_{\text{PC}} = 10,2$ Hz, C-4'); 89,6 (C-1); 99,2 (C-Py); 110,2 (C-5); 110,4 (C-Py); 117,7 (C-Py); 124,7 (C-2'); 133,5 (C-Py); 137,2 (C-3'); 140,1 (C-6); 151,3 (C-2); 151,6 (C-Py); 157 (d, $J_{\text{PC}} = 5,7$ Hz, C-2 Py); 165,3 (C-4). HRMS m/z 404,0794 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$ 404,0765.

2',3'-Dideoksyurydyn-5'-ylo [N-(chinolin-3-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78C;e). Wydajność 55%. RP HPLC R_f 17,81 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_H (D_2O) 1,19 (9H, t,

$J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 1,72 (2H, m, H-3', 3''); 1,98 (1H, m, H-2'); 2,24 (1H, m, H-2''); 3,09 (6H, k, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 3,84 (1H, m, H-4'); 4,09 (1H, m, H-5'); 4,26 (1H, m, H-5''); 5,06 (1H, t, $J = 5,6$ Hz, H-5); 5,83 (1H, dd, $J = 3,3; 7,3$ Hz, H-1'); 7,07 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,42 (2H, m, H-6 Q, H-7 Q); 7,56 (1H, m, H-5 Q); 7,71 (2H, m, H-8 Q, H-4 Q); 8,50 (1H, d, $J = 2,6$ Hz, H-3 Q). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_c (D_2O) 7,7 (CH_2CH_3); 24,4 (C-3'); 30,3 (C-2'); 46,6 (CH_2CH_3); 66 (d, $J_{\text{PC}} = 5,1$ Hz, C-5'); 79,4 (d, $J_{\text{PC}} = 9,5$ Hz, C-4'); 85,2 (C-1'); 100,9 (C-5'); 119,2 (d, $J_{\text{PC}} = 4,1$ Hz, C-4 Q); 126 (C-Q); 126,2 (C-Q); 126,7 (C-Q); 126,9 (C-Q); 128 (C-Q); 135,6 (C-Q); 140,4 (C-6); 140,5 (d, $J_{\text{PC}} = 10,4$ Hz, C-2Q); 142,7 (d, $J_{\text{PC}} = 10,8$ Hz, C-3 Q); 150,2 (C-2); 164,6 (C-4). HRMS m/z 417,0958 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{P}^-$ 417,0969.

2',3'-Dideoksyurydyn-5'-ylo [N-(chinolin-6-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78C;h). Wydajność 52%. RP HPLC R_f 16,70 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_H (D_2O) 1,27 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 1,80 (1H, m, H-3'); 1,95 (1H, m, H-3''); 2,09 (1H, m, H-2'); 2,36 (1H, m, H-2'') 3,19 (6H, k, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 3,91 (1H, m, H-4'); 4,14 (1H, m, H-5'); 4,37 (1H, m, H-5''); 5,11 (1H, m, H-5); 5,96 (1H, dd, $J = 3,3; 7,4$ Hz, H-1'); 7,23 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6); 7,38 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-Q); 7,48 (2H, m, H-Q); 7,82 (1H, d, $J = 9,1$ Hz, H-Q); 8,18 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-Q); 8,57 (1H, d, $J = 3,0$ Hz, H-Q). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_c (D_2O) 7,7 (CH_2CH_3); 24,5 (C-3'); 30,1 (C-2'); 46,1 (CH_2CH_3); 66,1 (d, $J_{\text{PC}} = 5,2$ Hz, c-5'); 79,6 (d, $J_{\text{PC}} = 9,8$ Hz, H-4'); 85,6 (C-1'); 100,8 (C-5); 110,4 (d, $J_{\text{PC}} = 4,9$ Hz, C-Q); 121,1 (C-Q); 123,7 (d, $J_{\text{PC}} = 9,7$ Hz, C-Q); 126,2 (C-Q); 128,8 (C-Q); 136,7 (C-Q); 139,9 (C-Q); 140,9 (C-6); 145,4; 150,5 (C-2); 164,8 (C-4). HRMS m/z 417,0636 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6\text{P}^-$ 417,0969.

2',3'-Dideoksyurydyn-5'-ylo [N-(5-cyjanopirydyn-2-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78C;m). Wydajność 67%. RP HPLC R_f 15,78 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_H (D_2O) 1,30 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 1,92 (1H, m, H-3'); 2,12 (2H, m, H-3'', H-2'); 2,45 (1H, m, H-2''); 3,22 (6H, k, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 3,96 (1H, m, H-4'); 4,16 (1H, m, H-5'); 4,35 (1H, m, H-5''); 5,68 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-5); 6,04 (1H, dd, $J = 3,2; 7,3$ Hz, H-1'); 7,09 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-3 Py); 7,70 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-6); 7,87 (1H, dd, $J = 2,3; 8,9$ Hz, H-4); 8,43 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6 Py). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_c (D_2O) 7,7 (CH_2CH_3); 24,4 (C-3'); 30,2 (C-2'); 46,2 (CH_2CH_3); 65,9 (d, $J_{\text{PC}} = 5,2$ Hz, C-5'); 79,7 (d, $J_{\text{PC}} = 9,2$ Hz, C-4'); 85,9 (C-1'); 99,2 (C-5 Py); 101,1 (C-5); 110,5 (C-3 Py); 117,8 (C-CN); 140,6 (C-4 Py), 140,7 (C-6); 150,9 (C-6 Py); 151,8 (C-2); 157,1 (C-2 Py); 165,5 (C-4). HRMS m/z 392,0699 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_6\text{P}^-$ 392,0765.

2',3'-Dideoksyurydyn-5'-ylo [N-(4-metylotiazol-2-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78C;o). Wydajność 53%. RP HPLC R_f 15,90 min. ¹H NMR (400 MHz) δ_H (D₂O) 1,27 (9H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 1,94 (1H, m, H-3'); 2,08 (2H, m, H-3'', H-2''); 2,25 (3H, d, *J* = 1,0 Hz, Me-5 T); 2,42 (1H, m, H-2''); 3,18 (6H, k, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 3,95 (1H, m, H-4'); 4,13 (1H, m, H-5'); 4,33 (1H, m, H-5'); 5,71 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, H-5); 6,04 (1H, dd, *J* = 3,3; 7,1 Hz, H-1'); 6,80 (1H, d, *J* = 1,0 Hz, H-4 T); 7,80 (1H, d, *J* = 8,1 Hz, H-6). ¹³C NMR (100 MHz) δ_C (D₂O) 7,7 (CH₂CH₃); 10,3 (Me-5 T); 24,3 (C-3'); 30,5 (C-2'); 46,1 (CH₂CH₃); 65,5 (d, *J*_{PC} = 5,3 Hz, C-5'); 79,8 (d, *J*_{PC} = 9,1 Hz, C-4'); 85,9 (C-1'); 101,1 (C-5); 125 (C-4 T); 132 (C-5 T); 141,6 (C-6); 151 (C-2); 163,9 (d, *J*_{PC} = 4,9 Hz, C-2 T); 165,7 (C-4). HRMS *m/z* 387,0485 [M – H]⁻, obliczone C₁₃H₁₆N₄O₆PS⁻ 387,0533.

2',3'-Didehydro-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [N-(4-metylotiazol-2-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78B;o). Wydajność 61%. RP HPLC R_f 16,01 min. ¹H NMR (400 MHz) δ_H (D₂O) 1,29 (9H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 1,79 (3H, d, *J* = 0,8 Hz, Me-5); 2,25 (3H, d, *J* = 1,1 Hz, Me-5 T); 3,21 (6H, k, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 3,88 (1H, m, H-5'); 4,10 (1H, m, H-5''); 5,11 (1H, m, H-4'); 5,93 (1H, m, H-3'); 6,47 (1H, m, H-2''); 6,73 (1H, s, H-1'); 6,88 (1H, m, H-4 T); 7,39 (1H, d, *J* = 1,1 Hz, H-6). ¹³C NMR (100 MHz) δ_C (D₂O) 7,7 (CH₂CH₃); 10,3 (Me-5); 10,9 (Me-5 T); 46,2 (CH₂CH₃); 65 (d, *J*_{PC} = 4,9 Hz, C-5'); 85 (d, *J*_{PC} = 10,2 Hz, C-4'); 89,7 (C-1'); 110,3 (C-5); 124,5 (C-2'); 124,8 (C-5 T); 132 (C-4 T); 133,7 (C-3'); 137,5 (C-6); 151,7 (C-2); 163,3 (C-2 T); 165,9 (C-4). HRMS *m/z* 399,0532 [M – H]⁻, obliczone C₁₄H₁₆N₄O₆PS⁻ 399,0533.

2',3'-dideoksy-3'-tiacytydyn-5'-ylo [N-(4-metylotiazol-2-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78D;o). Wydajność 69%. RP HPLC R_f 12,03 min. ¹H NMR (400 MHz) δ_H (D₂O) 1,27 (9H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 2,22 (3H, d, *J* = 0,8 Hz, 5-Me T); 3,12 (1H, m, H-2'') 3,17 (6H, k, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 3,49 (1H, dd, *J* = 5,6; 12,2 Hz, H-2''); 4,11 (1H, m, H-5'); 4,24 (1H, m, H-5''); 5,38 (1H, k, *J* = 7,6 Hz, H-4'); 5,92 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, H-5); 6,25 (1H, t, *J* = 5,0 Hz, H-1'); 6,77 (1H, s, H-4 T); 7,84 (1H, d, *J* = 7,6 Hz, H-6). ¹³C NMR (100 MHz) δ_C (D₂O) 7,7 (CH₂CH₃); 10,4 (Me-5 T); 36,2 (C-2'); 46,1 (CH₂CH₃); 63,6 (d, *J*_{PC} = 5,1 Hz, C-5'); 83,4 (d, *J*_{PC} = 8,9 Hz, C-4'); 86,7 (C-5); 95,4 (C-1'); 125 (C-4 T); 132 (C-5 T); 141,1 (C-6); 156,3 (C-2); 163,9 (d, *J*_{PC} = 4,9 Hz, C-2 T); 165,3 (C-4). HRMS *m/z* 404,0546 [M – H]⁻, obliczone C₁₂H₁₅N₅O₅PS₂⁻ 404,0257.

(1S)-4-[2-Amino-6-(cyklopropyloamino)-9H-puryno-9-ylo]-2-cyklopentano-1-metylo [N-(5-cyjanopirydyn-2-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78E;m). Wydajność 35%. RP HPLC R_f 19,39 min. ¹H NMR (400 MHz) δ_H (D₂O) 0,69 (2H, m, H-cyklopropan); 0,99 (2H, m, H-cyklopropan); 1,27 (9H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 1,28 (1H, m, H-cyklopropan); 2,50 (1H, m, H-6 cyklopenten); 2,88 (1H, m, H-6 cyklopenten); 3,10 (1H, m H-6, cyklopenten); 3,19 (6H, k, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 3,57 (1H, m, H-5 cyklopenten); 3,97 (1H, m, H-5 cyklopenten); 5,10 (1H, m, H-1 cyklopenten); 5,88 (1H, m, H-2 cyklopenten); 6,19 (1H, m, H-3 cyklopenten); 6,71 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H-3 Py); 6,47 (1H, dd, *J* = 2,2; 8,8 Hz, H-4 Py); 7,50 (1H, m, H-6 Py); 8,12 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H-8 puryna). ¹³C NMR (100 MHz) δ_c (D₂O) 6,3 (C-cyklopropan); 7,7 (CH₂CH₃); 22,8 (C-6 cyklopenten); 33,4 (C-cyklopropan); 48,8 (d, *J*_{PC} = 4,0 Hz, C-4 cyklopenten); 46,1 (CH₂CH₃); 58,4 (C-1 cyklopenten); 67,1 (d, *J*_{PC} = 21,6 Hz, H-5 cyklopenten); 98,5 (C-5 Py); 109,9 (C-3 Py); 112,6 (C-5 puryna); 117,6 (C-CN); 128,3 (C-2 cyklopenten); 129,2 (C-8 puryna); 136,5 (C-4 puryna); 138 (C-3 cyklopenten); 139,9 (C-4 Py); 148,8 (C-4 puryna); 151,3 (C-6 Py); 154,8 (C-6 puryna); 156,6 (C-2 Py); 158,7 (C-2 puryna). HRMS *m/z* 466,1461 [M – H][–], obliczone C₂₀H₂₁N₃O₃P[–] 466,1510.

(1S)-4-[2-Amino-6-(cyklopropyloamino)-9H-puryno-9-ylo]-2-cyklopentano-1-metylo [N-(4-metylotiazol-2-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78E;o). Wydajność 51%. RP HPLC R_f 19,94 min. ¹H NMR (400 MHz) δ_H (D₂O) 0,66 (2H, m, H-cyklopropan); 0,89 (2H, m, H-cyklopropan); 1,26 (9H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 1,42 (1H, m, H-cyklopropan); 1,97 (3H, d, *J* = 1,0 Hz, Me-5 T); 2,65 (1H, m, H-6 cyklopenten); 2,81 (1H, s, H-6 cyklopenten); 3,09 (1H, s, H-4 cyklopenten); 3,18 (6H, k, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 3,66 (1H, m, H-5 cyklopenten); 3,90 (1H, m, H-5 cyklopenten); 5,17 (1H, m, H-1 cyklopenten); 5,88 (1H, m, H-2 cyklopenten); 6,17 (1H, m, H-3 cyklopenten); 6,44 (1H, s, H-4 T); 7,57 (1H, s, H-8 puryna). ¹³C NMR (100 MHz) δ_c (D₂O) 6,4 (C-cyklopropan); 7,7 (CH₂CH₃); 10,1 (Me-5 T); 22,6 (C-6 cyklopenten); 33,4 (C-cyklopropan); 45 (d, *J*_{PC} = 9,6 Hz, C-4 cyklopenten); 46,1 (CH₂CH₃); 58,7 (C-1 cyklopenten); 66,8 (d, *J*_{PC} = 5,3 Hz, H-5 cyklopenten); 122,6 (C-5 puryna); 124,5 (C-2 cyklopenten); 128,3 (C-8 puryna); 132,1 (C-3 cyklopenten); 136,6 (C-4 T); 138 (C-5 T); 148,9 (C-4 puryna); 154,8 (C-6 puryna); 158,5 (C-2 puryna); 163 (C-2 T). HRMS *m/z* 461,1461 [M – H][–], obliczone C₁₈H₂₂N₈O₃PS[–] 461,1278.

Metoda B

Arylo nukleozydo amidofosforan **78A;d** i **78A;j** otrzymano zmodyfikowaną metodą literaturową¹¹⁰.

Etap 1. Otrzymywanie fosforylo-tris-(1*H*-1,2,4-triazolu) **83**^{110, 132}

1,2,4-Triazol (62,3 mmol) osuszono przez odparowanie z 3 x 50 ml suchego acetonitrylu i umieszczenie na 24 h w wysokiej próżni (poma olejowa). Następnie związek ten rozpuszczono w 100 ml bezwodnego 1,4-dioksanu i dodano POCl₃ (20,7 mmol). Do otrzymanego roztworu mieszanego na mieszadle magnetycznym w ciągu 20 min wkroplono bez dostępu powietrza bezwodną trietyloaminę (62,3 mmol) rozpuszczoną w 35 ml 1,4-dioksanu, po czym kontynuowano mieszanie przez 30 min. Wytrącony osad chlorowodoru trietyloamoniowego szybko odsączono na lejku ze szkłem porowatym ograniczając dostęp powietrza. Uzyskany przesącz wykorzystano bezpośrednio w następnym etapie procedury.

Etap 2. Otrzymywanie di(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylo) [*N*-(heteroarylo)]amidofosforanów typu **84**

Do mieszanego na mieszadle magnetycznym roztworu fosforylo-tris-(1*H*-1,2,4-triazolu) (1 mmol/10 ml) w 1,4-dioksanie dodano kroplami aminę aromatyczną (1 mmol/1,25 ml Py) osuszoną wstępnie przez odparowanie z pirydyną. Po wytrąceniu się krystalicznego osadu di(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylo) [*N*-(heteroarylo)]amidofosforanu supernatant zdekantowało, a pozostały osad przemyto 3 x 10 ml 1,4-dioksanem i 3 x 10 ml eterem dietylowym, wysuszono na pompie próżniowej i wykorzystano bezpośrednio w następnym etapie procedury.

Etap 3. Otrzymywanie 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [*N*-(heteroarylo)]-amidofosforanów

Zawiesinę di(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylo) [*N*-(heteroarylo)]amidofosforanu **84** w pirydynie (2 mmol/25 ml) ogrzewano na łaźni olejowej do temperatury 75°C mieszając ją na mieszadle magnetycznym. AZT osuszono przez dwukrotne odparowanie z pirydyną, rozpuszczono w tym samym rozpuszczalniku (1 mmol/10 ml) i dodano do zawiesiny w kilku porcjach. Po 10 minutach dodano 10% (v/v) wody i kontynuowano mieszanie przez 30 min. Następnie mieszaninę reakcyjną zatężono do oleju i oczyszczono jak w metodzie A.

3'-Azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [*N*-(chinolin-2-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78A;d**). Wydajność 43%. RP HPLC R_f 22,40 min. ¹H NMR (400 MHz) δ_H (D₂O) 1,26 (9H, t, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 1,60 (3H, s, Me-5); 2,33 (2H, t, *J* = 6,7 Hz, H-2',2'"); 3,17 (6H, k, *J* = 7,3 Hz, CH₂CH₃); 4,03 (1H, m, H-5'); 4,09 (1H, m, H-5'"); 4,20 (1H, m, H-4'); 4,27 (1H, m, H-3'); 5,92 (1H, t, *J* = 6,5 Hz, H-1'); 7,14 (1H, s, H-6 Q); 7,21 (1H, d, *J* = 9,1 Hz, C-3 Q); 7,36 (1H, t, *J* = 7,4 Hz, H-7 Q); 7,54 (1H, t, *J* = 7,4 Hz, H-8 Q); 7,60 (1H, t, *J* = 7,7 Hz, H-5**

Q); 7,66 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-4 Q); 8,03 (1H, d, $J = 9,1$ Hz, H-6). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_{c} (D_2O) 7,7 (CH_2CH_3); 11 (Me-5); 35,3 (C-2'); 46,2 (CH_2CH_3); 59,2 (C-3'); 64,8 (d, $J_{\text{PC}} = 5,1$ Hz, C-5'); 82 (d, $J_{\text{PC}} = 8,0$ Hz, H-4'); 84,2 (C-1'); 110,6 (C-5); 112,7 (C-3 Q); 122,3 (C-10 Q); 122,8 (C-6 Q); 124,5 (C-8 Q); 127,5 (C-5 Q); 130,7 (C-7 Q); 136,4 (C-6); 139,7 (C-4 Q); 150,3 (C-9 Q); 153,1 (C-2 Q); 164,9 (C-2); 180,8 (C-4). HRMS m/z 472,1062 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6\text{P}^-$ 472,1140.

3'-Azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [N-(izochinolin-1-ylo)]amidofosforan, sól TEAH⁺ (78A;j). Wydajność 61%. RP HPLC R_f 21,94 min. ^1H NMR (400 MHz) δ_{H} (D_2O) 1,27 (9H, t, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 1,50 (3H, s, Me-5); 2,39 (2H, m, H-2',2''); 3,18 (6H, k, $J = 7,3$ Hz, CH_2CH_3); 4,10 (1H, m, H-5'); 4,14 (1H, m, H-5''); 4,24 (1H, m, H-4'); 4,33 (1H, m, H-3'); 5,94 (1H, t, $J = 6,5$ Hz, H-1'); 7,17 (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-5 Q); 7,25 (1H, s, H-7 Q); 7,41 (1H, s, H-6 Q); 7,56 (1H, m, H-5 Q); 7,70 (1H, m, H-8); 7,84 (1H, d, $J = 6,6$ Hz, H-3 Q); 8,03 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6). ^{13}C NMR (100 MHz) δ_{c} (D_2O) 7,7 (CH_2CH_3); 10,8 (Me-5); 35,5 (C-2'); 46,5 (CH_2CH_3); 60,1 (C-3'); 65 (d, $J_{\text{PC}} = 4,5$ Hz, C-5'); 82,8 (d, $J_{\text{PC}} = 7,5$ Hz, C-4'); 84,9 (C-1'); 110,8 (C-5); 113,7; 118,6; 122,5; 126,9; 130,7; 136,8 (C-6); 137; 138,6; 151,2 (C-2); 152,4; 166 (C-4). HRMS m/z 472,1144 $[\text{M} - \text{H}]^-$, obliczone $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6\text{P}^-$ 472,1140.

Ogólna procedura badania utraty kationu trietyloamoniowego podczas pomocą chromatografii

Badaną sól (100 mg) w postaci soli trietyloamoniowej rozpuszczono w 1 ml układu metanol : toluen 1:1 (v/v) i naniesiono na kolumnę z żelem krzemionkowym (50 g), po czym eluowano fazą ruchomą toluen : metanol 1:1 (v/v). Zebrane frakcje 50 ml zakwaszono 100 μl stęż. HCl, odparowano do sucha, rozpuszczono w 1 ml d_6 -DMSO i analizowano za pomocą spektroskopii ^1H NMR.

Ogólna procedura badania utraty kationu trietyloamoniowego podczas odparowywania rozpuszczalnika

Badaną sól (20 mg) rozpuszczono w 50 ml badanego rozpuszczalnika w kolbie o pojemności 100 ml i odparowano na wyparce w ciągu 30 min przy maksymalnym podciśnieniu membranowej pompy próżniowej i temperaturze łaźni 40 °C. Procedurę powtarzano zadaną liczbę razy. Suchą pozostałość po odparowaniu rozpuszczono w 1 ml D_2O i analizowano za pomocą ^1H NMR.

Tabela 9. Przesunięcia chemiczne i stałe sprzężeń ^{31}P NMR produktów pośrednich i końcowych

Związek	δ_{P} [ppm]	J_{HP} [Hz]	Związek	δ_{P} [ppm]	J_{HP} [Hz]
Produkt pośredni			Produkt		
d4T _{PH} 81B	3,05	611,0; 7,1 (dt)			
3TC _{PH} 81D	4,11	626,2; 8,5 (dt)			
ABC _{PH} 81E	3,63	610,4; 7,3 (dt)			
AZT – 3Q ^a 82A;e	7,57; 8,09	651,1; 7,6 (dt); 652,4; 7,6 (dt)	78A;e	-1,58	6,8 (q)
AZT – 5Q ^a 82A;g	9,00; 9,55	656,6; 8,2 (dq); 653,9; 9,2 (dq)	78A;g	-0,4	5,5 (q)
AZT – 6Q ^a 82A;h	7,38; 7,85	653,9; 7,9 (dq); 651,1; 8,9 (dq)	78A;h	-1,99	5,9 (q)
AZT – 8Q ^a 82A;i	7,52; 8,12	667,6; 8,9 (dq); 666,7; 9,2 (dq)	78A;i	-0,39 ^e	- ^b
AZT – 1AIC ^a 82A;j	-14,9	- ^b	78A;j	-4,20 ^e	- ^b
AZT – 5AIC ^a 82A;k	6,82; 9,28	653,5; 8,2 (dt); 651,7; 8,7 (dt)	78A;k	-1,49	6,4 (q)
AZT – 5ACPy ^a 82A;l	6,54; 6,88	667,2; 8,7 (dq); 663,6; 8,2 (dq)	78A;l	-4,49	6,4 (q)
AZT – 6ACPy ^a 82A;m	6,23; 6,98	680,9; 7,3 (dt); 676,4; 8,7 (dt)	78A;m	-3,49 ^e	5,5 (q)
AZT – ABT ^a 82A;p	9,65; 9,98	650,7; 7,7 (dt); 648,9; 7,7 (dt)	78A;p	-3,29 ^e	- ^b
AZT – AT ^a 82A;n	9,27; 9,62	652,7; 8,9 (dt); 649,9; 7,7 (dt)	78A;n	-4,07	6,2 (t)
AZT – AMT ^a 82A;o	9,73; 9,95	646,3; 7,7 (dt); 642,5; 7,7 (dt)	78A;o	-3,99	5,4 (t)
d4T – 3Q ^a 82B;e	7,12; 7,18	658,5; 6,9 (dt) ^c	78B;e	-1,85	7,3 (q)
d4T – 6Q ^a 82B;h	6,84 ^c	656,2; 7,3 (dt) ^c	78B;e	-1,71	7,7 (q)
d4T – 6ACPy ^a 82B;m	9,43 ^c	640,1; 8,2 (dt) ^c	78B;m	-3,92 ^e	- ^b
d4T – AMT ^a 82B;o	9,51; 9,55	638,3; 7,0 (dt) ^c	78B;o	-2,93	- ^b
ddU – 3Q ^a 82C;e	7,12; 7,57	660,7; - ^b (dm); 660,7; - ^b (dm)	78C;e	-1,82	7,3(q)
ddU – 6Q ^a 82C;h	6,75; 7,19	658,1; 8,2 (dt); 656,2; 7,8 (dt)	78C;h	-1,87	5,5 (q)
ddU – 6ACPy ^a 82C;j	6,14; 6,60	682,8; 8,2 (dt); 680,9; 9,1 (dt)	78C;j	-4,97	6,1 (q)
ddU – AMT ^a 87C;o	9,43 ^c	641,7; 7,7 (dt) ^c	78C;o	-3,82	4,9 (q)
3TC – 6ACPy ^a 82D;m	10,10; 10,30 ^d	628; - ^b (dm)	78D;m	-2,74 ^f	6,4 (t)

ABC – 6ACPy ^a 82E;m	9,02; 9,09 ^d	649,4; 9,8 (dq) ^c	78E;m	-2,92 ^e	3,7 (t)
ABC – AMT ^a 82E;o	5,83; 6,05	680,0; 7,3 (dq)	78E;o	-3,90	3,7 (t)

^adwa diastereoizomery;

^bnie rozdzielone;

^cnałożone

^dw Py

^ew H₂O

^fw MeOH

Pozostałe widma wykonane zostały w CH₂Cl₂

VI. LITERATURA

1. El Safadi, Y.; Vivet-Boudou, V.; Marquet, R. HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2007**, *75*, 723-737.
2. Administration, U. S. F. a. D. Antiretroviral drugs used in the treatment of HIV infection, <https://www.fda.gov/forpatients/illness/hivaids/treatment/ucm118915.htm>. 2017.
3. Arts, E. J.; Wainberg, M. A. Mechanisms of nucleoside analog antiviral activity and resistance during human immunodeficiency virus reverse transcription. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1996**, *40*, 527-540.
4. Zimmerman, T. P.; Mahony, W. B.; Prus, K. L. 3'-Azido-3'-Deoxythymidine - An Unusual Nucleoside Analog That Permeates the Membrane of Human-Erythrocytes and Lymphocytes by Nonfacilitated Diffusion. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 5748-5754.
5. Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; Stclair, M. H.; Weinhold, K.; Rideout, J. L.; Freeman, G. A.; Lehrman, S. N.; Bolognesi, D. P.; Broder, S.; Mitsuya, H.; Barry, D. W. Phosphorylation of 3'-Azido-3'-Deoxythymidine and Selective Interaction of the 5'-Triphosphate with Human-Immunodeficiency-Virus Reverse-Transcriptase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, *83*, 8333-8337.
6. 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 Invitro Biological Properties and Mouse Toxicities of 3 Thymidine Analogs Active Against Human-Immunodeficiency-Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1990**, *34*, 637-641.
7. Martin, J. L.; Brown, C. E.; Matthews, N.; Reardon, J. E. Effects of Antiviral Nucleoside Analogs on Human Dna-Polymerases and Mitochondrial-Dna Synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1994**, *38*, 2743-2749.
8. Manouilov, K. K.; Fedorov, I. I.; Boudinot, F. D.; White, C. A.; Kotra, L. P.; Schinazi, R. F.; Hong, C. I. 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. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **1995**, *6*, 230-238.
9. Ho, H. T.; Hitchcock, M. J. M. Cellular Pharmacology of 2',3'-Dideoxy-2',3'-Didehydrothymidine, A Nucleoside Analog Active Against Human Immunodeficiency Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1989**, *33*, 844-849.
10. Tortolani, D. R.; Russell, J. W.; Whiterock, V. J.; Hitchcock, M. J. M.; Ghazzouli, I.; Martin, J. C.; Mansuri, M. M.; Starrett, J. E. Prodrugs of 2',3'-Didehydro-3'-Deoxythymidine (D4T) - Synthesis, Antiviral Activity, and Rapid Pharmacokinetic Evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1994**, *83*, 339-343.

11. 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-1 Reverse Transcriptase and Human Dna-Polymerase-Gamma. *Biochemical Pharmacology* **1995**, *50*, 1043-1051.
12. Stewart, B.; Jobarteh, M. L.; Sarge-Njie, R.; Alabi, A.; de Silva, T.; Peterson, K.; Peterson, I.; Whittle, H.; Rowland-Jones, S.; Jaye, A.; Cotten, M.; Mendy, M. Emergence of HBV resistance to lamivudine (3TC) in HIV/HBV co-infected patients in The Gambia, West Africa. *BMC research notes* **2011**, *4*, 561-561.
13. Choo, H.; Chong, Y. H.; Chu, C. K. The role of 2',3'-unsaturation on the antiviral activity of anti-HIV nucleosides against 3TC-resistant mutant (M184V). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 1993-1996.
14. Diallo, K.; Gotte, M.; Wainberg, M. A. Molecular impact of the M184V mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2003**, *47*, 3377-3383.
15. Wainberg, M. A.; Brenner, B. G.; Turner, D. Changing patterns in the selection of viral mutations among patients receiving nucleoside and nucleotide drug combinations directed against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49*, 1671-1678.
16. Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. Pronucleotides: Toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Medicinal Research Reviews* **2000**, *20*, 417-451.
17. Administration, F. a. D. U.S. Food and Drug Administration Approves Gilead's Single Tablet Regimen Genvoya® (Elvitegravir, Cobicistat, Emtricitabine and Tenofovir Alafenamide) for Treatment of HIV-1 Infection, <http://www.gilead.com/news/press-releases/2015/11/us-food-and-drug-administration-approves-gileads-single-tablet-regimen-genvoya-elvitegravir-cobicistat-emtricitabine-and-tenofovir-alafenamide-for-treatment-of-hiv1-infection>. 2015.
18. Pertusati, F.; Serpi, M.; McGuigan, C. Medicinal chemistry of nucleoside phosphonate prodrugs for antiviral therapy. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **2012**, *22*, 181-203.
19. Romanowska, J.; Szymanska-Michalak, A.; Boryski, J.; Stawinski, J.; Kraszewski, A.; Loddo, R.; Sanna, G.; Collu, G.; Secci, B.; La Colla, P. Aryl nucleoside H-phosphonates. Part 16: Synthesis and anti-HIV-1 activity of di-aryl nucleoside phosphotriesters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, *17*, 3489-3498.
20. Westheimer, F. H. Why Nature Chose Phosphates. *Science* **1987**, *235*, 1173-1178.

21. Khandazhinskaya, A.; Matyugina, E.; Shirokova, E. Anti-HIV therapy with AZT prodrugs: AZT phosphonate derivatives, current state and prospects. In *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, Taylor & Francis: 2010; Vol. 6, s. 701-714.
22. McGuigan, C.; Tollerfield, S. M.; Riley, P. A. Synthesis and Biological Evaluation of Some Phosphate Triester Derivatives of the Anti-Viral Drug Araa. *Nucleic Acids Research* **1989**, *17*, 6065-6075.
23. McGuigan, C.; Nickson, C.; Petrik, J.; Karpas, A. Phosphate Derivatives of Azt Display Enhanced Selectivity of Action Against Hiv-1 by Comparison to the Parent Nucleoside. *Febs Letters* **1992**, *310*, 171-174.
24. McGuigan, C.; Kinchington, D.; Wang, M. F.; Nicholls, S. R.; Nickson, C.; Galpin, S.; Jeffries, D. J.; Oconnor, T. J. Nucleoside Analogs Previously Found to be Inactive Against Hiv May be Activated by Simple Chemical Phosphorylation. *Febs Letters* **1993**, *322*, 249-252.
25. 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. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **1990**, *1*, 355-360.
26. McGuigan, C.; Davies, M.; Pathirana, R.; Mahmood, N.; Hay, A. J. Synthesis and Anti-Hiv Activity of Some Novel Diaryl Phosphate Derivatives of Azt. *Antiviral Research* **1994**, *24*, 69-77.
27. McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Davies, M. P. H.; Balzarini, J.; Declercq, E. Diaryl Phosphate Derivatives Act As Pro-Drugs of Azt with Reduced Cytotoxicity Compared to the Parent Nucleoside. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1994**, *4*, 427-430.
28. Meier, C.; Balzarini, J. Application of the cycloSal-prodrug approach for improving the biological potential of phosphorylated biomolecules. *Antiviral Research* **2006**, *71*, 282-292.
29. Gisch, N.; Balzarini, J.; Meier, C. Enzymatically activated cycloSal-d4T-monophosphates: The third generation of cycloSal-pronucleotides. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 1658-1667.
30. Morales, E. H.; Balzarini, J.; Meier, C. Stereoselective Synthesis and Antiviral Activity of Methyl-Substituted cycloSal-Pronucleotides. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 7245-7252.
31. Meier, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Nucleotide Delivery from cycloSaligenyl-3'-azido-3'-deoxythymidine Monophosphates (cycloSal-AZTMP). *European Journal of Organic Chemistry* **1998**, 837-846.
32. Balzarini, J.; Naesens, L.; Aquaro, S.; Knispel, T.; Perno, C. F.; De Clercq, E.; Meier, C. Intracellular metabolism of CycloSaligenyl 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine monophosphate, a prodrug of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (zidovudine). *Molecular Pharmacology* **1999**, *56*, 1354-1361.

33. Lefebvre, I.; Perigaud, C.; Pompon, A.; Aubertin, A. M.; Girardet, J. L.; Kirn, 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. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, 38, 3941-3950.
34. 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 Enzyme-Labile Transient Phosphate Protecting Groups. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1993**, 3, 2521-2526.
35. Perigaud, C.; Aubertin, A. M.; Benzaria, S.; Pelicano, H.; Girardet, J. L.; Maury, G.; Gosselin, G.; Kirn, A.; Imbach, J. L. Equal Inhibition of the Replication of Human-Immunodeficiency-Virus in Human T-Cell Culture by Dda Bis(Sate)Phosphotriester and 3'-Azido-2',3'-Dideoxythymidine. *Biochemical Pharmacology* **1994**, 48, 11-14.
36. 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. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 4570-4574.
37. Shafiee, M.; Deferme, S.; Villard, A. L.; Egron, D.; Gosselin, G.; Imbach, J. L.; Lioux, T.; Pompon, A.; Varray, S.; Aubertin, A. M.; Van den Mooter, G.; Kinget, R.; Perigaud, C.; Augustijns, P. New bis(SATE) prodrug of AZT 5'-monophosphate: In vitro anti-HIV activity, stability, and potential oral absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2001**, 90, 448-463.
38. Girardet, J. L.; Perigaud, C.; Aubertin, A. M.; Gosselin, G.; Kirn, A.; Imbach, J. L. Increase of the anti-HIV activity of D4T in human T-cell culture by the use of the sate pronucleotide approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1995**, 5, 2981-2984.
39. Peyrottes, S.; Egron, D.; Lefebvre, I.; Gosselin, G.; Imbach, J. L.; Perigaud, C. SATE pronucleotide approaches: An overview. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2004**, 4, 395-408.
40. 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 Biochimica Polonica* **1996**, 43, 195-208.
41. Krise, J. P.; Stella, V. J. Prodrugs of phosphates, phosphonates, and phosphinates. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1996**, 19, 287-310.
42. 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, 42, 612-617.

43. A randomized placebo-controlled trial of adefovir dipivoxil in advanced HIV infection: the ADHOC trial. *HIV medicine* **2002**, 3, 229-238.
44. Manalakopoulos, S.; Bethanis, S.; Koutsounas, S.; Goulis, J.; Vlachogiannakos, J.; Christias, E.; Savariadis, A.; Pavlidis, C.; Triantos, C.; Christidou, A.; Papatheodoridis, G.; Karamanolis, D.; Tzourmakliotis, D. Long-term therapy with adefovir dipivoxil in hepatitis B e antigen-negative patients developing resistance to lamivudine. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **2008**, 27, 266-273.
45. De Clercq, E. Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clinical Microbiology Reviews* **2003**, 16, 569-596.
46. Chandra, P.; Rathore, A.; Sathiyarayanan, L.; Mahadik, K. Application of High-Performance Thin-Layer Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of Lamivudine and Tenofovir Disoproxil Fumarate in Pharmaceutical Dosage Form. *Journal of the Chilean Chemical Society* **2011**, 56, 702-705.
47. Benhamou, Y.; Fleury, H.; Trimoulet, P.; Pellegrin, I.; Urbinelli, R.; Katlama, C.; Rozenbaum, W.; Le Teuff, G.; Trylesinski, A.; Piketty, C. Anti-hepatitis B virus efficacy of tenofovir disoproxil fumarate in HIV-infected patients. *Hepatology* **2006**, 43, 548-555.
48. Fung, H. B.; Stone, E. A.; Piacenti, F. J. Tenofovir disoproxil fumarate: A nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clinical Therapeutics* **2002**, 24, 1515-1548.
49. Thomson, W.; Nicholls, D.; Irwin, W. J.; Al-Mushadani, J. S.; Freeman, S.; Karpas, A.; Petrik, J.; Mahmood, N.; Hay, A. J. Synthesis, bioactivation and anti-HIV activity of the bis(4-acyloxybenzyl) and mono(4-acyloxybenzyl) esters of the 5[prime or minute]-monophosphate of AZT. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1993**, 1239-1245.
50. 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* **1995**, 14, 1545-1558.
51. Mitchell, A. G.; Nicholls, D.; Irwin, W. J.; Freeman, S. Prodrugs of phosphonoformate: the effect of para-substituents on the products, kinetics and mechanism of hydrolysis of dibenzyl methoxycarbonylphosphonate. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1992**, 1145-1150.
52. Schlienger, N.; Peyrottes, S.; Aubertin, A. M.; Gosselin, G.; Imbach, J. L.; Perigaud, C. New series of mixed pronucleotides. Synthesis and anti-HIV activities of mononucleoside phenyl SATE phosphotriesters. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, 18, 1025-1026.

53. Peyrottes, S.; Schlienger, N.; Beltran, T.; Lefebvre, I.; Pompon, A.; Gosselin, G.; Aubertin, A. M.; Imbach, J. L.; Perigaud, C. Design of new mononucleotide prodrugs: Aryl (SATE) phosphotriester derivatives. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, 20, 315-321.
54. Jochum, A.; Schlienger, N.; Egron, D.; Peyrottes, S.; Perigaud, C. Biolabile constructs for pronucleotide design. *Journal of Organometallic Chemistry* **2005**, 690, 2614-2625.
55. Peyrottes, S.; Coussot, G.; Lefebvre, I.; Imbach, J. L.; Gosselin, G.; Aubertin, A. M.; Perigaud, C. S-acyl-2-thioethyl aryl phosphotriester derivatives of AZT: Synthesis, antiviral activity, and stability study. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, 46, 782-793.
56. Villard, A. L.; Coussot, G.; Lefebvre, I.; Augustijns, P.; Aubertin, A. M.; Gosselin, G.; Peyrottes, S.; Perigaud, C. Phenyl phosphotriester derivatives of AZT: Variations upon the SATE moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, 16, 7321-7329.
57. 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.
58. Cahard, D.; McGuigan, C.; Balzarini, J. Aryloxy phosphoramidate triesters as pro-tides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2004**, 4, 371-381.
59. 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. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **1990**, 1, 107-113.
60. Curley, D.; McGuigan, C.; Devine, K. G.; O'connor, T. J.; Jeffries, D. J.; Kinchington, D. Synthesis and Anti-Hiv Evaluation of Some Phosphoramidate Derivatives of Azt-Studies on the Effect of Chain Elongation on Biological-Activity. *Antiviral Research* **1990**, 14, 345-356.
61. 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. *Antiviral Research* **1991**, 15, 255-263.
62. McIntee, E. J.; Rimmel, 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. *Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, 40, 3323-3331.
63. McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Balzarini, J.; Declercq, E. Intracellular Delivery of Bioactive Azt Nucleotides by Aryl Phosphate Derivatives of Azt. *Journal of Medicinal Chemistry* **1993**, 36, 1048-1052.

64. McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Mahmood, N.; Hay, A. J. Aryl Phosphate Derivatives of Azt Inhibit Hiv Replication in Cells Where the Nucleoside Is Poorly Active. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1992**, *2*, 701-704.
65. McGuigan, C.; Cahard, D.; Sheeka, H. M.; Declercq, 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. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39*, 1748-1753.
66. 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, *225*, 363-369.
67. McGuigan, C.; Harris, S. A.; Daluge, S. M.; Gudmundsson, K. S.; Mclean, E. W.; Burnette, T. C.; Marr, H.; Hazen, R.; Condreay, L. D.; Johnson, L.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Application of phosphoramidate pronucleotide technology to abacavir leads to a significant enhancement of antiviral potency. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 3504-3515.
68. Ballatore, C.; McGuigan, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Synthesis and evaluation of novel amidate prodrugs of PMEA and PMPA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11*, 1053-1056.
69. Pertusati, F.; Hinsinger, K.; Flynn, A. S.; Powell, N.; Tristram, A.; Balzarini, J.; McGuigan, C. PMPA and PMEA prodrugs for the treatment of HIV infections and human papillomavirus (HPV) associated neoplasia and cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *78*, 259-268.
70. Chapman, H.; Kernan, M.; Prisbe, E.; Rohloff, J.; Sparacino, M.; Terhorst, T.; Yu, R. Practical synthesis, separation, and stereochemical assignment of the PMPA pro-drug GS-7340. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, *20*, 621-628.
71. Chapman, H.; Kernan, M.; Rohloff, J.; Sparacino, M.; Terhorst, T. Purification of PMPA amidate prodrugs by SMB chromatography and X-ray crystallography of the diastereomerically pure GS-7340. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, *20*, 1085-1090.
72. Ray, A. S.; Fordyce, M. W.; Hitchcock, M. J. M. Tenofovir alafenamide: A novel prodrug of tenofovir for the treatment of Human Immunodeficiency Virus. *Antiviral Research* **2016**, *125*, 63-70.
73. Margot, N. A.; Liu, Y.; Miller, M. D.; Callebaut, C. High resistance barrier to tenofovir alafenamide is driven by higher loading of tenofovir diphosphate into target cells compared to tenofovir disoproxil fumarate. *Antiviral Research* **2016**, *132*, 50-58.
74. De Clercq, E. Tenofovir alafenamide (TAF) as the successor of tenofovir disoproxil fumarate (TDF). *Biochemical Pharmacology* **2016**, *119*, 1-7.

75. McGuigan, C.; Tsang, H. W.; Sutton, P. W.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Synthesis and anti-HIV activity of some novel chain-extended phosphoramidate derivatives of d4T (stavudine): esterase hydrolysis as a rapid predictive test for antiviral potency. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* **1998**, *9*, 109-115.
76. Zemlicka, J. Lipophilic phosphoramidates as antiviral pronucleotides. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **2002**, *1587*, 276-286.
77. Chang, S. L.; Griesgraber, G. W.; Southern, P. J.; Wagner, C. R. Amino acid phosphoramidate monoesters of 3'-azido-3'-deoxythymidine: Relationship between antiviral potency and intracellular metabolism. *J. Med. Chem* **2001**, *44*, 223-231.
78. Saboulard, D.; Naesens, L.; Cahard, D.; Salgado, A.; Pathirana, R.; Velazquez, S.; McGuigan, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Characterization of the activation pathway of phosphoramidate triester prodrugs of stavudine and zidovudine. *Molecular Pharmacology* **1999**, *56*, 693-704.
79. Winter, H.; Maeda, Y.; Mitsuya, H.; Zemlicka, J. Phosphodiester amidates of allenic nucleoside analogues: Anti-HIV activity and possible mechanism of action. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39*, 3300-3306.
80. Valette, G.; Pompon, A.; Girardet, J. L.; Cappellacci, L.; Franchetti, P.; Grifantini, M.; LaColla, P.; Loi, A. G.; Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. Decomposition pathways and in vitro HIV inhibitory effects of IsoddA pronucleotides: Toward a rational approach for intracellular delivery of nucleoside 5'-monophosphates. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39*, 1981-1990.
81. Venkatachalam, T. K.; Samuel, P.; Qazi, S.; Uckun, F. M. Effect of change in nucleoside structure on the activation and antiviral activity of phosphoramidate derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 5408-5423.
82. Mesplet, N.; Saito, Y.; Morin, P.; Agrofoglio, L. A. HPLC and mass spectrometry analysis of the enzymatic hydrolysis of anti-HIV pronucleotide diastereomers. *Bioorganic Chemistry* **2003**, *31*, 237-247.
83. Mesplet, N.; Saito, Y.; Morin, P.; Agrofoglio, L. A. Liquid chromatographic separation of phosphoramidate diastereomers on a polysaccharide-type chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A* **2003**, *983*, 115-124.
84. Kraszewski, A.; Sobkowski, M.; Stawinski, J. Studies on Reactions of Nucleoside H-Phosphonates with Bifunctional Reagents .1. Reaction with Amino-Alcohols. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1993**, 1699-1704.
85. Sobkowski, M.; Wenska, M.; Kraszewski, A.; Stawinski, J. Studies on reactions of nucleoside H-phosphonates with bifunctional reagents. Part VI. Reaction with diols. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2000**, *19*, 1487-1503.

86. Wiemer, A.; Wiemer, D. Prodrugs of Phosphonates and Phosphates: Crossing the Membrane Barrier. In *Phosphorus Chemistry I*, 360 ed.; Montchamp, J. L., Ed. Springer International Publishing: 2015; s. 115-160.
87. Egron, D.; Imbach, J. L.; Gosselin, G.; Aubertin, A. M.; Perigaud, C. S-acyl-2-thioethyl phosphoramidate diester derivatives as mononucleotide prodrugs. *J. Med. Chem* **2003**, 46, 4564-4571.
88. Fries, K. M.; Joswig, C.; Borch, R. F. Synthesis and Biological Evaluation of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine Phosphoramidate Analogs. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, 38, 2672-2680.
89. Meyers, C. L. F.; Hong, L. P.; Joswig, C.; Borch, R. F. Synthesis and biological activity of novel 5-fluoro-2'-deoxyuridine phosphoramidate prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 4313-4318.
90. Meyers, C. L. F.; Borch, R. F. Activation mechanisms of nucleoside phosphoramidate prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 4319-4327.
91. Tobias, S. C.; Borch, R. F. Synthesis and biological studies of novel nucleoside phosphoramidate prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, 44, 4475-4480.
92. Wagner, C. R.; McIntee, E. J.; Chang, S. L.; Zimmerman, C. Antiviral nucleotide drug delivery via amino acid phosphoramidates. *Faseb Journal* **1997**, 11, A836-A836.
93. Chang, S. N.; 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.
94. Pradere, U.; Garnier-Amblard, E. C.; Coats, S. J.; Amblard, F.; Schinazi, R. F. Synthesis of Nucleoside Phosphate and Phosphonate Prodrugs. *Chemical Reviews* **2014**, 114, 9154-9218.
95. Iyer, V. V.; Griesgraber, G. W.; Radmer, M. R.; McIntee, E. J.; Wagner, C. R. Synthesis, in vitro anti-breast cancer activity, and intracellular decomposition of amino acid methyl ester and alkyl amide phosphoramidate monoesters of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT). *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 2266-2274.
96. Wagner, C. R.; Kim, J.; Chou, T. F. Direct measurement of antiviral nucleoside monophosphate delivery from phosphoramidate pronucleotides by stable isotope labeling and LC-ESI-MS/MS. *Antiviral Research* **2004**, 62, A27-A27.
97. Adelfinskaya, O.; Herdewijn, P. Amino acid phosphoramidate nucleotides as alternative substrates for HIV-1 reverse transcriptase. *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, 46, 4356-4358.

98. Adelfinskaya, O.; Terrazas, M.; Froeyen, M.; Marliere, P.; Nauwelaerts, K.; Herdewijn, P. Polymerase-catalyzed synthesis of DNA from phosphoramidate conjugates of deoxynucleotides and amino acids. *Nucleic Acids Research* **2007**, *35*, 5060-5072.
99. Terrazas, M.; Marliere, P.; Herdewijn, P. Enzymatically catalyzed DNA synthesis using L-Asp-dGMP, L-Asp-dCMP, and L-Asp-dTMP. *Chemistry & Biodiversity* **2008**, *5*, 31-39.
100. Hong, C. I.; Nechaev, A.; West, C. R. Nucleoside conjugates as potential antitumor agents. 2. Synthesis and biological activity of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine conjugates of prednisolone and prednisone. In *Journal of Medicinal Chemistry*, American Chemical Society: 1979; Vol. 22, s. 1428-1432.
101. Raetz, C. R.; Chu, M. Y.; Srivastava, S.; Turcotte, J. G. A phospholipid derivative of cytosine arabinoside and its conversion to phosphatidylinositol by animal tissue. *Science* **1977**, *196*, 303-305.
102. Steim, J. M.; Neto, C. C.; Sarin, P. S.; Sun, D. K.; Sehgal, R. K.; Turcotte, J. G. Lipid conjugates of antiretroviral agents. I. Azidothymidine-monophosphate-diglyceride: Anti-HIV activity, physical properties, and interaction with plasma proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1990**, *171*, 451-457.
103. Piantadosi, C.; Marasco, C. J.; Morris-Natschke, S. L.; Meyer, K. L.; Gumus, F.; Surles, J. R.; Ishaq, K. S.; Kucera, L. S.; Iyer, N. Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV-1 activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, American Chemical Society: 1991; Vol. 34, s. 1408-1414.
104. Hecker, S. J.; Erion, M. D. Prodrugs of phosphates and phosphonates. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 2328-2345.
105. Yasushi, Y.; Junji, Y.; Takafumi, W.; Tetsuya, S.; Hideki, T. Participation of the peroxisomal α -oxidation system in the chain-shortening of PCA16, a metabolite of the cytosine arabinoside prodrug, YNKO1, in rat liver. *Biochemical Pharmacology* **1990**, *39*, 1505-1512.
106. Girard, P. M.; Pegram, P. S.; Diquet, B.; Anderson, R.; Raffi, F. ž.; Tubiana, R.; Sereni, D.; Boerner, D. Phase II Placebo-Controlled Trial of Fozivudine Tidoxil for HIV Infection: Pharmacokinetics, Tolerability, and Efficacy. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **2000**, *23*.
107. Fogle, J. E.; Tompkins, W. A.; Campbell, B.; Sumner, D.; Tompkins, M. B. Fozivudine Tidoxil as Single-Agent Therapy Decreases Plasma and Cell-Associated Viremia during Acute Feline Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **2011**, *25*, 413-418.
108. Kucera, G. L.; Goff, C. L.; Iyer, N.; Morris-Natschke, S.; Ishaq, K. S.; Wyrick, S. D.; Fleming, R. A.; Kucera, L. S. Cellular metabolism in lymphocytes of a novel thioether-phospholipid-AZT conjugate with anti-HIV-1 activity. *Antiviral Research* **2001**, *50*, 129-137.

109. Gangadhara, K. L.; Lescrinier, E.; Pannecouque, C.; Herdewijn, P. Hydroxy fatty acids for the delivery of dideoxynucleosides as anti-HIV agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 817-820.
110. Romanowska, J.; Sobkowski, M.; Szymanska-Michalak, A.; Kolodziej, K.; Dabrowska, A.; Lipniacki, A.; Piasek, A.; Pietrusiewicz, Z. M.; Figlerowicz, M.; Guranowski, A.; Boryski, J.; Stawinski, J.; Kraszewski, A. Aryl H-Phosphonates 17: (N-Aryl)phosphoramidates of Pyrimidine Nucleoside Analogues and Their Synthesis, Selected Properties, and Anti-HIV Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 6482-6491.
111. Kraszewski, A.; Romanowska, J.; Sobkowski, M.; Szymanska-Michalak, A.; Stawinski, J.; Boryski, J.; Lipniacki, A.; Piasek, A. Nucleotide analogue, method of synthesis of nucleotide analogue, use of nucleotide analogue, antiviral pro-nucleotide, pharmaceutical composition. US9206209 B2 Patents: 2013.
112. Stawinski, J.; Kraszewski, A. How to get the most out of two phosphorus chemistries. studies on H-phosphonates. *Accounts of Chemical Research* **2002**, *35*, 952-960.
113. A.Kraszewski; J.Stawinski. Aryl nucleoside H-phosphonates. Versatile intermediates in the synthesis of nucleotides and their analogues. *Trends in Org. Chem* **2003**, *10*, 1-19.
114. Jankowska, J.; Sobkowski, M.; Stawinski, J.; Kraszewski, A. Studies on aryl H-phosphonates. 1. An efficient method for the preparation of deoxyribo- and ribonucleoside 3'-H-phosphonate monoesters by transesterification of diphenyl H-phosphonate. *Tetrahedron Lett* **1994**, *35*, 3355-3358.
115. Wada, T.; Sato, Y.; Honda, F.; Kawahara, S.; Sekine, M. Chemical Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides Using N-Unprotected H-Phosphonate Monomers and Carbonium and Phosphonium Condensing Reagents: O-Selective Phosphonylation and Condensation *Journal of American Chemical Society* **1997**, *119*, 12710-12721.
116. Yang, Z. W.; Xu, Z. S.; Shen, N. Z.; Fang, Z. Q. A Convenient and Efficient Method for the Synthesis of Nucleoside H-Phosphonates Using A Novel Phosphonylating Agent. *Nucleosides & Nucleotides* **1995**, *14*, 167-173.
117. Romanowska, J.; Szymanska-Michalak, A.; Pietkiewicz, M.; Sobkowski, M.; Boryski, J.; Stawinski, J.; Kraszewski, A. A New, Efficient Entry to Non-Lipophilic H-Phosphonate Monoesters - Preparation of Anti-HIV Nucleotide Analogues. *Letters in Organic Chemistry* **2009**, *6*, 496-499.
118. Sobkowska, A.; Sobkowski, M.; Cieslak, J.; Kraszewski, A.; Kers, I.; Stawinski, J. Aryl H-Phosphonates. 6. Synthetic Studies on the Preparation of Nucleoside N-Alkyl-H-phosphoramidates. *J. Org. Chem* **1997**, *62*, 4791-4794.

119. Kolodziej, K.; Romanowska, J.; Stawinski, J.; Kraszewski, A.; Sobkowski, M. The case of triethylammonium cation loss during purification of certain nucleotide analogues: a cautionary note. *Anal. Bioanal. Chem* **2015**, 407, 1775-1780.
120. Kluger, R.; Wasserstein, P.; Nakaoka, K. Factors controlling association of magnesium ion and acyl phosphates. In *Journal of the American Chemical Society*, American Chemical Society: 1975; Vol. 97, s. 4298-4303.
121. Gilard, V.; Martino, R.; Malet-Martino, M.; Niemeyer, U.; Pohl, J. Chemical stability and fate of the cytostatic drug ifosfamide and its N-dechloroethylated metabolites in acidic aqueous solutions. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, 42, 2542-2560.
122. Perrin, D. D. *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution*. Butterworth: London, 1965.
123. Perrin, D. D. Dissociation constants of inorganic acids and bases in aqueous solution. *Pure & Applied Chemistry* **1969**, 20, 133-236.
124. Lebedeva, I. V.; Ivanovskaya, M. G.; Fedorov, A. N.; Limborskaya, S. A.; Shabarova, Z. K. New method of nonradioactive labeling of oligonucleotides and their use as allele-specific probes for mutations causing beta- thalassemia. *Mol. Biol. - Engl. Tr* **1994**, 28, 521-526.
125. Avdeev, A. *Assessment of Distribution-pH Profdes, [w:] Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*. Wiley, 2008; p 109–139.
126. Kolodziej, K.; Romanowska, J.; Stawinski, J.; Boryski, J.; Dabrowska, 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. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 100, 77-88.
127. Siddiqui, M. A.; Driscoll, J. S.; Marquez, V. E.; Roth, J. S.; Shirasaka, T.; Mitsuya, H.; Barchi, J. J.; Kelley, J. A. Chemistry and anti-HIV properties of 2'-fluoro-2',3'-dideoxyarabinofuranosylpyrimidines. *Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, 35, 2195-2201.
128. Siddiqui, A. Q.; McGuigan, C.; Ballatore, C.; Zuccotto, F.; Gilbert, I. H.; De Clercq, E.; Balzarini, J. Design and Synthesis of Lipophilic Phosphoramidate d4T-MP Prodrugs Expressing High Potency Against HIV in Cell Culture: Structural Determinants for in Vitro Activity and QSAR. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, 42, 4122-4128.
129. Uckun, F. M.; Pendergrass, S.; Qazi, S.; Samuel, P.; Venkatachalam, T. K. Phenyl phosphoramidate derivatives of stavudine as anti-HIV agents with potent and selective in-vitro antiviral activity against Adenovirus. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, 39, 225-234.

130. Janneh, O.; Khoo, S. Interactions of Tenofovir, Lamivudine, Abacavir and Didanosine in Primary Human Cells. *Pharmaceutics* **2011**, *3*, 326-337.
131. J. Romanowska, M. S., A. Szymanska-Michalak, K. Kolodziej, J. Boryski, J. Stawinski, A. Kraszewski. Badania na zwierzętach przeprowadzono w Zakładzie Badań Toksykologicznych w Instytucie Przemysłu Organicznego, Oddział w Pszczynie. Wyniki niepublikowane, 2014.
132. Kraszewski, A.; Stawinski, J. Phosphoryl tris-triazole - a new phosphorylating reagent. *Tetrahedron Lett* **1980**, *21*, 2935-2936.