

Dr Tomasz Ostrowski
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
ul. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

Załącznik 3

Autoreferat

do wniosku o przeprowadzenie procedury habilitacyjnej

Tytuł cyklu prac:

„Synteza wybranych analogów nukleozydowych wykazujących
czynność biologiczną”

Poznań 2013

I IMIĘ I NAZWISKO: Tomasz Ostrowski

II POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

- a/ magister chemii
Wydział Chemii, Uniwersytet im. A.Mickiewicza w Poznaniu, 1985
promotor: prof. dr hab. Maria D.Rozwadowska
tytuł pracy magisterskiej: „Zastosowanie zmodyfikowanej kondensacji benzoinowej w syntezie pleurosperminy”
- b/ doktor nauk chemicznych
Wydział Chemii, Uniwersytet im. A.Mickiewicza w Poznaniu, 1995
promotor: prof. dr hab. Bożenna Golankiewicz
tytuł pracy doktorskiej: „Synteza analogów wyożyny i próby korelacji ich właściwości fizykochemicznych oraz biologicznych ze strukturą” (praca wyróżniona)

III ZATRUDNIENIE W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- od 1985 pracownik Zakładu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
(następnie Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu)
na stanowiskach: 1985-1988 chemik; 1988-1990 asystent;
1990-1995 starszy asystent; 1995-2007 adiunkt; od 2007 starszy specjalista

IV STAŻE ZAGRANICZNE

- 1989 staż naukowy (2 miesiące): Institute of Organic Synthesis, Latvian Academy of Sciences, Riga, Łotewska SRR, ZSRR
- 1996-1997 podoktorski staż naukowy (12 miesięcy): Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, Belgia
- 2000 podoktorski staż naukowy (6 miesięcy): Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette, Francja
- 2004-2005 podoktorski staż naukowy (6 miesięcy): Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, Belgia

V DOROBK PUBLIKACYJNY:

27 prac (w tym 21 prac w czasopismach z listy Journal Citation Reports)

a/ prace przed doktoratem – 5

b/ prace po doktoracie, składające się na cykl habilitacyjny – 12

c/ pozostałe prace po doktoracie – 10

- sumaryczny Impact Factor prac (wg roku opublikowania) – 54.651
- sumaryczny Impact Factor prac cyklu habilitacyjnego (wg roku opublikowania) – 39.635
- całkowita ilość cytowań prac – 325; ilość cytowań bez autocytowań – 289;
indeks Hirscha – 9 (dane z 1.10.2013)

Cykl habilitacyjny obejmuje 12 wybranych prac opublikowanych w czasopismach z listy JCR po doktoracie, oznaczonych symbolami [H1]-[H12].

Załącznik 8 zawiera zestawienie udziałów procentowych (moich i pozostałych współautorów) we wszystkich pracach cyklu habilitacyjnego, przygotowane na podstawie ustaleń głównych autorów i oświadczeń współautorów.

Załącznik 8 zawiera także oświadczenia współautorów prac.

VI SPIS PUBLIKACJI W CZASOPISMACH NAUKOWYCH

PRACE OPUBLIKOWANE PRZED DOKTORATEM

1. **[A1]** J.Boryski, T.Ostrowski, B.Golankiewicz
Ribosylation of 3-methylguanine and the relative stability of its
7- and 9- β -D-ribofuranosides.
Nucleosides & Nucleotides 8, 1271-1280 (1989)
IF (1989) = 0.606
2. **[A2]** B.Golankiewicz, T.Ostrowski, W.Folkman
Chemical synthesis and spontaneous glycosidic hydrolysis of 3-methyl-2'-
deoxyguanosine and 2'-deoxyxyosine.
Nucleic Acids Res. 18, 4779-4782 (1990)
IF (1990) = 3.163
3. **[A3]** B.Golankiewicz, T.Ostrowski, J.Boryski, E.De Clercq
Synthesis of acycloxyosine and acyclo-3-methylguanosine, as probes for some
chemical and biological properties resulting from the N-3 substitution of guanosine
and its analogues.
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 589-593 (1991)
IF (1991) = 1.248
4. **[A4]** B.Golankiewicz, T.Ostrowski, W.Folkman
2-Bromoxyosine and related compounds. probing the effects of simultaneous
presence of *syn* and *anti* directing substituents.
Coll. Czech. Chem. Commun. Special Issue, 56-59 (1993)
5. **[A5]** B.Golankiewicz, T.Ostrowski, G.Andrei, R.Snoeck, E.De Clercq
Tricyclic analogues of acyclovir and ganciclovir. Influence of substituents in the
heterocyclic moiety on the antiviral activity.
J. Med. Chem. 37, 3187-3190 (1994)
IF (1994) = 3.784

PRACE WCHODZĄCE W SKŁAD CYKLU HABILITACYJNEGO

6. **[H1]** B.Golankiewicz, T.Ostrowski, T.Gośliński, P.Januszczyk, J.Zeidler, D.Baranowski,
E.De Clercq
Fluorescent tricyclic analogues of acyclovir and ganciclovir. A structure – antiviral
activity study.
J. Med. Chem. 44, 4284-4287 (2001)
IF (2001) = 4.139
7. **[H2]** J.Balzarini, T.Ostrowski, T.Gośliński, E.De Clercq, B.Golankiewicz
Pronounced cytostatic activity and bystander effect of a novel series of fluorescent
tricyclic acyclovir and ganciclovir derivatives in Herpes Simplex Virus thymidine
kinase gene – transduced tumor cell lines.
Gene Therapy 9, 1173-1182 (2002)
IF (2002) = 5.616

8. **[H3]** T.Ostrowski, B.Golankiewicz, E.De Clercq, J.Balzarini
Fluorosubstitution and 7-alkylation as prospective modifications of biologically active 6-aryl derivatives of tricyclic acyclovir and ganciclovir analogues.
Bioorg. Med. Chem. 13, 2089-2096 (2005)
IF (2005) = 2.286

9. **[H4]** T.Ostrowski, B.Golankiewicz, E.De Clercq, J.Balzarini
Synthesis and biological activity of tricyclic analogues of 9- $\{[cis-1',2'$ -bis(hydroxymethyl)cycloprop-1'-yl]methyl\}guanine.
Bioorg. Med. Chem. 14, 3535-3542 (2006)
IF (2006) = 2.624

10. **[H5]** B.Golankiewicz, T.Ostrowski
Tricyclic nucleoside analogues as antiherpes agents.
Antiviral Res. 71, 134-140 (2006)
IF (2006) = 2.878

11. **[H6]** T.Ostrowski, B.Golankiewicz, E.De Clercq, G.Andrei, R.Snoeck
Synthesis and anti-VZV activity of 6-heteroaryl derivatives of tricyclic acyclovir and 9- $\{[cis-1',2'$ -bis(hydroxymethyl)cycloprop-1'-yl]methyl\}guanine analogues.
Eur. J. Med. Chem. 44, 3313-3317 (2009)
IF (2009) = 3.269

12. **[H7]** T.Ostrowski, J.Zeidler, T.Gośliński and B.Golankiewicz
Substituent-directed aralkylation and alkylation reactions of the tricyclic analogues of acyclovir and guanosine.
Nucleosides, Nucleotides & Nucl. Acids 19, 1911-1929 (2000)
IF (2000) = 0.622

13. **[H8]** T.Ostrowski, B.Wroblowski, R.Busson, J.Rozenski, E.De Clercq, M.S.Bennett, J.N.Champness, W.C.Summers, M.R.Sanderson, P.Herdewijn
5-Substituted pyrimidines with a 1,5-anhydro-2,3-dideoxy-D-arabino-hexitol moiety at N-1: synthesis, antiviral activity, conformational analysis and interaction with viral thymidine kinase.
J. Med. Chem. 41, 4343-4353 (1998)
IF (1998) = 3.739

14. **[H9]** J.N.Champness, M.S.Bennett, F.Wien, R.Visse, W.C.Summers, P.Herdewijn, E.De Clercq, T.Ostrowski, R.L.Jarvest, M.R.Sanderson
Exploring the active site of Herpes Simplex Virus type-1 thymidine kinase by X-ray crystallography of complexes with acyclovir and other ligands.
Proteins: Structure, Function, and Genetics 32, 350-361 (1998)
IF (1998) = 3.346

15. **[H10]** T.Ostrowski, J.-C.Maurizot, M.-T.Adeline, J.-L.Fourrey, P.Clivio
Sugar conformation effects on the photochemistry of thymidylyl(3'-5')thymidine.
J. Org. Chem. 68, 6502-6510 (2003)
IF (2003) = 3.297

16. **[H11]** P. Van de Vijver, T. Ostrowski, B. Sproat, J. Goebels, O. Rutgeerts, A. Van Aerschot, M. Waer, P. Herdewijn
Aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as potent and synergistic immunosuppressants.
J. Med. Chem. 51, 3020-3029 (2008)

IF (2008) = 4.898

17. **[H12]** T. Ostrowski, P. Januszczyk, M. Cieślak, J. Kaźmierczak-Barańska, B. Nawrot, E. Bartoszak-Adamska, J. Zeidler
5-Ethynyl-1- β -D-ribofuranosyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid amide (ETCAR) and its analogues: synthesis and cytotoxic properties.
Bioorg. Med. Chem. 19, 4386-4398 (2011)

IF (2011) = 2.921

POZOSTAŁE PRACE OPUBLIKOWANE PO DOKTORACIE W CZASOPISMACH Z LISTY
JOURNAL CITATION REPORTS

18. **[B1]** J. Boryski, T. Ostrowski, D. Baranowski, T. Gośliński, B. Golankiewicz
Oxidative cleavage of the tricyclic derivatives of 9-substituted guanines.
Coll. Czech. Chem. Commun. 61, Special Issue, S 38-41 (1996)

IF (1996) = 0.549

19. **[B2]** T. Ostrowski, J. Zeidler, T. Gośliński, B. Golankiewicz
A convenient approach to N-3 alkylation of 9-substituted guanines.
Nucleosides & Nucleotides 18, 565-566 (1999)

IF (1999) = 0.798

20. **[B3]** B. Hladoń, T. Gośliński, H. Laskowska, D. Baranowski, T. Ostrowski, J. Zeidler, P. Ruszkowski, B. Golankiewicz
In vitro cytostatic activity of 8-substituted and tricyclic analogues of acyclovir.
Pol. J. Pharmacol. 54, 45-53 (2002)

IF (2002) = 0.684

21. **[B4]** G. Wenska, J. Koput, M. Insinska-Rak, B. Golankiewicz, T. Goslinski, T. Ostrowski
Spectral and photophysical properties of some imidazo[1,2-*a*]purine derivatives related to acyclovir.
J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry 163, 171-180 (2004)

IF (2004) = 2.235

22. **[B5]** B. Golankiewicz, T. Ostrowski, P. Leonard, F. Seela
The thermal N⁹/N⁷ isomerization of N²-acylated 2'-deoxyguanosine derivatives in the melt and in solution.
Helv. Chim. Acta 85, 388-398 (2002)

IF (2002) = 1.949

PRACE OPUBLIKOWANE PO DOKTORACIE W CZASOPISMACH SPOZA LISTY JCR

23. **[C1]** T. Ostrowski, J. Nowotna, B. Golankiewicz
Herpesvirus - encoded thymidine kinase in chemotherapy (review).
Postępy Biochemii 41, 342-347 (1995)

24. **[C2]** P.Leonard, T.Ostrowski, B.Golankiewicz, F.Seela
The isomerization of 2'-deoxyguanosine and the incorporation of guanine N⁷-2'-deoxy-β-D-ribonucleoside) into oligonucleotide duplexes.
Collection Symposium Series (A.Holý and M.Hocek, Eds.), Vol. 2, 324-327 (1999)
25. **[C3]** T.Ostrowski, J.Zeidler, T.Gośliński, B.Golankiewicz
Aralkylation reactions of 3,9-dihydro-3-R¹-6-R²-9-oxo-5*H*-imidazo[1,2-*a*]purines directed by substituents in 3 and 6 positions.
Collection Symposium Series (A.Holý and M.Hocek, Eds.), Vol. 2, 237-241 (1999)
26. **[C4]** T.Ostrowski, J.Zeidler
Synthesis of 5-ethynyl-1-β-D-ribofuranosyl-1*H*-[1,2,3]triazole-4-carboxylic acid amide (isosteric to EICAR) and its derivatives.
Nucl. Acids Symp. Series 52, 585-586 (2008)
27. **[C5]** A.Krajczyk, K.Kulińska, T.Kuliński, B.L.Hurst, C.W.Day, D.F.Smee, T.Ostrowski, P.Januszczyk, J.Zeidler
Antivirally active ribavirin analogues – 4,5-disubstituted 1,2,3-triazole nucleosides: biological evaluation against certain respiratory viruses and computational modeling.
Antivir. Chem. Chemother. – praca przyjęta do druku (2013);
DOI: 10.3851/IMP2564

VII OMÓWIENIE NAJWAŻNIEJSZYCH OSIĄGNIĘĆ ZAWARTYCH W PRACACH PRZEDSTAWIONYCH DO HABILITACJI

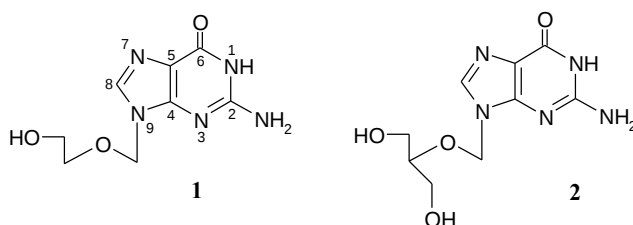
„Synteza wybranych analogów nukleozydowych wykazujących czynność biologiczną”

1. TRICYKLICZNE ANALOGI ACYKLOWIRU, GANCYKLOWIRU ORAZ A-5021

1.1. WPROWADZENIE – PRACA **[A5]**

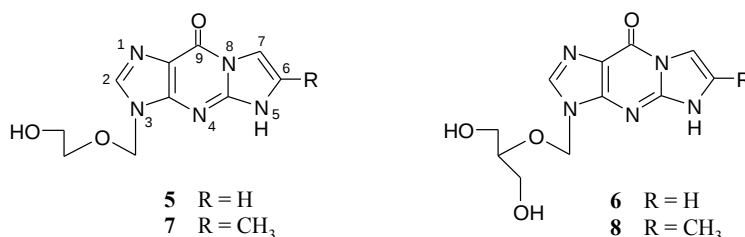
Najważniejszym praktycznym zastosowaniem modyfikowanych nukleozydów jest wykorzystanie ich w chemioterapii. Wśród nukleozydowych środków przeciwwirusowych szczególne miejsce zajmuje acyklowir tj. 9-[(2-hydroksyetoksy)metylo]guanina (ACV, **1**), analog guanozyny, w cząsteczce którego rybozę zastąpiono acyklicznym pseudocukrem. Silna aktywność tego związku przeciwko wirusom z rodziny *Herpesviridae*, jak też mechanizm jego działania, odkryte zostały przez G.Elion i jej współpracowników pod koniec lat 70. ubiegłego wieku.^{1,2} Acyklowir wyróżnia się wyjątkową selektywnością, którą zawdzięcza temu, że nie stanowi substratu dla komórkowej kinazy, a może być jedynie specyficznie fosforylowany w zainfekowanych komórkach przez kinazę tymidynową (TK) herpeswirusów. Powstający monofosforan jest następnie przeprowadzany przez enzymy komórkowe w formę trifosforanową, która w sposób kompetycyjny wobec trifosforanu 2'-deoksyguanozyny

oddziałuje z kolejnym wirusowym enzymem, polimerazą DNA, mając do niej większe powinowactwo niż do komórkowych polimeraz. Włączenie ACV do DNA herpeswirusa powoduje zatrzymanie syntezy łańcucha. Acyklowir (jako lek znany pod nazwą Zovirax[®]), podobnie jak jego doustny prolek, ester L-walinowy (walacyklowir, Zelitrex[®], Valtrex[®]), stosowane są przeciwko infekcjom wywoływanym przez wirusy *Herpes Simplex* typ 1 i 2 (HSV-1 i HSV-2) oraz *Varicella-Zoster* (VZV).^{3,4} Strukturalnie pokrewny w stosunku do acyklowiru jest gancyklowir, 9-[(1,3-dihydroksy-2-propoksy)metylo]guanina (GCV, DHPG, 2). Pomimo swojej wysokiej aktywności przeciwko HSV-1, HSV-2 i VZV, z powodu obserwowanych niepożądanych efektów ubocznych, gancyklowir (Cymevene[®], Cytovene[®]) i jego prolek (walgancyklowir, Valcyte[®]) stosowane są jedynie w przypadkach zakażeń wirusem cytomegalii (HCMV) u osób o obniżonej wydolności układu odpornościowego.²⁻⁴



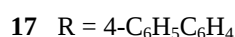
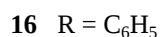
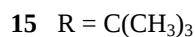
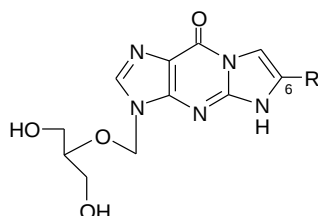
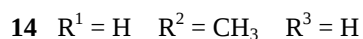
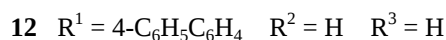
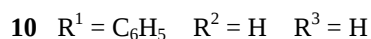
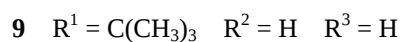
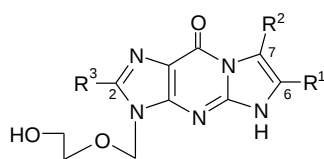
Początkowe próby modyfikacji zasady heterocyklicznej acyklowiru sugerowały, że enzymy wirusowe tego typu zmian nie tolerują.^{5,6} Włączając się do tych badań, w kierowanej przez prof. dr hab. Bożennę Golankiewicz Pracowni Chemii Nukleozydów Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN przeprowadzono na przełomie lat 80. i 90. syntezę kilku N-podstawionych analogów acyklowiru, które poddane zostały następnie testom w Laboratorium Wirusologii i Chemioterapii Katedry Mikrobiologii i Immunologii, Katholieke Universiteit Leuven w Belgii (prof. Erik De Clercq). Wyniki testów pokazały, że zablokowanie grupą metylową odpowiednich atomów azotu w cząsteczce ACV pozwala na modulowanie jego właściwości. Usytuowanie podstawnika metylowego w położeniu N1 prowadzi do związku wykazującego znaczącą czynność przeciwko herpeswirusom, podczas gdy podstawienie grupy egzoaminowej (C2-NH₂) praktycznie pozbawia acyklowir aktywności.⁷ Stwierdzono ponadto, że całkowicie nieaktywne są także otrzymane przeze mnie dwa związki, 3-metyloacyklowir (3) i zawierająca 3-metyloacyklowir jako element strukturalny acyklowyozyna (4). Synteza oraz aktywność związków 3 i 4 przedstawione zostały w pracy [A3], a w niniejszym autoreferacie wspominam o nich w rozdziale nt. dorobku przed doktoratem, str. 36. Uzyskane w testach przeciwwirusowych dane pozwoliły na uszeregowanie poszczególnych centrów azotowych acyklowiru pod kątem ich znaczenia dla aktywności: N3 ≥ N² > N7 > N1.

Jednocześnie wykazano, że przekształcenie **1** i **2** w tricykliczne związki, pochodne 3,9-dihydro-9-okso-5*H*-imidazo[1,2-*a*]puryny (1,*N*²-etenocyklowir, TACV, **5** oraz 1,*N*²-etenogancyklowir, TGCV, **6**), powoduje od 100- do ponad 1000-krotne obniżenie aktywności przeciwko HSV-1, HSV-2, VZV i HCMV.⁸ Z kolei wprowadzenie dodatkowego podstawnika metylowego w położeniu 6 w dobudowanym pierścieniu potęguje aktywność w stosunku do TACV i TGCV: 6-Me-TACV (**7**) wykazywał aktywność od 10- do 100-krotnie niższą od ACV (w zależności od szczepu wirusa i rodzaju komórek), a 6-Me-TGCV (**8**) był jedynie ok. 10 razy mniej aktywny od GCV.^{7,8}



Biorąc powyższe pod uwagę, zaprojektowaliśmy serię tricyklicznych analogów ACV i GCV, na którą składało się 7 związków zawierających w położeniu 6 podstawnik inny niż metylowy, jeden związek 2,6-dipodstawiony i jeden związek 7-podstawiony. Przeprowadzona w pełni przeze mnie ich synteza, a także wyniki wykonanych w laboratorium prof. E.De Clercq'a testów biologicznych, zostały przedstawione w 1994 r. w publikacji **[A5]**. Praca ta nie może być uwzględniona w cyklu habilitacyjnym ze względu na fakt, że zawarty w niej materiał znalazł się w rozprawie doktorskiej. Chciałbym jednak podkreślić, że stanowiła ona punkt zwrotny na mojej drodze naukowej, gdyż zapoczątkowała dla mnie nową tematykę badawczą. Efektem realizacji tej tematyki jest kolejnych 11 prac, z których 7 (prace **[H1]**-**[H7]**) stanowi rdzeń zgłoszonego i omówionego poniżej cyklu habilitacyjnego.

Związki **9-17** otrzymałem w wyniku reakcji acyklowiru, gancyklowiru lub 8-bromoacyklowiru z odpowiednimi bromoketonami w obecności wodoru sodu, według opracowanej wcześniej metody dla reakcji z bromoacetonem.⁷ W syntezie 7-podstawionego izomeru 6-Me-TACV (związek 7-Me-TACV, **14**), osiągnąłem 3-krotnie wyższą wydajność kondensacji ACV z α -bromopropionaldehydem, w zestawieniu z opisaną analogiczną reakcją, w której substratem była guanozyna.⁹ Stało się to możliwe dzięki czystości ww. reagenta, uzyskanego przeze mnie w reakcji bromowania aldehydu propionowego kompleksem brom-dioksan. Zsyntetyzowane związki przygotowałem w postaci analitycznie czystej, z przeznaczeniem do testów biologicznych.



Badania przeprowadzone w Leuven potwierdziły, że podstawienie w utworzonym trzecim pierścieniu potęguje aktywność przeciwko herpeswirusom związków TACV i TGCV. Efekt ten jest zależny od: a/ położenia i typu podstawnika; b/ szczepu wirusowego; c/ rodzaju pseudocukru w położeniu 3. I tak, w przypadku związków z podstawnikiem metylowym, 6-Me-TACV (**7**) zasadniczo wykazuje zbliżoną lub wyższą aktywność w stosunku do 7-Me-TACV (**14**), a jedynie względem jednego szczepu 7-Me-TACV jest wyraźnie aktywniejszy. Wprowadzenie w położeniu 2 podstawnika bromowego (związek **13**) redukuje aktywność 6-Me-TACV o 1 lub 2 rzędy wielkości. Zastąpienie podstawnika 6-metylowego grupą *tert*-butylową powoduje obniżenie aktywności względem HSV-1 i HSV-2 oraz wzrost aktywności względem VZV dla pary 6-Me-TACV (**7**) i 6-*t*Bu-TACV (**9**). W przypadku analogów GCV (**8** i **15**), 6-podstawnik metylowy jest dla czynności przeciwwirusowej korzystniejszy niż *tert*-butylowy względem każdego z testowanych szczepów.

Największy wzrost aktywności względem HSV-1, HSV-2 i VZV spowodowało podstawienie pozycji 6 grupą fenyłową. Wyznaczone w $\mu\text{g/mL}$ wartości minimalnego stężenia inhibitorowego (MIC) dla 6-Ph-TACV (**10**) są w przypadku 6 z 8 użytych szczepów tylko 3-20 razy słabsze od wartości dla macierzystego ACV, podczas gdy 6-Ph-TGCV (**16**) praktycznie dorównuje aktywnością GCV. Związki **10** i **16** są ponadto fluoryzujące, a określona przeze mnie na podstawie wykonanych widm wydajność kwantowa ich fluorescencji w H_2O (względem 2-aminopuryny jako wzorca) wynosi 8-12 %. Powyższa właściwość pozwalałaby, w razie zastosowania 6-fenyłowych związków w eksperymentach *in vivo*, na monitorowanie ich (lub ich metabolitów) przy niskich stężeniach w tkankach i płynach ustrojowych.

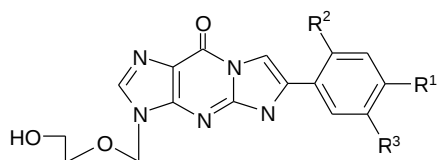
1.2. PRACE [H1]-[H7]

Spośród tricyklicznych analogów acyklowiru i gancyklowiru z początkowych serii, 6-Ph-TACV (**10**) i 6-Ph-TGCV (**16**) okazały się najbardziej obiecujące ze względu na korzystną kombinację ich znaczącej aktywności przeciwko herpeswirusom i fluorescencji. Wybraliśmy je zatem jako związki liderowe w syntezie dalszych analogów, pod kątem badania wpływu modyfikacji strukturalnych na właściwości biologiczne i fizykochemiczne. Celem tych badań było znalezienie związków potencjalnie przydatnych w terapii lub diagnostyce.

Przygotowaliśmy i skierowaliśmy do badań przeciwwirusowych w Leuven (prof. E.De Clercq) serię 22 związków, która zawierała 16 nowych, nie opisanych do tej pory pochodnych (praca [H1]). Na tę liczbę składało się 10 związków zsyntetyzowanych przeze mnie, w tym 9 nowych. Pochodne, które otrzymałem to analogi 6-Ph-TACV (**10**), podstawione w różnych położeniach pierścienia fenyłowego (związki **18-23**), zawierające grupę 6-naftylową (**24**, **25**) oraz N5,6- lub 6,7-dipodstawione (**26**, **27**). Ich synteza (z wyjątkiem związku **26**) polegała na reakcji alkilowania-kondensacji acyklowiru z 2-bromoketonami w obecności wodoru sodu. Można założyć, że deprotonacja 9-podstawionej guaniny skutkuje delokalizacją powstałego ładunku ujemnego, tym samym uaktywniając dwa centra nukleofilowe cząsteczki, N1 i O⁶. Standardowo, atom C2 bromoketonu podstawia się w położeniu N1 guaniny, po czym następuje zamknięcie pierścienia z udziałem jej grupy egzoaminowej oraz drugiego centrum elektrofilowego bromoketonu. Możliwy jest także inny mechanizm, co ilustruje wynik reakcji acyklowiru z 2-bromopropiofenonem. Obok spodziewanego produktu tricyklicznego **27** otrzymałem w niej produkt uboczny O⁶-podstawiony: w pracy [H1] zidentyfikowany mylnie jako N1-podstawiony, co skorygowano w publikacji [H3] (Schemat I, str.13). Związek **26** otrzymałem na drodze benzyłowania **10** (praca [H7]). Czystość związków **18-27** (praca [H1]), podobnie jak wszystkich innych tricyklicznych pochodnych przekazywanych przeze mnie do badań biologicznych (publikacje [A3], [A5], [H2]-[H5]) została potwierdzona przy pomocy spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz analizy elementarnej.

Fluoryzujący związek 6-(4-MeOPh)-TACV (**18**), różniący się od 6-Ph-TACV (**10**) obecnością podstawnika metoksyłowego w położeniu 4 grupy fenyłowej, okazał się bardziej aktywny wobec HSV-1 i HSV-2 niż 6-Ph-TACV. Wartość MIC związku **18**, jeśli podana w µg/mL, jest porównywalna z tą dla macierzystego acyklowiru. Po przeliczeniu na µM jest nawet wobec większości szczepów 2-7 razy lepsza niż w przypadku acyklowiru. Takie same, bardzo korzystne wyniki uzyskano dla związku dipodstawionego, 6-Phe-7-Me-TACV (**27**).

Analogi związku **18**, zawierające podstawnik metoksyowy usytuowany w położeniu 2 lub 3 pierścienia fenyłowego (**19**, **20**), jak też zawierające dwa takie podstawniki (**21**, **22**), okazały się zdecydowanie mniej aktywne i bardziej cytotoksyczne. Podobny spadek aktywności i selektywności działania stwierdzono dla związku zawierającego w pierścieniu fenyłowym grupę 4-nitrową (**23**). Kluczowa dla aktywności jest dostępność centrum azotowego N5, jego zablokowanie (związek **26**) powoduje zniwelowanie czynności przeciwwirusowej 6-Ph-TACV. Najbardziej fluoryzującymi z badanej serii były słabo aktywny analog 6-naftyłowy (**24**) i jego pochodna posiadająca zablokowaną grupę hydroksylową (**25**). Kompletny brak aktywności tego ostatniego związku jest zrozumiały w kontekście wymogu fosforylacji dla osiągnięcia aktywności przez acyklowir i jego analogi. Wszystkie omawiane w pracy [H1] związki były nieaktywne lub słabo aktywne wobec szczepu HSV-1 pozbawionego kinazy tymidynowej (HSV-1 TK⁻).



18 R¹ = CH₃O R² = H R³ = H

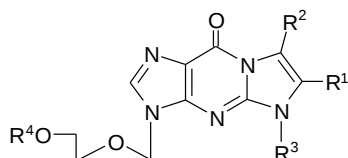
19 R¹ = H R² = CH₃O R³ = H

20 R¹ = H R² = H R³ = CH₃O

21 R¹ = CH₃O R² = CH₃O R³ = H

22 R¹ = H R² = CH₃O R³ = CH₃O

23 R¹ = NO₂ R² = H R³ = H



24 R¹ = naftyl R² = H R³ = H R⁴ = H

25 R¹ = naftyl R² = H R³ = H R⁴ = Ac

26 R¹ = C₆H₅ R² = H R³ = C₆H₅CH₂ R⁴ = H

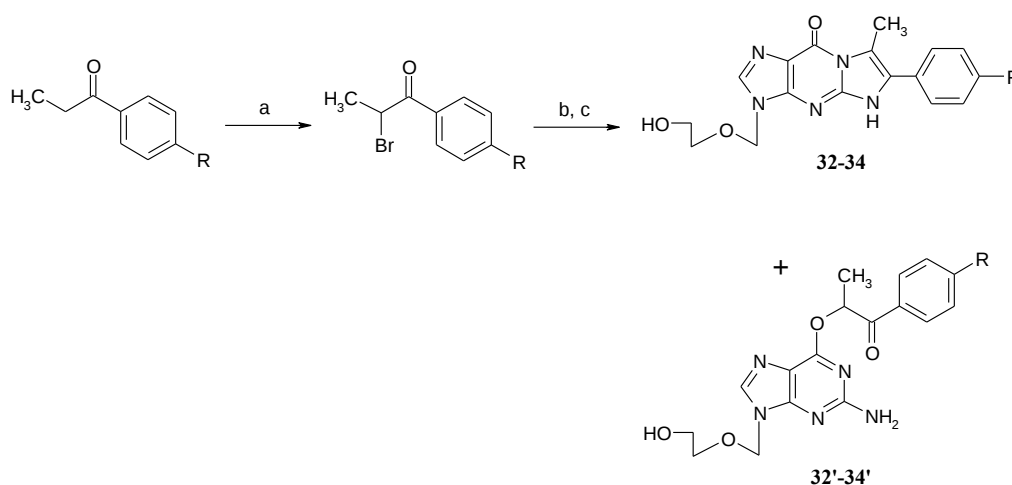
27 R¹ = C₆H₅ R² = CH₃ R³ = H R⁴ = H

Acyklowir, a przede wszystkim gancyklowir, znalazły zastosowanie jako proleki w terapii genowo-chemicznej nowotworów, zwanej też terapią genu samobójczego (*suicide gene therapy*) lub GDEPT (*Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy*).^{10,11} Metoda ta polega na wprowadzeniu do komórek nowotworowych genu kodującego enzym, który przekształca nieszkodliwy wobec tych komórek prolek w toksyczny lek. Układ gen kinazy tymidynowej HSV/gancyklowir stosuje się z powodzeniem w eksperymentach prowadzonych na modelach zwierzęcych, a w ostatnich latach opisano także szereg badań klinicznych z jego udziałem. Skuteczność działania gancyklowiru wynika m.in. z faktu, że jego monofosforan (GCVMP) ma zdolność do przenikania z transformowanych komórek, przez połączenia szczelinowe, do sąsiednich komórek rakowych („efekt sąsiada”, „*bystander effect*”).

W ramach poszukiwania nowych terapeutyków dla metody GDEPT, tricykliczne analogi ACV i GCV z naszej Pracowni poddane zostały przez prof. Jana Balzariniego z Laboratorium Wirusologii i Chemioterapii KU Leuven testom na aktywność cytostatyczną wobec komórek ludzkiego mięsaka kości (OST) i mysiego nowotworu sutka (FM3A), transdukowanych genem HSV-1 TK. Wśród związków dostarczonych przez nas do badań było m.in. 7 analogów ACV zsyntetyzowanych przeze mnie wcześniej (opisanych w pracach **[A5]** i **[H1]**). Przygotowanie odpowiednich analitycznie czystych próbek tych związków stanowiło mój wkład realizację tego projektu, zwieńczonego publikacją **[H2]**. Analogicznie jak w przypadku ACV i GCV, korzystne wyniki otrzymano w badaniach na komórkach OST TK⁻/HSV-1 TK⁺. Tricykliczne związki wykazały się w nich aktywnością cytostatyczną, w niektórych przypadkach dorównującą aktywności odpowiednich związków macierzystych, i „efektem sąsiada”. Dla całej serii związków stwierdzono korelację pomiędzy aktywnościami przeciwwirusową i cytostatyczną. Spośród dostarczonych przeze mnie pochodnych, 6-Ph-TACV (**10**), 6-(4-MeOPh)-TACV (**18**) i 6-Ph-7-Me-TACV (**27**) były tylko 2-6 razy mniej cytostatyczne od macierzystego ACV. Obecność kinazy tymidynowej okazała się niezbędna dla fosforylacji tricyklicznych związków, ponieważ nie odnotowano ich działania na komórki pozbawione tego enzymu (OST TK⁻). Nie zmienia tego fakt, że modelowanie komputerowe uwidocznilo trudności z wpasowaniem w kieszeń substratową TK trzeciego pierścienia aglikonu, a w szczególności aromatycznego 6-podstawnika. Zamieszczone w pracy **[H2]** dane, dotyczące inhibicji fosforylacji znakowanej tymidyny, wskazują na pewien spadek powinowactwa HSV-1 TK wobec badanych związków, w zestawieniu z powinowactwem wobec ACV i GCV. Fosforylację tricyklicznych pochodnych (m.in. **27**) przez wirusową TK udowodniono jednak dodatkowo w osobnym eksperymencie, w którym uległy one konwersji do trifosforanów w obecności HSV-1 TK, kinazy GMP i kinazy NDP.

W pracy **[H2]** opisano lipofilność tricyklicznych analogów ACV i GCV w oparciu o pomiar czasów retencji metodą HPLC oraz przez określenie współczynnika podziału pomiędzy n-oktanol i wodę (P). Wyniki, które są zbieżne z podanymi niezależnie przez prof. W.Zielenkiewicza,¹² wskazują na znaczny wzrost lipofilności wszystkich tricyklicznych pochodnych, w stosunku do ACV i GCV. W przypadku pochodnych 6-arylowych **18**, **21** i **27**, wartość P była o 2-3 rzędy wielkości wyższa niż dla ACV. Właściwość ta może potencjalnie ułatwiać przenikanie omawianych związków przez błony komórkowe, w tym wchłanianie z układu pokarmowego oraz przekraczanie bariery krew – mózg.

Kontynuując badanie wpływu zmian strukturalnych na czynność biologiczną w obrębie interesującej nas klasy związków, przeprowadziłem syntezę 9 nowych pochodnych zawierających fluor w części zasadowej lub/i 6,7-dipodstawionych (praca [H3]). Synteza 7 z nich (**28-34**) oparta była na reakcji alkilowania-kondensacji acyklowiru lub gancyklowiru z 4'-podstawionymi 2-bromoacetofenonami lub 2-bromopropiofenonami. Reagenty te (4 na 5 użytych) otrzymałem, działając na odpowiednie ketony bromem w obecności chlorku glinu.¹³ W wyniku reakcji ACV z 2-bromopropiofenonami wyizolowałem, oprócz produktów **32-34**, O⁶-podstawione pochodne bicykliczne **32'-34'** (Schemat I). 7-Arylalkilo-6-fenylowe związki **35** i **36** powstały z kolei na drodze aralkilowania 6-Ph-TACV (**10**). Dotychczas w wyniku benzylowania **10** uzyskiwałem, jako główny, produkt N5-podstawiony oraz ponadto mniejsze ilości jego izomeru N4 i pochodnej N5,C7-dibenzyłowej (praca [H7], str. 19). Dzięki zmianie użytego rozpuszczalnika udało się otrzymać w reakcji **10** z bromkiem benzyłu (lub 4-fluorobenzyłu), obok trzech produktów wymienionych powyżej, związek C7-podstawiony **35** (lub **36**). Wydajności wyizolowanych produktów aralkilowania były zróżnicowane, zależnie od warunków reakcji (w przypadku produktów **35** i **36**: 11-25 %).

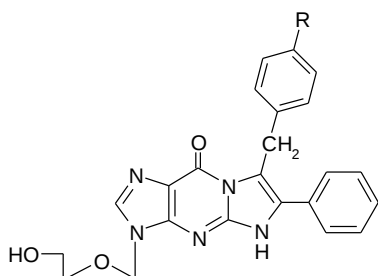
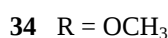
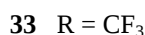
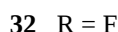
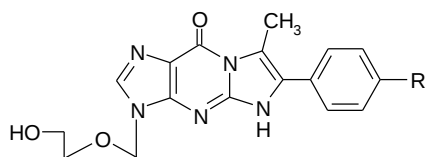
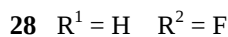
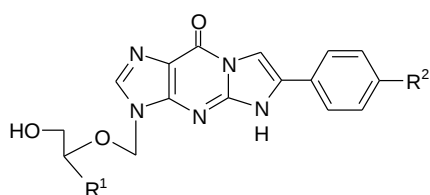


Schemat I. Reagenty: (a) Br₂, AlCl₃, THF; (b) ACV, NaH, DMF; (c) NH₄OH

Testy wykonane w laboratorium w Leuven wykazały, że wprowadzenie fluoru lub grupy trifluorometylowej w położenie 4 pierścienia fenyłowego 6-Ph-TACV, 6-Ph-TGCV lub 6-Ph-7-Me-TACV niekorzystnie wpływa na aktywność przeciwko HSV-1 i HSV-2. Zestawione w pracy [H3] minimalne stężenia inhibitorowe (MIC) związków **28-33** były o 1-3 rzędy wielkości wyższe niż dla odpowiednich bicyklicznych wzorców, ACV lub GCV. Na tym tle wyróżniają się wartości uzyskane dla 6-(4-FPh)-7-Me-TACV (**32**) wobec 3 szczepów HSV-1 i 1 szczepu HSV-2, najwyżej 3-krotnie gorsze niż w przypadku ACV. Aktywności

bardzo zbliżone do **32** wobec poszczególnych szczepów wirusowych przejawia 6-(4-MeOPh)-7-Me-TACV (**34**). W odróżnieniu od 6-Ph-7-Me-TACV, jego analogi 7-aralkilowe (**35** i **36**) są całkowicie pozbawione aktywności przeciwwirusowej. Wszystkie omawiane w pracy [**H3**] związki były nieaktywne wobec szczepu HSV-1 TK⁻.

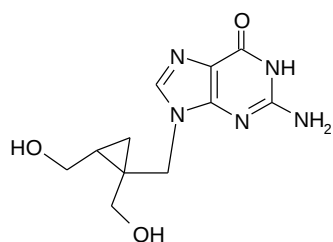
Stwierdzono, że fluoropodstawienie nie ma negatywnego wpływu na cytostatyczność w eksperymentach z użyciem komórek rakowych transdukowanych genem HSV-1 TK (praca [**H3**]). Także pod tym względem, najciekawsze z badanej serii wydają się być 6-(4-FPh)-7-Me-TACV (**32**) i 6-(4-MeOPh)-7-Me-TACV (**34**). Są one nawet bardziej cytostatyczne niż ACV i charakteryzują się korzystniejszym niż ACV indeksem selektywności.



Związki **29**, **31** i **32**, ze względu na obecny w ich cząsteczkach podstawnik fluorowy, mogłyby okazać się przydatne w badaniach oddziaływań z enzymem w oparciu o spektroskopię ¹⁹F NMR. Metoda ta jest również wygodnym narzędziem do identyfikacji oraz monitorowania *in vitro* (i nieinwazyjnie *in vivo*) metabolitów leków fluoropirymidynowych.¹⁴ Jeśli chodzi o acykliczne analogi purynowe, to dotychczas w tym celu wykorzystany został jedynie 8-fluoroacyklowir, skuteczny i selektywny prolek-cytostatyk w eksperymentach GDEPT.¹⁵ Warto nadmienić, że na bazie opisanego w publikacji [**A5**] 6-Ph-TGCV (**16**) przeprowadzono syntezę radioizotopowo znakowanego substratu kinazy tymidynowej, pod kątem obrazowania jej ekspresji metodą pozytonowej tomografii emisyjnej (PET).¹⁶

Trwają intensywne prace nad znalezieniem nowych przeciwherpetycznych związków typu nukleozydowego. Mając na uwadze sukces trzech dopuszczonych do stosowania w leczeniu (wraz z ich prolekami) acyklicznych analogów guanozyny tzn. acyklowiru (**1**), gancyklowiru (**2**) i pencyklowiru, zsyntetyzowano w latach 90. kolejne pochodne, różniące się od ww. fragmentem pseudocukrowym.^{2,17} Jednym z karbocyklicznych analogów, które wzbudzają spore zainteresowanie jest opisana przez japońskich badaczy z Ajinomoto Co., Inc. 9- $\{[cis-1',2']\text{-bis(hydroksymetylo)cykloprop-1'-ylo]metylo}\}$ guanina (**37**), a zwłaszcza jej enancjomer 1'S,2'R (A-5021, **37a**). Już wstępne testy wykazały, że **37a** przejawia wyjątkowo silną aktywność względem HSV-1.¹⁸ Bardziej dogłębne badania, przeprowadzone na różnych szczepach herpetowirusów i z użyciem różnych rodzajów ludzkich komórek, pozwoliły na stwierdzenie, że A-5021 jest o 1 lub 2 rzędy wielkości bardziej aktywny niż acyklowir wobec HSV-1 oraz kilka razy bardziej aktywny niż acyklowir wobec HSV-2 i VZV.¹⁹ Indeks selektywności **37a** jest wyższy niż w przypadku ACV względem HSV-1 i podobny jak w przypadku ACV względem HSV-2 i VZV. Ustalono, że metabolizm A-5021 w komórkach zainfekowanych przebiega w sposób analogiczny jak w przypadku acyklowiru.²⁰ Wyższa aktywność **37a** wynika z faktu, iż związek ten jest efektywniej przekształcany w trifosforan, którego wewnątrzkomórkowy czas półtrwania jest ponadto dłuższy niż czas półtrwania trifosforanu acyklowiru. Odnotowano też, że A-5021 jest bardziej efektywny niż ACV względem HSV-1 *in vivo*.²¹ Z powodzeniem zastosowano nowy związek w eksperymentach terapii genowej z użyciem komórek rakowych transdukowanych genem HSV-1 TK: A-5021 jest podobnie cytostatyczny jak gancyklowir oraz podobnie jak tamten przejawia „efekt sąsiada”.^{17,22} Co niezwykle ważne, A-5021 jest mniej toksyczny niż gancyklowir wobec ludzkiego szpiku kostnego.²²

Zgodnie z sugestią wyrażoną przez prof. E.De Clercq'a, podjąłem próbę połączenia niezwykle obiecującej aktywności biologicznej 9- $\{[cis-1',2']\text{-bis(hydroksymetylo)cykloprop-1'-ylo]metylo}\}$ guaniny z korzystnymi właściwościami 6-podstawionego układu 1,N²-eteno-guaniny tzn. fluorescencją i lipofilnością. Zdecydowałem się zsyntetyzować tricykliczne analogi **37** (RA-5021) tj. związku w formie racemicznej, ponieważ według informacji w literaturze wykazywał on tylko 2-krotnie niższą aktywność przeciwwirusową niż **37a** (A-5021),¹⁸ natomiast jego synteza jest kilkadziesiąt razy tańsza niż synteza A-5021.

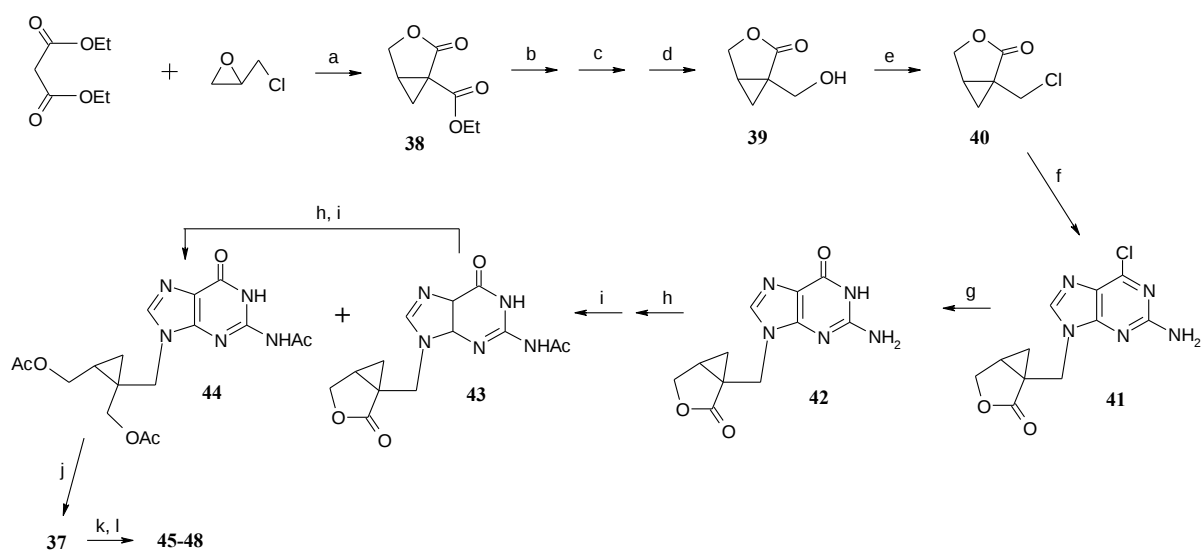


37 racemat (RA-5021)

37a 1'S,2'R (A-5021)

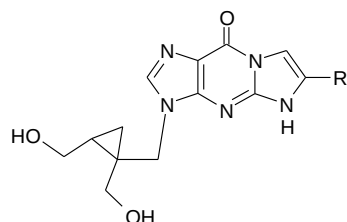
37b 1'R,2'S

Przeprowadziłem syntezę **37** na podstawie opisanej ogólnikowo przez grupę japońską procedury,^{18,23} do której wprowadziłem kilka szczegółowych rozwiązań i modyfikacji m.in. dotyczących zastosowanych rozpuszczalników, czasu i temperatury reakcji, jak również sposobu przerobu mieszanin poreakcyjnych (praca [**H4**]). W efekcie kondensacji malonianu dietylowego z racemiczną epichlorohydryną otrzymałem 1-etoksykarbonylo-2-okso-3-oksa-bicyklo[3.1.0]heksan (**38**; *Schemat II*). Lakton ten w trzech etapach przeprowadziłem w jego pochodną 1-hydroksymetylową (**39**), a w kolejnym etapie w pochodną 1-chlorometylową (**40**) działaniem chlorku mesylu tj. inaczej niż w oryginalnej pracy.²³ Poprzez kondensację **40** z 2-amino-6-chloropuryną uzyskałem nukleozyd **41**, obok niewielkiej ilości jego 7-izomeru. Przekształciłem **41** w analog guaninowy **42**, który następnie poddałem redukcji z użyciem borowodorku sodu. Obserwowałem powstanie spodziewanego produktu **37** obok drugiego związku, o którym nie wspomniano w cytowanym artykule źródłowym.²³ Całą mieszaninę poddałem acetylowaniu, po czym wyizolowałem produkty **43** i **44**. Drugą porcję trójoctanu **44** otrzymałem przez ponowną redukcję **43** i acetylowanie powstałej mieszaniny. Deprotekcja **44** przyniosła RA-5021 (**37**), który posłużył jako substrat w syntezie tricyklicznych związków: 6-metylowego (**45**), 6-etylowego (**46**), 6-fenylowego (**47**) i 6-(4-metoksyfenylowego) (**48**).



Schemat II. Reagenty: (a) bezw. EtOH; (b) NaOH, EtOH; (c) NaBH₄, 80 % aq EtOH; (d) 2N HCl; (e) MsCl, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂; (f) 2-amino-6-chloropuryna, K₂CO₃, DMF; (g) 85 % HCOOH; (h) NaBH₄, 90 % EtOH; (i) Ac₂O, pirydyna; (j) NH₄OH; (k) NaH, BrCH₂COR, DMF; (l) NH₄OH

Wyniki testów potwierdziły literaturowe doniesienie,¹⁸ że RA-5021 jest 20-krotnie bardziej aktywny niż ACV przeciwko HSV-1. Wykazuje także 5-17 razy wyższą aktywność wobec HSV-2 i VZV. Dodanie trzeciego pierścienia w części zasadowej generalnie obniża aktywność, w stopniu zależnym od typu wirusa oraz rodzaju podstawnika w położeniu 6. Redukuje też aktywność cytostatyczną w układzie OST TK⁻/HSV-1 TK⁺. Najciekawsze w serii okazały się fluoryzujące pochodne 6-Ph-T(RA-5021) i 6-(4-MeOPh)-T(RA-5021), które pod względem czynności przeciwwirusowej przewyższają kilkakrotnie ACV. Ich szczególną cechą jest specyficzna aktywność względem szczepów VZV, porównywalna z wykazywaną przez macierzysty RA-5021. Wszystkie badane związki są nieaktywne względem szczepów HSV-1 TK⁻ i VZV TK⁻, co wskazuje na decydującą rolę tego enzymu w ich fosforylacji.



45 R = CH₃

46 R = CH₃CH₂

47 R = C₆H₅

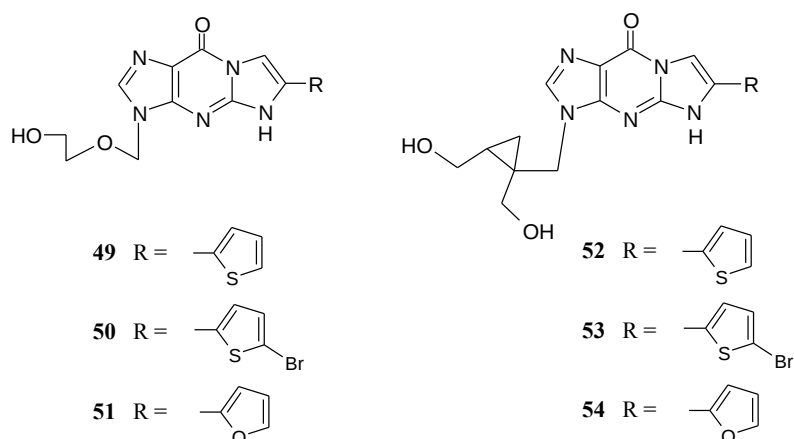
48 R = 4-CH₃OC₆H₅

W 2006 r. zostaliśmy zaproszeni do opublikowania w specjalnym numerze *Antiviral Research*, który dedykowany był prof. Erikowi De Clercq'owi, artykułu przeglądowego nt. aktywności przeciwwirusowej tricyklicznych analogów guaninowych. Zamieściliśmy w nim (praca [H5]) m.in. zbiorcze zestawienie przeliczonych na μ M wartości MIC i EC₅₀ dla wybranych, najciekawszych związków otrzymanych w naszej Pracowni. Dane te zaczerpnięte zostały z 4 oryginalnych prac omówionych powyżej ([A5], [H1], [H3], [H4]), a także z 2 innych publikacji.^{24,25} Wyniki dotyczące każdej konkretnej pochodnej przedstawiliśmy wraz z pochodzącymi z tej samej pracy danymi dla związku wzorcowego (ACV, GCV lub RA-5021). Uczyniliśmy w ten sposób ze względu na pewne różnice odnośnie aktywności wzorców, gdy testowane były poszczególne serie związków.

Pozostaje sprawą otwartą, czy aktywność związków tricyklicznych jest aktywnością ich samych, czy też wynika z rozpadu w komórkach do ich bicyklicznych prekursorów. Za pierwszą z tych opcji przemawia trwałość w roztworach wodnych, ich skuteczna fosforylacja katalizowana przez wyizolowane kinazy (praca [H2]) oraz badania kompleksu z TK przy użyciu ¹H NMR (techniką *transferred NOE*).²⁶ Dodatkowa poszlaka na rzecz tego, iż związki te nie są jedynie prolekami, wynika z naszych zestawień w pracy [H5]. Przekształcenie ACV, GCV lub RA-5021 w ich pochodne tricykliczne, zawierające określony podstawnik w

położeniu 6, w różny sposób wpływa na aktywność produktów, w zależności od tego, jaki pseudocukier jest obecny w cząsteczce. Na przykład, względem szczepu HSV-1 (F), 6-Ph-TACV jest 120 razy mniej aktywny niż ACV, a 6-Ph-TGCV jest równie aktywny jak GCV. Względem szczepu HSV-2 (Lyons), 6-*t*Bu-TACV jest ponad 1600 razy mniej aktywny niż ACV, podczas gdy 6-*t*Bu-TGCV jest tylko 20 razy mniej aktywny niż GCV. Wydaje się zatem, że przynajmniej w niektórych przypadkach o aktywności związków nie decyduje szybkość rozpadu trzeciego pierścienia, na którą decydujący wpływ ma znajdujący się w nim podstawnik. Odmienne zdania jest R.F.Schinazi, który poddał testom przeciwwirusowym 4 serie 6-podstawionych tricyklicznych analogów guanozyny, zawierających modyfikację w części cukrowej.²⁷ Na podstawie uzyskanych wyników sformułował tezę, iż podstawniki elektronodonorowe, ułatwiając degradację dobudowanego pierścienia, nadają tricyklicznym prolekom aktywność bliską aktywności związków macierzystych – odwrotnie w stosunku do podstawników elektronoakceptorowych, które redukują aktywność. W przypadku związków tricyklicznych zsyntetyzowanych w naszej Pracowni i przebadanych w laboratorium prof. De Clercq'a, ta hipoteza sprawdza się jednak tylko na niektórych przykładach.

Po ukazaniu się ww. pracy przeglądowej przygotowałem jeszcze jedną serię związków tricyklicznych, analogów acyklowiru i RA-5021, zawierających w położeniu 6 podstawnik tien-2-yłowy, 5-bromotien-2-yłowy lub furan-2-yłowy (publikacja [H6]). Przesłanką do ich syntezy była opisana w literaturze znacząca czynność przeciwherpetyczna 5-(tien-2-ylo)- i 5-(5-bromotien-2-ylo)-2'-deoksyurydyny, ich arabinofuranozyłowych analogów oraz 5-(furan-2-ylo)-2'-deoksyurydyny.^{28,29} Związki **49-54** zsyntetyzowałem w reakcjach alkilowania-kondensacji ACV lub RA-502 z 2-(2-bromoacetylo)tiofenem, 2-(2-bromoacetylo)-5-bromotiofenem lub 2-(2-bromoacetylo)furanem, które otrzymałem na drodze bromowania ketonów.



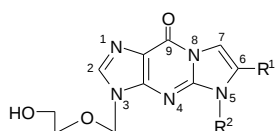
Z racji tego, iż 6-arylowe tricykliczne analogi acyklowiru (związek **10**) oraz RA-5021 (**47** i **48**) wykazały poprzednio obiecującą aktywność względem VZV, nowo zsyntetyzowane związki poddano badaniom przeciwko szczepom tego właśnie wirusa (YS i OKA). Stwierdzono, że zamiana podstawnika arylowego na heteroarylowy nie wpływa zasadniczo na aktywność związków, gdyż na ogół ustępują wszystkie one kilkakrotnie swoim bicyklicznym prekursorom. Najatrakcyjniejszy z całej serii związek, fluoryzujący 6-(tien-2-ylo)-T(RA-5021) (**52**) jest 5-krotnie aktywniejszy od ACV i porównywalnie aktywny do RA-5021.

Kończąc omawianie aktywności biologicznej tricyklicznych analogów guaninowych, chciałbym nadmienić, że stała się ona tematem osobnego rozdziału w pracy przeglądowej prof. De Clercq'a, podsumowującej dorobek Autora w dziedzinie poszukiwania skutecznych środków przeciwwirusowych.³⁰ Łącznie w pięciu częściach tej pracy omówionych jest 50 najważniejszych wątków badań, z których niektóre doprowadziły do znalezienia związków uznanych później za leki. Pisząc o związkach z naszej Pracowni, Autor wyraził opinię, iż zasługują one na większe niż dotąd zainteresowanie ze strony świata biomedycznego.

Kierując się potrzebą znalezienia metody wprowadzania podstawników w położenie 7 układu 3,9-dihydro-9-okso-5*H*-imidazo[1,2-*a*]puryny, przeprowadziłem szczegółowe badania jego reaktywności wobec halogenków alkilowych i aralkilowych w środowisku zasadowym (praca [**H7**]). Poprzednio, kiedy reakcjom takim poddawany był tricykliczny acyklowir zawierający grupę metylową w położeniu 6 (6-Me-TACV, **7**) lub jego analog w serii rybo, otrzymywano regioselektywnie produkt N5-podstawiony.^{7,31} Gdy użyłem jako substratu w reakcji benzylowania związku 6-fenyłowego (6-Ph-TACV, **10**), uzyskałem mieszaninę, z której wyodrębniłem produkty podstawione w położeniach N5 (**26**; 41 %) i N4 (**56a**; 6 %) oraz produkt dipodstawiony N5,C7 (**57a**; 9 %). Zbliżony rozkład produktów (**55b**, **56b**, **57b**) obserwowałem w przypadku gdy substratem był 6-(4-MeOPh)-TACV (**18**).

Objętościowa grupa 6-*tert*-butylowa związku 6-*t*Bu-TACV (**9**) wymusiła powstanie w reakcji z bromkiem benzylu większej ilości produktu N4 (**56c**; 36 %), obok produktu N5 (**55c**; 9 %) oraz produktu N4,C7 (**58c**; 4 %). W rezultacie reakcji **9** z bromkiem 4-nitrobenzylu wyizolowałem **56d** (39 %) i **55d** (8 %). W przypadku tricyklicznych rybonukleozydów, zawada przestrzenna powodowana przez obecność rybozy nie pozwoliła na powstanie produktów typu N4: benzylowanie 6-(4-MeOPh)-TG (**59**) przyniosło pochodne N5 (**60a**; 38%) i N5,C7 (**60b**; 15 %), 4-nitrobenzylowanie **59** dało pochodne N5 (**60c**; 32 %) i N5,C7 (**60d**; 25 %), a z mieszaniny po reakcji 6-*t*Bu-TG (**61**) z bromkiem benzylu wyizolowałem

tylko nieprzereagowany związek wyjściowy. Stwierdziłem, że grupa 6-fenyłowa w ten sposób wpływa na kierunek reakcji **10** z jodkiem metylu, że powstają produkty N5 (**55e**; 79 %) i N4 (**56e**; 7 %), ale nie obserwuje się podstawienia w położeniu C7 (w reakcji z jodkiem etylu tworzą się odpowiednie produkty **55f** i **56f**). Nie odnotowałem żadnego wpływu grupy *tert*-butylowej na kierunek etylowania **9**, gdyż jedynym produktem w tej reakcji był związek N5-podstawiony **55g**. Uzyskane wyniki wskazują na delokalizację ładunku ujemnego anionowej formy 9-podstawionej 1,N²-etenoguaniny, która powoduje w konsekwencji istnienie trzech centrów nukleofilowych substratu: N5, N4 i C7. Dominującą rolę, jeśli chodzi o wydajność oraz kierunek reakcji alkilowania lub aralkilowania, odgrywają czynniki steryczne, związane z rodzajem podstawników obecnych na skrajnych pierścieniach układu tricyklicznego, jak również z rodzajem czynnika elektrofilowego użytego w reakcji.



26 R¹ = Ph R² = Bzl

55 b R¹ = 4-MeOPh R² = Bzl

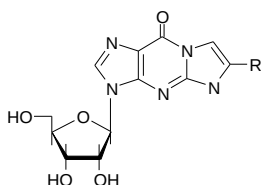
c R¹ = *t*Bu R² = Bzl

d R¹ = *t*Bu R² = NBzl

e R¹ = Ph R² = Me

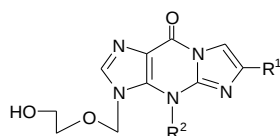
f R¹ = Ph R² = Et

g R¹ = *t*Bu R² = Et



59 R = 4-MeOPh

61 R = *t*Bu



56 a R¹ = Ph R² = Bzl

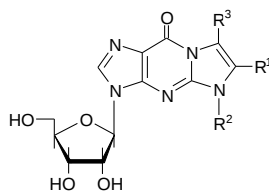
b R¹ = 4-MeOPh R² = Bzl

c R¹ = *t*Bu R² = Bzl

d R¹ = *t*Bu R² = NBzl

e R¹ = Ph R² = Me

f R¹ = Ph R² = Et

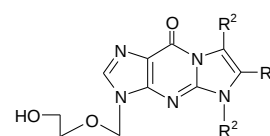


60 a R¹ = 4-MeOPh R² = Bzl R³ = H

b R¹ = 4-MeOPh R² = Bzl R³ = Bzl

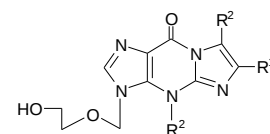
c R¹ = 4-MeOPh R² = NBzl R³ = H

d R¹ = 4-MeOPh R² = NBzl R³ = NBzl

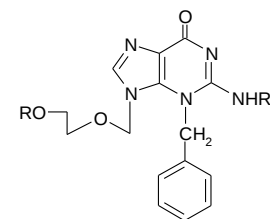


57 a R¹ = Ph R² = Bzl

b R¹ = 4-MeOPh R² = Bzl



58 c R¹ = *t*Bu R² = Bzl



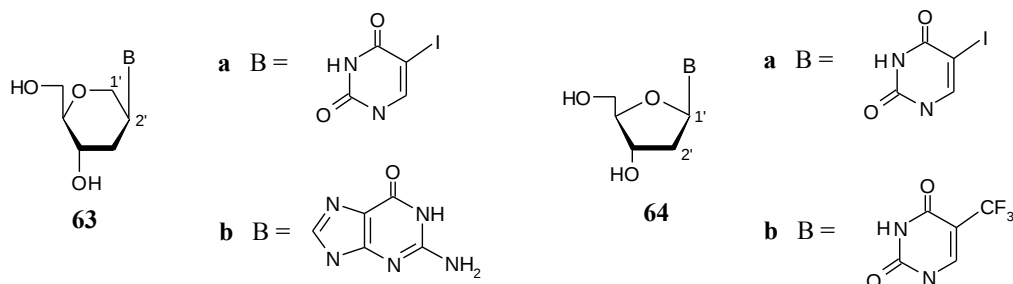
62 a R = H

b R = Ac

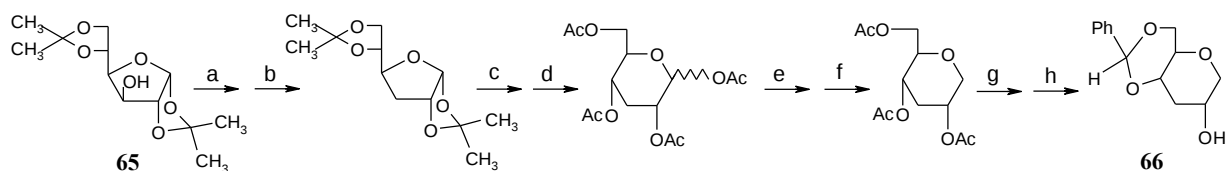
Opracowanie sposobu na aralkilowanie układu TACV w położeniu N4 umożliwiło mi syntezę 3-benzyloacyklowiru (**62a**). Dotychczasowe jedyne doniesienie literaturowe nt. N3-aralkilowania monomerycznej 9-podstawionej guaniny mówiło o izolacji śladowej ilości 3-benzyloguaniny z wieloskładnikowej mieszaniny po benzylowaniu 2'-deoksyguanozyny.³² Działając zgodnie z procedurą usuwania trzeciego pierścienia przy pomocy N-bromoimidu kwasu bursztynowego (NBS),³³ która wcześniej w naszej Pracowni zdała egzamin m.in. w syntezie 3-metyloguanozyny oraz 3-metyloacyklowiru (por. rozdział poświęcony pracom wykonanym przed doktoratem), uzyskałem **62a** z **56a**. Oczyszczenie związku **62a**, po uprzednim przekształceniu go w pochodną acetylową (**62b**), umożliwiło otrzymanie go z dobrą wydajnością i w postaci analitycznie czystej. Próba zastosowania **56c** jako substratu w reakcji z NBS zakończyła się niepowodzeniem, przypuszczalnie z powodów sterycznych.

2. ANALOGI 5-PODSTAWIONEJ 2'-DEOKSYURYDYNY – PRACE [H8] I [H9]

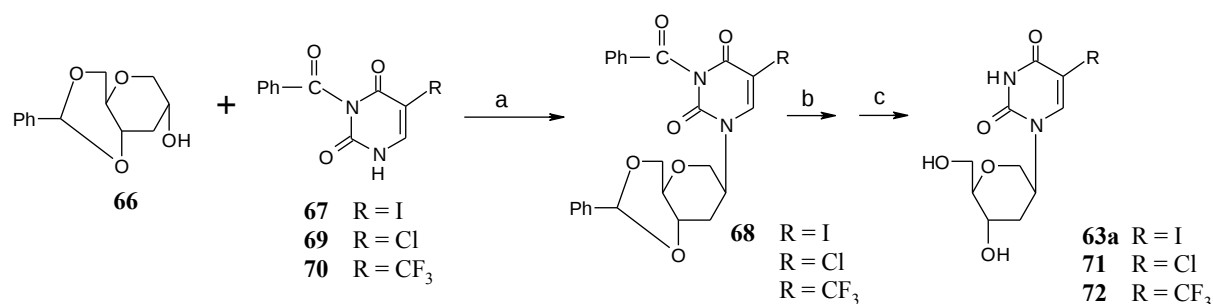
Od września 1996 r. do sierpnia 1997 r. byłem na podoktorskim stażu naukowym w Belgii, w kierowanej przez prof. P.Herdewijna Pracowni Chemii Medycznej, funkcjonującej w ramach Wydziału Farmacji Uniwersytetu w Leuven (Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven). Uczestniczyłem w projekcie, który miał na celu znalezienie nowych, aktywnych przeciwwirusowo analogów nukleozydów, posiadających 6-członowy pierścień cukrowy. Okazało się, że postulat ten spełniają pochodne 1,5-anhydro-2,3-dideoksy-D-arabinoheksitolu (**63**), analogi 2'-deoksyrybonukleozydów (**64**), które zawierają w części cukrowej dodatkową grupę metylenową pomiędzy atomem tlenu a atomem węgla związanym z aglikonem.^{34,35} Najciekawszymi związkami z pierwszych dwóch serii były: pochodna 5-jodouracylowa (**63a**), wykazująca korzystniejszą aktywność względem HSV-1 i HSV-2 od stosowanej klinicznie 5-jodo-2'-deoksyurydyny (**64a**), a także pochodna guaninowa (**63b**), o aktywności względem niektórych szczepów HSV i VZV porównywalnej z acyklowirem.



W trakcie mojego pobytu przygotowałem trzecią serię nukleozydów 1,5-anhydro-2,3-dideoksy-D-arabinoheksitolu, których część heterocykliczną stanowił 5-podstawiony uracyl. Publikacja [H8] obejmuje opis syntezy tych związków oraz wyniki przeprowadzonych badań biologicznych i strukturalnych. Wychodząc z 1,2:5,6-di-O-izopropylideno- α -D-glukofuranozy (**65**), zsyntetyzowałem 1,5-anhydro-4,6-O-benzylideno-3-deoksy-D-glucitol (**66**) zgodnie z 8-etapową procedurą podaną w literaturze (*Schemat III*).³⁶ Na drodze kondensacji metodą Mitsunobu alkoholu **66** z N3-benzoilo-5-jodouracylem (**67**) otrzymałem blokowany produkt **68**, który po usunięciu grup ochronnych dał 1',5'-anhydro-2',3'-dideoksy-2'-(5-jodouracyl-1-ylo)-D-arabinoheksitol (**63a**; *Schemat IV*).³⁵ W ten sam sposób, wykorzystując do kondensacji przygotowane przez siebie zasady, N3-benzoilo-5-chlorouracyl (**69**) oraz N3-benzoilo-5-(trifluorometylo)uracyl (**70**), uzyskałem związki **71** i **72**.



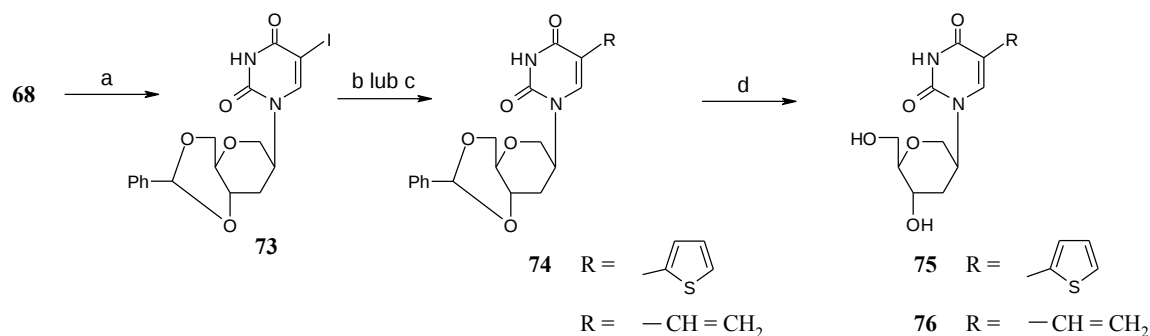
Schemat III. Reagenty: (a) NaH, CS₂, CH₃I, THF, imidazol; (b) Bu₃SnH, toluen; (c) Dowex H⁺, H₂O, EtOH; (d) Ac₂O, pirydyna; (e) HBr, AcOH; (f) Bu₃SnH, Et₂O; (g) NH₃, MeOH; (h) PhCH(OMe)₂, p-TsOH, dioksan



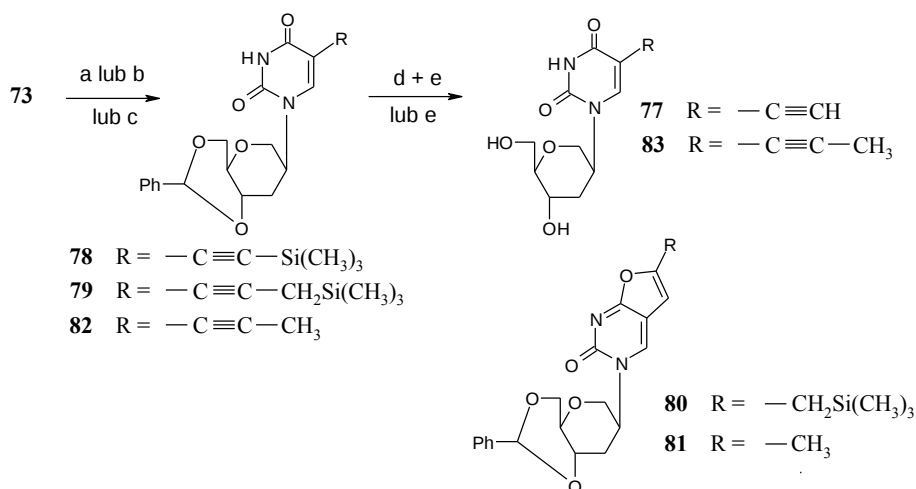
Schemat IV. Reagenty: (a) Ph₃P, DEAD, THF; (b) NH₃, MeOH; (c) 80 % AcOH

Związek 5-jodowy **68** poddałem debenzoilowaniu, a powstały produkt **73** sprzęgałem z 2-(tributylostannylo)tiofenem wobec chlorku bis(trifenylofosfino)palladu(II),²⁸ otrzymując w efekcie nukleozyd zawierający w położeniu 5 podstawnik tien-2-yłowy (**74**; po usunięciu grupy benzylidenowej **75**; *Schemat V*). Na podobnej drodze otrzymałem produkt 5-winyłowy

76, stosując ten sam katalizator palladowy, lecz modyfikując warunki sprzęgania z winylo-tributylostannanem.



Schemat V. Reagenty: (a) NH_3 , MeOH; (b) 2-(tributylostannylo)tiofen, $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$, THF; (c) $\text{Bu}_3\text{SnCH}=\text{CH}_2$, $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$, CH_3CN ; (d) 80 % aq AcOH



Schemat VI. Reagenty: (a) $\text{HC}\equiv\text{CTMS}$, Et_3N , $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$, CuI; (b) $\text{HC}\equiv\text{CCH}_2\text{TMS}$, Et_3N , $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$, CuI; (c) $\text{HC}\equiv\text{CCH}_3$, $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$, Et_3N , CuI; (d) KF, Et_4NBr , CH_3CN ; (e) 80 % AcOH

Przeprowadziłem syntezę 1',5'-anhydro-2',3'-dideoksy-2'-(5-etynylouracyl-1-ylo)-D-arabinoheksitolu (**77**; Schemat VI) sprzęgając **73** z trimetylosililoacetylenem wobec chlorku bis(trifenylfosfino)palladu(II), jodku miedzi (I) i trietyloaminy.³⁷ Produkt **78** poddałem desililowaniu przez działanie fluorku potasu i bromku tetraetyloamoniowego, po czym usunąłem blokadę benzylidenową. Tę samą strategię i warunki zamierzałem zastosować aby otrzymać analog 5-propynyłowy (**83**), jednak w reakcji związku **73** z propargilotrimetylosilanem powstał, obok pożądanego produktu **79**, fluoryzujący produkt cykliczny **80**. Próba usunięcia grupy trimetylosililowej związku **79** doprowadziła do powstania wyłącznie 1',5'-anhydro-4',6'-O-benzylideno-2',3'-dideoksy-2'-{6-metylofurano[2,3-d]pirymidyn-2-on-1-ylo}-D-arabinoheksitolu (**81**). W drugim podejściu zastosowałem zatem jako reagent do

reakcji sprzęgania gazowy propyn, uzyskany przez dehydrohalogenację 1,2-dibromopropanu. W taki sposób dobrałem temperaturę i czas reakcji, że zdołałem uniknąć cyklizacji w kierunku **81** i otrzymać produkt 5-propynyłowy **82** (a po odblokowaniu związek **83**). Końcowe związki zostały scharakteryzowane przez NMR, spektrometrię masową i analizę elementarną.

Jeśli chodzi o aktywność przeciwwirusową, związek 5-trifluorometyłowy (**72**) okazał się najbardziej obiecujący z omawianej serii. Wykazał wyższą aktywność niż acyklowir i porównywalną aktywność z **63a** względem HSV-1 oraz zbliżoną aktywność do acyklowiru i **63a** względem HSV-2. W stosunku do VZV **72** był nieaktywny, podobnie jak **63a**. Zamiana 2'-deoksyrybozy na heksitol w cząsteczce 5-(trifluorometylo)-2'-deoksyurydyny (TFT, **64b**), chronologicznie jednego z pierwszych nukleozydowych środków stosowanych przeciwko herpeswirusom, pozwoliła zachować jego wysoką aktywność, likwidując jednocześnie jego cytotoksyczność.^{2,38} Wy tłumaczeniem tego ostatniego efektu jest prawdopodobny brak oddziaływania 5'-monofosforanu związku **72** z komórkową syntazą tymidylanową. Związki 5-chlorowy (**71**), 5-(tien-2-yłowy) (**75**) i 5-etynyłowy (**77**) były całkowicie pozbawione aktywności (dwa ostatnie w przeciwieństwie do swoich 2'-deoksyrybozowych analogów^{28,39}). Związek 5-propynyłowy (**83**), chociaż wykazał pewną aktywność wobec HSV-1, był jednak ok. 10-krotnie mniej aktywny niż acyklowir i **63a**. Związek 5-winyłowy (**76**) był w testach tak samo aktywny jak acyklowir i prawie tak samo jak **63a** wobec HSV-1, lecz wyraźnie ustępował obu tym wzorcom, jeśli chodzi o aktywność wobec HSV-2.

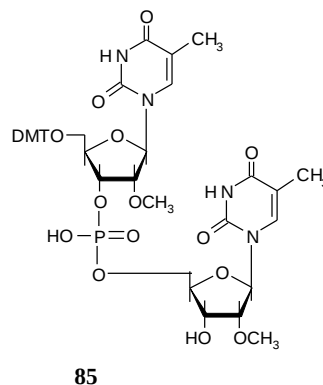
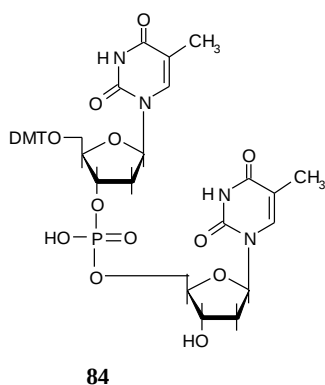
Jeden z dostarczonych przeze mnie związków, 1',5'-anhydro-2',3'-dideoksy-2'-(5-jodouracyl-1-ylo)-D-arabinoheksitol (**63a**) posłużył do badań rentgenostrukturalnych w kompleksie z kinazą tymidynową HSV-1. Wyniki omówione zostały w pracy [**H9**], wraz z danymi uzyskanymi dla kompleksów HSV-1 TK z tymidyną, acyklowirem, pencyklowirem i trzema innymi wysoce aktywnymi 5-podstawionymi nukleozydami uracyłowymi: (E)-5-(2-bromowinylo)-2'-deoksyurydyną (BVDU), 5-jodo-2'-deoksyurydyną (IDU) i 5-(5-bromotien-2-ylo)-2'-deoksyurydyną (BTDU). Stwierdzono, że atom jodu w położeniu 5 związku **63a** zajmuje ten sam region miejsca aktywnego enzymu, co atom jodu IDU, podstawnik bromowinyłowy BVDU i podstawnik bromotienyłowy BTDU. Sposób związania pierścienia anhydroheksitolu z TK jest zbliżony do obserwowanego w przypadku 2'-deoksyrybozy pozostałych ligandów. Zidentyfikowano aminokwasy enzymu, z którymi tworzą wiązania wodorowe grupy hydroksylowe 4'-OH i 6'-OH, a także atomy O², O⁴ i N3-H związku **63a**. W wykrystalizowanym kompleksie **63a** z TK, pierścień cukrowy nukleozydu znajduje się w

konformacji krzesłowej 1C, z ekwatorialnie zorientowanym podstawnikiem heterocyklicznym i grupą hydroksymetylową w położeniu aksjalnym. Poprzednio odnotowano, że nukleozydy 1,5-anhydro-2,3-dideoksy-D-arabinoheksitolu w fazie stałej oraz w roztworze występują w konformacji krzesłowej C1 (gdzie zasada podstawiona jest aksjalnie, a grupa hydroksymetylowa ekwatorialnie), będącej odpowiednikiem konformacji C3'-endo nukleozydów furanozowych.^{34,35} Ustalenia te sugerują zdolność kinazy tymidynowej do powodowania zmiany konformacyjnej ligandu heksitolowego, a możliwe jest to dzięki niewielkiej różnicy energetycznej pomiędzy obu konformerami, którą wykazała analiza dokonana metodami komputerowymi (publikacja [H8]). W późniejszym artykule przedstawiono wyniki obliczeń dotyczących dopasowania w kieszeni TK nukleozydu heksitolowego o dwóch założonych konformacjach C1 i 1C.⁴⁰ Wykazano, że trwalszy jest kompleks z udziałem cukru w konformacji 1C, ze względu na jedno dodatkowe wiązanie wodorowe grupy 4'-OH z aminokwasem enzymu. Pokazano też, że wysoka aktywność związku 5-trifluorometylowego (72) zdeterminowana jest przez niską, w stosunku do jego nieaktywnych analogów, barierę energetyczną przejścia od konformacji C1 do 1C.

3. ANALOG TYMIDYLYLO(3'-5')-TYMIDYNY – PRACA [H10]

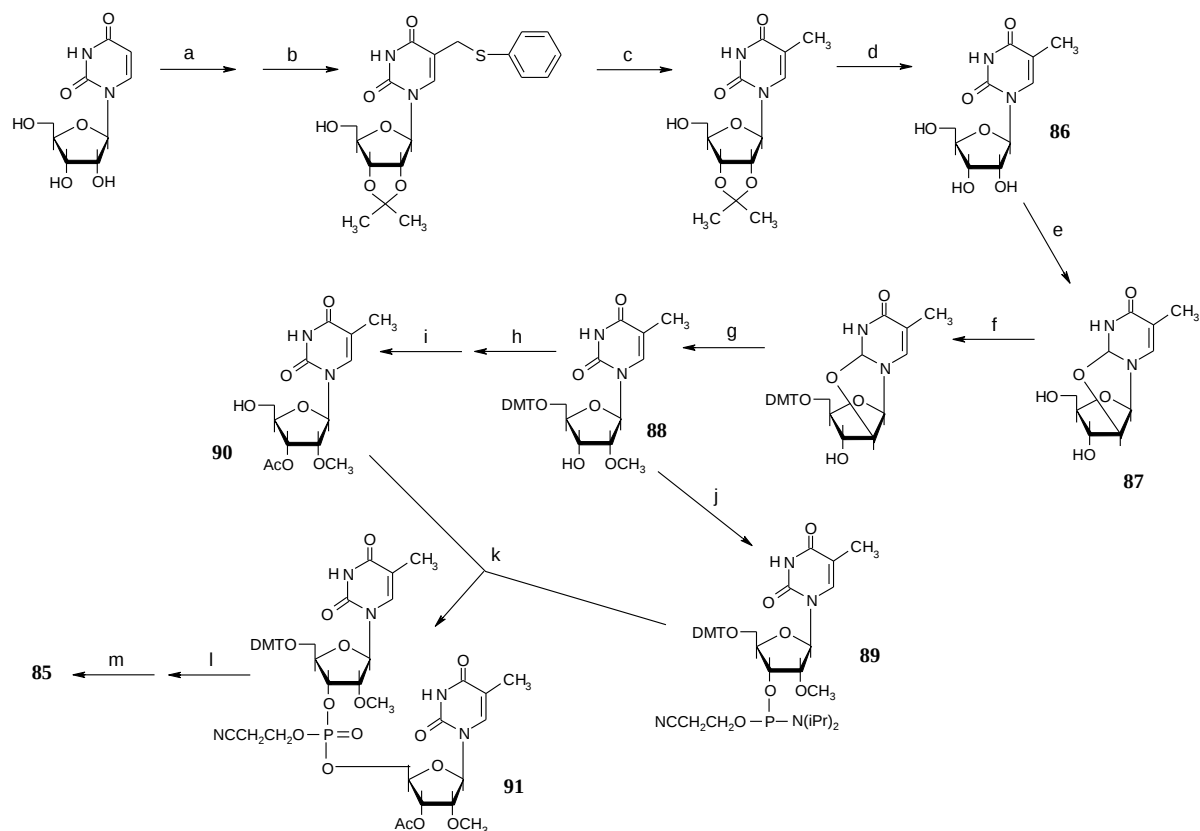
Działanie promieniowania UV pochodzenia słonecznego (głównie UV-B o długości fali 290-320 nm) na DNA prowadzi do tworzenia się dimerycznych fotoproduktów poprzez połączenie wiązaniami kowalencyjnymi sąsiadujących ze sobą zasad pirymidynowych.⁴¹ W przypadku ludzkich komórek naskórka, uszkodzenie DNA spowodowane obecnością takich fotodimerów stanowi pierwszy etap w procesie powstawania nowotworów.⁴² Nie wyjaśniono dotąd wyczerpująco roli wszystkich czynników, które wpływają na zakres i kierunek zmian fotochemicznych w obrębie DNA. Wśród najistotniejszych czynników wymienia się jednak przestrzenne ukształtowanie jego cząsteczki. Ponieważ fotoprodukty wykazują zróżnicowane właściwości mutagenne, to w celu lepszego zrozumienia zjawiska fotokarcynogenezy wydaje się uzasadnione określenie zależności pomiędzy efektami konformacyjnymi w helisie DNA a preferencyjnym tworzeniem konkretnego fotoproduktu. Służą temu eksperymenty fotolizy prowadzone na poziomie dinukleotydów, będących prostymi modelami łańcuchów DNA o określonych właściwościach. Drugi nurt opisywanych badań to włączanie otrzymanych fotodimerów dinukleotydowych do oligonukleotydów, które wykorzystuje się następnie w eksperymentach mających przybliżyć poznanie mechanizmów naprawczych DNA.⁴³

W 2000 r. pracowałem przez 6 miesięcy we Francji, jako stypendysta w Instytucie Chemii Produktów Naturalnych (Institut de Chimie des Substances Naturelles), CNRS, w Gif-sur-Yvette, w zespole kierowanym przez dr J.-L.Fourrey. Jeden z tematów badawczych realizowanych przez tę grupę stanowiła synteza analogów tymidylylo(3'-5')-tymidyny (TpT, **84**), modyfikowanych w części zasadowej lub cukrowej, a także analogu zawierającego połączenie pseudopeptydowe zamiast mostka cukrowo-fosfodiesterowego, jako substratów dla reakcji fotochemicznych. Włączając się do tych prac, przeprowadziłem syntezę 2'-O,5-dimetylourydylylo(3'-5')-2'-O,5-dimetylourydyny (TmopTmo, **85**), dinukleotydu różniącego się od TpT obecnością grupy metoksyłowej w położeniu 2'-α obu pierścieni 2'-deoksyrybozy (publikacja [**H10**]). Wiadomo z literatury,⁴⁴ że przejście od 2'-deoksyoligonukleotydu do jego analogu 2'-metoksy powoduje przesunięcie równowagi konformacyjnej pierścieni cukrowych od formy C2'-endo (typowej dla B-DNA) w kierunku formy C3'-endo (charakterystycznej dla A-DNA). Związek **85** został zatem zaprojektowany jako model A-DNA w celu porównania go z **84** (modelem B-DNA) pod względem wydajności tworzenia poszczególnych rodzajów fotoproduktów.



Pierwszą część mojej drogi syntetycznej w kierunku docelowego dinukleotydu **85** stanowiło 4-etapowe przejście od urydyny, poprzez jej pochodną 5-fenylotiometylową, do 5-metylourydyny (**86**, *Schemat VII*).⁴⁵ Następnie przeprowadziłem **86** w 2,2'-O-anhydro-1-(β-D-arabinofuranozylo)-5-metylouracyl (**87**).⁴⁶ Pochodną **87**, blokową w położeniu 5'-O grupą 4,4'-dimetoksytrytylową (DMTr), przekształciłem w 5'-O-DMTr-2'-O,5-dimetylourydynę (**88**) działaniem metanolanu magnezu jako czynnika nukleofilowego, zgodnie z procedurą opisaną uprzednio dla urydyny.⁴⁷ Fosfitylacja związku **88** dokonana zmodyfikowaną metodą literaturową⁴⁸ przyniosła 3'-O-fosforynoamid **89**, który posłużył w dalszej kolejności do kondensacji z 3'-O-acetylo-2'-O,5-dimetylourydyną (**90**). Nie opisany do tej pory związek **90** otrzymałem przez acetylowanie **88**, a następnie usunięcie blokady trytylowej. W efekcie

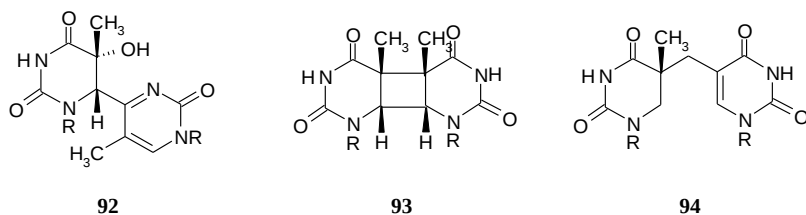
kondensacji prowadzonej z użyciem tetrazolu, jak również późniejszego utleniania jodem powstał blokowany dinukleotyd **91**. Nowy, nieznany dotąd końcowy związek **85** otrzymałem w rezultacie dwustopniowej deprotekcji **91**. Jego struktura i czystość potwierdzone zostały przez ^1H , ^{13}C i ^{31}P NMR, a także metodami wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) i wysokorozdzielczej spektrometrii masowej (HRMS).



Schemat VII. Reagenty: (a) 2,2-dimetoksypropan, p-TsOH, aceton; (b) HCOH, pirolidyna, H₂O; następnie tiofenol, CH₃CN; (c) nikiel Raneya, EtOH; (d) 50 % aq TFA; (e) węglan difenyłu, DMF, NaHCO₃; (f) DMTrCl, DMAP, pirydyna; (g) Mg(OCH₃)₂, DMF; (h) Ac₂O, pirydyna; (i) 3 % TFA w CH₂Cl₂; (j) (iPr)₂NEt, CH₂Cl₂, chloro-2-cyanoetoksy-diizopropylaminofosfina; (k) tetrazol, CH₃CN; następnie I₂, THF-H₂O-2,6-lutydyna 2:1:1 (l) NH₄OH, MeOH; (m) 80 % aq TFA

Na podstawie widm ^1H NMR stwierdzono w pracy [H10], że wprowadzenie dwóch grup 2'- α -OCH₃ do cząsteczki TpT powoduje znaczny wzrost populacji konformeru C3'-endo obu pierścieni cukrowych (od 30 % do 75 % dla cukru na końcu 5' oraz od 37 % do 66 % dla cukru na końcu 3'). W wyniku naświetlania TmopTmo w roztworze wodnym otrzymano dwa takie same rodzaje fotoproduktów, jakie obserwuje się w przypadku fotolizy TpT: (6-4) fotoprodukt (**92**) i cis-syn dimer cyklobutanowy (CPD, **93**). Modyfikowany dinukleotyd **85**, pomimo konformacji cukru C3'-endo upodabniającej go do A-DNA, nie dał w rezultacie reakcji fotochemicznej produktu typu przetrwalnikowego (*spore photoproduct*, SP, **94**), który

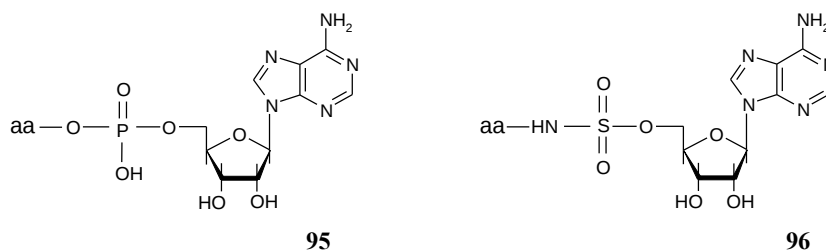
obserwuje się wyłącznie w przypadku naświetlania A-DNA obecnego w endosporach bakterii przetrwalnikujących.⁴³



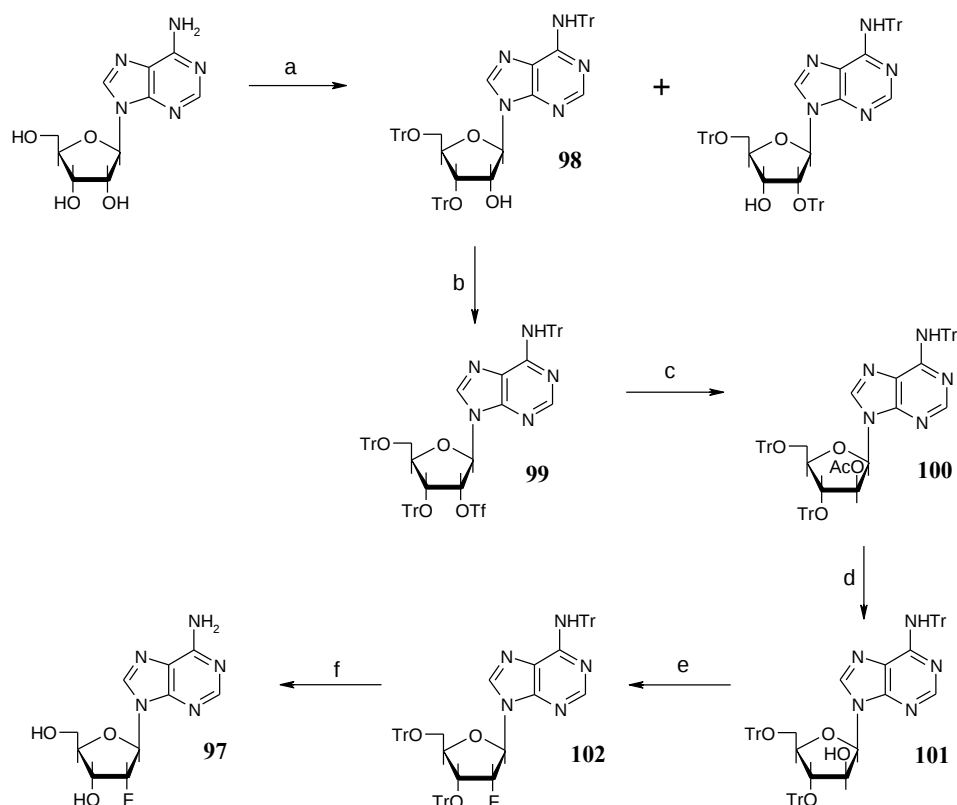
W oparciu o dokonane pomiary dichroizmu kołowego ustalono (praca [H10]), że wewnątrzcząsteczkowa asocjacja warstwowa (*stacking*) tymin jest dla związku **85** silniejsza niż dla związku **84**, co stanowi bardzo prawdopodobną przyczynę większej efektywności tworzenia fotoproduktów w przypadku naświetlania **85**. Przeprowadzona później⁴⁹ symulacja molekularna pozwoliła na stwierdzenie zbliżonej geometrii oddziaływań warstwowych w obu dinukleotydach. Fakt ten tłumaczy przyczynę paradoksu, jakim jest powstawanie takich samych fotodimerów (i w takim samym stosunku) gdy fotolizie poddaje się TpT i TmopTmo.

4. ANALOGI AMINOACYLO-AMP – PRACA [H11]

Syntetazy aminoacylo-tRNA pełnią kluczową rolę w biosyntezie białek, katalizując proces tworzenia aminoacylo-tRNA. Ich inhibicja stanowi atrakcyjny cel dla potencjalnych środków hamujących wzrost komórek np. dla związków przeciwbakteryjnych. Poszukując antybiotyków działających wg tego mechanizmu skoncentrowano się na analogach produktu pośredniego aminoacylacji tRNA, jakim jest L-aminoacylo-adenylan (aa-AMP, **95**). Opisano liczne modyfikacje cząsteczki aa-AMP, wprowadzane w jej części adeninowej, pierścieniu rybozy, fragmencie aminokwasowym lub wiązaniu fosfodwuestrowym.⁵⁰ Skutecznymi inhibitorami syntetaz aminoacylo-tRNA okazały się 5'-O-[N-(L-aminoacylo)sulfamoilo]-adenozyny (aa-S-A, **96**). Niestety, związki te nie wykazują selektywności działania wobec enzymów bakteryjnych w stosunku do działania wobec enzymów ludzkich, prawdopodobnie z powodu wysokiego podobieństwa do naturalnych adenylanów.

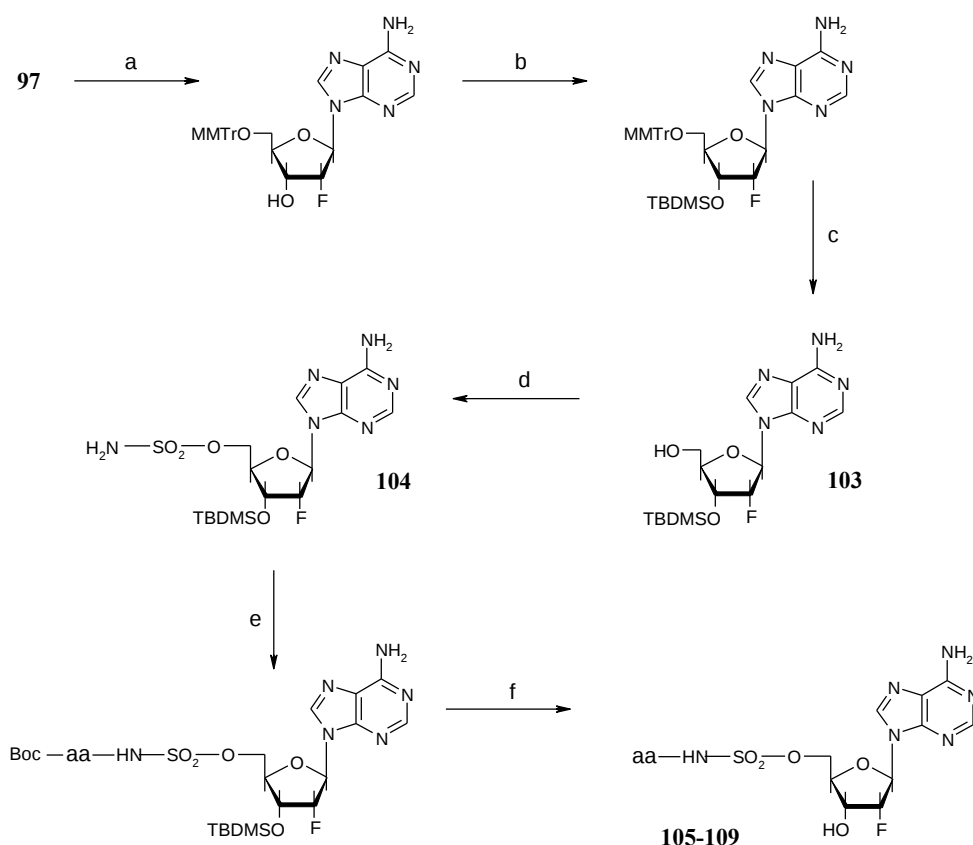


W Pracowni Chemii Medycznej Katholieke Universiteit Leuven (Belgia), kierowanej przez prof. P.Herdewijna, przeprowadzona została synteza analogów aa-S-A, które zawierały przekształconą część rybozową lub sześcioczłonowy pierścień heksitolu w miejsce rybozy lub/i zmodyfikowany aminokwas. Uczestniczyłem w tych pracach w trakcie mojego drugiego pobytu w Leuven, w czasie 6 miesięcy 2004/2005 r. Powierzono mi przygotowanie związków typu aa-S-A, posiadających jako element swojej struktury 2'-deoksy-2'-fluoroadenozyne (**97**), z przeznaczeniem do badań biologicznych (publikacja [**H11**]). Zsyntetyzowałem związek **97** w oparciu o procedurę,⁵¹ która obejmowała: otrzymanie 3'-O,5'-O,N⁶-tritytyloadenozyne (**98**), wprowadzenie w jej położenie 2'-O blokady trifluorometylosulfonowej (Tf), wymianę grupy O-Tf w **99** na O-acetylową (przebiegającą z inwersją konfiguracji), deacetylowanie pochodnej **100**, fluorowanie 9-(3'-O,5'-O-ditrytylo-β-D-arabinofuranozylo)-N⁶-trytyloadeniny (**101**) przy użyciu trifluorku dietyloaminosiarki (DAST) w kierunku 3'-O,5'-O,N⁶-tritytylo-2'-deoksy-2'-fluoroadenozyne (**102**) i końcową deprotekcję (*Schemat VIII*).



Schemat VIII. Reagenty: (a) TrCl, DMAP, pirydyna; (b) CF₃SO₂Cl, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; (c) AcONa, HMPA; (d) NH₃, MeOH; (e) DAST, pirydyna, CH₂Cl₂; (f) TFA, CH₂Cl₂

2'-Deoksy-2'-fluoroadenozynę (**97**) przeprowadziłem w jej pochodną 5'-O-metoksytrytylową (MMTr), a następnie wprowadziłem w położenie 3'-O grupę *tert*-butylo-dimetylosililową (TBDMS) oraz usunąłem grupę MMTr (*Schemat IX*). Otrzymaną pochodną **103** poddałem sulfamoiłowaniu działaniem generowanego *in situ* chlorku sulfamoilu, po czym sprzęgałem 3'-O-TBDMS-5'-O-sulfamoilo-2'-deoksy-2'-fluoro-adenozynę (**104**) z estrami N-hydroksyimidobursztynowymi N-*tert*-butoksykarbonylowych (N-Boc) pochodnych wybranych L-aminokwasów.⁵² Produkty odblokowałem, co przyniosło finalne związki **105-109**, których strukturę i czystość potwierdzono metodami NMR, HPLC i HRMS. Wszystkie te związki zostały poddane w Katedrze Mikrobiologii i Immunologii, Katholieke Universiteit Leuven testom przeciwko 35 szczepom bakterii (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* oraz *Enterococcus*), co wykazało ich umiarkowaną aktywność, porównywalną do aktywności macierzystych aa-S-A (**96**). W serii związków 2'-fluorowych pewną czynność prezentowały pochodne histydylowa, alanylowa i proliny, a pochodne leucylowa i metionylowa były jej pozbawione.

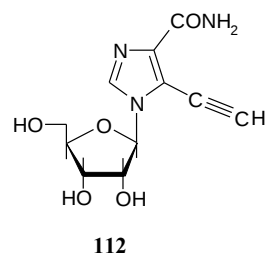
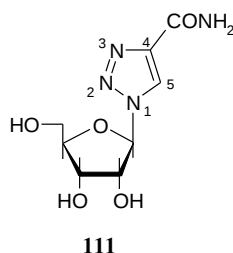
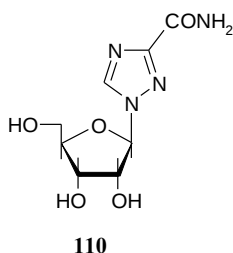


Schemat IX. Reagenty: (a) MMTrCl, Et₃N, pirydyna; (b) TBDMSCl, imidazol, DMF; (c) p-TsOH, CH₂Cl₂, MeOH; (d) H₂NSO₂Cl, CH₃CN, DMA; (e) Boc-aa-OSu, DBU, DMF; (f) TFA-H₂O 5:2

Nic nie wiadomo było dotąd na temat immunosupresyjnych właściwości inhibitorów syntetaz aminoacylo-tRNA. Ewentualne powinowactwo wobec ludzkich syntetaz mogłoby umożliwiać ich ingerencję w biosyntezę białka komórek układu odpornościowego. Dlatego 5'-O-[N-(L-aminoacylo)sulfamoilo]adenozyny (aa-S-A, **96**) i zsyntetyzowane przez nas ich analogi poddano badaniom na zdolność hamowania mieszanej reakcji limfocytowej (MLR) tj. testowi *in vitro* pozwalającemu przewidzieć stopień odrzucenia przeszczepu *in vivo*. Wartości MLR IC₅₀ niemodyfikowanych aa-S-A wskazywały na ich silne działanie immunosupresyjne. Zamiana rybozy na sześcioczłonowy pierścień cukrowy wywołała różny efekt, w zależności od rodzaju cukru i od aminokwasu obecnego w cząsteczce. Podstawienie rybozy w położeniu 2' fluorem spowodowało w każdym przypadku podwyższenie aktywności. Powyższe wyniki stanowią argument za tym, aby w toku opracowywania nowych antybiotyków bazujących na inhibicji syntetaz aminoacylo-tRNA brać pod uwagę ich ewentualną aktywność względem limfocytów, która może osłabiać układ odpornościowy pacjenta.

5. ANALOGI RYBAWIRYNY – PRACA [H12]

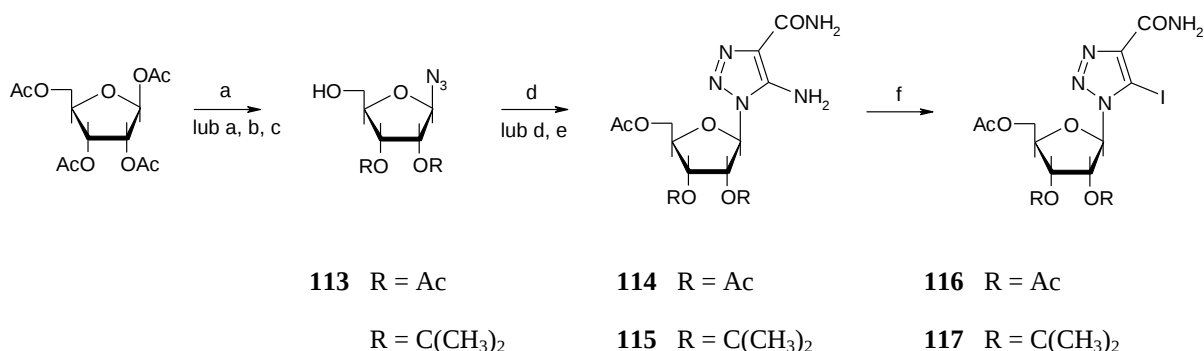
Dehydrogenaza 5'-monofosforanu inozyny (IMPDH) jest enzymem odgrywającym kluczową rolę w biosyntezie *de novo* nukleotydów guaninowych, katalizując utlenianie 5'-monofosforanu inozyny (IMP) do 5'-monofosforanu ksantozyny (XMP). Inhibicja IMPDH prowadzi do zmniejszenia puli trifosforanów guanozyny i 2'-deoksyguanozyny (GTP i dGTP) w komórce, co w konsekwencji wpływa na syntezę RNA i DNA. Dlatego też inhibitory tego enzymu przejawiają czynność immunosupresyjną, przeciwnowotworową, przeciwwirusową, lub przeciwpasożytniczą. Przykładem takiego inhibitora jest rybawiryna, 1-β-D-rybofuranozylo-1*H*-[1,2,4]-triazolo-3-karboksyamid (**110**), stosowana (jako Virazole®) w leczeniu infekcji wywołanych przez *Respiratory Syncytial Virus* (RSV), a także w terapii wirusowego zapalenia wątroby wywołanego przez *Hepatitis C Virus* (HCV). Rybawiryna może działać według kilku różnych mechanizmów,⁵³ ale w przypadku hamowania replikacji wirusów z rodzin *Paramyxoviridae* i *Flaviviridae* dominującym jest mechanizm inhibicji IMPDH przez jej 5'-monofosforan (RMP).⁵⁴ Stwierdzono, że izomer rybawiryny, 1-β-D-rybofuranozylo-1*H*-[1,2,3]triazolo-4-karboksyamid (**111**), który nie ulega fosforylacji przez kinazę adenozynową, nie przejawia właściwości przeciwwirusowych ani cytostatycznych.^{55,56} Niemniej otrzymany chemicznie 5'-monofosforan związku **111** dorównuje RMP, jeśli chodzi o zdolność inhibicji IMPDH.⁵⁵



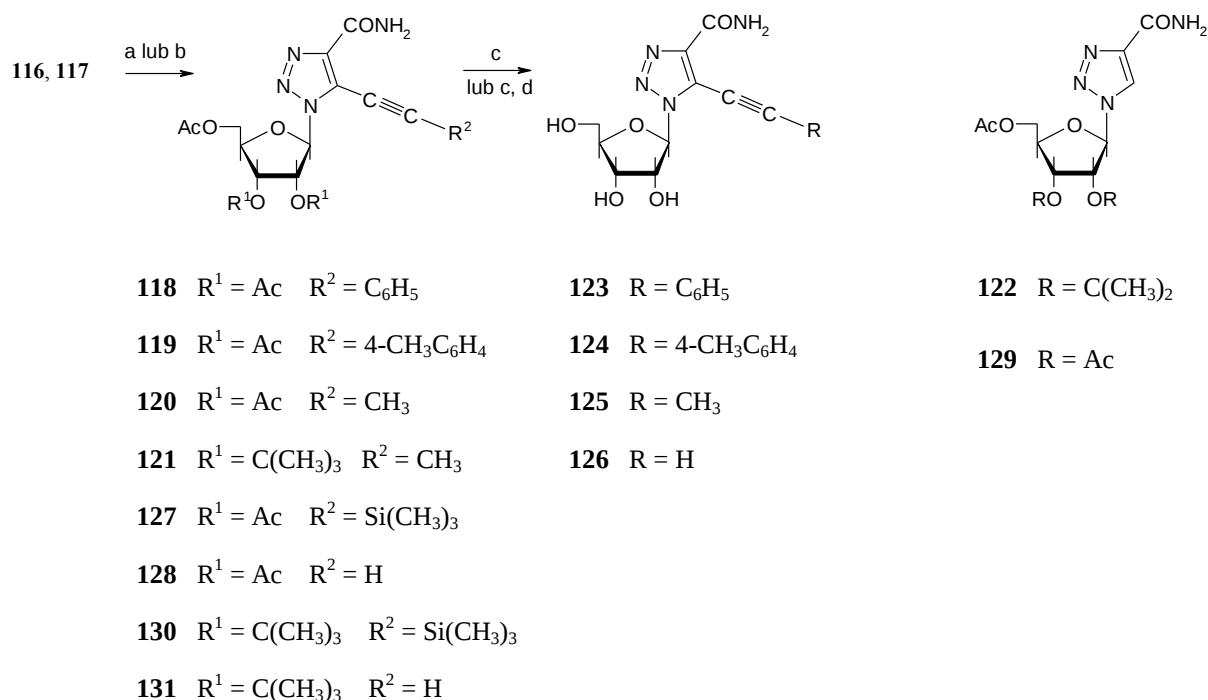
Skutecznym środkiem przeciwwirusowym jest zsyntetyzowany przez grupę japońską 5-etynylo-1-β-D-rybofuranozyloimidazolo-4-karboksyamid (EICAR, **112**).⁵⁷ Związek ten 10-100 razy przewyższa rybawirynę pod względem aktywności wobec paramyksowirusów i ortomyksowirusów.⁵⁸ Wykazał także wysoką aktywność cytostatyczną *in vitro* wobec szeregu rodzajów komórek rakowych (porównywalną do aktywności 5-fluorouracylu) oraz w badaniach *in vivo*.⁵⁷ Aktywny metabolit EICAR, jego 5'-monofosforan (EICARMP), jest inhibitorem IMPDH dzięki nieodwracalnej addycji reszty cysteinowej, znajdującej się w centrum aktywnym enzymu, do grupy etynylowej nukleotydu.⁵⁹ Współpracując z dr hab. Joanną Zeidler z Pracowni Chemii Nukleozydów IChB PAN, podjąłem syntezę związków pokrewnych w stosunku do **112**, zawierających dodatkowy atom azotu w położeniu 2 pierścienia aglikonu, 5-alkinylowych analogów **111** (publikacja [**H12**]). Przewidywaliśmy, że otrzymane związki mogą ulegać w komórkach fosforylacji (podobnie jak EICAR), a obecność podstawników 5-alkinylowych w cząsteczkach ich 5'-monofosforanów może pozwalać (analogicznie, jak w przypadku EICARMP) na tworzenie wiązań kowalencyjnych z IMPDH. Zaprojektowane prekursory potencjalnych inhibitorów IMPDH planowaliśmy poddać testom na aktywność cytostatyczną i przeciwwirusową.

W reakcji 1,2,3,5-tetra-O-acetylo-β-D-rybofuranozy z azydkiem trimetylosililowym otrzymałem blokowany azydek β-D-rybofuranozy (**113**; *Schemat X*). Poddałem go 1,3-cykloaddycji z cyjanoacetamidem, co przyniosło w rezultacie 1-(2,3,5-tri-O-acetylo-β-D-rybofuranozylo)-5-amino-1*H*-[1,2,3]triazolo-4-karboksyamid (**114**). Na drodze deacetylacji azydku **113**, jego izopropylidenowania i cykloaddycji z cyjanoacetamidem, a następnie 5'-O-acetylowania produktu cykloaddycji uzyskałem 1-(5-O-acetylo-2,3-O-izopropylideno-β-D-rybofuranozylo)-5-amino-1*H*-[1,2,3]triazolo-4-karboksyamid (**115**). Związki **114** oraz **115** przekształciłem w pochodne 5-jodowe **116** i **117** w reakcjach diazowania-jodowania z użyciem diiodometanu i azotynu izoamylu. Sprzęganie **116** i **117** z fenyloacetylenem, 4-metylofenyloacetylenem oraz propynem przeprowadziłem wg zmodyfikowanej procedury Sonogashiry, z użyciem chlorku bis(benzonitrylo)palladu(II) i trietyloaminy (*Schemat XI*).

Podstawowe znaczenie miał dobór odpowiedniej temperatury i czasu prowadzenia reakcji. W przypadku substratu imidazolowego reakcję prowadzono (stosując te same reagenty) w ciągu 4 h w temperaturze 100 °C.⁵⁷ Gdy substratem był karbocykliczny analog nukleozydu 1,2,3-triazolowego, cel osiągnięto po podwyższeniu temperatury do 155 °C.⁶⁰ Powtórzenie tych ostatnich warunków nie było możliwe w przypadku **116** i **117**, ze względu na ich nietrwałość. Ostatecznie, zbliżone wydajności (~70 %) do opisanych w cytowanych pracach uzyskałem sprzęgając **116** z alkinami aryłowymi w temp. 100 °C przez 18 h (produkty **118** i **119**). Stosując do reakcji dimetyloformamid nasycony propynem otrzymałem: wychodząc z **116** produkt **120** (51 %), a wychodząc z **117** produkt **121** (32 %; a ponadto z wydajnością 50 % produkt redukcyjnej dehalogenacji **122**). W efekcie metanolizy związków **118-120** uzyskałem finalne nukleozydy: 5-fenyletynyłowy (**123**), 5-(4-metylofenyletynyłowy) (**124**) oraz 5-propynyłowy (**125**). Syntezę związku 5-etynyłowego (ETCAR, **126**) przeprowadziłem w oparciu o metodę sprzęgania wg Stille, z użyciem trimetylosililoetynylo-tri-*n*-butylocyny i bis(benzonitrylo)palladu(II) jako katalizatora, a optymalne okazały się temperatura 90 °C i czas trwania reakcji przez noc. W przypadku substratu 2',3',5'-tri-O-acetylowanego **116** osiągnąłem sumaryczną wydajność produktów 5-(TMS-etynylo) i 5-etynylo (**127** i **128**) 72 %, porównywalną do wydajności opisanej w syntezie EICAR.⁵⁷ Dodatkowo wyizolowałem produkt redukcyjnej dehalogenacji **129** (22 %). W przypadku substratu 5'-O-acetylo-2',3'-O-izopropylidenowego **117** uzyskałem produkty **130** i **131** (łącznie 62 %) obok zredukowanego produktu **122** (18 %). Deprotekcja **127** i **128** przyniosła ETCAR (**126**), tytułowy związek pracy [**H12**]. Strukturę i czystość związków **123-126** potwierdzono na podstawie widm NMR i analizy elementarnej.

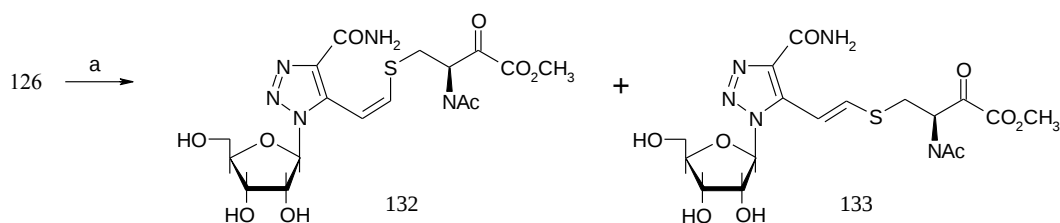


Schemat X. Reagenty: (a) (CH₃)₃SiN₃, SnCl₄, CH₂Cl₂; (b) MeONa, MeOH; następnie Dowex H⁺; (c) I₂, aceton; (d) cyjanoacetamid, KOH, DMF, H₂O; (e) Ac₂O, pirydyna; (f) CH₂I₂, azotyn izoamylu



Schemat XI. Reagenty: (a) $\text{HC}\equiv\text{CR}$ ($R = \text{Ph}$ lub $4\text{-CH}_3\text{Ph}$ lub CH_3), Et_3N , $(\text{PhCN})_2\text{PdCl}_2$, DMF; (b) $\text{Bu}_3\text{SnC}\equiv\text{CTMS}$, $(\text{PhCN})_2\text{PdCl}_2$, CH_3CN ; (c) MeONa , MeOH ; następnie Dowex H^+ ; (d) 80 % aq TFA

Przed wykonaniem badań biologicznych potwierdziłem reaktywność nukleozydu 1,2,3-triazolowego **126** wobec nukleofila imitującego cysteinę dehydrogenazy IMP, którym był ester metylowy N-acetylo-L-cysteiny. Reagent ten w obecności trietyloaminy uległ addycji do potrójnego wiązania ETCAR, dając produkt w postaci izomerów Z (**132**) i E (**133**), które udało mi się rozdzielić (*Schemat XII*). W reakcji związku **126** z innym nukleofilem, tiometanolanem sodu, uzyskałem produkt addycji wewnątrzcząsteczkowej, cykliczny 5,2'-eteno-1- β -D-rybofuranozylo-1*H*-[1,2,3]triazolo-4-karboksyamid. Testy przeprowadzone w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi (prof. dr hab. B. Nawrot) pokazały, że związki **123-125** są zupełnie pozbawione cytotoksyczności, natomiast ETCAR (**126**) przejawia niski poziom cytotoksyczności wobec komórek białaczki (K562), komórek raka szyjki macicy (HeLa) i normalnych komórek (HUVEC).

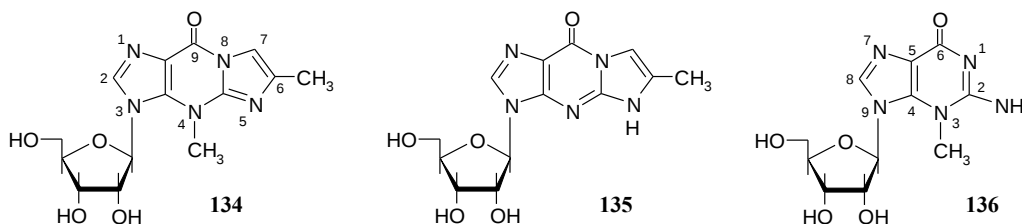


Schemat XII. Reagenty: (a) ester metylowy N-acetylo-L-cysteiny, Et_3N , CH_3CN

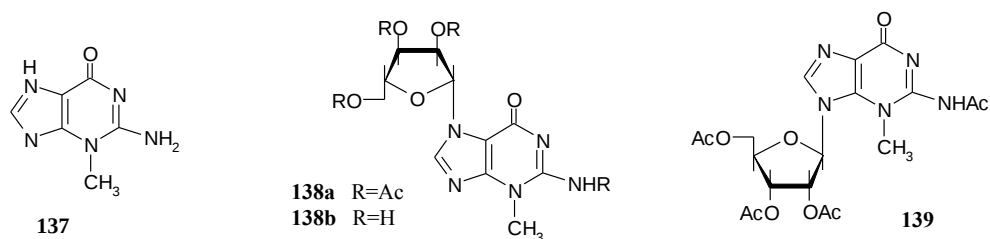
VIII OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH PRAC OPUBLIKOWANYCH PRZED DOKTORATEM

SYNTEZA I WŁAŚCIWOŚCI ANALOGÓW WYOZYNY – PRACE [A1]-[A4]

Wyozyina, 4,9-dihydro-4,6-dimetylo-9-okso-3-(β -D-rybofuranozyl)-imidazo[1,2-*a*]-puryna (imG, **134**) należy do grupy 8 tricyklicznych nukleozydów, które występują w pozycji 37 pętli antykodonowej tRNA specyficznego dla fenyloalaniny organizmów eukariotycznych oraz archeobakterii.⁶¹ W Pracowni Chemii Nukleozydów ZChB PAN, kierowanej przez prof. dr hab. B. Golankiewicza, opracowano na początku lat 80. XX w. nowatorską metodę syntezy wyozyiny z jej bioprekursora, guanozyny.⁶² Kluczowym etapem tej syntezy było metylowanie układu N4-dezmetylowyozyiny (1,N²-izopropenoguanozyny, **135**) diazometanem, w wyniku czego otrzymywano głównie produkt N5-podstawiony, obok niewielkiej ilości pożądanego jego izomeru N4-metylowego. Wydajność tego etapu została radykalnie podwyższona, gdy jako czynnik metylujący użyto kompleks cynkoorganiczny Simmonsa-Smitha.⁶³ Zwiększona dostępność wyozyiny uczyniła możliwym wykorzystanie jej w naszej Pracowni jako substratu w syntezie 3-metyloguanozyny (**136**).⁶⁴



Nie udało się uzyskać **136** na drodze bezpośredniego metylowania guanozyny.⁶⁴ Nie powiodły się też próby syntezy tego związku przez glikozylację 3-metyloguaniny (**137**), gdyż w wyniku każdej z trzech stosowanych metod obserwowaliśmy podstawienie w położeniu 7. Moim wkładem w realizację tego tematu, zakończonego publikacją [A1], było przygotowanie N²-acetylo-3-metyloguaniny i jej fuzja z 1,2,3,5-tetra-O-acetylo- β -D-rybofuranozą, co w efekcie przyniosło 7-rybozyd **138a** (**138b** po deacetylacji). Wykazaliśmy ponadto, że nie można przekształcić **138a** w odpowiedni 9-izomer (**139**) poprzez transglikozylację termiczną, podczas gdy w przeciwną stronę reakcja taka zachodzi ilościowo. Wyniki powyższe wskazują na zdecydowanie większą trwałość termodynamiczną 7-podstawionej 3-metyloguaniny w porównaniu z 9-podstawioną. Ma to odzwierciedlenie także w szybkości rozpadu wiązania glikozydowego: stwierdziłem, że związek **138b** w 1N HCl, 45 °C hydrolizuje 2500 razy wolniej niż 3-metyloguanozyna (**136**) w 0.1 N HCl, 25 °C.⁶⁴

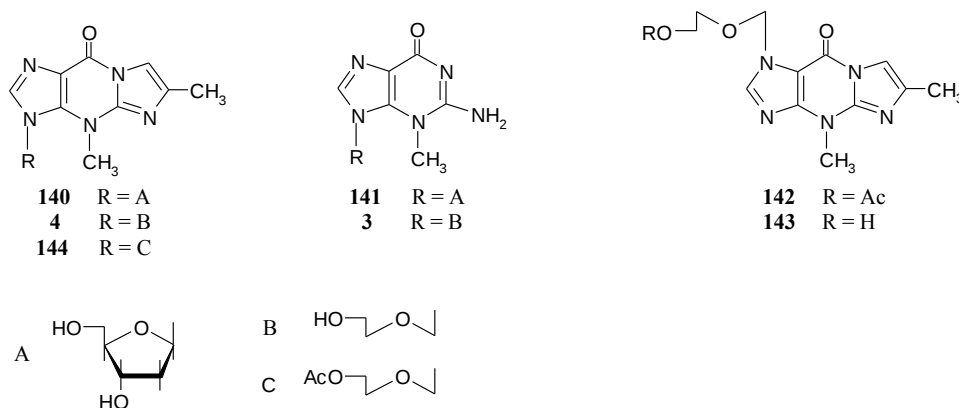


2'-Deoksywyozyna (**140**) i 3-metylo-2'-deoksyguanozyna (**141**) nie występują naturalnie w przyrodzie, ani do czasu ukazania się naszej pracy [A2] nie otrzymano ich na drodze syntetycznej. Doniesienia mówiły jedynie o uwalnianiu 3-metyloguaniny (**137**) z DNA traktowanego czynnikami metylującymi.⁶⁵ Mając na uwadze to, że wprowadzono grupę metylową w pozycję N3 2'-deoksyguanozyny, kiedy była ona związana jako składnik DNA (choć w ograniczonym stopniu w stosunku do ogółu produktów), podjąłem próbę dokonania tego samego na poziomie monomeru. Przeprowadziłem 7-etapową syntezę **141**, która obejmowała konwersję 2'-deoksyguanozyny do związku tricyklicznego, metylowanie w położeniu N4 jego blokowanej formy, deprotekcję, degradację trzeciego pierścienia 2'-deoksywyozyny w reakcji z N-bromoimidem kwasu bursztynowego (NBS) oraz izolację produktu. Modyfikacja warunków metylowania, w porównaniu z syntezą w serii rybo, pozwoliła na optymalizację wydajności na tym etapie. W toku reakcji **140** z NBS, a także podczas oczyszczania acetylowej pochodnej związku **141** i odblokowania natrafiłem na spore trudności, wynikające z niezwyklej labilności wiązania glikozydowego ww. związków. Droga licznych prób opracowałem jednak takie warunki reakcji i przerobu, które pozwoliły na uzyskanie 3-metylo-2'-deoksyguanozyny (**141**) w postaci analitycznie czystej.

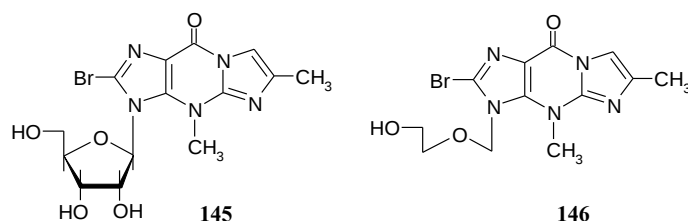
Oprócz syntezy związków **140** i **141**, w pracy [A2] przedstawione zostały uzyskane przeze mnie wyniki pomiarów połowicznych czasów ich hydrolizy oraz hydrolizy wyozyny (**134**). Wykazałem na podstawie badań prowadzonych w różnych warunkach pH, że szybkość rozpadu wiązania glikozydowego w przypadku 2'-deoksywyozyny jest kilkaset razy większa niż dla wyozyny, a dla 3-metylo-2'-deoksyguanozyny jest jeszcze 5-13 razy większa niż dla 2'-deoksywyozyny.

Tematem pracy [A3] jest synteza acyklowyozyny (**4**) i 3-metyloacykloguanozyny (**3**), którą przeprowadziłem wychodząc z acyklowiru (**1**). Stwierdziłem, że regioselektywność metylowania (N1/N4) była uzależniona od stosunku użytych w reakcji rozpuszczalników. Związki **4** i **3** potraktowałem jako dogodne modele dla dokonania pomiarów szybkości reakcji rozpadu wiązania N3(lub N9)—C, odpowiadającego wiązaniu glikozydowemu nukleozydów.

Ustaliłem, że zdecydowane zmniejszenie zatłoczenia przestrzennego w cząsteczkach **4** i **3**, w porównaniu z wyożyną (**134**) i 3-metyloguanozyną (**136**), powoduje stosunkowo niewielkie (10- do 30-krotne) jej spowolnienie, co może świadczyć o istotnym udziale czynników elektronowych w obserwowanej nietrwałości 9-podstawionej 3-metyloguaniny. Wychodząc z N²,7-diacetylo-3-metyloguaniny uzyskałem blokowany 7-izomer 3-metyloacykloguanozyny, a następnie 1-izomer acyklowyozyny (produkt **142**, po deacetylacji **143**). Dowiodłem, że **142** nie ulega transglikozylacji termicznej w kierunku **144**, a odwrotna reakcja zachodzi łatwo.



Odpowiedni dobór rozpuszczalników, wymuszający N4-metylowanie, umożliwił mi również otrzymanie 2-bromowyozyny (**145**) i 2-bromoacyklowyozyny (**146**) (praca [A4]). 2-Bromowyozyna okazała się związkiem o równie nietrwałym wiązaniu glikozydowym jak wyożyna. Na podstawie widm NMR stwierdziłem, że jej objętościowy podstawnik bromowy traci, na skutek obecności grupy metylowej w położeniu 4, swój wpływ sytuujący aglikon w stosunku do rybozy w konformacji *syn*.



IX OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH PRAC OPUBLIKOWANYCH PO DOKTORACIE

W pracy [B1] opisana jest metoda usuwania dobudowanego pierścienia w układzie 9-podstawionej 1,N²-etenoguaniny z użyciem jodu w metanolu, alternatywna wobec stosowanej wcześniej w naszej Pracowni metody wykorzystującej NBS. Mój udział w tej publikacji był niewielki i miał charakter pomocniczy.

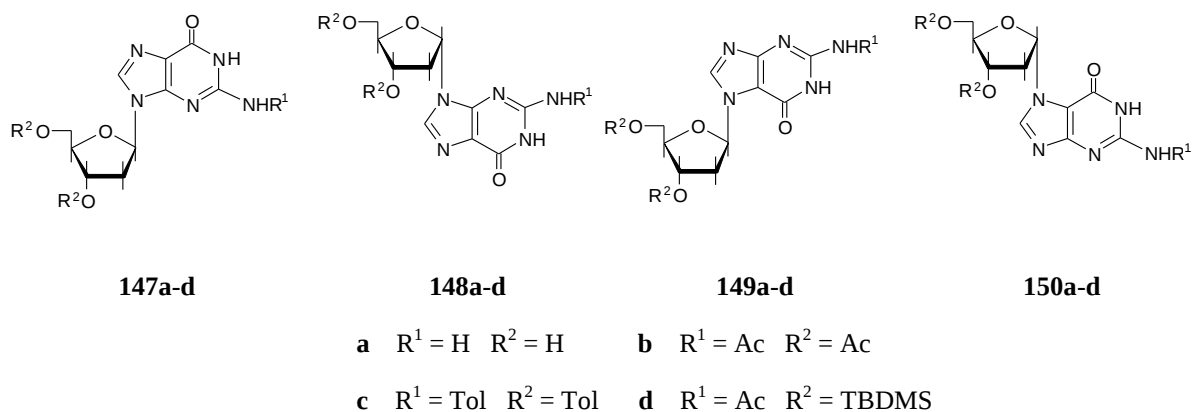
Praca [B2] zawiera wstępne wyniki badań nad wpływem podstawników w położeniu 6 tricyklicznych analogów acyklowiru i guanozyny na kierunek ich alkirowania i aralkirowania. Pełne zestawienie otrzymanych rezultatów znalazło się w obszerniejszej pracy [H7] (str. 19).

Skierowaliśmy do badań na cytotoksyczność względem komórek KB nowotworu nosogardzieli serię kilkunastu 8-podstawionych lub/i tricyklicznych analogów acyklowiru oraz czterech pokrewnych związków (Katedra Farmakologii Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Poznaniu, prof. dr hab. B.Hładoń). W tej liczbie było 8 związków zsyntetyzowanych wcześniej przeze mnie (opisanych w pracach [A5] i [H1]). Jak pokazują wyniki zamieszczone w publikacji [B3], testowane związki były w większości nieaktywne. Umiarkowaną aktywność przejawiało tylko kilka z nich np. 8-bromoacyklowir.

Otrzymane przeze mnie i opisane wcześniej (w pracach [A5] i [H7]) fluoryzujące związki, aktywny przeciwwirusowo 6-Ph-TACV (**10**) oraz 5-Me-6-Ph-TACV (**55e**) i 4-Me-6-Ph-TACV (**56e**), zostały poddane szczegółowym badaniom spektralnym i fotofizycznym na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. A.Mickiewicza w Poznaniu (prof. dr hab. G.Wenska). W powstałej publikacji [B4] przedstawiono m.in. parametry ich fluorescencji w zależności od polarności rozpuszczalnika oraz, w przypadku roztworów wodnych, od pH roztworu.

W pracy [B5] przedstawione zostały wyniki moich badań nad izomeryzacją 2'-deoksyguanozyny (**147a**). Zsyntetyzowałem 3 blokowane pochodne **147a**: N²-acetylo-3',5'-di-O-acetylo-2'-deoksyguanozynę (**147b**), N²-(4-toluoilo)-3',5'-di-O-(4-toluoilo)-2'-deoksyguanozynę (**147c**; z wydajnością prawie 2-krotnie wyższą niż podano w literaturze⁶⁶) i N²-acetylo-3',5'-di-O-(*tert*-butylodimetylosililo)-2'-deoksyguanozynę (**147d**). Ogrzewałem je w stanie stopionym lub w roztworze, uzyskując 7-regioizomery z wydajnościami, które były uzależnione od zastosowanego substratu i warunków reakcji. Zgodnie z przewidywaniami, następowała anomeryzacja, której rezultatem była obecność w mieszaninach poreakcyjnych związków 9 β (**147b-d**), 9 α (**148b-d**), 7 β (**149b-d**) i 7 α (**150b-d**). Użycie **147b** jako substratu powodowało powstanie niewielkich ilości **149b** i **150b**, których nie udało się rozdzielić. W eksperymentach z użyciem **147c** i **147d** wydajność termicznej 9 $\rightarrow$ 7 izomeryzacji była wyższa (24-55 %), a składniki mieszanin wyizolowałem na drodze bardzo precyzyjnej chromatografii kolumnowej i krystalizacji. Produkty scharakteryzowałem przy pomocy ¹H i ¹³C NMR, a związki **147c**, **148c**, **149c** i **150c** dodatkowo przez analizę elementarną. Następnie poddałem je odblokowaniu, co dało 2'-deoksyguanozynę i jej izomery 9 α (**148a**), 7 β (**149a**) i 7 α (**150a**). Powyższa synteza **149a** jest prostsza od opisanej wcześniej,⁶⁷ chociaż sumaryczne wydajności

w przypadku obu tych metod są zbliżone. Ciekawą obserwacją jest stwierdzenie większej efektywności izomeryzacji **147c** w porównaniu z pertoluoilowaną guanozyną, co przypisać należy wyższej trwałości wiązania glikozydowego rybonukleozydu.



Praca przeglądowa **[C1]** to zwięzłe zestawienie stanu wiedzy z 1995 r. nt. kinazy tymidynowej herpetowirusów: jej specyficzności substratowej, roli w aktywacji metabolicznej analogów nukleozydowych, inhibicji przez modyfikowane nukleozasady i nukleozydy, jej zastosowania w genowo-chemicznej terapii nowotworów (GDEPT). Bardziej szczegółowo przedstawiłem niektóre aspekty tej tematyki w części literaturowej mojej pracy doktorskiej.

Prace **[C2]** oraz **[C3]**, opublikowane w specjalnym tomie *Collection Symposium Series* przez Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic w Pradze, mają charakter wstępny w stosunku do późniejszych prac **[B5]** i **[H7]**. Mój udział w tych pracach był dominujący, jeśli chodzi o część syntetyczną.

Praca **[C4]** to chronologicznie pierwsza publikacja związana z realizacją projektu kierowanego przez dr hab. Joannę Zeidler, którego celem była synteza pochodnych 1,2,3-triazolu jako potencjalnych prekursorów inhibitorów IMPDH. W publikacji tej wstępnie zaprezentowaliśmy sposób otrzymania 1,2,3-triazolonukleozydów, z których najważniejszym był 5-etynylo-1-β-D-rybofuranosylo-1H-[1,2,3]triazolo-4-karboksyamid (**126**). Całościowy opis syntezy, wraz z dokładną częścią eksperymentalną, zamieściliśmy w późniejszej pracy **[H12]** (str. 31-34). Otrzymane związki, w tym 4 zsyntetyzowane przeze mnie (**123-126**), przekazaliśmy do testów na aktywność względem wybranych ortomyksowirusów i paramyksowirusów, które zostały przeprowadzone w Institute for Antiviral Research, Utah State University, USA (prof. D.F.Smee). Wśród wyselekcjonowanych z całej serii i opisanych w pracy **[C5]** trzech związków przejawiających najciekawsze właściwości znalazły się

związki 5-etynylowy (ETCAR, **126**) i 5-propynylowy (ProTCAR, **125**). W porównaniu z rybawiryną, ETCAR wykazał podobną, lub nawet nieco wyższą aktywność wobec wirusów grypy A (H1N1, H3N2, H5N1), wirusa grypy B, wirusa paragrypy typu 3 oraz RSV, ale jednocześnie wyższą cytotoksyczność. ProTCAR był od kilku do 100 razy słabiej aktywny niż ETCAR, nie przejawiał jednak toksyczności. Stwierdzono też, że w efekcie działania **125** i **126** następuje obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu GTP, co wskazuje na inhibicję IMPDH jako mechanizm ich działania przeciwwirusowego. Powyższą tezę podtrzymują uzyskane rezultaty przeprowadzonego modelowania komputerowego kompleksów enzym-ETCARMP i enzym-ProTCARMP.

Obecnie nadal zajmuję się syntezą modyfikowanych nukleozydów, współpracując w tym zakresie z dr hab. J.Zeidler (IChB PAN). Zsyntetyzowane związki będą w przyszłości poddane testom biologicznym. Podjęliśmy współpracę z Katedrą Chemii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. K.Marcinkowskiego w Poznaniu (dr hab. I.Muszalska) gdzie wykonywane są aktualnie badania fizykochemiczne niektórych z otrzymanych przeze mnie nowych związków.

LITERATURA CYTOWANA W ROZDZIAŁACH VII-IX

1. G.B.Elion; The purine pathway to chemotherapy. *Science* **244**, 41-47 (1989) – praca przeglądowa
2. G.Andrei, E.De Clercq, R.Snoeck; Viral DNA polymerase inhibitors. In: Viral genome replication (C.E.Cameron et al., Eds.); pp 481-526; Springer Science+Business Media (2009) – praca przeglądowa
3. E.De Clercq; Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.* **30**, 115-133 (2004) – praca przeglądowa
4. E.De Clercq; Antivirals: past, present and future. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 727-744 (2013) – praca przeglądowa
5. L.M.Beauchamp, B.L.Dolmatch, H.J.Schaeffer, P.Collins, D.J.Bauer, P.M.Keller, J.A.Fyfe; Modifications on the heterocyclic base of acyclovir: syntheses and antiviral properties. *J. Med. Chem.* **28**, 982-987 (1985)
6. M.J.Robins, P.W.Hatfield, J.Balzarini, E.De Clercq; Nucleic acid related compounds. 47. Synthesis and biological activities of pyrimidine and purine “acyclic” nucleoside analogues. *J. Med. Chem.* **27**, 1486-1492 (1984)
7. J.Boryski, B.Golankiewicz, E. De Clercq; Synthesis and antiviral activity of novel N-substituted derivatives of acyclovir. *J. Med. Chem.* **31**, 1351-1355 (1988)
8. J.Boryski, B.Golankiewicz, E. De Clercq; Synthesis and antiviral activity of 3-substituted derivatives of 3,9-dihydro-9-oxo-5H-imidazo[1,2-a]purines, tricyclic analogues of acyclovir and ganciclovir. *J. Med. Chem.* **34**, 2380-2383 (1991)
9. V.Nair, G.A.Turner; Determination of the structure of the adduct from guanosine and glycidaldehyde. *Tetrahedron Lett.* **25**, 247-250 (1984)
10. T.Gośliński, M.Olejniczak, B.Golankiewicz; Terapia genowo-chemiczna nowotworów z zastosowaniem układu złożonego z genu kinazy tymidynowej wirusa *Herpes Simplex* i gancyklowiru (HSV TK/GCV). W: Na pograniczu chemii i biologii (H.Koroniak i J.Barciszewski, red.); tom XIV, s. 325-348; Wyd. Naukowe UAM, Poznań (2006) – praca przeglądowa

11. J.Balzarini, C.Bohman, E.De Clercq; Differential mechanism of cytostatic effect of (*E*)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine, 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine, and other antiherpetic drugs on tumor cells transfected by the thymidine kinase gene of Herpes Simplex Virus type 1 or type 2. *J. Biol. Chem.* **268**, 6332-6337 (1993)
12. W.Zielenkiewicz, B.Golankiewicz, G.L.Perlovich, M.Koźbiał; Aqueous solubilities, infinite dilution activity coefficients and octanol – water partition coefficients of tricyclic analogs of acyclovir. *J. Solution Chem.* **28**, 731-745 (1999)
13. C.-H.Park, R.S.Givens; New photoactivated protecting groups. 6. p-Hydroxyphenacyl: a phototrigger for chemical and biochemical probes. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 2453-2463 (1997)
14. R.Martino, M.Malet-Martino, V.Gilard; Fluorine Nuclear Magnetic Resonance, a privileged tool for metabolic studies of fluoropyrimidine drugs. *Curr. Drug Metab.* **1**, 271-303 (2000) – praca przeglądowa
15. J.R.Barrio, M.Namavari, M.E.Phelps, N.Satyamurthy; Elemental fluorine to 8-fluoropurines in one step. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10408-10411 (1996)
16. Y.Zhang, J.Lin, D.Pan; Synthesis of a technetium 99m labeled tricyclic ganciclovir analog for non-invasive reporter gene expression imaging. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 741-744 (2007)
17. E.De Clercq, G.Andrei, R.Snoeck, L.De Bolle, L.Naesens, B.Degrève, J.Balzarini, Y.Zhang, D.Schols, P.Leyssen, C.Ying, J.Neyts; Acyclic/carbocyclic guanosine analogues as anti-herpesvirus agents. *Nucleosides Nucleotides & Nucl. Acids* **20**, 271-285 (2001) – praca przeglądowa
18. T.Sekiyama, S.Hatsuya, Y.Tanaka, M.Uchiyama, N.Ono, S.Iwayama, M.Oikawa, K.Suzuki, M.Okunishi, T.Tsuji; Synthesis and antiviral activity of novel acyclic nucleosides: discovery of a cyclopropyl nucleoside with potent inhibitory activity against Herpesviruses. *J. Med. Chem.* **41**, 1284-1298 (1998)
19. S.Iwayama, N.Ono, Y.Ohmura, K.Suzuki, M.Aoki, H.Nakazawa, M.Oikawa, T.Kato, M.Okunishi, Y.Nishiyama, K.Yamanishi; Antiherpesvirus activities of (1'S,2'R)-9-{[1',2'-bis(hydroxymethyl)-cycloprop-1'-yl]methyl}guanine (A-5021) in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1666-1670 (1998)
20. N.Ono, S.Iwayama, K.Suzuki, T.Sekiyama, H.Nakazawa, T.Tsuji, M.Okunishi, T.Daikoku, Y.Nishiyama; Mode of action of (1'S,2'R)-9-{[1',2'-bis(hydroxymethyl)-cycloprop-1'-yl]methyl}guanine (A-5021) against Herpes Simplex Virus type 1 and type 2 and Varicella-Zoster Virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2095-2102 (1998)
21. S.Iwayama, Y.Ohmura, K.Suzuki, N.Ono, H.Nakazawa, M.Aoki, I.Tanabe, T.Sekiyama, T.Tsuji, M.Okunishi, K.Yamanishi, Y.Nishiyama; Evaluation of anti-herpesvirus activity of (1'S,2'R)-9-{[1',2'-bis(hydroxymethyl)-cycloprop-1'-yl]methyl}guanine (A-5021) in mice. *Antiviral Res.* **42**, 139-148 (1999)
22. Y.Hasegawa, Y.Nishiyama, K.Imaizumi, N.Ono, T.Kinoshita, S.Hatano, H.Saito, K.Shimokata; Avoidance of bone marrow suppression using A-5021 as a nucleoside analog for retrovirus-mediated Herpes Simplex Virus type I thymidine kinase gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **7**, 557-562 (2000)
23. T.Onishi, T.Matsuzawa, S.Nishi, T.Tsuji; A practical synthesis of antiviral cyclopropane nucleoside A-5021. *Tetrahedron Lett.* **40**, 8845-8847 (1999)
24. T.Gośliński, B.Golankiewicz, E.De Clercq, J.Balzarini; Synthesis and biological activity of strongly fluorescent tricyclic analogues of acyclovir and ganciclovir. *J. Med. Chem.* **45**, 5052-5057 (2002)
25. T.Gośliński, G.Wenska, B.Golankiewicz, J.Balzarini, E.De Clercq; Synthesis and fluorescent properties of 6-(4-biphenyl)-3,9-dihydro-9-oxo-5H-imidazo[1,2-a]purine analogues of acyclovir and anciclovir. *Nucleosides Nucleotides & Nucl. Acids* **22**, 911-914 (2003)
26. J.Czaplicki, T.Bohner, A.-K.Habermann, G.Folkers, A.Milon; A transferred NOE study of a tricyclic analog of acyclovir bound to thymidine kinase. *J. Biomol. NMR* **8**, 261-272 (1996)
27. F.Amblard, E.Fromentin, M.Detorio, A.Obikhod, K.L.Rapp, T.R.McBrayer, T.Whitaker, S.J.Coats, R.F.Schinazi; Synthesis, antiviral activity, and stability of nucleoside analogs containing tricyclic bases. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 3845-3851 (2009)

28. P.Wigerinck, C.Pannecouque, R.Snoeck, P.Claes, E.De Clercq, P.Herdewijn; 5-(5-Bromothien-2-yl)-2'-deoxyuridine and 5-(5-chlorothien-2-yl)-2'-deoxyuridine are equipotent to 5-(E)-bromovinyl-2'-deoxyuridine against HSV-1. *J. Med. Chem.* **34**, 2383-2389 (1991)
29. P.Wigerinck, L.Kerremans, P.Claes, R.Snoeck, P.Maudgal, E.De Clercq, P.Herdewijn; Synthesis and antiviral activity of 5-thien-2-yl-2'-deoxyuridine analogues. *J. Med. Chem.* **36**, 538-543 (1993)
30. E.De Clercq; The next ten stories on antiviral drug discovery (part E): advents, advances and adventures. *Med. Res. Rev.* **31**, 118-160 (2010) – praca przeglądowa
31. J.Boryski; Application of the 1,N-2-isopropenoguanosine system for synthesis of novel N-2-substituted derivatives of guanosine and acyclovir. *Coll. Czech. Chem. Commun.* Special Issue 85-88 (1990)
32. K.-Y.Moon, R.C.Moschel; Effect of ionic state of 2'-deoxyguanosine and solvent on its aralkylation by benzyl bromide. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 696-702 (1998)
33. J.Boryski, T.Ueda; A new simple synthesis of N-2-methylguanosine and its analogues via derivatives of 4-desmethylwyosine (Nucleosides and nucleotides. Part 63). *Nucleosides & Nucleotides* **4**, 595-606 (1985)
34. I.Verheggen, A.Van Aerschot, S.Toppet, R.Snoeck, G.Janssen, J.Balzarini, E.De Clercq, P.Herdewijn; Synthesis and antiherpes virus activity of 1,5-anhydrohexitol nucleosides. *J. Med. Chem.* **36**, 2033-2040 (1993)
35. I.Verheggen, A.Van Aerschot, L.Van Meervelt, J.Rozenski, L.Wiebe, R.Snoeck, G.Andrei, J.Balzarini, P.Claes, E.De Clercq, P.Herdewijn; Synthesis, biological evaluation, and structure analysis of a series of new 1,5-anhydrohexitol nucleosides. *J. Med. Chem.* **38**, 826-835 (1995)
36. M.W.Andersen, S.M.Daluge, L.Kerremans, P.Herdewijn; The synthesis of modified D- and L-anhydrohexitol nucleosides. *Tetrahedron Lett.* **37**, 8147-8150 (1996)
37. M.J.Robins, P.J.Barr; Efficient conversion of 5-iodo to 5-alkynyl and derived 5-substituted uracil bases and nucleosides. *J. Org. Chem.* **48**, 1854-1862 (1983)
38. E.De Clercq, J.Descamps, G.Verhelst, R.T.Walker, A.S.Jones, P.F.Torrence, D.Shugar; Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of Herpes Simplex Virus. *J. Infect. Dis.* **141**, 563-574 (1980)
39. S.G.Rahim, N.Trevioli, J.Selway, G.Darby, P.Collins, K.L.Powell, D.J.M.Purifoy; 5-Alkynyl pyrimidine nucleosides as potent selective inhibitors of Varicella-Zoster Virus. *Antiv. Chem. Chemother.* **3**, 293-297 (1992)
40. J.Wouters, P.Herdewijn; 5-Substituted pyrimidine 1,5-anhydrohexitols: conformational analysis and interaction with viral thymidine kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 1563-1566 (1999)
41. J.-L.Ravanat, T.Douki, J.Cadet; Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **63**, 88-102 (2001)
42. J.E.Cleaver, E.Crowley; UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. *Front. Biosci.* **7**, d1024-1043 (2002) – praca przeglądowa
43. J.Butenandt, L.T.Burgdorf, T.Carell; Synthesis of DNA lesions and DNA-lesion-containing oligonucleotides for DNA-repair studies. *Synthesis* 1085-1105 (1999) – praca przeglądowa
44. E.A.Lesnik, S.M.Freier; What affects the effect of 2'-alkoxy modifications? Stabilization effect of 2'-methoxy substitutions in uniformly modified DNA oligonucleotides. *Biochemistry* **37**, 6991-6997 (1998)
45. S.S.Jones, C.B.Reese, A.Ubasawa; A convenient synthesis of 5-methyluridine from uridine. *Synthesis* 259-260 (1982)
46. D.P.C.McGee, A.Vaughn-Settle, C.Vargeese, Y.Zhai; 2'-Amino-2'-deoxyuridine via an intramolecular cyclization of a trichloroacetimidate. *J. Org. Chem.* **61**, 781-785 (1996)
47. D.P.C.McGee, Y.Zhai; Reaction of anhydronucleosides with magnesium alkoxides: regiospecific synthesis of 2'-O-alkylpyrimidine nucleosides. *Nucleosides & Nucleotides* **15**, 1797-1803 (1996)
48. A.F.Lewis, G.R.Revankar 2'-O,5-Dimethyluridine: a total synthesis and single crystal X-ray diffraction study. *J. Heterocycl. Chem.* **30**, 1309-1315 (1993)
49. G.P.H.Santini, C.Pakleza, P.Auffinger, C.Moriou, A.Favre, P.Clivio, J.A.H.Cognet; Dinucleotide TpT and its 2'-O-Me analogue possess different backbone conformations and flexibilities but similar stacked geometries. *J. Phys. Chem. B* **111**, 9400-9409 (2007)

50. S.Kim, S.W.Lee, E.-C.Choi, S.Y.Choi; Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 278-288 (2003) – praca przeglądowa
51. K.W.Pankiewicz, J.Krzeminski, L.A.Ciszewski, W.-Y.Ren, K.A.Watanabe; A synthesis of 9-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)adenine and hypoxanthine. An effect of C3'-endo to C2'-endo conformational shift on the reaction course of 2'-hydroxyl group with DAST. *J. Org. Chem.* **57**, 553-559 (1992)
52. J.Castro-Pichel, M.T.García-López, F.G.De las Heras; A facile synthesis of ascamycin and related analogues. *Tetrahedron* **43**, 383-389 (1987)
53. W.B.Parker; Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res.* **107**, 165-171 (2005) – praca przeglądowa
54. P.Leyssen, J.Balzarini, E.De Clercq, J.Neyts; The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against Flaviviruses and Paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase. *J. Virol.* **79**, 1943-1947 (2005)
55. G.R.Revankar, V.C.Solan, R.K.Robins, J.T.Witkowski; Synthesis and biological activity of certain 1,2,3-triazole carboxamide nucleosides related to bredinin and pyrazofurin. *Nucleic Acids Res. Symp. Series* **9**, 65-68 (1981)
56. K.El Akri, K.Bougrin, J.Balzarini, A.Faraj, R.Benhida; Efficient synthesis and in vitro cytostatic activity of 4-substituted triazolyl-nucleosides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 6656-6659 (2007)
57. N.Minakawa, T.Takeda, T.Sasaki, A.Matsuda, T.Ueda; Nucleosides and nucleotides. 96. Synthesis and antitumor activity of 5-ethynyl-1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives. *J. Med. Chem.* **34**, 778-786 (1991)
58. E.De Clercq, M.Cools, J.Balzarini, R.Snoeck, G.Andrei, M.Hosoya, S.Shigeta, T.Ueda, N.Minakawa, A.Matsuda; Antiviral activities of 5-ethynyl-1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide and related compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 679-684 (1991)
59. W.Wang, V.V.Papow, N.Minakawa, A.Matsuda, K.Biemann, L.Hedstrom; Inactivation of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase by the antiviral agent 5-ethynyl-1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide 5'-monophosphate. *Biochemistry* **35**, 95-101 (1996)
60. N.Joubert, R.F.Schinazi, L.A.Agrofoglio; Efficient Pd(0)-catalyzed synthesis of 1,2,3-triazolo-3'-deoxycarbannucleosides and their analogues. *Tetrahedron* **61**, 11744-11750 (2005)
61. J.Urbonavičius, L.Droogmans, J.Armengaud, H.Grosjean; Deciphering the complex enzymatic pathway for biosynthesis of wyosine derivatives in anticodon of tRNA^{Phe}. In: DNA and RNA modification enzymes: structure, mechanism, function and evolution (H.Grosjean, Ed.); pp.423-435; Landes Bioscience (2009) – praca przeglądowa
62. B.Golankiewicz, W.Folkman; Methylation of desmethyl analogue of Y nucleosides. Wyosine from guanosine. *Nucleic Acids Res.* **11**, 5243-5255 (1983)
63. H.Bazin, X.-X. Zhou, C.Glemarec, J.Chattopadhyaya; An efficient synthesis of Y nucleoside (wyosine) by regiospecific methylation of N⁴-desmethylwyosine using organozinc reagent. *Tetrahedron Lett.* **28**, 3275-3278 (1987)
64. J.Boryski, W.Folkman, B.Golankiewicz; A novel route to 3-methylguanosine by chemical degradation of wyosine. *Tetrahedron Lett.* **29**, 4163-4164 (1988)
65. R.F.Newbold, W.Warren, A.S.C.Medcalf, J.Amos; Mutagenicity of carcinogenic methylating agents is associated with a specific DNA modification. *Nature* **283**, 596-598 (1980)
66. D.M.Brown, P.Kong Thoo Lin; Synthesis and duplex stability of oligonucleotides containing adenine-guanine analogues. *Carbohydr. Res.* **216**, 129-139 (1992)
67. F.Seela, P.Leonard; Studies on the base-pairing properties of N⁷-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)guanine (N⁷G_d). *Helv. Chim. Acta* **80**, 1301-1317 (1997)

X KOMUNIKATY KONFERENCYJNE: 27 (spis znajduje się w załączniku 5)
 a/ 15 komunikatów na konferencjach międzynarodowych
 b/ 12 komunikatów na konferencjach krajowych

XI RECENZJE PRAC: *Bioorg. Med. Chem.* (2011); IF (2011) = 2.921

XII WYKŁADY I WYSTĄPIENIA USTNE

- wystąpienia na seminariach Zakładu (Instytutu) Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu (1987, 1991, 1993, 1997, 2001, 2003, 2005, 2009), seminarium Instytutu Roślin i Przetworów Zielarskich w Poznaniu (1987) i seminarium w Institute of Organic Synthesis, Latvian Academy of Sciences, Riga, Łotewska SRR, ZSRR (1989)
- wystąpienie na Zjeździe PTCh i SITPCh, Białystok (1992)

XIII DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA

- opieka nad studentami Tomaszem Goślińskim i Danielem Baranowskim z Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Poznaniu, przygotowującymi się do wykonywania pracy magisterskiej w IChB PAN (1994-1996)
- opieka nad doktorantem mgr Danielem Baranowskim (1997-1999)
- funkcja promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim mgr inż. Anny Krajczyk (2013)

XIV UDZIAŁ W KRAJOWYCH PROJEKTACH BADAWCZYCH

- grant KBN 2 2608 92 03 (1.08.1992-31.07.1994)
„Analiza konformacyjna modyfikowanych nukleozydów. Dalsze prace nad graficzną metodą określania *syn-anti* orientacji zasady względem cukru w oparciu o różnicową spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego 1D ^1H NOE”
kierownik: prof. dr hab. B.Golankiewicz
charakter udziału: wykonawca
- grant KBN 4 PO5F 030 08 (1.01.1995-31.12.1997)
„Modyfikacja struktury leków przeciwwirusowych, acyklowiru i gancyklowiru, dla rozszerzenia zakresu ich stosowalności”
kierownik: prof. dr hab. B.Golankiewicz
charakter udziału: wykonawca
- grant KBN 4 PO5F 005 16 (1.01.1999-31.12.2001)
„Synteza drugiej generacji acyklonukleozydów tricyklicznych dla potrzeb terapii przeciwwirusowej i genowej terapii przeciwnowotworowej”
kierownik: prof. dr hab. B.Golankiewicz
charakter udziału: główny wykonawca
- grant PBZ-KBN 059/T09 (1.09.2002-31.08.2005)
„Kwasy nukleinowe jako potencjalne terapeutyki”
zadanie nr 18: „Przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe analogi guanozyny zawierające integralne znaczniki niepromieniotwórcze”
kierownik: prof. dr hab. B.Golankiewicz
charakter udziału: główny wykonawca
- grant MNiSW N N405 2516 33 (1.09.2007-31.08.2010)
„Nukleozydy i pronukleotydy pochodnych 1,2,3-triazolu jako prekursorzy inhibitorów dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny”
kierownik: dr hab. J.Zeidler
charakter udziału: wykonawca

XV NAJWAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘCIA ZAWARTE W PUBLIKACJACH CYKLU HABILITACYJNEGO

- Przeprowadziłem syntezę 29 tricyklicznych analogów acyklowiru, gancyklowiru i 9- $\{[cis-1',2'-bis(hydroksymetylo)cykloprop-1'-ylo]metylo\}$ guaniny, z przeznaczeniem do badań *in vitro* pod kątem aktywności przeciwko herpeswirusom oraz właściwości cytostatycznych w eksperymentach genowo-chemicznej terapii nowotworów. W oparciu o wyniki testów określiłem zależność pomiędzy strukturą związków a ich czynnością biologiczną.
- Zdefiniowałem wpływ podstawnika w dobudowanym pierścieniu 1,N²-etenoacyklowiru i 1,N²-etenoguanozyny na kierunek alkilowania i aralkilowania w warunkach zasadowych. Opracowałem metodę otrzymywania 3-benzyloacyklowiru.
- Zsyntetyzowałem 7 nukleozydów 1,5-anhydro-2,3-dideoksy-D-arabinoheksitolu, analogów 5-podstawionej 2'-deoksyurydyny. Nowe związki posłużyły do testów przeciwwirusowych, a jeden z nich również do badań strukturalnych w kompleksie z kinazą tymidynową HSV-1.
- W rezultacie wieloetapowej syntezy otrzymałem 2'-O,5-dimetylourydylo(3'-5')-2'-O,5-dimetylourydyne, modelowy, imitujący A-DNA substrat dla reakcji fotochemicznej.
- Przeprowadziłem syntezę 5 analogów L-aminoacylo-AMP jako potencjalnych inhibitorów syntetaz aminoacylo-tRNA. Przygotowane 5'-O-[N-(L-aminoacylo)sulfamilo]-2'-fluoro-adenozyny wykazały *in vitro* interesującą czynność przeciwbakteryjną i immunosupresyjną.
- Zsyntetyzowałem 5-etynylo-1- β -D-rybofuranozylo-1H-[1,2,3]triazolo-4-karboksyamid oraz trzy jego 5-alkinyłowe analogi. Jako potencjalne prekursory inhibitorów dehydrogenazy 5'-monofosforanu inozyny, związki te zostały poddane badaniom na cytotoksyczność wobec nowotworowych linii komórkowych, a także na aktywność przeciwko ortomyksowirusom i paramyksowirusom.

Tomasz Ostrowski