



Agnieszka Szymańska

**Synteza i wybrane właściwości
 α -hydroksyfosfonianów
nukleozydów i ich analogów,
potencjalnych proleków antywirusowych**

Praca doktorska

wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. Adama Kraszewskiego

w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

Poznań 2006

BIBLIOTEKA
INSTYTUTU CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ul. Noakowskiego 12/14
61-704 POZNAŃ

D-121

Mojej Mamie...

RECEIVED
MAY 10 1964
LIBRARY OF THE
UNITED STATES DEPARTMENT OF
AGRICULTURE
WASHINGTON, D. C. 20250

...simeM jeioM

*Mojemu promotorowi
Panu prof. dr. hab. Adamowi Kraszewskiemu
za wskazanie interesującego tematu
i wszechstronną pomoc
w trakcie wykonywania pracy
składam serdeczne podziękowania*

szkoleniu sędziów podjętym
w trakcie wykonywania pracy
i wzbudzeniu pomocy
na wskazanym interesującym temacie
Pani prof. dr hab. Adamowi Kraszewskiemu
Mojemu promotorowi

*Panu prof. dr. hab. Jackowi Stawińskiemu
za nieocenioną pomoc, serdeczność i cierpliwość
składam ogromne podziękowania*

SPIS TREŚCI

I. WPROWADZENIE.....	3
II. SPIS DONIESIEŃ NAUKOWYCH OPUBLIKOWANYCH W TRAKCIE WYKONYWANIA NINIEJSZEJ PRACY	4
III. SKRÓTY STOSOWANE W PRACY.....	5
IV. WSTĘP LITERATUROWY	6
1. Pochodzenie wirusa HIV.....	6
2. Budowa wirusa HIV	7
3. Struktura i organizacja genomu wirusa HIV	8
4. Etapy replikacji wirusa HIV	8
4.1 Przyłączenie i wniknięcie wirusa do komórki.....	9
4.2 Odwrotna transkrypcja - synteza wirusowego DNA	9
4.3 Integracja wirusowego DNA	10
4.4 Ekspresja genów wirusa HIV-1	11
4.5 Składanie cząstek wirusowych	11
5. Patogeneza wirusa HIV-1	12
6. Objawy kliniczne AIDS.....	12
7. Leczenie	13
7.1 Nukleozydowe inhibitory procesu odwrotnej transkrypcji wirusa HIV.	15
7.2 Nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy wirusa HIV	21
7.3 Inhibitory proteazy wirusa HIV	24
7.4 Terapia kombinowana.....	26
7.5 „Podwójne leki”	27
7.6 Proleki.....	29
8. Uwagi końcowe do wstępu literaturowego	49
V. WYNIKI I DYSKUSJA.....	51
1. Wstęp.....	51
2. Synteza α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych.....	54
2.1 Literaturowe metody otrzymywania α -hydroksyfosfonianów	54
2.2 Badania nad warunkami syntezy α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych oraz wpływem użytego aldehydu.....	55
2.3 Wpływ grupy arylowej w H-fosfonianodiestrze na tworzenie się α -hydroksy- fosfonianów arylowo nukleozydowych.....	63
3. Badania nad rozkładem α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych.....	65
3.1 Sposób rozkładu α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych.....	66
3.2 Możliwe mechanizmy rozkładu α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych..	70
3.3 Rozkład α -hydroksyfosfonianów fenylowo nukleozydowych w mieszaninach reakcyjnych i w trakcie przerobu	77

SPIS TREŚCI

I. WPROWADZENIE.....	3
II. SPIS DOTYCHCZASNYCH OPIBLIKOWANYCH W TRAKCIE WYKONYWANIA MINIETRZELI PRACY.....	4
III. SKRÓTY STOSOWANE W PRACY.....	5
IV. WSTĘP LITERATUROWY.....	6
1. Pochodzenie wirusa HIV.....	6
2. Budowa wirusa HIV.....	7
3. Struktura i organizacja genomu wirusa HIV.....	8
4. Etapy replikacji wirusa HIV.....	8
4.1. Postępowanie i walka z wirusem do chwili.....	9
4.2. Obrona transkrypcja - syntez wirusowego DNA.....	9
4.3. Integracja wirusowego DNA.....	10
4.4. Ekspresja genów wirusa HIV-1.....	11
4.5. Słabanie cząstek wirusowych.....	11
5. Patogenność wirusa HIV-1.....	12
6. Objawy choroby AIDS.....	12
7. Leczenie.....	13
7.1. Nukleosydowy inhibitor procesu odwrotnej transkrypcji wirusa HIV.....	13
7.2. Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji wirusa HIV.....	14
7.3. Inhibitory proteazy wirusa HIV.....	14
7.4. Terapia kombinowana.....	16
7.5. „rodzina białek”.....	17
7.6. Proteazy.....	19
8. Uwagi końcowe do wstępu literatutowego.....	19
V. WYBÓR I DYSKUSJA.....	21
1. Wstęp.....	21
2. Synteza α-hydroksycetonów α-ketooctenowych.....	24
2.1. Literaturowe metody otrzymywania α-hydroksycetonów.....	24
2.2. Badania nad warunkami syntezy α-hydroksycetonów α-ketooctenowych.....	27
2.3. Wpływ grupy karbonyl w II fosforanodiazotan na tworzenie się α-hydroksycetonów.....	27
2.4. Badania nad warunkami syntezy α-hydroksycetonów α-ketooctenowych.....	28
2.5. Rodzaje mechanizmu reakcji α-hydroksycetonów α-ketooctenowych.....	28
2.6. Rodzaje mechanizmu reakcji α-hydroksycetonów α-ketooctenowych w mieszaninie.....	28

4. Aktywność antywirusowa α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych - komentarz	80
5. Lipofilowość α -hydroksyfosfonianów fenylowo nukleozydowych	82
6. Syntezy towarzyszące	84
6.1 Otrzymywanie α -hydroksyfosfonianów nukleozydowych	84
6.2 Triestry i diestry fosforanowe	89
7. Pochodne α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych	92
7.1 Fosfoniano-amidofosforany	93
7.2 Fosfoniano-fosforany	95
7.3 α -Acylofosfoniany fenylowo nukleozydowe	98
VI. PODSUMOWANIE	103
VII. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	107
VIII. LITERATURA	125
SUPLEMENT	

I. WPROWADZENIE

Minęły ponad 24 lata od czasu pojawienia się pierwszych doniesień na temat klinicznych objawów AIDS. Choroba ta zmieniła ustalone poglądy na niektóre zjawiska biologiczne, spowodowała znaczące pogłębienie wiedzy medycznej dotyczącej infekcji wirusem HIV, ale zarazem pokazała bezsilność człowieka wobec pewnych stanów patologicznych wywoływanych przez tę chorobę. Mimo dynamicznego rozwoju medycyny i zastosowania chemioterapii w leczeniu infekcji wirusem HIV, AIDS nadal pozostaje jedną z głównych przyczyn śmiertelności ludzi na świecie. Pojawianie się mutantów wirusa HIV opornych na podawane leki, a także niekorzystne skutki uboczne wywołane ich stosowaniem znacznie ograniczają użyteczność terapeutyczną dotychczasowych terapeutyków. Prace nad polepszeniem skuteczności leczenia zespołu AIDS zmierzają do coraz lepszego poznania patogenezы i cyklu rozwojowego wirusa HIV. W oparciu o tę wiedzę podejmowane są próby otrzymania nowych specyfików antywirusowych, a także ulepszania właściwości farmakologicznych obecnie stosowanych leków.

Biorąc pod uwagę ciągłą potrzebę pozyskania nowych związków antywirusowych, podjęłam się syntezy i przebadania wybranych właściwości α -hydroksyfosfonianów aryloво nukleozydowych, nowych potencjalnych proleków przeciwko wirusowi HIV-1. Wyniki tych badań stanowią treść niniejszej rozprawy.

II. SPIS DONIESIEŃ NAUKOWYCH OPUBLIKOWANYCH W TRAKCIE WYKONYWANIA NINIEJSZEJ PRACY

1. M. Szymczak, A. Szymańska, J. Stawiński, J. Boryski i A. Kraszewski „Aryl *H*-phosphonates. 14. Synthesis of new nucleotide analogues with phosphonate-phosphate internucleosidic linkage” *Organic Letters* **2003**, Vol. 5, No. 20, 3571-3573
2. T. Johanson, J. Nilsson, M. Kulberg, G. Laven, M. Sobkowski, A. Szymańska, M. Szymczak, A. Kraszewski i J. Stawiński „Developing synthetic methods for bioactive phosphorus compounds using *H*-phosphonate chemistry: a progress report. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids* **2005**, Vol. 24, No. 5-7, 353-357
3. A. Szymańska, M. Szymczak, J. Boryski, J. Stawiński, A. Kraszewski, G. Collu, G. Sanna, G. Giliberti, R. Loddo i P. La Colla „ Aryl nucleoside *H*-Phosphonates. Part 15: Synthesis, properties and, anti-HIV activity of aryl nucleoside 5'- α -hydroxyphosphonates. Przyjęte do druku w *Bioorganic & Medicinal Chemistry*

III. SKRÓTY STOSOWANE W PRACY

- AZT – 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
- AZT MP – 5'-monofosforan AZT
- AZT DP – 5'-difosforan AZT
- AZT TP – 5'-trifosforan AZT
- B – *base* (zasada)
- CC₅₀ – *cytotoxic concentration* (stężenie cytotoksyczne)
- ddN – 2',3'-dideoksynukleozyd
- DIPEA – diizopropylometyloamina (zasada Hüniga)
- DMT – 4,4'-dimetoksytrytyl lub inaczej bis(4-metoksyfenyl)fenylometyl
- EC₅₀ – *effective concentration* (stężenie efektywne)
- ekw. – ekwiwalent
- FBS/FCS – *foetal bovine/calf serum* (serum z płodów cielęcych/bydlęcych)
- Fm – fluoren-9-ylometoksykarbonyl
- HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (wysokorozdzielcza chromatografia cieczowa)
- HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry* (wysokorozdzielcza spektrometria masowa)
- IC₅₀ – *inhibitory concentration* (stężenie inhibitorowe)
- MS – *Mass Spectrometry* (spektrometria masowa)
- MeIm – N-metyloimidazol
- NNRTI – *nonnucleoside inhibitory of reverse transcriptase* (nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy)
- NRTI – *nucleoside inhibitory of reverse transcription* (nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji)
- P – współczynnik lipofilowości
- RPMI 1640 – *Roswell Park Memorial Institut*
- RT – *reverse transcriptase* (odwrotna transkryptaza)
- SET – *single electron transfer* (reakcja rodnikowa z przeniesieniem pojedynczego elektronu)
- SI – *selectivity index* (indeks selektywności)
- t_{1/2} – czas połowicznego rozkładu
- TMSCl – chlorek trimetylosililu
- TPSCl – chlorek 2,4,6-triizopropylobenzenosulfonowy
- Thy – tymina

III. SKRÓTY WYKORZYSTANE W PRACY

- AZT - 3'-azydo-2'-deoksyadenozyna
- AZT MP - 5'-monofosforan AZT
- AZT DP - 3'-difosforan AZT
- AZT TP - 5'-trifosforan AZT
- E - kwas kaszubski
- CCa - cytotoksinowa komórka kaszubska
- dN - 2',3'-dibutyrylan dNTP
- DIPBA - dibutyrylocyjanid
- DMT - +4-dimetylostrychnina
- EC₅₀ - efektywna koncentracja inhibitora
- ew - ewolucyjny
- FBS/PCB - fetal bovine serum / fetal calf serum
- fm - faktor 6-główny
- HPLC - High Performance Liquid Chromatography
- chromatografia ciecząciowa
- HRMS - High Resolution Mass Spectrometry
- masowa spektrometria
- IC₅₀ - inhibitory koncentracja inhibitora
- MS - masa cząsteczkowa
- MeIm - N-metylimidazol
- NMDA - N-metyldimetyloamfetazyna
- inhibitor odwrócony
- NBT - nuczyniowy tetrakisbromoborany
- odwrócony transport
- P - wapniowy ligand
- RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute 1640
- RT - reverse transcription
- SBT - single electroporation
- polimerizacja elektroforetyczna
- SI - selektywny inhibitor
- S₁₂ - cząsteczka przeciwciała
- TMSG - chloranek tetrakisetylamoniowy
- TPSCG - chloranek tetrakisetylamoniowy
- Trp - tryptofan

IV. WSTĘP LITERATUROWY

1. Pochodzenie wirusa HIV

Jedną z grup wirusów, które w ostatnich latach cieszą się największym zainteresowaniem są retrowirusy. Jest to grupa wirusów sklasyfikowana ze względu na swój genom RNA, charakterystyczną budowę i kodowanie własnej odwrotnej transkryptazy.

W skład retrowirusów wchodzi 3 podrodziny tj. onkowirusy indukujące różnego typu zmiany nowotworowe (np. *Mouse leukemia virus* MLV lub *Human T-cell leukemia virus* HTLV), spumawirusy określane jako wirusy gąbczaste wywołujące słabe objawy chorobowe (np. *Human foamy virus* HFV) oraz nieonkogenne lentiwirusy wywołujące upośledzenie odporności z długim początkowym okresem ujawniania się objawów klinicznych (np. *Human immunodeficiency virus 1* HIV-1, *Simian immunodeficiency virus* SIV) ¹⁻³

Pierwszy ludzki retrowirus wyizolowany został z limfocytów pacjenta chorego na białaczkę w 1978 roku przez Roberta Gallo z Narodowego Instytutu Zdrowia w Bethesda (USA) i nazwany ludzkim wirusem białaczki z komórek T typu I (HTLV-I).

Drugi przedstawiciel tej rodziny- wirus HTLV-II wyizolowany został w Seattle z komórek pacjenta chorego na białaczkę kosmatokomórkową. Wirus ten zakaża limfocyty T i powoduje w nich zmiany nowotworowe, a jego działanie cytopatyczne jest silniejsze niż HTLV-I.

W 1981 r. opisany został nowy zespół chorobowy charakteryzujący się dysfunkcją układu odpornościowego i nazwany zespołem nabytego upośledzenia odporności (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS). Wydarzenie to poprzedzone było odnotowaniem niezwykle dużej liczby zapaleń płuc w grupie poprzednio zdrowych, młodych mężczyzn. W tym samym czasie pojawiły się również doniesienia o rozwinięciu rzadkiego nowotworu skóry, mięsaka Kaposiego u młodych homoseksualistów z Nowego Jorku i San Francisco.

Izolacja retrowirusa z węzłów chłonnych pacjenta chorego na AIDS została po raz pierwszy dokonana przez Montagniera i Barre-Sinoussiego w Instytucie Pasteura w Paryżu w 1983 r., a wirus ten nazwano wirusem skojarzonym z limfadenopatią (LAV). Rok później grupa amerykańska kierowana przez Gallo opisała izolację wirusa określanego jako HTLV-III z limfocytów krwi obwodowej chorego na AIDS.^{2,4} Późniejsza analiza sekwencji obu wirusów dowiodła, że genomy

IV. WSTĘP LITERATURY

1. Pochodzenie wirusa HIV

Wskazywany.

[11, 12].

jest zmieszanie HIV-1

na pierwszy doświadczenie

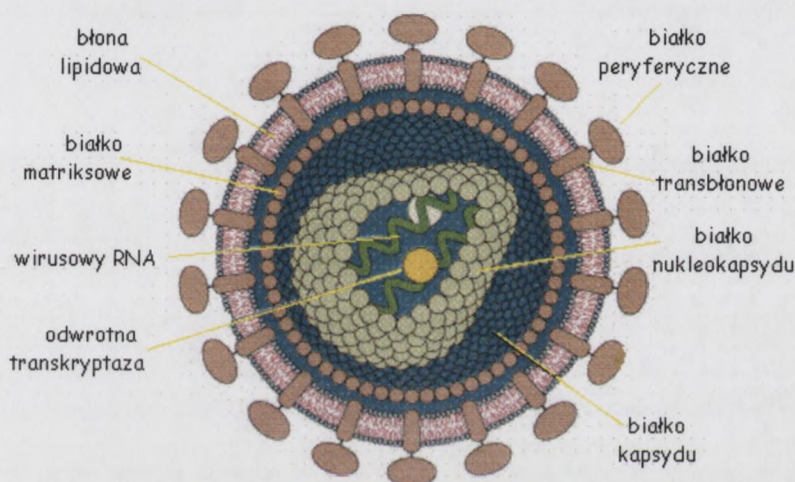
z immunoglobuliną (IVI)

choroba na AIDS? Później

LAV i HTLV-III są praktycznie identyczne. Dalsze szczegółowe badania pozwoliły zakwalifikować czynnik etiologiczny AIDS do ludzkich lentiwirusów i nazwać go ludzkim wirusem upośledzenia odporności HIV-1.^{2:5}

HIV-2 jest innym lentiwirusem, występującym głównie u mieszkańców zachodniej Afryki, powodującym podobne objawy chorobowe występujące po dłuższym czasie od chwili zarażenia niż wirus HIV-1.⁵

2. Budowa wirusa HIV



Ryc. 1

Wirion wirusa HIV-1 ma kształt kulisty o średnicy około 100 nm (Ryc. 1). Najbardziej zewnętrzną część wirionu stanowi osłonka lipidowa chroniąca kapsyd przed bezpośrednim kontaktem ze środowiskiem zewnętrznym. W osłonce wirusowej występuje specyficzny rodzaj kompleksów białkowych składających się z dwóch podjednostek tj. białka transbłonowego (TM) i białka peryferycznego (SU), które połączone są ze sobą wiązaniami disiarczkowymi i pełnią rolę białek receptorowych wirusa HIV.

Pod osłonką znajduje się ikosaedralny kapsyd utworzony z wielu kopii białek kapsydu (CA). Efektywne łączenie się kapsydu z osłonką wirusową zapewniają białka matriksowe (MA).

We wnętrzu wirionu mieści się nukleokapsyd o kształcie cylindra tworzony przez białka nukleokapsydu (NC) połączone z dwoma jednoniciowymi łańcuchami RNA o długości 9500 nukleotydów.

Obok wyżej wymienionych białek strukturalnych tworzących podstawową architekturę wirionu, w cząsteczce wirusa HIV występują również białka enzymatyczne. Należą do nich: odwrotna transkryptaza (RT), integraza (IN) oraz

1. THE HISTORY OF THE

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

... of the ...

proteaza (PR), których geny stanowią integralną część rybonukleinowego genomu wirusa.^{1:3:5}

3. Struktura i organizacja genomu wirusa HIV

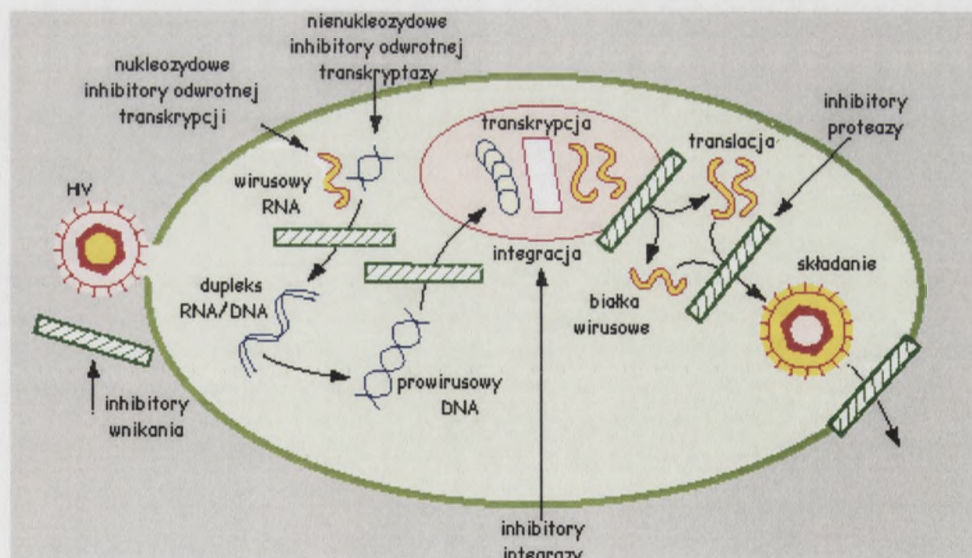
Genom wirusa HIV, tak jak innych retrowirusów, składa się z dwóch identycznych cząsteczek RNA o dodatniej polarności, stanowiący jedyny wśród wirusów genom diploidalny.

W strukturze cząsteczek RNA na końcach 3' i 5' występują długie końcowe powtórzenia (LTR), zaangażowane w replikację, integrację z genomem gospodarza oraz ekspresję genów wirusowych i zawierające sekwencje promotorowe, wzmacniające oraz sygnał poliadenylacji.

Na część kodującą składają się geny *gag*, *pol* i *env*. Gen *gag* koduje białka kapsydu, nukleokapsydu i matriksowe, gen *pol* koduje białka enzymatyczne zaangażowane w replikację wirusa (RT, IN, PR), natomiast gen *env* koduje białka otoczki.⁶

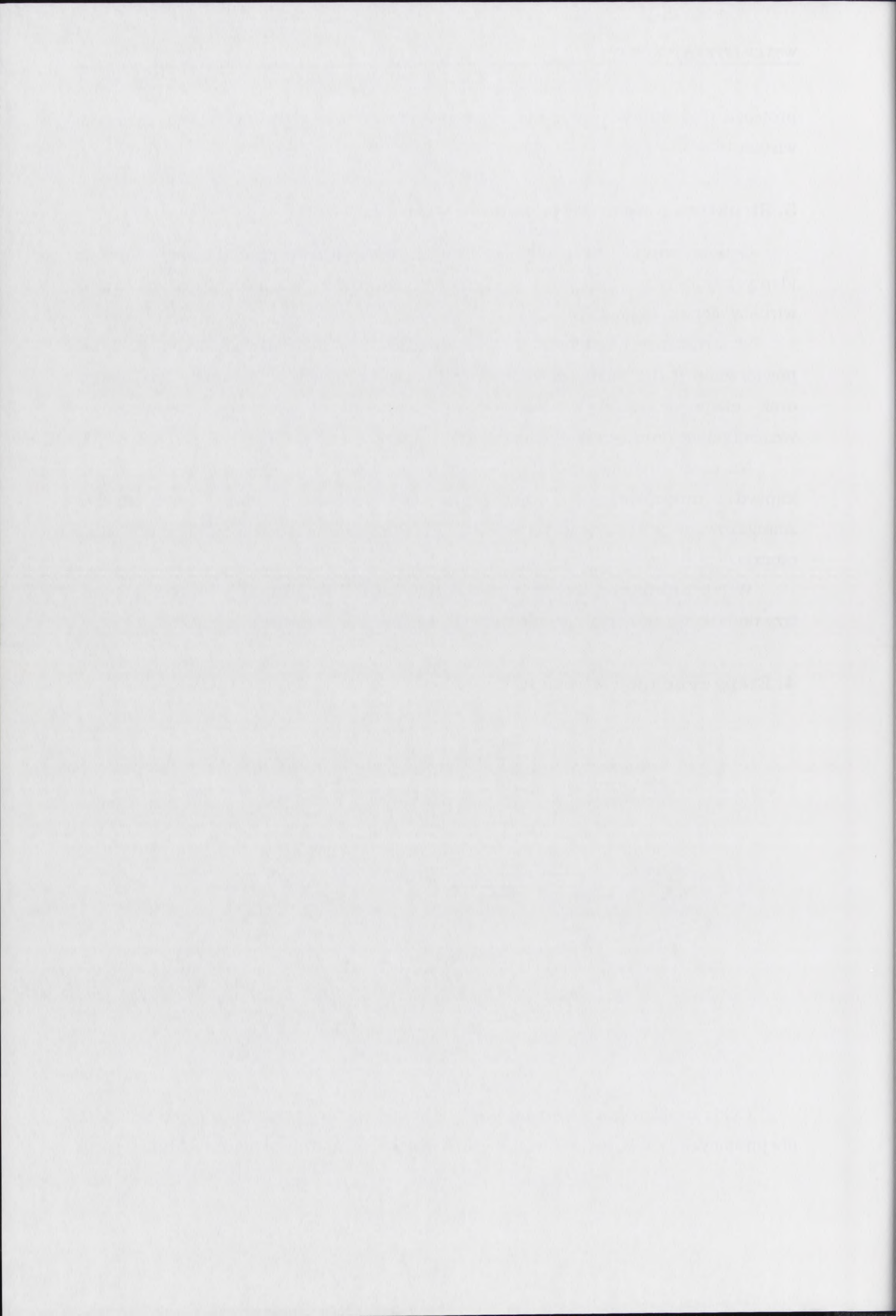
W odróżnieniu od innych retrowirusów wirus HIV posiada w swoim genomie trzy dodatkowe geny regulacyjne (*rev*, *tat*, *vif*) oraz gen represorowy *nef*.²

4. Etapy replikacji wirusa HIV



Ryc. 2

Cykl replikacyjny lentiwirusów odbywa się w kilku kolejnych etapach obejmujących przyłączenie i wniknięcie wirusa do komórki, odwrotną transkrypcję,



integrację wirusowego DNA, ekspresję materiału genetycznego oraz składanie cząstek wirusowych (Ryc. 2).

4.1 Przyłączenie i wniknięcie wirusa do komórki

Pierwsza faza rozpoczyna się od rozpoznania przez białko powierzchniowe (SU) wirusa HIV receptora komórkowego CD4 na powierzchni limfocytów pomocniczych T. Następnie dochodzi do fuzji osłonki wirusowej i błony komórkowej i wniknięcia wirusa do cytoplazmy w postaci kompleksu preintegracyjnego.³

4.2 Odwrotna transkrypcja - synteza wirusowego DNA

Odwrotną transkrypcję wirusa HIV inicjuje komórkowy tRNA^{Lys} jako starter wiążący się do wirusowego RNA w pobliżu 5' końca (miejsce wiążące starter PBS) a syntezę cDNA wykonuje heterodimeryczne białko, odwrotna transkryptaza.⁵

Odwrotna transkryptaza jest enzymem posiadającym dwie podjednostki p51 i p66. Podjednostka p51 powstaje na skutek odcięcia domeny nukleazowej od podjednostki p66. W podjednostce p66, zbudowanej z 560 aminokwasów, znajdują się jej dwie aktywności, w części N-końcowej, aktywność polimerazy DNA oraz w części C-końcowej, aktywność rybonukleazy H (RNazy H). Aktywność polimerazowa objawia się zdolnością do kopiowania RNA albo DNA na DNA, natomiast funkcja RNazy H polega na rozkładaniu RNA w duplesie RNA-DNA.

Struktura krystaliczna podjednostki p66 podobna jest do prawej ręki z wyróżnionymi pięcioma poddomenami tj. domeną RNazy H i czterema oddzielnymi fragmentami związanymi z domeną polimerazy DNA.⁷

Odwrotna transkrypcja rozpoczyna się syntezą pierwszej nici DNA o ujemnej polarności w pobliżu 5' końca genomowego RNA z wykorzystaniem tRNA^{Lys} jako startera. Starter ten związany jest z sekwencją PBS, złożoną z dwóch części: małej pętli U5-PBS oraz dużej struktury liderowej U5-PBS. W wyniku syntezy postępującej w kierunku końca 5' i obejmującej region 100-300 nukleotydów, określanej jako U5, powstaje heterodupleks RNA-DNA. Bezpośrednio przy końcu 5' występuje sekwencja R powtórzona na końcu 3' genomu i zakończona sekwencją poli(A). Na skutek działania RNazy H następuje usunięcie matrycowego RNA z kompleksu RNA-DNA przy końcu 5'. Powstała nić DNA odpowiadająca sekwencji R zostaje przeniesiona na koniec 3' łańcucha RNA, gdzie hybrydyzuje z komplementarną sekwencją. W wyniku tego koniec 3'-OH nici DNA może służyć

integracji wirusowego DNA, etapowe nakładanie genetycznego oraz składanie cząstek wirusowych (iloc. 2).

4.1. Przejście i walka z wirusem de Sausse

Wirus ten niebezpieczny jest od rozpoznania przez białko powierzchniowe (SU) wirusa HIV receptoru komórkowego CD4 na powierzchni receptorów powierzchniowych. Tę reakcję dochodzi do fuzji osłonek wirusowej i błony komórkowej i wniknięcia wirusa do cytoplazmy w postaci kompleksu białko-genetycznego.

4.2. Odwrotna transkrypcja - synteza wirusowego DNA

Odwrotna transkrypcja wirusa HIV rozpoczyna się od przyłączenia białka SU do receptora CD4 w pobliżu 5' końca (miejscu wiązania startu PBS) i syntezę cDNA wykonuje białko odwrotnego transkryptyazy.

Odwrotna transkrypcja jest etapem podlegającym dwóm podziałom 451 i 452. Podział 451 polega na zmianie struktury cząsteczki RNA wirusowej od podziału 450. W podziale 450, struktura 5' RNA wirusowej, znajdująca się na jej dwóch końcach, w części 3' końcowej, aktywne białko białkowe DNA oraz w części 5' końcowej, białko odwrotnego transkryptyazy. H (kwas H) aktywne białko białkowe odnosi się do białka de kodowania RNA albo DNA na DNA, natomiast funkcja RNA H polega na nakładaniu RNA w miejsce RNA-DNA.

Struktura cząsteczki podlega dwóm podziałom 451 i 452. Podział 451 polega na zmianie struktury cząsteczki RNA wirusowej od podziału 450. W podziale 450, struktura 5' RNA wirusowej, znajdująca się na jej dwóch końcach, w części 3' końcowej, aktywne białko białkowe DNA oraz w części 5' końcowej, białko odwrotnego transkryptyazy. H (kwas H) aktywne białko białkowe odnosi się do białka de kodowania RNA albo DNA na DNA, natomiast funkcja RNA H polega na nakładaniu RNA w miejsce RNA-DNA.

Odwrotna transkrypcja rozpoczyna się od przyłączenia białka SU do receptora CD4 w pobliżu 5' końca (miejscu wiązania startu PBS) i syntezę cDNA wykonuje białko odwrotnego transkryptyazy. Podział 451 polega na zmianie struktury cząsteczki RNA wirusowej od podziału 450. W podziale 450, struktura 5' RNA wirusowej, znajdująca się na jej dwóch końcach, w części 3' końcowej, aktywne białko białkowe DNA oraz w części 5' końcowej, białko odwrotnego transkryptyazy. H (kwas H) aktywne białko białkowe odnosi się do białka de kodowania RNA albo DNA na DNA, natomiast funkcja RNA H polega na nakładaniu RNA w miejsce RNA-DNA.

jako starter do dalszej syntezy na matrycy RNA. Ten etap syntezy określany jest jako pierwsze przesunięcie lub „przeskok”. Gdy synteza ujemnej nici DNA przejdzie poza rejon U3 przy końcu 3' genomowego RNA następuje usunięcie większości zhybrydowanego RNA w wyniku działania RNazy H. Wolny koniec 3'-OH pozostałej części RNA służy jako starter do syntezy dodatniej nici DNA. Pozycja starterowego RNA wyznacza koniec 5' długiej powtórzonej sekwencji (LTR) zawierającej strukturę U3-R-U5 na obu końcach powstałego dwuniciowego DNA. Synteza nici DNA o dodatniej polarności jest kontynuowana w kierunku lewej sekwencji LTR, z wykorzystaniem nici o ujemnej polarności jako matrycy. W wyniku kolejnego działania RNazy H następuje usunięcie sekwencji tRNA i powstanie wolnego końca dodatniej nici DNA, a następnie dochodzi do drugiego przesunięcia kompleksu replikacyjnego wraz z dodatnią nicią DNA. W ten sposób powstaje dwuniciowy DNA odpowiadający pełnemu genomowi wirusowemu, w którym oba końce zawierają powtórzone sekwencje LTR.³

4.3 Integracja wirusowego DNA

Dwuniciowa liniowa cząsteczka DNA wraz z białkami matriksowymi (MA) oraz białkiem - integrazą (IN) tworzą kompleks preintegracyjny i transportowane są z cytozolu do jądra zainfekowanej komórki, gdzie zachodzi kolejny, kluczowy etap cyklu rozwojowego retrowirusa, integracja z chromosomem gospodarza.

Integraza wirusa HIV-1 jest endonukleazą zawierającą trzy główne domeny: N-końcową odpowiedzialną za oligomeryzację, centralną katalityczną domenę rdzeniową oraz C-końcową domenę wiążącą DNA gospodarza i wirusa.³

Proces integracji rozpoczyna się od związania integrazy z sekwencjami LTR cząsteczki DNA wirusa w taki sposób, że cząsteczka ta przybiera formę kulistą. Następnie dochodzi do odcięcia dwóch nukleotydów na obydwu 3'-końcach wirusowego DNA. Na skutek dalszego działania integrazy następuje przyłączenie kompleksu integraza- wirusowy DNA grupą 3'-OH do wiązania fosfodiesterowego w łańcuchu DNA gospodarza. Nowe wiązanie fosfodiesterowe powstaje w momencie rozerwania obu nici DNA gospodarza z wytworzeniem lepkich końców. Komórkowy system naprawy DNA przycina wystające 5'-końce wirusowego DNA i uzupełnia powstałe przerwy. W ten sposób wirusowy DNA zostaje zintegrowany z DNA gospodarza z duplikacją krótkiej sekwencji komórkowego DNA po obydwu stronach włączonej sekwencji wirusa.^{1;3;8}

jesto starter do dalszej syntezy na matrycy RNA. Ten etap syntezy określany jest jako pierwsze przesunięcie lub „przeskok”. Gdy synteza ujemnej nici DNA przepadła poza region U3 przy końcu 3. genomowego RNA następuje uruchomienie wiązania aktywowanego RNA w wyniku działania RNazy H. Wtedy koniec 3'-OH potrafiłby czepić RNA nitę jako starter do syntezy dodatniej nici DNA. Potrzeba strukturę RNA wyznacza koniec 3' drugiej prowadzącej sekwencji (LTR) zawierającej sekwencje U3-R-U5 na obu końcach powstałego dwuniciowego DNA. Synteza nici DNA o dodatniej polarności jest kontynuowana w kierunku lewej sekwencji LTR, z wykorzystaniem nic o ujemnej polarności jako matrycy. W wyniku kolejnego działania RNazy H następuje usunięcie sekwencji tRNA i powstanie wolnego końca dodatniej nici DNA, a następnie dochodzi do drugiego przesunięcia kompleksu replikacyjnego wraz z dodatnią nicią DNA. W ten sposób powstaje dwuniciowy DNA odpowiedni do polimerazy genomowej wirusowej, w którym oba konce zawierają powtarzające sekwencje LTR.

4.2. Integracja wirusowego DNA

Dwuniciowy liniowy cząsteczkowy DNA wraz z białkami matrycowymi (MA) oraz białkami - integras (IN) tworzą kompleksa proteolityczny i transportowe, są przetrzymywane do czasu załadowania kompleksu, gdzie zachodzi kolejny, kluczowy etap cyklu rozwojowego wirusowej komórki, integracja i odcinanie gospodarza. Integracja wirusa HIV-1 jest endonukleazą zawierającą trzy główne domeny: N-końcową odpowiedzialną za oligonukleotydową, centralną katalizującą domenę i domenę C-końcową zdolną wiązać DNA gospodarza i wirusa.¹⁴⁴ Proces integracji rozpoczyna się od związania integrasy z sekwencjami LTR cząsteczki DNA wirusa w taki sposób, że cząsteczka ta przyswaja formę podłoża. Następnie dochodzi do odcięcia dwóch nukleotydów na obydwu 3'-końcach wirusowego DNA. Na skutek dalszego działania integrasy następuje przyłączenie kompleksu integras-wirusowy DNA grupa 3'-OH do wspania łańcuchowego w miejscu DNA gospodarza. Nowe wiązanie łańcuchowe powstaje w momencie rozmieszczenia obu nici DNA gospodarza z wytworzeniem łańcuchów końcowych. System naprawy DNA przyswaja sekwencje 2'-końców wirusowego DNA i umożliwia powstanie przerw. W ten sposób wirusowy DNA zostaje zintegrowany z DNA gospodarza z dwukrotną kopią sekwencji końcowego DNA na obydwu stronach wiązanej sekwencji wirusa.¹⁴⁴

4.4 Ekspresja genów wirusa HIV-1

Materiał genetyczny wirusa HIV-1 po zintegrowaniu z chromosomem gospodarza stanowi matrycę dla replikacji genomu wirusowego oraz ekspresji genów wirusowych.

Pierwszym etapem w tym procesie jest transkrypcja wirusowego DNA na RNA przeprowadzana przez komórkową polimerazę II, która wiąże się do sekwencji na 5'-końcach LTR. W sekwencji tej zgrupowane są odpowiednie promotory i wzmacniacze, których podatność na rozpoznawanie przez komórkowy aparat transkrypcyjny decyduje o tempie transkrypcji wirusowego DNA.³

Wszystkie powstałe transkrypty RNA ulegają poliadenylacji a ich część również splicingowi, po czym transportowane są do cytoplazmy. W pierwszej kolejności do cytoplazmy wysyłane są te cząsteczki mRNA, które uległy splicingowi i służą jako matryca do syntezy białek Tat, Rev i Nef (tzw. „wczesne” proteiny). Nagromadzenie się białek Rev w jądrze jest sygnałem uruchamiającym wysyłanie do cytoplazmy cząsteczek mRNA, które nie uległy bądź częściowo uległy splicingowi. Na matrycy tych RNA następuje biosynteza poliprotein strukturalnych (Gag, Gag- Pol i Env) oraz białek pomocniczych (Vif, Vpr, Vpu - tzw. „późne” proteiny).^{3;5}

4.5 Składanie cząstek wirusowych

Proces ten rozpoczyna się od oddziaływań pomiędzy poliproteinami Gag, co wywołuje w komórkowym cytozolu produkcję nukleoproteinowych kompleksów (precząstek wirusowych) składających się z poliprotein Gag, Gag-Pol i genomowego wirusowego RNA. Gag jest poliproteina zawierającą 4 domeny: MA, CA, NC, oraz p6 o nieznannej funkcji. Poliproteina Gag-Pol składa się natomiast z trzech głównych domen funkcyjnych - IN, RT oraz PR, która ulega autokatalitycznemu odcięciu.⁵

Proteaza wirusa HIV-1 jest małym homodimerycznym enzymem (99 reszt aminokwasowych) z grupy proteaz asparaginowych. Każda podjednostka PR zawiera katalitycznie aktywne reszty asparaginowe ulokowane w środku hydrofobowej szczeliny o długości pozwalającej na związanie siedmiu reszt aminokwasowych substratu.^{5;9;10}

Hydroliza wiązań peptydowych w poliproteinach Gag i Gag-Pol odbywa się w każdym miejscu rozcięcia przy udziale cząsteczki wody dostarczanej przez dwie reszty aminokwasowe proteazy (Ryc. 3).^{9;11}

4.4. Ekspresja genów wirusa HIV-1

Materiał genetyczny wirusa HIV-1 jest transkrybowany do mRNA i jest następnie przetwarzany w białka. W tym celu konieczne jest wyodrębnienie i aktywacja promiennika LTR, który jest niezbędny do rozpoczęcia transkrypcji i translacji. W celu wyodrębnienia LTR z genomu wirusa konieczne jest usunięcie sekwencji 5' i 3' niekodujących, które są niezbędne do przyłączenia się do białek i rozpoczęcia transkrypcji. W tym celu konieczne jest usunięcie sekwencji 5' i 3' niekodujących, które są niezbędne do przyłączenia się do białek i rozpoczęcia transkrypcji.

Ważnym etapem w tym procesie jest transkrypcja promiennika LTR, który jest niezbędny do rozpoczęcia transkrypcji i translacji. W tym celu konieczne jest usunięcie sekwencji 5' i 3' niekodujących, które są niezbędne do przyłączenia się do białek i rozpoczęcia transkrypcji. W tym celu konieczne jest usunięcie sekwencji 5' i 3' niekodujących, które są niezbędne do przyłączenia się do białek i rozpoczęcia transkrypcji.

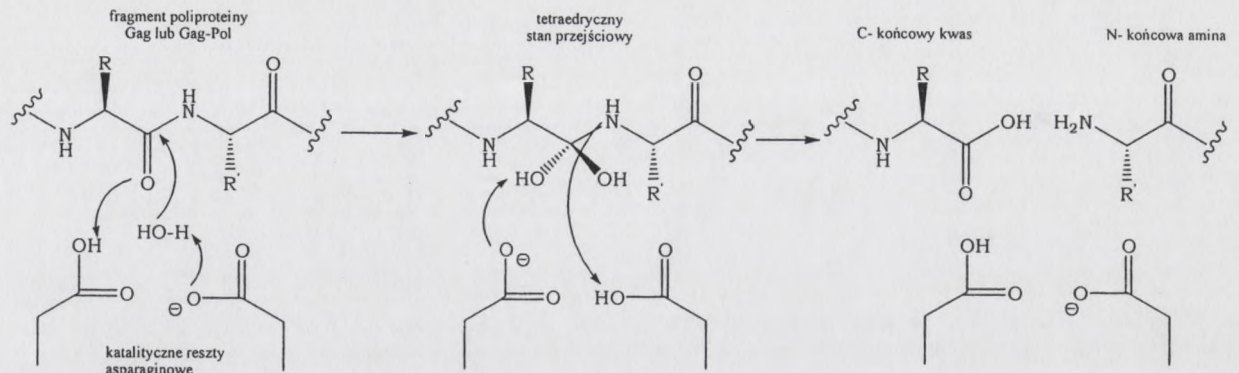
Ważnym etapem w tym procesie jest transkrypcja promiennika LTR, który jest niezbędny do rozpoczęcia transkrypcji i translacji. W tym celu konieczne jest usunięcie sekwencji 5' i 3' niekodujących, które są niezbędne do przyłączenia się do białek i rozpoczęcia transkrypcji. W tym celu konieczne jest usunięcie sekwencji 5' i 3' niekodujących, które są niezbędne do przyłączenia się do białek i rozpoczęcia transkrypcji.

4.5. Sztucznie stworzone wirusy

Proces ten rozpoczyna się od odwołania się do białek i białek. W tym celu konieczne jest usunięcie sekwencji 5' i 3' niekodujących, które są niezbędne do przyłączenia się do białek i rozpoczęcia transkrypcji. W tym celu konieczne jest usunięcie sekwencji 5' i 3' niekodujących, które są niezbędne do przyłączenia się do białek i rozpoczęcia transkrypcji.

Proces wirusa HIV-1 jest bardzo podobny do procesu innych wirusów. W tym celu konieczne jest usunięcie sekwencji 5' i 3' niekodujących, które są niezbędne do przyłączenia się do białek i rozpoczęcia transkrypcji. W tym celu konieczne jest usunięcie sekwencji 5' i 3' niekodujących, które są niezbędne do przyłączenia się do białek i rozpoczęcia transkrypcji.

Hydroliza włosałi polipeptydowej w kierunku N-terminu jest bardzo ważnym etapem w procesie. W tym celu konieczne jest usunięcie sekwencji 5' i 3' niekodujących, które są niezbędne do przyłączenia się do białek i rozpoczęcia transkrypcji. W tym celu konieczne jest usunięcie sekwencji 5' i 3' niekodujących, które są niezbędne do przyłączenia się do białek i rozpoczęcia transkrypcji.



Ryc. 3

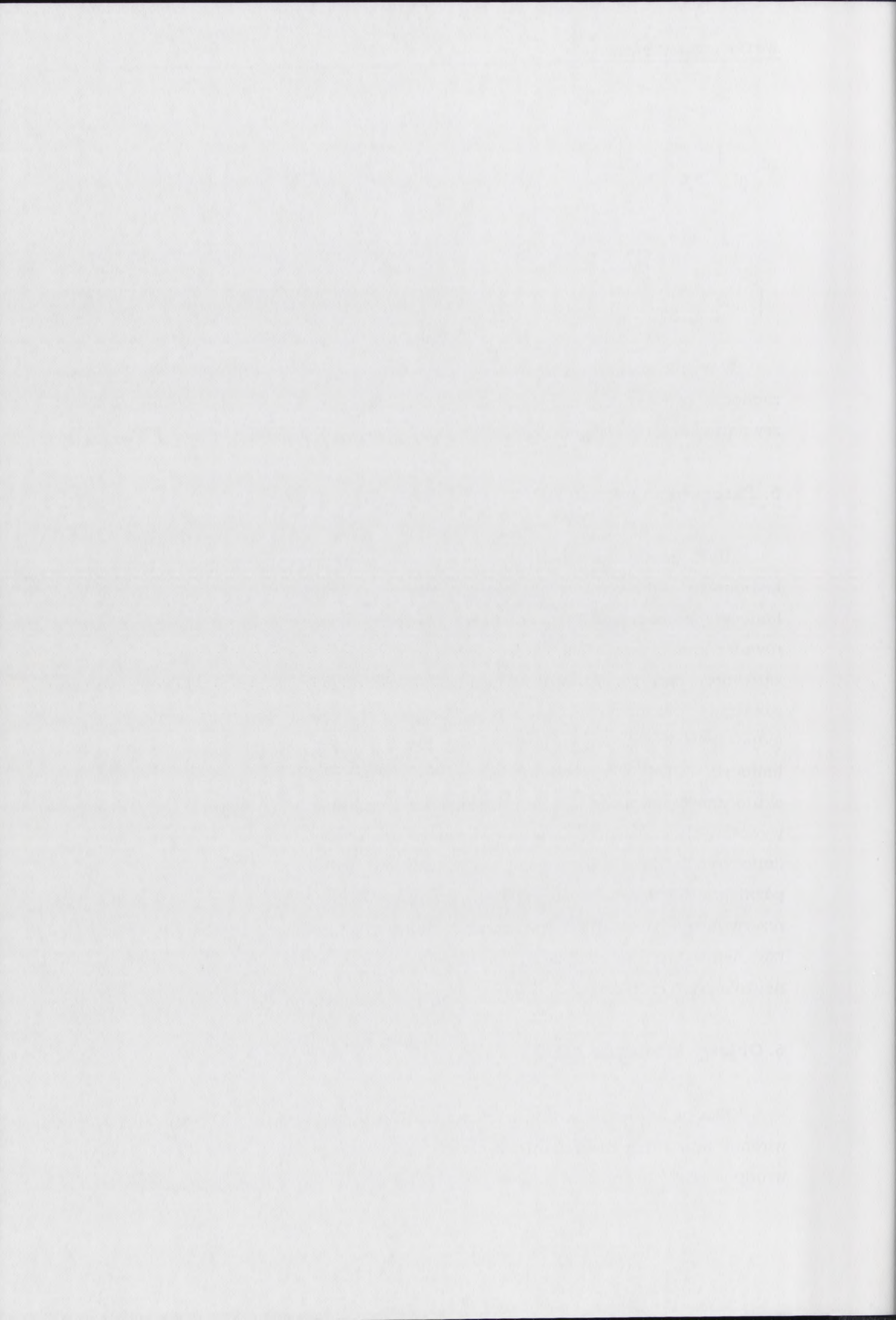
W wyniku działania wirusowej proteazy na cząsteczki poliprotein Gag i Gag-Pol zachodzi proces, którego produktem jest dojrzały wirion, wypączkujący na zewnątrz komórki i w pełni zdolny do zainfekowania kolejnych, zdrowych komórek.⁵

5. Patogeneza wirusa HIV-1

HIV-1 dostaje się do organizmu i zostaje w nim rozprzestrzeniony przez układ krwionośny. Głównym celem ataku wirusa jest pewien rodzaj limfocytów T tzw. limfocyty pomocnicze Th z białkiem powierzchniowym CD4 (stąd nazywa się je również limfocytami CD4), które pełnią istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej zarówno w fazie rozpoznania antygeny, jak w fazie jego eliminacji. W miarę postępu zakażenia wirusem zaburzeniu ulegają również funkcje limfocytów B (odpowiedzialnych za produkcję przeciwciał), gdyż są one regulowane przez limfocyty CD4. Zniszczenie podgrupy limfocytów pomocniczych T obniża skuteczność odpowiedzi immunologicznej organizmu i prowadzi do zakażeń wywołanych przez drobnoustroje, które u zdrowego człowieka zwalczane są przez limfocyty T. Zakażeniu ulegają również inne leukocyty, tj. monocyty, a także późniejsza ich forma występująca w tkankach - makrofagi, które mogą pełnić rolę rezerwuaru wirusa HIV-1. Wirus może także replikować się w komórkach mózgu, tzw. dendrytach, prowadząc do zniszczenia tych komórek i pojawienia się objawów neurologicznych.^{2;12;13}

6. Objawy kliniczne AIDS

Kilka tygodni po zakażeniu wirusem HIV w krwi chorego obserwuje się rozległą wiremę oraz dużą ilość zainfekowanych limfocytów pomocniczych CD4. Następnie w odpowiedzi obronnej organizm uruchamia działanie antygenów i innego rodzaju



limfocytów T, tzw. cytotoksycznych, co prowadzi do zmniejszenia ilości cząstek wirusa i przejścia zakażenia w fazę latencji. Podczas tej fazy ustala się stan dynamicznej równowagi (ang. steady state) polegający na ciągłym infekowaniu i niszczeniu komórek CD4 zastępowanych przez nowe komórki CD4. Po kilku latach trwania latencji liczba limfocytów T znacznie spada, co doprowadza do pełnego rozwoju AIDS.^{3;14}

AIDS, czyli zespół nabytego upośledzenia odporności (ang. acquired immunodeficiency syndrome) jest chorobą wywołującą immunosupresję tj. osłabienie mechanizmów odpornościowych organizmu, co predysponuje organizm do zagrażających życiu zakażeń wywołanych przez różnego rodzaju bakterie i wirusy. Innym charakterystycznym objawem AIDS jest mięsak Kaposiego.²

7. Leczenie

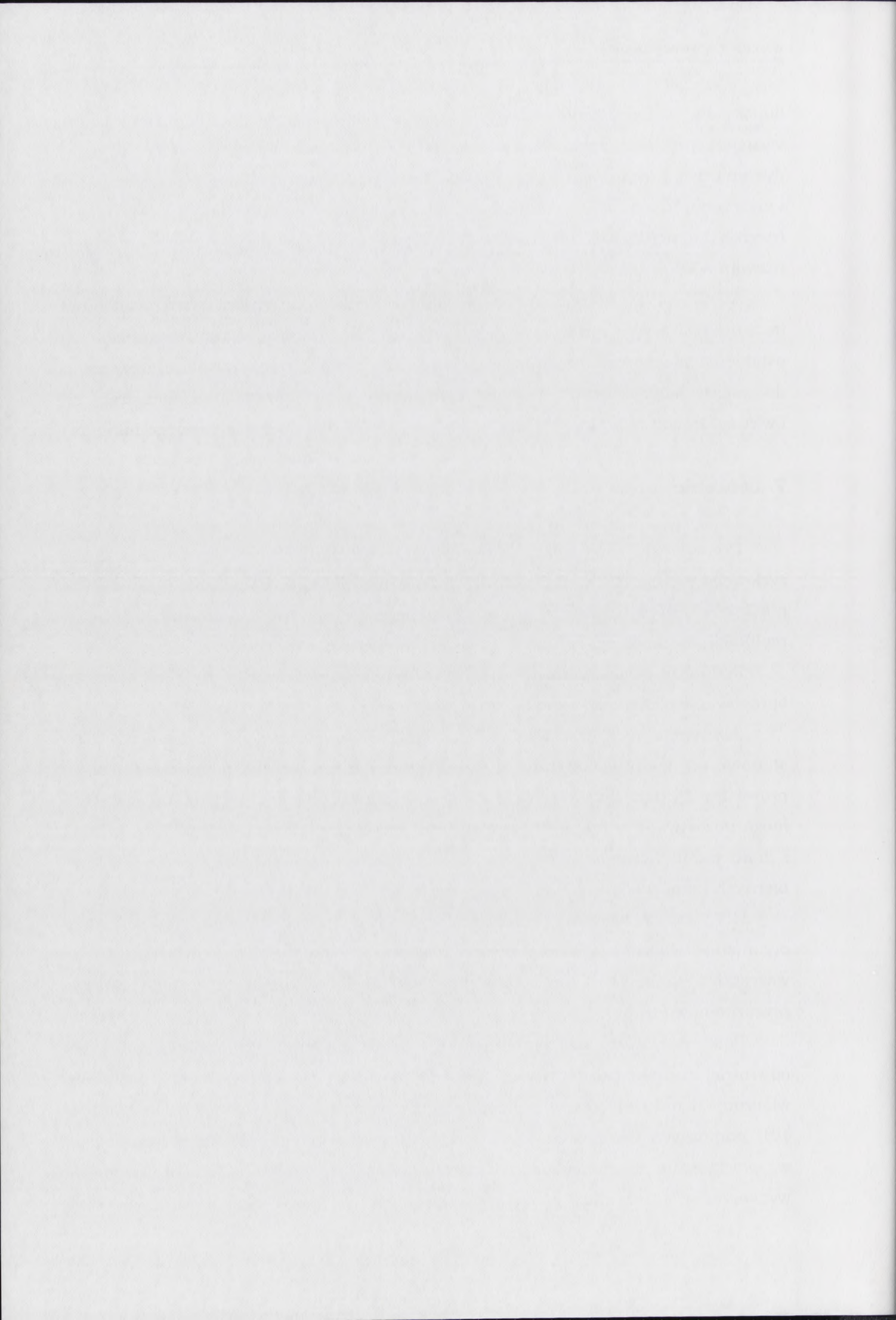
Coraz lepsza znajomość mechanizmów molekularnych każdego z etapów cyklu życiowego wirusa HIV umożliwia otrzymanie nowych, bądź ulepszanie stosowanych już leków antywirusowych, których działanie polega na blokowaniu wirusowej replikacji, co zapobiega lub opóźnia występowanie objawów choroby.

Jednakże po poznaniu mechanizmów replikacji wirusa HIV stało się jasne, że opracowanie efektywnej terapii będzie z kilku względów bardzo trudne.¹⁵

Jednym z nich jest fakt, że po integracji prowirusa z komórkowym DNA stanowi on jakby genetyczny element gospodarza i dzięki temu zintegrowane prowirusy są dalej przekazywane na drodze mitozy do komórek potomnych, gdzie mogą pozostawać w stanie utajonym. Leki antywirusowe hamują replikację wirusa i zmniejszają liczbę jego cząstek, ale nie działają na prowirusy obecne w tzw. biernych komórkach.

HIV jest rozsiewany przez limfocyty T i monocyty/makrofagi w całym organizmie włączając system nerwowy. Dostarczenie antywirusowych specyfików do wszystkich komórek, które mogą być siedliskiem wirusa jest drugą poważną przeszkodą w terapii.

Podczas syntezy nici potomnej, ze względu na brak aktywności naprawczej odwrotnej transkryptazy wirusa HIV, nie dochodzi do usunięcia nieprawidłowo włączonych nukleotydów, co ułatwia szybką produkcję wirusowego genomu (10^9 - 10^{10} potomnych wirusów w ciągu 1 dnia). Ponadto proces odwrotnej transkrypcji w powiązaniu z diploidalnym charakterem wirusowego RNA prowadzi do wytworzenia dużej liczby zrekombinowanych wirusów. Zmienność sekwencji



spowodowana błędami odwrotnej transkryptazy oraz rekombinacji przyczynia się do szybkiego powstawania nowych wariantów będących lekoopornymi odmianami wirusa, co sprawia, że wirus HIV jest wyjątkowo trudnym celem w chemioterapii.^{3;16;17}

Z tych samych powodów nie udało się dotąd wynaleźć skutecznej szczepionki przeciw HIV, a jej opracowanie wydaje się być niezwykle trudne.

Powyższe utrudnienia w rozwoju efektywnej terapii przeciwko wirusowi HIV zmuszają do intensywnego szukania nowych podejść w zwalczaniu wirusa HIV, ale jednocześnie nie eliminują stosowania dotychczas używanych chemioterapeutyków.⁵ Wśród nich najbardziej powszechnie stosuje się nukleozydowe i nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji oraz inhibitory wirusowej proteazy. Projektowane i badane są również związki, które hamują wnikanie wirusa do komórki, integrację wirusowego RNA, a także składanie wirusa HIV.^{5;10;18}

Związki chemiczne, rozważane jako potencjalne terapeutyczne środki antywirusowe, powinny spełniać pewne podstawowe kryteria wstępne dotyczące aktywności i toksyczności. W testach *ex vivo* stosuje się następujące parametry: w opisie aktywności biologicznej **IC₅₀** – stężenie inhibitorowe (ang. inhibitory concentration), czyli stężenie badanego preparatu, które redukuje w 50% zmiany patologiczne wywołane przez dany typ wirusa w jednowarstwowych kulturach komórkowych; **EC₅₀** – stężenie efektywne (ang. effective concentration), czyli stężenie powodujące zahamowanie w 50% replikacji wirusa w stacjonarnych kulturach komórkowych; **CC₅₀** – stężenie cytotoksyczne (ang. cytotoxic concentration), czyli stężenie badanego związku powodujące zmiany cytopatogeniczne w morfologii zdrowych (niezainfekowanych) komórek. Wzajemna relacja dwóch parametrów, CC_{50}/EC_{50} jest wyrażana przez indeks selektywności **SI**, który jest względnie obiektywną miarą przydatności terapeutycznej testowanej substancji. Poza tymi parametrami w laboratoryjnych testach inhibicji enzymatycznej stosuje się także typowe wartości używane do opisu reakcji enzymatycznych: stałą Michaelisa K_m , czyli stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji osiąga połowę swojej maksymalnej wartości V_{max} . (K_m jest również miarą siły tworzenia kompleksu enzym/substrat) i stałą inhibicji K_i (stała dysocjacji kompleksu enzym/inhibitor). Wielkości te pozwalają na oszacowanie właściwości inhibitorowych testowanego związku oraz określenie mechanizmu inhibicji.

Obiecujące wartości powyższych parametrów ustalonych w kulturach komórkowych podczas testów *ex vivo* nie zawsze znajdują potwierdzenie

Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej. Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej. Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej.

Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej. Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej. Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej.

Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej. Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej. Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej.

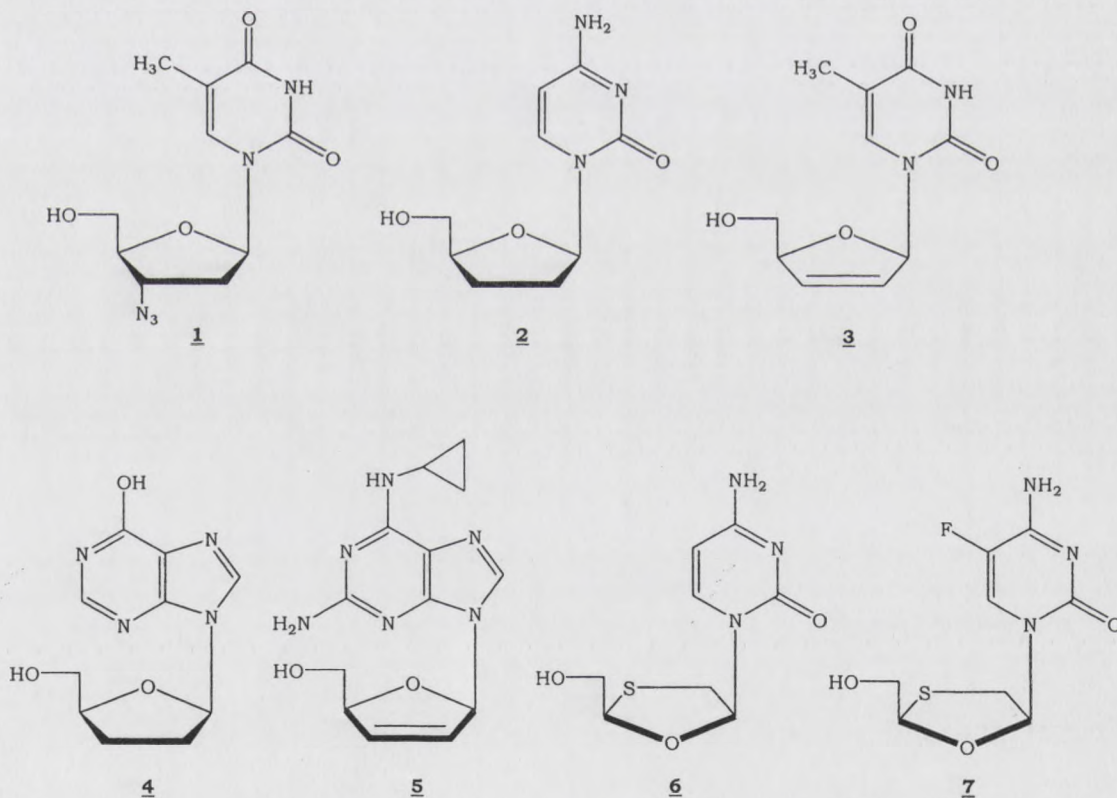
Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej. Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej. Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej.

Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej. Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej. Wzrost i rozwój układu krążenia jest zależny od stanu odżywienia i aktywności fizycznej.

w późniejszych eksperymentach *in vivo*, prowadzonych na zwierzętach doświadczalnych. Dopiero po pomyślnym przejściu testów *in vivo* rozpoczyna się długotrwały etap testów klinicznych, po których nowy preparat może zostać dopuszczony do stosowania klinicznego.^{8;19}

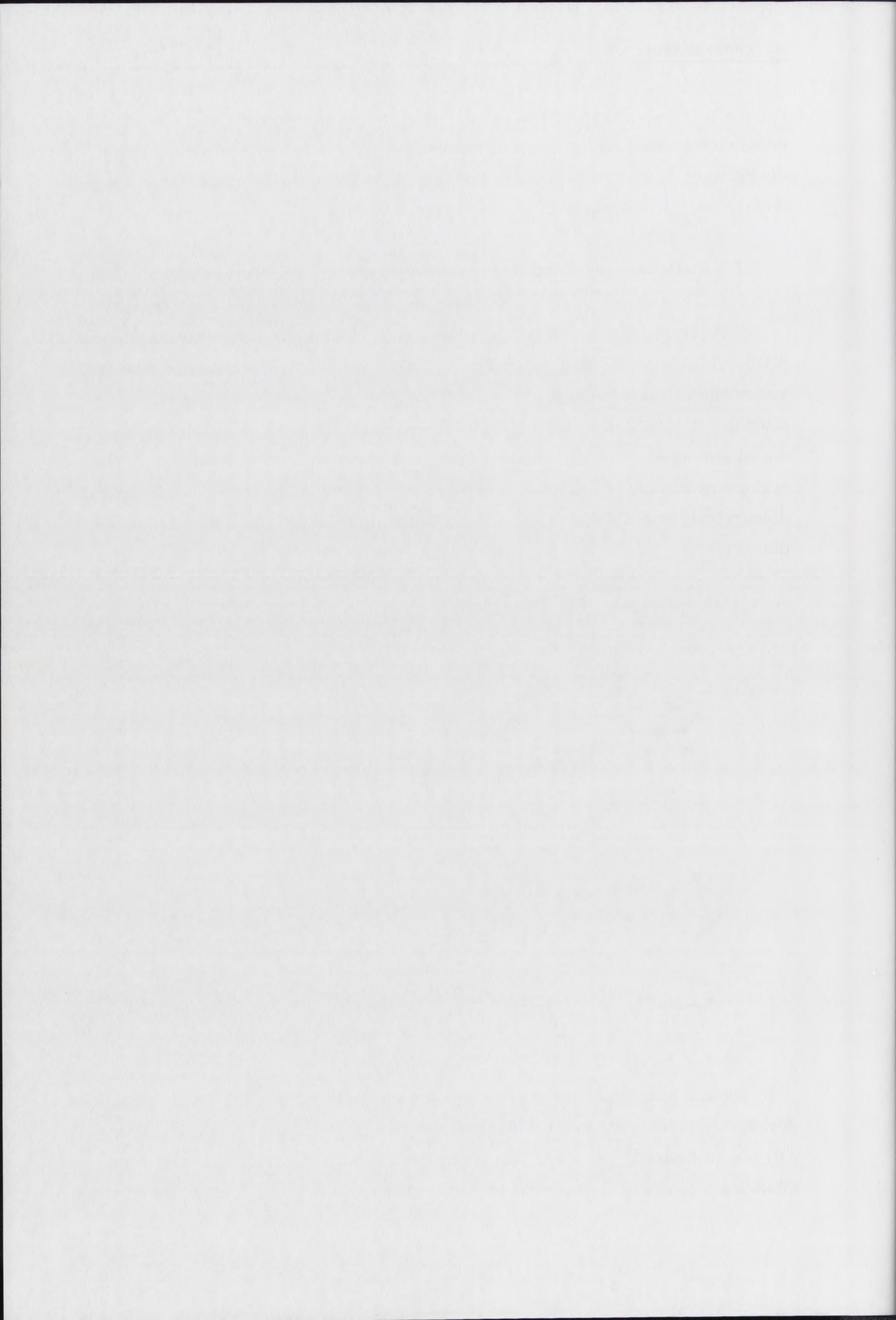
7.1 Nukleozydowe inhibitory procesu odwrotnej transkrypcji wirusa HIV.

Pierwszym lekiem dostępnym klinicznie (1985 r.) dla pacjentów chorych na AIDS była 3'-azydo-3'-deoksytymidyna **1** (AZT, Retrovir®). Obecnie w terapii AIDS stosowane są także analogi innych nukleozydów tj. 2',3'-dideoksytydyna **2** (ddC, zalcitabina), 2',3'-didehydro-3'-deoksytymidyna **3** (d4T, stawudyna), 2',3'-dideoksyinozyna **4** (ddI, didanozyna), 2',3'-didehydro-2',3'-dideoksy-2-amino-6-cyklopropyloaminopurynorybonukleozyd **5** (ABC, abakawir), L-3'-tia-2',3'-dideoksytydyna **6** (3TC, lamiwudyna) oraz 5-fluoro-L-3'-tia-2',3'-dideoksytydyna **7** (FTC, emtricitabina - III faza badań klinicznych) (Ryc. 4).¹¹



Ryc. 4

Związki te mogą być włączone do powstającego wirusowego DNA po uprzedniej fosforylacji przez wirusowe lub komórkowe kinazy. W związku z brakiem grupy 3'-OH nie dochodzi do tworzenia następnego wiązania 3'-5' fosfodiesterowego pomiędzy 3'-końcem łańcucha DNA a kolejnym 5'-trifosforanem nukleozydów.⁷ Mechanizm



działania tych związków polega więc na współzawodnictwie z naturalnymi substratami tj. trifosforanami deoksynukleozydów o miejsce aktywne odwrotnej transkryptazy (inhibicja kompetencyjna²⁰), ale przede wszystkim na terminacji rosnącego łańcucha wirusowego DNA.²¹

Skuteczność nukleozydowych analogów w hamowaniu replikacji wirusa HIV zależy więc od wielu czynników m.in. efektywności ich wnikania do komórek, wydajności fosforylacji przez kinazy komórkowe, poziomu utrzymującej się kompetencyjnej inhibicji oraz skuteczności wiązania się tych związków do odwrotnej transkryptazy i następującym po tym włączeniu ich do wydłużającego się łańcucha wirusowego DNA.²¹

7.1.1 AZT

Wśród stosowanych analogów nukleozydowych AZT **1** jest ciągle jednym z najefektywniejszych leków stosowanych w terapii przeciwko wirusowi HIV-1 (Tabela 1).

Tabela 1 Aktywność anty-HIV analogów nukleozydów

	EC₅₀ [μM] komórki CEM	CC₅₀ [μM] komórki CEM	SI = CC₅₀/EC₅₀
AZT ²²	0,002	>100	>50000
d4T ²²	0,35	143	408
ABC ²³	2,3	97	42
3TC ²²	0,01	>100	>10000
ddC ²²	0,04	3,5	87,5
ddI	4,3 ²⁴	>100 ²⁵	>23

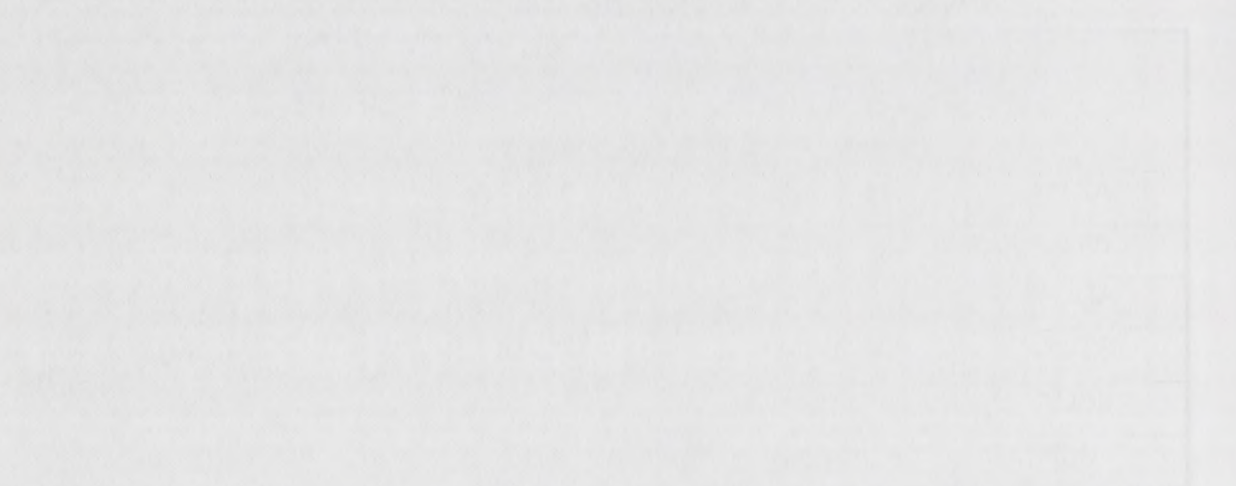
Stosowanie AZT hamuje namnażanie HIV w organizmie i przedłuża życie pacjentów z zaawansowanym zespołem AIDS.² Dowiedziono również, że podawanie AZT ciężarnym kobietom może zredukować ryzyko przekazania wirusa HIV-1 od matki do dziecka. Pacjenci otrzymujący AZT wykazują ponadto ogólne polepszenie funkcji neurologicznych.^{2;26}

AZT jest lekiem o dobrze zbadanej farmakokinetyce (co się dzieje z lekiem w organizmie), farmakodynamice (co się dzieje z organizmem pod wpływem leku) oraz terapeutycznej skuteczności. AZT wnika do komórek na drodze dyfuzji biernej, która jest skuteczniejszym sposobem pokonania błony komórkowej od transportu aktywnego charakterystycznego dla większości nukleozydowych analogów np. ddC

Abstract of the paper presented at the 1978 Annual Meeting of the American Society of Civil Engineers, San Francisco, California, October 1-5, 1978. The paper discusses the development of a computer program for the simulation of the hydrologic cycle. The program is designed to simulate the hydrologic cycle for a given area and is based on the principles of mass and energy balance. The program is capable of simulating the hydrologic cycle for a given area and is based on the principles of mass and energy balance. The program is capable of simulating the hydrologic cycle for a given area and is based on the principles of mass and energy balance.

2.1.1. INTRODUCTION

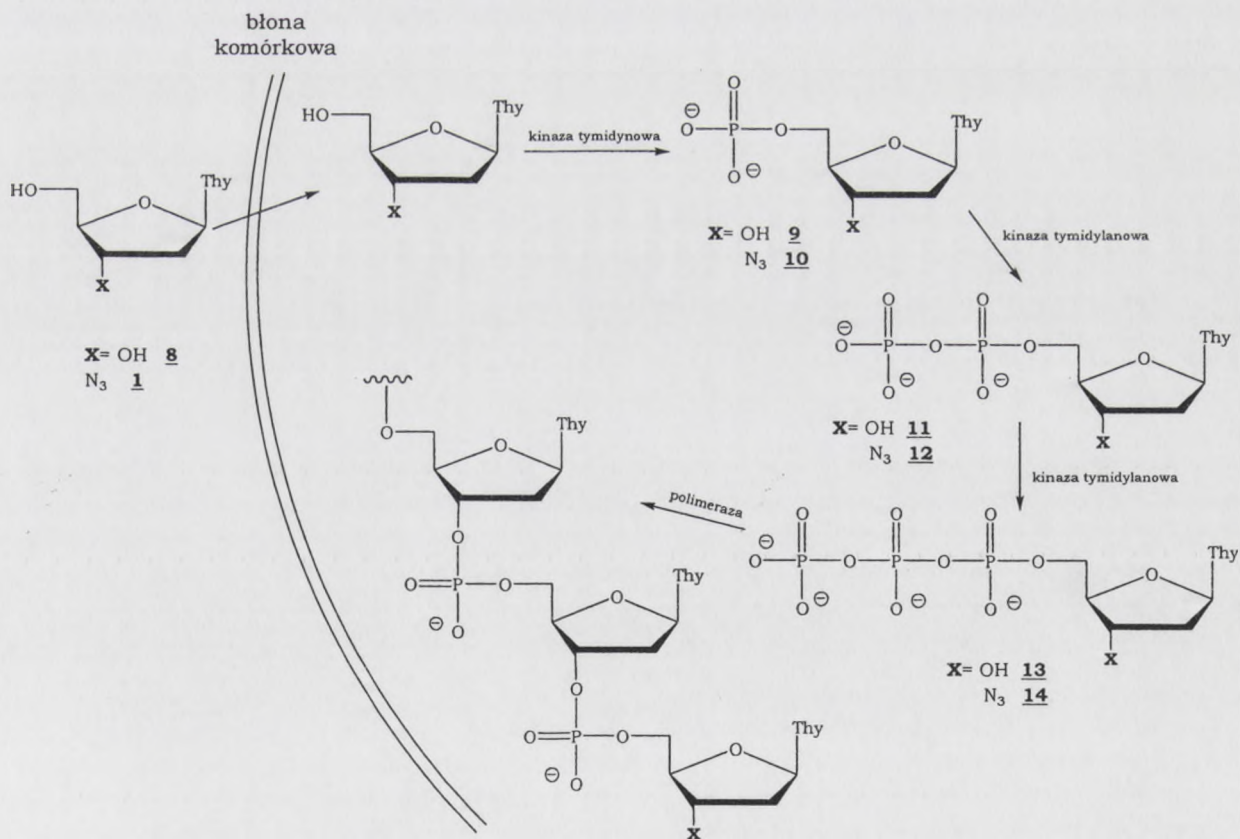
The hydrologic cycle is a complex process involving the interaction of various factors such as precipitation, evaporation, and runoff. The simulation of the hydrologic cycle is a challenging task that requires the use of sophisticated computer models. This paper presents a computer program designed to simulate the hydrologic cycle for a given area. The program is based on the principles of mass and energy balance and is capable of simulating the hydrologic cycle for a given area.



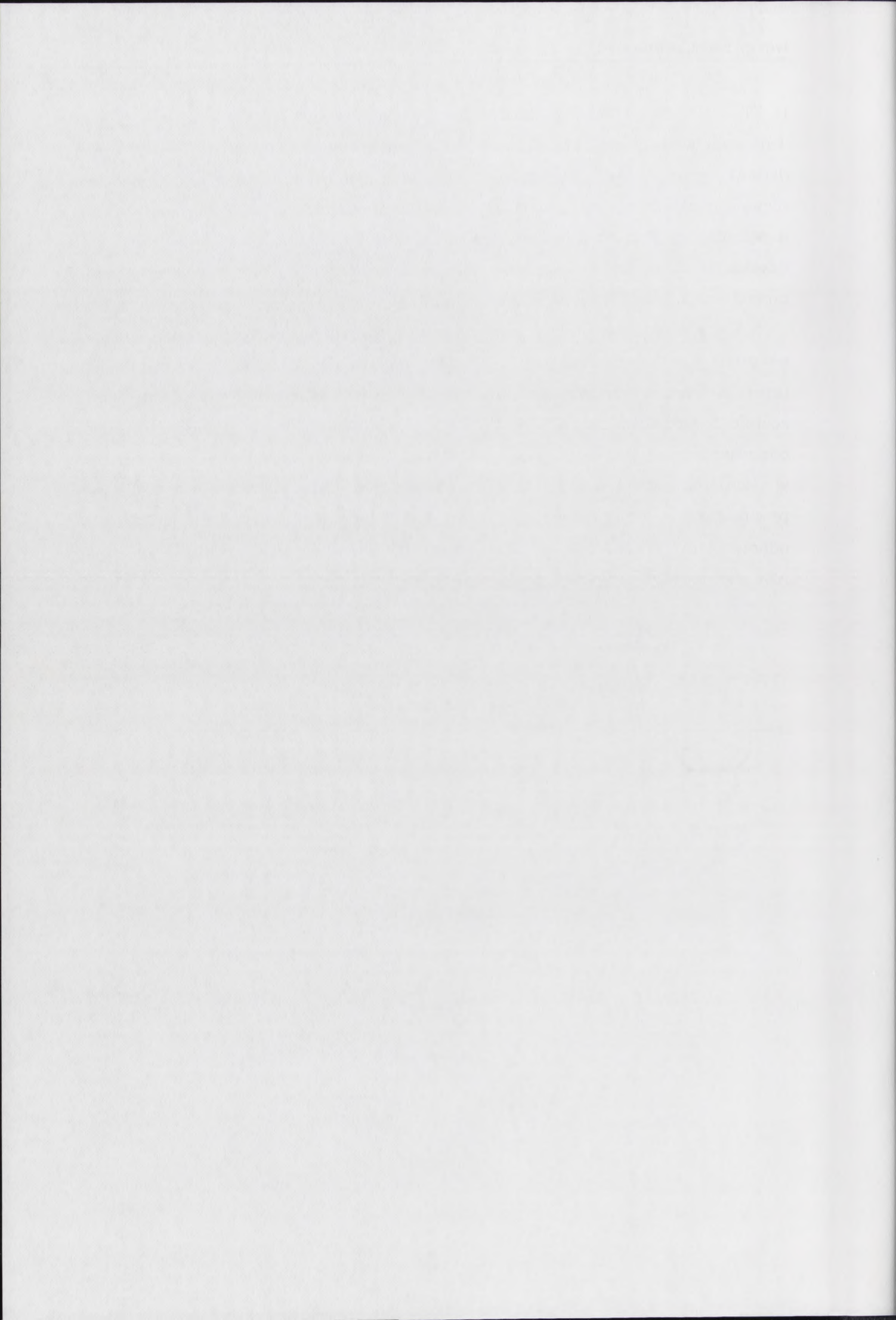
The simulation of the hydrologic cycle is a complex process that involves the interaction of various factors. The program is designed to simulate the hydrologic cycle for a given area and is based on the principles of mass and energy balance. The program is capable of simulating the hydrologic cycle for a given area and is based on the principles of mass and energy balance. The program is capable of simulating the hydrologic cycle for a given area and is based on the principles of mass and energy balance.

i 3TC. Dzięki znacznej lipofilowości (współczynnik podziału w układzie: 1-oktanol/woda $P = 0,97- 1,26$ ^{27;28}) AZT może przenikać barierę krew – mózg. Jednak jego ilość w płynie mózgowo-rdzeniowym jest prawdopodobnie niewystarczająca do osiągnięcia stężenia terapeutycznego w komórkach mózgu, a ponadto aktywność kinazy tymidynowej w tych komórkach jest zbyt niska do uzyskania dostatecznego stężenia 5'-trifosforanu AZT (AZTTP) i w konsekwencji powstrzymania replikacji wirusa w mózgu.^{26;29}

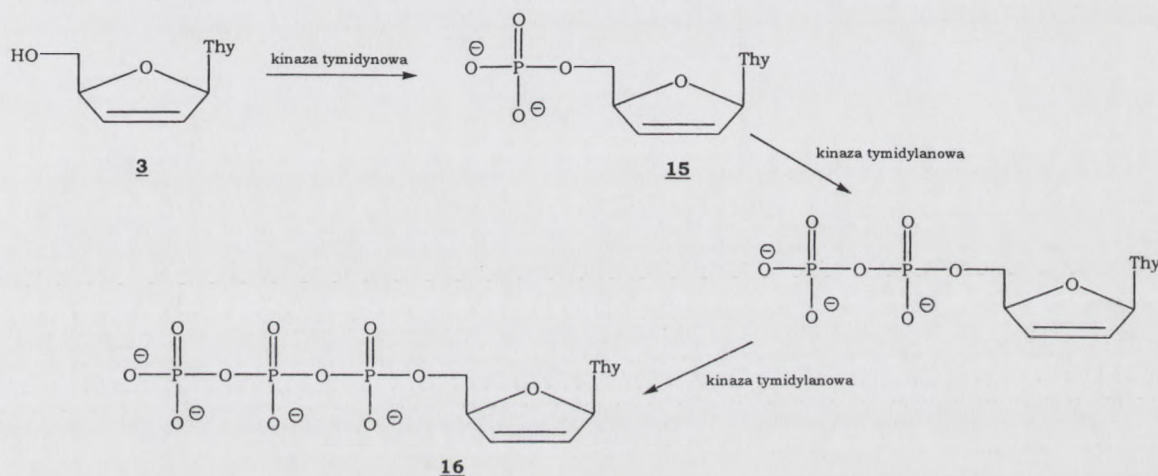
Aby spełnić swoją rolę w hamowaniu odwrotnej transkrypcji wirusa HIV AZT, podobnie jak i inne analogi nukleozydów, po wniknięciu do komórki musi zostać przekształcone do trifosforanu nukleozydu (Ryc. 5). W pierwszym etapie utworzony zostaje 5'-monofosforan AZT **9** (AZTMP) przy udziale kinazy tymidynowej, która odpowiedzialna jest za syntezę 5'-monofosforanu naturalnie występującej w komórce tymidyny **10** (TMP). Proces ten odbywa się przy zbliżonym powinowactwie obu substratów (AZT **1** i T **8**) do kinazy tymidynowej ($K_m =$ odpowiednio $3,0 \mu\text{M}$ i $2,9 \mu\text{M}$ w komórkach H9) a maksymalna szybkość fosforylacji AZT stanowi 60 % szybkości fosforylacji T.³⁰



Ryc. 5



Wyraźne różnice kinetyczne dla obu substratów pojawiają się na dalszych etapach fosforylacji z udziałem kinazy tymidylanowej. Wiązanie AZTMP **9** do tego enzymu jest dwukrotnie silniejsze niż TMP **10** ($K_m = 8,6 \mu\text{M}$ vs $4,1\mu\text{M}$), lecz przekształcenie monofosforanu AZT **9** w difosforan AZT **11** (AZTDP) jest znacznie wolniejsze (0,3 % maksymalnej szybkości przekształcenia TMP **10**).³⁰ Te dane są zgodne z badaniami anabolizmu AZT (440 razy więcej AZTMP **9** niż AZTTP **13** w niezainfekowanych komórkach H9) i biorąc pod uwagę zredukowany poziom TTP **14** w komórce wskazują wg P.A. Furmana³⁰ na inhibicję kinazy tymidylanowej przez AZTMP **9**.

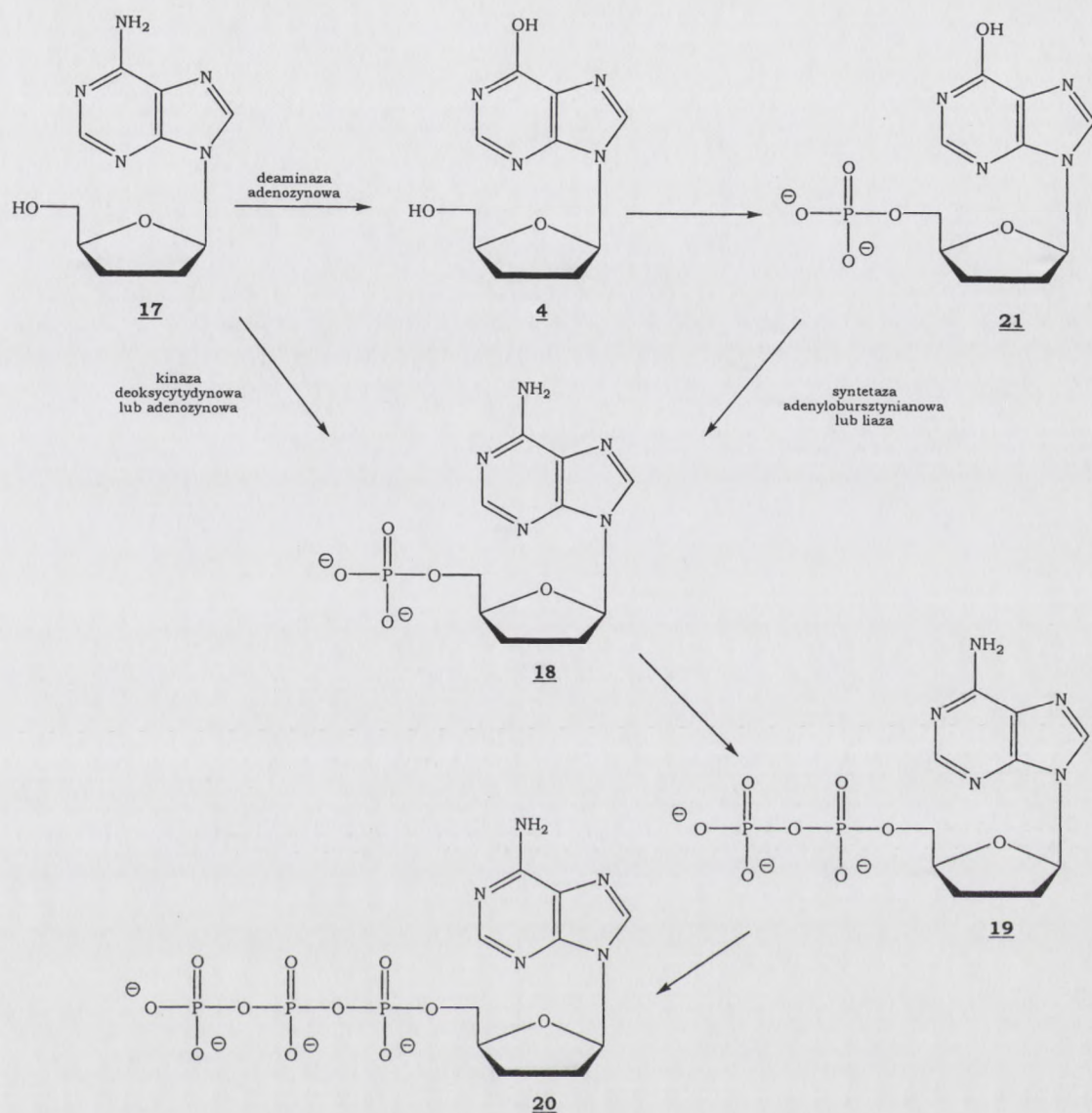


Ryc. 6

W porównaniu z AZT, kinetyka fosforylacji innego analogu tymidyny d4T **3** przebiega nieco inaczej (Ryc. 6). W związku z mniejszym powinowactwem d4T do kinazy tymidynowej ($K_m = 7,6 \mu\text{M}$ w komórkach CEM ³¹) w komórce wytworzona jest mniejsza ilość d4TMP **15** w porównaniu z AZTMP **9** (500 razy mniej po 24 h inkubacji komórek MT-4 przy początkowym stężeniu $50 \mu\text{M}$ ³²), lecz znacznie szybciej ulega on dalszej fosforylacji (V_{max} większe niż dla AZTMP **9**) do aktywnego d4TP **16**.³¹

Szlak fosforylacji analogów innych nukleozydów jest bardziej złożony i nie tak dobrze poznany jak dla AZT. Na przykład dda **17** może ulegać aktywacji w komórce na skutek bezpośredniej fosforylacji przy pomocy kinazy deoksycytydynowej lub adenozykowej do ddAMP **18** i dalej do ddADP **19** i ddATP **20**, bądź wejść w inny szlak metaboliczny obejmujący jej deaminację do ddi **4**, fosforylację do diIMP **21** a następnie aminację do ddAMP **18** przy udziale syntetazy adenylobursztynianowej lub liazy (Ryc. 7).³³

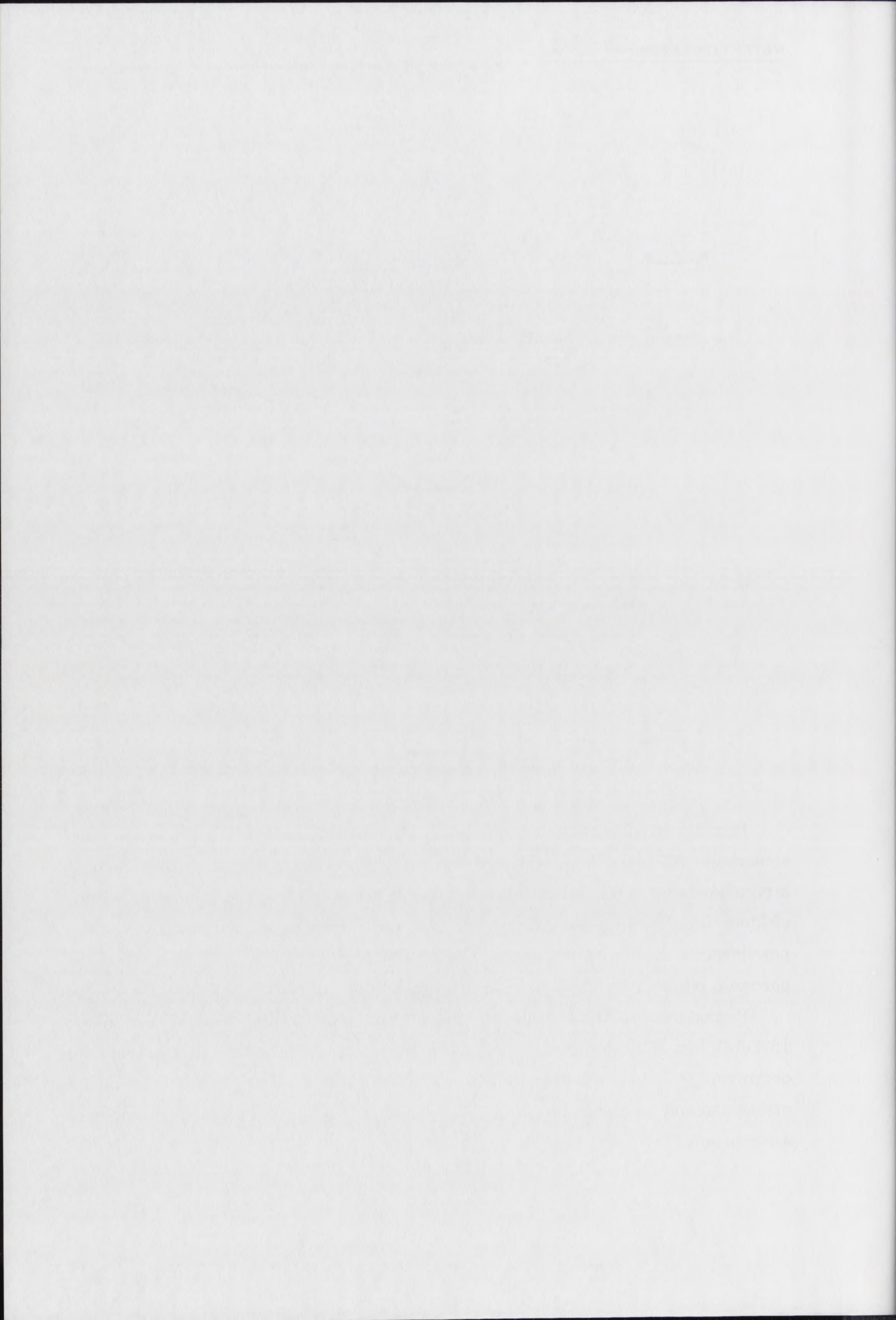


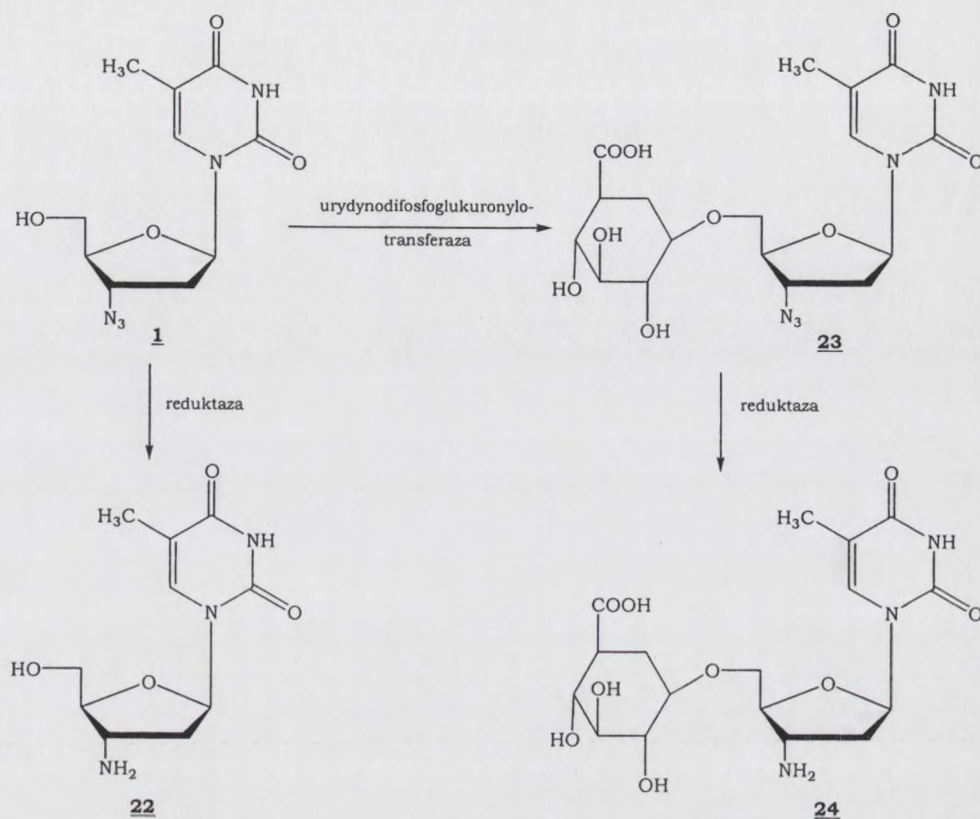


Ryc. 7

Pomimo wysokiej aktywności jednym z poważniejszych powodów ograniczenia stosowania AZT jako leku jest jego wysoka toksyczność szczególnie dla komórek szpiku kostnego, objawiająca się neutropenią i anemią a także miopatią, będącą efektem indukowania toksyczności w tkankach mięśni szkieletowych. Przyczyn powstawania tych niekorzystnych skutków ubocznych może być wiele a w ich poznaniu istotną rolę odgrywa badanie farmakokinetyki AZT.

Po podaniu AZT tylko pewna jej część wnika z osocza do komórek krwi, około 15% AZT jest eliminowane z organizmu w stanie niezmienionym (18% po podaniu dożylnym, 14% doustnym), natomiast większość (60% dożylnie, 75% doustnie) jest przekształcana w wątrobie do 5'-glukuronianu AZT i wydalana z moczem z organizmu.³⁴

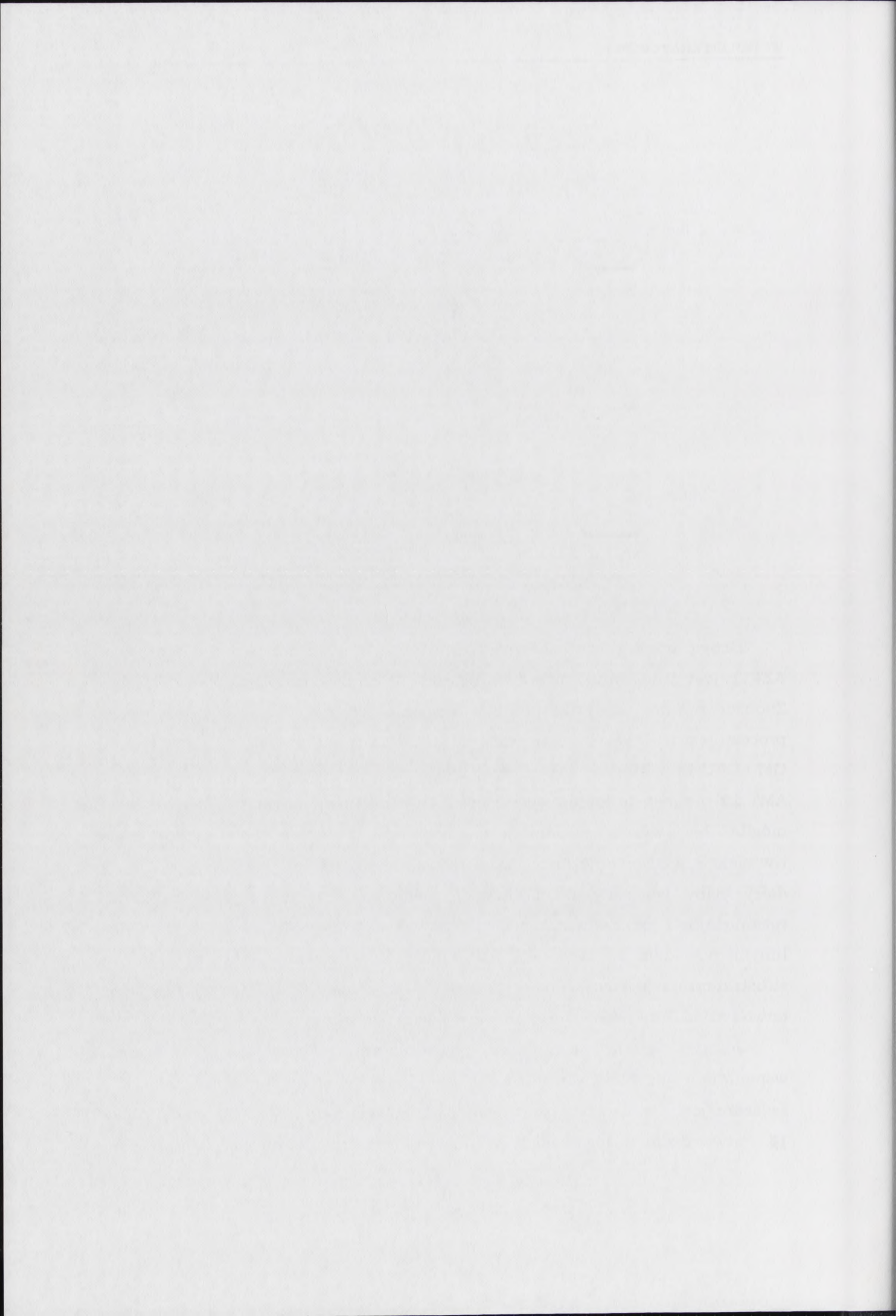




Ryc. 8

Drugą ścieżką kataboliczną istotną w wytłumaczeniu wysokiej toksyczności AZT **1** jest jego redukcja w wątrobie do 3'-aminotymidyny **22** (AMT) (Ryc. 8). Zaobserwowano, że produkt tego enzymatycznego³⁵ lub nieenzymatycznego³⁴ procesu jest 5 - 7 razy bardziej toksyczny niż AZT dla komórek macierzystych (CFU-GM i CFU-E), z których wywodzą się leukocyty i erytrocyty.^{35;36} Wysoka toksyczność AMT **22** nie jest do końca wyjaśniona. Jednym z mechanizmów toksyczności AMT mógłby być wysoki poziom jego fosforylacji w komórkach szpiku kostnego i w efekcie wytworzenie dużej ilości trifosforanu 3'-aminotymidyny (AMTTP), który dalej byłby włączany do DNA tych komórek i w ten sposób zaburzał ich rozmnażanie i proces hematopoezy, czyli wytwarzania składników krwiotwórczych. Innym powodem toksyczności AMT może mieć również fakt, że nie jest on substratem dla urydynodifosfoglukuronylotransferazy (UDPGT), czyli nie może być łatwo i szybko usuwany z organizmu w postaci glukoconianu AMT **24** (GAMT).³⁵

Jeszcze innym czynnikiem powodującym toksyczność AZT może być wspomniane już blokowanie cytozolowej kinazy tymidylanowej przez AZTMP **9** co związane jest z małą szybkością jego przekształcania do AZTDP **11** i dalej do AZTTP **13**. Potwierdzeniem tego mogą być obserwacje zmniejszania się poziomu dTTP **14**



w komórkach inkubowanych z AZT^{30;31}, jednak wg J.P. Sommadossi'ego³⁷ ubytek ten jest minimalny i szybko uzupełniany.

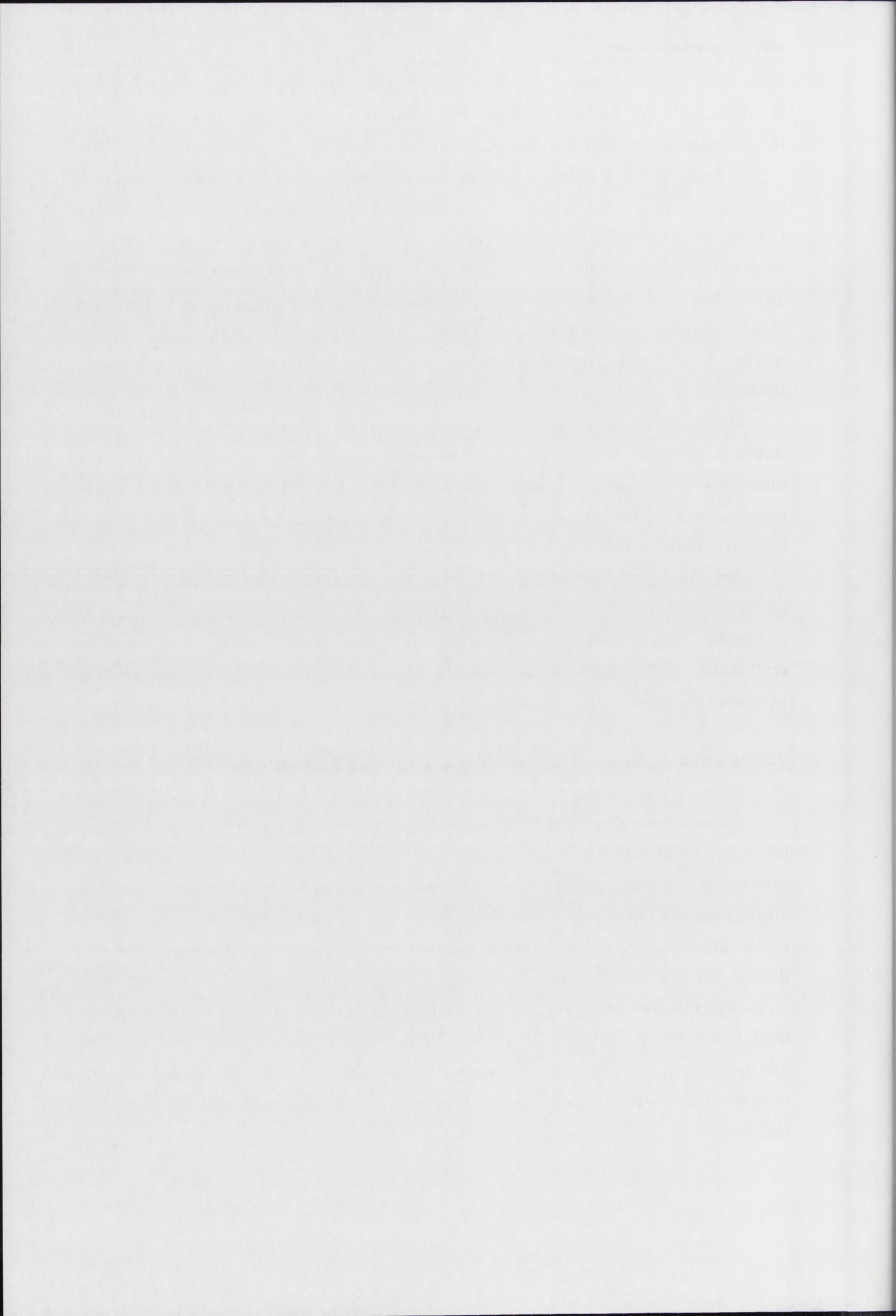
Przyczyną indukowania toksyczności AZT, szczególnie wobec komórek szpiku kostnego, może być również włączenie AZTMP **9** do komórkowego DNA i terminacja jego dalszej syntezy. Mimo, że w wielu pracach³⁷⁻³⁹ mechanizmowi temu przypisuje się istotną rolę, wydaje się on jednak mało prawdopodobny. Powinowactwo AZTTP **13** do polimerazy komórkowej α , odpowiedzialnej za inicjację syntezy DNA, jest około 100 razy mniejsze niż dla TTP **14**, co powoduje, że tylko jedna cząsteczka AZTMP **9** na 2500 cząsteczek TMP **10** jest włączana do łańcucha komórkowego DNA.⁴⁰

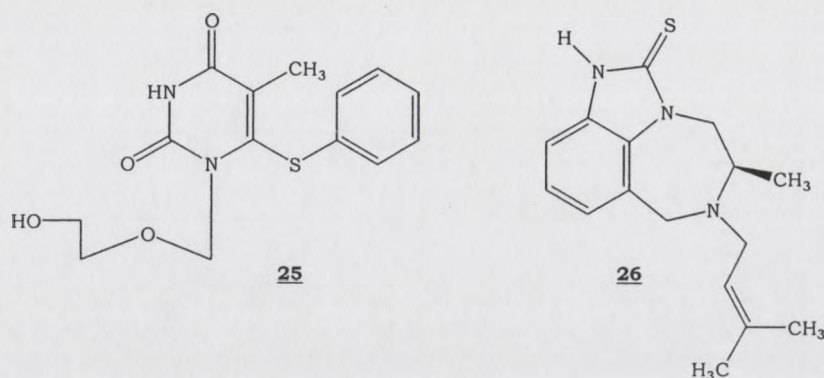
Gromadzenie się w komórce dużej ilości AZTMP **9** może natomiast wpływać na inhibicję procesu wykrywania i usuwania nukleotydu włączonego do DNA niezgodnie z regułami Watsona – Cricka przy udziale 3'-5' egzonukleazy związanej z polimerazą δ i ϵ . Inhibicja ta może spowodować wzrost liczby mutacji podczas syntezy komórkowego DNA przy udziale wspomnianych polimeraz.^{38;39;41;42}

Zbyt duże ilości AZTMP **9** w komórce mogą również wpływać niekorzystnie na glikozylację tłuszczów i białek, co znajduje odbicie w wadliwym funkcjonowaniu receptora erytropoetycznego, odgrywającego ważną rolę w proliferacji erytrocytów.^{43;44} Są również doniesienia o zmniejszeniu ekspresji tego receptora pod wpływem AZT.⁴⁵

7.2 Nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy- NNRTI

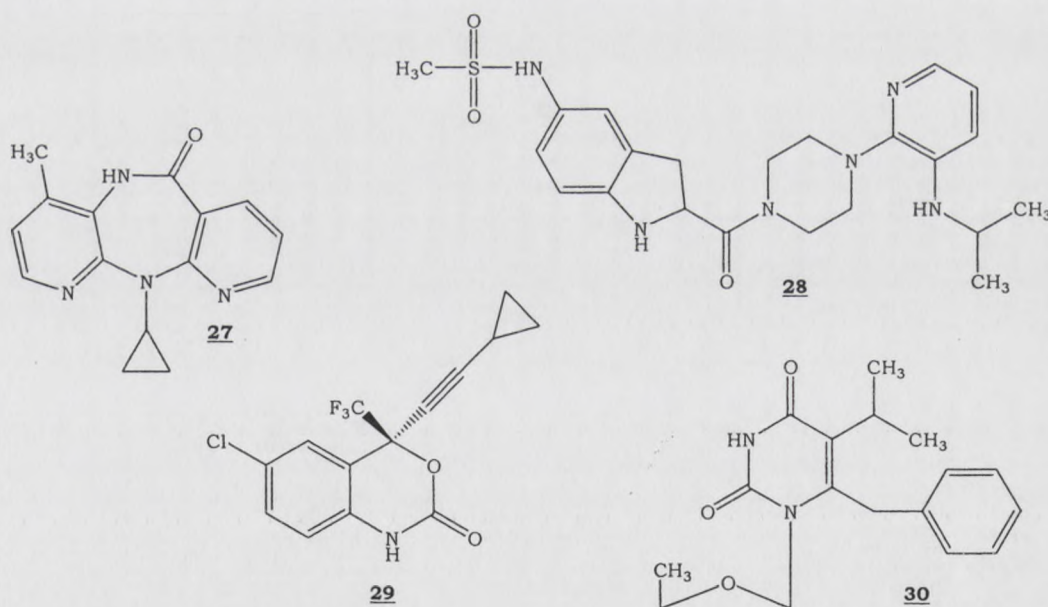
Ponad 30 strukturalnie różnych klas związków chemicznych zidentyfikowano jako nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy. Pierwszymi przedstawicielami tej grupy i wykazującymi wysoką skuteczność wobec wirusa HIV-1 oraz całkowitą bierność w stosunku do HIV-2 i innych retrowirusów były HEPT **25** i TIBO **26** (Ryc. 9) (związki te, jak również ich pochodne, są analogami nukleozydów, dlatego obecnie nazywa się je „analogami nukleozydów wykazującymi aktywność antywirusową poprzez mechanizm nienukleozydowy”⁴⁶). Działanie antywirusowe tego typu inhibitorów polega na niekompetycyjnym oddziaływaniu z miejscem allosterycznym odwrotnej transkryptazy wirusa HIV, co powoduje zmianę kształtu enzymu i „ukrycie” jego miejsca aktywnego, a w rezultacie dezaktywację tego enzymu.^{20;29}





Ryc. 9

Badania biochemiczne i strukturalne dowiodły, że nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy wiążą się do tzw. kieszeni hydrofobowej ulokowanej w podjednostce p66 RT wirusa HIV-1. Unikalna specyficzność NNRTI⁷ spowodowana jest brakiem tej kieszeni w strukturze innych RT lub polimeraz DNA.²⁹ Wykazano również dużą elastyczność wspomnianej kieszeni hydrofobowej, co tłumaczyłoby możliwość przyłączenia NNRT inhibitorów o różnych rozmiarach i kształtach. Okazało się jednak, że kompleksy HIV-1 RT/NNRTI przyjmują zawsze bardzo podobną strukturę przypominającą motyla.^{7;47}



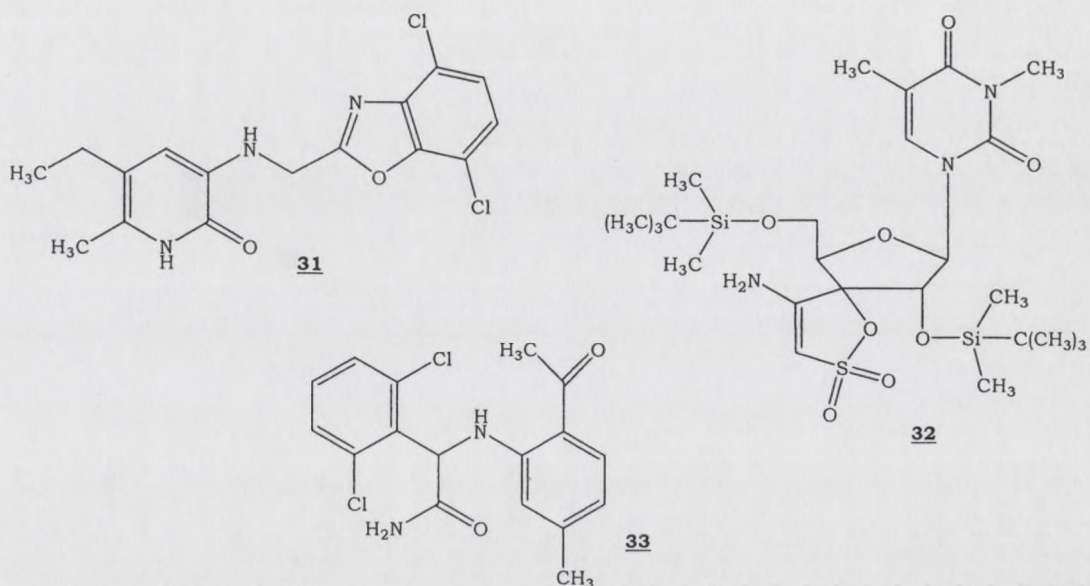
Ryc. 10

Trzy nienukleozydowe inhibitory RT - newirapina **27**, mesylan delawirdyny **28** i efawirenz **29** dopuszczone są przez FDA (Food and Drug Administration - Amerykański Urząd ds. Leków i Żywności) do stosowania klinicznego, a kolejny lek emiwiryna **30** (pochodna HEPT, analog nukleozydu wykazujący aktywność

The following information is provided for your information. The information is for informational purposes only and should not be used for any other purpose. The information is for informational purposes only and should not be used for any other purpose.

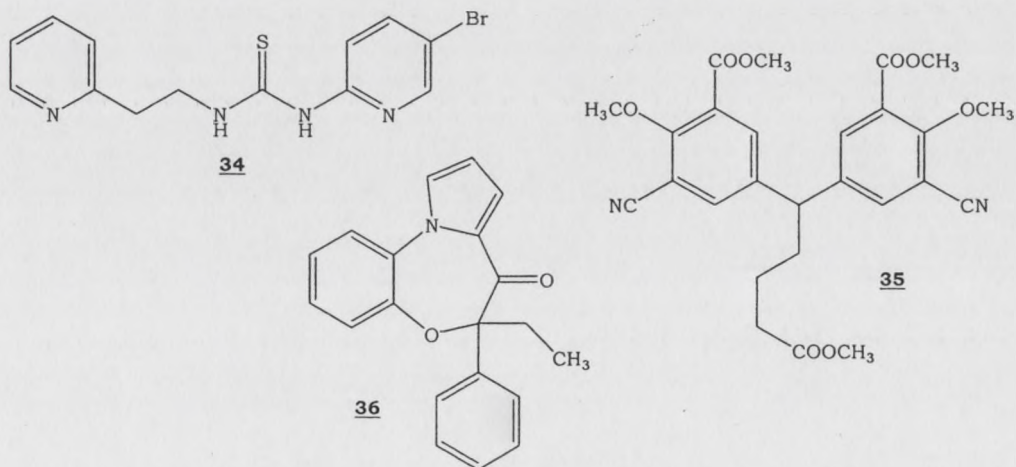
The following information is provided for your information. The information is for informational purposes only and should not be used for any other purpose. The information is for informational purposes only and should not be used for any other purpose.

antywirusową poprzez mechanizm nienukleozydowy), jest w III fazie badań klinicznych (Ryc. 10).⁴⁷

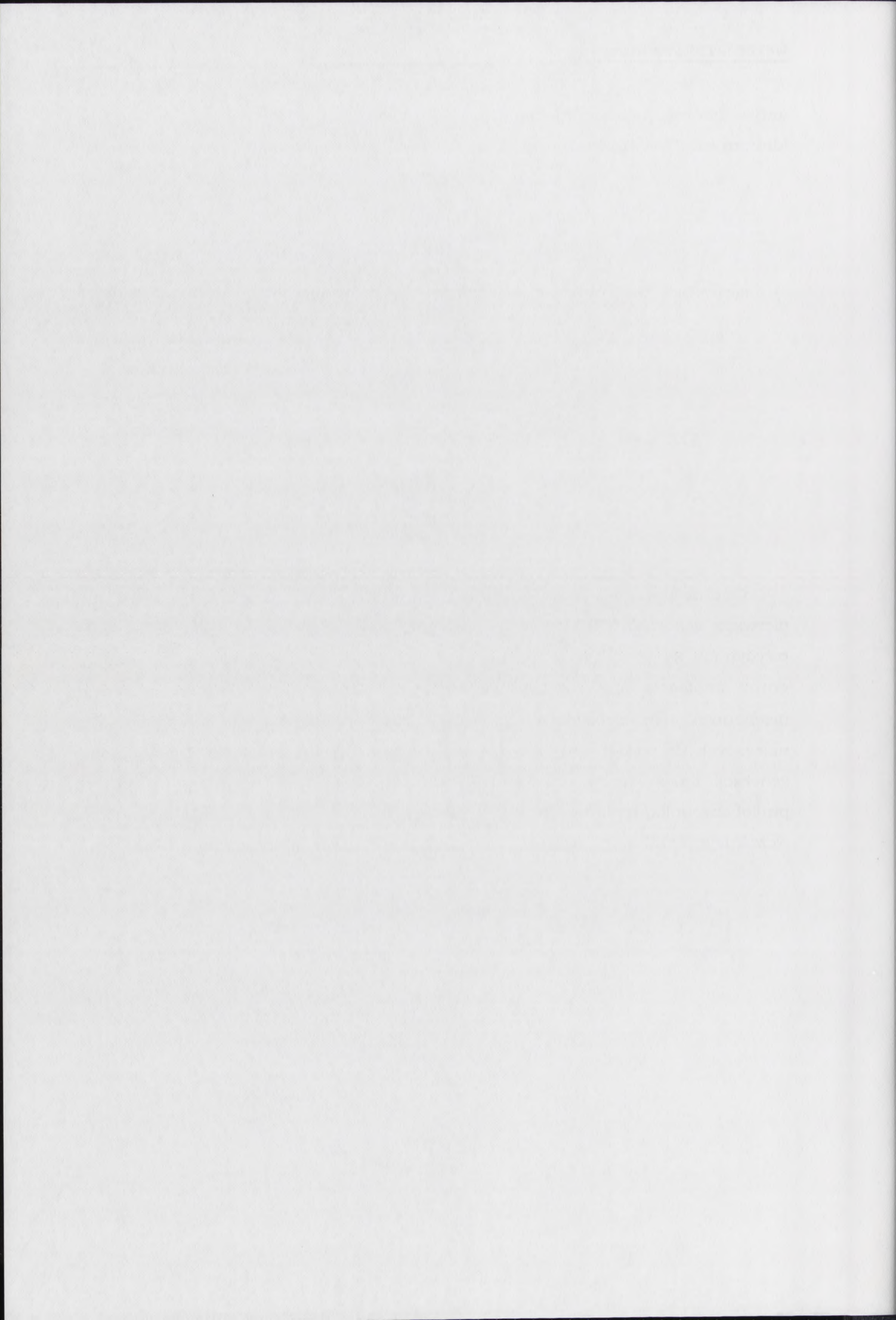


Ryc. 11

Oprócz ogromnej liczby od dawna znanych już związków należących do tzw. pierwszej generacji NNRTI (Ryc. 11) np. pochodne wymienianych już TIBO i HEPT, pirydynony **31** (L-697,661), pochodne TSAO **32** (TSAO-m³T, również należący do grupy analogów nukleozydów wykazujących aktywność antywirusową poprzez mechanizm nienukleozydowy) lub α -APA **33**, opisywanych jest szereg związków należących do tzw. drugiej lub trzeciej generacji NNRTI (Ryc. 12). Do tej „nowej” generacji należą np. pochodne TET **34**, alkenyldiazylometanu **35** (ADAM) czy pirolobenzenoksazepinonu **36** (PBO). Wykazują one z reguły wyższą aktywność niż wcześniejsze inhibitory, szczególnie w odmianach HIV-1 opornych na NNRTI.



Ryc. 12

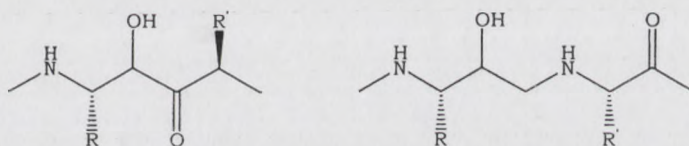


7.3 Inhibitory proteazy

Proteaza wirusa HIV-1, z uwagi na jej proteolityczną aktywność niezbędną do produkcji dojrzałych, infekujących cząstek wirusowych, uznana została jako kolejny atrakcyjny cel w terapii antywirusowej.⁹

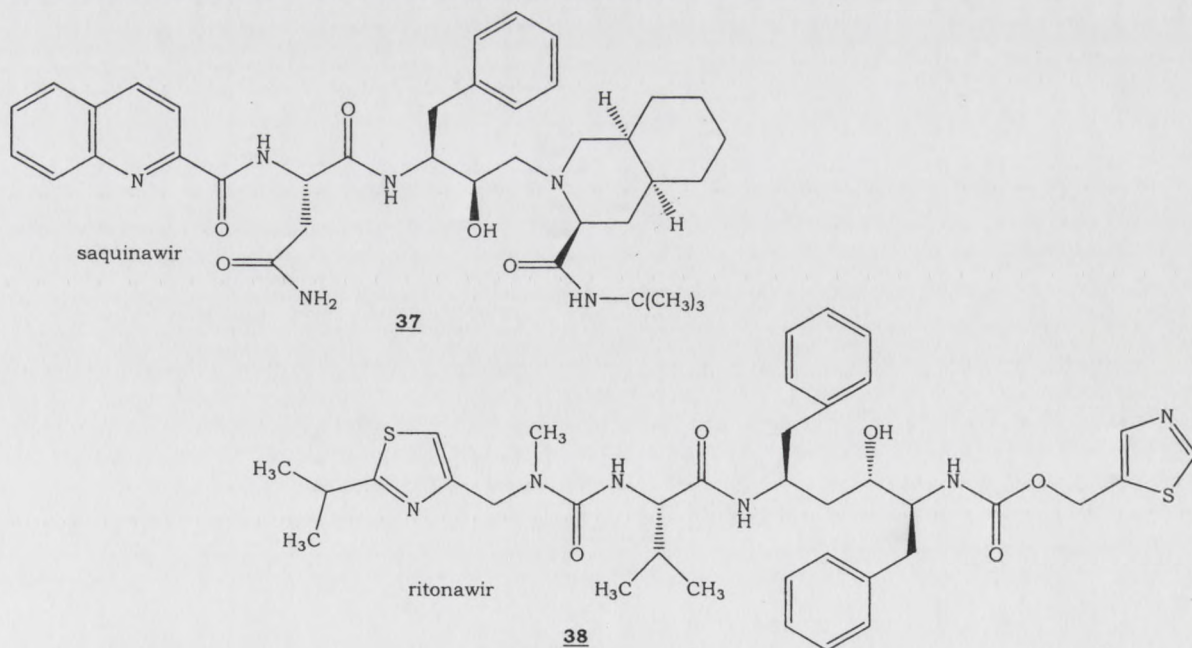
Pierwsze zaprojektowane inhibitory proteazy bazowały na strukturze produktów proteolizy wiązania peptydowego między resztą fenyloalaninową a prolinową w polipeptydzie Gag-Pol (Ryc. 3). Ich słaba przyswajalność oraz mała stabilność wykluczały jednak zastosowanie tych związków jako terapeutyków.

Dzięki systematycznej modyfikacji prowadzącej do zmniejszenia liczby wiązań peptydowych zastąpionych przez np. grupę hydroksymetylenową lub hydroksyetyloaminową (Ryc. 13) otrzymano nie ulegające hydrolizie analogi substratów proteazy wirusa HIV-1 tzw. naśladowcze inhibitory PR.^{9;11}

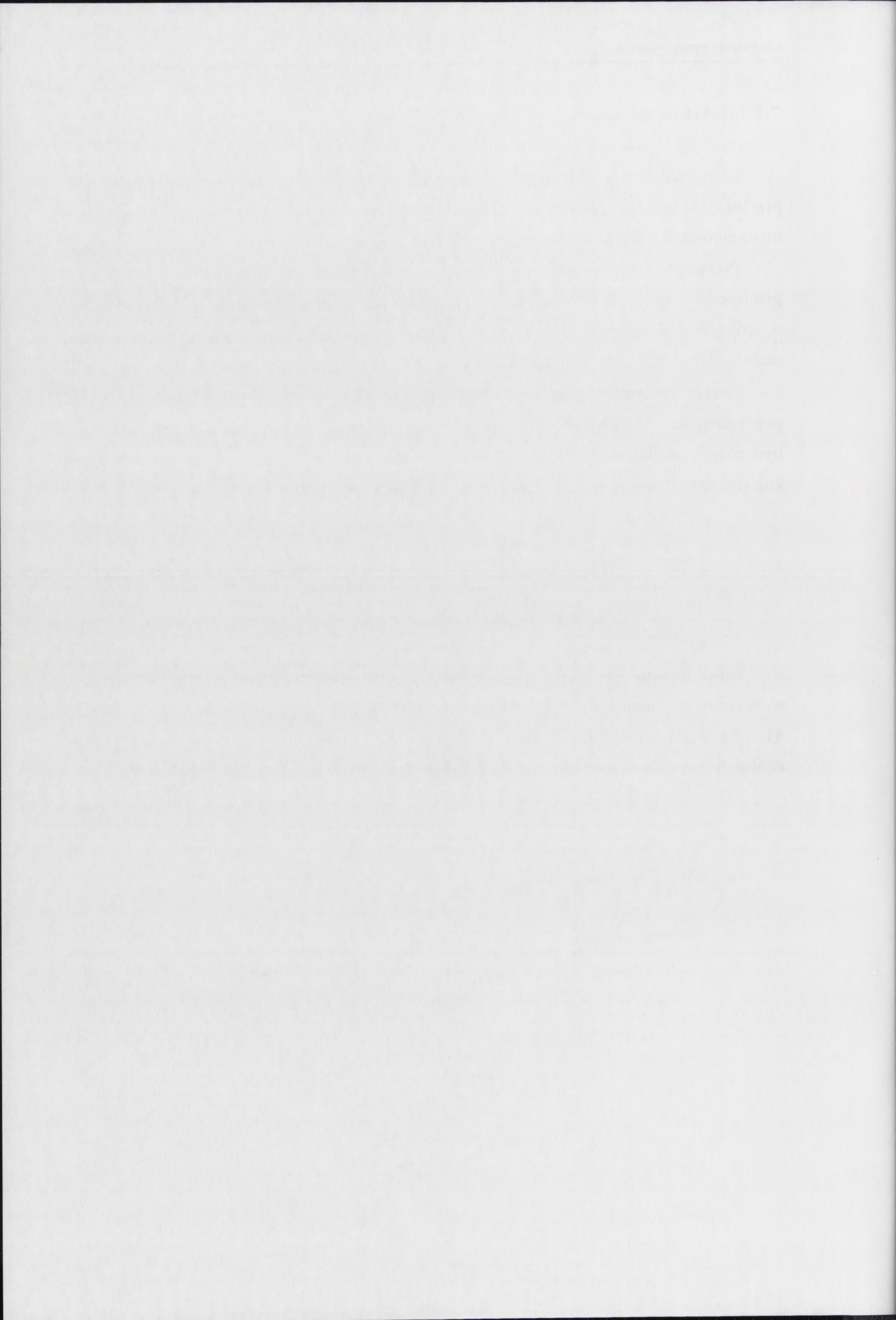


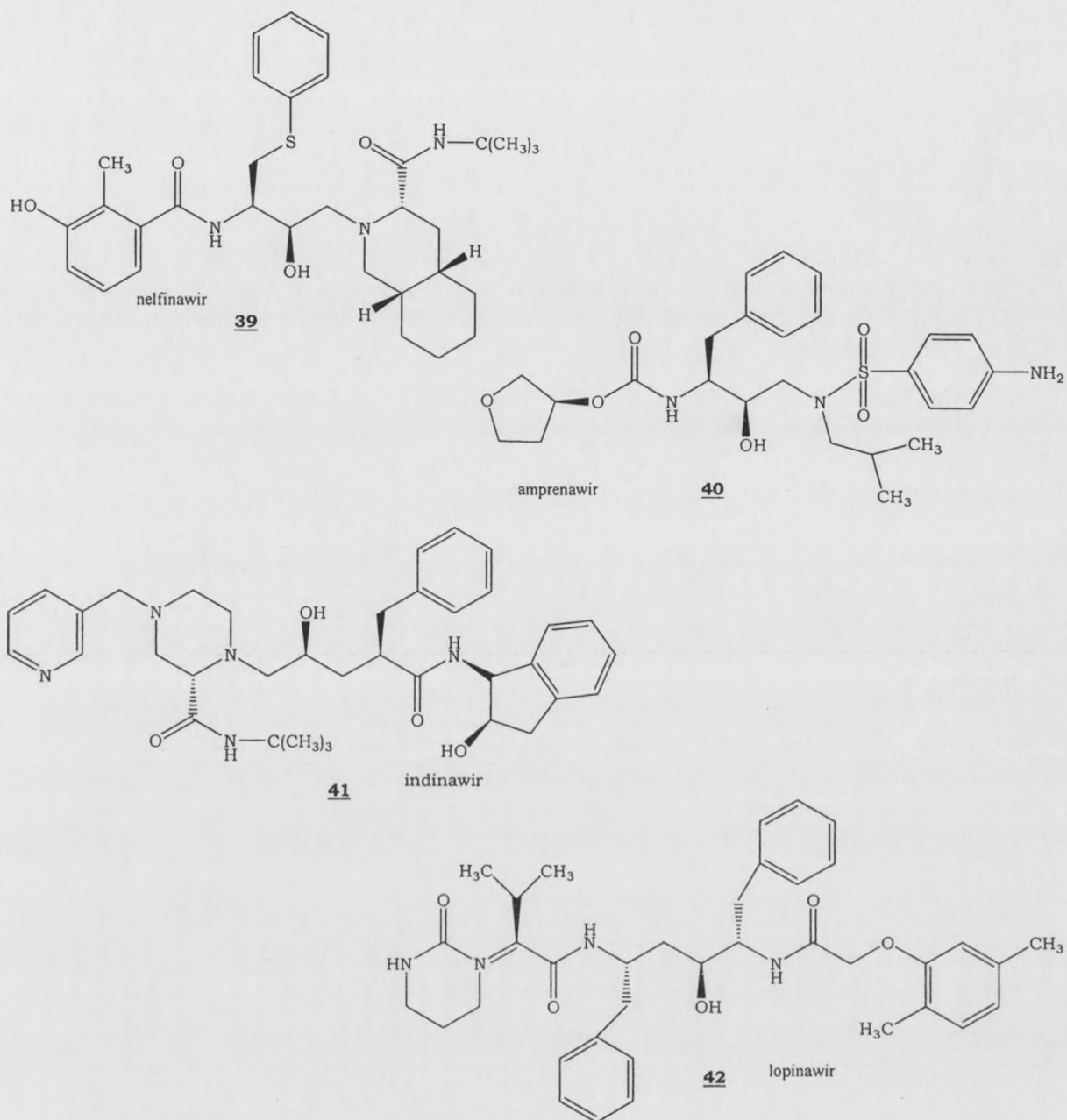
Ryc. 13

Inhibitorami proteazy wirusa HIV obecnie dopuszczonymi do stosowania w leczeniu są: saquinawir **37**, ritonawir **38**, nelfinawir **39**, amrenawir **40**, indinawir **41** oraz lopinawir **42** (Ryc. 14 i 15) Wszystkie te związki charakteryzują się dużą zdolnością inhibicji proteazy (stała inhibicji K_i rzędu nanomoli).⁹



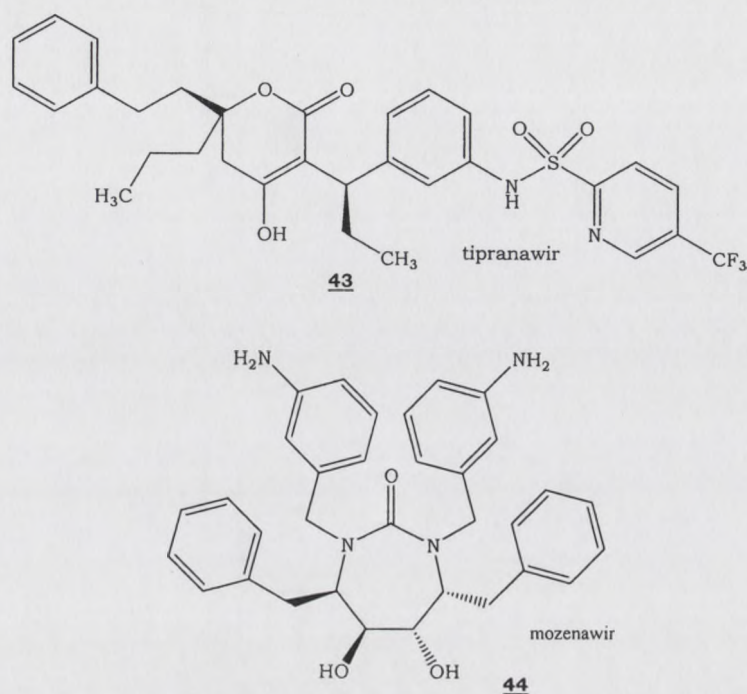
Ryc. 14





Ryc. 15

Znalezienie mutantów wirusa HIV-1 opornych na większość „naśladowczych” inhibitorów PR skłoniło do poszukiwań nowych, niepeptydowych inhibitorów, które oprócz zwiększonej aktywności, charakteryzują się lepszą przyswajalnością i/lub farmakokinetyką. Przykładami takich związków są: tipranawir **43** i mozenawir **44** (Ryc. 16).¹¹



Ryc. 16

7.4 Terapia kombinowana

Skuteczność stosowania jednego rodzaju leku w walce z HIV, jak już wcześniej wspomniałam, jest często ograniczona przez niecałkowite zahamowanie replikacji wirusa, nabywanie lekooporności przez wirus oraz pojawianie się toksycznych efektów ubocznych przy podawaniu optymalnej dawki leku. W związku z tym, na wzór zwalczania innych chorób infekcyjnych, zamiast monoterapii w walce z wirusem HIV zaczęto stosować terapię kombinowaną, czyli podawanie dwóch, trzech lub czterech leków jednocześnie.^{29,48,49}

Zaletami skutecznej terapii kombinowanej są przede wszystkim: obniżenie toksyczności spowodowane redukcją dawki poszczególnych związków, zmniejszenie prawdopodobieństwa rozwoju lekooporności tj. pojawiania się genomu z kilkoma mutacjami (prawdopodobieństwo wystąpienia genomu o oporności na jeden lek w co 10^3 wirionie, na drugi lek w co 10^4 wirionie a z obiema mutacjami – jeden na 10^7 wirionów¹⁰) oraz polepszenie aktywności antywirusowej na skutek współdziałania leków tj. synergizmu.

W terapii kombinowanej pacjentom podawane są różnego rodzaju zestawy związków, oddziałujące z różnymi enzymami wirusowymi (np. inhibitor wirusowej adsorpcji z inhibitorem proteazy), z różnymi miejscami w tym samym enzymie (np. nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji i nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptyazy) a także stosuje się kombinacje związków, które oddziałują

THE STATE OF TEXAS

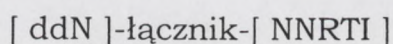
COUNTY OF _____

BEFORE ME, the undersigned authority, on this _____ day of _____, 20____

z tym samym miejscem, w tym samym enzymie, przy czym jeden związek ma zdolność tłumienia mutacji enzymu, wywołującej oporność na drugi lek (np. 3TC z AZT).²⁹

7.5 „Podwójne leki” (z ang. „double-drugs”)

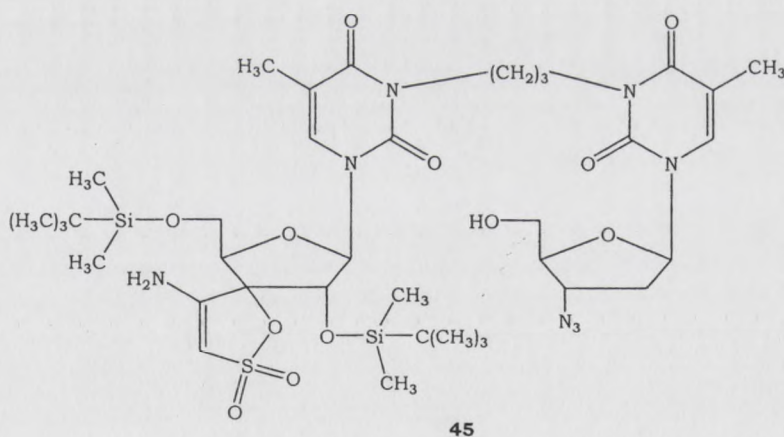
Ciekawym podejściem w ramach terapii kombinowanej zaproponowanym w 1993r. przez S.H. Arnolda i współpracowników⁵⁰ było otrzymanie dimerów tzw. „double-drugs” złożonych z nienukleozydowego inhibitora odwrotnej transkryptazy oraz odpowiedniego analogu nukleozydu połączonych odpowiednim łącznikiem przez atom azotu N-3 tyminy.



Właściwa długość łącznika pomiędzy obiema częściami dimeru związana jest z bliskością (około 10 Å) kieszeni hydrofobowej (miejsce wiązania NNRTI) i miejsca wiązania analogów ddN w odwrotnej transkryptazie wirusa HIV-1.^{7;47}

Dzięki obecności inhibitorów NNRT dimery miały być, w założeniu autorów, wysoce specyficzne wobec RT wirusa HIV-1 i zdolne opóźnić pojawienie się lekooporności wirusa.⁷

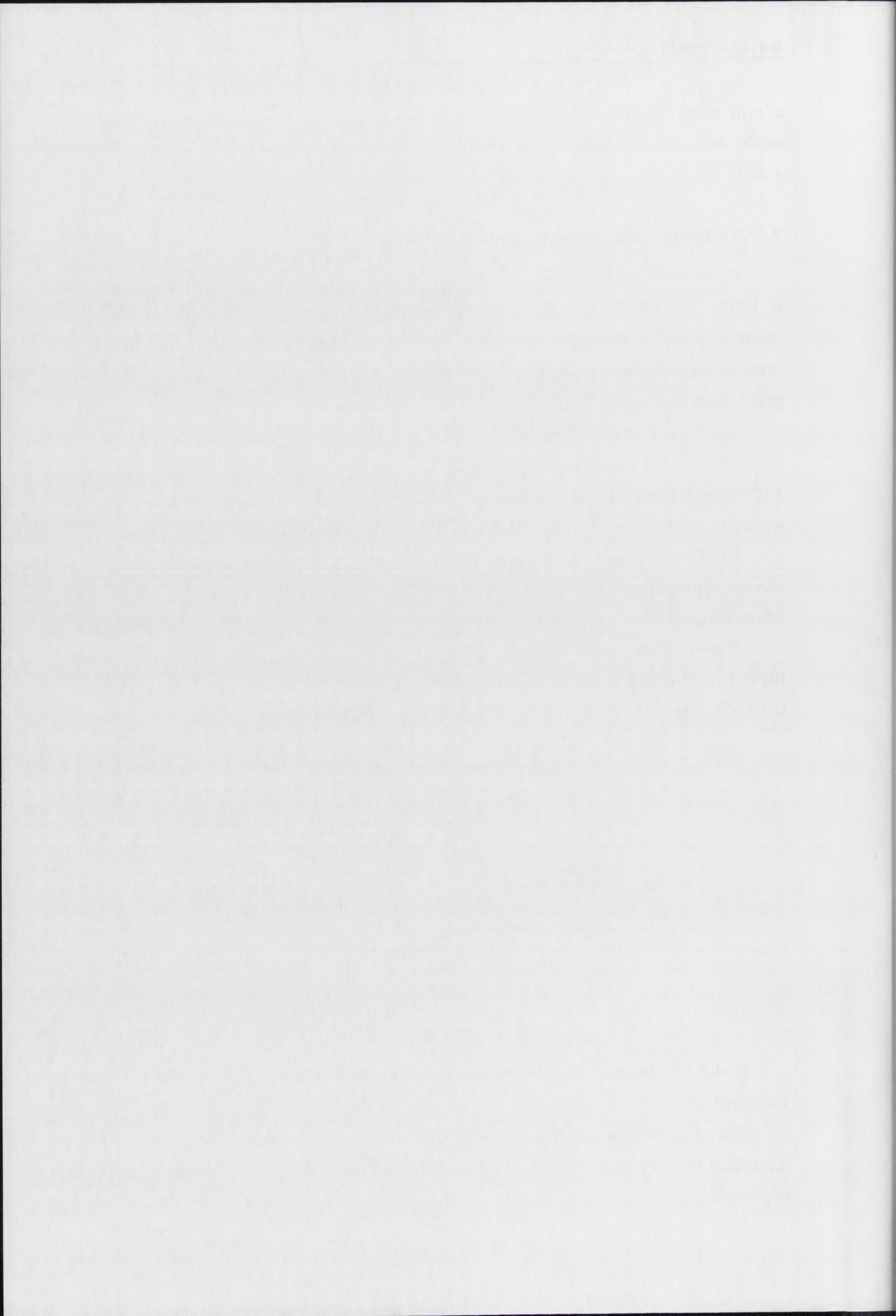
Najlepszą aktywnością, choć jednak mniejszą od AZT, odznaczał się dimer **45** (Ryc. 17) z łącznikiem *n*- propylowym pomiędzy AZT i TSAO-T **32** (Ryc. 11) ($EC_{50} = 0,10 \mu\text{M}$ i dla AZT $EC_{50} = 0,011 \mu\text{M}$ w komórkach CEM/O).⁵⁰



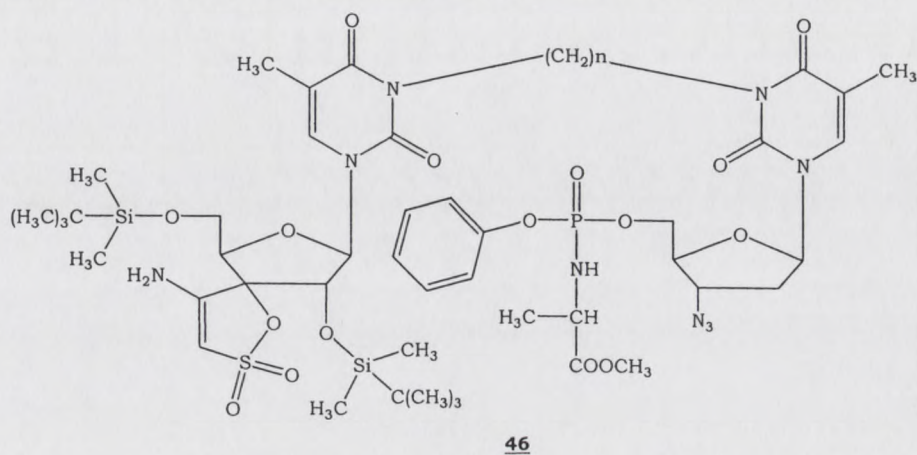
Ryc. 17

Podobne dimery AZT i HEPT nie wykazywały znaczącej aktywności przeciwko wirusowi HIV-1.⁵⁰

Dla polepszenia aktywności tego typu związków stosowano różnego rodzaju modyfikacje łączników (np. zastąpienie alifatycznego aryłowym) lub wprowadzano odpowiednio zamaskowany monofosforan w pozycję 5' analogu ddN - np. dimer **46**

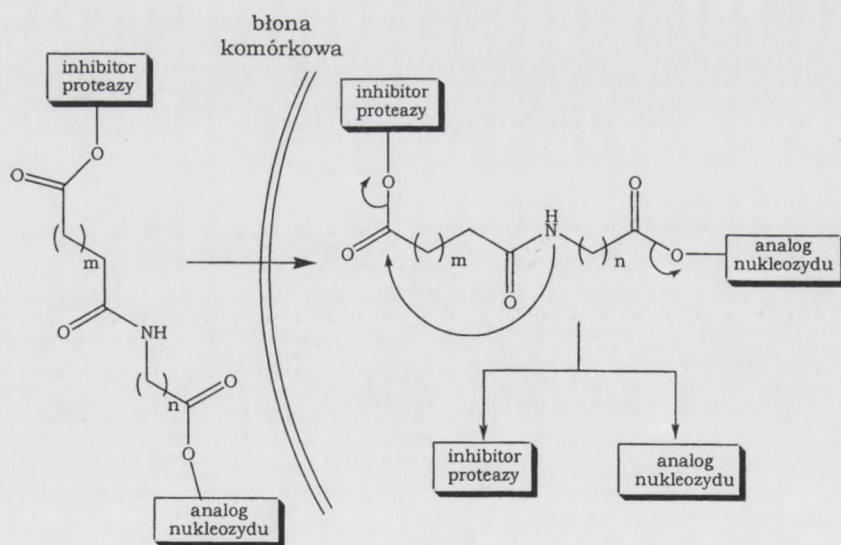


(Ryc. 18). Nie spowodowało to jednak zwiększenia ich aktywności antywirusowej.⁵¹ Również zmiana miejsca łączenia AZT z pochodną HEPT lub pirydynonem **31** (Ryc.11) (przez C-5 w AZT) nie dała pożądanego efektu.⁵²

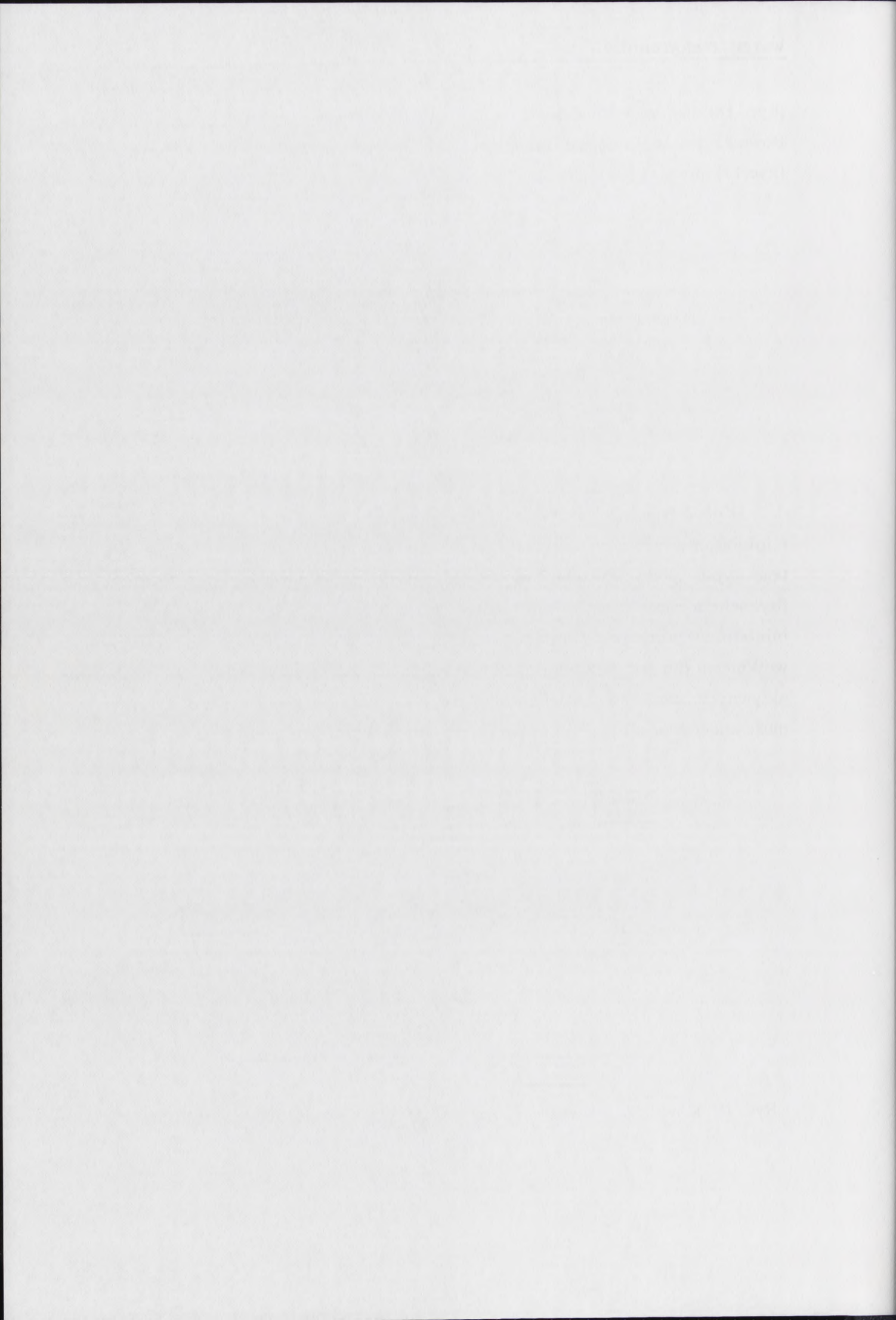


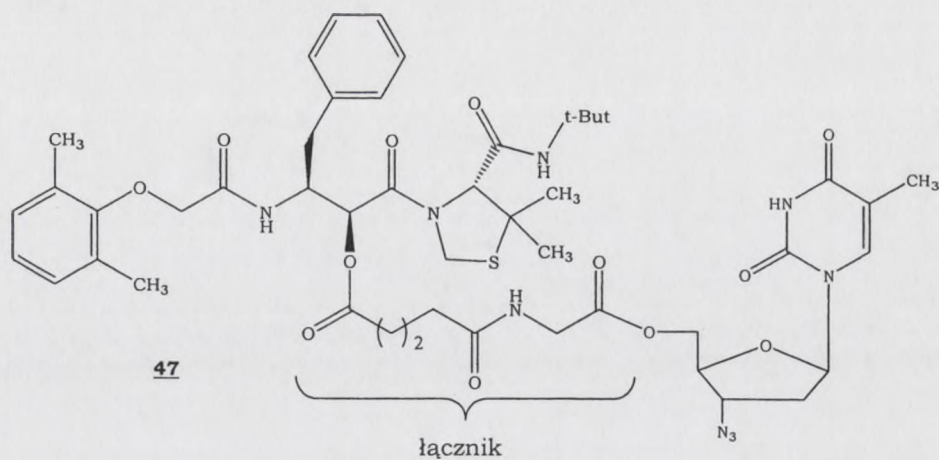
Ryc. 18

O dość znaczącej aktywności innego rodzaju dimerów tj. zbudowanych z AZT i inhibitorów proteazy doniosła grupa japońskich naukowców.^{53;54} Zastosowanie tego typu „podwójnych leków” miało przede wszystkim poprawić właściwości fizykochemiczne (szczególnie słabą przenikalność przez błony komórkowe) inhibitorów proteazy zawierających grupę karboksylową. Wg koncepcji autorów, po wnikięciu dimeru do komórki dochodzi do hydrolizy łącznika (Rys. 19) i uwolnienia aktywnych związków. Zwiększona aktywność antywirusowa dimeru **47** (Ryc. 20) może sugerować o ujawnieniu się w tym przypadku efektu synergistycznego.⁵⁴



Ryc. 19. Koncepcja „podwójnych leków” zawierających spontanicznie rozrywalny łącznik





Ryc. 20

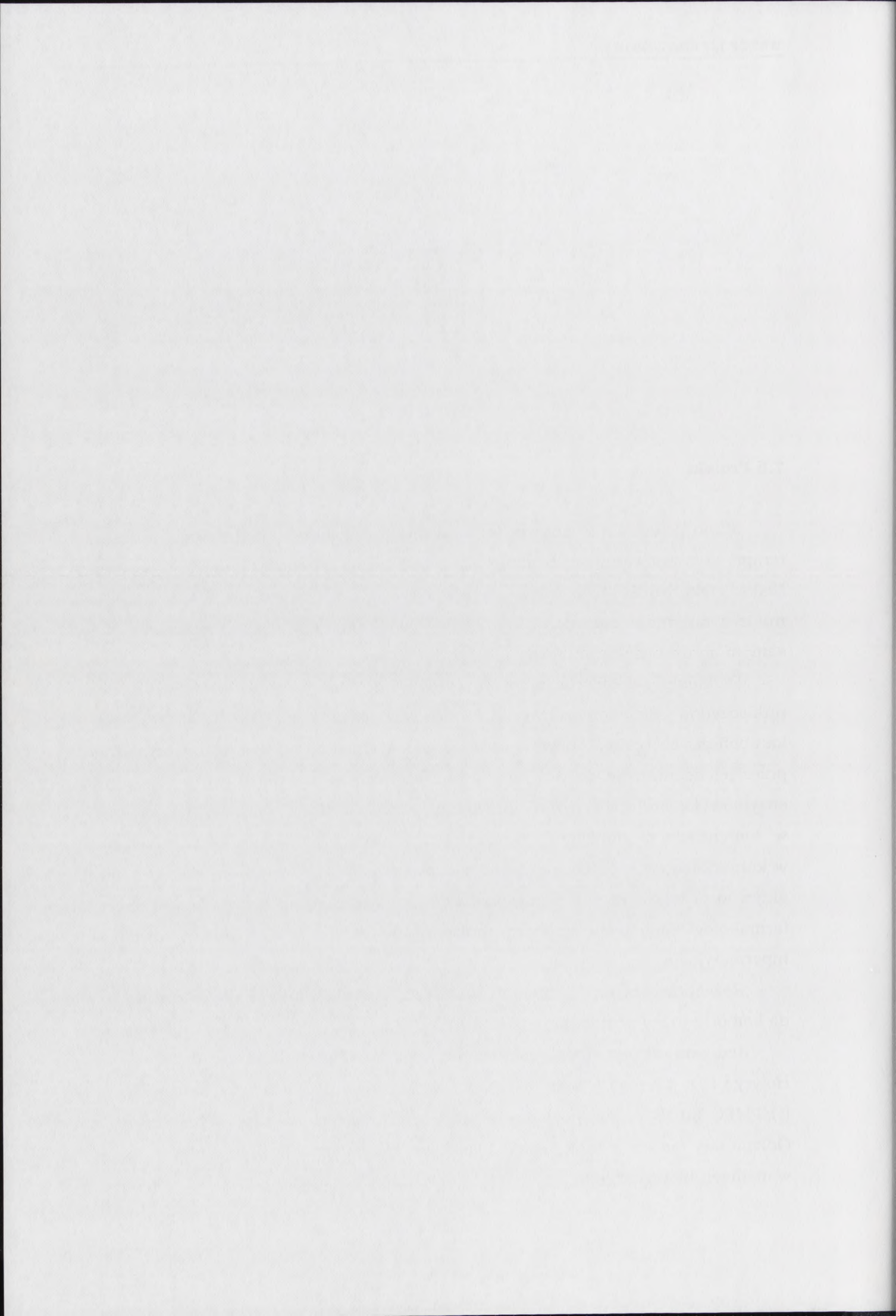
7.6 Proleki

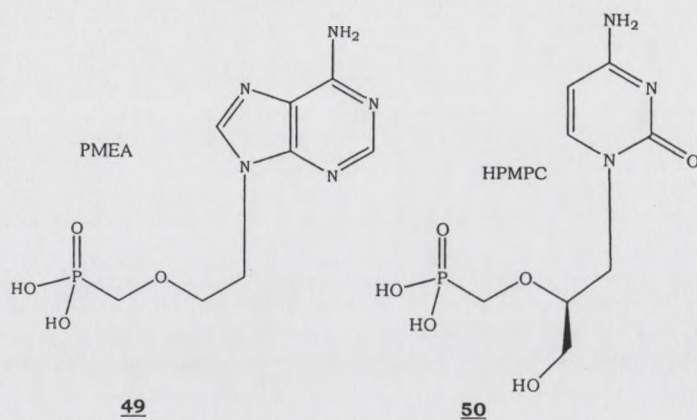
Mimo polepszenia aktywności analogów nukleozydów podawanych w ramach terapii kombinowanej problemem pozostaje nadal pierwszy etap ich fosforylacji. Niska efektywność tego etapu, prowadzącego do utworzenia 5'-monofosforanu nukleozydu, może ograniczać ich dalszy metabolizm do di- i trifosforanu, a tym samym obniżać efektywność terapeutyczną tej grupy związków.

Problemy z fosforylacją mogą wynikać: ze słabego powinowactwa analogów nukleozydów do komórkowych kinaz nukleozydowych (np. d4T czy ddU), katabolicznych reakcji enzymatycznych (np. wydłużony szlak metaboliczny ddA **17** przez jej deaminację do ddl) oraz zmniejszonego poziomu lub całkowitego braku enzymów fosforylujących.⁵⁵ W przypadku AZT trudności z fosforylacją występują w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej (np. monocyty/makrofagi) lub w komórkach, w których po długim podawaniu AZT doszło do spadku lub zaniku aktywności tego enzymu. Pojawienie się tego typu oporności (tzw. komórkowej lub farmakologicznej) jest wynikiem obniżenia ekspresji genu TK spowodowanej jego hipermetylacją.^{56,57}

Rozwiązaniem tego problemu może być wprowadzenie analogów nukleozydów do komórki już w postaci monofosforanu.

Jednymi z pierwszych nukleotydomowych analogów, zaproponowanymi przez Holyego i De Clercq⁵⁸, były fosfoniany acyklicznych nukleozydów m.in. (PMEA) **49** i HPMPC **50** (Ryc. 21) posiadające aktywność przeciwko retro- i herpeswirusom. Odznaczały się on jednak niską doustną przyswajalnością oraz małą stabilnością w mediach biologicznych.





Ryc. 21

Podobnie niekorzystne właściwości wykazują 5'-monofosforany analogów nukleozydów. Zwykle są one silnie kwasowe ($pK_a = 1-2$), stąd w warunkach fizjologicznych ($pH = 7,0-7,4$) występują jako aniony, co utrudnia ich przenikanie przez także ujemnie naładowaną lipidową błonę komórkową. Ponadto obecne we krwi i na powierzchni komórki fosfohydrolazy przekształcają je do odpowiednich nukleozydów. W 1961 r. J.A. Montgomery zaproponował rozwiązanie powyższych trudności przez utworzenie estrów nukleotydu, które będąc elektrycznie obojętne mogły przenikać błony komórkowe, a wewnątrz komórki ulegać metabolizmowi do 5'-fosforanów nukleozydów.⁵⁹

W podejściu zmierzającym do zaprojektowania aktywnego leku, zdolnego pokonać trudną wędrowkę w organizmie do miejsca jego przeznaczenia, istotną rolę odgrywa farmakokinetyka leku. Farmakokinetyka to, jak wspomniałam wcześniej, zachowanie leku w organizmie, jego absorpcja, metabolizm, dystrybucja i sposoby usuwania z organizmu. O skuteczności dotarcia związku do miejsca działania decydują przede wszystkim jego właściwości fizykochemiczne, m.in. trwałość chemiczna, odporność na przemiany metaboliczne, odpowiednio zrównoważony charakter hydrofilowo - lipofilowy oraz jonizacja.²⁰

Jednym ze sposobów optymalizacji farmakokinetyki leków, jest koncepcja proleków. Proleki to związki niewykazujące aktywności biologicznej, które w organizmie, po chemicznych i enzymatycznych przemianach, uwalniają aktywne związki wywołujące pożądany efekt farmakologiczny.^{20;26}

Projektowany prolek, aby dobrze spełniał swoją funkcję, winien spełniać kilka wymagań. Po podaniu doustnym powinien przetrwać silnie kwasowe środowisko żołądka a po dostaniu się do płynów ustrojowych, być stabilnym i odpornym na enzymy metaboliczne. W przeciwnym razie produkty jego rozkładu mogą być nieaktywne lub, co gorsze toksyczne. Dzięki odpowiedniej lipofilowości prolek powinien łatwo pokonywać błony komórkowe, a po wnikięciu do komórki ulegać

The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the war. It is followed by a detailed account of the military operations in the various theaters of war. The author then discusses the political and economic conditions of the belligerent nations and the impact of the war on the civilian population. The report concludes with a summary of the author's views on the future of the world and the role of the United States in the post-war era.

The author's analysis is based on a thorough study of the available sources and a personal observation of the war. He provides a clear and concise account of the events and offers valuable insights into the causes and consequences of the conflict. His report is a valuable contribution to the understanding of the First World War and its impact on the world.

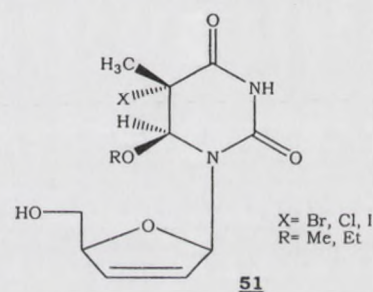
The report is well-organized and easy to read. It provides a comprehensive overview of the war and its various aspects. The author's writing is clear and concise, and his analysis is well-reasoned and balanced. His report is a valuable resource for anyone interested in the history of the First World War and its impact on the world.

The report is a valuable contribution to the understanding of the First World War and its impact on the world. It provides a clear and concise account of the events and offers valuable insights into the causes and consequences of the conflict. The author's analysis is based on a thorough study of the available sources and a personal observation of the war.

przemianom do aktywnego związku bez wytwarzania toksycznych produktów ubocznych. Szybkość uwalniania leku w komórce powinna być większa niż poza komórką i taka, aby umożliwiały stały i długotrwały poziom terapeutyczny leku w komórce. Odpowiednia szybkość uwalniania leku może maskować jego toksyczność i inne niepożądane właściwości, a także zapobiegać jego zbyt szybkiemu usuwaniu z ustroju.^{20;58}

Korzyściami w przypadku stosowania pochodnych analogów nukleozydowych jako proleków w terapii anty-HIV są m.in.: ułatwiony transport tych związków do limfocytów i przejście przez barierę krew/mózg, zredukowana toksyczność i zwiększony czas półtrwania w osoczu, co w rezultacie poprawia efektywność ich działania.²⁶

Wśród różnorodnych antywirusowych proleków analogów nukleozydów mały procent stanowią pochodne z modyfikacjami zasad heterocyklicznych np. 5-halogeno-6-alkoksy-5,6-dihydronukleozydy **51** (Ryc. 22). Związki te odznaczają się zwiększoną lipofilowością, co wg autorów ułatwia przechodzenie przez barierę krew/mózg i docieranie do dendrytów, które często bywają rezerwuarami wirusa HIV-1.^{60;61}



Ryc. 22

Większość proleków analogów nukleozydów to ich pochodne estrowe w pozycji 5'-OH, przy czym są to najczęściej estry karbocykliczne lub fosforanowe.

7.6.1. 5'-O-Estry karbocykliczne

Użyteczność tego typu proleków polega przede wszystkim na zwiększeniu lipofilowości dideoksynukleozydów oraz wydłużeniu ich połowicznego czasu życia ($t_{1/2}$) w osoczu. Korzyści te objawiają się jednak tylko przy odpowiednio dużej stabilności estrów w osoczu bogatym w esterazy oraz łatwości przekształcania ich do nukleozydów w zainfekowanych komórkach. Pamiętać jednak należy, że zwiększenie lipofilowości związków do optymalnego poziomu i dzięki temu ułatwione dotarcie ich do miejsca działania, może nieść z sobą zagrożenie zbyt wysokiego lokalnego stężenia leku a tym samym powodowanie zwiększonego efektu cytotoksycznego.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes the need for transparency and accountability in financial reporting.

Furthermore, it highlights the role of internal controls in preventing fraud and ensuring the integrity of the financial statements. The document also mentions the importance of regular audits and reviews.

In addition, the text discusses the impact of external factors such as market conditions and regulatory changes on the organization's financial performance. It suggests strategies to mitigate these risks and maintain financial stability.

The document also touches upon the importance of communication and collaboration between different departments. It stresses the need for clear reporting lines and regular updates on the organization's financial health.

Overall, the document provides a comprehensive overview of the financial management process. It serves as a guide for organizations looking to improve their financial reporting and internal controls.

The following sections will delve deeper into specific aspects of financial management, including budgeting, forecasting, and risk management. Each section will provide practical advice and examples to help organizations implement these concepts effectively.

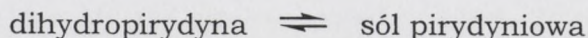
By following the guidelines outlined in this document, organizations can ensure that their financial reporting is accurate, transparent, and compliant with relevant regulations. This will help them build trust with stakeholders and achieve long-term financial success.

The document concludes by reiterating the importance of continuous improvement in financial management. It encourages organizations to regularly review their processes and make adjustments as needed to stay ahead of the competition.

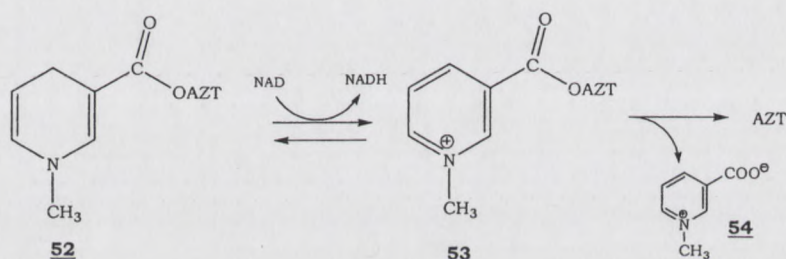
Finally, the document expresses the hope that the information provided will be helpful and informative. It invites readers to reach out if they have any questions or need further assistance.

a) 5'-O- [(1,4-Dihydro-1-metylo) nikotynian] 2',3'-dideoksynukleozydów

N. Bodor i współpracownicy⁶² zademonstrowali serię związków, które zostają specyficznym dostarczone do centralnego systemu nerwowego przy użyciu tzw. systemu redoks:



Biologicznie aktywne związki przyłączone do lipofilowego nośnika dihydropirydynowego **52** łatwo pokonują barierę krew/mózg. Powolne utlenianie nośnika do hydrofilowej soli pirydyniowej **53** w mózgu, zapobiega eliminacji tego typu związków z ogólnego obiegu. Następujące po tym odłączenie leku od nośnika pirydyniowego **54** zapewnia stały poziom leku w mózgu (Ryc. 23).



Ryc. 23

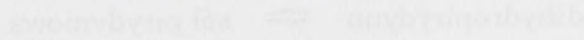
Powyższy system znalazł zastosowanie w dostarczaniu do komórek mózgu dideoksynukleozydów aktywnych przeciw HIV-1. S.K. Aggarwal²⁶ wskazał na nieznacznie większą aktywność antywirusową połączenia AZT z systemem redoks w porównaniu z samym nukleozydem, lecz znacznie dłuższy czas życia w osoczu i dwa razy większą zdolność wnikania ich do komórek H9.⁶³ Toksyczność AZT w systemie redoks jest w przybliżeniu o połowę mniejsza od samego AZT. Połączenia te są niestety, nawet w bezwodnych warunkach wysoce wrażliwe na utlenianie, co znacząco ogranicza ich zastosowanie w praktyce.

b) 5'-O-Mirystynianowe analogi 2',3'-dideoksynukleozydów

Dużą szansę na selektywne dostarczenie AZT do mózgu mogą mieć proleki bazujące na estrach wyższych kwasach tłuszczowych, co związane jest z lipofilową naturą tych kwasów. Zastosowanie niektórych kwasów tłuszczowych np. analogów kwasu mirystynowego (tetradekanowego) **55** wykazujących aktywność anti-HIV-1, umożliwia dostarczenie do komórki dwóch aktywnych związków- np. AZT i kwasu

W 5-0-11-4-Dihydro-1-metylo-2,3-dihydroksybenzodiazepin

W. Bodo i współpracownicy¹ zbadali syntezę i właściwości farmakologiczne i toksyczne 5-0-11-4-Dihydro-1-metylo-2,3-dihydroksybenzodiazepin. Wyniki badań przedstawiono w niniejszym artykule.



Badania farmakologiczne wykazały, że 5-0-11-4-Dihydro-1-metylo-2,3-dihydroksybenzodiazepin jest silnym przeciwdziałającym na układ nerwowy. W badaniach toksycznych stwierdzono, że 5-0-11-4-Dihydro-1-metylo-2,3-dihydroksybenzodiazepin jest silnie toksyczny dla zwierząt doświadczalnych. Wyniki badań przedstawiono w niniejszym artykule.



Fig. 2

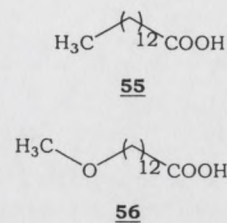
W niniejszym artykule przedstawiono wyniki badań farmakologicznych i toksycznych 5-0-11-4-Dihydro-1-metylo-2,3-dihydroksybenzodiazepin. Wyniki badań przedstawiono w niniejszym artykule.

5-0-11-4-Dihydro-1-metylo-2,3-dihydroksybenzodiazepin

W niniejszym artykule przedstawiono wyniki badań farmakologicznych i toksycznych 5-0-11-4-Dihydro-1-metylo-2,3-dihydroksybenzodiazepin. Wyniki badań przedstawiono w niniejszym artykule.

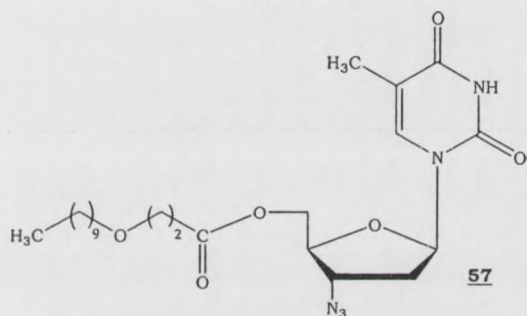
13-oksatetradekanowego **56** ($ID_{50} = 1-5 \mu M$, $CD_{50} = 80-190 \mu M$, komórki CEM ⁶⁴) (Ryc. 24).

Kwas 13-oksatetradekanowy **56**, podobnie jak mirystynowy **55** (Ryc. 24), włączany jest przy udziale N- mirystylotransferazy do poliproteiny Gag wirusa HIV-1 przez N-mirystylację jej reszty glicynowej, co konieczne jest w realizacji cyklu wirusowej replikacji. Obecność analogu kwasu mirystynowego **56** obniża jednak skuteczność proteolizy poliproteiny Gag a tym samym powstawanie nowych cząstek wirusa.^{64;65}



Ryc. 24

Kombinacja dwóch aktywnych związków w tego typu prolekach może dać podobne korzyści jak w podejściu „podwójnych leków” tj. zmniejszenie ryzyka pojawienia się lekooporności wirusa HIV-1 i zredukowanie toksyczności AZT. Potwierdzają to znacznie wyższe indeksy selektywności aktywności anti-HIV-1 estrów AZT szeregu analogów kwasu mirystynowego w porównaniu z samym AZT (dla związku **57** na ryc. 25, SI = 22500, dla AZT SI = 10000, komórki T4).⁶⁶



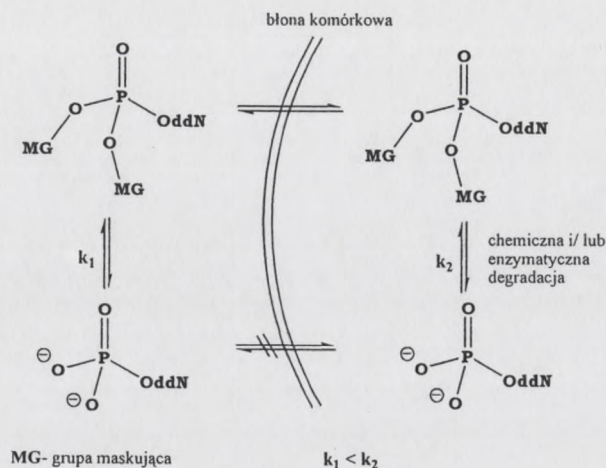
Ryc. 25

7.6.2. 5'-O-Estry fosforanowe nukleozydów

Zdecydowaną większość wśród proleków analogów nukleozydowych stanowią pochodne fosforanowe zaprojektowane głównie po to, by ominąć pierwszy, często kluczowy etap enzymatycznej fosforylacji ddN w komórce.

W związku z wysoką polarnością nukleotydydów przeprowadza się je, zgodnie z propozycją Montgomery'ego⁵⁹, w odpowiednie neutralne estry otrzymując tzw. nukleotydydowe proleki (Ryc. 26). Dobór grup maskujących na reszcie fosforanowej jest niezwykle istotny, gdyż wpływa na stabilność związków a to z kolei najczęściej decyduje o jego aktywności i farmakokinetyce.⁵⁵ W zależności od sposobu usuwania tych grup maskujących (chemicznego lub enzymatycznego) lub szybkości przekształcania proleku w lek wewnątrzkomórkowo **k₂** versus zewnątrzkomórkowo **k₁**, tego typu proleki mogą zgodnie z założeniem dostarczać do komórki nukleotydy (proleki te są wówczas pronukleotydami) lub mimo znaczącej aktywności antywirusowej jedynie nukleozydy (proleki te są wówczas pronukleozydami).

Faint, illegible text covering the majority of the page, likely bleed-through from the reverse side.



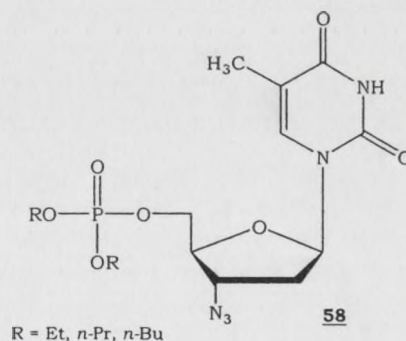
Ryc. 26

Przy dużej aktywności antywirusowej AZT problemem może być często rozstrzygnięcie czy dany prolek pochodnej AZT działa jako pronukleotyd czy pronukleozyd. Ustalenie tego możliwe jest po zbadaniu aktywności antywirusowej wybranego proleku w liniach komórkowych z deficytem kinazy tymidynowej (np. CEM/TK⁻). Jeśli badany związek w takich liniach komórkowych jest aktywny, to dowodzi, że jest on pronukleotydem. Innym sposobem jest przebadanie analogicznego proleku zawierającego 2',3'-dideoksyurydynę (ddU). Nukleozyd ten, w przeciwieństwie do jego trifosforanu ddUTP jest całkowicie nieaktywny w blokowaniu replikacji wirusa HIV, gdyż nie jest substratem dla kinaz komórkowych.⁵⁵

a) Fosforanotriestry analogów nukleozydów z chemicznie labilnymi grupami maskującymi

▪ Dialkylowe i diarylowe fosforanotriestry 2',3'-dideoksynukleozydów

Aktywność antywirusowa pronukleotydów jest ściśle uzależniona od zdolności uwalniania monofosforanu analogów nukleozydów w komórce. W przypadku prostych dialkylowych (Et, *n*-Pr, *n*-Bu) fosforanotriestrów **58** (Ryc. 27), na skutek nukleofilowego ataku cząsteczki wody na centrum fosforowe, powstaje odpowiedni fosforanodiester, który odporny jest na dalszą hydrolizę chemiczną i prawdopodobnie także enzymatyczną, stąd nie może być on przekształcony



R = Et, *n*-Pr, *n*-Bu

Ryc. 27

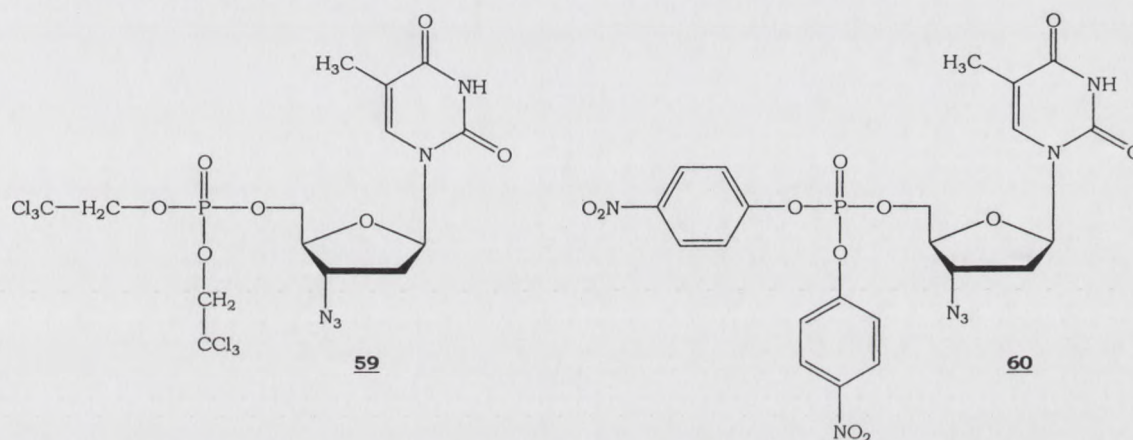
[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

w monofosforan nukleozydu i dalej w aktywny odpowiedni trifosforan.⁵⁵ Potwierdzeniem tego jest całkowity brak aktywności antywirusowej prostych alkilowych fosforanotriestrów AZT.⁶⁷

Nieznaczna aktywność przeciwko HIV-1 w porównaniu z AZT wykazują jej halogenoalkilowe fosforanotriestry np. 5'-O-bis(2,2,2-trichloroetylo)fosforan AZT **59** (Ryc. 28, $EC_{50} = 0,7\mu M$, dla AZT $EC_{50} = 0,004\mu M$, komórki C8166). Pojawienie się aktywności antywirusowej tych związków przypisywane jest zwiększonej labilności fosforanoestrowych grup alkilowych dzięki obecności atomów halogenu, co ułatwia ich hydrolizę do odpowiednich fosforanodi- i monoestrów.⁶⁸



Ryc. 28

Różny efekt antywirusowy w zależności od natury podstawnika w pierścieniu fenylowym widoczny jest w przypadku fosforanotriestrów diarylowych. Pochodne z podstawnikami silnie wyciągającymi elektrony, jak np. z grupą nitrową (związek **60**), wykazują porównywalną z AZT aktywność w komórkach C8166 ($EC_{50} = 0,0032\mu M$, dla AZT $EC_{50} = 0,008\mu M$). Może to być związane, podobnie jak w przypadku pochodnych halogenoalkilowych, z obecnością dobrej grupy odchodzącej (fenol o niskim pK_a) i podwyższoną labilnością wiązania P-O-aryl.⁶⁹ Okazuje się jednak, że związki te są nieaktywne w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej, co dowodzi, że są one pronukleozydami. Ponadto może to wskazywać, że zbyt labilne fosforanotriestry nie są dobrymi kandydatami na leki pronukleotydowe, gdyż zanim wnikną do komórki ulegają rozkładowi do odpowiednich nukleozydów.²⁶

▪ **Cyklosaligenianowe (cycloSal) fosforanotriestry 2',3'-dideoksynukleozydów**

W 1995 r. grupa C. Meiera zaprojektowała i otrzymała całkiem nowe triestrowe proleki 2',3'-dideoksynukleozydów bazujące na selektywnej, zależnej od pH chemicznej hydrolizie. Pochodne cyklosaligenianowe **61** odróżnia od wcześniej

1. Name of the witness: _____
2. Address: _____
3. Telephone: _____

4. Date of the incident: _____
5. Time of the incident: _____
6. Location of the incident: _____

7. Description of the incident: _____
8. Name of the person(s) involved: _____
9. Name of the person(s) who reported the incident: _____

10. Name of the person(s) who investigated the incident: _____

11. Name of the person(s) who interviewed the witness: _____

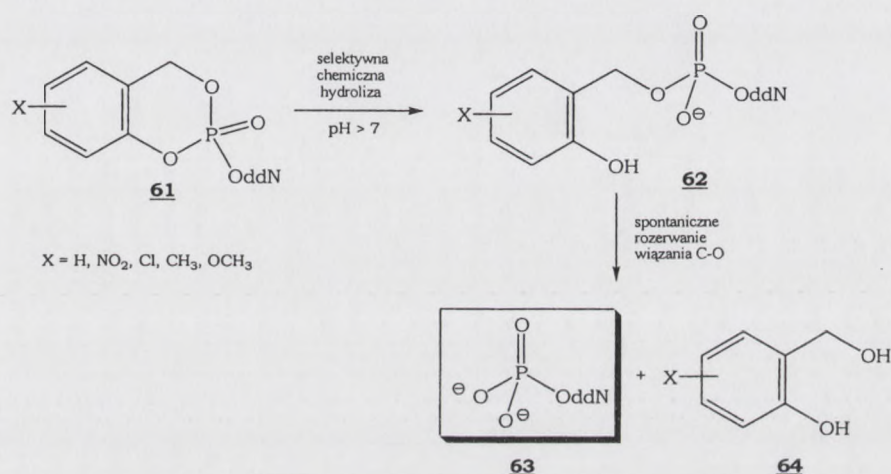
12. Name of the person(s) who interviewed the witness: _____
13. Name of the person(s) who interviewed the witness: _____

14. Name of the person(s) who interviewed the witness: _____
15. Name of the person(s) who interviewed the witness: _____

16. Name of the person(s) who interviewed the witness: _____
17. Name of the person(s) who interviewed the witness: _____

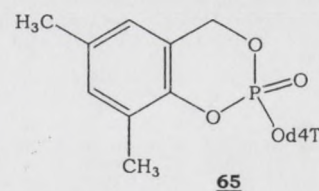
18. Name of the person(s) who interviewed the witness: _____
19. Name of the person(s) who interviewed the witness: _____

przedstawionych triestrów występowanie w ich cząsteczce dwóch różnych wiązań fosforoestrowych (ester benzyloowy i fenyloowy) wchodzących w skład sześciocząłowego pierścienia, wiązań benzylo- i fenylofosfoestrowych. Różnice w stabilności tych dwóch wiązań pozwalają na kontrolowaną, chemiczną degradację pochodnych *cycloSal*. Wiązanie fenyloestrowe jest bardziej labilne, więc pęka pierwsze z utworzeniem 2-hydroksybenzylofosforanodiestru **62**. W kolejnym etapie dochodzi do spontanicznego pęknięcia wiązania C-O w części benzylofosfoestrowej i powstania monofosforanu nukleozydu **63** i alkoholu salicylowego **64** (Ryc. 29).⁷⁰



Ryc. 29

Efektywność pochodnych saligenianowych analogów nukleozydów (ddT, d4T, ddA, AZT) została potwierdzona badaniami ich aktywności przeciw HIV oraz trwałości w mediach komórkowych. Większość *cycloSal* nukleotydu wykazuje nieznacznie większy lub porównywalny z nukleozydami potencjał antywirusowy w komórkach CEM/O. Istotne polepszenie aktywności obserwowano natomiast w przypadku cyklosaligenianowych pochodnych d4T w komórkach



Ryc. 30

CEM/TK⁻ (3,5-dimetylocycloSal d4TMP **65** ryc. 30, EC₅₀ = 0,08 μM, d4T EC₅₀ = 15 μM⁷¹) lecz, co zaskakujące, całkowity brak aktywności pochodnych AZT. Jak podają autorzy, może być to spowodowane różną komórkową absorpcją cyklosaligenianowych fosforanotriestrów d4T i AZT. Jednak do końca nie jest jasne, dlaczego ta jedna z ciekawszych propozycji dostarczania monofosforanów d4T i ddA do zainfekowanych komórek, całkowicie zawodzi w przypadku pochodnych AZT.⁷⁰

W niniejszym artykule przedstawiono wyniki badań nad właściwościami fizykochemicznymi i farmakologicznymi związków 1,2-dichloro-4,5-dihydro-1,4-benzodiazepin-3-ylu (DCL) i jego pochodnych. Wskazano na ich potencjalne zastosowanie w leczeniu zaburzeń snu i lęku. Wyniki badań farmakologicznych sugerują, że DCL i jego pochodne mogą działać jako leki przeciwlękowe i nasenne. Wskazano również na ich działanie przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe. Wyniki badań fizykochemicznych sugerują, że DCL i jego pochodne mogą być stosowane w syntezie nowych leków.



Fig. 1

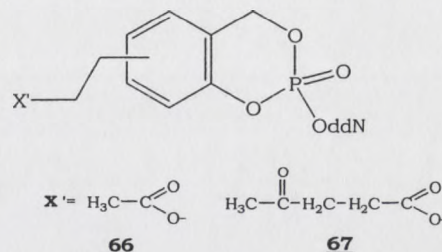
W niniejszym artykule przedstawiono wyniki badań nad właściwościami fizykochemicznymi i farmakologicznymi związków 1,2-dichloro-4,5-dihydro-1,4-benzodiazepin-3-ylu (DCL) i jego pochodnych. Wskazano na ich potencjalne zastosowanie w leczeniu zaburzeń snu i lęku. Wyniki badań farmakologicznych sugerują, że DCL i jego pochodne mogą działać jako leki przeciwlękowe i nasenne. Wskazano również na ich działanie przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe. Wyniki badań fizykochemicznych sugerują, że DCL i jego pochodne mogą być stosowane w syntezie nowych leków.



Fig. 2

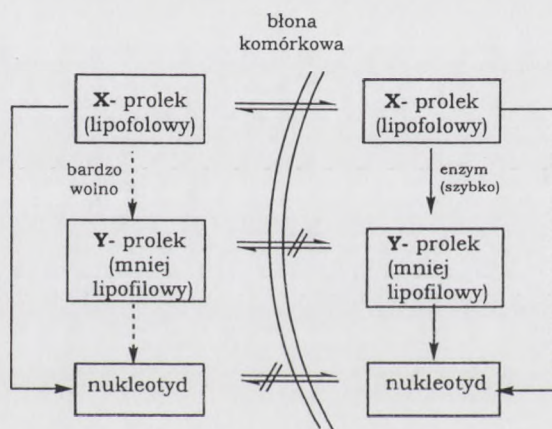
W niniejszym artykule przedstawiono wyniki badań nad właściwościami fizykochemicznymi i farmakologicznymi związków 1,2-dichloro-4,5-dihydro-1,4-benzodiazepin-3-ylu (DCL) i jego pochodnych. Wskazano na ich potencjalne zastosowanie w leczeniu zaburzeń snu i lęku. Wyniki badań farmakologicznych sugerują, że DCL i jego pochodne mogą działać jako leki przeciwlękowe i nasenne. Wskazano również na ich działanie przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe. Wyniki badań fizykochemicznych sugerują, że DCL i jego pochodne mogą być stosowane w syntezie nowych leków.

Dalsze ulepszanie struktury nukleotydowych pochodnych saligenianowych przez grupę C. Meiera zaowocowało tzw. drugą generacją tych pronukleotydów z enzymatycznie rozrywalną resztą estrów karbocyklicznych (octowego **66** i lewulinowego **67** ryc. 31). Usunięcie grupy estrowej przy udziale komórkowych



Ryc. 31

karboksyesteraz lub lipaz zmienia charakter proleku z bardziej lipofilowego na mniej lipofilowy, uniemożliwiając jego dyfuzję na zewnątrz komórki i tym samym zwiększając efektywność jego działania [koncepcja „zamkniętych wewnątrz” (z ang. „lock-in”) pochodnych *cycloSal*, ryc. 32].⁷²



Ryc. 32. Ogólna idea „zamkniętych wewnątrz” proleków

b) Analogi nukleozydów z fosforanotriestrowymi enzymatycznie labilnymi grupami maskującymi.

W tego typu fosforanotriestrach zastosowano takie grupy maskujące resztę fosforanową, które są łatwo usuwane enzymatycznie wewnątrz komórki, lecz stabilne poza nią. Wybór wśród takich biolabilnych grup jest raczej nieduży, co związane może być z faktem, że fosforanotriestry nie występują w naturze, stąd przyroda nie wytworzyła potrzebnych do ich metabolizmu „fosforanowych triesteraz”. Rozwiązaniem tego problemu może być umieszczenie grupy labilnej enzymatycznie w pewnej odległości od atomu fosforu. Po usunięciu takiej grupy powstały związek jest nadal biologicznie nieaktywny, lecz łatwo ulega dalszemu spontanicznemu rozkładowi dając aktywny lek. Podejście to nazywane jest koncepcją leku trzyczęściowego (Ryc. 33).^{55;73}

Declarant's Name

Address

City

State

County

Occupation

Relationship to Deceased

Signature

Date

Witness Name

Address

City

State

County

Occupation

Signature

Date

Witness Name

Address

City

State

County

Occupation

Signature

Date

Witness Name

Address

City

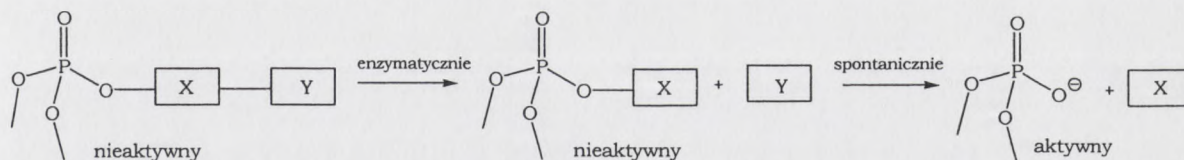
State

County

Occupation

Signature

Date

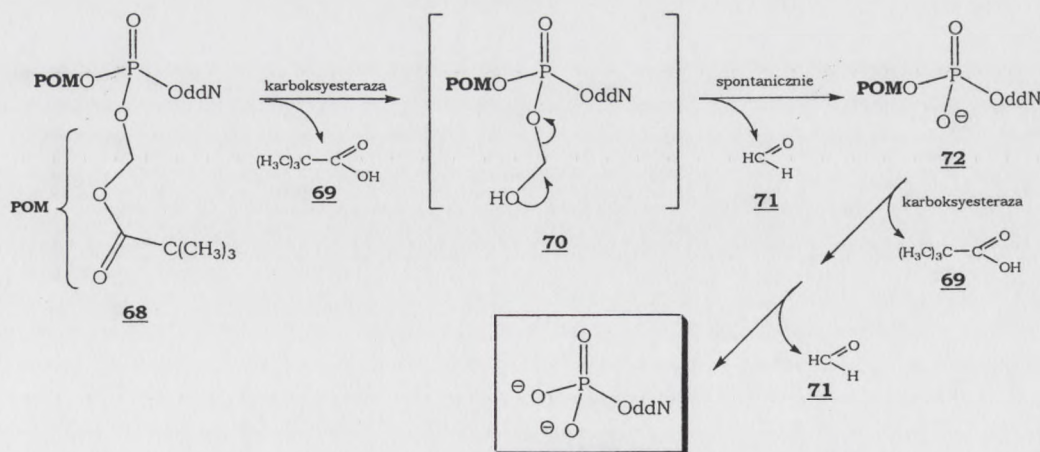


Ryc. 33

▪ **Bis(piwaloiloksymetylo) fosforanotriestry 2',3'-dideoksynukleozydów (POM)**

Po raz pierwszy koncepcję trzyczęściowych leków zastosował D. Farquhar⁷⁴, co opisał na przykładzie bis(piwaloiloksymetylo)fosforanotriestru 5-fluoro-2'-deoksyurydyny FdU **68** (ddN = FdU). Etapem inicjującym degradację tych związków jest usunięcie kwasu piwaloilowego **69** przy udziale karboksyesterazy i utworzenie wysoce reaktywnego hydroksymetylowego fosforanotriestru **70** (Ryc. 34). Z triestru tego spontanicznie eliminowany zostaje formaldehyd **71** dając fosforanodiester (POM) **72**. Do otrzymania wolnego nukleotydu konieczne jest powtórzenie dwóch wcześniejszych etapów, lecz tym razem zachodzących na ujemnie naładowanym fosfodiestrze **72**, gorszym substracie dla karboksyesterazy.

Podejście to zostało z powodzeniem użyte do generowania w komórce monofosforanu, m.in. ddU i AZT (bardziej aktywne niż nukleozydy w komórkach CEM/TK⁻). Problemem przy stosowaniu bis(piwaloiloksymetylo) fosforanotriestrów są toksyczne produkty uboczne - formaldehyd **71** i kwas piwaloilowy **69**, a także mała stabilność tego typu proleków w osoczu.^{55;59}



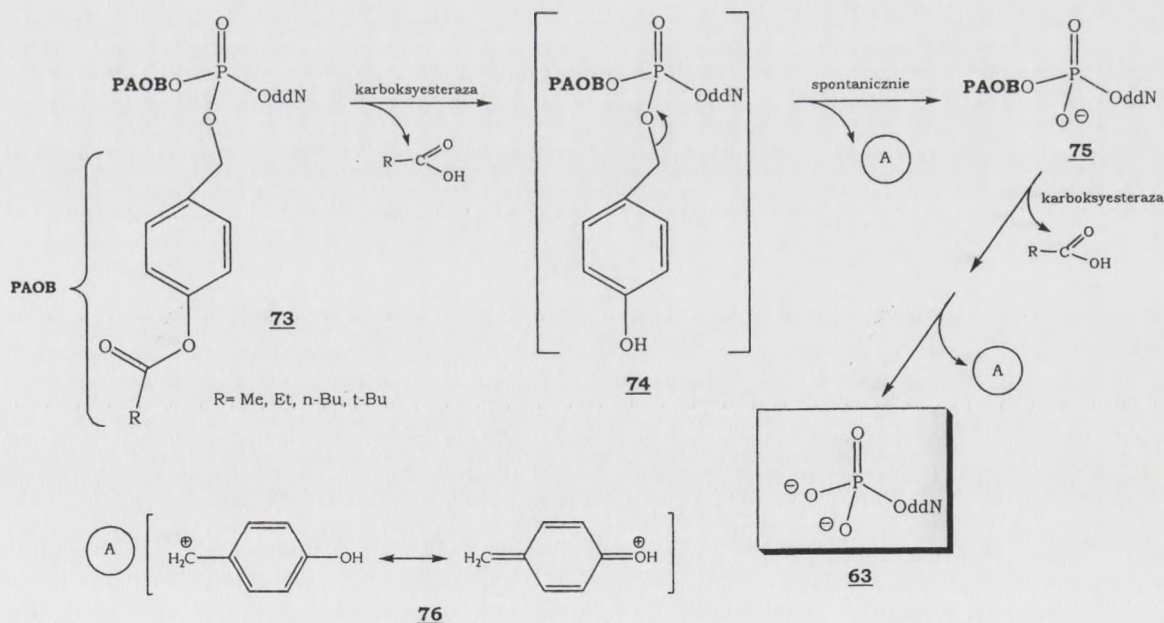
Ryc. 34

▪ Bis(*p*-acyloksybenzylo) fosforanotriestry 2',3'-dideoksynukleozydów (PAOB)

S. Freeman⁷⁵ zaproponował korzystne zwiększenie odległości między ujemnie naładowanym fosforanodiestrem a miejscem hydrolizy enzymatycznej podczas drugiego etapu degradacji trzyczęściowych leków.⁵⁵

W otrzymanych bis(*para*-acyloksybenzylo)nukleotydach **73** (Ryc. 35), wg obliczeń S. Freemana, odległość około 4Å między anionem fosforanowym a resztą karboksyestrową jest wystarczająca do usunięcia niekorzystnych elektrostatycznych oddziaływań między nimi.

Mechanizm degradacji bis(acyloksybenzylowych) pochodnych **73** jest analogiczny do bis (POM) fosforanotriestrów **68**. Po enzymatycznej hydrolizie części estrowej w pierścieniu aromatycznym powstaje niestabilny *p*-hydroksybenzylofosfotriester **74**, który spontanicznie generuje (*p*-acetyloksybenzylo)fosfodiester **75** i kation 4-hydroksybenzylowy **76**. Jon ten może, co niekorzystne, wchodzić w reakcję z DNA, białkami lub innymi komórkowymi nukleofilami.⁵⁹ Fosforanodiester **75** po ponownej enzymatycznej hydrolizie estru karboksylowego i uwolnieniu kationu **76** tworzy pożądany monofosforan nukleozydowy **63** (Ryc. 35).



Ryc. 35

Właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne 2,2-dichloro-1,1-difluoro-4,4-difenylopropanu

1. Wstęp. W niniejszym artykule przedstawiono wyniki badań nad właściwościami fizykochemicznymi i farmakologicznymi 2,2-dichloro-1,1-difluoro-4,4-difenylopropanu (DDP).

2. Materiały i metody. Do badań użyto czystego DDP otrzymanego metodą Friedel-Craftsa. Do pomiarów właściwości fizykochemicznych zastosowano standardowe metody.

3. Wyniki i omówienie. DDP jest substancją białą, krystaliczną, rozpuszczalną w wielu rozpuszczalnikach organicznych. Jego właściwości fizykochemiczne są następujące:

Temperatura topnienia: 102°C; Ciężar atomowy: 332,17; Ciężar cząsteczkowy: 332,17; Gęstość: 1,28 g/cm³; Indeks załamania światła: 1,51; Współczynnik załamania światła: 1,51.

4. Wnioski. Wyniki badań wskazują na to, że DDP jest substancją o właściwościach fizykochemicznych i farmakologicznych, które mogą być wykorzystane w przemyśle farmaceutycznym.

5. Bibliografia. 1. J. Kowalski, Właściwości fizykochemiczne i farmakologiczne DDP, Prace Naukowe, 1980, t. 10, s. 1-10.

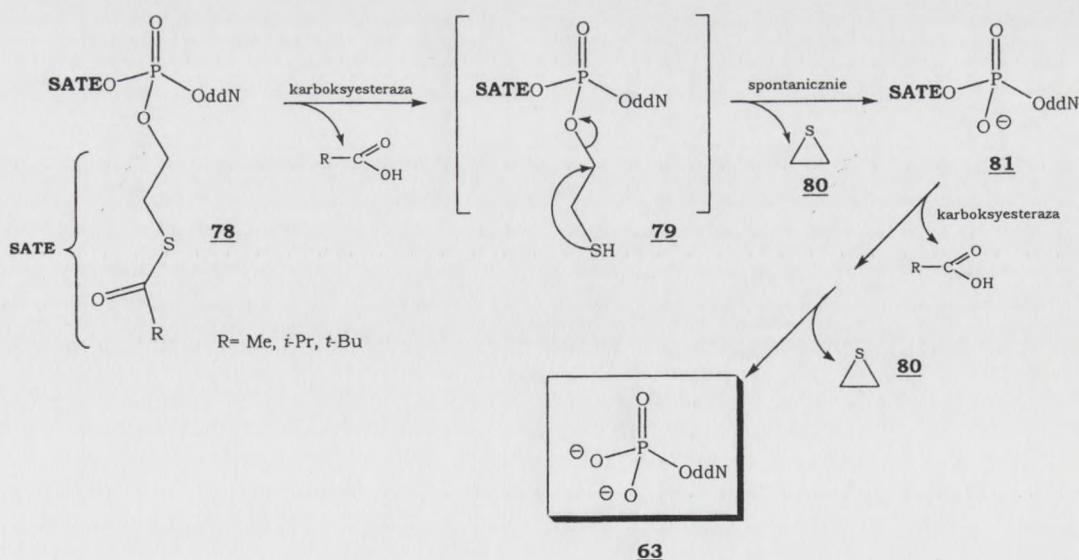


Pochodne bis(PAOB) AZT a także mono(PAOB) dla homodimerów AZT i heterodimerów AZT i ddI wykazują aktywność anti-HIV-1 w komórkach C8166 większą niż odpowiednie nukleozydy, natomiast mniejszą w komórkach JM z deficytem kinazy tymidynowej.⁷⁶

▪ **Bis(S-acylo-2-tioetylo) fosforanotriestry 2',3'-dideoksynukleozydów (SATE)**

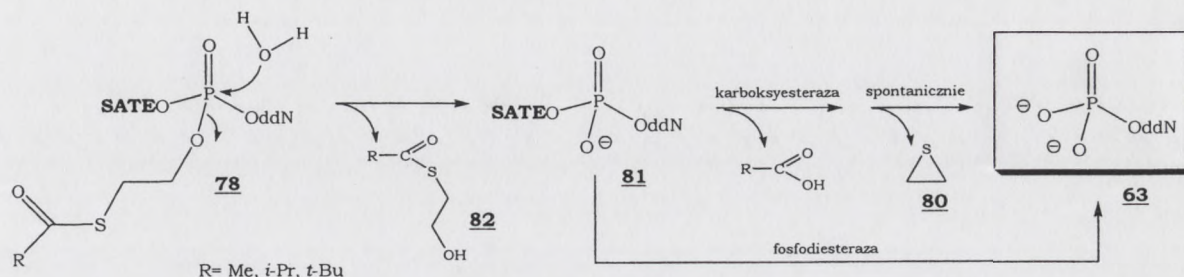
Kolejne podejście bazujące na wewnątrzcząsteczkowej eliminacji w cząsteczce pronukleotydów obejmuje pochodne tioetanolowe. W 1993 r. J.-L. Imbach i G. Gosselin⁵⁹ po raz pierwszy opisali i przebadali bis(S-acylo-2-tioetylo) fosforanotriestry analogów nukleozydów **78** (Ryc. 36), które wykazują większą aktywność przeciwko wirusowi HIV-1 niż odpowiednie nukleozydy w komórkach CEM-SS, MT-4 jak również CEM/TK⁻.

Generowanie 5'-monofosforanów nukleozydów **63** z pochodnych SATE odbywa się na drodze zbliżonej do ścieżki degradacji wcześniej omówionych fosforanotriestrów typu **73**. Po karboksyesterazowej aktywacji bis (SATE) fosforanotriestru **78** nukleozydu tworzy się niestabilny O-2-merkaptioetylo fosforanotriester **79**. Powstały tiol jako „miękki” nukleofil atakuje „miękkie” centrum elektrofilowe tj. atom węgla α (a nie „twardy” atom fosforu), uwalniając episiarczek **80** oraz mono(SATE) fosforanodiester **81**. Powtórzenie tego samego cyklu reakcji na związku **81** prowadzi do 5'-monofosforanu nukleozydu **63** (Ryc. 36).⁵⁹



Ryc. 36

Inny prawdopodobny mechanizm hydrolizy bis (SATE) fosforanotriestrów zaproponowany przez J.-L. Imbacha⁷⁷ zakłada bezpośredni atak nukleofilowy cząsteczki wody na atom fosforu z uwolnieniem *S*-acylo-2-tioetanolu **82** (Ryc. 37).

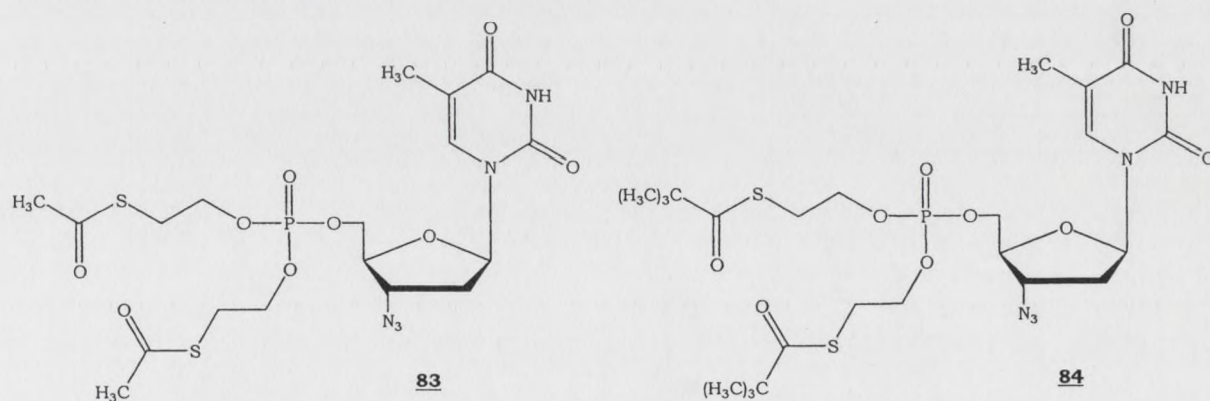


Ryc. 37

Fosforanotriester bis SATE ddA jest 1000 razy bardziej aktywny niż sama ddA, a aktywność ta zbliżona jest do EC₅₀ najbardziej aktywnego przeciw HIV-1 analogu nukleozydu czyli AZT.²⁴

Bis (SATE) fosforanotriestry d4T okazały się aktywne w zwalczaniu wirusa HIV-1 w komórkach MT-4, CEM-SS a także w tych z deficytem kinazy tymidynowej. W przypadku pochodnych AZT lepszą aktywność niż dla samego AZT zanotowano tylko w komórkach CEM/TK⁻.⁷⁷

Stabilność bis(SATE) fosforanotriestrów AZT, jak i innych analogów nukleozydów, silnie zależy od rodzaju reszty tioestrowej. Bis (Me-SATE) **83** (Ryc. 38) pochodne AZT wykazały wysoką aktywność *ex vivo*, lecz są zbyt nietrwałe w medium hodowlanym, co czyni wątpliwym, że wnikną niezmienione w dostatecznej ilości do zainfekowanych komórek. Stąd najbardziej optymalnym związkiem jest bis (SATE) fosforanotriester AZT mający dwa łańcuchy *S*-piwaloilo-2-tioetylowe **84** (Ryc. 38), ponieważ wysoka lipofilowość i zawada steryczna reszty *tert*-butylowej zapobiega zbyt szybkiemu usunięciu tej grupy maskującej a przez to niepożądanemu rozkładowi związku **84** w medium hodowlanym.^{55;77;78}



Ryc. 38

... (mirrored text from the reverse side of the page)



Fig. 1

... (mirrored text from the reverse side of the page)

... (mirrored text from the reverse side of the page)

... (mirrored text from the reverse side of the page)

... (mirrored text from the reverse side of the page)

... (mirrored text from the reverse side of the page)

... (mirrored text from the reverse side of the page)

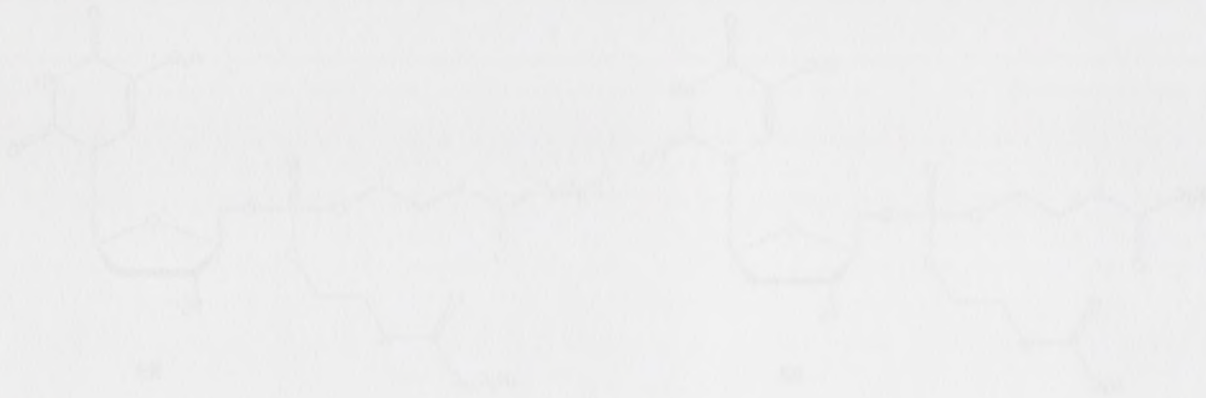


Fig. 2

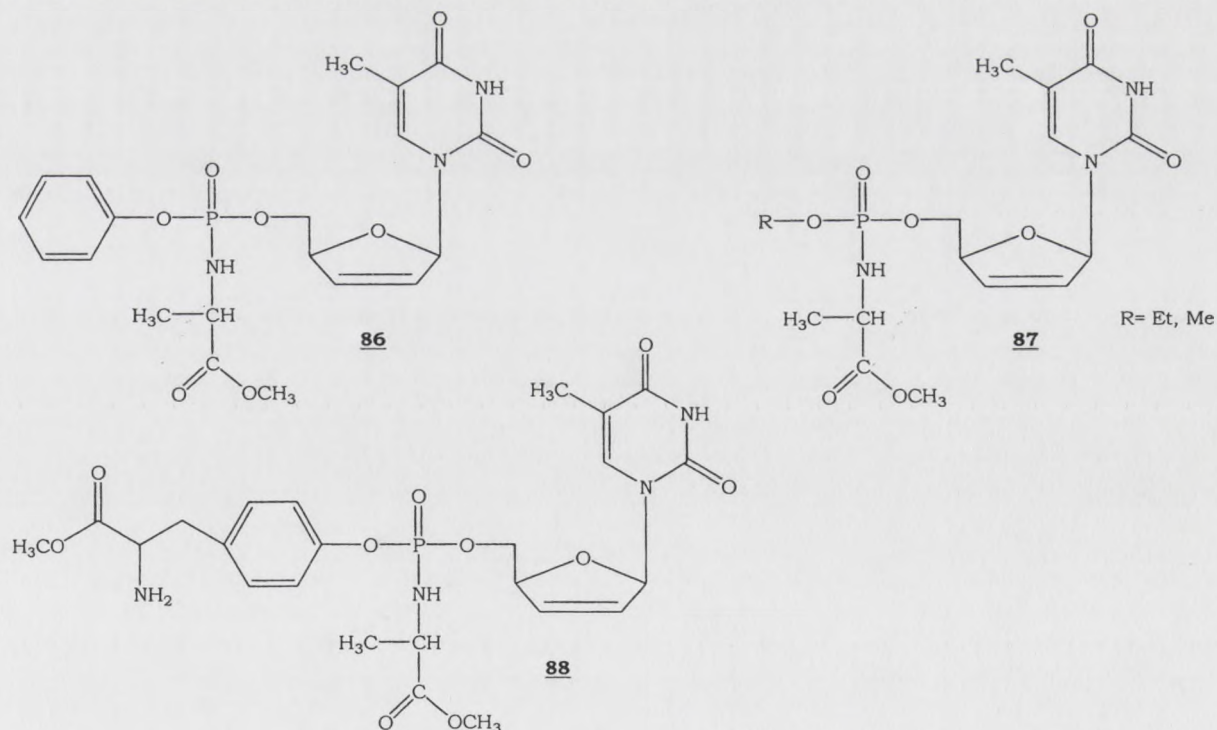
▪ Aryloamidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów

Inną klasą związków z enzymatycznie labilnymi grupami maskującymi ładunek ujemny na atomie fosforu, są proponowane przez C. McGuigana⁷⁹ antywirusowe proleki, będące kombinacją estrów arylowych i aminokwasowych amidofosforanów.

Aktywność przeciwko wirusowi HIV tego typu pochodnych uzależniona jest od analogu nukleozydu, rodzaju aminokwasu oraz estru w części aminokwasowej.

Koncepcja aryloamidofosforanów **85** (Ryc. 40) jako proleków została zastosowana dla większości analogów nukleozydów (AZT, 3TC, ddA, d4A oraz ABC), jednak najbardziej skuteczna okazała się w przypadku pochodnych d4T.

Intensywne badania prowadzone przez grupę McGuigana nad różnymi aryloamidofosforanowymi pochodnymi pozwoliły ustalić strukturę liderową, w której część fosforanowa połączona jest wiązaniem estrowym z nukleozydem i fenylem oraz wiązaniem amidowym z estrem metylowym aminokwasu (najczęściej alanina). Taki feniloamidofosforan d4T **86** (Ryc. 39) charakteryzuje się 4-10 razy większą aktywnością antywirusową niż d4T w komórkach MT-4, CEM/0 i M/M (monocyty/makrofagi), około 5 razy mniejszą toksycznością oraz do 400 razy większą aktywnością w CEM/TK⁻.^{22;80} Zamiana grupy fenylowej na etylową lub metylową **87** (Ryc. 39) w tej pochodnej powoduje duży spadek aktywności (aktywność 1000 razy mniejsza niż dla pochodnej z grupą fenylową).⁸⁰



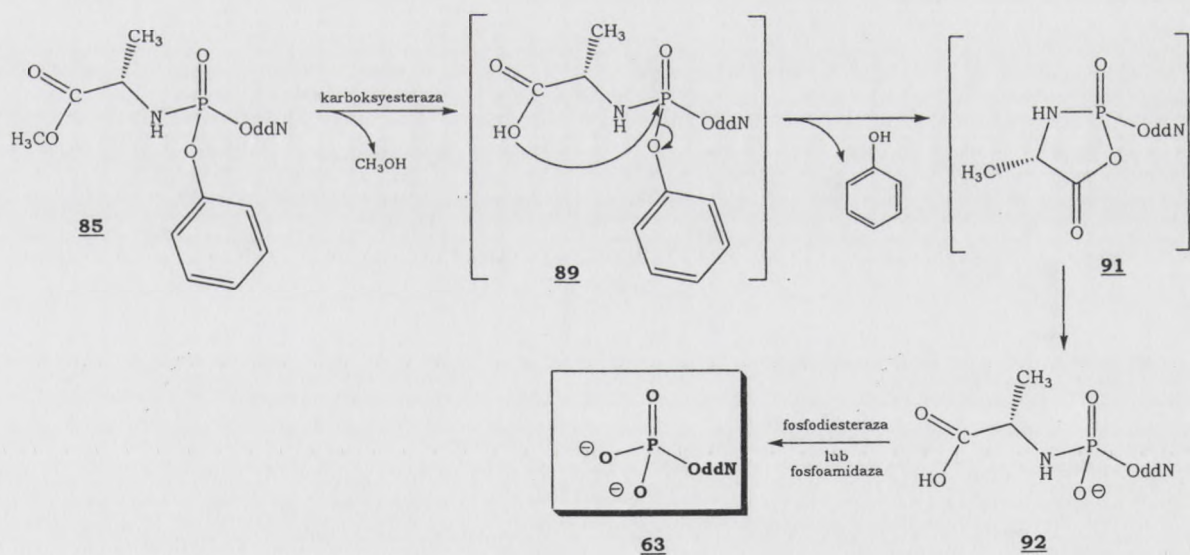
Ryc. 39



Szczególnie ważna dla aktywności biologicznej okazała się obecność estru α -aminokwasowego. Zastosowanie w jego miejsce prostej, alkilowej grupy aminowej lub estru β -aminokwasowego wywołuje całkowity zanik aktywności antywirusowej. Z kolei 30-krotny spadek aktywności obserwuje się w przypadku użycia amidu D-alaniny zamiast L-alaniny.⁵⁵

Próba polepszenia istotnej właściwości potencjalnego proleku, jego rozpuszczalności w wodzie, przez zastąpienie grupy fenylowej resztą tyrozynową **88** (Ryc. 39), również zakończyła się zmniejszeniem aktywności antywirusowej ($EC_{50} = 0,8 \mu M$, z grupą fenylową $EC_{50} = 0,075 \mu M$ w komórkach CEM/TK⁻, HIV-2).⁸¹

Czynniki decydujące o aktywności pochodnych aryloamidofosforanowych **85** związane są głównie z mechanizmem ich degradacji (Ryc. 40). Po pierwszym etapie hydrolizy estru aminokwasowego przy udziale karboksyesterazy, wygenerowana zostaje wolna, nukleofilowa grupa karboksylowa **89**, która następnie atakuje elektrofilowy atom fosforu, uwalniając fenol. Powstały nietrwały, cykliczny produkt przejściowy **91** jest szybko hydrolizowany do amidofosforanowego monoestru **92**. Otrzymanie wolnego monofosforanu analogu nukleozydu **63** nie jest całkowicie wyjaśnione, ale przypuszcza się, że rozerwanie wiązania P-N następuje z udziałem specyficznej komórkowej fosfodiesterazy⁵⁹ lub fosfoamidazy.⁷⁹



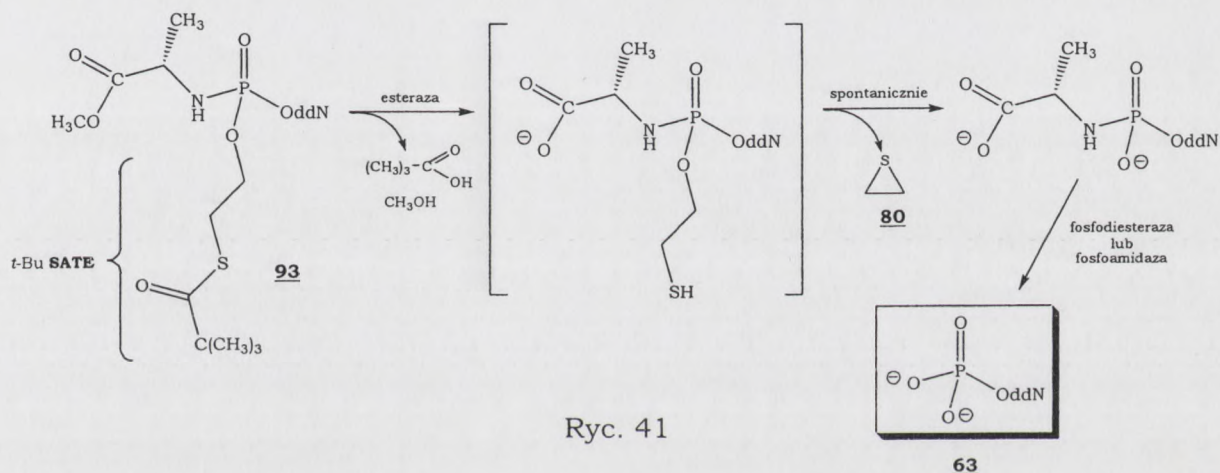
Ryc. 40

Dokładna analiza metabolizmu fenyloamidofosforanowych pochodnych AZT po ich inkubacji w enzymach z wątroby szczura wykazała wolniejsze i mniej wydajne ich przekształcanie do AZTMP w porównaniu z pochodnymi d4T. Powstały AZTMP był z kolei o wiele szybciej metabolizowany do wolnego nukleozydu niż d4TMP, co wg autorów może tłumaczyć, dlaczego aryloamidofosforany AZT mają znacznie

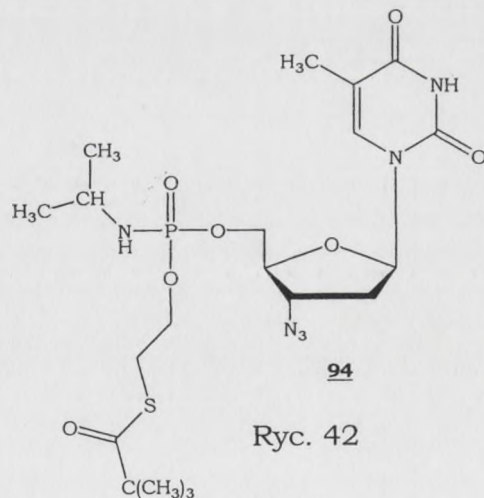


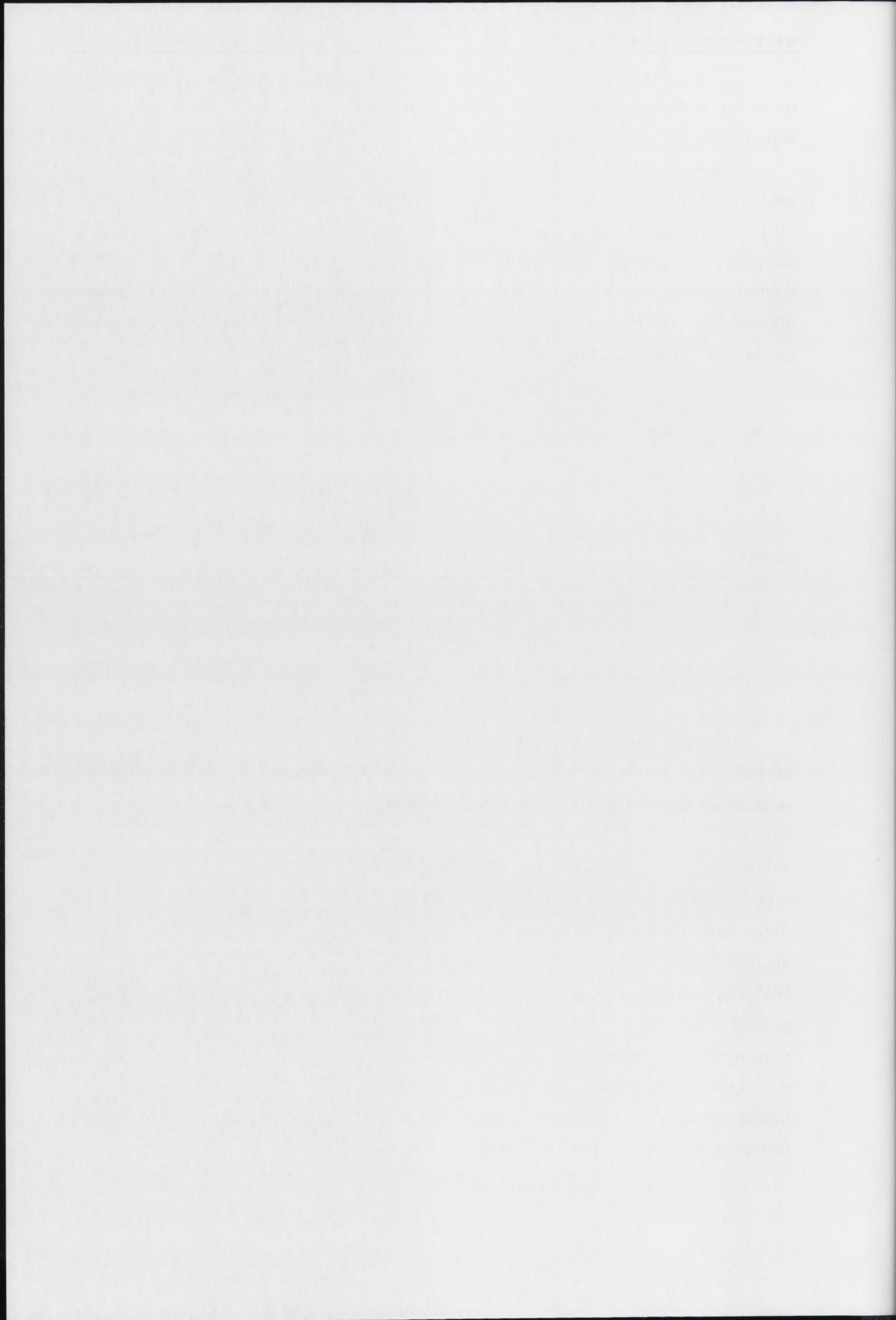
mniejszą zdolność hamowania replikacji wirusa HIV w komórkach CEM/TK⁻ w porównaniu z pochodnymi d4T.⁷⁹

Niedawno grupa C. Perigauda i J.-L. Imbacha^{82;83} opisała nową serię pochodnych diestrów amidofosforanowych, w których miejsce grupy arylowej zajęła grupa S-piwaloilo-2-tioetylowa czyli *t*-Bu SATE **93** (Ryc. 41). Zaletą tego typu związków w porównaniu z amidofosforanami C. McGuigana **85** (Ryc. 40), jest dostarczenie 5'-mononukleotydowych pochodnych **63** na prostszej drodze obejmującej: aktywację esterazą, spontaniczne usunięcie episiarczku **80** oraz działanie fosfoamidazy lub fosfodiesterazy (Ryc. 41).



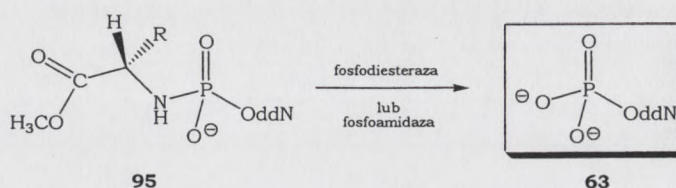
Większość amidofosforanów AZT z grupą SATE i różnymi alifatycznymi lub aromatycznymi resztami aminowymi wykazuje znaczący efekt antywirusowy w zakresie stężeń mikromolowych w komórkach CEM/TK⁻. Co interesujące, największą aktywność wykazywała pochodna z podstawnikiem izopropylaminowym **94** (Ryc. 42), więc obecność α -aminokwasu nie jest strukturalnym wymogiem dla aktywności anty-HIV. Wg autorów dalsze modyfikacje chemiczne w części amidowej bądź w grupie SATE dają możliwość otrzymania pronukleotydów o odpowiedniej rozpuszczalności w wodzie, lipofilowości i stabilności enzymatycznej, co jest istotne w badaniach farmakologicznych *ex vivo* i *in vivo* nad tymi związkami.^{82;83}





▪ Amidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów

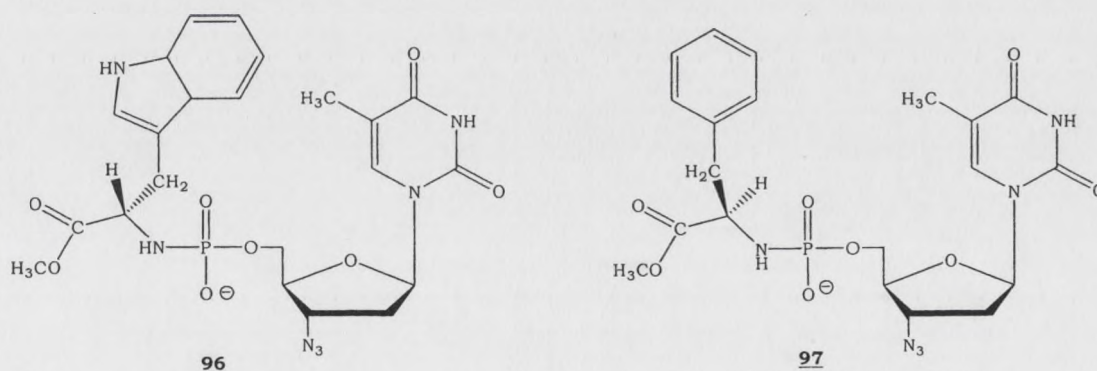
Wyniki badań G. Molemy⁸⁴ nad potencjalnymi inhibitorami namnażania wirusa HIV-1 w limfocytach T tj. składających się z albuminy z ludzkiej surowicy krwi przyłączonej przez lizyny do AZTMP, zachęciły grupę R. Wagnera⁵⁵ do otrzymania amidofosforanowych monoestrów **95** (Ryc. 43) jako ewentualnych pronukleotydów.



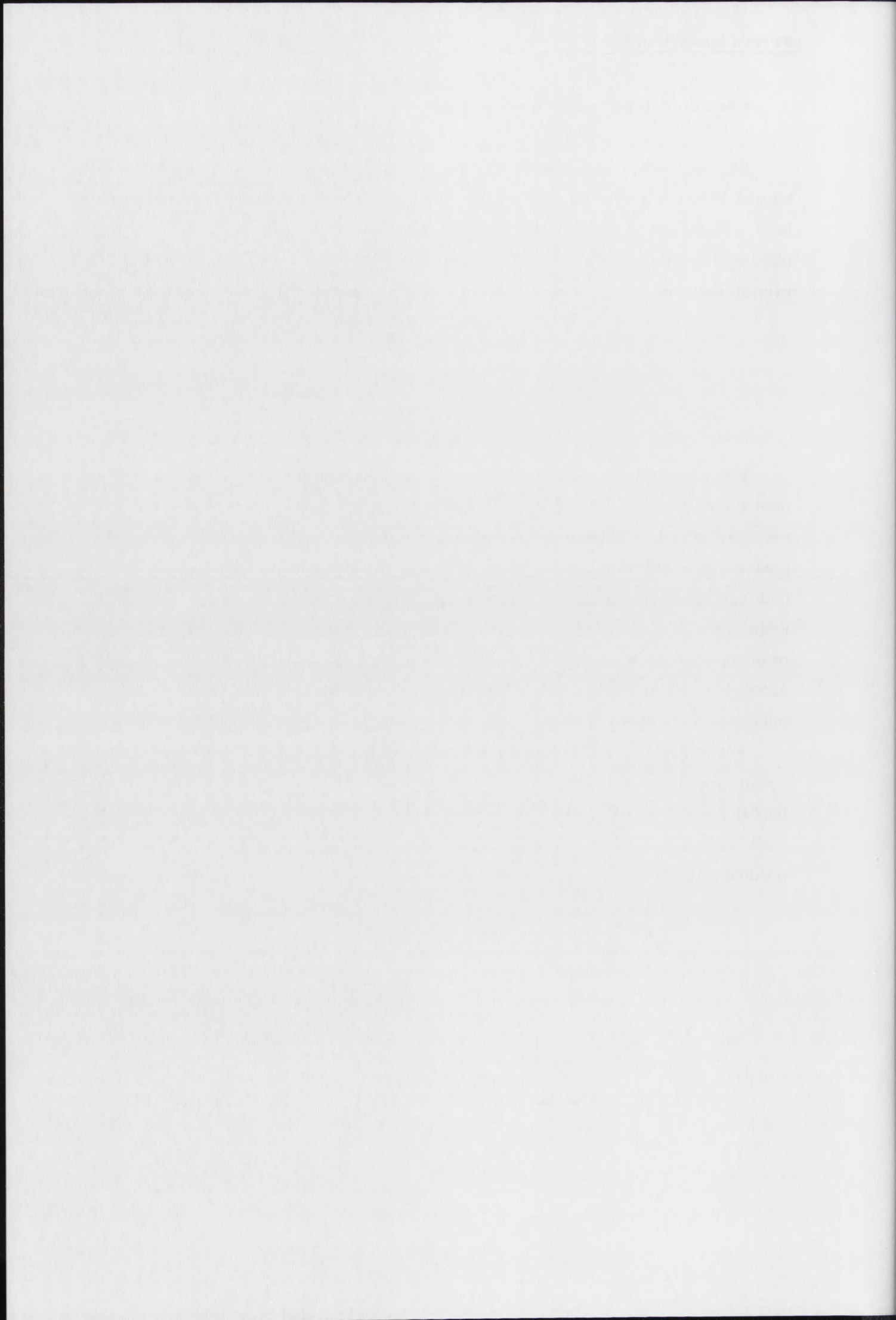
Ryc. 43

Estry metylowe aminokwasowych amidofosforanów AZT i 3'-fluoro-3'-deoksytymidyny (FLT) okazały się związkami aktywnymi przeciw wirusowi HIV, nietoksycznymi, trwałymi w ludzkiej krwi i rozpuszczalnymi w wodzie. Mimo posiadanego ładunku, jak podają autorzy, wnikają do komórek CEM i PBMC (jednojądrzaste komórki krwi obwodowej) i są tam przekształcane do odpowiednich fosforanów. Wcześniejsze powstawanie monofosforanów analogów nukleozydów jest prawdopodobnie wynikiem enzymatycznego procesu przy udziale być może tego samego enzymu, który degraduje związek przejściowy we wspomnianym już podejściu McGuigana.^{55;59}

Pochodne AZT z grupa L-tryptofanową **96** lub D-feniloalaninową **97** (Ryc. 44) wydają się być najbardziej aktywnymi zarówno w PBMC jak i w CEM, lecz nie bardziej niż sam AZT, choć we wcześniejszych pracach grupa Wagnera donosiła o ich znacznie większej zdolności do hamowania replikacji wirusa HIV od samego nukleozydu.^{85;86}



Ryc. 44

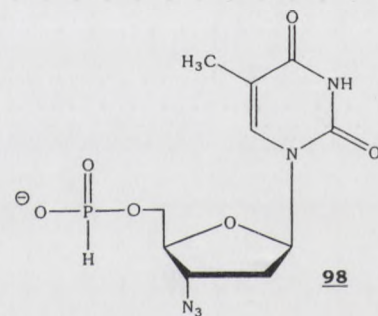


Nie zostały wykonane badania nad aktywnością tych związków w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej, lecz jedynie we wspomnianych komórkach PBMC. Według Wagnera komórki te posiadają tylko około 5% aktywności kinazy tymidynowej, lecz wykazana w nich aktywność antywirusowa amidofosforanów 2',3'-dideoksynukleozydów, w moim przekonaniu, nie do końca potwierdza, iż działają one jako pronukleotydy.⁵⁹

▪ Pochodne H-fosfonianowe 2',3'-dideoksynukleozydów

H-Fosfoniany nukleozydów, używane głównie w syntezie oligonukleotydów, dzięki swojemu strukturalnemu podobieństwu do monofosforanów, były również badane jako potencjalne związki antywirusowe.

H-Fosfonian AZT **98** (Ryc. 45), po zatwierdzeniu w 1999 r. przez Rosyjskie Ministerstwo Zdrowia pod nazwą Nicavir®, podawany jest w Rosji pacjentom chorym na AIDS. A.V. Kravczenko⁸⁷ wykazał ostatnio, że stosowanie tego leku wraz z ddl **4** i newirapiną **27** jest rekomendowane w Rosji jako efektywna i bezpieczna terapia kombinowana przeciwko wirusowi HIV. Jako główne zalety H-fosfonianu AZT (P_HAZT) wymienia się jego mniejszą toksyczność oraz dłuższy czas życia w osoczu w porównaniu z AZT. O mniejszej toksyczności H-fosfonianu AZT i porównywalnej lub wyższej od AZT aktywności anty-HIV w komórkach MT-4 donosiła grupa Krayevskyego (EC₅₀ = 0,072 μM, CC₅₀ = 2500 μM, dla AZT EC₅₀ = 0,005 μM, CC₅₀ = 210 μM). Zwiększony współczynnik selektywności obserwuje się także dla H-fosfonianu 3'-fluoro-2',3'-dideoksytymidyny (FLT), natomiast mniejszy dla pochodnych ddC i ddT.^{88;89}



Ryc. 45

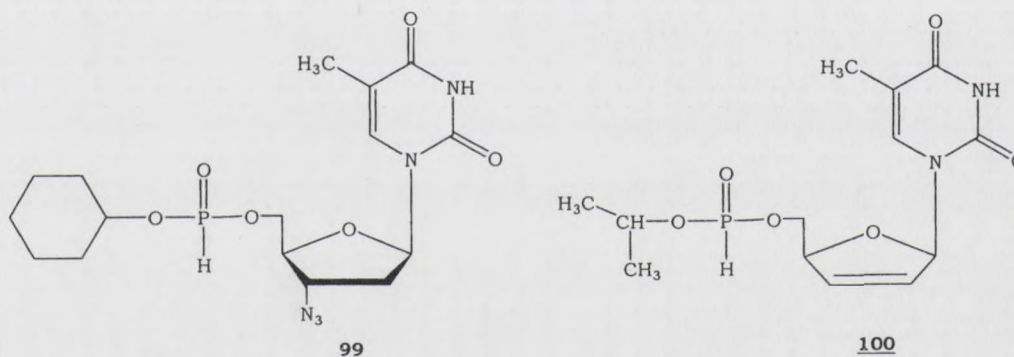
Wg wyników J.L. Imbacha⁹⁰ H-fosfonian AZT w komórkach MT-4 oraz CEM-SS oraz CEM-X174 wykazuje aktywność anty-HIV, jednak indeks selektywności dla tego związku jest zawsze niższy niż dla AZT. Ponadto w tej samej pracy autorzy donoszą o całkowitym braku właściwości antywirusowych H-fosfonianu AZT w komórkach CEM/TK⁻, co dowodzi, że w komórce z tego związku nie powstaje monofosforan AZT.

Z kolei w najnowszej pracy M. Kukhanowej⁸⁷ (z grupy Krayevskyego) nie wyklucza ona możliwości utleniania H-fosfonianu do fosforanu AZT, czego potwierdzeniem miałyby być powstawanie w przeważającej ilości AZTMP po inkubacji radioaktywnego H-fosfonianu AZT w RPMI-1640 z surowicą z płodów



bydłych (FCS). Wyniki te byłyby zgodne z tezą H.J. Boala⁹¹ o przekształcaniu w komórce H-fosfonianu AZT wyłącznie do AZTMP. Boal uzasadnia to trwałością P_HAZT w medium komórkowym RPMI-1640 (niestety wyniki potwierdzające to nie zostały w tej pracy opublikowane), brakiem AZT po przedłużonej inkubacji P_HAZT z 5'-nukleotydazą (również wyniki nieprzedstawione w pracy) oraz w komórkach U937. W tych ostatnich warunkach po 8 h obserwowano jedynie powstawanie AZTMP w ilości 3 razy mniejszej niż po tym samym czasie inkubacji samego AZT, co miało potwierdzać możliwość utlenienia H-fosfonianu AZT.

Dalsze badania wspomnianej Kukhanow⁸⁷ nad metabolizmem P_HAZT w ekstrakcie z komórek HL-6 i homogenacie z mysiej wątroby skłaniają autorkę do przyznania, że głównym metabolitem H-fosfonianu AZT jest sam nukleozyd. Sugeruje ona również, że przyczyną zmniejszenia toksyczności H-fosfonianu AZT w porównaniu z AZT jest mniejsze komórkowe stężenie AZTMP, wynikające ze stopniowego uwalniania i fosforylacji nukleozydu pochodzącego z degradacji H-fosfonianu.



Ryc. 46

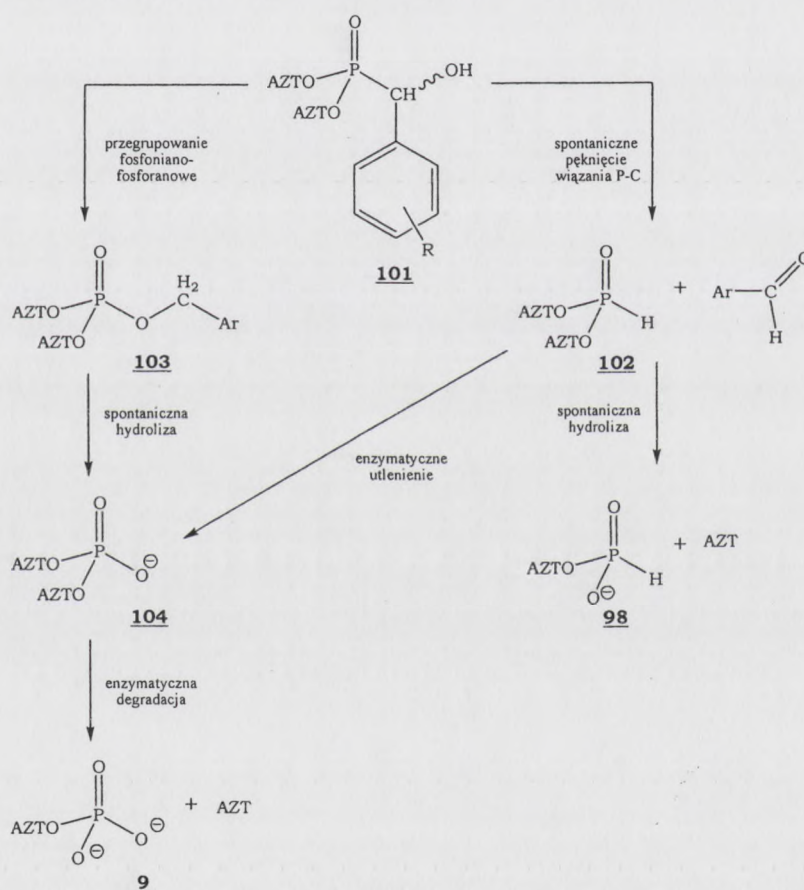
Rolę pronukleozydów pełnią również H-fosfonianowe diestry – pochodne AZT i d4T. Związki te wykazują aktywność anty-HIV w komórkach MT-4 i C8166, przy czym największy współczynnik selektywności posiada cykloheksylofosfonian AZT **99** (Ryc. 46, SI = 50417, dla AZT SI = 2671) oraz izopropylfosfonian d4T **100** (Ryc. 46, SI = 2027, dla d4T SI = 332). Podwyższenie aktywności anty-HIV związków **99** i **100** w porównaniu z monoestrami H-fosfonianowymi nukleozydów przypisuje się obecności grupy lipofilowej, która zwiększa ich zdolność przechodzenia przez błony komórkowe.^{92;93}



• Pochodne α -hydroksyfosfonianowe 2',3'-dideoksynukleozydów

Interesującą dla mojej rozprawy częścią programu badań grupy C. Meiera⁹⁴⁻⁹⁶ były dinukleozydowe (AZT, ddT, ddU) pochodne α -hydroksybenzylofosfonianów **101** (Ryc. 47) jako potencjalne proleki w terapii przeciwko wirusowi HIV.

Wykazana aktywność antywirusowa α -hydroksybenzylofosfonianów diAZT **101** (Ryc. 47) w komórkach CEM/O związana jest, wg autorów, z ich degradacją do dwóch aktywnych związków tj. 5'-monofosforanu **9** oraz 5'-H-fosfonianu AZT **98**.⁹⁷ Związki te powstają według dwóch różnych mechanizmów, co ściśle związane jest z charakterem elektronowym podstawników w części benzylovej α -hydroksyfosfonianów (Ryc. 47).



Ryc. 47

Pierwsza ścieżka degradacji prowadzi do utworzenia H-fosfonianu diAZT **102** i benzaldehydu. Powstały fosfonianodiester **102** jest dalej łatwo hydrolizowany do monoestru **98** i AZT. Innym wariantem metabolizmu H-fosfonianu diAZT **102** jest jego wewnątrzkomórkowe utlenienie do fosforanodiestru **104**, który to proces wg C. Meiera powinien zachodzić łatwo przy udziale oksydazy cytochromu P-450.



Drugi sposób degradacji polega na przekształceniu α -hydroksybenzylofosfonianu dinukleozydowego w odpowiedni fosforanotriester benzyloowo dinukleozydowy **103** na skutek przegrupowania fosfoniano-fosforanowego, możliwego w przypadku występowania w pierścieniu fenyłowym podstawników wyciągających elektrony. Produktem następującej w kolejnym etapie enzymatycznej degradacji fosforanodiestru **104** jest AZTMP **9**.⁹⁶

Całkowity brak aktywności w komórkach CEM/TK⁻ (HIV-2) α -hydroksybenzylofosfonianów diAZT **101** dowodzi o możliwości wykorzystania ich jako „depozytu nukleozydów”.⁹⁶

8. Uwagi końcowe do wstępu literaturowego

Intensywne badania nad skuteczną terapią zwalczającą wirusa HIV trwają od ponad 20 lat. W tym czasie w laboratoriach wielu krajów przebadanych zostało tysiące związków, spośród których tylko nieliczne dopuszczono do stosowania klinicznego. W części literaturowej mojej rozprawy miałam możliwość przedstawić tylko pewną część z tych związków, potencjalnych leków przeciwko wirusowi HIV. Różnorodność ich struktur i właściwości fizykochemicznych oraz, często nie taki jak zakładano początkowo, sposób degradacji w organizmie ukazują ciekawą, choć niełatwą drogę do znalezienia efektywnego chemioterapeutyku

Mimo sporych nakładów i zaangażowania ogromnej liczby badaczy nie udało się dotąd otrzymać szczepionki eliminującej wirusa HIV. W związku z wysoką zmiennością genetyczną tego wirusa, jego ciągle nowe warianty genetyczne potrafią unikać obronnej reakcji układu odpornościowego. Opracowywane są podejścia mające na celu zwiększenie odporności organizmu i tym samym szansy pokonania wirusa.¹⁶ Jedną z nich jest strategia tzw. przerywanego leczenia (ang. treatment interruption) bazująca na zaobserwowaniu „autouodpornienia” organizmu, czyli samoistnego rozpoczęcia odbudowywania systemu immunologicznego po przerwaniu chemioterapii rozpoczętej we wczesnym okresie po zakażeniu wirusem HIV.⁹⁸

Innym sposobem, obecnie na etapie prób klinicznych, są szczepionki DNA, których zadaniem będzie dostarczenie DNA kodującego białka antygenów przy wspomagającym podawaniu związków antywirusowych.^{3;99} Szczepionki te nie uchronią oczywiście przed zakażeniem wirusem HIV. Będą raczej pomagały jak



najdłużej utrzymać niski poziom cząstek wirusa w organizmie a tym samym opóźniały pojawienie się AIDS. Podobnie jak dotychczasowe terapie, szczepionki DNA prawdopodobnie nie stłumią całkowicie wirusowej replikacji.

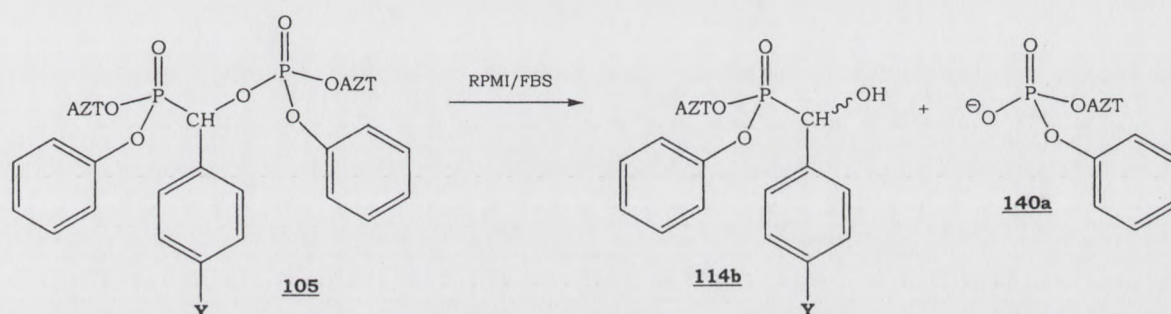
W tej sytuacji konieczne jest więc poszukiwanie związków o nowej strukturze, aktywnych przeciwko lekoopornym odmianom wirusa, o zwiększonej aktywności i zmniejszonej toksyczności, aby w tym poinfekcyjnym wyścigu namnażania się wirusa, zabijania limfocytów i powstawania nowych komórek, człowiek w końcu nie przegrywał.



V. WYNIKI I DISKUSJA

1. Wstęp

Od pewnego czasu w Pracowni Analogów Nukleotydów i Oligonukleotydów w ramach badań nad H- fosfonianami aryłowymi, prowadzone są prace nad nowymi analogami nukleotydowymi, fosfoniano - fosforanami dinukleozydowymi.¹⁰⁰ Pochodne te z różnymi podstawnikami w części benzylowej rozważane były jako potencjalne związki antywirusowe ze względu na możliwość dostarczenia do komórki dwóch różnych albo takich samych analogów nukleozydów, działających jako inhibitory odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1.

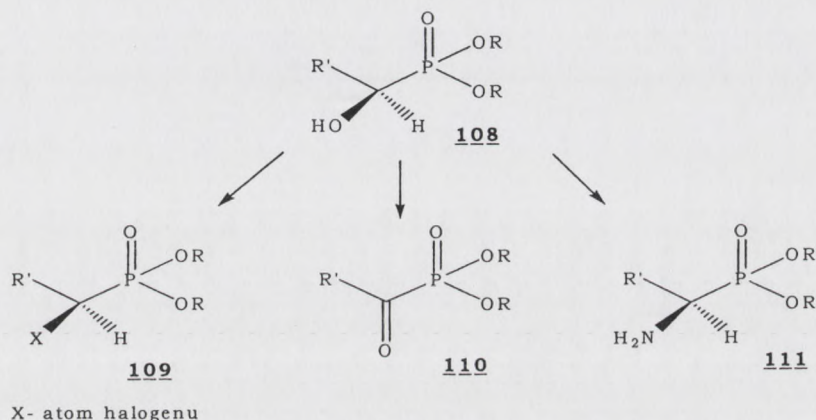


Ryc. 48

Najwyższą aktywnością antywirusową, porównywalną z aktywnością AZT ($EC_{50} = 0,04 \mu M$, komórki MT-4), odznaczał się fosfoniano - fosforan bis AZT z łącznikiem 4-metoksybenzylowym **105d** ($Y = OCH_3$, ryc. 48). Prześledzenie rozkładu (HPLC) tego związku w medium hodowlanym komórek (RPMI-1640 z FBS) wykazało szybkie ($t_{1/2} < 5$ min) tworzenie się α -hydroksy- α -(4-metoksyfenylo)-metanofosfonianu 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylowego **114a** oraz fosforanodiestru 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylowego **140a** (Ryc. 48). Biorąc pod uwagę słabą przenikalność przez błony komórkowe oraz podatność na działanie fosfodiesteraz, można przyjąć, że udział fosforanodiestru **140a** w hamowaniu replikacji wirusa HIV-1 był raczej wątpliwy.^{26;59} Wpływ drugiego produktu rozkładu, α -hydroksyfosfonianu **114b**, na obserwowaną aktywność antywirusową wspomnianego fosfoniano - fosforanu **105d** nie był nam znany. Oczekiwaliśmy, że związek typu **114b** może mieć interesujące właściwości, szczególnie ze względu na obecność dwóch pierścieni aryłowych. Aby się o tym przekonać, konieczne było zbadanie α -hydroksyfosfonianów aryłowo nukleozydowych typu **114** i próba skorelowania ich właściwości ze strukturą.

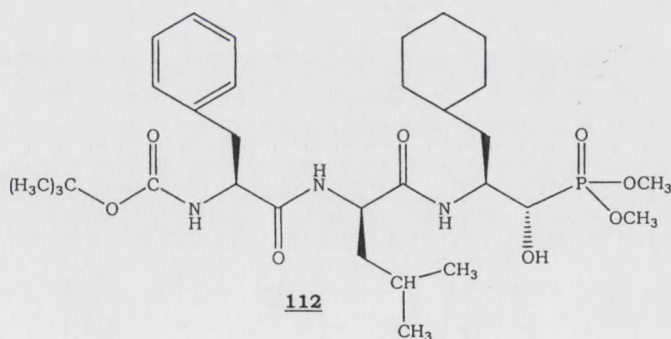


Opisane w literaturze α -hydroksyfosfoniany, to głównie estry dialkylowe typu **108** (Ryc. 49) a badania nad nimi dotyczyły wykorzystania ich jako ważnych substratów w syntezie organicznej. Związki te (zwłaszcza czyste enancjomerycznie) używa się m.in. do otrzymywania α -halogenofosfonianów typu **109**, acylofosfonianów typu **110** (te mogą być dalej przekształcane do hydrazonów, imin lub oksymów^{101;102}) i α -aminofosfonianów typu **111** (tzw. P-aminokwasów, używanych jako analogi α -aminokwasów^{103;104}) (Ryc. 49).



Ryc. 49

Na początku lat 90 ubiegłego wieku pojawiły się doniesienia o aktywności biologicznej α -hydroksyfosfonianów przejawiającej się m.in. w inhibicji ludzkiej reniny - enzymu proteolitycznego wydzielanego przez korę nerek i odpowiedzialnego za występowanie nadciśnienia tętniczego (α -hydroksyfosfonian **112** IC₅₀ = 10nM, ryc. 50)¹⁰⁵ oraz syntetazy EPSP - enzymu biorącego udział w biosyntezie egzogennych aminokwasów aromatycznych.^{8;103;104}

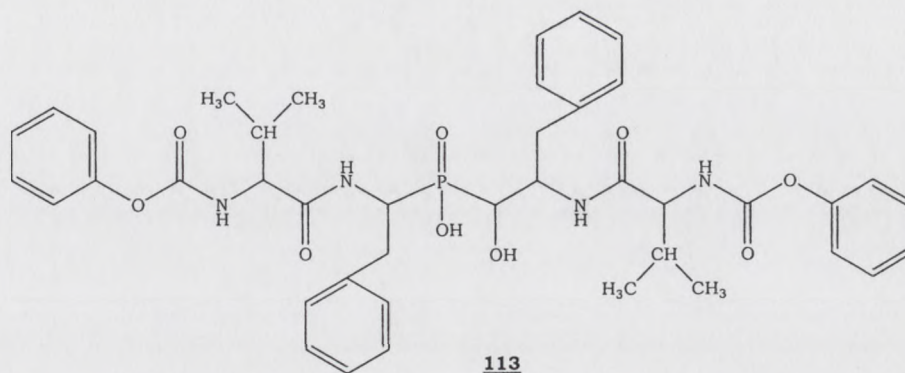


Ryc. 50

C. Meier i W.G.H. Laux^{103;104} badali zdolność analogów α -hydroksyfosfonianów do hamowania aktywności innego enzymu proteolitycznego - proteazy wirusa HIV



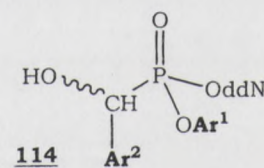
i jak się okazało, aktywność tę wykazywał dość złożony α -hydroksyfosfinian **113** ($IC_{50} = 1,3$ nM, ryc. 51).¹⁰⁶



Ryc. 51

C. Meier opisał również α -hydroksyfenylometanofosfoniany dinukleozydowe (Ryc. 47) jako potencjalne proleki przeciwko wirusowi HIV⁹⁶, o czym pisałam już w części literaturowej mojej pracy.

Jak dotąd nie były badane α -hydroksyfosfoniany arylowo nukleozydowe typu **114** (Ryc. 52). W odróżnieniu od innych tego typu związków, z uwagi na obecność w ich cząsteczce dwóch pierścieni arylowych, można się było spodziewać dużych możliwości modulacji ich właściwości w zależności od zmiany podstawników w pierścieniach aromatycznych zarówno w części fosforoestrowej (**Ar¹**) jak i hydroksymetanowej (**Ar²**). Dlatego w ramach mojej pracy doktorskiej, podjęłam się syntezy α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych, a następnie przebadania niektórych ich właściwości chemicznych i biologicznych.

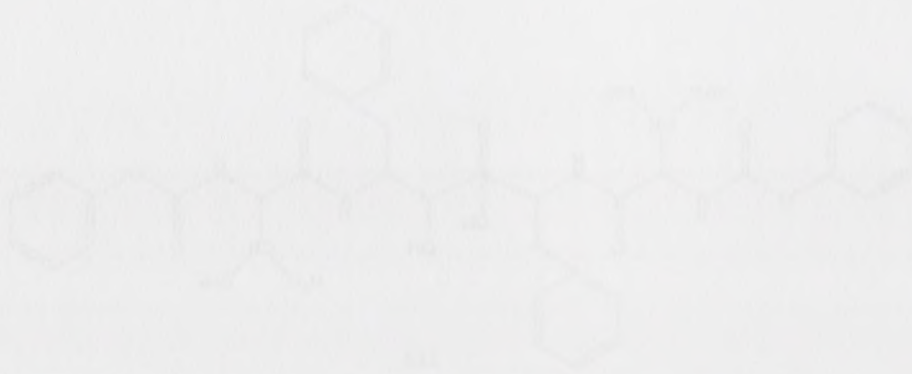


Ryc. 52

Zadaniami cząstkowymi mojej rozprawy były:

- synteza α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych z różnymi podstawnikami **Ar¹**, **Ar²** oraz **R** = C₄H₉ (jako związek referencyjny),
- przebadanie sposobu rozkładu otrzymanych α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych w środowiskach hodowli komórek,
- skorelowanie wyników rozkładu α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych z ich aktywnością antywirusową i cytotoksycznością oraz kierunkiem modyfikacji ich struktury,

1. Jak to działa, opisano to w książce "Klasyfikacja i systematyka zwierząt" (1998) s. 211-212.



112

2. Jak to działa, opisano to w książce "Klasyfikacja i systematyka zwierząt" (1998) s. 211-212. Wskazano tam, że jest to związek, który ma działanie przeciwnowotworowe.

3. Jak to działa, opisano to w książce "Klasyfikacja i systematyka zwierząt" (1998) s. 211-212. Wskazano tam, że jest to związek, który ma działanie przeciwnowotworowe.

4. Jak to działa, opisano to w książce "Klasyfikacja i systematyka zwierząt" (1998) s. 211-212. Wskazano tam, że jest to związek, który ma działanie przeciwnowotworowe.

5. Jak to działa, opisano to w książce "Klasyfikacja i systematyka zwierząt" (1998) s. 211-212. Wskazano tam, że jest to związek, który ma działanie przeciwnowotworowe.

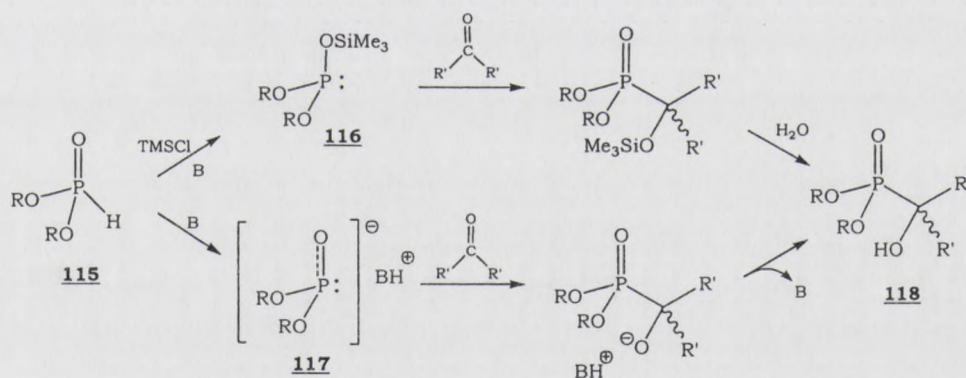
- Zakładając, że jest to związek przeciwnowotworowy, to:
- jest to związek, który ma działanie przeciwnowotworowe.
 - jest to związek, który ma działanie przeciwnowotworowe.
 - jest to związek, który ma działanie przeciwnowotworowe.
 - jest to związek, który ma działanie przeciwnowotworowe.
 - jest to związek, który ma działanie przeciwnowotworowe.

- na podstawie wyników powyższych badań, zaproponowanie nowych α -hydroksyfosfonianów o spodziewanych lepszych właściwościach anty-HIV.

2. Synteza α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych

2.1 Literaturowe metody otrzymywania α -hydroksyfosfonianów

Spośród metod opisanych w literaturze, najbardziej znaczące w syntezie α -hydroksyfosfonianów są te wykorzystujące reakcje Abramova oraz Pudovika. Koncepcja obu reakcji jest podobna i polega na przekształceniu H-fosfonianu dialkylowego **115** w formę terwalentną za pomocą chlorku trimetylosililu (związek **116** - reakcja Abramova¹⁰⁷) lub z użyciem katalizatorów zasadowych (związek **117** - reakcja Pudovika¹⁰⁸) i która to forma reaguje z grupą karbonylową aldehydów i ketonów dając odpowiedni α -hydroksyfosfonian **118** (Ryc. 53).¹⁰⁷



Ryc. 53

Kolejna metoda, to reakcja H-fosfonianu **115** z odpowiednim aldehydem przy udziale tlenku magnezu, który prawdopodobnie aktywuje oba substraty¹⁰¹ (Ryc. 54). W innej jeszcze reakcji prowadzonej wobec chlorku trimetylosililu i chloranu (VII) litu w eterze dietylowym¹⁰⁹ (lithium perchlorate in diethyl ether - LPDE) zachodzi przegrupowanie epitlenku typu **120** do odpowiedniego aldehydu¹¹⁰, który z trialkilofosforynem **119** tworzy regioselektywnie α -hydroksyfosfonian typu **121** (Ryc. 54).

na podstawie wyników powyższych badań, zapropomowano następującą metodę otrzymywania α-hydroksycetonów z epoksydowymi związkami...

2. Synthesis of α-hydroxycetones from epoxy compounds

2.1. Synthesis of α-hydroxycetones from epoxy compounds

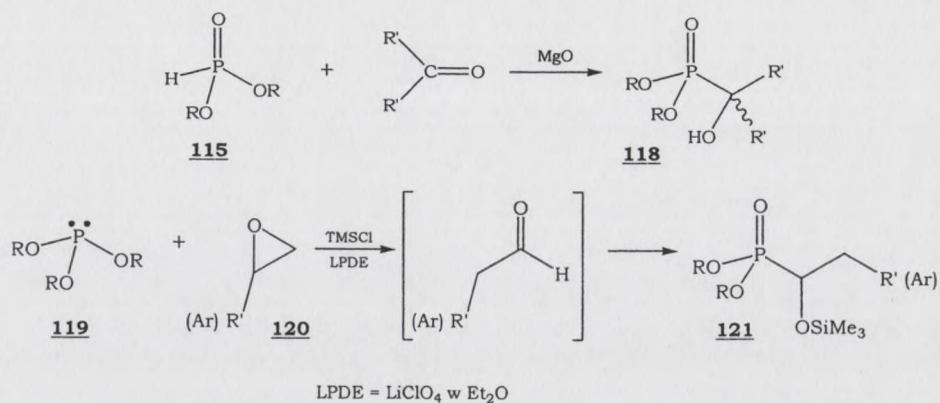
Specjalną metodą otrzymywania α-hydroksycetonów jest reakcja Alkaina z epoksydowymi związkami. W tym celu należy wykonać następujące kroki: 1. przygotowanie roztworu Alkaina w odpowiednim rozpuszczalniku, 2. dodanie epoksydowego związku, 3. mieszanie w określonej temperaturze, 4. odparowanie rozpuszczalnika, 5. czyszczenie produktu. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 1.



Ryc. 2

Kolejna metoda to reakcja Alkaina z odpowiednimi aldehydami. W tym celu należy wykonać następujące kroki: 1. przygotowanie roztworu Alkaina w odpowiednim rozpuszczalniku, 2. dodanie aldehydu, 3. mieszanie w określonej temperaturze, 4. odparowanie rozpuszczalnika, 5. czyszczenie produktu. Wyniki badań przedstawiono w tabeli 2.

Ryc. 3

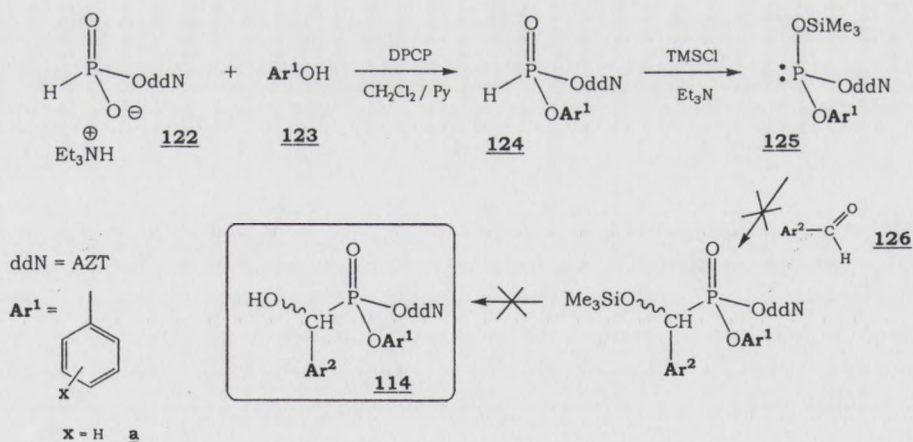


Ryc. 54

Warto zaznaczyć, że używając metod Abramova i Pudovika opracowano wiele podejść umożliwiających otrzymywanie czystych enancjomerycznie α -hydroksyfosfonianów dialkilowych.¹¹¹

2.2 Badania nad warunkami syntezy α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych oraz wpływem użytego aldehydu

Z powyższych metod najbardziej prosta i dogodna dla moich potrzeb wydawała się klasyczna reakcja Abramova. Dlatego w pierwszej kolejności postanowiłam przebadać reakcje H-fosfonianu 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylowego **124** z różnymi aldehydami.



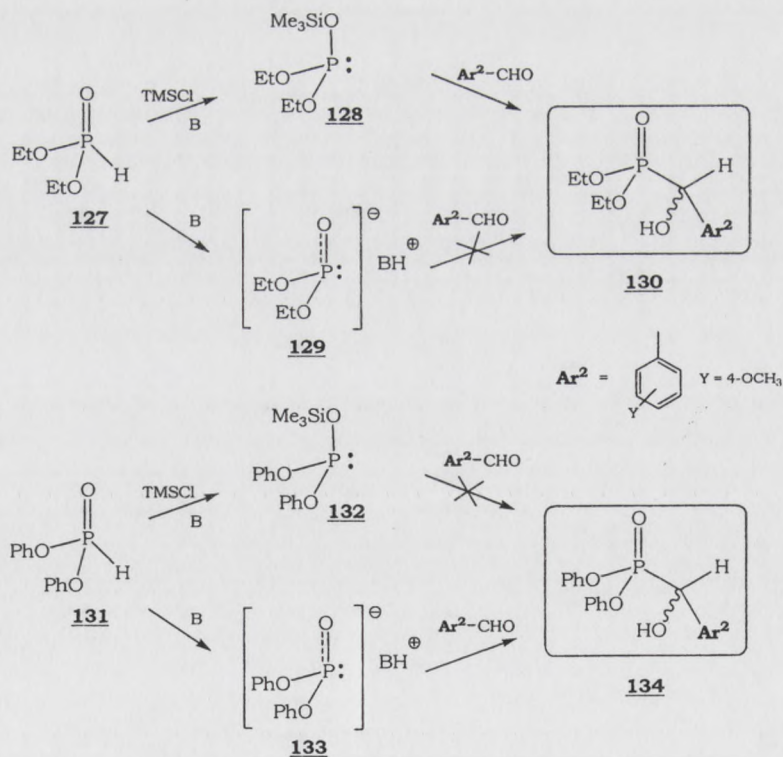
Ryc. 55

H-Fosfonianodiester **124** generowałam *in situ* (ze względu na małą trwałość nie można izolować tego typu związków) na drodze szybkiej (< 20 min) i czystej kondensacji H-fosfonianu AZT **122** z fenolem **123**, w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (10% objętościowych) przy użyciu chlorofosforanu difenylowego (DPCP)

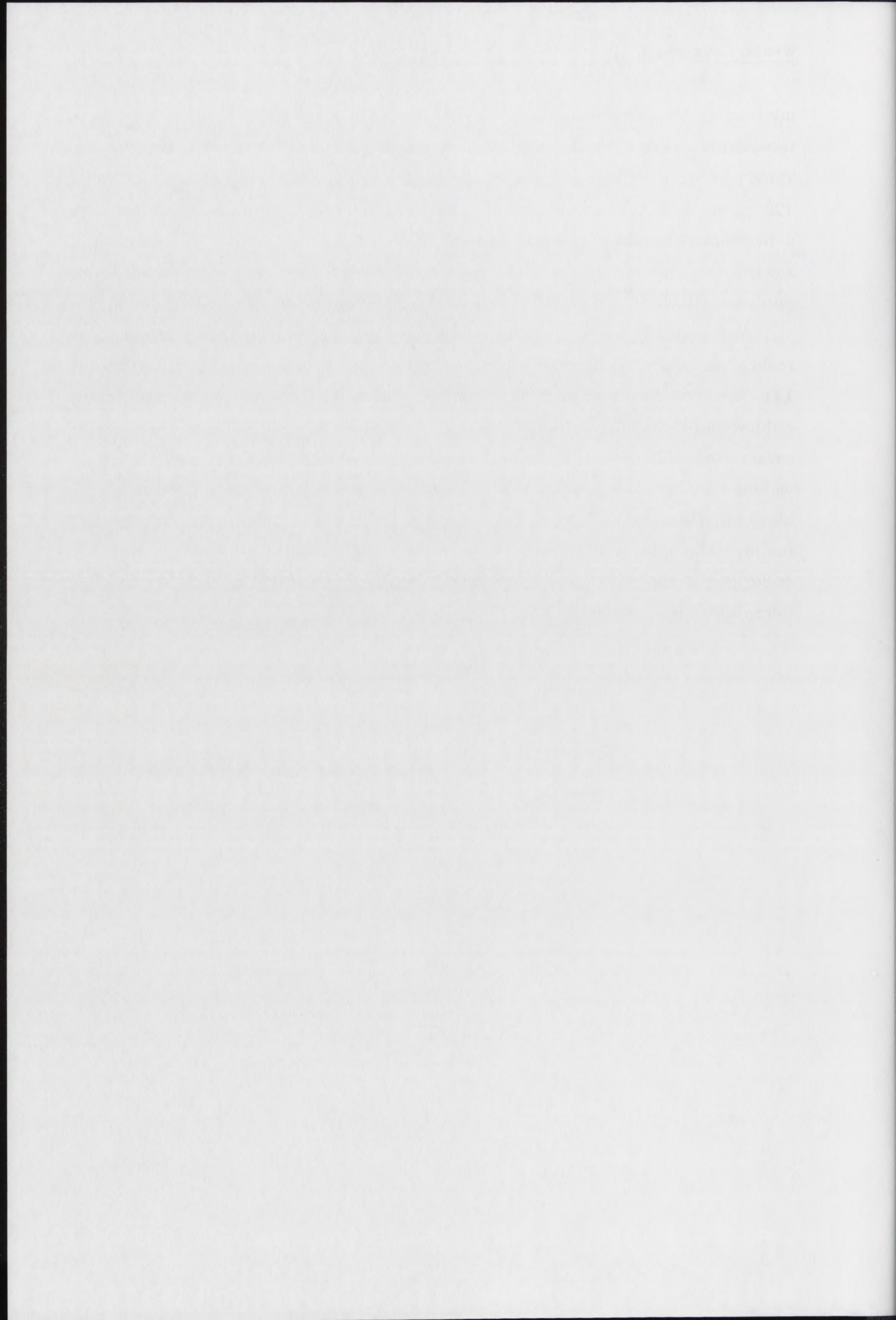


jako czynnika kondensującego.¹¹² Wytworzenie w następnym etapie reakcji terwalentnego fosforynu fenylowo nukleozydowo trimetylosililowego **125** przy użyciu TMSCl wobec Et₃N było również efektywne, co potwierdziła analiza ³¹P NMR (δ_P ~ 123 ppm, dwa sygnały od dwóch diastereoizomerów w widmie rejestrowanym z heteronuklearnym rozprężeniem). Po dodaniu aldehydu **126b** do mieszaniny zawierającej związek **125** nie obserwowaliśmy jednak tworzenia się oczekiwanego produktu addycji **114** (Ryc. 55) nawet wtedy, gdy wydłużyłam czas reakcji (4 godz.).

Aby wyjaśnić małą reaktywność związku **125**, przeprowadziłam analogiczną reakcję na związkach modelowych tj. H-fosfonianach dietylowym **127** i difenylowym **131** (Ryc. 56). Fosforyn dietylowo trimetylosililowy **128** (otrzymany po uprzednim zsililowaniu H-fosfonianu dietylowego **127** chlorkiem trimetylosililowym wobec Et₃N) czysto reagował z 4-metoksybenzaldehydem w kierunku produktu **130**, który na widmie ³¹P NMR dawał sygnał w okolicy 20 ppm, a więc w regionie typowym dla tej klasy związków.⁹⁶ Analogiczna reakcja silylowanego H-fosfonianu difenylowego **132** nie prowadziła do spodziewanego C-fosfonianu **134** a analiza (³¹P NMR) mieszaniny reakcyjnej w znacznych odstępach czasu ukazywała jedynie niezmienny fosforyn difenylowo trimetylosililowy **132** (124 ppm).



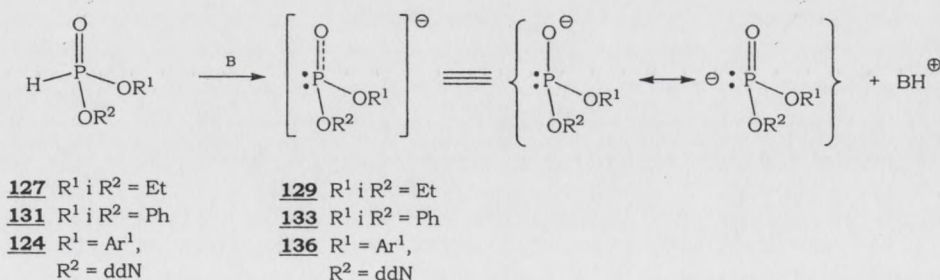
Ryc. 56



Wyniki te tłumaczyłam tym, iż w utrwalonej formie terwalentnej H-fosfonianu dietylowego **128** ze względu na obecność dwóch grup alkilowych dostarczających elektrony, centrum fosforowe odznacza się większą nukleofilowością niż w analogicznych fosforinach difenyłowych i aryłowo nukleozydowo trimetylosililowych (**132** i **125**, ryc. 55 i 56), co powodowało, że związek **128** reagował z aldehydem **126b** a związki **125** i **132** nie.

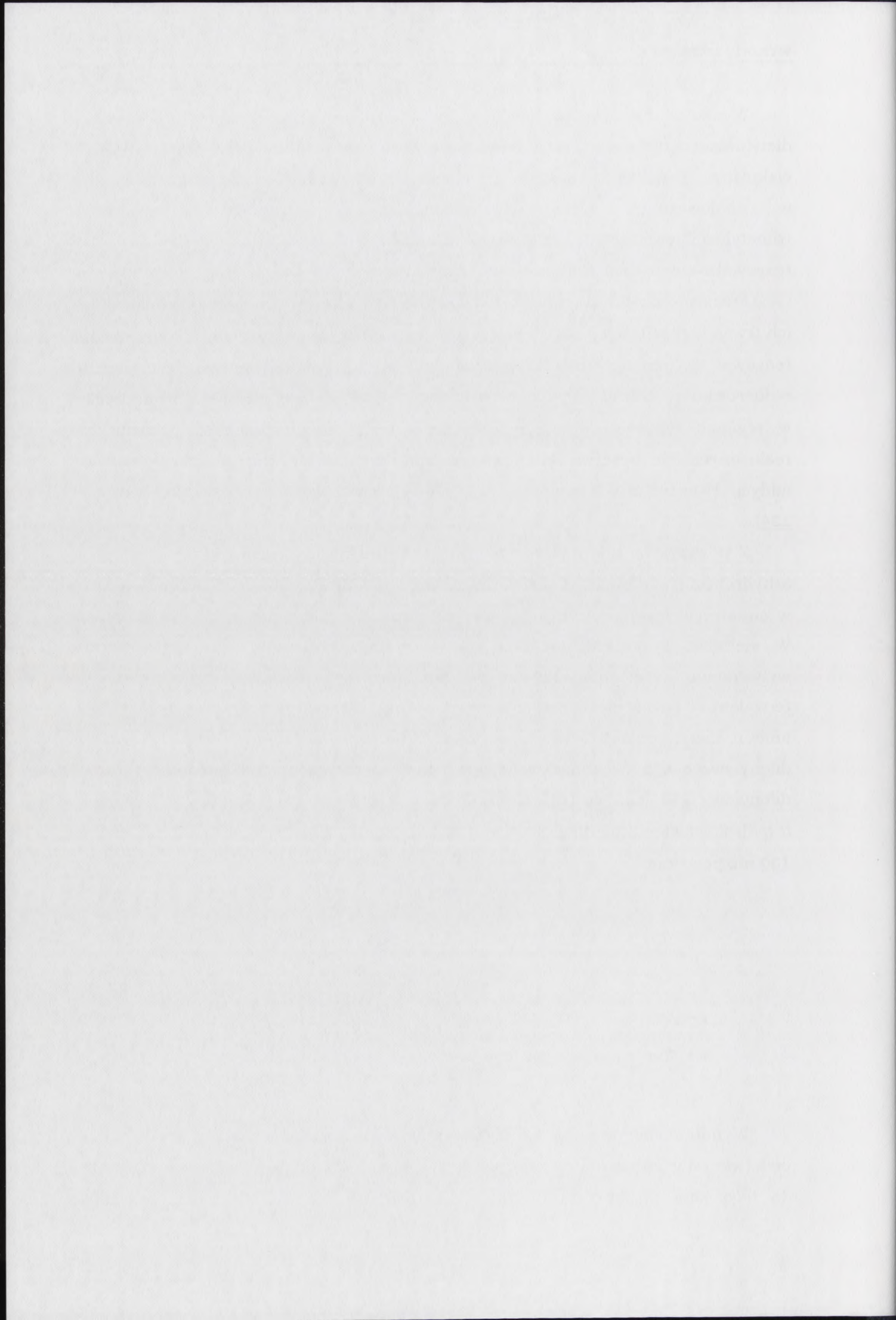
Przeprowadzając natomiast reakcje aldehydu ze związkami modelowymi bez ich trwałej ternalizacji (reakcja Pudovika) okazało się, że H-fosfonian difenyłowy **131** reagował szybko z 4-metoksybenzaldehydem **126b** w obecności trietyloaminy w kierunku produktu **134** dającego w widmie ^{31}P NMR sygnał (14,9 ppm), leżący w regionie typowym dla α -hydroksyfosfonianów. W tych samych warunkach reakcyjnych nie obserwowałam natomiast tworzenia się analogicznego produktu addycji H-fosfonianu dietylowego **127** do 4-metoksybenzaldehydu **126b** (związek **134**).

Z powyższych doświadczeń mogłam wywnioskować, że efektywność tworzenia α -hydroksyfosfonianów zależy nie tylko od nukleofilowości atomu fosforu w substracie fosforinowym, ale również stężenia reaktywnej formy H-fosfonianu. W metodzie Pudovika, podobnie jak w reakcji Abramova, forma terwalentna wytworzona z diestru dietylowego powinna być bardziej nukleofilowa niż terwalentna forma diestru difenyłowego, jednak łatwość generowania reaktywnego anionu dietylowego **129** jest prawdopodobnie mniejsza niż w przypadku anionu difenyłowego **133**. W konsekwencji, w stosowanych warunkach zasadowych anion difenyłowy **133** jest bardziej efektywnym nukleofilem, co powoduje tworzenie się α -hydroksyfosfonianu difenyłowego **134**, natomiast α -hydroksyfosfonian dietylowy **130** nie powstaje.



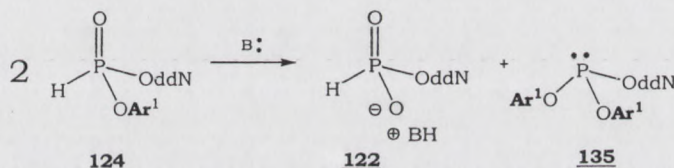
Ryc. 57

Wyniki eksperymentów z modelowymi H-fosfonianami wykazały, w jaki sposób podstawniki w substratach fosforinowych mogą wymusić różny sposób dochodzenia do tego samego typu produktu - α -hydroksyfosfonianu. W moim przypadku



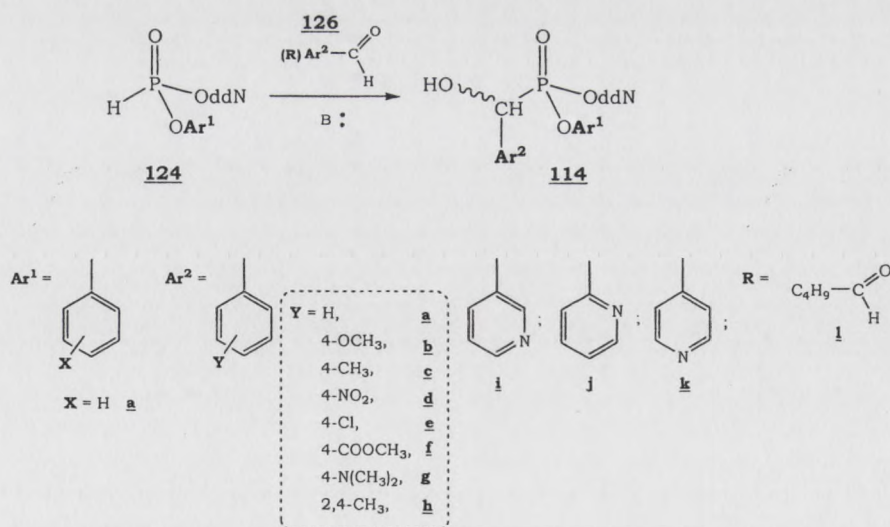
zastosowanie wariantu Abramova w syntezie α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych okazało się całkowicie nieskuteczne. Zdecydowałam się więc na podejście Pudovika, do czego zachęciły mnie wyniki badań własnych z H-fosfonianodiestrem difenylowym, a także badania H-fosfonianów dinukleozydowych z aldehydami opisane przez C. Meiera.⁹⁶

Jedna z dwóch procedur C. Meiera okazała się nieużyteczna w syntezie α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych. W proponowanych warunkach (duży nadmiar trietyloaminy, wysoka temperatura i wielogodzinny czas reakcji) H-fosfoniany arylo nukleozydowe **124** ulegałyby bowiem dysproporcjonowaniu¹¹³ (Ryc. 58) zamiast pożądanej addycji do aldehydów. Z tego też powodu odrzuciłam użycie DBU jako zasadowego katalizatora w tej reakcji, jak to polecali inni badacze.¹¹⁴



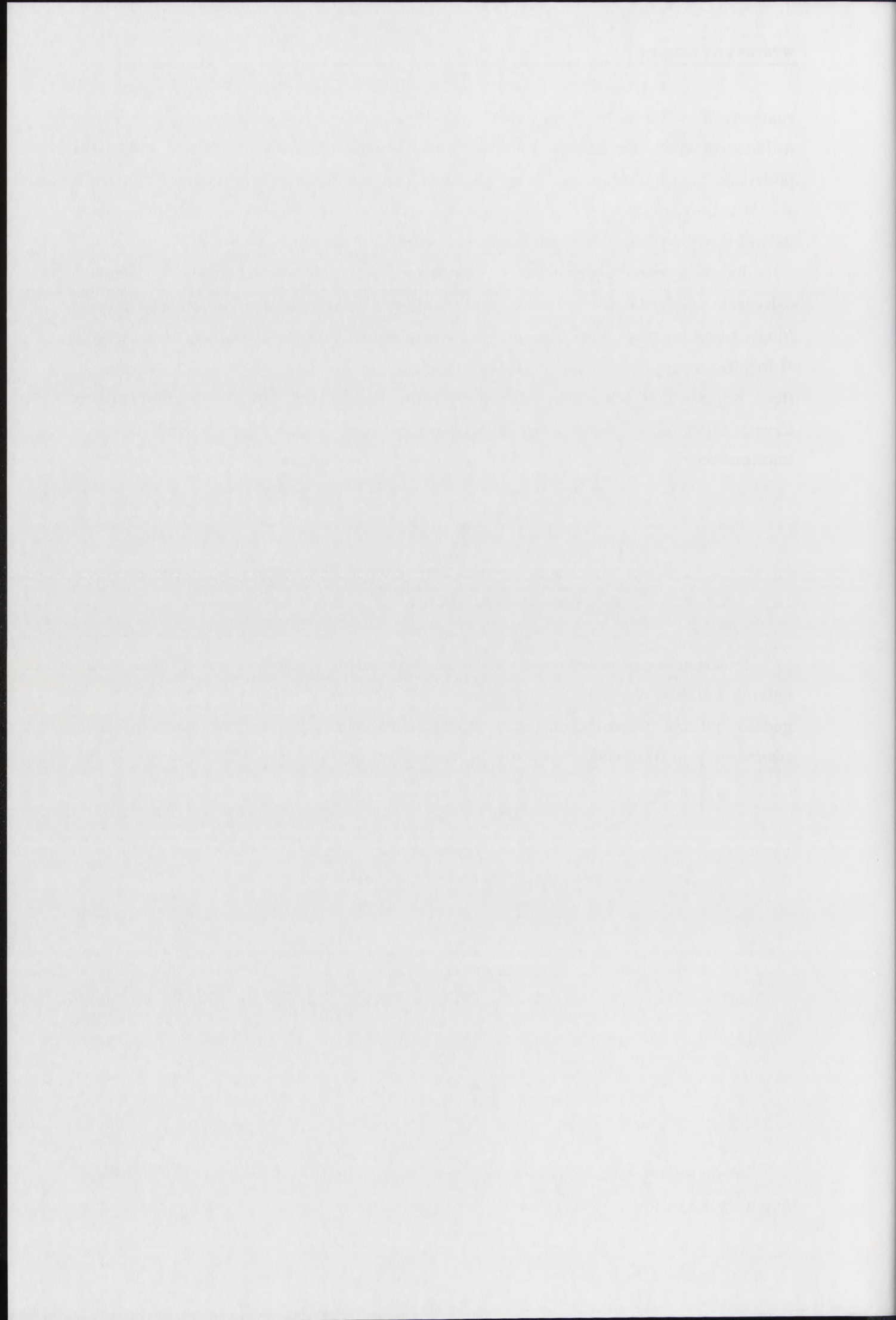
Ryc. 58

Dość zachęcająca wydawała się inna procedura C. Meiera, w której stosował on jedynie katalityczną ilość trietyloaminy. Wydłużało to znacznie czas reakcji (3 - 49 godzin), jednak na tym etapie badań nie mogłam ocenić, jaki to może mieć wpływ na tworzenie produktów w planowanych przeze mnie reakcjach.



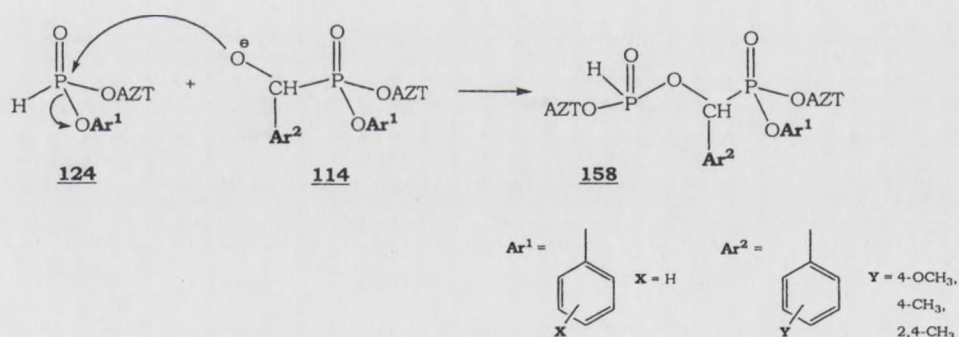
Ryc. 59

W pierwszej serii doświadczeń, w których substratami były H-fosfonian AZT fenylowy **124A** (ddN = AZT) i kilka aldehydów aromatycznych **126** z podstawnikami



elektronoakceptorowymi i elektronodonorowymi, zastosowałam warunki podobne do opisanych przez C. Meiera. W reakcjach tych wobec niewielkiego nadmiaru molowego (0,2 ekw. molowego) trietyloaminy, dochodziło do tworzenia oczekiwanych α -hydroksyfosfonianów fenylowo nukleozydowych typu **114** (cztery sygnały o $\delta_P \approx 20$ ppm odpowiadające czterem diastereoizomerom na skutek, obecności dwóch centrów chiralnych: na atomie fosforu i na atomie węgla, ^{31}P NMR) (Ryc. 59). Wydajności tych reakcji w przeliczeniu na H-fosfonian nukleozydowy **122** (Ryc. 55) były na ogół niskie, co spowodowane było tworzeniem się różnego rodzaju produktów ubocznych bądź następczych.

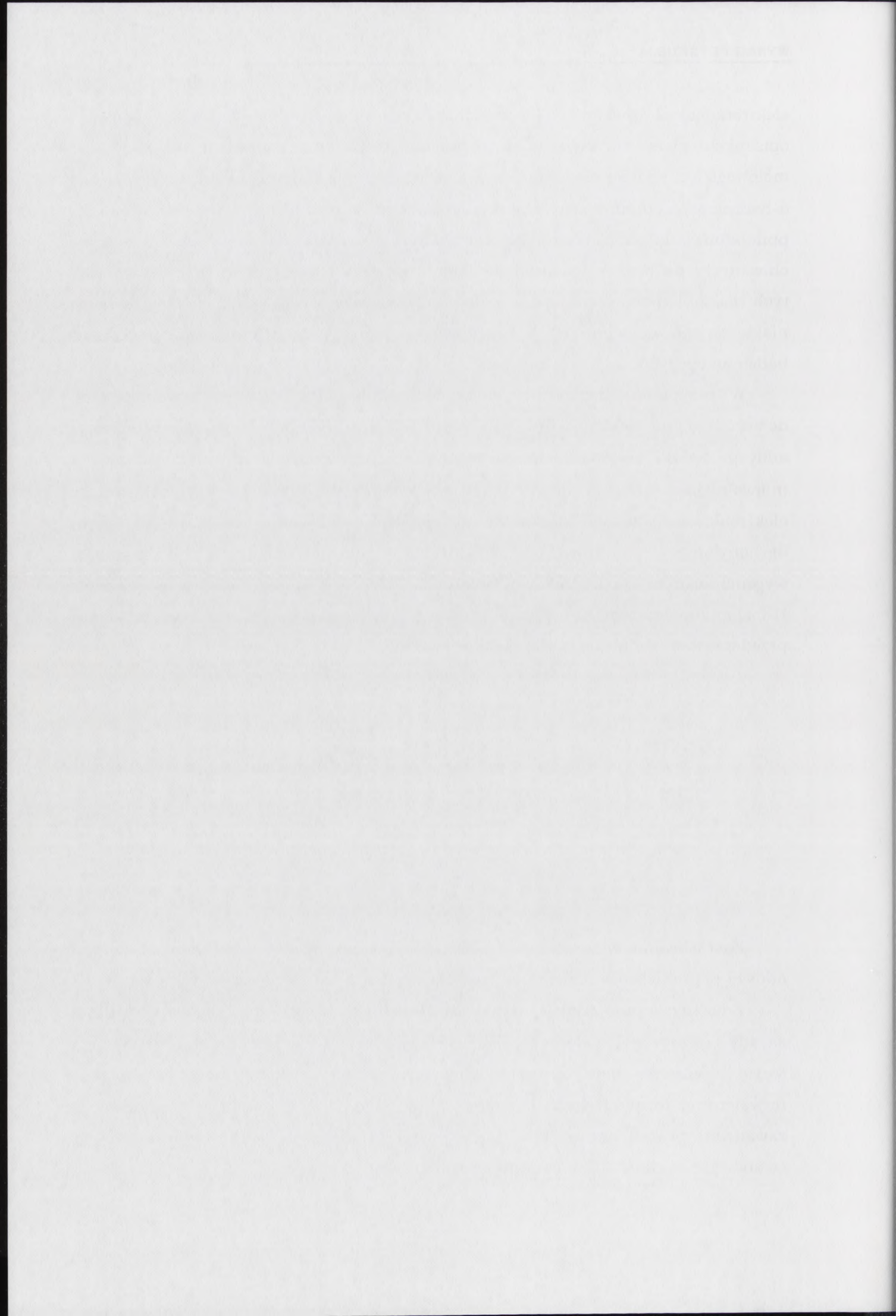
W przypadku użycia benzaldehydów **126b**, **126c**, **126h** z podstawnikami dostarczającymi elektrony (Ryc. 59, **Y** = 4-OCH₃; 4-CH₃; 2,4-CH₃) szybkość reakcji addycji malała ze spadkiem wartości stałej Hammetta σ dla podstawnika **Y** (najwolniejsza ≈ 80 min dla **Y** = OCH₃, $\sigma_p = -0,27^{115}$), co należy przypisać zmianie elektrofilowości grupy karbonylowej aldehydu. Powolna addycja do grupy karbonylowej powodowała zachodzenie reakcji następczych pomiędzy wygenerowanym α -hydroksyfosfonianem **114** a wciąż nieprzereagowanym H-fosfonianodiestrem **124** (Ryc. 60) (szczegółowe wyniki badań nad tymi reakcjami przedstawiłam w dalszej części mojej rozprawy).



Ryc. 60

Zastosowanie większego nadmiaru trietyloaminy w celu zwiększenia szybkości addycji i ograniczenia reakcji następczych nie przyniosło spodziewanych efektów.

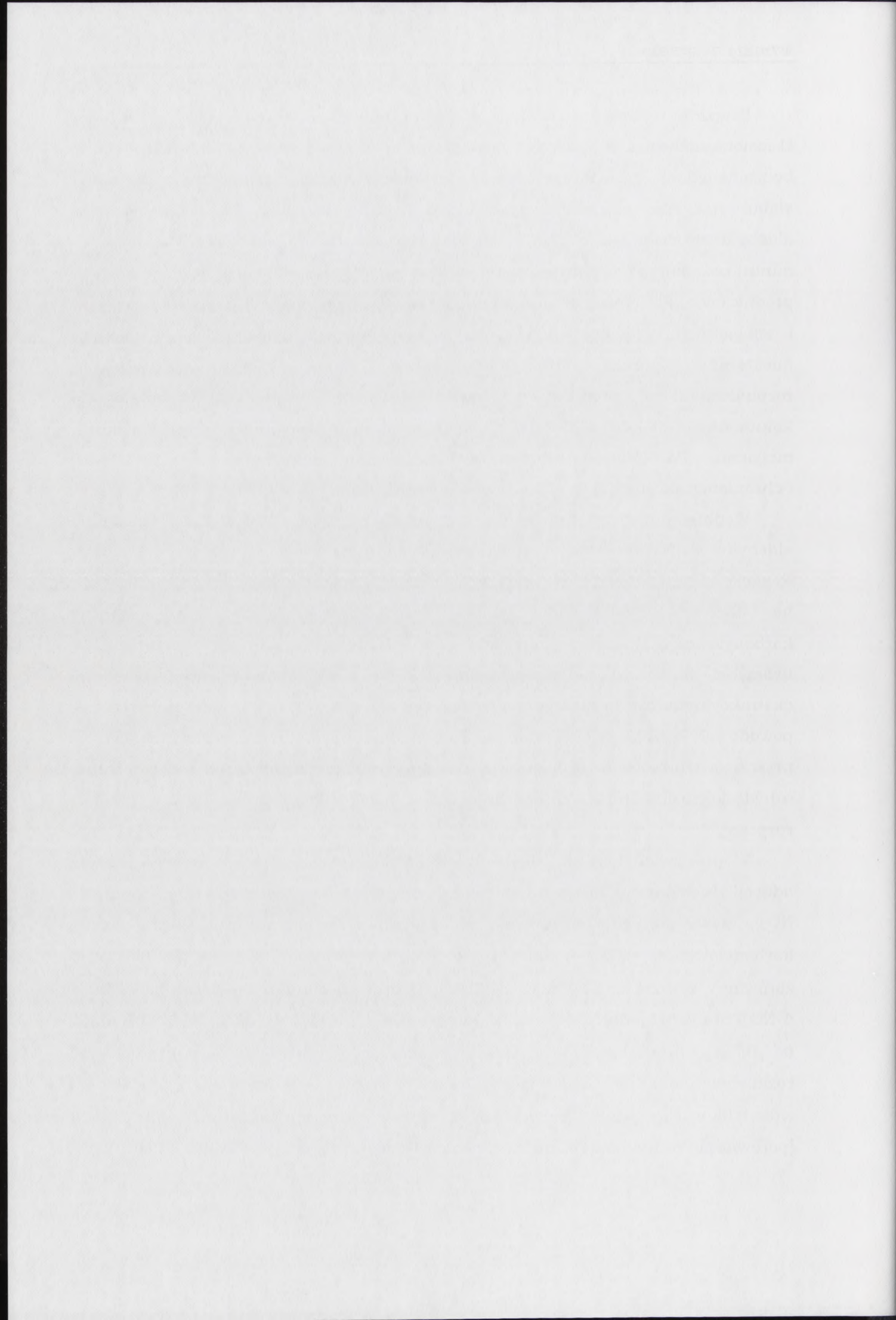
Znacznie lepsze wyniki uzyskałam stosując 1 ekwiwalent molowy silniejszej zasady - diizopropyluetyloaminy (DIPEA $\text{pK}_a \approx 11,5^{116;117}$ vs Et₃N $\text{pK}_a = 10,9^{118}$) co jak sądzę, związane było zapewne z generowaniem większej ilości reaktywnej, terwalentnej formy H-fosfonianodiestru **136** (Ryc. 57). Ponadto jest możliwe, że zawadzona przestrzennie DIPEA nie aktywuje funkcji hydroksylowej produktu **114**, co znacznie ogranicza lub eliminuje reakcje następcze.



Powyższe warunki zostały z powodzeniem zastosowane w reakcjach H-fosfonianodiestru **124** z niepodstawionym benzaldehydem **126a** oraz benzaldehydami z podstawnikami elektronodonorowymi **126b**, **126c**, **126h** oraz słabo wyciągającymi elektrony **126e**, **126f** (Ryc. 59, **Y** = 4-Cl, 4-COOCH₃) a także aldehydu walerianowego **126i** i pozwalały na otrzymanie w krótkim czasie (< 40 minut) pożądanych α -hydroksyfosfonianów typu **114** jako jedynych nukleotydowych produktów. Po rozcieńczeniu mieszanin reakcyjnych chlorkiem metylenu i zobojętnieniu lodowatym kwasem octowym (równomolowa ilość z aminą), mieszaniny poreakcyjne ekstrahowałam wodą. Po oddestylowaniu rozpuszczalników, produkty końcowe izolowałam za pomocą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy) stosując gradient 2-propanolu (4-6%) w chlorku metylenu. Po liofilizacji otrzymywałam czyste spektralnie (¹H, ³¹P NMR) i chromatograficznie (TLC, HPLC) związki z wydajnością 70-90%.

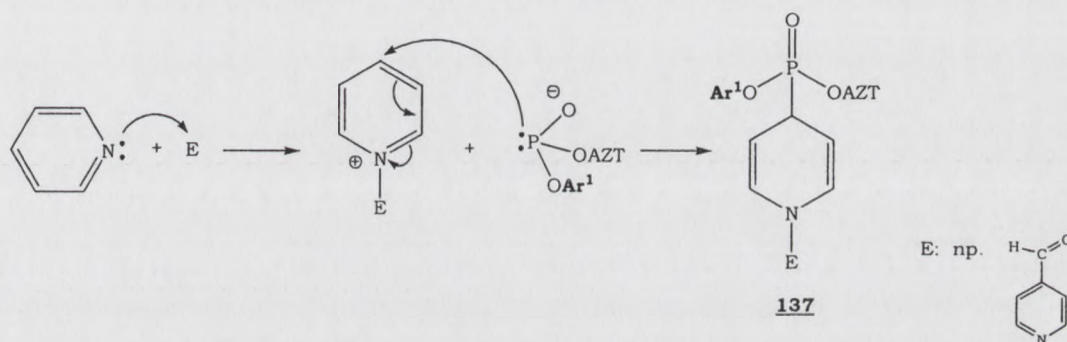
Według powyższej procedury nie udało się jednak otrzymać pochodnej aldehydu 4-(*N,N*-dimetyloamino)benzoesowego **126g** [Ryc. 59, **Y** = 4-N(CH₃)₂]. Reakcja addycji zachodziła wolno (około 2h, czego można było oczekiwać ze względu na obecność podstawnika silnie zmniejszającego elektrofilowość grupy karbonylowej, $\sigma_p = -0,83^{115}$), a pożądany produkt **114g** [Ar¹ = Ph, Ar² = 4-N(CH₃)₂Ph] tworzył się mało wydajnie (maksymalnie 35%, ³¹P NMR). Próby przerobu metodami ekstrakcyjnymi lub bezpośredniej izolacji tego produktu z mieszaniny poreakcyjnej powodowały szybki jego rozkład do H-fosfonianu AZT. Przypuszczam, że główną przyczyną trudności w izolacji związku **114g** jest odwracalność reakcji tworzenia, α -hydroksyfosfonianów, co bardziej szczegółowo omawiam w dalszej części rozprawy.

W przeciwieństwie do aldehydu 4-(*N,N*-dimetyloamino)benzoesowego reakcja addycji H-fosfonianodiestru do aldehydu 4-nitrobenzoesowego **126d** (Ryc. 59, **Y** = 4-NO₂), zawierającego podstawnik silnie podwyższający elektrofilowość grupy karbonylowej ($\sigma_p = 0,71^{115}$ dla grupy 4-NO₂), przebiegała bardzo szybko (< 5 min) zarówno w obecności Et₃N jak i DIPEA. α -Hydroksyfosfonian **114d** (Ar¹ = Ph, Ar² = 4-NO₂Ph) nie był jednak jedynym nukleotydowym produktem (około 85 %, ³¹P NMR) tej reakcji. Dodatkowo w trakcie przerobu, α -hydroksyfosfonian **114d** ulegał rozkładowi do kilku zawierających fosfor związków, z których jeden udało się zidentyfikować jako α -hydroksy-(4-nitrofenylo)metanofosfonian AZT **138** [porównanie z otrzymanym na innej drodze wzorcem **138** (¹H, ³¹P NMR, HPLC)] W tej



sytuacji zrezygnowałam z otrzymania α -hydroksyfosfonianu **114d** w tych warunkach.

Podobnie niekorzystną sytuację obserwowałam w przypadku reakcji H-fosfonianodiestu **124** z 2- i 4-pirydynokarboaldehydami (**126j** i **126k**), w których tworzące się α -hydroksy-(2- lub 4- pirydylo)metanofosfoniany **114j** ($\text{Ar}^1 = \text{Ph}$, $\text{Ar}^2 = 2\text{-pirydył}$) i **114k** ($\text{Ar}^1 = \text{Ph}$, $\text{Ar}^2 = 4\text{-pirydył}$) ulegały w medium reakcyjnym dalszym reakcjom następczym, a w trakcie przerobu mieszaniny reakcyjnej, niemalże całkowitemu rozpadowi do kilku produktów, których struktury nie ustaliłam. Teoretycznie, jednym z możliwych powodów tworzenia się produktów ubocznych (czy następczych) o przesunięciu chemicznym $\delta_P = 27\text{-}32$ ppm mogła być obecność cząsteczki pirydyny i tworzenie się np. 4-pirydylo-C-fosfonianów **137** (Ryc. 61).¹¹⁹



Możliwość tę jednak wykluczyłam prowadząc reakcje addycji bez pirydyny a jedynie w obecności DIPEA, gdzie również obserwowałam (³¹P NMR) tworzenie się tych samych (lub bardzo podobnych do wyżej opisanych), niezidentyfikowanych przeze mnie związków.

Powyższe wyniki świadczyły o tym, że reakcje H-fosfonianodiestu **124** z aldehydami zawierającymi podstawniki silnie wyciągające elektrony w pierścieniu aromatycznym (takie jak NO₂ czy endocykliczny atom azotu w pozycjach 2 i 4) zachodzą szybko, ale jednocześnie ich produkty addycji ulegają dalszym reakcjom następczym. Wydawało się, że reakcje następcze mogą być związane z wysoką reaktywnością funkcji hydroksylowej α -hydroksyfosfonianów **114d** ($\text{Ar}^1 = \text{Ph}$, $\text{Ar}^2 = 4\text{-NO}_2\text{Ph}$), **114j** ($\text{Ar}^1 = \text{Ph}$, $\text{Ar}^2 = 2\text{-pirydył}$) i **114k** ($\text{Ar}^1 = \text{Ph}$, $\text{Ar}^2 = 4\text{-pirydył}$) spowodowaną sąsiedztwem grup silnie wyciągających elektrony tj. 4-nitrofenylowej albo 2- lub 4-pirydylowej, a także obecnością mocnej zasady (DIPEA) w mieszaninie reakcyjnej. Mając to na uwadze, przeprowadziłam analogiczne reakcje zastępując mocno zasadową DIPEA, znacznie słabszą, nienukleofilową 2,6-lutydyną ($\text{pK}_a = 6,6$)¹¹⁸.

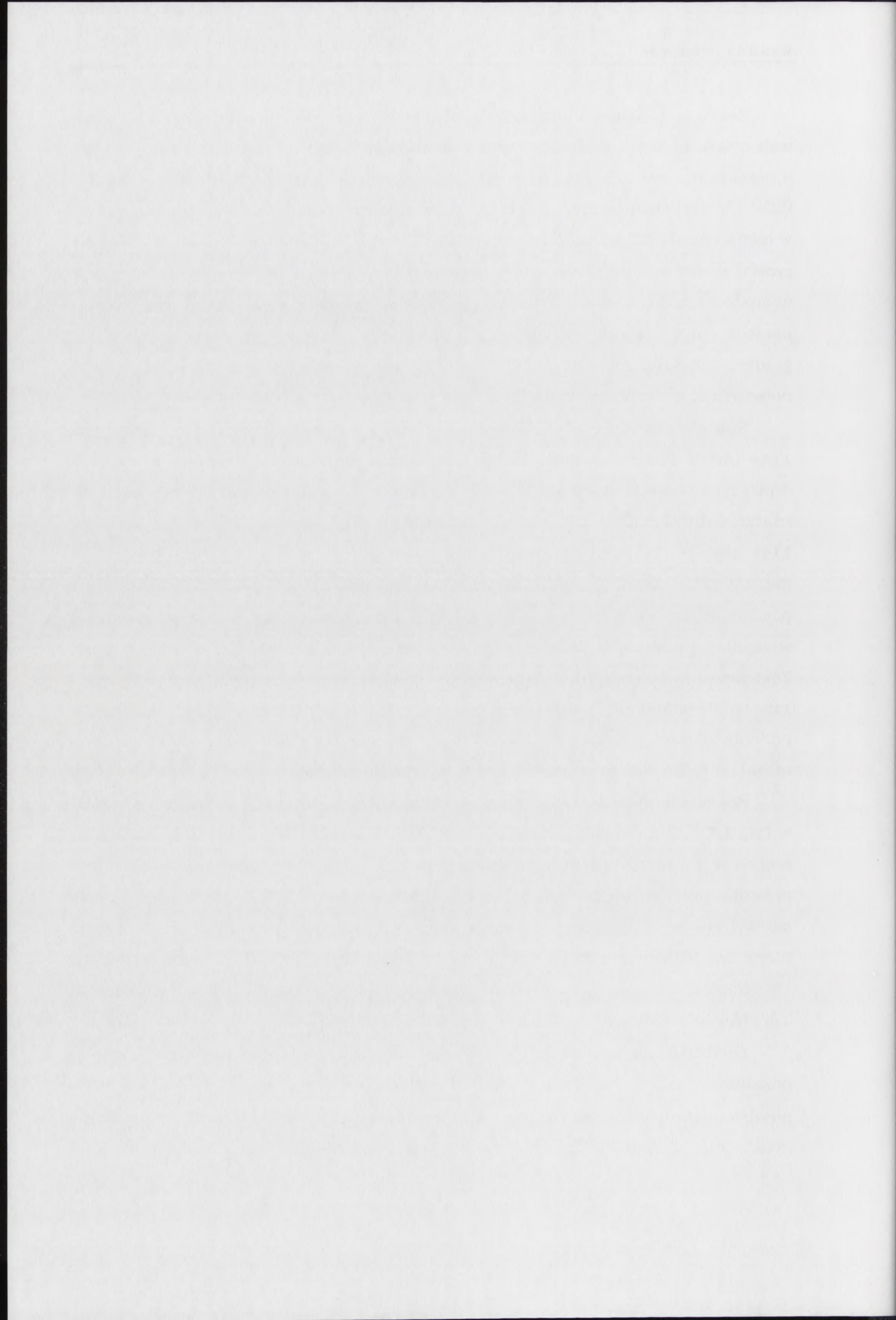
Reakcja H-fosfonianodiestru **124** z aldehydem 4-nitrobenzoesowym **126d** wobec 2,6-lutydyny zachodziła znacznie wolniej (całkowity czas reakcji 45 min), a oczekiwany związek **114d** ($\text{Ar}^1 = \text{Ph}$, $\text{Ar}^2 = 4\text{-NO}_2\text{Ph}$) był produktem głównym (> 90%). W trakcie przerobu mieszaniny poreakcyjnej, do ekstrakcji zastosowałam w miejsce wody 1M bufor fosforanowy KH_2PO_4 o $\text{pH} = 4$, gdyż jak opisałam w dalszej części rozprawy, α -hydroksyfosfoniany arylowo nukleozydowe **114** były trwałe w środowisku kwasowym. Produkt **114d** ($\text{Ar}^1 = \text{Ph}$, $\text{Ar}^2 = 4\text{-NO}_2\text{Ph}$) oczyszczony za pomocą chromatografii na kolumnie wypełnionej żel krzemionkowym (stosując gradient 2-propanolu w CH_2Cl_2) uzyskałam z wydajnością 80%, co może potwierdzać skuteczność zmian w procedurze izolacji.

Sukces w syntezie α -hydroksy-(4-nitrofenylo)metanofosfonianu AZT fenylowego **114d** ($\text{Ar}^1 = \text{Ph}$, $\text{Ar}^2 = 4\text{-NO}_2\text{Ph}$) zachęcił mnie do podobnej syntezy z użyciem 4-pirydynokarboaldehydu **126k**. Także i w tym przypadku całkowity czas reakcji był znacznie dłuższy (2 godz.), reakcja zachodziła jednak czysto i oczekiwany związek **114k** ($\text{Ar}^1 = \text{Ph}$, $\text{Ar}^2 = 4\text{-pirydył}$) stanowił prawie 90% (^{31}P NMR) produktów mieszaniny reakcyjnej. Sprawdzając przebieg reakcji (^{31}P NMR) obserwowałam pojawianie się sygnału $\delta_{\text{P}} = -7$ ppm (8%), nie tworzyły się jednak wspomniane wcześniej produkty uboczne o przesunięciu chemicznym $\delta_{\text{P}} = 27\text{-}32$ ppm. Zastosowanie 1M buforu KH_2PO_4 o $\text{pH} = 4$ do ekstrakcji mieszaniny poreakcyjnej zapewniało stabilność **114k** ($\text{Ar}^1 = \text{Ph}$, $\text{Ar}^2 = 4\text{-pirydył}$) w czasie przerobu, jednak podczas dalszej jego izolacji na kolumnie chromatograficznej (żel krzemionkowy) ulegał on całkowitemu rozkładowi.

Prawie identyczny przebieg miała próba syntezy α -hydroksyfosfonianu **114j** ($\text{Ar}^1 = \text{Ph}$, $\text{Ar}^2 = 2\text{-pirydył}$) z resztą 2-pirydyłową (Ryc. 59). Mimo czystego przebiegu reakcji w 2,6-lutydynie (90% pożądanego związku, ^{31}P NMR) i dalszego pomyślnego przerobu poreakcyjnego (wytrzaśnięcie z 1M buforem KH_2PO_4 o $\text{pH} = 4$), nie udało się wyizolować z mieszaniny poreakcyjnej oczekiwanego produktu, gdyż również ulegał on całkowitemu rozkładowi w czasie chromatografii na żelu krzemionkowym.

Rozważania o możliwych przyczynach rozkładu wygenerowanych α -hydroksyfosfonianów opisałam w dalszej części mojej pracy.

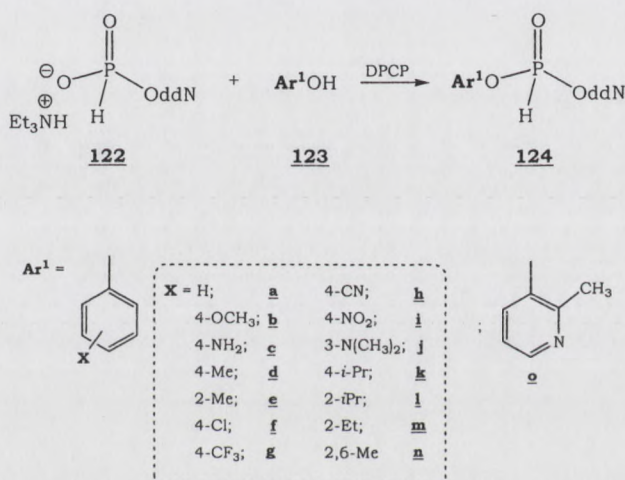
Zastosowanie powyższych warunków reakcyjnych i poreakcyjnego przerobu pozwoliło mi natomiast bez problemów uzyskać α -hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian fenylowo nukleozydowy **114i** ($\text{Ar}^1 = \text{Ph}$, $\text{Ar}^2 = 3\text{-pirydył}$) (Ryc. 59). Związek ten, po oczyszczeniu (chromatografia kolumnowa, żel



krzemionkowy) i liofilizacji z benzenu, otrzymywałam z dość dobrą wydajnością (55%) w postaci białego niehigroskopijnego osadu.

2.3 Wpływ grupy aryłowej w H-fosfonianodiestrze na tworzenie się α -hydroksyfosfonianów aryłowo nukleozydowych

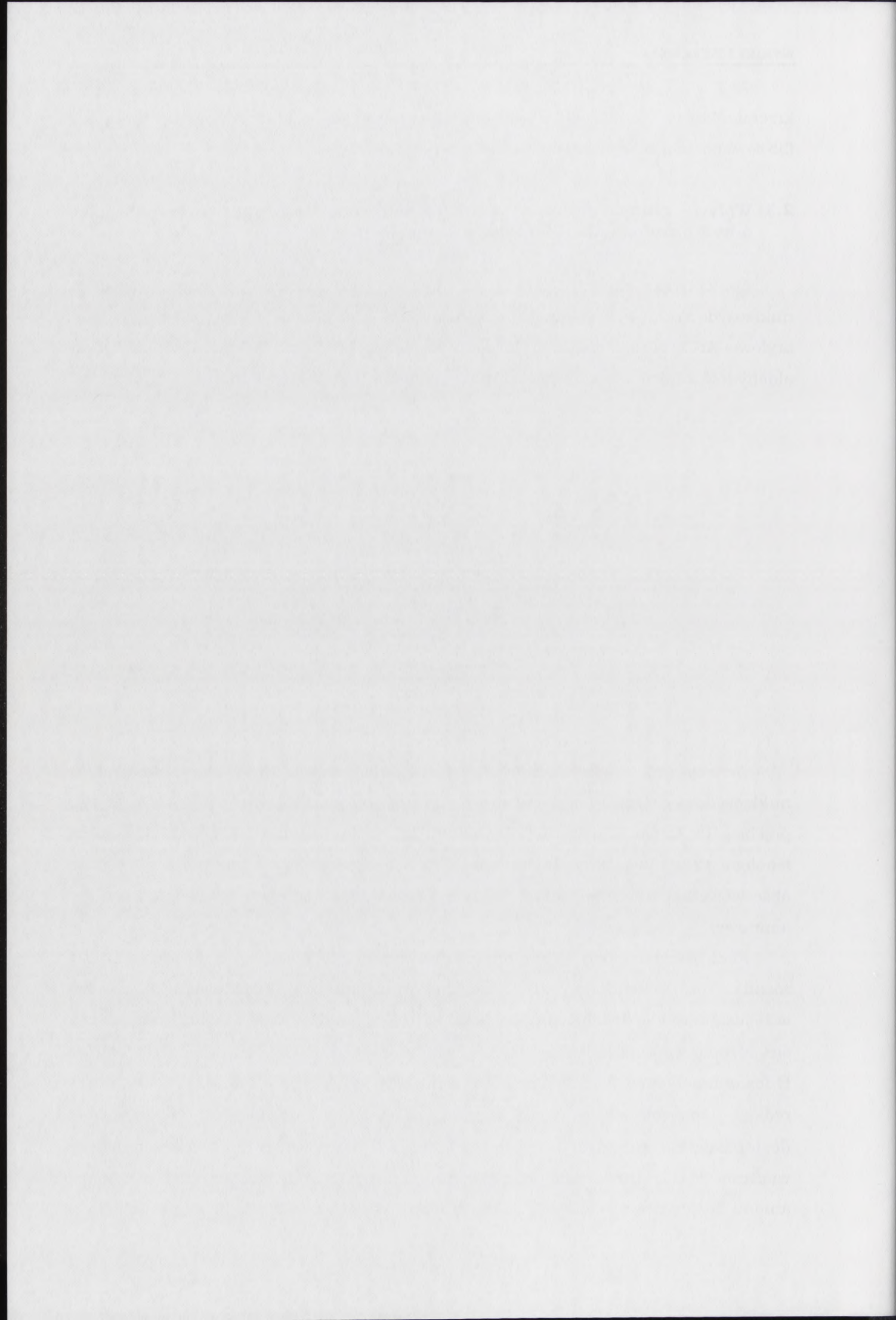
Następnym etapem prac nad syntezą α -hydroksyfosfonianów aryłowo nukleozydowych, były badania nad wpływem charakteru fosforoestrowej grupy aryłowej Ar^1 w H-fosfonianie aryłowo nukleozydowym **124** na efektywność addycji do aldehydów a także na właściwości utworzonych α -hydroksyfosfonianów.



Ryc. 62

Generowanie odpowiednich H-fosfonianodiestrów **124** z H-fosfonianu nukleozydowego **122** i podstawionych w pozycji *para*, *orto* lub *meta* fenoli typu **123** przebiegało łatwo i wydajnie podobnie jak w kondensacji z niepodstawionym fenolem **123a**. Wyjątkiem była reakcja z 4-aminofenolem **123c** (Ryc. 62), gdzie obserwowałam uboczne reakcje, będące prawdopodobnie efektem obecności grupy aminowej.

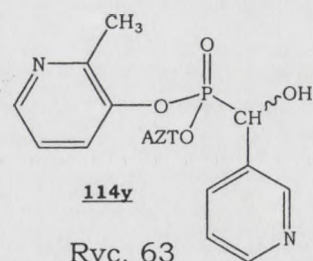
Reaktywność powyższych diestrów z 4-metoksybenzaldehydem znacznie się różniła, co przypisuję zróżnicowanej nukleofilowości centrum fosforowego w H-fosfonianodiestrach typu **124** (Ryc. 62). W obecności Et₃N, różnice te objawiały się przede wszystkim w szybkości reakcji addycji. Najwolniej (20 h) reagował H-fosfonianodiester 4-metylofenylowo nukleozydowy **124d** (Ryc. 62). Tak długi czas reakcji spowodowany był najprawdopodobniej obecnością podstawnika dostarczającego elektrony ($X = Me$, $\sigma_p = -0,17^{115}$), co powodowało zwiększenie mocy wiązania P-H i utrudniało generowanie reaktywnego, diskutowanego wcześniej anionu fosforynowego. Odwrotny efekt obserwowałam w analogicznych reakcjach



H-fosfonianodiestrów **124f** – **124i** zawierających reszty od bardziej kwasowych fenoli ($X = 4\text{-Cl}$, 4-CF_3 , 4-CN , 4-NO_2), gdzie szybkość addycji tych diestrów do aldehydu wyraźnie wzrastała (najszybsza 15 min dla **124h** i **124i**, ryc. 62). Wprawdzie α -hydroksyfosfoniany **114p** i **114q** ($\text{Ar}^1 = 4\text{-CNPh}$ lub $4\text{-NO}_2\text{Ph}$, $\text{Ar}^2 = 4\text{-CH}_3\text{OPh}$) tworzyły się najłatwiej, ale były jednocześnie najmniej trwałe i ulegały szybkiemu rozpadowi w trakcie prób przerobu mieszanin poreakcyjnych lub oczyszczania na żelu krzemionkowym. Fakt ten tłumaczyłam tym, iż zarówno Ar^1 jak i Ar^2 silnie osłabiają wiązanie P-C w produktach **114p** i **114q**, co prawdopodobnie uniemożliwiało izolację tych związków. Zmniejszenie ilości produktów następczych lub całkowite ich wyeliminowanie uzyskałam, podobnie jak dla reakcji prostego H-fosfonianodiestru fenylogo **124a**, stosując DIPEA zamiast Et_3N .

W diskutowanym kontekście, przeprowadziłam osobną serię doświadczeń (ich podjęcie uzasadniały wyniki badań biologicznych, omawianych w dalszej części rozprawy), w której kondensowałam różne H-fosfonianodiestry **124** (Ryc. 62, $X = 3\text{-N}(\text{Me})_2$, 4-OMe , 4-i-Pr , 2-Me , 2-Et , 2-i-Pr , $2,6\text{-Me}$) z aldehydem nikotynowym. Wszystkie reakcje prowadzone wobec 2,6-lutydyny zachodziły ilościowo w czasie 24-40 godz., zależnie od rodzaju oraz położenia podstawnika(ów) X w pierścieniu aromatycznym H-fosfonianodiestru **124**. Powyższe związki po przerobieniu i oczyszczaniu, w warunkach opracowanych dla α -hydroksy-(3-pirydylo)-metanofosfonianów typu **114i**, uzyskiwałam z wydajnościami 50-70% jako czyste spektralnie i chromatograficznie preparaty.

Nie powiodło się natomiast otrzymanie α -hydroksyfosfonianu **114y** przedstawionego na ryc. 63 w reakcji H-fosfonianodiestru 2-metylo-3-pirydylowo nukleozydowego **124o** (Ryc. 58) i aldehydu nikotynowego na skutek tworzenia dużej ilości produktów następczych (ponad 50%, ^{31}P NMR). Wynikało to prawdopodobnie z charakteru grupy 2-metylo-3-pirydylowej, silnie wyciągającej elektrony i, co z tym związane, aktywacji grupy hydroksylowej w powstałym α -hydroksyfosfonianie **114y**, który reagował z obecnym w mieszaninie H-fosfonianodiestrem. Ponadto α -hydroksyfosfonian okazał się nietrwały podczas przerobu, rozkładając się do trudnych do zidentyfikowania związków (multiplety $\delta_{\text{P}} \sim 9$ i 11 ppm).



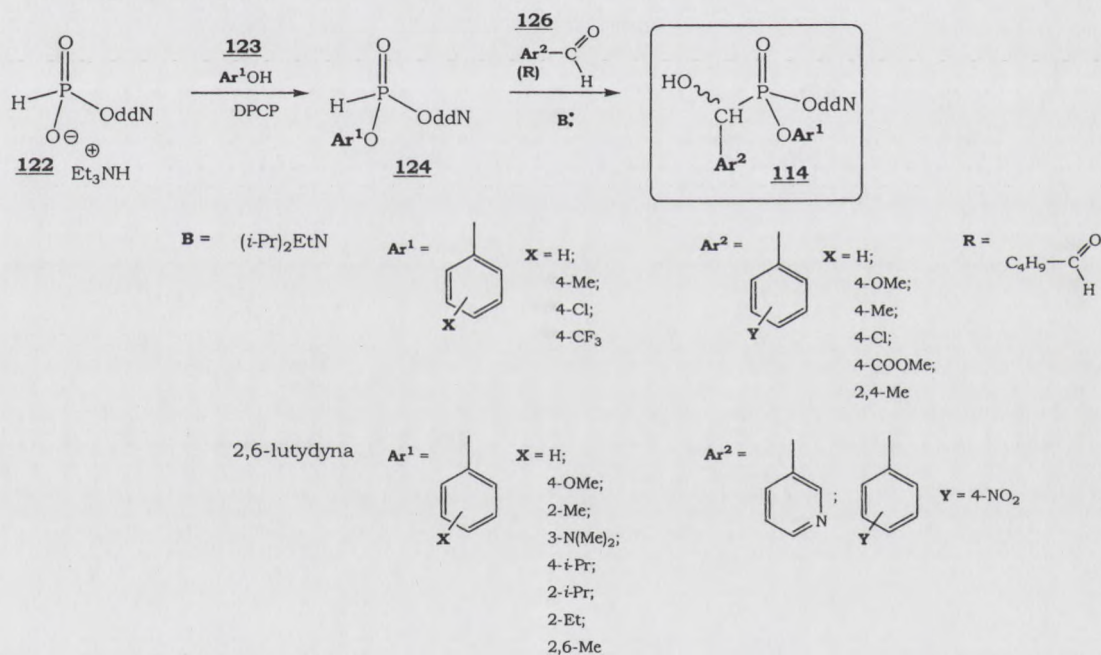
Ryc. 63

Kończąc opisywanie tego fragmentu badań mogę podsumować, że opracowałam proste i wydajne metody otrzymywania α -hydroksyfosfonianów

[The body of the document contains extremely faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.]

arylowo nukleozydowych, z wyjątkiem pochodnych zawierających podstawniki silnie wyciągające elektrony w części fosforoestrowej. Ustaliłam, że w syntezie α -hydroksyfosfonianów pochodnych aldehydów alifatycznych, benzaldehydu niepodstawionego oraz z podstawnikami dostarczającymi elektrony lub słabo wyciągającymi elektrony, reakcje należy prowadzić wobec DIPEA. Natomiast w przypadku aldehydów z podstawnikami silnie wyciągającymi elektrony reakcje addycji zachodzą najlepiej w obecności 2,6-lutydyny. Wprowadzenie różnych grup arylowych w części fosforoestrowej nie wymagało opracowania warunków odmiennych od tych prowadzonych z niepodstawionym fenolem (Ryc. 64).

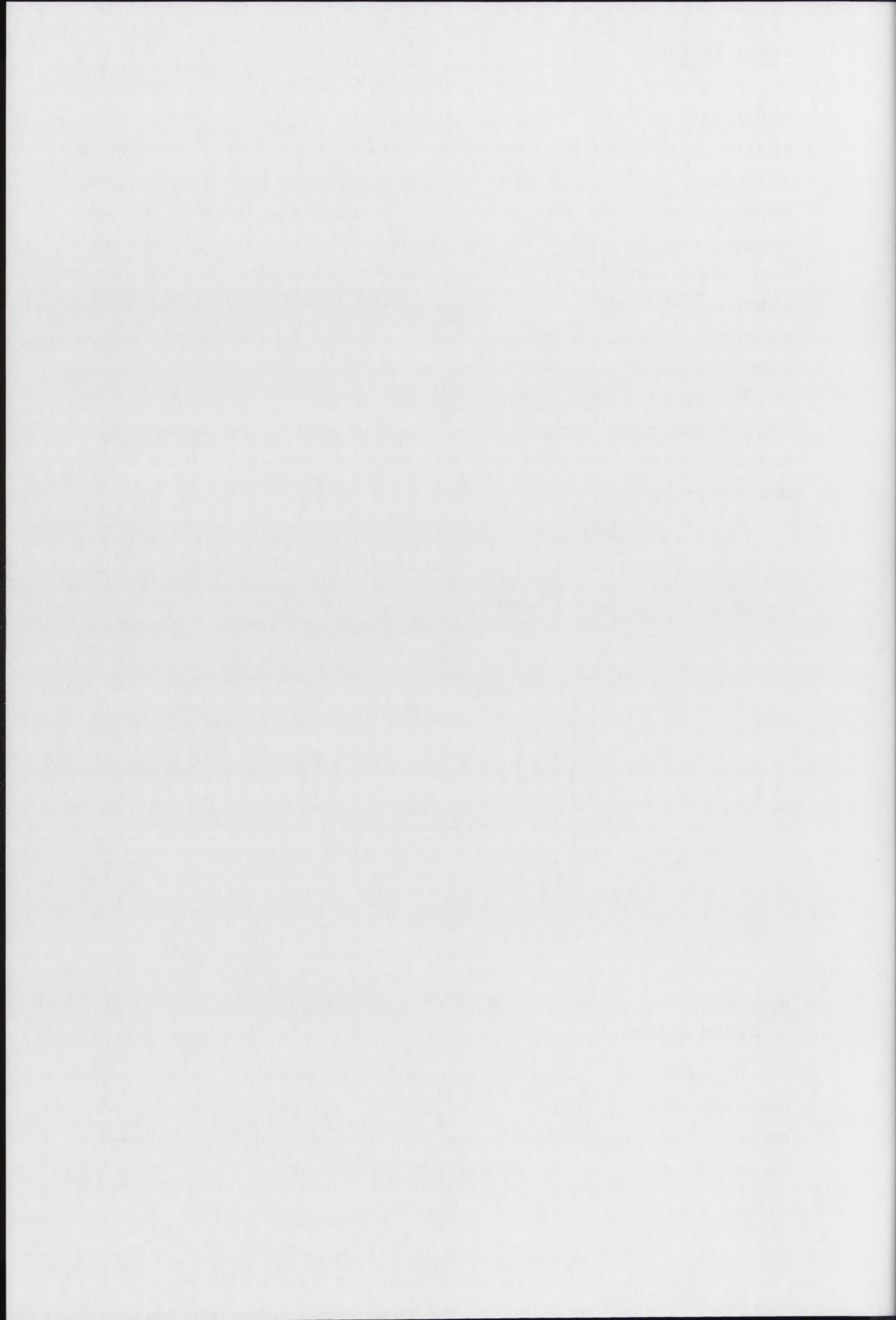
Te łagodne i efektywne warunki reakcji pozwoliły mi otrzymać serię α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych, gotowych do dalszych badań fizykochemicznych i biologicznych, a także wykorzystania ich do syntezy bardziej złożonych pochodnych.



Ryc. 64

3. Badania nad rozkładem α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych

W projektowaniu związków o potencjalnym zastosowaniu jako proleki niezwykle ważne jest poznanie sposobu ich rozkładu chemicznego i/lub enzymatycznego, prowadzącego do generowania związków aktywnych biologicznie. Pozwala to na lepszą interpretację badań biologicznych *ex* i *in vivo* oraz



skorelowanie budowy i mechanizmu rozkładu związków z ich potencjalną aktywnością.

Pierwsze dane o ścieżkach rozkładu α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych uzyskałam umieszczając je w mieszaninie $\text{CH}_3\text{CN} : \text{Et}_3\text{N} : \text{H}_2\text{O}$ [2 : 1 : 1 (v/v/v)]. Korzyścią z zastosowania tej mieszaniny (pH \approx 12) była możliwość szybkiego otrzymywania wstępnych informacji o produktach i kierunku rozkładu α -hydroksyfosfonianów, nie tylko w tak silnie zasadowym warunkach. Ponadto, ze względu na dobrą rozpuszczalność α -hydroksyfosfonianów we wspomnianej mieszaninie możliwe było śledzenie reakcji rozkładu tych związków za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR.

Powyzsze medium reakcyjne dalekie było jednak od warunków badań biologicznych, dlatego stabilność α -hydroksyfosfonianów obserwowałam w medium hodowlanym komórek - RPMI-1640* (pH = 7,6) oraz w mieszaninie RPMI-1640 z 10% objętościowymi surowicy z płodów bydłych (FBS) - RPMI/FBS. Do badań tych stosowałam 2 mM roztwory α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych w powyższych mediach zawierających 5% DMSO (v/v). Próbki te były następnie inkubowane w 37 °C, a rozkład związków śledzony za pomocą HPLC. Tworzące się produkty rozkładu identyfikowałam przez dodawanie do próbek odpowiednich wzorców, które otrzymywałam w niezależnych syntezach. Wyniki tych obserwacji były przedmiotem moich dalszych rozważań nad niektórymi właściwościami α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych.

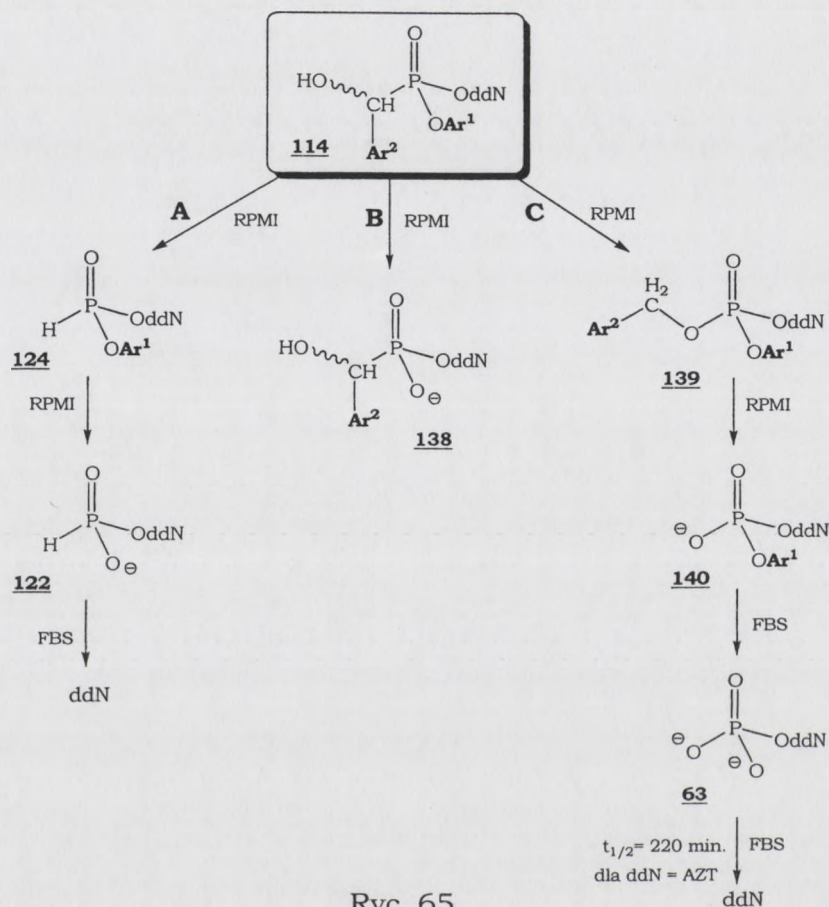
3.1 Sposób rozkładu α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych

Wszystkie α -hydroksyfosfoniany arylo nukleozydowe typu **114** okazały się stosunkowo nietrwałe ($t_{1/2}$ = 7-40 min, z wyjątkiem pochodnej aldehydu walerianowego $t_{1/2} \approx$ 100 min) w medium hodowlanym komórek (RPMI/FBS) a ich sposób rozkładu zależał od grupy Ar^2 w części hydroksymetanowej oraz rodzaju grupy arylowej Ar^1 w części fosforoestrowej.

α -Hydroksyfosfoniany arylo nukleozydowe typu **114** rozkładają się na trzech różnych drogach (**A**, **B** i **C**) (Ryc. 65). Ścieżka **A** zapoczątkowana jest najprawdopodobniej spontaniczną dysocjacją α -hydroksyfosfonianów do wyjściowego H-fosfonianodiestru i odpowiedniego aldehydu, ścieżka **B** jest efektem hydrolizy wiązania fosforoestrowego z odejściem grypy arylowej, natomiast ścieżka **C**

* skład RPMI-1640 podany jest w suplemencie niniejszej pracy

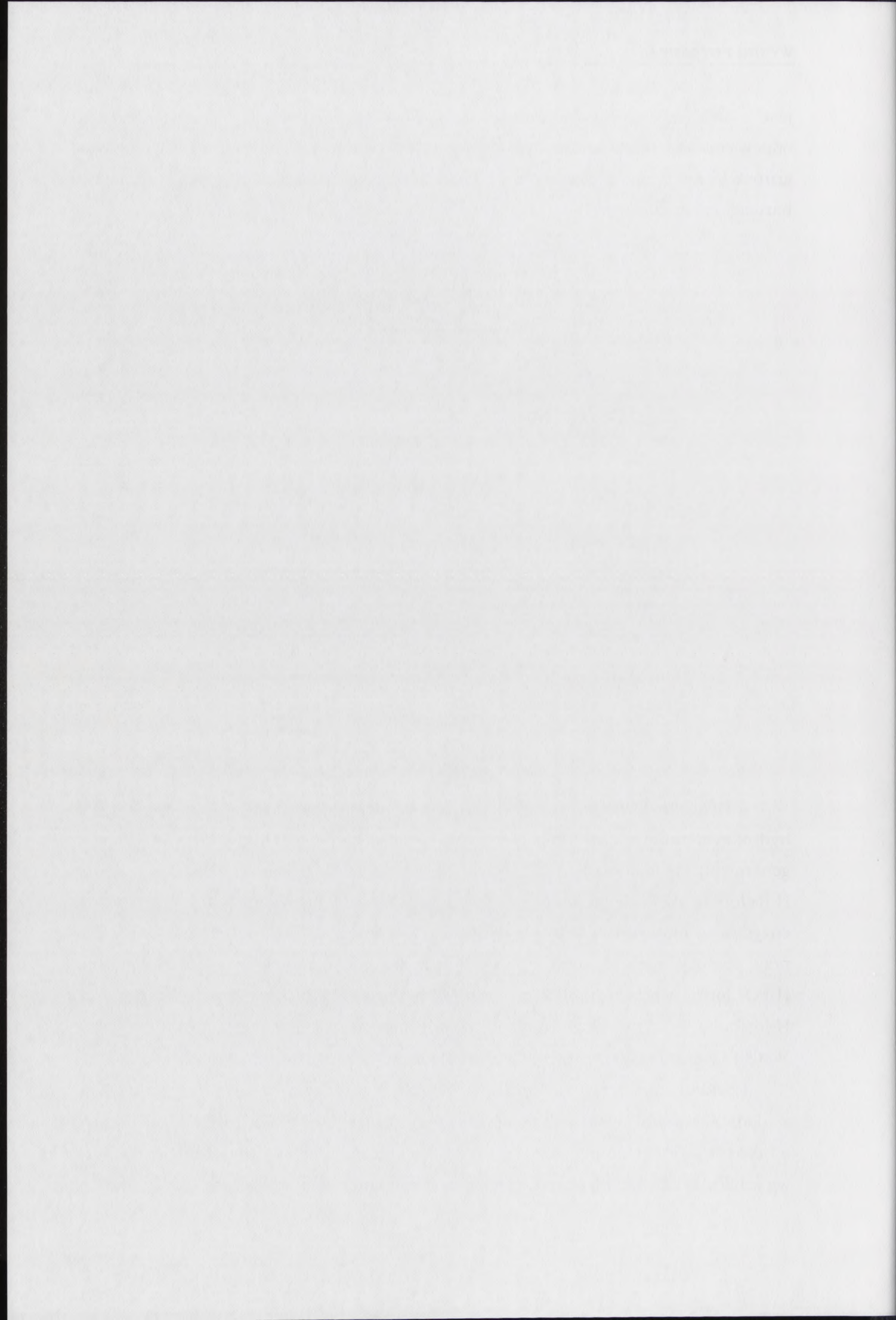
jest efektem przegrupowania fosfoniano-fosforanowego z utworzeniem odpowiedniego fosforanotriestru typu **139**. W zależności od natury elektronowej grup Ar^1 i Ar^2 udział poszczególnych sposobów rozkładu związków **114** był mniej lub bardziej zróżnicowany.



Ryc. 65

α -Hydroksyfosfoniany z podstawnikami dostarczającymi elektrony w części hydroksymetanowej Ar^2 ulegały rozkładowi wyłącznie według ścieżki **A** i szybko generowały H-fosfonian AZT. Jeżeli RPMI zawierał dodatek FBS, to powstały H-fosfonian AZT ulegał wolnej defosforylacji do AZT prawdopodobnie przy udziale enzymów o aktywności 5'-nukleotydazowej obecnych w FBS. Obserwacja tej reakcji przy pomocy spektroskopii ^{31}P NMR wykazała tworzenie się kwasu fosfonowego H_3PO_3 [ortofosforowego(III)] a nie ortofosforowego(V) H_3PO_4 , co może wskazywać, że H-fosfonian AZT nie ulega utlenieniu do fosforanu AZT (jak to sugerował wcześniej Boal⁹¹) i jest raczej formą „depozytu nukleozydu” a nie pronukleotydem.⁹⁰

Rozkład α -hydroksyfosfonianów, w których grupa Ar^2 jest grupą aryłową z podstawnikami elektronoakceptorowymi ($Ar^2 = 4-NO_2Ph$, $4-ClPh$, 3-pirydył), a także związku referencyjnego ($R = C_4H_9$), przebiega nie tylko wg szlaku **A**, ale także wg szlaku **B** i **C**. α -Hydroksy- α -(4-chlorofenylo)metanofosfonian **114e** ($Ar^1 = Ph$, $Ar^2 =$



4-ClPh) generował w przeważającej ilości (92%) H-fosfonian AZT (ścieżka **A**), lecz również α -hydroksyfosfonianowy monoester typu **138**, produkt rozkładu wg ścieżki **B**. Udział hydrolizy wiązania fosfoestrowego jest znacznie większy, gdy grupą **Ar²** jest podstawnik butylowy (**114i**, 53%) lub 3-pirydylowy (**114i**, 45%). W przypadku α -hydroksyfosfonianów pochodnych benzaldehydu z podstawnikami silnie wyciągającymi elektrony (**Ar²** = 4-NO₂Ph), obserwowaliśmy także szlak rozkładu **C**, przebiegający z przegrupowaniem fosfoniano-fosforanowym. Produkt tego przegrupowania, fosforanotriester fenylowo 4-nitrobenzylowo nukleozydowy **139s**, ulega dalej w RPMI/FBS wolnej, chemoselektywnej hydrolizie do fosforanodiestru fenylowo nukleozydowego, a następnie do monofosforanu AZT i dalej do AZT. Dwie ostatnie przemiany tj. tworzenie AZTMP i jego defosforylacja do AZT są prawdopodobnie reakcjami katalizowanymi przez fosfodiesterazy i fosfatazy z FBS, a które nie zachodzą w samym RPMI (oba związki były stabilne przez co najmniej 6 dni).

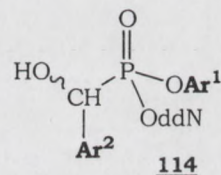
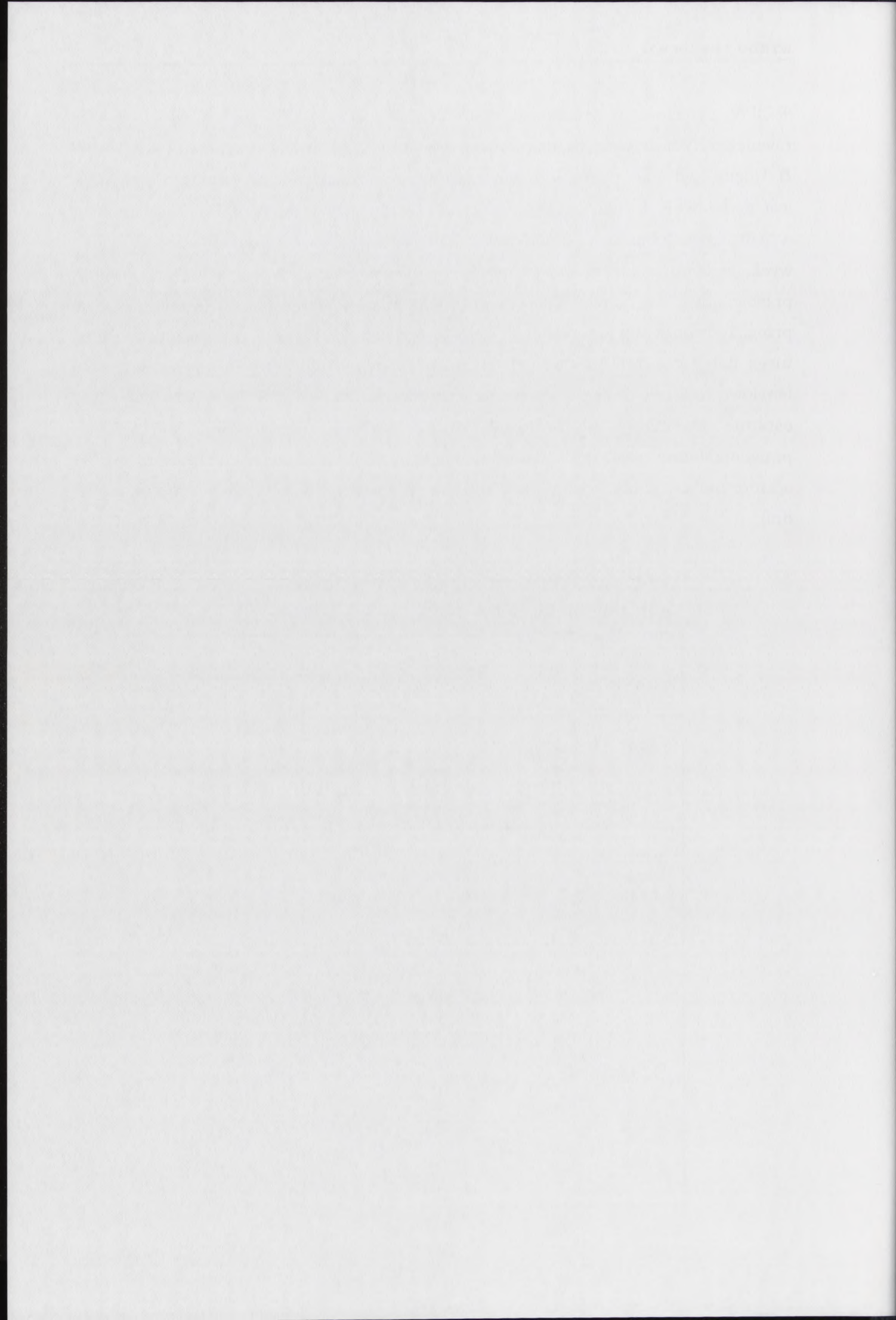
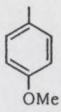
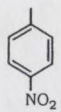

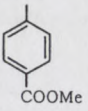

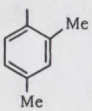
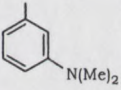



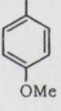

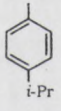

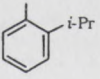





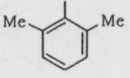


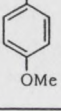
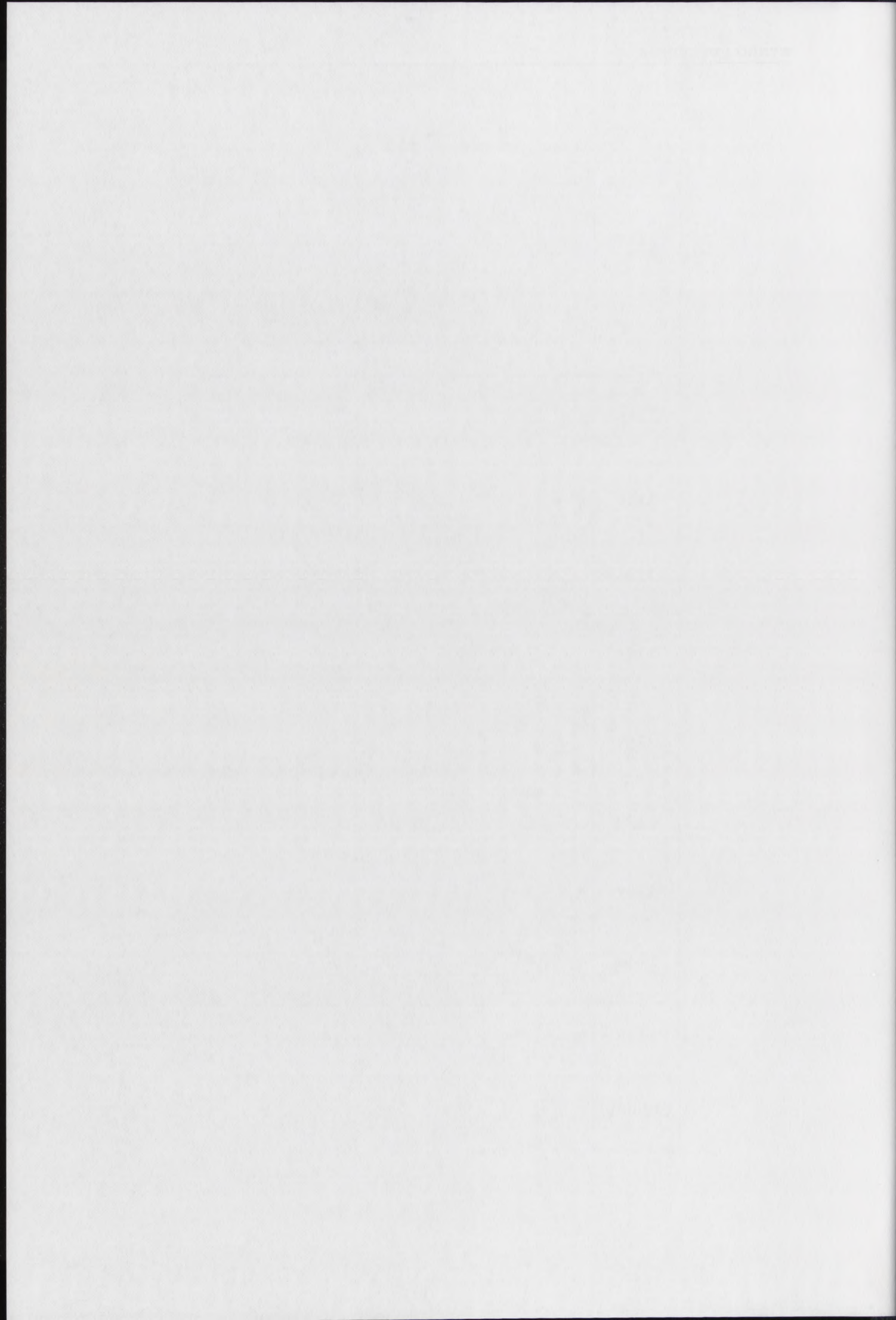


Tabela 2. Czasy połowiczne i sposób rozkładu α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych

Nr związku	Ar ²	Ar ¹	t _{1/2} [min] RPMI/FBS	Ścieżka		
				A (%)	B (%)	C (%)
114i		-C ₄ H ₉	102	47	53	—
114a			27	100	—	—
114b			13	100	—	—
114c			19	100	—	—
114e			13	92	8	—
114d			9	24	47	29



Nr związku	Ar ²	Ar ¹	t _{1/2} [min] RPMI/FBS	Ścieżka		
				A (%)	B (%)	C (%)
114z			7	45	33	21
114f			44	36	64	—
114h			13	100	—	—
114r			42	44	56	—
114i			16	55	45	—
114s			26	58	42	—
114t			30	65	35	—
114u			41	72	28	—
114v			33	69	31	—
114w			29	66	34	—
114x			58	100	—	—
114(ddU)			26	100	—	—



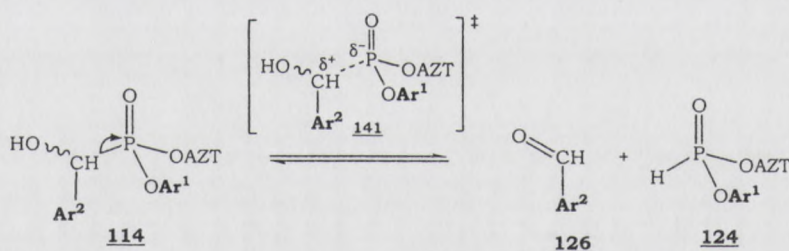
Po przebadaniu α -hydroksyfosfonianów fenylo- nukleozydowych otrzymanych z różnych aldehydów, interesowało mnie również, jak modyfikacje w części fosfoestrowej wpłyną na trwałość wiązania P-O, a w konsekwencji na rozkład α -hydroksyfosfonianów. W tym celu porównałam udział produktów rozkładu α -hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonianu ($\text{Ar}^2 = 3\text{-pirydyl}$) oraz α -hydroksy- α -(4-nitrofenylo)metanofosfonianu ($\text{Ar}^2 = 4\text{-NO}_2\text{Ph}$) z różnymi podstawnikami $\text{Ar}^1 =$ fenyl ($\text{pK}_a = 9,98$)¹²⁰, 4-metoksyfenyl ($\text{pK}_a = 10,05$)¹²¹, 4-*i*-propylofenyl ($\text{pK}_a = 10,37$)¹²², 2-metylofenyl ($\text{pK}_a = 9,82$)¹²¹, 2-etylofenyl ($\text{pK}_a = 10,20$)¹²¹, 2-*i*-propylofenyl ($\text{pK}_a = 10,34$)¹²¹, 2,6-dimetylofenyl ($\text{pK}_a = 10,59$)¹²⁰. Jak się okazało zastąpienie fenylu grupą *p*-metoksyfenylową nie zmieniło znacząco sposobu degradacji związku. Większy udział (do 72%) spontanicznej dysocjacji α -hydroksyfosfonianu (ścieżka **A**) mogłam zaobserwować, kiedy podstawnikiem Ar^1 był 4-izopropylofenyl (**114t**), 2-metylofenyl (**114w**), 2-etylofenyl (**114v**) lub 2-izopropylofenyl (**114u**). Natomiast zastąpienie grupy fenolowej 2,6-dimetylofenylową (**114x**) całkowicie wyeliminowało hydrolytyczny rozkład α -hydroksyfosfonianów wg szlaku **B**. Może to sugerować, że czynnik elektronowy podstawnika nie odgrywa w tej reakcji tak dużej roli, jak można się było spodziewać. Istotna wydaje się być obecność dwóch grup metylowych w położeniu *orto*, które mogą utrudniać solwatację odchodzącej grupy aryloksylowej, przez co reakcja hydrolizy [najprawdopodobniej wg mechanizmu $\text{S}_\text{N}2(\text{P})$] nie jest prawdopodobnie uprzywilejowana. Wprowadzenie podstawników silnie dostarczających elektrony wpływa natomiast wyraźnie na zwiększenie trwałości α -hydroksyfosfonianów ($t_{1/2} = 16$ min dla $\text{Ar}^1 = \text{Ph}$; 26 min dla $\text{Ar}^1 = 4\text{-CH}_3\text{OPh}$ i 58 min dla $\text{Ar}^1 = 2,6\text{-CH}_3\text{Ph}$).

Badania nad rozkładem α -hydroksyfosfonianów arylo- nukleozydowych zakończyłam eksperymentami w środowisku silnie kwasowym, $\text{pH} = 2,0$. Analizy HPLC wykazały dużą trwałość (ponad 6 dni) wszystkich badanych α -hydroksyfosfonianów typu **114** w tym silnie kwasowym środowisku.

3.2 Możliwe mechanizmy rozkładu α -hydroksyfosfonianów arylo- nukleozydowych

Różny sposób rozkładu α -hydroksyfosfonianów zależny od ich struktury oraz udziału poszczególnych ścieżek reakcyjnych można wyjaśnić analizując możliwe mechanizmy tych reakcji.

Ścieżka **A**, prowadząca do H-fosfonianów nukleozydów i dalej do odpowiednich nukleozydów, może być istotna z punktu widzenia potencjalnej aktywności antywirusowej α -hydroksyfosfonianów. Ten sposób rozkładu był dominujący w przypadku badanych α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych **114a-114c** i **114e**. Sądzę, że związane jest to z faktem, iż α -hydroksyfosfoniany typu **114** znajdują się w stanie równowagi z odpowiednim H-fosfonianodiestrem typu **124** i aldehydem typu **126** (Ryc. 66). Równowaga ta w środowisku kwasowym i obojętnym jest silnie przesunięta w lewo, natomiast już w słabo zasadowych warunkach hydrolytycznych dochodzi do szybkiej hydrolizy tworzącego się H-fosfonianodiestru typu **124** do H-fosfonianu nukleozydu **122**, co powoduje przesuwanie równowagi w prawo. Tworzenie się H-fosfonianodiestru typu **124** i aldehydu typu **126** z α -hydroksyfosfonianu typu **114** może zachodzić przez stan przejściowy **141** o charakterze karbokationu tworzącego się na skutek pęknięcia wiązania P-C (Ryc. 66). Można przypuszczać, że będą temu szczególnie sprzyjały podstawniki dostarczające elektrony ($\text{Ar}^2 = 4\text{-CH}_3\text{OPh}$ lub $4\text{-CH}_3\text{Ph}$), co tłumaczy rozkład α -hydroksyfosfonianów **114a - 114c** wyłącznie wg ścieżki **A** (Tabela 2).



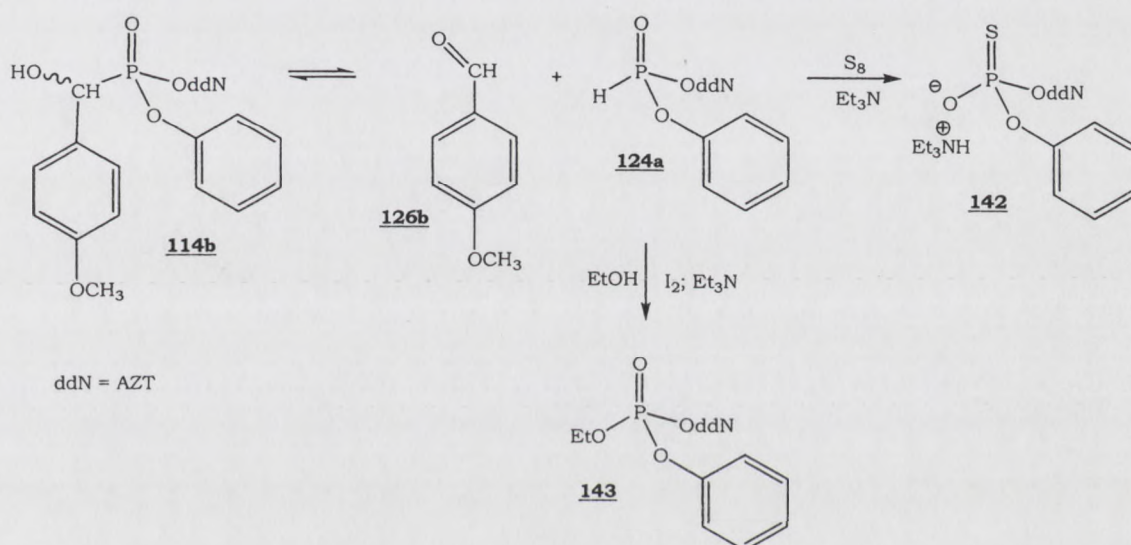
Ryc. 66

Z uwagi na silne przesunięcie w lewo równowagi pomiędzy α -hydroksyfosfonianem a odpowiednimi substratami, H-fosfonianodiestru występuje prawdopodobnie w stężeniu poniżej poziomu detekcji spektroskopii ^{31}P NMR. Dowodów na istnienie powyższej równowagi szukałam więc w reakcjach, które mogłyby potwierdzić generowanie diestru typu **124** z α -hydroksyfosfonianu typu **114**.

W jednej z takich reakcji traktowałam α -hydroksy- α -(4-metoksyfenylo)metanofosfonian fenylowo nukleozydowy siarką elementarną w mieszaninie chlorku metylenu z trietyloaminą [9 : 1, (v/v)]. Wykonane po nocy widmo ^{31}P NMR wykazało całkowity zanik α -hydroksyfosfonianu (cztery sygnały przy około 20 ppm) i pojawienie się dwóch singletów w regionie typowym dla tiofosforanodiestrów arylo nukleozydowych (dwa diastereoizomery, $\delta_{\text{P}} = 52,8$ i $53,5$ ppm).¹²³ Po

przerobie wyizolowałam z mieszaniny reakcyjnej, a następnie scharakteryzowałam (TLC, ^1H , ^{31}P NMR) dwa związki: 4-metoksybenzaldehyd oraz tiofosforanodiester 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenyłowy **142** (Ryc. 67).

W innym eksperymencie, α -hydroksy- α -(4-metoksyfenylo)metanofosfonian fenyłowo nukleozydowy po rozpuszczeniu w mieszaninie bezwodnego etanolu i trietyloaminy [3 : 1, (v/v)] i dodaniu 2 ekwiwalentów molowych jodu, przereagował całkowicie (24 godz., ^{31}P NMR) do fosforanotriestru etylowo fenyłowo nukleozydowego **143** (Ryc. 67).



Ryc. 67

Tworzenie się tiofosforanodiestru **142** i fosforanotriestru **143** w opisanych powyżej reakcjach wskazuje na obecność w mieszaninach reakcyjnych H-fosfonianodiestru fenyłowo nukleozydowego **124a**. Związek ten w reakcji z siarką elementarną tworzy tiofosforan **142**, natomiast w obecności jodu ulega utleniającej kondensacji z etanolem tworząc fosforanotriester **143**.

Za istnieniem postulowanej równowagi przemawiał również wpływ dodanego 4-metoksybenzaldehydu (10 ekw. molowych) na rozkład α -hydroksyfosfonianu **114b** w mieszaninie CH₃CN : Et₃N : H₂O [2 : 1 : 1, (v/v/v)] (Ryc. 68). W tych warunkach produktem rozkładu, charakterystycznym dla tego rodzaju α -hydroksyfosfonianu **114b**, nie był wyłącznie H-fosfonian AZT **122** (ścieżka **A**), lecz także α -hydroksyfosfonianowy monoester **138b** (ścieżka **B**). Obecność aldehydu najprawdopodobniej przesunęła postulowaną równowagę silnie w lewo, w kierunku α -hydroksyfosfonianu, co powinno sprzyjać hydrolizie wiązania fosforoestrowego.

Wyniki badań nad związkami 132 i 133 przedstawiono w tabeli 1. Związek 132 wykazuje silny efekt przeciwnowotworowy, natomiast związek 133 wykazuje słaby efekt przeciwnowotworowy.

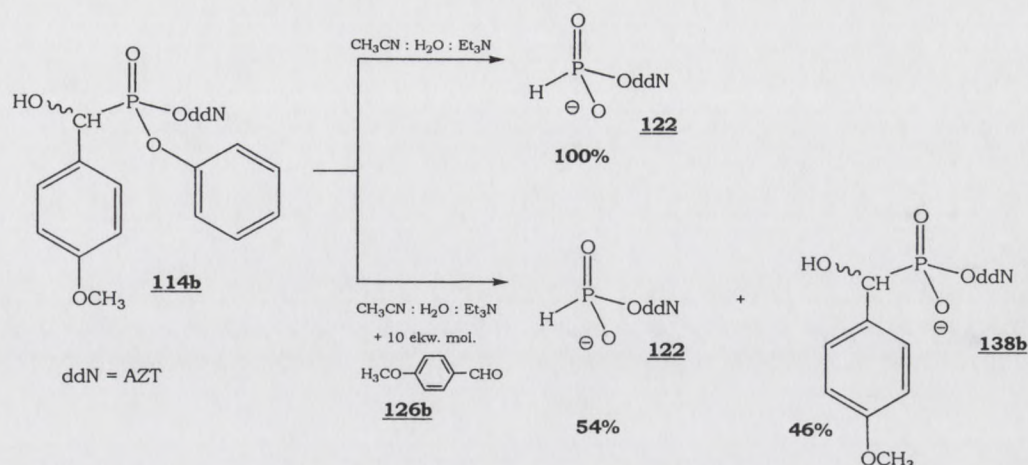
W innych eksperymentach wykazano, że związek 132 wykazuje silny efekt przeciwnowotworowy, natomiast związek 133 wykazuje słaby efekt przeciwnowotworowy. Wyniki badań nad związkami 132 i 133 przedstawiono w tabeli 1. Związek 132 wykazuje silny efekt przeciwnowotworowy, natomiast związek 133 wykazuje słaby efekt przeciwnowotworowy.



Tabela 1

Tabela 1 przedstawia wyniki badań nad związkami 132 i 133. Wyniki badań nad związkami 132 i 133 przedstawiono w tabeli 1. Związek 132 wykazuje silny efekt przeciwnowotworowy, natomiast związek 133 wykazuje słaby efekt przeciwnowotworowy.

Wyniki badań nad związkami 132 i 133 przedstawiono w tabeli 1. Związek 132 wykazuje silny efekt przeciwnowotworowy, natomiast związek 133 wykazuje słaby efekt przeciwnowotworowy. Wyniki badań nad związkami 132 i 133 przedstawiono w tabeli 1. Związek 132 wykazuje silny efekt przeciwnowotworowy, natomiast związek 133 wykazuje słaby efekt przeciwnowotworowy.

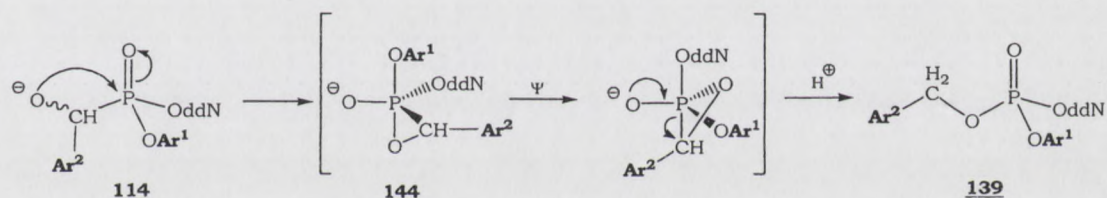


Ryc. 68

Szlak **B** w rozkładzie α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych typu **114** polegał na pękaniu wiązania fosforoestrowego, a jego udział zależał zarówno od rodzaju grupy Ar^2 jak i Ar^1 . Łatwe tworzenie α -hydroksyfosfonianowych monoestrów obserwowałam w przypadku pochodnych posiadających podstawniki elektonoakceptorowe ($\text{Ar}^2 = 4$ -chlorofenyl, 4-nitrofenyl i 3-pirydył), gdyż obecność tych podstawników mogła ułatwiać atak nukleofilowy na atom fosforu z odejściem odpowiedniej grupy aryloksylowej OAr^1 . Stwierdziłam także zmniejszanie udziału hydrolizy ze wzrostem wartości pK_a grupy odchodzącej OAr^1 (odpowiednio: $\text{Ar}^1 =$ fenyl, 4-metoksyfenyl, 4-*i*-propylofenyl). Różne podstawniki alkilowe w pozycji *orto* w grupie Ar^1 (2-metylofenyl, 2-etylofenyl i 2-*i*-propylofenyl) w α -hydroksyfosfonianach pochodnych 3-pirydynokarboaldehydu, nie wpływały znacząco na obniżenie ilości produktu hydrolizy wiązania P-O (około 30% monoestru dla *orto*-propylowego i 35% dla *para*-propylowego). Jak już wcześniej wspomniałam, całkowity zanik rozkładu wg ścieżki **B** obserwowałam dopiero w przypadku estru 2,6-dimetylofenylowego, co jak sądzę, związane było raczej z czynnikiem sterycznym, a nie ze zmianą wartości pK_a grupy 2,6-dimetylofenoksylowej.

Duża ilość produktu hydrolizy wiązania fosforoestrowego (53%) charakterystyczna była również dla α -hydroksyfosfonianu **1141** otrzymanego z aldehydu walerianowego. W przypadku tego związku nie występują omawiane wcześniej czynniki elektronowe wspomagające pęknięcie wiązania P-C (mała trwałość powstałego wtedy związku o charakterze karbokationu) co sprzyja rozkładowi z dużym udziałem ścieżki **B**.

Ścieżka **C**, związana z tworzeniem fosforanotriestrów, obserwowana była wcześniej przez C. Meiera również w przypadku rozkładu α -hydroksyfosfonianów dinukleozydowych.⁹⁶ Wydaje się, że warunkiem koniecznym uruchomienia tego sposobu rozkładu α -hydroksyfosfonianów jest obecność grupy **Ar²** silnie wyciągającej elektrony (np. **Ar²** = 4-nitrofenyl) w hydroksymetanowym fragmencie cząsteczki. Jednym z możliwych mechanizmów tego przegrupowania fosfoniano-fosforanowego mógłby być wewnątrzcząsteczkowy atak nukleofilowy grupy hydroksylowej (lub odpowiedniego anionu) na centrum fosforowe z pęknięciem wiązania P-C w α -hydroksyfosfonianach **114d** i **114z**. Przekształcenie to prawdopodobnie wymagałoby tworzenia wysoce zdeformowanego związku przejściowego (bipiramidy trygonalnej) z epitenkiem w pozycji ekwatorialno-apikalnej **144**. Bipiramida ta ulegałaby następnie pseudorotacji, dzięki której atom węgla musiałby zająć pozycję apikalną, umożliwiając pęknięcie wiązania P-C (Ryc. 69).¹²⁴

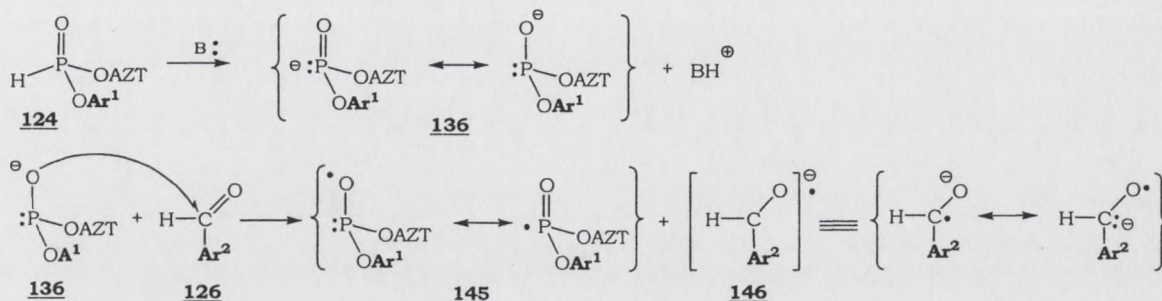


Ryc. 69

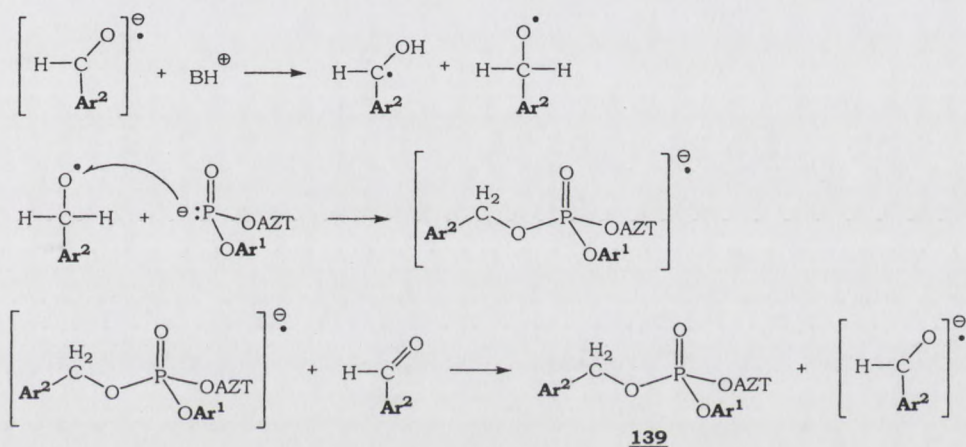
Tworzenie się tak niekorzystnie energetycznie struktury **144** nasuwało podejrzenie, że powstawanie triestru może zachodzić wg innego mechanizmu np. z przeniesieniem pojedynczego elektronu (single electron transfer; SET).

W możliwym mechanizmie z udziałem SET (Ryc. 70) założyłam istnienie równowagi pomiędzy α -hydroksyfosfonianodiestrem typu **114** a H-fosfoniano-diestrem **124** i aldehydem (Ryc. 66 str.71). W środowisku zasadowym z H-fosfoniano-diestru **124** generowany jest anion **136**, który może być dobrym donorem pojedynczego elektronu.¹²⁵ Z anionu tego może więc zostać przeniesiony pojedynczy elektron na elektrofilową grupę karbonylową aldehydu **126**, generując rodnik **145** typu $\text{L}_2\text{P}^{\bullet}=\text{O}$ ¹²⁶ i anionrodnik **146** z odpowiedniego aldehydu. W ten sposób może dochodzić do inicjacji reakcji łańcuchowej, a podczas jej dalszego przebiegu do tworzenia obserwowanego fosforanotriestru **139**.

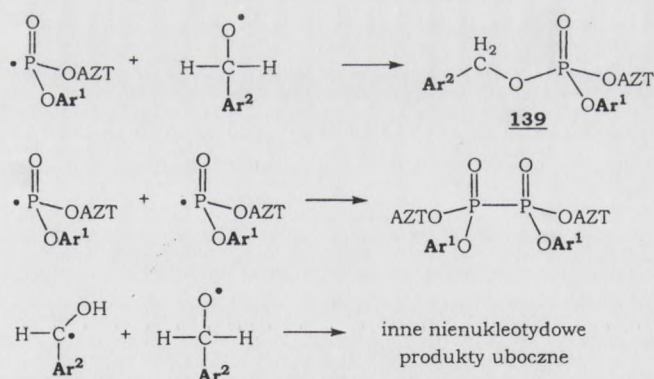
Inicjacja



Propagacja



Terminacja



Ryc. 70

Aby potwierdzić przebieg reakcji wg mechanizmu SET, a szczególnie żeby wykluczyć konkurencyjny mechanizm S_N2, przeprowadza się zwykle reakcje w obecności wychwytywaczy rodników lub anionorodników, co powinno znacznie spowolnić lub całkowicie zapobiec tworzeniu się produktów. Zastosowany przeze mnie wychwytywacz anionorodników, *p*-dinitrobenzen (PDB) (0,132¹²⁵ - 2 ekw.

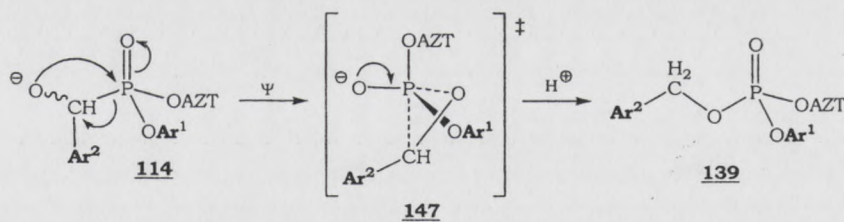


ANALIZA
 WYKONANIE PRAC
 W OBLASCI
 SPRAWNOŚCI
 PRACOWNIKÓW

molowych) w środowisku rozkładu α -hydroksy- α -(4-nitrofenylo)metanofosfonianu 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenyłowego **114d** [mieszanina CH₃CN : H₂O : Et₃N [2 : 1 : 1 (v/v/v)], nie spowodował widocznej zmiany w ilości powstałego fosforanotriestru **139s** (50%, ³¹P NMR). Możliwe są przynajmniej dwie interpretacje. Pierwsza, że wychwytywacz anionorodników nie był dość reaktywny, aby wyłapać cząstki, które odpowiadają za inicjację lub propagację reakcji. Mógł on wówczas reagować z innymi anionorodnikami obecnymi w mieszaninie reakcyjnej, dając zakłamywany wynik doświadczenia.¹²⁷ Drugim wytłumaczeniem może być oczywiście fakt, że mechanizm typu SET nie miał miejsca w przypadku badanej reakcji.

Innym sposobem sprawdzenia, czy reakcja ma przebieg rodnikowy jest zbadanie jej wrażliwości na światło. Przeprowadzona przeze mnie reakcja rozkładu α -hydroksyfosfonianu **114d** w ciemności zachodziła jednak podobnie jak reakcja kontrolna przebiegająca przy świetle dziennym.

W tej sytuacji rozważanym przez mnie sposobem tworzenia się fosforanotriestru **139** z α -hydroksyfosfonianodiestru typu **114** było przegrupowanie fosfoniano-fosforanowe, lecz o nieco innym niż wcześniej opisałam przebiegu. Aby doszło do powstania produktu na drodze o najniższej energii, możliwy mógłby być przebieg reakcji, w której dwa uprzednio opisane etapy tj. tworzenie bipiramidy trygonalnej i jej pseudorotacja zachodzą jednocześnie. Byłby to więc atak nukleofilowy na centrum fosforowe sprzężony z pseudorotacją. Wówczas zniekształcona bipiramida trygonalna **147** byłaby tylko stanem a nie związkiem przejściowym, co byłoby korzystne ze względów energetycznych (Ryc. 71).^{128,129}



Ryc. 71

Ostatnio ukazała się praca¹³⁰ sugerująca, iż przegrupowanie α -hydroksyfosfonianów do fosforanów odbywa się wg mechanizmu przegrupowania typu "phospha-Brook". Przegrupowanie Brooka polega na izomeryzacji α -hydroksysilanów typu **148** do eterów sililowych typu **149** zachodzącej pod wpływem zasad (Ryc. 72).¹³¹

Wzrost w anizotropii w kierunku osi a i b (rys. 1) jest spowodowany różnicą w rozmiarach cząsteczek wzdłuż osi a i b . Wzrost w kierunku osi c jest spowodowany różnicą w rozmiarach cząsteczek wzdłuż osi a i b . Wzrost w kierunku osi a jest spowodowany różnicą w rozmiarach cząsteczek wzdłuż osi a i b . Wzrost w kierunku osi b jest spowodowany różnicą w rozmiarach cząsteczek wzdłuż osi a i b . Wzrost w kierunku osi c jest spowodowany różnicą w rozmiarach cząsteczek wzdłuż osi a i b .

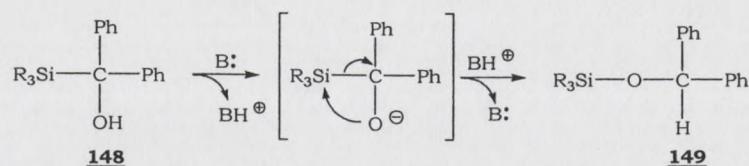
Wzrost w kierunku osi a jest spowodowany różnicą w rozmiarach cząsteczek wzdłuż osi a i b . Wzrost w kierunku osi b jest spowodowany różnicą w rozmiarach cząsteczek wzdłuż osi a i b . Wzrost w kierunku osi c jest spowodowany różnicą w rozmiarach cząsteczek wzdłuż osi a i b .

Wzrost w kierunku osi a jest spowodowany różnicą w rozmiarach cząsteczek wzdłuż osi a i b . Wzrost w kierunku osi b jest spowodowany różnicą w rozmiarach cząsteczek wzdłuż osi a i b . Wzrost w kierunku osi c jest spowodowany różnicą w rozmiarach cząsteczek wzdłuż osi a i b .



rys. VI

Ostatnio okazało się, że procesy... w kierunku osi a i b jest spowodowany różnicą w rozmiarach cząsteczek wzdłuż osi a i b . Wzrost w kierunku osi c jest spowodowany różnicą w rozmiarach cząsteczek wzdłuż osi a i b .



Ryc. 72

Mimo, że sposób powstawania eterów sililowych zbliżony jest do sposobu tworzenia fosforanów z α -hydroksyfosfonianów, nie wiadomo jednak wiele na temat dokładnego przebiegu tego przegrupowania. Wspomniana praca¹³⁰ nie dostarczyła więc znaczących informacji pomocnych w wytłumaczeniu mechanizmu przegrupowania fosfoniano-fosforanowego.

Na podstawie powyższych wyników mogę podsumować, że reaktywność α -hydroksyfosfonianów aryloво nukleozydowych, rozważanych jako potencjalne związki antywirusowe, może być modulowana przez odpowiedni dobór grup **Ar**¹ lub **Ar**². Badania nad stabilnością α -hydroksyfosfonianów w komórkowych mediach hodowlanych wykazały możliwość ich degradacji na trzech różnych drogach **A**, **B** i **C**. W zależności od czynników elektronowych i sterycznych α -hydroksyfosfoniany generują w różnych proporcjach odpowiednie nukleozydy, nukleotydy, fenole oraz aldehydy, które mogą być odpowiedzialne za różną aktywność antywirusową i cytotoksyczność α -hydroksyfosfonianów.

3.3 Rozkład α -hydroksyfosfonianów fenyloво nukleozydowych w mieszaninach reakcyjnych i w trakcie przerobu

Jak opisałam wcześniej, nie udało mi się wyizolować i przebadać α -hydroksyfosfonianów fenyloво nukleozydowych **114j-k** pochodnych 2- i 4-pirydynokarboaldehydu. Na przykładzie α -hydroksyfosfonianu **114k** zaobserwowałam, iż ulegał on rozkładowi już w mieszaninie reakcyjnej lub podczas oczyszczania na żelu krzemionkowym do związku, którego wartość przesunięcia chemicznego

w widmie ³¹P NMR ($\delta_P = -7$ ppm) oraz multipletowość sygnału (tryplet) w widmie sprzężonym wskazywały na fosforanodiester fenyloво nukleozydowy **140a**.

Przypuszczenie to potwierdziłam przez wyizolowanie z mieszaniny reakcyjnej i scharakteryzowanie oraz porównanie tego związku ze wzorcem (¹H NMR, ³¹P NMR,



Wzrost 12

Wzrost 12 przedstawia sposób powstania ciałek silikoniowych. Jest to proces tworzenia hydroksywodorków z 2-hydroksywodorkami. Jest wiadomo jednak wiele na temat hydroksywodorków tego typu. Wzrostanie przez 12 nie dostarcza więc informacji o mechanizmie powstania ciałek silikoniowych.

Na podstawie powyższych wyników należy postawić hipotezę, że ciałka silikoniowe powstają z 2-hydroksywodorków i 2-hydroksywodorków. Wzrost 12 jest to ciałko silikoniowe, które jest modyfikacją przez odpowiedni dodatek grup Si lub Al . Wzrost 12 przedstawia sposób powstania ciałek silikoniowych w warunkach laboratoryjnych. Wzrost 12 jest to ciałko silikoniowe, które jest modyfikacją przez odpowiedni dodatek grup Si lub Al . Wzrost 12 przedstawia sposób powstania ciałek silikoniowych w warunkach laboratoryjnych. Wzrost 12 jest to ciałko silikoniowe, które jest modyfikacją przez odpowiedni dodatek grup Si lub Al .

3.3. Reakcja 2-hydroksywodorków i 2-hydroksywodorków w mieszaninie reakcyjnej i w trakcie powstania ciałek silikoniowych

Jak wiadomo, wzrost 12 jest to ciałko silikoniowe, które jest modyfikacją przez odpowiedni dodatek grup Si lub Al . Wzrost 12 przedstawia sposób powstania ciałek silikoniowych w warunkach laboratoryjnych. Wzrost 12 jest to ciałko silikoniowe, które jest modyfikacją przez odpowiedni dodatek grup Si lub Al . Wzrost 12 przedstawia sposób powstania ciałek silikoniowych w warunkach laboratoryjnych. Wzrost 12 jest to ciałko silikoniowe, które jest modyfikacją przez odpowiedni dodatek grup Si lub Al .

HPLC). Co warte zaznaczenia, wspomniany fosforanodiester powstawał w mieszaninie reakcyjnej z powolnego (około 24 h), ale całkowicie chemoselektywnego rozkładu α -hydroksy- α -(4-pirydylo)metanofosfonianu fenylo- nukleozydowego **114k**.

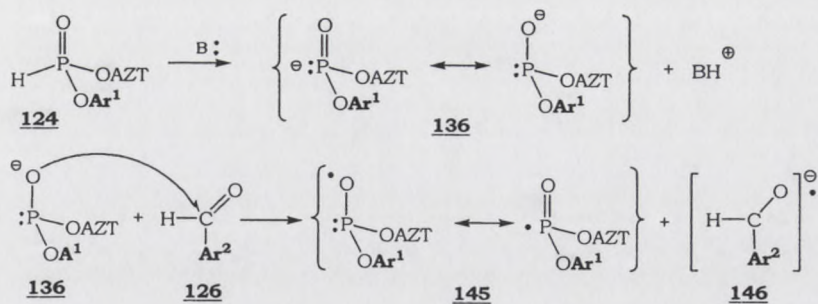
Wynik ten skłonił mnie do zastanowienia się, w jaki sposób fosforanodiester **140a** powstaje w mieszaninie reakcyjnej. Najprostszą i, jak się wydawało na początku, najbardziej oczywistą hipotezą, była hydroliza fosforanotriestru 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylo- (4-pirydylo)metylowego **139r**, który potencjalnie mógł tworzyć się na skutek przegrupowania fosfoniano-fosforanowego α -hydroksyfosfonianu **114k** z silnie wyciągającą elektrony grupą 4-pirydylową. Sygnału od triestru jednak nie obserwowałam (^{31}P NMR), co mogłoby być związane z powolnym jego tworzeniem i bardzo szybką hydrolizą do obserwowanego diestru **140r**.

Innym możliwym sposobem tworzenia diestru **140a** mogłaby być również dealkilacja wspomnianego fosforanotriestru **139r** przebiegająca wg mechanizmu $\text{S}_{\text{N}}2$ (wysoka elektrofilowość metylenowego atomu węgla). Jednak jak pokazały późniejsze doświadczenia, fosforanotriester po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej był trwały przez co najmniej tydzień (^{31}P NMR). W buforze fosforanowym KH_2PO_4 o $\text{pH} = 9$ oraz w RPMI rozkładał się powoli [po 18 dniach jeszcze około 20% triestru **139r** (HPLC)] do dwóch diestrów: fenylo- nukleozydowego **140a** i (4-pirydylo)metylo- nukleozydowego **140r**. Z wyników powyższych doświadczeń mogłam wnioskować, iż tworzenie α -hydroksy- α -(4-pirydylo)metanofosfonianu fenylo- nukleozydowego **114k** nie zachodzi prawdopodobnie przez fosforanotriester jako związek przejściowy.

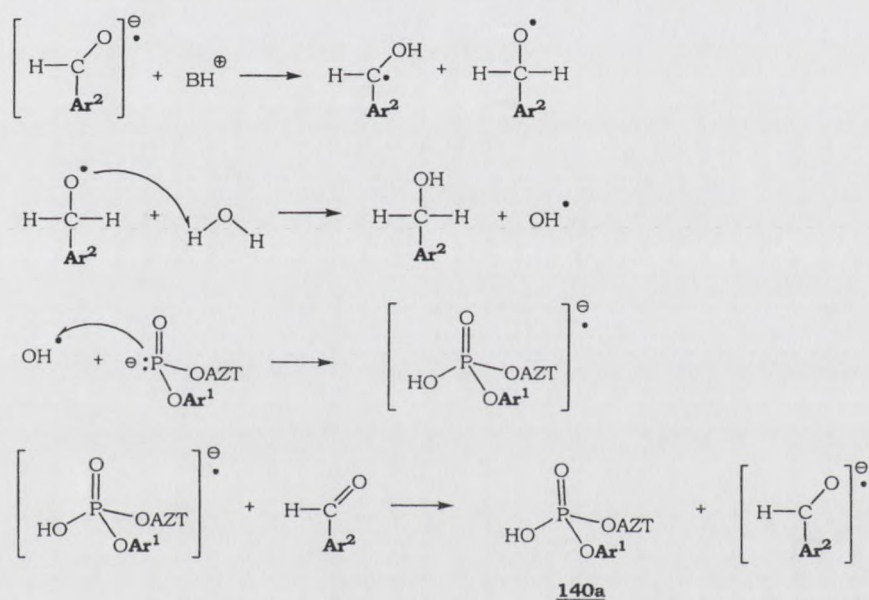
W tej sytuacji inną drogą powstawania diestru fenylo- nukleozydowego **140a**, bez udziału fosforanotriestru **139r** mogła być reakcja o przebiegu rodnikowym wg mechanizmu SET. Etap inicjacji tej reakcji byłby zbliżony do zakładanego przy tworzeniu fosforanotriestrów z α -hydroksyfosfonianów (Ryc. 70), lecz na etapie propagacji istotną rolę odgrywałaby cząsteczka wody (Ryc. 73).

Niestety nie udało się znaleźć potwierdzenia dla tego mechanizmu prowadząc reakcje w obecności wychwytywacza anionorodników (PDB) lub wykonując ją w ciemności. W obu przypadkach ilość powstałego diestru **140r** oraz szybkość jego tworzenia były porównywalne z próbami kontrolnymi. W związku z tym nie potrafię jednoznacznie wyjaśnić sposobu chemoselektywnego rozkładu α -hydroksy- α -(4-pirydylo)metylofosfonianu fenylo- nukleozydowego **114k** w mieszaninie reakcyjnej.

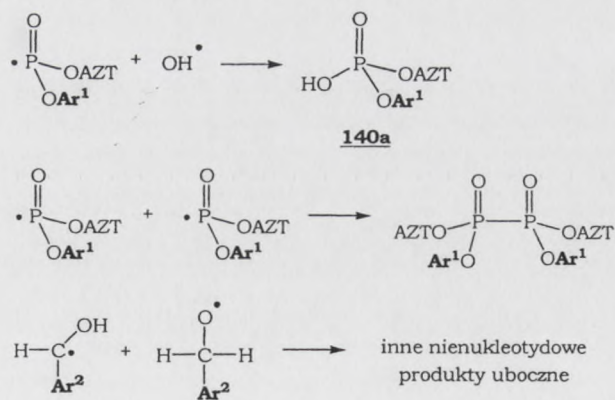
Inicjacja



Propagacja

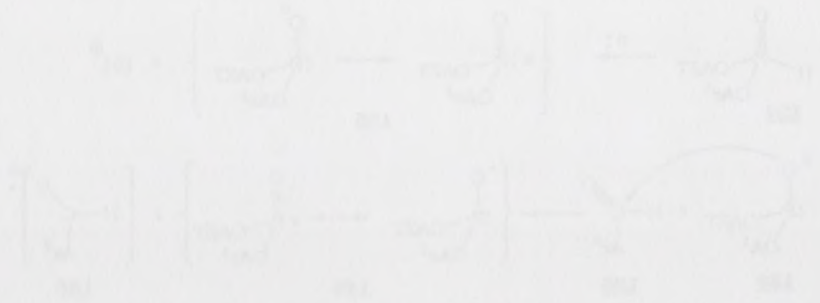


Terminacja



Ryc. 73

1.1. Wstęp



1.2. Wstęp



1.3. Wstęp



Fig. 1.1

4. Aktywność antywirusowa α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych typu **114** - komentarz

Po zaprojektowaniu nowej struktury związku i zachęcających wynikach sposobu jego degradacji, kolejnym ważnym krokiem w poszukiwaniu aktywnego leku antywirusowego jest przebadanie jego właściwości biologicznych. Wyniki wstępnych badań biologicznych wykorzystujących testy *ex vivo* pozwalają chemikowi syntetykowi zweryfikować poprawność kierunku syntezy nowych związków (które z grup chemicznych mają znaczenie w oddziaływaniach lek - miejsce działania), a także wstępnie ustalić ewentualne ich działanie toksyczne na zdrowe komórki.

Cytotoksyczność i aktywność przeciwko wirusowi HIV-1 wybranych α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych typu **114** a także ich bardziej złożonych pochodnych zostały oznaczone przez grupę prof. La Colla z Cagliari we Włoszech. Badania prowadzone były na komórkach MT-4 z użyciem dzikiego szczepu wirusa HIV-1 (III_B i III_{RF}) oraz niektórych jego lekoopornych mutantów (NNRTI^R - odporne na nienukleozydowe inhibitory RT, AZT^R - odporne na AZT) używając AZT lub H-fosfonian AZT jako związków referencyjnych. Ze względu na to, że wyniki oznaczeń właściwości biologicznych otrzymanych przez mnie związków nie należą do moich badań własnych, zamieszczone są w suplemencie niniejszej rozprawy.

Biorąc pod uwagę sposób i szybkość rozkładu α -hydroksyfosfonianów w mieszaninie RPMI z FBS oraz doniesienia literaturowe o aktywności H-fosfonianu AZT^{87,90} i monofosforanu AZT⁵⁹ (prawdopodobne „depozyty” AZT), spodziewałam się, że te α -hydroksyfosfoniany, które ulegają rozkładowi wg ścieżki **A** i **C** powinny wykazywać zbliżone wartości EC₅₀. Dane o aktywności α -hydroksyfosfonianów zebrane w suplemencie, potwierdzają te przypuszczenia, a niewielkie różnice w wartościach stężenia efektywnego (EC₅₀ = 0,01 - 0,06 μ M) mogą być związane z różnym udziałem oraz szybkością tworzenia H-fosfonianu AZT (lub monofosforanu AZT) w mediach komórkowych.

α -Hydroksyfosfonian **114d** z grupą Ar² = 4-nitrofenylową, który ulegał rozkładowi wg trzech ścieżek **A**, **B** i **C** nie wykazał zwiększonego współczynnika selektywności. Jego aktywność jak i cytotoksyczność pochodzą prawdopodobnie od H-fosfonianu AZT (EC₅₀ = 0,06 μ M, CC₅₀ = 55 μ M) oraz fosforanotriestru **139s**, który jest aktywny, lecz niestety również bardzo toksyczny (dokładniej w dalszej części pracy).

Inny α -hydroksymetanofosfonian fenylo-3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo-**114i** posiadający grupę Ar^2 silnie wyciągającą elektrony ($Ar^2 = 3$ -pirydył), ulegający degradacji zarówno wg dwóch szlaków **A** i **B**, okazał się najmniej toksyczny ($CC_{50} > 100 \mu M$) wśród wszystkich testowanych α -hydroksyfosfonianów, przy umiarkowanej wartości aktywności anty HIV-1 ($EC_{50} = 0,04 \mu M$). Wynik ten był zaskakujący ze względu na niską aktywność dwóch związków powstających podczas degradacji tego α -hydroksyfosfonianu tj. monoestru α -hydroksyfosfonianowego **138i**, a także aldehydu nikotynowego **126i**, przy bardzo wysokiej toksyczności tego ostatniego produktu ($CC_{50} = 37 \mu M$). Ester 4-metoksyfenylo- α -hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonianu **114s** wykazał nieznacznie większą aktywność ($EC_{50} = 0,01 \mu M$) od estru fenylo- α -hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonianu ($EC_{50} = 0,04 \mu M$), lecz znacznie wyższą toksyczność ($CC_{50} = 27 \mu M$), co prawdopodobnie wynikało z uwalniania toksycznego 4-metoksyfenolu ($CC_{50} = 39 \mu M$). Jeśli jednak 4-metoksyfenyl zastąpiony był 2,6-dimetylofenylem, wówczas, taki α -hydroksyfosfonian **114x** rozkładał się wyłącznie do H-fosfonianu AZT, z uwolnieniem aldehydu nikotynowego oraz 2,6-dimetylofenolu o niskiej toksyczności ($CC_{50} > 100 \mu M$). W efekcie indeks selektywności (SI) związku **114x** w porównaniu ze związkiem **114s** nieco się poprawił. Dodatkowo α -hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian 2,6-dimetylofenylo- α -hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian nukleozydowy **114x** charakteryzował się korzystnym czasem połowicznego rozkładu ($t_{1/2} = 40 \text{ min}$) w medium komórkowym.

Dla potwierdzenia przypuszczenia, iż α -hydroksyfosfoniany arylo- α -hydroksy- α -(4-metoksyfenylo)metanofosfonianu 2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo- α -hydroksy- α -(4-metoksyfenylo)metanofosfonianu 2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo- α -hydroksy- α -(4-metoksyfenylo)metanofosfonianu **114(ddU)**. Niski indeks EC_{50} takiego związku wskazuje na to, że badane α -hydroksyfosfoniany typu **114** najprawdopodobniej nie są pronukleotydami.

Podsumowując wyniki badań biologicznych nad α -hydroksyfosfonianami arylo- α -hydroksy- α -(4-metoksyfenylo)metanofosfonianu 2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo- α -hydroksy- α -(4-metoksyfenylo)metanofosfonianu **114(ddU)** w kontekście ich zastosowania jako potencjalnych proleków antywirusowych, ich zdolność do zahamowania replikacji wirusa HIV-1 jest zbliżona do aktywności H-fosfonianu AZT i samego AZT. Wynika to prawdopodobnie, ze sposobu rozkładu α -hydroksyfosfonianów, gdzie głównymi metabolitami są wspomniane dwa związki. Wszystkie testowane α -hydroksyfosfoniany wykazały oczekiwaną aktywność antywirusową, a ich cytotoksyczność zdaje się być możliwa do kontrolowania i dzięki temu zredukowana

przez odpowiednie kombinacje grup Ar^1 i Ar^2 . Z przebadanych związków najbardziej obiecujący wydaje się być α -hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian AZT z różnymi aryłowymi grupami estrowymi. Związek ten może być interesujący z punktu widzenia działania jako prolek AZT lub wykorzystania go jako fragmentu bardziej złożonych cząsteczek.

5. Lipofilowość α -hydroksyfosfonianów fenyloво nukleozydowych typu 114

Jak wspomniałam w części literaturowej, przedstawiając różnorodne związki antywirusowe, istotną cechą większości potencjalnych leków jest wyważona równowaga hydrofilowo-lipofilowa, która umożliwia rozpuszczenie związku w wodzie przy zachowaniu zdolności jego przenikania przez błony komórkowe, a także lipidową barierę krew/mózg. Zbyt polarne związki są w znacznym stopniu zjonizowane, nie przenikają przez lipidowe bariery i są szybko wydalane przez nerki, podczas gdy związki niepolarne, słabo rozpuszczają się w roztworach wodnych, są słabo absorbowane z przewodu pokarmowego i wychwytywane zostają przez tkankę tłuszczową. Stąd jednym z ważniejszych parametrów fizykochemicznych określających potencjalną użyteczność leku jest jego lipofilowość.

Lipofilowość związku można mierzyć, badając jego względną rozpuszczalność w mieszaninie 1-oktanol/woda bądź 1-oktanol/bufor. Cząsteczki bardziej lipofilowe w tym dwufazowym układzie przechodzą łatwiej do warstwy oktanolowej, a cząsteczki mniej lipofilowe do warstwy wodnej. Względny podział określa się mianem współczynnika podziału P (często podawany jako $\log P$) i oblicza według równania:

$$P = \frac{\text{stężenie związku w 1-oktanolu}}{\text{stężenie związku w roztworze wodnym}}$$

Z powyższego równania wynika więc, że im większa wartość współczynnika podziału P (lub $\log P$), tym związek jest bardziej lipofilowy.

Współczynniki podziału dla α -hydroksyfosfonianów fenyloво nukleozydowych wyznaczyłam w układzie 1-oktanol/0,01 M bufor KH_2PO_4 pH = 2 z uwagi na ich trwałość w środowisku kwasowym. Wartości tych współczynników dla większości związków okazały się od 3 do 73 razy większe od AZT, który przyjąłam jako związek

Przez odpowiednio dobranie grup A1 i A2, 2 przedstawiających związków najbardziej odpowiednich wydaje się być 2-hydroksy-4,4-dicyanopentadienol A17 z różnymi grupami aminowymi. Związek ten może być interesujący z punktu widzenia otrzymania jako produktu AXT lub wykorzystania go jako fragmentu bardziej złożonych związków.

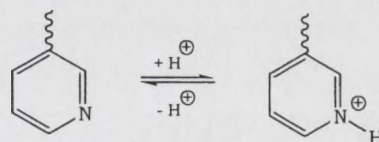
5. Lignolowość o-hydroksyloksolanów tlenowo nienasyconych typu III

Jak wspomnieliśmy w czasie literaturowej przedstawięcej różnorodność związków nienasyconych, istotną rolę w ich właściwościach potencjalnych będącą jest wywołana różnorodność hydroksyloksolanów. Istotną rolę w tym odgrywa także woda, przy zachowaniu właściwości jego parowania przez tleny karbonylowe, a także lipoidalne i inne katalizatory. Dla polimeru otrzymanego z katalizatoru stopniowego, nie przystając przez podział partycji i nie będąc wydajnie przez nich poddawany zmianom, należy wspomnieć, że w różnicach wadliwych, są takie odpowiadające w pewnym zakresie i wykorzystywane zostały przez siebie. Wskazano, że podział i rozdzielanie katalizatorów hydroksyloksolanów, szczególnie potencjalnie ciekawym jest jego hydroksylacja. Liczono, że związek można otrzymać, badając jego właściwości rozpuszczalności w mieszaninie 1-oktanol/woda pod 1-alkanol/benzol. Częstość i barwność lipoidalna w tym zakresie jest bardzo różnorodna, dlatego też w tym zakresie odnotowano, że częstość i podział lipoidalny do wartości podziału otrzymanego z katalizatoru stopniowego podziału. Wskazywany podział otrzymanego z katalizatoru stopniowego podziału (zwykle podawany jako P_1) i otrzymanego z katalizatoru stopniowego.

$$P_1 = \frac{\text{stężenie związku w 1-oktanolu}}{\text{stężenie związku w mieszaninie}}$$

Z powyższego równania wynika więc, że im większa wartość współczynnika podziału P_1 (lub P_2), tym większe jest podział lipoidalny. Wskazywany podział dla o-hydroksyloksolanów tlenowo nienasyconych wyznaczony w układzie 1-oktanol/0,01 M benzol/Et₂PO, pH = 2 z dwiema ich częściami w stosunku kwantowym. Wskazywany podział wyznaczony dla związków otrzymanych z katalizatoru stopniowego (zwykle podawany jako P_1) i otrzymanego z katalizatoru stopniowego.

referencyjny ($\log P = 0,02$). Można więc przypuszczać, że związki te mają szansę przeniknąć przez błonę komórkową tak jak AZT na zasadzie dyfuzji biernej.^{96;132} Jedynie dwa z przebadanych α -hydroksyfosfonianów **114i** i **114s**, pochodne aldehydu nikotynowego, są mniej lipofilowe od samego nukleozydu (wartość współczynnika P o 1,5 razy mniejszy). Obecność pierścienia pirydylowego w cząsteczce tych związków umożliwia jednak występowanie ich w formie zjonizowanej i niezjonizowanej. Forma zjonizowana wpłynie być może na dobrą rozpuszczalność tych związków w wodzie, natomiast niezjonizowana pozwoli przekroczyć błonę komórkową (Ryc. 74).²⁰



Ryc. 74

Przyjmuje się, że wraz ze wzrostem lipofilowości związku wzrasta jego aktywność biologiczna, co ma być odzwierciedleniem zdolności do pokonywania błon komórkowych, warunkujących dotarcie do miejsca działania.^{133;134} Mało jest jednak leków, których aktywność uzależniona jest tylko od wartości współczynnika P . Na skuteczne dotarcie związku aktywnego do miejsca jego przeznaczenia wpływa kilka innych, często ważniejszych właściwości, o czym już wspomniałam przy omawianiu projektowania aktywnych proleków. Ponadto związek o zbyt dużej wartości współczynnika podziału staje się słabo rozpuszczalny w wodzie, może zostać zgromadzony w tkance tłuszczowej i nie dotrzeć do miejsca działania. Leki silnie lipofilowe są też bardziej podatne na procesy metaboliczne i eliminację z ustroju.²⁰ Należy więc dążyć do otrzymania związków o odpowiedniej lipofilowości a zarazem wysokiej aktywności biologicznej co jednak często bywa dość trudne.

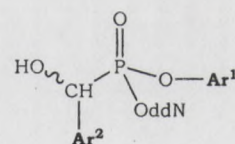


Tabela 3. Lipofilowość α -hydroksyfosfonianów aryloowo nukleozydowych typu **114**

Nr związku	114a	114b	114c	114d	114e	114z	114i	114s	114x	114l	114 (ddU)	AZT
Ar¹												
Ar²												
log P	1,49	1,48	1,88	1,14	1,53	0,99	-0,14	-0,23	0,56	1,18	1,27	0,02

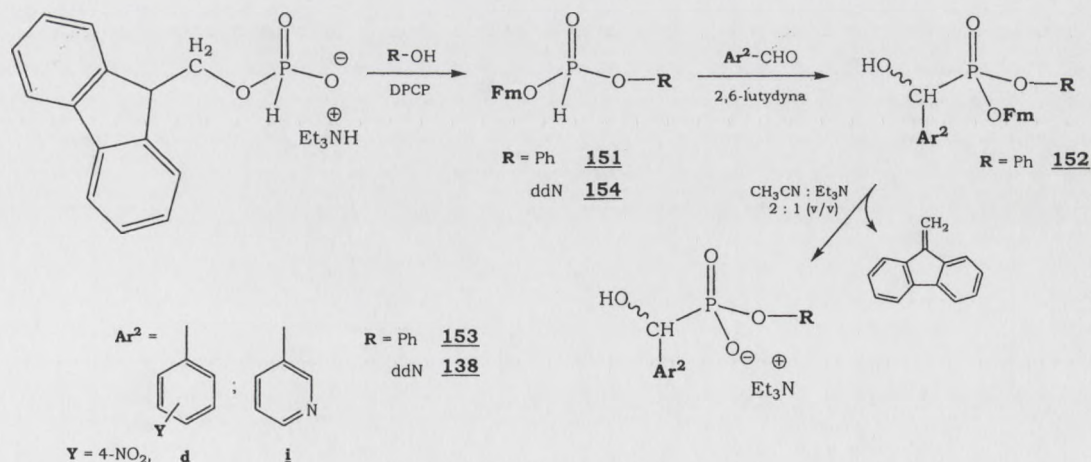
6. Syntezy towarzyszące

Badając ścieżki rozkładu α -hydroksyfosfonianów fenylowo nukleozydowych typu **114** stosowałam HPLC jako metodę analityczną. Aby zidentyfikować produkty powstające w wyniku hydrolizy wiązania fosfoestrowego lub przegrupowania fosfoniano-fosforanowego w α -hydroksyfosfonianach, konieczne było otrzymanie wzorców α -hydroksyfosfonianowych monoestrów typu **138** oraz fosforanotriestrów typu **139** na drodze niezależnych syntez, co opisuję w tym punkcie rozprawy.

6.1 Otrzymywanie α -hydroksyfosfonianów nukleozydowych

Pierwsze eksperymenty otrzymywania α -hydroksyfosfonianów nukleozydowych polegały na próbie selektywnej hydrolizy wiązania arylofosfoestrowego w warunkach zasadowych tj. w mieszaninie $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{Et}_3\text{N}$ [2 : 1 : 1 (v/v/v)], pirydynie z wodą [9 : 1, (v/v)], 25% wodnym roztworze amoniaku w pirydynie [1 : 2, (v/v)], 5 ekwiwalentami molowymi DBU lub 2,6-lutydyny w mieszaninie $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ [3 : 1, (v/v)]. Niestety żadna z powyższych reakcji nie dawała pożądanego monoestru jako głównego produktu.

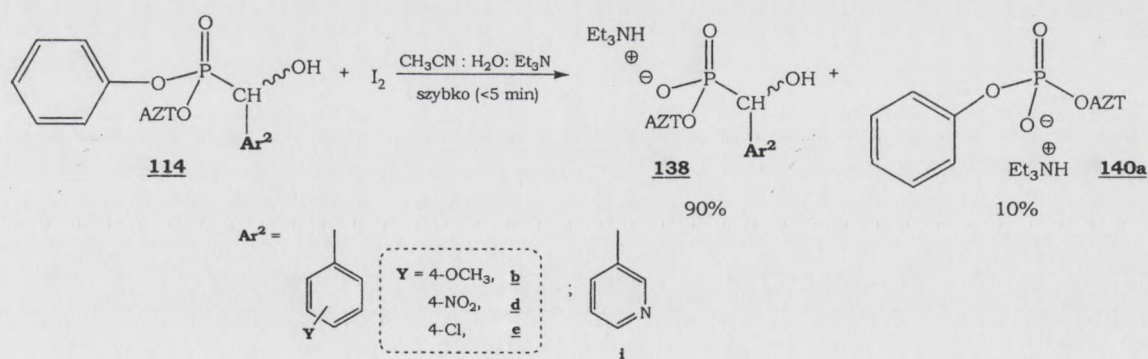
Dobłą metodą syntezy α -hydroksyfosfonianowych monoestrów fenylowych typu **153**, stosowaną wcześniej do otrzymywania amidofosforanowych monoestrów¹³⁵, było wykorzystanie pochodnej z łatwo usuwalną grupą 9-fluorenylometylową (**Fm**). Do wygenerowanego H-fosfonianodiestru 9-fluorenylometylowo fenylowego **151** dodawałam aldehyd 4-nitrobenzoesowy **126d** lub nikotynowy **126i** w obecności 2,6-lutydyny. Z powstałego α -hydroksyfosfonianodiestru **152** eliminowałam fulwen stosując duży nadmiar Et_3N , uzyskując w ten sposób odpowiedni α -hydroksyfosfonian fenylowy **153** (Ryc. 75).



Ryc. 75

Wykorzystanie tej metody do otrzymywania α -hydroksyfosfonianów nukleozydowych typu **138** było mało efektywne. W obecności 2,6-lutydyny kondensacja H-fosfonianu 9-fluorenylometylowo nukleozydowego **154** z mało reaktywnymi aldehydami zachodziła bardzo wolno, natomiast w bardziej zasadowym środowisku (DIPEA) ulegał on rozkładowi do monoestru nukleozydowego. Reakcja ta wymagała więc zastosowania odmiennych warunków kondensacji od tych przebadanych dla H-fosfonianów arylowo nukleozydowych.

Niespodziewanie użyteczna w syntezie α -hydroksyfosfonianów nukleozydowych okazała się reakcja mająca w pierwotnym założeniu dowieść istnienia równowagi między α -hydroksyfosfonianem a H-fosfonanodiestrem i aldehydem. Do α -hydroksy- α -(4-metoksyfenylo)metanofosfonianu fenylowo nukleozydowego **114b** dodałam 3 ekwiwalenty molowe jodu rozpuszczonego w acetonitrylu a następnie mieszaninę $\text{Et}_3\text{N} : \text{H}_2\text{O}$ [w sumie z CH_3CN w stosunku 2 : 1 : 1, (v/v/v)]. Po krótkim czasie (3 min) widmo ^{31}P NMR wykazało całkowity zanik substratu i obecność α -hydroksyfosfonianowego monoestru **138b** oraz około 10% fosforanodiestru **140a** (Ryc. 76). Zastosowanie tych warunków w przypadku innych α -hydroksyfosfonianów fenylowo nukleozydowych dawało zawsze taką samą ilość monoestru α -hydroksyfosfonianu typu **138** (90%) i fosforanodiestru **140a** (10%) bez względu na charakter elektronowy grup Ar^2 w części hydroksymetanowej. W ten sposób mogłam szybko i łatwo generować α -hydroksyfosfoniany nukleozydowe **138**, a po oczyszczeniu na kolumnie z żelom krzemionkowym, uzyskiwać je jako czyste preparaty gotowe do dalszych badań.



Ryc. 76

Właściwości biologiczne α -hydroksyfosfonianów nukleozydowych zostały zbadane tylko w przypadku jednego związku, mianowicie pochodnej aldehydu nikotynowego tj. związku **138i**. Ze względu na to, iż powstawał on w wyniku

Wynikami tej pracy jest otrzymanie 2-hydroksy-1,4-dihydroksybenzenu (138) z kwasu 2-hydroksy-1,4-dihydroksybenzoesowego (137) z użyciem 2,6-dimetylo-4-tert-butylfenolu (139) jako reagenta. W celu otrzymania 138 z 137 zastosowano metodę Friedmana-Craftsa z użyciem $AlCl_3$ w CH_2Cl_2 w temperaturze $0^\circ C$. W celu otrzymania 139 z 137 zastosowano metodę Friedmana-Craftsa z użyciem $AlCl_3$ w CH_2Cl_2 w temperaturze $0^\circ C$.

W celu otrzymania 138 z 137 zastosowano metodę Friedmana-Craftsa z użyciem $AlCl_3$ w CH_2Cl_2 w temperaturze $0^\circ C$. W celu otrzymania 139 z 137 zastosowano metodę Friedmana-Craftsa z użyciem $AlCl_3$ w CH_2Cl_2 w temperaturze $0^\circ C$. W celu otrzymania 138 z 137 zastosowano metodę Friedmana-Craftsa z użyciem $AlCl_3$ w CH_2Cl_2 w temperaturze $0^\circ C$. W celu otrzymania 139 z 137 zastosowano metodę Friedmana-Craftsa z użyciem $AlCl_3$ w CH_2Cl_2 w temperaturze $0^\circ C$.

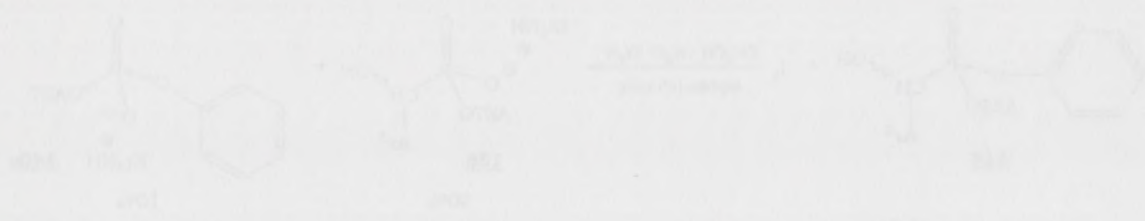


Fig. 70

Wskazano, że 2-hydroksy-1,4-dihydroksybenzen jest reagentem w syntezie 2-hydroksy-1,4-dihydroksy-3-metylobenzenu (138) z kwasu 2-hydroksy-1,4-dihydroksybenzoesowego (137) z użyciem 2,6-dimetylo-4-tert-butylfenolu (139) jako reagenta.

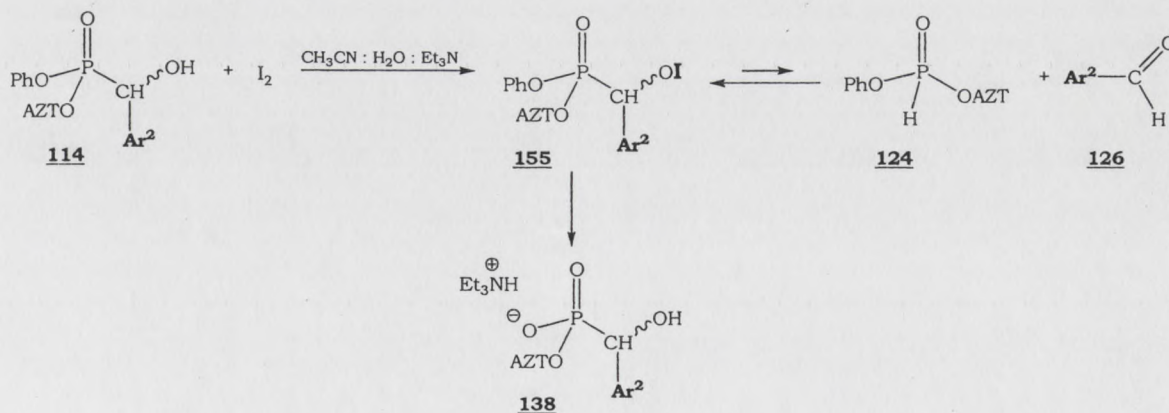
rozkładu α -hydroksyfosfonianodiestru **114i** o najbardziej korzystnym współczynniku selektywności, interesowało mnie, jaki jest jego udział w hamowaniu replikacji wirusa HIV-1. Związek ten, mimo, że nie był toksyczny ($CC_{50} > 100 \mu\text{M}$) nie wykazywał jednak aktywności antywirusowej ($EC_{50} = 2,4 \mu\text{M}$).

Reakcja α -hydroksyfosfonianów typu **114** z jodem we wspomnianych warunkach była dla mnie bardzo użyteczna, gdyż niezależnie od grupy Ar^2 prowadziła do otrzymania α -hydroksyfosfonianowych monoestrów typu **138** jako głównych produktów (90%). Ponieważ sposób tworzenia się α -hydroksyfosfonianu nukleozydowego nie był oczywisty, stąd wykonałam kilka eksperymentów mających na celu wyjaśnienie mechanizmu tej reakcji.

Pierwszym spostrzeżeniem był fakt, że do przebiegu reakcji konieczna była obecność jodu, zasady (Et_3N) i wody, najlepiej z acetonitrylem, w stosunku objętościowym 2:1:1.

Optymalną ilością jodu okazały się 2 ekwiwalenty molowe, przy czym większa ilość nie zmieniała szybkości reakcji ani stosunku tworzących się produktów. Katalityczna ilość I_2 (0,5 ekw. molowego) powodowała natomiast generowanie mniejszej ilości monoestru α -hydroksyfosfonianu (70%) a resztę stanowiły równomolowe ilości fosforanodiestru **140a** i H-fosfonianu AZT.

Pierwszą hipotezą na temat mechanizmu tej reakcji było powstawanie pochodnych kwasu jodowego (I) typu **155** (Ryc. 77) jako wynik reakcji pomiędzy grupą hydroksylową w α -hydroksyfosfonianie a jodem, analogicznie do znanych w chemii nieorganicznej reakcji jodu z wodą.¹³⁶ Za powstawaniem związku **155** przemawiało to, iż nie mógłby on występować w stanie równowagi z H-fosfonianodiestrem **124a** i aldehydem typu **126**, dzięki czemu uprzywilejowana byłaby hydroliza wiązania fosforoestrowego (Ryc. 77).

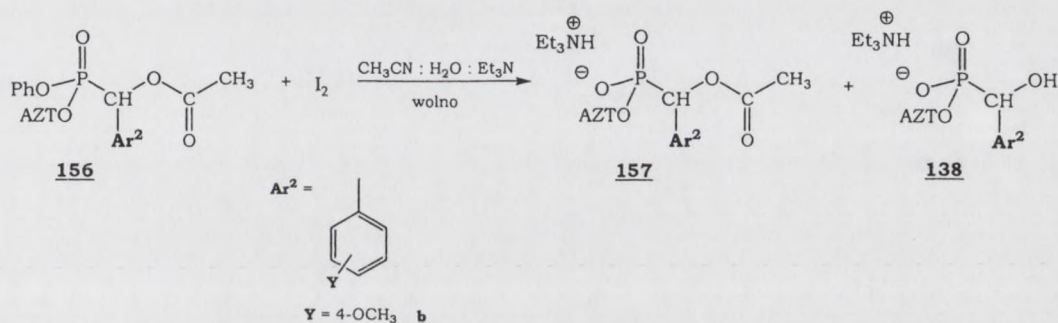


Ryc. 77

The first part of the document discusses the general situation of the county and the various towns and villages. It mentions the population and the state of the land. The second part describes the different sections of the county and the names of the towns and villages. The third part contains a list of the names of the various sections and the names of the towns and villages. The fourth part contains a list of the names of the various sections and the names of the towns and villages. The fifth part contains a list of the names of the various sections and the names of the towns and villages. The sixth part contains a list of the names of the various sections and the names of the towns and villages. The seventh part contains a list of the names of the various sections and the names of the towns and villages. The eighth part contains a list of the names of the various sections and the names of the towns and villages. The ninth part contains a list of the names of the various sections and the names of the towns and villages. The tenth part contains a list of the names of the various sections and the names of the towns and villages.

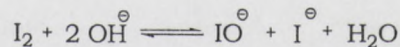
J. W. ...
 ...
 ...

Zgodnie z tą hipotezą, podobnie powinny zachowywać się *O*-acetylowane pochodne α -hydroksyfosfonianów typu **156**, gdzie równowaga taka celowo została zablokowana. Jak się jednak okazało α -acetylofosfoniany (opisane w dalszej części pracy) w roztworze z jodem były stosunkowo trwałe, a po 48 godz. mogłam zaobserwować jeszcze ponad 60% substratu oraz mieszaninę monoestrów α -acetylo-**157** i α -hydroksyfosfonianów **138** i (Ryc. 78). Obserwacja ta wskazywać mogła, iż obecność wolnej grupy hydroksylowej jest prawdopodobnie konieczna do szybkiego tworzenia się α -hydroksyfosfonianowego monoestru.



Ryc. 78

W dalszych doświadczeniach zaobserwowałam, że na wynik reakcji nie wpływa kolejność dodawania reagentów do α -hydroksyfosfonianu. Co jednak istotne, I_2 ulegał prawdopodobnie reakcji jeszcze przed dodaniem α -hydroksyfosfonianu typu **114**, co wywnioskowałam ze zmiany zabarwienia mieszaniny z brunatnego na słomkowy. Mogło to wskazywać, na tworzenie w tym zasadowym środowisku wspomnianych już soli kwasu jodowego (I) (Ryc. 79).



Ryc. 79

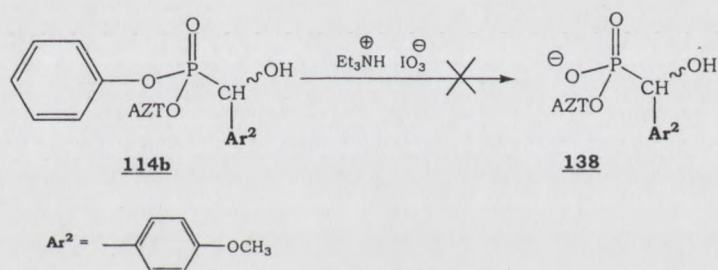
Anion jodanowy(I) IO^- ze względu na obecność atomu jodu w pozycji α może być silnym α -nukleofilem (silniejszym niż wskazuje to jego $\text{pK}_a = 10$)¹³⁶, atakującym elektrofilowe centrum fosforowe w α -hydroksyfosfonianach **114** z szybkim odejściem grupy fenoksyłowej. W tej sytuacji jod cząsteczkowy, prawdopodobnie występujący w mieszaninie z jodanem(I), ma możliwość utlenienia tylko niewielkiej ilości (10%) H-fosfonanodiestru **124** istniejącego w równowadze z α -hydroksyfosfonianem **114**.

Mieszanina, z przypuszczalnie wytworzonym jodanem(I) dawała ten sam efekt (90% monoestru α -hydroksyfosfonianowego), jeśli przygotowana była w krótkim czasie (do około 30 min) przed reakcją z α -hydroksyfosfonianem. Po znacznie dłuższym czasie (3 dni) mieszanina z jodem generowała mniejszą ilość monoestru, zależną od ilości użytego jodu. Na przykład w mieszaninie z 3 ekw. molowymi I_2 tworzyło się 51% monoestru α -hydroksyfosfonianowego **138**, 36% fosforanodiestru

140a i 13% H-fosfonianu AZT. Natomiast z 2 ekw. molowymi I_2 obserwowałam obecność 26% monoestru **138**, niewiele (5%) fosforanodiestru **140a**, za to aż prawie 70% H-fosfonianu AZT. Wyniki te można tłumaczyć małą trwałością jodanów (I), które z czasem dysproporcjonują do jodku i jodanu(V) $3 IO^{\ominus} \longrightarrow IO_3^{\ominus} + 2 I^{\ominus}$ (Ryc. 80).¹³⁶ Ubytek silnego nukleofila, ale także jodu cząsteczkowego może być bardziej widoczny w mieszaninie z mniejszą ilością jodu, co będzie się sprzyjała konkurencyjnej reakcji hydrolizy H-fosfonianodiestru.

Ryc. 80

Tworzący się anion jodanowy(V) ($pK_a = 0,8$)¹³⁶, nie ma prawdopodobnie tak silnych właściwości nukleofilowych jak anion jodanowy(I). Przekonałam się o tym traktując α -hydroksyfosfonian **114b** 3 ekwiwalentami molowymi jodanu(V) trietyloamoniowego w mieszaninie acetonitrylu z wodą [2 : 1, (v/v)], w których to warunkach związek **114b** był trwały (Ryc. 81).



Ryc. 81

Na podstawie wykonanych doświadczeń mogę postulować, że:

- hydroliza α -hydroksyfosfonianów typu **114** do odpowiedniego monoestru **138** w obecności jodu jest na tyle szybka, że umożliwia odejście grupy aryloksylowej nawet w przypadku tych α -hydroksyfosfonianów, w których łatwo dochodzi do pęknięcia wiązania P-C,
- anion jodanowy(I) jako silny α nukleofil może atakować centrum fosforowe,
- efektywnemu odejściu grupy aryloksylowej sprzyja obecność grupy hydroksylowej działającej prawdopodobnie jako ogólny katalizator kwasowy (Ryc. 82).

1000

1000

1000

1000

1000

1000

1000

1000

1000

1000

1000

1000

1000

1000

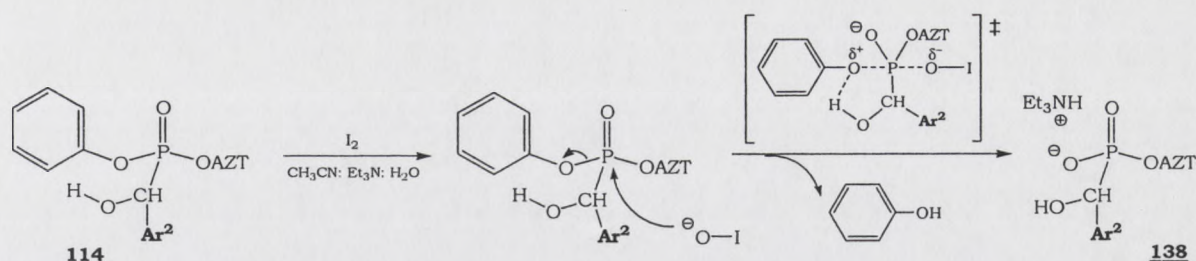
1000

1000

1000

1000

1000

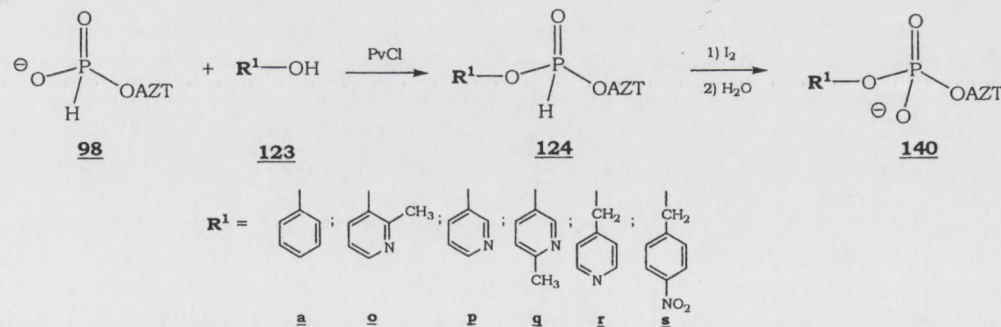


Ryc. 82

W związku z brakiem innych, bardziej przekonujących wyników, mogę jedynie domniemywać o udziale jodanu (I) w mechanizmie powstawania α -hydroksyfosfonianu nukleozydowego z α -hydroksyfosfonianodiestru przedstawionego na ryc. 82. Nie zmienia to jednak faktu, iż opisane przeze mnie warunki tej reakcji można traktować jako efektywną metodę syntezy α -hydroksyfosfonianowych monoestrów wyróżniającą ją spośród innych opisanych w literaturze metod.

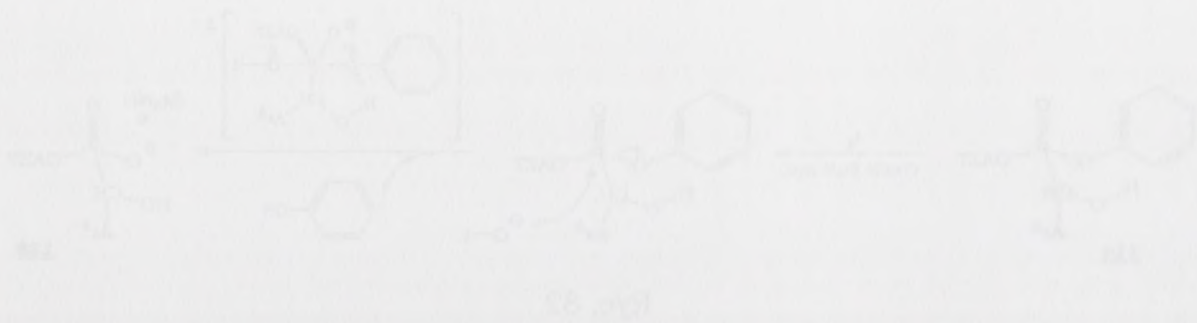
6.2. Triestry i diestry fosforanowe

Fosforanodiestry arylowo nukleozydowe otrzymywałam standardową metodą¹²³ stosowaną w Pracowni Analogów Nukleotydów i Oligonukleotydów tj. w wyniku kondensacji H-fosfonianu AZT z odpowiednim fenolem lub alkoholem typu **123** a następnie utlenianie powstałego H-fosfonianodiestru **124** jodem wobec wody (Ryc. 83). Wygenerowane w ten sposób fosforanodiestry typu **140** oczyszczałam na żelu krzemionkowym otrzymując czyste spektralnie (^{31}P , ^1H NMR) i chromatograficznie, lecz silnie higroskopijne preparaty.



Ryc. 83

Rozkład fosforanodiestrów do monofosforanów w RPMI z FBS oraz w samym FBS zachodził w ciągu $t_{1/2} = 120\text{-}245$ min (HPLC) a w FBS w ciągu $t_{1/2} = 40\text{-}60$ min



W związku z brakiem danych, bardziej precyzyjnych wytych, mogą jedynie domniemywać o istnieniu jądru (f) w mechanizmie powstawania α -hydroksylostanu katalizowanego z α -hydroksylostanem przedstawanym na rys. 53. Nie wydaje to jednak tak, iż istnieje jakieś wyjątkowe miejsce, gdzie można by oczekiwać, jako istniejącego, jakiegoś α -hydroksylostanu, ponieważ w rzeczywistości wyznaczone są jedynie inne sposoby w literaturze.

5.3. Trietylo i dietylo katalizatory

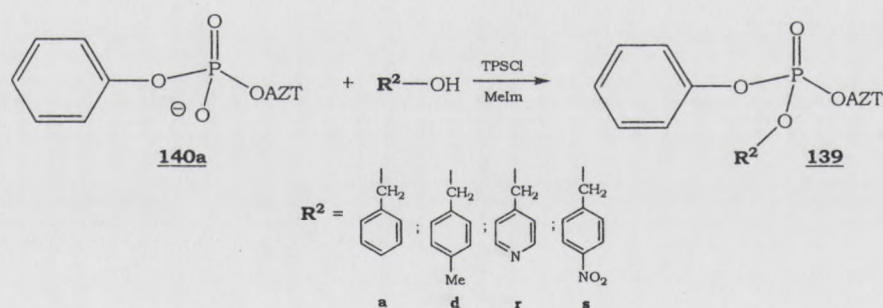
W celu wyznaczenia szybkości reakcji katalizowanej standardowe metody stosowane w trybowi katalizacji trietylo i dietylo katalizatorami (f) w wyniku katalizacji H-bromem AET z odpowiednim katalizatorem lub alkoholem typu 183 z katalizatorem dietylo katalizatorem H-bromem 184 jedyną wodą (f) 53). Wyznaczenie w ten sposób konstanty typu 184 otrzymaliśmy na tej podstawie, że w tym celu użyliśmy czynnika katalizacji (f) (HBr) i chromosomu, jak w literaturze.



Wyznaczenie konstanty 50 z konstantami w RPL z RPL oraz w innych RPL zachodzi w czasie $t_{1/2} = 110-242$ min (RPL) z $t_{1/2} = 40-60$ min

(HPLC). Wskazuje to, iż związki te są dobrymi substratami dla fosfodiesteraz i prawdopodobnie mogą być łatwo hydrolizowane w komórkach do monofosforanu AZT, pożądanego produktu w pronukleoetydowym podejściu terapii antywirusowej. Oprócz odpowiedniej trwałości, badane fosforanodiestry typu **140** posiadały również wysoką aktywność antywirusową ($EC_{50} = 0,003-0,01 \mu M$), lecz ich współczynnik selektywności był mocno obniżony z powodu znacznej cytotoksyczności ($CC_{50} \approx 40 \mu M$).

Fosforanodiestry **140**, otrzymane jako wzorce produktów rozpadu badanych α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych typu **114**, okazały się przydatne w syntezie fosforanotriestrów, a później także fosfoniano-fosforanów dinukleozydowych. Do syntezy triestrów **139** wykorzystywałam metodę Efimova^{137;138} stosowaną w syntezie oligonukleotydów. W tym celu fosforanodiestry fenylowo nukleozydowy **140a** kondensowałam z odpowiednim alkoholem w obecności chlorku 2,4,6-triizopropylbenzylsulfonowego (TPSCl) i N-metyloimidazolu jako katalizatora nukleofilowego (Ryc. 84). Reakcja ta przebiegała szybko (< 5min) i ilościowo, a po przerobieniu mieszaniny reakcyjnej (1M bufor KH_2PO_4 pH = 4,0 w celu usunięcia MeIm) i oczyszczeniu chromatograficznym oraz liofilizacji, uzyskiwałam pożądaną triestry **139**.



Ryc. 84

Dwa otrzymane przeze mnie fosforanotriestry **139r** i **139s** okazały się trwałe w RPMI ($t_{1/2} > 100$ godz.). Jest to zgodne z danymi literaturowymi o tego typu fosforanotriestrach benzyłowych z podstawnikami silnie wyciągającymi elektrony, które są bardziej stabilne ($t_{1/2}$ około 300 razy większy) niż ich analogi z podstawnikami dostarczającymi elektrony.^{27;139} Wy tłumaczenie tego faktu przez autorów wspomnianych doniesień jest jednak różne.

J. Engels¹³⁹ sugeruje, iż tak znaczna różnica w szybkości hydrolizy tego typu fosforanotriestrów przemawiać może za jednocząsteczkowym atakiem nukleofilowym na benzyłowy atom węgla, a nie atakiem nukleofilowym na atom fosforu.

Wzrosty w czasie 12 godzin w kierunku dodatnim do 100% (100%) i w kierunku ujemnym do 100% (100%) w czasie 12 godzin. Wzrosty w czasie 12 godzin w kierunku dodatnim do 100% (100%) i w kierunku ujemnym do 100% (100%) w czasie 12 godzin. Wzrosty w czasie 12 godzin w kierunku dodatnim do 100% (100%) i w kierunku ujemnym do 100% (100%) w czasie 12 godzin.

Wzrosty w czasie 12 godzin w kierunku dodatnim do 100% (100%) i w kierunku ujemnym do 100% (100%) w czasie 12 godzin. Wzrosty w czasie 12 godzin w kierunku dodatnim do 100% (100%) i w kierunku ujemnym do 100% (100%) w czasie 12 godzin. Wzrosty w czasie 12 godzin w kierunku dodatnim do 100% (100%) i w kierunku ujemnym do 100% (100%) w czasie 12 godzin.



Fig. 3

Wzrosty w czasie 12 godzin w kierunku dodatnim do 100% (100%) i w kierunku ujemnym do 100% (100%) w czasie 12 godzin. Wzrosty w czasie 12 godzin w kierunku dodatnim do 100% (100%) i w kierunku ujemnym do 100% (100%) w czasie 12 godzin. Wzrosty w czasie 12 godzin w kierunku dodatnim do 100% (100%) i w kierunku ujemnym do 100% (100%) w czasie 12 godzin.

Wzrosty w czasie 12 godzin w kierunku dodatnim do 100% (100%) i w kierunku ujemnym do 100% (100%) w czasie 12 godzin. Wzrosty w czasie 12 godzin w kierunku dodatnim do 100% (100%) i w kierunku ujemnym do 100% (100%) w czasie 12 godzin. Wzrosty w czasie 12 godzin w kierunku dodatnim do 100% (100%) i w kierunku ujemnym do 100% (100%) w czasie 12 godzin.

Powstawaniu karbokationu benzyłowego w pierwszym etapie tej reakcji sprzyjać będą z pewnością podstawniki dostarczające elektrony i stąd odpowiednie triestry mogą odznaczać się małą stabilnością. Z kolei triestry z podstawnikami elektronoakceptorowymi, ze względu na słabą stabilizację powstającego karbokationu, będą zdecydowanie mniej podatne na rozerwanie wiązania C-O, a przez to bardziej trwałe.

C. Meier²⁷ natomiast rozważa dwa różne mechanizmy degradacji fosforanotriestrów benzyłowych w zależności od właściwości elektronowych podstawnika w pierścieniu benzyłowym. Wg tego autora, wspomniany przez J. Engelsa mechanizm hydrolizy dotyczy tylko związków z niepodstawioną grupą benzyłową oraz z podstawnikami dostarczającymi elektrony, natomiast związki z podstawnikami wyciągającymi elektrony ulegają rozkładowi na skutek ataku nukleofilowego cząsteczki wody na atom fosforu [$S_N2(P)$].

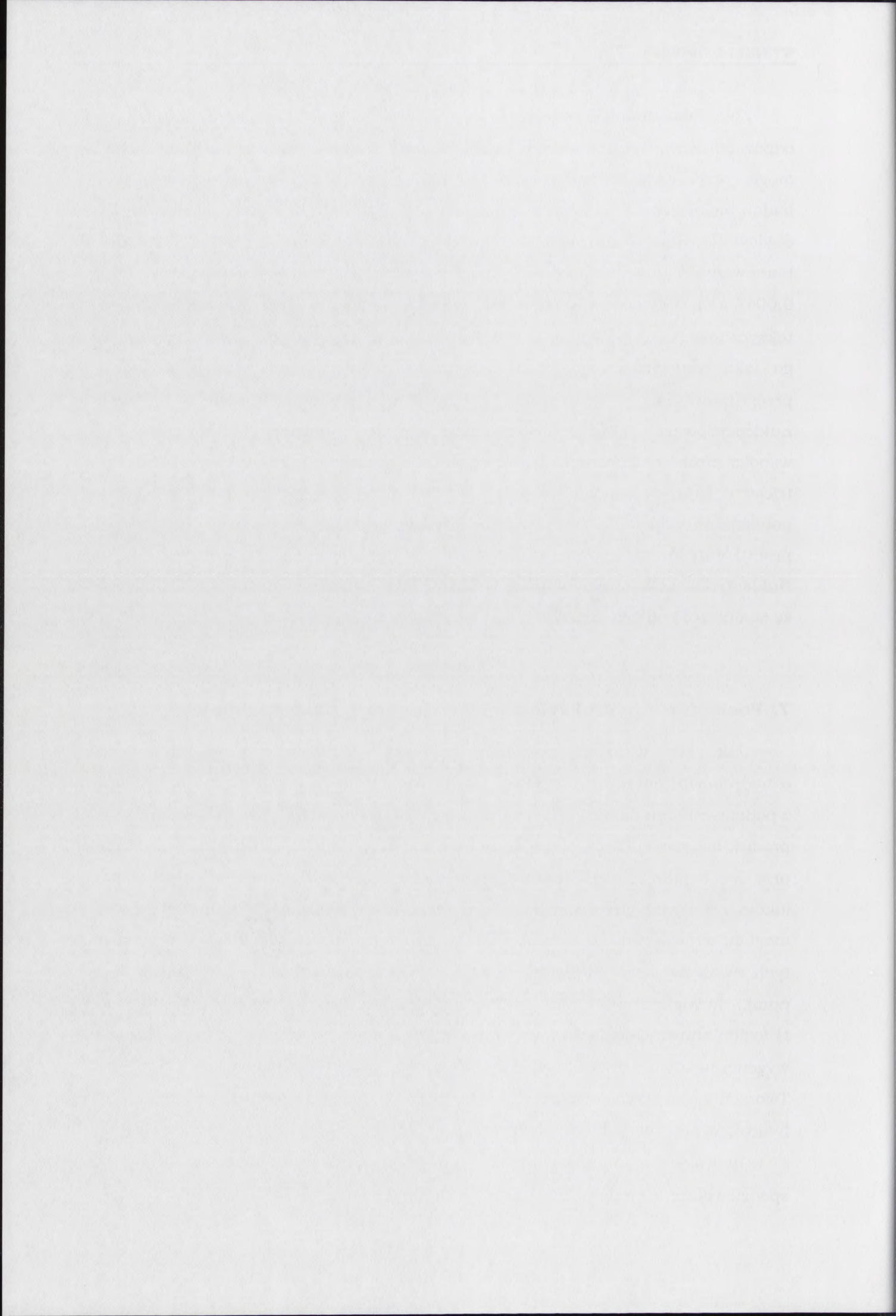
Przyjmując koncepcję C. Meiera, rodzaj generowanego produktu hydrolizy fosforanotriestru 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenyłowo 4-nitrobenzyłowego **139s** jak i fosforanotriestru **139r** z grupą (4-pirydylo)metyłową powinien być silnie zależny od pK_a grupy odchodzącej. Można się więc spodziewać, że znacznie szybciej i łatwiej od grup *p*-nitrobenzyloksylowej ($pK_a = 14,6$)¹⁴⁰ lub 4-pirydylometoksylowej odchodziłaby grupa fenoksylova ($pK_a = 9,9$)¹⁴⁰ dając w przeważającej ilości fosforanodiester odpowiednio 4-nitrobenzyłowo nukleozydowy **140s** lub (4-pirydylo)metyłowo nukleozydowy **140r**. Z tego też względu trwałość triestrów **139r** i **139s** byłaby prawdopodobnie niezbyt duża, co jest sprzeczne z moimi wynikami. Ponadto rodzaj generowanego w przeważającej ilości produktu rozkładu obu fosforanotriestrów (diester fenyłowo nukleozydowy **140a**, odpowiednio 88% i 73%), przemawiał raczej za dealkilacją rozważanych fosforanotriestrów wg hipotezy J. Engelsa.

Otrzymane dla porównania triestry z niepodstawioną grupą benzyłową **139a** oraz z podstawnikiem metyłowym **139d** (Ryc. 84) znacznie szybciej ($t_{1/2}$ odpowiednio 559 min i 24 min) rozkładały się w RPMI i to wyłącznie do diestru fenyłowo nukleozydowego. Można więc przypuszczać, iż główną drogą rozkładu triestrów benzyłowo fenyłowo nukleozydowych jest atak nukleofilowy na benzyłowy atom węgla. Aby wyjaśnić, czy reakcja ta przebiega wg dwóch różnych lub takich samych mechanizmów w zależności od rodzaju podstawnika w części benzyłowej, konieczne byłyby dokładniejsze badania kinetyczne. Ze względu na czasochłonność tych eksperymentów nie przeprowadziłam ich w ramach tej pracy.

Zbyt duża trwałość triestrów **139r** i **139s** generowanych w wyniku rozkładu odpowiednich α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych wydawać by się mogła przeszkodą w zastosowaniu ich jako związków antywirusowych. Wyniki badań biologicznych jednego z rozważanych triestrów tj. 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylowo 4-nitrobenzylowego **139s** wykazały jednak jego dużą zdolność do hamowania replikacji wirusa HIV-1, a szczególnie jego lekoopornych odmian ($EC_{50} = 0,004 \mu\text{M}$). Wysokiej aktywności związku **139s** towarzyszy niestety wysoka toksyczność ($CC_{50} = 24 \mu\text{M}$), co może być przeszkodą w potencjalnym zastosowaniu go jako antywirusowego pronukleotydu, a jego tworzenie się jako produktu przegrupowania α -hydroksy- α -(4-nitrofenylo)metanofosfonianu fenylowo nukleozydowego **114d** wpływa niekorzystnie prawdopodobnie również na współczynnik selektywności tego związku. Jednakże wysoka aktywność anti-HIV-1 triestru **139s** przemawia za tym, że tego typu związki można rozważać jako potencjalne proleki. Z tego względu bardziej szczegółowe badania triestrów jako pronukleotydów przeciwko wirusowi HIV kontynuowane są w Pracowni Analogów Nukleotydów i Oligonukleotydów. Wyników tych badań nie opisuję ze względu na to, że są one zbyt odległe merytorycznie od tematu mojej rozprawy.

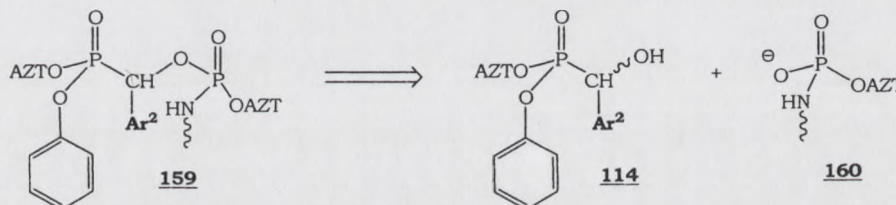
7. Pochodne α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych

Jak już wcześniej pisałam, podczas pierwszych prób otrzymywania α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych pochodnych benzaldehydu z podstawnikami dostarczającymi elektrony obserwowałam powstawanie dużej ilości produktów następczych. Dawały one w widmie ^{31}P NMR dwie grupy multipletów przy $\delta_{\text{P}} \approx 9$ ppm i $\delta_{\text{P}} \approx 13$ ppm. Na podstawie integracji tych dwóch grup sygnałów (około 1 : 1), ich przesunięcia chemicznego oraz informacji z widma sprzężonego, mogłam wnioskować o obecności dwóch różnych centrów fosforowych w cząsteczce tych związków (część H-fosfonianowa $\delta_{\text{P}} \approx 9$ ppm oraz część C-fosfonianowa $\delta_{\text{P}} \approx 13$ ppm). Przyjęłam więc, iż wspomniane produkty następcze mają strukturę H-fosfonianowo-C-fosfonianową typu **158** i były wynikiem reakcji pomiędzy wygenerowanym α -hydroksyfosfonianem **114** a H-fosfonianodiestrem **124** (Ryc. 60). Tworzenie się tych związków świadczyło o dużej reaktywności wolnej grupy hydroksylowej w α -hydroksyfosfonianach. Zachęciło mnie to do otrzymywania z α -hydroksyfosfonianów innych, bardziej złożonych związków o, jak się spodziewałam, ciekawych właściwościach chemicznych i biologicznych.



7.1 Fosfoniano-amidofosforany

Część H-fosfonianowa w powstających podczas syntezy α -hydroksyfosfonianów H-fosfoniano-C-fosfonianach umożliwiała wprowadzenie do ich struktury dalszych modyfikacji. Jedną z nich mogło być tworzenie wiązania P-N poprzez utlenienie tej części do amidofosforanu. Powstałe wówczas fosfoniano-amidofosforany typu **159**, mogłyby być interesujące, gdyby jako potencjalne proleki ulegały degradacji do dwóch aktywnych związków: α -hydroksyfosfonianów **114** oraz amidofosforanowych monoestrów **160** (Ryc. 85).



Ryc. 85

Aby się o tym przekonać, zsyntetyzowałam dwa fosfoniano-amidofosforany pochodne AZT oraz L-tryptofanu. Aminokwas ten zastosowałam biorąc pod uwagę wyniki badań Wagnera⁸⁶ o najwyższej aktywności antywirusowej amidofosforanów AZT typu **160** z grupą L-tryptofanową. W pierwszym etapie syntezy fosfoniano-amidofosforanów skondensowałam odpowiedni α -hydroksyfosfonian aryloowo nukleozydowy **114** z H-fosfonianem nukleozydowym w obecności chlorku piwaloilu. Następnie do powstałego H-fosfoniano-C-fosfonianu typu **158** dodałam ester metylowy L-tryptofanu z trietyloaminą, a na koniec jod (Ryc. 86). Po zakończeniu reakcji (20 min, dwie grupy multipletów, $\delta_P \approx 8,5$ i 14 ppm, ^{31}P NMR), przerobienie mieszaniny reakcyjnej (1M KH_2PO_4 , pH = 4), oczyszczeniu na silikażelu i liofilizacji, uzyskiwałam czyste preparaty z wydajnością około 80%. Wydajność tej reakcji była niższa od oczekiwanej przez zachodzenie reakcji ubocznej utleniania części H-fosfonianowej w związku **158** do fosforanu z utworzeniem związku **161** (Ryc. 86). Aby tego uniknąć, dodawałam do wygenerowanego H-fosfoniano-C-fosfonianu **158** chlorku trimetylosililu (w celu usunięcia wody) i dzięki temu reakcja utleniania miała znacznie czystszy przebieg (wydajność 95%).

1.1. Introduction

The purpose of this study is to investigate the effects of various factors on the growth of plants. The study was conducted in a greenhouse under controlled conditions. The factors investigated were light intensity, temperature, and nutrient availability. The results show that light intensity has a significant effect on the growth rate of the plants. Higher light intensity resulted in faster growth and larger plants. Temperature also had an effect, with optimal growth occurring at a temperature of 20-25 degrees Celsius. Nutrient availability was also important, with plants receiving a complete nutrient solution showing the best growth.

2. Materials and Methods

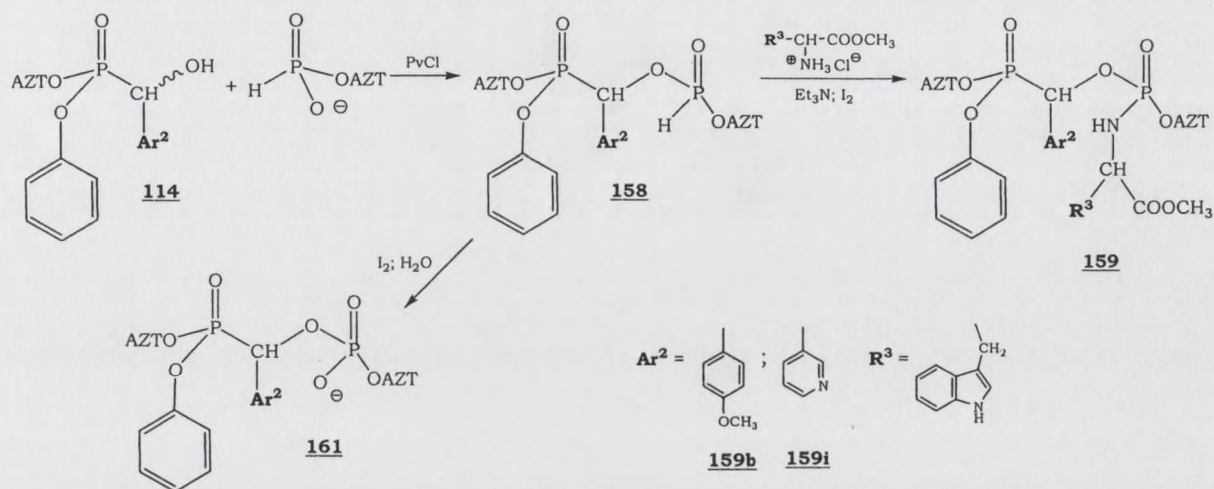
The experiment was conducted in a greenhouse. The plants were grown in pots containing a standard potting mix. The plants were divided into three groups: control, high light, and low light. The control group received normal light conditions, the high light group received 16 hours of light per day, and the low light group received 8 hours of light per day. The temperature was maintained at 20-25 degrees Celsius, and the plants were watered and fertilized regularly.

3. Results

The results of the experiment are shown in Figure 1. The high light group showed the highest growth rate, reaching a height of 15 cm after 4 weeks. The control group reached a height of 10 cm, and the low light group reached a height of 5 cm. The difference in growth rate between the high light and control groups was statistically significant (p < 0.05). The difference between the control and low light groups was also significant (p < 0.05). The results indicate that light intensity is a major factor influencing plant growth.

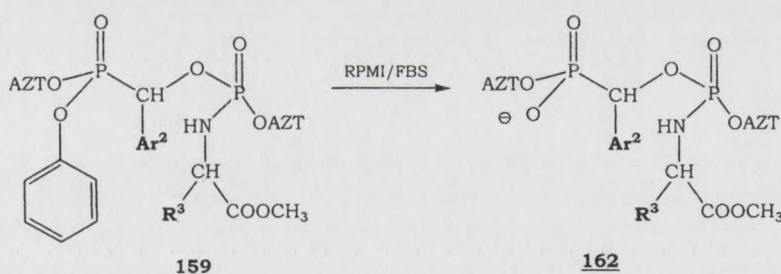
4. Discussion

The results of this study confirm the importance of light intensity in plant growth. Higher light intensity provides more energy for photosynthesis, leading to faster growth. The control group, which received normal light conditions, showed a moderate growth rate. The low light group, which received only 8 hours of light per day, showed a significantly lower growth rate. This suggests that light intensity is a limiting factor for plant growth. The results also show that temperature and nutrient availability are important factors, but their effects were less pronounced than those of light intensity. Further research is needed to determine the optimal light intensity for different plant species and to investigate the interactions between light, temperature, and nutrients.



Ryc. 86

Otrzymane fosfoniano-amidofosforany **159b** i **159i** okazały się bardzo trwałe ($t_{1/2}$ około 4 dni) w mieszaninie RPMI/FBS i nie generowały, tak jak oczekiwałam, α -hydroksyfosfonianów **114** i amidofosforanowych monoestrów **160** (HPLC). Znalazło to potwierdzenie w braku aktywności antywirusowej tych związków. Zaskakująca była duża stabilność obu fosfoniano-amidofosforanów **159b** i **159i** z różnymi grupami Ar^2 w łączniku metylenowym. Sądziłam, iż charakter elektronowy grupy Ar^2 będzie wpływał na łatwość pęknięcia wiązania P-O bądź C-O w części amidofosforanowej, podczas ataku cząsteczki wody odpowiednio na atom fosforu lub atom węgla. Jak się jednak okazało, w RPMI/FBS dochodziło wyłącznie do hydrolizy wiązania fosfoestrowego w części C-fosfonanowej (Ryc. 87).



Ryc. 87

Powyższe fosfoniano-amidofosforany **159b** i **159i** były dla mnie przykładem tego, że korzystne właściwości otrzymanych związków, oczekiwane na podstawie ich budowy, nie zawsze znajdują potwierdzenie w późniejszych badaniach biologicznych tych związków.



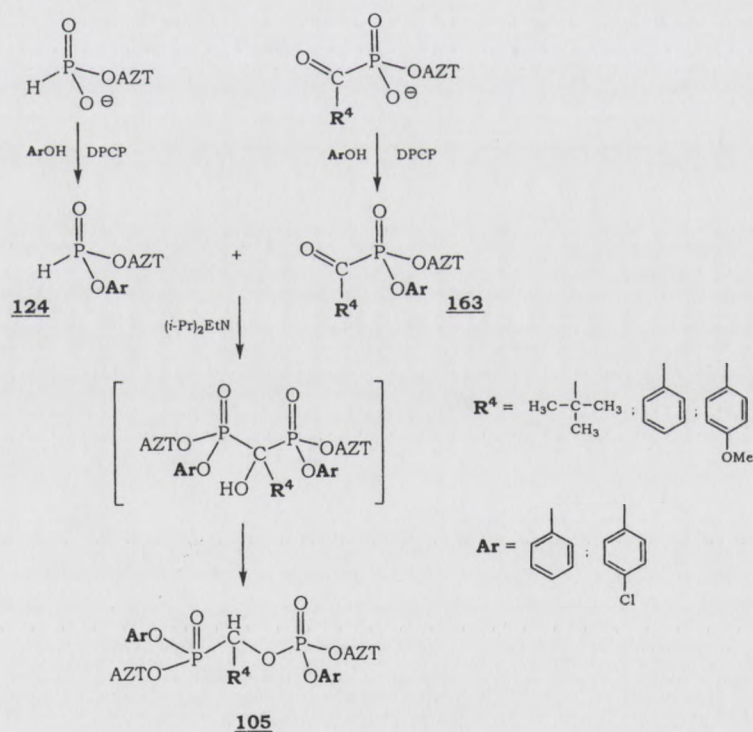
During the past few years, the use of electronic equipment in the laboratory has increased rapidly. This equipment is used for a wide variety of purposes, including the measurement of physical quantities, the control of processes, and the simulation of systems. The use of electronic equipment in the laboratory has many advantages, including the ability to measure quantities that are difficult to measure with conventional instruments, the ability to control processes that are difficult to control with conventional instruments, and the ability to simulate systems that are difficult to simulate with conventional instruments. The use of electronic equipment in the laboratory is also becoming increasingly important in the field of education, where it is used to teach students about the principles of electronics and the applications of electronics in industry and research.

The purpose of this document is to provide a guide to the use of electronic equipment in the laboratory. It is intended for use by students and faculty alike. The document is divided into two main sections. The first section, "Introduction," discusses the general principles of electronics and the applications of electronics in industry and research. The second section, "Equipment," describes the various types of electronic equipment used in the laboratory, including amplifiers, oscillators, and logic circuits. This section also provides information on the safety precautions that should be taken when using electronic equipment in the laboratory.

7.2 Fosfoniano-fosforany

H-Fosfoniano-C-fosfoniany typu **158**, powstające w wyniku kondensacji α -hydroksyfosfonianów i H-fosfonianowego monoestru, mogły być dalej przekształcane, analogicznie jak w przypadku syntezy opisanych powyżej fosfoniano-amidofosforanów, w pochodne np. fosfoniano-fosforany typu **105**.

Fosfoniano-fosforany były już przedmiotem wcześniejszych badań w Pracowni Analogów Nukleotydów i Oligonukleotydów, z których jak już wspominałam, wyniknęło moje zainteresowanie α -hydroksyfosfonianami arylowo nukleozydowymi (Ryc. 48). Te nukleotydowe analogi typu **105** otrzymywane były wówczas na drodze reakcji H-fosfonianodiestru **124** i P-acylofosfonianodiestru arylowo nukleozydowego **161** wobec DIPEA (Ryc. 88).¹⁰⁰ Mimo, że reakcja ta na ogół dawała z dobrą wydajnością pożądaną fosfoniano-fosforany, jednak różnorodność ich struktur była mocno ograniczona dostępnością użytych substratów (szczególnie P-acylofosfonianów **163**).



Ryc. 88

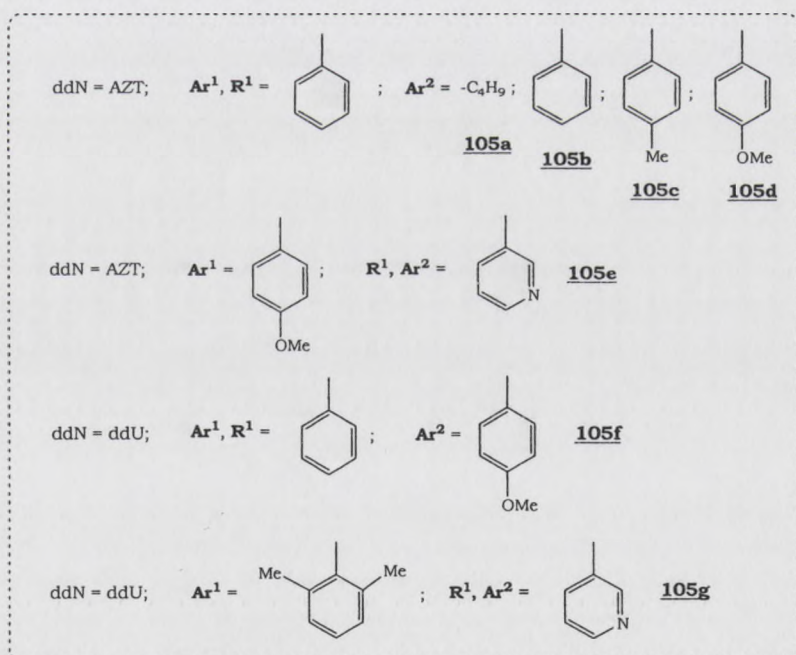
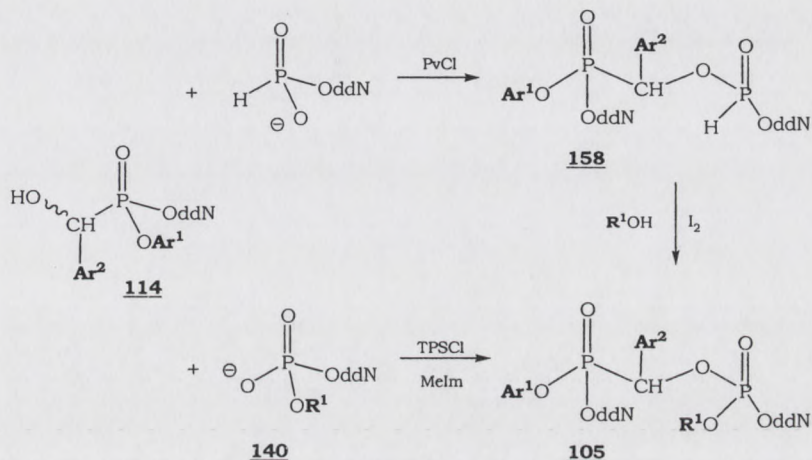
Zastosowanie α -hydroksyfosfonianów do otrzymywania fosfoniano-fosforanów **105** umożliwiało syntezę ich pochodnych o założonej strukturze (nie jako wynik spontanicznego przegrupowania difosfonianu we wcześniejszej metodzie) oraz z różnymi grupami aryłowymi i nukleozydowymi jako elementy części fosfonianowej lub fosforanowej związków **105**.

1.2. Introduction

The purpose of this study is to investigate the effects of the proposed changes on the system. The study is divided into two main parts: a theoretical analysis and a practical implementation. The theoretical analysis will focus on the mathematical models and the underlying principles. The practical implementation will involve the development of a software prototype and the evaluation of its performance. The results of the study will be presented in the form of a report and a set of recommendations.

The first part of the study is a theoretical analysis of the system. This part will discuss the mathematical models used to describe the system's behavior. It will also explore the underlying principles that govern the system's operation. The second part of the study is a practical implementation of the proposed changes. This part will involve the development of a software prototype and the evaluation of its performance. The results of the study will be presented in the form of a report and a set of recommendations.

Używając α -hydroksyfosfonianów typu **114** jako substratów, opracowałam dwie metody syntezy fosfoniano-fosforanów typu **105** (Ryc. 89). W pierwszej z nich wykorzystałam, wspomniane wcześniej, łatwe tworzenie się H-fosfoniano-C-fosfonianów typu **158**, które w utleniającej kondensacji z fenolem lub pirydynolem w obecności jodu szybko i wydajnie prowadziły do docelowych fosfoniano-fosforanów **105**.



Ryc. 89

W drugiej metodzie kondensowałam α -hydroksyfosfoniany **114** (jako substraty hydroksylowe) z odpowiednimi fosforanodiestrami arylo nukleozydowymi typu **140**, w warunkach opisanych przez V. Efimova¹³⁷ (TPSCl wobec N-metyloimidazolu) (Ryc. 89). W reakcjach tych fosfoniano-fosforany tworzyły się stosunkowo szybko (~30 min.) i praktycznie ilościowo (³¹P NMR). Problemem była jedynie trudność z usunięciem N-metyloimidazolu (wysoka temp. wrzenia 198°C) z mieszaniny

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

1907-1908

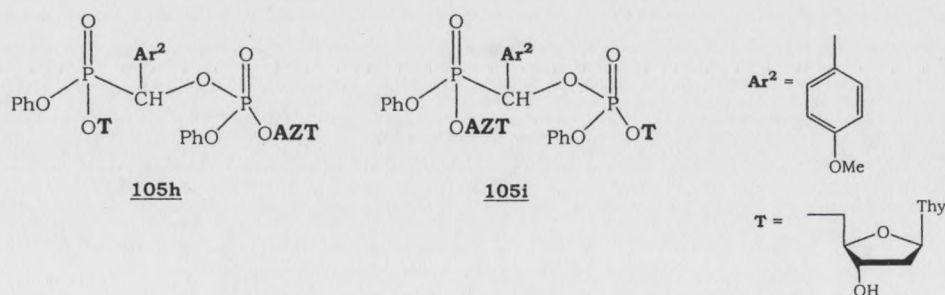
1907-1908

reakcyjnej (kilkukrotne przemywanie fazy organicznej 1M KH_2PO_4 , pH = 4), którego obecność utrudniała izolację fosfoniano-fosforanów metodami chromatograficznymi i wpływała negatywnie na ich stabilność. W obu metodach otrzymywałam czyste (^1H , ^{31}P NMR, HPLC) produkty końcowe z porównywalnymi, dobrymi wydajnościami (~ 50-90%).

Jak wspomniałam we wstępie, fosfoniano-fosforany **105c-d** rozkładały się w komórkowych mediach hodowlanych do odpowiednich α -hydroksyfosfonianów **114** oraz fosforanodiestrów **140**, natomiast w **105a-b** dochodziło do hydrolizy wiązań fosfoestrowych.¹⁰⁰ Dalsze modyfikacje w strukturze fosfoniano-fosforanów **105e-g** powodowały, że ich rozkład był coraz bardziej złożony i niekontrolowany, co nie jest korzystne w projektowaniu potencjalnych proleków. Analiza rozkładu tych związków znacznie wykraczała poza cele tej rozprawy, dlatego nie będzie przeze mnie omawiana.

Aktywność antywirusowa fosfoniano-fosforanów **105d** i **105e** zbliżona była do aktywności AZT ($\text{EC}_{50} = 0,04 \mu\text{M}$). Wszystkie badane tego typu pochodne α -hydroksyfosfonianów (**105a-e**) powodowały również podobny do AZT efekt cytotoksyczny ($\text{CC}_{50} = 24-67 \mu\text{M}$). Przebadane zostały również właściwości biologiczne fosfoniano-fosforanów ddU **105f-g**, aby rozstrzygnąć, czy mogą one działać jako pronukleotydy. Duża wartość EC_{50} (>100 μM) obu fosfoniano-fosforanów **105f-g** wskazała na to, że ta grupa pochodnych α -hydroksyfosfonianów służyć może jedynie jako forma „depozytu” nukleozydów a nie nukleotydy.

Doświadczenia z fosfoniano-fosforanami zakończyłam syntezą niesymetrycznych pochodnych dwóch nukleozydów: AZT i T **105h-i** (Ryc. 90), aby sprawdzić, która część, fosfonianowa czy fosforanowa, wnosi większy udział w hamowaniu replikacji wirusa HIV-1.



Ryc. 90

Zakładałam, że za aktywność anti-HIV-1 będzie odpowiedzialny fragment związany z AZT, a nie z tymidyną. Jak się jednak okazało aktywności antywirusowe

The first part of the report deals with the general situation in the country and the progress of the work during the year. It is followed by a detailed account of the work done in each of the various departments.

The second part of the report deals with the work done in each of the various departments. It is followed by a detailed account of the work done in each of the various departments.

The third part of the report deals with the work done in each of the various departments. It is followed by a detailed account of the work done in each of the various departments.

The fourth part of the report deals with the work done in each of the various departments. It is followed by a detailed account of the work done in each of the various departments.

The fifth part of the report deals with the work done in each of the various departments. It is followed by a detailed account of the work done in each of the various departments.

The sixth part of the report deals with the work done in each of the various departments. It is followed by a detailed account of the work done in each of the various departments.

($EC_{50} = 0,08 \mu M$) obu niesymetrycznych związków **105h** i **105i** okazały się identyczne i porównywalne z aktywnościami wcześniej omówionych fosfoniano-fosforanów bis AZT. Co ciekawe, związki te nie były jednak cytotoksyczne ($CC_{50} > 100 \mu M$), co prawdopodobnie można wytłumaczyć obecnością tymidyny, zdolnej do obniżania toksycznego wpływu AZT.¹⁴¹ Mechanizm molekularny tego działania nie jest jak dotąd wyjaśniony. Sądzę jednak, że jest on podobny lub identyczny z tym, kiedy traktowano komórki mieszaniną AZT i T. Te ostatnie wyniki mogą stanowić cenną wskazówkę ukierunkowującą dalsze badania, nad poprawieniem parametrów farmakokinetycznych wciąż stosowanych leków anty-HIV (np. AZT), co wydaje się trudne do osiągnięcia na innej drodze.

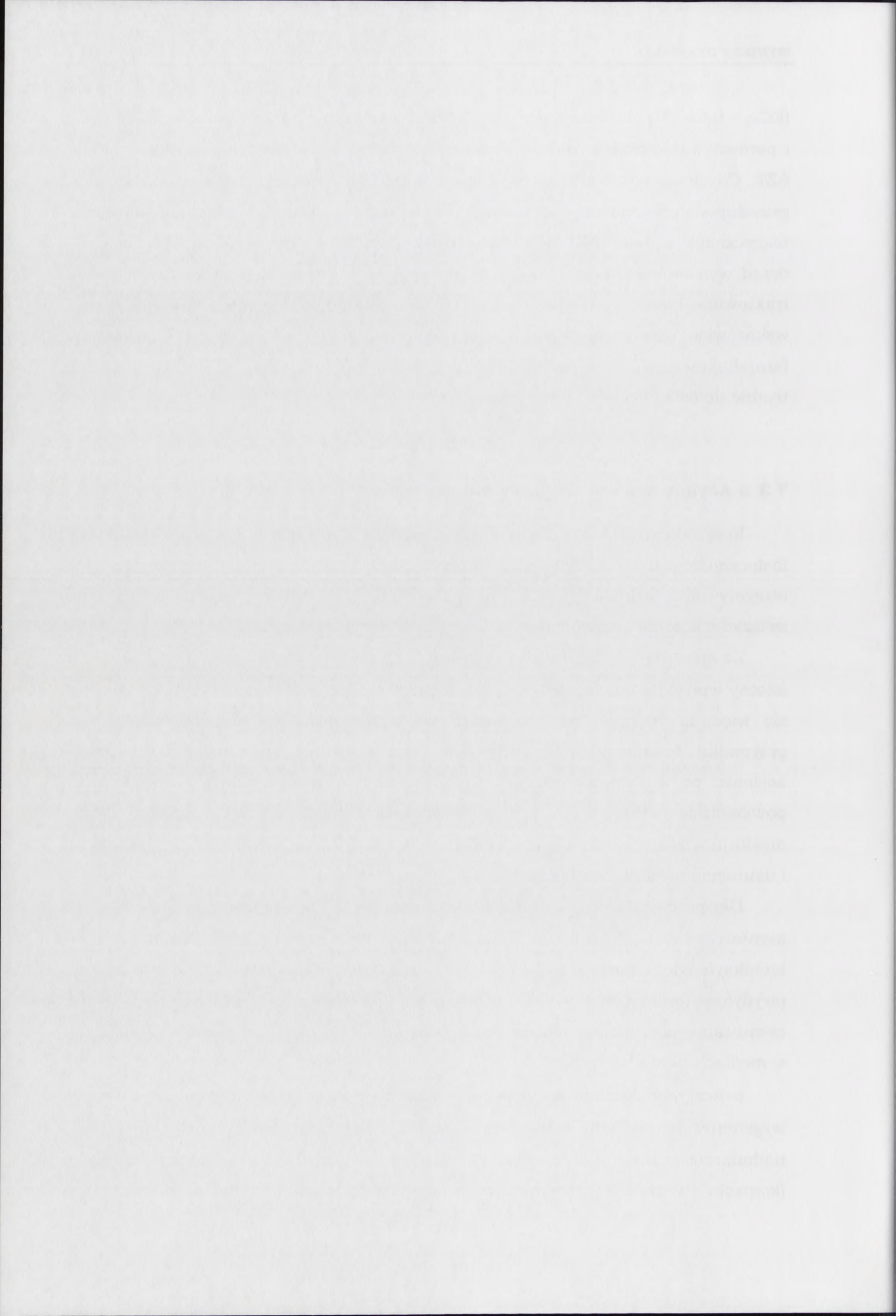
7.3 α -Acylofosfoniany fenylovo nukleozydowe

Rozkład α -hydroksyfosfonianów pochodnych 2- i 4-pirydynokarboaldehydu do fosforanodiestru, o czym już wspomniałam, uniemożliwiał wprawdzie ich otrzymywanie, jednak był zachęcający z punktu widzenia wykorzystania tego typu związków jako potencjalnych pronukleotydów antywirusowych.

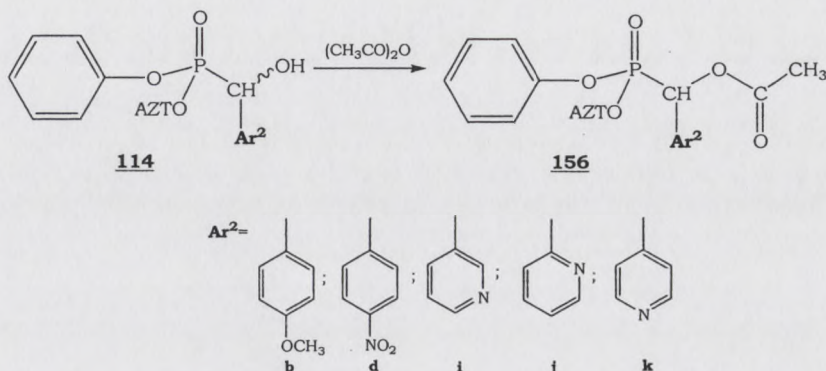
Ze sposobu rozkładu wyżej wymienionych α -hydroksyfosfonianów wynikało, iż istotny wpływ na ten rozkład ma prawdopodobnie grupa α -hydroksylowa. Wydawało się więc, że najprostszym sposobem na wyeliminowanie, niepożądaną w tym przypadku, reaktywności tej grupy byłoby zablokowanie jej grupą acylową. Grupa acylowa, po wniknięciu związku **156** do komórki, mogłaby być usuwana przez powszechnie występujące w tym środowisku karboksyesteryazy. Jako grupę maskującą zastosowałam grupę acetylową ze względu na łatwość jej wprowadzenia i usunięcia produktów ubocznych.

Dla porównania właściwości fizykochemicznych i biologicznych, postanowiłam zsyntetyzować pochodne α -acylowe również innych α -hydroksyfosfonianów tj. 4-metoksyfenylometanowego **114b**, 4-nitrofenylometanowego **114d** oraz 3-pirydylometanowego **114i**. W przypadku tych związków brałam pod uwagę ewentualne korzyści wynikające ze zwiększenia ich czasu połowicznego rozkładu w mediach komórkowych.

α -Acetylofosfoniany fenylovo nukleozydowe typu **156** otrzymałam traktując wygenerowane *in situ* α -hydroksyfosfoniany fenylovo nukleozydowe typu **114** nadmiarem bezwodnika octowego (10 ekw. molowych) (Ryc. 91). Po około 24 godz. (kontrola ^{31}P NMR), mieszaniny reakcyjne wytrząsałam z wodą, a produkty **156**



oczyszczalam na żelu krzemionkowym otrzymując bez problemu czyste chromatograficznie i spektralnie preparaty.



Ryc. 91

Wyniki przeprowadzonych analiz α -acetylofosfonianów w RPMI oraz mieszaninie RPMI z FBS [9 : 1 (v/v)] dowiodły znacznej ich trwałości ($t_{1/2} > 500$ min), spowodowanej prawdopodobnie dużą stabilnością acetylowej grupy maskującej. Szczególnie zaskakująca była trwałość tej grupy w medium z surowicą z płodów bydłych (FBS), która, jak się spodziewałam, powinna zawierać karboksyestery. Brak enzymatycznej hydrolizy wiązania estrowego w α -acetylofosfonianach typu **156** potwierdziłam eksperymentem z użyciem esterazy ze świńskiej wątroby (pig liver esterase; PLE). Ponad 24 godzinna inkubacja α -acetylo- α -(3-pirydylo)metanofosfonianu **156i** z PLE w mieszaninie $\text{CH}_3\text{CN} : 0,2 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ pH = 7,4 [1 : 1 (v/v)] w temp. 37 °C wykazała, iż, związek ten nie jest dobrym substratem dla tego enzymu. Podobne spostrzeżenia opisał F. Hammerschmidt¹⁴², który badał wykorzystanie α -acylofosfonianów dialkylowych do otrzymywania odpowiednich enancjomerów α -hydroksyfosfonianów pod wpływem enzymów esterolitycznych (m.in. PLE).

Sposób degradacji α -acetylo- α -(3-pirydylo)metanofosfonianu 3'-azydo-3'-deoksytymidylowo fenyloвого **156i** po hydrolizie grupy acetyloestrowej podobny był do rozkładu jego nieacetylowanej pochodnej **114i**, tzn. przebiegał wg dwóch ścieżek **A**, z utworzeniem H-fosfonianu AZT (36% łącznie z powstałym z niego nukleozydem w RPMI/FBS, analiza HPLC po 3 dniach) i **B**, z powstaniem α -hydroksyfosfonianowego monoestru **138i** (35%). Ponadto dochodziło również do pęknięcia wiązania fosfoestrowego jeszcze w nieodacetylowanym związku dając α -acetylofosfonian nukleozydowy **157i** (29%) (Ryc. 92).

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

1950

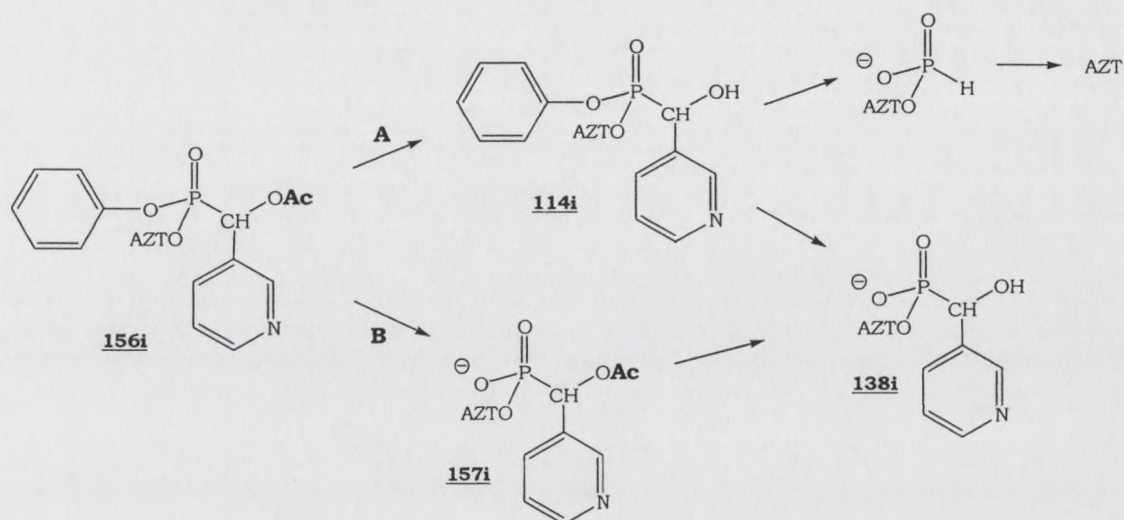
1950

1950

1950

1950

1950



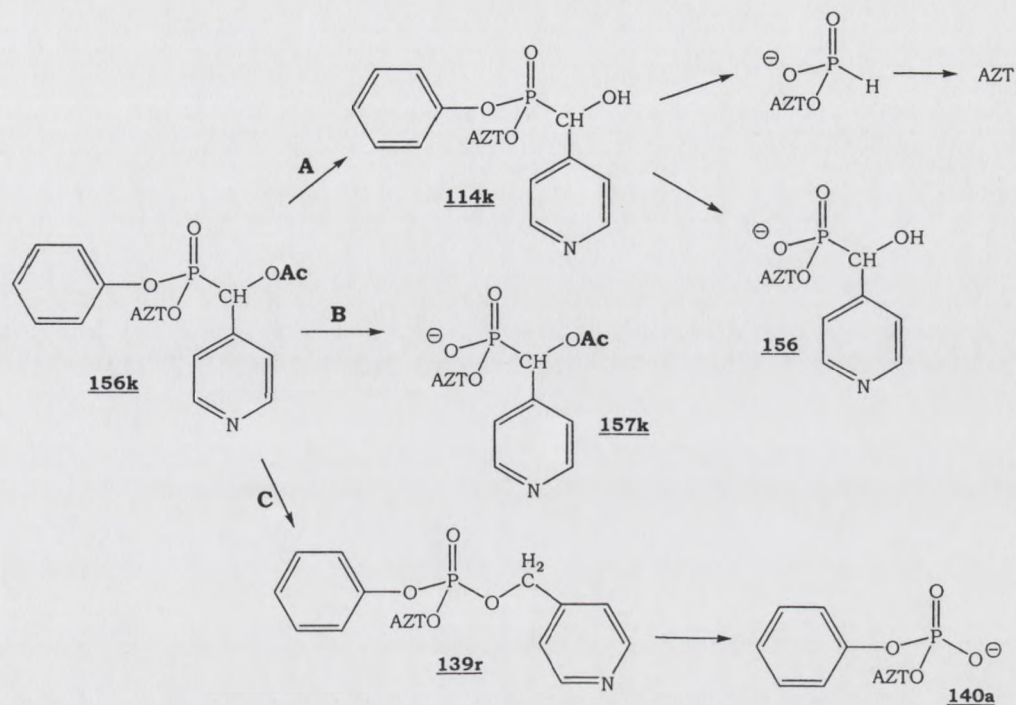
Ryc. 92

Rozkład α -acetylo- α -(4-pirydylo)metanofosfonianu 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylowego **156k** w mediach hodowlanych komórek nie okazał się nadzwyczaj interesujący, biorąc pod uwagę to, iż α -hydroksy- α -(4-pirydylo)metanofosfonian **114k** generował jeszcze w mieszaninie reakcyjnej wyłącznie fosforanodiester fenylo nukleozydowy **140a**. Po powolnym odacetylowywaniu grupy α -hydroksylowej ($t_{1/2} = 520$ min w FBS/RPMI lub 2100 min w FBS, analiza HPLC) powstały α -hydroksyfosfonian **114k** generował głównie monoester α -hydroksyfosfonianowy **138k** (61%, RPMI/FBS) H-fosfonian nukleozydowy (22%), a także fosforanotriester **139r** (17%), co było zgodne z tendencją do przegrupowania α -hydroksyfosfonianów **114** z grupą Ar^2 silnie wyciągającą elektrony (Ryc. 93).

Niska aktywność antywirusowa ($EC_{50} = 0,1 \mu M$) i zarazem niska cytotoksyczność ($CC_{50} > 100 \mu M$) wszystkich otrzymanych przez mnie α -acetylofosfonianów fenylo nukleozydowych typu **156** była najprawdopodobniej związana ze zbyt dużą ich stabilnością. Co ciekawe, jedynie w komórkach z dwoma szczepami wirusa HIV-1 (szczepy odporne na nienukleozydowe inhibitory RT) α -acetylofosfoniany **156** odznaczały się dobrą zdolnością do hamowania replikacji wirusa ($EC_{50} = 0,03-0,09 \mu M$).

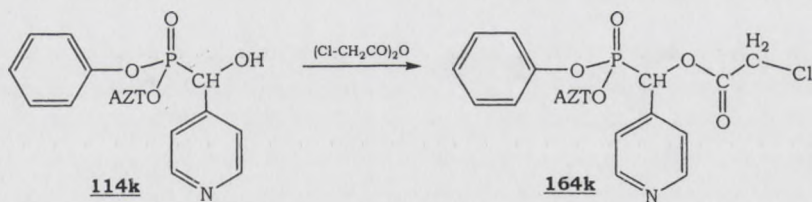
1950

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.



Ryc. 93

W związku z obserwowaną odpornością estru acetylowego na hydrolizę enzymatyczną postanowiłam zwiększyć jego labilność chemiczną przez zastosowanie grupy chloroacetylowej. Szczególnie interesowało mnie otrzymanie pochodnej chloroacetylowej α -hydroksy- α -(4-pirydylo)metanofosfonianu fenylo nukleozydowego (związek **164k** ryc. 94). Sądziłam, iż szybsze usunięcie grupy maskującej może zmienić udział poszczególnych produktów rozkładu i być może zaprocentować większą ilością produktu przegrupowania fosfoniano-fosforanowego (fosforanotriestru **139r**).



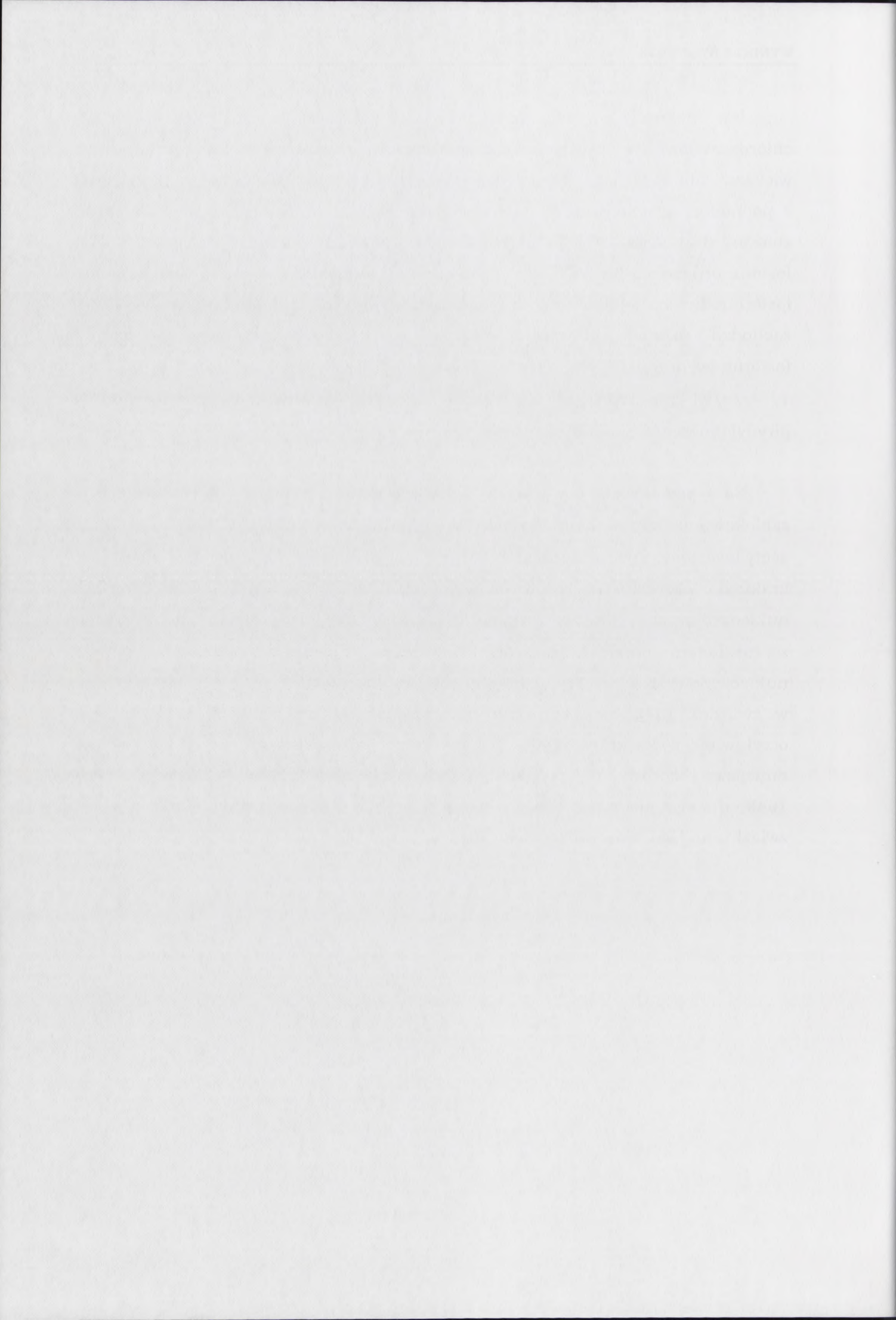
Ryc. 94

Synteza tego związku, z wykorzystaniem bezwodnika kwasu chlorooctowego, przebiegała podobnie jak α -acetylofosfonianów. Po trwającym kilka godzin chloroacetylowaniu wygenerowanego *in situ* α -hydroksyfosfonianu **114k**, przerobienie, a następnie rozdzielanie chromatograficznym otrzymałam czysty α -chloroacetylo- α -(4-pirydylo)metanofosfonian fenylo nukleozydowy **164k**.

[The following text is extremely faint and illegible due to low contrast and scan quality. It appears to be a multi-paragraph document.]

Jak pokazały wyniki analiz HPLC, korzyścią z zastosowania grupy chloroacetylowej w α -acylofosfonianie fenylowo nukleozydowym była znacznie większa labilność tego typu pochodnej **164k** ($t_{1/2} < 10$ min) w porównaniu z pochodną acetylową **156k**. Sposób rozkładu obu związków był jednak bardzo zbliżony (trzy ścieżki rozkładu). Nie zaobserwowałam znacznego zwiększenia ilości fosforanotriestru **139r** (22%, RPMI/FBS, HPLC), a przede wszystkim spodziewanego fosforanodiestru **140a**. Nie było to również związane z pH środowiska, w którym zachodził rozkład. Inkubacja chloroacetylowej pochodnej **164k** w buforze fosforanowym o pH = 9 a także w mieszaninie CH₃CN: H₂O: Et₃N o pH \approx 12 [2 : 1 : 1, (v/v/v)] nie wpłynęła na zmianę sposobu rozkładu α -chloroacetylo- α -(4-pirydylo)metanofosfonianu fenylowo nukleozydowego **164k**.

Na podstawie powyższych eksperymentów, mogę podsumować, że zablokowanie grupy hydroksylowej w α -hydroksyfosfonianach typu **114** grupą acetylową zwiększyło znacznie ich trwałość, lecz objawiło się prawdopodobnie także brakiem aktywności antywirusowej takich α -acetylofosfonianów fenylowo nukleozydowych. Sposób rozkładu związków **156** był bardzo porównywalny z rozkładem odpowiednich nieblokowanych α -hydroksyfosfonianów fenylowo nukleozydowych typu **114**. Zastosowanie bardziej labilnej grupy chloroacetylowej w związku **164k** nie zaprocentowało również wygenerowaniem większej ilości oczekiwanego fosforanu **140a**, potencjalnego pronukleotydu. Do chwili złożenia niniejszej rozprawy, nie posiadałam wyników aktywności antywirusowej związku **164k**, dlatego nie mogę ocenić, jaki jest wpływ obecności atomu chloru w tym związku na jego właściwości biologiczne.



VI. PODSUMOWANIE

Celem mojej rozprawy doktorskiej było poznanie α -hydroksyfosfonianów arylo- nukleozydowych jako nowej grupy związków o potencjalnych właściwościach antywirusowych. Aby to osiągnąć konieczne było zrealizowanie kilku celów cząstkowych.

Pierwszym z nich było opracowanie metody syntezy α -hydroksyfosfonianów arylo- nukleozydowych. Ze względu na otoczenie centrum fosforowego w tych α -hydroksyfosfonianach (obecność pierścienia arylowego **Ar¹** i nukleozydowego) wykorzystanie dostępnych w literaturze sposobów otrzymywania tego typu związków było niemożliwe lub mało wydajne. Dzięki badaniom metodycznym udało mi się ustalić dogodne warunki dla syntezy α -hydroksyfosfonianów arylo- nukleozydowych. Korzystając z dostępnych syntetycznie H-fosfonianów nukleozydów generowałam H-fosfonianodiestry arylo- nukleozydowe, które *in situ* ulegały kondensacji z aldehydem wobec zasady dając oczekiwane α -hydroksyfosfoniany arylo- nukleozydowe. Jak się okazało, rodzaj użytego aldehydu wymuszał rodzaj stosowanej zasady. Reakcja addycji z aldehydami alifatycznymi i benzaldehydem niepodstawionym oraz z podstawnikami dostarczającymi elektrony lub słabo wyciągającymi elektrony należało prowadzić wobec DIPEA. Natomiast w przypadku aldehydów z podstawnikami silnie wyciągającymi elektrony reakcje addycji zachodziły najlepiej w obecności 2,6-lutydyny. W ten sposób łatwo i efektywnie otrzymałam α -hydroksyfosfoniany arylo- nukleozydowe z różnymi grupami **Ar²** w części hydroksymetanowej, a także grupami **Ar¹** w części fosforoestrowej.

Drugim celem cząstkowy mojej rozprawy było zbadanie właściwości otrzymanych α -hydroksyfosfonianów arylo- nukleozydowych. Z punktu widzenia zastosowania tych związków jako potencjalnych proleków, istotne było określenie ich stabilności oraz sposobu rozkładu w mediach hodowlanych komórek (RPMI i RPMI/FBS) w oparciu o analizę HPLC oraz spektroskopię ³¹P NMR. Dysponując serią różnych α -hydroksyfosfonianów arylo- nukleozydowych mogłam stwierdzić, iż związki te szybko ($t_{1/2}$ = 7-40 min) ulegały rozkładowi wg trzech ścieżek **A**, **B** i **C** w zależności od natury elektronowej dwóch grup arylo- wych **Ar¹** i **Ar²** obecnych w cząsteczce badanych związków.

- Ścieżka **A** była efektem spontanicznej dysocjacji α -hydroksyfosfonianów arylo- nukleozydowych, które występują w równowadze z aldehydem

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

1950-1951

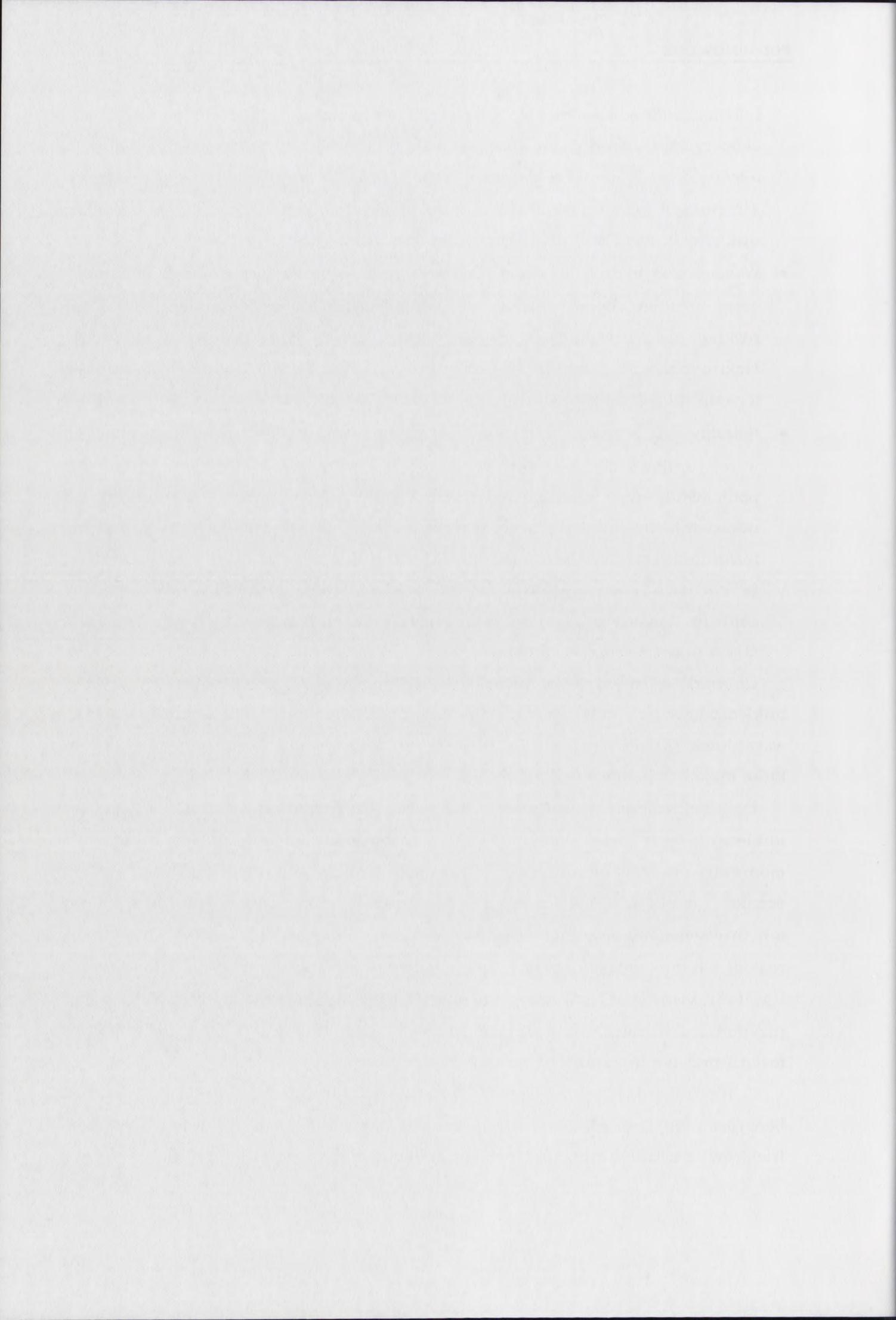
i H-fosfonianodiestrem. Istnienie takiej równowagi udowodniłam w kilku eksperymentach. Sposób rozkładu **A** był charakterystyczny szczególnie dla α -hydroksyfosfonianów z podstawnikami dostarczającymi elektrony (Ar^2 = fenyl, 4-metoksyfenyl i 4-metylofenyl), a jego końcowym produktem był H-fosfonian nukleozydu (w RPMI) lub nukleozyd (w obecności FBS).

- W ścieżce **B** hydrolizie ulegało wiązanie fosforoestrowe α -hydroksyfosfonianów, czego efektem było tworzenie α -hydroksyfosfonianowych monoestrów. Taki rozkład obserwowałam w przypadku pochodnych posiadających podstawniki elektronoakceptorowe (Ar^2 = 4-chlorofenyl, 4-nitrofenyl i 3-pirydydyl), natomiast jego udział zależał zarówno od rodzaju grupy Ar^1 jak i Ar^2 .
- Ścieżka **C** była wynikiem przegrupowania fosfoniano-fosforanowego w α -hydroksyfosfonianie aryloво nukleozydowym posiadającym w grupie Ar^2 podstawnik silnie wyciągający elektrony (Ar^2 = 4-nitrofenyl). Nie udało mi się udowodnić mechanizmu tego przegrupowania, na drodze którego tworzył się fosforanotriester aryloво 4-nitrobenzyloво nukleozydowy. Jest jednak możliwe, że zachodzi ono na skutek ataku nukleofilowej grupy hydroksylowej na centrum fosforowe z jednoczesną pseudorotacją bipyramidy trygonalnej, jako stanu przejściowego w tej reakcji.

Co warte zaznaczenia w kontekście stabilności, α -hydroksyfosfoniany aryloво nukleozydowe były całkowicie stabilne przez co najmniej 6 dni w silnie kwasowych warunkach (KH_2PO_4 pH = 2,0), co jest pożądaną cechą potencjalnych proleków, które mają być podawane doustnie.

Do określenia sposobu rozkładu α -hydroksyfosfonianów aryloво nukleozydowych przy pomocy HPLC zsyntetyzowałam α -hydroksyfosfonianowe monoestry oraz fosforanotriestry, służące jako wzorce produktów rozkładu. W mojej ocenie, istotnym osiągnięciem tej części rozprawy było otrzymanie α -hydroksyfosfonianów nukleozydów podczas, nieopisanej dotąd w literaturze, reakcji α -hydroksyfosfonianodiestrów z jodem w mieszaninie z wodą, trietyloaminą i acetonitrylem (1 : 1 : 2 v/v/v). Przebieg tej szybkiej i wydajnej reakcji mógł być przypuszczalnie związany z atakiem nukleofilowym anionu rodanowego (I) na atom fosforu przy istotnym udziale grupy hydroksylowej.

Z nieco bardziej szczegółowych badań nad otrzymanymi fosforanotriestrami benzyloво fenyloво nukleozydowymi mogłam wywnioskować, iż trwałość tego typu triestrów uzależniona była od rodzaju podstawnika w części benzylowej. Związane



było to prawdopodobnie z rozkładem tych związków na skutek pękania przede wszystkim wiązania C-O a nie wiązania P-O.

W ramach etapu obejmującego badania właściwości α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych, określiłam również ich lipofilowość, gdyż wielkość tę (jako $\log P$) koreluje się ze zdolnością przechodzenia leków przez błony komórkowe, a tym samym z dotarciem do miejsca ich działania. Współczynnik podziału $\log P$ dla wybranych α -hydroksyfosfonianów AZT był większy (3-73 razy) niż dla samego nukleozydu. Wyjątkiem okazały się pochodne aldehydu nikotynowego, które były mniej lipofilowe, ale jako związki obojętne mogą mieć również szansę na wniknięcie do zainfekowanej komórki.

Otrzymane wyniki aktywności antywirusowej i cytotoksyczności (współpraca z prof. P. La Colla z Cagliari, Włochy) wybranych α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych, pozwoliły mi skorelować rozkład tych związków z właściwościami biologicznymi. Najlepszą zdolność do hamowania replikacji wirusa HIV-1 a przy tym najmniejszą cytotoksyczność wykazał α -hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian fenylo nukleozydowy. Na przykładzie pochodnych tego związku (z modyfikacjami w części fosforoestrowej) zaobserwowałam, co według mnie niezwykle ważne, że odpowiednia kombinacja grup Ar^1 i Ar^2 w α -hydroksyfosfonianach umożliwia kontrolę nad kierunkiem ich rozkładu i w pewnym stopniu kontrolę ich aktywności antywirusowej. Porównanie wartości współczynników selektywności (SI) α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych z ich współczynnikiem podziału ($\log P$) wykazało ponadto raczej niejednoznaczną korelację między lipofilowością a aktywnością biologiczną potencjalnego terapeutyku.

Ostatnim etapem mojej rozprawy było wykorzystanie α -hydroksyfosfonianów arylo nukleozydowych do otrzymywania z nich bardziej złożonych pochodnych. Pomysł ten nasunął się podczas syntezy α -hydroksyfosfonianów, w której widoczne były również produkty reaktywności grupy hydroksylowej w powstających α -hydroksyfosfonianach. Najważniejszymi osiągnięciami tego etapu było:

- ◇ opracowanie prostej i wydajnej metody syntezy fosfoniano-amidofosforanów wykorzystującej możliwość utlenienia ugrupowania H-fosfonianowego do amidofosforanowego w początkowo powstającym H-fosfoniano-C-fosfonianie,
- ◇ ustalenie warunków dwóch prostych i wydajnych metod syntezy fosfoniano-fosforanów korzystając z H-fosfoniano-C-fosfonianów jako produktów przejściowych lub podejścia Efimova, z większą możliwością modyfikacji

The first part of the report discusses the current state of the world economy and the impact of the Asian financial crisis. It notes that the crisis has led to a sharp decline in economic growth in many Asian countries, and has had a significant impact on the global economy.

The second part of the report discusses the impact of the crisis on the global economy. It notes that the crisis has led to a sharp decline in economic growth in many Asian countries, and has had a significant impact on the global economy.

The third part of the report discusses the impact of the crisis on the global economy. It notes that the crisis has led to a sharp decline in economic growth in many Asian countries, and has had a significant impact on the global economy.

The fourth part of the report discusses the impact of the crisis on the global economy. It notes that the crisis has led to a sharp decline in economic growth in many Asian countries, and has had a significant impact on the global economy.

The fifth part of the report discusses the impact of the crisis on the global economy. It notes that the crisis has led to a sharp decline in economic growth in many Asian countries, and has had a significant impact on the global economy.

The sixth part of the report discusses the impact of the crisis on the global economy. It notes that the crisis has led to a sharp decline in economic growth in many Asian countries, and has had a significant impact on the global economy.

The seventh part of the report discusses the impact of the crisis on the global economy. It notes that the crisis has led to a sharp decline in economic growth in many Asian countries, and has had a significant impact on the global economy.

The eighth part of the report discusses the impact of the crisis on the global economy. It notes that the crisis has led to a sharp decline in economic growth in many Asian countries, and has had a significant impact on the global economy.

The ninth part of the report discusses the impact of the crisis on the global economy. It notes that the crisis has led to a sharp decline in economic growth in many Asian countries, and has had a significant impact on the global economy.

The tenth part of the report discusses the impact of the crisis on the global economy. It notes that the crisis has led to a sharp decline in economic growth in many Asian countries, and has had a significant impact on the global economy.

The eleventh part of the report discusses the impact of the crisis on the global economy. It notes that the crisis has led to a sharp decline in economic growth in many Asian countries, and has had a significant impact on the global economy.

The twelfth part of the report discusses the impact of the crisis on the global economy. It notes that the crisis has led to a sharp decline in economic growth in many Asian countries, and has had a significant impact on the global economy.

podstawników zarówno w części fosfonianowej jak i fosforanowej niż we wcześniej stosowanej metodzie z P-acylofosfonianami,

- ◇ zwiększenie trwałości α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych przez zablokowanie grupy hydroksylowej grupą acetylową lub bardziej labilną grupą chloroacetylową, co umożliwiło przebadanie sposobu rozkładu tych α -hydroksyfosfonianów, które ulegały dekompozycji już podczas ich syntezy.

Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki badań nad α -hydroksyfosfonianami arylowo nukleozydowymi pozwoliły mi zapoznać się z ich właściwościami chemicznymi, a także skorelować je z niektórymi właściwościami biologicznymi. W moim odczuciu udało mi się zatem zrealizować postawione sobie cele, a ponadto otrzymane informacje stały się źródłem inspiracji do przeprowadzenia innych ciekawych badań (np. dotyczących fosforanotriestrów) przydatnych w projektowaniu nowych związków antywirusowych.

Wzrostowe zmiany w ciele człowieka, jak i inne, nie są
 jednakże związane z 1-rychodzeniem.
 Wzrostowe zmiany w ciele człowieka, jak i inne, nie są
 jednakże związane z 1-rychodzeniem.
 Wzrostowe zmiany w ciele człowieka, jak i inne, nie są
 jednakże związane z 1-rychodzeniem.

Wzrostowe zmiany w ciele człowieka, jak i inne, nie są
 jednakże związane z 1-rychodzeniem.
 Wzrostowe zmiany w ciele człowieka, jak i inne, nie są
 jednakże związane z 1-rychodzeniem.
 Wzrostowe zmiany w ciele człowieka, jak i inne, nie są
 jednakże związane z 1-rychodzeniem.
 Wzrostowe zmiany w ciele człowieka, jak i inne, nie są
 jednakże związane z 1-rychodzeniem.

VII. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Materiały i metody

Widma NMR rejestrowane były na spektrofotometrze Varian Unity 300. Eksperymenty ^{31}P NMR przeprowadzane były w 25 °C w probówkach \varnothing 5 mm (0,6 ml) przy stężeniach związków zawierających fosfor wynoszących 0,1 mmol/ml.

Chromatografię cienkowarstwową przeprowadzałam na płytkach z żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄ (Merck) stosując następujące fazy rozwijające (v/v): A- chloroform- metanol 9 : 1, B- chloroform-2-propanol 95 : 5, C- 2-propanol-woda-25 % wodny roztwór amoniaku 85 : 10 : 5, D- 2-propanol-Et₃N-woda 90 : 5 : 5.

Do chromatografii kolumnowej stosowałam żel krzemionkowy Merck 60 (70-230 mesh ASTM).

Analizy HPLC wykonywałam na chromatografie Waters 2487 z użyciem kolumny Hypersil ODS (4,6 x 250 mm, 5 μm), przepływem 1,5 ml/min i rozpuszczalnikami:

- A - 0,01M trifluorooctan trietyloamoniowy pH = 3,02 i B - A/acetonitryl 1 : 4 (v/v) dla α -hydroksyfosfonianów i fosfoniano-fosforanów
- A - 0,01M octan trietyloamoniowy pH = 7,4 i B - A/acetonitryl 1 : 4 (v/v) dla pozostałych związków

Profil gradientu: 5 min 100% A, 40 min liniowy gradient 0-100% B, 15 min przemywanie 100% A. Integrator LKB 2221.

Oznaczenia molowego współczynnika absorpcji wykonywałam za pomocą spektrofotometru UV/VIS Beckman DU-65.

Współczynnik podziału **P** wyznaczałam w następujący sposób: 10 ml 0,2 M roztworu badanego związku w 1-oktanolu wraz z 10 ml 0,01 M wodnego roztworu KH₂PO₄ pH = 2 wytrząsałam przez 15 min (Vortex), a następnie po rozdzieleniu warstw (15 min) oznaczałam spektrofotometrycznie stężenie badanego związku w warstwie organicznej.

Pirydyna (Aldrich), chlorek metylenu (Aldrich), acetonitryl (Merck), 2,6-lutydyna (Fluka) przechowywane były nad sitami 4 Å, dopóki zawartość wody obniżyła się poniżej 20 ppm (miareczkowanie kulometryczne Karla-Fischera na kulometrze Metrohm 684 KF). Chlorek piwaloilu (Aldrich), chlorek trimetylosililu (POCh) były przedestylowane przed użyciem. Trietyloamina (Merck) i diizopropylloetyloamina (Aldrich) były przedestylowane i przechowywane nad wodorkiem wapnia (Aldrich).

Difenylochlofosforan (Aldrich), jod (Aldrich), kwas fosforowy(III) (Fluka), wszystkie aldehydy (Aldrich) i fenole (Aldrich) oraz etanotiol (Aldrich) były używane bez oczyszczania.

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

RPMI-1640, FBS i ddU pochodziły z Sigmy. AZT syntetyzowałam wg procedur opisanych w literaturze.¹⁴³

H-fosfonian AZT, H-fosfonian ddU oraz H-fosfonian 9-fluorenylometylowy otrzymywałam wg standardowej metody stosowanej w Pracowni Analogów Nukleotydów i Oligonukleotydów tj. w reakcji odpowiednich nukleozydów lub alkoholu z kwasem pirofosfonowym w pirydynie.¹⁴⁴

Opis widm ³¹P NMR produktów pośrednich i końcowych znajduje się w Tabeli 4. (Str. 122).

Ogólna procedura syntezy α -hydroksyfosfonianów aryloво nukleozydowych typu **114**

o z zastosowaniem DIPEA

5'-H-fosfonian nukleozydowy (1 ekw. molowy) i odpowiedni fenol (1,5 ekw. molowego) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną a następnie rozpuściłam w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną [10% (v/v)] (0,1 mmol/1 ml) i dodałam DPCP (1,5 ekw. molowego). Po utworzeniu H-fosfonianodiestru aryloво nukleozydowego (20 min, ³¹P NMR) do mieszaniny reakcyjnej dodałam aldehyd (5 ekw. molowych) oraz DIPEA (2,5 ekw. molowego). Po zakończeniu reakcji (10-80 min, ³¹P NMR) mieszaninę reakcyjną rozcieńczyłam 3 krotnie chlorkiem metylenu i dodałam lodowatego kwasu octowego (1 ekw. molowy) w celu zobojętnienia nadmiaru aminy. Całość przemyłam wodą, a oddzieloną warstwę organiczną osuszyłam nad bezw. Na₂SO₄ i odparowałam do gęstego oleju. α -Hydroksyfosfoniany izolowałam na kolumnach wypełnionych żelem krzemionkowym stosując liniowy gradient (0-10%) 2-propanolu w chlorku metylenu. Z zebranych frakcji, po odparowywaniu a następnie liofilizacji z benzenu otrzymywałam czyste α -hydroksyfosfoniany typu **114** w postaci niehigroskopijnych, zwykle białych, bezpostaciowych ciał stałych.

α -Hydroksy- α -fenylometanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-yloво fenyloво **114a**. Wydajność 70 %, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 9.19-9.17 (1H, m, NH), 7.54-7.05 (11H, m, ArH z dwóch grup Ph i 6-H), 6.13-6.03 (1H, m, 1'-H), 5.54, 5.26, 5.22 (1H, 3d, $J = 3.3\text{Hz}, 2.7\text{ Hz}, 2.7\text{ Hz}, \text{CH}$), 4.34-3.89 (4H, m, 3', 5', 5'', 4'-H), 2.36-1.90 (2H, m, 2', 2''-H), 1.83, 1.81, 1.78, 1.77 (3H, 4d, $J = 1.2\text{ Hz}, 5\text{-CH}_3$). HRMS [MH]⁺: 514,1486 liczone dla [C₂₃H₂₅O₇N₂P]⁺: 514,1491.

α -Hydroksy- α -(4-metoksyfenylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-yloво fenyloво **114b**. Wydajność 73%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 7.44-6.88 (10H, m, ArH i 6-H), 6.16-6.05 (1H, m, 1'-H), 5.19-5.14 (1H, m, CH), 4.36-3.90 (4H,

The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the war. It is followed by a detailed account of the operations of the army and the navy. The report then discusses the financial situation and the state of the economy. Finally, it concludes with a summary of the achievements of the government and the army during the year.

The operations of the army were successful in all directions. The army has been victorious in all its engagements and has captured a large number of prisoners and arms. The navy has also been successful in its operations and has captured several merchant ships and a number of submarines.

The financial situation of the country is satisfactory. The government has been able to meet its obligations and has managed to keep the inflation rate under control. The economy is also showing signs of recovery and is expected to continue to grow in the coming years.

In conclusion, the government and the army have achieved a great deal of success during the year. It is hoped that these achievements will lead to a final victory over the enemy.

m, 3', 5', 5'', 4'-H), 3.82, 3.80, 3.79 (3H, 3s, OCH₃), 2.39-1.90 (2H, m, 2', 2''-H), 1.85, 1.83, 1.80, 1.79 (3H, 3d, *J* = 1.2 Hz, 1.2 Hz, 1.2 Hz, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺: 544,1584 liczone dla [C₂₄H₂₇O₈N₅P]⁺: 544,1597.

α-Hydroksy-α-(4-metylofenylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksy-tymidyn-5'-ylowo fenylowy 114c. Wydajność 77 %, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 7.41-7.06 (10H m, ArH i 6-H), 6.15-6.04 (1H, m, 1'-H), 5.24-5.20 (1H, m, CH), 4.32-3.89 (4H, m, 3', 5', 5'', 4'-H), 2.33 (3H, s, CH₃), 2.29-1.85 (2H, m, 2', 2''-H), 1.80, 1.78, 1.75 (3H, 3s, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺: 528,1650 liczone dla [C₂₄H₂₇O₇N₅P]⁺: 528,1648.

α-Hydroksy-α-(4-chlorofenylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksy-tymidyn-5'-ylowo fenylowy 114e. Wydajność 55%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 7.46-7.03 (10H, m, ArH i 6-H), 6.08-5.98 (1H, m, 1'-H), 5.27, 5.24, 5.23, 5.19 (1H, 4s, CH), 4.40-4.10 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 3.99-3.90 (1H, m, 4'-H), 2.43-2.05 (2H, m, 2', 2''-H), 1.83, 1.80, 1.79 (3H, 3s, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺: 548,1160 liczone dla [C₂₃H₂₄O₇N₅³⁵ClP]⁺: 548,1102.

α-Hydroksy-α-[4-(metoksykarbonylo)fenylo]metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksy-tymidyn-5'-ylowo fenylowy 114f. Wydajność 48%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.07-8.03 (2H, 2d, *J* = 2.7 Hz, 2.4 Hz, ArH), 7.64-7.58 (2H, m, ArH), 7.32-7.03 (5H, m, ArH i 6-H), 6.08-5.97 (1H, m, 1'-H), 5.37, 5.34, 5.30 (1H, 3s, CH), 4.38-4.13 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 3.95-3.86 (1H, m, 4'-H), 3.92 (3H, s, COOCH₃) 2.37-2.08 (2H, m, 2', 2''-H), 1.83, 1.81, 1.79 (3H, 3s, 5-CH₃).

α-Hydroksy-α-(2,4-dimetylofenylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksy-tymidyn-5'-ylowo fenylowy 114h. Wydajność 75%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 7.60-7.51 (1H, m, ArH), 7.36-6.99 (8H m, ArH i 6-H), 6.18-6.05 (1H, m, 1'-H), 5.50-5.41 (1H, m, CH), 4.37-3.89 (4H, m, 3', 5', 5'', 4'-H), 2.36, 2.30 (6H, 2 s, 2x CH₃), 2.42-1.89 (2H, m, 2', 2''-H), 1.86, 1.82, 1.78, 1.76 (3H, 4s, 5-CH₃).

α-Hydroksy-α-(n-butylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylowy 114l. Wydajność 87 %, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 7.37-7.18 (6H m, ArH i 6-H), 6.16-6.08 (1H, m, 1'-H), 4.52-4.41 (1H, m, 5'-H), 4.38-4.20 (2H, m, 3', 5''-H), 4.14-4.04 (1H, m, CH), 4.16-4.00 (1H, m, 4'-H), 2.45-2.12 (2H, m, 2', 2''-H), 1.89, 1.88, 1.87, 1.86 (3H, 4s, 5-CH₃).

α-Hydroksy-α-(4-metoksyfenylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksy-tymidyn-5'-ylowo 4-chlorofenylo 114n. Wydajność 77%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.04-8.01 (2H, m, ArH), 7.50-7.03 (7H, m, ArH i 6-H), 6.45-6.33 (1H, m, 1'-H), 5.50-5.37 (1H, m, CH), 4.60-4.26 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 3.90-3.72 (1H, m, 4'-H), 3.81, 3.80, 3.78 (3H, 3s, OCH₃), 2.60-2.11 (2H, m, 2', 2''-H), 1.88-1.83 (3H, m, 5-CH₃).

α -Hydroksy- α -(4-metoksyfenylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 4-trifluorometylofenylo 114o. Wydajność 41%, $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3): 8.06-8.01 (2H, m, ArH), 7.65-7.16 (7H, m, ArH i 6-H), 6.46-6.31 (1H, m, 1'-H), 5.28-5.19 (1H, m, CH), 4.66-4.27 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 4.01-3.90 (1H, m, 4'-H), 3.79, 3.78 (3H, 2s, OCH_3), 2.58-2.11 (2H, m, 2', 2''-H), 1.88-1.87, 1.85, 1.83 (3H, 4d, $J = 0.9 \text{ Hz}$, 1.2 Hz, 1.2 Hz, 0.9 Hz, 5- CH_3).

α -Hydroksy- α -(4-metoksyfenylo)metanofosfonian 2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo 5-fenylo 114(ddU). Wydajność 63%, $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3): 7.46-6.87 (10H, m, ArH i 6-H), 6.06-5.91 (1H, m, 1'-H), 5.66, 5.62, 5.54, 5.51 (1H, 4d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 7.5 Hz, 8.7 Hz, 8.7 Hz, 5-H), 5.22-5.14 (1H, m, CH), 4.32-4.15 (3H, m, 4', 5', 5''-H), 3.81, 3.80, 3.80, 3.79 (3H, 4s, OCH_3), 2.40-1.64 (4H, m, 2', 2'', 3', 3''-H). HRMS $[\text{MH}]^+$: 488,1342 liczone dla $[\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_8\text{N}_2\text{P}]^+$: 488,1349.

o **z zastosowaniem 2,6-lutydyny**

Reakcje kondensacji H-fosfonianu nukleozydu z fenolem prowadziłam w chlorku metylenu z 2,6-lutydyną [10%, (v/v)] (0,1 mmol/1 ml) używając tych samych ilości reagentów (kondensacja zakończona po 20 min). Następnie do wytworzonego H-fosfonianodiestru dodawałam odpowiedni aldehyd (5 ekw. molowych) i reakcja pozostawiana była na noc w temp. pokojowej. Po zakończeniu reakcji ($^{31}\text{P NMR}$) mieszanina reakcyjna rozpuszczona była w chlorku metylenu i przemyta 3 razy wodnym 1M roztworem KH_2PO_4 pH=4,0. Kolejne czynności oraz izolacja przebiegały tak jak opisałam powyżej.

α -Hydroksy- α -(4-nitrofenylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 5-fenylo 114d. Wydajność 80%, $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3): 8.22-8.19, 7.75-7.68 (4H, 2m, ArH), 7.26-7.04 (6H, m, ArH oraz 6-H), 5.98-5.88 (1H, m, 1'-H), 5.45-5.35 (1H, m, CH), 4.47-4.23 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 4.01-3.89 (1H, m, 4'-H), 2.54-2.27 (2H, m, 2', 2''-H), 1.85, 1.84, 1.82 (3H, 3d, $J = 1.2 \text{ Hz}$, 0.9 Hz, 1.2 Hz, 5- CH_3). HRMS $[\text{MH}]^+$: 559,1337 liczone dla $[\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{N}_6\text{P}]^+$: 559,1342.

α -Hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 5-fenylo 114i. Wydajność 55%, $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3): 8.70-8.67 (1H, m, ArH), 8.52-8.50 (1H, m, ArH), 7.90-7.84 (1H, m, ArH), 7.30-7.02 (7H, m, ArH oraz 6-H), 5.92 (1H, m, 1'-H), 5.30-5.25 (1H, m, CH), 4.44-4.16 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 3.91-3.90 (1H, m, 4'-H), 2.30-2.24 (2H, m, 2', 2''-H), 1.82-1.77 (3H, m, 5- CH_3). HRMS $[\text{MH}]^+$: 515,1427 liczone dla $[\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{N}_6\text{P}]^+$: 515,1444.

α -Hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo 3-(dimetylo)aminofenyłowy 114r. Wydajność 56%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.74 (1H, br m, ArH), 8.50 (1H, br m, ArH), 8.01-7.92 (1H, m, ArH), 7.36-6.88 (6H, m, ArH oraz 6-H), 5.96 (1H, br m, 1'-H), 5.35-5.29 (1H, m, CH), 4.40-4.18 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 3.96-3.92 (1H, m, 4'-H), 2.86, 2.85 (6H, 2s, 2x CH_3), 2.23 (2H, br m, 2', 2''-H), 1.81, 1.80, 1.79, 1.77 (3H, 4s, 5- CH_3).

α -Hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo 4-metoksyfenyłowy 114s. Wydajność 52%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.68 (1H, br m, ArH), 8.50 (1H, br m, ArH), 7.90-7.82 (1H, m, ArH), 7.23-6.67 (6H, m, ArH oraz 6-H), 5.90 (1H, br m, 1'-H), 5.26-5.23 (1H, m, CH), 4.37-4.15 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 3.93-3.88 (1H, m, 4'-H), 3.70, 3.69 (3H, 2s, OCH_3), 2.26 (2H, br m, 2', 2''-H), 1.77 (3H, s, 5- CH_3). HRMS $[\text{MH}]^+$: 545,1552 liczone dla $[\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{N}_6\text{P}]^+$: 545,1550.

α -Hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo 2-*i*-propylofenyłowy 114u. Wydajność 54%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.78 (1H, br m, ArH), 8.53 (1H, br m, ArH), 8.09-8.04 (1H, m, ArH), 7.43-7.02 (6H, m, ArH oraz 6-H), 6.06-5.89 (1H, m, 1'-H), 5.48-5.34 (1H, m, CH), 4.54-4.42 (1H, m, 3'-H), 4.35-4.23 (2H, m, 5', 5''-H), 4.01-3.90 (1H, m, 4'-H), 3.03-2.92 [1H, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$], 2.45-2.31 (2H, m, 2', 2''-H), 1.85 (3H, s, 5- CH_3), 1.11-1.03 [6H, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$].

α -Hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo 2-etylofenyłowy 114v. Wydajność 55%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.78 (1H, br m, ArH), 8.53 (1H, br m, ArH), 8.07-8.04 (1H, m, ArH), 7.43-7.03 (6H, m, ArH oraz 6-H), 6.05-5.90 (1H, m, 1'-H), 5.49-5.34 (1H, m, CH), 4.52-4.41 (1H, m, 3'-H), 4.34-4.22 (2H, m, 5', 5''-H), 4.02-3.90 (1H, m, 4'-H), 2.52-2.28 (2H, m, 2', 2''-H, CH_2CH_3), 1.84 (3H, s, 5- CH_3), 1.09-0.99 (3H, m, CH_2CH_3).

α -Hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo 2-metylofenyłowy 114w. Wydajność 58%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.76 (1H, br m, ArH), 8.50 (1H, br m, ArH), 8.06-8.01 (1H, m, ArH), 7.40-7.02 (6H, m, ArH oraz 6-H), 6.03-5.92 (1H, m, 1'-H), 5.46-5.34 (1H, m, CH), 4.49-4.38 (1H, m, 3'-H), 4.36-4.21 (2H, m, 5', 5''-H), 4.01-3.90 (1H, m, 4'-H), 2.49-2.28 (2H, m, 2', 2''-H), 2.11-2.04 (3H, 4s, CH_3), 1.83 (3H, s, 5- CH_3).

α -Hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo 2,6-dimetylofenyłowy 114x. Wydajność 60%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.78-8.75 (1H, m, ArH), 8.52 (1H, s, ArH), 8.06-7.7 (1H, m, ArH), 7.38-6.93 (7H, m, ArH oraz 6-H), 6.02-5.79 (1H, m, 1'-H), 5.44-5.30 (1H, m, CH), 4.45-4.31 (1H, m, 3'-H), 4.21-4.09 (2H, m, 5', 5''-H), 3.97-3.83 (m, 1H, 4'-H), 2.43-2.28 (2H, m, 2', 2''-H), 2.14,

o-Hydroksy-o-(3-pyridyl)metanolekolan 3-azido-3-dekarylsydzyn-5-
 ylowo 3-dimetyloksylozowy 114. Wyznaczono 25%, 1H NMR, δ (CDCl₃):
 8.74 (1H, br m, ArH), 8.50 (1H, br m, ArH), 8.01-7.93 (1H, m, ArH), 7.50-6.88 (m,
 m, ArH) oraz 6-10: 2.95 (1H, br m, 1-H), 2.35-2.19 (1H, m, CH), 4.40-4.18 (2H, m,
 2, 2', 2'-H), 3.90-3.93 (1H, m, 4-H), 2.88, 2.85 (2H, 2a, 2b-CH₂), 2.33 (2H, br m, 2,
 2'-H), 1.81, 1.80, 1.79, 1.77 (2H, 2'-CH₃).

o-Hydroksy-o-(3-pyridyl)metanolekolan 3-azido-3-dekarylsydzyn-5-
 ylowo 4-metoksylozowy 115. Wyznaczono 52%, 1H NMR, δ (CDCl₃): 8.63 (1H, br
 m, ArH), 8.50 (1H, br m, ArH), 7.90-7.82 (1H, m, ArH), 7.33-6.67 (m, m, ArH) oraz
 6-10: 5.99 (1H, br m, 1-H), 5.30-5.23 (1H, m, CH), 4.77-4.75 (2H, m, 2, 2'-H),
 3.93-3.88 (1H, m, 4-H), 3.70, 3.69 (2H, 2a, 2b-CH₂), 3.28 (2H, br m, 2, 2'-H), 1.77
 (2H, 2'-CH₃). HRMS (M⁺): 342.1523 (suma dla C₁₆H₁₆O₄N₄); 342.1520.

o-Hydroksy-o-(3-pyridyl)metanolekolan 3-azido-3-dekarylsydzyn-5-
 ylowo 2-4-pyridylozowy 116. Wyznaczono 54%, 1H NMR, δ (CDCl₃): 8.78 (1H,
 br m, ArH), 8.53 (1H, br m, ArH), 8.02-8.04 (1H, m, ArH), 7.43-7.03 (2H, m, ArH)
 oraz 6-10: 6.05-5.83 (1H, m, 1-H), 5.48-5.34 (1H, m, CH), 4.84-4.42 (2H, m, 2-H),
 4.35-4.23 (2H, m, 2', 2'-H), 4.01-3.90 (1H, m, 4-H), 3.03-2.92 (1H, m, CH₂),
 2.45-2.31 (2H, m, 2', 2'-H), 1.82 (2H, 2'-CH₃), 1.41-1.03 (2H, m, CH₂).

o-Hydroksy-o-(3-pyridyl)metanolekolan 3-azido-3-dekarylsydzyn-5-
 ylowo 3-etylekarylozowy 117. Wyznaczono 23%, 1H NMR, δ (CDCl₃): 8.78 (1H, br
 m, ArH), 8.53 (1H, br m, ArH), 8.07-8.09 (1H, m, ArH), 7.43-7.03 (2H, m, ArH) oraz 6-
 10: 6.02-5.90 (1H, m, 1-H), 5.42-5.34 (1H, m, CH), 4.82-4.41 (1H, m, 2-H), 4.34-
 4.22 (2H, m, 2', 2'-H), 4.03-3.90 (1H, m, 4-H), 2.53-2.38 (2H, m, 2', 2'-H, CH₂),
 1.84 (2H, 2'-CH₃), 1.09-0.99 (2H, m, CH₂).

o-Hydroksy-o-(3-pyridyl)metanolekolan 3-azido-3-dekarylsydzyn-5-
 ylowo 2-metyloksylozowy 118. Wyznaczono 28%, 1H NMR, δ (CDCl₃): 8.76 (1H, br
 m, ArH), 8.50 (1H, br m, ArH), 8.03-8.01 (1H, m, ArH), 7.40-7.02 (2H, m, ArH) oraz
 6-10: 6.03-5.91 (1H, m, 1-H), 5.40-5.24 (1H, m, CH), 4.90-4.38 (1H, m, 2-H), 4.35-
 4.21 (2H, m, 2', 2'-H), 4.01-3.90 (1H, m, 4-H), 2.49-2.38 (2H, m, 2', 2'-H), 2.11-
 2.04 (2H, m, CH₂), 1.83 (2H, 2'-CH₃).

o-Hydroksy-o-(3-pyridyl)metanolekolan 3-azido-3-dekarylsydzyn-5-
 ylowo 2,6-dimetyloksylozowy 119. Wyznaczono 60%, 1H NMR, δ (CDCl₃): 8.78-8.72
 (1H, m, ArH), 8.53 (1H, 4-ArH), 8.05-7.77 (1H, m, ArH), 7.58-6.95 (2H, m, ArH) oraz
 6-10: 6.03-5.79 (1H, m, 1-H), 5.44-5.30 (1H, m, CH), 4.45-4.31 (1H, m, 2-H), 4.31-
 4.09 (2H, m, 2', 2'-H), 3.97-3.83 (1H, 4-H), 2.43-2.38 (2H, m, 2', 2'-H), 2.14-
 2.04 (2H, m, CH₂), 1.83 (2H, 2'-CH₃).

2.13 (6H, 2s, 2 x CH₃), 1.90, 1.86, 1.85 (3H, 3d, $J = 0.6$ Hz, 0.9 Hz, 1.2 Hz, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺: 543,1748 liczone dla [C₂₄H₂₈O₇N₆P]⁺: 543,1757.

α -Hydroksy- α -(4-nitrofenylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo 4-metoksyfenylowy 114z. Wydajność 54%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.23-8.19, 7.74 - 7.68 (4H, 2m, ArH), 7.21-7.14 (1H, m, ArH), 7.03 - 6.90 (2H, 2m, ArH oraz 6-H), 6.79-6.70 (2H, m, ArH), 5.99-5.89 (1H, m, 1'-H), 5.42-5.33 (1H, m, CH), 4.45-4.24 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 4.01-3.90 (1H, m, 4'-H), 2.52-2.31 (2H, m, 2', 2''-H), 1.85, 1.84, 1.82 (3H, 3d, $J = 0.9$ Hz, 0.6 Hz, 0.9 Hz, 5-CH₃).

Ogólna procedura syntezy α -hydroksyfosfonianowych monoestrów nukleozydowych typu 138.

Do α -hydroksyfosfonianu aryloowo nukleozydowego typu 114 (1 ekw. molowy) dodałam jod (2 ekw. molowe) w mieszaninie CH₃CN : Et₃N : H₂O [2 : 1 : 1 (v/v/v)] (0,1 mmol/1 ml). Po zakończeniu reakcji (5 min, ³¹P NMR) całość odparowałam do sucha a pozostałość naniosłam na krótką kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym. α -Hydroksyfosfonianowe monoestry wymywałam stosując liniowy gradient wody (0-6%) w 2-propanolu z dodatkiem Et₃N (3% objętościowe). Frakcje zawierające czysty związek odparowywałam, uzyskując zwykle białe piany (z wyjątkiem żółtych pochodnych 4-nitrofenylowych), które po liofilizacji z benzenu dawały niehigroskopijne, bezpostaciowe ciała stałe.

α -Hydroksy- α -(4-metoksyfenylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowy 138b Et₃NH⁺. Wydajność 64%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 7.42, 7.41 (1H, 2d, $J = 1.2$ Hz, 1.5Hz, 6-H), 7.33, 7.31 (2H, 2s, ArH), 6.79-6.77 (2H, 2s, ArH), 6.03 (1H, t, $J = 6.7$ Hz, 1'-H), 4.76, 4.72 (1H, 2s, CH), 4.15-4.13 (1H, m, 3'-H), 3.88-3.77 (3H, m, 5', 5'', 4'-H), 3.70 (3H, s, OCH₃), 3.04 [6H, q, $J = 7.3$ Hz, N(CH₂CH₃)₃] 2.19-2.08 (2H, m, 2', 2''-H), 1.80 (3H, s, 5-CH₃), 1.12 [9H, t, $J = 6.3$ Hz, N(CH₂CH₃)₃].

α -Hydroksy- α -(4-chlorofenylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowy 138e Et₃NH⁺. Wydajność 88%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 7.69, 7.63 (1H, 2d, $J = 0.9$ Hz, 1.2 Hz, 6-H), 7.52-7.47 (2H, m, ArH), 7.28-7.26 (2H, m, ArH), 6.19- 6.12 (1H, m, 1'-H) 4.91, 4.86 (1H, 2s, CH), 4.41-4.37 (1H, m, 3'-H), 4.30- 3.94 (3H, m, 5', 5'', 4'-H), 2.92 [6H, q, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃], 2.38-2.26 (2H, m, 2', 2''-H), 1.93-1.88 (3H, m, 5-CH₃), 1.18 [9H, t, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃]. HRMS [M]⁻: 470,0646 liczone dla [C₁₇H₁₈O₇N₅P]⁻: 470,0632.

α -Hydroksy- α -(4-nitrofenylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowy 138d Et₃NH⁺. Wydajność 67%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.76-8.75

2.13 (m, 2H, 2 x CH₂, 1.56, 1.55 (2H, 2d, 1-0.9 Hz, 0.9 Hz, 1.2 Hz, 2-CH₂)
HRMS (MH⁺) 243.1745 (base peak), C₁₀H₁₅N₂O₂: 243.1137

o-Hydroksy-4-(4-nitrofenyl)metanolan-2-azydo-3-deoksy-5-
głowa 4-metoksypolowy 115g Wydzielone 24%. IR (NMR, 5% CDCl₃): 8.23-8.19,
7.74-7.68 (m, 2H, ArH), 7.51-7.14 (m, ArH), 7.02-6.90 (2H, 2d, ArH), 6.85-
6.79-6.70 (2H, m, ArH), 5.99-5.89 (1H, m, 1H), 5.43-5.33 (1H, m, CH), 4.45-
4.34 (2H, m, 2, 5, H), 4.01-3.90 (1H, m, 4, H), 2.52-2.51 (2H, m, 2, 5, H), 1.65,
1.84, 1.83 (2H, 2d, 1-0.9 Hz, 0.8 Hz, 0.9 Hz, 2-CH₂)

Opisane procedure syntety 4-hydroksyfenolanowych monostry
niekolejowych typu 115

Do 4-hydroksyfenolanu wpływano metylodowodny tryn (114) (2 ekw. molowy)
dołożono (0.2 ekw. molowy) w mieszaninie CHCl₃ : Et₂O : H₂O (2 : 1 : 1 v/v/v)
(0.1 mmol) mól. IR: 3400-3200 (szeregi 2 mm), 1610 (W) (całkowicie odwołano do
rodzaju i powstania pochodząca na 100% kolimacja trynolowa i szereg
fenolowy), 1510 (W) (całkowicie odwołano do 100% trynolowej), 1510 (W)
rodzaju w trynolowej 2-piętowej z dołożeniem 114 (10% trynolowej), 1510 (W)
kwasowego szereg szereg odwołano, uszczelnienie trynolowej 114 (10% trynolowej)
wynikają z trynolowej 4-hydroksyfenolanu, które po dołożeniu z dołożeniem
dawały nitrofenolanowe, 2-piętowej szereg szereg.

o-Hydroksy-4-(4-metoksypolowy)metanolan-2-azydo-3-deoksy-
głowa 5-tytu 115g Wydzielone 24%. IR (NMR, 5% CDCl₃): 7.42, 7.41,
7.14, 7.13, 7.12, 7.11, 7.10, 7.09, 7.08, 7.07, 7.06, 7.05, 7.04, 7.03, 7.02,
6.03 (2H, 2, 5, H), 5.70, 5.69, 5.68, 5.67, 5.66, 5.65, 5.64, 5.63, 5.62, 5.61,
5.60 (2H, m, 2, 5, H), 5.30 (2H, m, 2, 5, H), 5.00 (2H, m, 2, 5, H), 4.70 (2H, m, 2, 5, H),
4.40 (2H, m, 2, 5, H), 4.10 (2H, m, 2, 5, H), 3.80 (2H, m, 2, 5, H), 3.50 (2H, m, 2, 5, H),
3.20 (2H, m, 2, 5, H), 2.90 (2H, m, 2, 5, H), 2.60 (2H, m, 2, 5, H), 2.30 (2H, m, 2, 5, H),
2.00 (2H, m, 2, 5, H), 1.70 (2H, m, 2, 5, H), 1.40 (2H, m, 2, 5, H), 1.10 (2H, m, 2, 5, H),
0.80 (2H, m, 2, 5, H), 0.50 (2H, m, 2, 5, H), 0.20 (2H, m, 2, 5, H), 0.00 (2H, m, 2, 5, H)

o-Hydroksy-4-(4-chlorofenyl)metanolan-2-azydo-3-deoksy-
głowa 5-tytu 115g Wydzielone 24%. IR (NMR, 5% CDCl₃): 7.82, 7.83,
7.84, 7.85, 7.86, 7.87, 7.88, 7.89, 7.90, 7.91, 7.92, 7.93, 7.94, 7.95, 7.96, 7.97,
6.98-6.92 (2H, m, 2, 5, H), 6.60 (2H, m, 2, 5, H), 6.30 (2H, m, 2, 5, H), 6.00 (2H, m, 2, 5, H),
5.70 (2H, m, 2, 5, H), 5.40 (2H, m, 2, 5, H), 5.10 (2H, m, 2, 5, H), 4.80 (2H, m, 2, 5, H),
4.50 (2H, m, 2, 5, H), 4.20 (2H, m, 2, 5, H), 3.90 (2H, m, 2, 5, H), 3.60 (2H, m, 2, 5, H),
3.30 (2H, m, 2, 5, H), 3.00 (2H, m, 2, 5, H), 2.70 (2H, m, 2, 5, H), 2.40 (2H, m, 2, 5, H),
2.10 (2H, m, 2, 5, H), 1.80 (2H, m, 2, 5, H), 1.50 (2H, m, 2, 5, H), 1.20 (2H, m, 2, 5, H),
0.90 (2H, m, 2, 5, H), 0.60 (2H, m, 2, 5, H), 0.30 (2H, m, 2, 5, H), 0.00 (2H, m, 2, 5, H)

o-Hydroksy-4-(4-nitrofenyl)metanolan-2-azydo-3-deoksy-
głowa 5-tytu 115g Wydzielone 24%. IR (NMR, 5% CDCl₃): 8.20-8.15

(1H, m, ArH), 8.46-8.44 (1H, m, ArH), 7.95-7.89 (1H, m, ArH), 7.69, 7.65, (2d, $J = 1.2$ Hz, 1.2 Hz, 6-H), 7.27-7.23 (1H, m, ArH), 6.18- 6.11 (1H, m, 1'-H), 4.98, 4.96 (1H, 2s, CH), 4.44-4.40 (1H, m, 3'-H), 4.30-4.02 (3H, m, 5', 5'', 4'-H), 2.87 [6H, q, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃], 2.44-2.24 (2H, m, 2', 2''-H), 1.95-1.90 (3H, m, 5-CH₃), 1.13 [9H, t, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃]. HRMS [M]⁻: 481,0888 liczone dla [C₁₇H₁₈O₉N₆P]⁻: 481,0873.

α -Hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowy 138i Et₃NH⁺. Wydajność 94%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.18-8.15 (2H, m, ArH), 7.78-7.73 (2H, m, ArH), 7.66, 7.62 (1H, 2d, $J = 1.2$ Hz, 0.9 Hz, 6-H), 6.15-6.08 (1H, m, 1'-H), 5.08, 5.03 (1H, 2s, CH), 4.40-4.37 (1H, m, 3'-H), 4.30-3.91 (3H, m, 5', 5'', 4'-H), 2.94 [6H, q, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃], 2.41-2.28 (2H, m, 2', 2''-H), 1.93 (3H, s, 5-CH₃), 1.17 [9H, t, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃]. HRMS [M]⁻: 437,0983 liczone dla [C₁₆H₁₈O₇N₆P]⁻: 437,0975.

Ogólna procedura syntezy α -hydroksyfosfonianowych monoestrów fenylowych typu 153.

H-Fosfonian 9-fluorenylometylowy (1 ekw. molowy) i fenol (1,5 ekw. molowego) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną, następnie rozpuściłam w mieszaninie chlorku metylenu z lutydyną (10% v/v) (0,1mmol/1 ml) i dodałam chlorek piwaloilu (1,5 ekw. molowego). Na koniec po około 20 min. (³¹P NMR) do wygenerowanego H-fosfonianodiestru 151 dodałam aldehyd (5 ekw. molowe). Po zakończeniu reakcji (~ 2-24 godz, ³¹P NMR) mieszaninę reakcyjną rozcieńczyłam 3 krotnie chlorkiem metylenu i wytrząsnęłam 3 razy z 1M wodny roztworem KH₂PO₄ pH = 4,0. Oddzieloną warstwę organiczną osuszyłam następnie nad bezw. Na₂SO₄ i odparowałam do gęstego oleju. α -Hydroksyfosfonian fenylowo 9-fluorenylometylowy 152 izolowałam za pomocą chromatografii kolumnowej stosując liniowy gradient (0-8%) 2-propanolu w chlorku metylenu. Frakcje zawierające czysty produkt odparowywałam i traktowałam mieszaniną acetonitrylu z trietyloaminą (2 : 1 v/v). Po eliminacji fulwenu z α -hydroksyfosfonianodiestru (około 20 min, ³¹P NMR) mieszaninę reakcyjną zagęszczałam a czysty α -hydroksyfosfonian fenylowy 153 wytrącałam z mieszaniny heksan : eter dietylowy (1 : 1 v/v). Otrzymany osad suszyłam pod zmniejszonym ciśnieniem.

α -Hydroksy- α -(4-nitrofenylo)metanofosfonian fenylowy 153d Et₃NH⁺. Wydajność 38%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.13, 8.10 (2H, 2s, ArH), 7.71-7.67 (2H, m,

1.23 (m, 2H, 6-H), 1.32 (m, 2H, 7-H), 1.41 (m, 1H, 8-H), 1.58 (d, 3H, 15-H), 1.61 (m, 1H, 9-H), 1.64 (m, 1H, 10-H), 1.75 (m, 1H, 11-H), 1.85 (m, 1H, 12-H), 1.95 (m, 1H, 13-H), 2.05 (m, 1H, 14-H), 2.15 (m, 1H, 16-H), 2.25 (m, 1H, 17-H), 2.35 (m, 1H, 18-H), 2.45 (m, 1H, 19-H), 2.55 (m, 1H, 20-H), 2.65 (m, 1H, 21-H), 2.75 (m, 1H, 22-H), 2.85 (m, 1H, 23-H), 2.95 (m, 1H, 24-H), 3.05 (m, 1H, 25-H), 3.15 (m, 1H, 26-H), 3.25 (m, 1H, 27-H), 3.35 (m, 1H, 28-H), 3.45 (m, 1H, 29-H), 3.55 (m, 1H, 30-H), 3.65 (m, 1H, 31-H), 3.75 (m, 1H, 32-H), 3.85 (m, 1H, 33-H), 3.95 (m, 1H, 34-H), 4.05 (m, 1H, 35-H), 4.15 (m, 1H, 36-H), 4.25 (m, 1H, 37-H), 4.35 (m, 1H, 38-H), 4.45 (m, 1H, 39-H), 4.55 (m, 1H, 40-H), 4.65 (m, 1H, 41-H), 4.75 (m, 1H, 42-H), 4.85 (m, 1H, 43-H), 4.95 (m, 1H, 44-H), 5.05 (m, 1H, 45-H), 5.15 (m, 1H, 46-H), 5.25 (m, 1H, 47-H), 5.35 (m, 1H, 48-H), 5.45 (m, 1H, 49-H), 5.55 (m, 1H, 50-H), 5.65 (m, 1H, 51-H), 5.75 (m, 1H, 52-H), 5.85 (m, 1H, 53-H), 5.95 (m, 1H, 54-H), 6.05 (m, 1H, 55-H), 6.15 (m, 1H, 56-H), 6.25 (m, 1H, 57-H), 6.35 (m, 1H, 58-H), 6.45 (m, 1H, 59-H), 6.55 (m, 1H, 60-H), 6.65 (m, 1H, 61-H), 6.75 (m, 1H, 62-H), 6.85 (m, 1H, 63-H), 6.95 (m, 1H, 64-H), 7.05 (m, 1H, 65-H), 7.15 (m, 1H, 66-H), 7.25 (m, 1H, 67-H), 7.35 (m, 1H, 68-H), 7.45 (m, 1H, 69-H), 7.55 (m, 1H, 70-H), 7.65 (m, 1H, 71-H), 7.75 (m, 1H, 72-H), 7.85 (m, 1H, 73-H), 7.95 (m, 1H, 74-H), 8.05 (m, 1H, 75-H), 8.15 (m, 1H, 76-H), 8.25 (m, 1H, 77-H), 8.35 (m, 1H, 78-H), 8.45 (m, 1H, 79-H), 8.55 (m, 1H, 80-H), 8.65 (m, 1H, 81-H), 8.75 (m, 1H, 82-H), 8.85 (m, 1H, 83-H), 8.95 (m, 1H, 84-H), 9.05 (m, 1H, 85-H), 9.15 (m, 1H, 86-H), 9.25 (m, 1H, 87-H), 9.35 (m, 1H, 88-H), 9.45 (m, 1H, 89-H), 9.55 (m, 1H, 90-H), 9.65 (m, 1H, 91-H), 9.75 (m, 1H, 92-H), 9.85 (m, 1H, 93-H), 9.95 (m, 1H, 94-H), 10.05 (m, 1H, 95-H), 10.15 (m, 1H, 96-H), 10.25 (m, 1H, 97-H), 10.35 (m, 1H, 98-H), 10.45 (m, 1H, 99-H), 10.55 (m, 1H, 100-H).

Wydane 188. W NMR, 5.00 (d, 2H, 21-H), 5.10 (d, 2H, 22-H), 5.20 (d, 2H, 23-H), 5.30 (d, 2H, 24-H), 5.40 (d, 2H, 25-H), 5.50 (d, 2H, 26-H), 5.60 (d, 2H, 27-H), 5.70 (d, 2H, 28-H), 5.80 (d, 2H, 29-H), 5.90 (d, 2H, 30-H), 6.00 (d, 2H, 31-H), 6.10 (d, 2H, 32-H), 6.20 (d, 2H, 33-H), 6.30 (d, 2H, 34-H), 6.40 (d, 2H, 35-H), 6.50 (d, 2H, 36-H), 6.60 (d, 2H, 37-H), 6.70 (d, 2H, 38-H), 6.80 (d, 2H, 39-H), 6.90 (d, 2H, 40-H), 7.00 (d, 2H, 41-H), 7.10 (d, 2H, 42-H), 7.20 (d, 2H, 43-H), 7.30 (d, 2H, 44-H), 7.40 (d, 2H, 45-H), 7.50 (d, 2H, 46-H), 7.60 (d, 2H, 47-H), 7.70 (d, 2H, 48-H), 7.80 (d, 2H, 49-H), 7.90 (d, 2H, 50-H), 8.00 (d, 2H, 51-H), 8.10 (d, 2H, 52-H), 8.20 (d, 2H, 53-H), 8.30 (d, 2H, 54-H), 8.40 (d, 2H, 55-H), 8.50 (d, 2H, 56-H), 8.60 (d, 2H, 57-H), 8.70 (d, 2H, 58-H), 8.80 (d, 2H, 59-H), 8.90 (d, 2H, 60-H), 9.00 (d, 2H, 61-H), 9.10 (d, 2H, 62-H), 9.20 (d, 2H, 63-H), 9.30 (d, 2H, 64-H), 9.40 (d, 2H, 65-H), 9.50 (d, 2H, 66-H), 9.60 (d, 2H, 67-H), 9.70 (d, 2H, 68-H), 9.80 (d, 2H, 69-H), 9.90 (d, 2H, 70-H), 10.00 (d, 2H, 71-H), 10.10 (d, 2H, 72-H), 10.20 (d, 2H, 73-H), 10.30 (d, 2H, 74-H), 10.40 (d, 2H, 75-H), 10.50 (d, 2H, 76-H), 10.60 (d, 2H, 77-H), 10.70 (d, 2H, 78-H), 10.80 (d, 2H, 79-H), 10.90 (d, 2H, 80-H), 11.00 (d, 2H, 81-H), 11.10 (d, 2H, 82-H), 11.20 (d, 2H, 83-H), 11.30 (d, 2H, 84-H), 11.40 (d, 2H, 85-H), 11.50 (d, 2H, 86-H), 11.60 (d, 2H, 87-H), 11.70 (d, 2H, 88-H), 11.80 (d, 2H, 89-H), 11.90 (d, 2H, 90-H), 12.00 (d, 2H, 91-H), 12.10 (d, 2H, 92-H), 12.20 (d, 2H, 93-H), 12.30 (d, 2H, 94-H), 12.40 (d, 2H, 95-H), 12.50 (d, 2H, 96-H), 12.60 (d, 2H, 97-H), 12.70 (d, 2H, 98-H), 12.80 (d, 2H, 99-H), 12.90 (d, 2H, 100-H).

Ogólna procedura syntazy o-hydroksylowanych monosaccharidów

Wydane 188. W NMR, 5.00 (d, 2H, 21-H), 5.10 (d, 2H, 22-H), 5.20 (d, 2H, 23-H), 5.30 (d, 2H, 24-H), 5.40 (d, 2H, 25-H), 5.50 (d, 2H, 26-H), 5.60 (d, 2H, 27-H), 5.70 (d, 2H, 28-H), 5.80 (d, 2H, 29-H), 5.90 (d, 2H, 30-H), 6.00 (d, 2H, 31-H), 6.10 (d, 2H, 32-H), 6.20 (d, 2H, 33-H), 6.30 (d, 2H, 34-H), 6.40 (d, 2H, 35-H), 6.50 (d, 2H, 36-H), 6.60 (d, 2H, 37-H), 6.70 (d, 2H, 38-H), 6.80 (d, 2H, 39-H), 6.90 (d, 2H, 40-H), 7.00 (d, 2H, 41-H), 7.10 (d, 2H, 42-H), 7.20 (d, 2H, 43-H), 7.30 (d, 2H, 44-H), 7.40 (d, 2H, 45-H), 7.50 (d, 2H, 46-H), 7.60 (d, 2H, 47-H), 7.70 (d, 2H, 48-H), 7.80 (d, 2H, 49-H), 7.90 (d, 2H, 50-H), 8.00 (d, 2H, 51-H), 8.10 (d, 2H, 52-H), 8.20 (d, 2H, 53-H), 8.30 (d, 2H, 54-H), 8.40 (d, 2H, 55-H), 8.50 (d, 2H, 56-H), 8.60 (d, 2H, 57-H), 8.70 (d, 2H, 58-H), 8.80 (d, 2H, 59-H), 8.90 (d, 2H, 60-H), 9.00 (d, 2H, 61-H), 9.10 (d, 2H, 62-H), 9.20 (d, 2H, 63-H), 9.30 (d, 2H, 64-H), 9.40 (d, 2H, 65-H), 9.50 (d, 2H, 66-H), 9.60 (d, 2H, 67-H), 9.70 (d, 2H, 68-H), 9.80 (d, 2H, 69-H), 9.90 (d, 2H, 70-H), 10.00 (d, 2H, 71-H), 10.10 (d, 2H, 72-H), 10.20 (d, 2H, 73-H), 10.30 (d, 2H, 74-H), 10.40 (d, 2H, 75-H), 10.50 (d, 2H, 76-H), 10.60 (d, 2H, 77-H), 10.70 (d, 2H, 78-H), 10.80 (d, 2H, 79-H), 10.90 (d, 2H, 80-H), 11.00 (d, 2H, 81-H), 11.10 (d, 2H, 82-H), 11.20 (d, 2H, 83-H), 11.30 (d, 2H, 84-H), 11.40 (d, 2H, 85-H), 11.50 (d, 2H, 86-H), 11.60 (d, 2H, 87-H), 11.70 (d, 2H, 88-H), 11.80 (d, 2H, 89-H), 11.90 (d, 2H, 90-H), 12.00 (d, 2H, 91-H), 12.10 (d, 2H, 92-H), 12.20 (d, 2H, 93-H), 12.30 (d, 2H, 94-H), 12.40 (d, 2H, 95-H), 12.50 (d, 2H, 96-H), 12.60 (d, 2H, 97-H), 12.70 (d, 2H, 98-H), 12.80 (d, 2H, 99-H), 12.90 (d, 2H, 100-H).

ArH), 7.26-7.01 (5H, m, ArH), 5.13, 5.09 (1H, 2s, CH), 2.87 [6H, q, $J = 7.4$ Hz, $N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$], 1.14 [9H, t, $J = 7.4$ Hz, $N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$].

α -Hydroksy- α -(3-pirydylo)metanofosfonian fenyłowy 153j Et_3NH^+ .

Wydajność 32%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.18-8.15 (2H, m, ArH), 7.78-7.73 (2H, m, ArH), 7.30-7.09 (5H, m, ArH), 5.09, 5.03 (1H, 2s, CH), 2.94 [6H, q, $J = 7.4$ Hz, $N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$], 1.17 [9H, t, $J = 7.4$ Hz, $N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$].

Ogólna procedura syntezy fosforanodiestrów typu 140

H-Fosfonian nukleozydowy (1 ekw. molowy) i fenol (alkohol lub pirydynol) (1,5 ekw. molowego) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną, następnie rozpuściłam w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (10% v/v) (0,1 mmol/1 ml) i dodałam chlorek piwaloilu (1,2 ekw. molowego). Po około 20 min. (^{31}P NMR) dodałam jod (1,1 ekw. molowego) rozpuszczony w niewielkiej ilości bezwodnej pirydyny, a po 2 min. wodę (10 ekw. molowych). Po zakończeniu reakcji (^{31}P NMR) nadmiar jodu rozłożyłam etanotiolem i odparowałam rozpuszczalniki. Diestry izolowałam na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym stosując liniowy gradient wody (0-7%) w 2-propanolu zawierającym 5% Et_3N (v/v). Frakcje zawierające czyste produkty zateżałam otrzymując białe, silnie higroskopijne piany.

Fosforanodiester 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenyłowy 140a Et_3NH^+ . Wydajność 72%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 7.65 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, 6-H), 7.21-7.15 (4H, m, ArH), 6.99-6.95 (1H, m, ArH), 6.21 (1H, t, $J = 6.7$ Hz, 1'-H), 4.27-4.23 (1H, m, 3'-H), 4.19-4.08 (2H, m, 5',5''-H), 3.97-3.93 (1H, m, 4'-H), 3.02 [6H, q, $J = 7.4$ Hz, $N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$], 2.24-2.19 (2H, m, 2',2''-H), 1.81 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, 5- CH_3), 1.29 [9H, t, $J = 7.4$ Hz, $N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$].

Fosforanodiester 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo 2-metylo-3-pirydyłowy 140o Et_3NH^+ . Wydajność 65%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.16-8.14 (1H, m, ArH), 7.93-7.90 (1H, m, ArH), 7.71 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, 6-H), 7.33-7.28 (1H, m, ArH), 6.22 (1H, t, $J = 6.7$ Hz, 1'-H), 4.49-4.43 (1H, m, 3'-H), 4.28-4.14 (2H, m, 5',5''-H), 4.08-4.05 (1H, m, 4'-H), 3.19 [6H, q, $J = 7.4$ Hz, $N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$], 2.56 (3H, s, CH_3), 2.49-2.31 (2H, m, 2',2''-H), 1.81 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, 5- CH_3), 1.30 [9H, t, $J = 7.4$ Hz, $N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$].

Fosforanodiester 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo 3-pirydyłowy 140p Et_3NH^+ . Wydajność 87%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.34-8.33 (1H, m, ArH), 8.24-8.22 (1H, m, ArH), 7.64-7.59 (1H, m, ArH), 7.46 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, 6-H), 7.38-7.36 (1H, m, ArH), 6.24 (1H, t, $J = 6.7$ Hz, 1'-H), 4.51-4.45 (1H, m, 3'-H), 4.35-4.28 (1H, m, 5',-H), 4.04-3.96 (2H, m, 5'', 4'-H), 3.19 [6H, q, $J = 7.4$ Hz, $N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$], 2.50-2.45

Wydane: 32% (NMR, δ (CDCl₃): 8.15-8.13 (m, ArH), 7.75-7.73 (m, ArH), 7.50-7.02 (m, ArH), 5.99, 5.03 (m, CH), 2.94 (m, CH₂), 1.74 (s, CH₃), 1.17 (m, CH₃).

Wydane: 32% (NMR, δ (CDCl₃): 8.15-8.13 (m, ArH), 7.75-7.73 (m, ArH), 7.50-7.02 (m, ArH), 5.99, 5.03 (m, CH), 2.94 (m, CH₂), 1.74 (s, CH₃), 1.17 (m, CH₃).

Opis procedury syntetycznej i oznaczeń

W reakcji podanej w przykładzie 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000.

Wydane: 32% (NMR, δ (CDCl₃): 7.05 (m, ArH), 6.75-6.73 (m, ArH), 6.52 (m, ArH), 6.31 (m, ArH), 6.17 (m, ArH), 5.97 (m, ArH), 5.77 (m, ArH), 5.57 (m, ArH), 5.37 (m, ArH), 5.19 (m, ArH), 4.99 (m, ArH), 4.79 (m, ArH), 4.59 (m, ArH), 4.39 (m, ArH), 4.19 (m, ArH), 3.99 (m, ArH), 3.79 (m, ArH), 3.59 (m, ArH), 3.39 (m, ArH), 3.19 (m, ArH), 2.99 (m, ArH), 2.79 (m, ArH), 2.59 (m, ArH), 2.39 (m, ArH), 2.19 (m, ArH), 1.99 (m, ArH), 1.79 (m, ArH), 1.59 (m, ArH), 1.39 (m, ArH), 1.19 (m, ArH), 0.99 (m, ArH), 0.79 (m, ArH), 0.59 (m, ArH), 0.39 (m, ArH), 0.19 (m, ArH).

Wydane: 32% (NMR, δ (CDCl₃): 7.05 (m, ArH), 6.75-6.73 (m, ArH), 6.52 (m, ArH), 6.31 (m, ArH), 6.17 (m, ArH), 5.97 (m, ArH), 5.77 (m, ArH), 5.57 (m, ArH), 5.37 (m, ArH), 5.19 (m, ArH), 4.99 (m, ArH), 4.79 (m, ArH), 4.59 (m, ArH), 4.39 (m, ArH), 4.19 (m, ArH), 3.99 (m, ArH), 3.79 (m, ArH), 3.59 (m, ArH), 3.39 (m, ArH), 3.19 (m, ArH), 2.99 (m, ArH), 2.79 (m, ArH), 2.59 (m, ArH), 2.39 (m, ArH), 2.19 (m, ArH), 1.99 (m, ArH), 1.79 (m, ArH), 1.59 (m, ArH), 1.39 (m, ArH), 1.19 (m, ArH), 0.99 (m, ArH), 0.79 (m, ArH), 0.59 (m, ArH), 0.39 (m, ArH), 0.19 (m, ArH).

Wydane: 32% (NMR, δ (CDCl₃): 7.05 (m, ArH), 6.75-6.73 (m, ArH), 6.52 (m, ArH), 6.31 (m, ArH), 6.17 (m, ArH), 5.97 (m, ArH), 5.77 (m, ArH), 5.57 (m, ArH), 5.37 (m, ArH), 5.19 (m, ArH), 4.99 (m, ArH), 4.79 (m, ArH), 4.59 (m, ArH), 4.39 (m, ArH), 4.19 (m, ArH), 3.99 (m, ArH), 3.79 (m, ArH), 3.59 (m, ArH), 3.39 (m, ArH), 3.19 (m, ArH), 2.99 (m, ArH), 2.79 (m, ArH), 2.59 (m, ArH), 2.39 (m, ArH), 2.19 (m, ArH), 1.99 (m, ArH), 1.79 (m, ArH), 1.59 (m, ArH), 1.39 (m, ArH), 1.19 (m, ArH), 0.99 (m, ArH), 0.79 (m, ArH), 0.59 (m, ArH), 0.39 (m, ArH), 0.19 (m, ArH).

(2H, m, 2',2''-H), 1.66 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, 5-CH₃), 1.26 [9H, t, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃].

Fosforanodiester 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo 4-metylo-3-pirydylowy 140q Et₃NH⁺. Wydajność 77%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.34-8.33 (1H, m, ArH), 7.71-7.67 (1H, m, ArH), 7.46 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, 6-H), 7.30-7.27 (1H, m, ArH), 6.22 (1H, t, $J = 6.7$ Hz, 1'-H), 4.46-4.40 (1H, m, 3'-H), 4.28-4.22 (1H, m, 5'-H), 4.19-4.13 (1H, m, 5''-H), 4.06-4.94 (1H, m, 4'-H), 3.19 [6H, q, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃], 2.48 (3H, s, CH₃), 2.44-2.30 (2H, m, 2',2''-H), 1.77 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, 5-CH₃), 1.30 [9H, t, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃].

Fosforanodiester 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo (4-pirydylo)-metylowy 140r Et₃NH⁺. Wydajność 79%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.55-8.51 (2H, m, ArH), 7.68 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, 6-H), 7.35-7.29 (2H, m, ArH), 6.25 (1H, t, $J = 6.7$ Hz, 1'-H), 4.99 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, CH₂), 4.42-4.37 (1H, m, 3'-H), 4.19-4.06 (2H, m, 5', 5''-H), 3.99-4.13 (1H, br m, 4'-H), 3.05 [6H, q, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃], 2.34-2.29 (2H, m, 2',2''-H), 1.92 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, 5-CH₃), 1.30 [9H, t, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃].

Fosforanodiester 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo (4-nitrofenylo)-metylowy 140s Et₃NH⁺. Wydajność 81%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.19-8.171 (2H, m, ArH), 7.71 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, 6-H), 7.57-7.54 (2H, m, ArH), 6.25 (1H, t, $J = 6.7$ Hz, 1'-H), 5.05 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, CH₂), 4.43-4.38 (1H, m, 3'-H), 4.17-4.06 (2H, m, 5', 5''-H), 4.02-4.01 (1H, m, 4'-H), 3.06 [6H, q, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃], 2.38-2.33 (2H, m, 2',2''-H), 1.96 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, 5-CH₃), 1.30 [9H, t, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃].

Synteza tiofosforanodiestru 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylowego 142 Et₃NH⁺. Siarkę elementarną (3 ekw. molowe) rozpuściłam w mieszaninie CH₂Cl₂ : Et₃N (9 : 1 v/v) i dodałam do wcześniej osuszonego (dwukrotne odparowanie z bezwodną pirydyną) α-hydroksyfosfonianu **114b** (1 ekw. molowy) (0,1mmol/1 ml). Po zakończeniu reakcji (około 24h, ³¹P NMR) odparowałam rozpuszczalniki a z pozostałości izolowałam tiofosforan **142** stosując kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym [liniowy gradient 2-propanolu (0-20%) w CH₂Cl₂]. Frakcje zawierające czysty produkt zateżałam i liofilizowałam z benzenu otrzymując biały osad. Wydajność 64%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 7.83, 7.75 (1H, 2d, $J = 1.2$ Hz, 1.2 Hz, 6-H), 7.30-7.24 (4H, m, ArH), 7.11-7.06 (1H, m, ArH), 6.33-6.27 (1H, m, 1'-H), 4.43-4.21 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 4.09-4.08 (1H, m, 4'-H), 3.08 [6H, q, $J = 7.4$ Hz, N(CH₂CH₃)₃], 2.37-2.25 (2H, m, 2',2''-H), 1.93, 1.90 (3H, 2d, $J = 1.2$ Hz, 1.2 Hz, 5-

1998

1998

1998

1998

1998

CH₃), 1.28 (t, $J = 7.4$ Hz, 9H). HRMS [M]⁻: 438,0625 liczone dla [C₁₆H₁₇O₆N₅P]⁻: 438,0637.

Ogólna procedura syntezy fosforanotriestrów typu **139** (metoda A)

Fosforanodiester arylo nukleozydowy typu **140** (1 ekw. molowy) i alkohol (fenol lub pirydynol; 1,2 ekw. molowego) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną a następnie rozpuściłam w mieszaninie chlorku metylenu z N-metyloimidazolem (10% v/v) (0,1mmol/1 ml). Następnie dodałam TPSCl (3 ekw. molowe). Po zakończeniu kondensacji (30 min, ³¹P NMR) mieszaninę reakcyjną rozcieńczyłam 3 krotnie chlorkiem metylenu i wytrząsnęłam 3 razy z 1M wodnym roztworem KH₂PO₄ pH = 4,0. Oddzieloną warstwę organiczną osuszyłam następnie nad bezw. Na₂SO₄ i odparowałam do gęstego oleju. Triester izolowałam za pomocą chromatografii krótkokolumnowej stosując liniowy gradient (0-8%) 2-propanolu w chlorku metylenu. Frakcje zawierające czysty produkt zatężałam i liofilizowałam z benzenu, otrzymując białe lub lekko różowe, bezpostaciowe ciała stałe.

Fosforanotriester 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-yloowo benzyloowo fenyloowy 139a. Wydajność 75%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 7.34-7.13 (11H, m, ArH i 6-H), 6.19 (1H, t, $J = 6.6$ Hz, 1'-H), 5.17-5.11 (2H, m, CH₂), 4.42-4.17 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 3.99 (1H, br m, 4'-H), 2.42-2.16 (2H, 2 m, 2', 2''-H), 1.84, 1.81 (3H, 2 s, 5-CH₃).

Fosforanotriester 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-yloowo fenyloowo 4-metylobenzyloowy 139d. Wydajność 68%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 7.52-7.24 (10H, m, ArH i 6-H), 6.23-6,18 (1H, m, 1'-H), 5.12-5.02 (2H, m, CH₂), 4.39-4.14 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 3.91-3,87 (1H, m, 4'-H), 2.39-2.25 (2H, 2 m, 2', 2''-H), 2.35 (3H, s, CH₃), 1.83, 1.81 (3H, 2 s, 5-CH₃).

Fosforanotriester 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-yloowo fenyloowo (4-pirydylo)metyloowy 139r. Wydajność 61%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.73-8.71 (2H, m, ArH), 7.67-7.50 (2H, m, ArH), 7.39-7.17 (6H, m, ArH i 6-H), 6.64-6.58 (1H, m, 1'-H), 5.47, 5.44 (2H, 2s, CH₂), 4.81-4.68 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 4.32-4.30 (1H, br m, 4'-H), 2.78-2.51 (2H, m, 2',2''-H), 1.96, 1.94 (3H, 2d, $J = 1.2$ Hz, 1.2 Hz, 5-CH₃).

Fosforanotriester 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-yloowo fenyloowo 4-nitrobenzyloowy 139s. Wydajność 73%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.23-8.17 (2H, m, ArH), 7.51-7.15 (2H, m, ArH), 7.34-7.15 (6H, m, ArH i 6-H), 6.19-6.15 (1H, m, 1'-H), 5.29, 5.26 (2H, 2d, $J = 6.9$ Hz, 6.6Hz, CH₂), 4.48-4.24 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 4.03-4.01 (1H, m, 4'-H), 2.48-2.24 (2H, m, 2', 2''-H), 1.86, 1.82 (3H, 2d, $J = 1.2$ Hz, 1.2 Hz, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺: 559,1322 liczone dla [C₂₃H₂₄O₉N₆P]⁺: 559,1342.

Synteza fosforanotriesteru 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo etylowo fenyłowego 143 (metoda B).

H-Fosfonian AZT (1 ekw. molowy) i fenol (1,5 ekw. molowego) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną a następnie rozpuściłam w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (10%, v/v) (0,1 mmol/1 ml). Do obu reagentów dodałam DPCP (1,5 ekw. molowego) a po wygenerowaniu H-fosfonianodiestru typu 124 (20 min, ^{31}P NMR) alkohol etylowy (5 ekw. molowych). Na koniec dodałam jod (1,1 ekw. molowego) rozpuszczony w niewielkiej ilości bezwodnej pirydyny. Po zakończeniu reakcji (30 min, ^{31}P NMR) do mieszaniny reakcyjnej dodałam etanotiol, w celu usunięcia nadmiaru jodu a następnie odparowałam rozpuszczalniki. Z pozostałości izolowałam czysty triester postępując tak jak w metodzie **A**. Wydajność 86%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 7.40-7.19 (6H, m, ArH i 6-H), 6.26-6.20 (1H, m, 1'-H), 4.67-4.21 (5H, m, 3', 5', 5''-H i CH_2CH_3), 4.06-4.02 (1H, 2q, $J = 2.7$ Hz, 4'-H), 2.45-2.19 (2H, m, 2', 2''-H), 1.88, 1.86 (3H, 2d, $J = 0.9$ Hz, 1.2 Hz, 5- CH_3), 1.40-1.33 (3H, m, CH_2CH_3). HRMS $[\text{MH}]^+$: 451,1263 liczone dla $[\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{N}_5\text{P}]^+$: 451,1257.

Ogólna procedura syntezy fosfoniano-fosforanów typu 105 (metoda A)

α -Hydroksyfosfonian aryłowo nukleozydowy typu 114 (1 ekw. molowy) oraz fosforanodiester aryłowo nukleozydowy typu 140 (1,2 ekw molowego) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną. Następnie rozpuściłam oba reagenty w mieszaninie chlorku metylenu z N-metyloimidazolem (10%, v/v) (0,1mmol/1 ml) i dodałam TPSCl (3 ekw. molowe). Po zakończeniu reakcji (20-30 min, ^{31}P NMR) mieszaninę reakcyjną rozcieńczyłam 3 krotnie chlorkiem metylenu i wytrząsnęłam 3 razy z 1M wodnym roztworem KH_2PO_4 pH = 4,0. Po oddzieleniu i wysuszeniu warstwy organicznej nad bezw. Na_2SO_4 odparowałam ją do gęstego oleju. Fosfoniano-fosforany typu 105 izolowałam na kolumnach wypełnionych żelem krzemionkowym stosując liniowy gradient (0-6%) 2-propanolu w chlorku metylenu. Frakcje zawierające czyste produkty odparowywałam i liofilizowałam z benzenu lub wytrącałam z heksanu (rozpuszczałam w niewielkiej ilości chlorku metylenu, dodawałam porcjami do heksanu, a uzyskany osad odsączałam i suszyłam pod zmniejszonym ciśnieniem) otrzymując białe, niehigroskopijne ciała stałe.

Fosforan 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenyłowo [fosfonylo (3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylo) *n*-butylo]metyłowy 105a. Wydajność 52%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 7.34-7.14 (12H, m, ArH i 6-H), 6.17-5.93 (2H, m, 1'-H), 5.12-

5-azido-3-deoksytrydyn-2-yłowe trynowe
 (wynik 355 i tabela B).

W celu uzyskania 3-azido-2-deoksytrydyny (3-ADP) z 3-azido-2-deoksytrydyny-2-yłowego trynowego (3-ADP-3') przeprowadzono reakcję z 2-tylenem (1,2-etylen) w obecności katalizatora i zasady w celu usunięcia azynu z 3-ADP. Reakcję przeprowadzono w następujących warunkach: 3-ADP-3' (0,5 mmol), 2-etylen (2 ml), K₂CO₃ (0,5 mmol), Na₂S₂O₈ (0,5 mmol), Me₂SO (5 ml), 50°C, 24 h. Po zakończeniu reakcji mieszaninę rozcieńczono etanolem i odparowano do sucha. Produkt wyizolowano przez ekstrakcję i oddestylowano. Wykonalono: 1H NMR (DMSO-d₆) δ: 8,1 (m, 1H, H-8), 7,4 (m, 1H, H-2'), 6,5 (m, 2H, H-6,7), 4,0-4,5 (m, 2H, H-4,5), 2,1 (s, 3H, CH₃). 13C NMR (DMSO-d₆) δ: 155,5 (C-3'), 148,5 (C-2'), 128,5 (C-8), 115,5 (C-6), 114,5 (C-7), 95,5 (C-4,5), 45,5 (C-3), 17,5 (C-1).

Ogólna procedura syntezy 3-azido-2-deoksytrydyny (3-ADP) (tabela A)

W celu uzyskania 3-azido-2-deoksytrydyny (3-ADP) z 3-azido-2-deoksytrydyny-2-yłowego trynowego (3-ADP-3') przeprowadzono reakcję z 2-tylenem (1,2-etylen) w obecności katalizatora i zasady w celu usunięcia azynu z 3-ADP. Reakcję przeprowadzono w następujących warunkach: 3-ADP-3' (0,5 mmol), 2-etylen (2 ml), K₂CO₃ (0,5 mmol), Na₂S₂O₈ (0,5 mmol), Me₂SO (5 ml), 50°C, 24 h. Po zakończeniu reakcji mieszaninę rozcieńczono etanolem i odparowano do sucha. Produkt wyizolowano przez ekstrakcję i oddestylowano. Wykonalono: 1H NMR (DMSO-d₆) δ: 8,1 (m, 1H, H-8), 7,4 (m, 1H, H-2'), 6,5 (m, 2H, H-6,7), 4,0-4,5 (m, 2H, H-4,5), 2,1 (s, 3H, CH₃). 13C NMR (DMSO-d₆) δ: 155,5 (C-3'), 148,5 (C-2'), 128,5 (C-8), 115,5 (C-6), 114,5 (C-7), 95,5 (C-4,5), 45,5 (C-3), 17,5 (C-1).

3-azido-2-deoksytrydyna (3-ADP)
 3-azido-2-deoksytrydyna (3-ADP)
 1H NMR (DMSO-d₆) δ: 8,1 (m, 1H, H-8), 7,4 (m, 1H, H-2'), 6,5 (m, 2H, H-6,7), 4,0-4,5 (m, 2H, H-4,5), 2,1 (s, 3H, CH₃).

4.90 (1H, m, CH), 4.49-4.25 (6H, m, 3', 5', 5''-H), 2.43-2.25 (4H, m, 2',2''-H), 1.86-1.84 (6H, m, 5-CH₃), 1.61 [6H, br s, (CH₂)₃], 0.81-0.77 (3H, m, CH₃).

Fosforan 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-yloowo fenyloowo [fosfonylo (3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylo) fenylo] metylowy 105b. Wydajność 59%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 7.41-7.13 (17H, m, ArH i 6-H), 6.18-5.89 (3H, m, 1'-H i CH), 4.52-3.72 (8H, 6 m, 3', 5', 5'', 4'-H), 2.36-1.89 (4H, m, 2',2''-H), 1.85-1.75 (6H, 2 m, 5-CH₃).

Fosforan 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-yloowo fenyloowo [fosfonylo (3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylo) 4-metylofenylo] metylowy 105c. Wydajność 50%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 7.47-6.89 (16H, m, ArH i 6-H), 6.17-5.85 (3H, m, 1'-H i CH), 4.72-3.74 (8H, 6 m, 3', 5', 5'', 4'-H), 2.34 (3H, br s, CH₃), 2.89-1.88 (4H, m, 2',2''-H), 1.84-1.74 (6H, 2 m, 5-CH₃).

Fosforan 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-yloowo fenyloowo [fosfonylo (3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylo) 4-metoksyfenylo] metylowy 105d. Wydajność 51%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 7.54-6.80 (16H, m, ArH i 6-H), 6.18-5.81 (3H, m, 1'-H i CH), 4.51-3.97 (8H, 4 m, 3', 5', 5'', 4'-H), 3.81-3.79 (3H, m, OCH₃), 2.41-1.91 (4H, m, 2',2''-H), 1.86-1.77 (6H, 2 m, 5-CH₃).

Fosforan 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-yloowo 3-pirydylowy [fosfonylo (3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 4-metoksyfenylo) 3-pirydylo] metylowy 105e. Wydajność 89%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.86-8.32 (4H, m, ArH), 7.36-6.65 (10H, m, ArH i 6-H), 6.12-5.73 (3H, m, 1'-H i CH), 4.37-4.33 (3H, m, OCH₃), 3.73-3.67 (2H, m, 3'-H), 3.25-3.11 (6H, m, 5', 5'', 4'-H), 2.87-2.78 (4H, m, 2',2''-H), 1.82-1.75 (6H, 2 m, 5-CH₃).

Fosfoniano-fosforany różnych nukleozydów

Procedura jak w metodzie **A**, przy czym w substratach zawierających tymidynę, grupa 3'-OH zablokowana była grupą 4,4'-dimetoksytrytylową. Po syntezie i wyizolowaniu czystych fosfoniano-fosforanów typu **105** grupę dimetoksytrytylową usunęłam działając 2% roztworem (CH₂Cl₂/MeOH, 7 : 3 v/v) kwasu *p*-toluenosulfonowego w temp. pokojowej. Po około 10 min. (TLC) mieszaninę reakcyjną zneutralizowałam wodnym roztworem NaHCO_{3(sat)} i następnie z osuszonej warstwy organicznej odparowałam rozpuszczalniki. Pozostałość oczyszczałam na żelu krzemionkowym [liniowy gradient (0-10%) 2-propanolu w CH₂Cl₂], frakcje zawierające czyste produkty były zateżane i strącane z heksanu, a uzyskane osady suszone pod zmniejszonym ciśnieniem.

4.70 (t, m, CH, 4.99-4.23 (OH, m, 7.3, 7.4-H), 2.43-2.25 (H, m, 3.7, 3.8), 1.86 (H, m, 2-OH), 1.61 (H, m, 1-OH), 0.84-0.77 (H, m, CH).

Compound 2. mp 60-62°C. IR (KBr): 3300 (OH), 1600 (C=C), 1450 (C-O) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 7.81-7.13 (m, 4H, 6.9, 7.1, 7.2, 7.4, 7.5-H), 6.18-5.89 (m, 1.1-H), 4.31-3.72 (m, 2 m, 3, 4-H), 2.36-1.89 (H, m, 3.7, 3.8), 1.52-1.75 (H, 2 m, 5-OH).

Compound 3. mp 65-67°C. IR (KBr): 3300 (OH), 1600 (C=C), 1450 (C-O) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 7.47-6.89 (m, 4H, 6.9, 7.1, 7.2, 7.4, 7.5-H), 6.17-5.88 (m, 1.1-H), 4.23-3.74 (m, 2 m, 3, 4-H), 2.34-1.84 (H, m, 3.7, 3.8), 1.51-1.74 (H, 2 m, 5-OH).

Compound 4. mp 68-70°C. IR (KBr): 3300 (OH), 1600 (C=C), 1450 (C-O) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 7.56-6.90 (m, 4H, 6.9, 7.1, 7.2, 7.4, 7.5-H), 6.18-5.81 (m, 1.1-H), 4.01-3.97 (m, 2 m, 3, 4-H), 2.81-2.79 (H, m, OH), 2.41-1.91 (H, m, 3, 7, 8-H), 1.86-1.77 (H, 2 m, 5-OH).

Compound 5. mp 70-72°C. IR (KBr): 3300 (OH), 1600 (C=C), 1450 (C-O) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 8.55-8.33 (m, 4H, 7.56-7.55 (H, m, 1.1-H), 3.77 (H, m, 1.1-H), 3.37-3.23 (H, m, OH), 2.73-2.67 (H, m, OH), 2.38-2.34 (H, m, 3, 7, 8-H), 2.27-2.18 (H, m, 3, 7, 8-H), 1.82-1.75 (H, 2 m, 5-OH).

Preparation of various aromatic isomers

1,2-Dichloroethane (A) was used as the solvent for the polymerization. The polymerization was carried out in a 100 ml glass reaction flask equipped with a mechanical stirrer. The reaction mixture was cooled to 0°C and 2.5 g (0.1 mol) of the monomer was added. The reaction mixture was stirred for 10 min at 0°C . The resulting polymer was precipitated into methanol and dried in a vacuum oven at 40°C . The molecular weight of the polymer was determined by gel permeation chromatography (GPC) using polystyrene as the standard. The GPC was carried out using a Waters apparatus with a refractive index detector and a series of Styragel columns. The mobile phase was THF and the flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was maintained at 30°C . The polymer samples were dissolved in THF and the solution was filtered before injection into the GPC. The molecular weight of the polymer was determined by comparing its retention time with that of the polystyrene standard. The molecular weight of the polymer was found to be approximately 100,000.

Fosforan 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylo [fosfonylo (tymidyn-5'-ylo fenylo) 4-metoksyfenylo] metylowy 105h. Wydajność 35%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 7.54-6.78 (16H, m, ArH i 6-H), 6.23-5.79 (3H, m, 1'-H i CH), 4.67-3.89 (8H, m, 3', 5', 5'', 4'-H), 3.81-3.78 (3H, m, OCH_3), 2.41-1.91 (4H, m, 2', 2''-H), 1.85 (3H, br s, 5- CH_3), 1.78-1.74 (3H, m, 5- CH_3).

Fosforan tymidyn-5'-ylo fenylo [fosfonylo (3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylo) 4-metoksyfenylo] metylowy 105i. Wydajność 42%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 7.41-6.81 (16H, m, ArH i 6-H), 6.35-5.81 (3H, 3 m, 1'-H i CH), 4.44-3.86 (8H, m, 3', 5', 5'', 4'-H), 3.80-3.76 (3H, m, OCH_3), 2.41-1.91 (4H, m, 2', 2''-H), 1.87-1.77 (6H, m, 5- CH_3).

Ogólna procedura syntezy fosfoniano-fosforanów (metoda B)

α -Hydroksyfosfonian arylo fenylo nukleozydowy typu **114** (1 ekw. molowy) i H-fosfonian nukleozydowy (1,1 ekw. molowego) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną, rozpuściłam w chlorku metylenu z pirydyną (10%, v/v) (0,1 mmola/1 ml) a następnie dodałam chlorek piwaloilu (1,2 ekw. molowego). Po wygenerowaniu H-fosfoniano-C-fosfonianu typu **158** (20 min, ^{31}P NMR) dodałam osuszony fenol (pirydynol, 3 ekw. molowe) oraz jod (1,2 ekw. molowego). Po zakończeniu reakcji syntezy fosfoniano-fosforanu typu **105** nadmiar jodu rozłożyłam etanotiolem a następnie odparowałam rozpuszczalniki. Pozostałość rozpuściłam w chlorku metylenu i przemyłam 1M wodnym roztworem KH_2PO_4 pH = 4,0. Fazę organiczną osuszyłam nad bezw. Na_2SO_4 i odparowałam do sucha. Fosfoniano-fosforany typu **105** izolowałam na kolumnie wypełnionej żelazem krzemionkowym lub żelazem zsilanizowanym (faza odwrócona). Frakcje zawierające czyste produkty zateżałam i liofilizowałam z benzenu.

Fosforan 2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo fenylo [fosfonylo (2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo fenylo) 4-metoksyfenylo] metylowy 105f. Wydajność 48%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 7.53-6.82 (16H, m, ArH i 6-H), 6.11-5.82 (3H, m, 1'-H i CH), 5.66-5.54 (2H, m, 5-H), 4.42-3.87 (6H, 2 m, 5', 5'', 4'-H), 3.82-3.79 (3H, m, OCH_3), 2.30, 1.85 (8H, 2 br m, 2', 2'', 3', 3''-H).

Fosforan 2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo 3-pirydylo [fosfonylo (2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo 2,6-dimetylofenylo) 3-pirydylo] metylowy 105g. Wydajność 50%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.86-8.37 (4H, m, ArH), 8.01-7.82 (1H, m, ArH), 7.56-7.13 (8H, m, ArH i 6-H), 6.19-5.87 (3H, m, 1'-H i CH), 5.79-5.58 (2H, m, 5-H), 4.58-3.94 (6H, 5 m, 5', 5'', 4'-H), 2.44-1.50 (4H, 2 m, 2', 2'', 3', 3''-H), 2.17-2.10 (6H, m, 2x CH_3).

The first part of the report discusses the current state of the world economy and the impact of the recession on the United States. It notes that the recession has led to a significant increase in unemployment and a decline in consumer spending. The report also discusses the impact of the recession on the financial markets and the role of the Federal Reserve in responding to the economic challenges.

The second part of the report focuses on the impact of the recession on the labor market. It discusses the decline in job openings and the increase in the duration of unemployment spells. The report also examines the impact of the recession on the wages and benefits of workers, noting that real wages have fallen significantly since the start of the recession.

The third part of the report discusses the impact of the recession on the housing market. It notes that the recession has led to a sharp decline in housing starts and a significant increase in foreclosures. The report also discusses the impact of the recession on the mortgage market and the role of the Federal Reserve in providing liquidity to the financial system.

The fourth part of the report discusses the impact of the recession on the government budget. It notes that the recession has led to a significant increase in government spending and a decline in tax revenues. The report also discusses the impact of the recession on the federal deficit and the role of the government in responding to the economic challenges.

CONCLUSION

The recession has had a significant impact on the United States economy and the labor market. It has led to a significant increase in unemployment and a decline in consumer spending. The recession has also led to a sharp decline in housing starts and a significant increase in foreclosures. The recession has also led to a significant increase in government spending and a decline in tax revenues, leading to a significant increase in the federal deficit.

The Federal Reserve has played a key role in responding to the economic challenges of the recession. It has lowered the federal funds rate and provided liquidity to the financial system. The report also discusses the impact of the recession on the labor market, noting that the duration of unemployment spells has increased significantly.

The report also discusses the impact of the recession on the housing market, noting that housing starts have declined sharply and foreclosures have increased significantly. The report also discusses the impact of the recession on the government budget, noting that government spending has increased significantly and tax revenues have declined.

The recession has had a significant impact on the United States economy and the labor market. It has led to a significant increase in unemployment and a decline in consumer spending. The recession has also led to a sharp decline in housing starts and a significant increase in foreclosures. The recession has also led to a significant increase in government spending and a decline in tax revenues, leading to a significant increase in the federal deficit.

The Federal Reserve has played a key role in responding to the economic challenges of the recession. It has lowered the federal funds rate and provided liquidity to the financial system. The report also discusses the impact of the recession on the labor market, noting that the duration of unemployment spells has increased significantly.

The report also discusses the impact of the recession on the housing market, noting that housing starts have declined sharply and foreclosures have increased significantly. The report also discusses the impact of the recession on the government budget, noting that government spending has increased significantly and tax revenues have declined.

Ogólna procedura syntezy fosfoniano-amidofosforanów typu 159

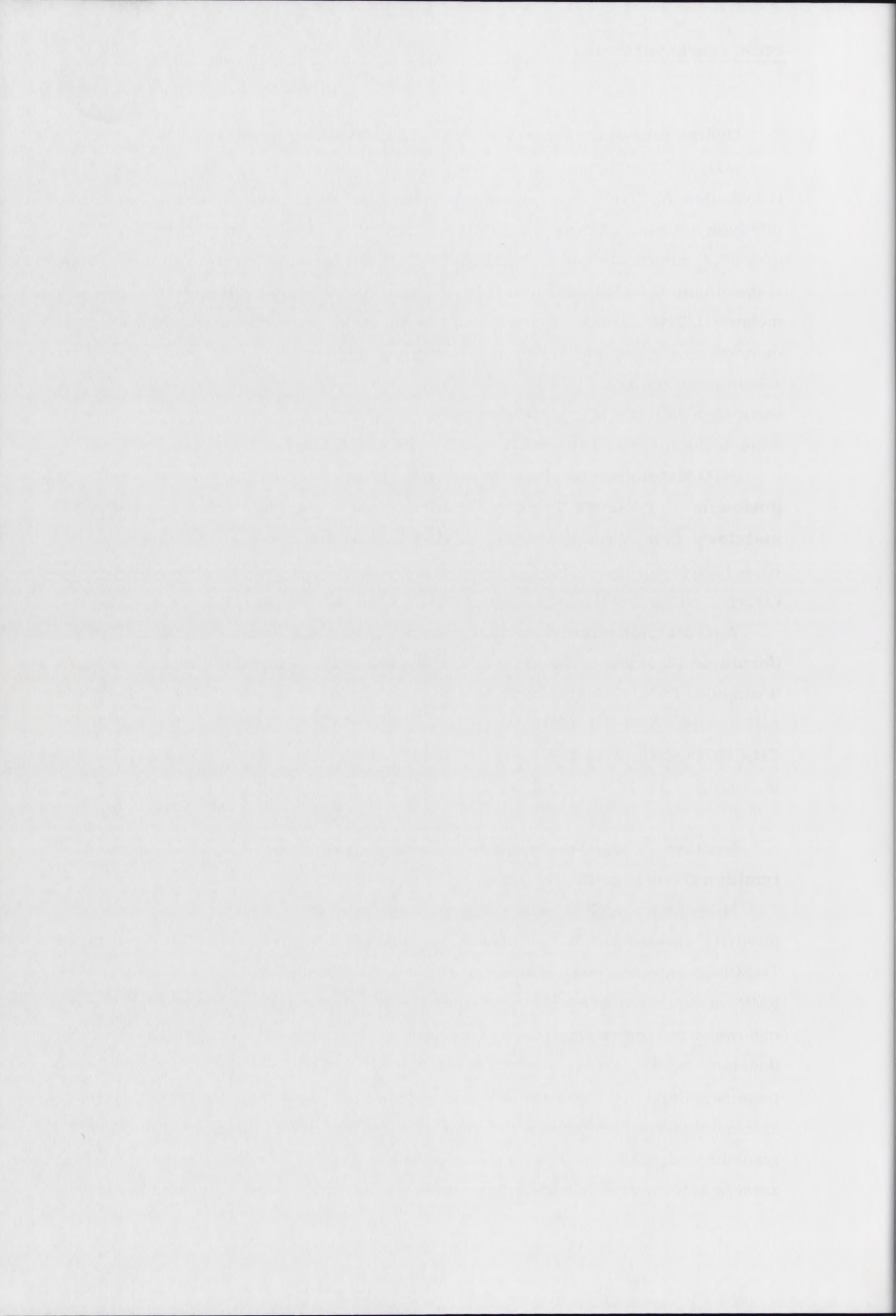
α -Hydroksyfosfonian arylowo nukleozydowy typu **114** (1 ekw. molowy) oraz H-fosfonian AZT (1,1 ekw. molowego) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną a następnie rozpuściłam w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (10% v/v) (0,1 mmola/1 ml) i dodałam PvCl (1,2 ekw. molowego) Do powstałego H-fosfoniano-C-fosfonianu typu **158** (20 min, ^{31}P NMR) dodałam TMSCl (3 ekw. molowe) i Et_3N (2 ekw. molowe) a następnie ester metylowy tryptofanu (3 ekw. molowe) z trietyloaminą (5 ekw. molowych) i na koniec jod (1,2 ekw. molowego). Po zakończeniu reakcji (15 min, ^{31}P NMR) i standardowym przerobie z wodnym roztworem NaHCO_3 oraz chromatografii w układzie odwróconym, czyste fosfoniano-amidofosforany typu **159** zostały wyizolowane i zliofilizowane z benzenu.

***N*-(*O*-Metylo)tryptofyloamidofosforan 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [fosfonylo (3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylo) 4-metoksyfenylo] metylowy 159b.** Wydajność 95%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 7.54-6.50 (16H, m, ArH i 6-H), 6.13-5.62 (3H, m, 1'-H i CH), 4.45-3.13 (17H, m, 3', 5', 5'', 4'-H, $\text{CH}_2\text{CHCOOCH}_3$ i OCH_3), 2.11-1.75 (4H, m, 2',2''-H), 1.80-1.73 (6H, m, 5- CH_3).

***N*-(*O*-Metylo)tryptofyloamidofosforan 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo [fosfonylo (3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylo) 3-pirydylo] metylowy 159i.** Wydajność 89%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.76-8.52 (2H, m, ArH), 7.56-6.95 (14H, m, ArH i 6-H), 6.24-5.52 (3H, m, 1'-H i CH), 4.35-3.62 (17H, m, 3', 5', 5''-H i $\text{CH}_2\text{CHCOOCH}_3$), 3.13 (2H, br m, 4'-H), 2.30-2.04 (4H, m, 2',2''-H), 1.86-1.74 (3H, m, 5- CH_3), 1.78-1.74 (6H, m, 5- CH_3).

Synteza *N*-(*O*-metylo)tryptofyloamidofosforanu 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo Et₃NH⁺ 160.

H-Fosfonian AZT (1 ekw. molowy) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną, rozpuściłam w tym samym rozpuszczalniku (0,1 mmola/1 ml) i dodałam TMSCl (2 ekw. molowe). Następnie do wygenerowanego H-fosfonianodiestru (^{31}P NMR) dodałam osuszony ester metylowy tryptofanu (3 ekw. molowe) z Et_3N (7 ekw. molowe) i na końcu jod (1,2 ekw. molowego). Po 5 min (^{31}P NMR) do mieszaniny dodałam wodę. Po zakończeniu reakcji (10 min., ^{31}P NMR) odparowałam rozpuszczalniki, a pozostałość naniosłam na kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym. Amidofosforan nukleozydowy **160** wymywałam stosując liniowy gradient wody (0-2%) w 2-propanolu z dodatkiem Et_3N (5% objętościowych). Frakcje zawierające czysty związek odparowywałam i liofilizowałam z benzenu otrzymując



niehigroskopijne, bezpostaciowe ciało stałe. Wydajność 71%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 6.83 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, 6-H), 7.36-7.31 (2H, m, ArH), 7.14-7.0 (3H, m, ArH), 6.17 (1H, t, $J = 7$ Hz, 1'-H), 4.31-4.13 (2H, m, 3'-H i CH), 3.94-3.85 (3H, m, 5', 5'', 4'-H), 3.21-3.04 (2H, m, CH_2), 2.89 [6H, q, $J = 7.4$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$], 2.24-2.08 (2H, 2', 2''-H), 1.93 (3H, s, 5- CH_3), 1.19 [9H, t, $J = 7.4$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$].

Ogólna procedura syntezy α -acylofosfonianów arylowo nukleozydowych 156 lub 164.

Do wygenerowanych α -hydroksyfosfonianów arylowo nukleozydowych typu **114** (1 ekw. molowy) w mieszaninie chlorku metylenu z lutydyną (10% v/v) dodałam bezwodnik octowy lub chlorooctowy (10 ekw. molowych). Po zakończeniu reakcji (60-120 min, ^{31}P NMR) mieszaninę reakcyjną przemyłam wodą, a warstwę organiczną wysuszyłam nad bezw. Na_2SO_4 i odparowałam do gęstego oleju. α -Acylofosfoniany 156 lub 162 izolowałam za pomocą chromatografii krótkokolumnowej stosując liniowy gradient (0-10%) 2-propanolu w chlorku metylenu. Frakcje zawierające czyste związki odparowywałam, a pozostałość liofilizowałam z benzenu.

α -Acetylo- α -(4-metoksy)fenylometanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylowy 156b. Wydajność 76%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 7.49-6.87 (10H, m, ArH i 6-H), 6.35-6.27 (1H, m, CH), 6.21-6.06 (1H, m, 1'-H), 4.42-3.89 (4H, 4 m, 3', 5', 5'', 4'-H), 3.80, 3.79, 3.70 (3H, 3s, OCH_3), 2.39-1.91 (2H, m, 2', 2''-H), 2.17, 2.15, 2.06, 2.01 (3H, 4s, CH_3COO), 1.86, 1.84 (3H, 2 br s, 5- CH_3).

α -Acetylo- α -(4-nitro)fenylometanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylowy 156d. Wydajność 64%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.28-8.23, 7.75-7.70 (4H, 2m, ArH), 7.35-7.05 (6H, m, ArH oraz 6-H), 6.51-6.43 (1H, m, CH), 6.16-6.02 (1H, m, 1'-H), 4.40-4.16 (3H, m, 3', 5', 5''-H), 4.01-3.97 (1H, m, 4'-H), 2.52-2.22 (2H, m, 2', 2''-H), 2.27, 2.25, 2.20, 2.17 (3H, 4s, CH_3COO), 1.87, 1.86 (3H, 2s, 5- CH_3).

α -Acetylo- α -(3-pirydylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylowy 156i. Wydajność 53%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.75-8.63 (1H, 2 br s, ArH), 7.90-7.87 (1H, m, ArH), 7.36-7.01 (8H, m, ArH oraz 6-H), 6.42-6.35 (1H, m, CH), 6.16-6.02 (1H, m, 1'-H), 4.43-3.92 (3H, m, 3', 5', 5'', 4'-H), 2.40-2.06 (2H, m, 2', 2''-H), 2.21, 2.19, 2.12, 2.09 (3H, 4s, CH_3COO), 1.85 (3H, s, 5- CH_3).

α -Acetylo- α -(2-pirydylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylowy 156j. Wydajność 49%, ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 8.59-8.55 (1H, m, ArH), 7.74-7.70 (1H, m, ArH), 7.52 (1H, br m, ArH), 7.39-7.09 (7H, m, ArH oraz 6-H), 6.56-6.43 (1H, m, CH), 6.26-6.15 (1H, m, 1'-H), 4.54-3.97 (3H, 3m, 3', 5', 5'', 4'-H),

2.41-2.06 (2H, m, 2', 2''-H), 2.21, 2.19, 2.11, 2.07 (3H, 4s, CH₃COO), 1.79, 1.76 (3H, 2 br s, 5-CH₃).

α -Acetylo- α -(4-pirydylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylowy 156k. Wydajność 54%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.68-8.63 (2H, m, ArH), 7.48-7.47 (2H, m, ArH), 7.34-7.03 (6H, m, ArH oraz 6-H), 6.41-6.33 (1H, m, CH), 6.10-5.99 (1H, m, 1'-H), 4.40-4.20 (2H, m, 3', 5'-H), 4.18-4.08 (1H, m, 5''-H), 3.98-3.93 (1H, 3m, 4'-H), 2.45-2.08 (2H, m, 2', 2''-H), 2.25, 2.23, 2.19, 2.16 (3H, 4s, CH₃COO), 1.85-1.84 (3H, m, 5-CH₃).

α -Chloroacetylo- α -(4-pirydylo)metanofosfonian 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylowo fenylowy 164k. Wydajność 48%, ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 8.61-8.56 (2H, m, ArH), 7.47-7.42 (2H, m, ArH), 7.30-6.98 (6H, m, ArH oraz 6-H), 6.40-6.33 (1H, m, CH), 6.09-5.85 (1H, m, 1'-H), 4.36-3.83 (6H, 3m, 3', 5', 5'', 4'-H i ClCH₂COO), 2.39-2.28 (2H, m, 2', 2''-H), 1.80-1.76 (3H, m, 5-CH₃).

Tabela 4. Przesunięcia chemiczne i stałe sprzężeń ³¹P NMR produktów pośrednich i końcowych.

Związek	Przesunięcie chemiczne ^a δ_P [ppm]	¹ J _{PH} [Hz]	³ J _{PH} [Hz]
98	5,41 ^{dt}	631	5,5
105a	-6,87 – -5,78 i 16,30-17,22 ^m	–	
105b	-6,64 – -5,60 i 12,14 – 13,57 ^m	–	
105c	-6,79 – -5,55 i 12,26 – 13,73 ^m	–	
105d	-6,67 – -5,75 i 12,17 – 15,65 ^m	–	
105e	-6,82 – -5,74 i 11,54 – 12,57 ^m	–	
105f	-6,44 – -5,58 i 13,54 – 14,52 ^m	–	
105g	-5,58 – -5,08 i 11,23 – 12,57 ^m	–	
105h	-6,86 – -5,72 i 11,94 – 13,92 ^m	–	
105i	-6,73 – -4,91 i 12,74 – 14,04 ^m	–	
114a	18,72; 18,76; 18,97 ;19,05 ^b	–	
114b	18,82; 18,85; 18,98 ;19,09 ^b	–	
114c	18,88; 18,96; 19,11 ;19,24 ^b	–	
114d	17,10; 17,14;17,31; 17,54 ^b	–	
114e	17,96; 18,05; 18,08; 18,26 ^b	–	
114f	18,08; 17,89; 17,75 ^b	–	

1.41-2.06 (2H, m, 2'-H), 2.11, 2.19, 2.21, 2.07 (2H, 4x, CH₂COO), 1.73, 1.76 (2H, 2 br s-CH₂).

o-Acetyl-*o*-(4-pyridyl)metanolanizolizina 3-azido-3-deoksyzymidyn-5-ylowa forma krystalowa. Wykrycie 80%. ¹H NMR, 4% (CDCl₃): 8.68-8.63 (2H, m, 4H), 7.45-7.41 (2H, m, 4H), 7.34-7.32 (2H, m, 4H), 6.41-6.33 (2H, m, 2H), 6.10-5.99 (2H, m, 2H), 4.80-4.70 (2H, m, 2H), 4.18-4.08 (2H, m, 2H), 1.98-1.93 (2H, 2x, 2'-H), 1.45-1.08 (2H, m, 2', 2'-H), 1.22, 1.23, 1.19, 1.16 (2H, 4x, CH₂COO), 1.83-1.84 (2H, m, 2-CH₂).

o-Chloroacetyl-*o*-(4-pyridyl)metanolanizolizina 3-azido-3-deoksyzymidyn-5-ylowa forma krystalowa. Wykrycie 48%. ¹H NMR, 4% (CDCl₃): 8.61-8.56 (2H, m, 4H), 7.47-7.43 (2H, m, 4H), 7.30-7.22 (2H, m, 4H), 6.40-6.33 (2H, m, 2H), 6.09-5.85 (2H, m, 2H), 4.93-4.81 (2H, m, 2', 2'-H), 1.4-1.1 (2H, 2'-H), 1.80-1.76 (2H, m, 2-CH₂).

Table 4. Parametry chemiczne i stała optyczna ¹H NMR produktów pojedynczych i koflowych

Wzrostek	Parametry chemiczne (ppm)	$[\alpha]_D^{25}$ (m)	$[\alpha]_D^{25}$ (m)
23	8.61*	631	53
102*	8.57 - 8.78 (1.60 - 17.2)*	-	-
102*	8.61 - 8.60 (12.14 - 13.57)*	-	-
102*	8.79 - 8.52 (12.78 - 13.75)*	-	-
102*	8.67 - 8.73 (12.17 - 13.65)*	-	-
102*	8.92 - 8.74 (11.24 - 12.37)*	-	-
102*	8.41 - 8.50 (13.04 - 14.52)*	-	-
102*	8.35 - 8.04 (14.33 - 15.87)*	-	-
102*	8.50 - 8.73 (11.04 - 13.92)*	-	-
102*	8.73 - 8.91 (12.74 - 14.04)*	-	-
114*	16.73, 16.76, 13.97, 13.03*	-	-
114*	16.82, 16.83, 16.93, 16.04*	-	-
114*	16.88, 16.96, 19.11, 19.24*	-	-
114*	17.10, 17.14, 17.31, 17.24*	-	-
114*	17.95, 18.02, 18.08, 18.23*	-	-
114*	18.08, 17.83, 17.73*	-	-

Związek	Przesunięcie chemiczne ^a δ_P [ppm]	$^1J_{PH}$ [Hz]	$^3J_{PH}$ [Hz]
114h	19,84; 19,81; 19,72; 19,59 ^m	–	
114i	18,05; 18,22; 18,43; 18,59 ^m	–	
114l	23,30; 23,22; 23,15; 23,12 ^m	–	
114n	19,60; 19,47; 19,16; 19,09 ^m	–	
114o	19,62; 19,50; 19,28; 19,10 ^m	–	
114r	17,96; 17,81; 17,61; 17,52 ^m	–	
114s	18,26; 18,01; 17,88; 17,66 ^m	–	
114t	18,57; 18,49; 18,14; 18,06 ^m	–	
114u	17,56; 17,63; 17,82; 18,14 ^m	–	
114v	17,59; 17,91; 18,19 ^m	–	
114w	17,59; 17,70; 17,90; 18,20 ^m	–	
114x	17,54; 17,68; 17,81; 18,12 ^m	–	
114z	17,23; 17,27; 17,39; 17,64 ^m	–	
114(ddU)	18,96; 19,12 ^m	–	
124a	4,56; 5,25 ^{2dt}	724,2; 725,7	7,8; 7,8
124o	4,58; 5,32 ^{2dt}	721,4; 722,6	7,8; 7,9
124p	4,96; 5,94 ^{2dt}	724,2; 723,8	7,7; 7,8
124q	5,14; 5,91 ^{2dt}	719,8; 720,5	7,9; 7,9
124r	8,39; 9,03 ^{2de}	717,1; 717,9	8,7; 8,2
124s	8,32; 8,97 ^{2de}	720,5; 719,6	7,9; 8,1
125	123,71; 123,42 ^m	–	
128	127,23 ^t	–	7,3
132	124,09	–	–
138b	17,80; 17,83	–	
138e	16,10; 16,30	–	
138d	15,09; 15,31	–	
138i	15,81; 16,05	–	
139r	-6,36; -6,39 ^m	–	
139s	-6,26; -6,29 ^m	–	
140a	-6,00 ^t	–	5,9
140o	-5,80 ^t	–	5,5
140p	-5,84 ^t	–	5,9
140q	-5,26 ^t	–	5,7
140r	-0,92 ^e	–	6,4
140s	-0,94 ^e	–	6,4
142	52,58 ^t	–	5,8
143	-6,48 ^e	–	7,3
151	4,16 ^{dt}	717,1	7,33; 7,33
152d	16,62; 16,73 ^m	–	
152i	16,99 ^m	–	
153d	11,89 ^d	–	16,5
153i	12,98 ^d	–	13,7
154	8,05; 8,64 ^{2de}	712,5; 713,9	7,8; 7,9
156b	15,10; 15,44 ^m	–	
156d	13,05; 13,14; 13,34; 13,54 ^m	–	
156i	13,73; 13,76; 14,06; 14,19 ^m	–	
156j	13,58; 13,61; 13,98; 14,49 ^m	–	
156k	13,03; 13,08; 13,32; 13,52 ^m	–	

Year	Amount	Description	Year	Amount
1900	10.00	...	1900	10.00
1901	10.00	...	1901	10.00
1902	10.00	...	1902	10.00
1903	10.00	...	1903	10.00
1904	10.00	...	1904	10.00
1905	10.00	...	1905	10.00
1906	10.00	...	1906	10.00
1907	10.00	...	1907	10.00
1908	10.00	...	1908	10.00
1909	10.00	...	1909	10.00
1910	10.00	...	1910	10.00
1911	10.00	...	1911	10.00
1912	10.00	...	1912	10.00
1913	10.00	...	1913	10.00
1914	10.00	...	1914	10.00
1915	10.00	...	1915	10.00
1916	10.00	...	1916	10.00
1917	10.00	...	1917	10.00
1918	10.00	...	1918	10.00
1919	10.00	...	1919	10.00
1920	10.00	...	1920	10.00
1921	10.00	...	1921	10.00
1922	10.00	...	1922	10.00
1923	10.00	...	1923	10.00
1924	10.00	...	1924	10.00
1925	10.00	...	1925	10.00
1926	10.00	...	1926	10.00
1927	10.00	...	1927	10.00
1928	10.00	...	1928	10.00
1929	10.00	...	1929	10.00
1930	10.00	...	1930	10.00
1931	10.00	...	1931	10.00
1932	10.00	...	1932	10.00
1933	10.00	...	1933	10.00
1934	10.00	...	1934	10.00
1935	10.00	...	1935	10.00
1936	10.00	...	1936	10.00
1937	10.00	...	1937	10.00
1938	10.00	...	1938	10.00
1939	10.00	...	1939	10.00
1940	10.00	...	1940	10.00
1941	10.00	...	1941	10.00
1942	10.00	...	1942	10.00
1943	10.00	...	1943	10.00
1944	10.00	...	1944	10.00
1945	10.00	...	1945	10.00
1946	10.00	...	1946	10.00
1947	10.00	...	1947	10.00
1948	10.00	...	1948	10.00
1949	10.00	...	1949	10.00
1950	10.00	...	1950	10.00
1951	10.00	...	1951	10.00
1952	10.00	...	1952	10.00
1953	10.00	...	1953	10.00
1954	10.00	...	1954	10.00
1955	10.00	...	1955	10.00
1956	10.00	...	1956	10.00
1957	10.00	...	1957	10.00
1958	10.00	...	1958	10.00
1959	10.00	...	1959	10.00
1960	10.00	...	1960	10.00
1961	10.00	...	1961	10.00
1962	10.00	...	1962	10.00
1963	10.00	...	1963	10.00
1964	10.00	...	1964	10.00
1965	10.00	...	1965	10.00
1966	10.00	...	1966	10.00
1967	10.00	...	1967	10.00
1968	10.00	...	1968	10.00
1969	10.00	...	1969	10.00
1970	10.00	...	1970	10.00
1971	10.00	...	1971	10.00
1972	10.00	...	1972	10.00
1973	10.00	...	1973	10.00
1974	10.00	...	1974	10.00
1975	10.00	...	1975	10.00
1976	10.00	...	1976	10.00
1977	10.00	...	1977	10.00
1978	10.00	...	1978	10.00
1979	10.00	...	1979	10.00
1980	10.00	...	1980	10.00
1981	10.00	...	1981	10.00
1982	10.00	...	1982	10.00
1983	10.00	...	1983	10.00
1984	10.00	...	1984	10.00
1985	10.00	...	1985	10.00
1986	10.00	...	1986	10.00
1987	10.00	...	1987	10.00
1988	10.00	...	1988	10.00
1989	10.00	...	1989	10.00
1990	10.00	...	1990	10.00
1991	10.00	...	1991	10.00
1992	10.00	...	1992	10.00
1993	10.00	...	1993	10.00
1994	10.00	...	1994	10.00
1995	10.00	...	1995	10.00
1996	10.00	...	1996	10.00
1997	10.00	...	1997	10.00
1998	10.00	...	1998	10.00
1999	10.00	...	1999	10.00
2000	10.00	...	2000	10.00

Związek	Przesunięcie chemiczne ^a δ_P [ppm]	$^1J_{PH}$ [Hz]	$^3J_{PH}$ [Hz]
157b	12,34 ^m	-	
158b	7,80 - 9,57 ^{dm} i 13,26 - 14,16 ^m	718,9	
158i	8,02 - 9,94 ^{dm} i 12,47 - 13,08 ^m	746,4	
159b	8,08 - 9,07 ^m i 13,94 - 14,92 ^m	-	
159i	7,89 - 9,18 ^m i 12,49 - 13,82 ^m	-	
160	4,31 ^m	-	
161b	-2,22 - -7,71 i 16,26 - 17,06 ^m	-	
162b	9,08 - 10,17 ^m i 11,85 - 12,10 ^m	-	
164k	11,68; 11,95; 12,19 ^m	-	

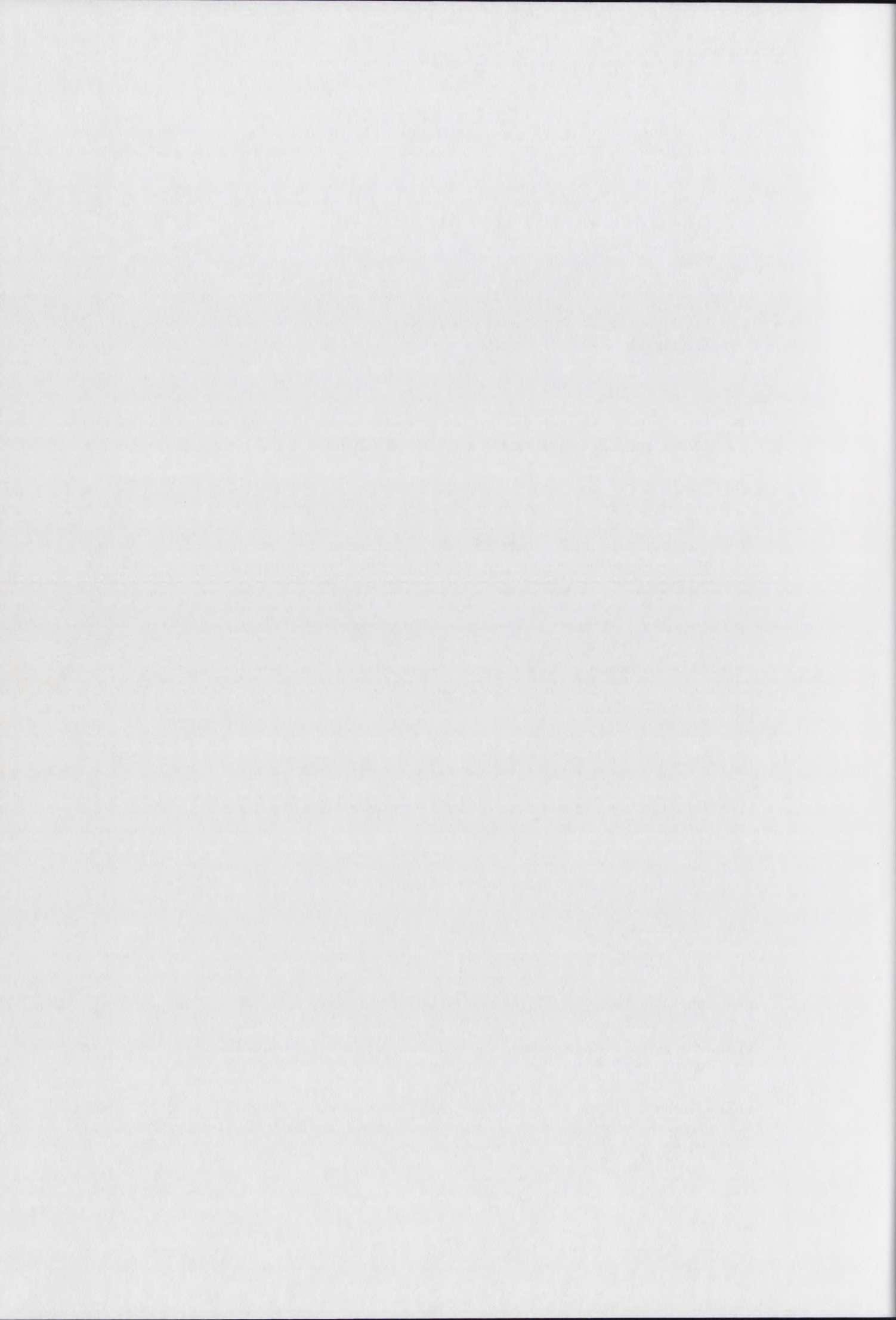
^a Przesunięcia chemiczne z widm wykonanych w CH_2Cl_2 z rozprężeniem heterojądrowym (wzorzec zewnętrzny: 2% H_3PO_4 w D_2O). ^d Dublet. ^t Tryplet. ^{dt} Dublet trypletów. ^e Kwintet. ^{de} Dublet kwintetów. ^m Multiplet. ^{dm} Dublet multipletów.

Lp.	Nazwa	Wykonanie	
		Plan	Faktycznie
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

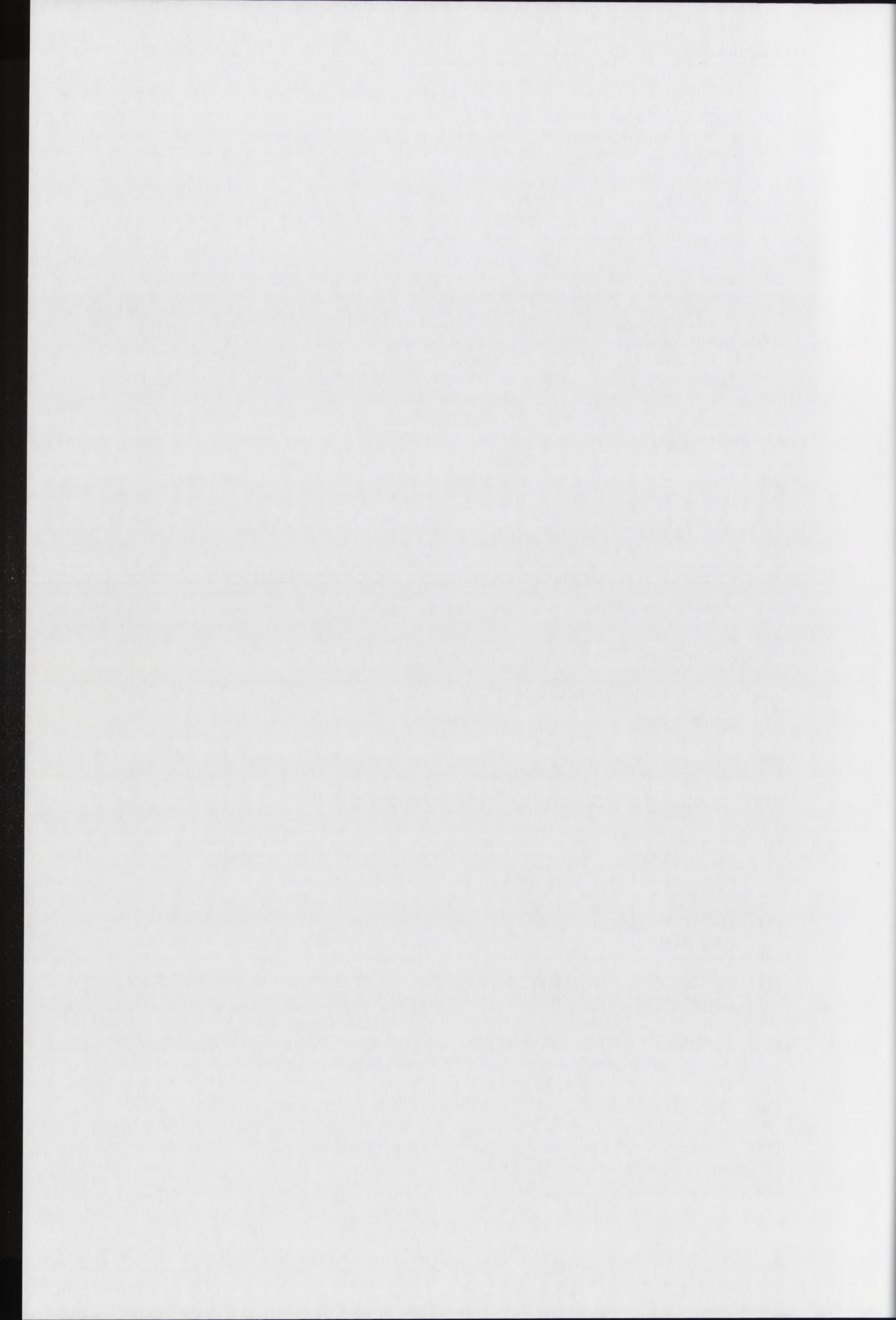
Wykonanie planu w % = (Wykonanie faktyczne / Wykonanie planowe) * 100
 Wykonanie planowe = Wykonanie poprzednie + zmiany w planie
 Wykonanie faktyczne = Wykonanie poprzednie + zmiany w wykonaniu

VIII. LITERATURA

- (1) Coffin, J. M. Retroviridae: The Viruses and Their Replication; In *Fields Virology*; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 1996.
- (2) Collier, L.; Oxford, J. *Wirusologia- podręcznik dla studentów medycyny, stomatologii i mikrobiologii.*; Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa, 1996.
- (3) Piekarowicz, A. *Podstawy wirusologii molekularnej*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2004.
- (4) Kuratowska, Z. *AIDS- nowa choroba.*; Wiedza Powszechna: Warszawa, 1987.
- (5) Luciw, P. A. Human Immunodeficiency Viruses and Their Replication.; In *Fields Virology*; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 1996.
- (6) Turner, P. C.; McLennan, A. G.; Bates, A. D.; White, M. R. H. *Biologia molekularna- krótkie wykłady.* Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2004.
- (7) Tarrago-Litvak, L.; Andreola, M. L.; Fournier, M.; Nevinsky, G. A.; Parissi, V.; de Soultrait, V. R.; Litvak, S. *Current Pharmaceutical Design* **2002**, 8, 125-133.
- (8) Stryer, L. *Biochemia*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa , 1999.
- (9) Lebon, F.; Ledecq, M. *Current Medicinal Chemistry* **2000**, 7, 455-477.
- (10) Prevention and Control of Viral Diseases.; In *Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control.*; ASM Press: Washington, 2000.
- (11) De Clercq, E. *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, 1587, 258-275.
- (12) Cichocki, T.; Litwin, J. A.; Mirecka, J. *Kompedium histologii*; Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego: Kraków, 1998.
- (13) Hirsch, M. S.; Curran, J. Human Immunodeficiency Viruses; In *Fields Virology*; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 1996.
- (14) Coffin, J. M. *Science* **1995**, 267, 483-489.
- (15) Mitsuya, H.; Broder, S. *Nature* **1987**, 325, 773-778.
- (16) Richman, D. D. *Nature* **2001**, 410, 995-1001.
- (17) Kurzyńska-Kokorniak, A.; Jaskólski, M.; Figlerowicz, M. *Biotechnologia* **2002**, 1, 24-34.
- (18) Multiple Facets of human Immunodeficiency Virus Pathogenicity.; In *Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control.*; ASM Press: Washington, 2000.



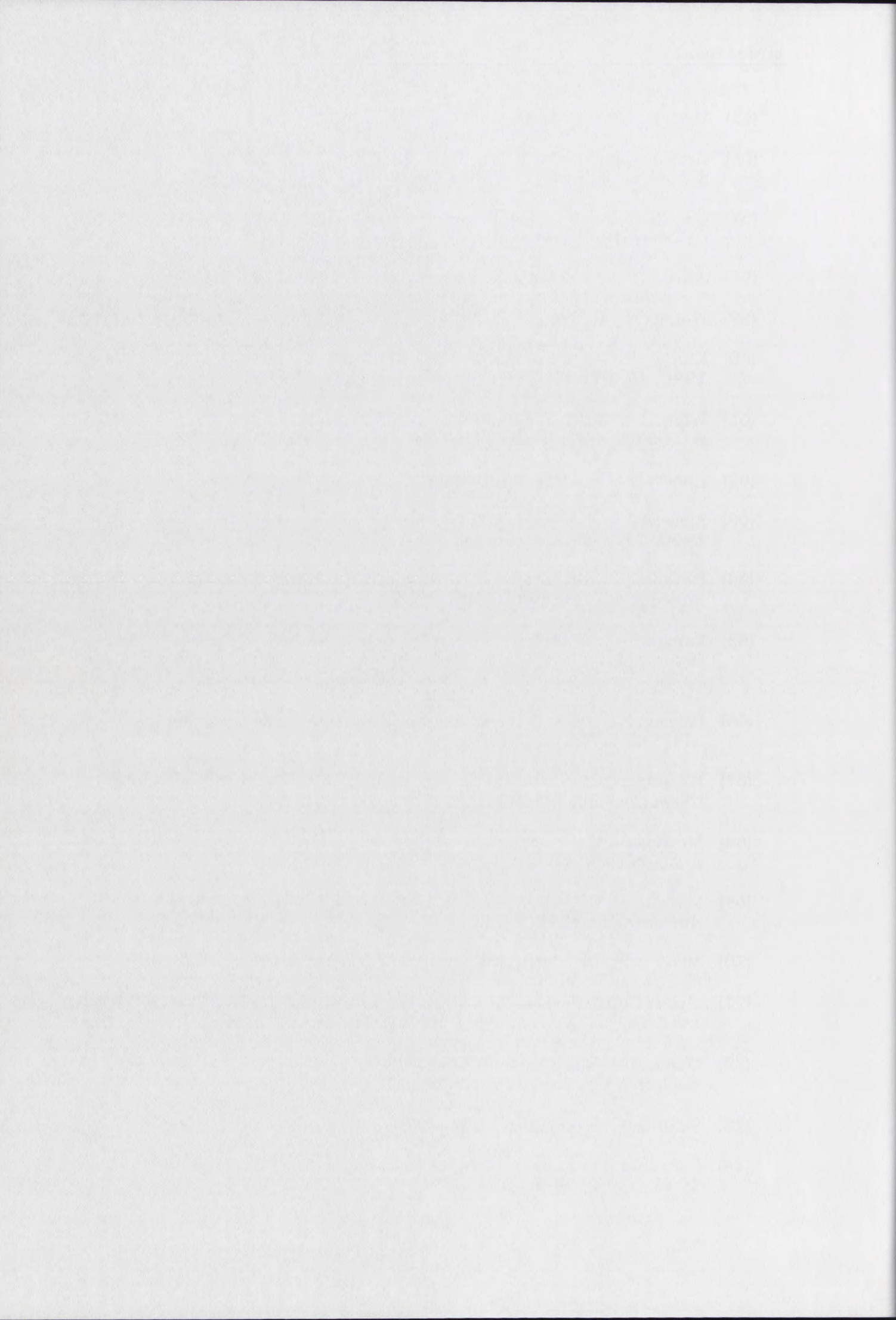
- (19) Boryski, J. Aktywność antywirusowa analogów nukleozydowych i jej zastosowanie w celach terapeutycznych.; In *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie.*; Barciszewski, J., Łastowski, K., Twardowski, T., eds. Poznań, 1996.
- (20) Patrick, G. L. *Chemia medyczna. Podstawowe zagadnienia.*; Wydawnictwa Naukowo- Techniczne: Warszawa, 2003.
- (21) Arts, E. J.; Wainberg, M. A. *Antimicrob.Agents Chemother.* **1996**, *40*, 527-540.
- (22) Aquardo, S.; Wedgwood, O.; Yarnold, C.; Cahard, D.; Pathirana, R. N.; McGuigan, C.; Calio, R.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Perno, C.-F. *Antimicrob.Agents Chemother.* **2000**, *44*, 173-177.
- (23) Balzarini, J.; Aquaro, S.; Hassan-Abdallah, A.; Daluge, S. M.; Perno, C.-F.; McGuigan, C. *FEBS Lett.* **2004**, *573*, 38-44.
- (24) Perigaud, C.; Aubertin, A.-M.; Benzaria, S.; Pelicano, H.; Girardet, J. L.; Maury, G.; Gosselin, G.; Kirn, A.; Imbach, J.-L. *Biochem.Pharmacol.* **1994**, *48*, 11-14.
- (25) Schinazi, R. F.; Sommadossi, J. P.; Saalman, V.; Cannon, D. L.; Xie, M.-Y.; Hart, G. C.; Smith, G. A.; Hahn, E. *Antimicrob.Agents Chemother.* **1990**, *June*, 1061-1067.
- (26) Parang, K.; Wiebe, L. I.; Knaus, E. E. *Current Medicinal Chemistry* **2000**, *7*, 995-1039.
- (27) Meier, C.; Habel, L. W.; Balzarini, J.; DeClerq, E. *Liebigs Ann.Chem.* **1995**, 2203-2208.
- (28) Palomino, E.; Kessel, D.; Horwitz, J. P. *J.Med.Chem.* **1989**, *32*, 622-625.
- (29) De Clercq, E. *J.Med.Chem.* **1995**, *38*, 2491-2517.
- (30) Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; St Clair, M. H.; Weinhold, K.; Rideout, J. L.; Freeman, G. A.; Nusinoff Lehrman, S.; Bolognesi, D. P.; Broder, S.; Mitsuya, H.; Barry, D. W. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1986**, *83*, 8333-8337.
- (31) Ho, H. T.; Hitchcock, M. J. M. *Antimicrob.Agents Chemother.* **1989**, *33*, 844-849.
- (32) Balzarini, J.; Herdewijin, P.; De Clercq, E. *J.Biol.Chem.* **1989**, *264*, 6127-6133.
- (33) Johnson, M. A.; Ahluwalia, G.; Connelly, M. C.; Cooney, D. A.; Broder, S.; Johns, D. G.; Fridland, A. *J.Biol.Chem.* **1998**, *263*, 15354-15357.
- (34) Good, S. S.; de Miranda, P. *Antiviral Chem.Chemother.* **1992**, *3*, 65-77.
- (35) Cretton, E. M.; Xie, M. Y.; Bevan, R. J.; Goudgaon, N. M.; Schinazi, R. F. *Molecular Pharmacology* **1990**, *39*, 258-266.



- (36) Faraj, A.; Fowler, D. A.; Bridges, E. G.; Sommadossi, J. P. *Antimicrob.Agents Chemother.* **1994**, *38*, 924-930.
- (37) Sommadossi, J. P.; Carlisle, R.; Zhou, Z. *Molecular Pharmacology* **1989**, *36*, 9-14.
- (38) Nickel, W.; Austermann, S.; Bialek, G.; Grosse, F. *J.Biol.Chem.* **1992**, *267*, 848-854.
- (39) Harrington, J. A.; Reardon, J. E.; Spector, T. *Antimicrob.Agents Chemother.* **1993**, 918-920.
- (40) Copeland, W. C.; Chen, M. S.; Wang, T. S. F. *J.Biol.Chem.* **1992**, *267*, 21459-21464.
- (41) Bridges, E. G.; Faraj, A.; Sommadossi, J. P. *Biochem.Pharmacol.* **1993**, *45*, 1571-1576.
- (42) Byrnes, J. J.; Downey, K. M.; Que, B. G.; Lee, M. Y. W.; Black, V. L.; So, A. G. *Biochemistry* **1977**, *16*, 3740-3745.
- (43) Yan, J. P.; Ilsley, D. D.; Frohlick, C.; Steet, R.; Hall, E. T.; Kuchta, R. D.; Malancon, P. *J.Biol.Chem.* **1995**, *270*, 22836-22841.
- (44) Hall, E. T.; Yan, J. P.; Malancon, P.; Kuchta, R. D. *J.Biol.Chem.* **1994**, *269*, 14355-14358.
- (45) Gogu, S.; Malter, J. S.; Agrawal, K. C.; . *Biochem.Pharmacol.* **1992**, *44*, 1009-1012.
- (46) De Clercq, E. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2004**, *23*, 457-470.
- (47) De Clercq, E. *Antiviral Res.* **2005**, *38*, 153-179.
- (48) de Jong, M. D.; Boucher, Ch. A. B.; Galasso, G. J.; Hirsch, M. S.; Kern, E. R.; Lange, J. M. A.; Richman, D. D. *Antiviral Res.* **1995**, *29*, 5-29.
- (49) Vandamme, A.-M.; Van Vaerenberg, K.; DeClerq, E. *Antiviral Chem.Chemother.* **1998**, *9*, 187-203.
- (50) Valazquez, S.; Alvarez, R.; San-Felix, A.; Jimeno, M. L.; DeClerq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. *J.Med.Chem.* **1995**, *38*, 1641-1649.
- (51) Velazquez, S.; Tunon, V.; Jimeno, M. L.; Chamorro, C.; De Clerq, E.; Balzarini, J.; Camarasa, M. J. *J.Med.Chem.* **1999**, *42*, 5188-5196.
- (52) Pontikis, R.; Dolle, V.; Guillaumel, J.; Dechaux, E.; Note, R.; Nguyen, Ch. H.; Legraverend, M.; Bisagni, E.; Aubertin, A.-M.; Grierson, D. S.; Monneret, C. *J.Med.Chem.* **2000**, *43*, 1927-1939.
- (53) Matsumoto, H.; Hamawaki, T.; Ota, H.; Kimura, T.; Goto, T.; Sano, K.; Hayashi, Y.; Kiso, Y. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **2000**, *10*, 1227-1231.
- (54) Matsumoto, H.; Kimura, T.; Hamawaki, T.; Kumagai, A.; Goto, T.; Sano, K.; Hayashi, Y.; Kiso, Y. *Bioorg.Med.Chem.* **2001**, *9*, 1589-1600.

Year	Value	Year	Value
1960	100	1970	100
1961	105	1971	105
1962	110	1972	110
1963	115	1973	115
1964	120	1974	120
1965	125	1975	125
1966	130	1976	130
1967	135	1977	135
1968	140	1978	140
1969	145	1979	145
1980	150	1980	150
1981	155	1981	155
1982	160	1982	160
1983	165	1983	165
1984	170	1984	170
1985	175	1985	175
1986	180	1986	180
1987	185	1987	185
1988	190	1988	190
1989	195	1989	195
1990	200	1990	200
1991	205	1991	205
1992	210	1992	210
1993	215	1993	215
1994	220	1994	220
1995	225	1995	225
1996	230	1996	230
1997	235	1997	235
1998	240	1998	240
1999	245	1999	245
2000	250	2000	250
2001	255	2001	255
2002	260	2002	260
2003	265	2003	265
2004	270	2004	270
2005	275	2005	275
2006	280	2006	280
2007	285	2007	285
2008	290	2008	290
2009	295	2009	295
2010	300	2010	300
2011	305	2011	305
2012	310	2012	310
2013	315	2013	315
2014	320	2014	320
2015	325	2015	325
2016	330	2016	330
2017	335	2017	335
2018	340	2018	340
2019	345	2019	345
2020	350	2020	350

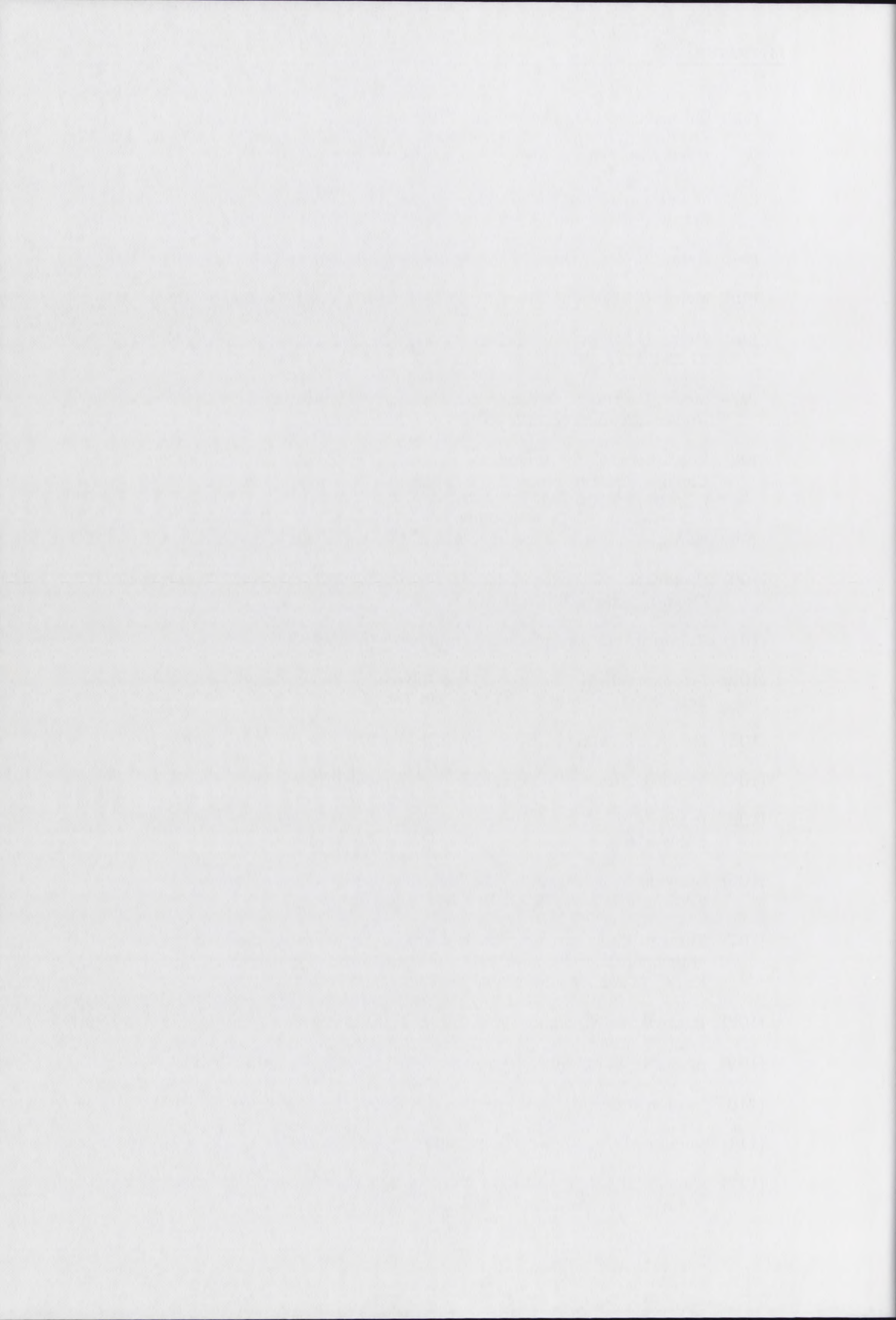
- (55) Meier, C. *Synlett* **1998**, 233-242.
- (56) Groschel, B.; Hover, G.; Doerr, H. W.; Cinatl, J. Jr. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, 20, 487-492.
- (57) Cinatl, J. Jr.; Groschel, B.; Zehner, R.; Cinatl, J.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L.; Doerr, H. W. *Antiviral Chem.Chemother.* **1997**, 8, 343-352.
- (58) Jones, R. J.; Bischofberger, N. *Antiviral Res.* **1995**, 27, 1-17.
- (59) Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med.Res.Rev.* **2000**, 20, 417-451.
- (60) Kumar, R.; Wang, L.; Wiebe, L. J.; Knaus, E. E. *Nucleosides & Nucleotides* **1996**, 15, 265-286.
- (61) Wang, L.; Morin, K. W.; Kumar, R.; Cheraghali, M.; Todd, K. G.; Baker, G. B.; Knaus, E. E.; Wiebe, L. I. *J.Med.Chem.* **1996**, 39, 826-833.
- (62) Bodor, N.; Farag, H. H.; Brewster III, M. E. *Science* **1981**, 214, 1370-1372.
- (63) Aggarwal, S. K.; Gogu, S. R.; Rangan, S. R.; Agrawal, K. C. *J.Med.Chem.* **1990**, 33, 1505-1510.
- (64) Devadas, B.; Kishore, N. S.; Adams, S. P.; Gordon, J. I. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1993**, 3, 779-785.
- (65) Langner, C. A.; Lodge, J. K.; Travis, S. J.; Caldwell, J. E.; Lu, T.; Li, Q.; Bryant, M. L.; Devadas, B.; Gokel, G. W.; Kobayashi, G. S.; Gordon, J. I. *J.Biol.Chem.* **1992**, 267, 17159-17169.
- (66) Parang, K.; Wiebe, L. I.; Knaus, E. E. *Antiviral Chem.Chemother.* **1998**, 9, 311-323.
- (67) McGuigan, C.; Nicholls, S. R.; O'Connor, T. J.; Kinchington, D. *Antiviral Chem.Chemother.* **1990**, 1, 25-33.
- (68) McGuigan, C.; O'Connor, T. J.; Nicholls, S. R.; Nickson, C.; Kinchington, D. *Antiviral Chem.Chemother.* **1990**, 1, 355-360.
- (69) McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Mahmood, N.; Devine, K. G.; Hay, A. J. *Antiviral Res.* **1992**, 17, 311-321.
- (70) Meier, Ch.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *Eur.J.Org.Chem.* **1998**, 837-846.
- (71) Meier, Ch.; Lorey, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *J.Med.Chem.* **1998**, 41, 1417-1427.
- (72) Meier, Ch.; Ruppel, M. F.; Vukadinovic, D.; Balzarini, J. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2004**, 23, 89-115.
- (73) Schultz, C. *Bioorg.Med.Chem.* **2003**, 11, 885-898.
- (74) Farquhar, D.; Khan, S.; Srivastva, D. N.; Saunders, P. P. *J.Med.Chem.* **1994**, 37, 3902-3909.



- (75) Thomson, W.; Nicholls, D.; Irwin, W. J.; Al-Mushadani, J. S.; Freeman, S.; Karpas, A.; Petrik, J.; Mahmood, N.; Hay, A. J. *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1* **1993**, 1239-1245.
- (76) Routledge, A.; Walker, I.; Freeman, S.; Hay, A.; Mahmood, N. *Nucleosides & Nucleotides* **1995**, *14*, 1545-1558.
- (77) Lefebvre, I.; Perigaud, Ch.; Pompon, A.; Aubertin, A.-M.; Girardet, J. L.; Kirn, A.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L. *J.Med.Chem.* **1995**, *38*, 3950.
- (78) Tan, X.; Boudinot, F. D.; Chu, C. K.; Egron, D.; Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L. *Antiviral Chem.Chemother.* **2000**, *11*, 203-212.
- (79) Saboulard, D.; Naesens, L.; Cahard, D.; Salgado, A.; Pathirana, R. N.; Velazquez, S.; McGuigan, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *Molecular Pharmacology* **1999**, *56*, 693-704.
- (80) McGuigan, C.; Cahard, D.; Sheeka, H. M.; DeClercq, E.; Balzarini, J. *J.Med.Chem.* **1996**, *39*, 1748-1753.
- (81) Siddiqui, A.; McGuigan, C.; Ballatore, C.; Srinivasan, S.; De Clercq, E.; Balzarini, J. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **2000**, *10*, 381-384.
- (82) Egron, D.; Imbach, J.-L.; Gosselin, G.; Aubertin, A.-M.; Perigaud, C. *J.Med.Chem.* **2003**, *46*, 4564-4571.
- (83) Peyrottes, S.; Egron, D.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L.; Perigaud, C. *Mini-Reviews in Med.Chem.* **2004**, *4*, 395-408.
- (84) Molema, G.; Jansen, R. W.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; Meijer, D. K. F. *Biochem.Pharmacol.* **1990**, *40*, 2603-2610.
- (85) Wagner, C. R.; McIntee, E. J.; Schinazi, R. F.; Abraham, T. W. *Bioorg.Med.Chem.* **1995**, *5*, 1819-1824.
- (86) Chang, S.; Griesgraber, G. W.; Southern, P. J.; Wagner, C. R. *J.Med.Chem.* **2001**, *44*, 223-231.
- (87) Skoblov, Y.; Karpenko, I.; Shirokova, E.; Popov, K.; Andronova, V.; Galegov, G.; Kukhanova, M. *Antiviral Res.* **2004**, *63*, 107-113.
- (88) Krayevsky, A. A.; Tarussova, N. B.; Zhu, Q.; Vidal, P.; Chou, T.; Baron, P.; Polsky, B.; Jiang, X.; Matulic-Adamic, J.; Rosenberg, I.; Watanabe, A. *Nucleosides&Nucleotides* **1992**, *11*, 177-196.
- (89) Tarussova, N. B.; Kukhanova, M. K.; Krayevsky, A. A.; Karamov, E. K.; Lukashov, V. V.; Kornilayeva, C. B.; Rodina, M. A.; Galegov, G. A. *Nucleosides & Nucleotides* **1991**, *10*, 351-354.
- (90) Gosselin, G.; Perigaud, C.; Lefebvre, I.; Pompon, A.; Aubertin, A.-M.; Kirn, A.; Szabo, T.; Stawinski, J.; Imbach, J.-L. *Antiviral Res.* **1993**, *22*, 143-153.
- (91) Boal, J. H.; Iyer, R. P.; Egan, W. *Nucleosides & Nucleotides* **1993**, *12*, 1075-1084.

1871 The first year of the century
1872 The second year of the century
1873 The third year of the century
1874 The fourth year of the century
1875 The fifth year of the century
1876 The sixth year of the century
1877 The seventh year of the century
1878 The eighth year of the century
1879 The ninth year of the century
1880 The tenth year of the century
1881 The eleventh year of the century
1882 The twelfth year of the century
1883 The thirteenth year of the century
1884 The fourteenth year of the century
1885 The fifteenth year of the century
1886 The sixteenth year of the century
1887 The seventeenth year of the century
1888 The eighteenth year of the century
1889 The nineteenth year of the century
1890 The twentieth year of the century
1891 The twenty-first year of the century
1892 The twenty-second year of the century
1893 The twenty-third year of the century
1894 The twenty-fourth year of the century
1895 The twenty-fifth year of the century
1896 The twenty-sixth year of the century
1897 The twenty-seventh year of the century
1898 The twenty-eighth year of the century
1899 The twenty-ninth year of the century
1900 The thirtieth year of the century

- (92) Pokrovsky, A. G.; Pronayeva, T. R.; Fedyuk, N. V.; Shirokova, E. A.; Khandazhynskaya, A. L.; Tarussova, N. B.; Karpenko, I. L.; Krayevsky, A. A. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, *20*, 767-769.
- (93) McGuigan, C.; Bellevergue, P.; Jones, B. C. N. M.; Mahmood, N.; Hay, A. J.; Petrik, J.; Karpas, A. *Antiviral Chem. Chemother.* **1994**, *5*, 271-277.
- (94) Habel, L. W.; Meier, Ch. *Nucleosides&Nucleotides* **1997**, *16*, 1311-1314.
- (95) Meier, Ch. *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **1993**, *32*, 1704-1706.
- (96) Meier, C.; Habel, L. W.; Balzarini, J.; DeClerq, E. *Liebigs Ann.Chem.* **1995**, 2195-2202.
- (97) Meier, C.; Habel, L.; Laux, W.; De Clerq, E.; Balzarini, J. *Nucleosides&Nucleotides* **1995**, *14*, 759-762.
- (98) Rosenberg, E. S.; Altfeld, M.; Poon, S. H.; Philipps, M. N.; Wilkes, B. M.; Eldrige, R. L.; Robbins, G. K.; D'Aquila, R. T.; Goulder, P. J. R.; Walker, B. D. *Nature* **2000**, *407*, 523-526.
- (99) Barouch, D. H. e. a. *Science* **2000**, *290*, 486-492.
- (100) Szymczak, M.; Szymańska, A.; Stawiński, J.; Boryski, J.; Kraszewski, A. *Organic Letters* **2003**, *5*, 3571-3573.
- (101) Kaboudin, B. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3169-3171.
- (102) Firouzabadi, H.; Iranpoor, N.; Sobhani, S.; Sardarian, A.-R. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4369-4371.
- (103) Meier, C.; Laux, W. G. H.; Bats, J. W. *Liebigs Ann.Chem.* **1995**, 1963-1979.
- (104) Meier, C.; Laux, W. *Tetrahedron Asymmetry* **1995**, *6*, 1089-1092.
- (105) Patel, D. V.; Rielly-Gauvin, K.; Ryono, D. E. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5587-5590.
- (106) Stowasser, B.; Budt, K.-H.; Jian-Qi, L.; Peyman, A.; Ruppert, D. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6625-6628.
- (107) Thottathil, J. Developments in the preparation and use of silicon- containing organophosphorus compounds.; In *Handbook of organophosphorus chemistry*.; Engel, R., ed. Marcel Dekker, Inc.: New York, 1992.
- (108) Pudovik, A. N.; Konovalova, I. V. *Synthesis* **1979**, 81-96.
- (109) Azizi, N.; Saidi, M. R. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 7933-7935.
- (110) Sankaraman, S.; Nesakumar, J. E. *Eur.J.Org.Chem.* **2000**, 2003-2011.
- (111) Wiemer, D. F. *Tetrahedron.* **1997**, *53*, 16609-16644.
- (112) Cieslak, J.; Szymczak, M.; Wenska, M.; Stawinski, J.; Kraszewski, A. *J.Amer.Chem.Soc.,Perkin Trans.1* **1999**, *1*, 3327-3331.



- (113) Kers, A.; Kers, I.; Stawiński, J.; Sobkowski, M.; Kraszewski, A. *Tetrahedron*. **1996**, *52*, 9931-9944.
- (114) Pamies, O.; Backwall, J.-E. *J.Org.Chem.* **2003**, *68*, 4815-4818.
- (115) Jones, R. A. Y. *Fizyczna chemia organiczna*; PWN: W-wa, 1988.
- (116) Fuji, T.; Nishida, H.; Abiru, Y.; Yamamoto, M.; Kise, M. *Chem.Pharm.Bull.* **1995**, *43*, 1872-1877.
- (117) King, J. F.; Hillhouse, J. H.; Skonieczny, S. *Can.J.Chem.* **1984**, *62*, 1977-1995.
- (118) Perrin, D. D. *Dissociation constants of organic bases in aqueous solution.*; Butterworths: London, 1965.
- (119) Kers, A.; Stawiński, J.; Dembkowski, L.; Kraszewski, A. *Heteroatom Chem.* **1999**, *10*, 492-499.
- (120) Kortum, G.; Vogel, W.; Andrussow, K. *Dissociation constants of organic acids in aqueous solution.*; Butterworths: London, 1961.
- (121) Epstein, J.; Plapinger, R. E.; Michel, H. O.; Cable, J. R.; Stephani, R. A.; Hester, R. J.; Billington, J.; List, G. R. *J.Amer.Chem.Soc.* **1964**, *86*, 3075-3084.
- (122) Smith, S. C.; Khaledi, M. G. *Anal.Chem.* **1993**, *65*, 193-198.
- (123) Cieslak, J.; Jankowska, J.; Sobkowski, M.; Wenska, M.; Stawinski, J.; Kraszewski, A. *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1* **2002**, 31-37.
- (124) Westheimer, F. H. *Acc.Chem.Res.* **1968**, *1*, 70-78.
- (125) Kinas, R. W.; Okruszek, A.; Stec, W. J. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7875-7879.
- (126) Marque, S.; Tordo, P. *Top Curr Chem* **2005**, *250*, 43-76.
- (127) Chanon, M.; Tobe, M. L. *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **1982**, *21*, 1-86.
- (128) Tole, Ph.; Lim, C. *J.Phys.Chem.* **1993**, *97*, 6212-6219.
- (129) Lim, C.; Tole, Ph. *J.Phys.Chem.* **1992**, *96*, 5217-5219.
- (130) Kaim, L. E.; Gaultier, L.; Grimaud, L.; Dos Santos, A. *Synlett* **2005**, 2335-2336.
- (131) Brook, A. G. *J.Amer.Chem.Soc.* **1958**, *80*, 1886-1889.
- (132) Rim, S.; Audus, K. L.; Borchardt, R. T. *International Journal of Pharmaceutics* **1986**, *32*, 79-84.
- (133) Kucera, G. L.; Goff, C. L.; Iyer, N.; Morris-Natschke, S.; Ishaq, K. S.; Wyrick, S. D.; Fleming, R. A.; Kucera, L. S. *Antiviral Res.* **2001**, *50*, 129-137.

1950-1951

1951-1952

1952-1953

1953-1954

1954-1955

1955-1956

1956-1957

1957-1958

1958-1959

1959-1960

1960-1961

1961-1962

1962-1963

1963-1964

1964-1965

1965-1966

1966-1967

1967-1968

1968-1969

1969-1970

1970-1971

1971-1972

1972-1973

1973-1974

1974-1975

1975-1976

1976-1977

1977-1978

1978-1979

1979-1980

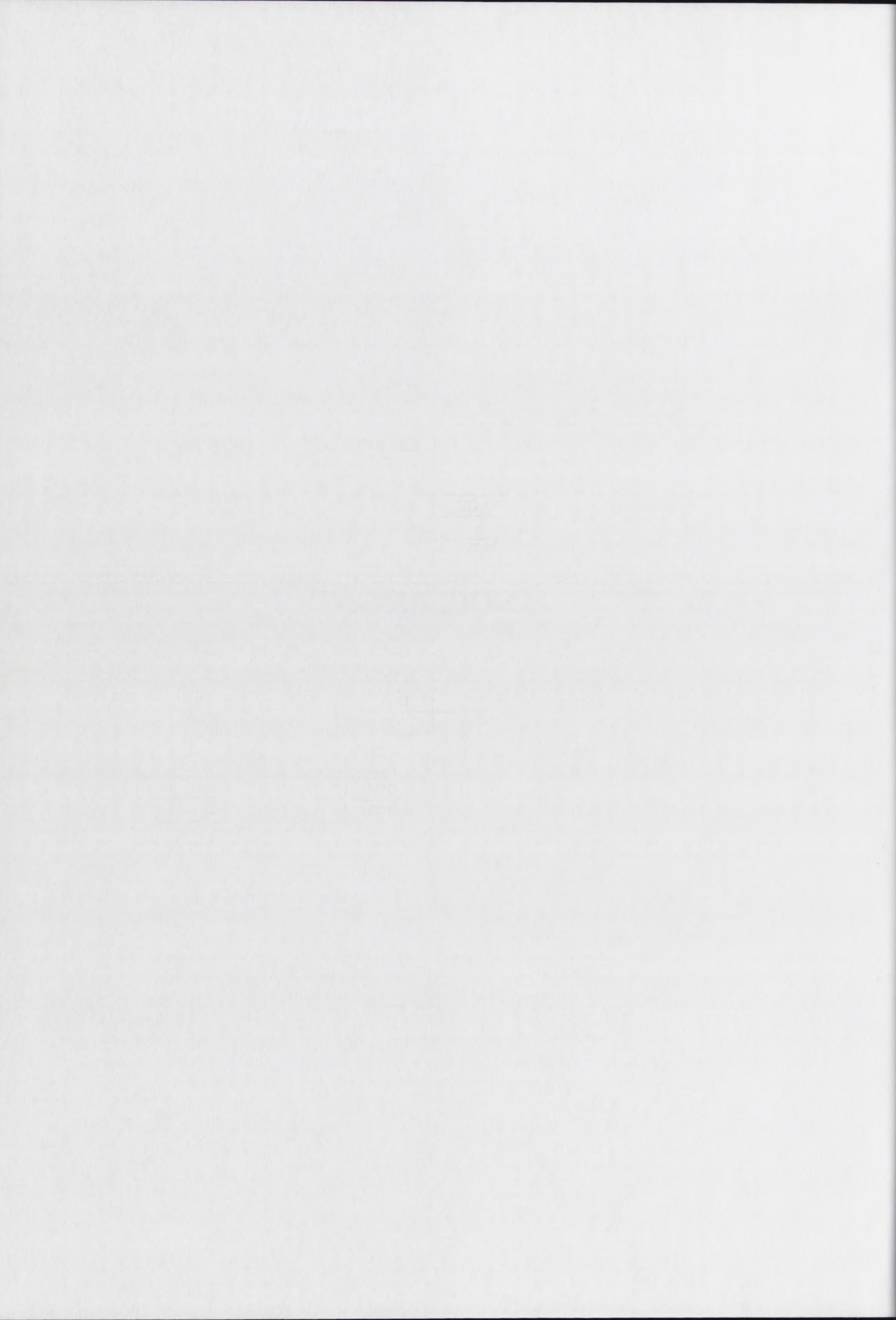
- (134) Piantadosi, C.; Marasco, C. J. Jr.; Maorris-Natschke, S. L.; Meyer, K. L.; Gumus, F.; Surles, J. R.; Ishaq, K. S.; Kucera, L. S.; Iyer, N.; Wallen, C. A.; Piantadosi, S.; Modest, E. J. *J.Med.Chem.* **1991**, *34*, 1408-1414.
- (135) Zhu, J.; Fu, H.; Jiang, Y.; Zhao, Y. *Synlett* **2005**, 1927-1929.
- (136) Bielański, A. *Podstawy chemii nieorganicznej*; Wydawnictwo Naukowe PWN: W-wa, 1994.
- (137) Efimov, V. A.; Reverdatto, S. V.; Chakhmakhcheva, O. G. *Nucl.Acids Res.* **1982**, *10*, 6675-6694.
- (138) Efimov, V. A.; Chakhmakhcheva, O. G.; Ovchinnikov, Y. A. *Nucl.Acids Res.* **1985**, *13*, 3651-3666.
- (139) Engels, J. W.; Schlaeger, E.-J. *J.Med.Chem.* **1977**, *20*, 907-911.
- (140) Menger, F. M.; Ladika, M. *J.Amer.Chem.Soc.* **1987**, *109*, 3145-3146.
- (141) Sommadossi, J. P.; Carlisle, R.; Schinazi, R. F.; Zhou, Z. *Antimicrob.Agents Chemother.* **1998**, *32*, 997-1001.
- (142) Li, Y.-F.; Hammerschmidt, F. *Tetrahedron Asymmetry* **1993**, *4*, 109-120.
- (143) Czernecki, S.; Valery, J.-M. *Synthesis* **1991**, 239-240.
- (144) Stawinski, J.; Thelin, M. *Nucleosides & Nucleotides* **1990**, *9*, 129-135.



Aktywność antywirusowa
 opisanych w rozprawie
 «Hydroksyfosfonianów
 proleków antywirusowych»
 z Uniwersytetu

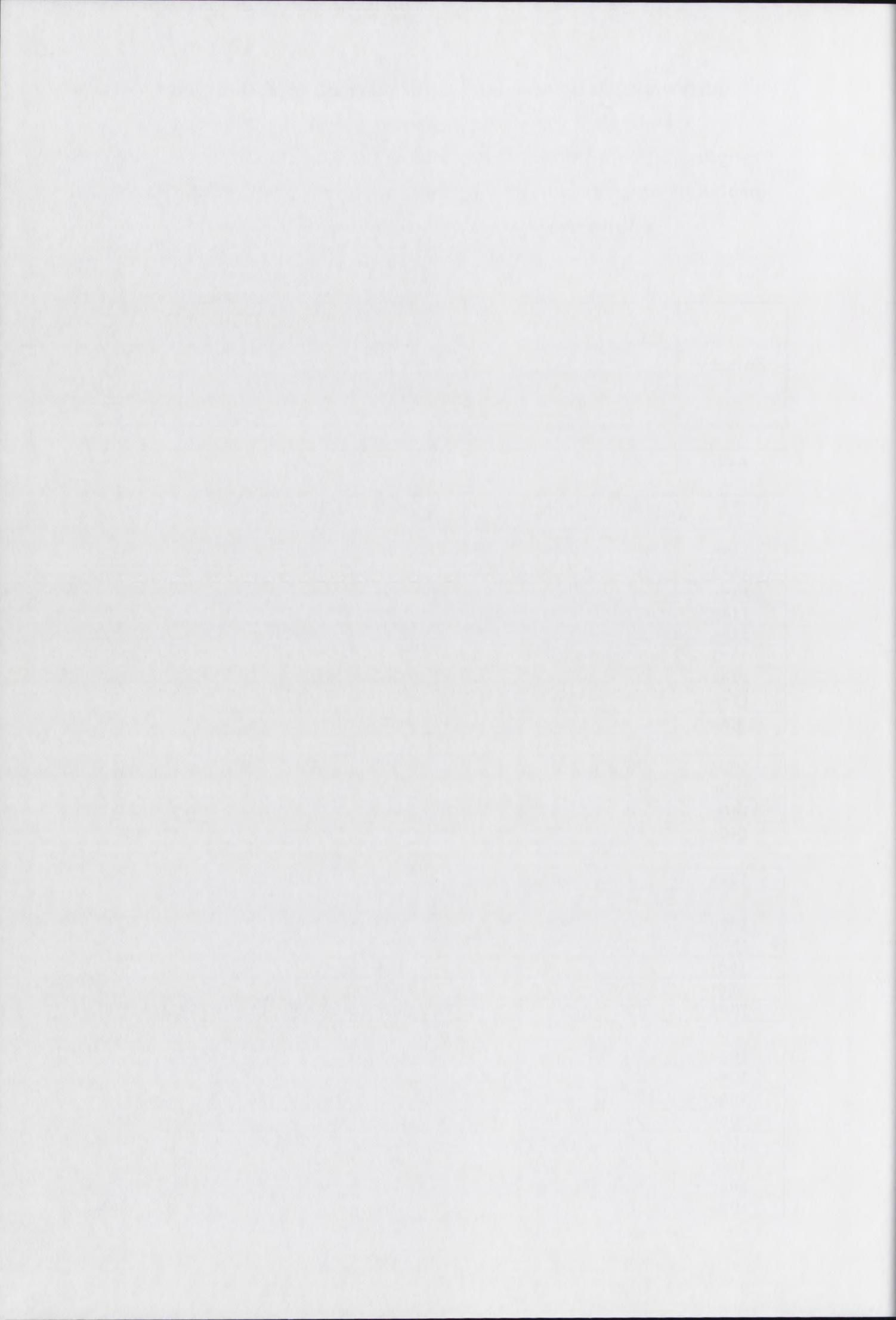
Związek	CC ₅₀	
	MT-4	wtm
A2T	50	0.01
9B	35	0.05
113a	45	0.04
113b	51	0.04
114a	42	0.04
114b	32	0.04
114c	30	0.04
114d	>100	0.04
115a	27	0.04
115b	67	0.04
116a-d	>100	>20
140a	45	0.01
140b	42	0.01
140c	38	0.01
140d	39	0.009
149a	24	0.01
155b	>100	0.1
155d	>100	0.2
156a	>100	0.1
156b	>100	0.1
156c	>100	0.1
105a	24	1.4
105b	25	2
105c	32	0.6
105d	24	0.04
105e	67	0.04
105f	>100	>20
105g	>100	>100
105h	>100	0.04

SUPPLEMENT



**Aktywność antywirusowa i cytotoksyczność niektórych związków
opisanych w rozprawie „Synteza i wybrane właściwości
 α -hydroksyfosfonianów nukleozydów i ich analogów, potencjalnych
proleków antywirusowych” wyznaczone przez grupę prof. P. La Colla
z Uniwersytetu w Cagliari (Monserrato, Włochy)**

Związek	CC ₅₀	EC ₅₀					SI
	MT-4	wt _{IIIb}	wt _{IIIrf}	EFV ^R	Y181C	AZT ^R	CC ₅₀ /EC ₅₀ wt _{IIIb}
AZT	50	0,01	0,02	0,01	0,02	0,2	5000
98	55	0,06	0,02	0,004	0,06	0,9	917
114a	49	0,06	0,04	0,04	0,06	1,4	817
114b	51	0,04	0,05	0,01	0,01	0,2	1275
114c	42	0,05	0,2	0,2	0,3	1,9	840
114d	32	0,04	0,04	0,01	0,01	0,2	800
114e	50	0,05	0,09	0,03	0,08	0,5	1000
114i	>100	0,03	0,04	0,01	0,01	0,2	>3333
114s	27	0,01	–	0,004	0,01	–	2700
114x	67	0,04	–	0,01	0,04	–	1675
114(ddU)	>100	>20	>20	>20	>20	>20	<5
140a	45	0,01	–	0,005	0,01	–	4500
140o	42	0,01	–	0,004	0,01	–	4200
140p	38	0,01	–	0,007	0,01	–	3800
140q	39	0,009	–	0,003	0,004	–	4333
139s	24	0,01	–	0,007	0,004	–	2400
156b	>100	0,1	0,1	0,03	0,04	0,6	>1000
156d	>100	0,4	0,4	0,1	0,09	1,4	>250
156i	>100	0,1	0,2	0,04	0,04	0,5	>1000
156j	>100	0,1	0,2	0,03	0,05	0,8	>1000
156k	>100	0,1	0,3	0,06	0,09	0,2	>1000
105a	24	1,4	1,7	0,8	1	>20	17
105b	28	2	2,7	1,4	1,7	≥20	14
105c	32	0,6	0,7	0,3	0,3	3	53
105c	24	0,04	0,04	0,02	0,04	0,3	600
105e	67	0,04	–	0,01	0,04	–	1675
105f	>100	>20	>20	>20	>20	>20	<5
105g	>100	>100	–	>100	>100	–	<1
105h	>100	0,08	0,1	0,07	0,07	>20	>1250

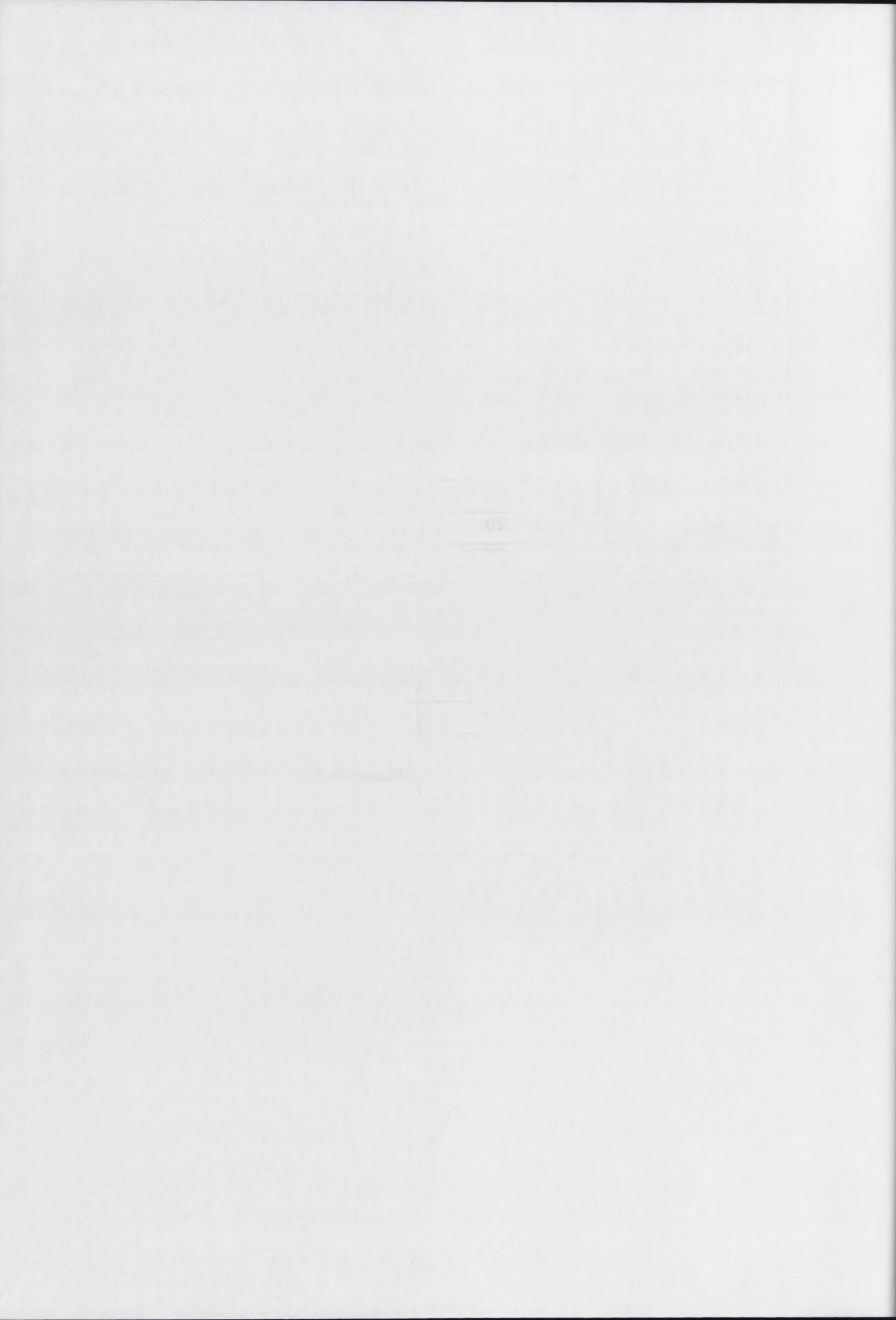


Związek	CC ₅₀	EC ₅₀					SI
	MT-4	w _{tIII B}	w _{tIII R F}	EFV ^R	Y181C	AZT ^R	CC ₅₀ /EC ₅₀ w _{tIII B}
105i	>100	0,08	0,1	0,07	0,07	>20	>1250
159b	>100	0,5	0,2	0,5	0,8	1,2	>200
159i	>100	0,4	1,6	0,4	0,5	14	>250
123b	39	>39	-	>39	>39	-	<1
123n	>100	>100	-	>100	>100	-	<1
123o	>100	>100	-	>100	>100	-	<1
123p	>100	>20	>20	>20	>20	>20	<5
123q	>100	>100	-	>100	>100	-	<1
126i	37	>20	>20	>20	>20	>20	<1,8

w_{tIII B} i w_{tIII R F} – dzikie szczepy wirusa HIV-1

EFV^R, Y181C, AZT^R – lekooporne szczepy wirusa HIV-1

CC₅₀ i EC₅₀ oznaczone zostały metodą MTT



Skład komórkowego medium hodowlanego RPMI-1640

(wg Gibco™ cell culture)

Związek	mg/l	Związek	mg/l
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	100	L-metionina	15
KCl	400	L-Fenyloalanina	15
MgSO ₄	48,84	L-Prolina	20
NaCl	6000	L-Seryna	30
Na ₂ HPO ₄	800	L-Treonina	20
D-glukoza	2000	L-Tryptofan	5
Glutation	1	L-Tyrozyna	28,94
Fenol	5	L-Walina	20
L-Arginina HCl	241,86	D-Biotyna	0,2
L-Asparagina	50	D-Pantotnian wapnia	0,25
Kwas L-asparaginowy	20	Chlorek choliny	3
L-Cystyna 2 HCl	65,15	Kwas foliowy	1
Kwas L-glutaminowy	20	Inozytol	35
L-Glutamina	300	Nikotynamid	1
Glicyna	10	Kwas p-aminobenzoesowy	1
L-Histydyna	15	Pirydoksal HCl	1
L-Hydroksyprolina	20	Ryboflawina	0,2
L-Izoleucyna	50	Tiamina HCl	1
L-Lizyna HCl	40	Witamina B ₁₂	0,005

