

Maurycy K. Szlenkier

Funkcjonalizacja układu *cis*-diolowego
rybonukleozydów z wykorzystaniem struktur
anhydrocyklicznych

*Functionalization of a cis-diol system of ribonucleosides
using anhydrocyclic structures*

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

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

Poznań 2017

Promotorowi pracy

Panu Profesorowi dr hab. Jerzemu Boryskiemu,

dziękuję za wprowadzenie w bardzo ciekawą chemię, okazaną pomoc, cenne rady,
cierpliwość i życzliwość.

Rodzicom,

dziękuję za ciągły doping oraz wsparcie.

Dr Karolowi Kamelowi,

dziękuję za pomoc w poznawaniu możliwości metod modelowania molekularnego.

OBJAŚNIENIA STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

| | | | |
|------------------------|--|------------------------|--|
| 3-TC | lamiwudyna | ddA | dideoksyadenozyna |
| aa | aminokwas | ddC | dideoksyocytydina |
| ACN | acetonitryl | ddG | dideoksyguanozyna |
| ACV | acyklowir | ddI | didanozyna |
| AD4 | AutoDock 4 | DHBV | kaczy wirus zapalenia wątroby typu B |
| AD Vina | AutoDock Vina | DHPA | dihydroksypropyloadenina |
| AIBN | α, α' -aza-bis-izobutyrylonitryl | DMAP | 4-dimetyloaminopirydina |
| AICAR | rybozyd 5-aminoimidazo-4-karboksyamidu | DMF | dimetyloformamid |
| AIDS | zespół nabytego niedoboru odporności | DMSO | dimetylosulfotlenek |
| AMBER | jedno z pól siłowych w mechanice molekularnej | dTK | kinaza 2'-deoksytymidynowa |
| ASO | antysensowy oligonukleotyd | EBV | wirus Epsteina-Barra |
| AZT | 3'-azydo-3'-deoksytymidyna, zydowudyna | EICAR | 5-etynylo-1- β -D-rybofuranozyl-imidazolo-4-karboksyamid |
| AZT-TP | trifosforan AZT | EC₅₀ | stężenie efektywne |
| BVDU | E-5-(2-bromowinylo)-2'-deoksyurydina | ETCAR | 5-etynylo-1- β -D-rybofuranozyl-1H-[1,2,3]-triazolo-karboksyamid |
| CC₅₀ | stężenie cytotoksyczne | FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| CDG | karbocykliczna 2'-deoksyguanozyna | FTC | emtrycytabina |
| cdNA | komplementarna nić DNA | GCV | gancyklowir |
| CMV | cytomegalowirus | HCV | wirus zapalenia wątroby typu C |
| COSY | spektroskopia korelacyjna (^1H - ^1H) | HCMV | ludzki cytomegalowirus |
| CuAAC | 1,3-dipolarna cykloaddycja azydek-alkin katalizowana miedzią | HIV-RT | odwrotna transkryptaza wirusa HIV |
| DABCO | 1,4-diazabicyklo[2.2.2]-oktan | HMBC | heterojądrowa spektroskopia korelacyjna przez wiele wiązań (^1H - ^{13}C) |
| DBU | 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en | HMPA | heksametylofosforamid |
| DCM | dichlorometan | HPLC | wysokosprawna chromatografia cieczowa |
| DEAD | azodikarboksylan dietylu | HSQC | spektroskopia pojedynczej heterojądrowej koherencji kwantowej (^1H - ^{13}C) |
| DFT | teoria funkcjonału gęstości | HSV-1 | <i>Herpes simplex virus</i> typu pierwszego |
| DIAD | azodikarboksylan diizopropylu | | |
| DEHP | H-fosfonian dietylu | | |

| | | | |
|------------------------|---|----------------|--|
| HSV-2 | <i>Herpes simplex virus</i> typu drugiego | RSV | <i>Respiratory syncytial virus</i> |
| HSV-dTK | wirusowa kinaza 2'-deoksytymidynowa wirusa HSV | RT | odwrotna transkryptaza |
| HSV TK | mutant wirusa HSV nieposiadający własnej kinazy tymidynowej | SAH | S-adenozylhomocysteina |
| IC₅₀ | stężenie inhibitorowe | SAR | <i>structure activity relationship</i> |
| IDU | 5-jodo-2'-deoksyurydyna | SI | indeks selektywności |
| IMPDH | dehydrogenaza inozynomono-fosforanu | THF | tetrahydrofuran |
| LHMDS | bis(trimetylosililo)amidek litu | TBDMSCI | chlerek t-butyldimetylosililu |
| LADME | farmakokinetyczny system opisu losu leku w ustroju | TLC | chromatografia cienkowarstwowa |
| MRC-5 | linia komórek wyprowadzona z embrionalnych fibroblastów tkanki płucnej | TMSA | trimetylosililoacetylen |
| MS | spektrometria mas | TPSCI | chlerek 2,4,6-triizopropylbenzenosulfonowy |
| NDP | difosforan nukleozydowy | TS | stan przejściowy (<i>transition state</i>) |
| NMP | monfosforan nukleozydowy | TsCl | chlerek tosyłu |
| NMR | spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego | UCK | kinaza urydynowo-cytydynowa |
| NOESY | spektroskopia jądrowego efektu Overhausera (¹ H- ¹ H) | VSV | <i>Vesicular stomatitis virus</i> - wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej |
| NRTI | nukleozydowy inhibitor odwrotnej transkryptazy | VZV | <i>Varicella zoster virus</i> – wirus ospy wietrznej |
| PM7 | jedna z półempirycznych metod chemii kwantowej | VV | <i>Vaccina virus</i> – wirus krowianki |
| Pol γ | polimeraza gamma obecna w mitochondrium | ww | wiązanie wodorowe |
| pTK | <i>p</i> -tiokrezol | | |
| Py | pirydyna | | |
| PPI | ftalimidek potasu | | |
| RBV | rybawiryna | | |
| RdRp | polimeraza RNA zależna od RNA | | |
| RMSD | odchylenie średniej kwadratowej określające podobieństwo struktur (<i>root-mean-square deviation</i>) | | |
| RNaza H | endonukleaza odpowiedzialna za cięcie RNA | | |

Spis treści

| | |
|---|-----|
| Wprowadzenie..... | 1 |
| 1. Aktywność biologiczna nukleozydów modyfikowanych w pozycjach 2' oraz 3' | 5 |
| 1.1. Aktywność biologiczna modyfikowanych nukleozydów – przegląd..... | 5 |
| 1.1.1. Analogi nukleozydowe posiadające modyfikacje w części zasadowej..... | 7 |
| 1.1.2. Nukleozydy posiadające inne zasady heterocykliczne..... | 9 |
| 1.1.3. Analogi nukleozydowe posiadające modyfikacje w części cukrowej..... | 12 |
| 1.2. Aktywność biologiczna nukleozydów dimodyfikowanych w pozycjach 2' i 3'..... | 20 |
| 2. Funkcjonalizacja układu <i>cis</i> -diolowego rybonukleozydów | 33 |
| 2.1. Wprowadzenie..... | 33 |
| 2.2. Częściowe blokowanie grup funkcyjnych..... | 33 |
| 2.3. Funkcjonalizacja z wykorzystaniem struktur anhydrocyklicznych..... | 39 |
| 3. Badania własne..... | 69 |
| 3.1. Cel badań..... | 69 |
| 3.2. Badania wstępne..... | 70 |
| 3.3. Regioselektywna reakcja Mitsunobu częściowo acylowanej urydyny | 73 |
| 3.3.1. Reakcja Mitsunobu..... | 73 |
| 3.3.2. Obliczenia..... | 77 |
| 3.3.3. Dalsze reakcje | 81 |
| 3.3.4. Reakcja Mitsunobu 4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydyny | 84 |
| 3.4. Poszukiwania nowych reaktywności mostków anhydrocyklicznych..... | 85 |
| 3.4.1. Reakcje substytucji przykładowych nukleofilów węglowych i fosforowych..... | 86 |
| 3.4.2. Reaktywność mostka 2,3'-anhydrocyklicznego urydyny..... | 89 |
| 3.4.3. Reaktywność 8,2'-S-anhydro-2'-deoksyadenozyny..... | 94 |
| 3.5. Synteza pochodnych urydyny dimodyfikowanych w pozycjach 2' i 3' | 96 |
| 3.5.1. Synteza pochodnych 3'-deoksyurydyny | 96 |
| 3.5.2. Synteza pochodnych 1-(β -D-ksylofuranozylo)uracylu..... | 101 |
| 3.5.3. Dalsze wykorzystanie pochodnych 1-(β -D-ksylofuranozylo)uracylu | 106 |
| 3.6. Dokowanie molekularne pochodnych 2',3'-dimodyfikowanych pochodnych urydyny | 107 |
| 3.7. Badania biologiczne | 123 |
| 3.8. Podsumowanie i wnioski..... | 127 |
| 4. Część doświadczalna..... | 133 |
| 4.1. Metody ogólne | 133 |
| 4.1.1 Modelowanie molekularne | 133 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.2 Chemia | 133 |
| 4.2. Szczegółowe dane eksperymentalne | 136 |
| 5. Bibliografia | 177 |

Załącznik 1. Dokowanie molekularne – mody wiązania ligandów

Załącznik 2. Wybrane widma NMR

Streszczenie

Abstract

Wprowadzenie

Nukleozydy są podstawową jednostką budulcową kwasów nukleinowych. Fosforany nukleozydów – nukleotydy tworzą długie łańcuchy kwasów nukleinowych, które pełnią zasadniczą rolę w funkcjonowaniu wszystkich organizmów żywych jako nośniki informacji genetycznej przekazywanej następnemu pokoleniu. Kwasy nukleinowe w swej różnorodności posiadają również wiele innych funkcji w skomplikowanej maszynarii komórkowej jako relatywnie małe, osobne cząsteczki regulatorowe, transporterowe, sensorowe, lub stanowią części dużych biomolekuł białkowo-nukleinowych – rybosomów. Wiedza z pogranicza chemii i biologii o funkcjach, strukturze, biosyntezie jak i możliwościach syntezy chemicznej kwasów nukleinowych oraz nukleozydów rozwijała się na przestrzeni ostatnich dziesiątków lat nierównomiernie, w ścisłej zależności od poziomu rozwoju innych dziedzin jak fizyka czy nauki techniczne, które dostarczały co raz doskonalszych narzędzi do obserwacji i lepszego zrozumienia natury otaczającego świata ożywionego i nieożywionego. W historii tej warto przytoczyć pierwsze odkrycie kwasów nukleinowych poprzez Johana Fridricha Mieschera w 1869 roku, pierwszą syntezę chemiczną nukleozydu w 1914 roku przez Burckhardta Helfericha i H. Emila Fischera oraz odkrycie struktury drugorzędowej kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) poprzez Jamesa Watsona, Francisa Cricka i Rosalinde Franklin w 1953 roku.

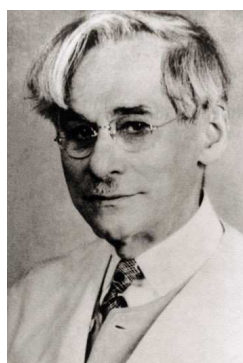
Chemia nukleozydów zaczęła rozwijać się wcześniej niż wiedza o funkcjach i mechanizmach działania kwasów nukleinowych, głównie dzięki H. E. Fischerowi (Nagroda Nobla w dziedzinie Chemii w 1902 roku), który już pod koniec XIX wieku rozwinął chemię cukrów oraz puryn kładąc podwaliny w tej dziedzinie dla przyszłych pokoleń. Do kontynuatorów jego pracy należą wspomniany Helferich oraz Ludwig Knorr. Również na początku XX wieku swą pracę rozpoczęli Phoebus Levene (ur. k. Korelicz) i W. Jacobs, którzy rozróżnili kwasy deoksyrybonukleinowy i rybonukleinowy oraz wykazali obecność reszt cytozyny, guaniny, adeniny i tyminy w kwasach nukleinowych.^[1] W 1935 roku Klein i Thannhauser uzyskali po raz pierwszy



J. F. Miescher

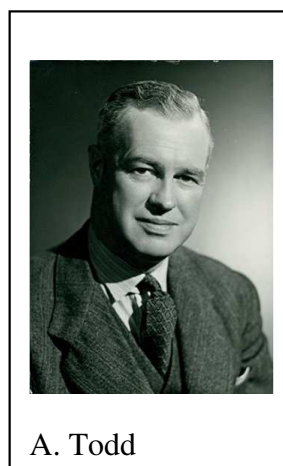


H. E. Fischer



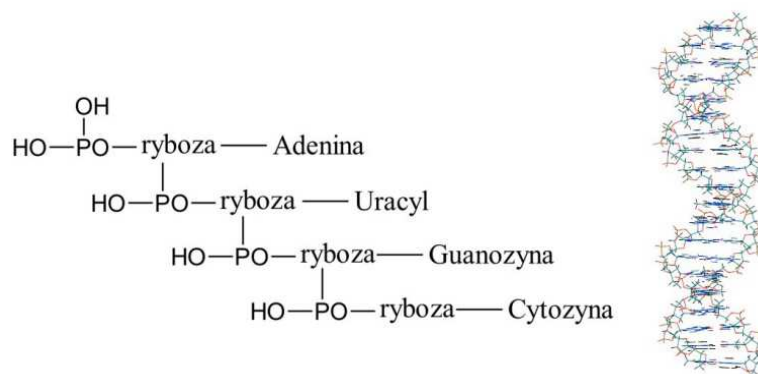
P.A. Levene

deoksyrybonukleotydy w postaci krystalicznej na drodze hydrolizy DNA, których strukturę potwierdził ostatecznie sir Alexander Todd poprzez pełną syntezę chemiczną w latach pięćdziesiątych XX w. (Nagroda Nobla w dziedzinie Chemii w 1957 r.). Jednak już w latach trzydziestych uznawano ogólną formę pierwszorzędowej struktury kwasów nukleinowych zilustrowaną np. przez Helmuta Bredericka^[2] (Rysunek 1.) w 1934 roku. Dało to przedpole dla Watsona i Cricka, którzy pierwsi rozwiązali II-rzędową strukturę DNA jako podwójną helisę w 1953 roku.



A. Todd

Chemia nukleozydów przeżywała wówczas swój rozkwit. Pojawiło się zapotrzebowanie na modyfikowane nukleozydy, aby badać zmiany konformacyjne kwasów nukleinowych, potwierdzać strukturę naturalnych nukleozydów modyfikowanych izolowanych z materiału biologicznego oraz wprowadzać znaczniki izotopowe. Rozwijano podejście zbieżne w syntezie (*convergent approach*), czyli metody

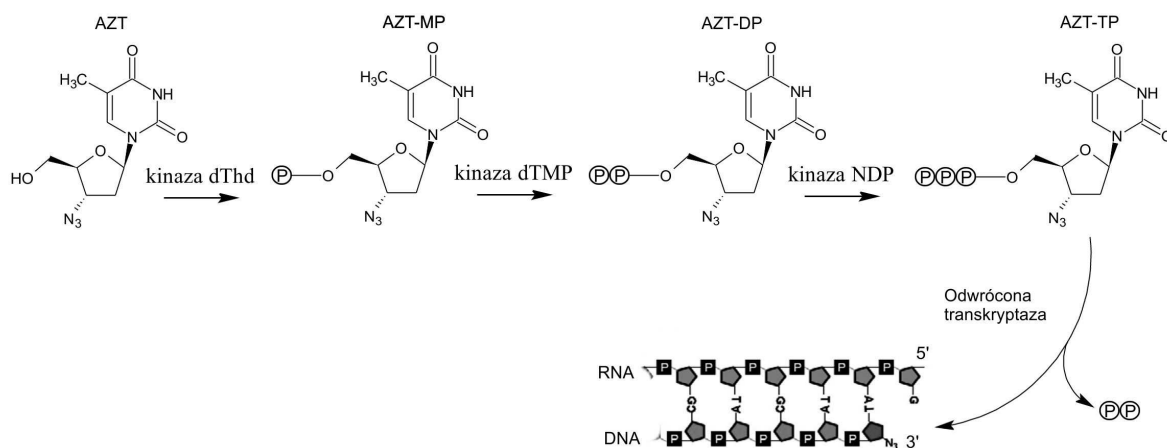


Rysunek 1. Ogólny schemat struktury pierwszorzędowej RNA z pracy H. Bredericka^[2] oraz model helisy DNA wg J. Watsona i F. Cricka.

glikozylacji. Na tym polu główne zasługi mieli twórcy metod Koenigsa-Knorra, Hilberta-Johnsona, Vorbrüggena (metoda siliolowa), stapiania (*i.a.* T. Sato i M.J. Robins), anionowej (*i.a.* R.K. Robins) i transglikozylacji (*i.a.* B. Shimizu, M. Miyaki). Współcześnie najczęściej stosowane są metody Vorbrüggena, anionowa dla 2'-deoksynukleozydów oraz transglikozylacji. Równocześnie rozwijane było podejście rozbieżne (*divergent approach*) polegające na modyfikowaniu naturalnych nukleozydów z wykorzystaniem bogatej palety możliwości alkilowania, halogenowania, sprzęgania, cyklizacji, substytucji, itd. Podejście to nabrało znaczenia w momencie opracowania tanich, przemysłowych, chemicznych i biotechnologicznych metod produkcji naturalnych nukleozydów, które są obecnie łatwo

dostępne. W latach sześćdziesiątych XX wieku odkryto właściwości przeciwwirusowe, antybiotyczne oraz przeciwnowotworowe modyfikowanych nukleozydów co przypieczętowało pierwszoplanową rolę chemii nukleozydów jaką posiada do dzisiaj. Już w 1964 roku zsyntezowano po raz pierwszy 3'-azydotymidynę (AZT, **1**),^[3] która 20 lat później okazała się być głównym orężem w walce z wirusem HIV.^[4] Następne lata przyniosły kolejne ważne odkrycia w medycynie i biochemii, które były możliwe dzięki chemii nukleozydów.

Funkcjonalizacja układu 2',3'-*cis*-diolowego rybonukleozydów w podejściu rozbieżnym jest ciągle atrakcyjnym i ciekawym tematem, ponieważ nukleozydy modyfikowane w pozycjach 2' i 3' reszty cukrowej mają duże znaczenie w poszukiwaniu nowych leków, działających jako inhibitory transkrypcji lub oligonukleotydy antysensowe. Przykładem może tu być wspomniane AZT. Związek ten po przedostaniu się do

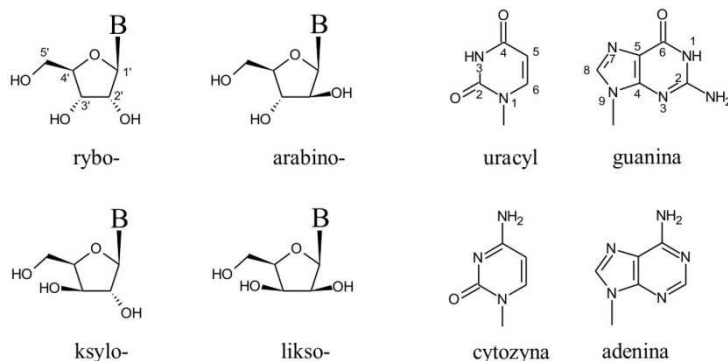


Rysunek 2. Mechanizm inhibicji transkrypcji wirusowego RNA poprzez AZT. Źródło: Eric de Clercq, 2009.^[5]

zainfekowanej komórki dzięki transporterom nukleozydowym systemu aktywnego i biernego, ulega serii reakcji enzymatycznych do aktywnej postaci trifosforanu AZT (AZT-TP). Następnie AZT-TP jest rozpoznawany przez wirusową odwrotną transkryptazę (RT) i ulega wbudowaniu w powstający łańcuch cDNA (komplementarne DNA) wirusa (Rysunek 2.^[5]).

W wyniku transformacji układu *cis*-diolowego rybonukleozydów można uzyskać szeroką gamę produktów o zmienionej konfiguracji w części cukrowej, dlatego warto już na początku przedstawić cztery możliwe grupy nukleozydów 1- oraz 9- β -D-pentofuranozyliowych o konfiguracji D-rybozy, D-arabinozy, D-ksylozy i D-liksozy oraz ogólnie przyjętą regułę numerowania atomów w nukleozydach (Rysunek 3.). Istnieje wiele metod wprowadzania modyfikacji w pozycjach 2' i 3' części cukrowej. O ile modyfikowanie pozycji 3' 2'-deoksyrybonukleozydów oraz modyfikowanie pozycji 2' rybonukleozydów nie

nastęcza trudności, to wprowadzanie modyfikacji w pozycję 3' rybonukleozydów już trywialne nie jest. Metody służące w tym celu wymagają kilkusetapowych syntez, drogich



Rysunek 3. Cztery grupy nukleozydów 1- oraz 9-β-D-pentofuranozylowych.

blokad bifunkcyjnych, prowadzą do uzyskania trudnych do rozdzielenia mieszanin izomerów lub zmieniają konfigurację części cukrowej. Ciekawym rozwiązaniem jest wykorzystanie struktury anhydrocyklicznej nukleozydów jako etapu pośredniego na drodze do rozróżnienia chemicznego i modyfikacji grup 2'-OH oraz 3'-OH rybozy. Choć struktury anhydrocykliczne są znane od kilku dekad, ich możliwości aplikacyjne w kierunku modyfikacji pozycji 3' rybonukleozydów wydają się nie być w pełni opisane i opracowane. Celem tej pracy jest wykonanie przeglądu możliwych metod funkcjonalizacji układu *cis*-diolowego rybonukleozydów oraz weryfikacja przydatności struktur anhydrocyklicznych w syntezie 3'-modyfikowanych pochodnych rybonukleozydów.

1. Aktywność biologiczna nukleozydów modyfikowanych w pozycjach 2' oraz 3'

1.1. Aktywność biologiczna modyfikowanych nukleozydów – przegląd

Każdego roku w laboratoriach na świecie powstają setki nowych analogów nukleozydowych. W procesie tym współpracują biolodzy, informatycy, chemicy, farmakolodzy i lekarze. Celem tych działań jest znalezienie nowych analogów o wysokiej aktywności biologicznej, możliwie niskiej toksyczności, które mogłyby być stosowane w medycynie. Zbiorowe wysiłki rzeszy naukowców przyniosły wyjątkowe rezultaty. Medycyna zdobyła nowe narzędzia w walce z czynnikami chorobotwórczymi, zwłaszcza z wirusami i nowotworami. Ogólny mechanizm aktywności antywirusowej analogów nukleozydowych, dzięki ich podobieństwu do wykorzystywanych w procesie replikacji nukleozydów, polega na blokowaniu funkcyjnym docelowych enzymów zaangażowanych w proces replikacji poprzez trwałe wiązanie się w centrum aktywnym samych nukleozydów lub ich fosforanów, czyli inhibicję lub włączanie się do replikowanego materiału genetycznego upośledzając go funkcyjnie poprzez przerwanie elongacji lub zaburzenie

| Związki | Przeprowadzone testy aktywności biologicznej | | | | | |
|---------|--|----|-----|----|---|-----|
| | I | II | III | IV | V | ... |
| 1 | | | | | + | |
| 2 | + | | | | | |
| 3 | | | | + | | |
| 4 | | + | | | | |
| ... | | | | | | |

Rysunek 1.1.1. Ilustracja szacunkowego stopnia przebadania uzyskanych analogów nukleozydowych.

strukturalne. Znalezienie nowych aktywnych związków nie jest częste, a wprowadzenie ich do aptek jest jeszcze rzadsze. Pomimo syntezowania setek ciągle nowych analogów rocznie, rzadko które wykazują aktywność i pomyślnie przechodzą wszystkie testy oraz badania kliniczne. Inną rzeczą jest to, że wiele zsyntezowanych analogów nie zostało w pełni przebadane. Gdyby wyobrazić sobie tabelę wszystkich otrzymanych pochodnych nukleozydów i badań biologicznych, którym zostały poddane, uzyskano by obraz jak na Rysunku 1.1.1. Szacuje się, że poziom wypełnienia takiej tabeli wyniósłby kilka procent. Na

szczęście również na tym polu obserwuje się postęp i rozwój przesiewowych badań, które obejmują coraz więcej związków.

W badaniach przesiewowych wykonywanych *in vitro* określa się poziomy aktywności i cytotoksyczności wyrażonych na kilka sposobów. Do najczęściej spotykanych należą:

- IC_{50} – stężenie inhibitorowe (ang. *inhibitory concentration*), stężenie substancji badanej, które hamuje w 50% patologiczne zmiany komórek wywoływane przez np. dany typ wirusa;
- CC_{50} – stężenie cytotoksyczne (ang. *cytotoxic concentration*), stężenie badanej substancji powodujące zmiany cytopatogeniczne zdrowych komórek;
- EC_{50} – stężenie efektywne (ang. *effective concentration*), stężenie powodujące zahamowanie w 50% replikacji wirusa;
- SI – indeks selektywności (ang. *selectivity index*), to stosunek CC_{50}/IC_{50} .

Wartości IC_{50} oraz CC_{50} mogą być podawane jako stężenia mikromolarne (μM) lub w mikrogramach na mililitr ($\mu g/mL$). Im wyższa wartość CC_{50} , a wartość IC_{50} niższa, tym badany związek wydaje się bardziej obiecujący jako przyszły farmaceutyk. Związki wysoce aktywne i selektywne osiągają nawet wartość IC_{50} rzędu $0,001 \mu g/mL$, a SI nawet dziesiątki tysięcy. Jeżeli $SI = 1$ oznacza to, że dany preparat jest równie szkodliwy dla wirusa jak i dla komórki gospodarza. Stwierdzona aktywność *in vitro* nie oznacza jeszcze, że związek jest aktywny *in vivo*, na co wpływają inne czynniki np. farmakokinetyczne jak uwolnienie (ang. *liberation*), wchłanianie (ang. *absorption*), dystrybucja (ang. *distribution*), metabolizm (ang. *metabolism*) czy usuwanie (ang. *elimination*) – w skrócie LADME. Inne wielkości określające aktywność biologiczną to:

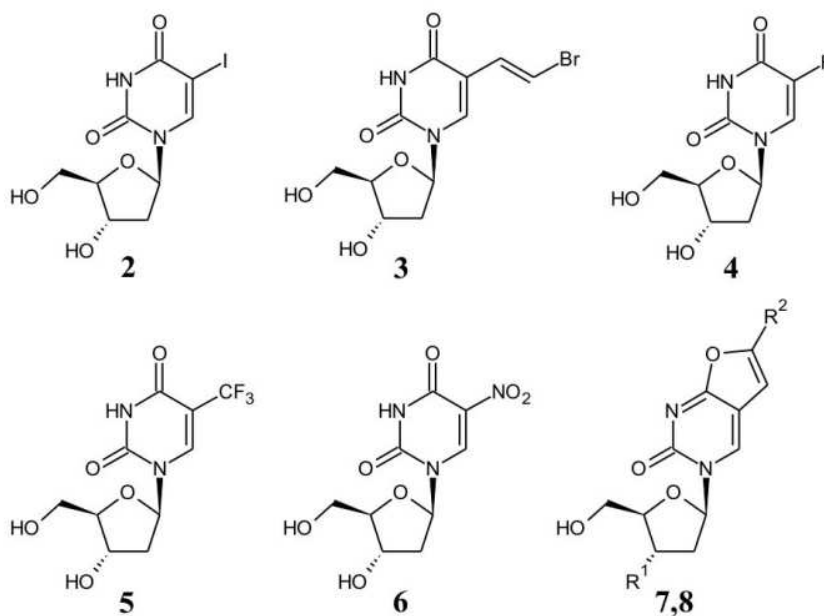
- ID_{50} – dawka inhibitorowa (ang. *inhibitory dose*), taka dawka testowanego preparatu, która redukuje w 50% zmiany patologiczne wywołane przez np. wirusa w jednowarstwowych kulturach bakterii;
- ED_{50} – dawka efektywna (ang. *effective dose*), dawka badanego związku, która powoduje zahamowanie w 50% replikacji wirusa w stacjonarnych kulturach komórkowych. W badaniach *in vivo* symbol ten oznacza dawkę, która powoduje 50% spadek śmiertelności wywołanej infekcją wirusową zwierząt doświadczalnych.

Poza tymi parametrami w testach inhibicji enzymatycznej stosuje się wartości używane w enzymologii: stałą Michaelisa K_M i stałą inhibicji K_i .

1.1.1. Analogi nukleozydowe posiadające modyfikacje w części zasadowej

W grupie analogów modyfikowanych w części zasadowej najwięcej jest pochodnych pirymidynowych.^[6] Historycznie pierwszym opisanym analogiem nukleozydowym o działaniu antywirusowym była 5-jodo-2'-deoksyurydyna (IDU, **2**, Rysunek 1.1.1.1.). Syntezę wykonał W. H. Prusoff^[7] w 1959 r., a w 1961 r. E. C. Hermann^[8] wykazał aktywność *in vitro* przeciw herpeswirusom. Ze względu na kardiotoksyczność, jest ona wykorzystywana jedynie do leczenia miejscowego i zewnętrznego np. w leczeniu infekcji rogówki. W 1976 r. w zespole R.T. Walkera otrzymano E-5-(2-bromowinylo)-2'-deoksyurydynę (BVDU, Zostex®, **3**).^[9] Wartość IC_{50} przeciw herpeswirusom wyniosła 0,008 $\mu\text{g/mL}$ przy $SI > 25\ 000$. Tak wyjątkową selektywność tłumaczy się selektywną fosforylacją wirusową kinazą tymidynową (dTK), co ogranicza działanie tylko do zainfekowanych komórek.

Inne analogi z tej grupy jak 5-fluoro-2'-deoksyurydyna (FDU, **4**), trifluorotymidyna (TFT, **5**), 5-nitro-2'-deoksyurydyna (**6**) nie są zależne od kinazy deoksytymidynowej, ponieważ ich mechanizm działania jest inny.^[10] Działają jako inhibitory syntetazy



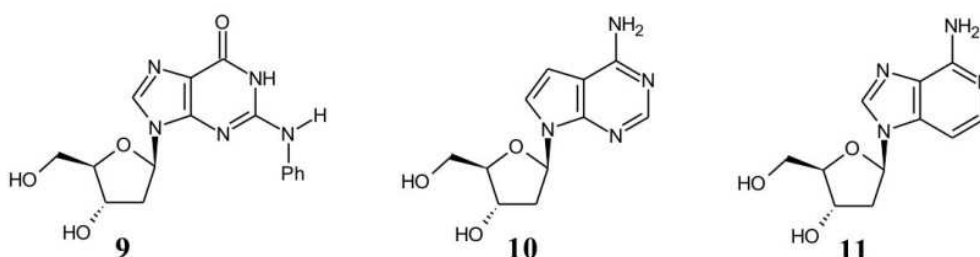
7: $R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{alkil}$; 8: $R^1 = \text{OH}$; $R^2 = \text{alkil}$.

Rysunek 1.1.1.1 Przykładowe analogi pirymidynowe modyfikowane w części zasadowej.

tymidylanowej i wykazują wysoką aktywność przeciw wirusom nieposiadającym własnej

dTK jak np. mutant HSV TK⁻. FDU jest stosowane także w leczeniu raka jelita grubego jako cytostatyk.^[11] Z nowszych osiągnięć można przytoczyć dwie analogiczne grupy związków **7** i **8** zgłoszonych przez C. McGuigana et al.^[12,13]. Posiadają one charakterystyczny układ dwupierścieniowy 6-alkilo-2,3-dihydrofurano-[2,3-*d*]pirymidyn-2(1H)-onu. Związki te (**7**) wykazały w badaniach *in vitro* bardzo wysoką aktywność przeciw wirusowi *Varicella-zoster* (VZV) – 300-krotny wzrost aktywności w porównaniu z acyklowirem. Związki z grupy **8** są nieaktywne wobec VZV, ale za to wykazują dobrą aktywność przeciw cytomegalowirusowi (HCMV) na poziomie 1 μM przy cytotoksyczności na poziomie 300 μM.

Wśród purynowych pochodnych posiadających modyfikacje w części zasadowej można wymienić N-2-alkilowane pochodne 2'-deoksyguanozyny, które wykazują właściwości inhibitorowe zarówno polimeraz wirusowych jak i organizmów wyższych. Choć pochodna N-2-fenylova (**9**, Rysunek 1.1.1.2.)^[14] okazała się być selektywnym inhibitorem kinazy tymidynowej herpeswirusów. Odrębną grupą związków aktywnych są pochodne typu deazaadenozyny. 7-Deazaadenozyna (tubercydyna, **10**) badana przez E. De Clerqa^[15,16] okazała się być aktywna przeciw wirusom DNA oraz RNA takim jak wirus polio, rinowirus,

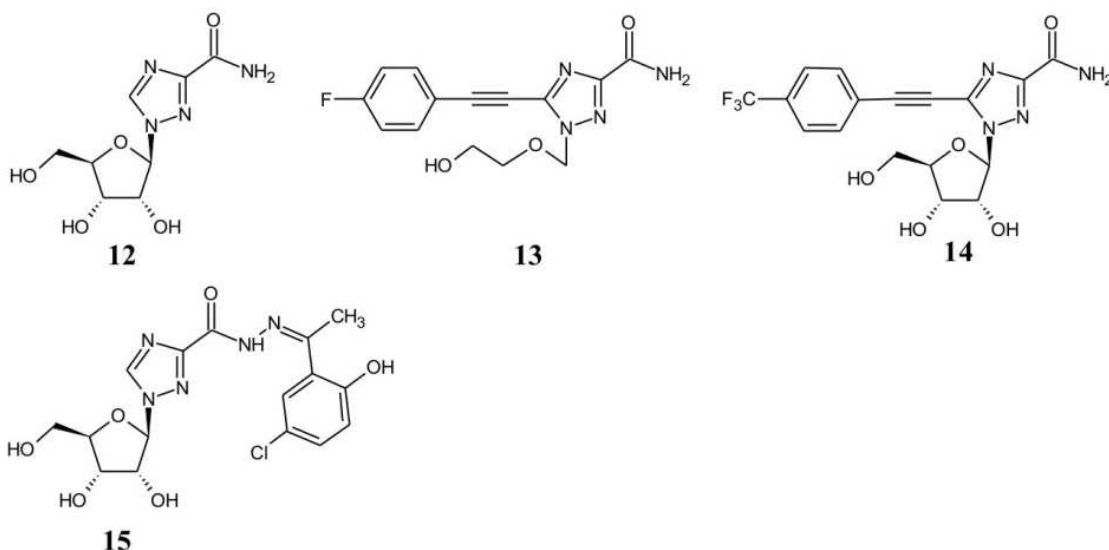


Rysunek 1.1.1.2 Przykładowe analogi purynowe modyfikowane w części zasadowej.

wirus zapalenia jamy ustnej VSV (IC₅₀ = 0,007 μg/ml), jednak jest również bardzo toksyczna. 3-Deazaadenozyna (**11**) zsyntezowana w zespole L.B. Townsenda i R.K. Robinsa^[17] w 1966 r. również okazała się aktywna przeciw wielu wirusom RNA jak RSV, VSV. Mechanizm działania polega na zakłócaniu transmetylacji wirusowego RNA przez inhibicję procesu hydrolizy S-adenozylhomocysteiny.^[15] Ta pochodna nie ulega również enzymatycznej deaminacji, co przedłuża jej działanie w organizmie. Co więcej, uważa się, że może ulegać przekształceniu do 3-deazaadenozylhomocysteiny, która jest inhibitorem wirusowych metylotransferaz.

1.1.2. Nukleozydy posiadające inne zasady heterocykliczne

W tej grupie związków najwyższą aktywność antywirusową mają związki o heterocyklicznych pierścieniach pięcioczłonowych zawierających azot. Rybawiryna (**12**, Rysunek 1.1.2.1.), czyli 1-(β -D-rybofuranozylo)-3-karboksyamido-1,2,4-triazol (RBV) jest sztandarowym przykładem. Związek ten zaprojektowano i uzyskano w 1972 r. w zespole R.K. Robinsa i zgodnie z założeniem okazał się być aktywny zarówno przeciw wirusom DNA jak RNA.^[18] RBV ulega fosforylacji w komórce dzięki kinazie adozynowej do 5'-monofosforanu i następnie dzięki odpowiednim kinazom do trifosforanu, który jest inhibitorem wielu enzymów wirusowych biorących udział w cyklu replikacyjnym np.:



Rysunek 1.1.2.1. Rybawiryna i jej przykładowe analogi.

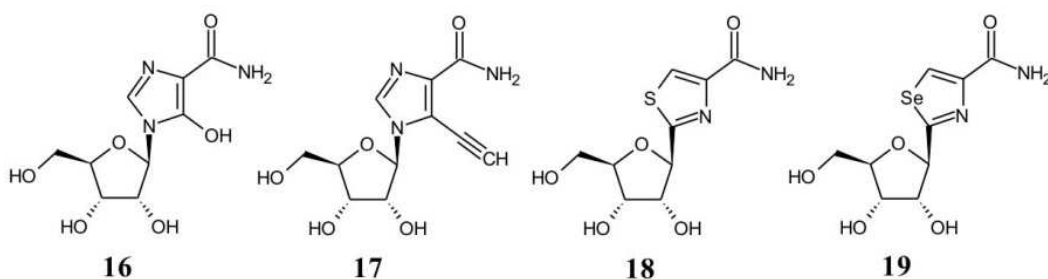
wirusowej polimerazy RNA (wirusy grypy), metylotransferazy poksywirusów, odwrotnej transkryptazy HIV.^[19]

Innym mechanizmem działania rybawiryny o szczególnym znaczeniu jest jej mutagenność wynikająca z możliwości wbudowania jej do kwasów nukleinowych. W wyniku rotacji grupy karboksamidowej RBV może tworzyć pary zarówno z uracylem jak i cytozyną. Mutacja wirusów jest zjawiskiem częstym i naturalnym ponieważ mechanizmy naprawcze wirusowego materiału genetycznego są dużo bardziej prymitywne i ograniczone, niż w syntezie komórkowych kwasów nukleinowych. Szybkość mutowania wirusów jest ich przewagą, bo potrafią się łatwo uodparniać i dostosowywać. Jednak dodanie kolejnego czynnika mutującego może spowodować nadmiar zmian, które kończą się tzw. katastrofą

z nadmiaru błędów, czyli masowym wymieraniem wirusa.^[20] Problemem jest toksyczność rybawiryny (CC_{50} = ok. 200 $\mu\text{g/mL}$), co może wynikać z faktu, że jej 5'-monofosforan jest inhibitorem dehydrogenazy inozynomonofosforanu (IMPDH), co w efekcie prowadzi do zatrzymania biosyntezy RNA i DNA w komórce. Jednak ze względu na silną aktywność przeciw wielu wirusom została dopuszczona do leczenia.

Rybawirynę wykorzystano jako związek liderowy i zsyntezowano wiele nowych pochodnych.^[21,22,23,24] Modyfikowano zarówno część cukrową jak i zasadową poprzez wprowadzenie zamiast rybozy struktury acyklicznej, blokowanie grup OH lub wprowadzenie hydrofobowego podstawnika do pierścienia 1,2,4-triazolu. Na przykład związek acykliczny **13** posiadający podstawnik fenyloalkinylowy w pozycji 5, posiada ciekawe właściwości skierowane przeciw wirusowi HCV. Również przeciw wirusowi HCV aktywność wykazał związek **14**, który posiada zwykłą rybozę, ale różni się w obrębie części zasadowej. Związek **15** z kolei wykazał zdolność hamowania namnażania się komórek raka płuc A549.

Inną grupą związków są pochodne typu mizorybiny^[25] (**16**, Rysunek 1.1.2.2.) i 5-etynylo-1- β -D-rybofuranozyloimidazolo-4-karboksyamid^[26] (EICAR, **17**) posiadające zamiast kanonicznej zasady azotowej imidazol. Mizorybina jest występującym naturalnie, dopuszczonym do handlu w Japonii lekiem immunosupresorowym. Hamuje syntezę zasad purynowych w limfocytach. Podobieństwo do rybozydu AICA (substrat w biosyntezie nukleozydów purynowych) powoduje, że jest dobrym inhibitorem IMPDH. EICAR z kolei wykazuje się działaniem hamującym rozwój białaczki *in vivo*, oraz szerokim spektrum aktywności przeciw RNA i DNA wirusom przewyższając rybawirynę często 10 – 100-krotnie



Rysunek 1.1.2.2. Inne azolowe analogi nukleozydowe.

pod względem aktywności. W tym punkcie można wspomnieć również o tiazofuryynie (**18**), czyli 2- β -D-rybofuranozyliotiazolo-4-karboksyamidzie.^[27,28] Jest to również związek posiadający związany wiązaniem glikozydowym pierścień pięciocłonowy należący do klasy C-nukleozydów. Związek ten wykazuje silne działanie anti-białaczkowe. Otrzymano szereg

azolowych nukleozydów różniących się aranżacją heteroatomów w pierścieniu pięciocłonowym oraz podstawnikami. Wykazują one korzystne właściwości przeciw szczególnie niebezpiecznym wirusom jak arenawirusy, flawiwirusy i alfawirusy. Selenazofuryna^[29] (**19**) różniąca się od tiazofuryny jedynie tym, że zamiast atomu siarki w pierścieniu azolowym jest atom selenu, jest szczególnie aktywna przeciw wirusom żółtej febry oraz grypy A i B.

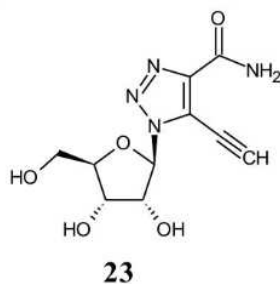
Obok związków **18** i **19**, do grupy C-nukleozydów należy także oksazynomycyna^[30] (**20**, Rysunek 1.1.2.3.). W swej strukturze przypomina jeden z najczęściej spotykanych naturalnych modyfikowanych nukleozydów – pseudourydynę (ψ , **21**). Oksazynomycyna jest naturalnym antybiotykiem produkowanym przez niektóre bakterie z rodzaju *Streptomyces*



Rysunek 1.1.2.3. Przykładowe C-nukleozydy.

i wykazuje właściwości hamujące wzrost bakterii gram dodatnich, gram ujemnych, a także niektórych typów nowotworów – mięsaków. Drugim przykładem C-nukleozydów może być formicyna A (**22**) wyizolowana ze *Streptomyces lavendula*. Formicyna A posiada pewne aktywności cytostatyczne, antywirusowe i może stanowić punkt wyjścia w poszukiwaniu nowych aktywnych związków.^[31]

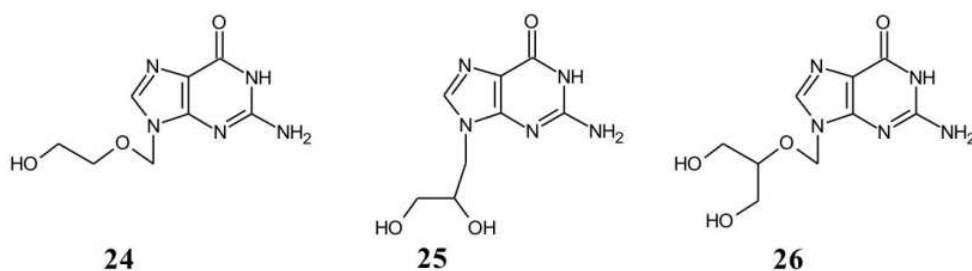
Rosnącym zainteresowaniem cieszą się pochodne posiadające zamiast kanonicznej zasady azotowej ugrupowanie 1,2,3-triazolu. Powodem zainteresowania tą grupą związków na pewno jest łatwość syntezy (*click-chemistry*^[32]) dzięki 1,3-dipolarnej cykloaddycji. Jednak jak do tej pory nie zgłoszono istotnych aktywności. Przykładem poszukiwań w tej grupie związków może być 5-etynylo-1- β -D-rybofuranozylo-1H-[1,2,3]-triazolokarboksyamid (ETCAR, **23**, Rysunek 1.1.2.4.) i jego pochodne.^[33] W kontekście możliwości wykorzystania 1,3-dipolarnej cykloaddycji pomiędzy azydkiem a alkinem katalizowanej miedzią (CuAAC – ang. *Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*) w chemii nukleozydów warto przytoczyć szeroką pracę przeglądową F. Amblard'a *et al.*^[34]



Rysunek 1.1.2.4. Struktura ETCAR.

1.1.3. Analogi nukleozydowe posiadające modyfikacje w części cukrowej

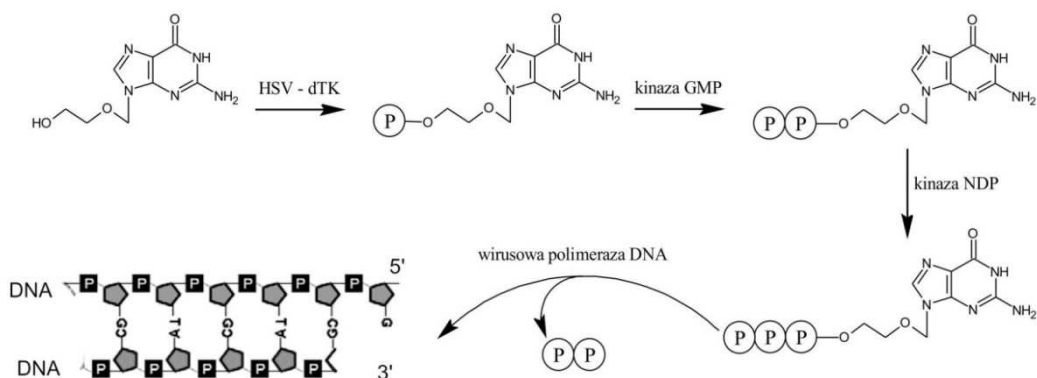
Aktywność nukleozydów posiadających modyfikacje w pozycjach 2' i 3' rybozy zostaną omówione w oddzielnym podrozdziale, a w tym miejscu zostaną przedstawione pokrótce inne modyfikacje części cukrowej. W tej kategorii związków na pierwszy plan wychodzą nukleozydy acykliczne, w których pierścień cukrowy został zastąpiony przez podstawnik (2-hydroksyetyloksy)metylowy (np. acyklowir, ACV, Zovirax®, **24**, Rysunek 1.1.3.1.) lub dihydroksypropyloksy (np. dihydroksypropyloadenina, DHPA, **25**) W pierwszej grupie została zachowana część odpowiadająca atomom C1', C4', C5' oraz atomowi tlenu, a w drugiej grupie została zachowana część z układem 2',3'-*cis*-diolowym. ACV po raz pierwszy opisany został przez H.J. Schaeffera i G.B. Elion w 1977 r.^[35] Prócz syntezy przedstawiono również pierwsze wyniki badań aktywności przeciwwirusowej. Za swą pracę nad ACV i jego pochodnymi G.B. Elion otrzymała w 1992 roku nagrodę Nobla. ACV wykazuje wysoką i selektywną aktywność zwłaszcza przeciw herpeswirusom (HSV-1, HSV-2). Wartości IC₅₀ przeciw różnym szczepom wynoszą 0,1-0,01 µg/mL. Mechanizm



Rysunek 1.1.3.1 Acykliczne nukleozydy.

działania^[5] można przedstawić analogicznie do prezentowanego już mechanizmu z AZT. ACV po przedostaniu się do wnętrza komórki ulega fosforylacji przez wirusową kinazę deoksytymidynową HSV-dTK do postaci monofosforanu (Rysunek 1.1.3.2.). Następnie ulega fosforylacji przez ludzką kinazę GMP (guanozynomonofosforanu) do difosforanu i komórkowe kinazy NDP (nukleozydodifosforanowe) do trifosforanu. Trifosforan zostaje

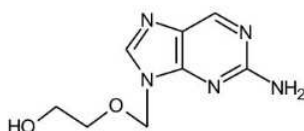
rozpoznany przez wirusową polimerazę DNA i wbudowany do wirusowego łańcucha nukleinowego. ACV nie jest substratem dla komórkowych kinaz, dlatego fosforylacja zachodzi tylko w zainfekowanych komórkach. ACV wykazuje aktywność również przeciw wirusowi VZV oraz umiarkowaną aktywność przeciw wirusowi CMV.



Rysunek 1.1.3.2. Mechanizm działania ACV. Źródło: Eric de Clerc, 2009.^[5]

ACV wykorzystano jako strukturę liderową w dalszych poszukiwaniach, w których wyniku uzyskano m.in. gancyklowir (GCV, Cytovene®, **26**).^[36,37,38] GCV okazał się być również aktywny przeciw wirusom HSV-1 i 2, CMV, VZV a także EBV (wirus Epsteina-Barra). Co ciekawe, GCV jest również aktywny wobec zmutowanych szczepów HSV TK⁻, wobec których ACV nie jest aktywny. Zamiana guaniny na adeninę w strukturze ACV dała obniżenie aktywności, a wstawienie w to miejsce zasad pirymidynowych dało związki nieaktywne.

Inne modyfikacje części azotowej mają na celu poprawę rozpuszczalności i poprawę parametrów wchłaniania przy podaniu doustnym. Przykładem takiej modyfikacji może być 6-deoksyacyklowir (**27**, Rysunek 1.1.3.3.),^[39] który w komórce zostaje utleniony przez oksydazę ksantynową do postaci ACV. Pozwala to na sześciokrotne zwiększenie stężenia ACV w organizmie. Ważnym nukleozydem acyklicznym jest wspomniany wcześniej DHPA

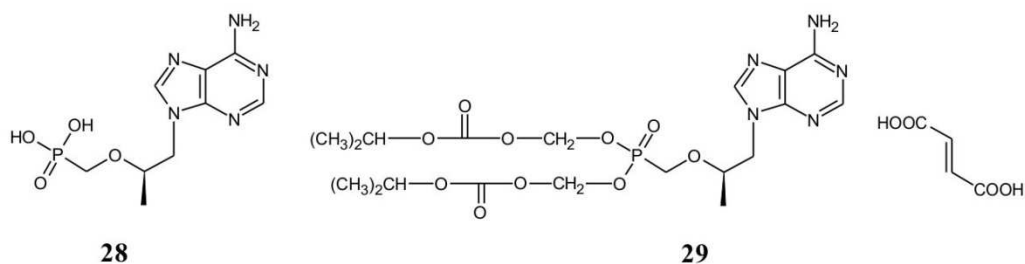


27

Rysunek 1.1.3.3. Struktura 6-deoksyacyklowiru.

(25),^[40] którego enancjomer o konfiguracji S jest tym aktywnym. Wykazuje on szerokie spektrum aktywności przeciw wirusom (+)RNA, (-)RNA, dsRNA (dwuniciowe RNA), a także w mniejszym stopniu przeciw wirusom DNA. Mechanizm działania jest mechanizmem typowym dla analogów adeninowych. Stanowi on inhibitor dla hydrolazy S-adenozylhomocysteinowej (SAH). Inhibicja tego enzymu powoduje kumulowanie się w komórce S-adenozylhomocysteininy, która z kolei utrudnia m.in. metylacje terminalnej guanozyny w strukturze *cap* mRNA i zakłóca dojrzewanie wirusowego RNA.

Tenofowir (**28**, PMPA, [(R)-9-(2-fosfonylometoksypropylo)adenina) również zalicza się do analogów acyklicznych, choć w tym przypadku uważa się go za izosteryczny i izoelektryczny analog acyklonukleotydu; należy on do acyklicznych fosfonianów nukleozydowych, których prekursorem w syntezie jest właśnie DHPA. Jest to bardzo ciekawa grupa związków przeciwwirusowych.^[41] Są stosowane w leczeniu wielu wirusów np. w leczeniu CMV u pacjentów chorych na AIDS. Został dopuszczony do terapii przeciw

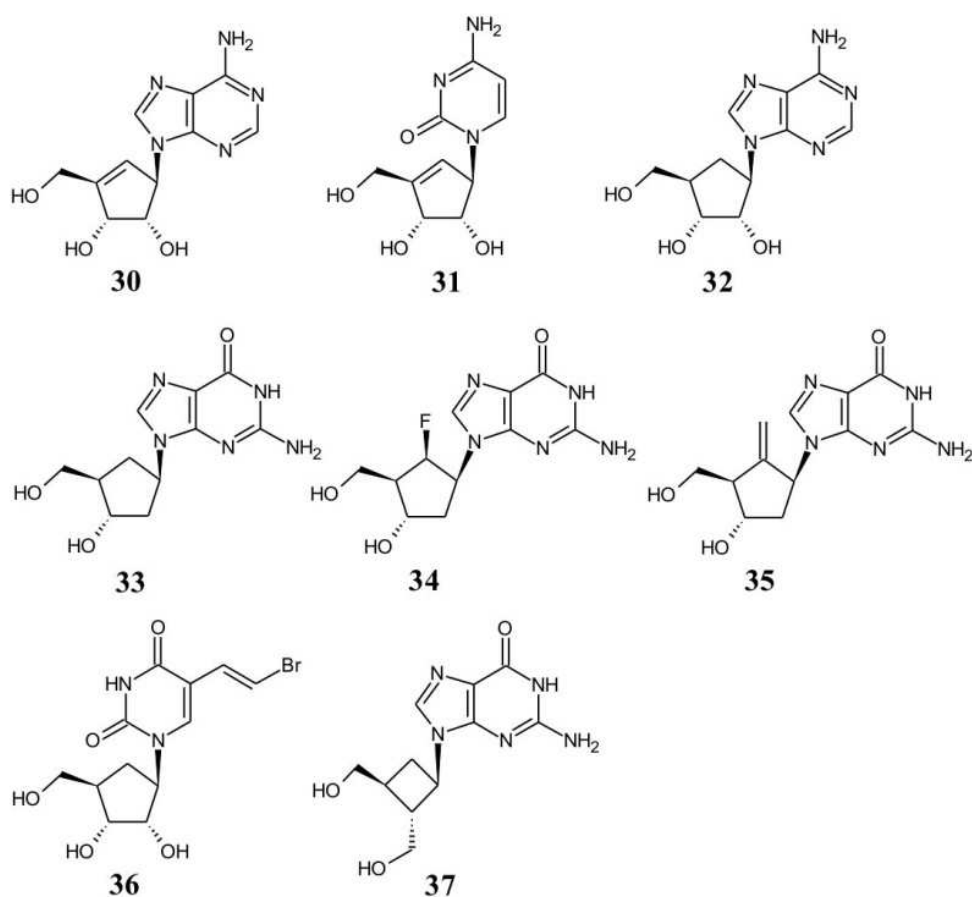


Rysunek 1.1.3.4. Struktura tenofowiru i TDF.

wirusowi HIV w 2001 roku, a także przeciw wirusowi HBV w roku 2008. Stosowany jest w postaci proleku dizoproksylu tenofowiru, w którym grupa fosforanowa jest dodatkowo zestryfikowana dwiema resztami izopropylloksykarbonyloksymetyłowymi ze względu na lepsze wchłanianie. Po wnikięciu do komórki triester ten rozkłada się do aktywnego biologicznie tenofowiru. Forma doustna jest solą fumaranową dizoproksylu tenofowiru (TDF, **29**, Viread®). Z karty charakterystyki produktu leczniczego można wyczytać, że Viread jest stosowany w leczeniu dzieci zakażonych wirusem HIV-1 w wieku od 6 do 12 lat z opornością na NRTI (nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy) lub przy zbyt dużej toksyczności leków pierwszego rzutu. Tenofowir może być stosowany w profilaktyce zakażeń w grupie wysokiego ryzyka.

Prócz nukleozydów acyklicznych, znane są również nukleozydy karbocykliczne oraz L-nukleozydy, które także posiadają ciekawe właściwości biologiczne.^[42] Należąca do nukleozydów karbocyklicznych neplanocyna A (**30**, Rysunek 1.1.3.5.)^[43] jest również

inhibitorem hydrolazy SAH z $IC_{95} = 0,2 \mu\text{M}$. Neplanocyna A w komórce jest łatwo metabolizowana do nieaktywnej formy inozynowej przez deaminazę adenozykową, dlatego podjęto próby jej modyfikacji aby zwiększyć czas półtrwania w komórce, a także zmniejszyć jej cytotoksyczność poprzez utrudnienie fosforylacji przez kinazę adenozykową. IC_{50} neplanocyny względem wirusów VV, VSV, Reowirusa 1, Junin (wirus argentyńskiej gorączki krwotocznej, JUNV), CMV mieściło się w przedziale $0,3\text{-}7 \mu\text{g/mL}$.^[44,45] Badania prowadzono w komórkach E₆SM (linia komórkowa ludzkich embrionalnych fibroblastów), HeLa (linia komórek raka szyjki macicy), Vero (linia komórek nabłonka nerki koczkodana) i HEL (linia komórek białaczki erytroblastycznej). Cytozynowy analog neplanocyny o nazwie zwyczajowej cyklopentynylocytozyna **31** (CPE-C)^[46,47] prócz aktywności przeciwwirusowej



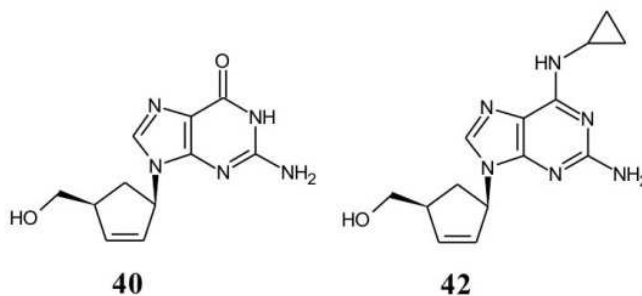
Rysunek 1.1.3.5. Karbocykliczne nukleozydy.

na ponad 20 różnych wirusów posiada również aktywność przeciwnowotworową inhibując w postaci trifosforanowej syntetazę trifosforanu cytydyny (CTP), która w komórkach nowotworowych ma zwiększoną aktywność. Jednak stwierdzona w I fazie badań klinicznych kardiotoxyczność opóźnia wprowadzenie go do leczenia. Arysteromycyna (**32**)^[48,49] to

kolejny purynowy nukleozyd karbocykliczny, który również należy do grupy inhibitorów hydrolazy SAH, wykazuje właściwości sercowo-naczyniowe prawdopodobnie jako agonista receptora adenozynowego A₂^[50] i stanowi strukturę liderową dla wielu aktywnych związków.

Karbocykliczna 2'-deoksyguanozyna (CDG, **33**)^[51] należy do inhibitorów replikacji wirusowego DNA. Posiada szerokie spektrum aktywności przeciwwirusowej np. HSV, HCMV i HBV. W celu wyjaśnienia mechanizmu działania CDG przeciw HSV badano poziom wprowadzenia go do komórkowego i wirusowego DNA. Okazało się, że trifosforan CDG jest lepszym substratem dla wirusowej polimerazy i działa jako inhibitor kompetycyjny, ale nie działa jako terminator elongacji łańcucha DNA.^[52] CDG wykorzystano jako strukturę liderową i tak zgłoszono kolejne aktywne analogi. 6'-Fluoro-β-CDG (**34**)^[53] okazała się być kilkukrotnie skuteczniejsza od ACV *in vitro* przeciw HSV-1 i 2, a entekawir (BMS-200475, **35**)^[54] wykazał bardzo wysoką aktywność przeciw HBV (EC₅₀=0,003 μM) przy cytotoksyczności zależnej od linii komórkowej 21-120 μM. Nie sposób wymienić wszystkich analogów karbocyklicznych, które zostały zsyntezowane i przebadane biologicznie, ale trzeba wspomnieć także o C-BVDU (**36**)^[55] oraz C-oksetanocynie G (**37**)^[56] które są karbocyklicznymi wariantami aktywnych nukleozydów i przedstawicielami dwóch grup związków. C-BVDU wykazuje porównywalną aktywność do BVDU, a przy okazji jest odporny na hydrolityczne działanie fosforylasy urydynowej i deoksytymidynowej, a C-oksetanocyna G wykazuje również ciekawe aktywności jak związek liderowy, jednak jest bezpieczniejszy w użyciu i może stanowić obiecujące rozwiązanie terapeutyczne w leczeniu infekcji HSV i HCMV. Związek **37** wykazuje również aktywność anti-HIV jednak słabszą od znanych ddA (dideoksyadenozyna, **38**) i ddG (dideoksyguanozyna, **39**), które będą omówione w dalszej części.

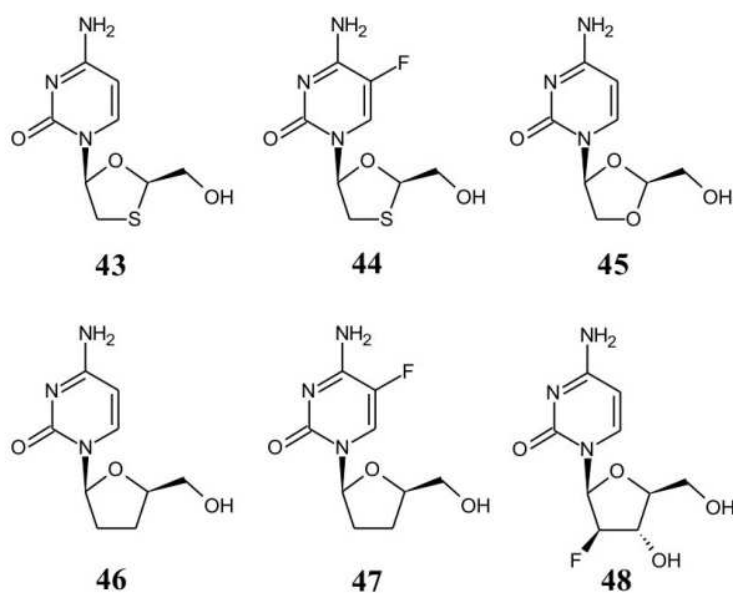
Ostatnią grupę związków karbocyklicznych, o której trzeba wspomnieć, stanowią karbowir (**40**, Rysunek 1.1.3.6.) i jego pochodne. Karbowir wytypowano jako strukturę aktywną w wyniku dużego programu badań przesiewowych zrealizowanych w National



Rysunek 1.1.3.6. Karbowir i abakawir.

Cancer Institute.^[57] Okazał się być odpornym na hydrolizę i zdolnym do hamowania infekcyjności i replikacji wirusa HIV w limfocytach T na poziomie stężenia 200-400 krotnie niższym od poziomu cytotoksycznego. W trzech różnych liniach komórkowych wykazał aktywność w zakresie $IC_{50} = 0,12-0,31 \mu M$ (enancjomer (-)). AZT (**1**) i ddC (**41**) w tych samych testach osiągały aktywność o dwa rzędy lepsze, prócz linii komórkowej JM (Jurkat, linia komórkowa nieśmiertelnych T-limfocytów), w której AZT okazał się nieaktywny. Badania enzymatyczne wykazały właściwości inhibitorowe trifosforanu (-)-karbowiru wobec HIV1-RT na poziomie (K_i) równym AZT-TP. Znalezione również sposób na przedłużenie czasu półtrwania związku w komórce, inhibując pierwszy etap metabolizmu przez użycie mieszaniny dwóch izomerów, a to drugi izomer (+) okazał się być tym chętniej utlenianym przez komórkowe dehydrogenazy przy niewiele mniejszej aktywności anti-HIV. Choć związek okazał się być bardzo dobrym środkiem przeciw wirusowi HIV, jednak pewne wady w biodostępności, jak niska absorpcja przy podaniu ustnym, niska przenikalność przez barierę krew-mózg oraz cytotoksyczność zatrzymały rozwój do produktu leczniczego. Wprowadzono różne modyfikacje do struktury karbowiru w celu poprawy tych cech z różnym skutkiem. Badania kliniczne pomyślnie przeszedł abakawir (**42**). Choć wstępne pomiary aktywności nie były doskonałe, jednak związek okazał się być dobrym kandydatem pod względem farmakokinetycznym^[58] i pod względem toksyczności. W Ameryce został dopuszczony do użycia już 1998 roku.

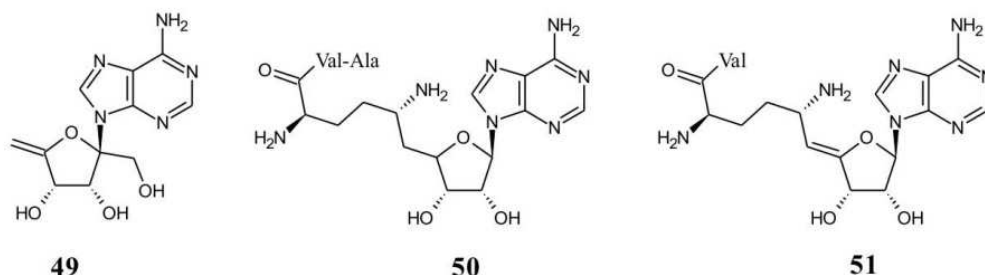
Kolejną grupą związków modyfikowanych w części cukrowej, którą trzeba opisać w tym rozdziale są analogi L-nukleozydów. Nie dziwi fakt, że od początku poszukiwań leków



Rysunek 1.1.3.7. Analogi L-nukleozydów.

zajmowano się analogami D-enancjomerów nukleozydów, które występują naturalnie i można się było spodziewać, że to one będą wchodzić w interakcje w organizmach żywych. Zmiana nastąpiła na początku lat dziewięćdziesiątych u.w. gdy pojawiły się pierwsze doniesienia o aktywnościach anty-HBV i HIV nienaturalnych β -L-nukleozydów. Prekursorem okazała się być β -L-2'-deoksy-3'-tiacytydyna (3-TC, Lamiwudyna) **43**, Rysunek 1.1.3.7.).^[59] Pierwotnie uzyskano mieszaninę racemiczną, która poddana badaniom biologicznym i wykazała bardzo dobrą aktywność przeciw wirusowi HIV na poziomie $EC_{50} = 0,02-0,06 \mu M$. Później uzyskano oba enancjomery osobno i wykazano, że bardziej aktywnym oraz mniej toksycznym jest enancjomer L ($EC_{50} = 0,018 \mu M$). Podobną charakterystykę aktywności uzyskano przeciw wirusowi HBV. W komórce ulegają fosforylacji do trifosforanu dzięki kinazom komórkowym i blokują aktywność wirusowej HIV1-RT i HBV-Pol (polimeraza wirusa HBV) o aktywności RT konkurując z naturalnym substratem. Enancjomer L wykazuje wysoką selektywność, podczas gdy enancjomer D wykazywał pewne powinowactwo do polimeraz gospodarza. Lamiwudyna doczekała się wprowadzenia do terapii przeciw wirusowi HIV i stała się strukturą liderową w dalszych poszukiwaniach. Tak uzyskano β -L-FTC (emtrycytabina, **44**),^[60] β -L-dioekso-C (troksacytabina, **45**),^[61] β -L-ddC (**46**, L - dideoksycytydyna), β -L-FddC (**47**, β -L-5-fluoro-2',3'-dideoksycytydyna)^[62] i β -L-FMAU (**48**, 1-(2'-deoksy-2'-fluoro- β -L-arabino-furanozylo)cytozyna).^[63] Trifosforany związków **46** i **47** wykazały zdolność do selektywnej inhibicji HIV-RT z wartościami stałej inhibicji K_i niewiele gorszej od 3-TC, choć dużo gorszej od AZT-TP. Stwierdzono, że działają jako terminatory elongacji wirusowego DNA. Oba nukleozydy **46** i **47** okazały się być również bardzo aktywne przeciw HBV *in vitro* na poziomie $ED_{50} = 0,01 \mu M$. Oba wykazały zerową aktywność wobec mitochondrialnej polimerazy γ na poziomie $100 \mu M$, co jest bardzo dobrym wynikiem, ponieważ uważa się, że głównym cytotoksycznym ubocznym efektem stosowania NRTI (nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy) w leczeniu AIDS jest właśnie inkorporacja NRTI do mitochondrialnego DNA w komórce gospodarza.^[64] Na przykład ddC (**41**), lek dopuszczony do leczenia AIDS, wykazuje aktywność inhibitorową wobec Pol γ na poziomie $0,022 \mu M$ *in vitro*. Aktywność β -L-FTC (**44**) *in vitro* względem wirusa HIV wyniosła $EC_{50} = 0,0013 \mu M$ przy cytotoksyczności $CC_{50} > 100 \mu M$ w dwóch różnych liniach komórkowych. Jest to doskonały rezultat i nie dziwi, że dopuszczono ją do leczenia w 2006 roku. Analog β -L-FMAU wykazał za to dobrą aktywność przeciw wirusowi HBV na poziomie $EC_{50} = 0,1 \mu M$ przy zerowej cytotoksyczności.^[42]

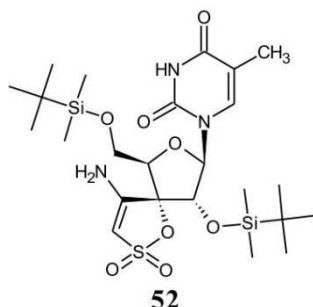
Choć w tak krótkiej formie przegląd nie może być kompletny, jednak wypada zasygnalizować istnienie innych grup modyfikowanych nukleozydów poprzez podanie kilku przykładów. Angustmycyna A (**49**, Rysunek 1.1.3.8.) aktywna wobec bakterii gram (+)^[65] jest analogiem modyfikowanym w pozycji 5'. Związki z tej grupy są najczęściej aktywne wobec enzymów biorących udział w reakcjach transmetylowania – hydrolazy SAH i reduktazy



Rysunek 1.1.3.8. Przykłady nukleozydów modyfikowanych w pozycji 5'.

difosforanu rybonukleozydów. Sinofungina VA (**50**) 4',5'-didehydrosinofungina V (**51**) wykazują ciekawe aktywności przeciw pasożytom z rodzaju świdrowców (*Trypanosoma*) na poziomie $IC_{50} = 0,0026 - 0,15 \mu\text{g/mL}$ przy braku toksyczności przeciwko linii komórkowej MRC-5. Świdrowiec gambijski (*Trypanosoma gambiense*) i świdrowiec rodezyjski (*Trypanosoma rhodesiense*) są odpowiedzialne za śpiączkę afrykańską przenoszoną przez muchy tse-tse.^[66]

Analogi posiadające podstawnik 3'-spiro są specyficznymi inhibitorami HIV-1 RT. Nie są aktywne wobec innych retrowirusów. Wiążą się z niesubstratowym miejscem aktywnym enzymu. Aby związek był aktywny musi posiadać w pozycjach 2' i 5' grupę *t*-butylodimetylosililową oraz konfigurację rybozy. Przykładem takiego związku jest TSAO-T



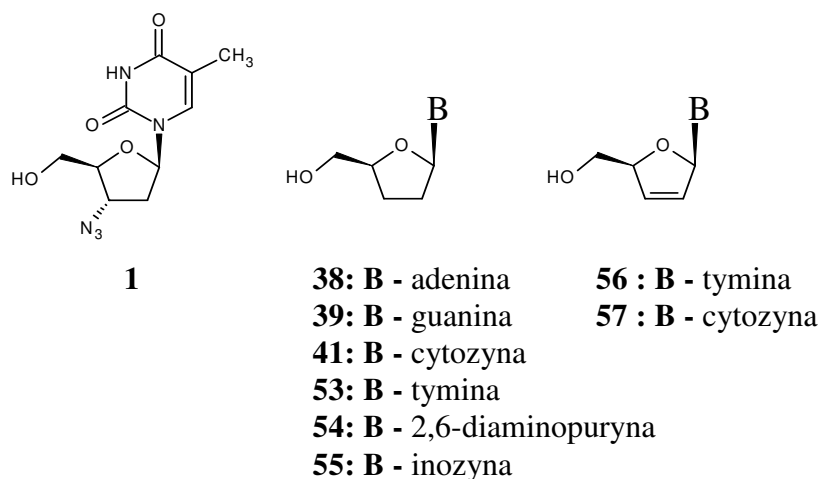
Rysunek 1.1.3.9. Struktury 3'-spironukleozydu TSAO-T.

(**52**, Rysunek 1.1.3.9.).^[67] Wprowadzenie podstawnika alkilowego w pozycji N-3 tyminy znacznie obniża cytotoksyczność związku bez szkody dla aktywności.

1.2. Aktywność biologiczna nukleozydów dimodyfikowanych w pozycjach 2' i 3'

Nukleozydy modyfikowane w pozycjach 2' i 3' są znane od wielu lat i obejmują wiele ważnych analogów o wyjątkowych aktywnościach biologicznych. W tej grupie można wymienić analogi 2',3'-dideoksy (**38**, **39**, **41**, **53**, **54**, **55**, Rysunek 1.2.1.), które są pozbawione obu grup hydroksylowych, analogi dideoksy-didehydro (**56**, **57**), które posiadają wiązanie podwójne między atomami C-2' i C-3', analogi dideoksy posiadające dodatkowe podstawniki w pozycjach 2' i/lub 3' zamiast grup hydroksylowych (**1**), analogi o zmienionej konfiguracji grup hydroksylowych oraz analogi posiadające dodatkowe podstawniki obok grup hydroksylowych. Są to związki ukierunkowane w swym działaniu głównie przeciw retrowirusom. Retrowirusy, jak to było wspomniane wcześniej, posiadają kodowany przez siebie enzym – odwrotną transkryptazę, która przepisuje wirusowe RNA na dwuniciowe DNA, które następnie ulega ekspresji w komórce gospodarza. Toteż inhibitory odwrotnej transkryptazy (enzymu) jak i inhibitory odwrotnej transkrypcji (procesu) – terminatory elongacji łańcucha nukleinowego, stanowią skuteczną metodę hamowania replikacji wirusa.

Aby efekt inhibitorowy został osiągnięty, konieczna jest fosforylacja analogów nukleozydowych do odpowiednich trifosforanów. Retrowirusy nie posiadają własnej kinazy nukleozydowej, dlatego proces fosforylacji musi zachodzić dzięki kinazom komórkowym, co



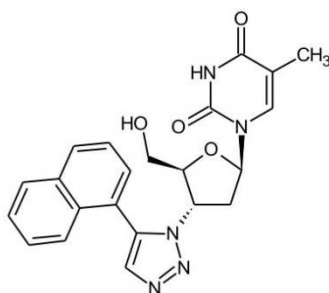
Rysunek 1.2.1. Niektóre dideoksynukleozydy.

od razu niesie ze sobą ograniczenie selektywności działania i zwiększenie toksyczności preparatu. Fosforylacja analogów nukleozydowych przez kinazy komórkowe zachodzą z małą wydajnością i jest to często etap limitujący ich transformację do trifosforanów. Zależy to od konkretnego organizmu i konkretnego nukleozydu. Np. w komórce ludzkiej AZT (**1**) jest

w małym stopniu przekształcana do trifosforanu i kumuluje się w komórce w postaci monofosforanu.^[68] Gdy już ulegnie pełnej fosforylacji działa skutecznie jako inhibitor kompetycyjny enzymu i terminator transkrypcji ze względu na brak grupy 3'OH. Jak już pisano wcześniej AZT posiada wysoką aktywność przeciw wirusowi HIV. Wystarczy przytoczyć kilka parametrów: stała inhibicji AZT-TP wobec HIV-RT typu dzikiego wyniosła $K_i = 0,0075 \pm 0,003$ mM, wobec ludzkiej polimerazy $\alpha K_i > 100$ mM, a wobec polimerazy $\beta K_i = 40 \pm 5$ mM, efektywne stężenie AZT w linii komórkowej zainfekowanej wirusem wyniosło $EC_{50} = 0,004$ μ M, przy cytotoksyczności określonej na poziomie $CC_{50} > 100$ μ M.^[42] Wartości parametrów różnią się w zależności od stosowanej linii komórkowej. Jednak wszystkie wskazują na wysoką aktywność preparatu, a także zadowalającą biodostępność i lipofilowość pozwalającą na przenikanie bariery krew-mózg. Centralny układ nerwowy, czyli mózg, płyn mózgowy oraz płyn rdzeniowo-mózgowy uznaje się za rezerwuar wirusa w późniejszych stadiach choroby, co utrudnia eradykację wirusa.^[69] AZT doczekało się wprowadzenia do leczenia, jednak przy długotrwałym stosowaniu klinicznym ujawniają się efekty uboczne i trzeba uznać AZT za związek o wysokiej toksyczności.^[70] Toksyczność AZT dotyczy głównie problemów hematologicznych jak niedokrwistość makrocytowa, leukopenia i neutropenia. Przy dłuższym stosowaniu może objawić się miopatia – choroba mięśniowa, spowodowana zmniejszoną ilością mitochondrialnego DNA w komórkach mięśni oraz supresja szpiku kostnego. Podawaniu AZT towarzyszą czasami także bezsenność, mdłości i bóle głowy. Dodatkowo, już po 6 miesiącach terapii można zaobserwować uodpornienie się wirusa.^[71]

Jednym z mechanizmów odporności wirusa HIV na działanie AZT (także innych NRTI) jest zdolność sprawnego wycinania AZT-MP (monofosforan AZT) przez RT z końca syntezowanej nici. Reakcja ta może zajść jedynie, gdy powstający oligonukleotyd zakończony AZT-MP jest związany w miejscu wiązania nukleotydu (miejsce wiązania N, pretranslokacyjne miejsce wiązania), a nie w miejscu wiązania P (miejsce wiązania posttranslokacyjne, ang. *priming site*), do którego syntezowana nić jest przenoszona, aby zwolnić miejsce wiązania kolejnego dNTP.^[72,73] Dzięki wspomianej wcześniej reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydku z alkinami w 2013 r. otrzymano serię pochodnych AZT posiadających w pozycji 3' 1,2,3-triazol podstawiony w pozycji 5 dużymi pierścieniami aromatycznymi.^[74] Choć wcześniejsze prace w tym kierunku wskazywały na utratę aktywności w wyniku zamiany gr. azydkowej na 1,2,3-triazol, jednak w tej pracy wykazano, że mogą one posiadać ciekawe właściwości. Związek **58** (Rysunek 1.2.2.) posiada $EC_{50} = 0,067$ μ M względem

wirusa HIV oraz $CC_{50} = 61 \mu\text{M}$. Przy czym wykazuje zwiększoną odporność na usuwanie przez RT, co może wynikać z szybszej translokacji syntezowanej nici cDNA do miejsca P.



58

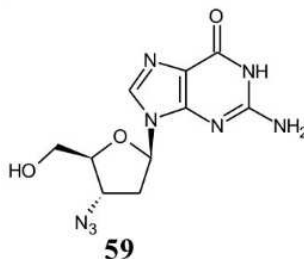
Rysunek 1.2.2. Analog AZT posiadający w pozycji 3' 1,2,3-triazol z dużym pierścieniem aromatycznym.

Didanozyna (ddI, 2',3'-dideoksyinozyna, Videx®, **55**)^[70,75,76] została dopuszczona do leczenia na początku lat pięćdziesiątych jako drugi po AZT lek przeciw wirusowi HIV. Można go podawać osobom o zwiększonej nietolerancji AZT, chociaż również posiada właściwości toksyczne i może powodować np. neuropatię obwodową. Mechanizm działania polega także na terminacji transkrypcji wirusowego RNA i wymaga uprzedniej fosforylacji do trifosforanu. Aktywność *in vitro* ddI plasuje się na poziomie $IC_{50} = 0,01-10 \mu\text{M}$ w zależności od użytej linii komórkowej. Didanozyna ulega wewnątrz komórki fosforylacji do monofosforanu (ddI-MP) i następnie wykorzystując enzymy zaangażowane w biosyntezę nukleotydów *de novo* oraz enzymów tzw. szlaku rezerwowego (ang. *nucleotide salvage pathway*; inaczej „szlak ratunkowy”) jest przeprowadzana do trifosforanu dideoksyadenozyny (ddA-TP), który jest dopiero związkiem aktywnym. Za to ddA jest łatwo przekształcane wewnątrzkomórkowo w ddI poprzez działanie deaminazy adenozykowej również należącej do szlaku rezerwowego. Z tego względu można uważać ddI i ddA (**38**) za formy alternatywne, jednak ddI cechuje się lepszą biodostępnością w podaniu ustnym. Didanozyna nie należy do leków o szerokim spektrum aktywności, posiada dłuższy od AZT czas półtrwania w komórce i posiada stosunkowo wysoki indeks selektywności w stosunku do innych dideoksynukleozydów. Przy okazji można wspomnieć, że ddA zgłoszono również jako związek aktywny przeciw różnym bakteriom gram ujemnym *in vitro*, a także *in vivo* w zainfekowanych myszach.^[77]

2',3'-Dideoksytydyna (zalcytabina, ddC, Hivid®, **41**)^[70,75,78] jest kolejnym typowym przykładem nukleozydowego inhibitora odwrotnej transkryptazy (NRTI). Zsyntezowana w 1967 roku przez Horwitza *et al.*, w roku 1992 została dopuszczona w USA do leczenia jako trzeci NRTI w historii. Aktywność ddC *in vitro* przeciw wirusowi HIV

w badaniach prowadzonych przez zespół S. Brodera^[79] wyniosła $IC_{95} = 0,01 \mu M$. W tym konkretnym układzie wykazała wyższą aktywność od AZT ($IC_{95} = 0,05 \mu M$). W innych badaniach ddC okazała się być nawet 10-krotnie bardziej aktywna. Także biodostępność jest lepsza, bo wynosi 87%. Stwierdzono również zdolność przenikania bariery krew-mózg. Aktywną formą związku jest jego trifosforan, który powstaje poprzez działanie enzymów: dCK (kinaza deoksycytydynowa), kinazy CMP (cytydynomonofosforanowa, cytydylowa) oraz kinazy NDP. Niestety ddC również posiada poważne właściwości toksyczne. Chociaż nie stwierdzono toksyczności hematologicznej jak przy AZT, ale przy dawkach powyżej 0,09 mg/kg i przy dłuższym stosowaniu zaczęła się pojawiać bolesna neuropatia obwodowa oraz kardiomiopatia. Stosowaniu ddC towarzyszą także czasami wykwity skórne, wrzody, gorączka, zapalenie trzustki. Jednym ze stwierdzonych mechanizmów cytotoksycznych zalcytabiny jest inhibicja mitochondrialnej polimerazy γ przez jej trifosforan.^[80] 2',3'-Dideoksycytydyna wchodzi często w interakcje z innymi lekami antyretrowirusowymi, co utrudnia jej stosowanie w terapii. Zalcytabina posiada szersze działanie antyretrowirusowe. W 1987 roku J. Dahlberg *et al.*^[81] wykazali, że ddC jest także skuteczna w hamowaniu rozwoju lentiwirusów (rodzaj wirusów z rodziny renowirusów) osiągając spadek miana wirusowego CAEV (wirus zapalenia stawów i mózgu kóz) o pięć rzędów wielkości już przy stężeniu $1,5 \mu M$. Trifosforan ddC posiada też pewną aktywność przeciw wirusowi VSV.^[82] W 2006 roku Hivid® został wycofany z użycia.

2',3'-Dideoksyguanozyna (**39**) wykazuje podobną aktywność przeciw wirusowi HIV jak ddA.^[75,83,84] Zgłoszono również relatywnie wysoką aktywność przeciw wirusowi Visna^[85] na poziomie $IC_{50} = 0,1 \mu M$. Wirus Visna należy także do lentiwirusów i w pewnym okresie był stosowany jako model w badaniach związków na aktywność antyretrowirusową. Na tej samej zasadzie określono aktywność ddG przeciw kaczemu wirusowi zapalenia wątroby typu B (DHBV), który jest modelem dla ludzkiego HBV. Okazało się, że jest równie wysoka.^[86] W badaniach przeprowadzonych przez J.C. Wu *et al.* stała inhibitorowa trifosforanu ddG wobec HIV-RT wyniosła $0,009 \mu M$, a wobec SIV-RT (odwrotna transkryptaza małpiego wirusa niedoboru odporności) $0,011 \mu M$, co w tym badaniu było lepszym wynikiem niż dla AZT-TP.^[87] Jednak ddG nie doczekała się badań klinicznych i dopuszczenia do leczenia. Podobny los spotkał 3'-azydo-2',3'-dideoksyguanozynę (**59**, Rysunek 1.2.3.). Wstępne badania wykazały selektywną inhibicję replikacji wirusa HIV *in vitro* na poziomie $IC_{50} = 1,4 \mu M$, jednak związek ten nie przeszedł dalszych etapów badań.^[88]

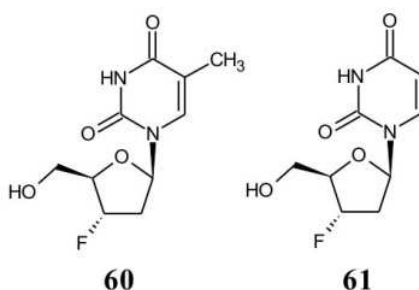


Rysunek 1.2.3. Struktura 3'-azydo-dideoksyguanozyny.

2',3'-Didehydro-2',3'-dideoksytymidyna (stawudyna, d4T, Zerit®, **56**) jest kolejnym ważnym związkiem z grupy NRTI. Zsyntezowano go już w 1964 przez Horwitza *et al.*^[89] Tak samo jak AZT, stawudyna mogła wykazać swoją przydatność dopiero 20 lat później, gdy wybuchła epidemia AIDS. Już w 1994 roku FDA (ang. *Food and Drug Administration*) dopuściła stawudynę do leczenia tej choroby. Lek posiada wysoką biodostępność przy podaniu ustnym oraz korzystny profil farmakokinetyczny. Tak samo jak w przypadku pozostałych NRTI, aktywną formą związku jest jego trifosforan, który powstaje dzięki działaniu kinaz komórkowych. Trifosforan stawudyny inhibuje HIV-1 RT konkurując z naturalnym trifosforanem tymidyny ($K_i = 0,0083-0,032 \mu\text{M}$) i powodując terminację powstającego łańcucha nukleinowego wirusowego DNA. Trifosforan stawudyny, tak samo jak w przypadku pozostałych NRTI, inhibuje komórkowe polimerazy β i γ i znacząco obniża ilość mitochondrialnego DNA. Aktywność *in vitro* stawudyny badano w różnych układach komórkowych i stężenie efektywne w przeprowadzonych badaniach mieściło się w przedziale $EC_{50} = 0,009-4 \mu\text{M}$. Badania wykazały też synergistyczne efekty stosowania stawudyny razem z innymi NRTI jak abakawir (**42**), didanozyna (**55**), tenofowir (**28**) i zalcytabina (**41**). Rybawiryna za to obniżyła aktywność stawudyny 2-5 krotnie, a zydowudyna (**1**) hamowała fosforylację opisywanego leku. Stawudyna nie jest pozbawiona działań niepożądanych. W badaniach klinicznych stwierdzono występowanie neuropatii obwodowej, hepatotoksyczności, nudności, biegunki, leukopenii i wielu innych objawów, tak że można stwierdzić, że stawudyna jest dość toksycznym lekiem. Podobnie jak przypadku innych NRTI, po pewnym czasie stosowania wirus wypracowuje sobie odporność na lek.^[90,91,92,93,94]

W przeglądzie aktywności biologicznych pochodnych nukleozydowych wspomniano wcześniej kilkakrotnie struktury posiadające podstawnik fluorowy w różnych miejscach struktury. Nie jest to kwestią przypadku, ponieważ obecność atomu fluoru lub grupy trifluorometylowej w naturalnie występujących związkach organicznych często prowadzi do

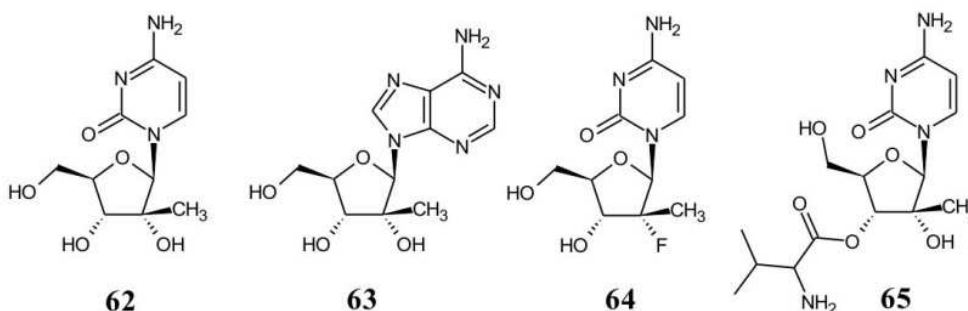
zwiększenia ich aktywności biologicznej. Wynika to z faktu, że podstawnik fluorowy potrafi imitować zarówno grupę hydroksylową oraz atom wodoru, wprowadzając jednocześnie duże zmiany w rozkładzie gęstości elektronowej. Podobieństwo do wodoru wynika ze zbliżonej wielkości promienia atomowego, więc podstawienie atomu wodoru atomem fluoru nie wprowadza wyraźnej zmiany sterycznej. Podobieństwo do grupy hydroksylowej z kolei wynika z faktu, że długość wiązania C-F (1,35 Å) jest bardzo podobna do długości wiązania C-O (1,43 Å). Atom fluoru stanowi dla grupy hydroksylowej tzw. izopolarny i izosteryczny zamiennik, więc mechanizmy rozpoznające substraty w organizmach żywych często dają się oszukać.^[95] Idąc za tym tropem zbadano aktywność anty-HIV dwóch analogicznych pod względem strukturalnym do AZT związków – 3'-fluoro-2',3'-dideoksytymidyny (FddT, **60**,



Rysunek 1.2.4. Struktury FddT i FddU.

Rysunek 1.2.4.) i 3'-fluoro-2',3'-dideoksyurydyny (FddU, **61**). Nie można ich pominąć w przeglądzie, ponieważ posiadają bardzo korzystny profil aktywności *in vitro* z ED₅₀ wynoszącym odpowiednio 0,001 μM i 0,04 μM oraz SI = 197 (**60**) i SI = 400 (**61**).^[96]

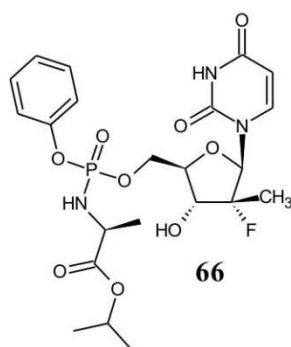
Inną grupą nukleozydów modyfikowanych w układzie *cis*-diolowym są analogi z podstawnikami alkilowymi w pozycjach 2' i 3', a sztandarowym przykładem z tej grupy jest 2'-C-metylocytydyna (**62**, Rysunek 1.2.5.), która okazała się być selektywnym inhibitorem replikacji różnych wirusów RNA takich jak HCV, WNV (wirus Zachodniego Nilu)



Rysunek 1.2.5. Struktura wybranych nukleozydów 2'-C-metylowych.

i DENV (wirus denga).^[97,98] Najbardziej obiecująca wydaje się być aktywność przeciw wirusowi HCV, ponieważ terapia z wykorzystaniem interferonu α (INF- α) i rybawiryny jest bardzo kosztowna, toksyczna i skuteczna jedynie u połowy pacjentów. 2'-C-Metylowe analogi nukleozydowe są silnymi inhibitorami wirusowej polimerazy RNA zależnej od RNA, czyli RdRp (ang. *RNA-dependent RNA polymerase*) wirusa HCV.^[99] Stężenie efektywne **62** wobec HCV w komórkach ludzkiej hepatoblastomy (HuH6) wyniosło $EC_{50} = 0,07 \mu\text{g/mL}$, gdy w tym samym układzie aktywność rybawiryny wyniosła $EC_{50} = 6 \mu\text{g/mL}$.^[100] Podobne właściwości wykazała 2'-C-metyloadenozyna (**63**) z $EC_{50} = 0,17 \mu\text{g/ml}$ w komórkach HuH6, choć okazała się być podatna na działanie deaminazy adenozykowej oraz posiadała niską biodostępność u szczurów. Badania SAR (ang. *structure activity relationship*) analogów purynowych posiadających podstawnik 2'- lub 3'-C-metylowy względem polimerazy HCV zostały opisane w dwóch artykułach zespołu A.B. Eldrup *et al.*^[101,102] W badaniach wykazano, że tylko grupa 2'-C-metylowa powodowała oczekiwaną aktywność i najczęściej analogi guaninowe były bardziej aktywne od adeninowych. Związek **62** stał się strukturą liderową i tak powstały np. 2'-deoksy-2'-fluoro-2'-C-metylocytydina (**64**) z EC_{90} wobec HCV na poziomie $5,40 \mu\text{M}$ przy $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$ oraz walopicytabina (NM 283, **65**), czyli 3'-O-L-walinowa pochodna estrowa 2'-C-metylocytydiny. Walopicytabina cechuje się lepszymi właściwościami fizykochemicznymi, biodostępnością i korzystnym profilem farmakologicznym. W komórce ulega hydrolizie i uwalnia 2'-C-metylocytydynę, która następnie ulega fosforylacji do aktywnej formy trifosforanu.

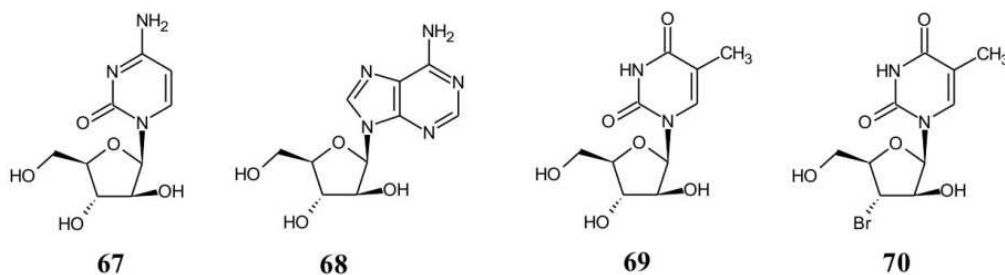
Prace nad tymi pochodnymi nabierają szczególnego znaczenia, gdy weźmie się pod uwagę, że w skali świata szacuje się, że ok. 170 mln osób jest zarażonych wirusem HCV. Związek ten zakwalifikował się do II fazy badań klinicznych prowadzonych przez firmę Novartis, jednak po uzyskaniu wyników dalsze prace zostały wstrzymane po opinii FDA, ze względu na niekorzystny profil korzyści do ryzyka (ang. *risk/benefit profile*). W nurt poszukiwań nowych pochodnych 2'-C-metylowych włączyli się także P. Januszczak, J. Fogt i J. Boryski otrzymując serie pochodnych urydyny i cytydyny z dodatkowymi modyfikacjami w części zasadowej uzyskując związki o aktywności $EC_{50} = 31-85 \mu\text{M}$ wobec HCV.^[103] Stosunkowo nowym odkryciem jest sofosbuwir (Sovaldi®, **66**, Rysunek 1.2.6.).^[104] Lek ten przeszedł szybką ścieżkę i po odkryciu w 2007 roku przez M. J. Sofia z firmy Pharmasset (kupiona niedługo potem przez Gilead za 11 mld \$) już w 2013 r. został dopuszczony przez FDA. Sofosbuwir jest spektakularnym sukcesem zastosowania opracowanej przez zespół C. McGuigana strategii prolekowej ProTide^[105] dla analogów 2'-C-metylowych. Związek **66**



Rysunek 1.2.6. Struktura sofosbuwiru.

po dostaniu się do komórki ulega aktywacji poprzez enzymy komórkowe do monofosforanu 2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-metylocytydyny, który z kolei ulega szybkiej i wydajnej fosforylacji do trifosforanu będącego substratem dla wirusowej polimerazy. Sofosbuwir stosowany w kilkukomponentowym reżimie terapeutycznym m. in. razem z rybawiryną daje skuteczność w leczeniu infekcji HCV > 90%.^[106]

Wśród aktywnych pochodnych nukleozydowych o zmienionej konfiguracji na atomach C-2' i C-3' można wymienić cytarabinę (araC, **67**, Rysunek 1.2.7.),^[107] czyli 1- β -arabinofuranozylocytozynę, 9- β -arabinofuranozyloadeninę (araA, widarabina, **68**)^[108] i 1- β -arabinofuranozylotyminę (araT, **69**).^[109] Cytarabina została otrzymana po raz pierwszy w roku 1959 przez Walwicka *et al.* Już w 1969 roku została dopuszczona do leczenia przez



Rysunek 1.2.7. Struktura wybranych nukleozydów 1- β -arabinofuranozylowych.

FDA. Od tamtej pory jest w użyciu głównie w leczeniu białaczki szpikowej, ostrej białaczki limfoblastycznej i chłoniaków w kombinacji z innymi lekami. Z powodu niskiej ustnej biodostępności, podaje ją się w formie wlewów dożylnych. Jest typowym cytostatykiem, który powoduje poważne efekty uboczne. Mechanizm działania polega na wewnątrzkomórkowej aktywacji poprzez fosforylacje do trifosforanu, który zaburza syntezę DNA w fazie S cyklu komórkowego. Cytarabina posiada również właściwości

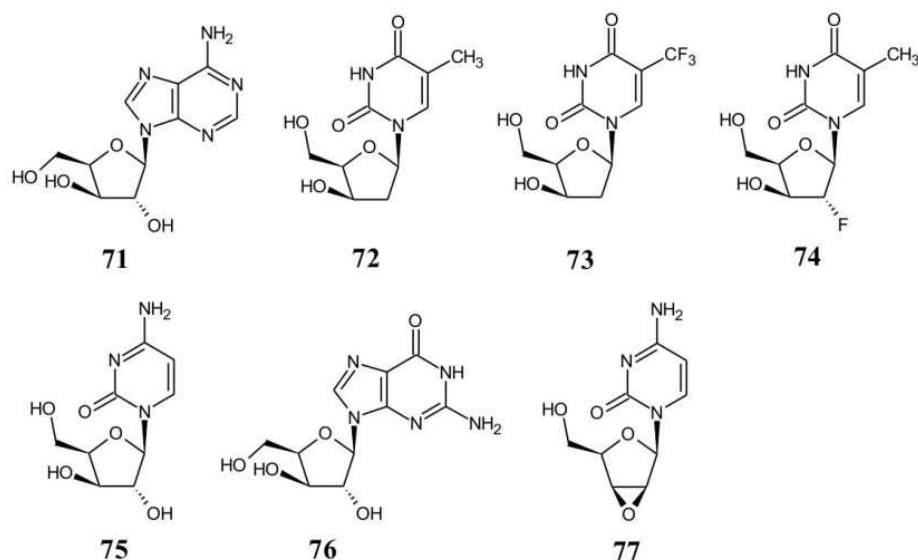
przeciwwirusowe zwłaszcza wobec herpeswirusów. Jednak ze względu na swoją toksyczność nie jest wykorzystywana w leczeniu infekcji. Również araT, otrzymana po raz pierwszy w latach pięćdziesiątych u.w., wykazuje aktywność przeciw herpeswirusom takim jak EBV, HSV-1 i SVV (*simian varicella virus*).^[110,111,112] Jest to o tyle ciekawe, że araT nie wykazuje takiej toksyczności jak araC, choć nie jest jej pozbawiona.

Widarabina (**68**) z kolei jest aktywna wobec wirusów HSV i VZV. Zsyntezowano ją po raz pierwszy w 1960 r. w zespole B.R. Bakera,^[113] choć była pomyślana jako związek przeciwnowotworowy, to jednak znalazła zastosowanie w terapii antywirusowej. Po raz pierwszy zgłoszono jej aktywność wobec herpeswirusów w 1964 r. przez M. Privat de Garilhe i J. de Rudder^[114] i znalazła zastosowanie w leczeniu do czasu wprowadzenia mniej toksycznych leków. Mechanizm działania jest analogiczny – aktywną formą jest powstający w komórce w wyniku działań odpowiednich kinaz trifosforan, który jest inhibitorem kompetycyjnym wirusowej polimerazy DNA i zaburza syntezę wirusowego DNA. Jedna publikacja sugeruje jednak, że aktywność widarabiny nie ogranicza się tylko do wirusów DNA, ponieważ zaobserwowano również jej aktywność wobec wirusa Gross MLV (wirus mysiej białaczki) należącego do retrowirusów.^[115]

Inną pochodną arabinofuranozyłową o istotnej aktywności jest 1-(3'-bromo- β -D-arabinofuranozylo)tymina (**70**). W testach przeciwko *Mycobacterium tuberculosis* wykazała $IC_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$ przeciw szczepowi H37Ra oraz $IC_{50} = 1-2 \mu\text{g/mL}$ przeciw szczepowi opornemu na ryfampicynę i izoniazyd (H37Rv) przy cytotoksyczności $CC_{50} > 100-200 \mu\text{g/mL}$.^[116] *M. tuberculosis* wywołuje gruźlicę, która jest ciągle powszechną i niebezpieczną chorobą zwłaszcza w krajach trzeciego świata oraz w przypadku osób o obniżonej odporności. Co roku z jej powodu umiera ponad milion ludzi na świecie. W 2015 roku znajdowała się na dziewiątej pozycji najczęstszych przyczyn zgonów w rankingu WHO (ang. *World Health Organisation*).

Analogi arabinofuranozyłowe nukleozydów, jak opisano przed chwilą, posiadają czasami bardzo ciekawe aktywności. Czy podobnie jest z pochodnymi ksylofuranazyłowymi? Wiele takich analogów zostało zsyntezowanych i część z nich rzeczywiście posiada pewne aktywności, choć ta grupa nie doczekała się przedstawiciela, który by znalazł zastosowanie w medycynie. W 1965 r. D.B. Ellis *et al.*^[117] po raz pierwszy zgłosiła aktywność przeciwnowotworową 9- β -D-ksylofuranazyloadeniny (ksylo-A, **71**, Rysunek 1.2.8.), co dało asumpt do uznania ksylo-A za strukturę wartą dalszych badań. Zostało to potwierdzone

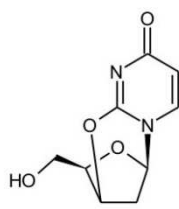
w kolejnych badaniach np. wobec linii komórkowej białaczki L1210, czy wobec komórek B-mix K-44/6, czyli szczyrzyczych komórek transformowanych RSV (*Rous sarcoma virus* – wirus mięsaka Rousa). Istotną aktywność przeciwwirusową *in vitro* **71** wykazała również wobec wirusów takich jak wirus afrykańskiego pomoru świń należące do Asfiwirusów (ASFV) oraz HSV ($EC_{50} = 4,6 \mu\text{g/mL}$ wobec HSV).^[118] Problemem w stosowaniu ksylo-A



Rysunek 1.2.8. Struktura wybranych pochodnych β -ksylofuranozylowych (**71-76**) i 2,3-anhydro- β -D-liksofuranocytozyny.

okazała się jej szybka deaminacja w komórce przez deaminazę adenozykową. Próba zniwelowania tego zjawiska poprzez modyfikacje w pozycji 8 puryny nie przyniosła pozytywnych wyników. Wirus HBV jest jeszcze bardziej rozpowszechniony niż HCV i szacuje się, że zarażonych na świecie jest ok. 2 mld ludzi. W 2010 roku pojawiła się publikacja badająca przydatność różnych pochodnych o zmienionej konfiguracji w pozycjach 2' i 3' wobec infekcji DHBV i HBV.^[119] Z przebadanych związków zasługującą na odnotowanie aktywność przeciw DHBV wykazały związki **72**, **73** i **74** w przedziale $EC_{50} = 3,84-4,13 \mu\text{M}$ ($CC_{50} > 600 \mu\text{M}$ dla komórek Huh-7 – linia komórek ludzkiego raka wątroby). Niestety wobec ludzkiego HBV okazały się być umiarkowanie aktywne z EC_{50} na poziomie 19,23-33,7 μM . W 1986 r. G. Gosselin *et al.* przeprowadzili przesiewowe badania na aktywność przeciwwirusową podstawowych analogów ksylofuranozylowych posiadających naturalne zasady azotowe wobec wirusów: HSV, VV, VSV, Polio, Coxsackie, RV-1 (Reo virus 1), RV 9 (rinowirus typu 9). W badaniu tym zaobserwowano umiarkowane aktywności ksylo-A, ksylo-C (**75**) i ksylo-G (**76**) wobec wirusów DNA jak HSV czy VV na poziomie $IC_{50} = 20-40 \mu\text{g/mL}$. Ksylo-A wykazała także aktywność przeciw wirusowi RNA RV 9. W 1988 roku T. Webb *et al.* zgłosili aktywność 2',3'-anhydro- β -D-liksofuranocytozyny

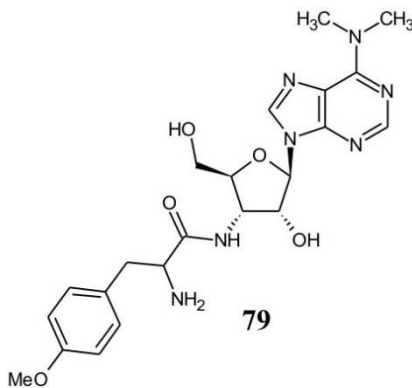
(77) przeciwko wirusowi HIV.^[120] Związek ten już przy stężeniu 0,5-1 μM wykazał dużą zdolność ochrony zakażonych komórek zwiększając kilkukrotnie liczbę żywych komórek. Jednak przy stężeniu 5 μM można było zauważyć efekt cytotoksyczny. Również w 2010 roku pojawiła się praca pokazująca, że stanowiące często etap pośredni w syntezie pochodnych nukleozydowych modyfikowanych w części cukrowej, związki 2,3'-anhydrocykliczne również mogą posiadać ciekawe aktywności. Wśród przebadanych pochodnych najlepszą aktywność wykazała 2,3'-anhydro-2'-deoksyurydyna (78) z $\text{EC}_{50} = 2,5-5 \mu\text{g/mL}$ przeciw wirusowi DHBV, $\text{EC}_{50} = 5 \mu\text{g/mL}$ przeciw HBV przy $\text{CC}_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$.^[121]



78

Rysunek 1.2.9. Struktura 2,3'-anhydro-2'-deoksyurydyny.

Kolejnym przykładem nukleozydów modyfikowanych w układzie *cis*-diolowym jest puromycyna^[122] (79) – 3'-modyfikowana pochodna adenozyiny; związek aktywny przeciwnowotworowo i przeciwbakteryjnie, którego skuteczną metodę syntezy opracowali K. Takatsuki *et al.*^[123] Puromycyna jest antybiotykiem pochodzenia naturalnego uzyskanego ze szczepu *Streptomyces alboniger*. Powoduje przedwczesną terminację łańcucha peptydowego w czasie translacji. Część cząsteczki przypomina koniec 3' tRNA połączonego z aminokwasem, dlatego zajmuje miejsce A w rybosomie, ulega transferowi do powstającego łańcucha peptydowego powodując jego przerwanie. Puromycyna jest aktywna zarówno



79

Rysunek 1.2.10. Struktura puromycyny.

wobec komórek prokariotycznych jak i eukariotycznych, dlatego zapewne nie znalazła zastosowania w medycynie. Wykazuje także działanie inhibitorowe wobec różnych enzymów jak np. proteaza serynowa.

W przeglądzie pojawiał się często skrót NRTI oznaczający nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy. Do tej grupy zalicza się duża liczba związków wymienionych wcześniej. Są one głównym elementem składowym tzw. wysoko aktywnej terapii przeciwretrowirusowej HAART (ang. *highly active antiretroviral therapy*). Jest to zbiór różnych reżimów terapeutycznych składających się z koktajli leków przeciwretrowirusowych należących do różnych klas związków. Prócz NRTI w skład HAART wchodzi także:

- NNRTI, czyli nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy wiążące się z enzymem allosterycznie;
- inhibitory wejścia utrudniające wiązanie się kapsydu wirusa z zewnętrzną stroną błony komórkowej oraz fuzję;
- inhibitory wirusowej proteazy (PI) odpowiedzialnej za dojrzewanie wirionowych elementów białkowych;
- inhibitory wirusowej integrazy (INSTI – ang. *integrase nuclear strand transfer inhibitor*) odpowiedzialnej za wbudowanie wirusowego DNA do DNA komórkowego.

Reżimy terapeutyczne składają się zwykle z dwóch NRTI i dodatkowego składnika innej klasy. Umiejętne żonglowanie składnikami terapii pozwala na uniknięcie lub przynajmniej odsunięcie w czasie powstawania szczepów odpornych na terapię (ang. *multi-drug resistant strains*) i powoduje, że AIDS zaczyna być uznawane za chorobę przewlekłą a nie śmiertelną.

Pisząc o aktywnościach biologicznych modyfikowanych nukleozydów w układzie *cis*-diolowym można wspomnieć również o wykorzystaniu nukleozydów modyfikowanych w pozycji 2' jako elementy składowe antysensowych oligonukleotydów (ASO – ang. *antisense oligonucleotides*). Specjalnie zaprojektowane i zsyntezowane fragmenty oligonukleotydowe wiążą się na drodze komplementarnej hybrydyzacji w właściwym miejscu DNA lub RNA modyfikując poziom ekspresji konkretnych genów i zmieniając tym samym ilość kodowanego białka. W podejściu tym można wyróżnić kilka klas terapeutyków:

- ASO zależne od RNAzy H działające na mRNA,

- exon-skipping ASO, którego działanie polega na zaburzeniu splicingu pre-mRNA.
- siRNA, czyli krótkie interferencyjne RNA działające na mRNA,
- miRNA mimics, co można tłumaczyć jako ASO imitujące mikro RNA, które są odpowiedzialne w komórce za regulację ekspresji genów.

Pod względem chemicznym ASO muszą się cechować zwiększonym powinowactwem wobec kwasów nukleinowych, odpornością na działanie nukleaz oraz odpowiednią lipofilowością. Modyfikacjom ulegają wiązania internukleotydowe w celu zamaskowania hydrofilowych grup fosforanowych, a także pozycja 2' nukleotydów co ma przynieść zarówno poprawę powinowactwa, trwałości dupletu oraz odporność na działanie nukleaz. Popularne są też modyfikacje wymuszające konformacje 3'-endo (North) części cukrowej zwiększające trwałość dupletu np. LNA (ang. *lock nucleic acids*). Wśród stosowanych modyfikacji pozycji 2' są modyfikacje 2'-fluoro, 2'-O-alkilo, 2'-O-2-(metoksykarbonylo)etylo (MOCE), 2'-O-2-(N-metylokarbamoylo)etylo (MCE), 2'-O-metoksyetylo (MOE) i inne. Do tej pory żadna terapia z wykorzystaniem ASO nie została dopuszczona do powszechnego stosowania z powodów trudności w dostarczeniu ich do miejsca działania wewnątrz komórki. Jednak opublikowana niedawno praca przeglądowa^[124] pokazuje, że dzięki różnym strategiom (biokoniugaty, lipidowe nanocząsteczki, wielofunkcyjne makromolekuły promujące uwolnienie z endosomów) dotychczasowe trudności zostały pokonane i nowe terapie pozytywnie przechodzą kolejne etapy badań klinicznych. Potencjalnie ASO mogą stanowić grupę terapeutyków zarówno w chorobach genetycznych, nowotworowych a także w infekcjach wirusowych.

2. Funkcjonalizacja układu *cis*-diolowego rybonukleozydów

2.1. Wprowadzenie

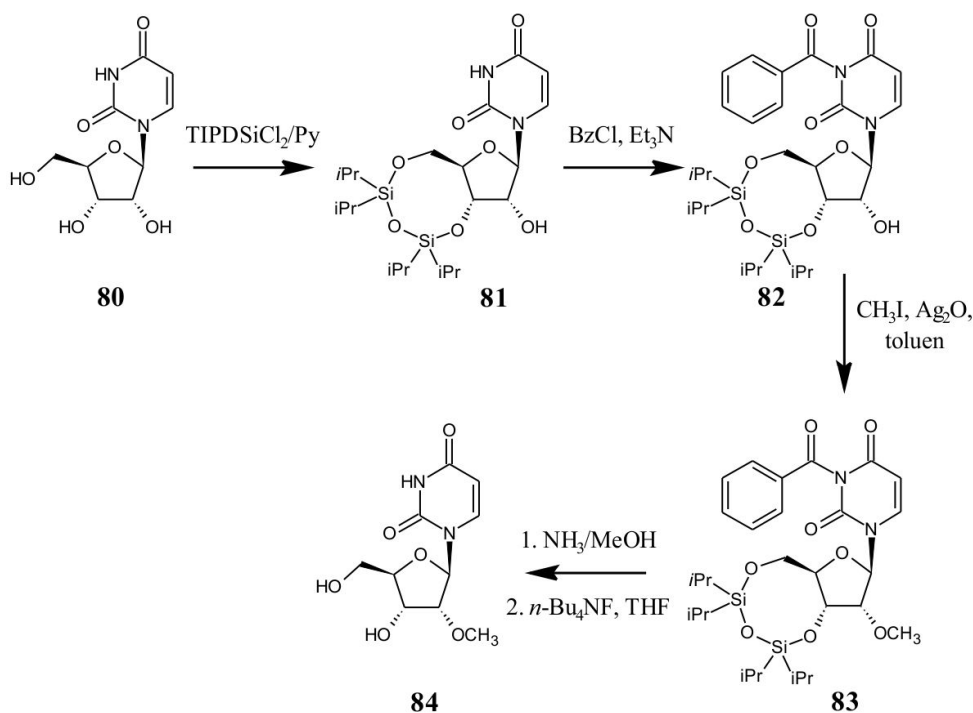
Funkcjonalizacja układu 2',3'-*cis*-diolowego rybonukleozydów jest ciągle interesującym tematem, ponieważ nukleozydy modyfikowane w pozycjach 2' i 3' rybozy mają duże znaczenie w chemii leków jako np. terminatory elongacji DNA lub RNA oraz elementy składowe antysensowych oligonukleotydów (ASO). Wśród sposobów rozróżnienia i funkcyjalizacji wymienionych pozycji można wymienić stosowanie częściowego blokowania grup funkcyjnych, wykorzystywanie mostków anhydrocyklicznych pomiędzy resztą cukrową a częścią zasadową nukleozydów oraz stosowanie struktur epoksydowych zwanych również 2',3'-anhydrocyklicznymi. Połączenie tych narzędzi umożliwia bardzo szerokie możliwości wprowadzania modyfikacji w układzie *cis*-diolowym. Prace nad wymienionymi narzędziami są prowadzone od początków chemii nukleozydów i ulegają ciągłemu rozwojowi w swoich wąskich specjalizacjach, ale czasem warto też wrócić do wcześniejszych publikacji, aby uzyskać szerszy obraz możliwości, jakie dają i dać jeszcze mogą omawiane metody.

2.2. Częściowe blokowanie grup funkcyjnych

W chemii rybonukleozydów najprostszym wydaje się być wprowadzanie modyfikacji w części cukrowej w pozycji 5'. Ze względu na obecność układu *cis*-diolowego można zastosować różne metody jednoczesnego blokowania grup 2' i 3'-OH np. tworzenie cyklicznych ortoestrów, acetalu, ketalu (np. grupa 2',3'-O-izopropylidenu).^[125,126] W ten sposób grupa 5'-OH pozostaje wolna i można ją bezpiecznie, selektywnie modyfikować. Z kolei regioselektywne modyfikowanie rybonukleozydów w pozycji 2' lub 3' wymaga przygotowania odpowiednich syntonów, w których grupa 2'-OH, albo 3'-OH pozostaje wolna. Przygotowanie związków z wolną grupą 2'-OH stało się relatywnie proste, gdy wprowadzono do użycia bifunkcyjne, disiloksanowe grupy symultanicznie blokujące pozycje 3'-OH i 5'-OH jak grupa tetraizopropylodisiloksanowa (TIPDSi) zaprojektowana przez W.T. Markiewicza (Rysunek 2.2.1),^[127] które są relatywnie drogie.

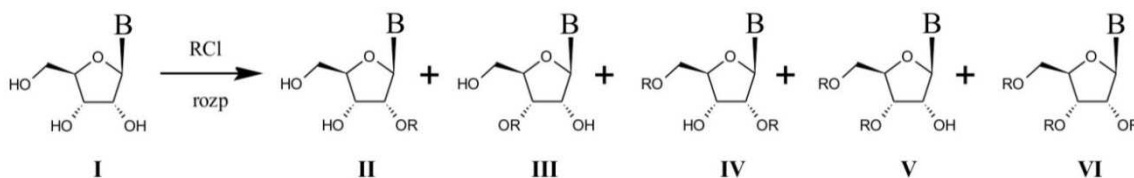
Najbardziej wymagające jest uzyskanie syntonu z wolną grupą 3'-OH. Można go uzyskać przez uprzednie zablokowanie pozycji 5' i 3' grupą Markiewicza, następnie zablokowanie pozycji 2' grupą niemigrującą w układzie *cis*-diolowym (np. grupą eterową jak

grupa trytylowa, tetrahydropiranylowa, allilowa, metoksymetylowa), zdjęcie blokady Markiewicza i selektywne wprowadzenie grupy ochronnej w pozycji 5'. Do tego celu nadają się grupy o dużej zawadzie sterycznej jak grupa trytylowa, piwaloilowa, benzoilowa i *t*-butylodimetylosililowa. Innym wyjściem jest zastosowanie strategii częściowego blokowania wykorzystując różnice w kwasowości i dostępności grup hydroksylowych części



Rysunek 2.2.1. Przykład wykorzystania TIPDSiCl₂ w chemii nukleozydów przez S.K. Roya i J.-Y. Tanga.^[141]

cukrowej. Obliczone w kalkulatorze* wartości pK_a dla grup hydroksylowych urydyny wynoszą 12,7 (2'-OH), 13,0 (3'-OH), 14,6 (5'-OH). Z tych wartości wynika, że w pierwszej



Rysunek 2.2.2. Częściowe acylowanie rybonukleozydów zaprezentowane przez Y. Ishido *et al.*^[128]

kolejności np. acylowaniu ulegać będzie grupa 2'-OH (Rysunek 2.2.2.). W momencie, gdy w układzie *cis*-diolowym jest już jedna grupa ochronna, wówczas ze względów sterycznych kolejne acylowanie zachodzić będzie preferencyjnie na grupie 5'-OH. Przy odpowiednim

* Kalkulator ChemAxon dostępny na stronie <https://epoch.uky.edu>

doborze warunków i wielkości czynnika acylującego można uzyskać duże nadmiary izomeru o wolnej grupie 3'-OH. Dla czynników acylujących warunki częściowego blokowania badano w zespole Y. Ishido^[128] i najlepsze wyniki przedstawiono w Tabeli 2.2.1. Odpowiedni chlorek acylu dodawano kroplami do schłodzonej mieszaniny reakcyjnej. Wykazano, że głównym produktem diacylowania rybonukleozydów był związek 2',5'-O-diacylowany. Mieszaninę oczyszczano na chromatograficznej kolumnie żelowej w celu określenia wydajności diacetylowania części cukrowej. W trakcie oczyszczania na kolumnie zachodziła migracja acylu w układzie *cis*-diolowym. Po kilkukrotnej krystalizacji autorzy uzyskiwali w postaci czystej produkty 3',5'-diacylowane.

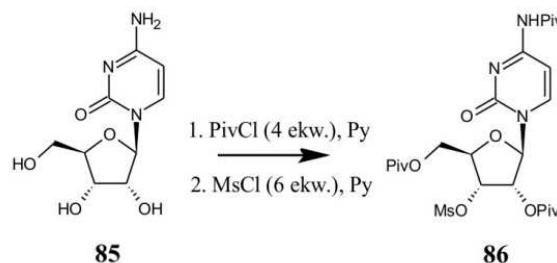
| B | RCl | Ekw. | Rozp. | Temp. | II+III /[%] | IV + V /[%] | VI /[%] |
|-------------------|-------|------|--------|----------|----------------|-----------------------|------------|
| U | BzCl | 2,2 | Py | lód/NaCl | 10 | 75 | 14 |
| U | PivCl | 2,5 | Py | lód/NaCl | - | 97 | - |
| A | BzCl | 2,4 | Py/DMF | lód/NaCl | - | 77 | 21 |
| A | PivCl | 4,0 | Py/DMF | lód/NaCl | - | 77 | 10 |
| C | PivCl | 6,0 | Py/DMF | lód/NaCl | - | 87 | - |
| G | PivCl | 3,3 | Py | t.pok. | - | 75(19 ^{**}) | 6 |
| G ^{iBu*} | BzCl | 2,4 | Py | lód/NaCl | - | 76 | 21 |
| G ^{iBu} | AnCl | 3,0 | Py | lód/NaCl | - | 84 | 12 |

Tabela 2.2.1. Acylowanie rybonukleozydów; Piv – piwaloil, Bz – benzoil, An – anizoil, wydajność po kolumnie chromatograficznej.^[136] * 2-N-izobutyryloguanozyna, ** acylowaniu uległa też grupa egzoaminowa zasady.

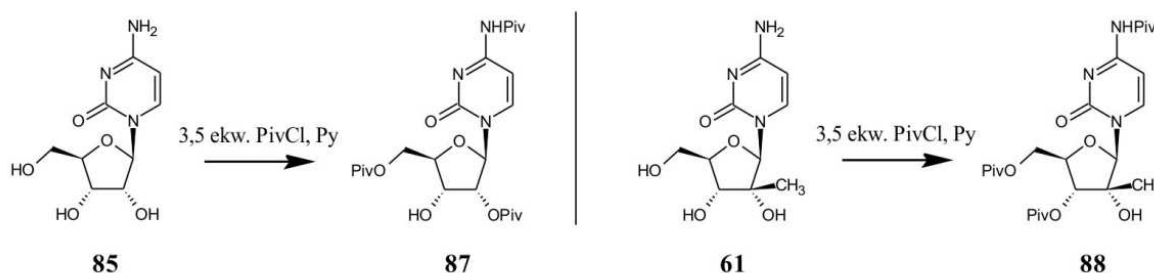
Wyniki te wykorzystano w innych pracach jak np. w syntezie przedstawionej przez M. Kawana *et al.*,^[129] w której autorzy bez oczyszczania, po częściowym piwaloilowaniu w obniżonej temp. przeprowadzili mesylowanie metodą *one-pot*, co jak w przypadku cytydyny (**85**) pozwoliło wyizolować czystą 3'-O-mesylo-4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydynę (**86**, 72%) (Rysunek 2.2.3.), którą w dalszym etapie przeprowadzono do postaci 3'-deoksyarabinofuranozylowej. W przypadku pozostałych nukleozydów udało się uzyskać surową postać analogów mesylowanych, które okazały się w dalszych etapach również prowadzić do pochodnych 3'-deoksyarabinofuranozylowych z wydajnościami 28-56%.

Z kolei J. Fogt *et al.*^[130] (Rysunek 2.2.4.) w swej pracy wykazali, że w wyniku zastosowanej procedury częściowego piwaloilowania cytydyny przy odpowiednim nadmiarze

chlorku piwaloilu (3,5 ekw.) można uzyskać głównie 4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydnę (**87**) i wyizolować ją w postaci krystalicznej. Odwrotny rezultat otrzymano dla 2'-C-metylocytydyny (**61**), ponieważ w wyniku częściowego piwaloilowania uzyskano jedynie 4-N,3',5'-O,O-tripiwaloil-2'-metylocytydnę (**88**).



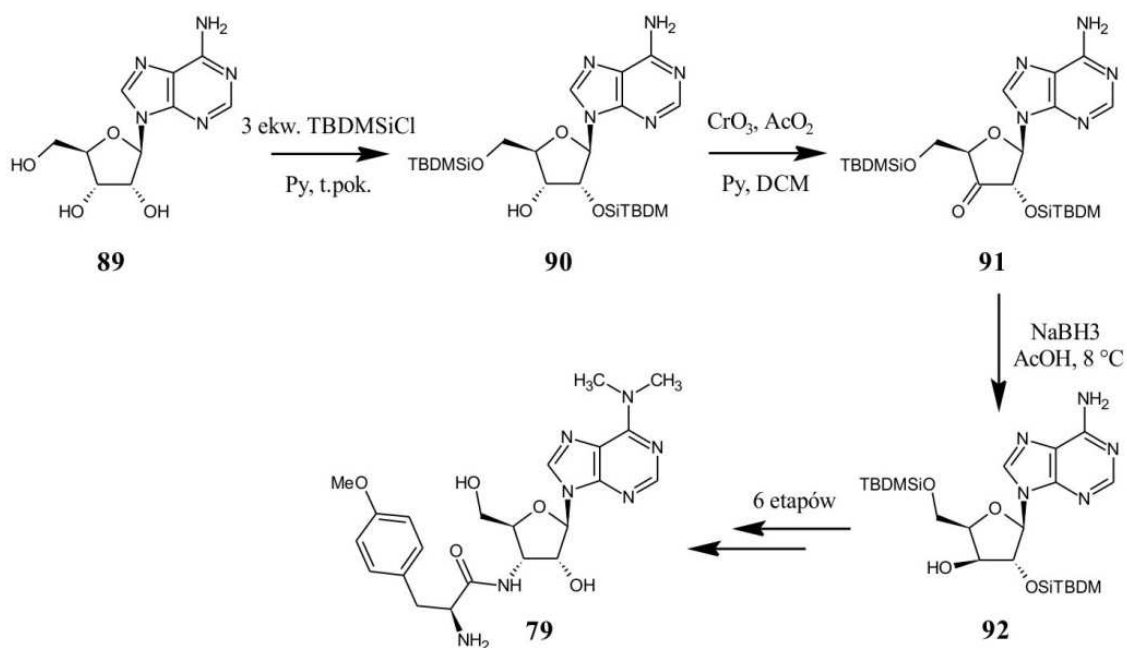
Rysunek 2.2.3. Otrzymywanie 3'-O-mesylo-4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydny .



Rysunek 2.2.4. Częściowe acylowanie cytydny oraz 2'-C-metylocytydny.

Analogicznie do prac na temat częściowego acylowania, w zespole K. Ogilwiego^[131,132,133] wykazano, że prowadzone w normalnych warunkach reakcje częściowego silylowania prowadzą do mieszaniny izomerów 2',5'- oraz 3',5'- blokowanych w niemal równych ilościach. Izomery te można było rozdzielić metodami chromatograficznymi i wyizolować w postaci czystej. Jednak po dodaniu katalizatora w obecności pirydyny udawało się uzyskiwać bardzo duże nadmiary izomeru blokowanego w pozycjach 2' i 5' (Tabela 2.2.2). W roli katalizatora wykorzystywane były AgNO₃, AgClO₄ i (nBu)₄NNO₃. Badania były prowadzone szeroko, na wszystkich naturalnych rybonukleozydach, również na rybonukleozydach uprzednio blokowanych grupą dimetoksytrytylową w pozycji 5' i blokowaną grupą egzoaminową. We wszystkich przypadkach, prócz 2-N-benzoilguanozyny, wyniki były bardzo dobre. Co więcej, gdy do prowadzonych reakcji dodano kolejny reagent – 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (DABCO) lub N-tlenek 4-nitropirydynowy uzyskiwano odwrotną regioselektywność.

W ten sposób otrzymywano duże nadmiary izomerów blokowanych w pozycjach 3' i 5'. Najlepsze wyniki zamieszczono w Tabeli 2.2.2. Podejście to jest często wykorzystywane, czego przykładem może być synteza puromycyny (**79**) i jej analogów opisana przez N.Q. Nguyen-Trung *et al.* w 2003 roku (Rysunek 2.2.5).^[134] W syntezie tej autorzy przeprowadzili częściowe silylowanie adenozyiny (**89**) z TBDMSCl (chlorek



Rysunek 2.2.5. Synteza puromycyny.^[134]

t-butylodimetylosililu) według procedury Ogilviego. Po wyizolowaniu produktów disilylowania – 2',5'-di-O-(*t*-butylodimetylosililo)-β-D-adenozynę (**90**) z wydajnością 60% oraz 3',5'-di-O-(*t*-butylodimetylosililo)-β-D-adenozynę (**91**) z wydajnością 34%, związek **91** poddano izomeryzacji z 2,5% (*v/v*) roztworem Et₃N w MeOH, co pozwoliło podnieść wydajność względem **90** do 85%. Następnie **90** poddano utlenieniu CrO₃ i redukcji NaBH₄ otrzymując 9-(2',5'-di-O-(*t*-butylodimetylosililo)-β-D-ksylofuranosylo)adeninę (**92**), którą poddano kolejnym etapom syntezy.

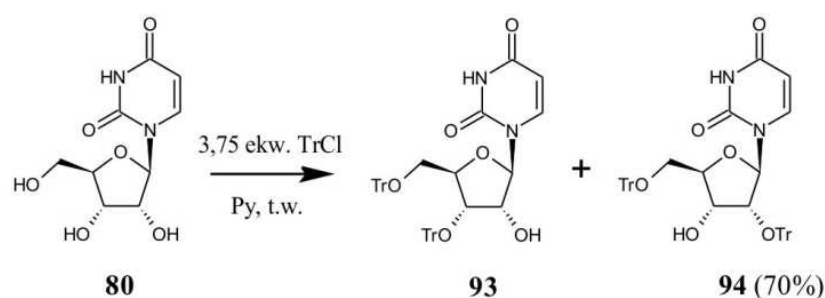
| Nukleozyd | TBDMS-Cl /[mmol] | Katalizator /[mmol] | Zasada /[mmol] | Czas /[h] | Produkt 2',5' /[%] | Produkt 3',5' /[%] |
|-----------|---------------------|-------------------------|-------------------|--------------|-----------------------|-----------------------|
| 5'-DMTr-U | 1,3 | AgNO ₃ (1,2) | Py (3,7) | 1,5 | 70 | 15 |
| U | 2,2 | AgNO ₃ (2,2) | Py (5) | 1 | 90 | 5 |

| | | | | | | |
|------------------|-----|---|-----------|---|----|----|
| A | 2 | AgNO ₃ (2) | Py (5) | 1 | 68 | 22 |
| C ^{Bz*} | 2,2 | AgNO ₃ (2,2) | Py (5) | 1 | 82 | 13 |
| G | 2,2 | AgNO ₃ (2,2) | Py (5) | 2 | 60 | 35 |
| U | 2,2 | AgNO ₃ (2,2) | DMAP (5) | 3 | 80 | 15 |
| U | 2,2 | (<i>n</i> Bu) ₄ NNO ₃ (2,2) | Py (5) | 1 | 87 | 6 |
| U | 2,2 | AgClO ₄ (2,2) | Py (5) | 2 | 90 | 7 |
| 5'-TBDMSi-U | 1,3 | AgClO ₄ (1,2) | Py (5) | 2 | 90 | 6 |
| A | 2,2 | AgClO ₄ (2,2) | Py (5) | 2 | 87 | 8 |
| 5'-TBDMSi-A | 1,3 | AgClO ₄ (1,2) | Py (3) | 2 | 80 | 10 |
| C ^{Bz*} | 2,2 | AgClO ₄ (2,2) | Py (5) | 2 | 90 | 5 |
| G ^{Bz*} | 2,5 | AgClO ₄ (2,5) | Py (6) | 5 | 55 | 40 |
| U | 2,2 | (<i>n</i> Bu) ₄ NClO ₄ (2,2) | Py (5) | 2 | 90 | 5 |
| A | 2,2 | (<i>n</i> Bu) ₄ NClO ₄ (2,2) | Py (5) | 2 | 85 | 5 |
| C ^{Bz*} | 2,2 | (<i>n</i> Bu) ₄ NClO ₄ (2,2) | Py (5) | 2 | 93 | 4 |
| U | 2,3 | AgClO ₄ (2,3) | DABCO (6) | 3 | 5 | 90 |
| 5'-DMTr-U | 1,3 | AgClO ₄ (1,2) | DABCO (6) | 2 | 5 | 91 |
| 5'-TBDMSi-U | 1,3 | AgClO ₄ (1,2) | DABCO (6) | 3 | 5 | 90 |
| C ^{Bz*} | 2,4 | AgClO ₄ (2,3) | DABCO (6) | 3 | 3 | 92 |

| | | | | | | |
|------------------|-----|--------------------------|------------------------------|-----|----|----|
| G ^{Bz*} | 2,6 | AgClO ₄ (2,5) | DABCO (6) | 6 | 30 | 60 |
| A | 2,2 | AgClO ₄ (2,2) | N-tlenek ^{**} (2,3) | 2 | 5 | 89 |
| C ^{Bz*} | 2,2 | AgClO ₄ (2,2) | N-tlenek (2,3) | 2 | 8 | 90 |
| G ^{Bz*} | 2,6 | AgClO ₄ (2,5) | N-tlenek (2,6) | 2,5 | - | 98 |

Tabela 2.2.2. Silylowanie rybonukleozydów [Hakimelahi, G.H. *et al.*].^[132] * C^{Bz}/G^{Bz} – nukleozydy z benzoilowaną grupą egzoaminową; ** N-tlenek 4-nitropirydyny.

Hakimelahi, G.H. z zespołu K. K. Ogliviego w swej pracy^[133] poruszył też temat częściowego dimetoksytrytylowania. Reakcje prowadził również w obecności AgNO₃ i pirydyny. Dla urydyny uzyskał duży nadmiar pochodnej blokowanej w pozycjach 2' i 5' (80%), co jest ciekawym wynikiem, bo grupy trytylowe są odporne na izomeryzację w czasie rozdziału chromatograficznego i izolacja pożądanego produktu z wolną grupą 3'-OH nie następuje z trudnością. W przypadku pozostałych naturalnych rybonukleozydów nie zaobserwowano regioselektywności w tych warunkach. Częściowe trytylowanie jest często wykorzystywane w syntezie pochodnych nukleozydów i nie brakuje przykładów w literaturze począwszy od N.C. Yunga i J.J. Foxa z 1961 roku.^[135, 136, 137] Dość zaskakujące w tym



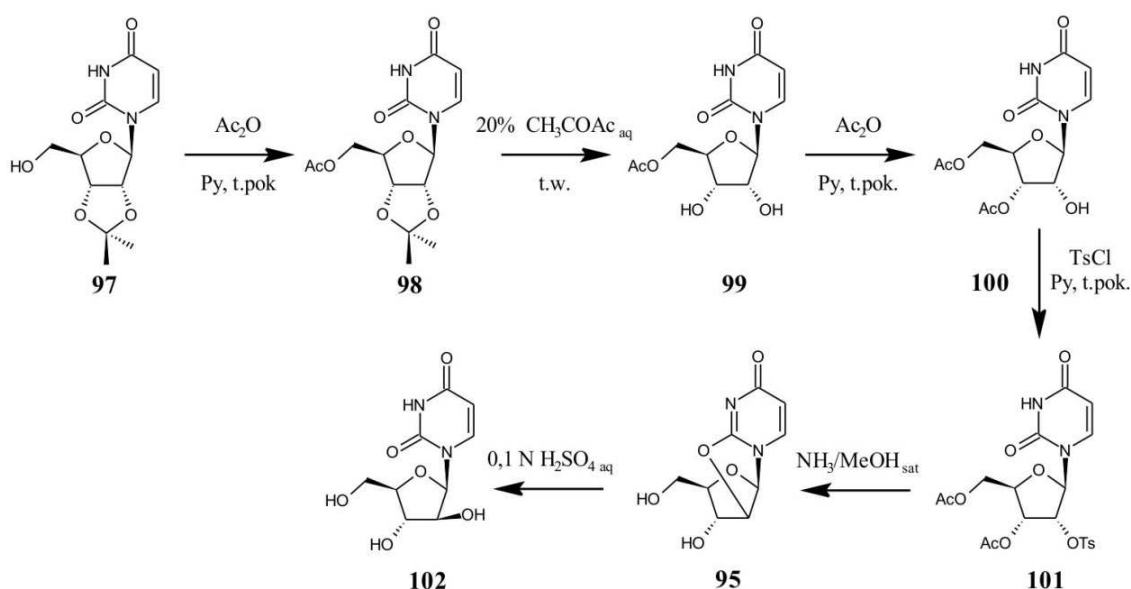
Rysunek 2.2.6. Ditytrylowanie urydyny.^[137]

kontekście było ostatnie doniesienie literaturowe, że 3',5'-di-O-trytylourydyna (93, Rysunek 2.2.6.) inhibuje replikację flawiwirusów (wirusa dengi, wirusa żółtej gorączki) z EC₅₀ ~ 1 μM przy niskiej toksyczności.^[138]

2.3. Funkcjonalizacja z wykorzystaniem struktur anhydrocyklicznych

Pierwszy raz syntezę 2,2'-anhydrourydyny (95) opisali D.B. Brown, A.R. Todd i S. Varadarajan w latach pięćdziesiątych XX wieku^[139] i od tamtej pory silnie badano nowe

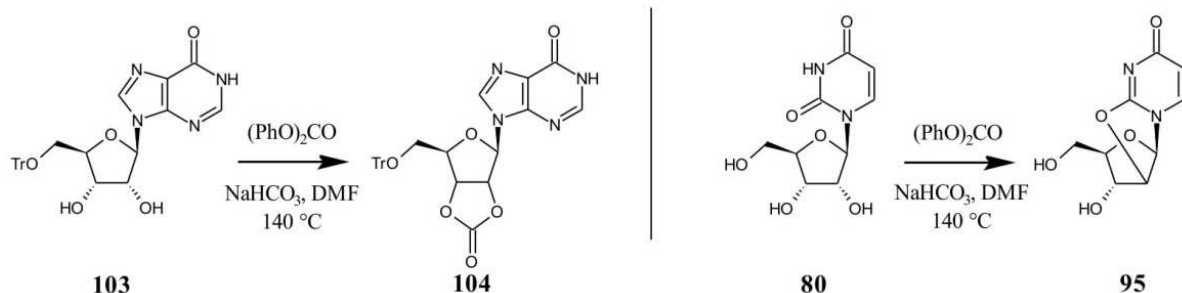
metody syntezy związków anhydrocyklicznych jak i ich zastosowanie. Dzięki swej podatności na substytucję nukleofilową S_N2 z wykorzystaniem różnych nukleofili związki te służą w syntezie pochodnych nukleozydowych modyfikowanych w pozycjach 2' i 3' części cukrowej jak na przykład AZT (**1**),^[140] czy 2'-O-metylourydyna (**96**).^[141] Co więcej, anhydronukleozydy mogą być łatwo przekształcone w pochodne arabino- lub ksylofuranozylowe w warunkach kwasowych^[142] lub zasadowych.^[143] Brown w przedstawionej syntezie (Rysunek 2.3.1.) wykorzystał również częściowe acylowanie z zastosowaniem najprostszego rozwiązania z bezwodnikiem octowym. Częściowe acylowanie z tym odczynnikiem się nie sprawdza, bo reszta kwasu octowego stanowi zbyt małą zawadę steryczną. Jednak Brown próbował obejść ten problem przez uprzednie założenie grupy izopropylidenu, monoacetylowanie w pozycji O5', zdjęcie izopropylidenu i częściowe acylowanie układu *cis*-diolowego. Wydajność tego etapu nie była dobra,



Rysunek 2.3.1. Pierwsza synteza 2,2'-anhydrourydyny D.M. Browna.

ponieważ uzyskano mieszaninę produktu triacetylowanego, pożądanego produktu diacetylowanego oraz substratu. Produkt oczyszczono metodą przeciwprądowej dystrybucji (metoda ekstrakcyjna) w układzie octan etylu – woda, co może uchroniło przed izomeryzacją w układzie *cis*-diolowym i uzyskano jedynie 3',5'-di-O-acetylourydynę (**100**) z wydajnością 17%. W następnym etapie przeprowadzono tosylowanie i produkt (**101**) poddano reakcji w nasyconym amoniakalnym roztworze metanolu. Wbrew oczekiwaniom autorów publikacji, w wyniku ogrzewania w metanolu z amoniakiem zamiast uzyskać 2'-O-*p*-toluenosulfonylourydynę, nastąpiła wewnątrzcząsteczkowa substytucja S_N2 dając cykliczny produkt 2,2'-anhydrourydynę (**95**).

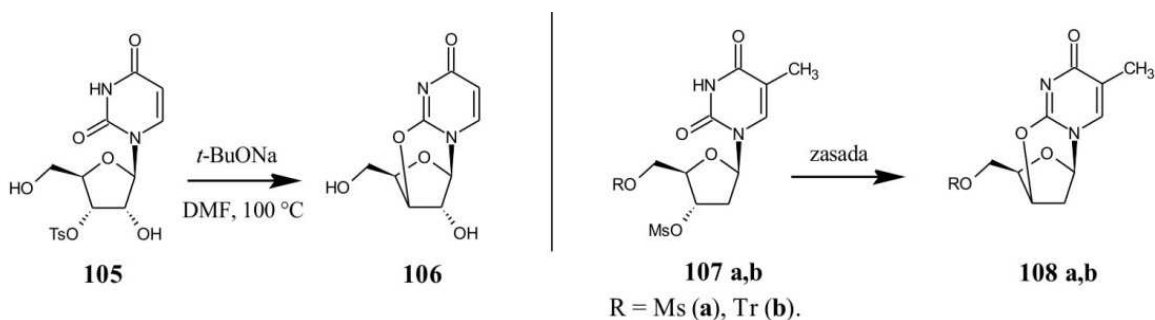
Zostało opisanych szereg metod otrzymywania anhydronukleozydów. W serii rybonukleozydów najlepsze rezultaty otrzymywania 2,2'-anhydrourydyny (**95**) daje metoda z wykorzystaniem węglanu difenyłu oraz wodorowęglanu sodu opracowana przez



Rysunek 2.3.2. Pierwsza synteza 2,2'-anhydrourydyny z węglanem difenyłu Hamptona i Nicola.

A. Hamptona i A.W. Nichola, jako efekt próby uzyskania 2',3'-cyklicznego węglanu nukleozydu (Rysunek 2.3.2).^[144] W pierwszej kolejności Hampton i Nichol wykonali reakcję 5'-O-trytyloinozyny (**103**) z węglanem difenyłu i uzyskali zgodnie z założeniem 2',3'-cykliczny węglan trytyloinozyny (**104**). Analogicznie postąpiono z urydyną (**80**), jednak w tym przypadku produktem okazała się być 2,2'-anhydrourydyna (**95**) z wydajnością 59%. W późniejszych czasach dopracowano warunki tej reakcji i tak w 2000 roku S.K. Roy i J.-Y. Tang przedstawili sposób na syntezę **95** w dużej skali laboratoryjnej (w skali kilogramowej) z wydajnością $> 90\%$.^[141] Reakcja ta nie wymaga żadnych grup ochronnych, dlatego jest tak atrakcyjna.

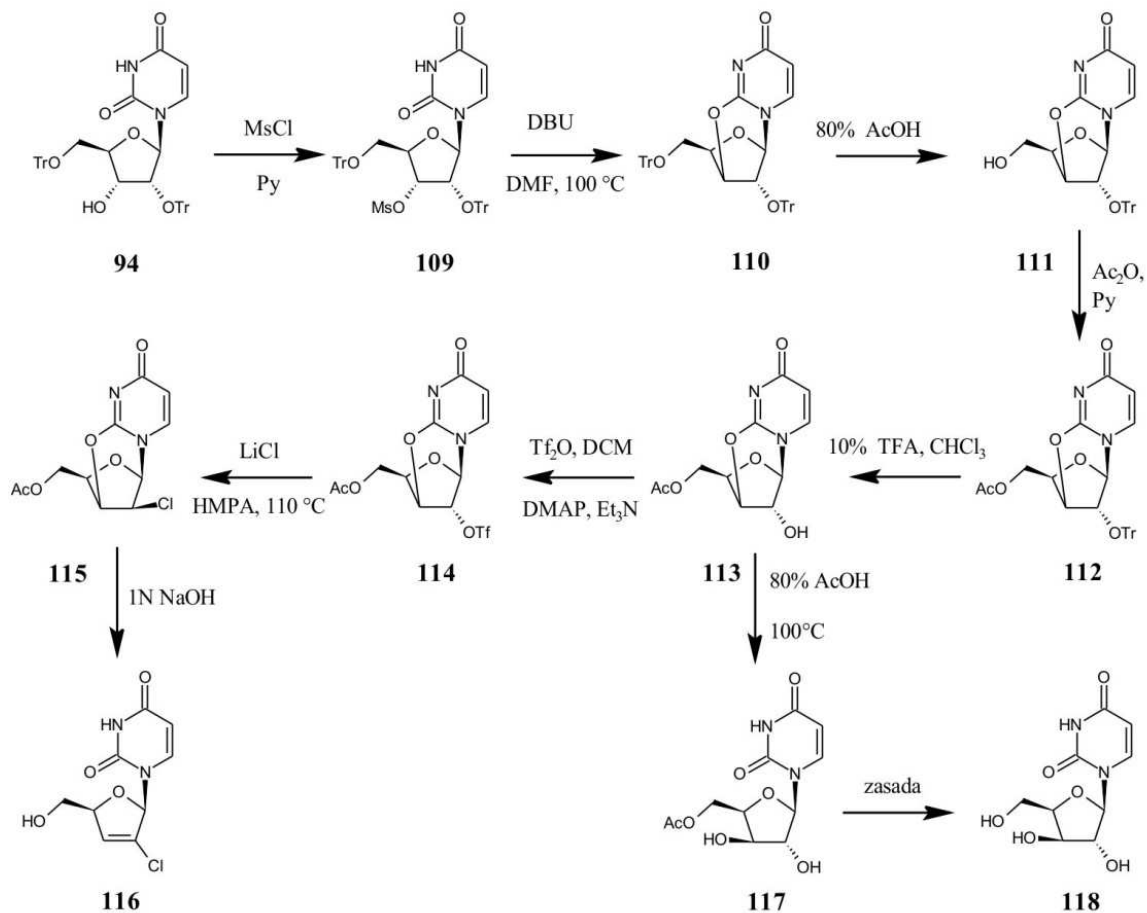
Reakcje cyklizacji wewnątrzcząsteczkowej nukleozydów 2' lub 3' tosylowanych (*p*-toluenosulfonowanych), mesylowanych (metanosulfonowanych) lub tryflatowanych



Rysunek 2.3.3. Pierwsze syntezy pochodnych 2,3'-anhydrocyklicznych nukleozydów pirymidynowych.^[135,145,146]

(trifluorometanosulfonowanych) są często stosowane w syntezie anhydronukleozydów zarówno w serii rybo jak i w serii 2'-deoksy. Wymagają jednak użycia grup ochronnych do przygotowania substratów. Jedni z pierwszych 2,3'-anhydrourydynam (**106**) otrzymali

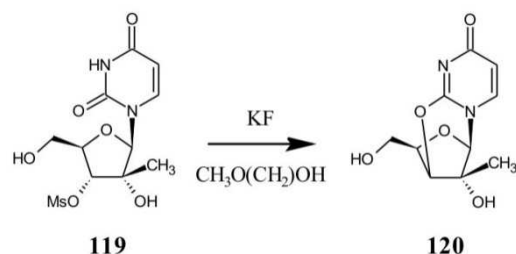
R. Letters i A.M. Michelson^[145] oraz N.C. Yung i J.J. Fox (Rysunek 2.3.3.).^[135] Przygotowaną wcześniej 3'-O-tosylourydynę (**105**) poddano reakcji z *tert*-butanolanem sodu w DMF. Wcześniej A.M. Michelson i A.R. Todd wykonali pierwszą syntezę 5'-O-mesylo-2,3'-



Rysunek 2.3.4. Synteza przeprowadzona przez K. Pankiewicza i K. Watanabe.

anhydrotymidyny (**108a**) z 3',5'-O-di-mesylotymidyny (**107a**) w etanolu nasyconym amoniakiem.^[146] Yung i Fox wykorzystali ditrytylowanie urydyny, grupę mesylową jako grupę odchodzącą i uzyskali 2',5'-di-O-trytylo-2,3'-anhydrourydynę (**110**). Prace te zostały rozwinięte przez J.J. Foxa i N.C. Millera i stwierdzono, że cyklizacje zachodzą w obecności różnych zasad jak ftalimidek potasu, benzoesan sodu.^[147,148] W taki sam sposób jak Yung i Fox, w 1987 roku K. Pankiewicz i K. Watanabe^[149] (Rysunek 2.3.4.) również otrzymali **110**. W tym przypadku zastosowano jako zasadę DBU (1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en). Punktem wyjścia dla tej syntezy była także 2',5'-di-O-trytylourydyna (**94**), którą poddano następnie mesylowaniu (**109**). Tak przygotowany substrat poddano cyklizacji. Autorzy publikacji wykonali dalsze reakcje, pokazując ciekawą możliwość selektywnego odblokowania grupy 5'-OH związku **110** otrzymując **111**. W dalszym etapie poprzez otwarcie

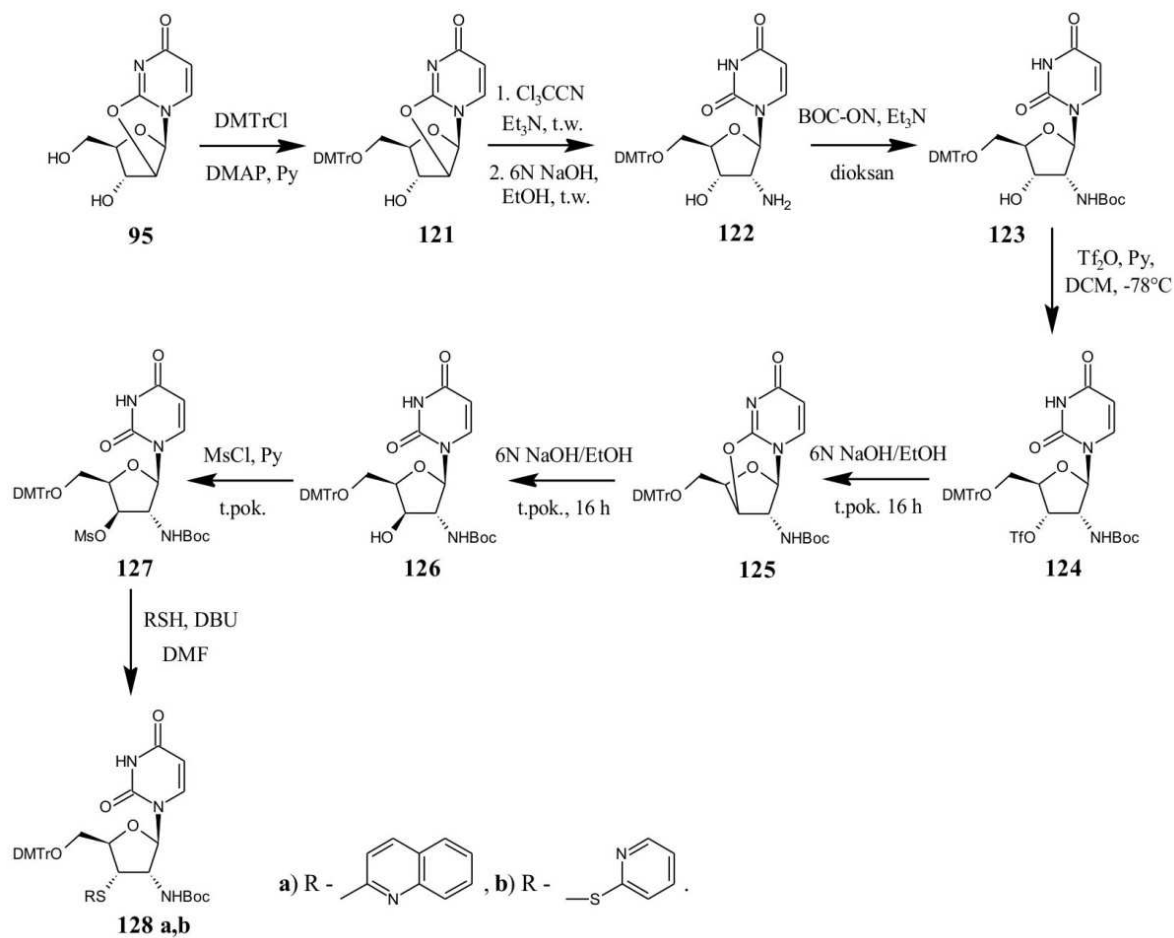
pierścienia w warunkach kwasowych uzyskano znaną już wcześniej ksylourydynę [1-(β -D-ksylofuranozylo)uracyl, **118**].^[150] K. Pankiewicz i K. Watanabe wprowadzili także na grupę 2'-OH 5'-O-acetylo-2,3'-anhydrourydyny (**113**) grupę tryflatową (trifluorometanosulfonową). Tak przygotowany związek poddano substytucji nukleofilowej S_N2 z LiCl i uzyskano 5'-O-acetylo-2,3'-anhydro-2'-chloro-liksourydynę (**115**). Pokazuje to, że atom C-2' był w tym



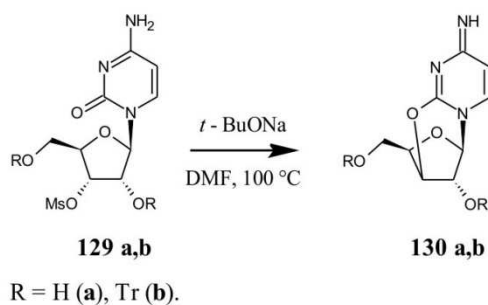
Rysunek 2.3.5. Synteza 2,3'-anhydro-2'-C- metylourydyny.

przypadku lepszym miejscem ataku nukleofilowego niż C-3' lub C-2' mostka anhydrocyklicznego. Przydatność podejścia do cyklizacji z sulfonową grupą odchodzącą może być pokazana również na przykładzie syntezy 2,3'-anhydro-2'-C-metylourydyny (**120**).^[137] Chociaż C. Pierra *et al.* zastosowali w tym przypadku dość zaskakujące warunki cyklizacji (Rysunek 2.3.5.).

To samo podejście zostało zastosowane do syntezy 2',3'-dimodyfikowanych pochodnych urydyny przez Q. Dai i J.A. Piccirilliego (Rysunek 2.3.6.).^[151] W tym przypadku autorzy wykorzystali struktury anhydrocykliczne dwukrotnie. W pierwszej kolejności utworzyli mostek 2,2'-anhydrocykliczny, następnie po zablokowaniu grupy 5'-OH wprowadzono grupę aminową w pozycji 2' na drodze wewnątrzcząsteczkowej substytucji S_N2 z CCl₃CN według koncepcji D.P. McGee (**122**),^[152] zabezpieczono ją grupą *tert*-butyloksykarbonylową (BOC) (**123**) i na grupę 3'-OH wprowadzono grupę tryflatową (**124**). Tak przygotowany związek poddano cyklizacji w warunkach zasadowych z wydajnością 80% (**125**). Uzyskany mostek 2,3'-anhydrocykliczny otworzono w warunkach zasadowych, otrzymując pochodną ksylofuranozylową z wolną grupą 3'-OH (**126**), którą to z kolei zmesylowano (**127**) i poddano substytucji S_N2 różnymi tiolami w obecności DBU (**128 a,b**). Autorzy tej pracy, zamiast grupy tryflatowej, próbowali również wykorzystać do utworzenia mostka 2,3'-anhydrocyklicznego mesyloową grupę odchodzącą. W pracy K. Pankiewicza i K. Watanabe, a także w pracy C. Pierra *et al.*, cyklizacja zachodziła gdy w pozycji 2' była grupa O-trytylowa. Jednak w przeprowadzonej przez Dai i Piccirilliego syntezie, gdy w pozycji 2' była grupa *tert*-butoksykarbonyloaminowa, reakcja ta nie miała miejsca.



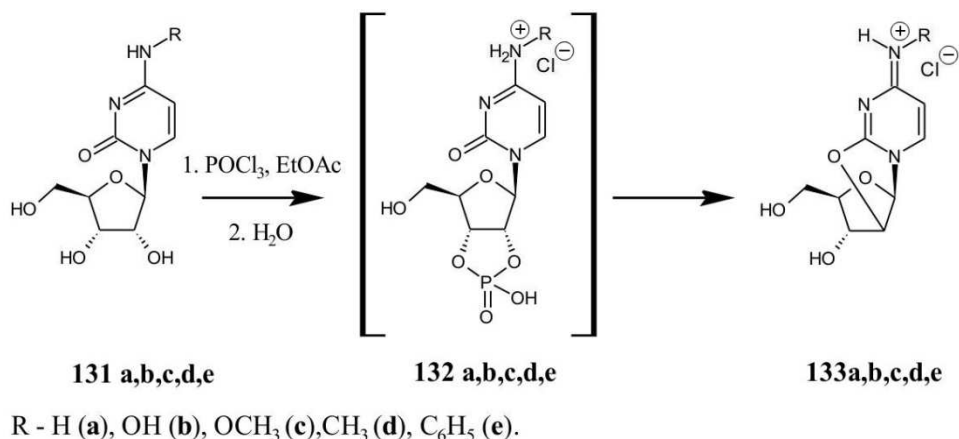
Rysunek 2.3.6. Synteza przeprowadzona przez Q. Dai i J.A. Piccirilliego.



Rysunek 2.3.7. Synteza przeprowadzona przez Y. Mizuno i T. Sasaki.

W przypadku pochodnych cytydyny reakcje cyklizacji zachodzą trochę inaczej. Przykład syntezy prowadzącej do mostka 2,3'-anhydrocyklicznego w serii rybo przedstawili w 1965 roku Y. Mizuno i T. Sasaki (Rysunek 2.3.7).^[153] Cyklizacja zachodziła pomyślnie nawet wtedy, gdy na sąsiednich grupach hydroksylowych były duże grupy ochronne – grupa trytylowa. Wydajność tych reakcji wyniosły 56%, gdy były obecne grupy trytylowe (**130b**)

i 84%, gdy ich nie było (**130a**). Zastanawia jednak fakt, że nikt inny nie powtórzył po autorach tych reakcji. Dużo przykładów w literaturze można za to znaleźć dla cyklizacji pochodnych cytydyny do pozycji 2' rybozy z wykorzystaniem POCl₃ w octanie etylu

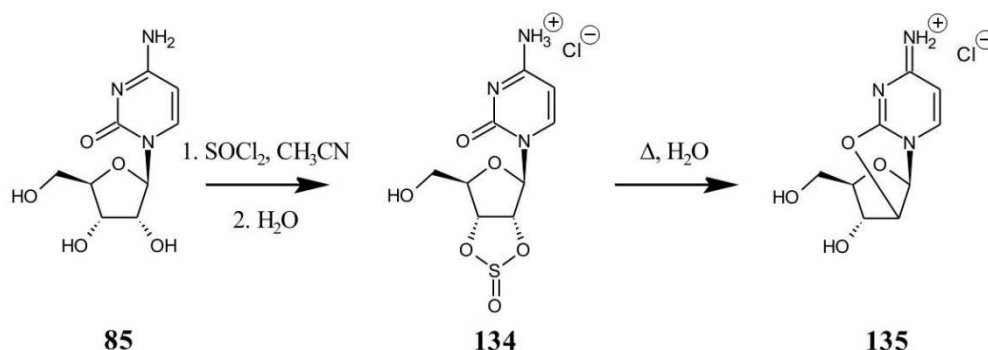


Rysunek 2.3.8. Reakcje zaprezentowane przez T. Kanai, M. Ichino.

z niewielką ilością wody (Rysunek 2.3.8.).^[154,155] Przy czym mechanizm tej reakcji jest inny. W trakcie reakcji tworzy się 2',3'-cykliczny fosforan (**132**), który jest w tych warunkach dobrą grupą odchodzącą. Obecność wody powoduje, że POCl₃ częściowo hydrolizuje z wydzielaniem HCl, dlatego zamiast deprotonacji części zasadowej raczej można mówić o protonacji. Jednak atom tlenu O-2 grupy karbonylowej w części zasadowej cytydyny jest wystarczająco dobrym nukleofilem,^[156] aby zaatakować pozycję 2' w wewnątrzcząsteczkowej reakcji S_N2 dając oczekiwany produkt 2,2'-anhydrocykliczny (**133**). Modyfikacja grupy egzoaminowej cytydyny wpływa na nukleofilowość tlenu karbonylowego O-2. Autorzy przedstawiający tą metodę wyraźnie zaznaczali, że pH w czasie cyklizacji powinno wynosić 4-4,5. Można wnioskować, że w tym przypadku protonacja pomaga zajść reakcji. Historycznie pierwszym, który zaobserwował taką cyklizację był J. Nagyvary.^[157]

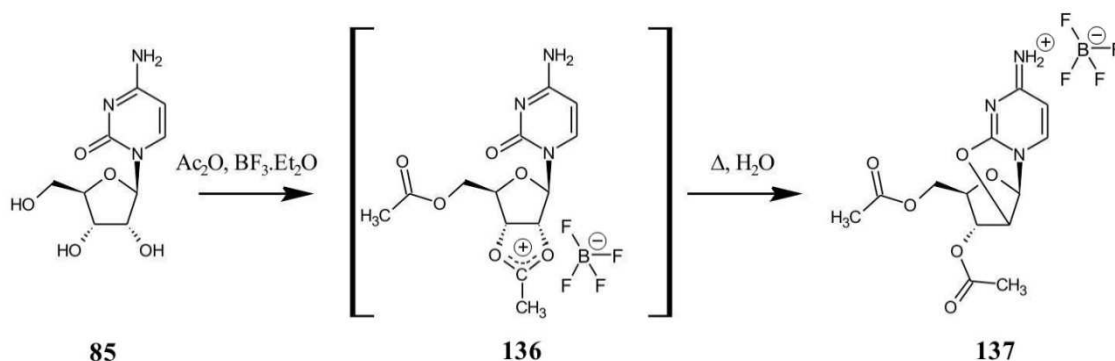
Analogicznie, cyklizację do pozycji 2' rybozy zaobserwowano dla 2',3'-cyklicznego siarczynu cytydyny (**134**) (Rysunek 2.3.9.) uzyskanego w reakcji cytydyny (**85**) z chlorkiem tionylu.^[158] W warunkach kwasowych, po podgrzaniu stwierdzono powstawanie produktu anhydrocyklicznego, którym okazał się być chlorowodorek 2,2'-O-anhydro-(1-β-D-arabinofuranozylo)cytozyny (**135**). W tej samej publikacji przedstawiono 2',3'-cykliczny siarczyn urydyny, który przy użyciu octanu sodu przeprowadzono w odpowiedni związek anhydrocykliczny. K. Kondo *et al.*^[159] w 1977 roku zaproponowali reakcję (Rysunek 2.3.10.), która w jednym etapie z cytydyny pozwala uzyskać 3',5'-di-O-acylo-2,2'-anhydrocytydynę (**137**) w postaci soli dzięki równoczesnemu użyciu reagenta acylującego i kwasu Lewisa.

W pierwszej udanej próbie wykorzystano bezwodnik octowy oraz addukt $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Autorzy



Rysunek 2.3.9. Reakcja cyklizacji z wykorzystaniem chlorku tionylu.

tej publikacji postulują, że produktem pośrednim tej reakcji jest 2',3'-cykliczny jon acetoksoniowy (**136**) (ang. *acetoxonium ion*), który następnie reaguje z tlenem O-2 tworząc mostek 2,2'-anhydrocykliczny. Produktem końcowym jest sól kwasu tetrafluoroborowego i 3',5'-di-O-acetylo-2,2'-anhydrocytydyny (**137**), którą na kolumnie jonowymiennej można przeprowadzić w formę chlorowodoru. Metodę tą zastosowano również z innymi bezwodnikami i chlorkami kwasowymi. W przypadku 2,2'-anhydrocytydyny i jej pochodnych mostek anhydrocykliczny jest dość łatwo otworzyć w warunkach zasadowych – nawet z tak

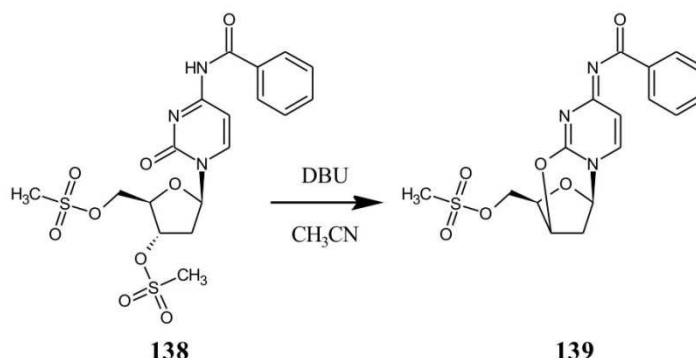


Rysunek 2.3.10. Reakcja zaproponowana przez K. Kondo *et al.*

słabą zasadą jak NaHCO_3 , uzyskując pochodne 1- β -D-arabinofuranozyłowe.

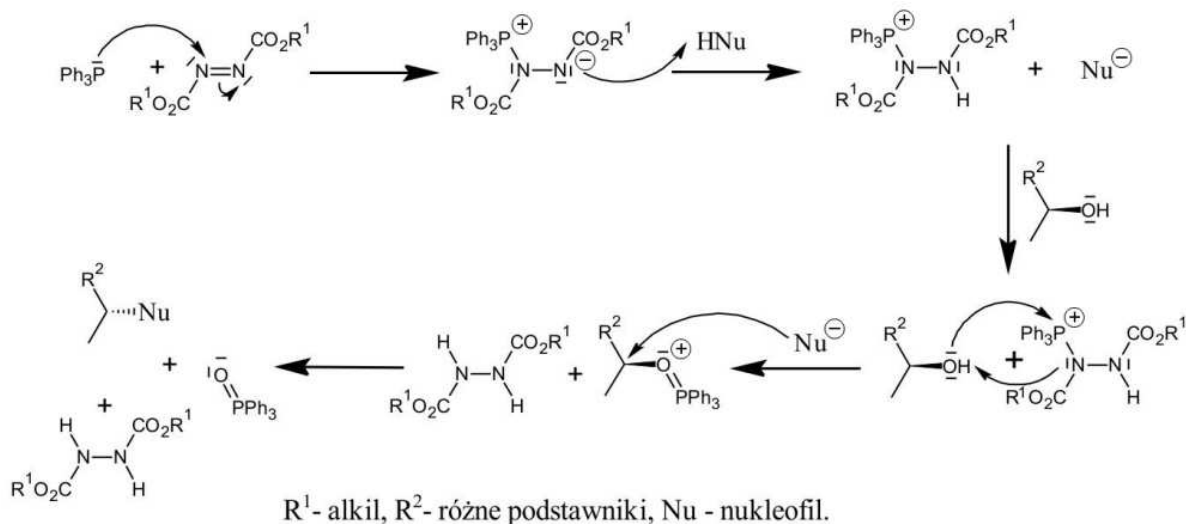
W przypadku 2'-deoksytydyny również znaleziono dość skuteczne metody cyklizacji. Jedną z nich wykorzystuje odchodzącą grupę mesyłową zgodnie z Rysunkiem 3.9.11.^[160] Drugą wykorzystuje niewspomnianą wcześniej reakcję Mitsunobu, która jest kolejnym powszechnie stosowanym sposobem na uzyskiwanie pirymidynowych pochodnych anhydrocyklicznych.^[161] Reakcja Mitsunobu jest szeroko stosowana jako uniwersalna regioselektywna metoda kondensacji pronukleofila z I- lub II-rzędowymi alkoholami

i wymaga redukującego reagenta fosfinowego (np. Ph_3P) i utleniającego azodwiazku jak azodikarboksylian dietylu (DEAD) lub równie często stosowany azodikarboksylian



Rysunek 2.3.11. Reakcja syntezy pochodnej 2,3'-anhydro-2'-deoksycytydyny.

diizopropylu (DIAD). Mechanizm reakcji Mitsunobu jest dobrze opisany^[162,163,164] i można go przedstawić w ogólnej formie jak na Rysunku 2.3.12. Przykładem reakcji Mitsunobu dla pochodnej 2'-deoksycytydyny może być reakcja zgłoszona przez R. Eisenhutha i C. Richerta^[165] i przedstawiona na Rysunku 2.3.13. Reakcja ta jest o tyle ciekawa, że zachodzi z jednoczesnym wprowadzeniem grupy acylowej w pozycji 5'. W swej pracy

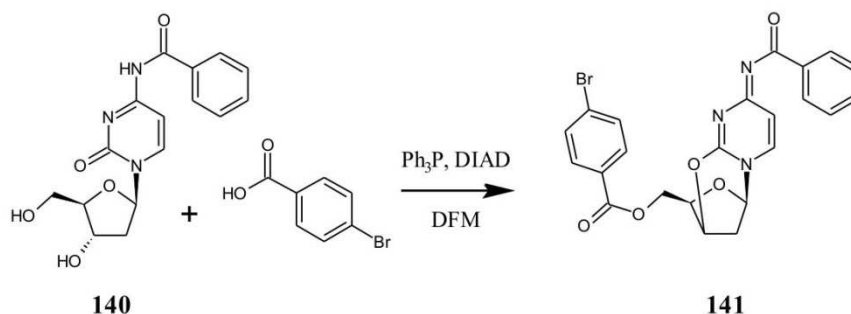


Rysunek 2.3.12. Uproszczony, ogólny mechanizm reakcji Mitsunobu.

bazowali na publikacjach z 1990 i z 1991 roku S. Czerneckiego i J.-M Valéry'ego,^[140,166] którzy taką reakcję wykonali dla tymidyny i opracowali w ten sposób bardzo efektywną syntezę AZT (**1**) (Rysunek 2.3.14.). Chociaż jak wykazano, są pewne możliwości otrzymywania anhydrocyklicznych pochodnych cytydyny oraz 2'-deoksycytydyny, jednak

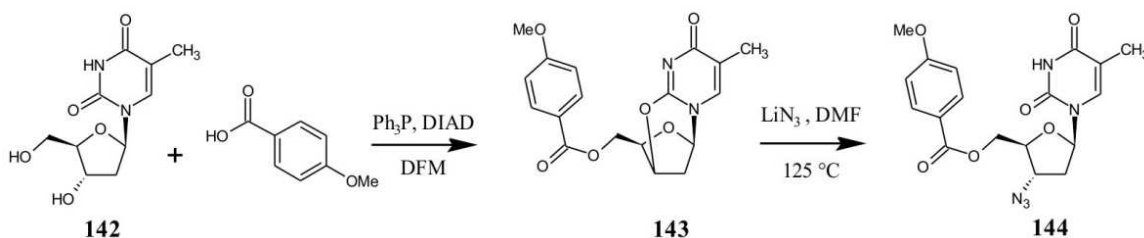
wiele zespołów w swych syntezach woli pracować na urydynie, wprowadzać modyfikacje w części cukrowej i następnie korzystając z dostępnych, znanych metod przeprowadzić uzyskane pochodne urydyny w pochodne cytydyny.^[167,168]

Trzeba wspomnieć, że podobne metody, zarówno z grupą odchodzącą halogenkową lub sulfonową oraz reakcja Mitsunobu, są wykorzystywane także w tworzeniu mostków



Rysunek 2.3.13. Reakcja przedstawiona przez R. Eisenhutha i C. Richerta.^[165]

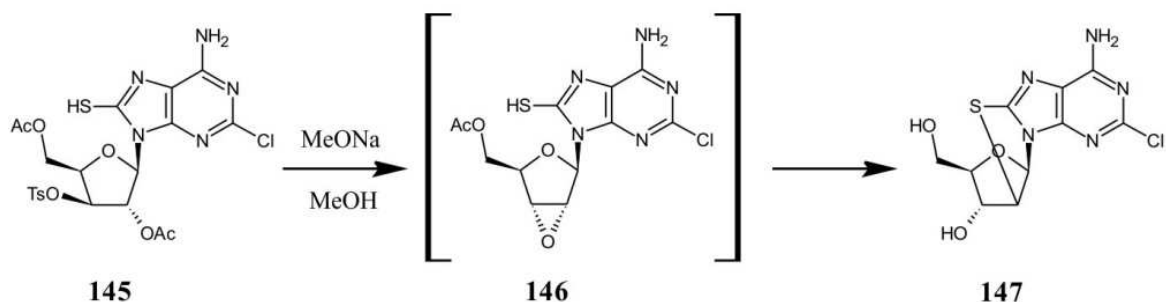
2,5'-anhydrocyklicznych. Jednak w tym miejscu warto poświęcić czas innemu zagadnieniu jakim są reakcje tworzenia mostków anhydrocyklicznych w nukleozydach purynowych. Prace nad tym zagadnieniem rozpoczęli V. Clark, A. Todd i J. Zussman zgłaszając po raz pierwszy cykliczną pochodną puryny w 1951 roku.^[169] Jednak dopiero prace M. Ikehary *et al.*



Rysunek 2.3.14. Tandemowa reakcja Mitsunobu dla tymidyny [S. Czernecki, J.-M. Valéry].^[166]

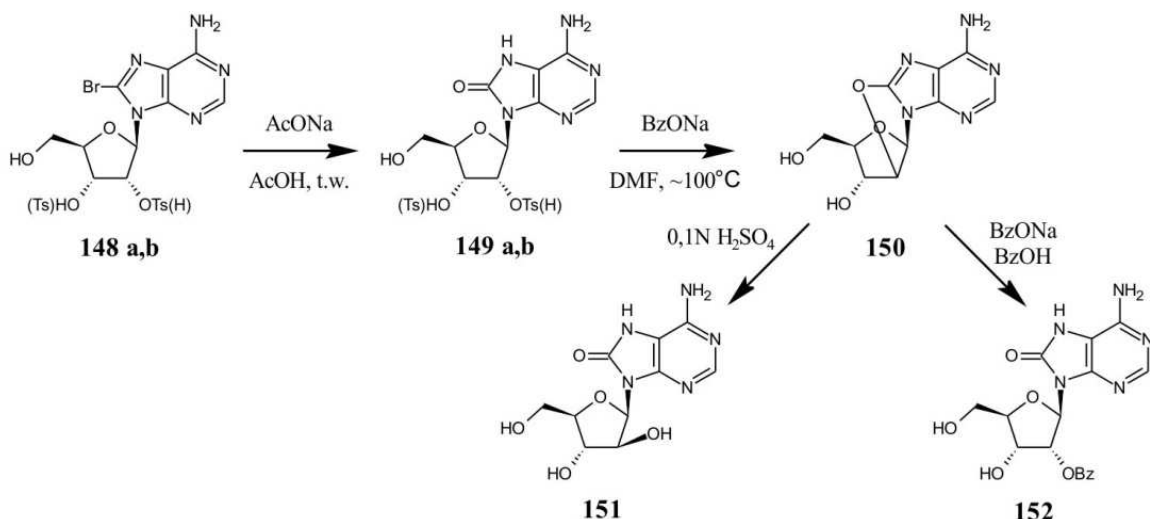
począwszy od 1963 roku gdy przedstawili syntezę 8,2'-S-anhydro-2-chloro-8-merkaptoadenozyny (**147**) (Rysunek 2.3.15.) pchnęły badania we właściwym kierunku.^[170]

Słusznie zauważyli, że po wprowadzeniu w pozycji 8 puryny grupy hydroksylowej lub tiolowej układ będzie przypominał zasady pirymidynowe i można się spodziewać, że będą tworzyły mostki anhydrocykliczne. Autorzy postulowali, że produktem pośrednim przedstawionej reakcji była struktura 2',3'-anhydrocykliczna (**146**) powstała w wyniku wewnątrzcząsteczkowego ataku nukleofilowego atomu tlenu O-2' na atom węgla C-3' z odejściem grupy tosyłanowej. W późniejszym czasie pojawiły się kolejne publikacje dotyczące tego typu przekształceń.



Rysunek 2.3.15. Reakcja przedstawiona przez M. Ikehara *et al.* w 1963 r.^[170]

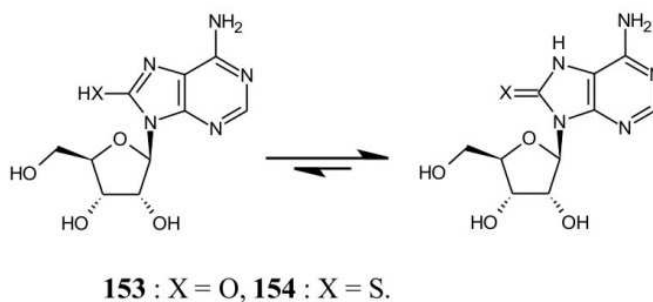
W 1966 roku M. Ikehara przedstawił kolejną syntezę, w wyniku której uzyskano mostek 8,2'-O-anhydrocykliczny.^[171] W pierwszym etapie w pozycji 8 adenozy, z zabezpieczonym układem *cis*-diolowym grupą izopropylidenową, wprowadzono brom metodą Holmesa z N-bromoacetamidem.^[172] Następnie zacetylowano grupę 5'-OH, zdjęto izopropyliden w warunkach kwasowych, przeprowadzono tosylowanie w wyniku którego



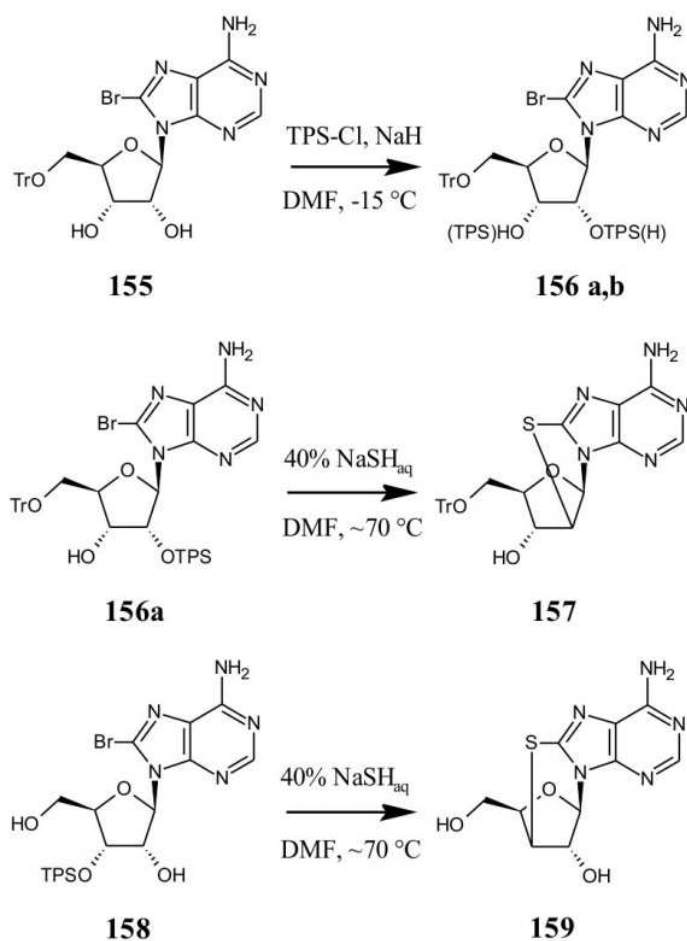
Rysunek 2.3.16. Reakcja przedstawiona przez M. Ikehara *et al.* w 1966 r.^[171]

uzyskano mieszaninę monotosylowanych izomerów w układzie *cis*-diolowym i zdjęto acetyl amoniakiem. Tak przygotowaną mieszaninę dwóch izomerów poddano reakcji z octanem sodu w kwasie octowym w celu podstawienia bromu grupą hydroksylową (Rysunek 2.3.16.). W kolejnym etapie przeprowadzono cyklizację z benzoesanem sodu w DMF (Rysunek 2.3.16). Metodami chromatograficznymi wyizolowano 8,2'-O-anhydro-8-okso-9-(-β-D-arabinofuranozylo)adeninę (**150**). Utworzony mostek 8,2'-O-anhydrocykliczny otworzono w środowisku kwasowym i uzyskano 8-hydroksy-9-β-D-(arabinofuranozylo)adeninę (**151**). Równoległe, do mostka anhydrocyklicznego przeprowadzono skuteczną substytucję

benzoesanem sodu w DMF w obecności kwasu benzoesowego, uzyskując 2'-O-benzoilo-8-oksoadenozynę (**152**).



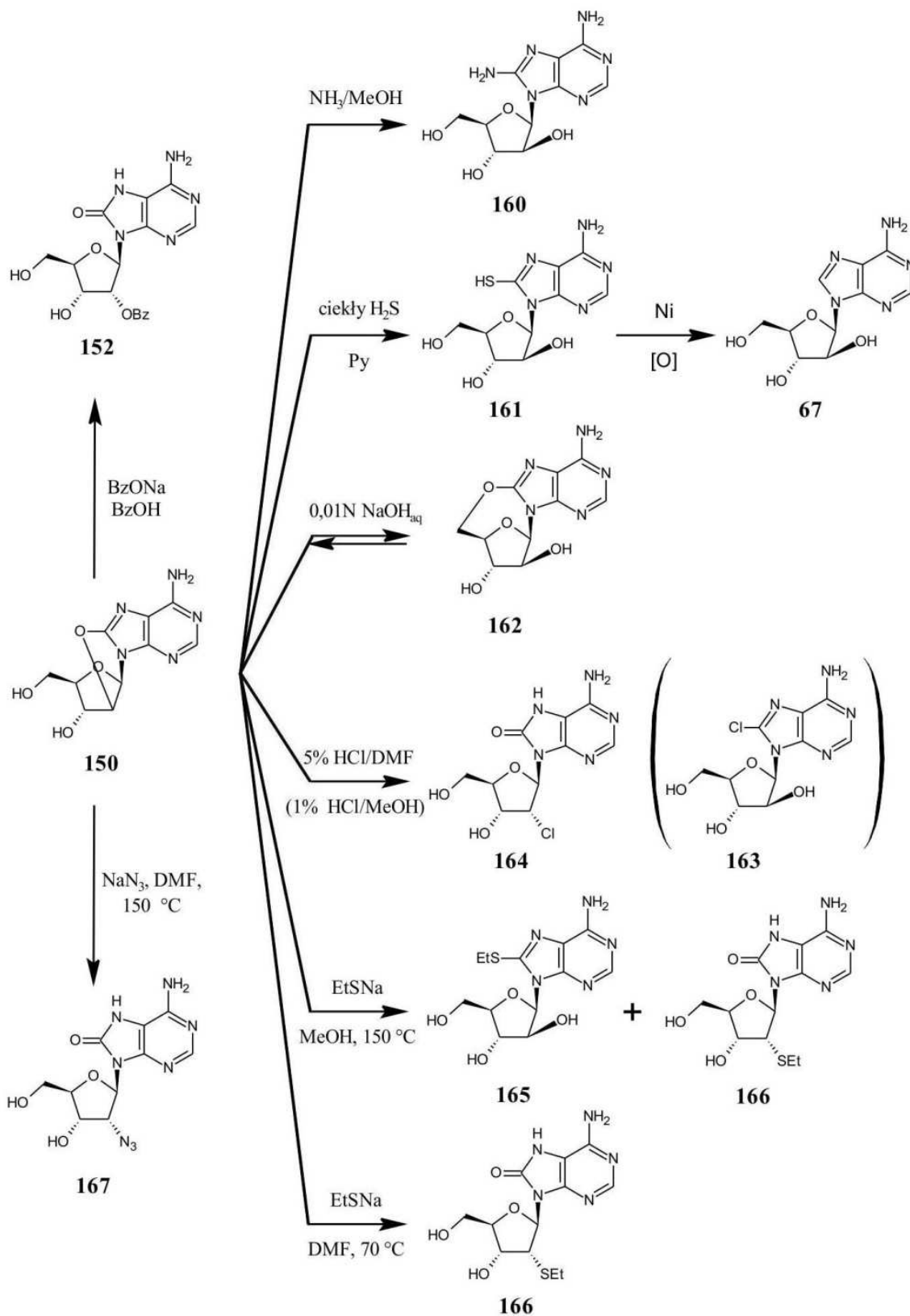
Rysunek 2.3.17. Struktury tautomeryczne 8-okso i 8-tioksoadenozyny.



Rysunek 2.3.18. Synteza zaprezentowana przez M. Ikeharę *et al.* w 1970 roku. TPS-Cl – chlorek 2,4,6-triizopropylbenzenosulfonowy.^[174]

8-Hydroksyadenozyna (**153**), ze względu na lokalizację protonu na atomie N-7 (Rysunek 2.3.17.), jest często nazywana 8-oksoadenozyną i wydaje się, że jest to bardziej poprawna nazwa. To samo tyczy się 8-merkaptoadenozyny (**154**), którą również często można znaleźć pod nazwą 8-tioksoadenozyny.^[173] W przypadku S- i O-anhydrocyklicznych

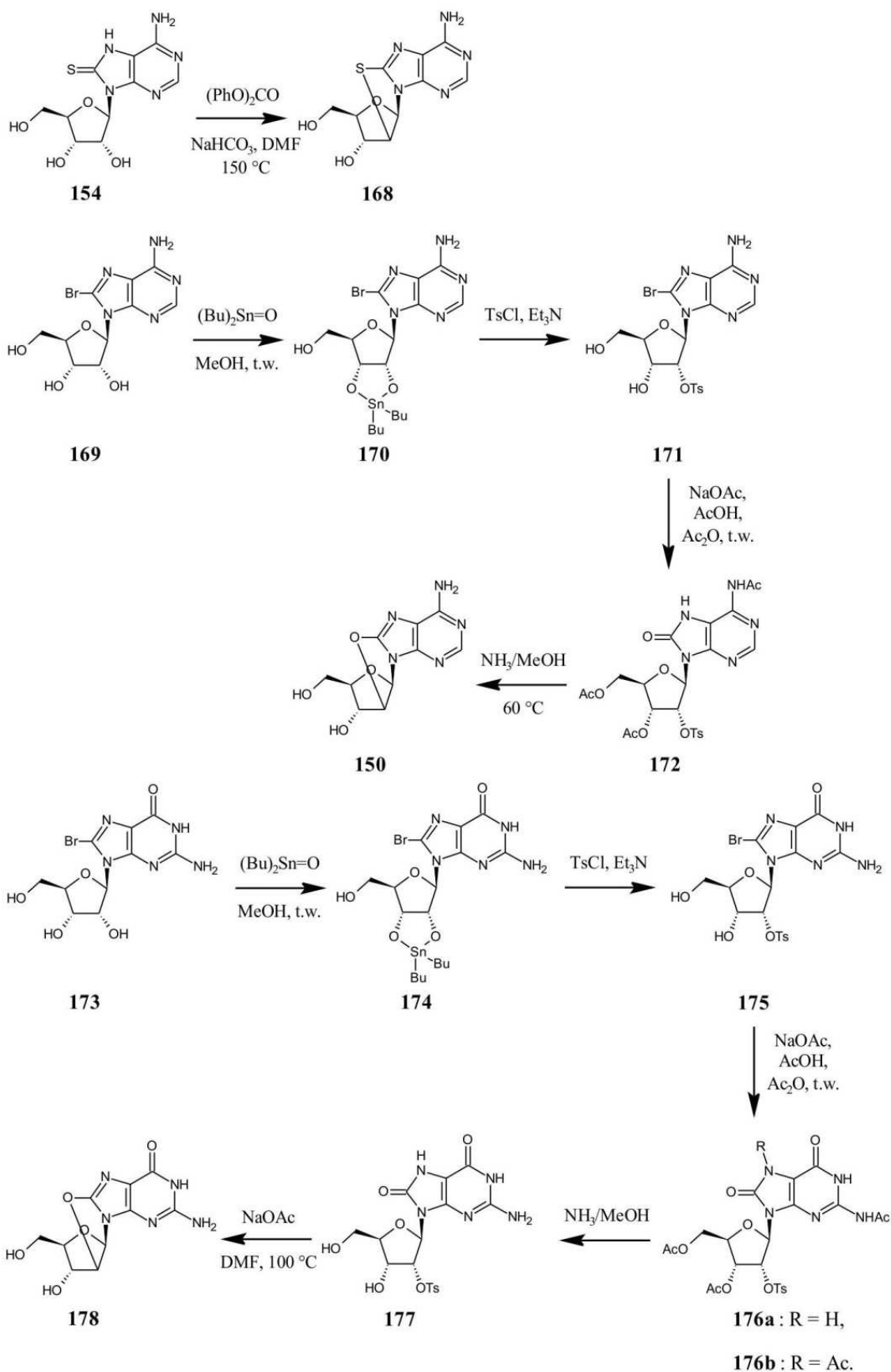
nukleozydów purynowych również można znaleźć w literaturze zamiennie stosowane przedrostki hydroksy/okso i merkapto/tiokso. Jednak wygodniej jest używać krótszej nazwy pomijającej przedrostek, z czym również można spotkać się w literaturze.



Rysunek 2.3.19. Reaktywność 8,2'-anhydroadenozyny.

W 1970 roku M. Ikehara *et al.*^[174] przedstawili kolejną ciekawą syntezę 5'-O-trytylo-8,2'-S-anhydroadenozyny (**157**) i 8,3'-S-anhydroadenozyny (**159**) (Rysunek 2.3.18.). 5'-O-trytylo-8-bromoadenozynę (**155**) poddano monosulfonowaniu chlorkiem 2,4,6-triizopropylbenzenosulfonowym (TPSCl) uzyskując mieszaninę izomerycznych produktów posiadających grupę sulfonową w pozycji O-2' (**156a**) albo w pozycji O-3' (**156b**). Mieszaninę tą można było w znacznej mierze rozdzielić chromatograficznie, ze względu na dużą różnicę w R_f wynikającą z innej konformacji. 8-Bromo-2'-O-(2,4,6-triizopropylbenzeno)sulfonylo-5'-O-trytyloadenozynę (**156a**) poddano reakcji z wodorosiarczkiem sodu w DMF i uzyskano odpowiedni produkt anhydrocykliczny (**157**) z wydajnością 83%. Z analogicznym związkem z grupą TPS w pozycji O-3' i nieblokowaną grupą 5'-OH (**158**) przeprowadzono cyklizację otrzymując produkt – 8,3'-S-anhydroadenozynę (**159**) z wydajnością 43%. Grupę 5'-OH odblokowano, aby nie utrudniała cyklizacji.

W dalszych swych pracach M. Ikehara *et al.* udoskonalali reakcje cyklizacji odpowiednich nukleozydów purynowych i badali ewentualne dalsze ich wykorzystanie (Rysunek 2.3.19.).^[175,176,177,178] Okazało się, że 8,2'-O-anhydroadenozyna (**150**) reaguje z amoniakalnym roztworem metanolu dając produkt substytucji w pozycji 8 zasady – 8-amino-9-(β -D-arabinofuranozylo)adeninę (**160**, 34%) oraz produkty uboczne jak 8-okso-9- β -D-(arabinofuranozylo)adeninę oraz 8,5'-O-anhydro-8-okso-9-(β -D-arabinofuranozylo)-adeninę w proporcjach zależnych od warunków reakcji. W reakcji **150** z ciekłym H_2S w pirydynie uzyskano z wydajnością 74% 8-tiokso-9-(β -D-arabinofuranozylo)adeninę (**161**). Przeprowadzono próby desulfuryzacji otrzymanego związku: na niklu Raneya (41%) lub w warunkach oksydacyjnych np. z H_2O_2 w 0,1N HCl_{aq} (73%) otrzymując araA (**67**). W tym samym artykule opisano również odwracalną izomeryzację w warunkach zasadowych w 0,01N $NaOH_{aq}$ **150** w 8,5'-O-anhydro-9-(β -D-arabinofuranozylo)adeninę (**162**). 8,2'-O-anhydroadenozynę (**150**) poddano reakcji w bezwodnych warunkach z 1% roztworem $HCl/MeOH$ i uzyskano mieszaninę produktów z niewielką ilością 8-chloro-9-(β -D-arabinofuranozylo)adeniny (**163**, 10%), jednak gdy reakcję prowadzono z 5% roztworem HCl/DMF uzyskano z wydajnością 62% 2'-chloro-8-oksoadenozynę (**164**). W reakcji **150** z etanotioianem sodu w bezwodnym metanolu w 150 °C uzyskano mieszaninę związków 8-S-etylo-9-(β -D-arabinofuranozylo)adeniny (**165**) i 2'-etylmerkapto-8-oksoadenozyny (**166**), gdy reakcję prowadzono w 70 °C w DMF uzyskano jedynie produkt **166** z wydajnością 60%. Wyniki te wskazują, że niektóre reagenty

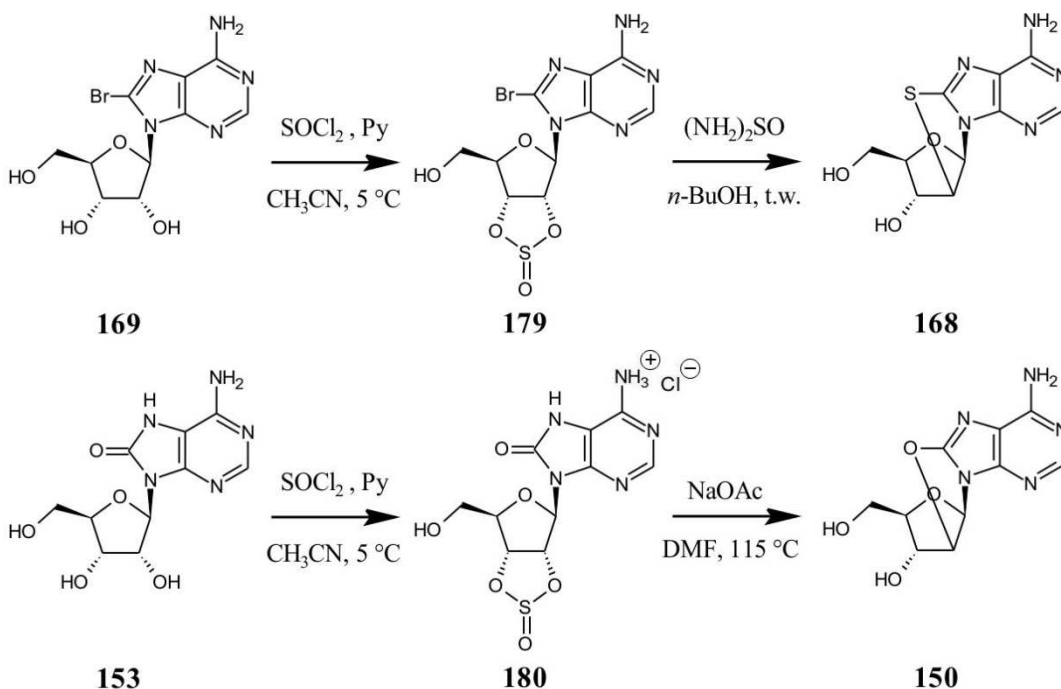


Rysunek 2.3.20. Metody otrzymywania purynowych pochodnych anhydrocyklicznych.

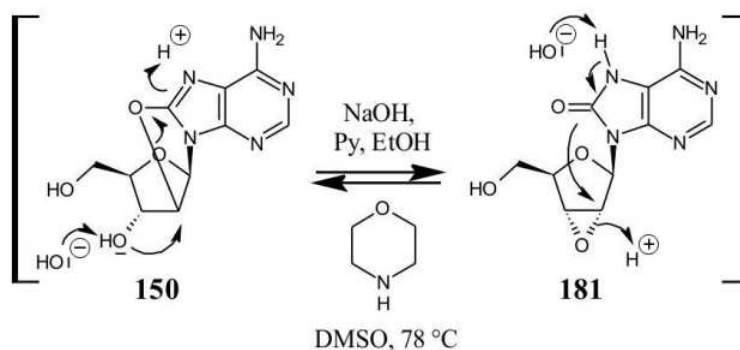
mogą atakować zarówno pozycje 8 jak i 2' mostka anhydrocyklicznego w zależności od

warunków. Autorzy tłumaczą ten efekt w przypadku etanotiolanu sodu innym stopniem dysocjacji w danych warunkach. Bardzo ciekawą syntezę przeprowadził M. Ikehara *et al.* w 1976 r.^[179] W pierwszym etapie tej syntezy **150** poddano reakcji z NaN_3 w DMF w $150\text{ }^\circ\text{C}$ i uzyskano 2'-azydo-8-oksoadenozynę (**167**) z wydajnością 80%.

Przetestowano również możliwość otrzymywania mostków anhydrocyklicznych w reakcji z węglanem difenyłu i węglanem sodu. W przypadku 8-oksoadenozyny (**153**) uzyskano oczekiwany produkt ze śladową wydajnością 3%, ale w przypadku 8-tioadenozyny (**154**) uzyskano oczekiwany produkt cyklizacji (**168**) (Rysunek 2.3.20.) z wydajnością 79%. Inną bardzo ciekawą metodą syntezy anhydrocyklicznych pochodnych purynowych M. Ikehara *et al.* opisali w 1975 roku. W pierwszym etapie 8-bromoadenozynę



Rysunek 2.3.21. Metody otrzymywania purynowych pochodnych anhydrocyklicznych – ciąg dalszy.



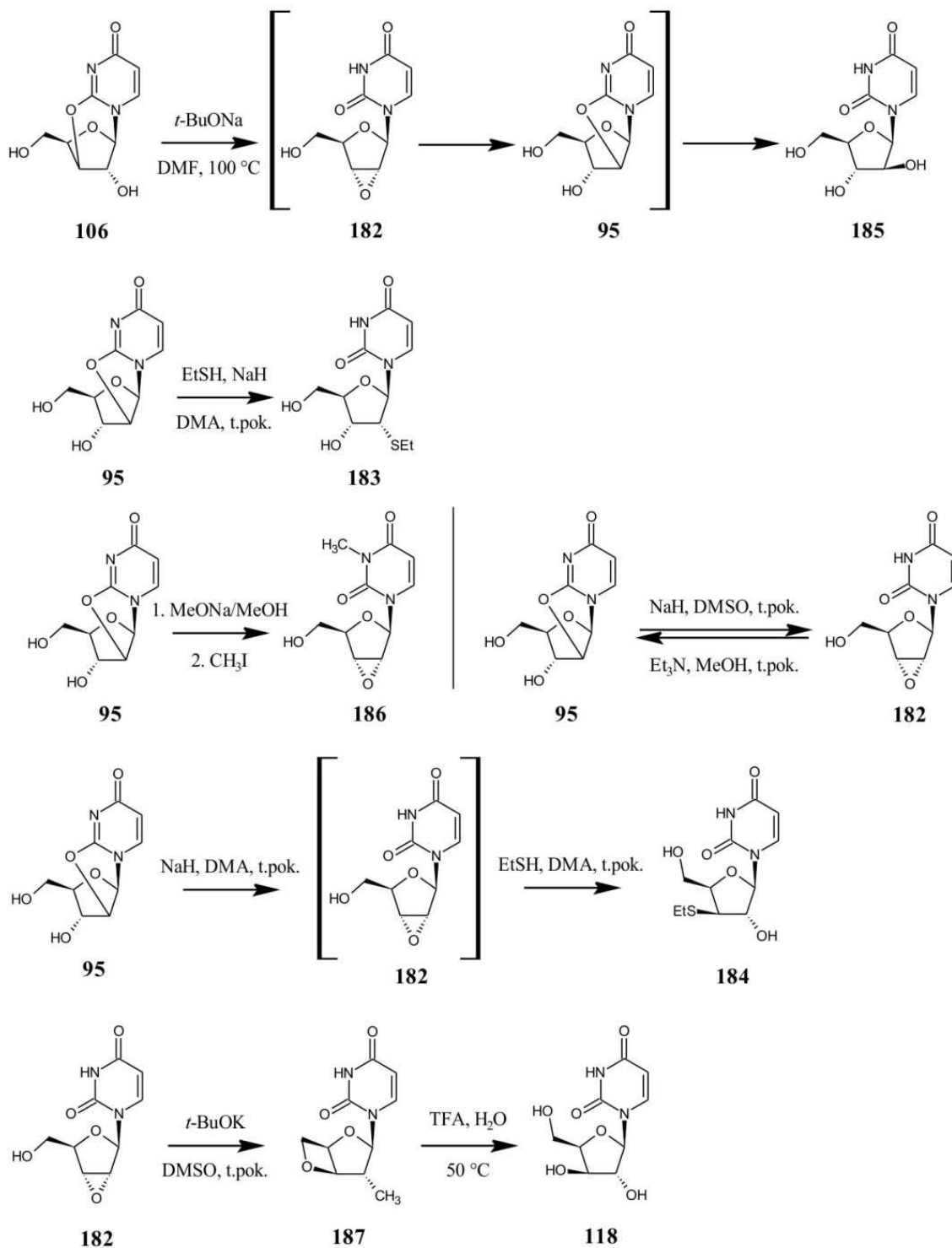
Rysunek 2.3.22. Odwracalna konwersja 8,2'-O-anhydroadenozyny.

(169) poddano reakcji z tlenkiem di-*n*-butylocyny, która prowadzi do 8-bromo-2',3'-O-dibutylocynianoadenozyny (170) zgodnie z metodą opracowaną przez Wagnera *et al.*^[180] Tosylowanie takiego związku w Et₃N daje selektywnie produkt tosylowania w pozycji 2' (171). Następnie przeprowadzono peracetylację, podstawiono brom grupą hydroksylową i wykonano cyklizację w NH₃/MeOH z wydajnością 64%, która dała nieblokowaną 8,2'-O-anhydro-8-oksoadenozynę (150). To samo podejście wykorzystano dla 8-bromoguanozyny (173). W ostatnim etapie do cyklizacji zastosowano octan sodu w DMF i uzyskano po raz pierwszy nieblokowaną 8,2'-O-anhydro-8-oksoguanozynę (178) z wydajnością 45%.

W nurt poszukiwań, tak szeroko prowadzonych przez M. Ikeharę *et al.*, wpisali się także T. Sowa i K. Tsunoda^[181] oraz J. Chattopadhyaya i C. Reese.^[182] Sowa i Tsunoda zaprezentowali reakcje powstawania mostków 8,2'-anhydrocyklicznych dla 8-bromoadenozyny (169) poprzez 2',3'-cykliczny siarczan (179) (Rysunek 2.3.21.). W bezpośredniej reakcji z tiomocznikiem w butanolu uzyskano 8,2'-S-anhydroadenozynę (168) z wydajnością 70%, a w reakcji z octanem sodu w DMF uzyskano 8,2'-O-anhydroadenozynę (150) z wydajnością 44%. Chattopadhyaya i Reese opisali również konwersję 8,2'-O-anhydroadenozyny (150) w warunkach zasadowych NaOH w Py/EtOH do 2',3'-O-anhydro-8-oksoadenozyny (181) (Rysunek 2.3.22.). Konwersję tą udało się odwrócić w reakcji w obecności morfoliny w DMSO.

Analogiczną konwersję przedstawiono dla 2,2'-anhydrourydydy (95) w 1998 roku.^[183] A. Miah, C.B. Reese *et al.* wykazali, że w warunkach zasadowych (NaH) 95 ulega wewnątrzcząsteczkowemu podstawieniu zdeprotonowanej grupy 3'-OH do pozycji 2' mostka anhydrocyklicznego dając 2',3'-anhydrourydydę (182) posiadającą ugrupowanie epoksydowe skierowane pod płaszczyznę pierścienia (Rysunek 2.3.23.). Co więcej, pokazali, że w zależności od kolejności dodawania reagentów w reakcji 95 z etanotiolem w obecności NaH można otrzymać albo 2'-etylmerkaptourydydę (183) albo 1-(3'-etylmerkpto-β-D-ksylofuranozyl)uracyl (184). Swoje badania i rozważania przeprowadzali bazując na wcześniejszych doniesieniach, które sugerowały, że w warunkach zasadowych 95 może ulegać takiej konwersji.^[184,185] Bezpośrednim dowodem na takie zachowanie 95 była przeprowadzona reakcja z metanolanem sodu w pierwszym etapie, a w drugim etapie uzyskaną mieszaninę poddano reakcji z jodkiem metylu, co pozwoliło wyizolować związek o strukturze 2',3'-anhydrocyklicznej – 2',3'-anhydro-N-3-metylourydydę (186). Co więcej, J.G. Buchanan i D.R. Clark^[186] pokazali, że z 2,3'-anhydrourydydy (106) w reakcji z *t*-BuONa można uzyskać 1-(β-D-arabinofuranozyl)uracyl (185). Reakcja ta, według

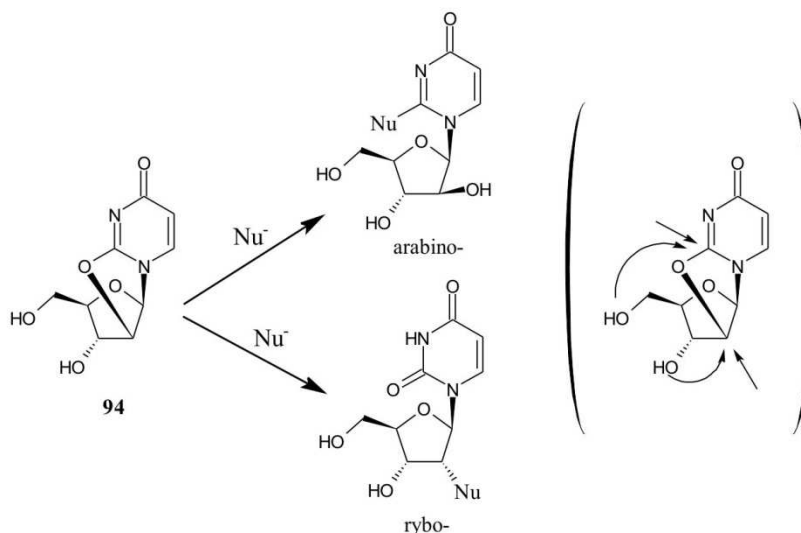
autorów, zachodziła poprzez struktury pośrednie: 2',3'-anhydryurydynę (**182**) oraz 2,2'-anhydryurydynę (**95**). A. Miah i C.B. Reese w wyniku reakcji **95** z NaH wyizolowali **182**, co stanowi ostateczne potwierdzenie, że taka konwersja zachodzi. Przedstawili również ciekawe wykorzystanie struktury **182** poprzez poddanie jej reakcji z *t*-BuOK w wyniku której



Rysunek 2.3.23. Wzajemne relacje 2,3'-anhydryurydyny, 2,2'-anhydryurydyny i 2',3'-anhydryurydyny oraz ich reaktywność. DMA – dimetyloanilina

uzyskano związek 3',5'-anhydro-1-(β -D-ksylofuranozylo)uracyl (**187**), a następnie w wyniku otwarcia mostka anhydrocyklicznego w warunkach kwaśnych uzyskano ksylourydyne (**118**).

Reaktywność 2,2'-anhydrourydyny (**95**) i jej blokowanych pochodnych została dobrze opisana. Nie sposób przytoczyć wszystkich zastosowań, ale można to zagadnienie streścić



Rysunek 2.3.24. Reaktywność 2,2'-anhydrourydyny.

bazując na kilku najważniejszych publikacjach.^[187,188,189,190] Związek **95** i jej pochodne ulegają reakcjom z różnymi nukleofilami zarówno w reakcjach międzycząsteczkowych jak i wewnątrzcząsteczkowych. Zachodzą one poprzez mechanizm substytucji S_N2 z którym konkuruje mechanizm eliminacji $E2$. Generalnie, można wyróżnić dwa miejsca ataku nukleofila: pozycja 2 uracylu lub pozycja 2' rybozy, jednak rzadko obserwuje się mieszaninę produktów i zwykle powstaje jeden produkt podstawienia albo w pozycji 2, albo w pozycji 2' (Rysunek 2.3.24.). W reakcjach wewnątrzcząsteczkowych regioselektywność jest wymuszona przez strukturę cząsteczki. W reakcjach międzycząsteczkowych regioselektywnością rządzą inne reguły.

W przytoczonej publikacji Q. Dai *et al.* z zespołu J.A. Piccirillego można znaleźć próbę określenia jednej z nich. Autorzy na podstawie doniesień literaturowych doszli do wniosku, że o regioselektywności podstawienia decyduje rodzaj atomu nukleofilowego, ale także elektroujemność atomu sąsiadującego z atomem nukleofilowym (Tabela 2.3.1). W przypadku nukleofili azotowych znane są bezpośrednie substytucje z amoniakiem, aminami I-rzędowymi oraz z azydkami.

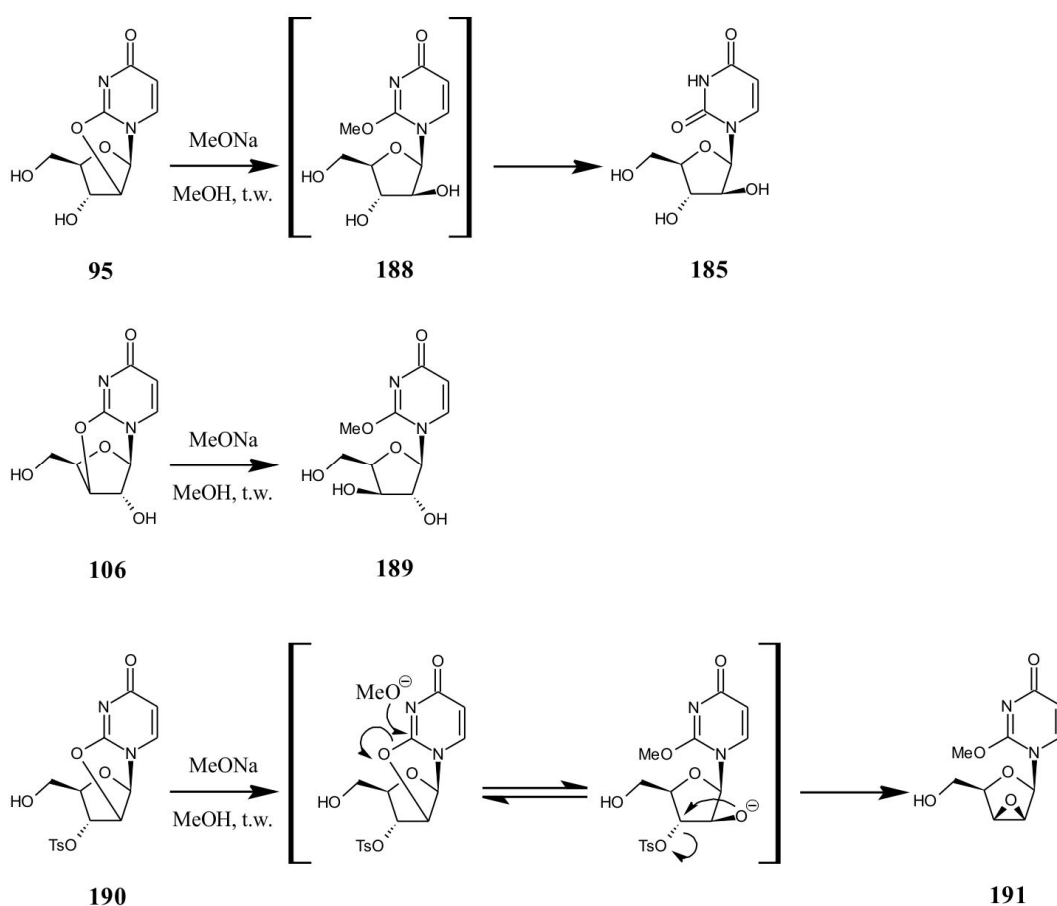
| Nukleofil | Rozpusz. | T/[°C] | Czas/[godz.] | Konfig. produktu | Wydajność/ [%] |
|------------------------------------|--------------------------------|--------|--------------|------------------|----------------|
| NaOH | MeOH/H ₂ O | t.pok. | 16 | arabino | 69 |
| Mg(OMe) ₂ | MeOH | 65 | 5 | rybo | 92 |
| B(OMe) ₃ | MeOH + CH(MeO) ₃ | 150 | 42 | rybo | 86 |
| NH ₃ | MeOH | 37 | 48-168 | arabino | 16 |
| Etylenodiamina | EtOH | 37 | 48-168 | arabino | 73 |
| NaN ₃ +BzOH | HMPA | 150 | <1 | rybo | 65 |
| H ₂ S+Et ₃ N | DMF | 20 | 120 | arabino | 70 |
| EtSH+TMG | DMF | 60 | 12 | rybo | 93 |
| AcSH | dioksan | 110 | 6 | rybo | 65 |
| PhSe-SePh+NaBH ₄ | EtOH | 78 | 1 | rybo | 90 |
| HCl | dioksan | 75-80 | 18 | rybo | 89 |
| LiBr | dioksan | 60 | 6 | rybo | 98 |
| NaI+TsOH | aceton | 50 | 2,5 | rybo | 98 |

Tabela 2.3.1. Reaktywność 2,2'-anhydrourydyny. TMG – 1,1,3,3-tetrametyloguanidyna; HMPA – heksametylofosforamid

Współczynnik elektroujemności atomów sąsiadujących wynoszą w skali Paulinga odpowiednio $\chi_P = 2,20$ (H), $\chi_P = 2,55$ (C), $\chi_P = 3,04$ (N). Jedynie grupa azydkowa atakuje pozycję 2', dając produkt o konfiguracji rybozy niezależnie od przeciwjonu (Na⁺, Li⁺). Amoniak oraz I-rzędowe aminy atakują pozycję 2 uracylu dając produkt o konfiguracji arabinozy. Aniony halogenkowe podstawiają się w pozycji 2' rybozy. W przypadku nukleofili siarkowych znane są substytucje z H₂S, tiolami alifatycznymi, tiolami aromatycznymi, kwasem tiooctowym. Atomem sąsiadującym jest więc atom wodoru ($\chi_P = 2,20$) lub atom węgla ($\chi_P = 2,55$). Siarkowodor atakuje pozycję 2, a pozostałe nukleofile pozycję 2'. Reakcje z tiolami prowadzi się w obecności katalitycznych ilości zasady w celu wygenerowania anionu tiolanowego, który jest skuteczniejszym nukleofilem. W przypadku nukleofili tlenowych znane są substytucje anionu wodorotlenkowego, alkoholów oraz soli kwasów karboksylowych. Tutaj również atomem sąsiadującym jest atom wodoru lub atom węgla. Anion wodorotlenkowy atakuje pozycję 2, a pozostałe nukleofile tlenowe zwykle atakują pozycję 2' dając produkt konfiguracji rybozy. Q. Dai *et al.* stwierdzili, że w przypadku metanolanów wpływ na regioselektywność ma również rodzaj przeciwjonu (Na⁺, Mg²⁺, B³⁺),

a dokładnie współczynnik elektroujemności $\chi_P = 0,93$ (Na), $\chi_P = 1,31$ (Mg) i $\chi_P = 2,03$ (B). Znane są w literaturze przykłady substytucji z użyciem metanolanu magnezu lub boru,^[141,191] które prowadzą do produktu rybofuranozyłowego.

W przypadku metanolanu sodu trzeba się odwołać do cytowanej już publikacji Buchanana i Clarka z 1979 roku.^[186] Opisali oni eksperyment, w którym **95** poddali działaniu metanolanu sodu w metanolu. Uzyskali głównie 1-(β -D-arabinofuranozylo)uracyl (**185**) (Rysunek 2.3.25.). Wynik ten można interpretować jako skutek bezpośredniego ataku anionu OH⁻ na pozycję 2, który powstał ze względu na niewielkie ilości wody, albo jako skutek ataku

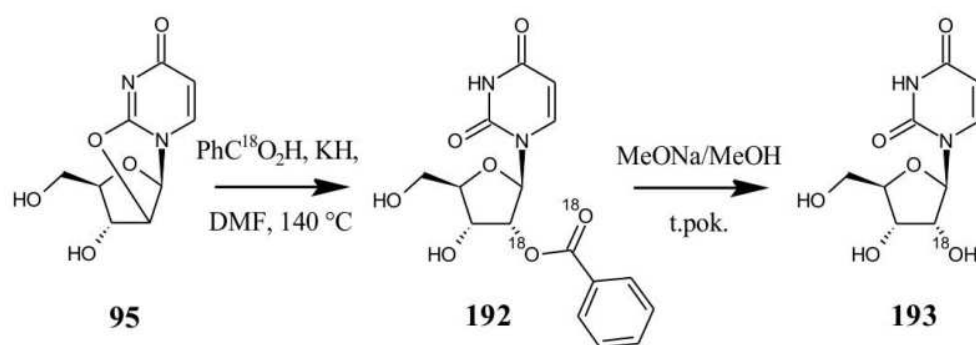


Rysunek 2.3.25. Regioselektywność substytucji MeONa do 2,3'- i 2,2'-anhydrourydyny oraz jej 3'-tosylowanej pochodnej.

anionu metanolanowego z utworzeniem produktu przejściowego (**188**), który dopiero w następnym etapie ulega hydrolizie zasadowej.^[192] Argumentem za drugą wersją jest fakt, że Buchanan i Clark w reakcji 2,3'-anhydrourydyny (**106**) z MeONa w MeOH wyizolowali produkt substytucji w pozycji 2 (**189**), który następnie zhydrolizowali do ksylourydyny (**118**). Drugim argumentem jest reakcja przedstawiona przez M. Hiratę w 1968 r.^[193] Podał on

reakcji z MeONa w MeOH 3'-tosylo-2,2'-anhydrourydynam (190). Anion metanolowy zaatakował pozycję 2 uracylu z otwarciem pierścienia. Powstała w ten sposób zdeprotonowana forma grupy 2'-OH skierowana nad płaszczyznę cukru zaatakowała od góry pozycję 3' z odejściem grupy tosylowej, tworząc strukturę liksoepoksydową (191). Produkt wyizolowano i scharakteryzowano. Dlatego można przypuszczać, że MeONa atakuje pozycję 2 części zasadowej związku 95 i jego pochodnych.

Q. Dai *et al.* wykazali również, że do 95 można skutecznie podstawić anion octanowy oraz benzoesowy w pozycji 2' (192) (Rysunek 2.3.26.). W mieszaninie zauważyli obecność

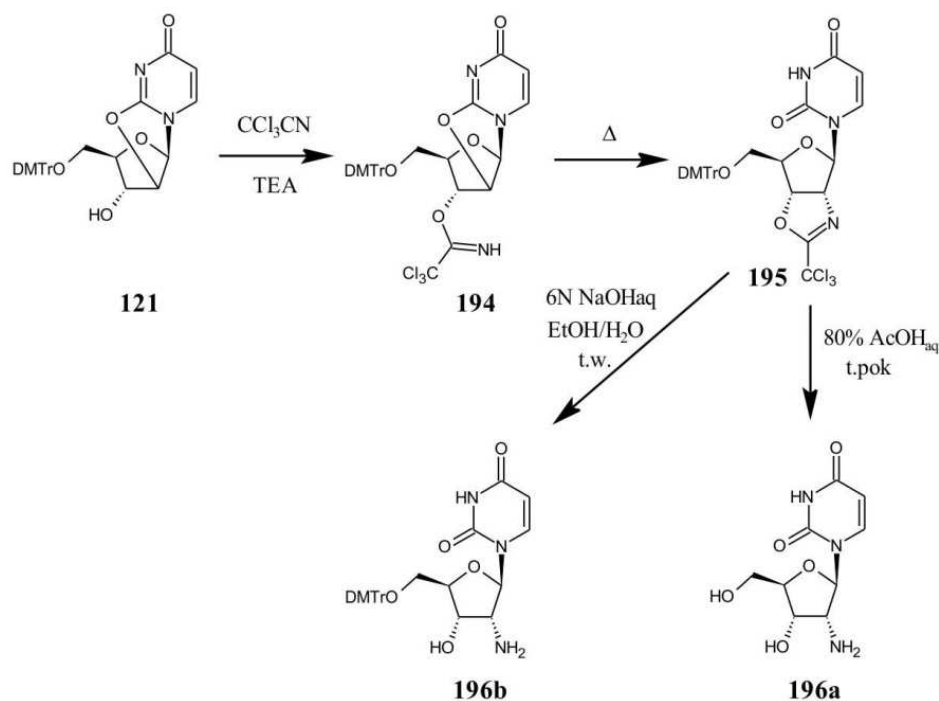


Rysunek 2.3.26. Synteza znakowanej izotopowo [2'-¹⁸O]urydyny.

produktu ubocznego 1-(β-D-arabinofuranozylo)uracylu (185). Stosunek oczekiwanego produktu do produktu ubocznego zależał od użytego przeciwjonu (Na⁺, K⁺), efektu elektronoakceptorowego grupy sąsiadującej oraz dodatku kwasu karboksylowego. Najlepszy rezultat uzyskano przy użyciu benzoesu potasu w obecności kwasu benzoesowego, bo oczekiwany produkt powstał w stosunku 20:1 względem produktu ubocznego. W przypadku octanu sodu bez dodatku kwasu stosunek produktów wynosił 2:3. W tym przypadku również można się spodziewać, że produkt uboczny 185 powstaje w wyniku ataku anionu karboksylanowego na pozycję 2 uracylu. Opracowaną metodę wykorzystali do wprowadzenia w pozycji 2' grupy hydroksylowej znakowanej izotopowo z ¹⁸O. Uzyskano w ten sposób [2'-¹⁸O]urydynam (193).

Jak wspomniano wcześniej, nie jest możliwe bezpośrednie wprowadzenie grupy aminowej w pozycji 2' rybozy poprzez działanie NH₃ w metanolu. Substytucja zachodzi w pozycji 2 uracylu. Jednak są sposoby, aby obejść ten problem. Pierwszym jest znana od 1919 roku reakcja Staudingera^[194,195] polegająca na redukcji grupy azydkowej do grupy aminowej przy użyciu Ph₃P. Drugą metodą jest metoda przedstawiona przez D. McGee *et al.* (Rysunek 2.3.27.).^[152] W reakcji tej stosuje się 2,2'-anhydrourydynam z blokowaną grupą 5'-OH

i trichloroacetonitryl w obecności trietyloaminy. McGee użył w tym przypadku 5'-O-(4,4'-O-dimetoksytrytylo)-2,2'-anhydrourydynamy (**121**). W pierwszym etapie zdeprotonowana grupa 3'-OH atakuje węgiel grupy nitylowej tworząc produkt pośredni 3'-O-trichloroacetamid 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2,2'-anhydrourydynamy (**194**). Produkt ten można wyizolować w innych warunkach, ale lepszą wydajność uzyskuje się stosując metodę *one-pot*, która w wyniku wewnątrzcząsteczkowego ataku nukleofilowego prowadzi do



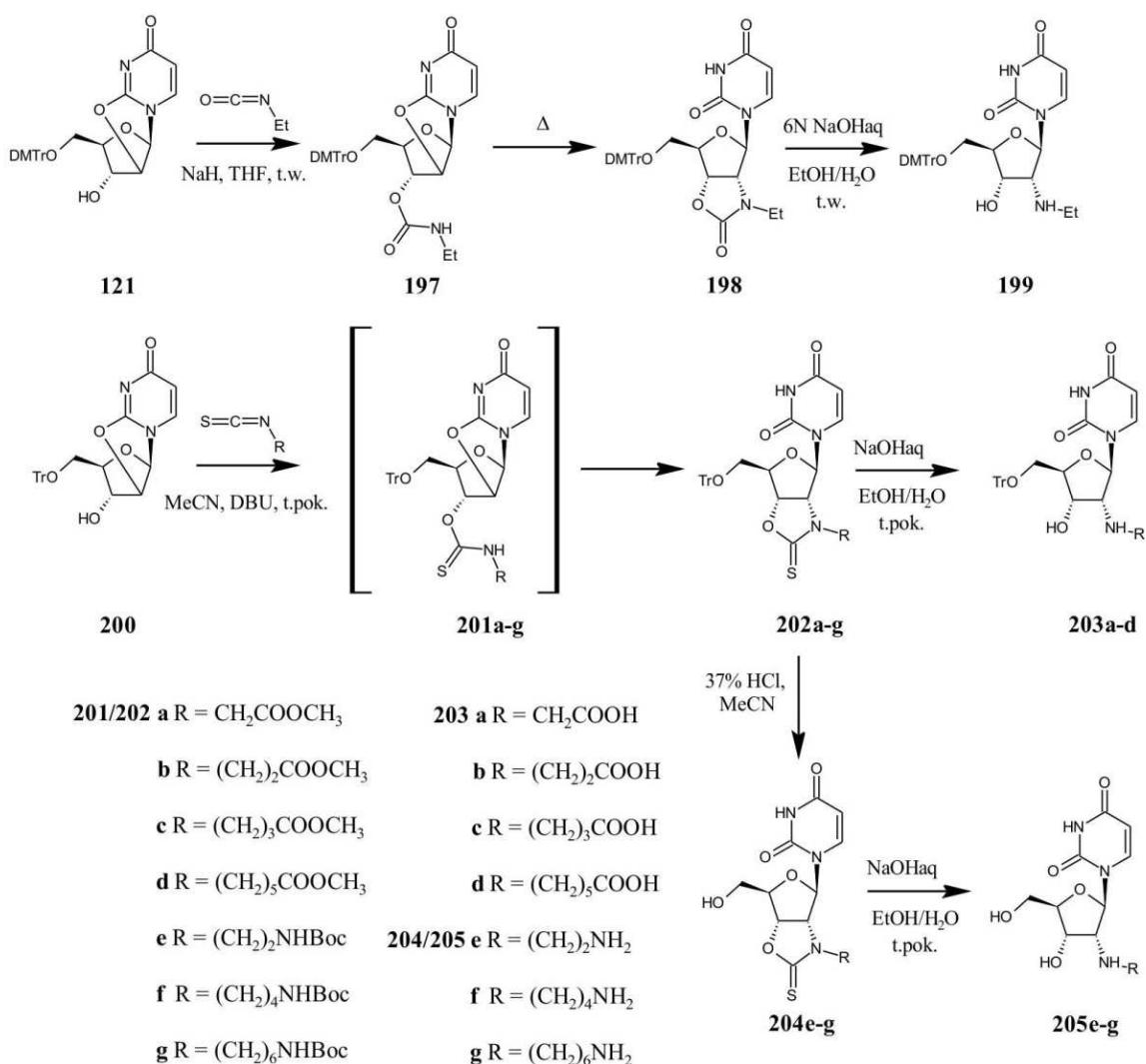
Rysunek 2.3.27. Metoda wewnątrzcząsteczkowej funkcjonalizacji 2,2'-anhydrourydynamy zaprezentowana przez D. McGee *et al.*

produktu oksazolinowego (**195**). Ugrupowanie oksazolinowe można otworzyć w warunkach kwasowych przy użyciu kwasu octowego lub w warunkach zasadowych przy użyciu 6N NaOH w układzie EtOH/H₂O uzyskując produkt o konfiguracji rybozy z wolnymi grupami 2'-aminową oraz 3'-hydroksylową (**196a,b**).

D. McGee rozwinął metodę pokazując równie skuteczną substytucję z wykorzystaniem alkilowych izocyjanianów.^[196] Syntezę opisał m. in. na przykładzie reakcji z izocyjanianem etylu. Reakcji również poddał związek **121**. Samo ogrzewanie z izocyjanianem w Et₃N nie dało oczekiwanego produktu cyklicznego, a jedynie niecykliczny produkt pośredni **197**. Etap ten zachodzi poprzez atak nukleofilowy zdeprotonowanej grupy 3'-OH na atom węgla ugrupowania izocyjanianowego. Dopiero prowadzenie reakcji w obecności NaH w THF dało oczekiwany produkt cyklizacji **198** z ugrupowaniem oksazolidynowym. Deprotekcja **198** została przeprowadzona analogicznie do **195**

w warunkach zasadowych z 6N NaOH_{aq} w układzie 1:2 z etanolem w temperaturze wrzenia. Uzyskano 2'-N-etylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)urydyne (**199**) z wydajnością 90%. Metoda ta została rozszerzona przez A. Gondelę *et al.* z zespołu K.Z. Walczaka o izotiocyjaniiny (Rysunek 2.3.28.).^[197] W swej pracy A. Gondela *et al.* postawili sobie za cel wprowadzenie w pozycji 2' rybozy grupy aminowej posiadającej dodatkową grupę funkcyjną na końcu łańcucha N-alkilowego, która umożliwi dołączenie grupy fluoroforowej. Odpowiednie izotiocyjaniiny zostały uprzednio przygotowane.

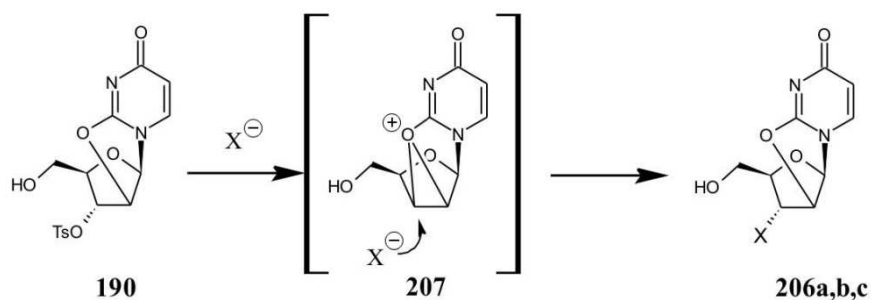
Cytowana wcześniej publikacja M. Hiraty w 1968 r. porusza inną ciekawą grupę reakcji stanowiących sposób na funkcjonalizację układu *cis*-diolowego z wykorzystaniem mostków anhydrocyklicznych. Wykorzystany w niej substrat 3'-tosylo-2,2'-anhydrourydyne



Rysunek 2.3.28. Metoda wewnątrzcząsteczkowej funkcjonalizacji 2,2'-anhydrourydyny.^[196,197]

(**190**) (Rysunek 2.3.29.) można poddać reakcjom z innymi nukleofilami z bardzo ciekawym

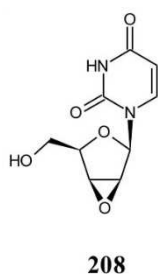
rezultatem. M. Hirata w innej pracy wykonał substytucje z NaN_3 , EtSNa oraz NaBr .^[198] W każdym przypadku uzyskano wg autora produkt podstawienia (**206a,b,c**) w pozycji 3' z zachowaniem mostka 2,2'-anhydrocyklicznego z podstawnikiem w pozycji 3' skierowanym pod płaszczyznę pierścienia. Reakcję z NaN_3 przeprowadzono w DMF w 100 °C z wydajnością 52%, z EtSNa w MeOH w t. pokojowej z równie dobrą wydajnością, jedynie reakcja z NaBr w DMF w 130 °C dała produkt z wydajnością 10%. Powstawanie



Rysunek 2.3.29. Reakcje przeprowadzone przez M. Hiratę.

takich produktów autor tłumaczył mechanizmem, według którego powstawał w etapie pośrednim cykliczny jon oksoniowy (**207**). Uzyskane produkty poddał kwaśnej hydrolizie w celu otwarcia mostka anhydrocyklicznego i otrzymane produkty porównał ze związkami uzyskanymi z substytucji do 1-(2',3'-anhydro- β -D-liksofuranozylo)uracylu (**208**, Rysunek 2.3.30.). Praca została wykonana bardzo rzetelnie, jednak zastanawiać może fakt, że nikt tych reakcji nie powtórzył.

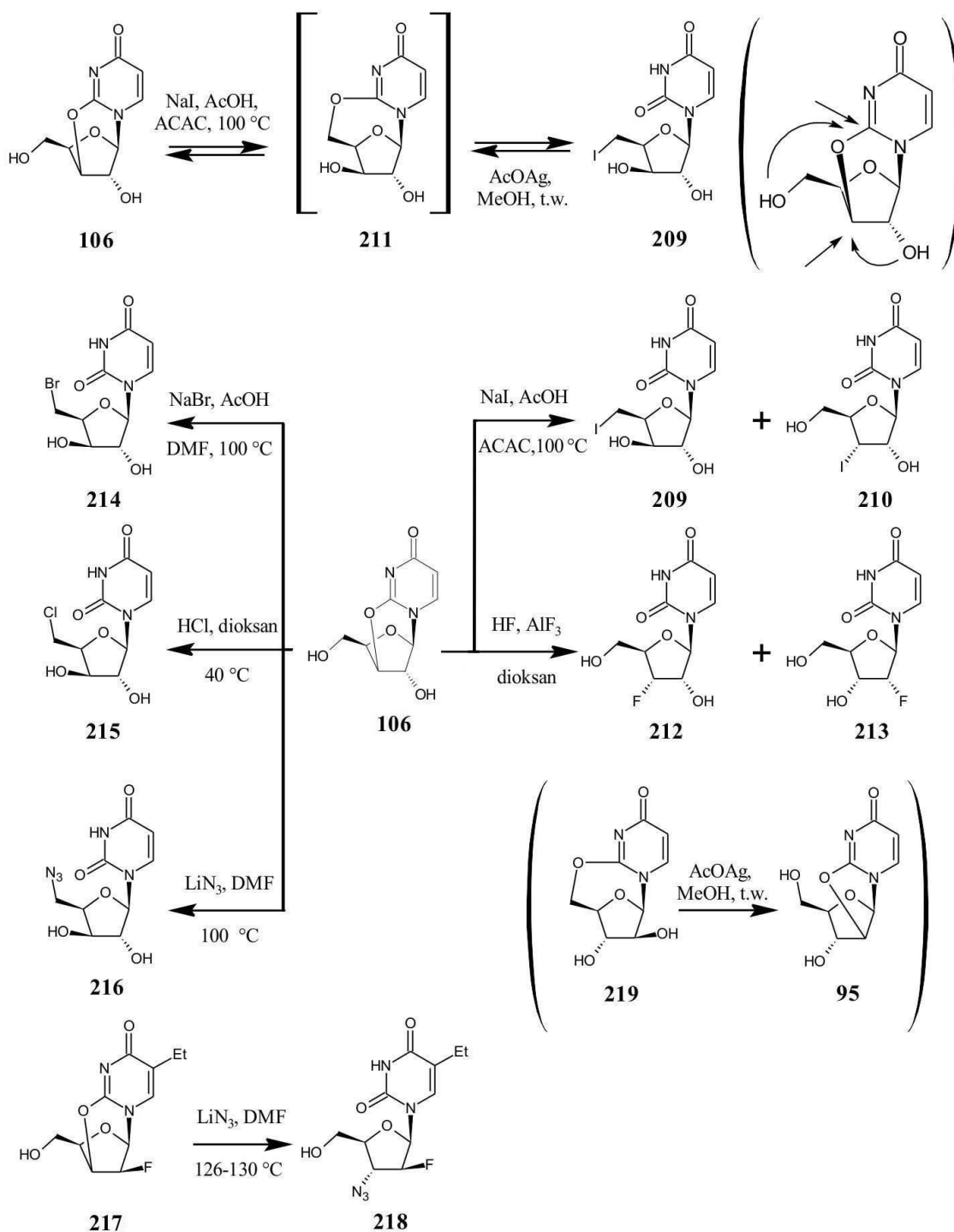
Mostek 2,3'-anhydrocykliczny nukleozydów pirymidynowych w serii 2'-deoksy ma podobną reaktywność do mostka 2,2'-anhydrocyklicznego. Ulega w sposób analogiczny hydrolizie i substytucjom. W serii rybo reaktywność mostka 2,3'-anhydrocyklicznego jest



Rysunek 2.3.30. Struktura 1-(2',3'-anhydro- β -D-liksofuranozylo)uracylu.

jednak inna (Rysunek 2.3.31). Z wcześniejszych rozważań wynika, że ulega otwarciu w warunkach zasadowych lub kwaśnych, ulega przegrupowaniu do struktury 2',3'-

anhydrocyklicznej oraz 2,2'-anhydrocyklicznej, co zostało zaobserwowane nawet pod wpływem temperatury.^[189] Znane są też przypadki przegrupowania do struktury 2,5'-

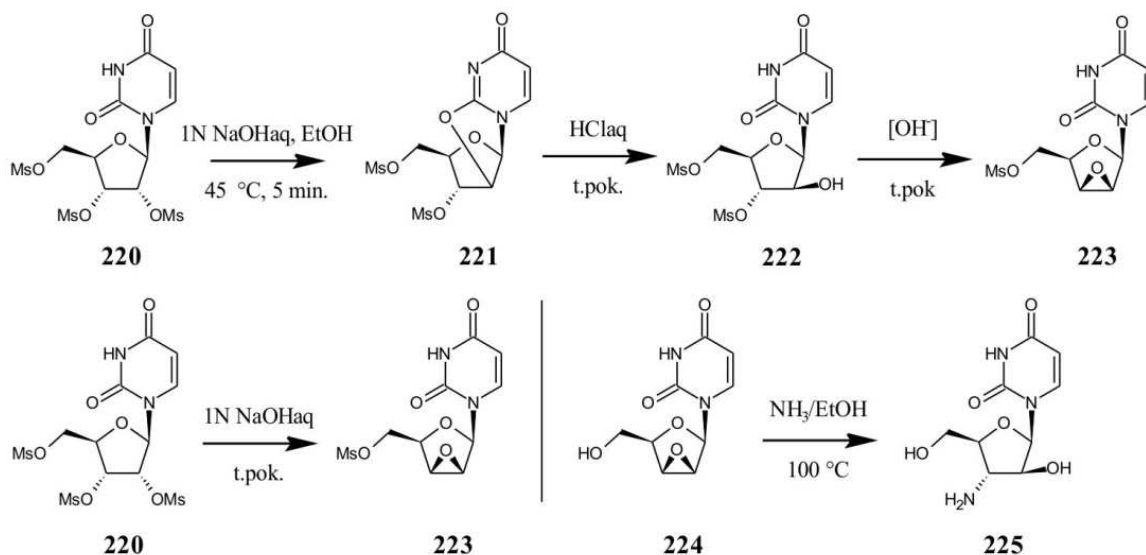


Rysunek 2.3.31. Reaktywność 2,3'-anhydrourydyny i jej pochodnej 2'-fluorolikso-5-etylowej. ACAC – acetyloaceton. anhydrocyklicznej. W reakcji przeprowadzonej przez K. Kikugawę *et al.*^[199] 2,3'-anhydrourydyny (**106**) z NaI w obecności AcOH uzyskano dwa produkty: główny 1-(5'-jodo-β-D-ksylofuranozylo)uracyl (**209**) oraz poboczny 3'-jodourydynę (**210**). Produkt **210** powstał

w wyniku bezpośredniej substytucji anionu jodkowego do mostka 2,3'-anhydro w pozycji 3'. Produkt **209** powstał wg autorów najprawdopodobniej przez pośredni produkt 2,5'-anhydrocykliczny (**211**). Jako argument potwierdzający to przypuszczenie, autorzy podali odwrotną reakcję **209** z octanem srebra, w której uzyskano 2,3'-anhydrourydyne (**106**). Analogiczną reakcję przeprowadzono dla 2,5'-anhydro-1-(β -D-arabinofuranozylo)uracylu (**219**) i uzyskano 2,2'-anhydrourydyne (**95**). Tego typu transformacje są często spotykane, ze względu na ułatwiony atak na pozycję 2 uracylu grupy hydroksylowej skierowanej nad płaszczyznę pierścienia cukrowego. K. Kikugawa przeprowadził też inne reakcje **106** z halogenkami oraz LiN_3 (Rysunek 2.3.31). Substytucję anionem fluorkowym przeprowadzili za to G. Kowolik *et al.*^[200] Upublikowane wyniki wskazują, że reaktywność mostka 2,3'-anhydro w **106** jest inna niż mostka 2,2'-anhydro w **95**. Pozycja C-3' w **106** jest mniej podatna na ataki nukleofili niż pozycja 2' w **95** i wygrywają konkurencyjne reakcje zachodzące poprzez różne przegrupowania wewnątrzcząsteczkowe. Jednym wyjątkiem są reakcje **106** z NaI oraz HF, które dają mieszaninę produktów z produktem bezpośredniego podstawienia włącznie, oraz warta odnotowania bezpośrednia substytucja azydkiem litu do mostka 2,3'-anhydrocyklicznego w 2,3'-anhydro-1-(2'-fluoro- β -D-liksofuranazylo)-5-etylouracylu (**217**) i powstanie 1-(3'-azydo-2'-fluoro- β -D-arabinofuranazylo)-5-etylouracylu (**218**). W tym przypadku na wzrost podatności na atak nukleofilowy pozycji 3' mostka 2,3'-anhydro miał wpływ elektronoakceptorowy charakter podstawnika fluorowego w pozycji 2'.

W dotychczasowym opisie otrzymywania oraz wykorzystywania mostków anhydrocyklicznych pojawiały się często struktury 2',3'-epoksydowe skierowane pod (rybo) lub nad płaszczyznę pierścienia cukrowego (likso). Prócz tego, że pojawiają się często jako produkty pośrednie lub uboczne w reakcjach związków 2,3'- i 2,2'-anhydrocyklicznych, znajdują również zastosowanie jako substraty w wprowadzaniu nowych grup w układzie *cis*-diolowym. Otrzymuje je się na kilka sposobów. Jednym sposobem jest wcześniej przedstawiona metoda przegrupowania mostków 2,2'-anhydronukleozydów pirymidynowych lub 8,2'-anhydronukleozydów purynowych prowadząca do mostków 2',3'-anhydrocyklicznych o konfiguracji rybozy (2',3'-epoksyrybonukleozydy). Drugą metodę ilustruje przykład podany przez J.F. Codingtona *et al.*^[150,201] w wyniku której uzyskuje się mostki 2',3'-anhydrocykliczne o konfiguracji liksozy (2',3'-epoksyliksonukleozydy) (Rysunek 2.3.32.). Wykorzystano w tym przypadku 2',3',5'-O-trimesylourydyne (**220**). W pierwszym wariantcie wyizolowano 3',5'-di-O-mesylo-2,2'-anhydrourydyne, którą poddano reakcji otwarcia mostka 2,2'-anhydrocyklicznego (**221**)

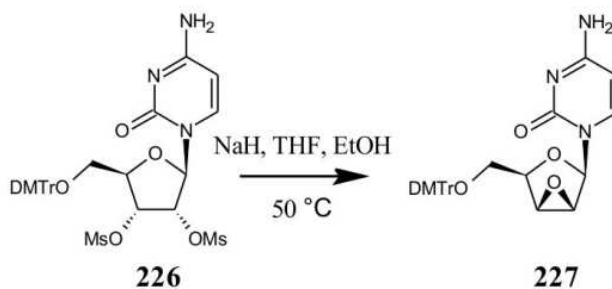
w warunkach kwaśnych, aby następnie w warunkach zasadowych przeprowadzić cyklizację mostka 2',3'-anhydrocyklicznego (**223**). W ostatnim etapie anionowa forma grupy 2'-OH atakuje pozycję 3' z odejściem grupy *trans* mesylanowej. W drugim wariantcie reakcje przeprowadzono *one-pot* z wydzieleniem oczekiwanego produktu w postaci krystalicznej



Rysunek 2.3.32. Otrzymywanie pochodnej 2',3'-epoksyliksourydyny i jej amonoliza.

z mieszaniny reakcyjnej. Metody te są również skuteczne, gdy w pozycji 5' zamiast grupy O-mesylowej są obecne inne grupy jak benzoilowa, trytylowa, a w pozycjach 2' i 3' obecne są inne grupy O-sulfonylowe lub halogenkowe. W dalszym etapie prac związek **224** poddano amonolizie w etanolu nasyconym amoniakiem w reaktorze ciśnieniowym. Uzyskano z wydajnością 38% produkt **225**. W podobny sposób można przygotować 5'-blokowaną 2',3'-epoksyliksocytydynę.^[120] 5'-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-2',3'-O-dimesylocytydynę (**226**) poddano reakcji z NaH w THF i EtOH i otrzymano produkt epoksydowy (**227**) (Rysunek 2.3.33.).

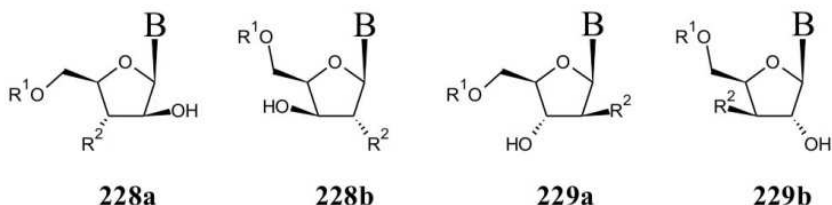
Metody te prowadzą do odpowiednich produktów 2',3'-epoksyliksonukleozydów poprzez strukturę 2,2'-anhydrocykliczną, dlatego nie znajdują zastosowania względem



Rysunek 2.3.33. Otrzymywanie 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2',3'-epoksyliksocytydyny.^[120]

naturalnych nukleozydów purynowych. W tym przypadku należy inną drogą przygotować pochodne o ogólnym wzorze **228a-b** (Rysunek 2.3.34.), aby w warunkach zasadowych otrzymać produkty 2',3'-liksoanhydrocykliczne. Użycie pochodnych o ogólnym wzorze **229a-b** da odpowiednio produkty 2',3'-ryboanhydrocykliczne.

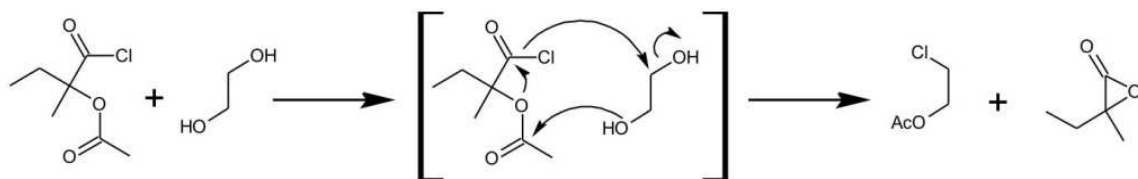
W kontekście pochodnych purynowych, bardzo ciekawą metodą syntezy mostków



B = adenina, guanina; R¹ = Bz-, Piv-, Tr-, DMTr-, i inne; R² = MsO-, TsO-, TfO-, I-.

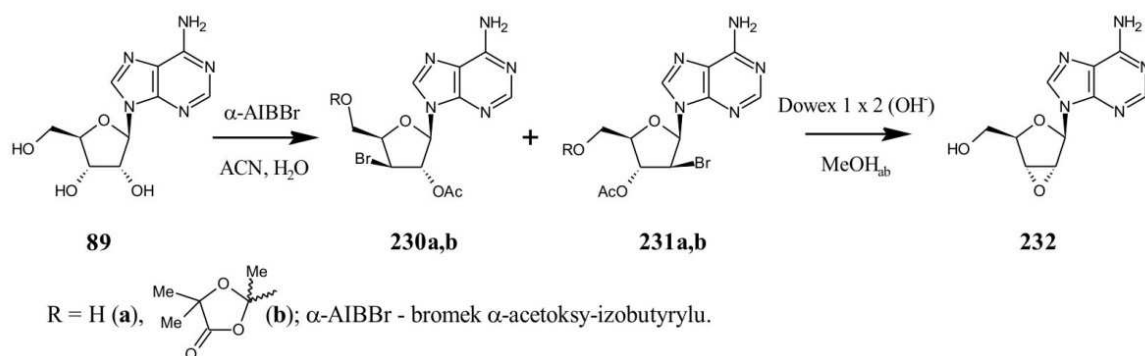
Rysunek 2.3.34. Substraty do otrzymywania purynowych pochodnych 2',3'-anhydrocyklicznych.

2',3'-anhydrocyklicznych wydaje się być droga przedstawiona przez S. Greenberga i J.G. Moffata,^[202, 203] później rozwinięta przez M.J. Robinsa *et al.*^[204,205] Na przykładzie adenozyiny (**89**) można zobaczyć, jak wydajna jest to metoda. Pierwszy raz nietypową reakcję halogenków 2-acetoksy-2-metylobutyrylu z diolami opisał A.R. Mattocks w 1963 r.^[206] i zaproponował prawdopodobny mechanizm tej reakcji (Rysunek 2.3.35.). Moffat i Greenberg wykazali, że reakcja Mattocksa ma zastosowanie jedynie wobec *cis*-dioli i prowadzi do produktów *trans*. Wytlumaczenie tych obserwacji znaleźli w mechanizmie



Rysunek 2.3.35. Mechanizm zaproponowany przez A.R. Mattocksa.

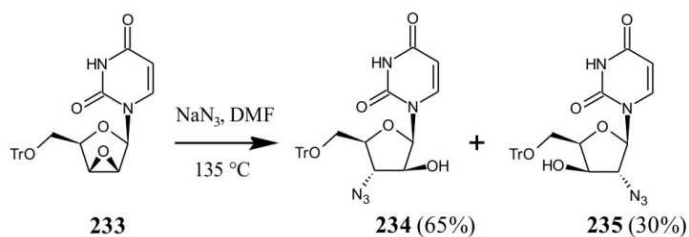
polegającym na początkowym tworzeniu się jonu acetoksoniowego (s. 46), który dopiero w kolejnym etapie ulega atakowi anionu halogenkowego. Reakcję Mattocksa zaadoptowali do układu *cis*-diolowego rybonukleozydów z użyciem chlorku lub bromku α -acetoksyizobutyrylu. W przypadku adenozyiny, która nie posiada w pozycji 8 odpowiedniej grupy mogącej brać udział w reakcji, powstający jon acetoksoniowy jest bezpośrednio atakowany przez anion halogenkowy na pozycje 2' lub 3' dając mieszaninę produktów o konfiguracji *trans* zgodnie z założeniem. Uzyskaną mieszaninę poddano reakcji z 2M



Rysunek 2.3.36. Synteza 2',3'-epoksyryboadenozyny wg M.J. Robinsa *et al.*

NaOMe/MeOH w 0 °C. Uzyskano 2',3'-epoksyryboadenozynę (**232**) z wydajnością 67%. M.J. Robins *et al.* udoskonaliли metodę uzyskując **232** z wydajnością 92% z adenozyiny poprzez prowadzenie reakcji Mattocksa w warunkach o kontrolowanej ilości wody. Reakcję cyklizacji przeprowadzono na żywicy jonowymiennej typu Dowex 1x2 (Rysunek 2.3.36.). W przypadku urydyny, Greenberg i Moffatt uzyskali wyłącznie jeden produkt o konfiguracji *cis*. Zjawisko to można wytłumaczyć przegrupowaniem powstałego acetoksoniowego produktu pośredniego, do pochodnej 2,2'-anhydrocyklicznej. Anion halogenkowy następnie atakuje pozycje 2' dając wyłączenie jeden produkt.

Reakcje otwarcia mostka liksoepoksydowego pod wpływem działania nukleofila zachodzą łatwo dając najczęściej mieszaninę produktów podstawienia w pozycji



Rysunek 2.3.37. Przykładowa substytucja z NaN_3 do 5'-O-trytylo-2',3'-epoksyliksourydyny.^[208]

3' i 2' o konfiguracji *trans* (Rysunek 2.3.37.). Przykładów w literaturze można znaleźć bardzo dużo od tych najstarszych jak praca J.M. Andersona i E. Percival z 1956 r.^[207] po najnowsze jak praca J. Sun *et al.* z 2013 r.^[208] Paleta możliwych do zastosowania nukleofili jest podobna do tej, jaką się stosuje w przypadku mostków 2,2'-anhydrocyklicznych. Jednak oprócz tioli, alkoholów, halogenków, azydków, amoniaku, amin I-rzędowych, korboksylianów można użyć również związki metaloorganiczne (bromek winylomagnezowy, acetylenek litu)^[209] oraz cykliczne aminy (imidazol, pirazol, 1,2,4-triazol, morfolina).^[210]

3. Badania własne

3.1. Cel badań

Tak jak opisano w części literaturowej, nukleozydy modyfikowane w pozycjach 2' i 3' są znane od wielu lat i obejmują wiele ważnych analogów o wyjątkowych aktywnościach biologicznych. W tej grupie można wymienić analogi 2',3'-dideoksy, które są pozbawione obu grup hydroksylowych w pozycjach 2' i 3', analogi dideoksy-didehydro (**56, 57**), które posiadają wiązanie podwójne między atomami C-2' i C-3', analogi 2',3'-dideoksy posiadające dodatkowe podstawniki w pozycjach 2' i/lub 3' zamiast grup hydroksylowych, analogi o zmienionej konfiguracji pierścienia cukrowego oraz analogi posiadające dodatkowe podstawniki obok grup hydroksylowych. Są to związki ukierunkowane w swym działaniu głównie przeciw retrowirusom. Struktury anhydrocykliczne są znane od połowy XX wieku, jednak jak wynika z przeglądu literaturowego, możliwości ich wykorzystania nie są w pełni przebadane i opisane. Liczba 2',3'-dimodyfikowanych pochodnych rybonukleozydów możliwych do otrzymania z wykorzystaniem struktur anhydrocyklicznych jest bardzo duża, jeśli się uwzględni możliwe kombinacje podstawników S-alkilowych, S-arylowych, O-alkilowych, O-arylowych, halogenkowych, triazolowych, aminowych i podstawnika azydowego w nukleozydach pirymidynowych a także purynowych.

Celem tej pracy było wykonanie przeglądu możliwych metod funkcjonalizacji układu *cis*-diolowego rybonukleozydów, weryfikacja przydatności struktur anhydrocyklicznych w syntezie 3'-modyfikowanych rybonukleozydów, poszerzenie zakresu wiedzy dotyczącej otrzymywania i wykorzystywania struktur anhydrocyklicznych w chemii nukleozydów oraz synteza z wykorzystaniem mostków anhydrocyklicznych serii pochodnych 2',3'-dimodyfikowanych rybonukleozydów. Przedmiotem rozprawy jest otrzymywanie i wykorzystanie mostków anhydrocyklicznych pochodnych pirymidynowych. Poszukiwania te zostały w pewnym stopniu poszerzone o nukleozydy purynowe, w przypadku których synteza i reaktywność mostków anhydrocyklicznych jest opisana w jeszcze mniejszym zakresie, a każde nowe ustalenia wydają się mieć dodatkową wartość w kontekście stosowania tego podejścia do funkcjonalizacji układu 2',3'-*cis*-diolowego pochodnych purynowych. Może to w konsekwencji doprowadzić do opracowania uniwersalnej metody funkcjonalizacji układu 2',3'-*cis*-diolowego rybonukleozydów. Otrzymane wyniki zostały wzbogacone o częściowe badania biologiczne oraz techniki modelowania molekularnego w celu podparcia rozważań mechanistycznych oraz oceny

dopasowania otrzymanych związków dimodyfikowanych do centrum aktywnego docelowego enzymu, którego działanie mają inhibować.

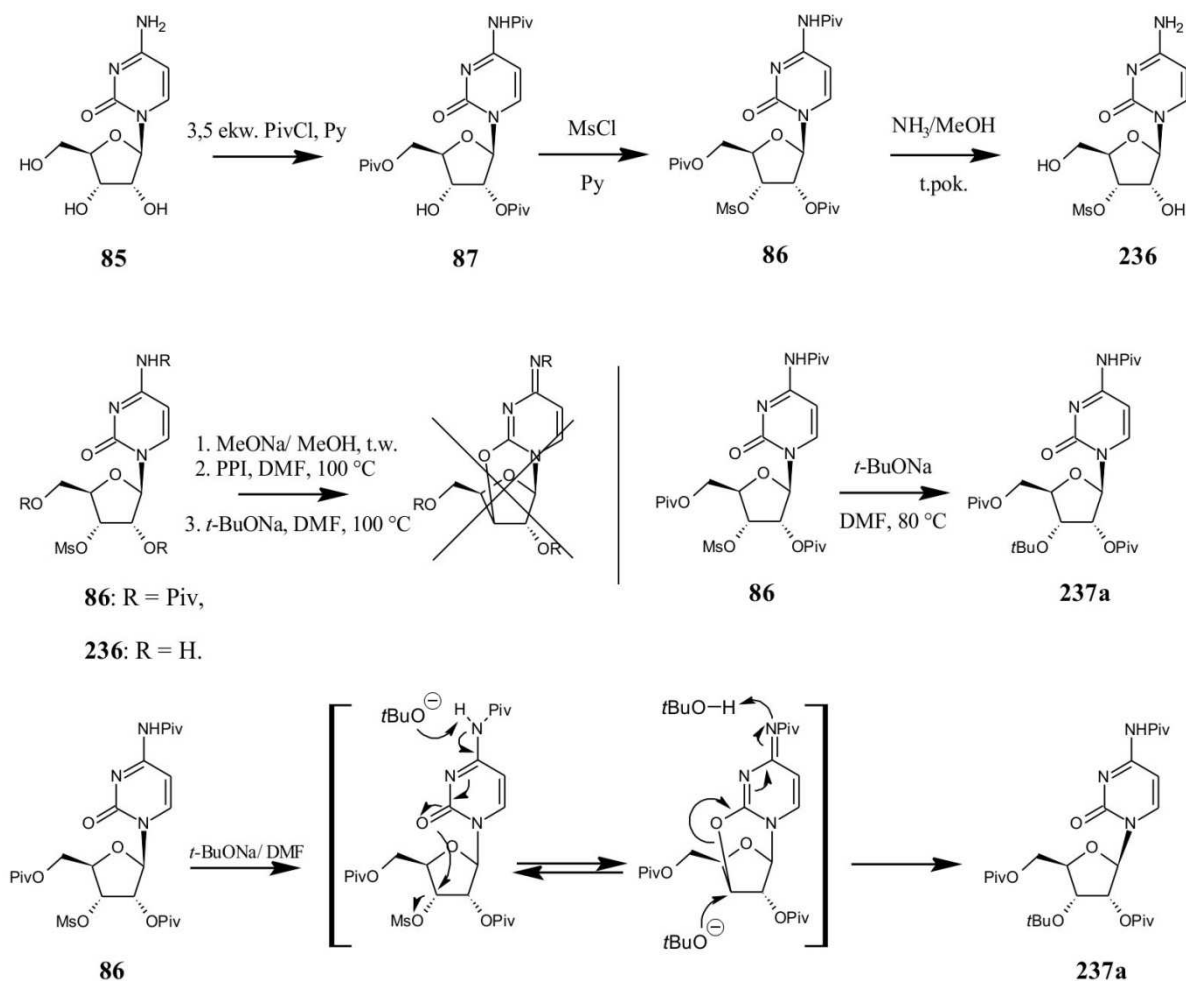
3.2. Badania wstępne

Poszukiwania zostały rozpoczęte od zweryfikowania, czy reakcje cyklizacji zaprezentowane przez Y. Mizuno i T. Sasaki^[153] rzeczywiście prowadzą do produktów anhydrocyklicznych. W tym celu przygotowano zgodnie z procedurą J. Fogt^[130] 4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydynę (**87**). Cytydynę (**85**) poddano reakcji w pirydynie z 3,5 ekw. chlorku piwaloilu. Po ekstrakcji produkt wykrystalizowano z toluenu z wydajnością 72%. W kolejnym kroku związek **87** poddano reakcji z chlorkiem mesylu w pirydynie w temperaturze pokojowej otrzymując pochodną mesylową z wydajnością 86% (**86**) (Rysunek 3.2.1). Część otrzymanej 3'-O-mesylo-4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydyny (**86**) odblokowano w metanolu nasyconym amoniakiem otrzymując ilościowo 3'-mesyloocytydynę (**236**). Pochodne mesylowe poddano cyklizacji w warunkach zasadowych:

- z MeONa w MeOH w temperaturze wrzenia,
- z ftalimidkiem potasu (PPI) w DMF w 100 °C
- i z *t*-BuONa w DMF w 100 °C zgodnie z procedurą podaną przez Mizuno i Sasaki.

Reakcje nie zachodziły zgodnie z oczekiwaniami. Z mieszaniny izolowano produkty z wydajnościami 10-25%. Analiza ¹H NMR wyizolowanych produktów wykluczyła powstanie nukleozydu anhydrocyklicznego. Z tego powodu nie przeprowadzono dokładnej charakterystyki uzyskanych produktów, prócz jednego dla przykładu, powstałego z wydajnością 12% w reakcji **86** z *t*-BuONa (Rysunek 3.2.1.). Wykonano komplet widm NMR (¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HSQC, HMBC i NOESY). Analiza wykazała zachowanie grup piwaloilowych, bardzo zbliżone wartości przesunięć chemicznych ¹H NMR i ¹³C NMR wszystkich sygnałów zasady azotowej oraz reszty cukrowej produktu i substratu, obecność dodatkowych sygnałów przy 1,11 ppm o integracji odpowiadającej 9 protonom na widmie ¹H MNR oraz dwóch sygnałów ¹³C NMR przy 25,0 i 44,6 ppm, przy jednoczesnym braku sygnałów pochodzących od grupy mesylowej oraz grup hydroksylowych. Nowe sygnały mogą pochodzić od grupy *tert*-butoksylowej. Widma 2D NMR wskazują na umiejscowienie grup piwaloilowych w pozycjach 2', 5' oraz N4. Przesunięcia chemiczne części zasadowej są zgodne z przesunięciami N-piwaloilowanej cytozyny, dlatego można wnioskować, że grupa

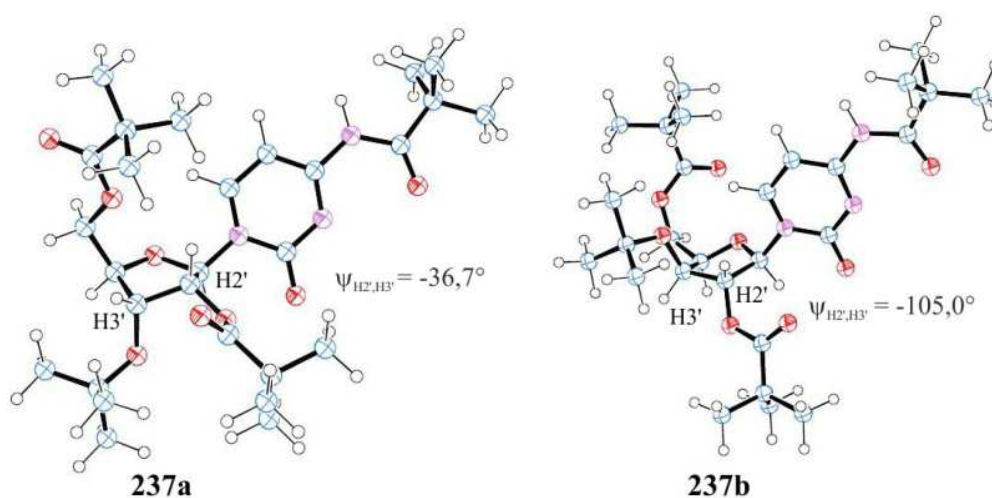
tert-butoksylowa znajduje się w pozycji 3', chociaż na widmie HMBC nie widać wyraźnej korelacji między protonem H3' a węglem C^{III} grupy *tert*-butoksylowej. Sygnały H3' i H2' są przesunięte w lewo, co jest typowe, gdy grupy 3'OH i 2'OH są blokowane. Jeżeli grupa *tert*-butoksylowa uległa podstawieniu w pozycji 3', to należy odpowiedzieć na pytanie, czy substytucja zaszła bezpośrednio do substratu mesylowego dając produkt o konfiguracji *trans*, czy poprzez anhydrocykliczny produkt pośredni dając produkt o konfiguracji *cis* – 3'-*O*-*t*-butylo-4-*N*,2',5'-*O*,*O*-tripiwaloilocytydynam (237a). Analiza stałych sprzężeń oraz widmo NOESY sugerują konfigurację rybozy. Wyznaczona z widma stała sprzężenia między protonami wicynalnymi 2' i 3' wynosi $J_{H2',H3'} = 5,2-5,6$ Hz w zależności od badanego sygnału. W programie HyperChem 8.0^[211] przeprowadzono analizę konformacyjną produktów



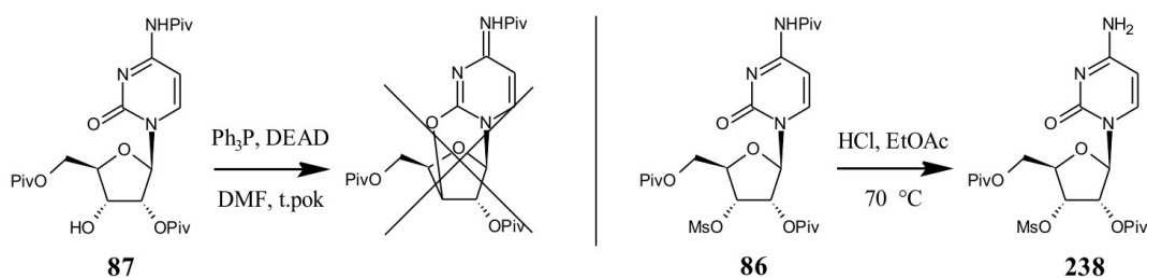
Rysunek 3.2.1. Próba utworzenia mostka 2,3'-anhydrocyklicznego dla cytydyny z użyciem silnej zasady.

o konfiguracji *cis* oraz *trans* uzyskując globalne minima konformacyjne o strukturach 237a i 237b (Rysunek 3.2.2.). Dla struktury 237b kąt torsyjny między H2' i H3' wyniósł $\psi_{H2',H3'} = -105,0^\circ$, a dla struktury 237a kąt torsyjny $\psi_{H2',H3'}$ wyniósł $-36,7^\circ$. Stałe sprzężenia obliczone

z równania Karplusa, zgodnie z parametryzacją przeprowadzoną przez C. A. Haasnoota *et al.*^{[212]†}, dla wyznaczonych kątów wyniosły $J_{H2'H3'} = 4,5$ Hz dla **237a** oraz $J_{H2'H3'} = 0,8$ Hz dla **237b**. Wyznaczona z widma ^1H NMR stała sprzężenia $J_{H2'H3'}$ jest zdecydowanie bliższa obliczonej stałej dla struktury **237a**, co jest wyraźną sugestią, że taka jest konfiguracja produktu. Drugim argumentem za taką konfiguracją jest widmo NOESY. Na widmie można zobaczyć korelacje między protonami H6-H2' oraz H6-H3', przy braku korelacji H6-CH₃^{tBu} (Widmo 5.4, s.). Można więc założyć, że w trakcie reakcji powstaje pewna ilość produktu anhydrocyklicznego, jednak ulega on dalszej reakcji dając produkt substytucji (Rysunek 3.2.1). Produktem ubocznym tej reakcji była wolna zasada azotowa.



Rysunek 3.2.2. Rysunki ORTEP struktur **237a** i **237b** uzyskanych w wyniku analizy konformacyjnej w programie HyperChem 8.0.



Rysunek 3.2.3. Nieudane próby utworzenia 2,3'-anhydrocyklicznej pochodnej cytydyny.

Uzyskany produkt częściowego piwaloilowania cytydyny (**87**) poddano również reakcji Mitsunobu z Ph₃P i DEAD w DMF w celu sprawdzenia, czy może to być metoda cyklizacji, tak jak dla pochodnych 2'-deokscytydyny, tymidyny i urydyny, o czym pisano w Rozdziale 2.3 (s. 48) (Rysunek 3.2.3.). Jednak bez powodzenia. Reakcję prowadzono

† Kalkulator dostępny na stronie <http://www.stenutz.eu/conf/jhh.html>.

w temperaturze pokojowej przez 32 godziny. Widmo protonowe wyizolowanego produktu wykluczyło możliwość, aby mógł on być produktem anhydrocyklicznym, ze względu na obecność sygnału NH. Widmo to różniło się również od widma substratu oraz podanego w literaturze widma 4-N,3',5'-O,O-tripiwaloilocytydyny.^[213]

Sugerując się publikacjami mówiącymi o cyklizacji pochodnych cytydyny w warunkach kwasowych (s. 45-46), przeprowadzono taką próbę na substracie **86** w octanie etylu z kwasem solnym (4 ekw.) w 70 °C, jednak w tym przypadku również nie uzyskano oczekiwanego produktu, a wyizolowany produkt okazał się być 3'-O-mesylo-2',3'-di-O-piwaloilocytydyną (**238**).

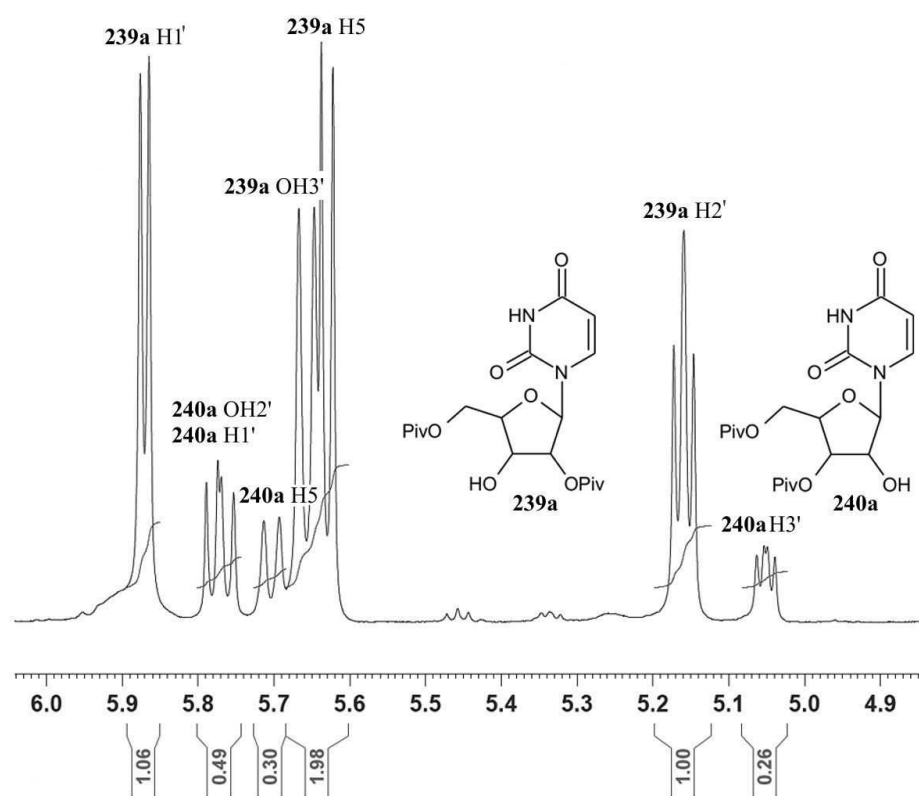
Skoro mostki 2,3'-anhydrocykliczne dla cytydyny są tak trudne do uzyskania, postanowiono w dalszej części pracy prowadzić doświadczenia na urydynie i ewentualnie później poszerzyć badania o inne rybonukleozydy. W literaturze można znaleźć wiele przykładów wprowadzania modyfikacji do urydyny, aby na końcu znanymi metodami przeprowadzić je do pochodnych cytydyny.

3.3. Regioselektywna reakcja Mitsunobu częściowo acylowanej urydyny

3.3.1. Reakcja Mitsunobu

Częściowe piwaloilowanie urydyny nie prowadzi do jednego produktu dipiwaloilowanego, ale niezależnie od warunków uzyskuje się mieszaninę dwóch izomerów – 2',5'-di-O-piwaloilourydynę (**239a**) i 3',5'-di-O-piwaloilourydynę (**240a**), których nie udało się oddzielić na drodze krystalizacji, jak to miało miejsce w przypadku cytydyny. W przypadku użycia 2 ekwiwalentów chlorku piwaloilu, oraz ekstrakcji zmrożonym roztworem NaHCO_{3aq} i DCM uzyskano mieszaninę o stosunku 4:1 z przewagą izomeru 2',5'-diacylowanego. Strukturę dwóch izomerów ustalono oraz przypisano charakterystyczne sygnały za pomocą metod 2D NMR – COSY, HSQC i HMBC. Przesunięcie chemiczne H1' w urydynie jest charakterystyczne i jest podobne także w pochodnych urydyny z blokowanymi grupami hydroksylowymi. Sygnał ten może stanowić punkt startowy w analizie linii korelacyjnych na widmie COSY. Dla mieszaniny izomerów **239a** i **240a** sygnał H1' (**239a**) (Rysunek 3.3.1.1.) jest dobrze odseparowany od pozostałych sygnałów i dał wyraźną korelację do protonu H2' (**239a**), który następnie dał wyraźną korelację do protonu H3' (**239a**). Sygnał ten był przesłonięty innymi sygnałami od protonów H4' i H5' obu izomerów, jednak sygnał 3'OH (**239a**) dawał korelację do tego samego punktu w grupie

sygnałów, co proton H2' (**239a**). Sygnał H1' (**240a**) z kolei był zasłonięty sygnałem 3'OH (**239a**). Dodanie wody deuterowanej pozwoliło zaobserwować H1' (**240a**) w sposób

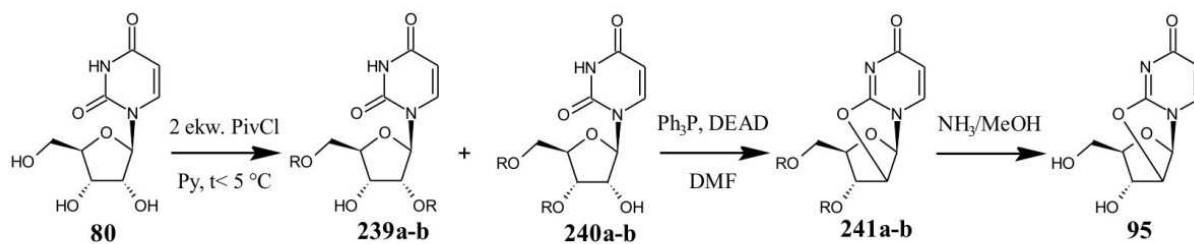


Rysunek 3.3.1.1. Charakterystyczne sygnały ^1H NMR dwóch izomerów dipiwaloilowanej urydyny.

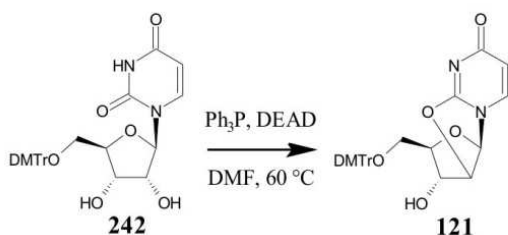
klarowny. Sygnał ten dał korelację do protonu H2' (**240a**), którego przesunięcie chemiczne było podobne do przesunięcia H2' urydyny z wolną grupą 2'OH. Proton H2' (**240a**) dał z kolei korelację do protonu H3' (**240a**), którego przesunięcie chemiczne było wyższe, typowe dla acylowanych grup hydroksylowych. Proton H2' (**240a**) dał również korelację z wymienialnym sygnałem 2'OH (**240a**).

Uzyskaną mieszaninę poddano reakcji Mitsunobu (Rysunek 3.3.1.2.). Oczekiwano powstania dwóch izomerów anhydrocyklicznych, które ze względu na różnicę w budowie mogłyby ulegać rozdzielaniu chromatograficznemu. Jak się okazało, uzyskano wyłącznie jeden produkt 3',5'-di-O-piwaloilu-2,2'-anhydrourydynę (**241a**) z wydajnością 56% z urydyny. Uzyskany produkt można łatwo wyizolować jako czysty osad strącając go eterem dietylowym. Reakcje wykonano w DMF i produkt strącono bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej. Chociaż wynik eksperymentu nie był zgodny z oczekiwaniem, przedstawiona regioselektywność reakcji Mitsunobu nie była wcześniej opisana, dlatego postanowiono rozszerzyć ten wątek pracy o dalsze badania.^[214] Strukturę rozstrzygnięto

poprzez wykonanie kompletu widm NMR oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas. Na widmie HMBC widać wyraźną korelację między atomem C-2 i protonem H2'. Dodatkowo HMBC pozwoliło ustalić, że grupy piwaloilowe znajdują się w pozycjach 3' i 5' dzięki korelacji karbonylowych atomów węgla z protonami H3' i H5'. Związek **241a** odblokowano z użyciem metanolu nasyconego amoniakiem i uzyskano 2,2'-anhydrourydynę (**95**), której widma NMR są zgodne z danymi literaturowymi.^[215]



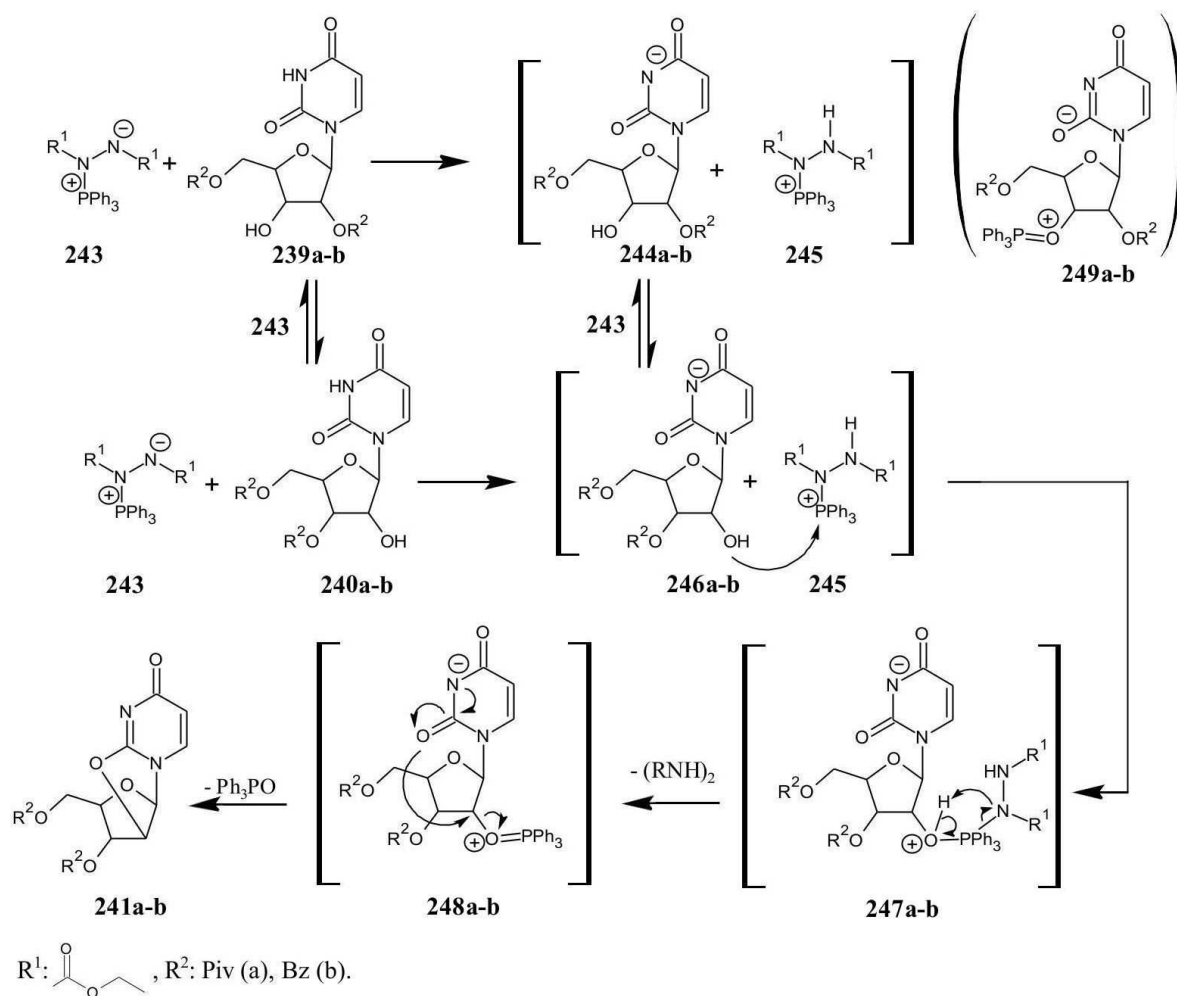
R= Piv (a), Bz (b).



Rysunek 3.3.1.2. Reakcje cyklizacji pochodnych urydyny w warunkach reakcji Mitsunobu.

Częściowe acylowanie urydyny oraz reakcję Mitsunobu powtórzono z użyciem chlorku benzoilu. W pierwszym etapie uzyskano mieszaninę dwóch izomerów dibenzoilowanych 2',5'-di-O-benzoilourydynę (**239b**) oraz 3',5'-di-O-benzoilourydynę (**240b**) w stosunku 2:1, a w drugim etapie w warunkach reakcji Mitsunobu uzyskano jeden produkt 3',5'-di-O-benzoilo-2,2'-anhydrourydynę (**241b**) z wydajnością 68% z urydyny. Wynik ten sugeruję, że regioselektywność reakcji Mitsunobu może przejawiać się dla różnych diacylowanych pochodnych urydyny, a cała procedura może znaleźć zastosowanie dla acylowych grup ochronnych zdolnych do częściowej acylacji zgodnie z wynikami opisanymi przez zespół Y. Ishido.^[128] Grupy acylowe o nierozbudowanym łańcuchu bocznym nie cechują się selektywnością i kontrolowane częściowe acylowanie nie jest możliwe. Przykładowo, użycie 2 ekwiwalentów chlorku acetylu da mieszaninę mono-, di- i triacylowanej urydyny i poddanie takiej mieszaniny reakcji Mitsunobu nie pozwoli na uzyskanieżądanego produktu z zadowalającą wydajnością.

W ramach badań nad tym wątkiem pracy przeprowadzono reakcję Mitsunobu dla 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)urydyny (**242**) w celu sprawdzenia, czy uda się zaobserwować



Rysunek 3.3.1.3. Proponowany mechanizm reakcji Mitsunobu.

regioselektywność. W wyniku reakcji uzyskano tylko jeden produkt 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2,2'-anhydrourydyny (**121**) z wydajnością 23%. Reakcja nie zachodziła w temperaturze pokojowej i dopiero podniesienie temperatury pozwoliło zaobserwować powstawanie produktu. Niska wydajność jak i zapotrzebowanie na energię można tłumaczyć dużą zawadą steryczną grupy 4,4'-dimetoksytrytylowej. Ten wynik może sugerować, że prezentowana regioselektywność reakcji Mitsunobu nie jest zależna od obecności labilnej grupy acylowej w układzie *cis*-diolowym, a zachodzi pomimo jej obecności. Labilny charakter grupy acylowej w warunkach reakcji Mitsunobu wskazuje fakt, że z mieszaniny dwóch dipivaloilowanych pochodnych urydyny z dużą przewagą izomeru z wolną grupą 3'OH (4:1), w reakcji powstaje tylko pochodna 2,2'-anhydrocykliczna (**241a-b**).

Prawdopodobny mechanizm regioselektywnego powstawania **241a** oraz **241b** w reakcji Mitsunobu może być przedstawiony analogicznie do migracji sililu w układzie diolowym zgłoszonym przez R. Peraliego et al.^[216] (Rysunek 3.3.1.3). W pierwszym etapie oderwaniu pod wpływem adduktu DEAD-Ph₃P ulega proton grupy imidowej uracylu generując dwie pary jonów **244a-b** i **245** oraz **246a-b** i **245**. Obliczona wartość pK_a grupy imidowej uracylu wynosi 9,7. W przypadku grup hydroksylowych wartości te wyniosły odpowiednio pK_{aOH2'} = 12,7 i pK_{aOH3'} = 13,0. Addukt DEAD-Ph₃P może działać jako katalizator zasadowy, dlatego grupa acylowa w układzie *cis*-diolowym może migrować powodując izomeryzację dwóch diacylowanych pochodnych urydyny jak i produktów pośrednich **244a-b** i **246a-b**. Jednego z izomerów ubywa w wyniku przeniesienia fosfiny na grupę 2'OH i utworzenie jonu oksofosfoniowego **248a-b**. W ostatnim etapie, który jest praktycznie nieodwracalny, następuje wewnątrzcząsteczkowa substytucja nukleofilowa typu S_N2 i powstanie produktu 2,2'-anhydrocyklicznego. Alternatywny jon oksofosfoniowy (**249a-b**) również może powstawać w odwracalnej reakcji przeniesienia fosfiny, jednak nie obserwuje się odpowiadającego mu produktu 2,3'-anhydrocyklicznego.

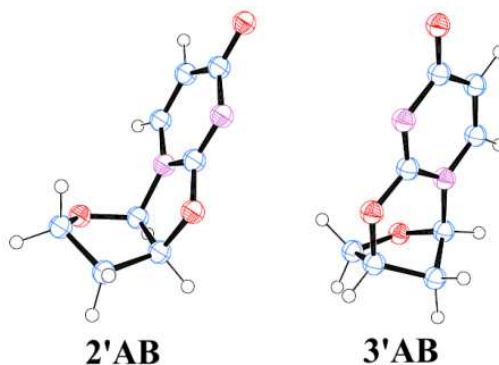
Regioselektywność opisanej reakcji może być spowodowana różnymi czynnikami – zawadą steryczną, rozkładem gęstości elektronowej w centrach ataków nukleofilowych oraz dogodnością geometryczną. Aby ocenić, który z czynników ma znaczenie, przeprowadzono obliczenia metodami DFT oraz półempirycznymi.

3.3.2. Obliczenia*

Ze względu na wielkość cząsteczek występujących w reakcji, które posiadają rozbudowane grupy piwaloilowe oraz grupę fosfinową, postanowiono na początku obliczyć z wykorzystaniem metody DFT (B3LYP/6-31++G(d,p)) strukturę samych szkieletów anhydrocyklicznych (Rysunek 3.3.2.1.). Eliminacja wszystkich podstawników pozwoliła na określenie różnicy energii wynikającej tylko ze względu na usytuowanie mostka anhydrocyklicznego. Dla szkieletu związku 2'-anhydrocyklicznego (**2'AB**) energia całkowita wyniosła -644,863 hartree, a dla szkieletu związku 3'-anhydrocyklicznego (**3'AB**) -644,852 hartree, co w przeliczeniu na kcal/mol oznacza 6,9 kcal/mol różnicy z korzyścią dla mostka 2'-anhydrocyklicznego. Aby znaleźć wytłumaczenie dla tej różnicy przeprowadzono analizę długości wiązań i wielkości kątów między sąsiadującymi wiązaniami. Szcytane z obliczonych modeli wartości porównano z danymi literaturowymi^[217] dla długości wiązań oraz

* Obliczenia te zostały przeprowadzone przy współpracy z dr Karolem Kamelem z IChB PAN.

wartościami idealnymi z tablic chemicznych dla kątów. Przeprowadzona w ten sposób analiza nie wykazała, które odkształcenia mogą odpowiadać za obliczoną różnicę energii. Patrząc całościowo na obliczone struktury stwierdzono, że reszta cukrowa szkieletu **3'AB** była



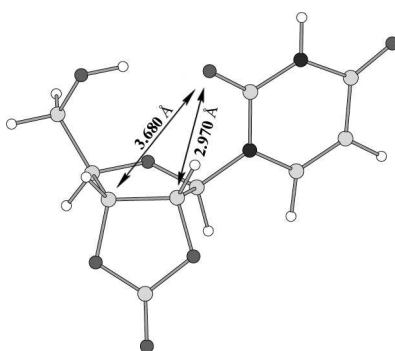
Rysunek 3.3.2.1. Rysunki ORTEP struktur dwóch szkieletów związków anhydrocyklicznych obliczonych metodą DFT w programie NWChem 6.1.

bardziej zwarta i długości przekątnych pierścienia furanowego wyniosły $d_{C3'-C1'} = 2,272 \text{ \AA}$ i $d_{C4'-C2'} = 2,377 \text{ \AA}$. Dla **2'AB** przekątne wyniosły odpowiednio $d_{C3'-C1'} = 2,428 \text{ \AA}$ i $d_{C4'-C2'} = 2,392 \text{ \AA}$. W modelach THF stworzonych na podstawie krystalograficznych długości wiązań oraz minimalnych i maksymalnych wielkości kątów^[218] przekątne mieściły się w przedziale od $2,370 \text{ \AA}$ do $2,426 \text{ \AA}$. W przypadku **3'AB** jedna przekątna nie mieści się w tym przedziale i obie przekątne są mniejsze od przekątnych w szkielecie **2'AB**.

W celu oszacowania efektu elektronowego na opisaną reakcję, czyli która grupa hydroksylowa jest lepszym akceptorem grupy fosfinowej, obliczono dwie uproszczone struktury 2'-fluorourydynę oraz 3'-fluorourydynę metodą DFT (B3LYP/6-31G(d,p)). Atom fluoru jest izopolarnym i izosterycznym zamiennikiem grupy hydroksylowej.^[219,220] Podstawienie fluorem miało na celu wyeliminowanie niepożądanego wiązania wodorowego 2',3' OH...O urydyny w układzie *cis*-diolowym przy jednoczesnej minimalizacji kosztów obliczeniowych. W policzonych strukturach ładunki cząstkowe na atomach tlenu wolnych grup hydroksylowych wyniosły $\delta_{O2'} = -0,31 \text{ e}$ i $\delta_{O3'} = -0,33 \text{ e}$ w analizie populacyjnej Lowdina, co ma nieduży, ale przeciwny wpływ na omawianą regioselektywność. Dostępna stacja robocza okazała się dostatecznie silna, aby policzyć metodą DFT (B3LYP/6-31G(d,p)) również większe układy niejonowe, dlatego obliczono struktury dwóch izomerów dipivaloilourydyny z wolną grupą 2'OH (**240a**) i 3'OH (**239a**). W policzonych strukturach ładunki cząstkowe na atomie tlenu wolnej grupy OH wyniosły odpowiednio $\delta_{O2'} = -0,32 \text{ e}$ (**240a**) i $\delta_{O3'} = -0,32 \text{ e}$ (**239a**) w analizie populacyjnej Lowdina i $\delta_{O2'} = -0,54 \text{ e}$ i $\delta_{O3'} = -0,56 \text{ e}$

w analizie populacyjnej Mullikena, co ma nieduży, ale przeciwny wpływ na omawianą regioselektywność.

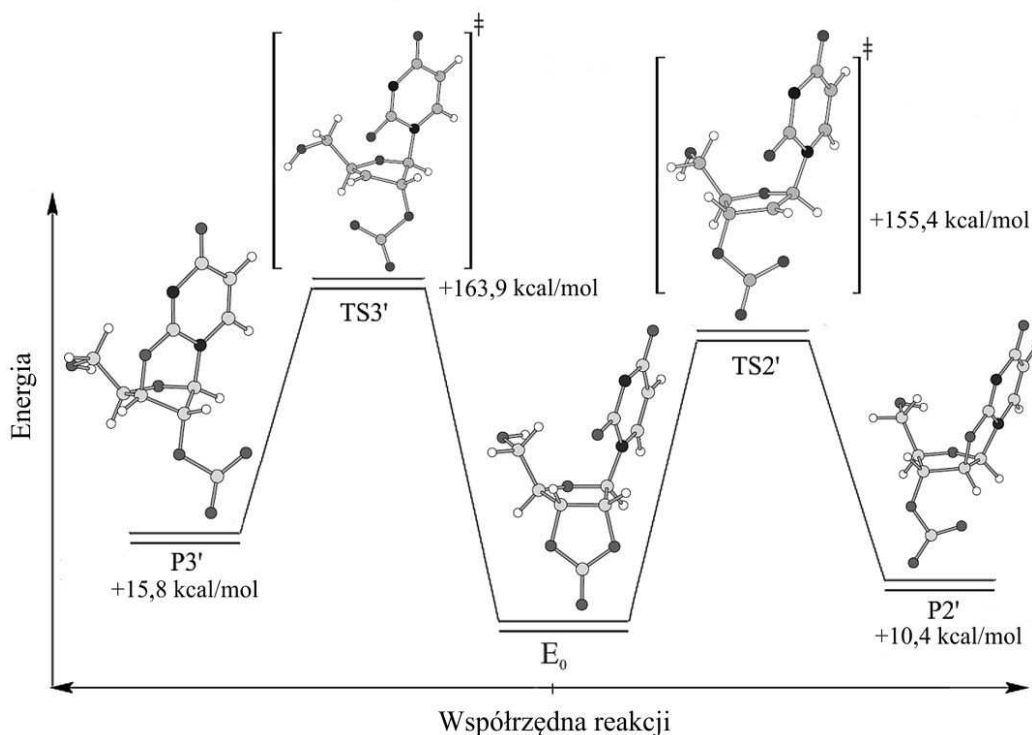
Aby określić, który atom węgla w układzie *cis*-diolowym będzie bardziej podatny na atak nukleofilowy, obliczono strukturę 2',3'-cyklicznego węglanu urydyny metodą DFT (B3LYP/6-31G(d,p)) (Rysunek 3.3.2.2.). Węglan urydyny jest produktem pośrednim w opisaney wcześniej reakcji urydyny z węglanem difenyłu i NaHCO₃, która prowadzi do 2,2'-anhydrourydyny (**95**). Reakcja ta również jest regioselektywna, chociaż oba miejsca ataku nukleofilowego są dostępne. W trakcie analizy konformacyjnej stwierdzono, że globalne minimum powierzchni energii konformacyjnej odpowiada strukturze z wiązaniem wodorowym pomiędzy grupą 5'OH oraz atomem tlenu w pozycji 2 uracylu (Rysunek 3.3.2.2.). Ładunki cząstkowe zlokalizowane na atomach węgla w pozycjach 2' i 3' są sobie równe i wynoszą +0,05 e. Dla wcześniej policzonych struktur fluorowanych ładunek cząstkowy na atomie węgla C-3' 2'-fluorourydyny wyniósł +0,03 e, a na atomie węgla C-2' 3'-fluorourydyny wyniósł +0,02 e, a dla dwóch izomerów dipiwaloilourydyny wyniosły odpowiednio $\delta_{C2'} = +0,02$ e (**240a**) i $\delta_{C3'} = +0,02$ e (**239a**) (Lowdin) oraz $\delta_{C2'} = +0,11$ e (**240a**) i $\delta_{C3'} = +0,15$ e (**239a**) (Mulliken), co znów sugeruje, że rozkład gęstości elektronowej w układzie *cis*-diolowym nie miał znaczenia w przypadku ataku nukleofilowego atomu tlenu O-2. Modelowanie nukleozydów dipiwaloilowanych z grupą fosfoniową, ze względu na obecny ładunek, wymagał użycia wyższego poziomu teorii obliczeń z funkcjami dyfuzyjnymi, co przerosło możliwości dostępnych stacji roboczych.



Rysunek 3.3.2.2. Struktura cyklicznego węglanu urydyny (Rysunek programu HyperChem 8.0.).

Węglan urydyny jest względnie prostą strukturą, a wewnątrzcząsteczkowy atak nukleofilowy jest relatywnie prostą reakcją do modelowania. To pozwoliło na obliczenie energii stanów przejściowych zamknięcia mostków anhydrocyklicznych do dwóch alternatywnych pozycji 2' oraz 3' przy użyciu metody półempirycznej PM7 w programie

MOPAC (Rysunek 3.3.2.3.). Jako punkt początkowy na powierzchni energii potencjalnej użyto strukturę węglanu urydyny o najniższej energii konformacyjnej, która nie posiada wiązania wodorowego 5'OH...O-2, a grupa 5'-OH jest zwrócona w przeciwnym do zasady azotowej kierunku. Wiązanie wodorowe uniemożliwiało znalezienie punktu siodłowego spełniającego matematyczne kryteria stanu przejściowego, gdyż ograniczało swobodę rotacji



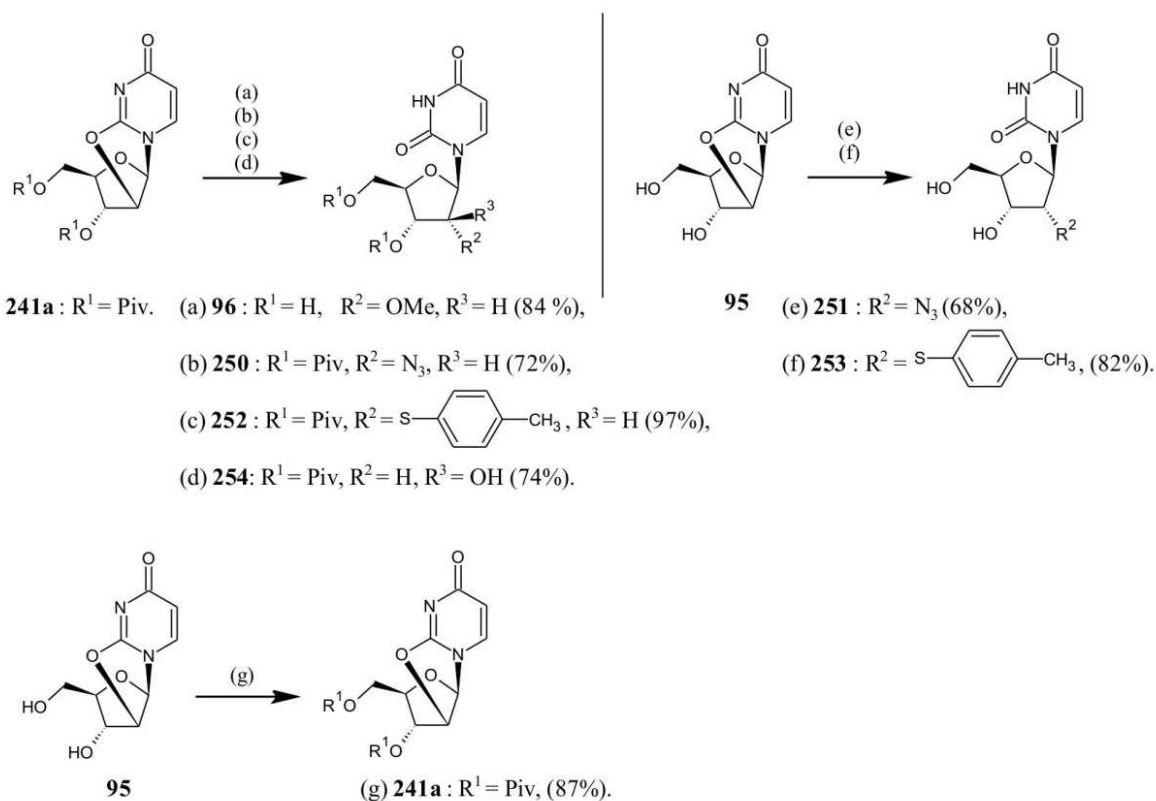
Rysunek 3.3.2.3. Energia vs. współrzędna reakcji dla dwóch alternatywnych dróg powstawania mostka anhydrocyklicznego. Rysunki struktur wykonano w programie HyperChem 8.0.

wiązania glikozydowego. Strukturze startowej przypisano wartość referencyjną 0 kcal/mol. Obliczona energia stanu przejściowego zamknięcia mostka anhydrocyklicznego w pozycji 2' (TS2') wyniosła 155,4 kcal/mol, a energia alternatywnego stanu przejściowego TS3' wyniosła 163,9 kcal/mol. Zarówno energia stanów przejściowych jak i energia produktów zamknięcia mostka anhydrocyklicznego pokazuje, że tworzenie się mostka anhydrocyklicznego w pozycji 2' jest energetycznie preferowane. Jest to zbieżne z wcześniejszymi ustaleniami oraz z faktem, że w reakcjach wewnątrzcząsteczkowych odległość między atomami biorącymi udział w reakcji jest proporcjonalna do energii aktywacji i kontroluje reakcję kinetycznie. Zmierzona w programie HyperChem odległość między atomem tlenu O-2 uracylu oraz atomami węgla C-2' o C-3' wynosi odpowiednio 2,970 Å and 3,680 Å. Chociaż węglan urydyny posiada wyjątkowe pofałdowanie reszty

cukrowej, to efekt ten powinien pozostać prawdziwy również dla omawianej reakcji Mitsunobu.

3.3.3. Dalsze reakcje

Chociaż 3',5'-di-O-piwaloilo-2,2'-anhydropirydyna (**241a**) nie była oczekiwanym produktem, a reakcje substytucji lub otwarcia mostka 2,2'-anhydrocyklicznego są dość dobrze znane, postanowiono jednak sprawdzić przydatność uzyskanego w wyniku reakcji Mitsunobu produktu. W tym celu przeprowadzono szereg reakcji. Zgodnie z przytoczonym wcześniej artykułem J. Piccirilliego et al.^[190] dla związków 2,2'-anhydrocyklicznych substytucje nukleofilowe mogą zachodzić w pozycji 2 zasady azotowej prowadząc do produktów o konfiguracji arabinozy lub w pozycji 2' reszty cukrowej prowadząc do produktów o konfiguracji rybozy. Pierwszą substytucję do **241a** przeprowadzono z metanolanem magnezu. Reakcja zaszła z wydajnością 84%, chociaż towarzyszyło jej odblokowanie grup hydroksylowych (Rysunek 3.3.3.1.). Wyizolowano 2'-O-metylourydynę (**96**). Nie było potrzeby przeprowadzania substytucji do 2,2'-anhydropirydyny (**95**), ponieważ reakcja ta została już wielokrotnie opisana m. in. przez S.K. Roya i J.-Y. Tanga,^[141] którzy podają



Rysunek 3.3.3.1. Dalsze reakcje: (a) Mg(OMe)₂/MeOH_{abs}, t.w.; (b)/(e) LiN₃, DMF, 135 °C; (c)/(f) *p*-tiokrezol, PPI, DMF, 120 °C; (d) 2N HCl_{aq}/DMF, 80 °C; (g) PivCl, Py.

wydajność 92%. Drugą reakcję **241a** przeprowadzono z azydkiem litu. Grupa azydkowa uległa podstawieniu w pozycji 2' z wydajnością 72% (**250**). Analogiczna reakcja dla 2,2'-anhydrourydyny zaszła z wydajnością 68% dając również produkt o konfiguracji rybozy (**251**). Trzeci nukleofil został wygenerowany *in situ* w reakcji z *p*-tiokrezolem w obecności katalitycznej ilości ftalimidku potasu (PPI). Dla **241a** reakcja zaszła ilościowo i po oczyszczeniu uzyskano produkt o konfiguracji rybozy z wydajnością 97% (**252**). W przypadku 2,2'-anhydrourydyny reakcja również zaszła ilościowo (TLC), jednak standardowe oczyszczenie przyniosło pewne straty i produkt podstawienia wyizolowano z wydajnością 82% (**253**). Dokładna analiza widm 2D NMR pozwoliła na przypisanie wszystkich sygnałów protonowych i węglowych również w dołączonej grupie tiotolilowej z rozróżnieniem pozycji orto, meta i para względem atomu węgla związanego z atomem siarki (C-S). Widma porównano z obrazem uzyskanym w ACD Lab NMR Predictor,^{*} oraz z widmem *p*-tiokrezolu dostępnego w bazie SDBS.[†] W wyniku przeprowadzonych reakcji można stwierdzić, że **241a** nie wykazuje szczególnej przewagi nad 2,2'-anhydrourydyną (**95**) w reakcjach substytucji nukleofilowej S_N2.

Dodatkowo poddano **241a** reakcji kwaśnej hydrolizy mostka anhydrocyklicznego. Zgodnie z oczekiwaniami, uzyskano 1-(3',5'-di-O-piwaloiło-β-D-arabinofuranozylo)uracyl (**254**). W czasie oczyszczania na kolumnie z żelom krzemionkowym nie stwierdzono migracji grupy piwaloiłowej w układzie diolowym, co jest właściwe dla układu *trans*-diolowego. Produkt wyizolowano z wydajnością 74%. Konfigurację reszty cukrowej sugeruje widmo NOESY, na którym widać korelację między grupą 2'OH i protonami H3', H6 oraz NH. Występuje również korelacja między protonami H3'-H6, a korelacji między protonem H2' i H6 lub NH nie ma, chociaż należy pamiętać przy interpretacji widm 2D, że gdy nie widać korelacji, to nie oznacza, że jej nie ma. Jedynie, gdy widać korelację, ma się pewność, że jest. Sygnały pochodzące od H2' i H3' są singletami, czyli stała sprzężenia *J* jest bliska zera, co również przemawia za tym, że otrzymany produkt posiada konfigurację arabinozy.

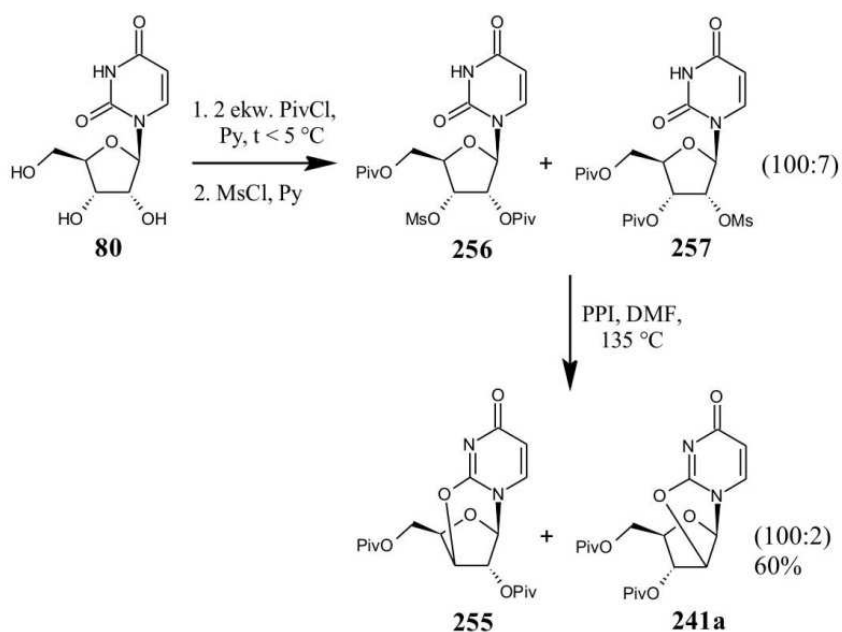
Postanowiono również odpowiedzieć na pytanie, czy bezpośrednia acylacja 2,2'-anhydrourydyny (**95**) jest lepszym sposobem otrzymywania związków typu **241**. J. Sheng *et al.*^[221] przeprowadzili benzoilowanie 2,2'-anhydrourydyny chlorkiem benzoilu z wydajnością > 88%. W ten sam sposób wykonano piwaloiłowanie z wydajnością 87%.

^{*} ACD Lab NMR Predictor, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, On, Canada, www.acdlabs.com, 2015.

[†] http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi

Zakładając 90% wydajność syntezy 2,2'-anhydrourydyny metodą z węglanem difenyłu,^[141] wydajność otrzymywania **241a** i **241b** z urydyny wyniosłaby odpowiednio 78% i > 79%, co jest lepszym wynikiem, niż przedstawiona synteza na drodze reakcji Mitsunobu.

W podrozdziale 3.3.1. napisano, że w reakcji Mitsunobu przeprowadzonej dla mieszaniny dwóch izomerów dipiwaloilourydyny z wolną grupą 2'OH oraz 3'OH (**239a**, **240a**) spodziewano się uzyskać mieszaninę odpowiednich pochodnych anhydrocyklicznych 3',5'-di-O-piwaloilo-2,2'-anhydrourydnę (**241a**) oraz 2',5'-di-O-piwaloilo-2,3'-anhydrourydnę (**255**). Otrzymaną mieszaninę planowano rozdzielić metodami chromatograficznymi. Jak już stwierdzono, w wyniku tej reakcji otrzymano jedynie **241a**. Mieszaninę izomerów **241a** i **255** można otrzymać jednak w inny sposób. Najpierw mieszaninę izomerów **239a** i **240a** (4:1) poddano reakcji mesylowania w pirydynie w temperaturze pokojowej. Otrzymano w ten sposób mieszaninę dwóch pochodnych mesylowych **256** i **257** z wydajnością 82% względem urydyny, których stosunek był również 4:1. Mieszaninę oczyszczono na kolumnie. Podczas rozdziału stwierdzono minimalną tendencję do separacji, dlatego zebrano i połączono wszystkie frakcje zawierające jeden lub oba izomery. Tak otrzymaną mieszaninę **256** i **257** poddano reakcji cyklizacji w warunkach zasadowych przy użyciu ftalimidku potasu (PPI). Zgodnie z założeniem otrzymano mieszaninę izomerów **241a** i **255** z wydajnością 93% w stosunku 4:1. Stwierdzono minimalną tendencję do separacji podczas rozdziału chromatograficznego w układzie chlorek metylenu – metanol 98:2 (v:v). Poziom zanieczyszczenia izomerem 2,2'-anhydrocyklicznym pozostawał



Rysunek 3.3.3.2. Otrzymywanie 2',5'-di-O-piwaloilo-2,3'-anhydrourydyny (**255**).

znaczący pomimo kilkukrotnego powtórzenia rozdziału. Ciekawy rezultat otrzymano w innym wariantcie, gdy piwaloilowanie oraz mesylowanie wykonano metodą *one-pot*. Otrzymano w ten sposób mieszaninę izomerów mesylowych **256** i **257** z wydajnością 93% (względem urydyny) o stosunku 100:7. Na otrzymanej mieszaninie przeprowadzono cyklizację z PPI i uzyskano mieszaninę pochodnych anhydrocyklicznych **241a** i **255** z wydajnością 90% o stosunku 100:7. W tym przypadku wyjściowe zanieczyszczenie izomerem 2,2'-anhydrocyklicznym jest na tyle małe, że można spróbować zmniejszyć jego ilość poprzez kilkukrotny rozdział. Za cel postawiono sobie uzyskać związek **255** o czystości > 95% (NMR). Już po dwóch rozdzielach mieszaniny poreakcyjnej w układzie DCM/MeOH 99:1 → DCM/MeOH 98:2 uzyskano mieszaninę **255** i **241a** z wydajnością 60% o stosunku 100:2 (Rysunek 3.3.3.2.). Pozostałe frakcje mieszane można poddać kolejnym rozdzielom poprawiając wydajność. Otrzymane w innych syntezach 2,2'-anhydrourydynę (**95**) i 2,3'-anhydrourydynę (**106**) zmieszano i sprawdzono możliwość separacji chromatograficznej na TLC. Współczynniki opóźnienia są zbliżone, choć różnica jest bardziej widoczna niż w przypadku pochodnych piwaloilowanych i wynoszą 0,46 dla **95** oraz 0,40 dla **106** w układzie chlorek metylenu – metanol 2:1 (v/v).

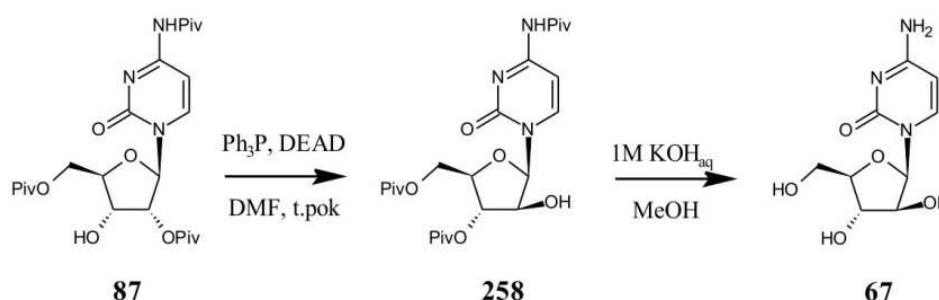
Prezentowana synteza może stanowić pewną alternatywę otrzymywania 2,3'-anhydrourydyny (**106**) w warunkach laboratoryjnych względem opisaną w części literaturowej metody Yunga i Foxa (s. 42), która zakłada ditrytylowanie urydyny i następnie rozdzielanie pochodnych ditrytylowych. Dopiero pochodna ditrytylowa z wolną grupą 3'OH jest poddawana mesyłowaniu i cyklizacji. Na pierwszym etapie następuje odrzucenie dużej części materiału ze względu na ograniczoną selektywność ditrytylowania w stosowanych warunkach. Jednak metoda Yunga i Foxa pozwala na otrzymanie produktu bez widocznego zanieczyszczenia drugim izomerem.

3.3.4. Reakcja Mitsunobu 4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydyny

Otrzymane wyniki przeprowadzonych reakcji Mitsunobu dla częściowo acylowanych pochodnych urydyny kazały wrócić do podobnej reakcji przeprowadzonej dla 4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydyny (**87**). Reakcję powtórzono i wyizolowany produkt (**258**, 67%) poddano dokładnej analizie NMR. Tak jak napisano w poprzednim podrozdziale związek ten nie jest anhydrocykliczny. Posiada sygnał NH oraz sygnał pochodzący od grupy OH. Widmo protonowe różni się zarówno od substratu jak i 4-N,3',5'-O,O-tripiwaloilocytydyny, co może oznaczać, że związek ten posiada zmienioną konfigurację części cukrowej. Analiza HSQC

i HMBC wskazuje, że wolna grupa hydroksylowa znajduje się w pozycji 2'. Chociaż sygnały H2' i H4' się nałożyły, widoczne korelacje dają silny argument za taką właśnie strukturą. Może to oznaczać, że związek ten jest 1-(4-N,3',5'-O,O-tripiwaloiło-β-D-arabinofuranozylo)cytozyną (**258**). Sygnał protonowy przypisany H3' jest singletem, sygnał H1' jest dubletem o $J_{H1'H2'} = 3,2$ Hz. Zaznaczyć również trzeba fakt, że w trakcie rozdzału chromatograficznego otrzymanej mieszaniny reakcyjnej nie zaobserwowano migracji grupy piwaloilowej w układzie diolowym, co jest właściwe dla układów *trans*. Na widmie NOESY, pomimo wydłużenia czasu akumulacji, ilości skanów i eksperymentów, obserwowane korelacje H6-2'OH, H6-H3' oraz H5'a-H3' są na poziomie szumu. W celu pozbycia się wątpliwości względem poprawności struktury odblokowano grupy hydroksylowe w warunkach zasadowych i wykonano widma NMR, które są zgodne z widmami arabinocytydyny (**67**).^[222]

W kontekście rozważań poczynionych dla regioselektywnej reakcji Mitsunobu częściowo acylowanej urydyny można przyjąć, że również w tym przypadku w warunkach reakcji dochodzi do migracji grupy piwaloilowej w układzie *cis*-diolowym substratu. Również



Rysunek 3.3.4.1. Reakcja Mitsunobu N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydyny (**87**).

w tym przypadku względy geometryczne mogą decydować o kinetycznej kontroli kierunku reakcji w stronę produktu 2,2'-anhydrocyklicznego. Mostek ten najwidoczniej w warunkach reakcji jest nietrwały, co w efekcie pozwoliło otrzymać 1-(4-N,3',5'-O,O-tripiwaloiło-β-D-arabinofuranozylo)cytozynę (**258**).

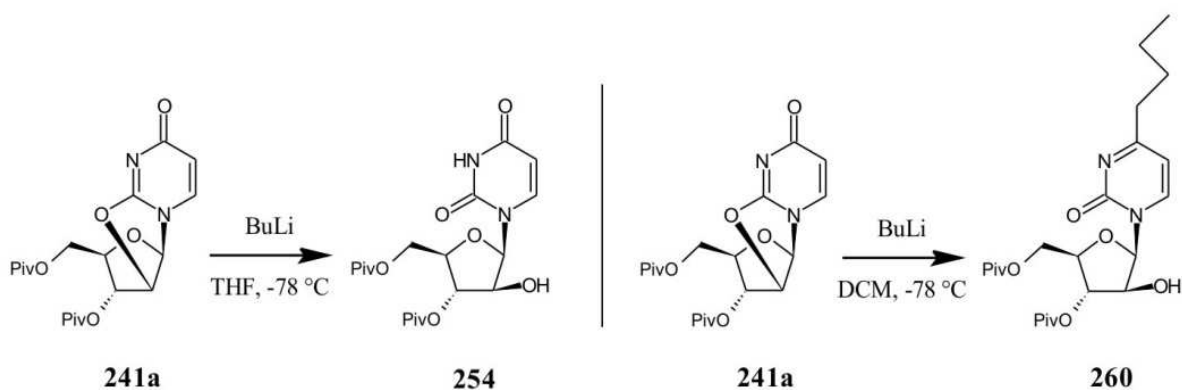
3.4. Poszukiwania nowych reaktywności mostków anhydrocyklicznych

W ramach realizowanej pracy dotyczącej struktur anhydrocyklicznych, postanowiono sprawdzić, czy możliwe jest wykorzystanie innych nukleofili, niestosowanych dotychczas w reakcjach substytucji do mostków anhydrocyklicznych, ale spotykanych w reakcjach substytucji do epoksydowych pochodnych nukleozydów lub do pochodnych nukleozydowych 2' lub 3'-karbonylowych. Postanowiono również sprawdzić, czy niektóre nukleofile

stosowane w substytucjach do mostka pochodnych 2,2'-anhydrourydyny można również podstawić do innych struktur anhydrocyklicznych, co do tej pory nie było w sposób wyczerpujący opisane.

3.4.1. Reakcje substytucji przykładowych nukleofilów węglowych i fosforowych

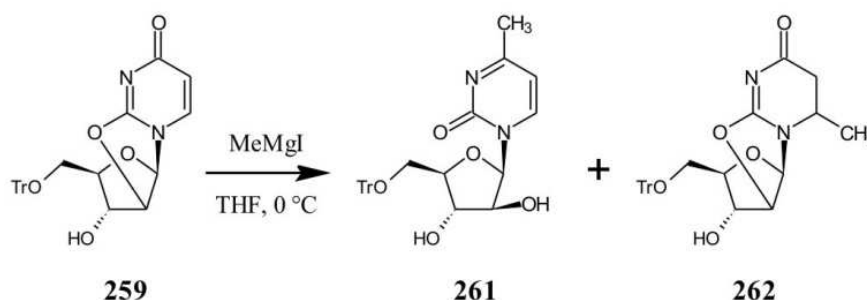
Wśród stosowanych nukleofilów w reakcjach z anhydronukleozydami można wymienić nukleofile siarkowe (np. tiole), tlenowe (np. alkoholany), azotowe (np. azydek, amoniak), halogenki oraz nukleofile selenowe, o czym nie było wcześniej wspomniane. Logicznym kierunkiem, gdy spojrzy się na układ okresowy, jest szukanie dostatecznie reaktywnych nukleofilów węglowych i fosforowych. W przypadku nukleofilów węglowych, można znaleźć w literaturze przykłady wykorzystania w reakcjach z pochodnymi epoksydowymi związków litoorganicznych oraz magnezoorganicznych. Postanowiono więc wykonać próby dla dwóch przykładowych reagentów – butylolitu i bromku metylomagnezowego. Do dyspozycji były dwa substraty anhydrocykliczne: 3',5'-di-O-piwaloiło-2,2'-anhydrourydyna (**241a**) oraz



Rysunek 3.4.1.1. Wykonane reakcje **241a** z BuLi.

5'-O-trytylo-2,2'-anhydrourydyna (**259**). 2,2'-Anhydrourydyna (**95**) ma bardzo ograniczoną rozpuszczalność, dlatego nie można było przeprowadzić z nią prób. Związek **241a** poddano reakcji z BuLi w bezwodnym THF w argonie, w obniżonej temperaturze (mieszanina chłodząca NaCl/lód) wedle procedury zapożyczony z pracy V. Pace *et al.*^[223] z tą różnicą, że nie użyto LiBr, aby uniknąć niepotrzebnych produktów ubocznych substytucji bromkiem. Niestety uzyskano mieszaninę wielu produktów niemożliwą do oczyszczenia. Reakcję powtórzono również w niższej temperaturze z użyciem suchego lodu i izopropanolu jako mieszaniny chłodzącej. Po wkropleniu BuLi mieszaninę chłodzono jeszcze przez 2 godziny. Po tym czasie nie stwierdzono żadnych zmian. Reakcję pozostawiono przez noc pozwalając ogrzać się do temperatury pokojowej. Uzyskano jeden główny produkt, który udało się wyizolować z wydajnością 24%. TLC wskazywała, że spora część substratu pozostała

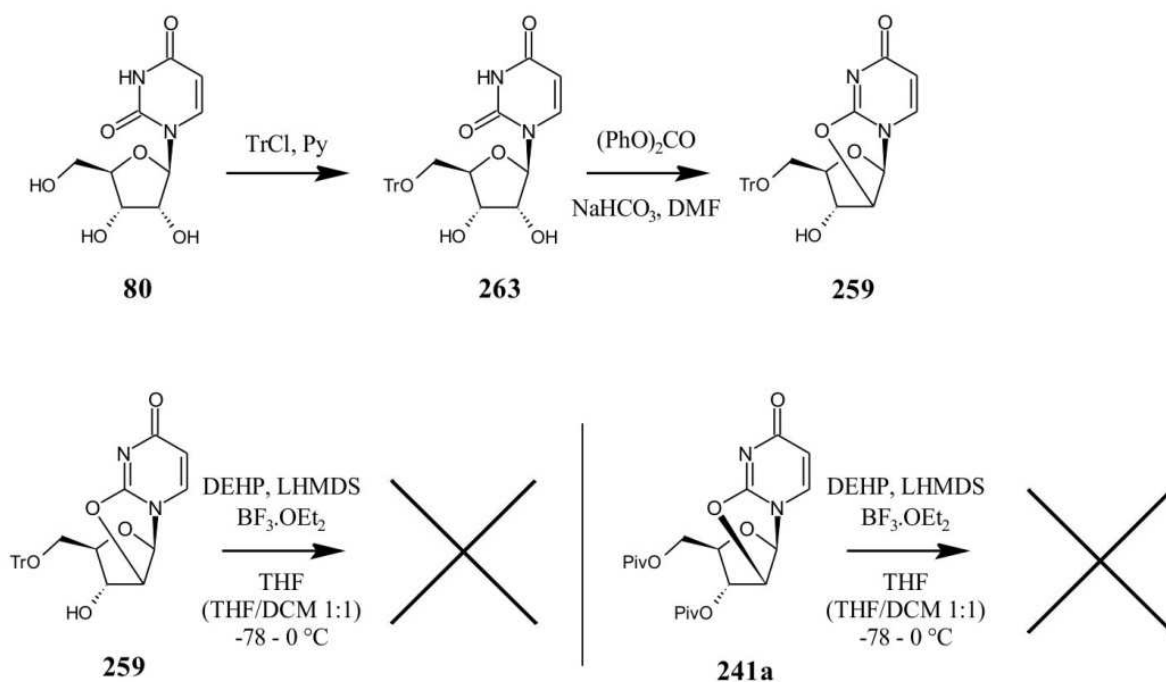
nieprzereagowana. Niestety widmo ^1H NMR produktu było identyczne z widmem 1-(3',5'-di-O-piwaloiilo- β -D-arabinofuranozylo)uracylu (**254**), co oznacza, że nie udało się uzyskać idealnie bezwodnych warunków, choć THF był przygotowany według sprawdzonej procedury destylacji z nad sodu i benzofenonu (s. 135). W analogicznej reakcji prowadzonej w DCM obraz TLC był inny. Udało się wyizolować główny produkt z wydajnością 38%. Odzyskano również 40% substratu. Wykonano komplet widm, których analiza sugeruje strukturę produktu podstawienia butylu w pozycji 4 (**260**) (Rysunek 3.4.1.1.). Widma dwuwymiarowe pozwoliły przypisać wszystkie sygnały odpowiednim atomom. Na widmie HMBC można zobaczyć wyraźną korelację atomu C-4 z protonami pierwszych dwóch grup metylenowych łańcucha butylowego. Mostek anhydrocykliczny uległ otwarciu, ponieważ na widmach jest obecny sygnał od grupy 2'OH, skierowanej nad płaszczyznę części cukrowej, o czym może świadczyć singletowy charakter sygnału pochodzącego od H3'. Sygnały H2', H4' i H5'b pokrywają się tworząc multiplet o integracji odpowiadającej trzem protonom. Wynik ten sugeruje niepełną aromatyzację pierścienia uracylu. Po substytucji następuje dehydratacja pozycji 4, czego siłą napędową jest pełna aromatyzacja układu. Poszukując



Rysunek 3.4.1.2. Reakcja opisana przez A. Grouiller i H. Essadiq.

przykładów syntezy 4-alkilowych pochodnych urydyny w literaturze znaleziono jeden przykład reakcji dla związków anhydrocyklicznych opisany przez A. Grouiller i H. Essadiq.^[224] Autorzy w tej pracy opisali próby dla 5'-O-trytylo-2,2'-anhydrourydyny (**259**) z dużymi nadmiarami MeMgI (15-30 ekw.) w THF (Rysunek 3.4.1.2). Uzyskiwano mieszaninę produktów, z której wyizolowano 4-metylo-1-(5'-O-trytylo- β -D-arabinofuranozylo)-2-pirymidynon (**261**) oraz 5,6-dihydro-6-metylo-5'-trytylo-2,2'-anhydro-urydynę (**262**). Proponowana struktura **260** na podstawie analizy widm 2D NMR, jest w zgodzie z wynikiem uzyskanym przez autorów publikacji. W związku z tym uznano, że dalsze próby reakcji związków anhydrocyklicznych z związkami metaloorganicznymi nie będą prowadzić do zaplanowanego celu, czyli modyfikacji części cukrowej nukleozydu.

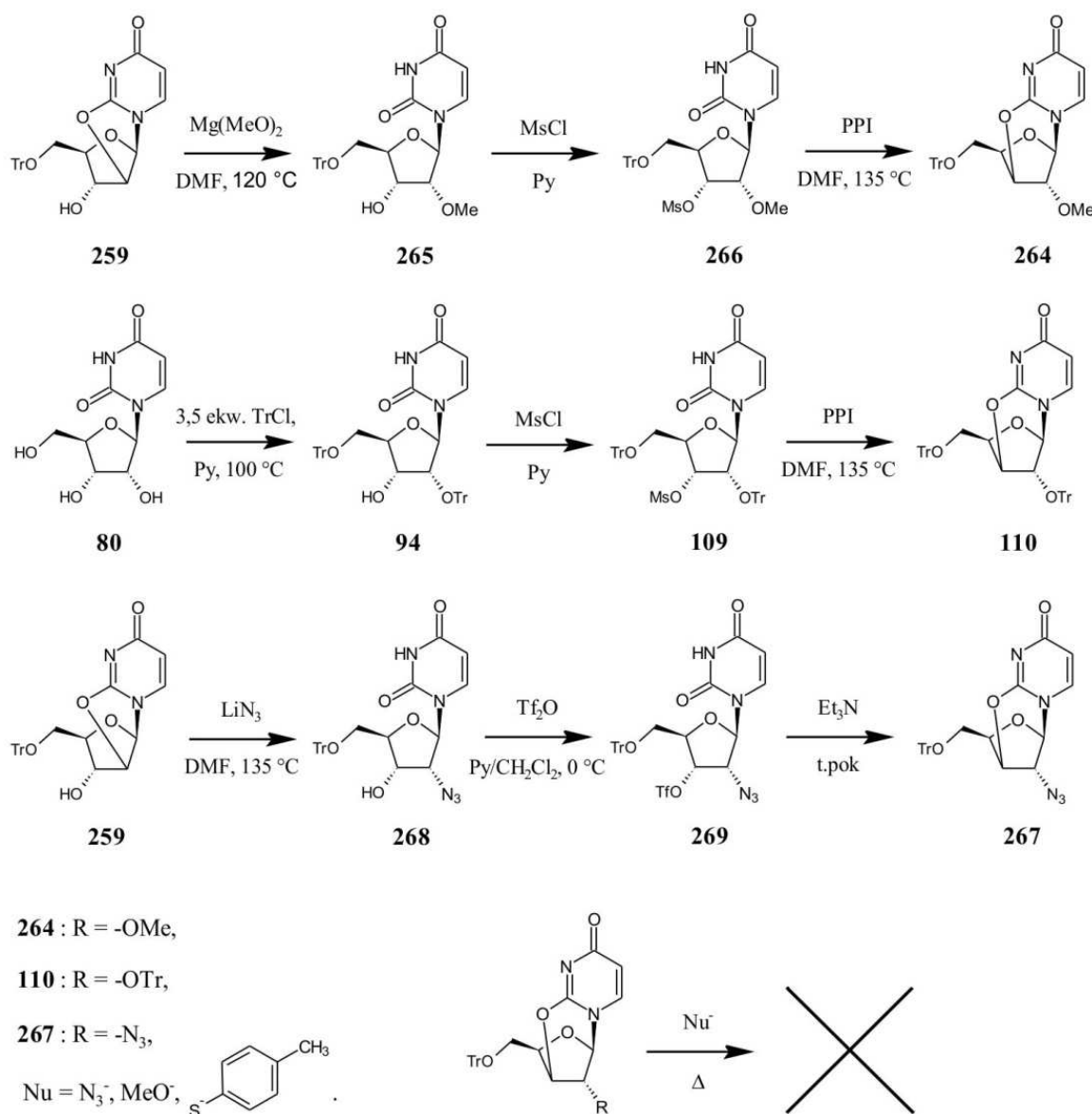
W przypadku nukleofili fosforowych, wybrano H-fosfonian dietylu (DEHP). Choć posiada on trzy podstawniki wyciągające elektrony, jednak ze względu na brak dostępu do H-fosfinianów lub odpowiednich fosfin postanowiono zastosować to, co było łatwo dostępne i bezpieczne w użyciu. Wykonano kilka prób dla **241a** i **259** bazując na procedurach podanych w literaturze dla pochodnych ketonowych,^[225] oraz dla związków epoksydowych.^[226] W pierwszej z dwóch cytowanych publikacji autorzy również zastosowali H-fosfonian dietylu, dlatego uznano że wykonanie próby z tym reagentem jest zasadne. Związek **259** otrzymano z urydyny poprzez monotrytylowanie i cyklizację powstałego produktu (**263**) z wykorzystaniem węglanu difenyłu i NaHCO₃ (Rysunek 3.4.1.3.). Substrat nukleozydowy oraz BF₃·OEt₂ rozpuszczono w THF (w przypadku **259** użyto dużą objętość ze względu na ograniczoną rozpuszczalność), a w drugim wariantcie w układzie THF/DCM (1:1 v/v) i schłodzono mieszaniną chłodzącą izopropanolu i suchego lodu. W drugiej kolbce rozpuszczono DEHP w THF, po schłodzeniu dodano strzykawką, kroplami 1M roztwór LHMDS w THF w atmosferze argonu. Po 15 minutach w atmosferze argonu przeniesiono roztwór DEHP/LHMDS/THF do roztworu nukleozydowego i mieszano przez 2 godziny. Po tym czasie nie zaobserwowano żadnych zmian. Reakcje pozostawiono na noc pozwalając mieszaninie ogrzać się do temperatury pokojowej. Zaobserwowano śladowe ilości produktu, dlatego nie podjęto próby izolacji.



Rysunek 3.4.1.3. Próby substytucji H-fosfonianu dietylu (DEHP) do pochodnych 2,2'-anhydrourydyny.

3.4.2. Reaktywność mostka 2,3'-anhydrocyklicznego urydyny

Kontynuując badania nad wykorzystaniem układów anhydrocyklicznych do otrzymywania 2' - lub 3' -modyfikowanych nukleozydów, postanowiono również wypróbować 2,3'-anhydrourydynę (**106**) i jej pochodne. Doniesienia literaturowe wskazywały na inną ich reaktywność niż pochodnych 2,2'-anhydrocyklicznych i postanowiono to zweryfikować. W trakcie prowadzenia badań zsyntezowano kilka pochodnych 2,3'-anhydrourydyny, które poddano reakcjom bezpośredniej substytucji. Pierwszą pochodną była 2'-O-metylo-5'-O-trytylo-2,3'-anhydrourydyna (**264**) (Rysunek 3.4.2.1.), którą uzyskano w kilku etapach. Związek **259** poddano reakcji ze świeżo przygotowanym metanolanem magnezu. Uzyskaną



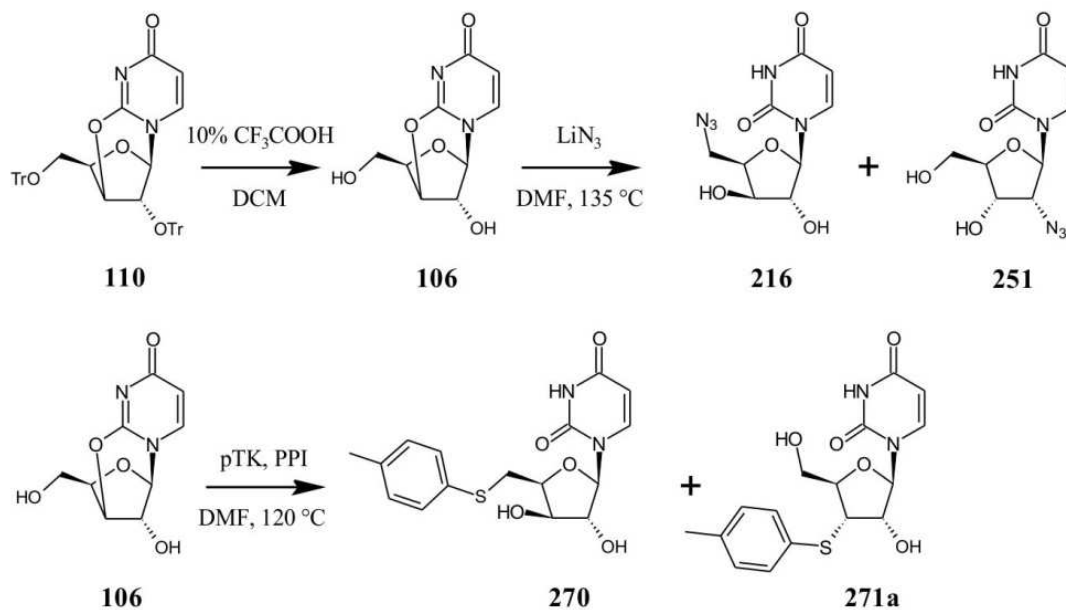
Rysunek 3.4.2.1. Próby substytucji różnych nukleofili do pochodnych 2,3'-anhydrourydyny.

w ten sposób 2'-O-metylo-5'-O-trytylourydynę (**265**, 95%) poddano reakcji z chlorkiem mesyłu, która zaszła ilościowo i wyizolowano produkt **266** z wydajnością 99%. Związek **264** otrzymano z pochodnej mesylowej (**266**) w reakcji z ftalimidkiem potasu (PPI) w DMF z wydajnością 90%. Wykonano również próbę z octanem sodu zamiast PPI. Reakcja zachodziła, jednak wydajność była niższa (60%).

2'-O-Metylo-5'-O-trytylo-2,3'-anhydrourydynę (**264**) poddano reakcji z azydkiem litu w DMF w temperaturze 135 °C, jednak po pierwszej nocy nie zaobserwowano żadnej zmiany. Podniesiono temperaturę do 160 °C i dodano drugą porcję azydku. Po kolejnej nocy zaobserwowano śladowe ilości pojedynczego produktu, jednak skala prowadzonej reakcji nie pozwoliła na jego izolację. Drugą próbę reakcji substytucji na tym substracie przeprowadzono z metanolanem magnezu w DMF. Reakcję prowadzono analogicznie do poprzedniej. Po nocy w 120 °C, gdy nie zaobserwowano żadnej zmiany, podniesiono temperaturę do 160 °C i zostawiono na kolejną noc, jednak bez skutku. Trzecią próbą była reakcja z *p*-tiokrezolem w obecności PPI. Pomimo podniesienia temperatury, powstawały jedynie śladowe ilości produktu.

Takie same nieudane próby z azydkiem litu, metanolanem magnezu i *p*-tiokrezolem wykonano na drugim substracie, jakim była 2',5'-di-O-trytylo-2,3'-anhydrourydyna (**110**). Związek ten przygotowano podobnie do metody opublikowanej *i.a.* przez K. Watanabe *et al.*^[149] Kolejnym substratem była 2'-azydo-5'-O-trytylo-2,3'-anhydrourydyna (**267**). Związek ten przygotowano z **259** w trzech etapach. W pierwszej kolejności podstawiono w pozycji 2' grupę azydkową, otrzymując **268**. Następnie na grupę 3'OH wprowadzono grupę tryflatową (**269**) i przeprowadzono cyklizację z trietyloaminą z wydajnością 95%. Na związku **267** wykonano dwie próby z azydkiem litu oraz z *p*-tiokrezolem i PPI. Jednak i tym razem bez powodzenia. Z uzyskanych wyników widać wyraźnie, że mostek 2,3'-anhydrocykliczny jest bardzo słabym elektrofilem i w prezentowanych reakcjach nie ulega substytucji S_N2.

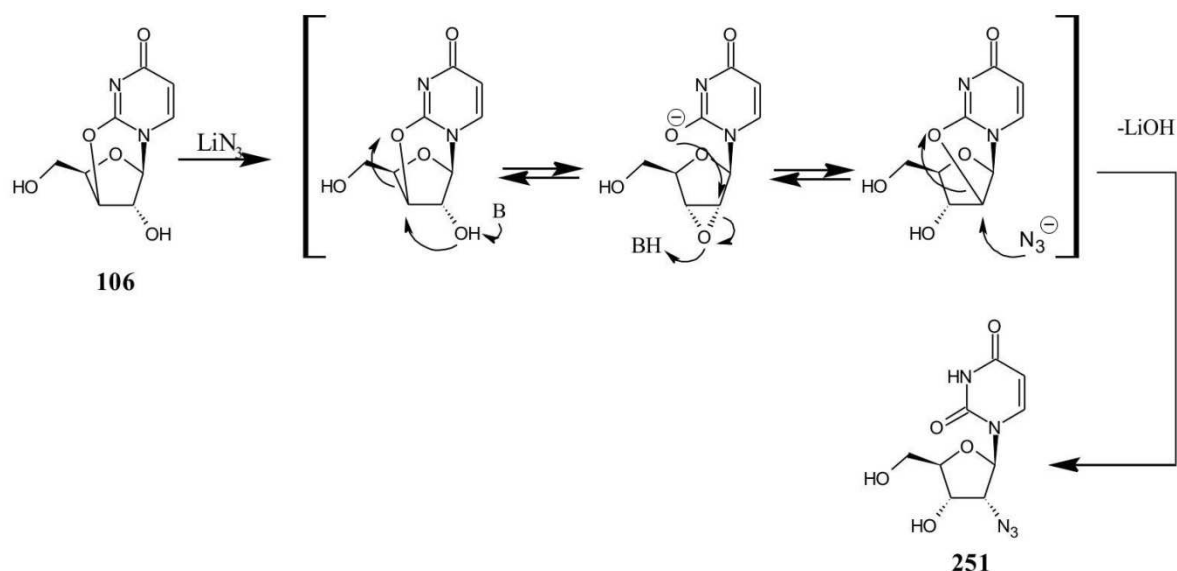
Przeprowadzono reakcje substytucji azydkiem litu i tiokrezolem do nieblokowanej 2,3'-anhydrourydyny (**106**) (Rysunek 3.4.2.2.) Związek **106** uzyskano przez zdjęcie grup trytylowych z **110** kwasem trifluorooctowym w DCM. W wyniku reakcji **106** z azydkiem litu uzyskano dwa produkty, które po dokładnej analizie NMR okazały się być 1-(5'-azydo-β-D-ksylofuranozyl)uracylem (**216**, 27%) oraz 2'-azydourydyną (**251**, 18%). Wynik ten nie różni się wiele od podanego w części literaturowej (s. 64). Jediną różnicą jest stwierdzenie



pTK - *p*-tiokrezol, PPI - ftalimidek potasu

Rysunek 3.4.2.2. Przeprowadzone reakcje 2,3'-anhydryurydyny.

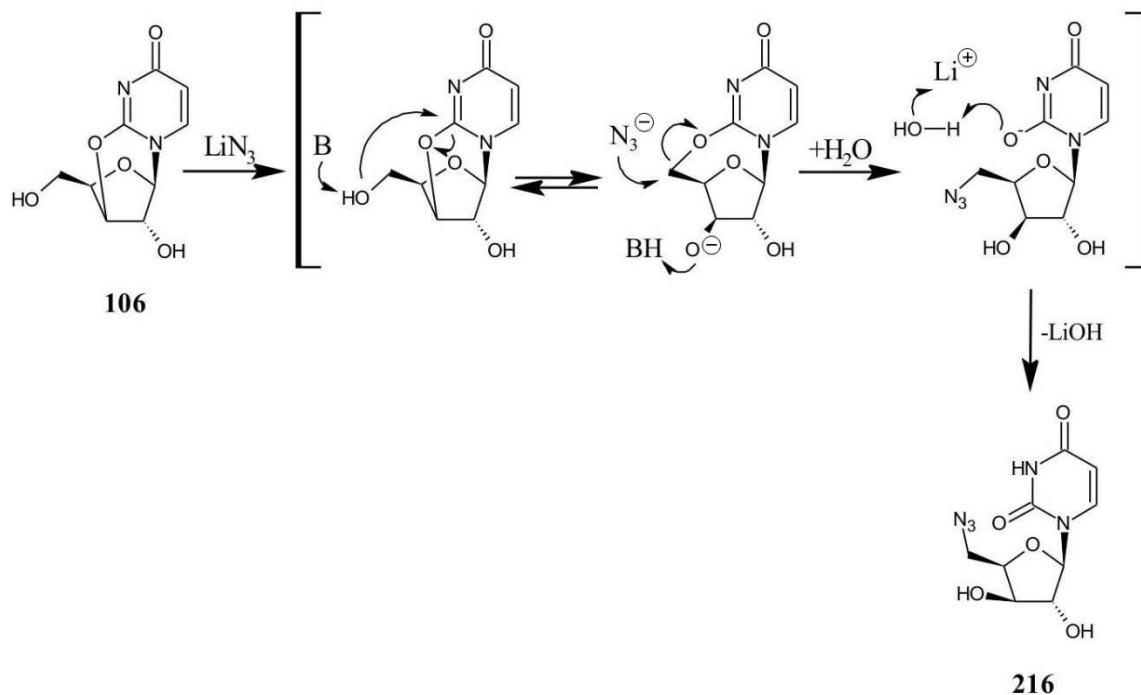
powstania również związku **251**, co może zachodzić w wyniku wewnątrzcząsteczkowej transformacji substratu poprzez strukturę ryboepoksydową do struktury 2,2'-anhydrocyklicznej (Rysunek 3.4.2.3.), co również jest zgodne z doniesieniami opisanymi w części literaturowej. Związek **216** z kolei mógł powstać poprzez pośrednią strukturę 2,5'-



Rysunek 3.4.2.3. Postulowany mechanizm powstawania produktu 251.

anhydrocykliczną (Rysunek 3.4.2.4.). Produkt **216** analizowano przy użyciu technik 2D NMR (HSQC, HMBC ^{13}C , HMBC ^{15}N oraz NOESY), które były zgodne z zaproponowaną

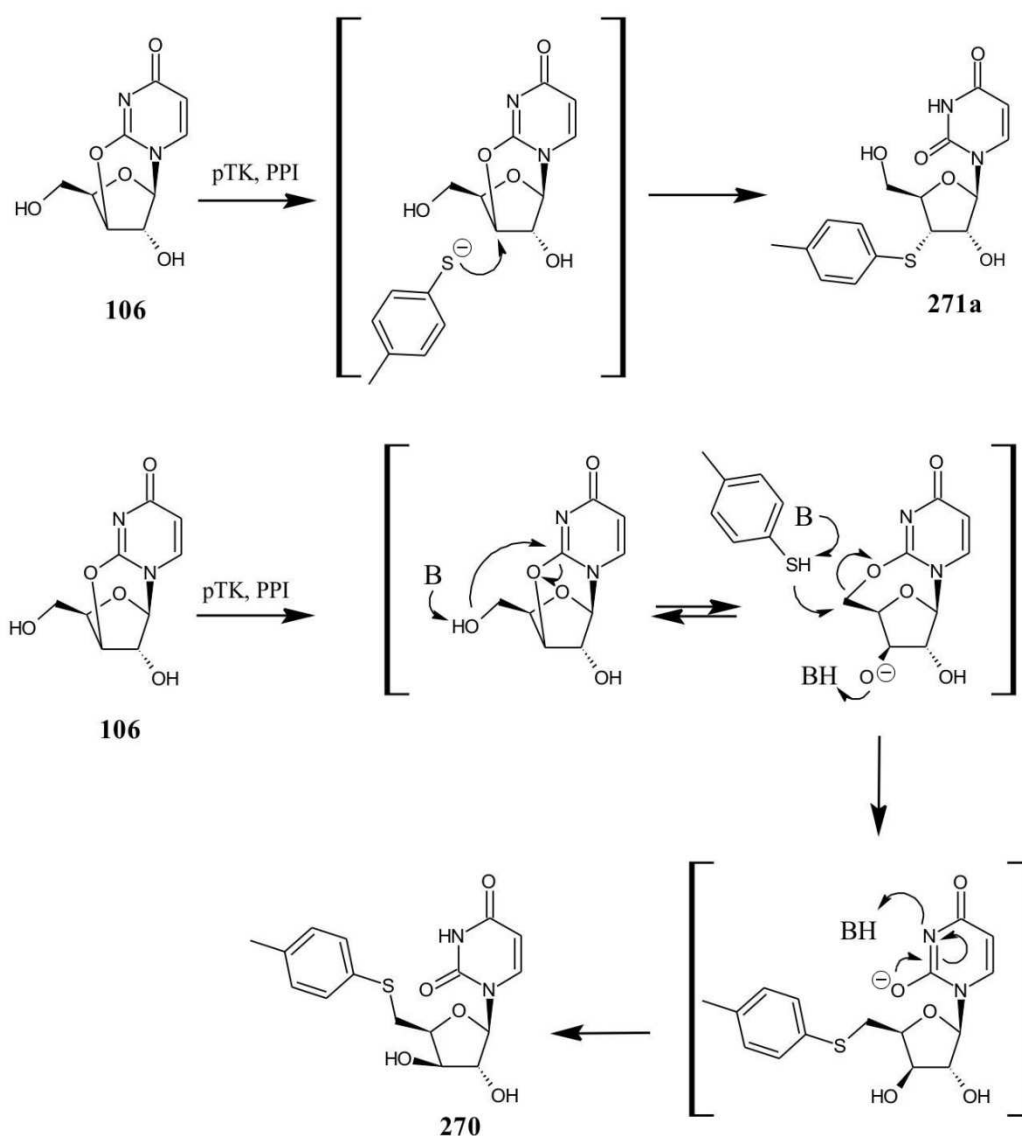
strukturą. Dla związku **251** uzyskanego w tej reakcji wykonano ^1H NMR i ^{13}C NMR, które były zgodne z wcześniej uzyskanymi widmami dla produktu reakcji **95** z azydkiem litu. W wyniku reakcji **106** z *p*-tiokrezolem w obecności PPI uzyskano również dwa produkty, jednak w tym przypadku otrzymano 1-(5'-S-toliltio- β -D-ksylofuranosylo)uracyl (**270**, 12%) i oczekiwany produkt bezpośredniego podstawienia 3'-S-toliltiourydyne (**271a**, 48%) (Rysunek 3.4.2.5.).



Rysunek 3.4.2.4. Postulowany mechanizm powstawania produktu **216**.

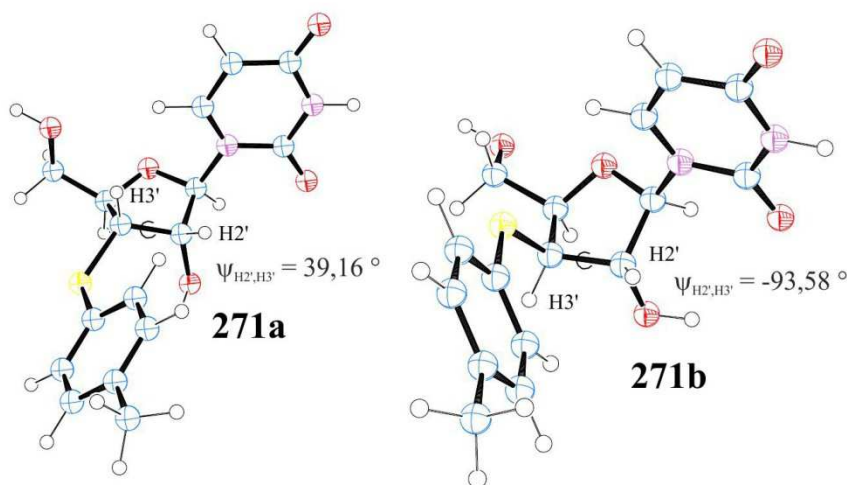
Otrzymane produkty analizowano z wykorzystaniem technik 2D NMR, a uzyskane dane były zgodne z zaproponowanymi strukturami. Jest to pierwsza opisana, o ile wiadomo autorowi, bezpośrednia substytucja nukleofila do mostka 2,3'-anhydrocyklicznego, gdy w pozycji 2' nie ma silnie elektronoakceptorowej grupy fluorkowej. Zastanawiać może fakt, że analogiczna reakcja nie zachodziła dla pochodnej 2'-O-metylowej **264**. Można zrozumieć, że reakcja nie zachodziła dla **110** ze względu na efekt steryczny dużych grup trytylowych, jednak w przypadku **264** w pozycji 2' była grupa O-metylowa. Czyżby jednak w opisywanej reakcji **106** zachodziła wewnątrzcząsteczkowa transformacja do struktury ryboepoksydowej (**180**) i następnie atak jonowej formy *p*-tiokrezolu w pozycji 3' od góry z powstaniem produktu o konfiguracji ksylozy (**271b**)? Zarówno stałe sprzężenia jak i widmo NOESY wskazują konfigurację rybozy. Na widmie ^1H NMR sygnał H2' jest dobrze odseparowany. Ma charakter dubletu dubletów i dwie stałe sprzężenia. Pierwsza jest zgodna ze stałą

sprężenia sygnału H1' i wynosi 2,0 Hz, druga wynosi 5,2 Hz i musi być stałą $J_{H2'/H3'}$. Sygnał od H3' jest częściowo przykryty sygnałem od H5'a. Nie można określić multipletowości, ale widać, że nie jest singletem i można wyróżnić stałą sprężenia o wartości 5,2 Hz. Stałe sprężenia obliczone z równania Karplusa zgodnie z parametryzacją C. A. Haasnoota *et al.*^[212] wynoszą $J_{H2'/H3'} = 6,0$ Hz dla kąta $\psi_{H2'/H3'} = 39^\circ$ oraz $J_{H1'/H2'} = 1,7$ Hz dla kąta $\psi_{H1'/H2'} = 106^\circ$ struktury o konfiguracji rybozy. Stałe sprężenia obliczone z kolei dla struktury o konfiguracji ksylozy wynoszą $J_{H2'/H3'} = 1,1$ Hz dla kąta $\psi_{H2'/H3'} = -93,6^\circ$ oraz $J_{H1'/H2'} = 2,1$ Hz dla kąta $\psi_{H1'/H2'} = 112^\circ$. Obliczenia stałych sprężeń były wykonane dla kątów odczytanych z modeli wykonanych w programie HyperChem 8.0 metodą analizy konformacyjnej w polu siłowym AMBER (Rysunek 3.4.2.6.). Widmo NOESY pokazuje



Rysunek 3.4.2.5. Postulowany mechanizm powstawania produktów 270 i 271a.

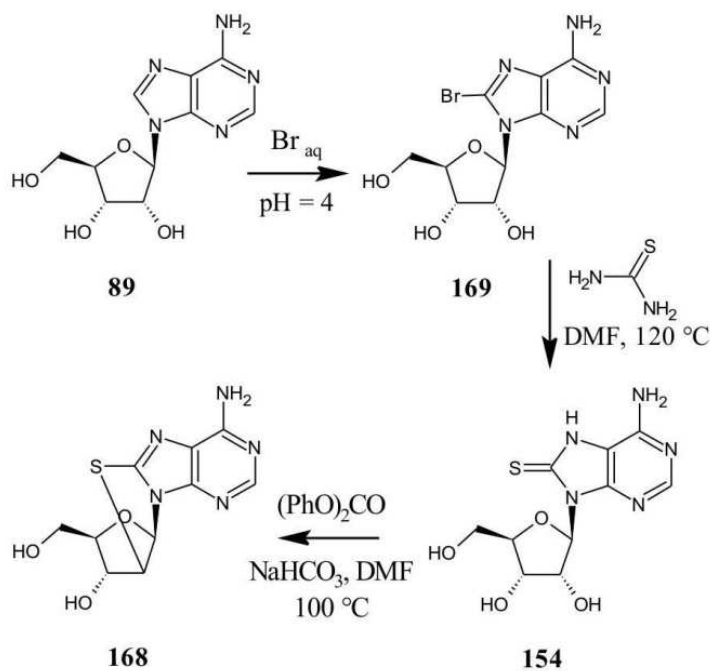
korelacje między H6 i H3', który jest tylko częściowo przykryty przez sygnał H5'a. Porównanie z widmem 2'-O-metylo-3'-S-toliltiourydyny (**272**) (Rysunek 3.5.3.1, s. 106) o potwierdzonej konfiguracji również daje silny argument za postulowaną konfiguracją.



Rysunek 3.4.2.6. Rysunki ORTEP modeli 3'-S-toliltiourydyny (**271a**) i 1-(3'-S-toliltio-β-D-ksylofuranosylo)uracyle (**271b**) obliczonych w programie HyperChem 8.0.

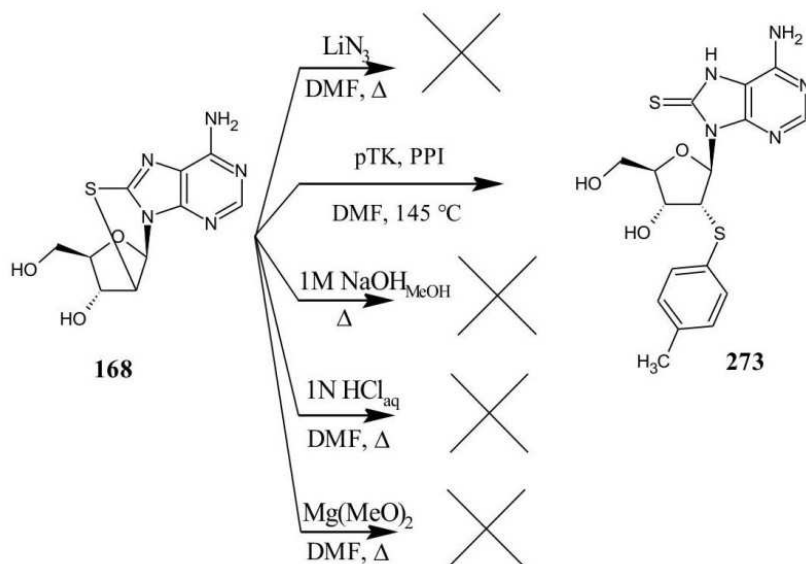
3.4.3. Reaktywność 8,2'-S-anhydro-2'-deoksyadenozyny

Aby w prowadzonych badaniach nie ograniczać się jedynie do pochodnych pirymidynowych, postanowiono również określić reaktywność cyklonukleozydu purynowego 8,2'-S-anhydroadenozyny (**168**). Związek przygotowano w trzech etapach (Rysunek 3.4.3.1).



Rysunek 3.4.3.1. Synteza 8,2'-S-anhydroadenozyny.

W pierwszej kolejności przeprowadzono bromowanie adenozyiny wodą bromową. W następnym kroku otrzymaną 8-bromoadenozynę (**169**) poddano reakcji z tiomocznikiem w DMF, uzyskując 8-tioksoadenozyinę (**154**). Związek **154** poddano cyklizacji z węglanem difenylu w DMF i otrzymano z umiarkowaną wydajnością oczekiwany produkt **168**. Związek ten poddano kilku reakcjom typowym dla struktur anhydrocyklicznych (Rysunek 3.4.3.2.):



Rysunek 3.4.3.2. Reaktywność 8,2'-S-anhydroadenozyny.

substytucji z azydkiem litu, tiokrezolem, metanolanem magnezu, oraz hydrolizie mostka w warunkach zasadowych i kwasowych analogicznie do reakcji prowadzonych na pochodnych 2,2'-anhydrourydny. Jednak w większości przypadków związek okazał się niereaktywny. Jedynie w przypadku reakcji z *p*-tiokrezolem w obecności ftalimidku potasu (PPI) udało się uzyskać produkt podstawienia grupy tiotolilowej w pozycji 2' (**273**). Struktura została potwierdzona analizą NMR, z wykorzystaniem widm 2D. Zarówno stałe sprzężenia jak i widmo NOESY potwierdzają przedstawioną strukturę. Taka substytucja, wedle przeprowadzonych poszukiwań literaturowych, nie była dotychczas opisywana i można przypuszczać, że inne tiole również będą ulegać podstawieniu w obecności zasady. Jednak ogólna niska reaktywność 8,2'-S-anhydroadenozyny (**168**), każe myśleć o 8,2'-O-anhydroadenozynie (**150**) jako o tym właściwym syntonie do regio- i stereoselektywnego wprowadzania podstawników do części cukrowej adenozyiny (s. 51). Innym problemem pozostaje ciągle selektywna redukcja pozycji 8 po skończonej syntezie, aby odtworzyć naturalną zasadę.

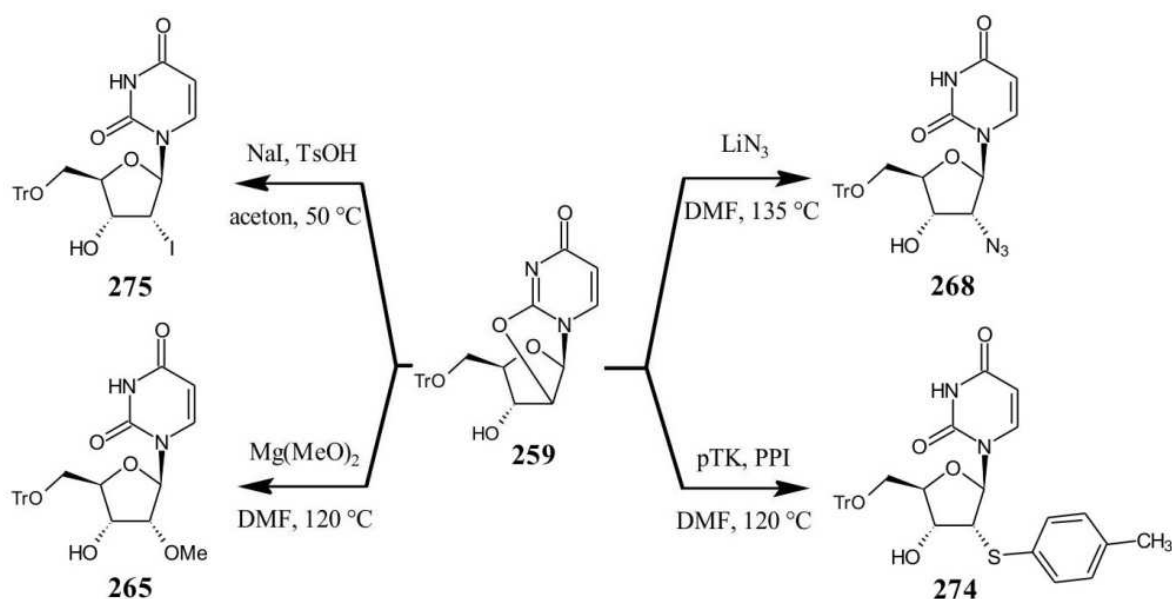
3.5. Synteza pochodnych urydyny dimodyfikowanych w pozycjach 2' i 3'

Chociaż poszukiwania nowych nukleofili zdolnych do substytucji do mostków anhydrocyklicznych nie przyniosły pozytywnych rezultatów, jednak dotychczas opisane możliwości ich zastosowania są już i tak bardzo szerokie, jednak w niewielkim stopniu wykorzystywane. Lista dimodyfikowanych pochodnych urydyny możliwych do otrzymania z wykorzystaniem mostków anhydrocyklicznych jest bardzo długa, gdy weźmie się pod uwagę liczbę znanych nukleofili ulegających podstawieniu, ale również bardzo niepełna. Owszem, część tych związków została otrzymana poprzez inne metody jak substytucje do struktur epoksydowych, jednak stosowanie mostków anhydrocyklicznych daje możliwość substytucji zarówno regio- jak i stereoselektywnej. Temat ten jest o tyle warty zainteresowania, że praktycznie każda uzyskana pochodna modyfikowana w układzie *cis*-diolowym może posiadać interesujące właściwości biologiczne. Postanowiono, korzystając ze znanych możliwości syntetycznych, przygotować dwie serie związków dimodyfikowanych w pozycjach 2' i 3'. Ze względów na specyfikę enzymów komórkowych biorących udział w biosyntezie materiału genetycznego, a także specyfikę enzymów patogenów, które są mniej selektywne substratowo, można się spodziewać, że w serii nukleozydów dimodyfikowanych w układzie *cis*-diolowym, posiadających różne, co raz większe podstawniki zaobserwuje się moment, w którym wielkość, lub charakter fizykochemiczny podstawnika spowoduje spadek cytotoksyczności oraz spadek aktywności antypatogenowej. Jako że jedna i druga cecha dotyczą różnych enzymów i innych mechanizmów molekularnych, możliwe jest, że zmiana wartości CC_{50} nie będzie oznaczała proporcjonalnej zmiany IC_{50} .

3.5.1. Synteza pochodnych 3'-deoksyurydyny

Pierwszą grupą związków, którą postanowiono otrzymać, jest seria pochodnych 3'-deoksyurydyny. Brak grupy OH w pozycji 3' ma spowodować, że analogicznie do wielu znanych nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy (NRTI), będzie skutecznie przerywać biosyntezę wirusowego DNA. Podstawniki w pozycji 2' mają za zadanie zmieniać strukturę związku powodując mniejszą cytotoksyczność i słabsze dopasowanie do ludzkich polimeraz. Synteza tych pochodnych okazała się być relatywnie prosta. Usunięcie grupy 3'OH wykonano metodą deoksygenacji Bartona-McCombie przy użyciu grupy fenoksytiokarbonylowej. W pierwszym podejściu najpierw wykonano substytucje odpowiednimi nukleofilami do uzyskanej wcześniej 5'-O-trytylo-2,2'-anhydrourydny (**259**). Wybrano cztery reprezentatywne nukleofile, które zgodnie z danymi literaturowymi ulegają

podstawieniu w pozycji 2' części cukrowej: azydek litu, *p*-tiokrezol, jodek sodu oraz metanolan magnezu i uzyskano odpowiednio **268**, **274**, **275** oraz **265** (Rysunek 3.5.1.1.). Warto zwrócić uwagę na kilka szczegółów w przeprowadzonych reakcjach. Mieszaniny reakcyjnej po substytucji azydkiem litu nie zobojętniano, co nie powodowało widocznych strat w wydajności. Reakcję z *p*-tiokrezolem prowadzono w obecności zasady. Najlepsze wydajności uzyskiwano przy użyciu ftalimidku potasu, który jest nieuciążliwy i łatwy w stosowaniu. Reakcja zachodziła ilościowo (TLC). Reakcję z jodkiem sodu prowadzono w obecności kwasu *p*-toluenosulfonowego w celu uniknięcia reakcji odwrotnej z odejściem grupy jodkowej, jednak ilość użytego kwasu musiała być dobrana tak, aby nie zachodziło niepożądane usuwanie grupy trytylowej. Reakcję z metanolanem magnezu prowadzono w DMF ze świeżo przygotowanym metanolanem. Metanol z opiłkami magnezu i katalityczną ilością jodu gotowano aż do pełnego przereagowania i powstania jednorodnej białej zawiesiny, którą następnie odparowano do sucha. Dopiero wtedy dodano DMF i substrat nukleozydowy. Ta metoda pozwoliła podnieść wydajność względem typowych warunków



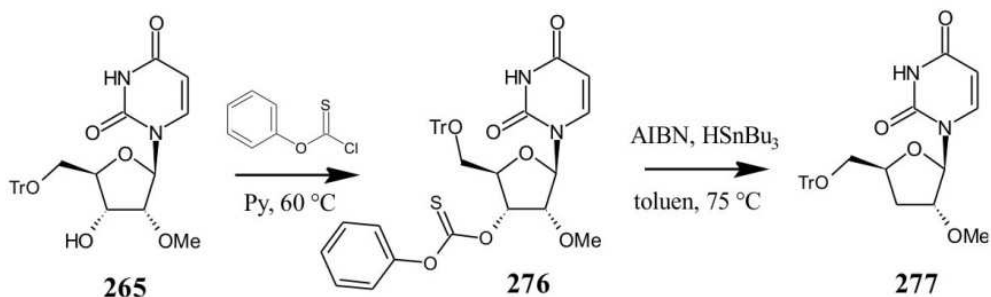
Rysunek 3.5.1.1. Synteza 2'-modyfikowanych, 5'-O-trytylowanych pochodnych urydyny.

prowadzenia reakcji w MeOH, głównie dzięki możliwości podniesienia temperatury prowadzenia reakcji.

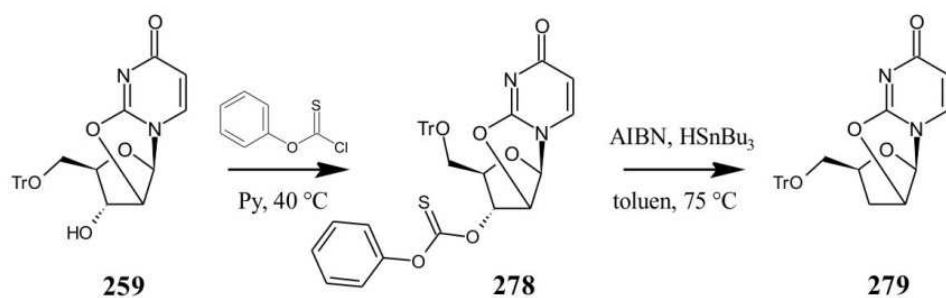
W kolejnym etapie przygotowane pochodne modyfikowane w pozycji 2' poddano reakcji wprowadzenia na grupę 3'OH ugrupowania fenoksytiokarbonylowego, działając odpowiednim chlorkiem. Wydajności tych reakcji nie były zadowalające (TLC), a otrzymane mieszaniny były trudne do rozdziału i oczyszczenia. Jedynie w przypadku pochodnej

2'-O-metylowej reakcja zachodziła z dobrą wydajnością i wyizolowano produkt **276** w postaci czystej z wydajnością 86% (Rysunek 3.5.1.2.). Kolejny etap, czyli deoksygenację, również udało się wykonać bez komplikacji, otrzymując z dobrą wydajnością 5'-O-trytylo-2'-O-metylo-3'-deoksyurydynę (**277**)

Trudność w wprowadzeniu grupy fenoksytiokarbonylowej można było obejść poprzez

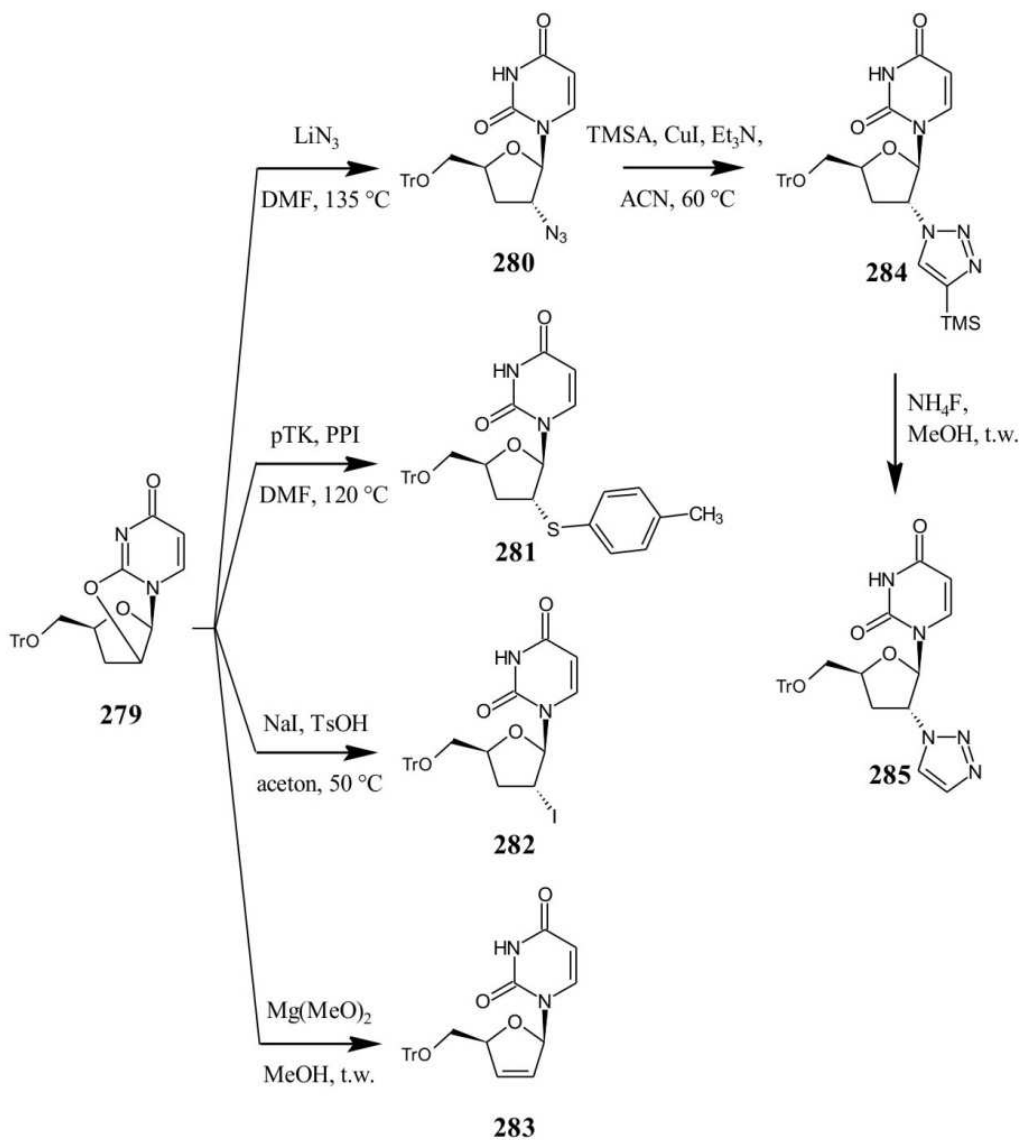


Rysunek 3.5.1.2. Synteza 5'-O-trytylo-2'-O-metylo-3'-deoksyurydyny (**277**).



Rysunek 3.5.1.3. Synteza 5'-O-trytylo-3'-deoksy-2,2'-anhydrourydyny (**279**).

reakcją acylacji chlorkiem fenoksytiokarbonylowym pochodnej anhydrocyklicznej (**259**), która zachodziła z dobrą wydajnością i izolacja produktu nie nastęczała problemów (**278**) (89%). Sama deoksygenacja z AIBN i HSnBu_3 zachodziła również bardzo dobrze z wydajnością 95% (Rysunek 3.5.1.3.). Uzyskaną 5'-O-trytylo-3'-deoksy-2,2'-anhydrourydynę (**279**) poddano reakcjom z w/w nukleofilami. Reakcje zaszły bardzo dobrze i otrzymano oczekiwane produkty substytucji (**280-282**). Jedynie reakcja z metanolanem magnezu nie przebiegła zgodnie z założeniem, a otrzymanym produktem okazała się być 5'-O-trytylo-2',3'-dideoksy-didehydrourydyna (**283**) (Rysunek 3.5.1.4.). W tym przypadku reakcja zaszła według konkurencyjnego mechanizmu eliminacji E2. Podobne sytuacje można znaleźć w literaturze.^[227]

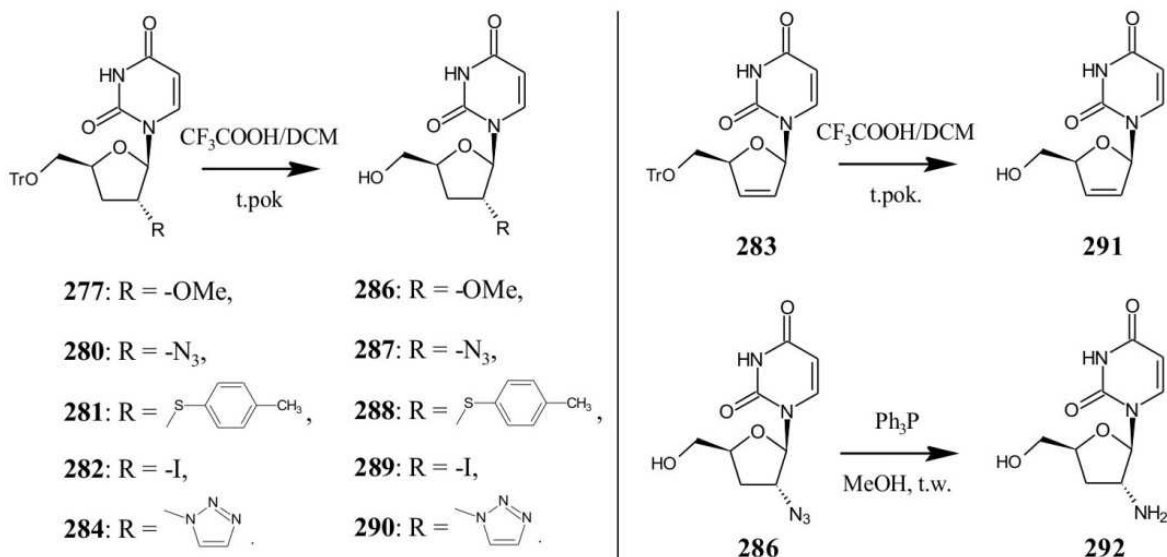


Rysunek 3.5.1.4. Synteza pochodnych 3'-deoksyurydyny. TMSA – trimetylosililoacetylen.

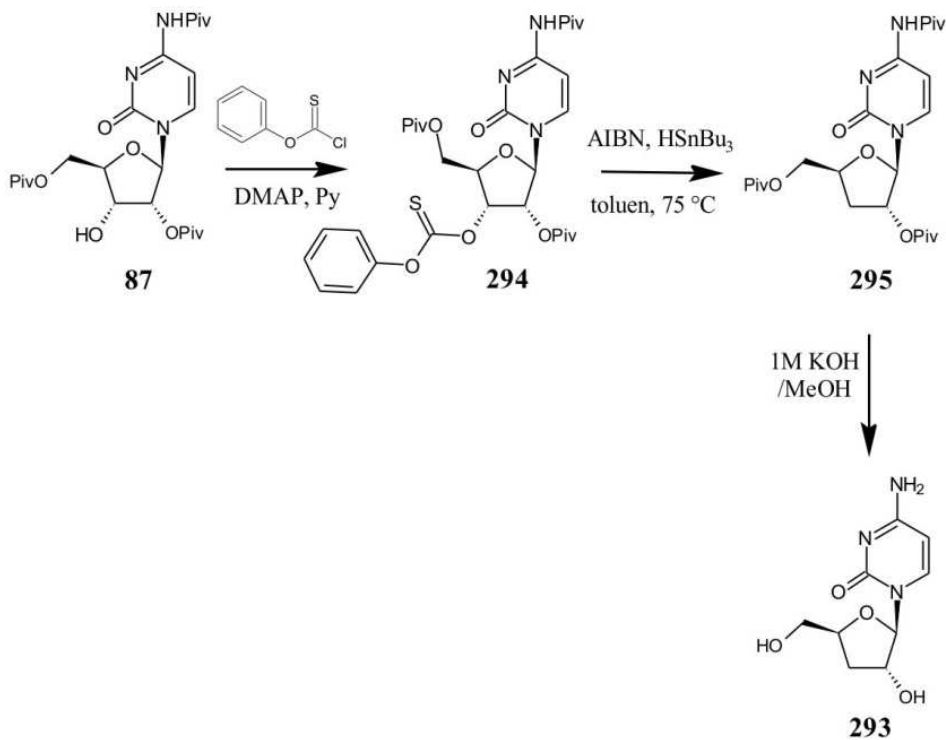
Związek **280** poddano reakcji cykloaddycji katalizowanej miedzią (CuAAC) z TMS-acetylenem, uzyskując produkt cyklizacji (**284**), z którego po zdjęciu grupy trimetylosililowej w reakcji z fluorkiem amonu otrzymano 5'-O-trytylo-2'-(1H-[1,2,3]triazolo)-3'-deoksyurydyny (**285**) (Rysunek 3.5.1.4.). Po usunięciu grup trytylowych z uzyskanych związków 2',3'-dimodyfikowanych działaniem 10% roztworu CF_3COOH w DCM otrzymano produkty końcowe (**286-291**) (Rysunek 3.5.1.5.). Pochodną aminową **292** uzyskano w wyniku reakcji Staudingera przeprowadzonej na odblokowanej pochodnej 2'-azydkowej **286**. Reakcję tą należało przeprowadzić na końcowym etapie ze względu na warunki usuwania grupy trytylowej, w których grupa aminowa nie pozostawała obojętna.

Prócz omówionych pochodnych 3'-deoksyurydyny przygotowano także 3'-deoksytydyny (**293**) (Rysunek 3.5.1.6.). Jest to związek znany^[228] i badany w kierunku

wielu aktywności.^[229] W rozdziale 3.2. opisano syntezę 4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydyny **87**. Związek ten poddano reakcji z chlorkiem fenoksytiokarbonylu w pirydynie z DMAP, otrzymując 3'-O-fenoksytiokarbonylo-4-N,2',5'-O-tripiwaloilocytydynę (**294**) i następnie przeprowadzono deoksygenację Burtona-McCombie, co było opisane przez J. Fogt.^[213]



Rysunek 3.5.1.5. Struktury końcowe pochodnych 3'-deoksyurydyny.

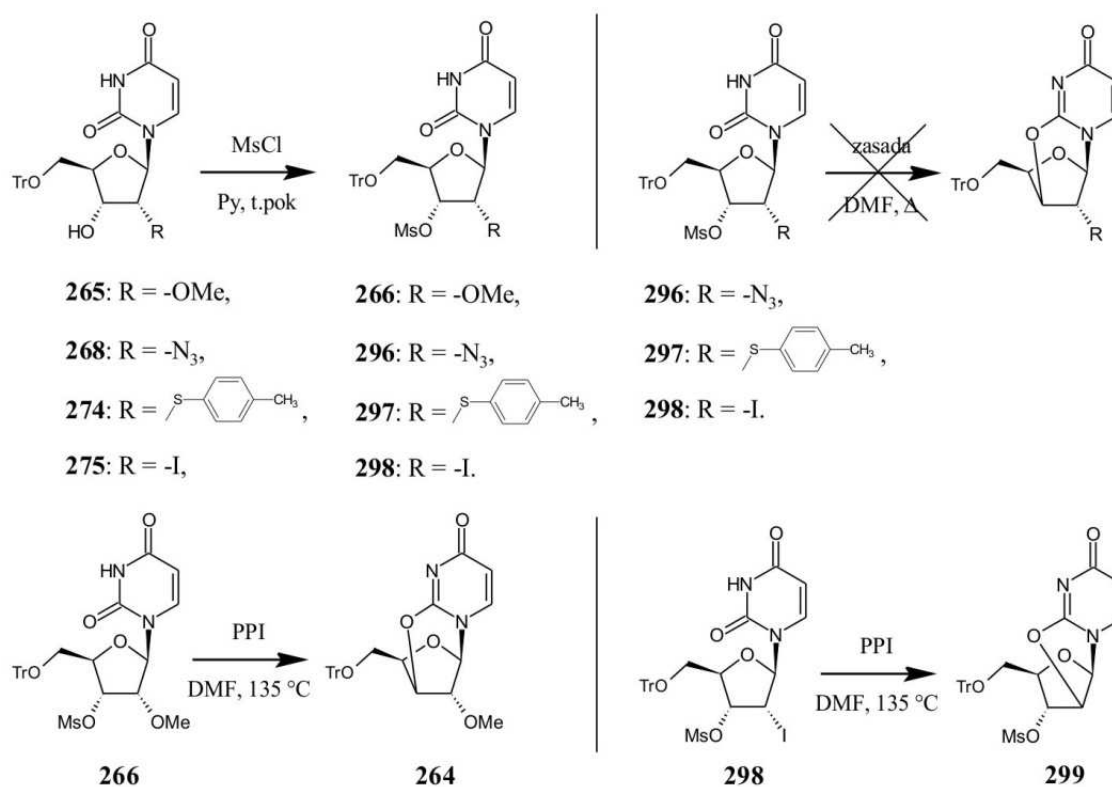


Rysunek 3.5.1.6. Synteza 3'-deoksycytydyny (293).

Z otrzymanej 4-N, 2',5'-O-tripiwaloloilo-3'-deoksycytydyny (**295**) usunięto grupy piwaloilowe poprzez reakcję w metanolu z 1M KOH, uzyskując 3'-deoksycytydynę (**293**). Związek ten może służyć jako odniesienie w badaniach biologicznych otrzymanych pochodnych 3'-deoksyurydyny.

3.5.2. Synteza pochodnych 1-(β -D-ksylofuranozylo)uracylu

Drugą serią związków, którą postanowiono otrzymać jest seria modyfikowanych w pozycji 2' pochodnych ksylourydyny. W tym przypadku modyfikacja pozycji 3' polega na odwróceniu konfiguracji na atomie C-3'. Obecność grupy 3'OH skierowanej nad płaszczyznę pierścienia cukrowego nie oznacza możliwości przerywania biosyntezy RNA lub DNA w typowy dla NRTI sposób, jednak pochodne ksylofuranozylowe, jak podano w części literaturowej również często posiadają ciekawe aktywności biologiczne wynikające z zaburzania biosyntezy materiału genetycznego i/lub wynikające z zaburzania ekspresji genów. Dodatkowym argumentem za syntezą tej serii związków jest możliwość dalszego ich wykorzystania w syntezie 2',3'-dimodyfikowanych pochodnych urydyny. W syntezie dwukrotnie wykorzystano struktury anhydrocykliczne – najpierw przy



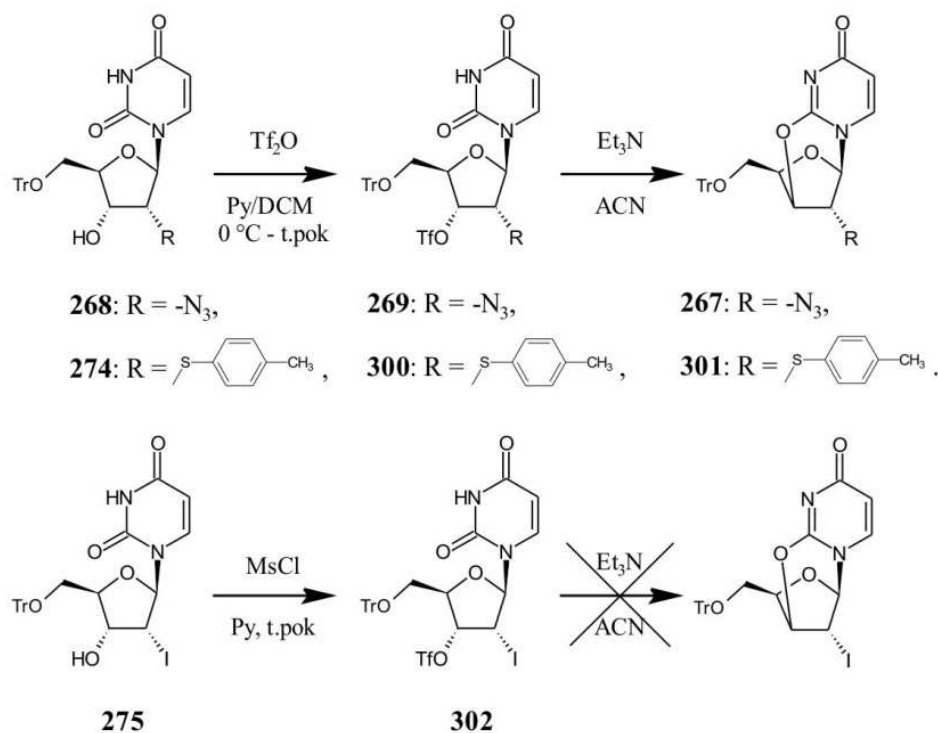
Rysunek 3.5.2.1. Przydatność pochodnych 3'-O-mesylowych urydyny w otrzymywaniu mostków 2,3'-anhydrocyklicznych.

wprowadzaniu modyfikacji w pozycji 2' i w kolejnym etapie do odwrócenia konfiguracji w pozycji 3'.

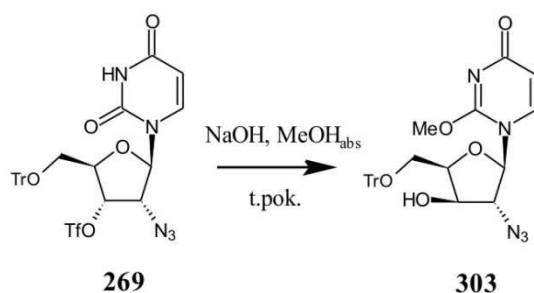
Syntezę tej grupy związków rozpoczęto od przeprowadzenia serii substytucji do 5'-O-trytylo-2,2'-anhydrourydyny (**259**) kilku w/w nukleofili, otrzymując pochodne **265**, **268**, **274** i **275** (Rysunek 3.5.1.1., s. 97). W kolejnych etapach spróbowano przeprowadzić dla nich syntezę mostka 2,3'-anhydrocyklicznego. Związek 5'-O-trytylo-2'-O-metylo-2,3'-anhydrourydynę (**264**) otrzymano zgodnie z opisem przedstawionym w Rozdziale 3.4.2. (s. 89-90). Syntezę związku 5'-O-trytylo-2'-azydo-2,3'-anhydrourydyny (**267**) również opisano wcześniej (s. 89-90). Pozostaje jedynie dodać, że próbowano przeprowadzić ją również z wykorzystaniem grupy mesylowej. W artykule Q. Dai i J. Piccirillego,^[151] który był już cytowany wielokrotnie, autorzy próbowali otrzymać mostek 2,3'-anhydrocykliczny z wykorzystaniem substratu 3'-O-mesyłowego posiadającego w pozycji 2' grupę *tert*-butoksykarbonylo-aminową, jednak bezskutecznie.

W przypadku prezentowanej tu syntezy w pozycji 2' znajdowała się grupa azydkowa, tiotolilowa lub jodkowa, dlatego postanowiono spróbować skorzystać z grupy mesylowej, która jest łatwiejsza w użyciu niż grupa tryflatowa. Uzyskany produkt mesylowania w pozycji 3' pochodnej azydkowej (**296**) poddano kilku próbom cyklizacji z wykorzystaniem ftalimidku potasu lub octanu sodu. Pomimo podnoszenia temperatury i wydłużania czasu reakcji nie zaobserwowano powstawania właściwego produktu (Rysunek 3.5.2.1.). Również otrzymana pochodna 3'-O-mesylo-2'-S-toliltio-5'-O-trytylourydyna (**297**) nie ulegała cyklizacji w reakcjach z ftalimidkiem potasu lub octanem sodu w DMF. Chociaż grupa jodkowa jest bardzo dobrą grupą odchodzącą, spróbowano również cyklizacji dla otrzymanej pochodnej 3'-O-mesyłowej (**298**). Jednak w tym przypadku, jak można się było spodziewać, cyklizacja zaszła do pozycji 2' z odejściem grupy jodkowej i uzyskano 5'-O-trytylo-3'-O-mesylo-2,2'-anhydrourydynę (**299**). W przypadku, gdy w pozycji 2' są grupy inne niż O-metylowa lub O-trytylowa, należało zastosować grupę tryflatową. Cyklizację pochodnych 3'-O-tryflatowych: 2'-azydo-3'-O-trifluorometanosulfonylo-5'-O-trytylourydyny (**269**) oraz 2'-S-toliltio-3'-O-trifluorometanosulfonylo-5'-O-trytylourydyny (**300**) prowadzono z wykorzystaniem kilku zasad: NaOH w MeOH, PPI w DMF, CH₃COONa w DMF i Et₃N w ACN. W ostatnim przypadku reakcje przebiegły czysto i ilościowo (TLC), pozwalając uzyskać pochodne 2,3'-anhydrocykliczne z dobrymi wydajnościami – 5'-O-trytylo-2'-azydo-2,3'-anhydrourydynę (**267**) oraz 5'-O-trytylo-2'-S-toliltio-2,3'-anhydrourydynę (**301**) (Rysunek 3.5.2.2.). Gdy zastosowano NaOH w MeOH_{abs} otrzymano zamiast oczekiwanego produktu 1-(2'-azydo-5'-O-trytylo-β-D-ksylofuranozylo)-2-O-metylouracyl (**303**) (Rysunek

3.5.2.3.). W przypadku **275**, gdy w pozycji 2' znajdowała się grupa jodkowa, tryflatowanie zachodziło dość dobrze. Na TLC można było zaobserwować powstający ilościowo jeden produkt o R_f wyższym od substratu, jednak związek jest wyjątkowo niestabilny i pomimo odparowywania w temperaturze $< 20\text{ }^\circ\text{C}$ i ekstrakcji zimnym $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ spora część ulegała rozkładowi i po oczyszczeniu na kolumnie w układzie heksan/octan uzyskano oczekiwany produkt z wydajnością ledwie 41% (**302**). Cyklizacja w najlepszych jak do tej pory warunkach, czyli z Et_3N w ACN prowadziła do mieszaniny produktów, z czego jeden o R_f niższym od **275**, co sugerowałoby produkt anhydrocykliczny, okazał się być niestabilny w czasie ekstrakcji. Próba oczyszczenia na kolumnie bez ekstrakcji pozwoliła go wyizolować, jednak widmo ^1H NMR wykluczyło obecność mostka anhydrocyklicznego, ponieważ był

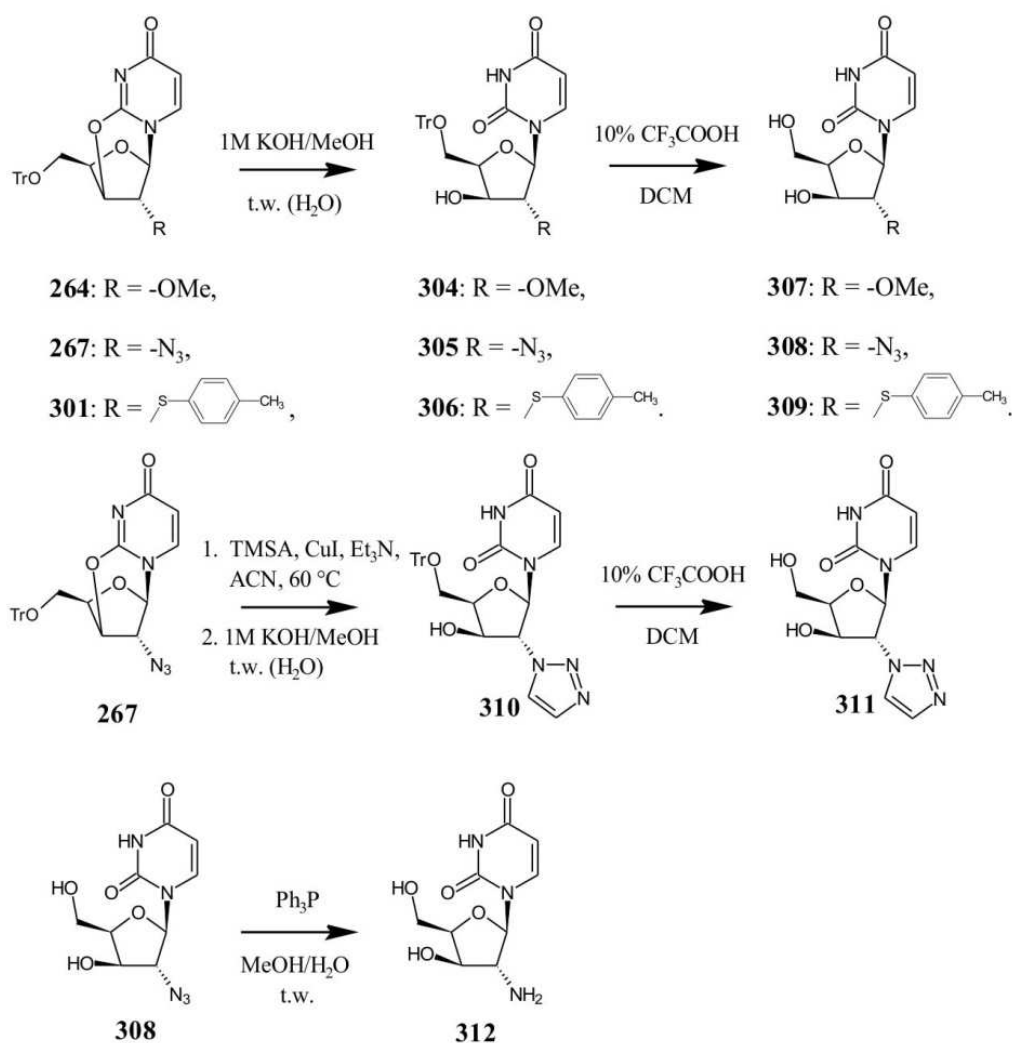


Rysunek 3.5.2.2. Przydatność pochodnych 3'-O-tryflatowych urydyny w otrzymywaniu mostków 2,3'-anhydrocyklicznych.



Rysunek 3.5.2.3. Produkt otrzymany w reakcji 269 z NaOH w MeOH w warunkach bezwodnych.

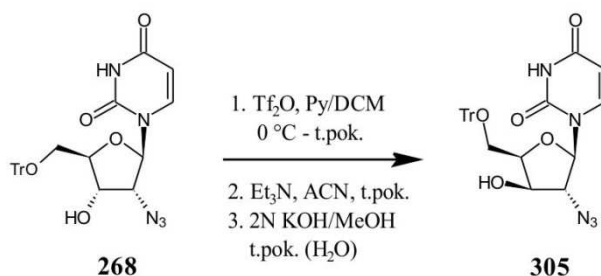
obecny sygnał grupy imidowej uracylu przy δ 11,30 ppm. Niższy R_f był spowodowany brakiem grupy trytylowej. Uzyskane produkty 2,3'-anhydrocykliczne **264**, **267** i **301** poddano hydrolizie zasadowej z otwarciem mostka (Rysunek 3.5.2.4). Otrzymano w ten sposób 5'-O-trytyłowe pochodne ksylourydyny posiadające w pozycji 2' grupę O-metylową (**304**), grupę azydkową (**305**) i grupę 2'-S-tiotolilową (**306**) z dobrymi wydajnościami. Następnie otrzymane pochodne odblokowano działając 10% roztworem CF_3COOH w DCM, uzyskując odpowiednio produkty **307**, **308** i **309**. Część związku **267** przed hydrolizą przeprowadzono, analogicznie do poprzedniej serii, do pochodnej 2'-[1,2,3]-triazolowej (**310**). Produkt po cyklizacji poddano hydrolizie w warunkach zasadowych. Jednocześnie w warunkach reakcji usunięta została grupa trimetylosililowa. Otrzymany w ten sposób związek (**310**) odblokowano otrzymując 1-([1H-{1,2,3}- β -D-2'-triazolo]-ksylofuranozylo)uracyl **311**. Część uzyskanego 1-(2'-azydo- β -D-ksylofuranozylo)uracylu (**308**) poddano reakcji Staudingera



Rysunek 3.5.2.4. Synteza pochodnych 1-(β -D-ksylofuranozylo)uracylu.

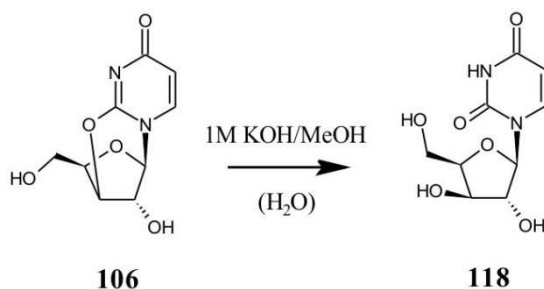
otrzymując pochodną aminową (**312**).

Związek **305** można uzyskać z **268** metodą *one-pot* (Rysunek 3.5.2.5.). Procedura jest relatywnie prosta i oszczędza dużo pracy. Tryflatowanie nastawiono w ten sam sposób, co poprzednio. Gdy na TLC zaobserwowano zanik substratu, dodano MeOH w celu neutralizacji nadmiaru bezwodnika, następnie mieszaninę odparowano do sucha, dodano ACN i Et₃N.



Rysunek 3.5.2.5. Metoda *one-pot* otrzymywania 1-(β-D-2'-azydo-5'-O-trytyloksylofuranosylo)uracyle (**305**).

Reakcja zachodziła ilościowo i na TLC obserwowano powstanie produktu anhydrocyklicznego. Znów odparowano mieszaninę do sucha i dodano 2N roztwór KOH/MeOH z dodatkiem wody. Dwa pierwsze etapy przebiegają na tyle szybko, że można je wykonać jednego dnia i ostatni etap nastawić na noc, także następnego dnia obserwuje się całościowe przereagowanie. Powstaje produkt o R_f podobnym do substratu **268**. Zwiększenie stężenia KOH przyspiesza reakcję nie powodując przy tym strat i można ją efektywnie prowadzić w temperaturze pokojowej. Mieszaninę można również bezpiecznie ogrzewać do



Rysunek 3.5.2.6. Synteza 1-(β-D-ksylofuranosylo)uracyle.

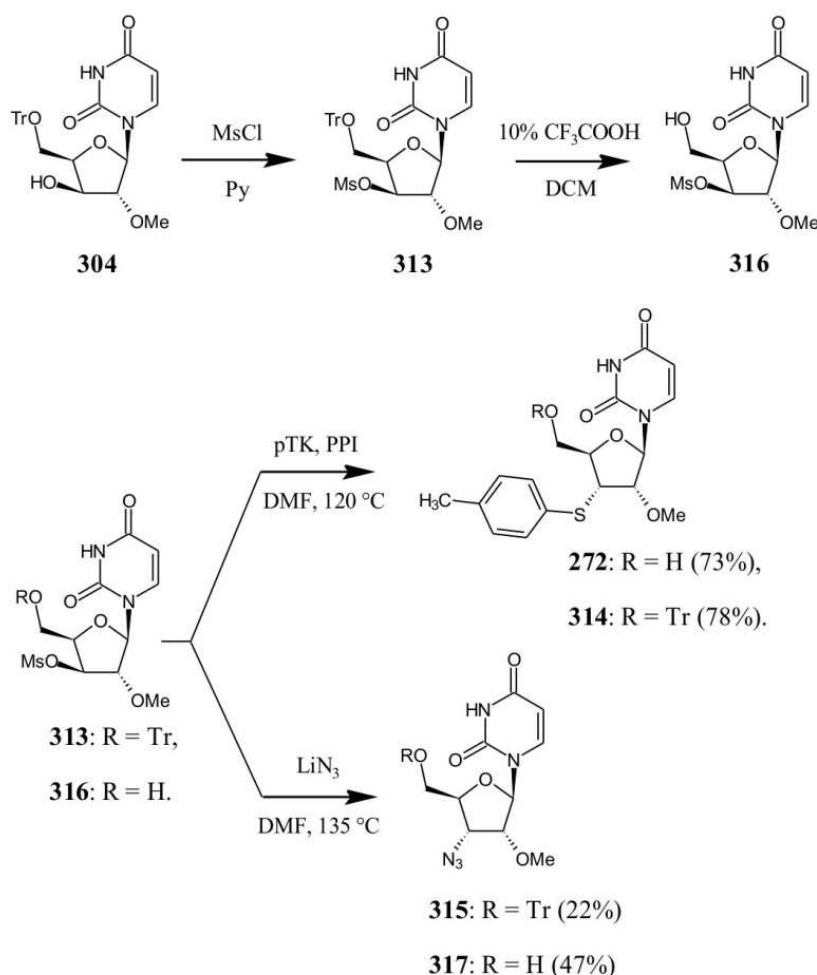
70 °C, co również przyspiesza reakcję. Metoda *one-pot* pozwoliła otrzymać produkt **305** z **268** z wydajnością 76%, co jest dużo lepszym wynikiem niż w przypadku wykonywania każdego etapu oddzielnie.

Równoległe do tej syntezy, przeprowadzono również syntezę ksylourydyny (1-(β-D-ksylofuranosylo)uracyle, **118**) (Rysunek 3.5.2.6.). Choć jest to związek dobrze znany i opisany, może on stanowić odnośnik w badaniach biologicznych. Otrzymaną wcześniej

2,3'-anhydrourydynę (**106**) poddano zasadowej hydrolizie, co pozwoliło uzyskać z dobrą wydajnością ksylourydynę.

3.5.3. Dalsze wykorzystanie pochodnych 1-(β -D-ksylofuranozylo)uracylu

Z pośród pochodnych 1-(β -D-ksylofuranozylo)uracylu ilościowo najwięcej uzyskano trytylowanej pochodnej 2'-O-metylowej **304**, dlatego postanowiono dla tej pochodnej spróbować kolejnych reakcji (Rysunek 3.5.3.1.). W pierwszej kolejności poddano ją mesylowaniu i wyizolowano produkt z dobrą wydajnością (89%) (**313**). Na tak przygotowanym związku przeprowadzono próby substytucji z azydkiem litu i *p*-tiokrezolem. W przypadku reakcji z tiokrezolem uzyskano oczekiwany produkt w sposób czysty i ilościowy (TLC) i wyizolowano go z wydajnością 83% (**314**). W przypadku reakcji **313**



Rysunek 3.5.3.1. Synteza dwóch pochodnych 2'-O-metylourydyny.

z azydkiem litu zaobserwowano powstawanie dwóch produktów. Jeden z produktów był tym oczekiwany, czyli 5'-O-trytylo-3'-azydo-2'-O-metylourydyną (**315**). Nie określono struktury drugiego produktu, choć analiza ^1H NMR i ^{13}C NMR wykazała, że nie jest to

substrat, ani oczekiwany produkt. Przesunięcie chemiczne sygnałów H3' i C3' są podobne do substratu mesylowego, ale brakuje sygnałów od grupy CH₃ mesylu. Brakuje także sygnałów od grupy 2'-O-metylowej oraz od H4' i C4'. Część uzyskanej pochodnej 3'-O-mesylowej o konfiguracji ksylozy (**313**) odblokowano w celu uniknięcia zawady sterycznej ze strony dużego podstawnika trytylowego, otrzymując 1-(3'-O-mesylo-2'-O-metylo- β -D-ksylofuranozyl)uracyl (**316**). Na tak przygotowanym związku również spróbowano substytucji z azydkiem litu oraz z *p*-tiokrezolem. W przypadku reakcji z azydkiem litu uzyskano lepszy wynik pod względem wydajności oczekiwanego produktu podstawienia. Również wyizolowano dwa produkty, z czego jeden posiadał widma NMR analogiczne do niezidentyfikowanego produktu opisanego wyżej. Drugi okazał się być 3'-azydo-2'-O-metylourydyną (**317**) o sygnałach H3' i C3' wyraźnie przesuniętych w kierunku niższych wartości, co jest zgodne z dotychczas uzyskiwanymi wartościami dla pochodnych azydkowych. Produkt ten, jak i pozostałe produkty końcowe, został poddany analizie MS, która potwierdziła strukturę. W przypadku reakcji **316** z *p*-tiokrezolem uzyskano oczekiwany produkt (**272**) z wydajnością 73%.

3.6. Dokowanie molekularne pochodnych 2',3'-dimodyfikowanych pochodnych urydyny*

W części literaturowej dotyczącej aktywności biologicznych nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy (NRTI) stwierdzono, że aktywność tych związków względem wirusa HIV-1 zależy w głównej mierze od dopasowania oraz siły oddziaływania ich trifosforanów z miejscem aktywnym wirusowej odwrotnej transkryptazy (HIV1-RT). Z kolei jako główną przyczynę obserwowanej cytotoksyczności NRTI uznaje się ich oddziaływanie z mitochondrialną polimerazą γ (Pol γ), która wbudowuje modyfikowane nukleozydy do mitochondrialnego DNA, co powoduje przerwanie biosyntezy, zaburzenie funkcjonowania mitochondrium i wynikające z tego choroby. Dlatego postanowiono przeprowadzić odpowiednie eksperymenty *in silico* dokowania molekularnego otrzymanych na drodze syntezy 2',3'-dimodyfikowanych pochodnych nukleozydów zarówno do HIV1-RT oraz Pol γ . Aktywność NRTI zależy również od wielu innych czynników: farmakokinetycznych oraz farmakodynamicznych, jak skuteczna fosforylacja nukleozydu przez kinazy do aktywnej formy trifosforanu. Jednak w tym opracowaniu skupiono się na problemie oddziaływania z HIV1-RT oraz Pol γ . Mnogość kinaz komórkowych

* Eksperymenty dokowanie molekularnego wykonano z pomocą merytoryczną dr Karola Kamela z IChB PAN.

odpowiedzialnych za fosforylację nukleozydów, NMP (monofosforany nukleozydowe) oraz NDP (difosforany nukleozydowe) utrudnia wybór właściwego przedmiotu dokowania, choć pewnie pierwszym wyborem byłyby kinazy urydynowo – cytydynowe 1 oraz 2 (UCK1, UCK2), których poziom aktywności różni się w komórkach zdrowych oraz nowotworowych, dzięki czemu projektuje się związki o zwiększonej selektywności antynowotworowej.^[230] Dokowania do HIV1-RT wykonano przy pomocy powszechnie stosowanych programów AutoDock 4^[231] oraz AutoDock Vina,^[232] a eksperymenty dokowania do Pol γ wykonano przy pomocy programu AutoDock Vina. Programy te cechują się podobną dokładnością przewidywań, ale ze względu na różne funkcje oceniające w pewnych sytuacjach lepszy może okazać się jeden lub drugi.

Dokowanie molekularne polega na poszukiwaniu optymalnego sposobu wiązania się liganda do makromolekuły, np. w miejscu aktywnym lub allosterycznym enzymu. Zbiór wszystkich możliwych konfiguracji położenia atomów liganda i receptora stanowi przestrzeń konformacyjną charakteryzowaną właściwą sobie N-wymiarową powierzchnią energii potencjalnej w przyjętym polu siłowym. Innymi słowy dokowanie molekularne polega na poszukiwaniu minimum globalnego na w/w powierzchni energii potencjalnej z uwzględnieniem efektu entropii (korzystniejsza może być „studnia” płytsza, ale szersza). Obliczeniowe rozwiązanie tego problemu wymaga algorytmu przeszukiwania wielowymiarowej przestrzeni konformacyjnej oraz funkcji oceniającej (ang. *scoring function*).

Wielkość przestrzeni konformacyjnej rośnie wykładniczo wraz z liczbą wymiarów (liczbą stopni swobody liganda i receptora), dlatego dla zmniejszenia kosztów obliczeniowych często stosuje się sztywny w części lub całości model receptora i/lub sztywny model liganda. Np. dokowanie półgiętkie polega na tym, że konformacja receptora jest niezmienna, natomiast cząsteczka liganda podlega translacjom, rotacjom oraz zmianom konformacyjnym. Innym sposobem obniżenia kosztów poszukiwania jest stosowanie algorytmów heurystycznych (przybliżonych) lub stochastycznych (losowych), ponieważ koszt systematycznego i wyczerpującego przeszukania jest zwykle bardzo duży. Algorytmy te proponują przybliżone rozwiązanie problemu, które nie musi być rozwiązaniem optymalnym. Przykładowe algorytmy przeszukiwania to: symulowane wyżarzanie typu Metropolis (SA), genetyczny (GA), przeszukiwania lokalnego Solis & Wets (LS), hybrydowy algorytm genetyczny Lamarcka (LGA).

Fukcje oceniające konstruowane są w różny sposób. Częstym podejściem jest rozwiązywanie hybrydowe, na które składają się człony pola siłowego mechaniki molekularnej, jak i człony empiryczne (uzyskiwane poprzez dopasowanie parametrów do danych uzyskanych z badań eksperymentalnych). Funkcja oceniająca powinna możliwie dokładnie określać energię swobodną Gibbsa (entalpię swobodną) tworzenia kompleksu ligand – receptor. Energia swobodna Gibbsa zależy od stałej równowagi dwóch stanów termodynamicznych:

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (1)$$

Funkcja energii swobodnej oddziaływania powinna uwzględniać następujące stany układu termodynamicznego (L – ligand, P – białko, V – energia potencjalna, ΔS – zmiana entropii):

$$\Delta G = V_{zw}^L - V_{niezw}^L + V_{zw}^P - V_{niezw}^P + V_{zw}^{PL} - V_{niezw}^{PL} + \Delta S \quad (2)$$

Co w przypadku dokowania z użyciem sztywnego receptora upraszcza się do równania:

$$\Delta G = V_{zw}^L - V_{niezw}^L + V_{zw}^{PL} - V_{niezw}^{PL} + \Delta S \quad (3)$$

W wielu programach np. w AutoDock funkcje określające energię swobodną łączą człony z pola siłowego mechaniki molekularnej z parametrami empirycznymi tworząc wyrażenia jak następujące:

$$\Delta G = \Delta G_{VDW} + \Delta G_{ww} + \Delta G_{el} + \Delta G_{desolv} + \Delta G_{entr} \quad (4)$$

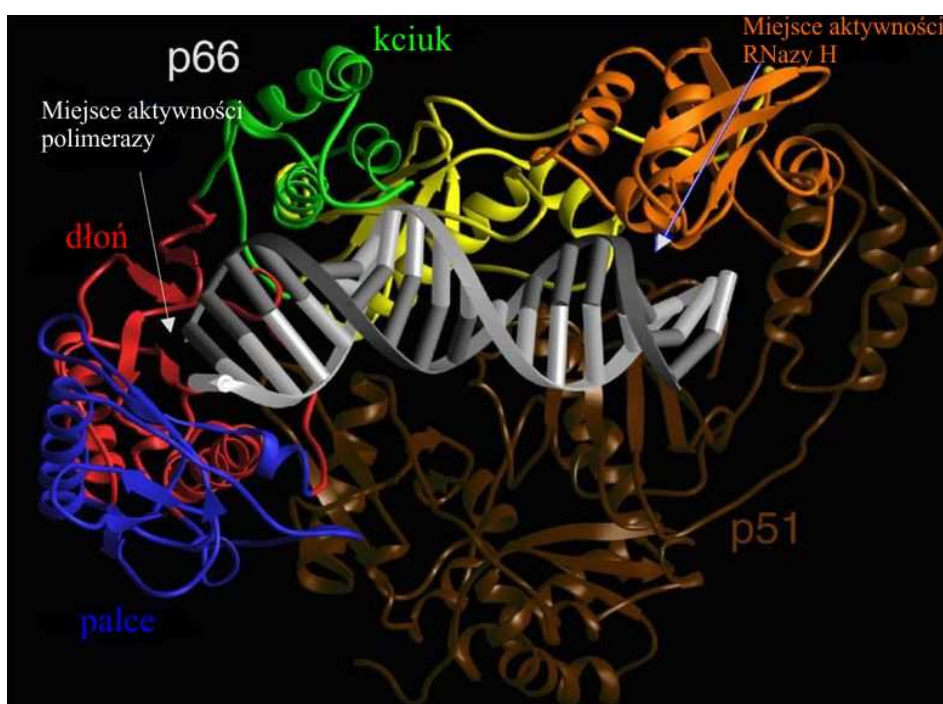
gdzie:

- ΔG_{VDW} - fizyczne wyrażenie na potencjał Lenarda-Jonesa;
- ΔG_{ww} - fizyczne wyrażenie na potencjał tworzenia ukierunkowanych wiązań wodorowych;
- ΔG_{el} - fizyczne wyrażenie na potencjał Coulomba;
- ΔG_{desolv} - empiryczne wyrażenie na potencjał desolvatacji;
- ΔG_{entr} - empiryczne wyrażenie na zmianę entropii tworzenia kompleksu ligand – receptor

Metodyka stosowana w dokowaniu molekularnym to kompromis między dokładnością a kosztem obliczeniowym. Pozwala w stosunkowo krótkim czasie wyznaczyć

prawdopodobne sposoby oddziaływania liganda z receptorem, jednak są one obarczone błędem wynikającym zarówno z przyjętych uproszczeń (usztynienie receptora), Algorytmów próbujących przestrzeń konformacyjną i pozycyjną (translacyjną) w sposób losowy oraz ograniczonej dokładności funkcji oceniających.

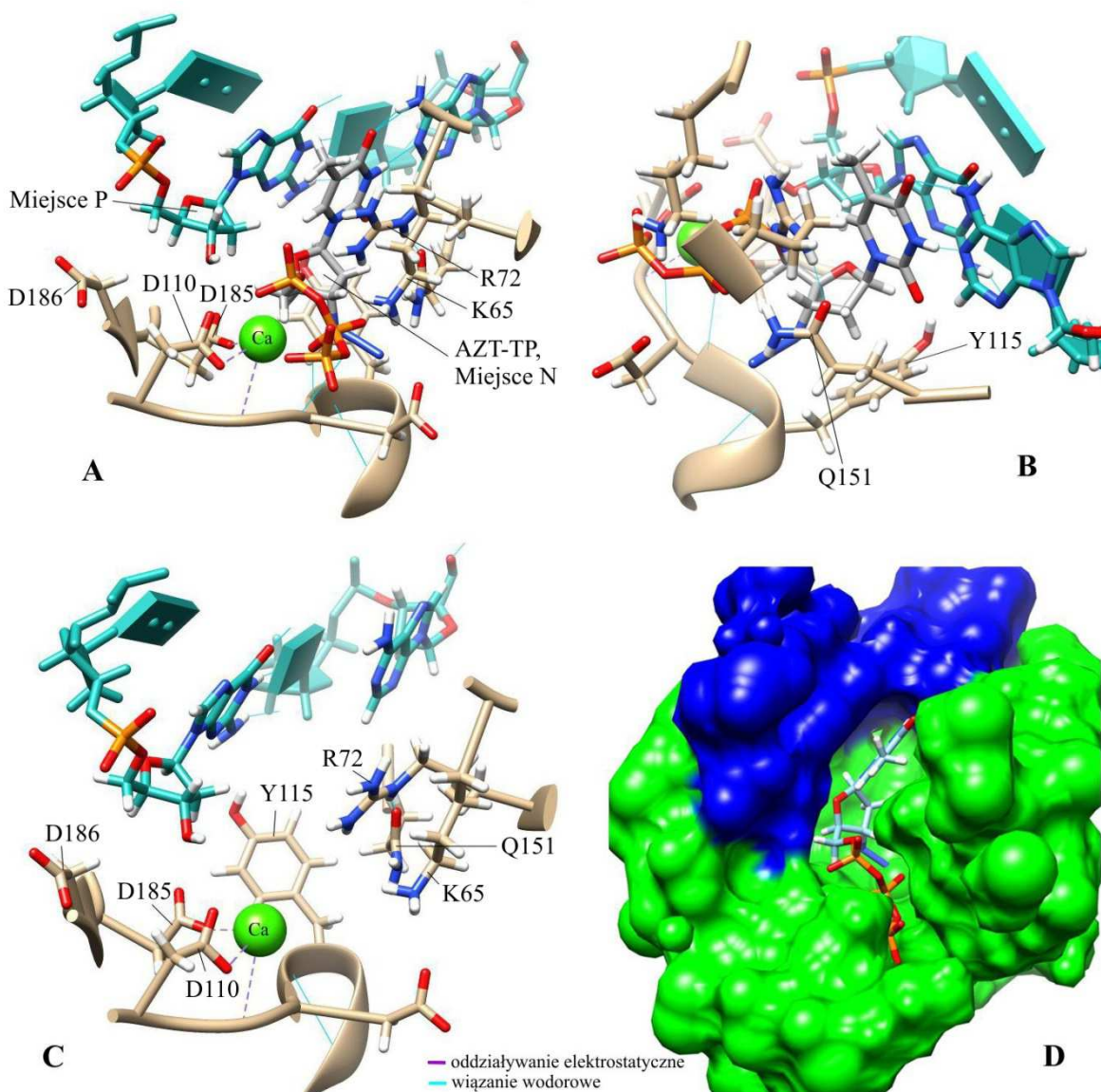
Przed opisaniem wyników eksperymentów dokowania molekularnego należy pokrótce opisać molekularne cele dokowania, czyli odwrotną transkryptazę wirusa HIV-1 (HIV1-RT) oraz mitochondrialną polimerazę γ (Pol γ). HIV1-RT jest heterodimerem zbudowanym z dwóch podjednostek p66 i p51.^[72] Posiada dwie aktywności enzymatyczne niezbędne do kopiowania jednoniciowego RNA wirionu na dwuniciowe DNA: aktywność polimerazy oraz aktywność RNazy H. Większa podjednostka p66 posiada miejsca aktywne obu tych funkcji. Mniejsza podjednostka posiada funkcję strukturalną. Domena aktywności polimerazowej składa się z kilku wyróżnionych elementów: palców (1-85 aa), dłoni (118-155 aa), kciuka (237-318 aa) i łącznika (319-426 aa) (Rysunek 3.6.1.). Szczelinę wiązania kwasu



Rysunek 3.6.1. Struktura odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1. Źródło: Sarafianos, S.G.; Marchand, B. 2009^[72]

nukleinowego budują zarówno palce, dłoń, kciuk, łącznik jak i domena aktywności RNazy H podjednostki p66. Podjednostka p51 tworzy spód szczeliny wiązania kwasu nukleinowego. Struktura enzymu pozwala na to, żeby kwas nukleinowy znajdował się jednocześnie w obu obszarach aktywności enzymu, a odległość między nimi wynosi 17-18 pz (par zasad). We właściwym usytuowaniu kwasu nukleinowego biorą udział również inne elementy jak helisy

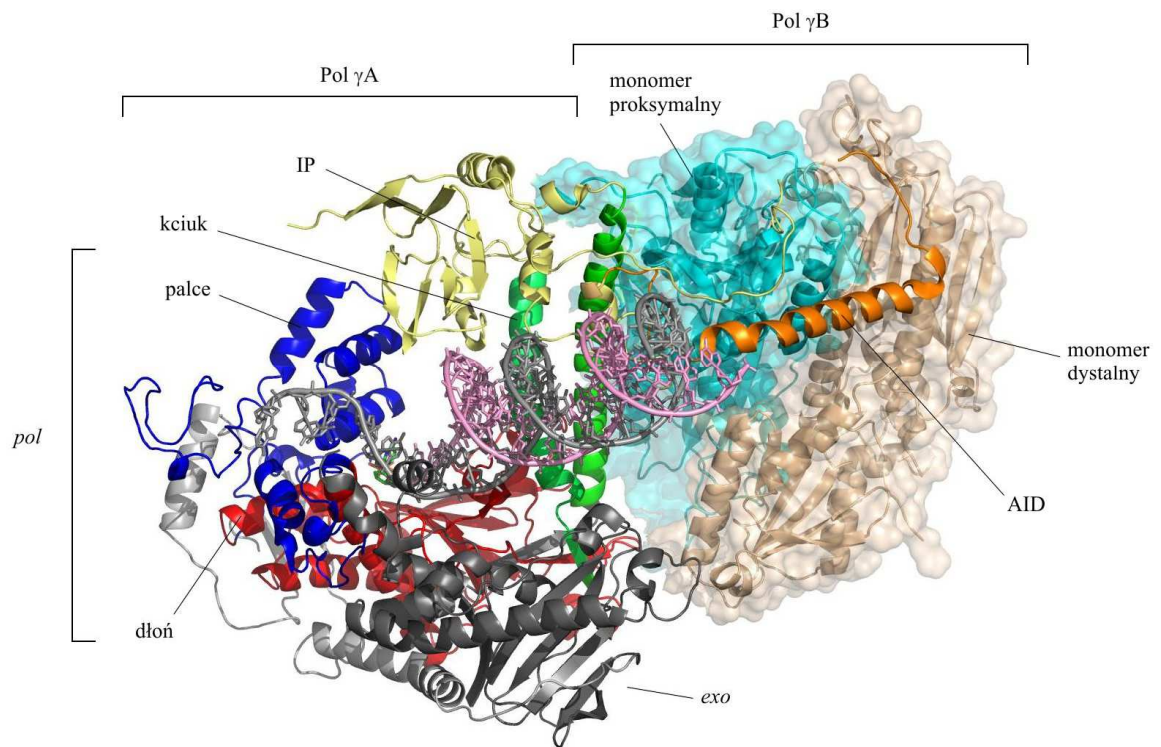
α H, α I, czy spinki β 12- β 13, które pomagają usytuować grupę 3'OH końca nici primerowej w miejscu aktywnym polimerazy. Miejsce to jest zbudowane m. in. z trzech karboksylowych reszt aminokwasowych Asp110 (D110), Asp185 i Asp186, które wiążą dwuwalencyjne jony metalu pełniące funkcję kofaktora. Prócz nich, miejsce aktywne jest zbudowane



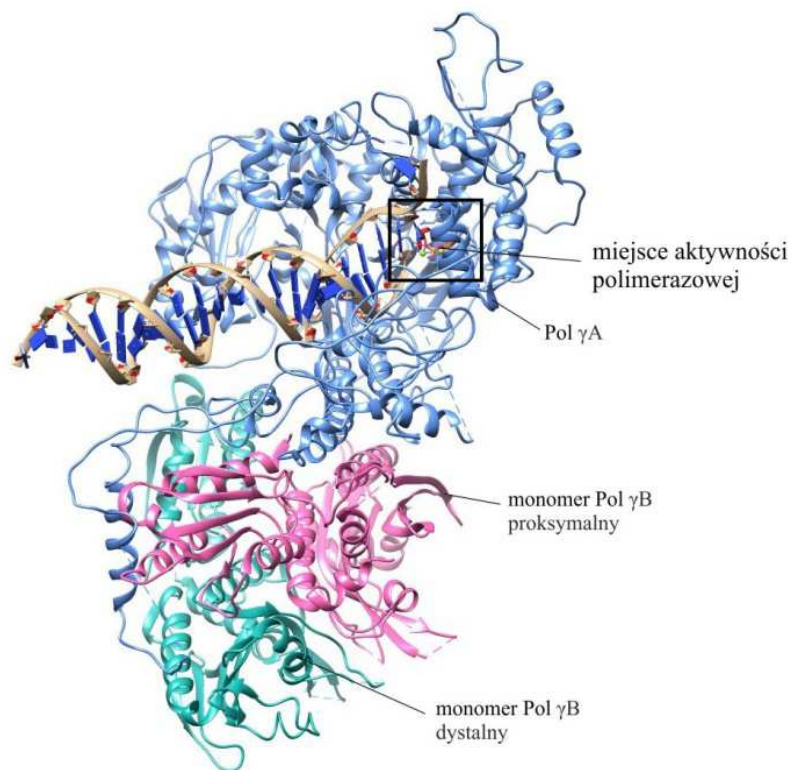
Rysunek 3.6.2. Miejsce aktywności polimerazowej odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1. A/B) Proteina-aptamer-ligand AZT-TP; C) Proteina-aptamer; D) reprezentacja powierzchniowa: zielony-proteina, granatowy-aptamer. Struktura RCSB PDB 5I42.^[236] Opracowanie własne.

z konserwatywnych reszt aminokwasowych Arg72 (R72) oraz Lys65 (K65), które pomagają w wiązaniu reszt β - i γ -fosforanowych trifosforanu, Tyr115 (Y115), która pomaga w wiązaniu części cukrowej nukleotydu i jest uznawana za czynnik dyskryminujący sterycznie rybonukleozydy względem 2'-deoksyrybnukleozydów oraz Gln151 (Q151), która oddziałuje bezpośrednio z grupą 3'OH trifosforanu nukleotydu (Rysunek 3.6.2.).

Mitochondrialna polimeraza γ zbudowana jest z podjednostki Pol γ A oraz dimerycznej podjednostki Pol γ B składającej się monomeru proksymalnego (bliższego) oraz dystalnego

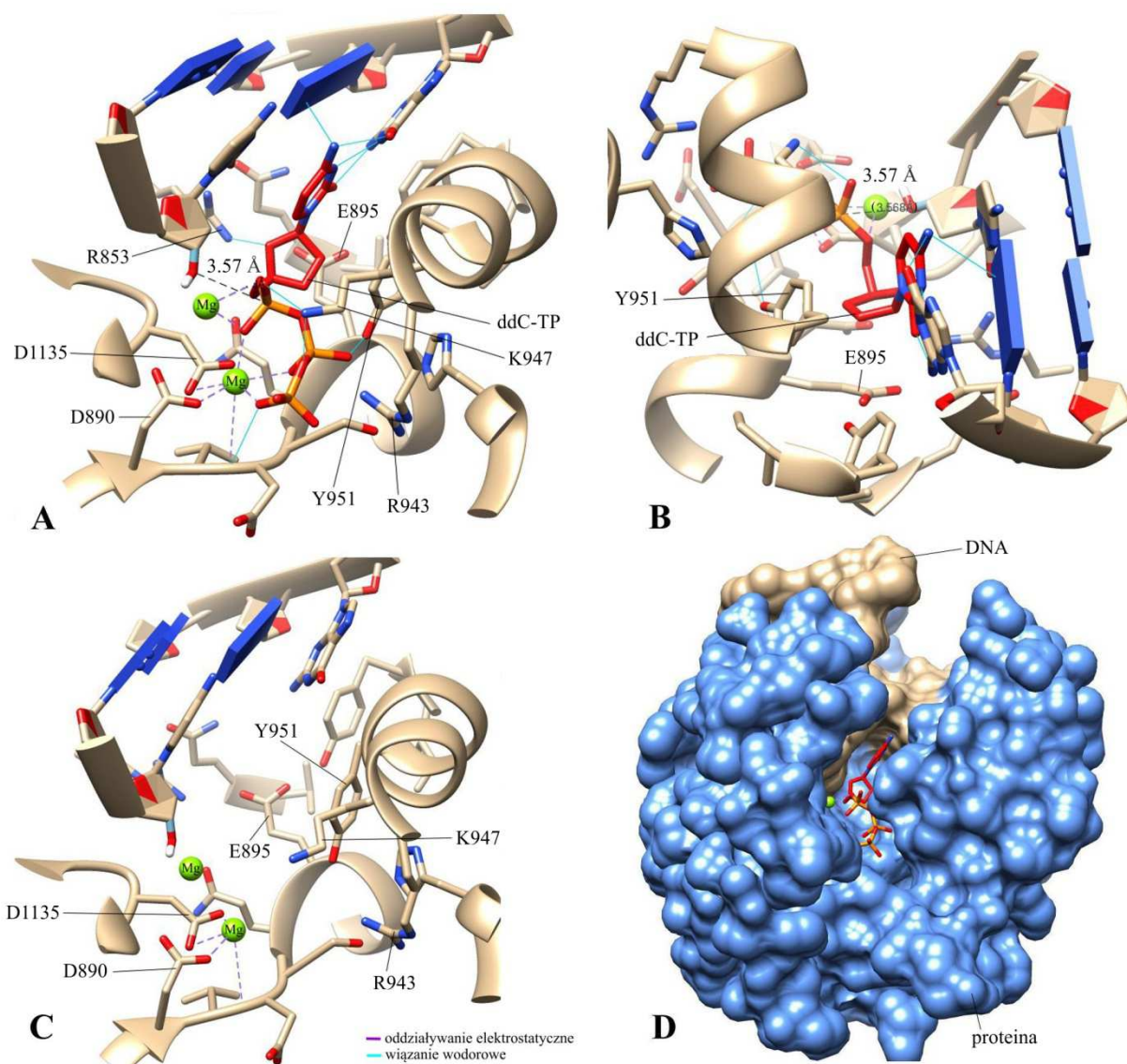


Rysunek 3.6.3. Struktura Pol γ . Źródło: Szymanski, M.R.; Kuznestov, V.B. 2015^[233]



Rysunek 3.6.4. Struktura Pol γ . Struktura RCSB PDB 4ZTU.^[233] Opracowanie własne.

(dalszego) (Rysunek 3.6.3., Rysunek 3.6.4.). Pol γ posiada zarówno funkcję replikacyjną jak i naprawczą. Podjednostka γA posiada wszystkie miejsca aktywne odpowiadające za aktywność polimerazową (domena *pol*), egzonukleazową (domena *exo*) oraz liazową. Podjednostka γB choć sama nie posiada żadnych aktywności, pełni istotną rolę poprzez allosteryczną stymulację aktywności domen *pol* i *exo*.^[233,234] Podjednostka γA posiada często spotykaną dla polimeraz budowę “prawej dłoni” z wyróżnionymi subdomenami



Rysunek 3.6.5. Miejsce aktywności polimerazowej Pol γ . A/B) Proteina-DNA-ligand; C) Proteina-DNA; D) reprezentacja powierzchniowa. Struktura RCSB PDB 4ZTU.^[233] Opracowanie własne.

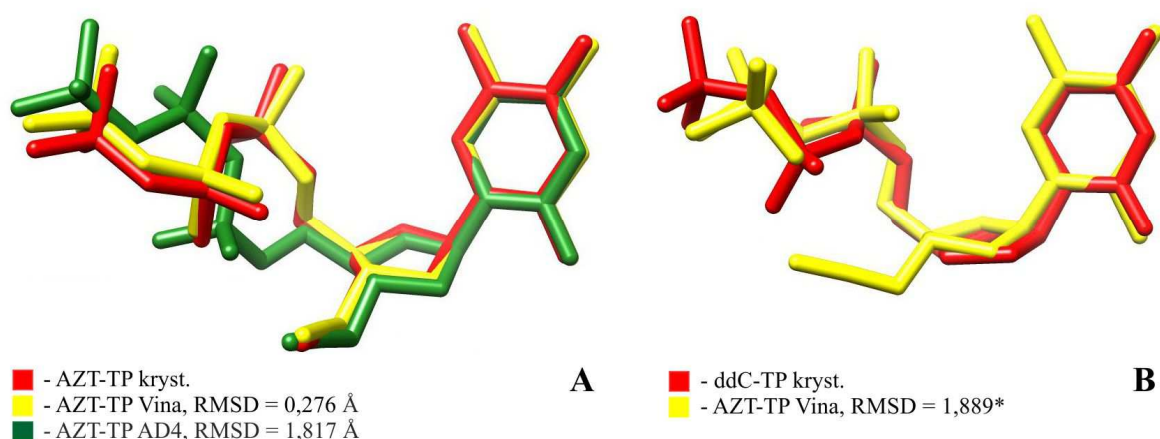
odpowiadającymi palcom, dłoni i kciuka w obrębie domeny *pol*, które wiążą matrycową nić DNA, substrat nukleotydowy i katalizują tworzenie wiązania fosfodiesterowego. Między domenami *pol* i *exo* znajduje się domena *spacer* zbudowana z dwóch subdomen IP (ang. *intrinsic processivity*) i AID (ang. *accessory interacting determinant*).

W miejscu aktywnym należy wyróżnić kilka kluczowych reszt aminokwasowych (Rysunek 3.6.5.): Asp890 (D890), Asp1135, które wiążą dwa dwuwalencyjne jony metalu biorące udział w wiązaniu reszt fosforanowych trifosforanu oraz w katalizie tworzenia wiązania fosfodiesterowego; Arg943 (R943) i Lys947 (K947) stabilizujące reszty fosforanowe trifosforanu; Tyr951 (Y951) odpowiadającą za selektywność substratową względem rNMP i dNMP; Arg853 (R853), która może oddziaływać z atomem tlenu pierścienia cukrowego; a także Glu895 (E895). Różnica względem miejsca aktywnego HIV1-RT polega między innymi na zamianie Arg72 (HIV1-RT) na Glu895 (Pol γ), co wprowadza w tym położeniu przeciwny ładunek, a także na położeniu reszty tyrozynowej (Tyr951/Tyr115).

Z bazy RCSB PDB^[235] pobrano plik struktury krystalograficznej kompleksu odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1, aptameru DNA, jonu wapnia oraz AZT-TP (trifosforan AZT) o symbolu PDB 5I42,^[236] która jest równie użyteczna do tego celu jak struktura PDB 3V4I^[237] (RT-DNA-AZT-TP) oraz plik struktury krystalograficznej kompleksu Pol γ , aptameru DNA, dwóch jonów magnezu oraz trifosforanu 2'-3'-dideoksycytydyny (ddC-TP) o symbolu 4ZTU.^[233] Przy użyciu programów AutoDock Tools oraz UCSF Chimera przygotowano receptory zgodnie z ogólnie przyjętą metodyką (usunięto cząsteczki wody, dodano brakujące wodory, uzupełniono braki łańcuchów bocznych aminokwasów, wykonano kilka kroków optymalizacyjnych w polu siłowym AMBER). Następnie w programie UCSF Chimera z obu kompleksów wycięto ligand z miejsca wiązania i w programie MOPAC metodą PM7 obliczono efektywny ładunek jonów metali otoczonych resztami aminokwasowymi w miejscach aktywnych enzymów. Przed wykonaniem dokowań do Pol γ należało wcześniej przebudować zasadę azotową ostatniego nukleotydu aptameru DNA w nici wiodącej z guaniny na adeninę ze względu na fakt, że dokowaniu poddane będą pochodne urydyny a nie cytydyny.

Tak przygotowane receptory poddano eksperymentom dokowania z AZT-TP. Miejsce wiązania ligandów obu enzymów jest znane, co pozwoliło precyzyjnie ustalić i zawęzić przestrzeń poszukiwań. W programie AutoDock 4 wybrano wariant dokowania półgiętkiego z sztywnym receptorem i ruchomym, elastycznym ligandem. Z możliwych algorytmów wybrano genetyczny algorytm Lamarcka (LGA) i ustawiono parametry poszukiwania (50 prób w wariancie „long”, 25 mln ewaluacji, 100 tys. generacji). Tak ustalone warunki pozwalają na wyczerpujące przeszukanie zadanej przestrzeni. Otrzymano 50 modów wiązania ligandu w miejscu N HIV1-RT, które zostały połączone w klastry i wytypowano najlepszą

strukturę. Struktura ta cechowała się największą reprezentacją, jedną z największych energii wiązania i pokrywała się dość dobrze ze współrzędnymi oryginalnego ligandu w zdeponowanej strukturze, prócz reszt fosforanowych. RMSD dla całej struktury ligandu wyniósł 1,817 Å (32 atomy). Przy uwzględnieniu tylko atomów C i N, co odpowiada szkieletom nukleozydowym, RMSD wyniosło 0,293 Å (15 atomów). RMSD (*root-mean-square deviation*) jest miarą określającą średnią odległość między atomami dwóch struktur (Rysunek 3.6.6.).



Rysunek 3.6.6. Poprawność dokowania AZT-TP do HIV1-RT oraz Pol γ . * RMSD obliczone tylko dla wspólnych atomów.

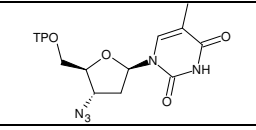
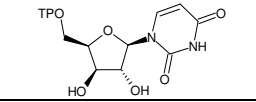
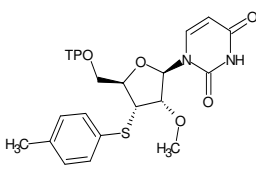
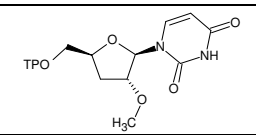
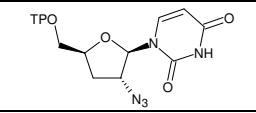
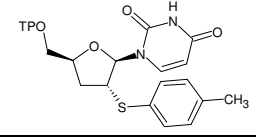
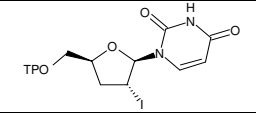
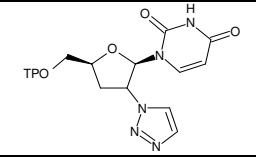
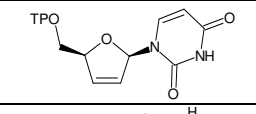
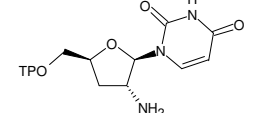
Do obliczeń w programie AutoDock Vina wykorzystano te same współrzędne przestrzeni poszukiwania miejsca aktywnego dla HIV1-RT. W przypadku Pol γ skorzystano z programu AutoDock Tools w celu określenia współrzędnych przestrzeni wiązania ligandu, które również jest znane dzięki zdeponowanej w bazie PDB strukturze. Tak określone współrzędne zaimplementowano do programu AutoDock Vina. W tym programie algorytm poszukiwania jak i funkcja oceniająca jest domyślna. Użytkownik może wybrać dokładność funkcji oceniającej oraz liczbę otrzymanych sposobów wiązania (modów) przez określenie parametrów „exhaustiveness” i „num_modes arg”. W przeprowadzonych eksperymentach ustalono odpowiednio wartości 30 oraz 20. Eksperyment powtórzono pięciokrotnie w celu zapewnienia bardziej wyczerpującego przeszukania przestrzeni, ponieważ program zaczyna poszukiwania w wybranym losowo punkcie. W tym przypadku dla HIV1-RT program wytypował strukturę prawie całkowicie zgodną pod względem geometrii i usytuowania z oryginalnym ligandem łącznie z resztami fosforanowymi. RMSD dla całej struktury wyniosło 0,276 Å (32 atomy). W przypadku dokowania AZT-TP do Pol γ również uzyskano dobry mod wiązania, a RMSD policzone dla atomów wspólnych wyniosło 1,889 Å

(26 atomów), a po ograniczeniu do wspólnych atomów C i N RMSD wyniosło 0,409 Å (11 atomów). Obliczenie parametru RMSD wymaga tożsamej numeracji atomów, co często sprowadza się do ręcznego numerowania, dlatego w dalszej części pracy podawane będą jedynie wartości RMSD obliczone dla 12 szkieletowych par atomów z uwzględnieniem atomu P_α, którego położenie wydaje się istotne w kontekście powstawania nowego wiązania fosfodiesterowego. Zwykle wartości RMSD > 4 Å są uznawane jako brak dopasowania i są traktowane jako równie złe, jednak w przypadku małych cząsteczek granicę tę trzeba postawić niżej, zwłaszcza jeżeli uwzględnia się tylko 12 szkieletowych par atomów z atomem P_α. Dlatego postanowiono w ocenie modów wiązania przyjąć graniczną wartość 2 Å.

Po udanej weryfikacji poprawności dokowania przystąpiono do eksperymentów z strukturami otrzymanych pochodnych 2',3'-dimodyfikowanych nukleozydów. W pierwszej kolejności w programie HyperChem 8 narysowano i zoptymalizowano w polu siłowym AMBER struktury trifosforanów wszystkich związków. Przeprowadzono dla nich analizę konformacyjną i zapisano strukturę konformera o najniższej energii. Wybór konformera o najniższej energii nie musi mieć znaczenia, ponieważ w przeprowadzonych eksperymentach wybrano tryb z elastycznym ligandem, który pozwala programom na swobodne rotowanie wiązań i zmianę konformacji również względem kąta torsyjnego χ wiązania glikozydowego z odwróceniem konformacji z *syn* na *anti*. Dokowania do HIV1-RT oraz Pol γ wykonano zgodnie z opisaną wcześniej metodyką. Wyniki dokowań przedstawiono w Tabeli 3.6.1.

Wyniki te stanowią jedynie odpowiedź w ocenie ewentualnej aktywności przeciw wirusowi HIV-1 oraz w ocenie toksyczności mitochondrialnej. Obliczone wartości energii Gibbsa nie są wartościami rzeczywistymi, a jedynie ilustracją wyniku, który można porównywać z wynikami otrzymanymi tą samą metoda w tym samym programie. Większe znaczenie od otrzymanej wartości liczbowej ma ocena jakości dopasowania, ilość wiązań wodorowych, ocena oddziaływań międzycząsteczkowych. W zadaniu tym pomocny jest program UCSF Chimera. Analiza wyników w programie Chimera pokazuje, że w miejscu wiązania ligandu enzymów HIV1-RT oraz Pol γ jest niewiele przestrzeni na wprowadzanie modyfikacji w pozycjach 2' i 3'. Jeśli przyjąć za idealny mod wiązania trifosforanu zalcytabiny, AZT lub 2',3'-dideoksydidehydrourydyny, to nawet niewielkie zmiany powodują odkształcenia, wysuwanie się ligandu z miejsca wiązania aż do utraty możliwości tworzenia wiązań wodorowych z komplementarną zasadą. Może to oznaczać, że w badanej grupie pochodnych 2',3'-dimodyfikowanych pochodnych urydyny moment utraty aktywności

zarówno względem HIV1-RT oraz Pol γ może nastąpić dość szybko. Jednak należy pamiętać, że tylko eksperyment *in vitro* lub *in vivo* kategorycznie rozstrzygną tę kwestię, a eksperymenty *in silico* stanowią jedynie pomoc w racjonalnym projektowaniu nowych związków. Można przypomnieć w tym miejscu opisany wcześniej związek **58** (pochodna tymidyny posiadająca w pozycji 3' triazol podstawiony naftalenem), który posiada wyjątkową aktywność względem wirusa HIV-1, chociaż posiada bardzo duży podstawnik.

| Numer nukleozydu | Struktura trifosforanu | Konformacja wyjściowa trifosforanu | Energia wiązania do HIV-RT (ΔG [kcal/mol]) Auto Dock Vina | Energia wiązania do HIV-RT (ΔG [kcal/mol]) Auto Dock 4 | Energia wiązania do Pol γ (ΔG [kcal/mol]) Auto Dock Vina |
|------------------|---|------------------------------------|--|---|--|
| 1 |  | C3'-endo(N) anti | -10,1 | -21,22 | -6,8 |
| 118 |  | C3'-endo(N) anti | -8,9 | -18,65 | -8,2 |
| 272 |  | C2'-endo(S) anti | brak dopasowania | brak dopasowania | brak dopasowania |
| 286 |  | C2'-endo(S) anti | -8,5 | -17,8 dopasowanie wątpliwe | -8,7 dopasowanie wątpliwe |
| 287 |  | C2'-endo(S) anti | brak dopasowania | -17,9 dopasowanie wątpliwe | -7,7 |
| 288 |  | C2'-endo(S) syn | brak dopasowania | brak dopasowania | brak dopasowania |
| 289 |  | C2'-endo(S) syn | brak dopasowania | brak dopasowania | -8,7 |
| 290 |  | C2'-endo(S) syn | brak dopasowania | -18,3 | -8,7 |
| 291 |  | koperta anti | -9,1 | -18,7 | -9,4 |
| 292 |  | C2'-endo(S) syn | -8,8 | -16,3 | -8,9 |

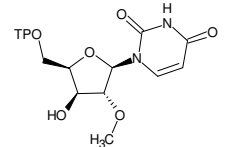
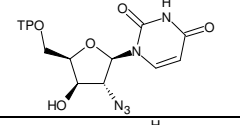
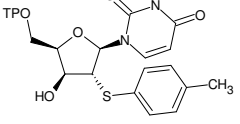
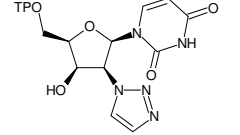
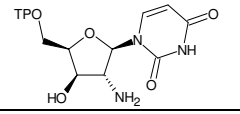
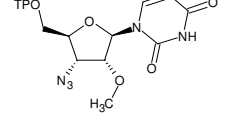
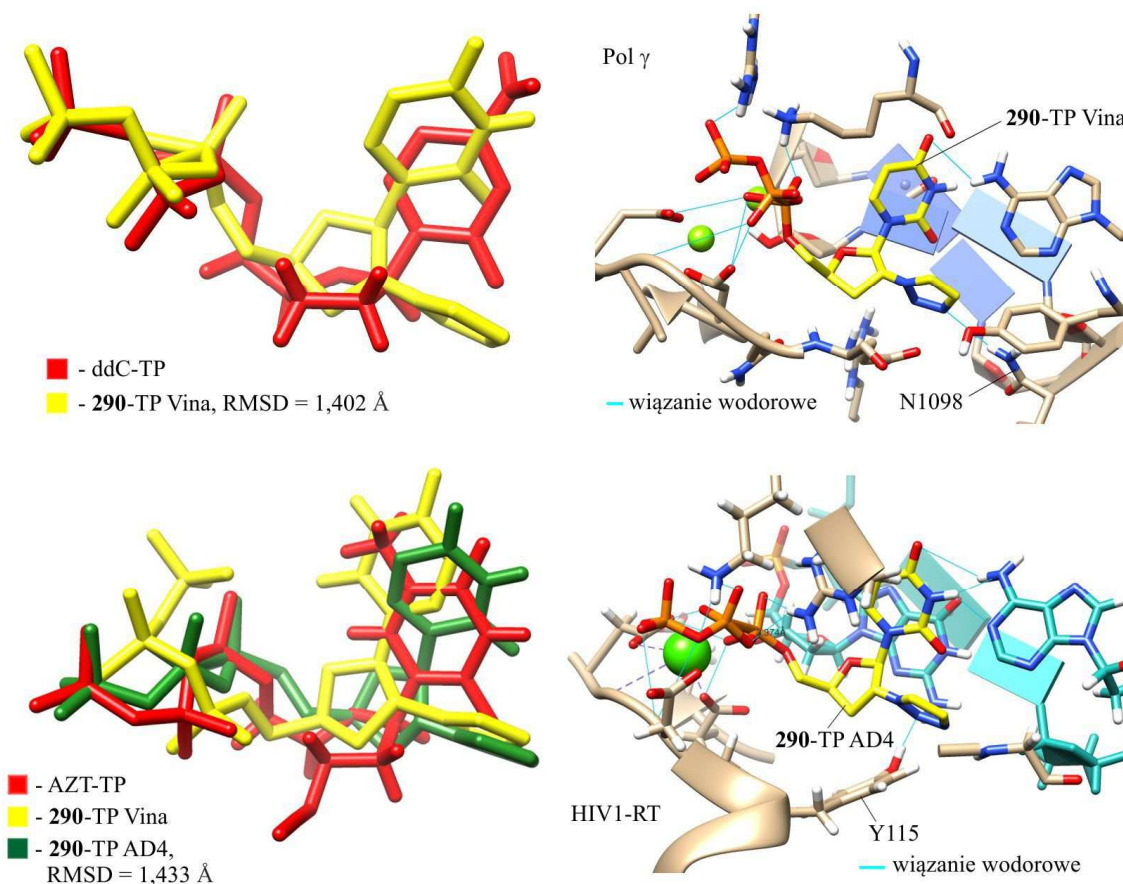
| | | | | | |
|-----|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------|
| 307 |  | C3'-endo(N) syn | -8,7 | -19,0 | -7,1 |
| 308 |  | C3'-endo(N) syn | -9,5 | brak dopasowania | -8,3 |
| 309 |  | C3'-endo(N) syn | brak dopasowania | brak dopasowania | brak dopasowania |
| 311 |  | C2'-endo(S) anti | brak dopasowania | brak dopasowania | -5,8 dopasowanie wątpliwe |
| 312 |  | C2'-endo(S) anti | -8,6 | -16,4 | -8,5 |
| 317 |  | C3'-endo(N) anti | brak dopasowania | brak dopasowania | -6,2 |

Tabela 3.6.1.1. Uzyskane wyniki dokowania molekularnego 2',3'-dimodyfikowanych urydyny.

Ocenę jakości wiązania przeprowadzono na podstawie liczby wiązań wodorowych, odległości między atomem P_{α} a grupą OH 3' końca nici primerowej, podobieństwa do ułożenia ligandu w strukturze krystalicznej oraz możliwością utworzenia wiązań wodorowych z komplementarną zasadą. Dodatkowym czynnikiem jest obliczona energia wiązania, która zgodnie z definicją powinna określać również oddziaływania van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe. Choć weryfikację dokładności dokowania lepiej przeszedł program AutoDock Vina, jednak w trakcie dokowania badanych ligandów program AutoDock 4 również podawał ciekawe mody wiązania. W niektórych sytuacjach nawet lepsze od programu Vina. Ilustracje uzyskanych modów wiązania wszystkich ligandów można znaleźć w załączniku nr. 1. Jako że badanych ligandów jest 15, enzymów dwa, a w przypadku HIV1-RT użyto dwóch programów, otrzymano bardzo wiele modów wiązania. Dlatego postanowiono przedstawić jedynie podsumowanie poczynionych obserwacji:

- odległość między atomem P_{α} a grupą OH 3' końca nici primerowej ($D_{P_{\alpha}-3'OH}$) dla krystalicznej struktury wiązania AZT-TP w HIV1-RT wyniosła 3,844 Å, a dla ddC-TP w Pol γ wyniosła 3,438 Å. Można przyjąć pewien margines akceptowalnego odchylenia tej wartości, jednak wedle intuicji autora, nie powinien on przekraczać 0,5 Å.

- Obecność podstawnika tiotolilowego w każdym przypadku oznaczała zupełny brak dopasowania.
- Obecność podstawnika triazolowego w przypadku modu wiązania trifosforanu **290**

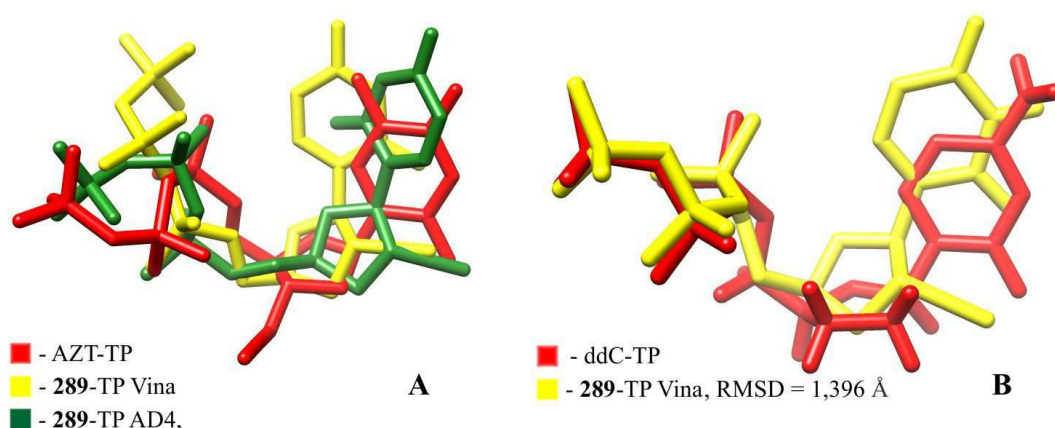


Rysunek 3.6.7. Dokowanie trifosforanu 290 do Pol γ oraz HIV1-RT.

obliczonego w Vinie dla Pol γ nie zakłóciła wiązania i ligand wydaje się być dobrze dopasowany, pojawiło się dodatkowe wiązanie wodorowe (ww) z Asn1098 (N1098), $D_{P_{\alpha-3'}OH}$ wyniosło 3,965 Å, a RMSD policzone dla 12 par wspólnych atomów szkieletowych i P_{α} wyniosło 1,402 Å. Reszty fosforanowe są dobrze stabilizowane przez szereg oddziaływań wodorowych i elektrostatycznych, jednak brakuje silnego wiązania wodorowego pomiędzy grupą NH uracylu i atomem N1 adeniny (Rysunek 3.6.7.). Odległość między tymi atomami (3.195 Å) oraz kąt (113°) klasyfikują takie wiązanie do wiązań słabych.^[238] W przypadku dokowania do HIV1-RT Vina nie wskazała modu, który można by uznać za poprawny – „najlepszy” mod posiadał konformację *syn*, która uniemożliwia stworzenie ww z komplementarną zasadą, a $D_{P_{\alpha-3'}OH}$ wyniosła 5,734 Å, co raczej uniemożliwia powstanie nowego wiązania fosfodiesterowego. Jednak AD4 wytypował strukturę, która może być uznana za poprawną: $D_{P_{\alpha-3'}OH}$ = 3,374 Å, dobra

stabilizacja reszt fosforanowych, dobre ww z komplementarną zasadą, dodatkowe ww między N2'' triazolu a grupą OH reszty Tyr115, która zamiast dyskryminować analog posiadający podstawnik w pozycji 2', stabilizuje wiązanie ligandu, RMSD dla 12 par wspólnych atomów wyniosło 1,433 Å. W przypadku pochodnej ksylofuranozylovej z podstawnikiem triazolowym **311-TP** nie znaleziono modu wiązania do HIV1-RT, który by spełniał przyjęte kryteria - $D_{P_{\alpha-3'}OH} < 4,344$ Å, RMSD (12 par atomów) < 2 Å, konformacja *anti*. Jednak Vina znalazła mod wiązania do Pol γ , którego nie można zupełnie odrzucić, ponieważ $D_{P_{\alpha-3'}OH} = 4,372$ Å, istnieje możliwość słabych ww z komplementarną zasadą, a RMSD (12 par atomów) wyniosło 1,432 Å. Energia wiązania ligandu wyniosła jednak zaledwie 5,8 kcal/mol.

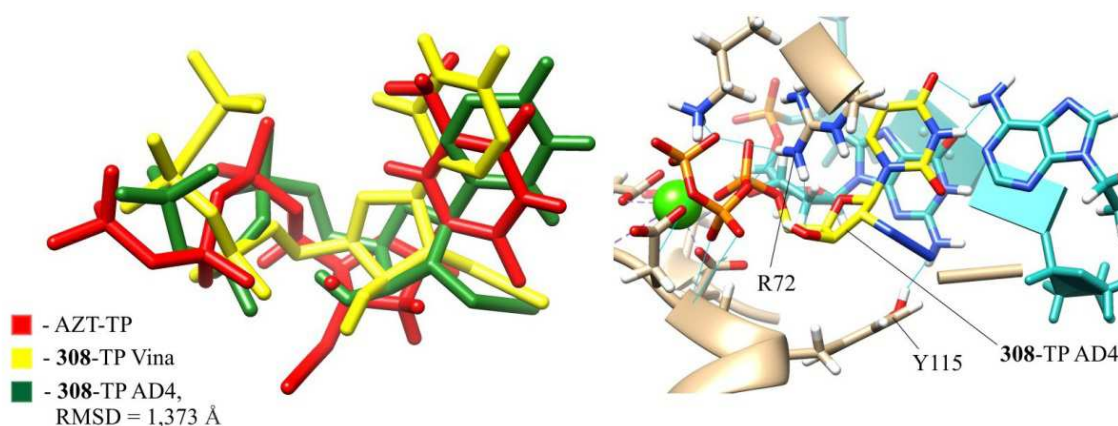
- Dla trifosforanu **291**, zgodnie z oczekiwaniem, otrzymano bardzo korzystne mody wiązania do obu enzymów (Vina), ponieważ związek nie posiada żadnych podstawników w pozycjach 2' i 3'. AD4 jednak nie dość dobrze dopasował reszty fosforanowe.



Rysunek 3.6.8. Nałożenie modów wiązania trifosforanu **289** do HIV1-RT (A) oraz Pol γ (B).

- Wprowadzenie w pozycji 2' podstawnika jodkowego w serii 3'-deoksy (**289-TP**) powoduje brak dopasowania w miejscu N enzymu HIV1-RT (Vina, AD4), jednak w przypadku Pol γ dopasowanie jest dostatecznie dobre. Wynik ten może sugerować, że tolerancja substratowa Pol γ względem pochodnych 2'-podstawionych jest większa od HIV1-RT, co nie jest korzystne (Rysunek 3.6.8.)
- Wprowadzenie w pozycji 2' grupy azydkowej w serii 3'-deoksy (**287-TP**) dało wynik podobny do **289-TP**. Dopasowanie do Pol γ jest dobre pod względem przyjętych kryteriów, jednak w przypadku HIV1-RT jedynie AD4 znalazł mod, który posiada pewne korzystne cechy jak obecność słabych ww z komplementarną zasadą, RMSD = 1,368 Å, jednak $D_{P_{\alpha-3'}OH} = 4,604$ Å, co wykracza poza przyjętą miarę. W serii ksylo

(308-TP) wynik jest trochę inny – dobry mod wiązania do Pol γ , oraz dostatecznie korzystny mod wiązania (AD4) do HIV1-RT: $D_{P_{\alpha-3'OH}} = 3,409 \text{ \AA}$, $RMSD = 1,373 \text{ \AA}$, ww z komplementarną zasadą o średniej energii, dodatkowe ww grupy 3'OH nukleotydu z Arg72 i ww grupy azydkowej z Tyr115 i z Gln151, co dodatkowo stabilizuje wiązanie ligandu. Jakkolwiek widać przekrzywienie tego ligandu względem AZT-TP, jednak suma dodatkowych korzystnych oddziaływań może to rekompensować (Rysunek 3.6.9.).



Rysunek 3.6.9. Dokowanie trisfosforanu 308 do HIV1-RT. Gln151 ukryto dla czytelności obrazu.

- Kolejnym zbadanym podstawnikiem w pozycji 2' była grupa aminowa. Grupa aminowa jest dużo mniejszym podstawnikiem, dlatego mody wiązania **292-TP** dla obu enzymów są bardzo dobre, choć można zwrócić uwagę, że w przypadku HIV1-RT AD4 znalazł mod lepszy od AD Vina. Ważną cechą tego modu wiązania jest nowe silne ww grupy aminowej i Gln151, przy niewielkim zaburzeniu ww z komplementarną zasadą. Związek ten wydaje się dobrym kandydatem do posiadania aktywności przeciw wirusowi HIV-1. Dokowanie **312-TP** również dało dobre mody wiązania do obu enzymów, choć w tym przypadku to AD Vina zaproponował lepszy pod względem $D_{P_{\alpha-3'OH}}$ mod wiązania do HIV1-RT. Jednak należy zauważyć, że ww grupy aminowej z Tyr115 i Gln151, które można zaobserwować, ze względu na kąty oddziaływań oraz długość, należą do słabych wiązań.
- Ostatnim zbadanym podstawnikiem była grupa 2'-O-metylowa. W serii 3'-deoksy (**286-TP**) dopasowanie ligandu do HIV1-RT można ocenić jako gorsze od pochodnej aminowej, ale lepsze od pochodnej azydkowej. AD Vina nie znalazł dobrego modu, jednak AD4 zaproponował mod, który spełnia wszystkie przyjęte kryteria, prócz $D_{P_{\alpha-3'OH}}$, które wyniosło $4,389 \text{ \AA}$. Wartość ta wykracza poza przyjęty margines odchylenia o $0,045 \text{ \AA}$, co przy arbitralności przyjętego marginesu nie stanowi większej różnicy. W przypadku Pol γ **286-TP** sposób wiązania ligandu nie jest dobry ze względu

na utrudnione tworzenie ww z komplementarną zasadą, jednak pozostałe kryteria zostały spełnione. W serii ksylofuranozylowej (**307-TP**) zarówno sposób wiązania do HIV1-RT jak i Pol γ spełnia przyjęte kryteria. Jednak zgodnie z wartościami RMSD modów wiązania ligandów w miejscu N HIV1-RT policzonymi względem atomów pierścienia cukrowego oraz pierścienia uracylowego (11 par atomów), można stwierdzić, że przesunięcie nukleotydu w miejscu wiązania enzymów jest większe niż w przypadku pochodnych aminowych, ale jest mniejsze od przesunięć pochodnych azydkowych: RMSD(**292-TP**) = 0,428 Å, RMSD(**312-TP**) = 0,930 Å, RMSD(**286-TP**) = 1,100 Å, RMSD(**307-TP**) = 1,128 Å, RMSD(**287-TP**) = 1,323 Å, RMSD(**308-TP**) = 1,423 Å. Czy może to mieć wyraz w kolejności szeregu zgodnie z aktywnością biologiczną? Niekoniecznie, ponieważ w przypadku pochodnych azydkowych oraz aminowych dochodzą dodatkowe wiązania wodorowe, które stabilizują układ. Można zaryzykować jednak stwierdzenie, że przesunięcie ligandu w miejscu wiązania, częściowe obrócenie względem osi x, y lub z może powodować osłabienie siły wiązań wodorowych z komplementarną zasadą aż do całkowitego ich zerwania, co niewątpliwie ma efekt negatywny.

- Najprostszy z badanych ligandów, czyli trifosforan **118** (ksylourydyna) wykazał dość dobry sposób wiązania do Pol γ – spełnia kryteria, choć dopasowanie (RMSD = 1,167 Å, 12 par atomów) jest mniejsze od pochodnej 2',3'-dideoksydidehydro (**291-TP**) a także od pochodnej aminowej (**312-TP**, RMSD = 0,791 Å, 12 par atomów). W przypadku HIV1-RT programy miały trudność w dopasowaniu reszt fosforanowych, tak że żadne z uzyskanych modów nie spełniało kryteriów.

Podsumowując, można zauważyć że wzrost wielkości podstawnika w pozycji 2' według prostej miary jaką jest jego objętość najczęściej zwiększa przesunięcie ligandu względem struktury wzorcowej, jednak nie musi mieć to jednoznacznego efektu w obniżeniu aktywności ze względu na powstawanie nowych wiązań wodorowych podstawników posiadających akceptory oraz donory wiązań wodorowych. Jakkolwiek w miejscach wiązania ligandów obu enzymów są obecne reszty aminokwasowe mające za zadanie dyskryminować sterycznie ligandy będące pochodnymi rybozy, jednak można zauważyć pewną zwiększoną tolerancję Pol γ względem badanych nukleozydów oraz tworzenie nowych wiązań wodorowych w obu enzymach przez reszty Tyr115/Tyr951, Gln151 HIV1-RT oraz Arg853 i Glu895 Pol γ z grupami w pozycji 2'. Niektóre ligandy posiadały dobre mody wiązania do enzymów pomimo obecnych podstawników, dlatego uzyskane wyniki potwierdzają

racjonalność przeprowadzonych syntez serii 2',3'-dimodyfikowanych pochodnych urydyny oraz postawionego w ich kontekście problemu badawczego. Przeprowadzone analizy sugerują również zasadność poszerzenia w przyszłości badań biologicznych oraz eksperymentów dokowania molekularnego o wirusy (np. HCV) posiadające polimerazę RNA zależną od RNA (RdRp), która powinna mieć większą tolerancję substratową dla pochodnych rybonukleozydów posiadających modyfikacje w pozycjach 2' i 3'.

3.7. Badania biologiczne

Tak jak przedstawiono wcześniej, można się spodziewać, że w serii nukleozydów dimodyfikowanych w układzie *cis*-diolowym, posiadających różne, coraz większe podstawniki w pozycji 2' zaobserwuje się moment, w którym wielkość, lub charakter fizykochemiczny podstawnika spowoduje spadek cytotoksyczności oraz spadek aktywności antypatogenowej. Jako że jedna i druga cecha dotyczą różnych enzymów i innych mechanizmów molekularnych, możliwe jest, że zmiana jednej (IC_{50}) nie będzie oznaczała zmiany drugiej (CC_{50}). Założenie to wynika z faktu, że specyfika substratowa enzymów komórkowych biorących udział w biosyntezie materiału genetycznego jest węższa, a mechanizmy naprawy ludzkiego DNA skuteczniejsze niż w przypadku bardziej prymitywnych enzymów patogenów. Aby uzyskać pełną odpowiedź na postawione pytanie w kontekście aktywności przeciw wirusowi HIV-1, należy przeprowadzić badania biologiczne uzyskanych dwóch serii 2',3'-dimodyfikowanych nukleozydów pod kątem cytotoksyczności oraz aktywności. Do tej pory udało się uzyskać jedynie część wyników badań cytotoksyczności *in vitro*.^{*} Wyników badań aktywności *in vitro* przeciw wirusowi HIV-1[†] jeszcze nie otrzymano.

W przypadku komórek nowotworowych różnica w aktywności i specyficzności enzymów względem enzymów zdrowych komórek jest zdecydowanie mniejsza. Różnica w tolerancji obecności modyfikowanych nukleozydów w tym przypadku jest dużo mniejsza i może polegać na zmianach w procesach naprawczych czy szybkości proliferacji. Jednak warto przebadать otrzymane związki również w tym kierunku, korzystając z możliwości jakie oferuje Instytut Chemii Bioorganicznej PAN. Dlatego przeprowadzono testy biologiczne na aktywność przeciw trzem typom nowotworów: wątroby w linii komórkowej HepG2, piersi

* Badania cytotoksyczności oraz aktywności przeciwnowotworowych przeprowadził D. Wawrzyniak z zespołu prof. J. Barciszewskiego z IChB PAN w Poznaniu.

† Badania aktywności przeciw wirusowi HIV są realizowane przy współpracy z zespołem prof. Z. Chilmonczyka z NIL w Warszawie.

w linii komórkowej T-47D oraz przeciw glejakowi wielopostaciowemu w linii komórkowej A-172 za pomocą testu MTT. Cytotoksyczność dla zdrowych komórek określono na linii komórkowej MRC-5 ludzkich fibroblastów. Test MTT opiera się na pomiarze aktywności redukcyjnej dehydrogenazy mitochondrialnej względem żółtej soli tetrazolowej (MTT). Metodą spektrofotometryczną oznaczano ilość produktu redukcji – fioletowego formazanu powstającego w żywych komórkach. Określono wartości IC_{50} oraz CC_{50} wraz z wartością odchylenia standardowego σ .

Korzystając z możliwości obliczeniowych określono również podstawowe deskryptory stosowane w metodzie SAR (ang. *structure activity relationship*)*:

- $\log P$ – logarytm wartości współczynnika podziału pomiędzy wodę i *n*-oktanol, powszechnie stosowany deskryptor określający lipofilowość mający wpływ na wszystkie fazy działania leku: farmakokinetyczną (uwalnianie, absorpcja, dystrybucja, metabolizm i eliminacja) oraz farmakodynamiczną (oddziaływanie lek-receptor); $\log P < 1$ oznacza, że związek jest hydrofilowy i nie podlega transportowi biernemu przez błony komórkowe, $1 < \log P < 3$ oznacza, że związek jest umiarkowanie lipofilowy i ulega migracji przez błony, $\log P > 3$ oznacza, że związek jest lipofilowy, wiąże się do błon komórkowych i dystrybucja w środowisku hydrofilowym jest utrudniona. $\log P$ obliczono siedmioma różnymi sposobami dzięki różnym programom stosujących różne algorytmy i bazy danych^[239]: ALOGPs, AC $\log P$, miLogP, ALOGP, MLOGP, XLOGP2 i XLOGP3; podana wartość jest wartością średnią;
- powierzchnia polarna (PSA, ang. *polar surface area*) [\AA^2] – definiowana jako część powierzchni związku dostępna dla rozpuszczalnika, posiadająca akceptory i/lub donory wiązania wodorowego lub inaczej jako suma powierzchni atomów polarnych mogących być donorami lub akceptorami wiązania wodorowego wraz z przyłączonymi atomami wodoru. Wyróżnia się dynamiczną powierzchnię polarną PSA_D , statyczną (PSA) i topologiczną (tPSA). Analogicznie można podać apolarną powierzchnię związku (aPSA);
- HBA – liczba akceptorów wiązań wodorowych, HDA – liczba donorów wiązań wodorowych.

* Obliczenia SAR wykonał D. Wawrzyniak z zespołu prof. J. Barciszewskiego.

- nrotb – liczba rotujących wiązań;
- V_m – objętość cząsteczki [\AA^3];
- Przewidywane parametry LADME: BB [$C_{\text{m\u00f3zg}}/C_{\text{krew}}$] – współczynnik podziału krew/m\u00f3zg wyrażony jako iloraz st\u0119żeń (niski – $BB < 0,1$; \u015bredni – $0,1 < BB < 2,0$; wysoki – $BB > 2,0$); $P_{\text{Caco-2}}$ [nm/s] – współczynnik przenikania do kom\u00f3rek Caco-2 (linia kom\u00f3rkowa gruczol\u0105ka jelita grubego) wyrażona w nanometrach na sekund\u0119 (niski – $P_{\text{Caco-2}} < 4$; \u015bredni $4 < P_{\text{Caco-2}} < 70$; wysoki – $P_{\text{Caco-2}} > 70$); HIA [%] – współczynnik wch\u0142aniania jelitowego (ang. *human intestinal absorption*) (niski – $HIA < 20\%$; \u015bredni – $20\% < HIA < 70\%$; wysoki – $HIA > 70\%$).*

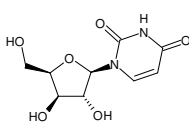
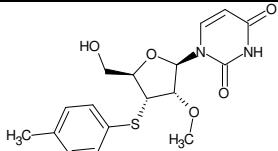
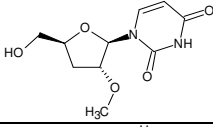
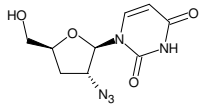
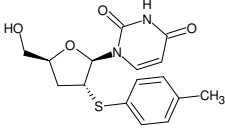
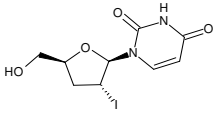
Regu\u0142a Lipi\u0144skiego pozwalaj\u0105ca okre\u015bli\u0107 prawdopodobie\u0144stwo przenikni\u0119cia leku do kom\u00f3rki stawia nast\u0119puj\u0105ce warunki: $M < 500$ Da, $\log P < 5$, $HBD \leq 5$, $HBA \leq 10$. Jest to prosta empiryczna regu\u0142a i znanych jest wiele wyj\u0105tk\u00f3w, jednak we wczesnej fazie opracowywania nowych leków znajduje zastosowanie. Wszystkie uzyskane w tej pracy 2',3'-dimodyfikowane pochodne spe\u0142niają t\u0119 regu\u0142\u0119. Fakt, \u017ce nukleozydy podlegaj\u0105 transportowi aktywnemu z wykorzystaniem transb\u0142onowych transporter\u00f3w nukleozydowych oraz tzw. no\u015bnikowemu transportowi biernemu,^[240] u\u0142atwia przenikanie nukleozyd\u00f3w do w\u0144\u0119tra kom\u00f3rki, je\u015bli tylko transportery rozpoznaj\u0105 modyfikowany nukleozyd. Jednak parametry fizykochemiczne, deskryptory oraz współczynniki LADME maj\u0105 istotne znaczenie ze wzgl\u0119du na wch\u0142anianie i dystrybucj\u0119 leku. Jak pisano w cz\u0119\u015bci literaturowej, o\u015brodkowy uk\u0142ad nerwowy stanowi rezerwu\u0105r wirusa HIV w p\u00f3\u017aniejszych stadiach choroby utrudniaj\u0105c jego eradykacj\u0119. Uzyskane wyniki bada\u0144 oraz oblicze\u0144 podano w Tabeli 3.7.1.

| Nr. | logP | V_m /[\AA^3] | PSA /[\AA^2] | HBA /HBD | BB /[C_m/C_k] | $P_{\text{Caco-2}}$ /[nm/s] | HIA /[%] | $CC_{50} \pm \sigma$ /[mM] (MRC-5) | $IC_{50} \pm \sigma$ /[mM] (A-172) | $IC_{50} \pm \sigma$ /[mM] (HepG2) | $IC_{50} \pm \sigma$ /[mM] (T-47D) |
|------------|-------|------------------------------|----------------------------|-------------|----------------------|--------------------------------|-------------|--|--|--|--|
| 118 | -2,08 | 198,7 | 188,1 | 8/4 | 0,497 | 8,50 | 30,4 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 272 | 1,12 | 314,3 | 127,7 | 7/2 | 0,146 | 19,07 | 92,9 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 286 | -1,18 | 208,2 | 137,8 | 7/2 | 0,125 | 0,22 | 69,8 | $0,76 \pm 0,02$ | $1,30 \pm 0,83$ | > 100 | > 100 |

* Skale parametr\u00f3w LADME mo\u017cna znale\u017c\u0107 na stronie <https://preadmet.bmdrc.kr/>

| | | | | | | | | | | | |
|------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|------|------------------|-----------------|-------|-------|
| 287 | -1,14 | 207,5 | 186,1 | 9/2 | 0,093 | 0,65 | 29,1 | 34,90 ± 9,80 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 288 | 1,38 | 288,7 | 135,3 | 6/2 | 0,036 | 14,19 | 94,0 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 289 | -0,02 | 206,6 | 122,6 | 6/2 | 0,358 | 20,29 | 95,4 | 2,12 ± 0,74 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 290 | -1,52 | 231,1 | 149,6 | 9/2 | 0,069 | 2,17 | 66,3 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 291 | -0,85 | 176,4 | 122,6 | 6/2 | 0,216 | 0,21 | 78,6 | 0,90 ± 0,20 | 1,44 ± 0,50 | > 100 | > 100 |
| 293 | -1,82 | 193,8 | 148,6 | 7/4 | 0,134 | 0,33 | 55,5 | 19,45 ± 5,25 | 22,44 ± 5,25 | > 100 | > 100 |
| 307 | -1,63 | 216,2 | 156,3 | 8/3 | 0,152 | 2,53 | 46,3 | 55,6 ± 10,74 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 308 | -1,73 | 215,6 | 204,6 | 10/3 | 0,079 | 11,82 | 14,8 | 55,00 ± 11,10 | > 100 | > 100 | > 100 |
| 317 | -1,40 | 233,1 | 177,5 | 10/2 | 0,075 | 1,53 | 24,7 | > 100 | > 100 | > 100 | > 100 |

Tabela 3.7.1.1. Uzyskane wyniki obliczeń SAR oraz badań biologicznych.

| Numer związku | Struktura nukleozydu | Numer związku | Struktura nukleozydu |
|---------------|---|---------------|---|
| 118 |  | 272 |  |
| 286 |  | 287 |  |
| 288 |  | 289 |  |

| | | | |
|-----|--|-----|--|
| 290 | | 291 | |
| 293 | | 307 | |
| 308 | | 317 | |

Tabela 3.7.1.1. Struktury związków objętych dotychczas badaniami biologicznymi.

Tak jak napisano wyżej, wyniki badań biologicznych są niekompletne. Dopiero po otrzymaniu wszystkich badań na cytotoksyczność i aktywności przeciw wirusowi HIV oraz w/w nowotworom uzyska się pełny obraz wpływu podstawnika w pozycji 2' na aktywność i cytotoksyczność badanych związków oraz relacji obu tych cech. Z dotychczas otrzymanych wyników można odczytać następujące informacje: żaden z badanych związków nie jest aktywny wobec komórek raka wątroby oraz komórek raka piersi; trzy związki aktywne wobec glejaka (**286**, **291**, **293**) są równie silnie toksyczne wobec zdrowych komórek, więc indeks selektywności $SI \approx 1$; w serii pochodnych 3'-deoksyurydyny można zaobserwować spadek cytotoksyczności wraz z wielkością podstawnika oraz że zmiana ta nie zależy od innych parametrów (logP, PSA, HBA, HBD); wyraźny spadek cytotoksyczności w serii 3'-deoksy można zaobserwować pomiędzy pochodną 2'-azydkową oraz 2'-triazolową, co wiąże się tylko ze zmianą wielkości podstawnika; w serii pochodnych 1-(β -D-ksylofuranozylo)uracylu brakuje danych dla kilku pochodnych, jednak można zaobserwować, że żadna z nich nie wykazuje aktywności przeciwnowotworowych, a cytotoksyczność pojawia się dopiero wraz z wprowadzeniem modyfikacji w pozycji 2'.

3.8. Podsumowanie i wnioski

W przedstawionej pracy wykonano szereg eksperymentów mających na celu weryfikację dotychczasowych doniesień literaturowych oraz poszerzenie wiedzy na temat otrzymywania i wykorzystania struktur anhydrocyklicznych rybonukleozydów. W poszukiwaniach, prócz eksperymentów laboratoryjnych, wielu prób reakcji chemicznych,

analizy wyników za pomocą metod instrumentalnych, posłużono się również metodami obliczeniowymi.

Ustalono, że metoda otrzymywania 2,3'-anhydrocytydyny opublikowana przez Y. Mizuno i T. Sasaki^[153] nie pozwala na skuteczne otrzymanie zakładanego produktu. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono, że w warunkach prowadzenia reakcji z silną zasadą jak np. *t*-butanolan sodu może powstawać pewna ilość produktu anhydrocyklicznego, jednak ulega on substytucji nukleofilowej jonem alkoholowym. Wskazuje na to wyizolowanie 3'-*O*-*t*-butylo-4-*N*,2',5'-*O*,*O*-tripiwaloilocytydyny (**237a**). Również inne próby otrzymania mostka 2,3'-anhydrocyklicznego cytydyny z 3'-*O*-mesylo-4-*N*,2',5'-*O*,*O*-tripiwaloilocytydyny (**86**) lub 3'-*O*-mesylocytydyny (**236**) w warunkach zasadowych, z **86** w warunkach kwasowych lub w reakcji Mitsunobu 4-*N*,2',5'-*O*,*O*-tripiwaloilocytydyny (**87**) nie powiodły się. Oznacza to, że struktury anhydrocykliczne nie nadają się do wprowadzania modyfikacji w pozycji 3' cytydyny, czyli nie nadają się do funkcjonalizacji układu *cis*-diolowego mającej na celu otrzymanie pochodnych 3'-modyfikowanych lub 2',3'-dimodyfikowanych. Dlatego postanowiono prowadzić dalsze badania z wykorzystaniem pochodnych urydyny, w przypadku której wiadomo, że strategia funkcjonalizacji układu *cis*-diolowego z wykorzystaniem struktur anhydrocyklicznych znajduje zastosowanie. Nie ogranicza to ewentualnej uniwersalności podejścia, ponieważ gotowe pochodne urydyny można znanymi metodami przeprowadzić do pochodnych cytydyny.

W pracach nad pochodnymi urydyny stwierdzono, że reakcja Mitsunobu mieszanin izomerów 2',5'- oraz 3',5'-diacylowanych prowadzi jedynie do jednego produktu 2,2'-anhydrocyklicznego. Jest to ciekawy wynik, dlatego poświęcono mu więcej czasu. Przedstawiono możliwy mechanizm tej reakcji oraz posłużając się metodami obliczeniowymi stwierdzono, że czynnikiem decydującym o obserwowanej tu regioselektywności jest geometria układu. Argumentami za tym stwierdzeniem są: regioselektywność reakcji Mitsunobu, gdy obie grupy hydroksylowe układu *cis*-diolowego są wolne, regioselektywność reakcji urydyny z węglanem difenyłu, wynik analizy rozkładu ładunków cząstkowych na atomach tlenu i węgla pochodnych urydyny oraz obliczone energie stanów przejściowych tworzenia mostków anhydrocyklicznych w reakcji urydyny z węglanem difenyłu.

W dalszym toku prac określono przydatność w syntezie otrzymanej 3',5'-di-*O*-piwaloil-2,2'-anhydrourydyny (**241a**) poprzez porównanie z reaktywnością nieblokowanej

2,2'-anhydrourydny (**95**). W wyniku przeprowadzonych reakcji stwierdzono, że **241a** nie posiada żadnej szczególnej przewagi nad **95** w reakcjach substytucji nukleofilowej, ale może stanowić substrat do otrzymania 1-(3',5'-di-O-piwaloiło- β -D-arabinofuranozylo)uracylu (**254**). Ustalono też, że związek **241a** można otrzymać z lepszą wydajnością na drodze piwaloiłowania 2,2'-anhydrourydny (**95**) i poprzez analogię lepszym sposobem otrzymywania 3',5'-di-O-benzoilo-2,2'-anhydrourydny (**241b**) od reakcji Mitsunobu jest benzoilowanie **95**. Zbadano również możliwość wykorzystania częściowego piwaloiłowania urydny do otrzymywania dipiwaloiłowanej pochodnej 2,3'-anhydrocyklicznej (**255**). W przeprowadzonej reakcji wykonano metodą *one-pot* piwaloiłowanie a następnie mesyłowanie. Tak otrzymaną mieszaninę pochodnych mesyłowych poddano cyklizacji i po wykorzystaniu metod chromatograficznych otrzymano mieszaninę dwóch izomerów anhydrocyklicznych w stosunku 100:2 z przewagą **255**. Zaprezentowana metoda może stanowić alternatywę otrzymywania mostka 2,3'-anhydrocyklicznego urydny względem syntezy przedstawionej przez Yunga i Foxa.^[135]

W trakcie poszukiwań nowych reaktywności struktur anhydrocyklicznych stwierdzono, że butylolit nie ulega substytucji w oczekiwanym miejscu części cukrowej pochodnych 2,2'-anhydrourydny (**241a**, **259** - 5'-O-trytylo-2,2'-anhydrourydny), a jedynym produktem podstawienia, jaki uzyskano w danych warunkach, jest 4-*n*-butylo-1-(3',5'-di-O-piwaloiło- β -D-arabinofuranozylo)-2-pyrimidynon (**260**). Wynik ten sugeruje niepełną aromatyzację pierścienia uracylu. Po substytucji następuje dehydratacja pozycji 4, czego siłą napędową jest pełna aromatyzacja układu. Strukturę potwierdzono analizą widm 1D i 2D NMR. Podobny wynik opublikowano wcześniej^[224] w przypadku innego związku metaloorganicznego, czyli jodku metylomagnezowego. Również H-fosfonian dietylu nie ulega substytucji do pochodnych **241a** i **259**. W warunkach przeprowadzonych reakcji nie zaobserwowano żadnej substytucji, co daje do zrozumienia, że struktury posiadające mostek anhydrocykliczny między częścią zasadową a resztą cukrową są mniej elektrofilowe i tym samym mniej podatne na atak nukleofilowy niż pochodne epoksydowe (2',3'-anhydrocykliczne) lub 2'- i 3'-karbonyłowe.

Badaniom poddano również reaktywność mostka 2,3'-anhydrocyklicznego pochodnych urydny: 2'-O-metylo-5'-O-trytylo-2,3'-anhydrourydny (**264**), 2'-azydo-5'-O-trytylo-2,3'-anhydrourydny (**267**) oraz 2,3'-anhydrourydny (**106**). Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły, że reaktywność (podatność na atak nukleofilowy) mostka 2,3'-anhydrocyklicznego urydny jest dużo mniejsza niż mostka 2,2'-anhydrocyklicznego

i w większości przypadków oczekiwane reakcje nie zachodziły. Co więcej, gdy grupy 5'- i 3'-hydroksylowe są wolne, można zaobserwować zachodzenie reakcji, jednak są to reakcje biegnące poprzez struktury pośrednie 2,5'-anhydrocykliczne, 2',3'-anhydrocykliczne (epoksydowe) oraz 2,2'-anhydrocykliczne będące produktami wewnątrzcząsteczkowych przegrupowań. Jedynie w reakcji nieblokowanej pochodnej **106** z *p*-tiokrezolem w obecności ftalimidku potasu zaobserwowano powstawanie produktu podstawienia w pozycji 3'. Przeprowadzone analizy wskazują, że podstawienie nastąpiło bezpośrednio do mostka 2,3'-anhydrocyklicznego, a uzyskany produkt ma konfigurację rybozy. Rezultat tej reakcji można tłumaczyć tym, że jony tiolanowe należą do jednych z najlepszych nukleofilów. Do tej pory, o ile wiadomo autorowi, nie publikowano przykładu bezpośredniej substytucji do mostka 2,3'-anhydrocyklicznego prócz sytuacji, gdy w pozycji 2' był silnie elektronoakceptorowy podstawnik fluorkowy, który poprzez efekt indukcyjny zwiększał elektrofilowość pozycji 3' mostka anhydrocyklicznego.

Aby nie ograniczać się wyłącznie do pochodnych pirymidynowych, zbadano również reaktywność struktury 8,2'-S-anhydroadenozyny (**168**). W przeciwieństwie do 8,2'-O-anhydroadenozyny (**150**) reaktywność **168** jest bardzo ograniczona. Związek **150** ulega substytucjom w pozycji 2' wobec nukleofilów takich jak anion benzoesanowy, anion azydkowy, anion tiolanowy. Ulega również substytucjom w pozycji 8, o czym było wspomniane w części literaturowej. Związek **168** poddano reakcjom z kilkoma wybranymi nukleofilami, poddano również hydrolizie w warunkach kwasowych i zasadowych stosując skuteczne wobec pochodnych 2,2'-anhydrourydyny warunki. Znow, jedynie reakcja z *p*-tiokrezolem w obecności ftalimidku sodu pozwoliła uzyskać oczekiwany produkt. W innych przypadkach żadna reakcja nie zachodziła, nawet reakcja przegrupowania wewnątrzcząsteczkowego. Z mieszaniny reakcyjnej izolowano substrat z mostkiem 8,2'-S-anhydrocyklicznym, co może wskazywać, że z możliwych struktur anhydrocyklicznych ta właśnie jest najkorzystniejsza termodynamicznie. Z tych obserwacji wynika jeden zasadniczy wniosek, że w strategii funkcjonalizacji układu *cis*-diolowego z wykorzystaniem struktur anhydrocyklicznych struktura 8,2'-S-anhydroadenozyny (**168**) jest niewłaściwa, a jedyną racjonalną możliwością w tym podejściu jest wykorzystanie 8,2'-O-anhydroadenozyny (**150**).

W ostatniej części pracy opisano syntezę dwóch serii 2',3'-dimodyfikowanych pochodnych urydyny wykorzystujące znane możliwości syntetyczne. W syntezie serii pochodnych 1-(β -D-ksylofuranozylo)uracylu rozwinięto podejście zaprezentowane w pracy Q. Dai *et al.*^[151] z zespołu J.A. Piccirilliego o pochodne 2'-azydkową, 2'-[1,2,3]triazolową,

2'-O-metylową i 2'-S-tiotolilową do etapu z grupą 3'-hydroksylową skierowaną nad płaszczyznę pierścienia. Reakcje wykonano z wydzieleniem produktów poszczególnych etapów w celu pełnego monitorowania przebiegu syntezy, jednak jak wykazano dla pochodnej 2'-azydkowej metoda *one-pot* jest bardziej wydajna, szybsza i dużo mniej pracochłonna. Zaprezentowano również kontynuację syntezy do produktów 2',3'-dipodstawionych o konfiguracji rybozy dla pochodnej 2'-O-metylowej. Synteza serii pochodnych 3'-deoksyurydny cechuje się mniejszą innowacyjnością, jednak przygotowanie tej serii, tak jak i serii ksylofuranozylowej, umożliwi ciekawą analizę wpływu wielkości i charakteru chemicznego podstawnika w pozycji 2' na aktywność przeciwwirusową, aktywność przeciwnowotworową i cytotoksyczność pochodnych nukleozydowych. Część wyników badań biologicznych już otrzymano i na ich podstawie można wyciągać pierwsze wnioski. W szeregu rosnącej objętości podstawnika serii 3'-deoksy można było wyróżnić dwa momenty. Pierwszym momentem był zanik aktywności przeciw glejakowi wielopostaciowemu między pochodną 2',3'-dideoksydidehydro a pochodną 2'-jodkową. Pochodna 2'-O-metylowa była również aktywna przeciw glejakowi. Aktywności za to nie wykazała pochodna 2'-azydkowa, której objętość była podobna do objętości pochodnej jodkowej i objętości pochodnej 2'-O-metylowej. Różnice objętościowe wynikają głównie z rodzaju podstawnika. W tym przypadku spadek aktywności nie zależał od wielkości podstawnika. Drugim momentem był zanik cytotoksyczności między pochodną 2'-azydkową a pochodną 2'-triazolową. Jest to szczególnie ciekawa obserwacja, ponieważ pochodne te nie różnią się szczególnie żadnym z podanych parametrów prócz objętości podstawnika. Z dalszymi wnioskami należy się wstrzymać do uzyskania wszystkich wyników badań biologicznych.

Przeprowadzone eksperymenty dokowania molekularnego wskazują dobre energie wiązania ligandów w miejscach aktywnych odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1 i polimerazy mitochondrialnej γ . Jednak, gdy spojrzeć się na usytuowanie w kieszeni względem trifosforanu AZT i trifosforanu ddC można zaobserwować, że obecność podstawnika w pozycji 2' powoduje pogorszenie dopasowania ze względu na usytuowanie reszty aminokwasowej w bliskiej odległości od atomu C-2' ligandu w położeniu optymalnym (położenie AZT). Można zauważyć że wzrost wielkości podstawnika w pozycji 2' według prostej miary jaką jest jego objętość najczęściej zwiększa przesunięcie ligandu względem struktury wzorcowej, jednak nie musi mieć to jednoznacznego efektu w obniżeniu aktywności ze względu na powstawanie nowych wiązań wodorowych podstawników posiadających

akceptory oraz donory wiązań wodorowych. Niektóre ligandy posiadały dobre mody wiązania do enzymów pomimo obecnych podstawników, co potwierdza słusność przeprowadzonych syntez oraz ukierunkowania badań w stronę określenia zmian aktywności przeciw wirusowi HIV-1. Należy jednak również rozważyć poszerzenie w przyszłości badań biologicznych oraz eksperymentów dokowania molekularnego o wirusy posiadające polimerazę RNA zależną od RNA (RdRp) (np. HCV), która powinna mieć większą tolerancję substratową dla pochodnych rybonukleozydów posiadających modyfikacje w pozycjach 2' i 3'.

Poruszony w pracy temat jest szeroki i przedstawione opracowanie nie wyczerpuje go. Można zaproponować wiele kolejnych eksperymentów do każdego rozdziału tej pracy. Zwłaszcza ciekawe byłyby próby przetestowania podejścia D. McGee^[152] do pochodnych 2,3'-anhydrourydyny i 8,2'-O-anhydroadenozyny, synteza mostka 8,3'-O-anhydrocyklicznego adenozyne oraz weryfikacja publikacji M. Hiraty,^[198] co będzie musiało być tematem innych opracowań.

4. Część doświadczalna

4.1. Metody ogólne

4.1.1 Modelowanie molekularne

Analizy konformacyjne były przeprowadzane przy użyciu pakietu HyperChem 8.0^[241] z wykorzystaniem mechaniki molekularnej w polu siłowym AMBER. Optymalizacje geometrii były przeprowadzone przy użyciu pakietów NWChem 6.1^[242] oraz GAMESS 11 (wersja z 2011)^[243] dostępnych na licencji akademickiej z wykorzystaniem metod DFT (B3LYP/6-31++G(d,p)) oraz DFT (B3LYP/6-31G(d,p)). Dla wszystkich obliczonych struktur wyliczono również widma IR w celu weryfikacji, czy odpowiadają one energetycznemu minimum. Analizę Mullikena i Lowdina przeprowadzono również w programie GAMESS 11 metodą DFT (B3LYP/6-31G(d,p)) w celu określenia ładunków cząstkowych oraz krotności wiązań. Obliczenia półempiryczne przeprowadzono z wykorzystaniem pakietów HyperChem 8.0 oraz MOPAC2012^[244] metodą PM7. Pakiet MOPAC2012 jest również dostępny na bezpłatnej licencji w celach niekomercyjnych za wiedzą autora programu. Dokowanie molekularne przeprowadzono za pomocą bezpłatnych pakietów AutoDock 4^[231] oraz AutoDock Vina^[232] przy pomocy AutoDock Tools. Receptor do dokowania przygotowano w programach UCSF Chimera^[245] i AutoDock Tools. Te same programy posłużyły również do analizy wyników i przygotowania ilustracji oddziaływań ligand-receptor. W pracy posłużono się programami Notepad++, Open Babel oraz ChemSketch firmy ACD/Labs.

4.1.2 Chemia

Wszystkie reagenty zostały zakupione u dostawców komercyjnych i były stosowane bez dalszego oczyszczania. Wyjątkiem są azydek litu otrzymany z siarczanu litu i azydku sodu oraz metanolan magnezu przygotowywany bezpośrednio przed reakcją z absolutnego metanolu i magnezu z katalityczną ilością jodu. Do reakcji w warunkach bezwodnych substraty w postaci stałej, nieulegające sublimacji suszono w próżni min. 2 godziny w 40 °C, chyba że podano inaczej, a szklane naczynia reakcyjne suszono w suszarce laboratoryjnej w 100 °C przez min. 2 godz. Standardowo wszystkie reakcje prowadzono w warunkach bezwodnych, prócz tych w których wymagane były warunki wodne.

- **Temperatura topnienia (T_{top})** była mierzona w otwartych kapilarach przy użyciu aparatu Laboratory Device Mel-Temp II.

- **Widma NMR** wykonano na aparacie Bruker Avance 400 MHz w DMSO- d_6 z TMS jako standardem wewnętrznym: przesunięcia chemiczne są zapisane w wartościach δ (ppm) a stałe sprzężenia J podano w Hz. W celu przypisania poszczególnych sygnałów ^1H NMR i ^{13}C NMR posiłkowano się często widmami 2D typu COSY, HSQC i HMBC. W celu ustalenia konfiguracji reszty cukrowej stosowano równanie krzywej Karplusa oraz widm NOESY.*
- **Widma MS** były wykonane na aparacie Bruker microTOF-Q dla produktów końcowych syntezy.†
- **RP-HPLC** były wykonane na aparacie Waters 1525 Binary HPLC z detektorem Waters 2487 UV Detector na kolumnie LiChospher RP18-5 Endcapped C18 (5,0 μm) 4,6 mm \times 250 mm z firmy Supelco Analytical w układzie rozpuszczalników A – 0,01 M octan trietyloamoniu i B – A/acetonitryl 1:4 (v/v) z gradientem dopasowanym do poszczególnych przypadków.
- **TLC** wykonywano na płytkach aluminiowych pokrytych żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄ firmy Merck w różnych układach rozpuszczalnikowych.
- **Chromatografia kolumnowa** wykonywana była na żelu krzemionkowym Merck 60 mesh 230-400 (0,040-0,063 mm) w różnych układach rozpuszczalnikowych. Objętość suchego żelu do rozdzielania określano względem masy rozdzielonej mieszaniny w proporcji 100 mL/1g mieszaniny. Na szczycie jak i na spodzie kolumny nakładano żel krzemionkowy Merck 60 (0,063-0,200 mm), który stanowił ok. 1/10 wysokości złoża. Złoże ubijano grawitacyjnie i hydraulicznie poprzez swobodny przepływ rozpuszczalnika lub ze wspomaganie pneumatycznym przy pomocy pompki ręcznej. Mieszaninę reakcyjną lub produkt zawsze наносono na kolumnę w DCM bez dodatku rozpuszczalników polarnych. W przypadku braku rozpuszczalności związku/ów w DCM mieszaninę adsorbowano na żelu poprzez odparowanie z roztworów polarnych rozpuszczalników z żelem krzemionkowym o średnicy 0,063-0,200 mm do postaci sypkiej i w takiej postaci наносono powoli na kolumnę, podczas gdy poziom rozpuszczalnika w kolumnie był wyższy o kilka centymetrów od szczytu złoża żelowego.

* Widma NMR wykonano korzystając z aparatu w Pracowni Biomolekularnego NMR IChB PAN.

† Widma MS wykonane przez pracowników Zakładu Biochemii Produktów Naturalnych IChB PAN.

W przypadku związków niestabilnych w warunkach kwasowych alkalizowano DCM poprzez przesączenie przez Al_2O_3 .

- **Układy rozpuszczalnikowe (v/v):**
 - C – chlorek metylenu/metanol (95:5),
 - D – chlorek metylenu/metanol (9:1),
 - E – chlorek metylenu/aceton (2:1),
 - F – chlorek metylenu/metanol (4:1),
 - G – chlorek metylenu/metanol (98:2),
 - H – chlorek metylenu/aceton (4:1),
 - I – chlorek metylenu/metanol (99:1),
 - J – chlorek metylenu/aceton (9:1),
 - K – chloroform/aceton (95:5),
 - L – chloroform/aceton (9:1),
 - M – chloroform/aceton (4:1),
 - N – chloroform/metanol (4:1),
 - O – chloroform/metanol (2:1),
 - P – heksan/octan (4:1),
 - Q – heksan/octan (2:1),
 - R – heksan/octan (1:1),
 - S – chlorek metylenu/aceton (95:5),
 - T – toluen/metanol (95:5),
 - U – toluen/metanol (9:1),
 - W – chlorek metylenu/aceton (98:2),
 - X – heksan/octan (3:1),
 - Y – chlorek metylenu/metanol (6:1),
 - Z – chlorek metylenu/metanol (2:1).
- **Bezwodne rozpuszczalniki** przygotowano zgodnie z instrukcją jednego z dostawców.^[246]
- **Przygotowanie THF** wykonano zgodnie z procedurą stosowaną w pracowni. Procedura ta ma na celu osuszenie z jednoczesnym usunięciem nadtlenków. W celu stwierdzenia nadtlenków dodawano do próbki ZnI_2 . Jeśli próbka zmieniała kolor, wówczas przed suszeniem usuwano nadtlenki mieszając bez dostępu światła nad $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ aż w wyniku próby z ZnI_2 nie obserwowano zmiany koloru. Następnie rozpuszczalnik dekantowano i suszono nad KOH

przez noc. Następnego dnia dekantowano i destylowano nad CaH_2 . Na końcu redestylowano nad sodu i benzofenonu. Uzyskany rozpuszczalnik przechowywano bez dostępu światła i powietrza nad sitami 4Å.

- **Przygotowywanie MeOH nasyconego NH_3** wykonano poprzez ogrzewanie wody amoniakalnej pod chłodnicą zwrotną, a wydobywające się z nad chłodnicy pary amoniaku poprzez układ suszek z KOH przepuszczano przez schłodzony do 0 °C MeOH.
- **Krystalizacje** wykonywano zgodnie z procedurą dostępną w literaturze.^[247]

4.2. Szczegółowe dane eksperymentalne

1-(β-D-Arabinofuranozylo)cytozyna (67)

1-(4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilo-β-D-arabino)cytozynę (**258**) (96,6 mg, 0,19 mmol) rozpuszczono w 4 mL MeOH i dodano 1 mL 1M KOH_{aq} . Reakcję prowadzono przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Po całkowitym przereagowaniu mieszaninę zaadsorbowano na żelu krzemionkowym poprzez odparowanie i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie F. Wyizolowano 42,2 mg (0,17 mmol) produktu z wydajnością 89%. TLC: $R_f = 0,31$ (Z); $^1\text{H NMR}$: δ 7.57 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H6), 7.07 (bs, 1H, NH_2), 6.99 (bs, 1H, NH_2), 6.03 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H1'), 5.66 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H5), 5.38 (m, 2H, 2'OH, 3'OH), 5.00 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, 5'OH), 3.94 (m, 1H, H2'), 3.88 (d, $J = 2.0$, 1H, H3'a), 3.73 (m, 1H, H4'), 3.57 (m, 2H, H5'a, H5'b); $^{13}\text{C NMR}$: δ 165.6 (C4), 155.1 (C2), 142.9 (C6), 92.3 (C5), 85.8 (C1'), 84.8 (C4'), 76.4 (C3'), 74.8 (C2'), 61.2 (C5').

3'-O-Mesylo-4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydyna (86)

Suszoną 4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydynę (**87**) (5,0 g, 10,09 mmol) rozpuszczono w 60 mL pirydyny, zatężono do ok. 55 mL i dodano chlorek mesylu (1,7343 g, 15,14 mmol, 1,173 mL, 1,5 ekw.). Reakcję pozostawiono na noc na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Pozostały śladowe ilości substratu. Pirydynę odparowano, następnie zawartość kolby trzykrotnie odparowano z toluenem. Otrzymany gęsty syrop rozpuszczono w DCM (80 mL) i ekstrahowano trzykrotnie wodnym roztworem NaHCO_3 (100 mL). Fazę organiczną suszono nad MgSO_4 i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie L. Produkt zebrano, odparowano rozpuszczalnik i wysuszono w próżni. Po wysuszeniu uzyskano 4,9587 g produktu (8,64 mmol) z wydajnością 86%. TLC: $R_f = 0,54$ (M); $^1\text{H NMR}$: δ 10.51 (s, 1H, NH), 8.08 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H6), 7.30 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H5), 5.89 (d, $J = 3.2$ Hz,

1H, H1'), 5.62 (dd, $J = 3.2, 5.6$ Hz, 1H, H2'), 5.35 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, H3'), 4.47 (m, 1H, H4'), 4.39 (dd, $J = 2.4, 12.8$ Hz, 1H, H5'a), 4.30 (dd, $J = 4.4, 12.8$ Hz, 1H, H5'b), 3.26 (s, 3H, Ms), 1.21, 1.19, 1.18 (3s, 27H, $9 \times \text{CH}_3^{\text{Piv}}$); ^{13}C NMR: δ 179.0, 177.1, 176.2 ($3 \times \text{C}=\text{O}$), 163.6 (C4), 154.1 (C2), 145.7 (C6), 96.2 (C5), 89.9 (C1'), 79.0 (C4'), 74.7 (C3'), 72.5 (C2'), 61.9 (C5'), 40.0, 38.4, 38.3 ($3 \times \text{C}^{\text{IIIPIV}}$), 37.5 (Ms), 26.8, 26.7, 26.3 ($3 \times \text{CH}_3^{\text{Piv}}$).

4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydyna (87)

Suszoną cytydynę (**85**) (5,0 g, 20,56 mmol) rozpuszczono w 80 mL pirydyny i zatężono do ok. 75 mL. Następnie roztwór schłodzony w łaźni z mieszaniną chłodzącą (lód/NaCl) i porcjami (0,5 mL) dodawano chlorek piwaloilu (8,6769 g, 71,96 mmol, 8,854 mL, 3,5 ekw.). Po dodaniu całości reagenta, mieszaninę pozostawiono na noc w lodówce. Pirydynę odparowano do sucha. Otrzymany zestalony syrop rozpuszczono w DCM (100 mL) i ekstrahowano trzykrotnie wodnym roztworem NaHCO_3 (150 mL). Fazę organiczną suszono nad MgSO_4 i produkt krystalizowano z toluenu uzyskując białe kryształy. Po wysuszeniu uzyskano 7,3511 g produktu (14,83 mmol) z wydajnością 72%. TLC: $R_f = 0,34$ (C); ^1H NMR: δ 10.45 (s, 1H, NH), 8.06 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H6), 7.27 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H5), 5.88 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H1'), 5.63 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 3'OH), 5.23 (dd, $J = 4.0, 2.4$ Hz, 1H, H2'), 4.33 (dd, $J = 8.0, 2.4$ Hz, 1H, H5'a), 4.25 (m, 2H, H5'b, H3'), 1.20, 1.18, 1.17 (3s, 27H, $9 \times \text{CH}_3^{\text{Piv}}$); ^{13}C NMR: δ 178.8, 177.4, 176.1 ($3 \times \text{C}=\text{O}$), 163.2 (C4), 154.2 (C2), 145.3 (C6), 96.2 (C5), 89.2 (C1'), 81.4 (C4'), 75.1 (C2'), 67.6 (C3'), 63.2 (C5'), 40.1, 38.3, 38.4 ($3 \times \text{C}^{\text{IIIPIV}}$), 26.8, 26.7, 26.3 ($3 \times \text{CH}_3^{\text{Piv}}$).

2',5'-Di-O-trytylourydyna (94).

Suszoną urydynę (3,0 g, 12,29 mmol) rozpuszczono w 40 mL Py i zatężono do ok. 37 mL. Następnie dodano TrCl (11,9931 g, 43,02 mmol, 3,5 ekw.) i mieszano w 100 °C przez 18 godzin. Reakcję zatrzymano przez odparowanie rozpuszczalnika z toluenem. Mieszaninę ekstrahowano w układzie $\text{DCM}/\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$, fazę organiczną suszono nad MgSO_4 i produkt oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie S. Produkt wyizolowano z wydajnością 40% (3,6089 g, 4,95 mmol). Uzyskano produkt w postaci białego osadu krystalizując w MeOH; TLC: $R_f = 0,71$ (D); ^1H NMR: δ 11.44 (s, 1H, NH), 7.47 (d, $J = 7.2$ Hz, 6H, Tr), 7.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 7.23 (m, 24H, Tr), 6.14 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H1'), 5.16 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H5), 4.30 (dd, $J = 4.8, 6.8$ Hz, 1H, H2'), 3.88 (s, 1H, H4'), 3.00 (dd, $J = 3.2, 10.4$ Hz, 1H, H5'a), 2.92 (dd, $J = 2.8, 10.4$ Hz, 1H, H5'b), 2.87 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, H3'); ^{13}C NMR: δ 162.9 (C4), 150.7 (C2), 143.8 (Tr), 143.0 (Tr), 140.4 (C6), 128.4 (Tr), 128.1 (Tr)

127.9 (Tr), 127.2 (Tr), 102.1 (C5), 86.9 (Tr), 86.7 (Tr), 86.3 (C1'), 84.5 (C4'), 76.3 (C2'), 69.8 (C3'), 63.9 (C5').

2,2'-Anhydrourydyna (95) z 241a

Suchą pochodną dipiwaloilową **241a** (100,0 mg, 0,25 mmol) rozpuszczono w 2 mL MeOH_{abs} nasyconego NH₃. Roztwór mieszano przez 3 godziny w T = 0 °C. Następnie rozpuszczalnik odparowano a produkt oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie D. Kolumnę przemyto uprzednio układem DCM/MeOH 1:1 (v/v). Produkt zebrano, rozpuszczalnik odparowano i przeprowadzono krystalizację z DMF. Wykryształizowany produkt przemyto metanolem. Po wysuszeniu w próżni uzyskano **95** z wydajnością 92% (52,5 mg, 0,23 mmol). Czystość produktu określona na RP-HPLC wyniosła 99%; T_{top} = 242-243 °C; TLC: R_f = 0,27 (F); ¹H NMR: δ 7.83 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H6), 6.30 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H1'), 5.87 (s, 1H, 3'OH), 5.84 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H5), 5.20 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H2'), 4.97 (s, 1H, 5'OH), 4.38 (s, 1H, H3'), 4.07 (t, J = 4.8 Hz, 1H, H4'), 3.28 (dd, J = 4.8, 11.6 Hz, 1H, H5'a), 3.19 (dd, J = 5.6, 11.2 Hz, 1H, H5'b); ¹³C NMR: δ 171.2 (C4), 159.8 (C2), 136.8 (C6), 108.6 (C5), 90.0 (C1'), 89.2 (C2'), 88.7 (C4'), 74.7 (C3'), 60.8 (C5'); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₉H₁₀N₂O₅+H]⁺ 227,0662, znal. 227,0666, bł. -1,7 ppm.

2,2'-Anhydrourydyna (95) z urydyny (80)

Urydynę (**80**) (2,0 g, 8,19 mmol) rozpuszczono w 20 mL DMF. Zateżono do ok. 17 mL, dodano suszony NaHCO₃ (68,9 mg, 0,82 mmol) oraz suszony węgiel difenyłu (2,6325 g, 12,29 mmol). Reakcję prowadzono w T = 100 °C przez 16 godz. Reakcję monitorowano metodą TLC w układzie F. Mieszaninę schłodzono do temperatury pokojowej i zateżono do ok. 10 mL. Mieszaninę pozostawiono na godzinę w temperaturze pokojowej, następnie osad odsączono, przemyto metanolem i rekryształizowano z MeOH. Otrzymany osad wysuszone w próżni i zważono. Uzyskano produkt z wydajnością 89% (1,6532 mg, 7,31 mmol). T_{top} = 242-243 °C; TLC: R_f = 0,27 (F); ¹H NMR i ¹³C NMR zgodne z widmami **95**.

2'-O-Metylourydyna (96)

Odważoną ilość magnezu (24,79 mg, 1,02 mmol) oraz katalityczną ilość jodu (6,5 mg, 0,05 mmol) dodano do 6 mL MeOH_{abs}. Ogrzewano w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną zakończoną fajką z CaCl₂ aż do uzyskania jednolitej białej zawiesiny. Następnie dodano **241a** (200,0 mg, 0,51 mmol) i kontynuowano ogrzewanie przez kolejne 5 godzin. Następnie ochłodzono mieszaninę do 5 °C i zobojętniono przez powolne dodawanie

stężonego kwasu octowego. Rozpuszczalnik odparowano i następnie ogrzewano w EtOH (5 mL) w temperaturze wrzenia. nierozpuszczalne sole odsączono i przesącz odparowano uzyskując 120,1 mg surowego produktu. Końcowe oczyszczenie przeprowadzono na kolumnie żelowej w układzie C. Frakcje zawierające produkt zebrano, odparowano i suszono w próżni. Uzyskano 111,2 mg produktu z wydajnością 84% (0,43 mmol). Czystość produktu sprawdzono na RP-HPLC i wyniosła 95%; $T_{top} = 158-158,5$ °C; TLC $R_f = 0,75$ (F); 1H NMR: δ 11.38 (s, 1H, NH), 7.94 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H6), 5.85 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H1'), 5.63 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 5.31 (bs, 2H, 3'OH, 5'OH), 4.12 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, H3'), 3.84 (d, $J = 4.4$ Hz, H1, H4') 3.78 (t, $J = 4.8$ Hz, H1, H2'), 3.63 (dd, $J = 2.8, 12.4$ Hz, H1, H5'a), 3.56 (dd, $J = 3,2, 12.2$ Hz, 1H, H5'b), 3.36 (s, 3H, CH₃); ^{13}C NMR: δ 163.25 (C4), 150.6 (C2), 140.34 (C6), 101.78 (C5), 85.96 (C1'), 85.05 (C4'), 82.7 (C2'), 68.12 (C3'), 60.34 (C5'), 57.48 (CH₃); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₁₀H₁₃N₂O₆]⁻ 257,0779, znal. 257,0776, bł. 1,1 ppm.

2,3'-Anhydrourydyna (106).

Nukleozyd **110** (573,0 mg, 0,80 mmol) rozpuszczono w roztworze 20 mL DCM i 2 mL CF₃COOH ($C_p = 11,2\%$) i mieszano przez 2 godziny. Kontrola TLC wskazała całkowite przereagowanie. Reakcję zakończono przez dwukrotne odparowanie z propanolem. Następnie dodano 10 mL MeOH i 100 mg NaHCO₃ i mieszano przez 2 godziny. Mieszaninę zaadsorbowano na żelu krzemionkowym (0,063-0,200 mm) (1 g). Całość naniesiono na kolumnę żelową. Produkt wymywano układem F. Kolumnę uprzednio przemyto układem DCM/MeOH 1:1 w celu wypłukania rozpuszczalnych zanieczyszczeń złoża. Wyizolowano produkt z wydajnością 99% (178,2 mg, 0,79 mmol); TLC: $R_f = 0,20$ (F); 1H NMR: δ 7.66 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H6), 6.43 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, 2'OH), 5.78 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H5), 5.77 (s, 1H, H1'), 5.07 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, 5'OH), 4.91 (s, 1H, H3'), 4.73 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H2'), 4.39 (m, 1H, H4'), 3.55 (m, 2H, H5'a,b); ^{13}C NMR: δ 170.4 (C4), 153.6 (C2), 141.1 (C6), 107.9 (C5), 89.4 (C1'), 83.8 (C4'), 79.3 (C3'), 69.6 (C2'), 59.1 (C5').

3'-O-Mesylo-2',5'-di-O-trytylourydyna (109).

Suszony nukleozyd **94** (3,0 g, 4,11 mmol) rozpuszczono w 35 mL Py i zatężono do ok. 33 mL. Następnie dodano chlorek mesyłu (941,6 mg, 8,22 mmol, 637,0 μ L, 2 ekw.) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Reakcję zakończono przez odparowanie pirydyny z toluenem i następnie wykonano ekstrakcję w układzie DCM/NaHCO₃aq. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i produkt oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie T i następnie frakcje zawierające produkt ponownie w układzie S.

Wyizolowano produkt z wydajnością 85% (2,8311 g, 3,51 mmol); TLC: $R_f = 0,29$ (U); ^1H NMR: δ 11.51 (s, 1H, NH), 7.30 (m, 31H, 2xTr, H6), 6.15 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H1'), 5.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 4.60 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, H2'), 4.32 (s, 1H, H4'), 3.94 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H3'), 3.13 (s, 3H, OMs), 3.06 (d, $J = 3.2$ Hz, 2H, H5'a,b); ^{13}C NMR: δ 162.7 (C4), 150.6 (C2), 143.0 (Tr), 142.8 (Tr), 140.1 (C6), 128.4 (Tr), 128.2 (Tr), 128.0 (Tr), 127.6 (Tr), 127.3 (Tr), 102.6 (C5), 87.4 (Tr), 86.9 (Tr), 85.9 (C1'), 80.8 (C4'), 78.5 (C3'), 73.3 (C2'), 62.9 (C5').*

* Sygnał ^{13}C NMR grupy MsO- nałożył się z sygnałami od DMSO.

2',5'-Di-O-trytylo-2,3'-anhydrourydyna (110).

Suszony nukleozyd (**109**) (2,6261 g, 3,25 mmol) rozpuszczono w 30 mL Py i zateżono do ok. 28 mL. Następnie dodano ftalimidek potasu (1,8059 g, 9,75 mmol, 3 ekw.) i mieszano w 135 °C przez 18 godzin. Wykonana TLC wskazuje całkowite przereagowanie. Reakcję zakończono przez odparowanie DMF. Mieszaninę rozdzielono na kolumnie żelowej w układzie S. Wyizolowano produkt z wydajnością 91% (2,1012 g, 2,95 mmol); TLC: $R_f = 0,43$ (H); ^1H NMR: δ 7.48 (d, $J = 7.2$ Hz, 6H, Tr), 7.32 (m, 24H, Tr), 7.17 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H6), 5.70 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H5), 4.91 (s, 1H, H2'), 4.54 (s, 1H, H1'), 4.50 (s, 1H, H4'), 4.43 (s, 1H, H3'), 3.21 (m, 1H, H5'a), 3.11 (m, 1H, H5'b); ^{13}C NMR: δ 170.0 (C4), 152.7 (C2), 143.2 (Tr), 143.1 (Tr), 140.4 (C6), 128.3 (Tr), 128.2 (Tr), 127.9 (Tr), 127.7 (Tr), 127.1 (Tr), 108.2 (C5), 88.4 (C1'), 88.2 (Tr), 86.5 (Tr), 82.4 (C4'), 78.3 (C3'), 72.3 (C2'), 61.6 (C5').

1-(β -D-Ksylofuranozylo)uracyl (118)

Nukleozyd **106** (100,0 mg, 0,44 mmol) rozpuszczono w 3 mL roztworu 1M KOH/MeOH, dodano kroplę wody i mieszano w 70 °C przez siedem godzin. Zobojętniono 1M roztworem $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{MeOH}$ i oczyszczono na kolumnie w układzie J. Otrzymano 105,9 mg (0,43 mmol) z wydajnością 98%. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: $R_f = 0,71$ (F); ^1H NMR: δ 11,28 (s, 1H, NH), 7.77 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 5.80 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 2'OH), 5.66 (s, 1H, H1'), 5.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 5.51 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, 3'OH), 4.80 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, 5'OH), 4.09 (dd, $J = 6.0, 9.2$ Hz, 1H, H4'), 3.96 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H2'), 3.92 (t, $J = 3.6$ Hz, 1H, H3'), 3.72 (m, 1H, H5'a), 3.65 (m, 1H, H5'b); ^{13}C NMR: δ 163.3 (C4), 150.5 (C2), 141.4 (C6), 100.8 (C5), 90.8 (C1'), 83.7 (C4'), 80.6 (C2'), 74.5 (C3'), 59.0 (C5'); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla $[\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6+\text{Na}]^+$ 529,1969, znal. 267,0592, bł. -0,4 ppm.

5'-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-2,2'-anhydrourydyna (121)

Suszoną 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)urydynę (**242**) (305,0 mg, 0,56 mmol) oraz Ph₃P (204,6 mg, 0,78 mmol) rozpuszczono w DMF (12 mL) i zatężono do ok. 10 mL. Następnie dodano DEAD (135,9 mg, 123,0 μL, 0,78 mmol) i mieszano przez noc w T = 80 °C. Po zakończeniu reakcji odparowano rozpuszczalnik i mieszaninę rozdzielono na kolumnie żelowej w układzie rozpuszczalnikowym C. Chlorek metylenu został uprzednio przesączony przez Al₂O₃ w celu alkalizacji. Zebrano produkt, odparowano i krystalizowano z toluenu. Następnie produkt suszono w próżni. Uzyskano 70,9 mg produktu (0,13 mmol, 23%) o czystości RP-HPLC 98%; T_{top} = 129,5-130 °C; TLC: R_f 0,34 (D); ¹H NMR: δ 7.93 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H6), 7.27 (m, 4H, DMTr), 7.21 (m, 1H, DMTr), 7.14 (dd, J = 2.8, 8.8 Hz, 4H, DMTr), 6.83 (dd, J = 6.0, 8.8 Hz, 4H, DMTr), 6.33 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H1'), 5.98 (d, J = 4.8 Hz, 1H, 3'OH), 5.88 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H5), 5.21 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H2'), 4.30 (d, 1H, H3'), 4.23 (m, 1H, H4'), 3.73 (s, 6H, OMe), 2.94 (dd, J = 4.4, 10.4 Hz, 1H, H5'a), 2.81 (dd, J = 7.2, 10.4 Hz, 1H, H5'b); ¹³C NMR: δ 170.9 (C4), 159.3 (C2), 158.1 (DMTr), 158.0 (DMTr), 144.6 (DMTr), 136.7 (C6), 135.2 (DMTr), 135.1 (DMTr), 129.5 (DMTr), 129.4 (DMTr), 127.8 (DMTr), 127.4 (DMTr), 126.7 (DMTr), 113.2 (DMTr), 108.87 (C5), 89.7 (C1'), 88.4 (C2'), 86.8 (C4'), 85.4 (DMTr), 74.7 (C3'), 62.8 (C5'), 55.0 (CH₃O), 54.9 (CH₃O); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₃₀H₂₈N₂O₇+H]⁺ 529,1969, znal. 529,1989, bł. -3,7 ppm.

8-Tioksoadenozyna (154)

Suszoną 8-bromoadenozynę (**169**) (2,5 g, 7,22 mmol) oraz tiomocznik (1,1004 g, 14,44 mmol, 2 ekw.) rozpuszczono w 40 mL DMF i zatężono do ok. 38 mL. Reakcję prowadzono przez 4 godziny w 120 °C. Odparowano rozpuszczalnik i produkt oczyszczono na kolumnie w układzie D. Wyizolowano 1,5948 g (5,33 mmol) produktu z wydajnością 74%. TLC: R_f = 0,54 (F); ¹H NMR: δ 12.57 (s, 1H, NH), 8.12 (s, 1H, H2), 7.00 (bs, 2H, NH₂), 6.34 (d, J = 6.4 Hz, 1H, H1'), 5.43 (bs, 2H, 5'OH, 2'OH), 5.20 (bs, 1H, 3'OH), 5.00 (t, J = 6.0 Hz, 1H, H2'), 4.22 (dd, J = 2.4, 4.8 Hz, 1H, H3'), 3.90 (dd, J = 4.0, 7.6 Hz, 1H, H4'), 3.66 (dd, J = 4.0, 8.0 Hz, 1H, H5'a), 3.51 (dd, J = 4.4, 8.0 Hz, 1H, H5'b); ¹³C NMR: δ 167.9 (C8), 159.6 (C6), 152.0 (C2), 148.0 (C4), 107.1 (C5), 88.7 (C1'), 85.7 (C4'), 70.8, 70.7 (C2', C3'), 62.2 (C5').

8,2'-S-Anhydro-2'-deoksyadenozyna (168)

Suszoną 8-tioksoadenozynę (**154**) (1,4 g, 4,68 mmol) rozpuszczono w 30 mL DMF i zateżono do ok. 28 mL. Następnie dodano węglan difenyłu (1,5038 g, 7,02 mmol, 1,5 ekw.) i NaHCO₃ (39,5 mg, 0,47 mmol, 0,1 ekw.). Reakcję prowadzono w 100 °C przez 16 godzin. Następnie mieszaninę odparowano i rozdzielono na kolumnie w układzie F. Wyizolowano produkt z wydajnością 52% (689,8 mg, 2,45 mmol). TLC: R_f = 0,27 (F); ¹H NMR: δ 8.04 (s, 1H, H2), 7.10 (s, 2H, NH₂), 6.50 (d, J = 6.8 Hz, 1H, H1'), 5.90 (d, J = 5.2 Hz 1H, 3'OH), 4.87 (m, 2H, 5'OH, H2'), 4.38 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H3'), 3.97 (dd, J = 5.6, 10.0 Hz, 1H, H4'), 3.44 (m, 1H, H5'a);* ¹³C NMR: δ 159.6 (C6), 154.0 (C4), 152.9 (C8), 151.6 (C2), 124.1 (C5), 87.9 (C4'), 86.2 (C1'), 77.3 (C3'), 62.3 (C2'), 61.1 (C5').

* Sygnał H5'b nałożył się z sygnałem od H₂O.

8-Bromoadenozyna (169)

Adenozynę (2,6671 g, 10 mmol) rozpuszczono w 150 mL buforu octanowego o pH = 4. Następnie do roztworu wkraplano 90 mL uprzednio przygotowanej wody bromowej (4,7840 g, 29,94 mmol, 1,533 mL). Po wkropleniu całości reakcję prowadzono przez 18 godzin. Roztwór odbarwiono przez dodanie Na₂SO₃ i zobojętniono przez dodanie 12% roztworu KOH_{aq}. Mieszaninę pozostawiono w lodówce na noc. Biało-żółtawy osad odsączono i przemyto wodą oraz acetonem. Uzyskano 2,7809 g (8,03 mmol) produktu z wydajnością 80%. TLC: R_f = 0,66 (F); ¹H NMR: δ 8.12 (s, 1H, H2), 7.56 (bs, 2H, NH₂), 5.83 (d, J = 6.4 Hz, 1H, H1'), 5.50 (dd, J = 4.0, 7.2 Hz, 1H, 5'OH), 5.46 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 2'OH), 5.23 (d, J = 4.4 Hz, 1H, 3'OH), 5.10 (dd, J = 6.4, 8.0 Hz, 1H, H2'), 4.19 (m, 1H, H3'), 3.98 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H4'), 3.66 (m, 1H, H5'a), 3.53 (m, 1H, H5'b); ¹³C NMR: δ 155.1 (C6), 152.4 (C2), 149.8 (C4), 127.2 (C8), 119.6 (C5), 90.4 (C1'), 86.7 (C4'), 71.0 (C2'), 70.8 (C3'), 62.1 (C5').

1-(5'-Azydo-β-D-5'-deoksy-ksylofuranosylo)uracyl (216) i 2'-Azydo-2'-deoksyurydyna (251)

Nukleozyd **106** (50,0 mg, 0,22 mmol) rozpuszczono w 4 mL DMF, zateżono do ok. 3,5 mL, dodano LiN₃ (21,5 mg, 0,44 mmol, 2 ekw.) i mieszano w 135 °C przez 18 godzin. Reakcję zatrzymano przez odparowanie i bez ekstrakcji naniesiono na kolumnę żelową. Związki wymywano w układzie C. Pierwszy produkt **216** o R_f = 0,75 (F) wyizolowano z wydajnością 27% (16,5 mg, 0,06 mmol). Produkt **251** o R_f = 0,69 (F) wyizolowano

z wydajnością 18% (10,4 mg, 0,04 mmol). ^1H NMR i ^{13}C NMR **251** zgodne z podanymi (s. 147).

^1H NMR (**216**): δ 11.30 (s, 1H, NH), 7.75 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 6.16 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, 2'OH), 5.70 (m, 2H, H1', 3'OH), 5.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 4.23 (m, 1H, H4'), 3.99 (d, $J = 4.0$, 1H, H2'), 3.94 (s, 1H, H3'), 3.64 (m, 2H, H5'a,b); ^{13}C NMR (**216**): δ 163.1 (C4), 150.5 (C2), 141.2 (C6), 101.1 (C5), 91.0 (C1'), 81.2 (C4'), 80.2 (C2'), 74.6 (C3'), 49.4 (C5'); ^{15}N NMR (HMBC): δ 248.9 (5'N₃), 158.3 (N3), 144.7 (N1), 67.6 (5'N₃).

3'-O-Mesyloctydyna (236)

3'-O-Mesylo-4-N,2',5'-O-tripiwaloilocytydynę (**86**) (4,5 g, 7,84 mmol) rozpuszczono w 50 mL metanolu nasyconego amoniakiem. Reakcję mieszano przez noc na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Do mieszaniny dodano 2 g żelu krzemionkowego (0,063-0,200mm). Mieszaninę zaadsorbowano na żelu poprzez odparowanie do sucha. Sypki żel z zaadsorbowaną mieszaniną reakcyjną naniesiono na kolumnę żelową i wymyto produkt w układzie N. Produkt zebrano, odparowano rozpuszczalnik i wysuszone w próżni. Po wysuszeniu uzyskano 2,4567 g produktu (7,65 mmol) z wydajnością 98%. TLC: $R_f = 0,36$ (O); ^1H NMR: δ 7.77 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H6), 7.28 (bs, 1H, NH₂), 7.19 (bs, 1H, NH₂), 5.93 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, 2'OH), 5.85 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, H1'), 5.76 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H5), 5.28 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, 5'OH), 4.95 (dd, $J = 2.8, 5.2$ Hz, 1H, H3'), 4.32 (dd, $J = 6.4, 12.0$ Hz, 1H, H2'), 4.12 (dd, $J = 3.2, 6.4$ Hz, 1H, H4'), 3.61 (m, 2H, H5'a, H5'b), 3.27 (s, 3H, Ms).

3'-Tert-butoksy-4-N,2',5'-O-tripiwaloilocytydyna (237a)

3'-O-Mesylo-4-N,2',5'-O-tripiwaloilocytydynę (**86**) (100,0 mg, 0,17 mmol) rozpuszczono w 4 mL DMF i zatężono do około 3,5 mL. Następnie dodano suszony *tert*-butanolan sodu (74,0 mg, 0,77 mmol, 4,5 ekw.) i mieszano w 100 °C przez 3 godziny. Po tym czasie pozostały śladowe ilości substratu. Na TLC (M) zaobserwowano główny produkt o R_f wyższym od substratu. Mieszaninę zobojętniono kwasem octowym, odparowano do sucha, zawieszono w DCM i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie K. Uzyskano 11,3 mg (0,02 mmol) produktu z wydajnością 12%. TLC: $R_f = 0,69$ (M); ^1H NMR: δ 10.51 (s, 1H, NH), 8.07 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H6), 7.31 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H5), 5.93 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H1'), 5.55 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, H2'), 5.45 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, H3'), 4.50 (m, 1H, H4'), 4.38 (m, 2H, H5'a, H5'b), 1.21, 1.19, 1.18 (3s, 27H, 9xCH₃^{Piv}), 1.11 (s, 9H, *t*Bu); ^{13}C NMR: δ 179.1, 177.4, 176.5 (3xC=O), 163.4 (C4), 154.2 (C2), 145.5 (C6), 96.5 (C5), 89.4 (C1'), 79.5 (C4'),

76.5 (C3'), 72.5 (C2'), 62.4 (C5'), 44.6 (C^{III}tBu), (3xC^{III}Piv)*, 26.8, 26.5, 26.2 (3xCH₃^{Piv}), 25.0 (C^tBu).

* Sygnały ukryte pod sygnałem DMSO.

3'-O-Mesylo-2',5'-di-O-piwaloilocytydyna (238)

3'-O-Mesylo-4-N,2',5'-O-tripiwaloilocytydynę (**86**) (50,0 mg, 0,09 mmol) rozpuszczono w EtOAc (4 mL). Następnie dodano kroplami kwas solny (C_p = 38%, 13,2 mg, 0,36 mmol, 29 μL, 4 ekw.) i mieszano w 70 °C przez 2 dni. Po tym czasie zaobserwowano brak dalszych zmian. Reakcję zatrzymano poprzez dodanie metanolowego roztworu NaHCO₃ (4 ml). Odparowano rozpuszczalniki, mieszaninę zawieszono w DCM i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie C. Wyizolowano 20,4 mg produktu (0,042 mmol) z wydajnością 47%. TLC: 0,06 (C); ¹H NMR: δ 7.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H6), 7.34 (bs, 2H, NH₂), 5.79 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H1'), 5.75 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H5), 5.52 (dd, *J* = 4.0, 5.6 Hz, 1H, H2'), 5.38 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H3'), 4.36 (m, 2H, H4', H5'a), 4.24 (dd, *J* = 5.6, 12.8 Hz 1H, H5'b), 1.17 (s, 18H, 6xCH₃^{Piv}); ¹³C NMR: δ 177.2, 176.3 (2xC=O), 165.9 (C4), 154.6 (C2), 142.3 (C6), 94.5 (C5), 89.7 (C1'), 78.6 (C4'), 75.1 (C3'), 72.2 (C2'), 62.4 (C5'), 38.34, 38.25 (2xC^{III}Piv), 37.53 (Ms) 26.8, 26.7 (2xCH₃^{Piv}).

2',5'-Di-O-piwaloilourydyna i 3',5'-di-O-piwaloilourydyna (239a i 240a)

Suszoną urydynę (**80**) (4,4913 g, 18,39 mmol) dodano do suchej pirydyny (80 mL). Roztwór zatężono do ok. 70 mL i schłodzono do 0 °C. Następnie dodano w dziewięciu porcjach chlorek piwaloilu (4,52 mL, 36,78 mmol, 2 ekw.) tak, by temperatura roztworu nie przekroczyła 5 °C. Mieszaninę pozostawiono na noc w lodówce. Reakcję zatrzymano poprzez odparowanie rozpuszczalnika aż do postaci gęstego syropu. W celu pozbycia się resztek pirydyny trzykrotnie odparowano mieszaninę z toluenem. Otrzymany gęsty syrop rozpuszczono w 80 mL chlorku metylenu i ekstrahowano trzykrotnie zimnym, nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ po około 80 ml. Fazę organiczną suszono nad Na₂SO₄, odparowano i suszono w próżni. Produkt (6,9778 g) analizowano metodami 2D NMR, co wykazało obecność dwóch izomerów dipiwaloilowanych w stosunku 4:1 oraz śladowe zanieczyszczenia nukleozydowe i odroczyszczalniki. Reakcję monitorowano metodą TLC w układzie D.

2',5'-Di-O-benzoilourydyna i 2',5'-di-O-benzoilourydyna (239b i 240b)

Urydynę (**80**) (1,0 g, 4,09 mmol) rozpuszczono w 30 mL pirydyny. Roztwór zatężono do ok. 25 mL i schłodzono do 0 °C. Następnie dodano w 5 porcjach chlorek benzoilu (0,950 mL, 8,18 mmol, 2 ekw.) tak, by temperatura nie przekroczyła 5 °C. Po czym pozostawiono mieszaninę w lodówce na noc. Reakcję zatrzymano poprzez odparowanie rozpuszczalnika aż do postaci gęstego syropu. W celu pozbycia się resztek pirydyny trzykrotnie odparowano mieszaninę z toluenem. Otrzymany gęsty syrop rozpuszczono w 40 mL chlorku metylenu i ekstrahowano trzykrotnie zimnym, nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ po około 40 ml. Fazę organiczną suszono nad Na₂SO₄, odparowano i suszono w próżni. Produkt (1,5728 g) analizowano spektroskopią NMR (¹H NMR and COSY), co wykazało obecność dwóch izomerów dibenzoilowanych w stosunku 2:1 oraz śladowe zanieczyszczenia nukleozydowe i odrozpuszczalnikowe. Reakcję monitorowano na TLC w układzie D.

3',5'-Di-O-piwaloilo-2,2'-anhydrourydyna (241a)

Otrzymaną mieszaninę dwóch izomerów dipiwalolilowanych (**239a i 240a**) oraz Ph₃P (5,3314 g, 20,30 mmol) rozpuszczono w 100 mL suchego DMF i następnie zatężono do ok. 90 mL. Następnie dodano DEAD (3,5363 g, 3,2 mL, 20,30 mmol) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 21 godzin. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik zatężono do ok. 20 mL i dodano 80 mL eteru dietylowego. Biały osad odsączono i suszono w próżni. Uzyskano 4,0474 g produktu (10,33 mmol, 56% z urydyny). RP-HPLC wykazało czystość 99%; T_{top} = 223-224 °C; TLC: R_f = 0,42 (D); ¹H NMR: δ 7.89 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H6), 6.40 (d, J = 5.2 Hz, 1H, H1'), 5.91 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H5), 5.49 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H2'), 5.32 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H3'), 4.46 (m, 1H, H4'), 4.05 (dd, J = 4.8, 12.4 Hz, 1H, H5'a), 3.94 (dd, J = 6.8, 12.4, Hz, 1H, H5'b), 1.19 (s, 9H, (3xCH₃^{Piv}), 1.08 (s, 9H, (3xCH₃^{Piv}); ¹³C NMR: δ 177.3, 177.0 (2xC=O), 171.2 (C4), 159.8 (C2), 137.1 (C6), 109.4 (C5), 90.1 (C1'), 86.5 (C2'), 82.5 (C4'), 76.4 (C3'), 62.4 (C5'), 38.6 (2xC^{III}Piv), 27.1 (CH₃^{Piv}), 27.0 (CH₃^{Piv}); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₁₉H₂₆N₂O₇+H]⁺ 395,1813, znal. 395,1801, bł. 3,0 ppm.

3',5'-Di-O-piwaloilo-2,2'-anhydrourydyna (241a) z 95

Suchą 2,2'-anhydrourydynę (**95**) (2,1500 g, 9,51 mmol) zawieszono w suchej pirydynie (35 mL). Ogrzewano na czaszy grzejnej do temp. ok. 60 °C aby zwiększyć stopień rozpuszczenia. Następnie schłodzono do temperatury pokojowej i zatężono do ok. 32 mL. Po zatężeniu mieszaninę schłodzono w łaźni lodowej do 0 °C i dodawano porcjami chlorek

piwaloilu (3,4401 g, 28,53 mmol, 3,5104 mL). Pozwolono mieszaninie ogrzać się do temperatury pokojowej i mieszano przez noc. Po zakończeniu reakcji roztwór jest klarowny. Rozpuszczalnik odparowano, a resztki pirydyny usunięto poprzez kilkukrotne odparowanie z toluenem. Uzyskany stały produkt rozpuszczono w 40 mL chlorku metylenu i ekstrahowano trzykrotnie wodnym, nasyconym roztworem NaHCO₃. Fazę organiczną suszono nad Na₂SO₄, zatężono i otrzymany związek wytrącono poprzez dodanie eteru dietylowego. Uzyskany w ten sposób surowy produkt był zanieczyszczony związkiem o mniejszym R_f – prawdopodobnie produktem monoacylacji. Dlatego oczyszczono go na kolumnie żelowej w układzie G uzyskując 3,2698 g produktu (8,29 mmol, 87%). Czystość produktu wyniosła 96% na RP-HPLC, T_{top} = 223-224 °C, NMR zgodne z **241a**.

3',5'-Di-O-benzoilo-2,2'-anhydrourydyna (241b)

Otrzymaną mieszaninę dwóch izomerów dibenzoilowanych (**239b i 240b**) oraz Ph₃P (1,5049 g, 5,73 mmol) rozpuszczono w suchym DMF (25 mL) i zatężono do ok. 20 mL. Następnie dodano DEAD (998,2 mg, 0,903 mL, 5,73 mmol) i mieszano w temperaturze pokojowej przez noc. Po zakończeniu reakcji mieszaninę zatężono do ok 5 mL i wytrącono produkt przez dodanie eteru dietylowego (30 mL). Biały osad odsączono, przemyto eterem i suszono w próżni uzyskując 1,2137 g produktu (2,78 mmol, 68% z urydyny). Czystość produktu określona na RP-HPLC wyniosła 97%; T_{top} = 263-264 °C; TLC: R_f = 0,42 (D); ¹H NMR: δ 8.05 (d, J = 7.2 Hz, 2H, Ph), 7.92 (d, J = 7.2 Hz, 1H, H6), 7.90 (d, J = 7.2 Hz, 2H, Ph), 7.72 (t, J = 7.2 Hz, 1H, Ph), 7.66 (t, J = 7.2 Hz, 1H, Ph), 7.58 (t, J = 7.6 Hz, 2H, Ph), 7.50 (t, J = 7.6 Hz, 2H, Ph), 6.49 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H1'), 5.89 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H5), 5.77 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H2'), 5.71 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H3'), 4.88 (m, 1H, H4'), 4.36 (m, 2H, H5'a,b); ¹³C NMR: δ 170.7 (C4), 165.2 (C=O), 164.9 (C=O), 159.4 (C2), 136.7 (C6), 134.0 (Ph), 133.6 (Ph), 129.6 (Ph), 129.2 (Ph), 129.0 (Ph), 128.8 (Ph), 128.7 (Ph), 128.6 (Ph), 109.0 (C5), 89.9 (C1'), 86.1 (C2'), 82.2 (C4'), 77.2 (C3'), 63.1 (C5'). Mas (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₂₃H₁₈N₂O₇+H]⁺ 435,1187, znal. 435,1184, bł. -0,6 ppm.

5'-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)urydyna (242)

Suszoną urydynę (**80**) (500,0 mg, 2,05 mmol) rozpuszczono w 15 mL pirydyny, zatężono do ok. 12 mL, dodano chlorek 4,4'-dimetoksytrytylu (1,0436 g, 3,08 mmol) i mieszano w temperaturze pokojowej przez noc. Następnego dnia mieszaninę odparowano, usunięto resztki pirydyny poprzez trzykrotne odparowanie z toluenem i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie G. Chlorek metylenu uprzednio przesączono przez Al₂O₃.

Wyizolowano produktu z wydajnością 82% (924,5 mg, 1,69 mmol). TLC: R_f 0,44 (D); $^1\text{H NMR}$: δ 11.35 (s, 1H, NH), 7.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 7.38 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, DMTr), 7.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, DMTr), 7.25 (dd, $J = 2.0, 8.8$ Hz, 5H, DMTr), 6.90 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H, DMTr), 5.49 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H1'), 5.98 (dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, 1H, H5), 5.15 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, 3'OH), 4.08 (m, 2H, H2', H3'), 3.95 (m, 1H, H4'), 3.74 (s, 6H, DMTr), 3.24 (m, 2H, H5'a, H5'b).

2'-Azydo-3',5'-di-O-piwaloilo-2'-deoksyurydyna (250)

Suszony nukleozyd (**241a**) (200,0 mg, 0,51 mmol) i LiN_3 (49,9 mg, 1,02 mmol) dodano do suchego DMF (6 mL) i zatężono do ok. 5 mL. Roztwór mieszano w $T = 135$ °C przez noc. Następnie rozpuszczalnik odparowano do postaci gęstego oleju. Mieszaninę rozdzielono na kolumnie żelowej w układzie E. Zebrano frakcje z produktem, odparowano i krystalizowano w układzie MeOH/ H_2O uzyskując 160,5 mg (0,37 mmol, 72%) białego drobnokrystalicznego osadu. Czystość sprawdzona za pomocą RP-HPLC wyniosła 95%; $T_{\text{top}} = 115\text{-}116$ °C, TLC: $R_f = 0,74$ (D); $^1\text{H NMR}$: δ 11.50 (s, 1H, NH), 7.43 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H6), 5.79 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H1'), 5.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 5.32 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, H3'), 4.78 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, H2'), 4.23 (m, 3H, H4', H5'a, H5'b), 1.22 (s, 9H, 3'(CH₃^{Piv})₃), 1.15 (s, 9H, 5'(CH₃^{Piv})₃); $^{13}\text{C NMR}$: δ 177.11 (5'C=O), 176.61 (3'C=O), 162.90 (C4), 150.25 (C2), 140.81 (C6), 102.44 (C5), 87.60 (C1'), 79.14 (C4'), 71.22 (C3'), 62.71 (C5'), 62.23 (C2'), 38.37 (3'C^{III}Piv), 38.24 (5'C^{III}Piv), 26.76 (5'CH₃^{Piv}), 26.62 (3'CH₃^{Piv}); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla $[\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_7]^-$ 436,1838, znal. 436,1859, bł. -4,8 ppm.

2'-Azydo-2'-deoksyurydyna (251)

Suszoną 2,2'-anhydrourydynę (**95**) (200,0 mg, 0,88 mmol) i LiN_3 (86,2 mg, 1,76 mmol) dodano do suchego DMF (6mL) i zatężono do ok. 5 mL. Mieszaninę mieszano w $T = 135$ °C przez noc. Następnie odparowano rozpuszczalnik i uzyskany olej rozdzielono na kolumnie żelowej w układzie C. Frakcje z produktem zebrano i odparowano. Następnie zawieszono w DCM przy pomocy ultrasonifikatora, odsączono i suszono w próżni. Uzyskano amorficzny, żółtawy sypki osad o dużej higroskopijności. Próby krystalizacji i pomiaru T_{top} nie powiodły się. Masa produktu wyniosła 161,0 mg (0,60 mmol, 68%). Czystość produktu określona na RP-HPLC wyniosła 95%; TLC: $R_f = 0,40$ (D); $^1\text{H NMR}$: δ 11.41 (s, 1H, NH), 7.86 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H6), 5.96 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H1'), 5.88 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, 3'OH), 5.67 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 5.17 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, 5'OH), 4.30 (dd, $J = 5.2, 10.4$ Hz, 1H, H2'), 4.05 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, H3'), 3.89 (dd, $J = 3.2, 7.6$ Hz, 1H, H4'), 3.66 (m, 1H, H5'a),

3.57 (m, 1H, H5'b); ^{13}C NMR: δ 163.0 (C4), 150.4 (C2), 140.0 (C6), 102.0 (C5), 85.6 (C1'), 85.2 (C4'), 70.4 (C2'), 64.6 (C2'), 60.2 (C5); ^{15}N NMR (HMBC): δ 245.1 ($5'\text{N}_3$), 157.8 (N3), 142.6 (N1), 69.1 ($5'\text{N}_3$); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla $[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_5+\text{Na}]^+$ 292,0652, znal. 292,0662, bł. -3,3 ppm.

3',5'-Di-O-piwaloilo-2'-S-toliltio-2'-deoksyurydyna (252)

Suszony **241a** (200,0 mg, 0,51 mmol) i *p*-tiokrezol (126,7 mg, 1,02 mmol) rozpuszczono w suchym DMF (6 mL) i zatężono do ok. 5 mL. Dodano katalityczną ilość ftalimidku potasu (9,2 mg, 0,05 mmol). Mieszaninę mieszano w $T = 120\text{ }^\circ\text{C}$ przez 4 godz. Reakcja zaszła ilościowo (TLC). Następnie odparowano rozpuszczalnik i uzyskany olej rozdzielono na kolumnie żelowej w układzie I. Frakcje z produktem zebrano, odparowano i produkt krystalizowano w MeOH/H₂O. Uzyskano 256,7 mg (0,495 mmol) drobnokrystalicznego białego produktu z wydajnością 97%. Czystość określona za pomocą RP-HPLC wyniosła 96%; $T_{\text{top}} = 134,5\text{-}135\text{ }^\circ\text{C}$; TLC: $R_f = 0,69$ (H); ^1H NMR: δ 11.29 (s, 1H, NH), 7.39 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 7.26 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph^{or*}), 7.08 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph^{m*}), 6.11 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H1'), 5.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 5.40 (d, $J = 6.0$ Hz, H1, H3'), 4.22 (m, 4H, H5'a, H5'b, H2', H4'), 2.23 (s, 3H, CH₃), 1.22 (s, 9H, 3'(CH₃^{Piv})₃), 1.13 (s, 9H, 5'(CH₃^{Piv})₃); ^{13}C NMR: δ 177.1 ($5'\text{C}=\text{O}$), 176.2 ($3'\text{C}=\text{O}$), 162.6 (C4), 150.3 (C2), 139.5 (C6), 137.8 (Ph^{p*}), 132.5 (Ph^{or*}), 129.8 (Ph^{m*}), 128.1 (Ph^{C-S*}), 102.6 (C5), 88.3 (C1'), 80.5 (C4'), 73.5 (C3'), 63.2 (C5'), 51.4 (C2'), 38.5 ($3'\text{C}^{\text{IIIPIV}}$), 38.2 ($5'\text{C}^{\text{IIIPIV}}$), 26.7 (2xCH₃^{Piv}), 20.6 (CH₃); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla $[\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}+\text{H}]^+$ 519,2159, znal. 519,2149, bł. 1,9 ppm.

* Skróty: "m" – meta, "or"- orto, "p"- para, "C-S"- atom węgla związany z atomem siarki w grupie tiotolilowej.

2'-S-Toliltio-2'-deoksyurydyna (253)

Suchą 2,2'-anhydrourydynę (**95**) (200,0 mg, 0,88 mmol) i *p*-tiokrezol (218,6 mg, 1,76 mmol) rozpuszczono w suchym DMF (6 mL) i zatężono do ok. 5 mL. Dodano katalityczną ilość ftalimidku potasu (16,7 mg, 0,09 mmol). Mieszaninę mieszano w $T = 120\text{ }^\circ\text{C}$ przez 4 godziny. Reakcja zaszła ilościowo (TLC). Następnie odparowano rozpuszczalnik i uzyskany olej rozdzielono na kolumnie żelowej w układzie C. Frakcje z produktem zebrano, odparowano i pozostałość krystalizowano w MeOH/H₂O. Uzyskano 252,3 mg (0,72 mmol) drobnokrystalicznego białego produktu z wydajnością 82%. Czystość określona za pomocą

RP-HPLC wyniosła 99%; $T_{\text{top}} = 209\text{-}210\text{ }^{\circ}\text{C}$; TLC: $R_f = 0,55$ (D); $^1\text{H NMR}$: δ 11.12 (s, 1H, NH), 7.55 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H6), 7.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph^{or*}), 7.04 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph^{m*}), 6.16 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H1'), 5.86 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, 3'OH), 5.44 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 5.10 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, 5'OH), 4.31 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, H3'), 3.91 (t, $J = 3.2$ Hz, 1H, H4'), 3.73 (dd, $J = 5.2, 9.2$ Hz, 1H, H2'), 3.56 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H, H5'a,b), 2.21 (s, 3H, CH₃); $^{13}\text{C NMR}$: δ 162.6 (C4), 150.5 (C2), 139.8 (C6), 137.0 (Ph^{p*}) 132.1 (Ph^{or*}), 129.6 (Ph^{m*}), 129.5 (Ph^{C-S*}), 102.3 (C5), 87.8 (C1'), 86.7 (C4'), 72.4 (C3'), 61.5 (C5'), 55.0 (C2'), 20.5 (CH₃); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₁₆H₁₈N₂O₅S+Na]⁺ 373,0829, znal. 373,0840, bł. -2,9 ppm.

* Skróty: "m" – meta, "or"- orto, "p"- para, "C-S"- atom węgla związany z atomem siarki w grupie tiotolilowej.

1-(3',5'-Di-O-piwaloilo-β-D-arabinofuranozylo)uracyl (254)

Suszony nukleozyd **241a** (75,0 mg, 0,19 mmol) rozpuszczono w DMF (3 mL) i dodano 2 mL 2N HCl_{aq}. Roztwór mieszano w $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i po 2.5 godzinach zneutralizowano dodając 3 mL nasyconego roztworu NaHCO_{3aq}. Następnie mieszaninę ekstrahowano z DCM. Fazę organiczną oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie G i produkt krystalizowano z toluenu uzyskując 57,2 mg (0,14 mmol) w postaci drobnokrystalicznej z wydajnością 74%. Czystość określona za pomocą RP-HPLC wyniosła 94%; $T_{\text{top}} = 139\text{-}140\text{ }^{\circ}\text{C}$; TLC: $R_f = 0,71$ (D); $^1\text{HNMR}$: δ 11.37 (s, 1H, NH), 7.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 6.11 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, 2'OH), 6.00 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, H1'), 5.59 (d, $J = 8.0$ Hz, H1, H5), 4.96 (s, 1H, H3'), 4.37 (m, 1H, H5'a), 4.22 (m, 1H, H5'b), 4.15 (s, 1H, H2'), 4.11 (m, 1H, H4'), 1.18 (s, 9H, (CH₃^{Piv})₃), 1.16 (s, 9H, (CH₃^{Piv})₃); $^{13}\text{C NMR}$: δ 177.2 (C=O), 176.5 (C=O), 163.1 (C4), 150.3 (C2), 141.7 (C6), 100.2 (C5), 85.6 (C1'), 79.5 (C4'), 78.0 (C3'), 72.4 (C2'), 62.9 (C5'), 38.3 (C^{III}Piv), 38.1 (C^{III}Piv), 26.8 (CH₃^{Piv}), 26.6 (CH₃^{Piv}); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₁₉H₂₈N₂O₈+Na]⁺ 435,1738, znal. 435,1725, bł. 3,1 ppm.

1-(3',5'-Di-O-piwaloilo-β-D-arabinofuranozylo)uracyl (254) w reakcji z BuLi

Suszony nukleozyd (**241a**) (50,0 mg, 0,13 mmol) rozpuszczono w 3,5 mL THF. Płukano argonem przez 5 min. Schłodzono mieszaninę izopropanol/suchy lód, strzykawką dodano 2,5M roztwór BuLi w heksanie (10,4 mg, 0,16 mmol, 64 μL, 1,2 ekw.). Reakcję prowadzono w obniżonej temperaturze przez 2 godziny, następnie pozwolono jej ogrzać się do temperatury pokojowej i pozostawiano na noc. Analiza TLC wskazała powstawanie jednego produktu o wyższym R_f . Reakcję zatrzymano wodnym roztworem chlorku amonu

(20,0 mg, 0,37 mmol, 2 mL). Fazę organiczną suszono nad MgSO₄. Odparowano THF, rozpuszczono w DCM i naniesiono na kolumnę żelową. Rozdział wykonano w układzie I. Wyizolowano produkt z wydajnością 24% (12,7 mg, 0,031 mmol). TLC: 0,69 (D); ¹H NMR i ¹³C NMR zgodne z **254**.

2',5'-Di-O-piwaloil-2,3'-anhydrourydyna (255) i 3',5'-Di-O-piwaloil-2,2'-anhydrourydyna (241a)

Suszoną mieszaninę izomerów **256** i **257** o stosunku 100:7 (NMR) (100 mg, 0,20 mmol) rozpuszczono w 4 mL DMF i zatężono do ok. 3,5 mL. Następnie dodano ftalimidek potasu (PPI) (40,7 mg, 0,22 mmol) i mieszano w 135 °C przez 2 godziny. Mieszaninę reakcyjną odparowano i rozdzielono na kolumnie żelowej w układzie I→G dwukrotnie. Otrzymano 47,1 mg (0,12 mmol, 60%) mieszaniny produktów **255** i **241a** w stosunku 100:2 (NMR) oraz dodatkowe 16,7 mg (0,04 mmol) mieszaniny **255** i **241a** z całkowitą wydajnością 80%. TLC: R_f (**255**) = 0,31 (C), R_f (**241a**) = 0,29 (C); ¹H NMR (**255**): δ 7.68 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₆), 6.03 (s, 1H, H_{1'}), 5.86 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H₅), 5.77 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H_{2'}), 5.35 (s, 1H, H_{3'}), 4.58 (m, 1H, H_{4'}), 4.31 (dd, *J* = 4.8, 12.0 Hz, 1H, H_{5'a}), 4.14 (dd, *J* = 6.8, 12.0 Hz, 1H, H_{5'b}), 1.19 (s, 9H, (CH₃^{Piv})₃), 1.12 (s, 9H, (CH₃^{Piv})₃); ¹³C NMR (**255**): δ 177.1, 176.0 (2 x C=O), 170.0 (C₄), 152.8 (C₂), 140.7 (C₆), 108.5 (C₅), 87.2 (C_{1'}), 81.1 (C_{4'}), 77.0 (C_{3'}), 71.0 (C_{2'}), 61.8 (C_{5'}), 38.3, 38.2 (2xC^{III}Piv), 26.7 (CH₃^{Piv}), 26.5 (CH₃^{Piv}).

3'-O-Mesylo-2',5'-di-O-piwaloilourydyna (256) i 2'-O-mesylo-3',5'-di-O-piwaloilourydyna (257)

Suszoną urydynę (**80**) (0,5 g, 2,05 mmol) dodano do suchej pirydyny (20 mL). Roztwór zatężono do ok. 18 mL i schłodzono do 0 °C. Następnie dodano w dwóch porcjach chlorek piwaloilu (494,4 mg, 4,01 mmol, 504,5 μL) tak, by temperatura roztworu nie przekroczyła 5 °C. Mieszaninę pozostawiono na noc w lodówce. Następnie dodano chlorek mesyłu (422,5 mg, 3,69 mmol, 285,9 μL) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 8 godzin. Reakcję zatrzymano poprzez odparowanie rozpuszczalnika aż do postaci gęstego syropu. W celu pozbycia się resztek pirydyny odparowano mieszaninę trzykrotnie z toluenem. Otrzymany gęsty syrop rozpuszczono w 40 mL chlorku metylenu i ekstrahowano trzykrotnie nasyconym wodnym roztworem NaHCO₃ po około 30 ml. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i rozdzielono na kolumnie żelowej w układzie Q. Otrzymano 852,6 mg mieszaniny **256** i **257** w stosunku 100:7 z wydajnością całkowitą 93%. Reakcję monitorowano metodą TLC w układzie H. TLC: R_f (**256/257**) = 0,66 (H); ¹H NMR (**256**): δ 11.49 (s, 1H, NH), 7.66

(d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 5.87 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, H1'), 5.70 (dd, $J = 2.0, 7.6$ Hz, 1H, H5), 5.54 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, H2'), 5.33 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, H3'), 4.44 (dd, $J = 4.4, 8.0$ Hz, 1H, H4'), 4.36 (dd, $J = 3.2, 12.4$ Hz, 1H, H5'a), 4.26 (dd, $J = 4.4, 12.4$ Hz, 1H, H5'b), 3.28 (s, 3H, Ms), 1.17 (2s, 18H, $2 \times (\text{CH}_3^{\text{Piv}})_3$); ^{13}C NMR: δ 177.1, 176.3 ($2 \times \text{C}=\text{O}$), 163.0 (C4), 150.1 (C2), 141.1 (C6), 102.3 (C5), 87.9 (C1'), 79.0 (C4'), 75.1 (C3'), 71.6 (C2'), 62.3 (C5'), 38.3 ($2 \times \text{C}^{\text{III Piv}}$), 37.7 (Ms), 26.8 (CH_3^{Piv}), 26.6 (CH_3^{Piv}).

1-(4-N,2',5'-O,O-tripiwaloil-o- β -D-arabino)cytozyna (258)

4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydynę (**87**) (150,0 mg, 0,30 mmol) rozpuszczono w DMF (5 mL), zatężono do ok. 4 mL i dodano Ph_3P (118,0 mg, 0,45 mmol) oraz DEAD (78,4 mg, 0,45 mmol, 71,3 μL). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 32 godziny. Mieszaninę odparowano i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie Q. Zebrano frakcje zawierające główny produkt. Produkt wysuszono i zważono. Uzyskano 100,8 mg (0,20 mmol) z wydajnością 67%. TLC: 0,14 (R); ^1H NMR: δ 10.38 (s, 1H, NH), 7.93 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H6), 7.27 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H5), 6.07 (m, 2H, 2'OH, H1'), 4.98 (s, 1H, H3'), 4.46 (dd, $J = 6.8, 11.2$ Hz, 1H, H5'a), 4.22 (m, 3H, H5'b, H4', H2'), 1.21, 1.19, 1.17 (3s, 27H, $9 \times \text{CH}_3$); ^{13}C NMR: δ 178.8, 177.3, 176.5 ($3 \times \text{C}=\text{O}$), 163.1 (C4), 154.2 (C2), 145.9 (C6), 94.9 (C5), 87.4 (C1'), 80.4 (C4'), 78.3 (C3'), 71.7 (C2'), 63.0 (C5'), 40.0, 38.3, 38.1 ($3 \times \text{C}^{\text{III Piv}}$), 26.8, 26.6, 26.3 ($3 \times \text{C}^{\text{Piv}}$).

5'-O-Trytylo-2,2'-anhydrourydyna (259)

Suszoną 5'-O-trytylourydynę (**263**) (5,0 g, 10,28 mmol) rozpuszczono w 60 mL DMF. Zatężono do ok. 55 mL, dodano suszony NaHCO_3 (86,5 mg, 1,03 mmol, 0,1 eq.) oraz suszony węgiel difenyłu (3,3033 g, 15,42 mmol, 1,5 eq.). Reakcję prowadzono w $T = 100$ °C przez 16 godz. Reakcje monitorowano metodą TLC w układzie D. Schłodzono do temperatury pokojowej, zatężono do połowy, dodano 50 mL MeOH, drugą porcją NaHCO_3 oraz kroplę wody. Mieszano przez min. 5 godz. w naczyniu zamkniętym nasadką fajkową aż do wytrącenia się dużych ilości osadu. Następnie odparowano rozpuszczalniki i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie C i potem D. Mieszaninę naniesiono na kolumnę w formie zawiesiny w DCM, którą po ubiciu przykryto cienką warstwą żelu. Frakcje z produktem zebrano, odparowano rozpuszczalniki, wysuszono w próżni i zważono. Uzyskano produkt w postaci białego ciała stałego z wydajnością 97% (4,6861 g, 9,96 mmol); TLC: $R_f = 0,37$ (D); ^1H NMR: δ 7.94 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H6), 7.29 (m, 15H, Tr), 6.33 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, H1'), 5.97 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, 3'OH), 5.87 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H5), 5.22 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H,

H2'), 4.32 (s, 1H, H3'), 4.24 (m, 1H, H4'), 2.98 (m, 1H, H5'a), 2.82 (m, 1H, H5'b); ¹³C NMR: δ 170.8 (C4), 159.2 (C2), 143.3 (Tr), 136.6 (C6), 128.0 (Tr), 127.9 (Tr), 127.1 (Tr), 108.9 (C5), 89.7 (C1'), 88.4 (C2'), 86.6 (Tr), 85.9 (C4'), 74.7 (C3'), 63.0 (C5').

4-n-Butylo-1-(3',5'-di-O-piwaloilo-β-D-arabinofuranozylo)-2-pirymidynon (260)

Suszony nukleozyd (**241a**) (50,0 mg, 0,13 mmol) rozpuszczono w 3,5 mL THF. Płukano argonem przez 5 min. Schłodzono mieszaniną izopropanol/suchy lód, strzykawką dodano 2,5M roztwór BuLi w heksanie (10,4 mg, 0,16 mmol, 64 μL, 1,2 ekw.). Reakcję prowadzono w obniżonej temperaturze przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano wodnym roztworem chlorku amonu (20,0 mg, 0,37 mmol, 2 mL). Fazę organiczną suszono nad MgSO₄. Odparowano THF, rozpuszczono w DCM i naniesiono na kolumnę żelową. Rozdział wykonano w układzie I. Wyizolowano produkt z wydajnością 38% (21,4 mg, 0,049 mmol). TLC: 0,34 (C); ¹H NMR: δ 7.87 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H6), 6.43 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H5), 6,08 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, 2'OH), 6.01 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H, H1'), 4.97 (s, 1H, H3'), 4.43 (m, 1H, H5'a), 4.22 (m, 3H, H2', H4', H5'b), 2.54 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH₂^α), 1.60 (m, 2H, CH₂^β), 1.34 (m, 2H, CH₂^γ), 1.19 (s, 9H, (CH₃^{Piv})₃), 1.17 (s, 9H, (CH₃^{Piv})₃), 0.90 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, CH₃^δ); ¹³C NMR: δ 179.2 (C4), 177.3 (C=O), 176.5 (C=O), 154.3 (C2), 144.1 (C6), 103.0 (C5), 87.7 (C1'), 80.5 (C4'), 78.4 (C3'), 71.6 (C2'), 63.0 (C5'), 38.3 (C^{III}Piv), 38.2 (C^{III}Piv), 37.4 (CH₂^α), 29.2 (CH₂^β), 26.8 (CH₃^{Piv}), 26.6 (CH₃^{Piv}), 21.8 (CH₂^γ), 13.7 (CH₃^δ).

5'-O-Trytylourydyna (263)

Suszoną urydynę (**80**) (5,0 g, 20,47 mmol) dodano do bezwodnej pirydyny (80 mL). Roztwór zatężono do ok. 75 mL, dodano suszony TrCl (8,5613 g, 30,71 mmol, 1,5 eq.) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 18 godz. Następnie odparowano rozpuszczalnik i trzykrotnie odparowano z toluenem w celu pozbycia się resztek pirydyny. Rozpuszczono w 100 mL DCM i ekstrahowano nasyconym roztworem NaHCO₃aq. Fazę organiczną suszono nad Na₂SO₄, zatężono i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie C. Frakcje z produktem zebrano, odparowano rozpuszczalnik, suszono w próżni i zważono. Uzyskano 9,3812 g produktu w postaci białej stałej piany (19,28 mmol, 94%). TLC: R_f = 0,6 (D); ¹H NMR: δ 11.36 (s, 1H, NH), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.34 (m, 15H, Tr), 5.75 (s, 1H, H1'), 5.50 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, 2'OH), 5.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5), 5.16 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, 3'OH), 4.09 (m, 2H, H2', H3'), 3.97 (m, 1H, H4'), 3.31 (m, 1H, H5'a), 3.22 (m, 1H, H5'b); ¹³C NMR:

δ 163.0 (C4), 150.5 (C2), 143.4 (Tr), 140.58 (C6), 128.3-127.0 (Tr), 101.4 (C5), 88.9 (C1'), 86.4 (Tr), 82.3 (C4'), 73.3 (C2'), 69.5 (C3'), 63.2 (C5').

2'-O-Metylo-5'-O-trytylo-2,3'-anhydrourydyna (264)

Suszony nukleozyd (**266**) (1,0082 g, 1,74 mmol) rozpuszczono 30 mL i zatężono do ok. 27 mL. Dodano ftalimidek potasu (966,0 mg, 5,22 mmol, 3 ekw.) i mieszano w 135 °C przez 18 godzin. Po tym czasie na TLC (D) widać śladowe ilości substratu. Odparowano DMF i zrobiono rozdział na kolumnie żelowej w układzie C. Uzyskano produkt w postaci białego ciała stałego z wydajnością 90% (758,1 mg, 1,57 mmol); TLC: $R_f = 0,53$ (D); $^1\text{H NMR}$: δ 7.67 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H6), 7.31 (m, 15H, Tr), 5.97 (s, 1H, H1'), 5.83 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H5), 5.27 (s, 1H, H3'), 4.60 (s, 1H, H2'), 4.25 (m, 1H, H4'), 3.45 (s, 3H, OCH₃), 3.16 (m, 2H, H5'a,b); $^{13}\text{C NMR}$: δ 170.0 (C4), 153.1 (C2), 143.2 (Tr), 141.0 (C6), 128.1 (Tr), 127.9 (Tr), 127.1 (Tr), 108.2 (C5), 87.1 (C1'), 86.4 (Tr), 82.3 (C4'), 77.7 (C2'), 77.2 (C3'), 62.0 (C5'), 57.0 (OCH₃).

2'-O-Metylo-5'-O-trytylourydyna (265)

Odważoną ilość wiórków magnezowych (475,5 mg, 19,57 mmol) oraz jodu (248,7 mg, 1,96 mmol) dodano do 50 mL absolutnego MeOH i gotowano do uzyskania jednolitej białej zawiesiny. Następnie mieszaninę odparowano do sucha, rozpuszczono w 45 mL DMF i zatężono do ok. 42 mL i do roztworu dodano suszony nukleozyd **259** (1,8418 g, 3,914 mmol). Reakcję prowadzono w 120 °C przez 18 godzin. Na TLC (H) zaobserwowano pełne przereagowanie. Reakcję zatrzymano przez odparowanie. Następnie bez zobojętniania wykonano ekstrakcję w układzie DCM/NaHCO_{3aq}, fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i produkt oczyszczono na kolumnie w układzie H. Uzyskano produkt w postaci białego ciała stałego z wydajnością 95% (1,8650 g, 3,73 mmol); TLC: $R_f = 0,40$ (H); $^1\text{H NMR}$: δ 11.39 (s, 1H, NH), 7.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 7.36 (m, 15H, Tr), 5.82 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H1'), 5.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 5.23 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, 3'OH), 4.22 (dd, $J = 5.6, 12.0$ Hz, 1H, H3'), 3.97 (m, 1H, H4'), 3.83 (m, 1H, H2'), 3.42 (s, 3H, OCH₃), 3.23 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H, H5'b);* $^{13}\text{C NMR}$: δ 163.0 (C4), 150.2 (C2), 143.3 (Tr), 140.3 (C6), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.2 (Tr), 101.5 (C5), 87.0 (C1'), 86.6 (Tr), 82.4 (C4',C2'), 68.4 (C3'), 62.8 (C5'), 57.8 (OCH₃).

* Sygnał H5'a jest przysłonięty sygnałem od wody.

3'-O-Mesylo-2'-O-metylo-5'-O-trytylourydyna (266)

Suszony nukleozyd (**263**) (1,3091 g, 2,62 mmol) rozpuszczono 40 mL i zatężono do ok. 37 mL. Dodano MsCl (600,2 mg, 5,24 mmol, 406 μ L) w dwóch porcjach. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Na TLC (H) zaobserwowano całkowite przereagowanie. Pirydynę odparowano z toluenem i wykonano ekstrakcję DCM/NaHCO_{3aq}. Fazę organiczną oczyszczono na kolumnie w układzie J. Uzyskano produkt w postaci białej stałej piany z wydajnością 99% (1,4987 g, 2,59 mmol); TLC: R_f = 0,54 (H); ¹H NMR: δ 11.48 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, NH), 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H6), 7.37 (m, 15H, Tr), 5.82 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, H1'), 5.32 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H, H5), 5.26 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H3'), 4.30 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, H2'), 4.25 (dd, *J* = 4.0, 8.8 Hz, 1H, H4'), 3.42 (s, 3H, OCH₃), 3.36 (m, 2H, H5'a,b), 3.24 (s, 3H, OMs); ¹³C NMR: δ 162.9 (C4), 150.3 (C2), 143.1 (Tr), 140.5 (C6), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.3 (Tr), 101.9 (C5), 87.1 (C1'), 86.7 (Tr), 80.2 (C4'), 79.6 (C2'), 75.5 (C3'), 62.0 (C5'), 58.0 (OCH₃), 37.9 (OMs).

2'-Azydo-5'-O-trytylo-2,3'-anhydro-2'-deoksyurydyna (267)

Suszony nukleozyd (**269**) (0,9 g, 1,40 mmol) rozpuszczono w 30 mL acetonitrylu i dodano Et₃N (566,7 mg, 5,60 mmol, 780 μ L, 4 ekw.). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez odparowanie do sucha. Mieszaninę rozpuszczono w DCM i ekstrahowano wodnym roztworem NaCl. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie G. Otrzymano 612,5 mg produktu (1,24 mmol) z wydajnością 89%. TLC: R_f = 0,60 (R); ¹H NMR: δ 7.70 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H6), 7.31 (m, 15H, Tr), 6.01 (s, 1H, H1'), 5.84 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H5), 5.33 (s, 1H, H2'), 5.08 (s, 1H, H3'), 4.52 (s, 1H, H4'), 3.11 (m, 2H, H5'a, H5'b); ¹³C NMR: δ 169.9 (C4), 152.7 (C2), 143.2 (Tr), 140.9 (C6), 128.1 (Tr), 127.9 (Tr), 127.1 (Tr), 108.3 (C5), 87.7 (C1'), 86.4 (Tr), 82.1 (C4'), 77.9 (C3'), 61.9 (C5'), 60.9 (C2').

2'-Azydo-5'-O-trytylo-2'-deoksyurydyna (268)

Suszoną 5'-O-trytylo-2,2'-anhydrourydynę (**259**) (5,0 g; 10,65 mmol) i LiN₃ (782,4 mg; 15,98 mmol) dodano do suchego DMF (60 mL) i zatężono do ok. 55 mL. Roztwór mieszało w T = 135 °C przez noc. Następnie rozpuszczalnik odparowano do postaci gęstego oleju. Mieszaninę rozdzielono na kolumnie żelowej w układzie G. Zebrano frakcje z produktem, odparowano i krystalizowano w układzie MeOH/H₂O uzyskując 3,8314 mg (7,49 mmol, 70%) białego drobnokrystalicznego osadu. TLC: R_f = 0,86 (D); 0,29 (J);

¹H NMR: δ 11.44 (s, 1H, NH), 7.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.32 (m, 15H, Tr), 6.00 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H1'), 5.75 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, 3'OH), 5.38 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H5), 4.43 (dd, *J* = 6.0, 12.4 Hz, 1H, H2'), 4.28 (dd, *J* = 3.6, 5.6 Hz, 1H, H3'), 3.98 (m, 1H, H4'), 3.32 (m, H5'a),* 3.26 (dd, *J* = 2.8, 4.0 Hz, 1H, H5'b); ¹³C NMR: δ 163.0 (C4), 150 (C2), 143.3 (Tr), 140.2 (C6), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.2 (Tr), 101.7 (C5), 87.0 (C1'), 86.4 (Tr), 82.4 (C4'), 69.9 (C2'), 64.7 (C3'), 62.6 (C5').

* Sygnał ¹H NMR H5'a częściowo przykryty sygnałem pochodzącym od wody.

2'-Azydo-3'-O-trifluorometanosulfonylo-5'-O-trytylo-2'-deoksyurydyna (269)

Suszony nukleozyd (**268**) (1,0 g, 1,95 mmol) rozpuszczono w 20 mL pirydyny, zatężono do ok. 18 mL i dodano 20 mL DCM. Schłodzono do *t* < 5 °C, dodano bezwodnik trifluorometanosulfonowy w pięciu porcjach (826,7 mg, 2,93 mmol, 493 μL, ekw. 1,5) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Reakcję zatrzymano przez dodanie MeOH (2 mL) i odparowano mieszaninę w temperaturze 18-20 °C. Następnie odparowano trzykrotnie całość z toluenem w obniżonej temperaturze i rozpuszczono w DCM (40 mL) zalkalizowanym na Al₂O₃. Przeprowadzono ekstrakcję z zimnym, wodnym, nasyconym roztworem Na₂CO₃. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie P. Otrzymano 968,7 mg produktu (1,51 mmol) z wydajnością 77%. TLC: *R*_f = 0,60 (R); ¹H NMR (CD₃CN): δ 9.34 (s, 1H, NH), 7.33 (m, 16H, Tr, H6), 5.86 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H1'), 5.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H5), 5.50 (dd, *J* = 3.6, 5.2 Hz, H1, H3'), 4.66 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, H2'), 4.36 (dd, *J* = 4.0, 7.6 Hz, 1H, H4'), 3.53 (dd, *J* = 4.0, 7.6 Hz, 1H, H5'a), 3.39 (dd, *J* = 4.0, 7.6 Hz, 1H, H5'b). ¹³C NMR (CD₃CN): δ 162.2 (C4), 149.8 (C2), 142.8 (Tr), 139.8 (C6), 128.0 (Tr), 127.5 (Tr), 127.0 (Tr), 102.2 (C5), 87.2 (Tr), 87.1 (C1'), 84.4 (C3'), 80.4 (C4'), 62.4 (C2'), 61.3 (C5'); ¹⁹F NMR (CDCl₃): δ -74.5 (CF₃).

1-(5'-S-Toliltio-β-D-5'-deoksy-ksylofuranozylo)uracyl (270) i 3'-S-toliltio-3'-deoksyurydyna (271a)

2,3'-Anhydrourydynę (**106**) (50,0 mg, 0,22 mmol) rozpuszczono w 4 mL DMF, zatężono do ok. 3,5 mL, dodano tiokrezol (54,7 mg, 0,44 mmol, 2 ekw.) i ftalimidek potasu (4,0 mg, 0,02 mmol, 0,1 ekw.). Reakcję prowadzono w 120 °C przez 18 godzin. Reakcję zatrzymano przez odparowanie i otrzymaną mieszaninę bez ekstrakcji naniesiono na kolumnę żelową. Związki wymywano w układzie G. Pierwszy produkt **271** o *R*_f = 0,44 (D)

wyizolowano z wydajnością 48% (36,7 mg, 0,105 mmol). Produkt **270** o $R_f = 0,39$ (D) wyizolowano z wydajnością 12% (9,5 mg, 0,027 mmol).

^1H NMR (**270**): δ 11.29 (s, 1H, NH), 7.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph), 7.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph), 5.81 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 2'OH), 5.68 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, 3'OH), 5.61 (m, 2H, H1', H5), 4.15 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H4'), 3.98 (d, $J = 3.2$, 1H, H2'), 3.91 (s, 1H, H3'), 3.26 (m, 2H, H5'a,b); ^{13}C NMR (**270**): δ 163.2 (C4), 150.4 (C2), 141.3 (C6), 135.6 (Ph), 132.0 (Ph), 129.8 (Ph), 129.0 (Ph), 100.9 (C5), 91.2 (C1'), 81.5 (C4'), 80.5 (C2'), 74.4 (C3'), 31.0 (C5');

^1H NMR (**271a**): δ 11.30 (s, 1H, NH), 8.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 7.36 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph), 7.13 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph), 6.18 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, 2'OH), 5.73 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H1'), 5.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 5.20 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H, 5'OH), 4.35 (dd, $J = 2.0, 5.2$ Hz, 1H, H2'), 4.02 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H4'), 3.72 (m, 2H, H3', H5'a), 3.47 (m, 1H, H5'b); ^{13}C NMR (**271**): δ 163.2 (C4), 150.5 (C2), 140.5 (C6), 136.1 (Ph), 131.3 (Ph), 130.5 (Ph), 129.7 (Ph), 101.1 (C5), 90.4 (C1'), 84.8 (C4'), 75.2 (C2'), 59.6 (C5'), 48.9 (C3'); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla $[\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}+\text{Na}]^+$ 373,0834, znal. 373,0830, bł. -1,1 ppm.

2'-O-Metylo-3'-S-toliltio-3'-deoksyurydyna (272)

Suszony 1-(3'-O-mesylo-2'-O-metylo- β -D-ksylofuranozyl)uracyl (**316**) (50,0 mg, 0,15 mmol) rozpuszczono w 4 mL DMF i zatężono do ok. 3,5 mL. Dodano *p*-tiokrezol (37,3 mg, 0,30 mmol) oraz ftalimidek potasu (4,0 mg, 0,02 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze 120 °C przez 18 godzin. Reakcję zatrzymano przez odparowanie, następnie produkt oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie G. Wyizolowano 39,3 mg (0,11 mmol, 73%) produktu. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: $R_f = 0,63$ (D); ^1H NMR: δ 11.34 (s, 1H, NH), 8.07 (s, 1H, H6), 7.38 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph^{or}), 7.14 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph^m), 5.82 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H1'), 5.89 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 5.25 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H, 5'OH), 4.10 (dd, $J = 1.2, 5.2$ Hz, 1H, H2'), 4.01 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H4'), 3.80 (dd, $J = 5.2, 9.6$ Hz, 1H, H3'), 3.76 (m, 1H, H5'a), 3.47 (m, 4H, H5'b, MeO), 2.27 (s, 3H, CH₃); ^{13}C NMR: δ 163.3 (C4), 150.3 (C2), 140.2 (C6), 136.3 (Ph^p), 130.9 (Ph^{C-S}), 130.6 (Ph^{or}), 129.7 (Ph^m), 101.1 (C5), 87.7 (C1'), 85.3 (C4'), 84.9 (C2'), 59.1 (C5'), 58.1 (MeO), 47.2 (C3'), 20.5 (CH₃); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla $[\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}+\text{Na}]^+$ 387,0991, znal. 387,0992, bł. 0,3 ppm.

8-Tiokso-2'-S-toliltio-2'-deoksyadenozyna (273)

Suszoną 8,2'-S-anhydro-2'-deoksyadenozynę (**168**) (313,0 mg, 1,11 mmol) rozpuszczono w 15 mL DMF i zatężono do ok. 13 mL. Dodano *p*-tiokrezol (551,5 mg, 4,44 mmol) oraz ftalimidek potasu (40,7 mg, 0,22 mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze 145 °C przez 40 godzin. Reakcję zatrzymano przez odparowanie, następnie związek oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie G. Wyizolowano 201,0 mg (0,50 mmol, 45%) produktu. TLC: $R_f = 0,43$ (D); $^1\text{H NMR}$: δ 12.28 (s, 1H, NH), 7.92 (s, 1H, H2), 7.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph^{or}), 6.83 (bs, 2H, NH₂), 6.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph^m), 6.67 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H1'), 5.91 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, 3'OH), 5.19 (dd, $J = 3.6, 8.4$ Hz, 1H, 5'OH), 4.90 (dd, $J = 4.8, 9.2$ Hz, 1H, H2'), 4.44 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, H3'), 4.00 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H, H4'), 3.66 (m, 1H, H5'a), 3.53 (m, 1H, H5'b), 2.10 (s, 3H, CH₃); $^{13}\text{C NMR}$: δ 167.5 (C8), 151.4 (C2), 147.6 (C4, C6), 137.0 (Ph^p), 132.6 (Ph^{or}), 128.7 (Ph^m), 128.4 (Ph^{C-S}), 106.8 (C5), 89.8 (C1'), 87.4 (C4'), 72.6 (C3'), 62.1 (C5'), 52.1 (C2'), 20.5 (CH₃).

2'-S-Toliltio-5'-O-trytylo-2'-deoksyurydyna (274)

Suszoną 5'-O-trytylo-2,2'-anhydrourydynę (**259**) (2,0 g, 4,27 mmol) rozpuszczono w 40 mL DMF i zatężono do ok. 38 mL. Następnie dodano *p*-tiokrezol (1,0607 g, 8,54 mmol) oraz ftalimidek potasu (79,6 mg, 0,43 mmol) i mieszano w 135 °C przez 18 godzin. Następnie DMF odparowano i produkt oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie S. Wyizolowano 2,4719 g (4,17 mmol) produktu z wydajnością 98%. TLC: 0,29 (J); $^1\text{H NMR}$: δ 11.16 (s, 1H, NH), 7.32 (m, 18 H, H6, Tr, Ph^{or}), 7.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph^m), 6.16 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H1'), 5.94 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H, 3'OH), 5.19 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H, H5), 4.33 (m, 1H, H3'), 4.01 (bs, 1H, H4'), 3.91 (dd, $J = 5.6, 8.8$ Hz, 1H, H2'), 3.35 (m, 1H, H5'a), 3.13 (dd, $J = 3.6, 6.4$ Hz, 1H, H5'b), 2.23 (s, 3H, CH₃); $^{13}\text{C NMR}$: δ 162.5 (C4), 150.3 (C2), 143.3 (Tr), 139.6 (C6), 137.2 (Ph^p) 132.4 (Ph^{or}), 129.6 (Ph^m), 129.2 (Ph^{C-S}), 128.2 (Tr), 128.0 (Tr), 127.2 (Tr), 102.0 (C5), 88.2 (C1'), 86.5 (Tr), 84.9 (C4'), 72.0 (C3'), 64.1 (C5'), 54.7 (C2'), 20.6 (CH₃).

2'-Jodo-5'-O-trytylo-2'-deoksyurydyna (275)

Trytylowaną 2,2'-anhydrourydynę (**259**) (2,0 g, 4,27 mmol) rozpuszczono w 40 mL acetonu i dodano NaI (960,8 mg, 6,41 mmol) i TsOH (suszony w eksykatorze) (771,4 mg, 4,06 mmol). Reakcję prowadzono w przez 2 godziny w 50 °C. Po całkowitym przereagowaniu substratu (TLC) odbarwiono mieszaninę przy użyciu Na₂S₂O₃, odsączono osad i rozdzielono przesącz na kolumnie w układzie J. Układ przed użyciem przesączono

przez Al₂O₅. Wyizolowano 1,9967 g (3,35 mmol) produktu z wydajnością 78%. TLC: R_f = 0,71 (H); ¹H NMR: δ 11.45 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, NH), 7.68 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.34 (m, 15H, Tr), 6.22 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H1'), 6.08 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, 3'OH), 5.43 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H, H5), 4.64 (t, *J* = 6.4 Hz, H1, H2'), 4.03 (dd, *J* = 4.8, 8.4 Hz, 1H, H4'), 3.77 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H3'), 3.34 (m, 1H, H5'a), 3.23 (dd, *J* = 3.2, 10.4 Hz, 1H, H5'b); ¹³C NMR: δ 162.8 (C4), 150.4 (C2), 143.3 (Tr), 139.6 (C6), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.2 (Tr), 102.0 (C5), 90.0 (C1'), 86.4 (Tr), 83.5 (C4'), 69.1 (C3'), 63.0 (C5'), 33.4 (C2').

3'-O-Fenoksytiokarbonylo-2'-O-metylo-5'-O-trytylourydyna (276)

Trytylowaną pochodną 2'-O-metylową **265** (444,0 mg, 0,89 mmol) rozpuszczono w 25 mL pirydyny, zatężono do ok. 23 mL, dodano DMAP (326,2 mg, 2,67 mmol, 3 ekw.) oraz chlorek tiofenoksykarbonylu (307,3 mg, 1,78 mmol, 246,2 μL, 2 ekw.) i mieszano przez 18 godzin w 80 °C. Następnie odparowano pirydynę z toluenem i ekstrahowano w układzie DCM/NaHCO_{3aq}. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie S. Frakcje z produktem zebrano, odparowano i suszono pod próżnią. Wyizolowano 416,8 mg produktu (0,65 mmol) z wydajnością 73%. TLC: 0,71 (H); ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.67 (s, 1H, NH), 7.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.36 (m, 18H, Tr, Ph), 7.12 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ph), 6.16 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H1'), 5.91 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H3'), 5.39 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H, H5), 4.46 (d, *J* = 5.6 Hz, H1, H4'), 4.33 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H2'), 3.34 (m, 5H, H5'a, H5'b, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 193.7 (C=S), 162.3 (C4), 152.9 (Ph), 149.5 (C2), 142.4 (Tr), 139.2 (C6), 129.2 (Ph), 128.2 (Tr), 127.7 (Tr), 127.3 (Ph), 127.1 (Tr), 121.2 (Ph), 102.2 (C5), 87.5 (Tr), 86.8 (C1'), 81.1 (C2'), 80.3 (C4'), 77.6 (C3'), 61.5 (C5'), 58.8 (OMe).

2'-O-Metylo-5'-O-trytylo-3'-deoksyurydyna (277)

Fenoksytiokarbonylową pochodną **276** (359,0 mg, 0,56 mmol) oraz AIBN (90,8 mg, 0,56 mmol) rozpuszczono w toluenie (20 mL). Roztwór płukano argonem przez 5 minut i dodano pipetą (kontakt z metalową igłą rozkłada związek) HSnBu₃ (652,0 mg, 2,24 mmol, 594,0 μL). Reakcję prowadzono przez 4 godziny w 75 °C. Reakcję zatrzymano przez odparowanie i następnie oczyszczono na kolumnie w układzie W. Produkt wysuszono i zważono. Uzyskano 239,9 mg produktu (0,50 mmol) z wydajnością 89%. TLC: R_f = 0,31 (J); ¹H NMR: δ 11.36 (s, 1H, NH), 7.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.33 (m, 15H, Tr), 5.79 (s, 1H, H1'), 5.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5), 4.32 (m, 1H, H4'), 4.00 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H2'), 3.34 (OCH₃),* 3.29 (m, 2H, H5'a,b), 2.11 (m, 1H, H3'a), 1.99 (m, 1H, H3'b); ¹³C NMR: δ 163.1

(C4), 150.1 (C2), 143.2 (Tr), 140.2 (C6), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.2 (Tr), 101.0 (C5), 89.4 (C1'), 86.4 (Tr), 84.7 (C2'), 79.5 (C4'), 63.7 (C5'), 56.6 (MeO), 31.0 (C3').

* Sygnał OCH₃ pokrywa się częściowo z sygnałem pochodzącym od wody.

3'-O-Fenoksytiokarbonylo-5'-O-trytylo-2,2'-anhydrourydyna (278)

Suszoną 5'-O-trytylo-2,2'-anhydrourydynę (**259**) (5,0 g, 10,65 mmol) rozpuszczono w 80 mL pirydyny. W tym celu ogrzewano pirydynę, aby poprawić rozpuszczalność. Schłodzono do temperatury pokojowej i zatężono do ok. 75 mL. Dodano DMAP (2,6022 g, 21,30 mmol) i w temp. 30 °C dodano w 5 porcjach chlorek fenoksytiokarbonylu (3,7196 g, 21,30 mmol; 2,980 mL). Po dodaniu całości podniesiono temp. do 45 °C i mieszano przez dwie doby. Reakcje monitorowano na TLC w układzie D. Pirydynę odparowano, następnie mieszaninę odparowano trzykrotnie z toluenem w celu pozbycia się resztek pirydyny i ekstrahowano w układzie DCM/NaHCO_{3aq}. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i naniesiono na kolumnę żelową. Kolumnę przepłukano DCM i następnie wykonano rozdział w układzie G. Frakcje z produktem zebrano, odparowano rozpuszczalniki, wysuszono w próżni i zważono. Uzyskano produkt z wydajnością 89% (5,7583 g, 9,49 mmol); TLC: R_f = 0,74 (D); 0,29 (H); ¹H NMR: δ 7.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.50 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ph), 7.36 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ph), 7.25 (m, 17H, Tr, Ph), 6.49 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H1'), 5.89 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H5), 5.81 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H1, H3'), 5.74 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H2'), 4.78 (m, 1H, H4'), 3.15 (m, 1H, H5'a), 2.87 (m, 1H, H5'b); ¹³C NMR: δ 193.1 (C=S), 170.5 (C4), 159.0 (C2), 153.0 (Ph), 143.1 (Tr), 136.5 (C6), 129.9 (Ph), 128.0 (Tr), 127.2 (Tr), 127.0 (Ph), 121.7 (Ph), 109.1 (C5), 90.1 (C1'), 86.4 (Tr), 85.4 (C2'), 84.7 (C3'), 84.0 (C4'), 62.8 (C5').

5'-O-Trytylo-2,2'-anhydro-3'-deoksyurydyna (279)

Suszoną 3'-O-fenoksytiokarbonylo-5'-O-trytylo-2,2'-anhydrourydynę (**278**) (5,0 g, 8,24 mmol) rozpuszczono w 60 mL toluenu. Dodano AIBN (1,3366 g, 8,24 mmol) i płukano argonem przez 5 min. Następnie otworzono kolbę, dodano pipetą (metalowa igła rozkłada reagent) HSnBu₃ (9,5930 g, 32,96 mmol, 8,7368 mL), szczelnie zamknięto i mieszano w 75 °C przez 4 godziny. Po tym czasie reakcja zaszła ilościowo (TLC). Odparowano rozpuszczalnik i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie C. Frakcje z produktem zebrano, odparowano rozpuszczalnik, wysuszono w próżni i zważono. Uzyskano produkt w postaci białego ciała stałego z wydajnością 96% (3,5925 g, 7,94 mmol). TLC: R_f = 0,09 (H); ¹H NMR: δ 7.93 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H6), 7.25 (m, 15H, Tr), 6.75 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H,

H1'), 5.85 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H5), 5.51 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, H2'), 4.53 (m, 1H, H4'), 2.89 (m, 1H, H5'a), 2.79 (m, 1H, H5'b), 2.50 (m, H3'a)*, 2.16 (m, 1H, H3'b); ^{13}C NMR: δ 171.0 (C4), 159.5 (C2), 143.4 (Tr), 136.7 (C6), 128.0 (Tr), 127.9 (Tr), 127.0 (Tr), 108.8 (C5), 90.8 (C1'), 85.8 (Tr), 83.9 (C2'), 84.2 (C4'), 65.4 (C5'), 33.1 (C3').

* Sygnał H3'a jest przykryty sygnałem od DMSO.

2'-Azydo-5'-O-trytylo-2',3'-dideoksyurydyna (280)

Nukleozyd **279** (1,4920 g, 3,30 mmol) rozpuszczono w 40 mL DMF, zatężono do ok. 38 mL, dodano LiN_3 (243,4 mg, 4,95 mmol) i mieszano przez 3 godziny w 135 °C. Mieszaninę odparowano i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie S. Frakcje z produktem zebrano, odparowano i wysuszono w próżni. Uzyskano 1,1393 produktu (2,30 mmol) z wydajnością 70%. TLC: $R_f = 0,63$ (H); ^1H NMR: δ 11.42 (s, 1H, NH), 7.73 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H6), 7.32 (m, 15H, Tr), 5.76 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H1'), 5.25 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 4.56 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H2'), 4.33 (m, 1H, H4'), 3.32 (m, H5'a,b)*, 2.22 (m, 1H, H3'a), 1.99 (m, 1H, H3'b); ^{13}C NMR: δ 163.1 (C4), 150.2 (C2), 143.3 (Tr), 139.6 (C6), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.2 (Tr), 101.0 (C5), 89.7 (C1'), 86.4 (Tr), 79.6 (C4'), 65.5 (C2'), 63.5 (C5'), 30.7 (C3').

* Sygnał H5'a,b jest schowany za sygnałem pochodzącym od wody.

2'-S-Tolilitio-5'-O-trytylo-2',3'-dideoksyurydyna (281)

Nukleozyd (**279**) (226,3 mg, 0,50 mmol) rozpuszczono w 12 mL DMF i zatężono do ok. 10 mL. Następnie dodano *p*-tiokrezol (124,2 mg, 1,00 mmol) oraz ftalimidek potasu (9,3 mg, 0,05 mmol). Reakcję prowadzono w 125 °C przez dwie godziny. Następnie mieszaninę odparowano i oczyszczono na kolumnie żelowej. Wyizolowany produkt wysuszono w próżni i zważono. Uzyskano 274,5 mg związku (0,48 mmol) z wydajnością 96%. TLC: $R_f = 0,71$ (H); ^1H NMR: δ 11.26 (s, 1H, NH), 7.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 7.33 (m, 17H, Tr, Ph^{or}), 7.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph^{m}), 5.89 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H1'), 5.25 (dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, 1H, H5), 4.30 (m, 1H, H4'), 4.03 (dd, $J = 5.6, 13.2$ Hz, 1H, H2'), 3.30 (m, H5'a),* 3.15 (dd, $J = 2.8, 10.8$ Hz, 1H, H5'b), 2.38 (m, 1H, H3'a), 1.99 (m, 1H, H3'b); ^{13}C NMR: δ 162.8 (C4), 150.2 (C2), 143.4 (Tr), 140.1 (C6), 137.3 (Ph^{p}), 132.1 (Ph^{or}), 129.8 (Ph^{m}), 128.9 ($\text{Ph}^{\text{C-S}}$), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.2 (Tr), 101.7 (C5), 89.3 (C1'), 86.3 (Tr), 77.5 (C4'), 64.9 (C5'), 48.9 (C2'), 32.3 (C3'), 20.6 (CH_3). * Sygnał H3'a jest przykryty sygnałem od H_2O .

2'-Jodo-5'-O-trytylo-2',3'-dideoksyurydyna (282)

Nukleozyd **279** (362,0 mg, 0,80 mmol) rozpuszczono w acetonie (15 mL) i dodano NaI (179,9 mg, 1,20 mmol) oraz *p*-TsOH (suszony w eksykatorze) (144,4 mg, 0,76 mmol). Reakcję prowadzono w 50 °C przez dwie godziny. Następnie odbarwiono mieszaninę przez dodanie Na₂SO₃, odsączono osad i oczyszczono przesącz na kolumnie żelowej. Wyizolowany produkt wysuszono w próżni i zważono. Uzyskano 376,1 mg (0,65 mmol) z wydajnością 81%. TLC: R_f = 0,43 (H); ¹H NMR: δ 11.40 (s, 1H, NH), 7.74 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.33 (m, 15H, Tr), 6.16 (s, 1H, H1'), 5.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5), 4.63 (s, 1H, H2'), 4.50 (bs, 1H, H4'), 3.34 (m, H5'a,b)*, 2.36 (m, 1H, H3'a), 2.23 (m, 1H, H3'b); ¹³C NMR: δ 163.0 (C4), 150.2 (C2), 143.3 (Tr), 139.3 (C6), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.9 (Tr), 127.2 (Tr), 101.0 (C5), 93.3 (C1'), 86.6 (Tr), 80.0 (C4'), 63.5 (C5'), 36.2 (C3'), 24.8 (C2').

* Sygnał H5'a,b jest schowany za sygnałem pochodzącym od wody.

5'-O-Trytylo-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrourydyna (283)

Świeżo przygotowany Mg(OMe)₂ (Mg: 194,4 mg, J₂: 101,5 mg) odparowano z metanolu do sucha, dodano DMF (25 mL) i nukleozyd **279** (362,0 mg, 0,80 mmol) i zatężono do ok. 22 mL. Reakcję prowadzono w 135 °C przez 18 godzin. Reakcję zatrzymano przez odparowanie. Następnie mieszaninę ekstrahowano w układzie DCM/H₂O. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i następnie produkt oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie G. Otrzymano po wysuszeniu 316,0 mg produktu (0,70 mmol) z wydajnością 88%. TLC: R_f = 0,50 (D); ¹H NMR: δ 11.36 (s, 1H, NH), 7.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.31 (m, 15H, Tr), 6.82 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H1'), 6.53 (m, 1H, H2'), 6.01 (m, 1H, H3'), 4.93 (m, 2H, H5, H4'), 3.31 (m, H5'a)*, 3.13 (m, 1H, H5'b); ¹³C NMR: δ 163.0 (C4), 150.7 (C2), 143.2 (Tr), 140.8 (C6), 134.5 (C2') 128.3 (Tr), 127.9 (Tr), 127.1 (Tr), 125.9 (C3'), 101.3 (C5), 89.2 (C1'), 86.3 (Tr), 85.3 (C4'), 64.9 (C5').

* Sygnał H5'a jest schowany za sygnałem pochodzącym od wody.

2'-(1H-4-Trimetylosililo-[1,2,3]-triazolo)-5'-O-trytylo-2',3'-dideoksyurydyna (284)

Pochodną 2'-azydkową **280** (266,0 mg, 0,54 mmol) rozpuszczono w ACN (5 mL), następnie płukano roztwór argonem przez 5 minut. Dodano CuI (41,9 mg, 0,22 mmol), TMS-acetylen (106,1 mg, 1,08 mmol, 152,7 μL) i Et₃N (5 mL). Kolbę szczelnie zamknięto i mieszano w 60 °C przez 18 godzin. Reakcję zatrzymano przez odparowanie i otrzymany

związek oczyszczono na kolumnie w układzie S. Produkt wysuszono i zważono. Otrzymano 296,9 mg związku (0,50 mmol) z wydajnością 93%. TLC: 0,37 (J); ^1H NMR: δ 11.41 (s, 1H, NH), 8.25 (s, 1H, H5''), 7.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 7.36 (m, 15H, Tr), 6.05 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H1'), 5.53 (m, 1H, H2'), 5.40 (dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, 1H, H5), 4.73 (m, 1H, H4'), 3.39 (m, 1H, H5'a), 3.34 (H5'b),* 2.59 (m, 1H, H3'a), 2.43 (m, 1H, H3'b); ^{13}C NMR: δ 163.1 (C4), 150.3 (C2), 143.4 (Tr), 140.2 (C6), 130.3 (C5''),** 128.2 (Tr), 128.0 (Tr), 127.2 (Tr), 101.5 (C5), 90.2 (C1'), 86.4 (Tr), 79.9 (C4'), 64.2 (C5'), 63.6 (C2'), 32.4 (C3'), -1.0 (TMS).

* Sygnał H5'b nałożył się z sygnałem od H₂O. ** Sygnał C4'' triazolu niewidoczny.

2'-(1H-[1,2,3]-Triazolo)-5'-O-trytylo-2',3'-dideoksyurydyna (285)

Nukleozyd (**284**) (408,4 mg, 0,69 mmol) bez suszenia rozpuszczono w 10 mL MeOH, dodano NH₄F (127,8 mg, 3,45 mmol) i mieszano w temperaturze wrzenia przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez odparowanie i oczyszczono na kolumnie w układzie I. Wyizolowany produkt wysuszono i zważono. Otrzymano 308,4 mg (0,59 mmol) produktu z wydajnością 86%. TLC: 0,29 (J); ^1H NMR: δ 11.43 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, NH), 8.25 (s, 1H, H5''), 7.81 (m, 2H, H6, H4''), 7.38 (m, 15H, Tr), 6.04 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H1'), 5.54 (m, 1H, H2'), 5.41 (dd, $J = 2.4, 8.0$ Hz, 1H, H5), 4.74 (m, 1H, H4'), 3.39 (m, 1H, H5'a), 3.31 (H5'b),* 2.60 (m, 1H, H3'a), 2.48 (m, 1H, H3'b); ^{13}C NMR: δ 163.1 (C4), 150.3 (C2), 143.4 (Tr), 140.2 (C6), 133.6 (C4''), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.2 (Tr), 124.8 (C5''), 101.6 (C5), 90.2 (C1'), 86.4 (Tr), 79.9 (C4'), 64.2 (C5'), 63.8 (C2'), 32.2 (C3').

* Sygnał H5'b nałożył się z sygnałem od H₂O.

2'-O-Metylo-3'-deoksyurydyna (286)

Nukleozyd **277** (217,0 mg, 0,45 mmol) rozpuszczono w 10% roztworze CF₃COOH w DCM (CF₃COOH: 1 g, 0,651 mL; DCM: 9 g, 6,767 mL). Reakcję mieszano przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez odparowanie z izopropanolem (trzykrotnie). Następnie rozpuszczono mieszaninę w MeOH, dodano 100 mg NaHCO₃ i mieszano przez 2 godziny. Na koniec całość odparowano razem z żelem krzemionkowym (0,063-0,200 mm) i naniesiono na kolumnę. Produkt wymywano układem C. Uzyskano 88,3 mg (0,36 mmol) z wydajnością 80%. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: R_f = 0,86 (F); ^1H NMR: δ 11.31 (s, 1H, NH), 8.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 5.76 (s, 1H, H1'), 5.58 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H5), 5.13 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, 5'OH), 4.20 (m, 1H, H4'), 3.94 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H2'), 3.76

(m, 1H, H5'a), 3.54 (m, 1H, H5'b), 3.34 (s, 3H, OCH₃),* 1.97 (m, 1H, H3'a), 1.88 (m, 1H, H3'b); ¹³C NMR: δ 163.2 (C4), 150.2 (C2), 140.3 (C6), 100.9 (C5), 89.0 (C1'), 84.8 (C2'), 81.3 (C4'), 61.0 (C5'), 56.6 (OCH₃), 30.4 (C3'); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₁₀H₁₄N₂O₅+Na]⁺ 265,0800, znal. 265,0799, bł. -0,4 ppm.

* sygnał częściowo nałożony z sygnałem od H₂O.

2'-Azydo-2',3'-dideoksyurydyna (287)

Trytylowany nukleozyd **280** (260,0 mg, 0,61 mmol) rozpuszczono w 10% roztworze CF₃COOH w DCM (CF₃COOH: 1 g, 0,651 mL; DCM: 9 g, 6,767 mL). Reakcję mieszano przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez odparowanie z izopropanolem (trzykrotnie). Następnie rozpuszczono mieszaninę w MeOH, dodano 100 mg NaHCO₃ i mieszano przez 2 godziny. Na koniec całość odparowano razem z żelem krzemionkowym (0,063-0,200 mm) i naniesiono na kolumnę. Produkt wymywano układem C. Uzyskano 101,4 mg (0,40 mmol) z wydajnością 66%. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: R_f = 0,34 (D); ¹H NMR: δ 11.37 (s, 1H, NH), 7.79 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H6), 5.74 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H1'), 5.60 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H5), 5.18 (t, J = 4.8 Hz, 1H, 5'OH), 4.48 (d, J = 4.0 Hz, 1H, H2'), 4.21 (m, 1H, H4'), 3.78 (m, 1H, H5'a), 3.54 (m, 1H, H5'b), 2.10 (m, 1H, H3'a), 1.89 (m, 1H, H3'b); ¹³C NMR: δ 163.2 (C4), 150.3 (C2), 139.8 (C6), 101.0 (C5), 89.3 (C1'), 81.3 (C4'), 65.7 (C2'), 60.8 (C5'), 30.0 (C3'); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₉H₁₁N₅O₄+Na]⁺ 276,0709, znal. 276,0701, bł. -2,9 ppm.

2'-S-Toliltio-2',3'-dideoksyurydyna (288)

Trytylowany nukleozyd **281** (256,1 mg, 0,44 mmol) rozpuszczono w 10% roztworze CF₃COOH w DCM (CF₃COOH: 1 g, 0,651 mL; DCM: 9 g, 6,767 mL). Reakcję mieszano przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez odparowanie z izopropanolem (trzykrotnie). Następnie rozpuszczono mieszaninę w MeOH, dodano 100 mg NaHCO₃ i mieszano przez 2 godziny. Na koniec całość odparowano razem z żelem krzemionkowym (0,063-0,200 mm) i naniesiono na kolumnę. Produkt wymywano układem C. Uzyskano 121,1 mg (0,36 mmol) z wydajnością 82%. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: R_f = 0,54 (D); ¹H NMR: δ 11.21 (s, 1H, NH), 7.81 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.32 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ph^{or}), 7.12 (d, J = 7.6 Hz, 2H, Ph^m), 5.87 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H1'), 5.55 (dd, J = 2.0, 8.4 Hz, 1H, H5), 5.08 (t, J = 5.2 Hz, 1H, 5'OH), 4.15 (m, 1H, H4'), 3.91 (dd, J = 7.2, 13.2 Hz, 1H, H2'), 3.64 (m, 1H, H5'a), 3.49 (m, 1H, H5'b), 2.32 (m, 1H, H3'a), 2.26 (s, 3H, CH₃), 1.95 (m, 1H, H3'b);

^{13}C NMR: δ 162.9 (C4), 150.3 (C2), 140.2 (C6), 137.3 (Ph^p), 132.3 (Ph^{or}), 129.7 (Ph^m), 128.7 (Ph^{C-S}), 101.8 (C5), 88.8 (C1'), 79.1 (C4'), 62.4 (C5'), 49.0 (C2'), 32.0 (C3'), 20.6 (CH₃); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₁₆H₁₈N₂O₄S+Na]⁺ 357,0885, znal. 357,0881, bł. -1,1 ppm.

2'-Jodo-2',3'-dideoksyurydyna (289)

Nukleozyd **282** (376,1 mg, 0,65 mmol) rozpuszczono w 10% roztworze CF₃COOH w DCM (CF₃COOH: 1 g, 0,651 mL; DCM: 9 g, 6,767 mL). Reakcję mieszano przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez odparowanie z izopropanolem (trzykrotnie). Następnie rozpuszczono mieszaninę w MeOH, dodano 100 mg NaHCO₃ i mieszano przez 2 godziny. Na koniec całość odparowano razem z żelazem krzemionkowym (0,063-0,200 mm) i naniesiono na kolumnę. Produkt wymywano układem C. Uzyskano 183,3 mg (0,54 mmol) z wydajnością 83%. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: R_f = 0,09 (H); ^1H NMR: δ 11.35 (s, 1H, NH), 8.01 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H6), 6.13 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H1'), 5.58 (dd, J = 2.0, 8.0 Hz, 1H, H5), 5.18 (bs, 1H, 5'OH), 4.54 (m, 1H, H2'), 4.36 (m, 1H, H4'), 3.79 (dd, J = 2.8, 12.4 Hz, 1H, H5'a), 3.60 (dd, J = 3.2, 12.0 Hz, 1H, H5'b), 2.29 (m, 1H, H3'a), 2.18 (m, 1H, H3'b); ^{13}C NMR: δ 163.2 (C4), 150.4 (C2), 139.6 (C6), 101.1 (C5), 92.7 (C1'), 81.7 (C4'), 60.9 (C5'), 35.9 (C3'), 25.1 (C2'); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₉H₁₁N₂O₄I+Na]⁺ 360,9661, znal. 360,9654, bł. -1,9 ppm.

2'-(1H-[1,2,3]-Triazolo)-2',3'-dideoksyurydyna (290)

Nukleozyd **285** (298,0 mg, 0,57 mmol) rozpuszczono w 10% roztworze CF₃COOH w DCM (CF₃COOH: 1 g, 0,651 mL; DCM: 9 g, 6,767 mL). Reakcję mieszano przez 2 godziny. Następnie zatrzymano reakcję przez dodanie 10 mL MeOH/H₂O (1:1 v/v) i 300 mg NaHCO₃. Kontynuowano mieszanie przez 2 godziny. Produkt znalazł się w fazie wodnej, którą odparowano i oczyszczono na kolumnie w układzie C. Uzyskano 117,1 mg (0,42 mmol) z wydajnością 74%. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: R_f = 0,31 (D); ^1H NMR: δ 11.37 (s, 1H, NH), 8.26 (s, 1H, H5''), 8.09 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.80 (s, 1H, H4''), 5.76 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H1'), 5.58 (dd, J = 2.0, 8.4 Hz, 1H, H5), 5.46 (m, 1H, H2'), 4.56 (m, 1H, H4'), 4.10 (bs, 1H, 5'OH), 3.78 (dd, J = 12.0, 2.8 Hz, 1H, H5'a), 3.60 (dd, J = 12.0, 3.2 Hz, 1H, H5'b), 2.51 (m, H3'a,b);* ^{13}C NMR: δ 163.2 (C4), 150.4 (C2), 140.1 (C6), 133.6 (C4''), 124.7 (C5''), 101.7 (C5), 89.3 (C1'), 81.3 (C4'), 63.9 (C2'), 61.6 (C5'), 31.5 (C3'); Masa (ESI-MS) m/z oblicz dla [C₁₁H₁₃N₅O₄+H]⁺ 280,1046, znal 280,1048, bł. 0,7 ppm.

* Sygnały H3'a i H3'b nałożyły się z sygnałem od DMSO.

2',3'-Dideoksy-2',3'-didehydrourydyna (291)

Nukleozyd **283** (186,7 mg, 0,41 mmol) rozpuszczono w 10% roztworze CF₃COOH w DCM (CF₃COOH: 1 g, 0,651 mL; DCM: 9 g, 6,767 mL). Reakcję mieszano przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez dodanie 10 mL MeOH/H₂O (1:1 v/v) i 300 mg NaHCO₃. Kontynuowano mieszanie przez 2 godziny. Produkt znalazł się w fazie wodnej, którą odparowano i oczyszczono na kolumnie w układzie C. Uzyskano 74,8 mg (0,35 mmol) z wydajnością 85%. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: R_f = 0,78 (F); ¹H NMR: δ 11.30 (s, 1H, NH), 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 6.81 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H1'), 6.40 (m, 1H, H2'), 5.92 (m, 1H, H3'), 5.58 (dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, 1H, H5), 4.78 (s, 1H, H4'), 4.48 (bs, 1H, 5'OH), 3.58 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, H5'a,b); ¹³C NMR: δ 163.2 (C4), 150.8 (C2), 141.1 (C6), 135.1 (C2'), 125.7 (C3'), 101.5 (C5), 89.1 (C1'), 87.4 (C4'), 62.2 (C5'); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₉H₁₀N₂O₄+Na]⁺ 233,0538, znal. 233,0529, bł. -3,9 ppm.

2'-Amino-2',3'-dideoksyurydyna (292)

2'-Azydo-2',3'-dideoksyurydynę (**287**) (25,0 mg, 0,099 mmol) rozpuszczono w układzie MeOH/H₂O 9:1 (v/v) (4 mL), dodano Ph₃P (34.1 mg, 0,13 mmol) i mieszano w 50 °C przez 3 godziny. Następnie odparowano rozpuszczalniki i oczyszczono mieszaninę na kolumnie w układzie Y. Wyizolowano 21,9 mg produktu (0,096 mmol) z wydajnością 97%. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: R_f = 0,09 (F); ¹H NMR: δ 7.91 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 5.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5), 5.53 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, H1'), 5.04 (bs, 1H, 5'OH), 4.24 (m, 1H, H4'), 3.64 (dd, *J* = 3.6, 12.0 Hz, 1H, H5'a), 3.48 (dd, *J* = 3.6, 12.0 Hz, 1H, H5'b), 3.41 (m, 1H, H2'), 2.01 (m, 1H, H3'a), 1.71 (m, 1H, H3'b);* ¹³C NMR: δ 163.3 (C4), 150.8 (C2), 140.6 (C6), 101.1 (C5), 91.6 (C1'), 79.7 (C4'), 62.4 (C5'), 56.8 (C2'), 34.0 (C3'); ¹⁵N NMR (HMBC): δ 158.1 (N3), 147.2 (N1), 30.1 (2'NH₂); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₉H₁₁N₃O₄+Na]⁺ 248,0647, znal. 248,0652, bł. 2,0 ppm.

* sygnały NH i NH₂ są niewidoczne.

3'-Deoksytydyna (293)

4-N,2',5'-O,O-Tripiwaloilo-3'-deoksytydynę (**295**) (800,0 mg, 1,67 mmol,) rozpuszczono w 1M KOH/MeOH (20 mL). Reakcję prowadzono przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Zakończono ją przez zobojętnienie stężonym kwasem octowym. Następnie odparowano rozpuszczalnik i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie N. Frakcje z produktem zebrano, odparowano i wysuszono w próżni. Uzyskano 358,4 mg (1,58

mmol) produktu z wydajnością 95% w postaci gęstego oleju. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: $R_f = 0,22$ (N); $^1\text{HNMR}$: δ 7.91 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H6), 7.08 (bs, 1H, NH_2), 6.99 (bs, 1H, NH_2), 5.65 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H5), 5.64 (s, 1H, H1'), 5.46 (d, $J = 4$ Hz, 1H, 2'OH), 5.02 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H, 5'OH), 4.27 (m, 1H, H2'), 4.09 (m, 1H, H4'), 3.74 (m, 1H, H5'a), 3.53 (m, 1H, H5'b), 1.86 (m, 1H, H3'a), 1.69 (m, 1H, H3'b); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla $[\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4+\text{Na}]^+$ 250,0804, znal. 250,0805, bł. 0,4 ppm.

3'-O-Fenoksytiokarbonylo-4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydyna (294)

Suszoną tripiwaloilowaną cytydynę (**87**) (1,5 g, 3,03 mmol) rozpuszczono w pirydynie (20 mL) i zatężono do ok. 18 mL. Dodano DMAP (740,4 mg, 6,06 mmol, 2 ekw.), porcjami w temperaturze pokojowej dodano chlorek fenoksytiokarbonylu (785,5 mg, 4,55 mmol, 1,5 ekw.) i mieszano przez 6 godz. Następnie odparowano pirydynę, trzykrotnie odparowano z toluenem i ekstrahowano w układzie DCM/ $\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$. Fazę organiczną suszono nad MgSO_4 i rozdzielono w układzie K. Produkt zebrano, odparowano rozpuszczalnik i wysuszono w próżni. Uzyskano 1,7144 g (2,72 mmol) produktu w postaci białej, stałej piany z wydajnością 90%. $R_f = 0,72$ (M); $^1\text{HNMR}$: δ 10.51 (s, 1H, NH), 8.13 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H6), 7.50 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ph), 7.33 (m, 2H, Ph, H5), 7.13 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ph), 5.98 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H, H3'), 5.93 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H1'), 5.70 (dd, $J = 4,0, 2,4$ Hz, 1H, H2'), 4.61 (dd, $J = 4,8, 6,0$ Hz, 1H, H4'), 4.40 (m, 2H, H5'a, H5'b), 1.21, 1.20, 1.18 (3s, 27H, $9 \times \text{CH}_3^{\text{Piv}}$).

3'-Deoksy-4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydyna (295)

Suszony nukleozyd (**294**) (1,5 g, 2,38 mmol) rozpuszczono w toluenie (30 mL) i zatężono do ok. 28 mL. Dodano α,α' -aza-bis-izobutyrylonitryl (AIBN) (193,0 mg, 1,19 mmol, 0,5 ekw.) i przepuszczono argon przez 5 min. Następnie pipetą dodano wodorek tri-*n*-butyllocyny (2,7708 g, 9,52 mmol, 2,523 ml, 4 ekw.) i mieszano przez 4 godz. w 75 °C. Następnie odparowano rozpuszczalnik i rozdzielono w układzie K. Produkt zebrano, odparowano rozpuszczalnik i wysuszono w próżni. Uzyskano 819,3 mg (1,71 mmol) produktu z wydajnością 72%. $R_f = 0,57$ (M); $^1\text{HNMR}$: δ 10.44 (s, 1H, NH), 8.06 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H6), 7.28 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H5), 5.80 (s, 1H, H1'), 5.29 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H2'), 4.49 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H4'), 4.31 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H5'a, H5'b), 2.17 (m, 1H, H3'a), 1.97 (m, 1H, H3'b), 1.20, 1.18, 1.17 (3s, 27H, $9 \times \text{CH}_3^{\text{Piv}}$).

2'-Azydo-3'-O-mesylo-5'-O-trytylo-2'-deoksyurydyna (296)

Suszoną 2'-azydo-5'-O-trytylo-2'-deoksyurydynę (**268**) (500,0 mg, 0,98 mmol) rozpuszczono w 20 mL pirydyny i zatężono do ok. 18 mL. Następnie dodano MsCl (168,5 mg, 1,47 mmol, 114,0 μ L) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Mieszaninę odparowano z toluenem i ekstrahowano w układzie DCM/NaHCO_{3aq}. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i oczyszczono na kolumnie w układzie S. Otrzymano 471,9 mg produktu (0,80 mmol) z wydajnością 82%. TLC: R_f = 0,77 (H); ¹H NMR: δ 11.52 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, NH), 7.68 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₆), 7.34 (m, 15H, Tr), 5.80 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, H1'), 5.49 (dd, *J* = 2.0, 8.0 Hz, 1H, H₅), 5.41 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, H_{3'}), 4.83 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, H_{2'}), 4.22 (dd, *J* = 4.4, 8.8 Hz, 1H, H_{4'}), 3.35 (m, 2H, H_{5'a,b}), 3.27 (s, 3H, OMs); ¹³C NMR: δ 162.9 (C₄), 150.3 (C₂), 143.1 (Tr), 140.6 (C₆), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.3 (Tr), 102.0 (C₅), 87.5 (C_{1'}), 86.7 (Tr), 80.3 (C_{4'}), 76.2 (C_{3'}), 62.4 (C_{2'}), 61.2 (C_{5'}), 37.7 (OMs).

3'-O-Mesylo-2'-S-toliltio-5'-O-trytylo-2'-deoksyurydyna (297)

Suszoną 2'-S-toliltio-5'-O-trytylourydynę (**274**) (500,0 mg, 0,84 mmol) rozpuszczono w 20 mL pirydyny i zatężono do ok. 18 mL. Następnie dodano MsCl (144,3 mg, 1,26 mmol, 97,6 μ L) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Reakcja zaszła ilościowo (TLC). Mieszaninę odparowano z toluenem i ekstrahowano w układzie DCM/NaHCO_{3aq}. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i oczyszczono na kolumnie w układzie S. Otrzymano 537,3 mg produktu (0,80 mmol) z wydajnością 95%. TLC: R_f = 0,57 (J); ¹H NMR: δ 11.28 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, NH), 7.34 (m, 18H, Tr, Ph^{or}, H₆), 7.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ph^m), 6.09 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H, H1'), 5.39 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H_{3'}), 5.24 (dd, *J* = 2.0, 8.0 Hz, 1H, H₅), 4.35 (t, *J* = 4.0 Hz, 1H, H_{4'}), 4.19 (dd, *J* = 5.6, 9.6 Hz, 1H, H_{2'}), 3.43 (dd, *J* = 4.8, 10.4 Hz, 1H, H_{5'a}), 3.30 (H_{5'b}, OMs), * 2.22 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR: δ 162.3 (C₄), 150.3 (C₂), 143.1 (Tr), 139.9 (C₆), 132.9 (Ph^{or}), 129.9 (Ph^m), (Ph^{C-S}), ** 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.3 (Tr), 102.3 (C₅), 87.9 (C_{1'}), 86.9 (Tr), 82.5 (C_{4'}), 81.2 (C_{3'}), 62.1 (C_{5'}), 51.6 (C_{2'}), 38.2 (OMs), 20.6 (CH₃).

* Sygnały częściowo nałożone z sygnałem od H₂O. ** Sygnał Ph^{C-S} niewidoczny.

2'-Jodo-3'-O-mesylo-5'-O-trytylo-2'-deoksyurydyna (298)

Suszoną 2'-jodo-5'-O-trytylo-2'-deoksyurydynę (**275**) (281,5 mg, 0,47 mmol) rozpuszczono w 20 mL pirydyny i zatężono do ok. 18 mL. Następnie dodano MsCl (81,3 mg, 0,71 mmol, 55,0 μ L) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Reakcja poszła ilościowo (TLC). Mieszaninę odparowano z toluenem i ekstrahowano w układzie

DCM/NaHCO₃aq. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i oczyszczono na kolumnie w układzie S. Układ należało przesączyć wcześniej przez Al₂O₃. Otrzymano 306,8 mg produktu (0,45 mmol) z wydajnością 96%. TLC: R_f = 0,80 (H); ¹H NMR: δ 11.55 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, NH), 7.64 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.35 (m, 15H, Tr), 6.15 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H1'), 5.54 (dd, *J* = 2.0, 8.0 Hz, 1H, H5), 5.03 (dd, *J* = 2.8, 5.2 Hz, 1H, H3'), 4.87 (dd, *J* = 5.6, 8.0 Hz, 1H, H2'), 4.38 (dd, *J* = 4.4, 7.6 Hz, 1H, H4'), 3.37 (m, 2H, H5'a,b), 3.30 (s, 3H, OMs); ¹³C NMR: δ 162.7 (C4), 150.5 (C2), 143.2 (Tr), 139.6 (C6), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.3 (Tr), 102.5 (C5), 89.7 (C1'), 86.8 (Tr), 81.8 (C4'), 78.8 (C3'), 62.5 (C5'), 38.5 (OMs), 22.5 (C2').

3'-O-Mesylo-5'-O-trytylo-2,2'-anhydrourydyna (299)

Nukleozyd **298** (50,0 mg, 0,07 mmol) rozpuszczono w 4 mL DMF, zateżono do ok. 3,5 mL i dodano ftalimidek potasu (20,4 mg, 0,11 mmol). Reakcję prowadzono w 135 °C przez 10 godzin. Na TLC zaobserwowano ilościowe przereagowanie. Mieszaninę odparowano i oczyszczono na kolumnie w układzie G. Wyizolowano 35,3 mg (0,065 mmol) produktu z wydajnością 93%. TLC: R_f = 0,83 (D); ¹H NMR: δ 7.94 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H6), 7.28 (m, 15H, Tr), 6.43 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H1'), 5.86 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H5), 5.62 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H2'), 5.42 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H3'), 4.61 (m, 1H, H4'), 3.33 (OMs),* 3.11 (m, 1H, H5'a), 2.83 (m, 1H, H5'b); ¹³C NMR: δ 170.5 (C4), 158.9 (C2), 143.1 (Tr), 136.5 (C6), 128.0 (Tr), 127.7 (Tr), 127.2 (Tr), 109.1 (C5), 89.7 (C1'), 86.3 (Tr), 85.8 (C2'), 84.0 (C4'), 81.0 (C3'), 62.3 (C5'), 37.5 (OMs).

* Sygnał OMs nałożył się z sygnałem od H₂O. Jego obecność potwierdza HSQC.

2'-S-Toliltio-3'-O-trifluorometanosulfonylo-5'-O-trytylo-2'-deoksyurydyna (300)

Suszony nukleozyd **274** (0,9381 g, 1,58 mmol) rozpuszczono w 20 mL pirydyny, zateżono do ok. 18 mL i dodano 20 mL DCM. Schłodzono do t < 5 °C, dodano bezwodnik trifluorometanosulfonowy w pięciu porcjach (846,4 mg, 3,00 mmol, 504,8 μL, ekw. 1,9) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Reakcję zatrzymano przez dodanie MeOH (2 mL) i odparowano mieszaninę w temperaturze 18-20 °C. Następnie odparowano trzykrotnie całość z toluenem w obniżonej temperaturze i rozpuszczono w DCM (40 mL) zalkalizowanym na Al₂O₃. Przeprowadzono ekstrakcję z zimnym, wodnym, nasyconym roztworem Na₂CO₃. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie X. Otrzymano 815,5 mg produktu (1,13 mmol) z wydajnością 72%. TLC: R_f = 0,74 (R); ¹H NMR: δ 11.29 (s, 1H, NH), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H6), 7.31 (m, 17H, Tr, Ph^{or}),

7.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Ph^m), 6.70 (s, 1H, H1'), 6.24 (s, 1H, H3'), 4.97 (bs, 1H, H4'), 4.85 (dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, 1H, H5), 3.33 (H2', H5'a),* 3.11 (dd, $J = 2.0, 10.8$ Hz, 1H, H5'b), 2.30 (s, H3, CH₃); ¹³C NMR: δ 162.7 (C4), 150.4 (C2), 143.1 (Tr), 140.5 (C6), 139.0 (Ph^p), 133.2 (Ph^{or}), 130.7 (Ph^{C-S}), 130.3. (Ph^m), 128.3 (Tr), 127.9 (Tr), 127.2 (Tr), 101.8 (C5), 88.8 (C1'), 86.5 (Tr), 85.1 (C3'), 79.9 (C4'), 64.7 (C5'), 53.5 (C2'), 20.7 (CH₃).

* Sygnały H2' i H5'a nałożyły się z sygnałem od H₂O.

2'-S-Tolilitio-5'-O-trytylo-2,3'-anhydro-2'-deoksyurydyna (301)

Suszony nukleozyd (**300**) (0,5 g, 0,69 mmol) rozpuszczono w 30 mL acetonitrylu i dodano Et₃N (209,4 mg, 2,07 mmol, 262,7 μ L, 3 ekw.). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez odparowanie do sucha. Mieszaninę rozpuszczono w DCM i ekstrahowano wodnym roztworem NaCl. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie G. Otrzymano 327,8 mg produktu (0,57 mmol) z wydajnością 83%. TLC: $R_f = 0,20$ (C); ¹H NMR: δ 7.72 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, H6), 7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Ph^{or}), 7.31 (m, 17H, Tr, Ph^m), 5.97 (s, 1H, H1'), 5.81 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H5), 5.25 (t, $J = 1.2$ Hz, H1, H3'), 4.72 (m, 1H, H4'), 4.66 (s, 1H, H2'), 3.19 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, H5'a, H5'b), 2.31 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR: δ 170.0 (C4), 152.8 (C2), 143.2 (Tr), 140.7 (C6), 137.9 (Ph^p), 131.2 (Ph^{or}), 130.1 (Ph^m), 128.1 (Tr), 127.9 (Tr), 127.8 (Ph^{C-S}), 127.1 (Tr), 108.2 (C5), 88.9 (C1'), 86.4 (Tr), 82.4 (C4'), 79.5 (C3'), 62.4 (C5'), 49.3 (C2'), 20.6 (CH₃).

2'-Jodo-3'-O-trifluorometanosulfonylo-5'-O-trytylo-2'-deoksyurydyna (302)

Suszony nukleozyd **275** (850,0 mg, 1668 mmol) rozpuszczono w 20 mL pirydyny, zateżono do ok. 18 mL i dodano 20 mL DCM. Schłodzono do $t < 5$ °C, dodano bezwodnik trifluorometanosulfonowy w pięciu porcjach (1,1709 mg, 4,15 mmol, 698,2 μ L, ekw. 2,5) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Reakcja zaszła ilościowo (TLC). Reakcję zatrzymano przez dodanie MeOH (2 mL) i odparowano mieszaninę w temperaturze 18-20 °C. Następnie odparowano trzykrotnie całość z toluenem w obniżonej temperaturze i rozpuszczono w DCM (40 mL) zalkalizowanym na Al₂O₃. Przeprowadzono ekstrakcję z zimnym, wodnym, nasyconym roztworem Na₂CO₃. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄ i produkt oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie X. Otrzymano 498,7 mg produktu (0,68 mmol) z wydajnością 41%. TLC: $R_f = 0,74$ (R); ¹H NMR (CDCl₃): δ 8.80 (s, 1H, NH), 7.35 (m, 16H, Tr, H6), 5.92 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H1'), 5.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 5.39 (d,

$J = 5.2$ Hz, 1H, H3'), 5.10 (dd, $J = 5.2, 9.2$ Hz, 1H, H2'), 4.55 (s, 1H, H4'), 3.99 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H5'a), 3.87 (dd, $J = 10.8$ Hz, 1H, H5'b); ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 161.7 (C4), 149.6 (C2), 146.4 (Tr), 141.4 (C6), 127.9 (Tr), 127.4 (Tr), 126.8 (Tr), 103.4 (C5), 95.1 (C1'), 87.8 (C3'), 84.4 (C4'), 81.6 (Tr), 61.5 (C5'), 18.0 (C2').

1-(2'-Azydo-5'-O-trytylo- β -D-2'-deoksy-ksylofuranozyl)-2-O-metylouracyl (303)

Wodorotlenek sodu (3,6 mg, 0,09 mmol) rozpuszczono w MeOH_{abs} (4 mL) i dodano nukleozyd **269** (50,0 mg, 0,078 mmol). Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przez 18 godzin. Następnie mieszaninę odparowano i oczyszczono na kolumnie w układzie G. Wyizolowano 34,4 mg produktu (0,065 mmol) z wydajnością 72%. TLC: 0,26 (C); ^1H NMR: δ 7.34 (m, 16H, H6, Tr), 6.70 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H, H1'), 5.74 (m, 2H, H5, 3'OH), 4.35 (s, 1H, H2'), 4.29 (m, 1H, H4'), 4.06 (t, $J = 2.8$ Hz, 1H, H3'), 3.90 (s, 3H, CH_3), 3.44 (m, 1H, H5'a), 3.27 (m, 1H, H5'b); ^{13}C NMR: δ 169.7 (C4), 155.0 (C2), 143.5 (Tr), 137.4 (C6), 128.3 (Tr), 127.9 (Tr), 127.1 (Tr), 106.9 (C5), 90.1 (C1'), 86.2 (Tr), 83.2 (C4'), 72.5 (C3'), 71.0 (C2'), 62.1 (C5'), 55.3 (CH_3).

1-(2'-O-Metylo-5'-O-trytylo- β -D-ksylofuranozyl)uracyl (304)

Nukleozyd **264** (184,7 mg, 0,38 mmol) rozpuszczono w 5 mL 1M roztworu KOH/MeOH . Dodano kroplę wody i mieszano w 70°C przez 5 godzin. Następnie zobojętniono mieszaninę roztworem 1M $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{MeOH}$, ekstrahowano w układzie $\text{DCM}/\text{H}_2\text{O}$ i rozdzielono na kolumnie w układzie G. Wyizolowano 187,2 mg produktu (0,37 mmol) z wydajnością 97%. TLC: $R_f = 0,77$ (D); ^1H NMR: δ 11,36 (s, 1H, NH), 7.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 7,34 (m, 15H, Tr), 5.83 (s, 1H, H1'), 5.54 (m, 2H, H5, 3'OH), 4.23 (m, 1H, H4'), 4.05 (t, $J = 3.2$ Hz, 1H, H3'), 3.69 (s, 1H, H2'), 3.39 (m, 4H, H5'a, OCH_3), 3.25 (dd, $J = 3.6, 10.4$ Hz, 1H, H5'b); ^{13}C NMR: δ 163.2 (C4), 150.3 (C2), 143.6 (Tr), 140.7 (C6), 128.3 (Tr), 127.9 (Tr), 127.1 (Tr), 100.9 (C5), 89.9 (C2'), 88.8 (C1'), 86.1 (Tr), 82.5 (C4'), 71.9 (C3'), 62.2 (C5'), 57.3 (OCH_3).

1-(2'-Azydo-5'-O-trytylo- β -D-2'-deoksy-ksylofuranozyl)uracyl (305)

Nukleozyd **267** (110,0 mg, 0,23 mmol) rozpuszczono w 3 mL roztworu 1M KOH/MeOH , dodano kroplę wody i mieszano w 70°C przez siedem godzin. Zobojętniono 1M roztworem $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{MeOH}$ i związek oczyszczono na kolumnie w układzie S. Otrzymano 114,9 mg produktu (0,22 mmol) z wydajnością 96%. TLC: $R_f = 0,49$ (J); ^1H NMR: δ 11,41 (s, 1H, NH), 7.35 (m, 16H, H6, Tr), 5.82 (s, 1H, H1'), 5.77 (d, $J = 3.6$ Hz,

1H, 3'OH), 5.54 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 4.24 (s, 2H, H4', H2'), 4.09 (s, 1H, H3'), 3.40 (m, 1H, H5'a), 3.27 (m, 1H, H5'b); ^{13}C NMR: δ 163.1 (C4), 150.3 (C2), 143.5 (Tr), 139.9 (C6), 128.3 (Tr), 127.9 (Tr), 127.1 (Tr), 101.0 (C5), 88.5 (C1'), 86.3 (Tr), 82.3 (C4'), 72.7 (C3'), 70.6 (C2'), 62.2 (C5').

1-(2'-S-Tolilitio-5'-O-trytylo- β -D-2'-deoksy-ksylofuranozyl)uracyl (306)

Nukleozyd **301** (102,7 mg, 0,18 mmol) rozpuszczono w 3 mL roztworu 1M KOH/MeOH, dodano kroplę wody i mieszano w 70 °C przez siedem godzin. Zobojętniono 1M roztworem $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{MeOH}$ i otrzymany nukleozyd oczyszczono na kolumnie w układzie S. Otrzymano 102,8 mg (0,17 mmol) z wydajnością 94%. TLC: $R_f = 0,71$ (J); ^1H NMR: δ 11,29 (s, 1H, NH), 7.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 7.35 (m, 17H, Tr, Ph^{or}), 7.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph^m), 5.93 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H, H1'), 5.88 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, 3'OH), 5.46 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 4.27 (m, 1H, H4'), 4.05 (dd, $J = 4.0, 6.4$ Hz, 1H, H3'), 3.73 (dd, $J = 2.4, 3.2$ Hz, 1H, H2'), 3.41 (m, 1H, H5'a), 3.23 (m, 1H, H5'b), 2.27 (s, 3H, CH₃); ^{13}C NMR: δ 162.9 (C4), 150.3 (C2), 143.5 (Tr), 140.4 (C6), 137.3 (Ph^p), 131.6 (Ph^{or}), 129.9 (Ph^m), 129.1 (Ph^{C-S}), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.1 (Tr), 101.5 (C5), 88.1 (C1'), 86.4 (Tr), 81.4 (C4'), 73.9 (C3'), 62.6 (C5'), 57.3 (C2'), 20.6 (CH₃).

1-(2'-O-Metylo- β -D-ksylofuranozyl)uracyl (307)

Nukleozyd **304** (187,2 mg, 0,38 mmol) rozpuszczono w 10% roztworze CF_3COOH w DCM (CF_3COOH : 1 g, 0,651 mL; DCM: 9 g, 6,767 mL) i mieszano przez 2 godziny. Następnie zatrzymano reakcję przez odparowanie z izopropanolem (trzykrotnie). Rozpuszczono otrzymaną mieszaninę w MeOH, dodano 100 mg NaHCO_3 i mieszano przez 2 godziny. Na koniec całość odparowano razem z żelem krzemionkowym (0,063-0,200 mm) i naniesiono na kolumnę. Produkt wymywano układem C. Uzyskano 90,0 mg (0,35 mmol) z wydajnością 92%. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: $R_f = 0,29$ (D); ^1H NMR: δ 11.33 (s, 1H, NH), 7.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 5.76 (s, 1H, H1'), 5.65 (dd, $J = 2.4, 8.4$ Hz, 1H, H5), 5.55 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, 3'OH), 4.77 (bs, 1H, 5'OH), 4.07 (t, $J = 2.8$ Hz, 1H, H3'), 3.97 (m, 1H, H4'), 3.73 (m, 2H, H5'a, H2'), 3.66 (m, 1H, H5'b), 3.39 (s, 1H, OCH₃); ^{13}C NMR: δ 163.2 (C4), 150.3 (C2), 141.1 (C6), 101.1 (C5), 90.1 (C2'), 88.4 (C1'), 84.0 (C4'), 71.7 (C3'), 58.8 (C5'), 57.3 (OCH₃); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla $[\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6+\text{Na}]^+$ 281,0750, znal. 281,0743 bł. -2,5 ppm.

1-(2'-Azydo-β-D-2'-deoksy-ksylofuranozylo)uracyl (308)

Nukleozyd **305** (127,9 mg, 0,25 mmol) rozpuszczono w 10% roztworze CF₃COOH w DCM (CF₃COOH: 1 g, 0,651 mL; DCM: 9 g, 6,767 mL) i mieszano przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez odparowanie z izopropanolem (trzykrotnie). Następnie rozpuszczono mieszaninę w MeOH, dodano 100 mg NaHCO₃ i mieszano przez 2 godziny. Na koniec całość odparowano w obecności żelu krzemionkowego (0,063-0,200 mm). Żel z zaadsorbowaną mieszaniną reakcyjną naniesiono na kolumnę. Produkt wymywano układem C. Uzyskano 62,8 mg (0,23 mmol) z wydajnością 92%. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: R_f = 0,43 (D); ¹H NMR: δ 11.38 (s, 1H, NH), 7.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 5.76 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, H1', 3'OH), 5.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5), 4.84 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, 5'OH), 4.25 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H2'), 4.13 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H3'), 4.01 (dd, *J* = 5.6, 10.0 Hz, 1H, H4'), 3.70 (m, 2H, H5'a,b); ¹³C NMR: δ 163.2 (C4), 150.4 (C2), 140.4 (C6), 101.3 (C5), 87.6 (C1'), 83.5 (C4'), 72.5 (C3'), 70.5 (C2'), 58.9 (C5'); Masa (ESI-MS) *m/z* oblicz. dla [C₉H₁₁N₅O₅+Na]⁺ 292,0658, znal. 292,0655 bł. -1,0 ppm.

1-(2'-S-Tiotolilo-β-D-2'-deoksy-ksylofuranozylo)uracyl (309)

Nukleozyd **306** (82,0 mg, 0,13 mmol) rozpuszczono w 7,4 mL 10% roztworu CF₃COOH/DCM i mieszano przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez odparowanie z izopropanolem (trzykrotnie). Następnie rozpuszczono mieszaninę w MeOH, dodano 100 mg NaHCO₃ i mieszano przez 2 godziny. Na koniec mieszaninę zaadsorbowano na żelu krzemionkowym (0,063-0,200 mm) poprzez odparowanie i naniesiono całość na kolumnę. Produkt wymywano układem C. Uzyskano 40,4 mg (0,115 mmol) z wydajnością 88%. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: R_f = 0,57 (D); ¹H NMR: δ 11.29 (s, 1H, NH), 7.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H6), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ph^{or}), 7.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ph^m), 5.88 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H1'), 5.84 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, 3'OH), 5.60 (dd, *J* = 1.2, 8.0 Hz, 1H, H5), 4.78 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, 5'OH), 4.07 (m, 2H, H3', H4'), 3.75 (dd, *J* = 2.0, 4.0 Hz, 1H, H4'), 3.68 (m, 2H, H5'a,b), 2.28 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR: δ 163.0 (C4), 150.4 (C2), 140.8 (C6), 137.1 (Ph^p), 131.4 (Ph^{or}), 129.9 (Ph^m), 129.2 (Ph^{C-S}), 101.8 (C5), 87.6 (C1'), 82.9 (C4'), 73.6 (C3'), 59.3 (C5'), 57.1 (C2'), 20.6 (CH₃); Masa (ESI-MS) *m/z* oblicz. dla [C₁₆H₁₈N₂O₅S+Na]⁺ 373,0834, znal. 373,0824 bł. -2,7 ppm.

1-(2'-[1H-{1,2,3}-Triazolo]-5'-O-trytylo-β-D-2'-deoksy-ksylofuranozyl)uracyl (310)

Nukleozyd **267** (110,0 mg, 0,22 mmol) rozpuszczono w ACN (3 mL) i DCM (2 mL), następnie płukano roztwór argonem przez 5 minut. Dodano CuI (20,9 mg, 0,11 mmol), trimetylosililoacetylen (43,2 mg, 0,44 mmol, 62,2 μL) i Et₃N (3 mL). Kolbę szczelnie zamknięto i mieszano w 60 °C przez 18 godzin. Reakcję zatrzymano przez odparowanie i oczyszczono na kolumnie w układzie C. Produkt wysuszono i zważono. Otrzymano 96,6 mg związku (0,16 mmol) z wydajnością 73% [TLC: 0,06 (C)]. Wyizolowany produkt rozpuszczono w 3 mL 1M KOH/MeOH, dodano kroplę wody i mieszano w 70 °C przez 6 godzin. Reakcję zobojętniono 1M roztworem CH₃COOH/MeOH, odparowano i ekstrahowano w układzie DCM/H₂O. Fazę organiczną suszono nad Mg₂SO₄ i oczyszczono na kolumnie w układzie G. Otrzymano 84,2 mg (0,157 mmol) produktu z wydajnością 71% po dwóch etapach. TLC: 0,43 (C); ¹H NMR: δ 11.43 (s, 1H, NH), 8.29 (s, 1H, H5''), 7.84 (s, 1H, H4''), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.35 (m, 15H, Tr), 6.23 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H1'), 6.10 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, 3'OH), 5.63 (dd, *J* = 1.6, 8.0 Hz, 1H, H5), 5.23 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, H2'), 4.71 (m, 1H, H4'), 4.52 (dd, *J* = 2.8, 5.6 Hz, 1H, H3'), 3.49 (m, 1H, H5'a), 3.31 (H5'b);* ¹³C NMR: δ 163.0 (C4), 150.3 (C2), 143.5 (Tr), 139.8 (C6), 133.6 (C4''), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.1 (Tr), 125.3 (C5''), 101.9 (C5), 87.7 (C1'), 86.3 (Tr), 82.3 (C4'), 73.8 (C3'), 70.6 (C2'), 62.5 (C5').

* Sygnał H5'b nałożył się z sygnałem H₂O.

1-(2'-[1H-{1,2,3}-Triazolo]-β-D-2'-deoksy-ksylofuranozyl)uracyl (311)

Nukleozyd **310** (70,0 mg, 0,13 mmol) rozpuszczono w 7,4 mL 10% roztworu CF₃COOH/DCM i mieszano przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez odparowanie z izopropanolem (trzykrotnie). Następnie rozpuszczono mieszaninę w MeOH, dodano 100 mg NaHCO₃ i mieszano przez 2 godziny. Na koniec całość odparowano w obecności żelu krzemionkowego (0,063-0,200 mm) i całość naniesiono na kolumnę. Produkt wymywano układem D. Czystość RP-HPLC > 95%; Uzyskano 35,4 mg (0,12 mmol) z wydajnością 92%. TLC: R_f = 0,57 (F); ¹H NMR: δ 11.43 (s, 1H, NH), 8.31 (s, 1H, H5''), 7.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H6), 7.81 (s, 1H, H4''), 6.21 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H1'), 6.17 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, 3'OH), 5.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5), 5.25 (t, *J* = 4.0 Hz, 1H, H2'), 5.00 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, 5'OH), 4.62 (dd, *J* = 4.8, 8.8 Hz, 1H, H3'), 4.52 (dd, *J* = 4.8, 9.6 Hz, 1H, H4'), 3.49 (m, 2H, H5'a,b); ¹³C NMR: δ 163.0 (C4), 150.4 (C2), 140.3 (C6), 133.5 (C4''), 125.1 (C5''), 102.2 (C5), 86.6

(C1'), 83.1 (C4'), 73.3 (C3'), 70.1 (C2'), 59.3 (C5'); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla $[C_9H_{13}N_3O_5+H]^+$ 244,0933, znal. 244,0934, bł. 0,4 ppm.

1-(2'-Amino-β-D-2'-deoksy-ksylofuranozylo)uracyl (312)

Nukleozyd **308** (20,0 mg, 0,074 mmol) rozpuszczono w układzie MeOH/H₂O 9:1 (v/v) (4 mL), dodano Ph₃P (28,9 mg, 0,11 mmol) i mieszano w 50 °C przez 3 godziny. Następnie odparowano rozpuszczalniki i oczyszczono mieszaninę na kolumnie w układzie Y. Wyizolowano 16,8 mg produktu (0,069 mmol) z wydajnością 93%. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: R_f = 0,09 (F); ¹H NMR: δ 7.82 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H6), 5.62 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H5), 5.54 (d, J = 2.0 Hz, 1H, H1'), 5.33 (d, J = 3.6 Hz, 1H, 3'OH), 4.72 (bs, 1H, 5'OH), 4.14 (dd, J = 5.2, 8.8 Hz, 1H, H4'), 3.85 (s, 1H, H3'), 3.69 (m, 1H, H5'a), 3.65 (m, 1H, H5'b), 3.23 (s, 1H, H2');* ¹³C NMR: δ 163.3 (C4), 150.7 (C2), 141.4 (C6), 100.9 (C5), 91.1 (C1'), 83.2 (C4'), 75.7 (C3'), 64.7 (C2'), 59.4 (C5'); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla $[C_9H_{13}N_3O_5+H]^+$ 244.0933, znal. 244.0934, bł. 0.4 ppm.

* sygnały NH i NH₂ są niewidoczne.

1-(3'-O-Mesylo-2'-O-metylo-5'-O-trytylo-β-D-ksylofuranozylo)uracyl (313)

Suszony nukleozyd (**304**) (900,0 mg, 1,80 mmol) rozpuszczono w 25 mL Py i zatężono do ok. 23 mL. Następnie dodano chlorek mesylu (412,4 mg, 3,60 mmol, 279,0 μL) i mieszano w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Reakcję zakończono przez odparowanie pirydyny z toluenem i następnie wykonano ekstrakcję w układzie DCM/NaHCO₃aq. Fazę organiczną suszono nad MgSO₄, oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie T i następnie frakcje zawierające produkt ponownie rozdzielono w układzie S. Wyizolowano produkt z wydajnością 89% (927,5 g, 1,60 mmol); TLC: R_f = 0,23 (J); ¹H NMR: δ 11.46 (s, 1H, NH), 7.38 (m, 16H, Tr, H6), 5.87 (d, J = 1.6 Hz, 1H, H1'), 5.55 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H5), 5.25 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H3'), 4.46 (m, 1H, H4'), 4.12 (s, 1H, H2'), 3.45 (m, 4H, OMs, H5'a), 3.27 (dd, J = 4.0, 10.4 Hz, 1H, H5'b), 3.09 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR: δ 163.0 (C4), 150.2 (C2), 143.2 (Tr), 139.2 (C6), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.2 (Tr), 101.7 (C5), 88.7 (C1'), 87.3 (C2'), 86.6 (Tr), 80.0 (C3', C4'), 61.3 (C5'), 57.8 (MeO), 37.5 (MsO).

2'-O-Metylo-3'-S-tolilitio-5'-trytylo-3'-deoksyurydyna (314).

Suszony nukleozyd **313** (50,0 mg, 0,09 mmol) rozpuszczono w 4 mL DMF i zatężono do ok. 3 mL. Dodano *p*-tiokrezol (28,6 mg, 0,23 mmol) oraz ftalimidek potasu (2,0 mg, 0,01

mmol). Reakcję prowadzono w temperaturze 120 °C przez 18 godzin. Reakcję zatrzymano przez odparowanie, następnie oczyszczono na kolumnie żelowej w układzie W. Wyizolowano 42,4 mg (0,07 mmol, 78%) produktu. TLC: $R_f = 0,49$ (J); $^1\text{H NMR}$: δ 11.38 (s, 1H, NH), 7.91 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H6), 7.23 (m, 17H, Tr, Ph^{or}), 7.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ph^m), 5.83 (s, 1H, H1'), 5.03 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H5), 4.19 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H2'), 4.13 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, H4'), 3.96 (dd, $J = 5.2, 10.4$ Hz, 1H, H3'), 3.49 (s, 3H, MeO), 3.33 (m, H5'a),* 3.21 (dd, $J = 4.0, 11.2$ Hz, 1H, H5'b), 2.21 (s, 3H, CH₃); $^{13}\text{C NMR}$: δ 163.2 (C4), 150.1 (C2), 143.0 (Tr), 140.3 (C6), 136.4 (Ph^p), 130.8 (Ph^{or}), 129.7 (Ph^m),** 127.2 (Tr), 100.8 (C5), 88.1 (C1'), 86.6 (Tr), 85.0 (C2'), 83.8 (C4'), 61.5 (C5'), 58.1 (MeO), 48.8 (C3'), 20.6 (CH₃).

* Sygnał H5'a nałożył się z sygnałem od H₂O; ** Sygnał Ph^{C-S} jest niewidoczny.

3'-Azydo-2'-O-metylo-5'-trytylo-3'-deoksyurydyna (315).

Suszony nukleozyd **313** (50,0 mg, 0,09 mmol) i LiN₃ (8,4 mg, 0,17 mmol) dodano do suchego DMF (4 mL) i zatężono do ok. 3,5 mL. Roztwór mieszano w T = 135 °C przez noc. Następnie rozpuszczalnik odparowano. Mieszaninę rozdzielono na kolumnie żelowej w układzie S. Zebrano frakcje z produktem, odparowano i wysuszono uzyskując 9,0 mg (0,02 mmol, 22%) związku. TLC: $R_f = 0,43$ (J); $^1\text{H NMR}$: δ 11.45 (s, 1H, NH), 7.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 7.34 (m, 15H, Tr), 5.50 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H1'), 5.34 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 4.37 (dd, $J = 5.6, 8.0$ Hz, 1H, H3'), 4.24 (dd, $J = 2.8, 5.2$ Hz, 1H, H2'), 4.06 (m, 1H, H4'), 3.48 (s, 3H, MeO), 3.33 (m, H5'a,b);* $^{13}\text{C NMR}$: δ 163.0 (C4), 150.2 (C2), 143.2 (Tr), 140.3 (C6), 128.3 (Tr), 128.0 (Tr), 127.3 (Tr), 101.6 (C5), 87.5 (C1'), 86.7 (Tr), 82.9 (C2'), 79.7 (C4'), 62.2 (C5'), 58.4 (C3'), 58.1 (MeO).

* Sygnał H5'a,b nałożył się z sygnałem of H₂O.

1-(3'-O-Mesylo-2'-O-metylo- β -D-ksylofuranozyl)uracyl (316)

Nukleozyd **313** (409,3 mg, 0,71 mmol) rozpuszczono w 7,4 mL 10% roztworu CF₃COOH/DCM i mieszano przez 2 godziny. Reakcję zatrzymano przez odparowanie z izopropanolem (trzykrotnie). Rozpuszczono mieszaninę w MeOH, dodano 100 mg NaHCO₃ i mieszano przez 2 godziny. Mieszaninę odparowano i naniesiono na kolumnę. Produkt wymywano układem G. Uzyskano 202,4 mg (0,60 mmol) produktu z wydajnością 84%. TLC: $R_f = 0,11$ (C); $^1\text{H NMR}$:* δ 7.50 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H6), 5.82 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H1'), 5.69 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1H, H5), 5.17 (dd, $J = 1.2, 3.6$ Hz, 1H, H3'), 4.22 (dd, $J = 6.0, 8.8$ Hz, 1H, H4'), 4.13 (s, 1H, H2'), 3.73 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H, H5'a,b), 3.44 (OMe), 3.30 (OMs); $^{13}\text{C NMR}$:

δ 163.1 (C4), 150.3 (C2), 139.7 (C6), 101.9 (C5), 88.1 (C1'), 87.3 (C2'), 81.4 (C4'), 79.8 (C3'), 58.3 (C5'), 57.8 (MeO), 37.6 (MsO).

* Sygnały wymienne od grup NH i 5'OH są niewidoczne.

3'-Azydo-2'-O-metylo-3'-deoksyurydyna (317).

Suszony nukleozyd **316** (50,0 mg, 0,15 mmol) i LiN₃ (14,7 mg, 0,30 mmol) dodano do suchego DMF (4 mL) i zatężono do ok. 3,5 mL. Roztwór mieszano w T = 135 °C przez noc. Następnie rozpuszczalnik odparowano. Mieszaninę rozdzielono na kolumnie żelowej w układzie G. Zebrano frakcje z produktem, odparowano i wysuszono uzyskując 19,8 mg (0,07 mmol, 47%) związku. Czystość RP-HPLC > 95%; TLC: R_f = 0,63 (D); ¹H NMR: δ 11.07 (bs, 1H, NH), 7.93 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H6), 5.82 (d, J = 4.0 Hz, 1H, H1'), 5.66 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H5), 5.36 (bs, H1, 5'OH), 4.21 (m, 2H, H2', H3'), 4.23 (m, 1H, H4'), 3.71 (m, 1H, H5'a), 3.58 (m, 1H, H5'b), 3.45 (s, 3H, OMe); ¹³C NMR: δ 163.0 (C4), 150.4 (C2), 140.2 (C6), 101.8 (C5), 86.5 (C1'), 83.0 (C2'), 82.0 (C4'), 60.0 (C5'), 58.7 (C3'), 58.1 (MeO); Masa (ESI-MS) m/z oblicz. dla [C₁₀H₁₃N₅O₅+Na]⁺ 306,0814, znal. 306,0803, bł. -3,6 ppm.

5. Bibliografia

1. Blackburn, G.M.; Gait, M.J. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Oxford University Press, Oxford 2006, ISBN: 0-19-963533-1.
2. Bredereck, H. Nucleinsäuren, *Angew. Chem.*, **1934**, 47, 290-293
3. Horwitz, J.P.; Chua, J.; Noel, M. Nucleosides. V. The Monomesylates of 1-(2'-Deoxy- β -D-lyxofuranosyl)thymine, *J. Org. Chem.*, **1964**, 29, 7, 2076–2078.
4. Mitsuya, H.; Weinhold, K.J.; Furman, P.A.; St Clair, M.H.; Lehrman, S.N. *et al.* 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 7096-7100.
5. De Clercq, E.; Neyts, J. Antiviral agents acting as DNA or RNA chain terminators, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **2009**, 189, 53-84.
6. Boryski, J. Aktywność antywirusowa analogów nukleozydowych i jej zastosowanie w celach terapeutycznych, w: Barciszewski, J.; Łastowski, K.; Twardowski, T. *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie*, Wyd. Sorus 1996, Poznań, ISBN: 8385599835, 241-269.
7. Prusoff, W. H. Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine, *Biochim. Biophys. Acta*, **1959**, 32, 1, 295–256.
8. Herrmann, H.C. Plaque Inhibition Test for Detection of Specific Inhibitors of DNA Containing Viruses, *Exp. Biol. Med.*, **1961**, 107, 1, 142-145.
9. De Clercq, E. Discovery and development of BVDU (brivudin) as a therapeutic for the treatment of herpes zoster, *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, 68, 2301–2315.
10. De Clercq, E.; Walker, R.T. *Antiviral Drug Development. A Multidisciplinary Approach*, Plenum Press, New York 1988, ISBN: 0-306-42796-6
11. Geng, L.; Huehls, A.M.; Wagner, J.M.; Huntoon, C.J.; Karnitz, L.M. Checkpoint signaling, base excision repair, and PARP promote survival of colon cancer cells treated with 5-fluorodeoxyuridine but not 5-fluorouracil. *PLoS One*, **2011**, 6, 12, 1-10.
12. McGuigan, C.; Yarnold, C.J.; Jones, G.; Velazquez, S.; Barucki, H. *et al.* Potent and Selective Inhibition of Varicella-Zoster Virus (VZV) by Nucleoside Analogues with an Unusual Bicyclic Base, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 22, 4479-4484.
13. McGuigan, C.; Pathirana, R.N.; Snoeck, R.; Endrei, G.; De Clercq, E. Discovery of a New Family of Inhibitors of Human Cytomegalovirus (HCMV) Based upon Lipophilic Alkyl Furano Pyrimidine Dideoxy Nucleosides: Action via a Novel Non-Nucleosidic Mechanism, *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 7, 1847-1851.

-
14. Focher, F.; Hildebrand, C.; Freese, S.; Ciarrocchi, G.; Noonan, T. *et al.* N2-Phenyldeoxyguanosine: a novel selective inhibitor of herpes simplex thymidine kinase, *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 8, 1496-1500.
 15. De Clercq, E.; Bergstrom, D.E.; Holý, A.; Montgomery, J.A. Broad-spectrum antiviral activity of adenosine analogues. *Antiviral Res.*, **1984**, 4, 119-133.
 16. De Clercq, E.; Bernaerts, R.; Bergstrom, D.E.; Robins, M.J.; Montgomery, J.A.; Holý, A. Antirhinovirus Activity of Purine Nucleoside Analogs, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1986**, 482-487.
 17. Rousseau, R.J.; Townsend, L.B.; Robins, R.K. The synthesis of 4-amino- β -D-ribofuranosylimidazo[4,5-c]pyridine (3-dezaadenosine) and related nucleotides, *Biochemistry*, **1966**, 5, 756
 18. Sidwell, R.W.; Huffman, J.H.; Khare, G.P.; Allen, L.B.; Witkowski, J.T.; Robins, R.K. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide, *Science*, **1972**, 177, 705.
 19. Graci, J.D.; Cameron, C.E.; Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses, *Rev. Med. Virol.*, **2006**, 16, 1, 37-48.
 20. Crotty, S.; Maag, D.; Arnold, J.J.; Zhong, W.; Lau, J.Y.N. *et al.* The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen, *Nat. Med.*, **2000**, 6, 12, 1375-1379.
 21. Krajczyk, A. *Nukleozydy 4,5-dipodstawione 1,2,3-triazolu i ich pochodne bicykliczne*, Rozprawa doktorska, IChB PAN, Poznań 2015.
 22. Zhu, R.; Wang, M.; Xia, Y.; Qu, F.; Neyts, J.; Peng, L. Arylethynyltriazole acyclonucleosides inhibit hepatitis C virus replication, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 11, 3321-3327.
 23. Wan, J.; Xia, Y.; Liu, Y.; Wang, M.; Rocchi, P. *et al.* Discovery of novel arylethynyltriazole ribonucleosides with selective and effective antiviral and antiproliferative activity, *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 4, 1144-1155.
 24. Liu, W.Y.; Li, H.Y.; Zhao, B.X.; Shin, D.S.; Lian, S.; Miao, J.Y. Synthesis of novel ribavirin hydrazone derivatives and anti-proliferative activity against A549 lung cancer cells, *Carbohydr. Res.*, **2009**, 344, 11, 1270-1275.
 25. Ishikawa, H. Mizoribine and mycophenolate mofetil, *Curr. Med. Chem.*, **1999**, 6, 7, 575-597.
 26. Minakawa, N.; Takeda, T.; Sasaki, T.; Matsuda, A.; Ueda, T. Nucleosides and nucleotides. 96. Synthesis and antitumor activity of 5-ethynyl-1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives, *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 2, 778-786.
 27. Srivastava, P. C.; Pickering, M. V.; Allen, L. B.; Streeter, D. G.; Campbell, M. T. *et al.* Synthesis and antiviral activity of certain thiazole C nucleosides, *J. Med. Chem.*, **1977**, 20, 2, 256-262.

-
28. Tricot, G.; Jayaram, H.N.; Weber, G.; Hoffman, R. Tiazofurin: biological effects and clinical uses, *Int. J. Cell Cloning*, **1990**, 8, 3, 161-170.
 29. Srivastava, P.C.; Robins, R.K. Synthesis and antitumor activity of 2- β -D-ribofuranosylselenazole-4-carboxamide and related derivatives, *J. Med. Chem.*, **1983**, 26, 3, 445-448.
 30. Haneishi, T.; Okazaki, T.; Hata, T.; Tamura, C.; Nomura, M. *et al.* Oxazinomycin, a new carbon-linked nucleoside antibiotic, *J. Antibiot.*, **1971**, 11, 797-799.
 31. De Clercq, E. C-Nucleosides To Be Revisited, *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 6, 2301-11.
 32. Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 11, 2004-2021.
 33. Ostrowski, T.; Januszczuk, P.; Cieslak, M.; Kazmierczak-Baranska, J.; Nawrot, B. *et al.* 5-Ethynyl-1- β -D-ribofuranosyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid amide (ETCAR) and its analogues: Synthesis and cytotoxic properties, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, 19, 4386-4398.
 34. Amblard, F.; Cho, J.H.; Schinazi, R.F. Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleosides, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 4207-4220.
 35. Elion, G.B.; Furman, P.A.; Fyfe, J.A.; de Miranda, P.; Beauchamp; Schaeffer, H.J. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1977**, 74, 12, 5716-5720.
 36. Field, A.K.; Davies, M.E.; DeWitt, C. Perry, H.C.; Liou, R. *et al.* 9-([2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]-methyl)guanine: a selective inhibitor of herpes group virus replication *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1983**, 80, 13, 4139-4143.
 37. Smee, D.F.; Martin, J.C.; Verheyden, J.P.H.; Matthews, T.R. Anti-herpesvirus activity of the acyclic nucleoside 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1983**, 23, 5, 676-682.
 38. Freitas, V.R.; Smee, D.F.; Chernow, M.; Boehme, R.; Matthews, T.R. Activity of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine compared with that of acyclovir against human, monkey, and rodent cytomegaloviruses *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1985**, 28, 2, 240-245.
 39. Krenitsky, T.A.; Hall, W.W.; De Miranda, P. 6-Deoxyacyclovir: A xanthine oxidase-activated prodrug of acyclovir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, 81, 10 I, 3209-3213.
 40. De Clercq, E.; Descamps, J.; De Somer, P.; Holý, A. (S)-9-(2,3-Dihydroxypropyl)adenine: An Aliphatic Nucleoside Analog with Broad-Spectrum Antiviral Activity, *Science*, **1978**, 200, 4341, 563-565.
 41. De Clercq, E. The Holý Trinity: The Acyclic Nucleoside Phosphonates, w. De Clercq, E. *Antiviral agents*, Elsevier 2013, San Diego, ISBN: 978-0-12-405880-4

-
42. Agrofoglio, L.A.; Challand, S.R. *Acyclic, Carbocyclic and L-nucleosides*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1998, ISBN: 978-94-010-3734-1
 43. Borchardt, R.; Keller, B.; Patel-Thrombe, U. Neplanocin A, a potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and of vaccinia virus multiplication in mouse L929 cells, *J. Biol. Chem.*, **1984**, 259, 7, 4353-4358.
 44. De Clercq, E. Antiviral and antimetabolic activities of neplanocins. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **1985**, 28, 1, 84-89.
 45. Shuto, S.; Obara, T.; Saito, Y.; Andrei, G.; Snoeck, R. *et al.* A. New neplanocin analogues. 6. Synthesis and potent antiviral activity of 6'-homoneplanocin A, *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 12, 2392-2399.
 46. De Clercq, E.; Murase, J.; Marquez, V. Broad-spectrum antiviral and cytotoxic activity of cyclopentenylcytosine, a carbocyclic nucleoside targeted at CTP synthetase, *Biochem. Pharmacol.*, **1991**, 41, 12, 1821-1829.
 47. Marquez, V.E.; Lim, M.I.; Treanor, S.P.; Plowman, J.; Priest, M.A. *et al.* Cyclopentenylcytosine. A carbocyclic nucleoside with antitumor and antiviral properties, *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 9, 1687-1694.
 48. Hasobe, M.; Liang, H.; Ault-Riche, D.B.; Borcharding, D.R.; Wolfe, M.S.; Borchardt, R.T. (1'R,2'S,3'R)-9-(2',3'-Dihydroxycyclopentan-1'-yl)-adenine and -3-deaza-adenine: Analogues of aristeromycin which exhibit potent antiviral activity with reduced cytotoxicity, *Antivir. Chem. Chemother.*, **1993**, 4, 4, 245-248.
 49. De Clercq, E. John Montgomery's legacy: carbocyclic adenosine analogues as SAH hydrolase inhibitors with broad-spectrum antiviral activity, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, **2005**, 24, 10, 1395-1415.
 50. Dunham, E.W.; Vince, R. Hypotensive and renal vasodilator effects of carbocyclic adenosine (aristeromycin) in anesthetized spontaneously hypertensive rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1986**, 238, 3, 954-959.
 51. Shealy, Y.F.; O'Dell, C.A.; Shannon, W. M.; Arnett, G.J. Synthesis and Antiviral Activity of Carbocyclic Analogues of 2'-Deoxyribofuranosides of 2-Amino-6-substituted-purines and of 2-Amino-6-substituted-8-azapurines, *J. Med. Chem.*, **1984**, 27, 11, 1416 – 1421.
 52. Parker, W.B.; Shaddix, S.C.; Allan, P.W.; Arnett, G.; Rose, L.M. *et al.* Incorporation of the carbocyclic analog of 2'-deoxyguanosine into the DNA of herpes simplex virus and of HEp-2 cells infected with herpes simplex virus, *Mol. Pharmacol.*, **1992**, 41, 2, 245-251.
 53. Borthwick, A.D.; Kirk, B.E.; Biggadike, K.; Exall, A.M.; Butt, S. *et al.* Fluorocarbocyclic nucleosides: Synthesis and antiviral activity of 2'- and 6'-fluorocarbocyclic 2'-deoxy guanosines, *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 3, 907-914.

-
54. Bisacchi, G.S.; Chao, S.T.; Bachard, C.; Daris, J.P.; Innaimo, S. *et al.* BMS-200475, a novel carbocyclic 2'-deoxyguanosine analog with potent and selective anti-hepatitis B virus activity in vitro, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 127.
 55. Balzarini, J.; De Clercq, E.; Baumgartner, H.; Bodenteich, E.; Griengl, H. Carbocyclic 5-iodo-2'-deoxyuridine (C-IDU) and carbocyclic (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (C-BVDU) as unique examples of chiral molecules where the two enantiomeric forms are biologically active: interaction of the (+)- and (-)-enantiomers of C-IDU and C-BVDU with the thymidine kinase of herpes simplex virus type 1. *Mol. Pharmacol.*, **1990**, 37, 3, 395-401.
 56. Nishiyama, Y.; Yamamoto, N.; Takahash, K.; Shimada, N. Selective inhibition of human cytomegalovirus replication novel nucleoside, oxetanocin G, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1988**, 32, 7, 1053-1056.
 57. Vince, R.; Hua, M. Synthesis and anti-HIV activity of carbocyclic 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy 2,6-disubstituted purine nucleosides, *J. Med. Chem.*, **1990**, 33, 1, 17-21.
 58. Daluge, S.M.; Good, S.S.; Faletto, M.B.; Miller, W.H.; St. Clair, M.H. *et al.* 1592U89, a novel carbocyclic nucleoside analog with potent, selective anti-human immunodeficiency virus activity, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**, 41, 5, 1082-1093.
 59. Coates, J.A.V.; Cammack, N.; Jenkinson, H.J.; Mutton, I.M.; Pearson, B.A. *et al.* The separated enantiomers of 2'-deoxy-3'-thiacytidine (BCH 189) both inhibit human immunodeficiency virus replication in vitro, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, 36, 1, 202-205.
 60. Schinazi, R. F.; McMillan, A.; Cannon, D.; Mathis, R.; Lloyd, R.M. *et al.* Selective inhibition of human immunodeficiency viruses by racemates and enantiomers of cis-5-fluoro-1-[2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl]cytosine, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, 26, 11, 2423-2431.
 61. Chu, C.K.; Ahn, S.; Kim, H.; Beach, J.W.; Alves, A.J. *et al.* Asymmetric synthesis of enantiomerically pure (-)-(1'R,4'R)-dioxolane-thymine and its anti-HIV activity *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 31, 3791-3794.
 62. Gosselin, G.; Schinazi, R.F.; Sommadossi, J.P.; Mathé, C.; Bergogne, M.C. *et al.* Anti-human immunodeficiency virus activities of the β -L enantiomer of 2',3'-dideoxycytidine and its 5-fluoro derivative in vitro, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, 38, 6, 1292-1297.
 63. Chu, C.K.; Ma, T.; Shanmuganathan, K.; Wang, C.; Xiang, Y. *et al.* Use of 2'-fluoro-5-methyl- β -L-arabinofuranosyluracil as a novel antiviral agent for hepatitis B virus and Epstein-Barr virus *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1995**, 39, 4, 979-981.
 64. Lewis, W.; Day, B.J.; Copeland, W.C. Mitochondrial Toxicity of NRTI Antiviral Drugs: an Integrated Cellular Perspective, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2003**, 2, 10, 812-822.
 65. Gotlieb, D.; Shaw, P.D. *Antibiotics I Mechanism of Action*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, 1967, ISBN: 978-3-662-37649-2

-
66. Niitsuma, M.; Hashida, J.; Iwatsuki, M.; Mori, M.; Ishiyama, A. *et al.* Sinefungin VA and dehydrosinefungin V, new antitrypanosomal antibiotics produced by *Streptomyces* sp. K05-0178, *J. Antibiot.*, **2010**, 63, 673-679.
67. Velazquez, S.; San-Felix, A.; Perez-Perez, M.J.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Camarasa, M.J. TSAO analogs. 3. Synthesis and anti-HIV-1 activity of 2',5'-bis-O-(tert-butylidimethylsilyl)- β -D-ribofuranosyl 3'-spiro-5''-(4''-amino-1'',2''-oxathiole-2'',2''-dioxide)purine and purine-modified nucleosides *J. Med. Chem.*, **1993**, 36, 22, 3230-3239.
68. Agarwal, R.P.; Mian, A.M. Thymidine and zidovudine metabolism in chronically zidovudine-exposed cells in vitro, *Biochem. Pharmacol.*, **1991**, 42, 4, 905-911.
69. Pomerantz, R.J. Reservoirs of Human Immunodeficiency Virus Type 1 The Main Obstacles to Viral Eradication, *Clin. Infect. Dis.*, **2002**, 34, 1, 91-97.
70. Connolly, K.; Hammer, S. Antiretroviral therapy: Reverse transcriptase inhibition, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1992**, 36, 2, 245-254.
71. Scholar, E. M.; Pratt, W.B. *The Antimicrobial Drugs Second Edition*, Oxford University Press, New York, 2000, ISBN: 0-19-512-529-0.
72. Sarafianos, S.G.; Marchand, B.; Das, K.; Himmel, D.M.; Parniak, M.A. *et al.* Structure and Function of HIV-1 Reverse Transcriptase: Molecular Mechanisms of Polymerization and Inhibition, *J. Mol. Biol.*, **2009**, 385, 3, 693-713.
73. Sarafianos, S.G.; Clark, A.C. Jr; Das, K.; Tuske, S.; Birktoft, J.J. *et al.* Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA, *EMBO J.*, **2002**, 21, 23, 6614-6624.
74. Sirivolu, V.R.; Vernekar, S.K.; Ilina, T.; Myshakina, N.S.; Parniak, M.A.; Wang, Z. Clicking 3'-Azidothymidine into Novel Potent Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus, *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 21, 8765-8780.
75. Mitsuya, H.; Broder, S. Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotrophic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, 83, 6, 1911-1915.
76. Yarchoan, R.; Mitsuya, H.; Thomas, R.V.; Pluda, J.M.; Hartman, N.R. *et al.* In vivo activity against HIV and favorable toxicity profile of 2',3'-dideoxyinosine, *Science*, **1989**, 245, 4916, 412-415.
77. Beskid, G.; Eskin, B.; Cleeland, R.; Siebelist, J.; Cappetta, A. *et al.* Antibacterial activity of 2',3'-dideoxyadenosine in vivo and in vitro, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1981**, 19, 3, 424-428.
78. Horowitz, J.P.; Chua, J.; Noel, M.; Donatt, J.T. Nucleosides. XI. 2',3'-Dideoxycytidine, *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 3, 817-818.

-
79. Perno, C.-F.; Yarchoan, R.; Cooney, D.A.; Hartman, N.R.; Gartnar, S. *et al.* Inhibition of Human Immunodeficiency virus (HIV1/HTLVIII-L) Replication in Fresh and Cultured Human Peripheral Blood Monocytes/Macrophages by Azidothymidine and Related 2',3'-Dideoxynucleosides, *J. Exp. Med.*, **1988**, 168, 3, 1111-1125.
 80. Chen, C.-H.; Chen, Y.-C. Delayed Cytotoxicity and Selective Loss of Mitochondrial DNA in Cells Treated with the Anti-human Immunodeficiency Virus Compound 2',3'-Dideoxycytidine, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 20, 11934-11937.
 81. Dahlberg, J.E.; Mitsuya, H.; Blam, S.B.; Broder, S.; Aaronson, S.A. Broad spectrum antiretroviral activity of 2',3'-dideoxynucleosides, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 8, 2469-2473.
 82. Patton, J.T.; Davis, N.L.; Wertz, G.W. Inhibition of vesicular stomatitis virus RNA synthesis by 2',3'-dideoxycytidine 5'-triphosphate, *J. Gen. Virol.*, **1983**, 64, 3, 743-748.
 83. Waqar, M.A.; Evans, M.J.; Manly, K.F.; Hughes, R.G.; Huberman, J.A. Effects of 2',3'-dideoxynucleosides on mammalian cells and viruses, *J. Cell Physiol.*, **1984**, 121, 2, 402-408.
 84. White, E.L.; Parker, W.B.; Macy, L.J.; Shaddix, S.C.; McCaleb, G. *et al.* Comparison of the effect of Carbovir, AZT, and dideoxynucleoside triphosphates on the activity of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and selected human polymerases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1989**, 161, 2, 393-398.
 85. Frank, K.B.; McKernan, P.A.; Smith, R.A.; Smee, D.F. Visna virus as an in vitro model for human immunodeficiency virus and inhibition by ribavirin, phosphonoformate, and 2',3'-dideoxynucleosides, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1987**, 31, 9, 1369-1374.
 86. Suzuki, S.; Lee, B.; Luo, W.; Tovell, D.; Robins, M.J.; Tyrrell, D.L. Inhibition of duck hepatitis B virus replication by purine 2',3'-dideoxynucleosides, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, 156, 3, 1144-1151.
 87. Wu, J.C.; Chernov, M.; Boehme, R.E.; Suttman, R.T.; McRoberts, M.J. Kinetics and Inhibition of Reverse Transcriptase from Human and Simian Immunodeficiency Viruses, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1988**, 32, 12, 1887-1890.
 88. Baba, M.; Pauwels, R.; Balzarini, J.; Herdewijn, P.; De Clercq, E. Selective inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) by 3'-azido-2',3'-dideoxyguanosine in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1987**, 145, 3, 1080-1086.
 89. Horwitz, J.P.; Chua, J.; Da Rooge, M.A.; Noel, M. Nucleosides. VIII. Synthesis of 2',3'-unsaturated pyrimidine nucleosides from oxetane derivatives, *Tetrahedron Lett.*, **1964**, 5, 38, 2725-2727.
 90. Mansuri, M.M; Hitchcock, M.J.; Buroker, R.A.; Bregman, C.L.; Ghazzouli, I. *et al.* Comparison of in vitro biological properties and mouse toxicities of three thymidine analogs active against human immunodeficiency virus, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1990**, 34, 4, 637-641.

-
91. Browne, M.J.; Mayer, K.H.; Chafee, S.B.; Dudley, M.N.; Posner, M.R. *et al.* 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine (d4T) in patients with AIDS or AIDS-related complex: A phase I trial, *J. Infect. Dis.*, **1993**, 167, 1, 21-29.
 92. Baba, M.; Pauwels, R.; Herdewijn, P.; De Clercq, E.; Desmyter, J.; Vandeputte, M. Both 2',3'-dideoxythymidine and its 2',3'-unsaturated derivative (2',3'-dideoxythymidinene) are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus replication in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1987**, 142, 1, 128-134.
 93. Balzarini, J.; Kang, G.J.; Dalal, M.; Herdewijn, P.; De Clercq, E. *et al.* The anti-HTLV-III (anti-HIV) and cytotoxic activity of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyribonucleosides: a comparison with their parental 2',3'-dideoxyribonucleosides, *Mol. Pharmacol.*, **1987**, 32, 1, 162-167.
 94. Dyatkina, N.; Minassian, S.; Kukhanova, M.; Krayevsky, A.; von Janta-Lipinsky, M. *et al.* Properties of 2',3'-dideoxy-2',3'-dehydrothymidine 5'-triphosphate in terminating DNA synthesis catalyzed by several different DNA polymerases, *FEBS Lett.*, **1987**, 219, 1, 151-155.
 95. Menga, W.-D.; Qing, F.-L. Fluorinated Nucleosides as Antiviral and Antitumor Agents. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2006**, 6, 1499-1528.
 96. Van Aerschot, A.; Herdewijn, P.; Balzarini, J.; Pauwels, R.; De Clercq, E. 3'-Fluoro-2',3'-dideoxy-5-chlorouridine: most selective anti-HIV-1 agent among a series of new 2'- and 3'-fluorinated 2',3'-dideoxynucleoside analogues, *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 8, 1743-1749.
 97. Pierra, C.; Benzaria, S.; Amador, A.; Moussa, A.; Mathieu, S. *et al.* NM 283, an efficient prodrug of the potent anti-HCV agent 2'-C-methylcytidine, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, **2005**, 24, 5, 767-770.
 98. Lee, J.C.; Tseng, C.K.; Wu, Y.H.; Kaushik-Basu, N.; Lin, C.K. *et al.* Characterization of the activity of 2'-C-methylcytidine against dengue virus replication, *Antiviral Res.*, **2015**, 116, 1-9.
 99. Clark, J.L.; Hollecker, L.; Mason, J.C.; Stuyver, L.J.; Tharnish, P.M. *et al.* Design, Synthesis, and Antiviral Activity of 2'-Deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine, a Potent Inhibitor of Hepatitis C Virus Replication, *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 17, 5504-5508.
 100. Coelmont, L.; Paeshuyse, J.; Windisch, M.P.; De Clercq, E.; Bartenschlager, R.; Neyts, J. Ribavirin antagonizes the in vitro anti-hepatitis C virus activity of 2'-C-methylcytidine, the active component of valopicitabine, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2006**, 50, 10, 3444-3446.
 101. Eldrup, A.B.; Allerson, C.R.; Bennett, C.F.; Bera, C.F.; Bhat, B. *et al.* Structure-Activity Relationship of Purine Ribonucleosides for Inhibition of Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase, *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 2283-2295.
 102. Eldrup, A.B.; Prhavc, M.; Brooks, J. Bhat, B.; Prakesh, T.P. Structure-Activity Relationship of Heterobase-Modified 2'-C-Methyl Ribonucleosides as Inhibitors of Hepatitis C Virus RNA Replication, *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 5284-5297.

-
103. Januszczak, P.; Fogt, J.; Boryski, J.; Kunisuke, I.; Onishi, T.; Neyts, J.; De Clercq, E. Synthesis and Antiviral Evaluation of 2'-C-Methyl Analogues of 3-Alkynyl- and 6-Alkylfuran- and Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine Ribonucleosides, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, **2009**, 28, 713-723.
104. Sofia, M.J.; Bao, D.; Chang, W.; Du, J.; Nagarathnam, D. *et al.* Discovery of a β -D-2'-Deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine Nucleotide Prodrug (PSI-7977) for the Treatment of Hepatitis C Virus, *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 19, 7202-7218.
105. McGuigan, C.; Harris, S.A.; Daluge, S.M.; Gudmundsson, K.S.; McLean, E.W. *et al.* Application of Phosphoramidate Pronucleotide Technology to Abacavir Leads to a Significant Enhancement of Antiviral Potency, *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 10, 3504-3515.
106. Flisiak, R.; Pogorzelska, J.; Flisiak-Jackiewicz, M. Hepatitis C: efficacy and safety in real life, *Liver Int.* **2017**; 37, 26-32.
107. Creasy, W.A. Arabinosylcytosine, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **1975**, 38, 232.
108. North, T.W.; Cohen, S.S. Aranucleosides and aranucleotides in viral chemotherapy, *Pharmacol. Ther.*, **1979**, 4, 1, 81-108.
109. Gentry, G.A.; Aswell, J.F. Inhibition of herpes simplex virus replication by araT, *Virology*, **1975**, 65, 1, 294-296.
110. Allen, L.B.; Schröder, H.C.; Löbering, H.G.; Maidhof, A.; Müller, W.E. Cytostatic and antiherpesvirus type 1 and 2 activities of 1- β -D-arabinofuranosylthymine (ara T) prodrugs, *Chemotherapy*, **1987**, 33, 4, 272-277.
111. Ooka, T.; Calender, A.; De Turenne, M.; Daillie, J. Effect of Arabinofuranosylthymine on the Replication of Epstein-Barr Virus and Relationship with a New Induced Thymidine Kinase Activity, *J. Virol.*, **1983**, 46, 1, 187-195.
112. Soike, K.F.; Baskin, G.; Cantrell, C.; Gerone, P. Investigation of antiviral activity of 1- β -D-arabinofuranosylthymine (ara-T) and 1- β -D-arabinofuranosyl-E-5-(2-bromovinyl)uracil (BV-ara-U) in monkeys infected with simian varicella virus, *Antiviral Res.*, **1984**, 4, 5, 245-257.
113. Lee, W.W.; Benitez, A.; Goodman, L.; Baker, B. R. Potential Anticancer Agents. XL. Synthesis of the β -Anomer of 9-(D-Arabinofuranosyl)adenine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 2648-2649.
114. Privat de Garilhe, M.; de Rudder, J. Effet de deux nucleosides de l'arabinose sur la multiplication des virus de l'herpes et de la vaccine en culture cellulaire, *C. R. Acad. Sci.*, **1964**, 259, 2725.
115. Shannon, W.M.; Westbrook, L.; Schabel, F.M. Antiviral Activity of 9-/3-Arabinofuranosyladenine (ara-A) Against Gross Murine Leukemia Virus in Vitro, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1974**, 145, 542-545.
116. Shakya, N.; Srivastav, M.C.; Desroches, N.; Agrawal, B.; Kunimoto, D.Y.; Kumar, R. 3'-Bromo Analogues of Pyrimidine Nucleosides as a New Class of Potent Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis, *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 4130-4140.

-
117. Ellis, D.B.; LePage, G.A. Some inhibitory effects of 9- β -D-xylofuranosyladenine, an adenosine analog, on nucleotide metabolism in ascites tumor cells, *Mol. Pharmacol.*, **1965**, 1, 231-238.
118. Jansons, J.; Maurinsh, Y.; Lidaks, M. 8-Substituted Adenine β -D-Xylofuranosides and β -L-Arabinofuranosides, *Nucleosides Nucleotides*, **1995**, 14, 8, 1709-1724.
119. Srivastav, N.C.; Shakya, N.; Mak, M.; Agrawal, B.; Tyrell, D.L. *et al.* Antiviral Activity of Various 1-(2'-Deoxy- β -D-lyxofuranosyl), 1-(2'-Fluoro- β -D-xylofuranosyl), 1-(3'-Fluoro- β -D-arabinofuranosyl), and 2'-Fluoro-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyribose Pyrimidine Nucleoside Analogues against Duck Hepatitis B Virus (DHBV) and Human Hepatitis B Virus (HBV) Replication, *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 7156-7166.
120. Webb, T.R.; Mitsuya, H.; Broder, S. 1-(2,3-anhydro- β -D-lyxofuranosyl)cytosine derivatives as potential inhibitors of the human immunodeficiency virus, *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 7, 1475-1479.
121. Srivastav, N.C.; Mak, M.; Agrawal, B.; Tyrrell, D.L.J.; Kumar, R. Antiviral activity of 2,3'-anhydro and related pyrimidine nucleosides against hepatitis B virus *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 22, 6790-6793.
122. Suhadolnik, R.J. *Nucleoside Antibiotics*, Wiley, New York, 1970, 1-50, ISBN 10: 0471835439
123. Takatsuki, K.-I.; Ohgushi, S.; Kohmoto, S.; Kishikawa, K.; Yamamoto, M. A simple and efficient synthesis of puromycin, 2,2'-anhydro- pyrimidine nucleosides, cytidines and 2',3'-anhydroadenosine from 3',5'-O-sulfinyl xylo-nucleosides, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, **2006**, 25, 7, 719-734.
124. Wittrup, A.; Lieberman, J. Knocking down disease: A progress report on siRNA therapeutics, *Nat. Rev. Genet.*, **2015**, 16, 9, 543-552.
125. Kociński, P.J. *Protecting Groups, 3rd Edition*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005, ISBN: 3-13-135603-0.
126. Hampton, A.; Magrath, D.I. Synthesis of an Isopropylidene Derivative of an Alkali-labile Nucleoside: 2',3'-O-Isopropylidene-9- β -D-ribofuranosylpurine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 12, 3250-3251.
127. Markiewicz, W.T. Tetrahydroisopropylidisiloxan, a group for simultaneous protections, *J. Chem. Res.(S)*, **1979**, 24-25.
128. Kamaike, K.; Uemura, F.; Yamakage, S.; Nishino, S.; Ishido, Y. Partial protection of carbohydrate derivatives. Part 23. Simple, efficient procedure for the preparation of 3'- and 2'-O-(tetrahydropyran-2-yl)ribonucleoside derivatives involving highly regioselective 2',5'-di-O-acylation is that followed by acyl migration on silica gel and subsequent O-(tetrahydropyran-2-yl)ation, *Nucleosides Nucleotides*, **1987**, 6, 4, 699-736.

-
129. Kawana, M.; Nishikawa, M.; Noritsugu, Y.; Kuzuhara, H. Facile transformation of β -D-ribofuranosyl purines and pyrimidines into their respective 3'-deoxy-threo-pentofuranosyl nucleosides, *J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1* **1989**, 1593-1596.
130. Fogt, J.; Januszczyk, P.; Onishi, T.; Izawa, K.; Boryski, J. Partial acylation of cytidine and its 2'-C-methyl analogue as a tool to functionalize the ribonucleosidic 2',3'-*cis*-diol system, *ARKIVOC*, **2009**, (iii), 198-205.
131. Hakimelahi, G.H.; Proba, Z.A.; Ogilvie, K.K. Nitrate ion as catalyst for selective silylations of nucleosides, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 48, 4775-4778.
132. Hakimelahi, G.H.; Proba, Z.A.; Ogilvie, K.K. High Yield Selective 3'-Silylation of Ribonucleosides, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 52, 5243-5246.
133. Hakimelahi, G.H.; Proba, Z.A.; Ogilvie, K.K. New catalysts and procedures for the dimethoxytritylation and selective silylation of ribonucleosides, *Can. J. Chem.*, **1982**, 60, 1106-1113.
134. Nguyen-Trung, N.Q.; Botta, O.; Terenzi, S.; Strazewski, P. A Practical Route to 3'-Amino-3'-deoxyadenosine Derivatives and Puromycin Analogues, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 5, 2038-2041.
135. Yung, N.C.; Fox, J.J. Nucleosides. X. Anhydronucleosides and Related Compounds Derived from 2',5'-Di-O-trityluridine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, 83, 3060-3066
136. Pankiewicz, K.W.; Krzeminski, J.; Watanabe, K.A. Synthesis of 2'- β -Fluoro- and 3'- α -Fluoro-Substituted Guanine Nucleosides. Effects of Sugar Conformational Shifts on Nucleophilic Displacement of the 2'-Hydroxy and 3'-Hydroxy Group with DAST, *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 28, 7315-7321.
137. Pierra, C.; Amador, A.; Badaroux, E.; Storer, R.; Gosselin, G. Synthesis of 2'-C-methylcytidine and 2'-C-methyluridine derivatives modified in 3'-position as potential antiviral agents, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **2006**, 71, 991-1010.
138. De Burghgraeve, T.; Selisko, B.; Kaptein, S.; Chatelain, G.; Leyssen, P. 3',5'-Di-O-trityluridine inhibits in vitro flavivirus replication, *Antivir. Res.*, **2013**, 98, 2, 242-247.
139. Brown, D.M.; Todd, A.; Varadarajan, S. Nucleotides. Part XXXVII. The structure of uridylic acids a and b, and a synthesis of spongouridine (3- β -D-arabinofuranosyluracil), *J. Chem. Soc.*, **1956**, 2388-2392.
140. Czernecki, S.; Valery, J.M. An efficient synthesis of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT), *Synthesis*, **1991**, 3, 239-240.
141. Roy, S.K.; Tang, J.-Y. Efficient large scale synthesis of 2'-O-alkyl pyrimidine ribonucleosides, *Org. Process Res. Dev.*, **2000**, 4, 170-171
142. Lin, K.; Chiang, L.; Wu, C.; Chen, S.; Yu, C. Synthesis of 5-radioiodoarabinosyl uridine analog for probing the HSV-1 thymidine kinase gene, *J. Chin. Chem. Soc.*, **2007**, 54, 563-568.

-
143. Zablotskaya, A.; Segal, I.; Pedersen, E.V. Simple and effective method for the synthesis of 3',5'-substituted 1- β -D-arabinofuranosyluracil, *Chem. Heterocycl. Compd.*, **1996**, 32, 835-837.
144. Hampton, A.; Nichol, A.W. Nucleotides. V. Purine ribonucleoside 2',3'-cyclic carbonates. Preparation and use for the synthesis of 5'-monosubstituted nucleosides, *Biochemistry*, **1966**, 5, 2076-2082.
145. Letters, R.; Michelson, A.M. O-2,3'-Cyclouridine, *J. Chem. Soc.*, **1961**, 1401.
146. Michelson, A.M.; Todd, A. Deoxyribonucleosides and Related Compounds 5. Cyclotymidines and Other Thymidine Derivatives – the Configuration at the Glycosidic Centre in Thymidine, *J. Chem. Soc.*, **1955**, 816-822.
147. Fox, J.J.; Miller, N.C. Nucleosides. XVI. Further Studies of Anhydronucleosides, *J. Org. Chem.*, **1963**, 28, 4, 936-941.
148. Miller, N.C.; Fox, J.J. Nucleosides. XXI. Synthesis of Some 3'-Substituted 2',3'-Dideoxyribonucleosides of Thymine and 5-Methylcytosine, *J. Org. Chem.*, **1964**, 29, 7, 1772-1776.
149. Pankiewicz, K.W.; Watanabe, K.A. Nucleosides. CXLIV. Some Reactions of 2'-O-Triflyl-2,3'-anhydroxylosyluracil with Nucleophilic Reagents. Synthesis of 2'-Chloro-2',3'-dideoxyuridinene. Studies Directed toward the Synthesis of 2'-Deoxy-2'-substituted *arabino* Nucleosides, *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 11, 4498-4502.
150. Codington, J.F.; Fecher, R.; Fox, J.J. Pyridine Nucleosides. 7. Reactions of 2',3',5'-Trimesyloxyuridine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 11, 2794-2803.
151. Dai, Q.; Piccirilli J.A. Efficient synthesis of 2',3'-dideoxy-2'-amino-3'-thiouridine, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 2169-2172.
152. McGee, D.P.; Vaughn-Settle, A.; Vargeese, C.; Zhai, Y. 2'-Amino-2'-deoxyuridine via an Intramolecular Cyclization of a Trichloroacetimidate, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 2, 781-785.
153. Mizuno, Y.; Sasaki, T. The Synthesis of Dinucleoside Phosphates of Natural Linkages by the "Anhydronucleoside Method", *Tetrahedron Lett.*, **1965**, 50, 4579-4584.
154. Kanai, T.; Ichino, M. Some Phosphate Esters of Cyclocytidine and Aracytidine, *Tetrahedron Lett.*, **1971**, 22, 1965-1968.
155. Kanai, T.; Ichino, M.; Hoshi, A.; Kanzawa, F.; Kuretani, K. Pyrimidine nucleosides. 6. Synthesis and anticancer activities of N4-substituted 2,2'-anhydronucleosides *J. Med. Chem.*, **1974**, 17, 10, 1076-1078.
156. Meyer, J.-P.; Probst, K.C.; Trist, I.M.; McGuigan, C.; Westwell, A.D. A novel radiochemical approach to 1-(2'-deoxy-2'-[¹⁸F]fluoro- β -D-arabinofuranosyl)cytosine (18F-FAC), *J. Labelled Comp. Radiopharm.*, **2014**, 57, 11, 637-644.
157. Nagyvary, J. Arabinonucleotides. II. Synthesis of O2,2'-anhydrocytidine 3'-phosphate, a precursor of 1- β -D-arabinosylcytosine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, 91, 5409-5410.

-
158. Sowa, T.; Tsunoda, K. The Convenient Synthesis of Anhydronucleosides via the 2',3'-O-Sulfinate of Pyrimidine Nucleosides as the Active Intermediates, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1975**, 48, 505-507.
159. Kondo, K.; Inoue, I. Studies on biologically active nucleosides and nucleotides. 2. A convenient one-step synthesis of 2,2'-anhydro-1-(3',5'-di-O-acyl- β -D-arabinofuranosyl)pyrimidines from pyrimidine ribonucleosides, *J. Org. Chem.*, **1977**, 42, 17, 2809-2812.
160. Shang, P.; Wang, H.; Cheng, C.; Zheng, H.; Zhao, Y. Study on Disulfur-Backboned Nucleic Acids: Part 3. Efficient Synthesis of 3',5'-Dithio-2'-Deoxyuridine and Deoxycytidine *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, **2008**, 27, 12, 1272-1281.
161. Mitsunobu, O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products, *Synthesis*, **1981**, 1, 1-28.
162. Varasi, M.; Walker, K.A.M.; Maddox, M.L. A revised Mechanism for the Mitsunobu Reaction, *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 4235-4238.
163. Camp, D.; Hanson, G.R.; Jenkins, I.D. Formation of Radicals in the Mitsunobu Reaction, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 2977-2980.
164. But, T.Y.S.; Toy, P.H. The Mitsunobu reaction: Origin, mechanism, improvements, and applications, *Chem. Asian J.*, **2007**, 2, 1340-1355.
165. Eisenhuth, R.; Richert, C. Convenient Syntheses of 3'-Amino-2',3'-dideoxynucleosides, Their 5'-Monophosphates, and 3'-Aminoterminal Oligodeoxynucleotide Primers, *J. Org. Chem.*, **2009**, 74, 1, 26-37.
166. Czernecki, S.; Valéry, J.-M. One-step conversion of thymidine into 2,3'-anhydro derivatives, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1990**, 11, 801-802.
167. Legorburu, U.; Reese, C.B.; Song, Q. Conversion of uridine into 2'-O-(2-methoxyethyl)uridine and 2'-O-(2-methoxyethyl)cytidine, *Tetrahedron*, **1999**, 55, 17, 5635-5640.
168. Rahman, A.A.-H.; Wada, T.; Saigo, K. Facile methods for the synthesis of 5-formylcytidine, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 1061-1063.
169. Clark, V. M.; Todd, A.R.; Zussman, J. 655. Nucleotides. Part VIII. cyclonucleoside salts. A novel rearrangement of some toluene-p-sulphonylnucleosides, *J. Chem. Soc.*, **1951**, 2952-2958.
170. Ikehara, M.; Tada, H. A New Type of "Cyclonucleoside" Derived from 2-Chloro-8-mercapto-9- β -D-xylofuranosyladenine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2344-2345.
171. Ikehara, M.; Tada, H.; Muneyama, K.; Kaneko, M. Synthesis of Purine Cyclonucleoside Having a 8,2'-O-Anhydro Linkage, *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 88, 13, 3165-3167.
172. Holmes, R.E.; Robins, R.K. Purine Nucleosides. VII. Direct Bromination of Adenosine, Deoxyadenosine, Guanosine, and Related Purine Nucleosides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 6, 1242-1244.

-
173. Mizuno, H.; Kitamura, K.; Miyao, A.; Yamagata, Y.; Wakahara, A. *et al.* The Structure of 8-Thioxoadenosine Monohydrate, *Acta Cryst. B*, **1980**, 36, 902-905.
174. Ikehara, M.; Kaneko, M. Studies of Nucleosides and Nucleotides – XLI, Purine Cyclonucleosides – 8, Selective Sulfonylation of 8-Bromoadenosine Derivatives and an Alternate Synthesis of 8,2'- and 8,3'-S-Cyclonucleosides, *Tetrahedron*, **1970**, 26, 18, 4251-4259.
175. Ikehara, M.; Ogiso, Y. Studies of Nucleosides and Nucleotides – LIV, Purine Cyclonucleosides – 19. Further Investigations on the Cleavage of the 8,2'-O-Anhydro Linkage. A New Synthesis of 9- β -D-Arabinofuranosyladenine, *Tetrahedron*, **1972**, 28, 3695-3704.
176. Ikehara, M.; Maruyama, T. Studies of Nucleosides and Nucleotides – LXV, Purine Cyclonucleosides – 26, A Versatile Method for the Synthesis of Purine O-Cyclo-Nucleosides. The First Synthesis of 8,2'-Anhydro-8-oxy-9- β -D-Arabinofuranosylguanine, *Tetrahedron*, **1975**, 31, 1369-1372.
177. Ikehara, M.; Tezuka, S. Synthesis of Adenine 8,2'-cyclonucleosides Using Diphenyl Carbonate, *Tetrahedron Lett.*, **1972**, 12, 1169-1170.
178. Ikehara, M.; Imura, J. Studies on Nucleosides and Nucleotides. LXXXVII. Purine Cyclonucleosides. XLII. Synthesis of 2'-Deoxy-2'-fluoroguanosine, *Chem. Pharm. Bull.*, **1981**, 29, 4, 1034-1038.
179. Ikehara, M.; Maruyama, T.; Miki, H.; Takatsuka, Y. Studies of Nucleosides and Nucleotides. LXXXV. Purine Cyclonucleosides. (35). Synthesis of Purine Nucleosides having 2'-Azido and 2'-amino Functions by Cleavage of Purine Cyclonucleosides, *Chem. Pharm. Bull.*, **1977**, 25, 4, 754-760.
180. Wagner, D.; Verheyden, J.P; Moffatt, J.G. Preparation and Synthetic Utility of Some Organotin Derivatives of Nucleosides, *J. Org. Chem.*, **1974**, 39, 1, 24-30.
181. Sowa, T.; Tsunoda, K. Novel Synthesis of Anhydronucleosides *via* the 2',3'-O-Sulfinate of Purine Nucleosides as Intermediates, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1975**, 48, 11, 3243-3245.
182. Chattopadhyaya, J.B.; Reese, C.B. Interconversion of 8,2'-O-Cycloadenosine and 2',3'-anhydro-8-oxyadenosine, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1976**, 21, 860-862.
183. Miah, A.; Reese, C.B.; Song, Q.; Sturdy, Z.; Neidle, S. *et al.* 2',3'-Anhydrouridine. A useful synthetic intermediate, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1998**, 19, 3277-3283.
184. Brown, D.M.; Parihar, D.B.; Todd, A.; Varadarajan, S. Deoxynucleosides and related compounds. Part VI. The synthesis of 2-thiouridine and of 3'-deoxyuridine *J. Chem. Soc.*, **1958**, 3028-3035.
185. Mårton-Merész, M.; Kuszmann, J.; Pelczer, I.; Párkányi, L.; Koritsánszky, T.; Kálmán, A. Synthesis and reactions of 2',3'-anhydro-1- β -D-ribofuranosyl-uracil derivatives: molecular

-
- structures of 3-methyl-2',3'-anhydrouridine and 3,5-dimethyl-2',3':O6,5'-dianhydrouridine, *Tetrahedron*, **1983**, 39, 2, 275-284.
186. Buchanan, J.G.; Clark, D.R. Studies on the interconversion of 2,3'-anhydro-1- β -D-xylofuranosyluracil and 2,2'-anhydro-1- β -D-arabinofuranosyluracil, *Carbohydr. Res.*, **1979**, 68, 2, 331-341.
187. Fox, J.J. Pyrimidine Nucleoside Transformations via Anhydronucleosides, *Pure Appl. Chem.*, **1969**, 18, 1-2, 233-255.
188. Moffat, J.G. Transformations of the Sugar Moiety of Nucleosides, w: Walker, R.T.; De Clercq, E.; Eckstein, *Nucleosides Analogues. Chemistry, Biology, and Medicinal Applications*, Plenum Press, New York, 1979, ISBN: 0-306-40302-1
189. Ueda, T. Synthesis and Reaction of Pyrimidine Nucleosides, w: *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, 1st ed.*; Townsend L. B.; Plenum Press: New York and London, 1988, pp 1-112, ISBN: 0-306-42871-7.
190. Dai, Q.; Frederiksen, J.F.; Anderson, V.E.; Harris, M.E.; Piccirilli, J.A. Efficient Synthesis of [2'-18O]Uridine and Its Incorporation into Oligonucleotides: A New Tool for Mechanistic Study of Nucleotidyl Transfer Reactions by Isotope Effect Analysis, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 309-311.
191. Ross, B. S.; Springer, R. H.; Tortorici, Z.; Dimock, S. A Novel and Economical Synthesis of 2'-O-Alkyl-Uridines, *Nucleosides Nucleotides*, **1997**, 16, 1641-1643.
192. Brown, D.M.; Todd, A.R.; Varadarajan, S. *J. Chem. Soc.*, **1957**, 868-872.
193. Hirata, M. Studies on Nucleosides and Nucleotides. X. Nucleophilic Substitution of Secondary Sulfonyloxy Groups of Pyrimidine Nucleosides. III. Reaction of 2',3'-Di-O-tosyluridine with Methanolic Ammonia, *Chem. Pharm. Bull.*, **1968**, 16, 3, 430-436.
194. Staudinger, H.; Meyer, J. Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylderivate und Phosphinimine, *Helvet. Chim. Acta*, **1919**, 2, 1, 635-646.
195. Tian, W.Q.; Wang, Y, A. Mechanisms of Staudinger Reactions within Density Functional Theory, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 13, 4299-4308.
196. McGee, D.P.; Vaughn-Settle, A. Novel Intramolecular Introduction of Nucleophiles to 2,2'-Anhydrouridine, *Nucleosides Nucleotides*, **1997**, 16, 7-9, 1095-1097.
197. Gondela, A.; Tomczyk, M.D.; Przepis, Ł.; Walczak, K.Z. Versatile synthesis of 2'-amino-2'-deoxyuridine derivatives with a 2'-amino group carrying linkers possessing a reactive terminal functionality, *Tetrahedron*, **2016**, 72, 5626-5632.
198. Hirata, M. Studies on Nucleosides and Nucleotides. IX. Nucleophilic Substitution of Secondary Sulfonyloxy Groups of Pyrimidine Nucleosides. II. Reaction of 2,2'-Anhydro-1-(3'-O-tosyl- β -D-arabinofuranosyl)uracil with Sodium Bromide, Sodium Ethanethiol, and Sodium Azide, *Chem. Pharm. Bull.*, **1967**, 16, 2, 291-295.

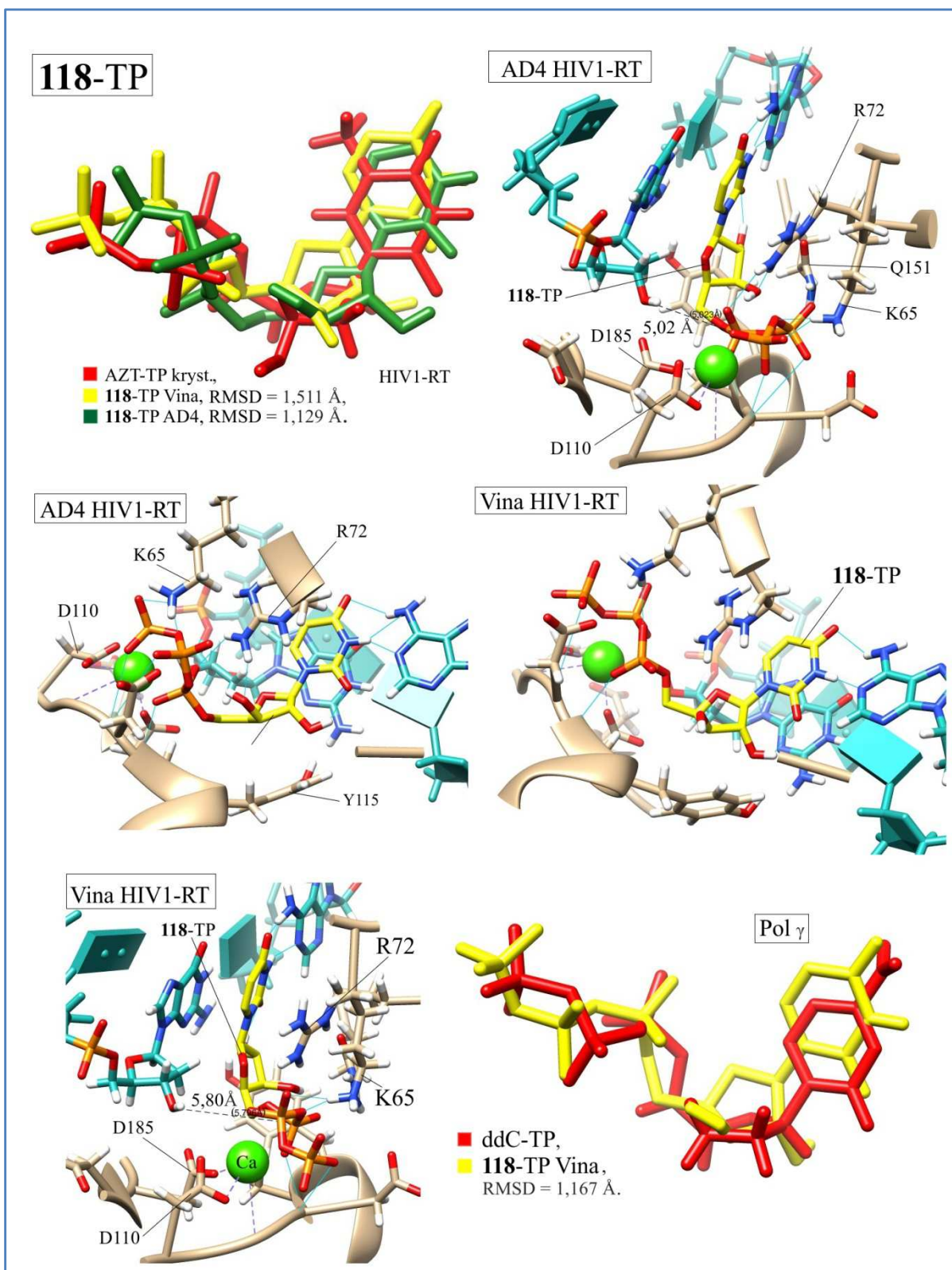
-
199. Kikugawa, K.; Ukita, T. Reaction of Hydrogen Halides on 2, 3'-Anhydro-1-(β -D-xylofuranosyl)uracil, *Chem. Pharm. Bull.*, **1969**, 17, 4, 775-784.
200. Kowollik, G.; Gaertner, K.; Langen, P. Nucleosides of Fluorocarbohydrates. 13. Synthesis of 3'-Deoxy-3'-fluorouridine, *J. Carbohydr. Nucleos. Nucleot.*, **1975**, 2, 3, 191-195.
201. Codington, J.F.; Fecher, R.; Fox, J.J. Nucleosides. XIII. Synthesis of 3'-Amino-3'-deoxy-arabinosyl-uracil via 2',3'-Epoxy-lyxosyl Nucleosides, *J. Org. Chem.*, **1962**, 27, 1, 163-167.
202. Greenberg, S.; Moffatt, J.G. Reactions of 2-acyloxyisobutyryl halides with nucleosides. I. Reactions of model diols and of uridine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 12, 4016-4025.
203. Russell, A.F.; Greenberg, S.; Moffatt, J.G. Reactions of 2-acyloxyisobutyryl halides with nucleosides. II. Reactions of adenosine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 12, 4025-4030.
204. Robins, M.J.; Hansske, F.; Low, N.H.; Park, J.I. A mild conversion of vicinal diols to alkenes. Efficient transformation of ribonucleosides into 2'-ene and 2',3'-dideoxynucleosides, *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 4, 367-370.
205. Robins, M.J.; Wilson, J.S.; Madej, D.; Low, N.H.; Hansske, F.; Wnuk, S.F. Nucleic Acid-Related Compounds. 88. Efficient Conversions of Ribonucleosides into Their 2',3'-Anhydro, 2'(and 3')-Deoxy, 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxy, and 2',3'-Dideoxynucleoside Analogs, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 24, 7902-7908.
206. Mattocks, A.R. Novel reactions of some α -acyloxy acid chlorides, *J. Chem. Soc.*, **1964**, 1918-1930.
207. Anderson, J.M.; Percival, E. 175. The ammonolysis of methyl 2 : 3-anhydro-D-furanosides. Part II. Methyl 2 : 3-anhydro-5-O-methyl- α - and - β -D-lyxofuranosides, *J. Chem. Soc.*, **1956**, 819-823.
208. Sun, J.; Duan, R.; Li, H.; Wu, J. Synthesis and Anti-HIV activity of triazolo-fused 2',3'-cyclic nucleoside analogs prepared by an intramolecular Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition, *Helv. Chim. Acta*, **2013**, 96, 1, 59-68.
209. Mete, A.; Hobbs, J. B. Novel nucleoside analogues via direct attack of carbon : Nucleophiles on nucleosides containing epoxy-sugars, *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 1, 97-100.
210. Ariza, X.; Garces, J.; Vilarrasa, J. Azide- or fluorine-containing 2' & 3'-azolyluridines by regioselective opening of 1-(2',3'-anhydro- β -D-lyxofuranosyl)uracils, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 28, 4069-4072.
211. HyperChem(TM) Professional 8.0, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.
212. Haasnoot, C.A.G.; DeLeeuw, F.A.A.M; Altona, C. The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities – I: An empirical generalization of the karplus equation, *Tetrahedron*, **1980**, 36, 19, 2783-2792.

-
213. Fogt, J. *Synteza i aktywność biologiczna 2'-C-metylowych analogów nukleozydów*, Rozprawa doktorska, IChB PAN, Poznań 2009.
214. Szlenkier, M.; Kamel, K.; Boryski, J. Regioselective Mitsunobu Reaction of Partially Protected Uridine, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, **2016**, 35, 8, 410-425.
215. Mathis, G.; Bourg, S.; Aci-Seche, S.; Truffert, J.-C.; Asseline, U. Synthesis and properties of 2'-O-neopentyl modified oligonucleotides, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 8, 1345-1357.
216. Perali, R.S.; Mandava, S.; Chunduri, V.R. An unexpected migration of O-silyl group under Mitsunobu reaction conditions, *Tetrahedron Lett.*, **2011**, 52, 3045-3047.
217. Egli, M.; Saenger, W. *Principles of Nucleic Acids Structure*, Springer-Verlag, Berlin, 1984, ISBN: 978-1-4612-5190-3.
218. *Ibid.*
219. Wójtowicz-Rajchel, H. Synteza i reakcje fluoroalkenylowych pochodnych zasad kwasów nukleinowych, ich prekursorów oraz analogów; Autoreferat do wniosku habilitacyjnego, **2012** Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
220. Liu, P.; Sharon, A.; Chu, C.K.; Fluorinated Nucleosides: Synthesis and Biological Implication, *J. Fluor. Chem.* **2008**, 129, 9, 743-766.
221. Sheng, J.; Hassan, A.E.A.; Huang, Z. New Telluride-Mediated Elimination for Novel Synthesis of 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxynucleosides, *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 3725-3729.
222. D'Acquarica, I.; Calcaterra, A.; Sacco, F.; Balzano, F.; Aiello, F. *et al.* Stereochemical Preference of 2'-Deoxycytidine for Chiral Bis(diamido)-bridged Basket Resorcin[4]arenes *Chirality*, **2013**, 25, 12, 840-851.
223. Pace, V.; Castoldi, L.; Hoyos, P.; Sinisterra, J.V.; Pregnotatoc, M.; Sánchez-Monteroa, J.M. Highly regioselective control of 1,2-addition of organolithiums to alpha, β -unsaturated compounds promoted by lithium bromide in 2-methyltetrahydrofuran: a facile and eco-friendly access to allylic alcohols and amines, *Tetrahedron*, **2011**, 67, 14, 2670-2675.
224. Grouiller, A; Essadiq, H. Behaviour of 2'-O-p-toluenesulfonyl uridine towards excess of a Grignard reagent, *Can. J. Chem.*, **1989**, 67, 708-709.
225. McEldoon, W.L.; Wiemer, D.F. Synthesis of Nucleoside 3'-Phosphonates via 3'-Keto Nucleosides, *Tetraherdon*, **1995**, 51, 26, 7131-7148.
226. Abrunhosa-Thomas, I.; Sellers, C.E.; Montchamp, J.-L. Alkylation of H-Phoshinate Esters under Basic Conditions, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 2851-2856.
227. Kim, C.U.; Misco, P.F. Facile, highly stereoselective synthesis of 2',3'-dideoxy- and 2',3'-didehydro-2',3t'-dideoxy nucleosides via a furanoid glycal intermediate, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 39, 5733-5736.
228. Walton, E.; Holly, F.W.; Boxer, G.E.; Nutt, R.F. 3'-Deoxynucleosides. IV. Pyrimidine 3'-Deoxynucleosides, *J. Org. Chem.*, **1966**, 31, 4, 1163-1169.

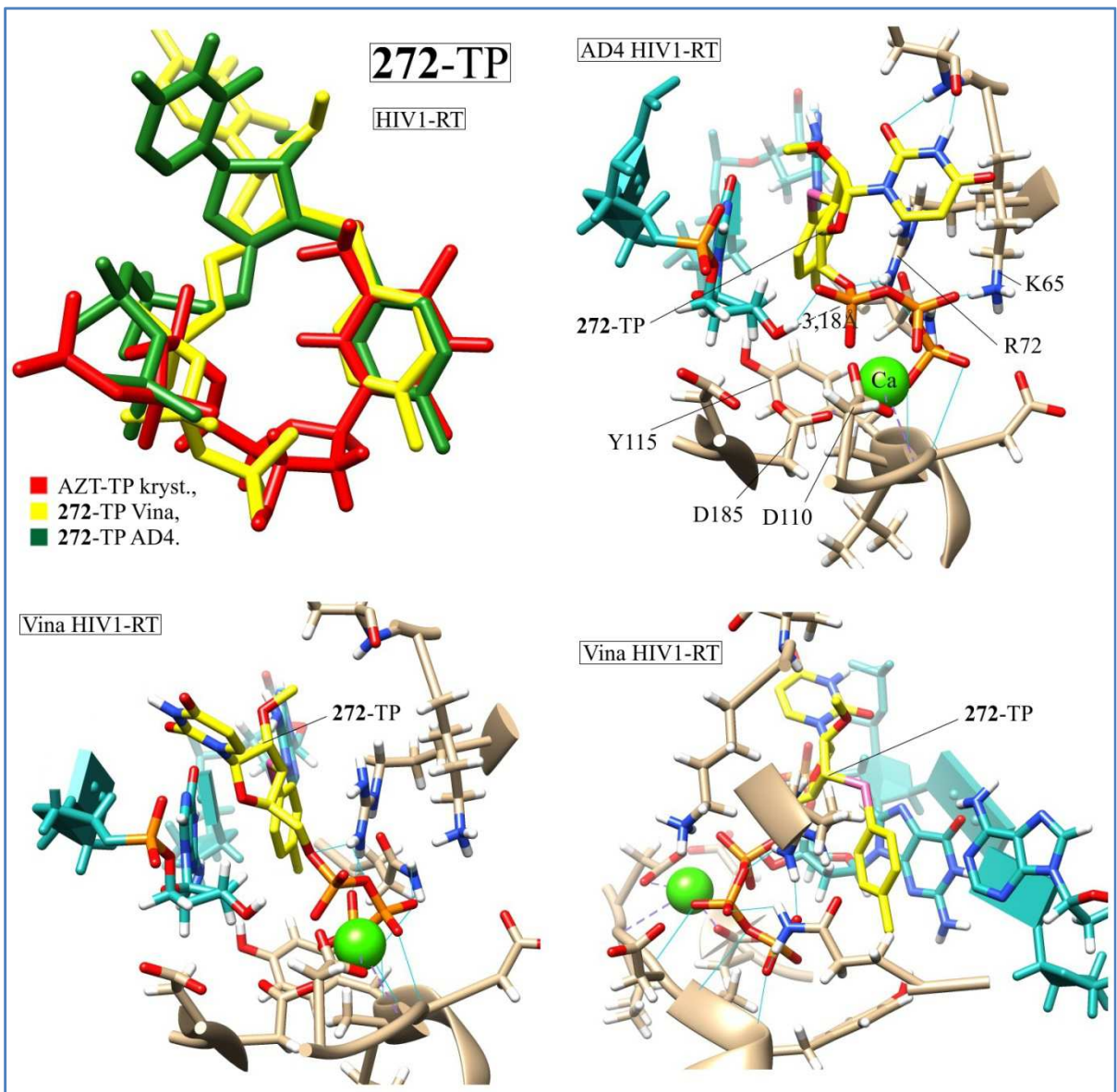
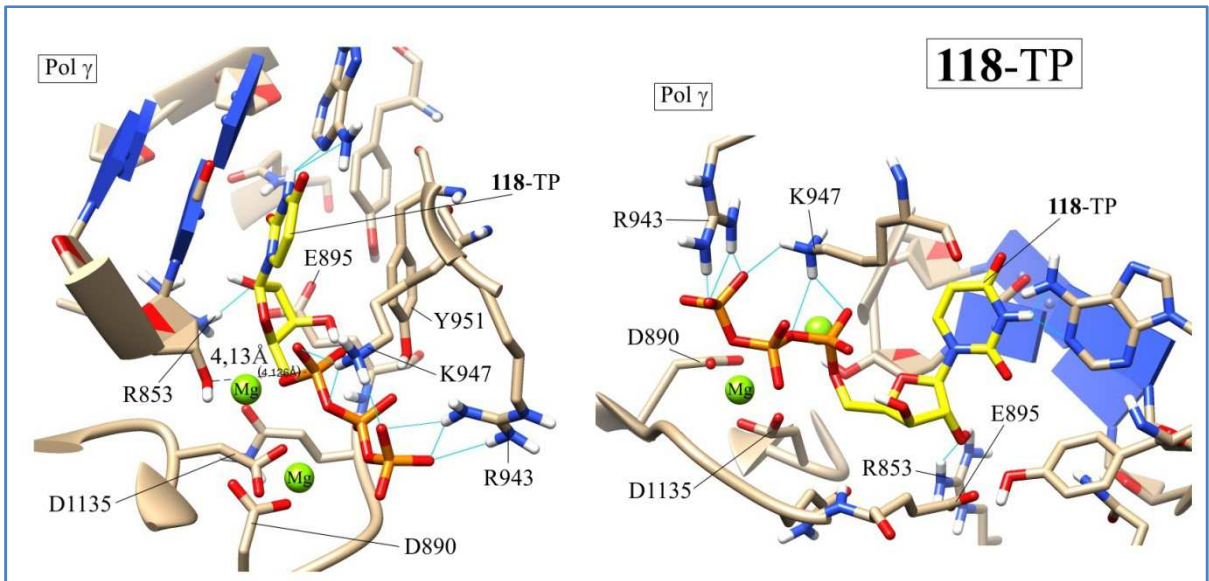
-
229. a) Prakash, T.P.; Prhac, M.; Eldrup, A.B.; Cook, P.D.; Carroll, S.S. *et al.* Synthesis and Evaluation of S-Acyl-2-thioethyl Esters of Modified Nucleoside 5'-Monophosphates as Inhibitors of Hepatitis C Virus RNA Replication, *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 4, 1199-1210; b) Lin, T.-S.; Yang, J.-H.; Liu, M.-C.; Shen, Z.-Y.; Cheng, Y.-C. *et al.* Synthesis and anticancer activity of various 3'-deoxy pyrimidine nucleoside analogs, and crystal structure of 1-(3-deoxy- β -D-threo-pentofuranosyl)cytosine, *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 2, 693-701.
230. Nobuo N. Suzuki, N.N.; Koizumi, K.; Fukushima, M.; Matsuda, A.; Inagaki, F. Structural Basis for the Specificity, Catalysis, and Regulation of Human Uridine-Cytidine Kinase, *Structure*, **2004**, 12, 751-764.
231. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K. *et al.* AutoDock 4 and AutoDock Tools 4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.*, **2009**, 16, 2785-91.
232. Trott, O.; Olson, A.J.; AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J. Comput. Chem.*, **2010**, 31, 455-461.
233. Szymanski, M.R.; Kuznestov, V.B.; Shumate, C.K.; Meng, Q.; Lee, Y.-S. *et al.* Structural basis for processivity and antiviral drug toxicity in human mitochondrial DNA replicase, *EMBO J.*, **2015**, 34, 14, 1959-1970.
234. Lee, Y.S.; Kennedy, W.D.; Yin, Y.W. Structural insight into processive human mitochondrial DNA synthesis and disease-related polymerase mutations, *Cell*, **2009**, 139, 2, 312-324.
235. Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N. *et al.* The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 235-242.
236. Das, K.; Balzarini, J.; Miller, M.T.; Maguire, A.R.; DeStefano, J.J.; Arnold, E. Conformational States of HIV-1 Reverse Transcriptase for Nucleotide Incorporation vs Pyrophosphorolysis-Binding of Foscarnet, *ACS Chem. Biol.*, **2016**, 11, 2158-2164.
237. Das, K.; Martinez, S.E.; Bauman, J.D.; Arnold, E. HIV-1 reverse transcriptase complex with DNA and nevirapine reveals non-nucleoside inhibition mechanism, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2012**, 19, 2, 253-259.
238. Jeffrey, G.A. *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press: New York and Oxford, 1997, ISBN: 0-19-509549-9.
239. Estrada-Tejedor, R.; Sabaté, N.; Broto, F.; Nonell, S. Octanol-water partition coefficients of highly hydrophobic photodynamic therapy drugs: a computational study, *Afinidad*, **2013**, 70, 564, 250-256.
240. Podgórska, M. *Wpływ insuliny na ekspresję transporterów nukleozydowych u szczura*, Rozprawa doktorska, Zakład Medycyny Molekularnej Katedry Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna, Gdańsk 2006.

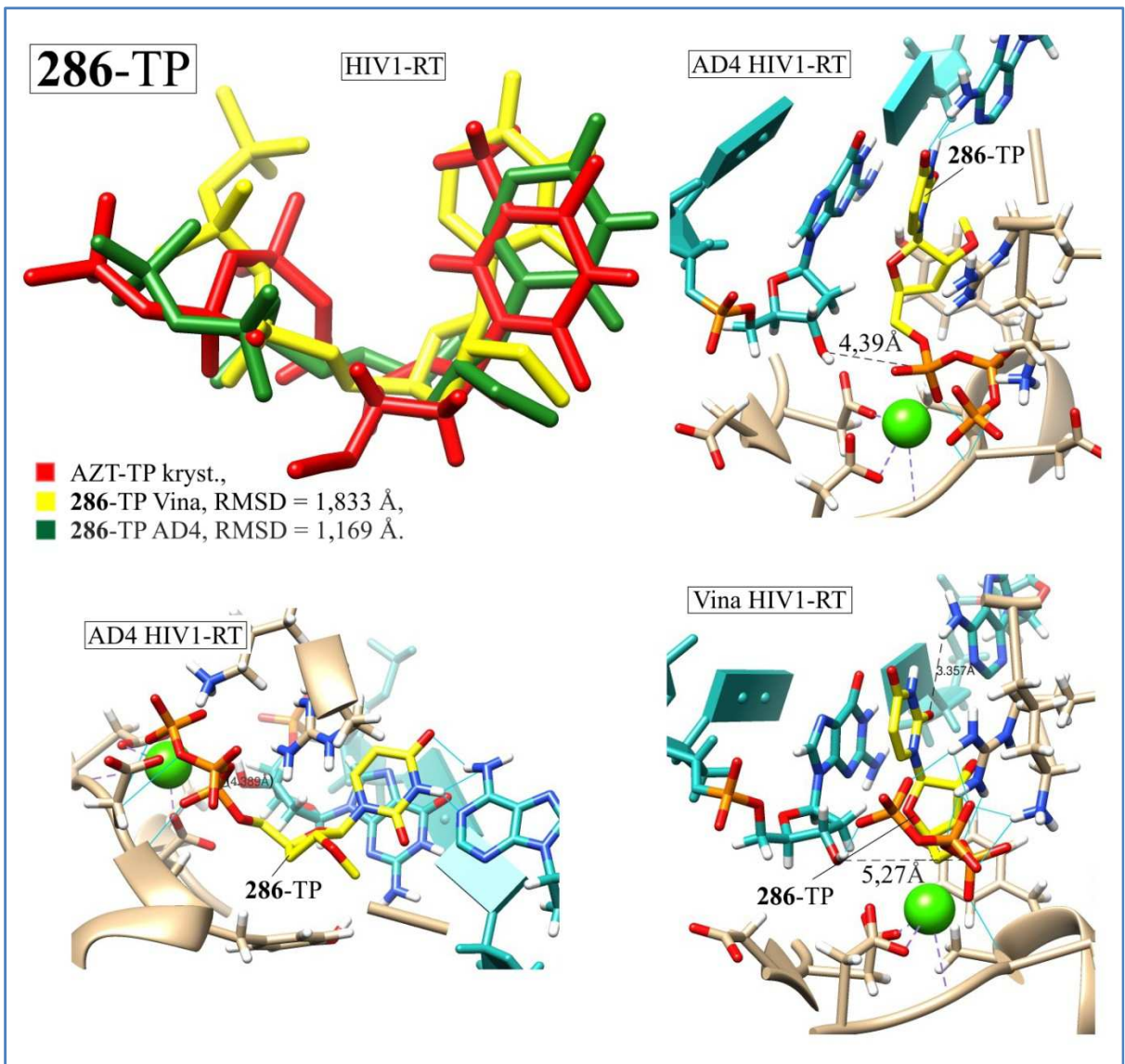
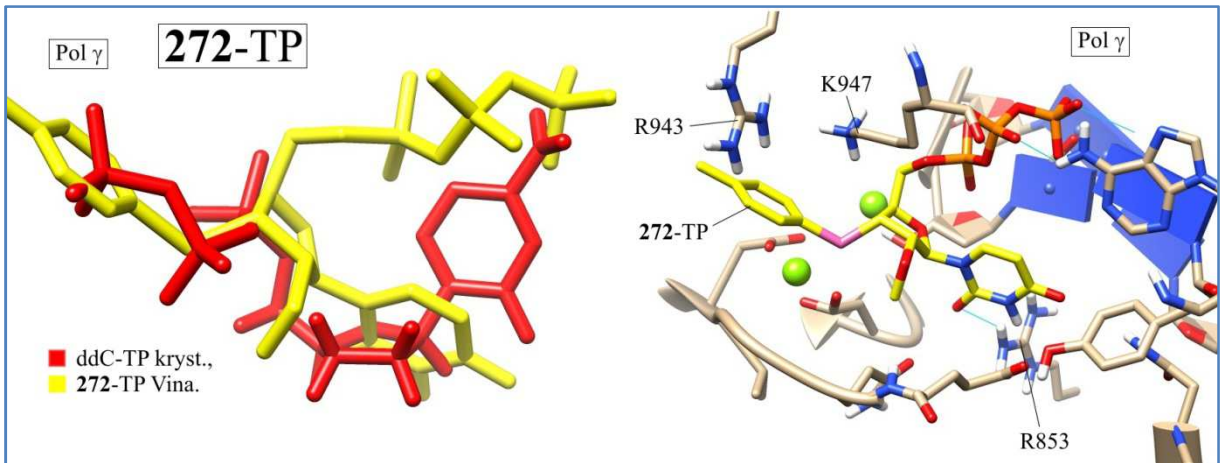
-
241. HyperChem(TM) Professional 8.0, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.
242. Valiev, M.; Bylaska, E.J.; Govind, N.; Kowalski, K.; Straatsma, T.P.; van Dam, H.J.J.; Wang, D.; Nieplocha, J.; Apra, E.; Windus, T.L.; de Jong, W.A. NWChem: a comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations, *Comput. Phys. Commun.*, **2010**, 181, 1477-1489.
243. Schmidt, M.W.; Baldridge, K.K.; Boatz, J.A.; Elbert, S.T.; Gordon, M.S.; Jensen, J.H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K.A.; Su, S.; Windus, T.L.; Dupuis, M.; Montgomery, J.A.; General Atomic and Molecular Electronic Structure System, *J. Comput. Chem.*, **1993**, 14, 1347-1363.
244. MOPAC2012, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA.
245. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, **2004**, 25, 13, 1605-1612.
246. <http://www.merckmillipore.com/PL/pl/support/lab-tools/lab-tools-booklet>.
247. Vogel, A. I. *Preparatyka organiczna*, WNT, Warszawa, 2006, ISBN: 83-204-3152-2

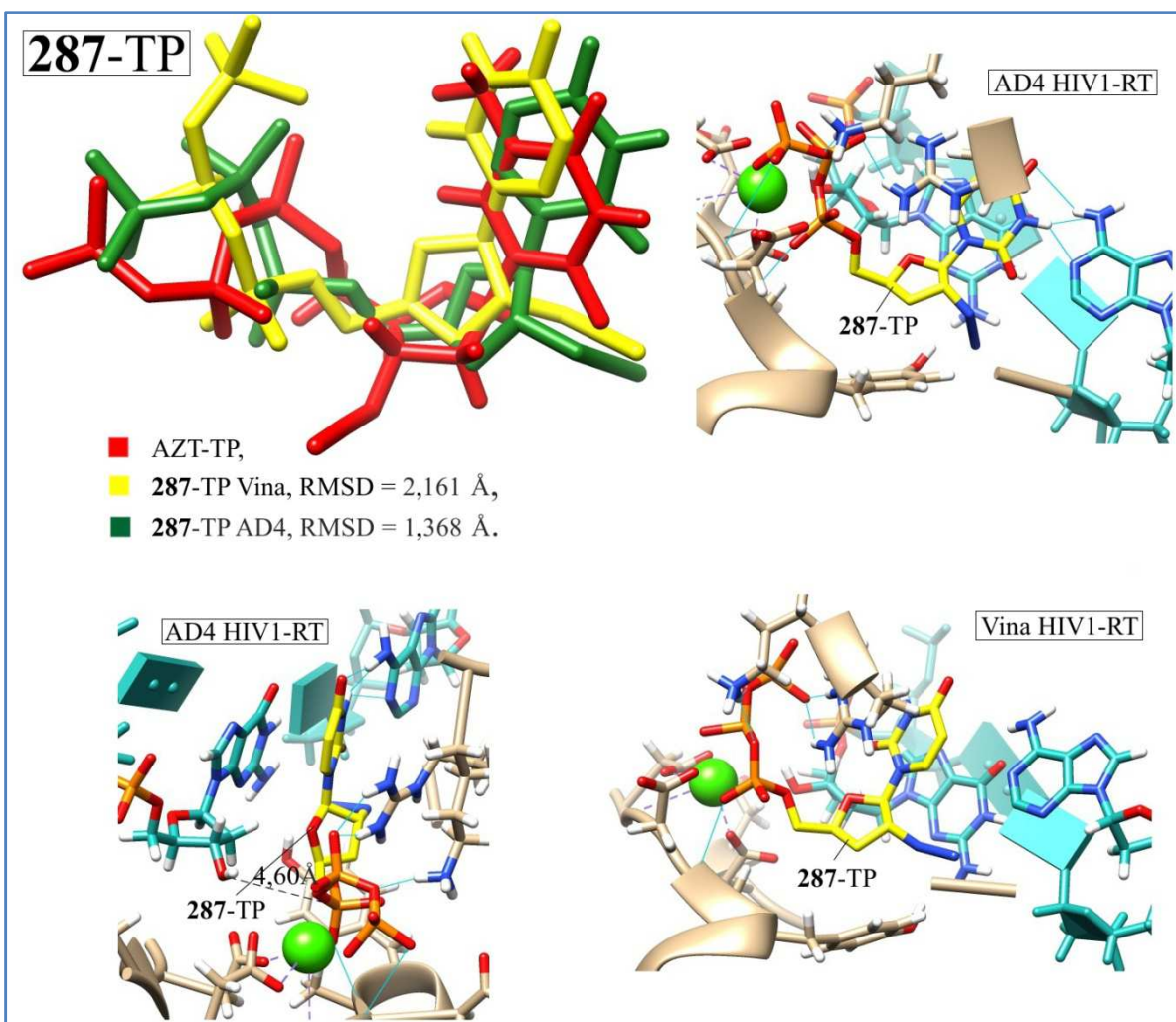
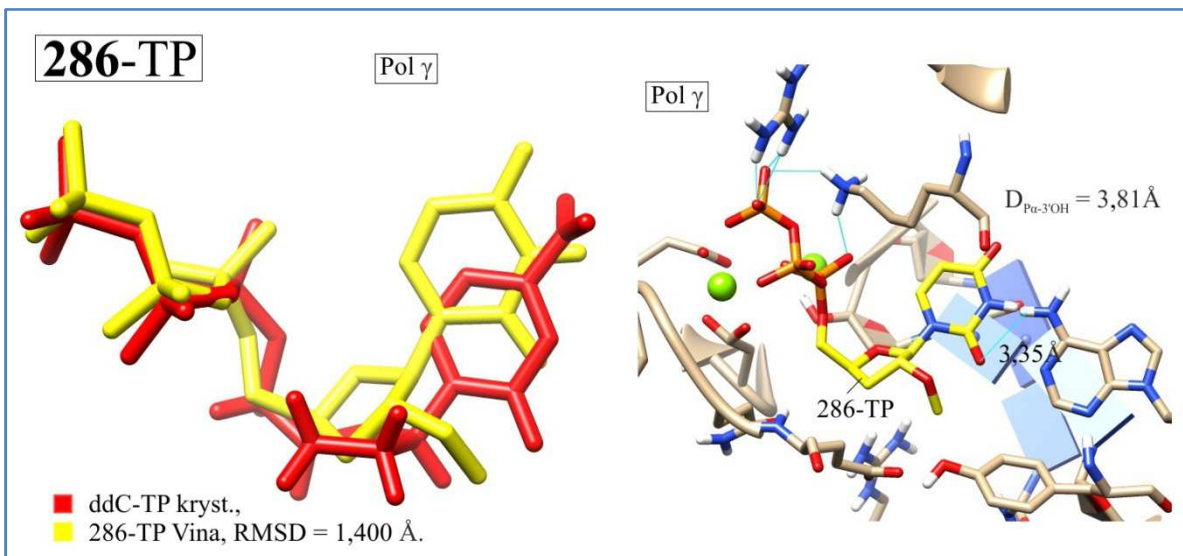
Załącznik 1: Dokowanie molekularne – mody wiązania ligandów*

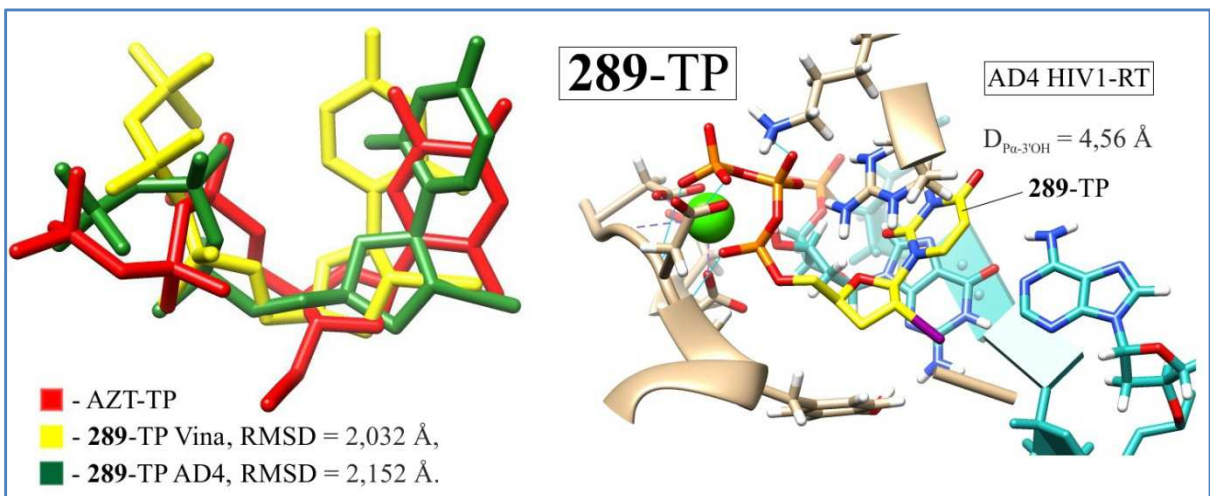
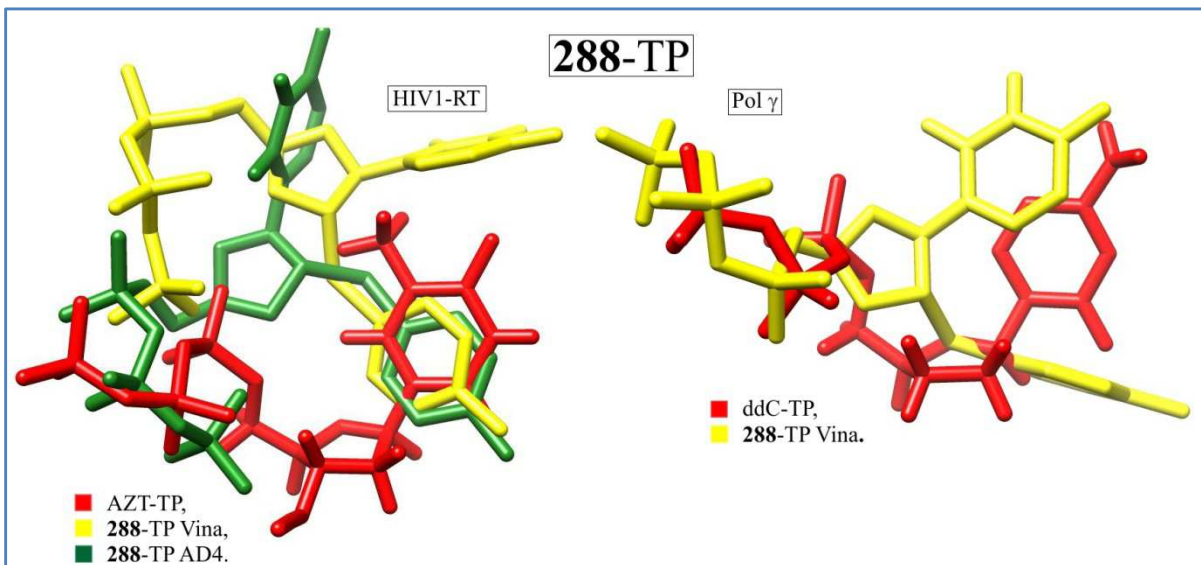
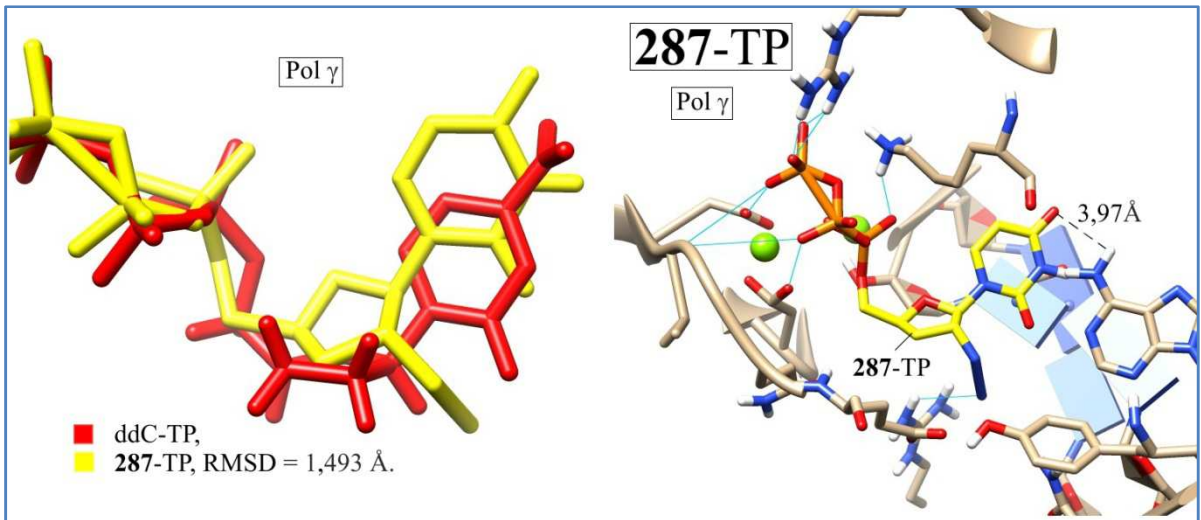


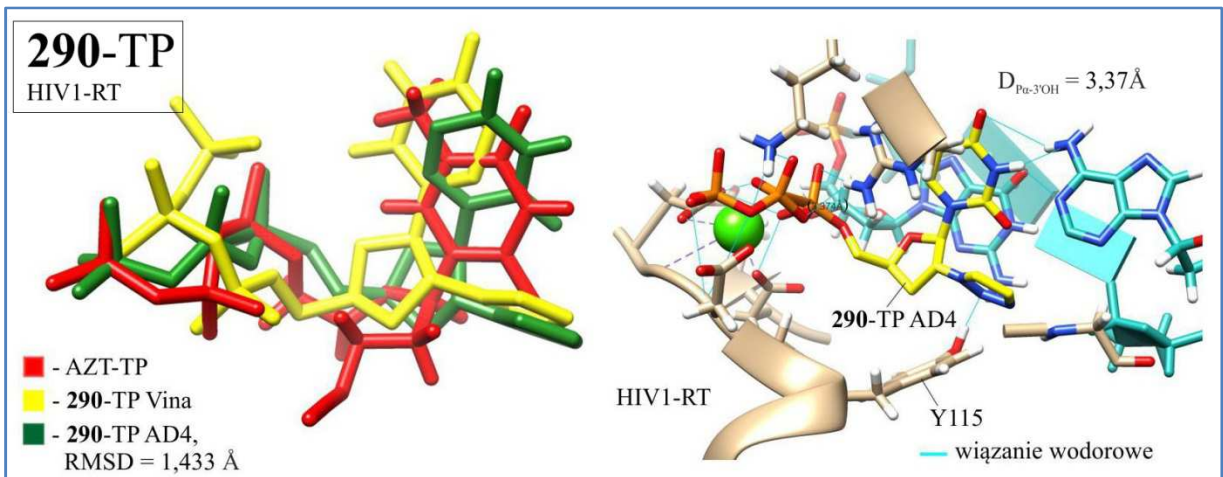
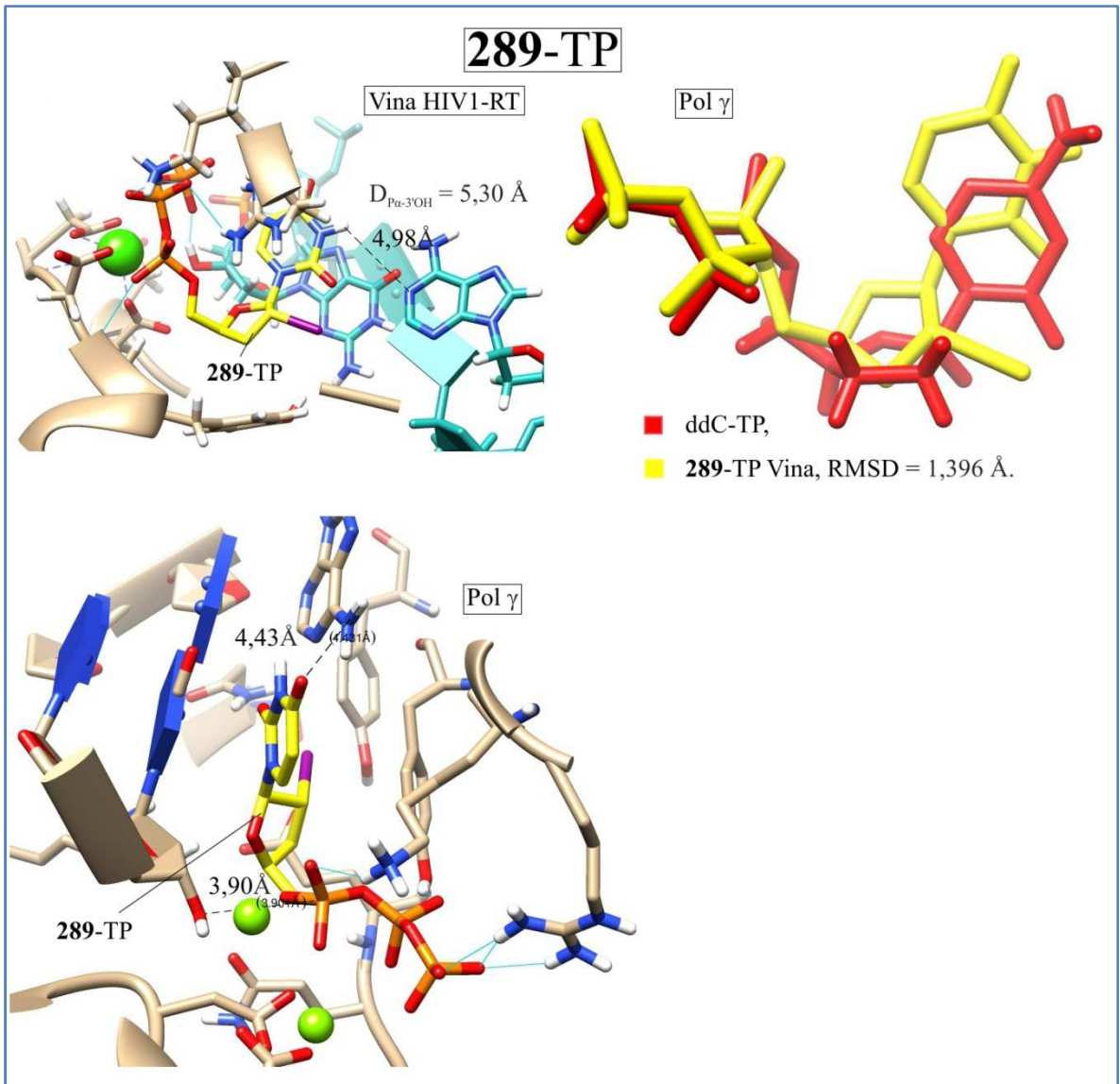
* W widokach od „przodu” dla przejrzystości ukryto Q151 (HIV1-RT) i Y951 (Pol γ).

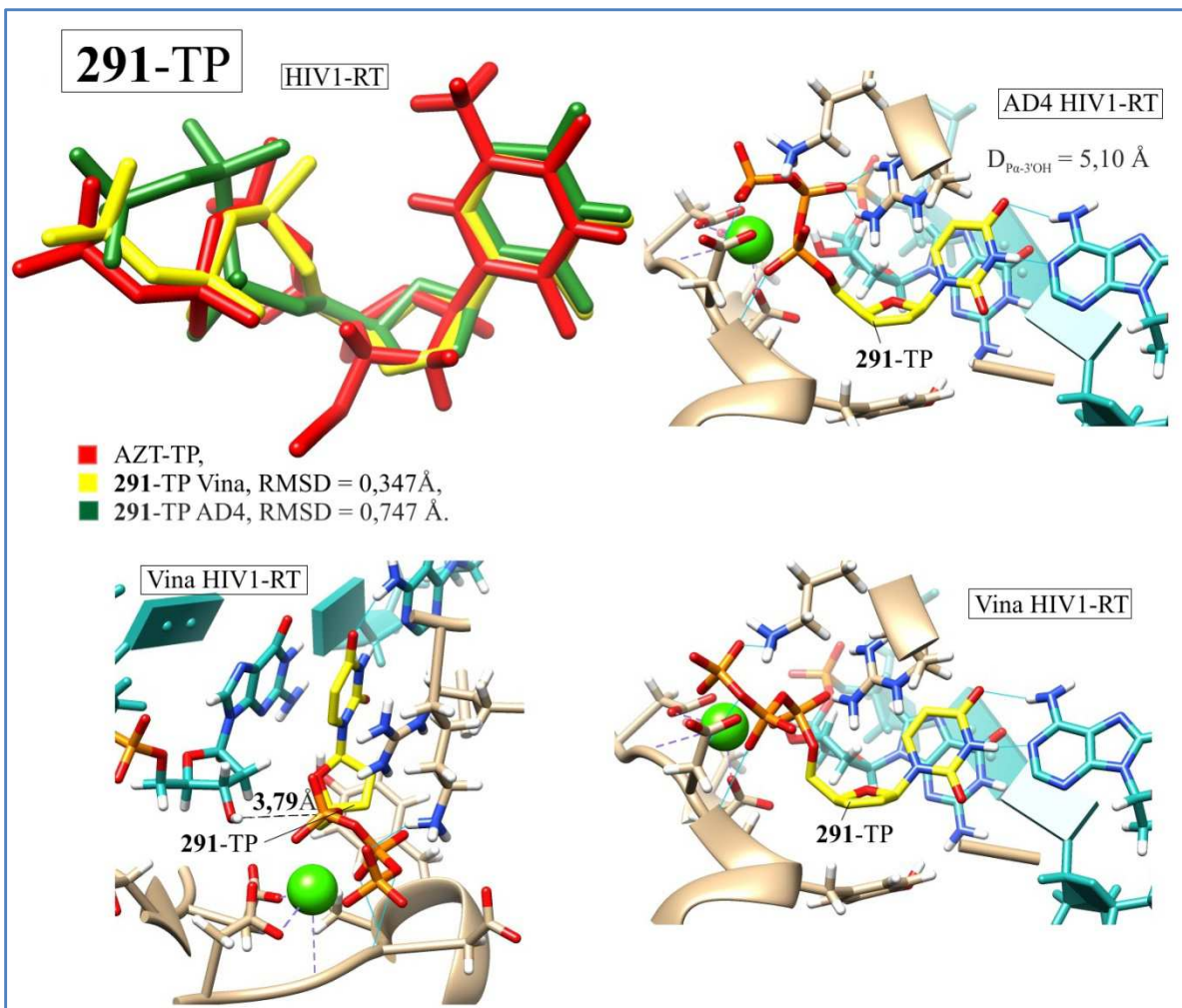
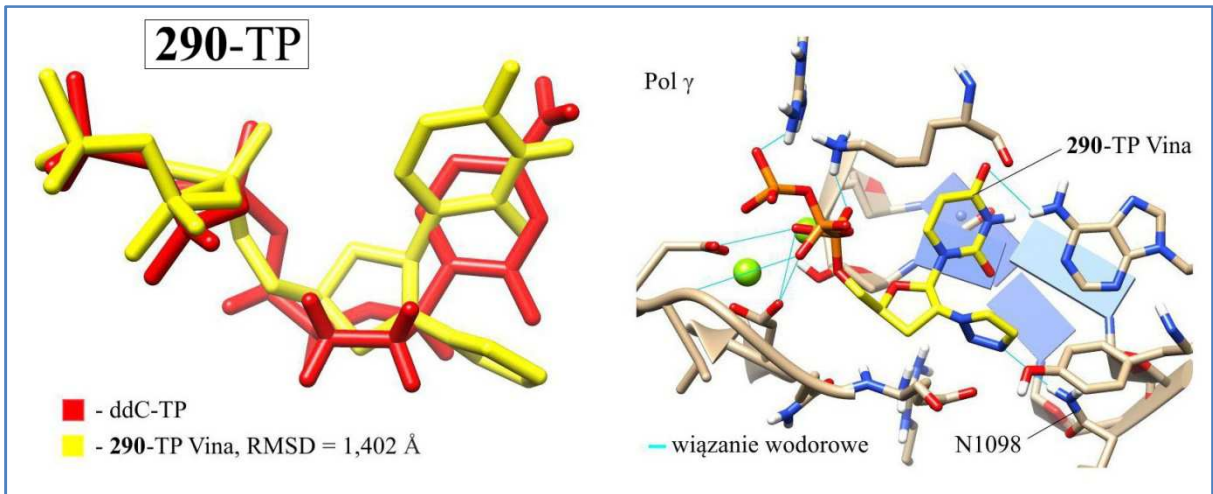


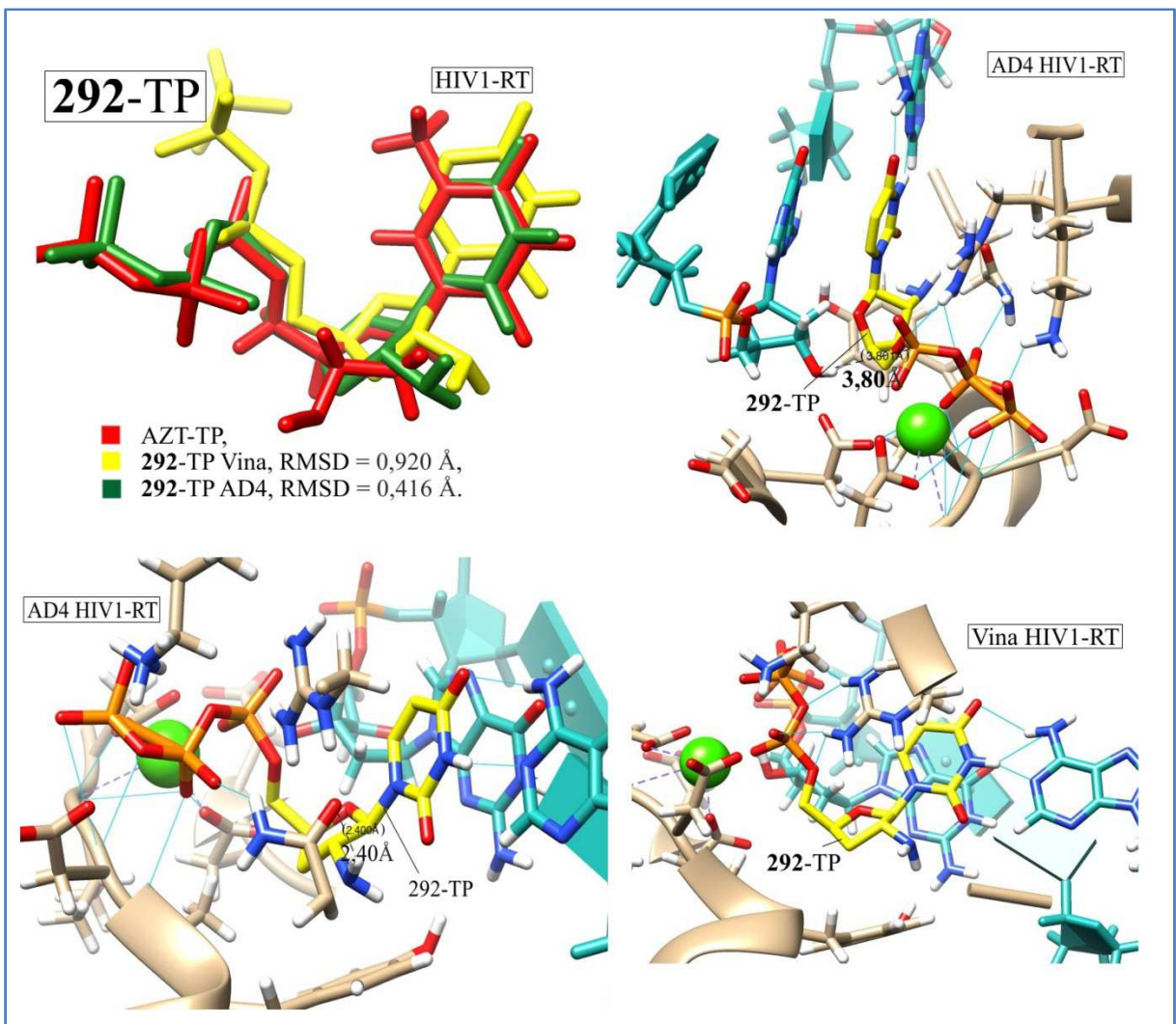
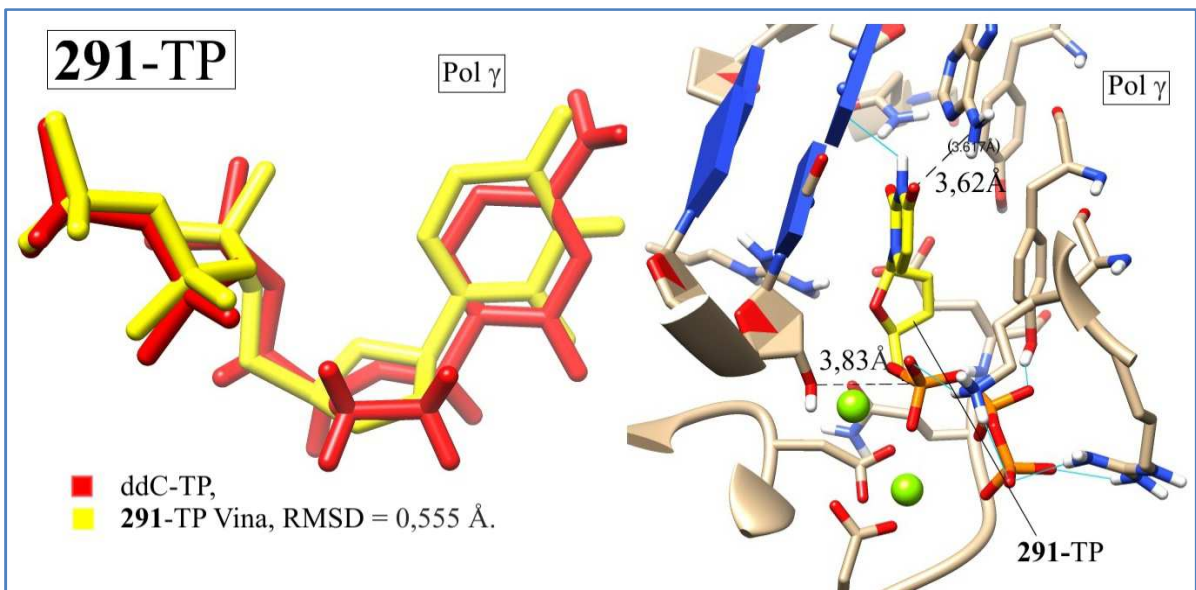


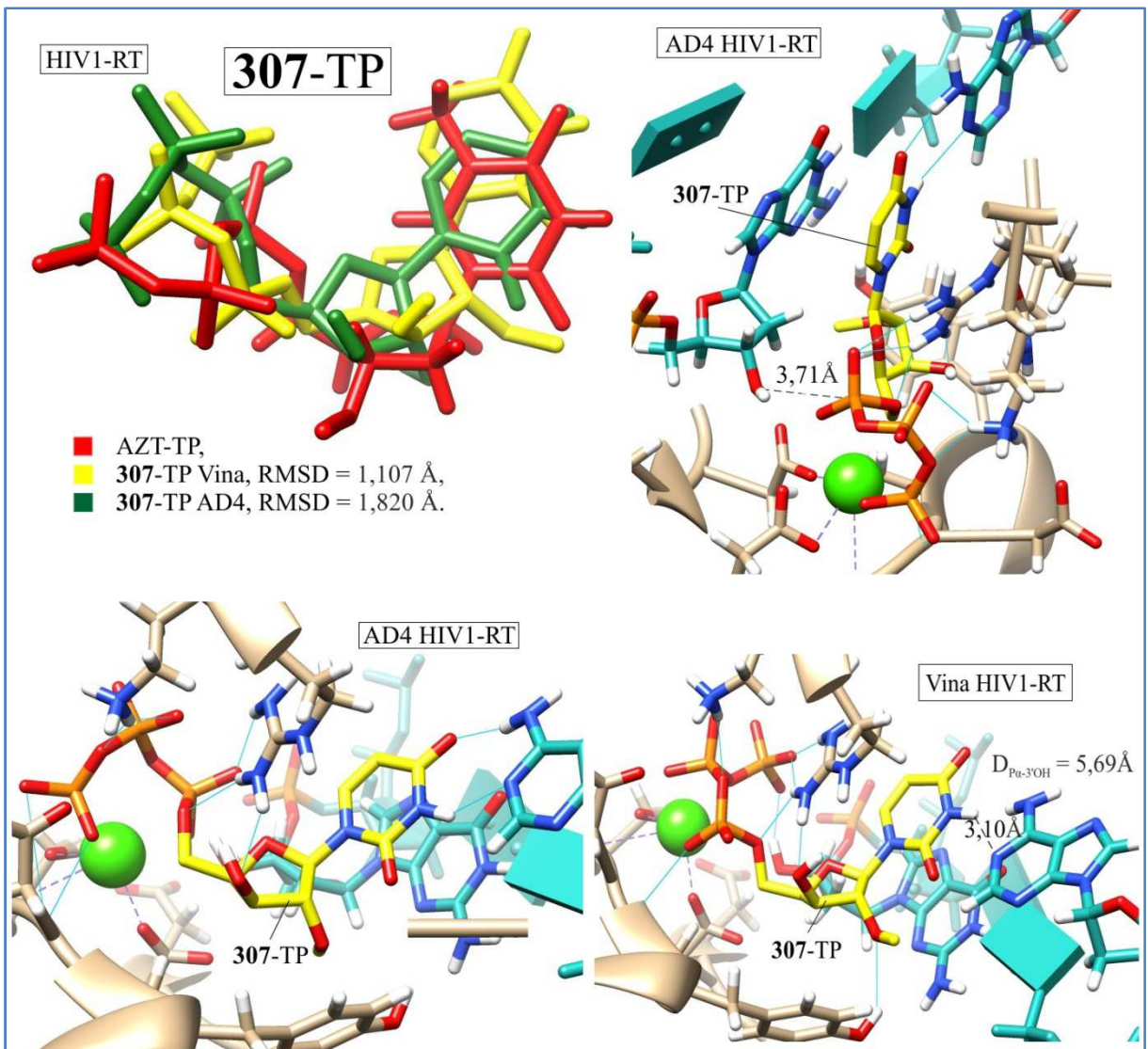
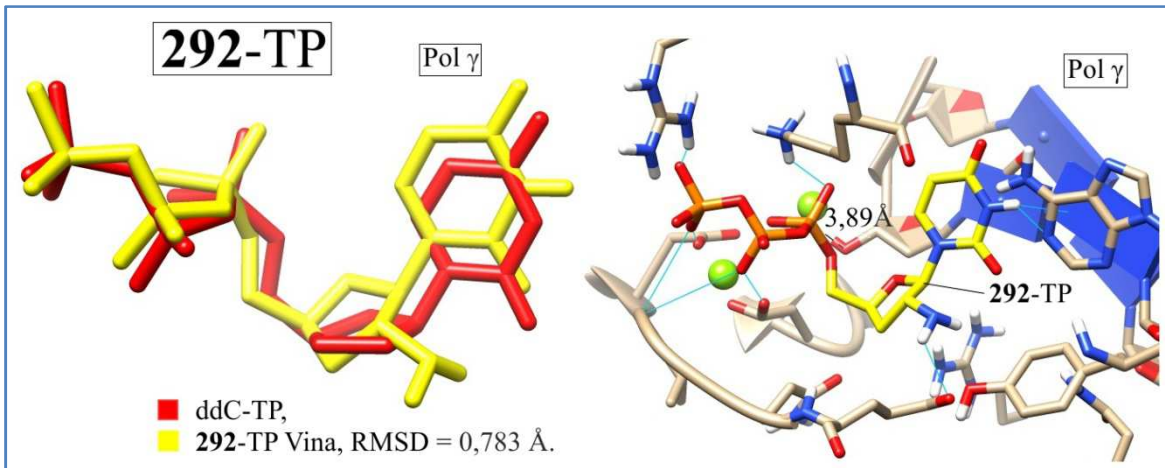


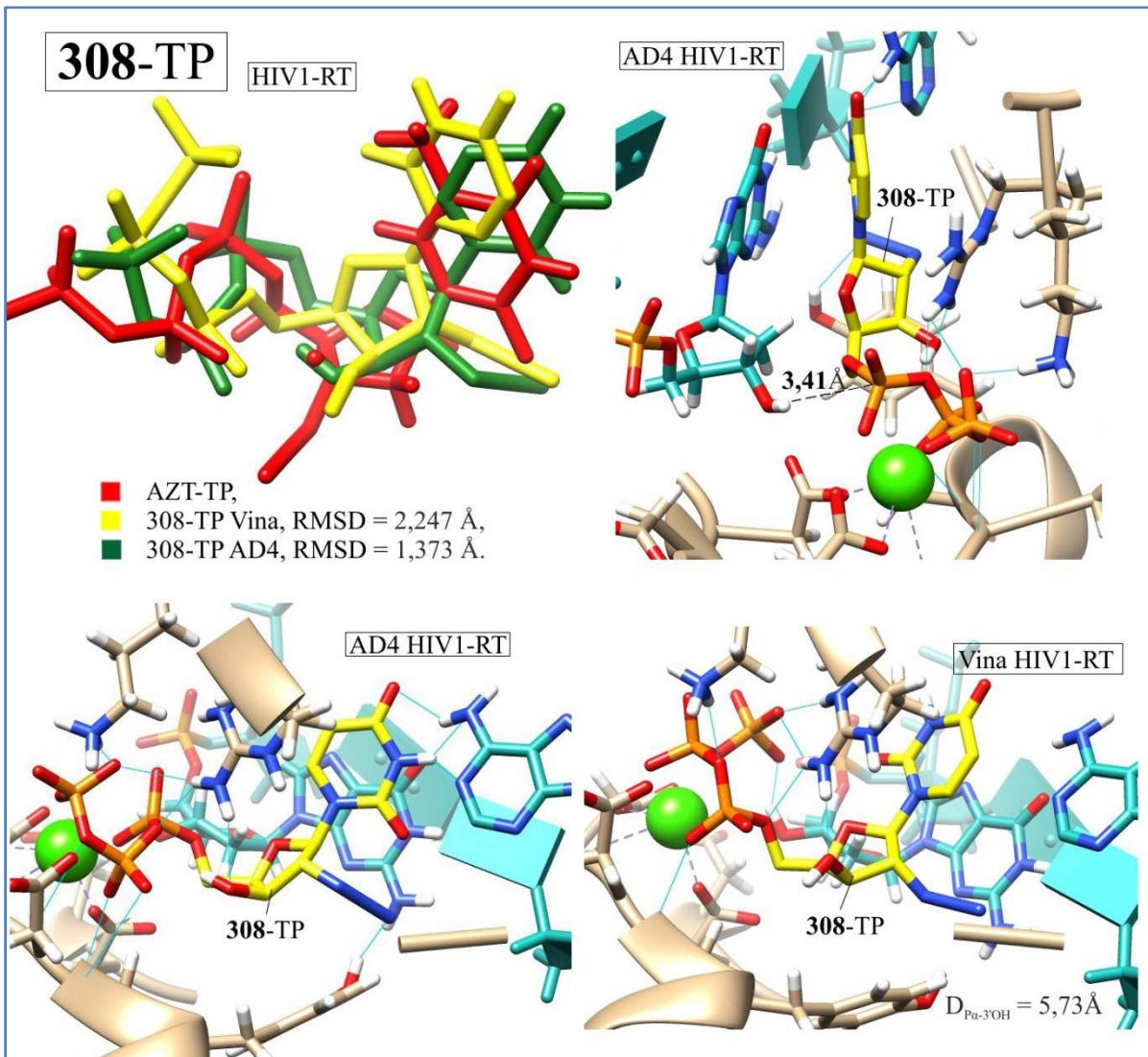
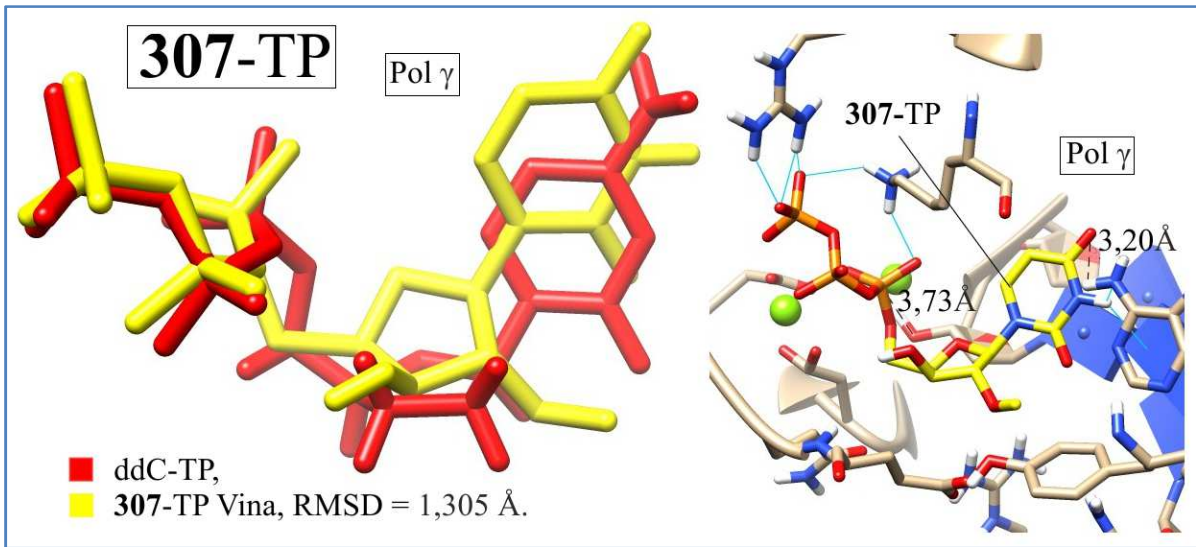


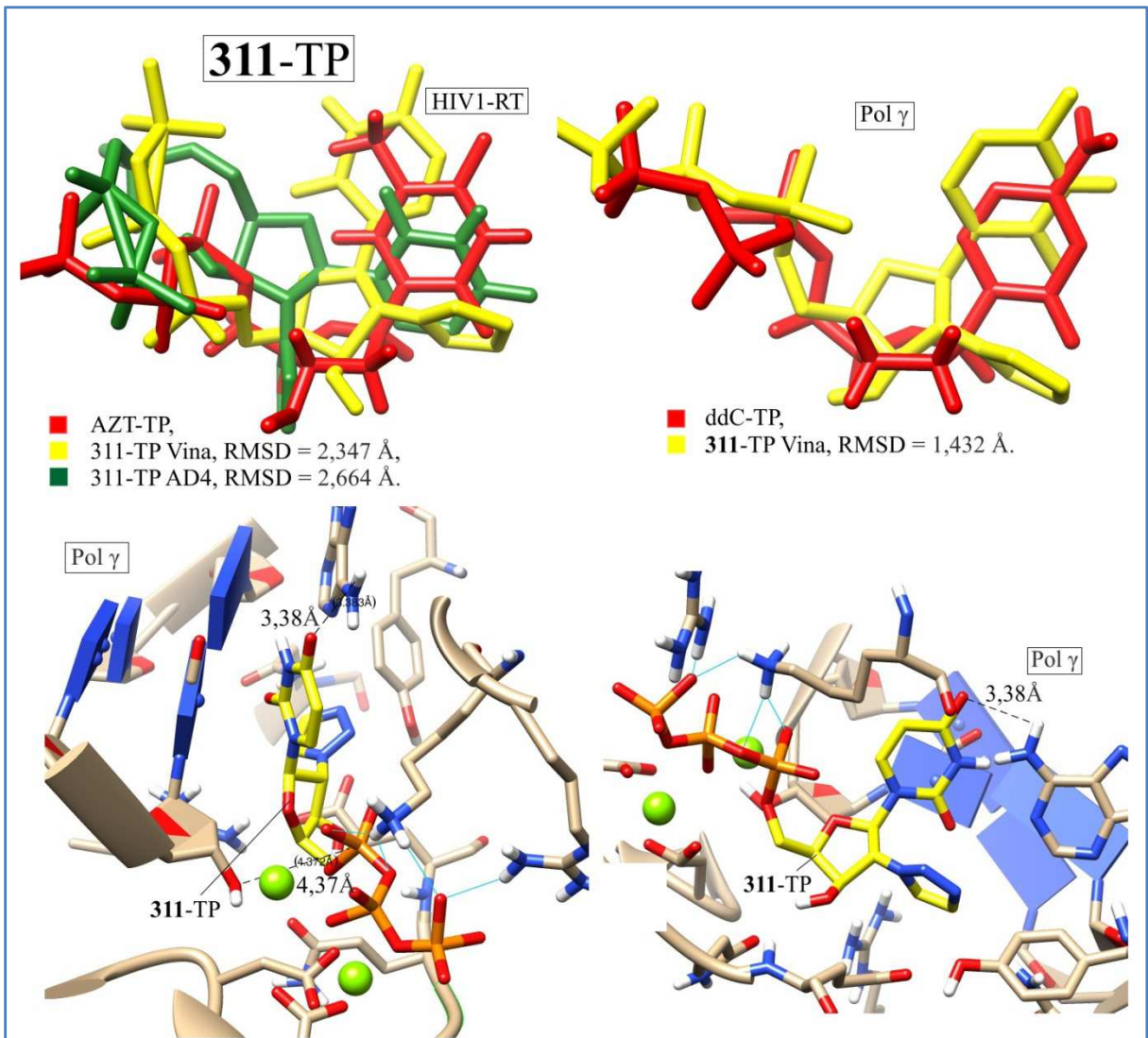
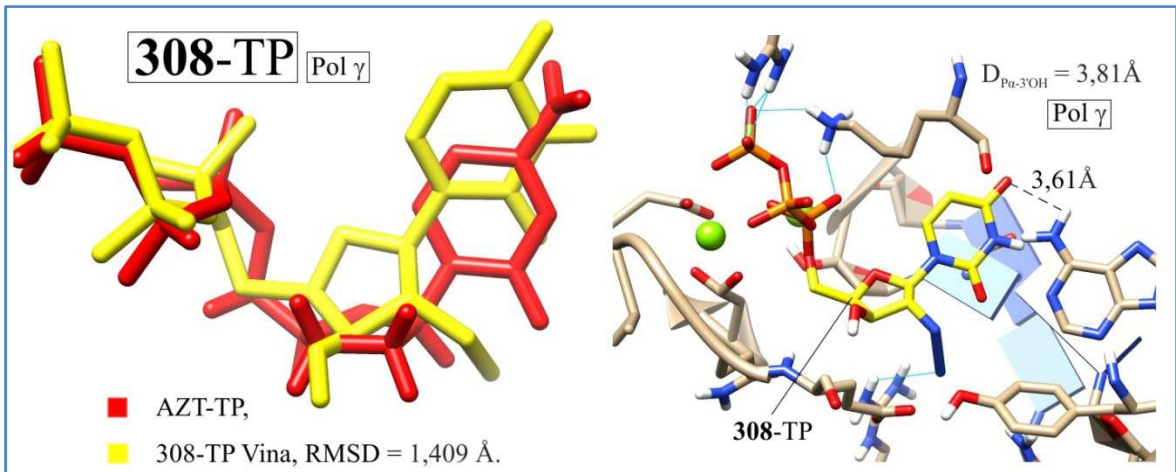


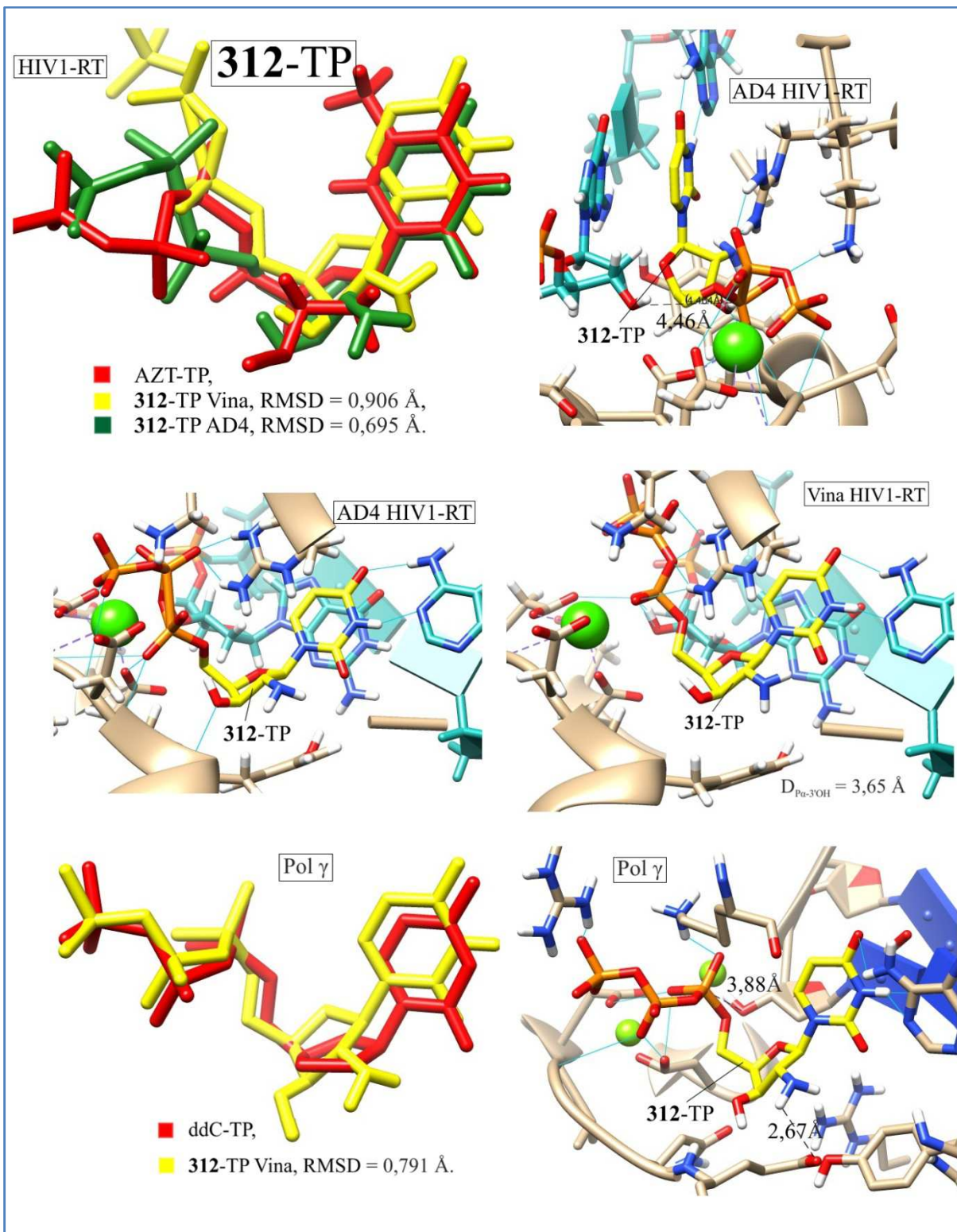


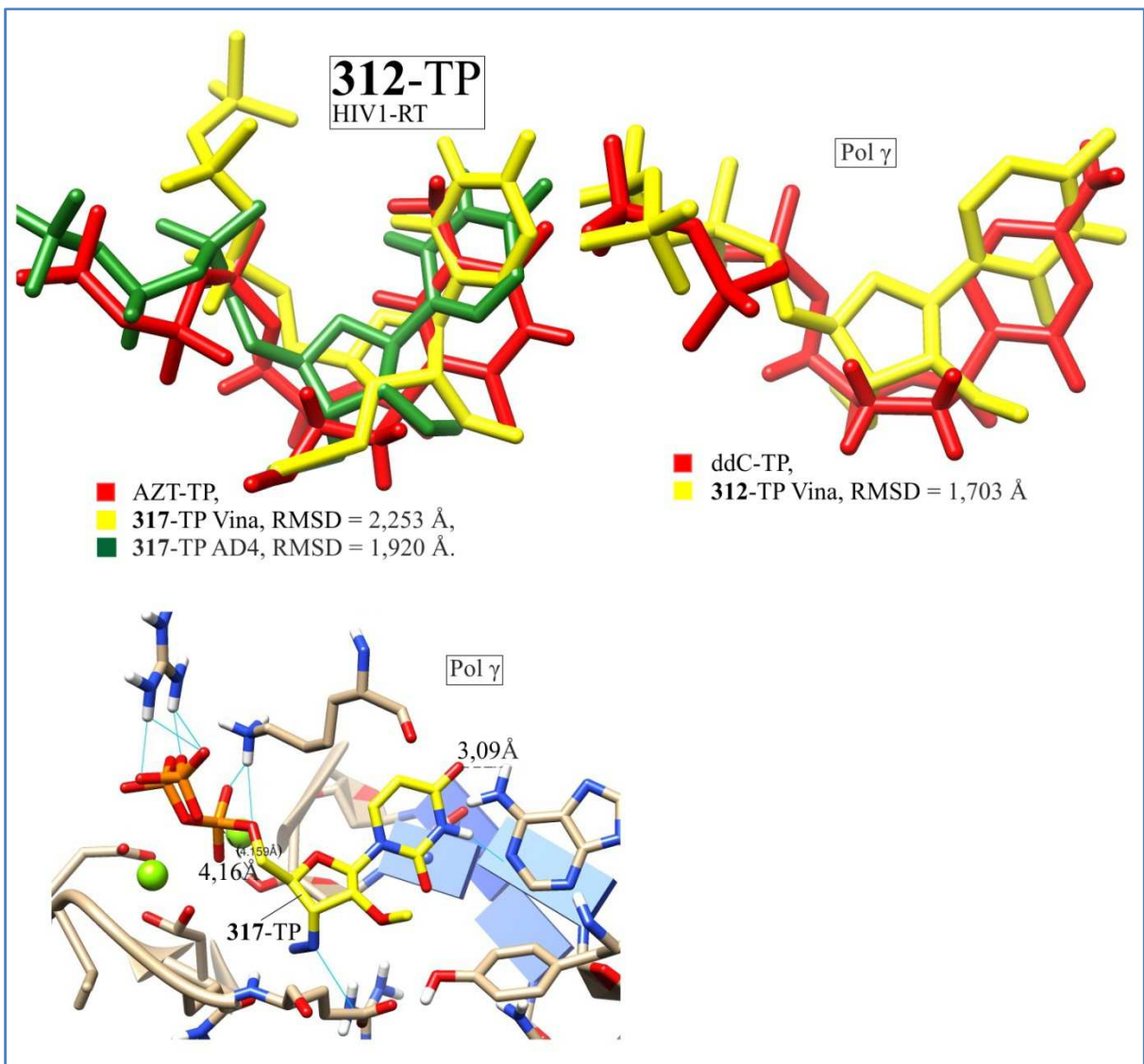




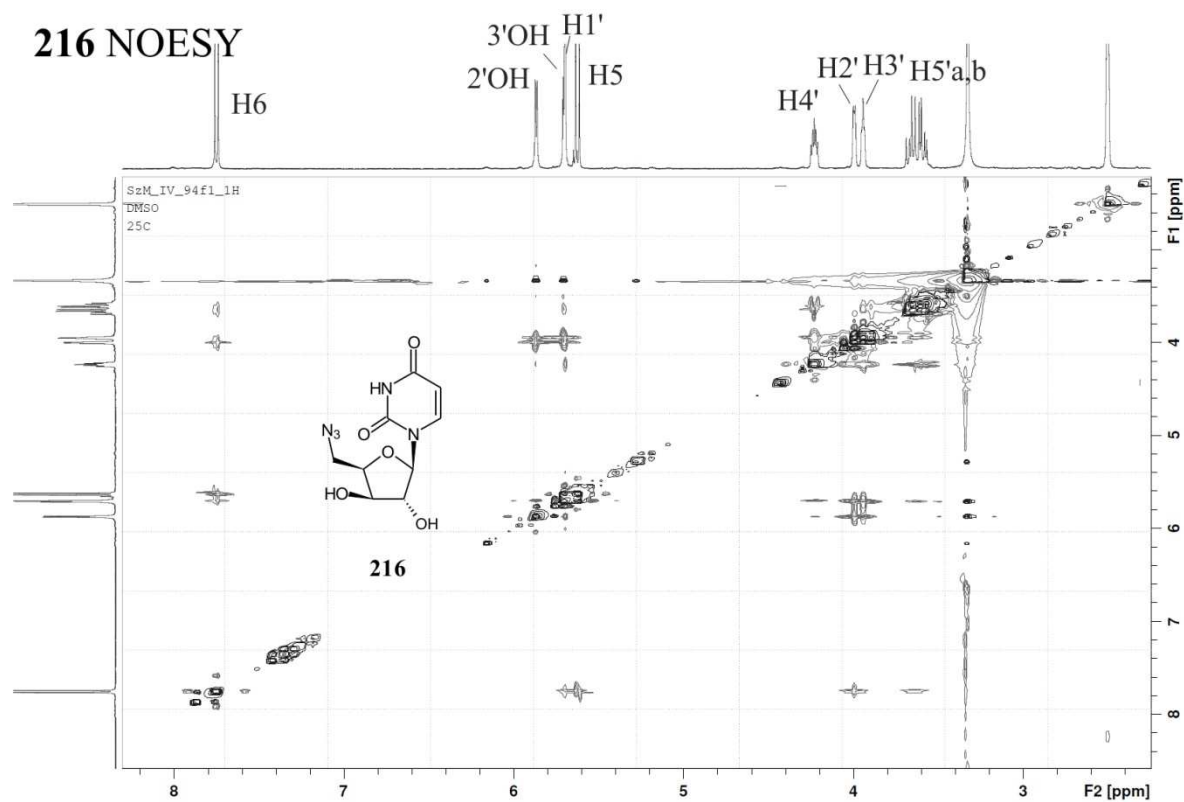
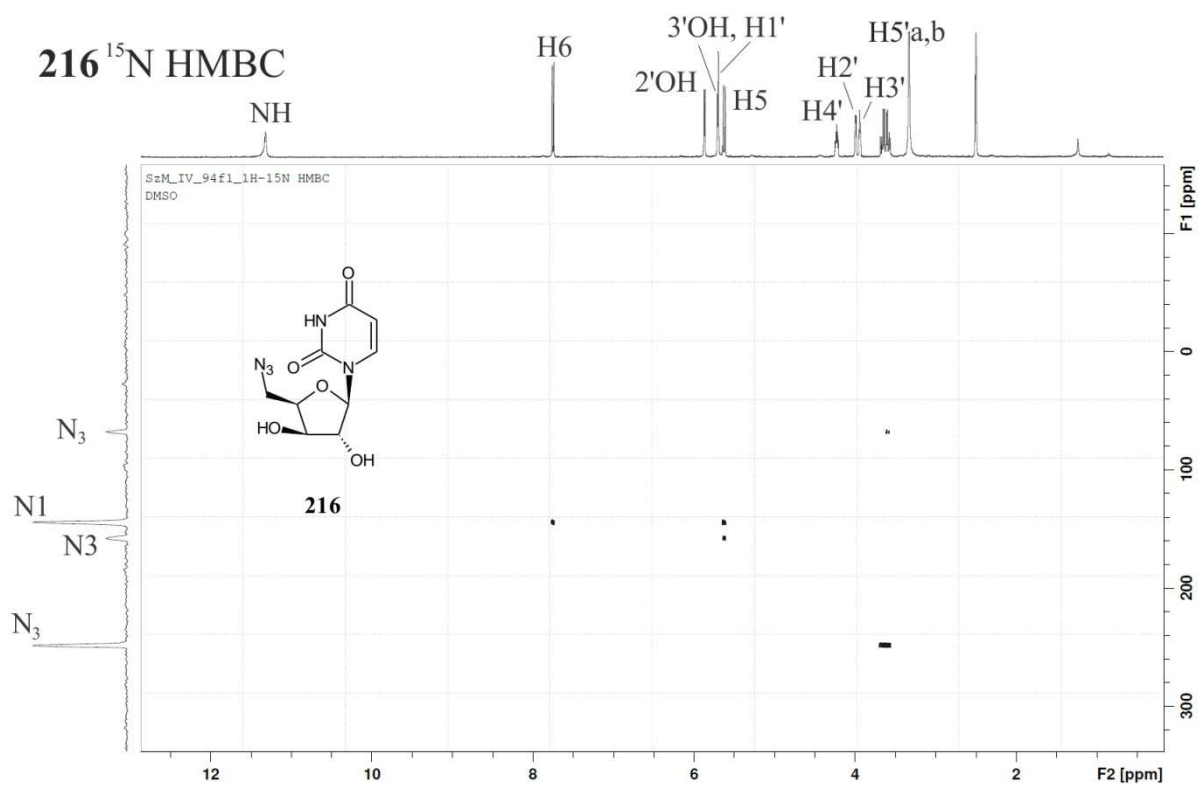








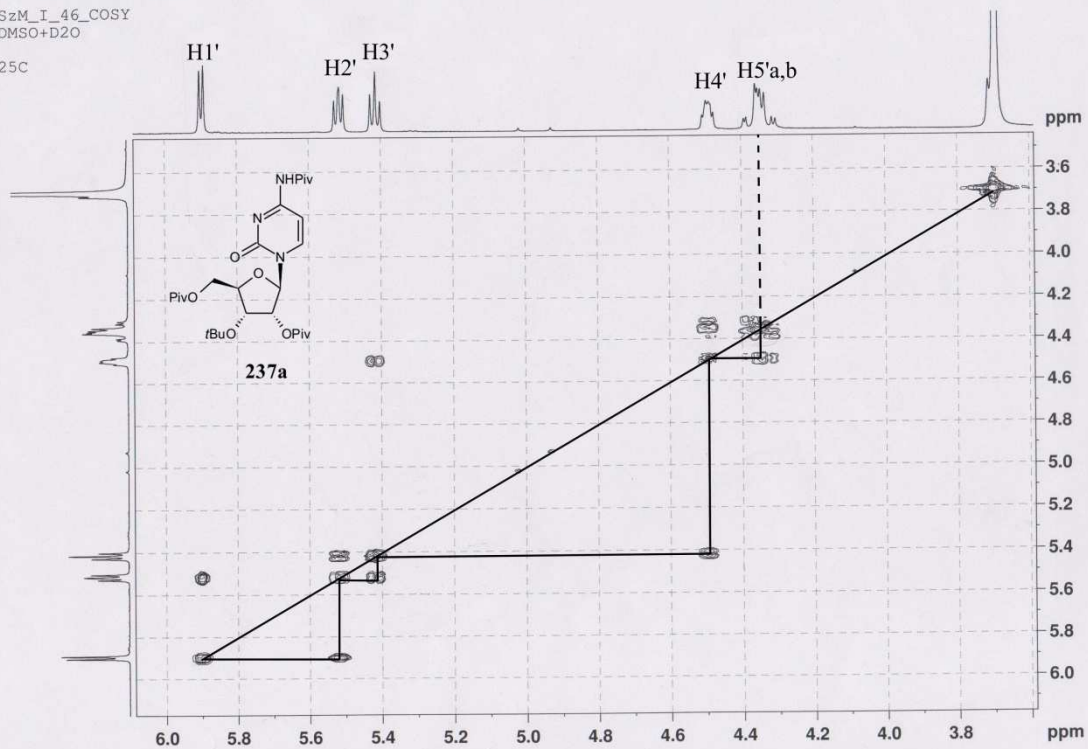
Załącznik 2 : Wybrane widma 2D NMR



237a COSY

SzM_I_46_COSY
DMSO+D2O

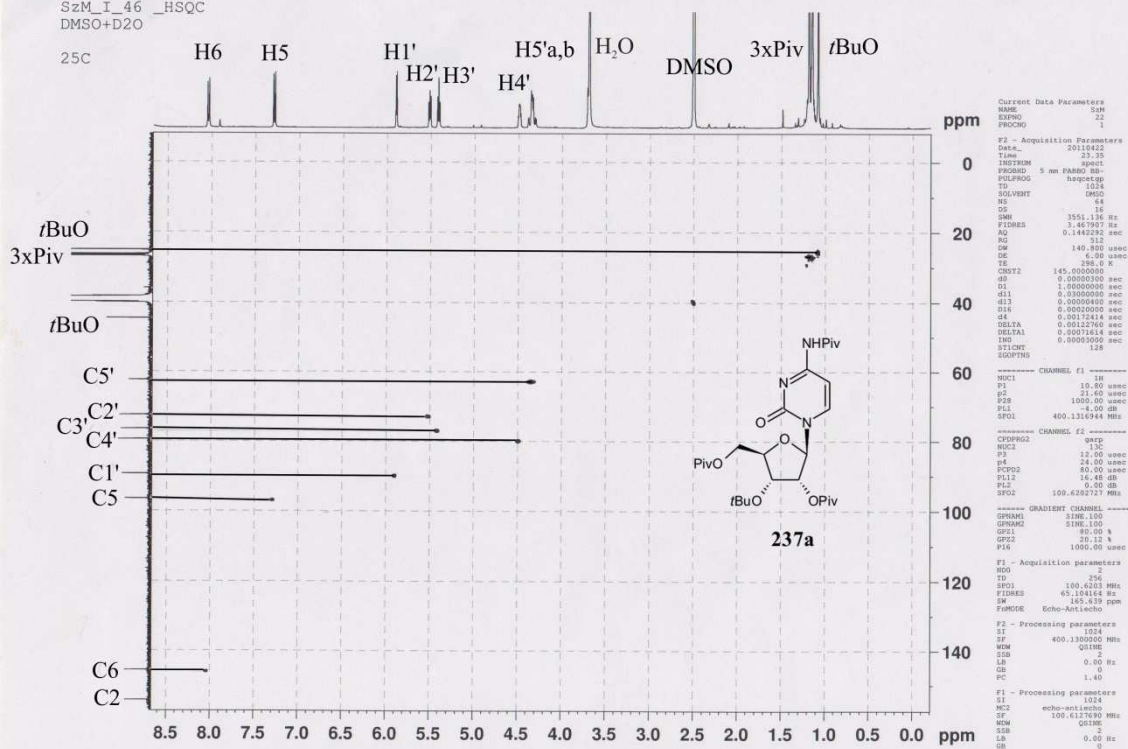
25C

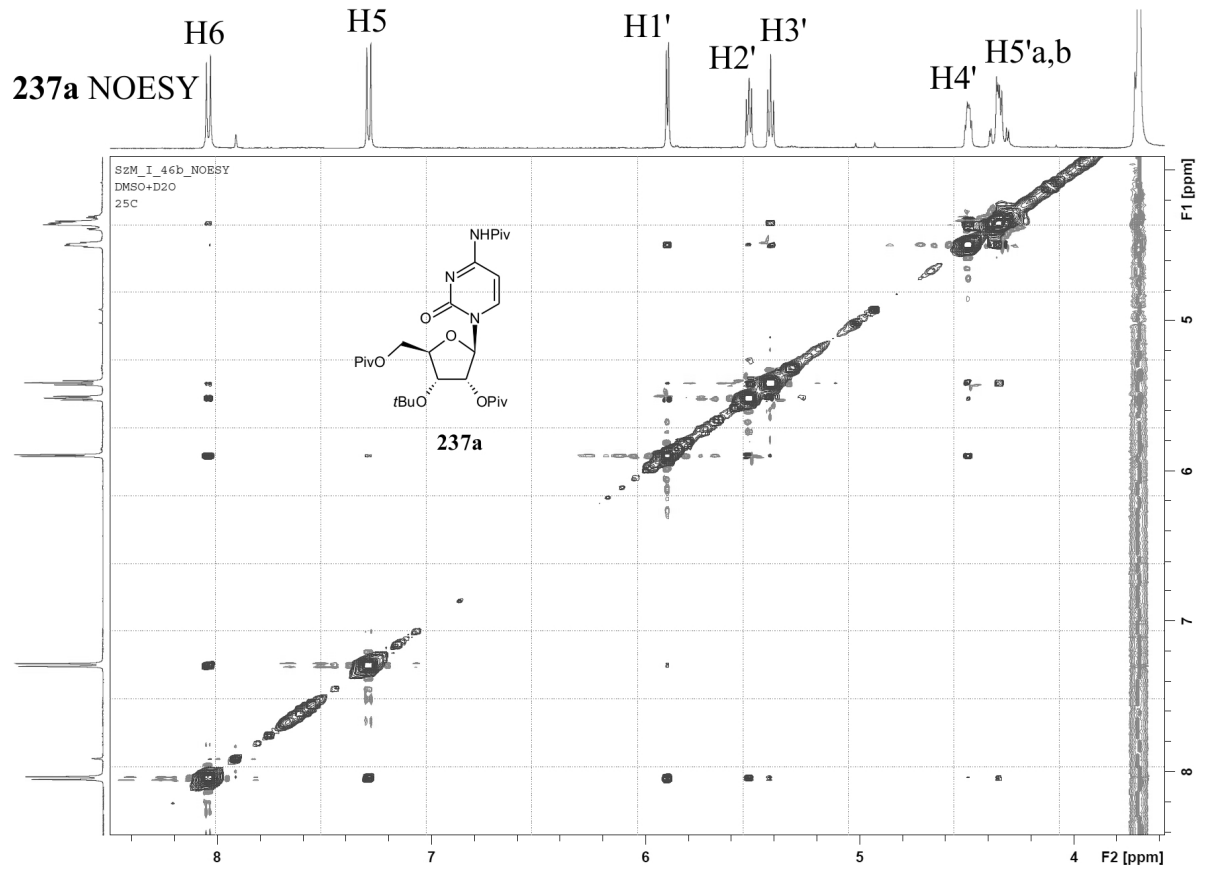
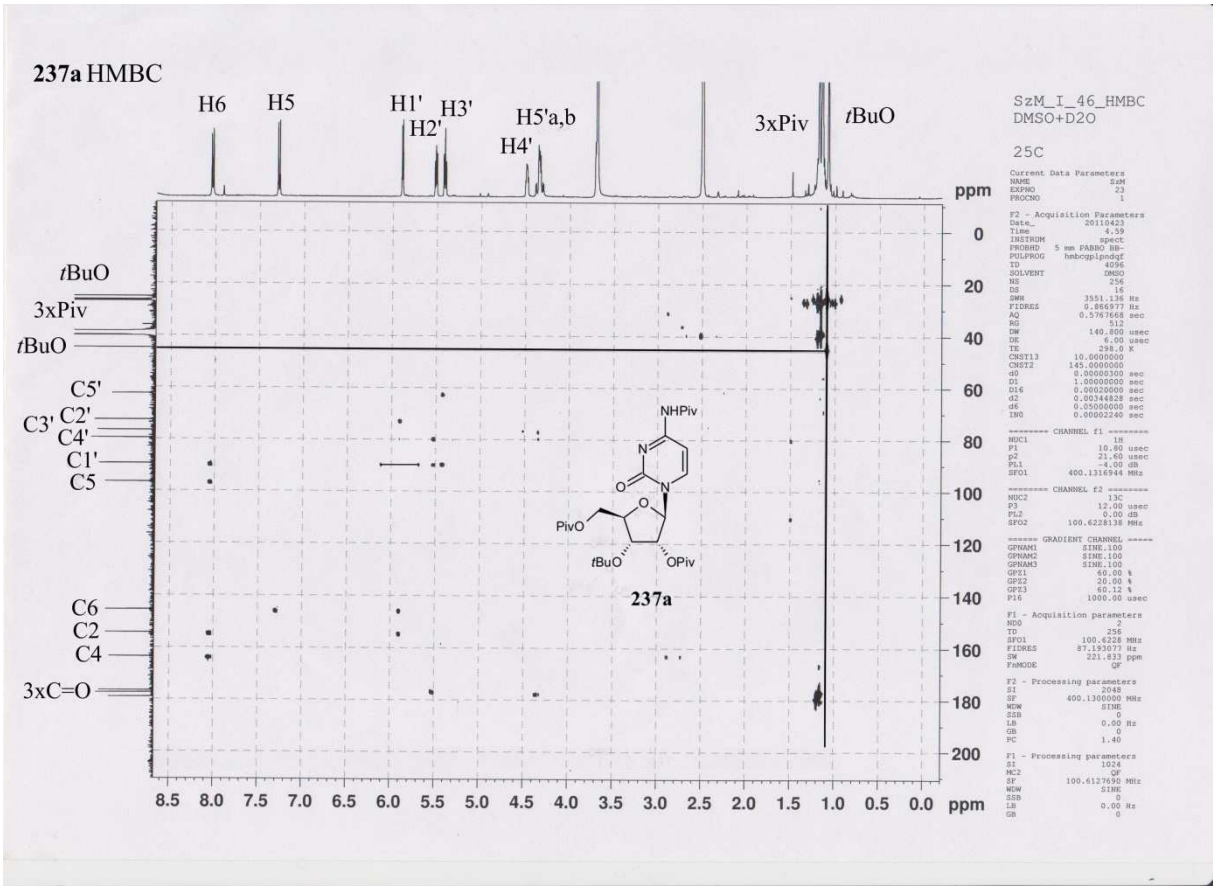


237a HSQC

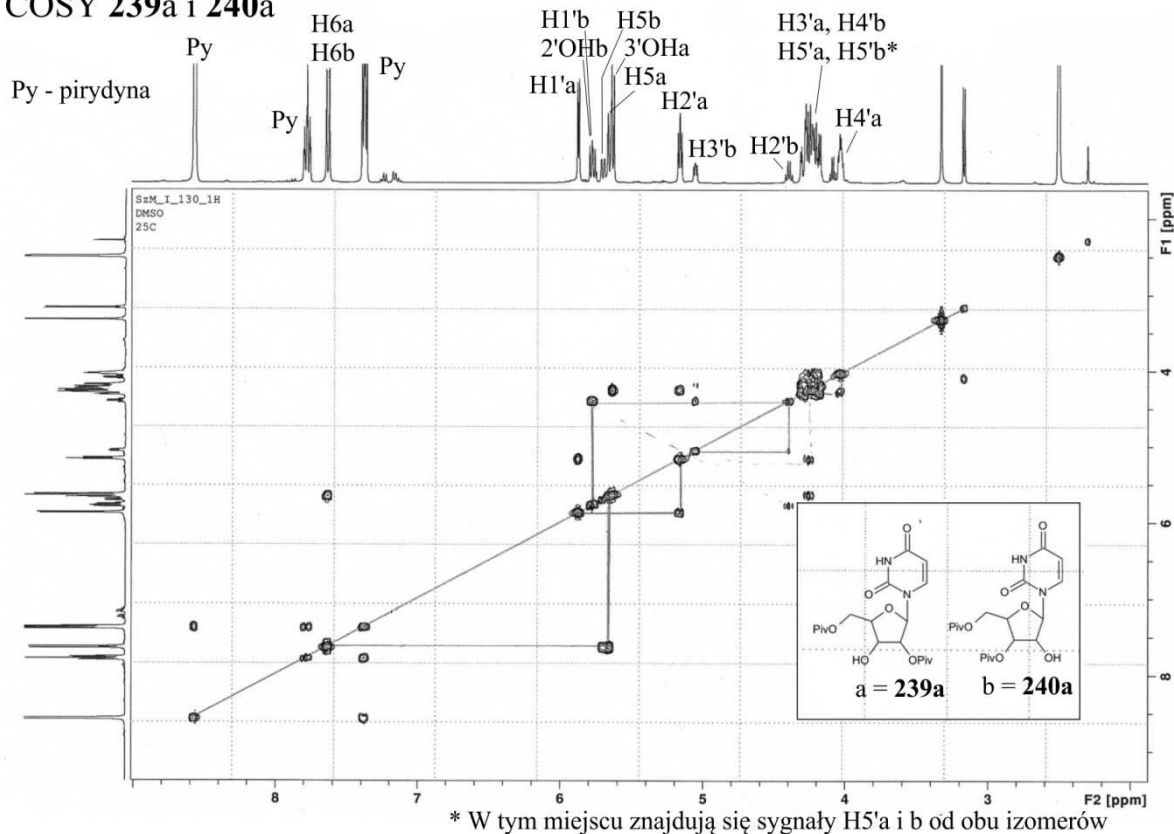
SzM_I_46_HSQC
DMSO+D2O

25C

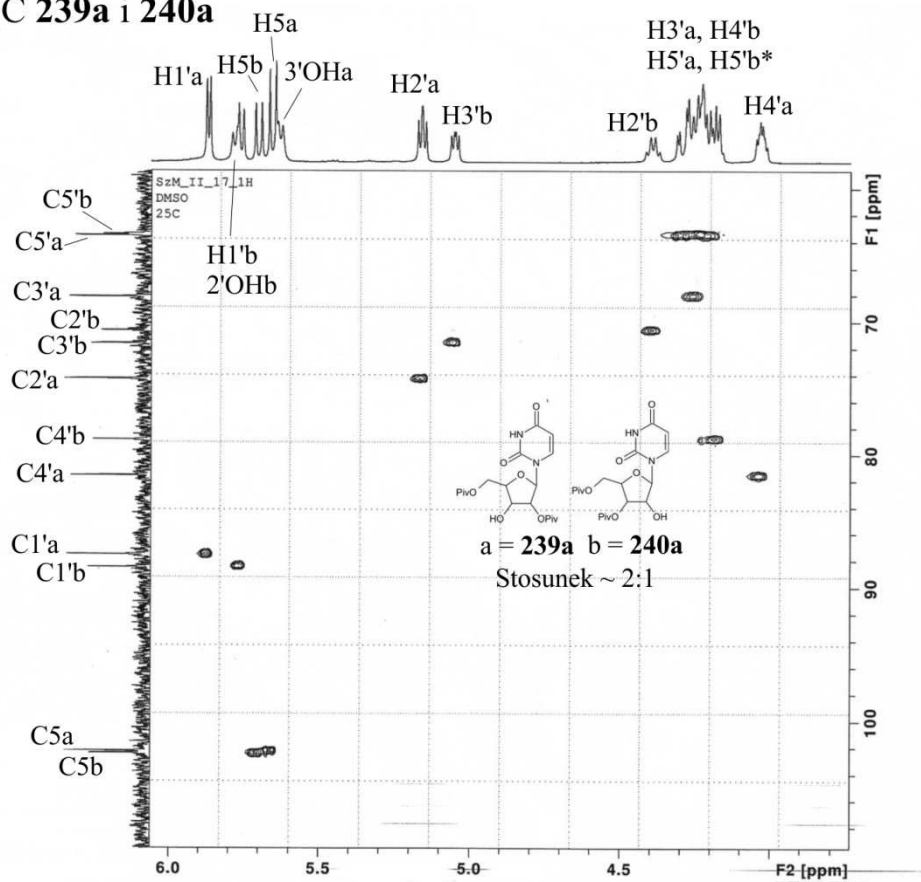




COSY 239a i 240a

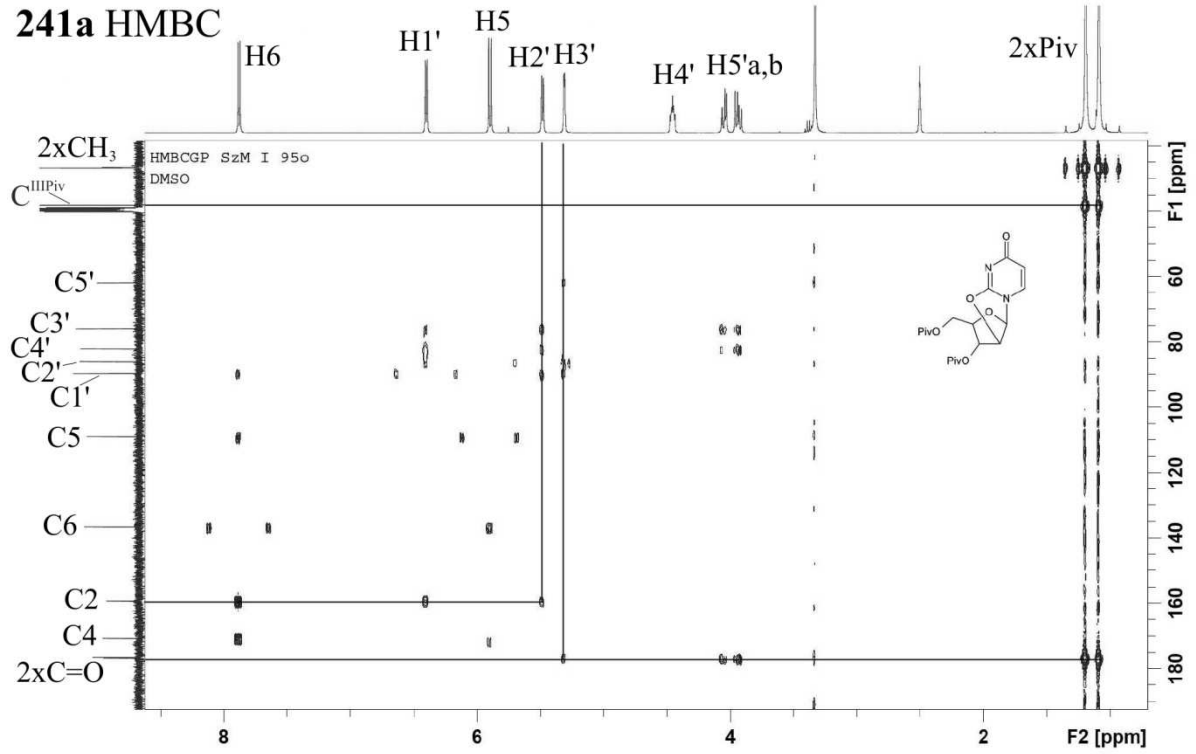


HSQC 239a i 240a

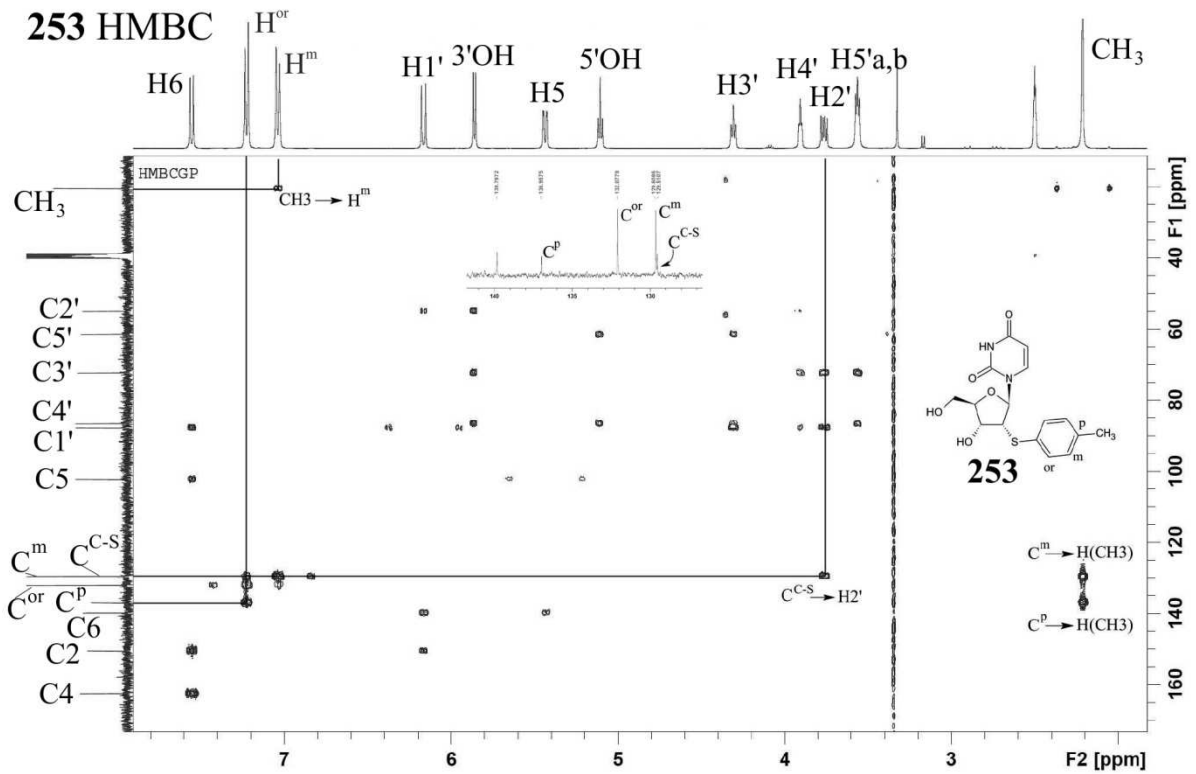


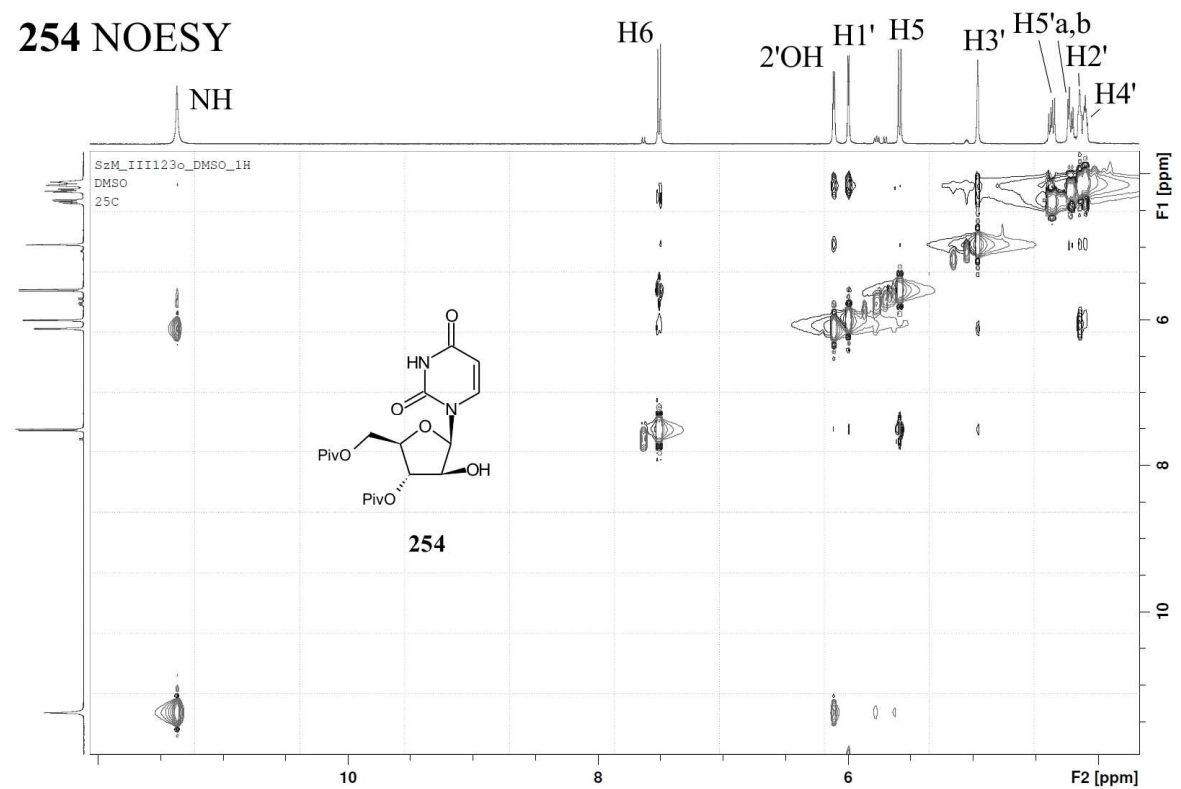
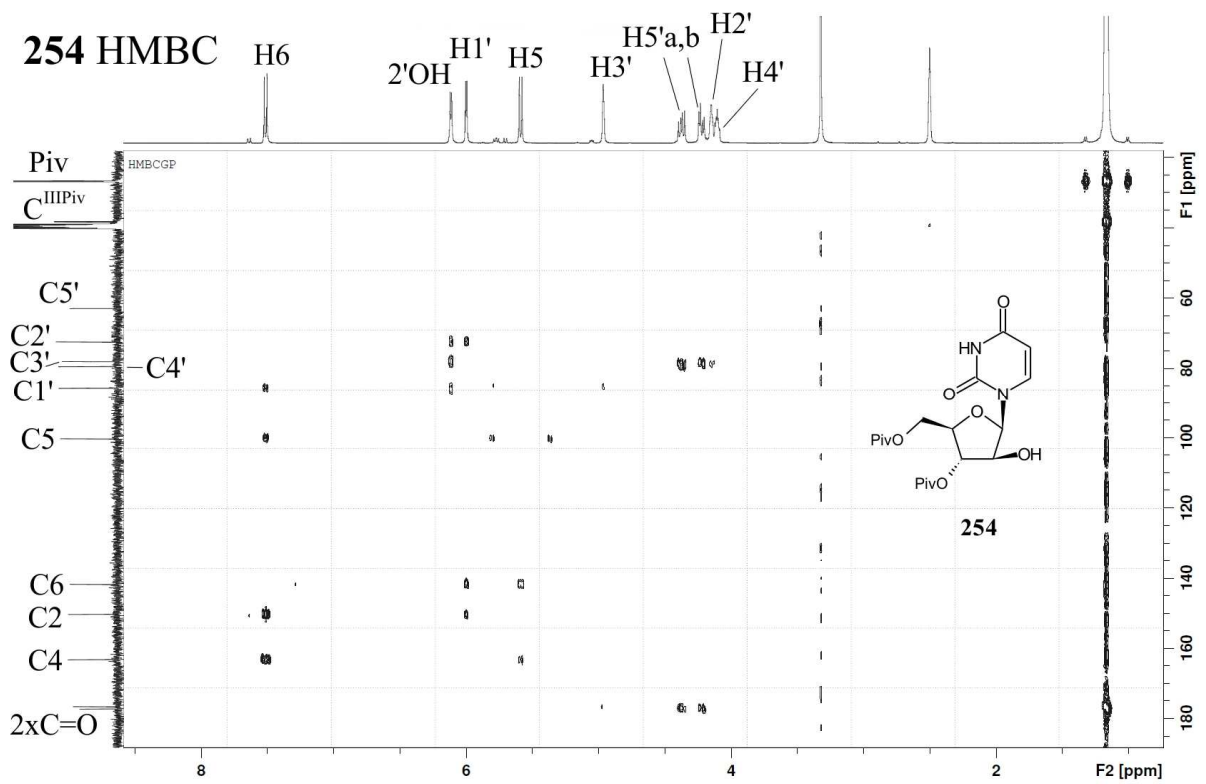
* W tym miejscu znajdują się sygnały od H5'a,b obu izomerów

241a HMBC

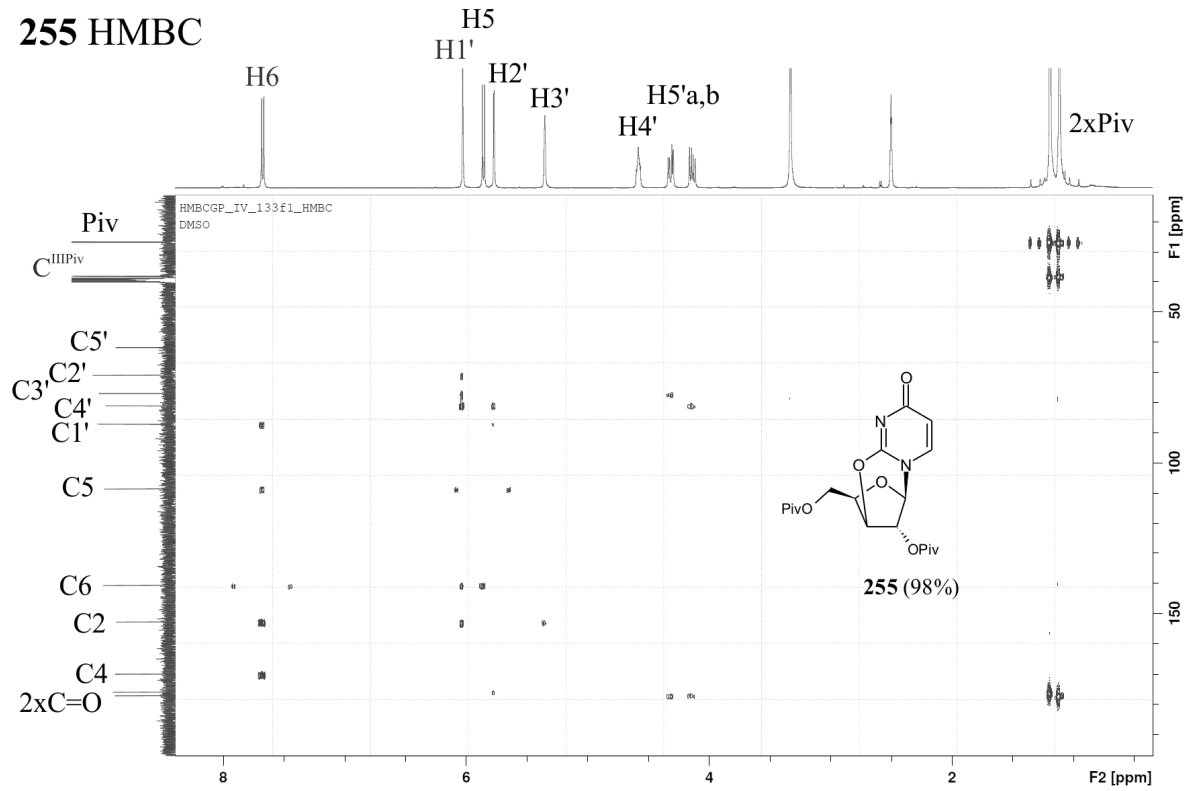


253 HMBC

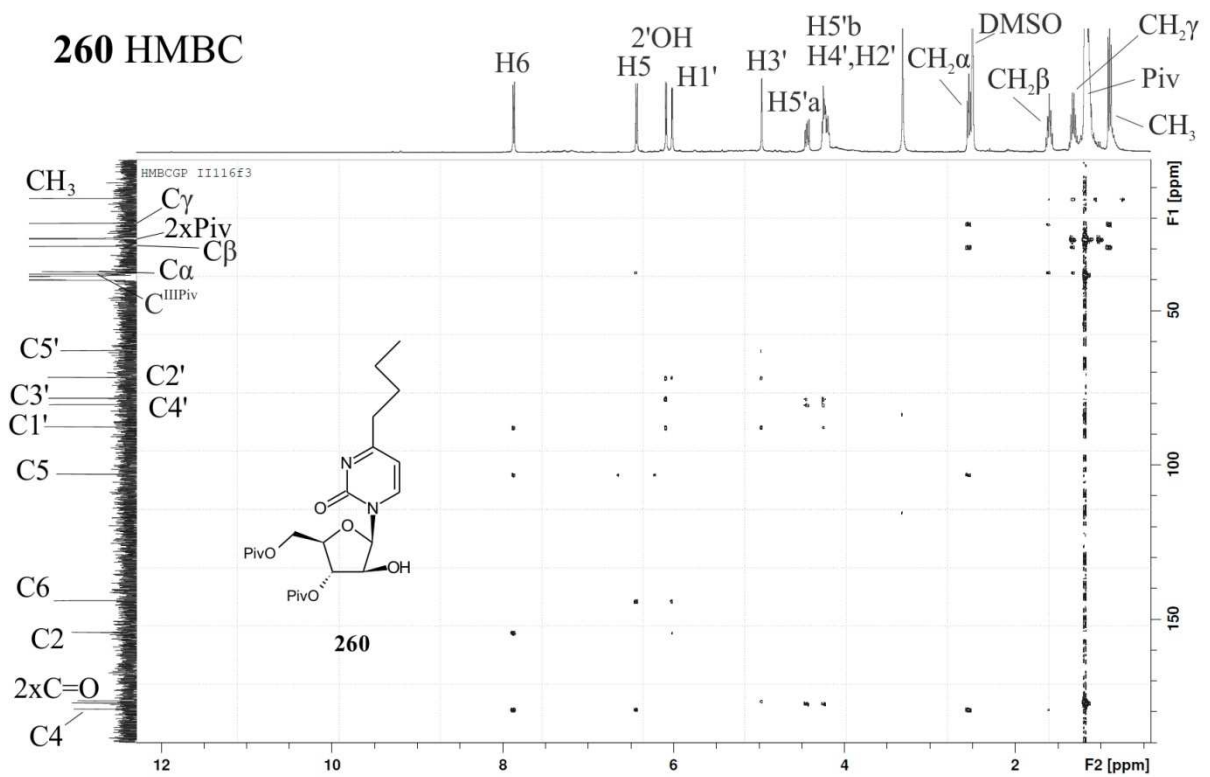


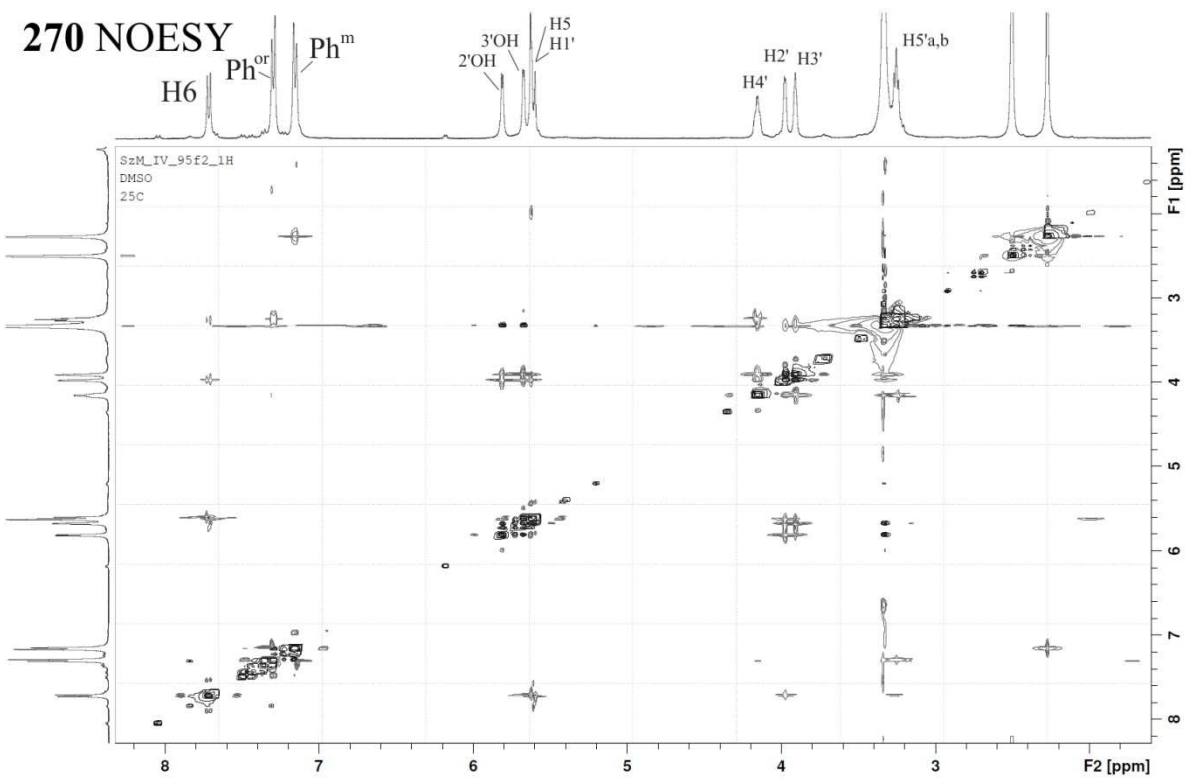
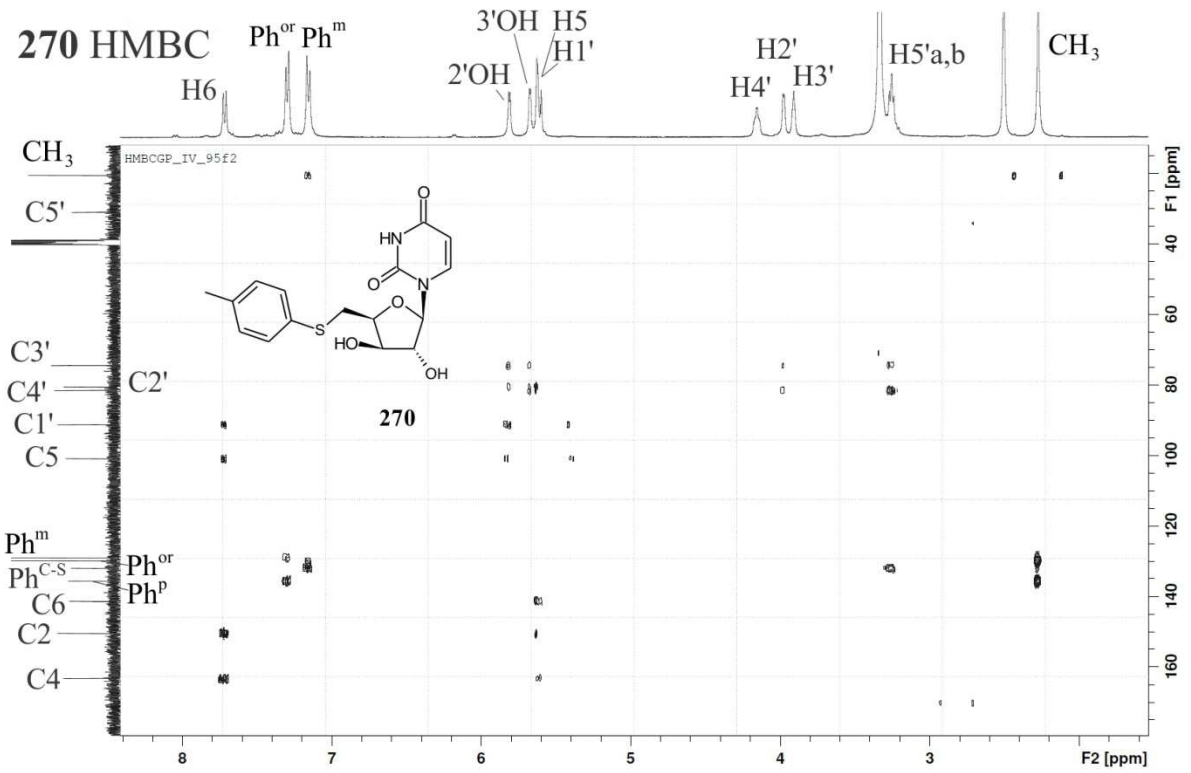


255 HMBC

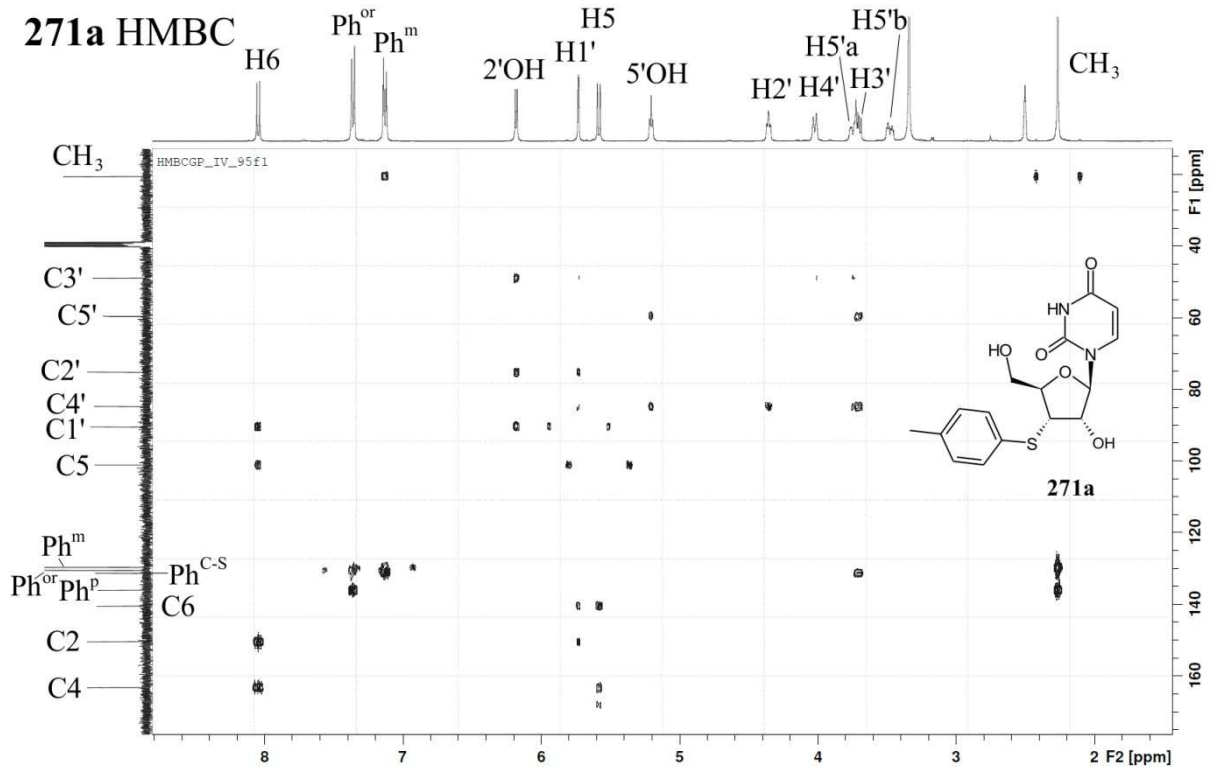


260 HMBC

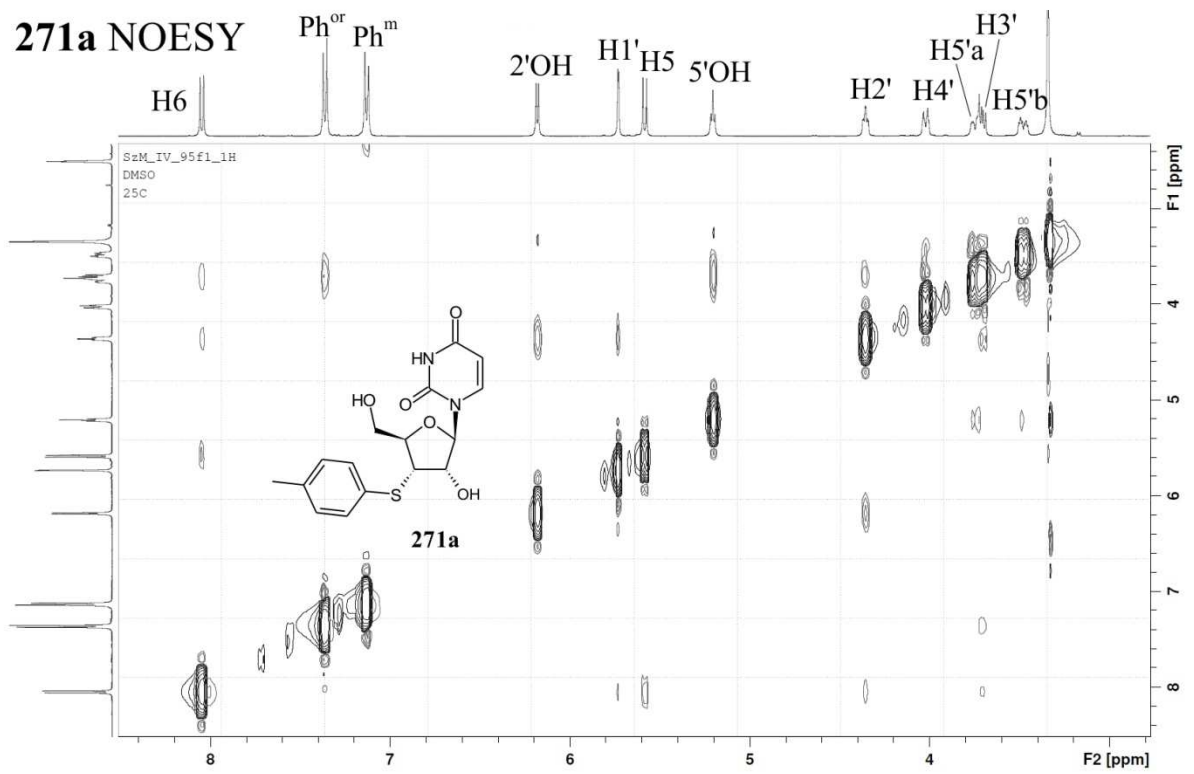




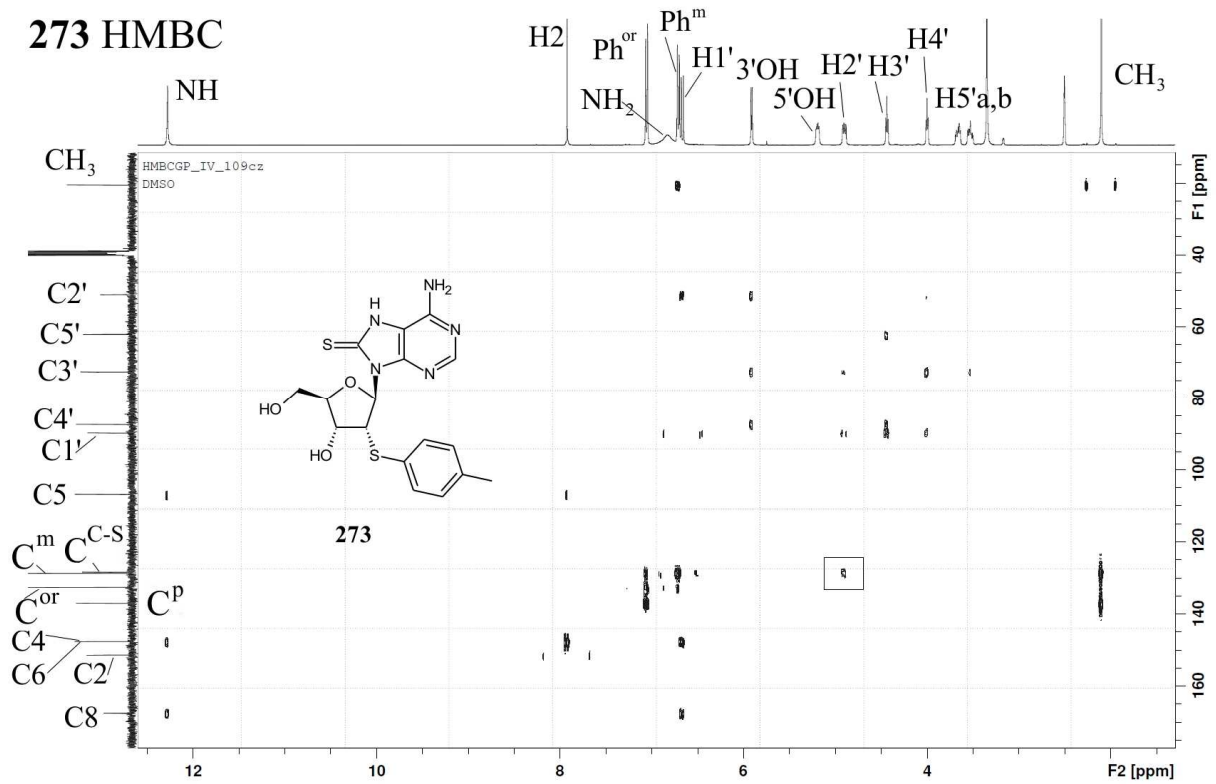
271a HMBC



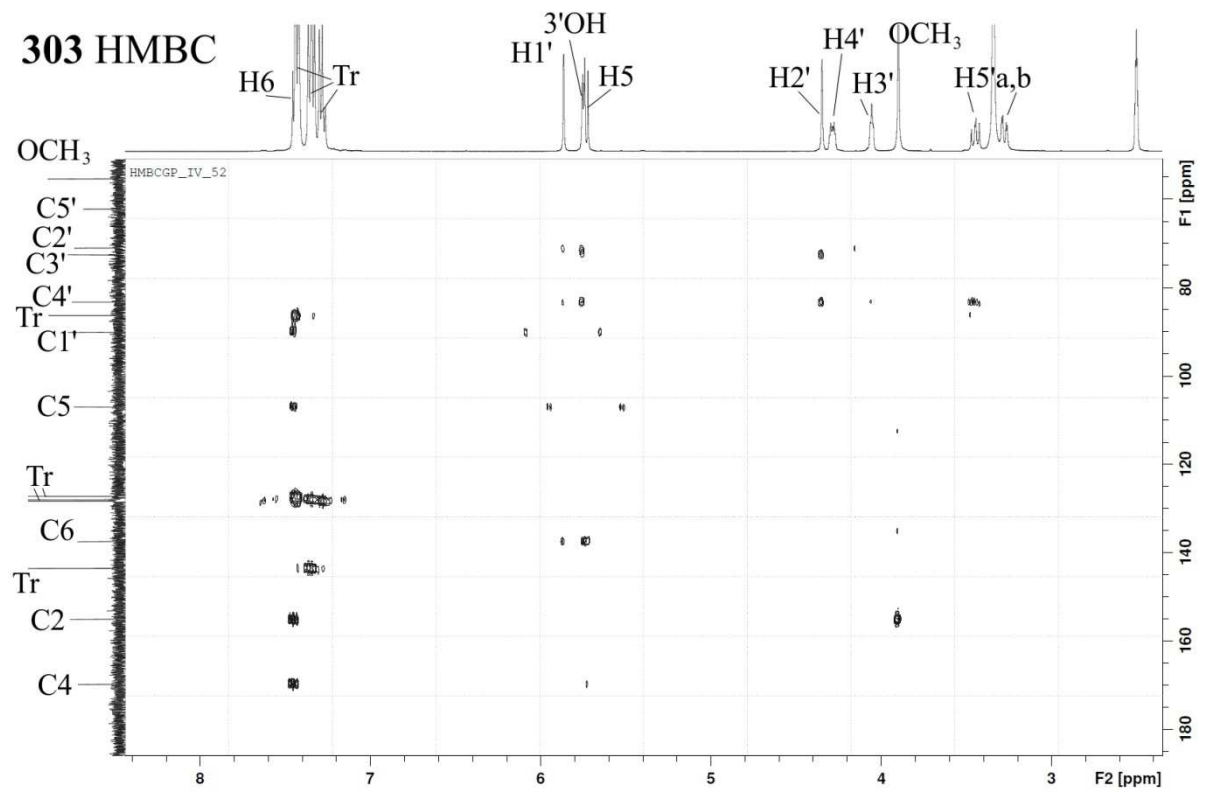
271a NOESY



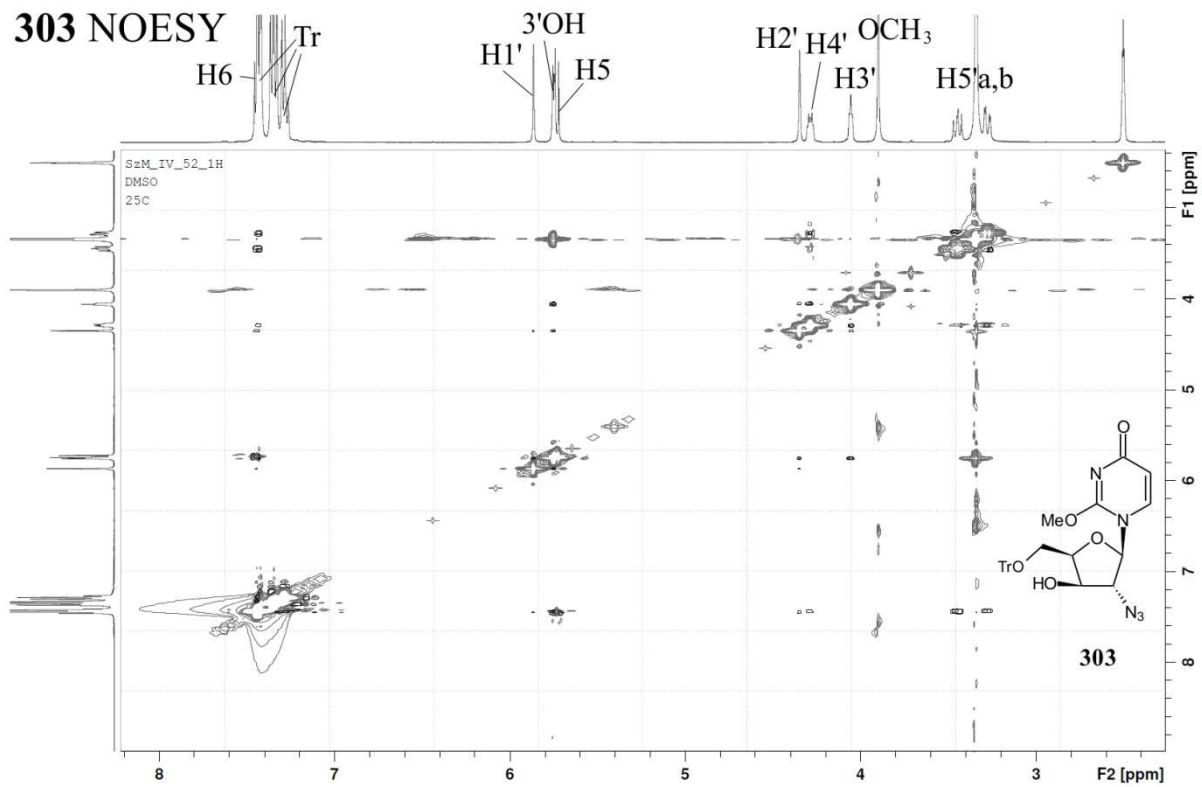
273 HMBC



303 HMBC



303 NOESY



Streszczenie

Funkcjonalizacja układu *cis*-diolowego rybonukleozydów z wykorzystaniem struktur anhydrocyklicznych

Maurycy K. Szlenkier

Nukleozydy modyfikowane w pozycjach 2' i 3' są znane od wielu lat i obejmują wiele ważnych analogów o wyjątkowych aktywnościach biologicznych. W tej grupie można wymienić analogi 2',3'-dideoksy, 2',3'-dideoksy-didehydro, analogi 2',3'-dideoksy posiadające dodatkowe podstawniki w pozycjach 2' i/lub 3' zamiast grup hydroksylowych, analogi o zmienionej konfiguracji pierścienia cukrowego oraz analogi posiadające dodatkowe podstawniki obok grup hydroksylowych. Są to związki ukierunkowane w swym działaniu przeciw wirusom i nowotworom. Struktury anhydrocykliczne są znane od połowy XX wieku, jednak możliwości ich wykorzystania wydają się nie być w pełni przebadane i opisane. Liczba 2',3'-dimodyfikowanych pochodnych rybonukleozydów możliwych do otrzymania z wykorzystaniem struktur anhydrocyklicznych jest bardzo duża, jeśli uwzględni się możliwe kombinacje podstawników S-alkilowych, S-arylowych, O-alkilowych, O-arylowych, halogenkowych, triazolowych, aminowych i podstawnika azydkowego w nukleozydach pirymidynowych a także purynowych.

Celem tej pracy było wykonanie przeglądu możliwych metod funkcjonalizacji układu *cis*-diolowego rybonukleozydów, weryfikacja przydatności struktur anhydrocyklicznych w syntezie 3'-modyfikowanych rybonukleozydów, poszerzenie zakresu wiedzy dotyczącej otrzymywania i wykorzystywania struktur anhydrocyklicznych w chemii nukleozydów oraz synteza z wykorzystaniem mostków anhydrocyklicznych serii pochodnych 2',3'-dimodyfikowanych rybonukleozydów.

Ustalono, że nie ma dobrej metody otrzymywania mostków 2,3'-anhydrocyklicznych cytydyny, a reakcja Mitsunobu 4-N,2',5'-O,O-tripiwaloilocytydyny prowadzi do produktu

o konfiguracji arabinozy. W przypadku częściowo acylowanych pochodnych urydyny reakcja Mitsunobu prowadziła do produktów 2,2'-anhydrocyklicznych pomimo dużej przewagi w mieszaninie substratów izomeru z wolną grupą 3'OH. Przy pomocy metod modelowania molekularnego stwierdzono, że przyczyną obserwowanej regioselektywności jest najprawdopodobniej geometria układu. Jednak korzystając z metod częściowej acylacji można uzyskać pochodną 2,3'-anhydrocykliczną z zadowalającą wydajnością oraz czystością. Opracowana metoda może stanowić alternatywę wobec dotychczas stosowanych metod korzystających z ditrytylowania.

W trakcie poszukiwań nowych reaktywności struktur anhydrocyklicznych nie znaleziono nowych nukleofili, które ulegałyby podstawieniu w pozycji 2' mostków 2,2'-anhydrocyklicznych. Stwierdzono za to, że do mostka anhydrocyklicznego 2,3'-anhydrourydny oraz 8,2'-S-anhydroadenozyny można przeprowadzić skuteczną substytucję anionem aryliotolanowym, co do tej pory nie było prezentowane. Gdy grupy 5'OH oraz 2'OH pochodnej 2,3'-anhydrourydny były blokowane, wówczas żadna substytucja zajść nie chciała. Bardzo ograniczona reaktywność 8,2'-S-anhydroadenozyny sugeruje, że w strategii wprowadzania modyfikacji w układzie *cis*-diolowym pochodnych adenozyne lepszym kandydatem będzie 8,2'-O-anhydroadenozyna.

Przedstawiono również syntezę dwóch serii 2',3'-dimodyfikowanych pochodnych urydny z wykorzystaniem struktur anhydrocyklicznych różniących się podstawnikiem w pozycji 2'. Związki te po wykonaniu wszystkich badań biologicznych mają pomóc w określeniu wpływu podstawnika w tym miejscu na aktywność przeciw wirusowi HIV-1 oraz cytotoksyczność. Eksperymenty dokowania molekularnego wykazały, że zmiany aktywności nie muszą być ściśle zależne od objętości podstawnika, ze względu na możliwość tworzenia dodatkowych wiązań wodorowych, gdy podstawnik posiada akceptory i/lub donory wiązań wodorowych. Przedstawiona strategia wprowadzania modyfikacji będąca rozwinięciem pracy Q. Dai i J.A. Piccirillego^[1] może stać się w przyszłości uniwersalną metodą modyfikacji układu *cis*-diolowego rybonukleozydów, do czego ta praca również się przyczyniła.

1. Dai, Q.; Piccirilli J.A. Efficient synthesis of 2',3'-dideoxy-2'-amino-3'-thiouridine, *Org. Lett.* **2004**, 6, 2169-2172.

Abstract

Functionalization of a *cis*-diol system of ribonucleosides using anhydrocyclic structures

Maurycy K. Szlenkier

Nucleosides modified in the 2' and 3' positions are known for many years and involve many important, bioactive compounds. This group consists of derivatives of 2',3'-dideoxy or 2',3'-dideoxy-didehydro types, derivatives with additional substituents or substituents instead of hydroxyl groups. These compounds are targeted against viruses and tumors. Anhydrocyclic structures have been known since the middle of the 20th century. However, their utility seems not to be fully explored and described. The number of possible to obtain through anhydrocyclic synthons 2',3'-dimodified derivatives is very vast, taking under consideration different combinations of S-alkyl, S-aryl, O-alkyl, O-aryl, halogen, triazole, amine and azide substituents in both pyrimidine and purine nucleosides.

The aim of this work was to overview known methods of functionalization of a *cis*-diol system of ribonucleosides, verification of anhydrocyclic synthons utility in 3'-modified ribonucleosides synthesis, extending the scope of recent knowledge and synthesis of 2',3'-dimodified ribonucleosides using anhydrocyclic synthons.

During the course of research it was established that there is no effective method to obtain 2,3'-anhydrocyclic bridge in cytidine derivatives and Mitsunobu reaction of 4-N,2',5'-O,O-tripivaloylcytidine led to a product with arabino configuration. In the case of partially acylated uridine, Mitsunobu reaction led to 2,2'-anhydrocyclic products despite of excess of isomer with free 3'-hydroxyl group. With the help of molecular modeling it was found that the observed regioselectivity was most probably due to geometrical feasibility. Nevertheless, partial acylation can lead to 2,3'-anhydrouridine derivatives with sufficient yield and purity, what can be an alternative synthetic method comparing to those based on partial tritylation.

During the conducted search for novel reactivities of anhydrocyclic synthons no new nucleophiles were found to substitute the position 2' of 2,2'-anhydrocyclic compounds.

However, it was established that aryltiolate anion can successively and directly substitute the 3' position of 2,3'-anhydrouridine and 2' position of 8,2'-S-anhydroadenosine, what was not reported so far. When 5'OH and 2'OH groups of 2,3'-anhydrouridine were blocked no substitution was observed. Accordingly to performed experiments with 8,2'-S-anhydroadenosine, the overall reactivity of this compound is very limited and 8,2'-O-anhydroadenosine seems to be a better candidate for introduction of substituents to the *cis*-diol system.

Finally, the synthesis of two 2',3'-dimodified uridine derivatives series were conducted. The compounds differed with 2'-substituents and are thought to help in establishing the influence of the 2'-substituent on antiviral activity against HIV-1 and cytotoxicity. Molecular docking revealed that changes of activity levels may not be directly resulting from size of substituents because of new hydrogen bonding with hydrogen donors and acceptors present in substituents. Presented strategy of the *cis*-diol system modification, as a development of work done by Q. Dai and J.A. Piccirilli^[1] may become an universal strategy for all ribonucleosides, and hopefully this work contributed to this goal.

1. Dai, Q.; Piccirilli J.A. Efficient synthesis of 2',3'-dideoxy-2'-amino-3'-thiouridine, *Org. Lett.* **2004**, 6, 2169-2172.