

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA MODYFIKOWNYCH NUKLEOZYDÓW. CZĘŚĆ II

BIOLOGICAL ACTIVITY OF MODIFIED NUCLEOSIDES. PART II

Maurycy Szlenkier

*Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
ul. Z. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
e-mail: mszlenk@ibch.poznan.pl; maurycy.szlenkier@gmail.com*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Aktywność biologiczna pochodnych 2',3'-dideoksyrybonukleozydów
2. Aktywność biologiczna pochodnych 2' lub 3'-deoksyrybonukleozydów
3. Aktywność biologiczna pochodnych alkilowanych w pozycji 2'

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr inż. Maurycy K. Szlenkier w roku 2009 ukończył jednolite studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej na kierunku biotechnologia. W 2008 r. odbył staż w Departamencie Biogeochemii Izotopowej Centrum Badań Środowiskowych im. Helmholtza w Lipsku. Od 2010 r. do 2016 r. był uczestnikiem Środowiskowego Studium Doktoranckiego przy Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, następnie został zatrudniony w Zakładzie Chemii Nukleozydów i Nukleotydów IChB PAN. Pracę doktorską z zakresu chemii nukleozydów wykonał pod kierunkiem prof. dr hab. Jerzego Boryskiego. Specjalność – synteza pochodnych nukleozydów. Zainteresowania naukowe: chemia bioorganiczna, chemia medyczna, modelowanie molekularne, CADD – *computer asisted drug design*.

ABSTRACT

Part II of the review describes biological activities of nucleosides modified in the position 2' and/or 3' of a sugar moiety including 2'- and/or 3'-deoxy, 2',3'-dideoxydidehydro and 2'- β -C-methylated derivatives. Analogues with a changed configuration in the sugar residue and others sugar modifications will be a subject of the part III of the review. Together with the part I it would be a short but possibly comprehensive review of nucleosides' biological activities. In the group of analogues modified in the position 2' and/or 3' of the sugar moiety the following derivatives among others are listed: AZT (zidovudine) – one of the key nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), which are the core of highly active antiretroviral therapy (HAART) against virus HIV; didanosine (ddI) – another potent NRTI with medical importance; stavudine – FDA approved NRTI; zalcitabine – historically important NRTI, however, because of a high mitochondrial toxicity is no longer in use; puromycin – a wide spectrum antibiotic which causes premature chain termination during translation, isolated from *Streptomyces alboniger*; gemcitabine – chemotherapy medication developed by Eli Lilly and Company and used to treat ovarian, breast, pancreas, bladder cancer and non-small cell lung carcinoma; cordycepin – the most intriguing analogue extracted from *Cordyceps sp.* known to traditional Chinese medicine (TCM) for centuries, possessing multi-activity against different cancer types; cladribine – used in the treatment of chronic lymphocytic leukemia, cutaneous T-cell lymphoma, hairy cell leukemia and non-Hodgkin's lymphomas; valopicitabine – a prodrug form of 2'-C-methylcytidine, which was a promising HCV treatment agent, however, it was held during clinical trials and finally sofosbuvir developed by M.J. Sofia from Pharmasset Inc. – a ProTide prodrug form of 2'-deoxy-2'-fluoro- β -C-methyluridine 5'-monophosphate, which revolutionized HCV infection therapy.

Keywords: modified nucleosides, biological activity, molecular targets, mechanism of action

Słowa kluczowe: nukleozydy modyfikowane, aktywność biologiczna, cele molekularne, mechanizm działania

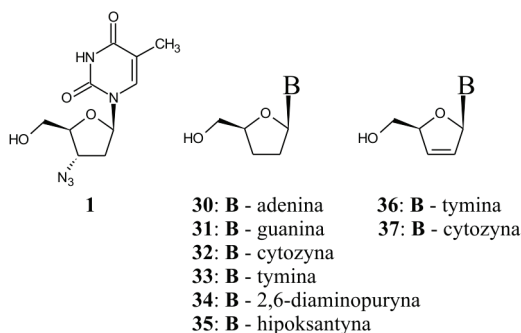
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADA	– deaminaza adenozykowa
AIDS	– zespół nabytego niedoboru odporności
AZT	– 3'-azydo-3'-deoksytymidyna, zydowudyna
AZT-TP	– trifosforan AZT
CC ₅₀	– stężenie cytotoksyczne
cDNA	– komplementarna nić DNA
CMV	– <i>Cytomegalovirus</i>
dCK	– kinaza 2'-deoksytydynowa
ddA	– dideoksyadenozyna
ddC	– 2',3'-dideoksytydyna
ddG	– 2',3'-dideoksyguanozyna
ddI	– didanozyna
DHBV	– <i>Duck Hepatitis B virus</i>
EC ₅₀	– stężenie efektywne
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
HCV	– <i>Hepatitis C virus</i>
HIV-RT	– odwrotna transkryptaza wirusa HIV
IC ₅₀	– stężenie inhibitorowe
NDP	– difosforan nukleozydowy
NRTI	– nukleozydowy inhibitor odwrotnej transkryptazy
RdRp	– polimeraza RNA zależna od RNA
RT	– odwrotna transkryptaza
SAR	– <i>structure activity relationship</i>
VSV	– <i>Vesicular stomatitis virus</i>

WPROWADZENIE

Poniżej zaprezentowano ciąg dalszy przeglądu aktywności biologicznych pochodnych nukleozydowych. W tej części opisano pochodne posiadające modyfikacje w pozycji 2' i/lub 3' należące do grup deoksynukleozydów oraz pochodnych 2'-alkilowanych. Ze względu na temat rozprawy doktorskiej, której ten przegląd towarzyszy, pochodne modyfikowane w pozycjach 2' i 3' zostały opisane ze szczególną uwagą. W założeniu przegląd ma zaprezentować wszystkie najważniejsze grupy pochodnych z wyszczególnieniem reprezentantów, którzy znaleźli zastosowanie w medycynie. Część II przeglądu obejmuje wiele istotnych pochodnych ze względu na poważne i ciężkie choroby w których leczeniu są lub mogą być przydatne np.: AZT, didanozyna, zalcytabina, gemcytabina, stawudyna, kordycepina i sofosbuwir. Opis aktywności starano się przedstawić zwięźle, jednak z odniesieniami do mechanizmów działania oraz danych farmakodynamicznych i farmakokinetycznych.

1. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA POCHODNYCH 2', 3'-DIDEOKSYRYBONUKLEOZYDÓW



Rysunek 1.1. Niektóre 2',3'-dideoksynukleozydy

Figure 1.1. Examples of 2',3'-dideoxynucleosides

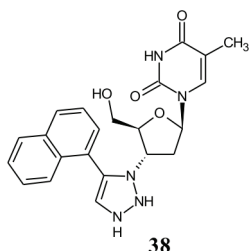
Nukleozydy modyfikowane w pozycjach 2' i 3' są znane od wielu lat i obejmują wiele ważnych analogów o wyjątkowych aktywnościach biologicznych. W tej grupie można wymienić analogi 2',3'-dideoksy (**30**, **31**, **32**, **33**, **34**, **35**, Rys. 1.1.), które są pozbawione obu grup hydroksylowych, analogi 2',3'-dideoksydidehydro (**36**, **37**), które posiadają wiązanie podwójne między atomami C-2' i C-3', analogi 2',3'-dideoksy posiadające dodatkowe podstawniki w pozycjach 2' i/lub 3' zamiast grup hydroksylowych np. AZT (**1**), analogi o zmienionej konfiguracji grup hydroksylowych (część III) oraz analogi posiadające dodatkowe podstawniki obok grup hydroksylowych. Są to związki ukierunkowane w swym działaniu głównie przeciw

retrowirusom. Retrowirusy, jak to było wspomniane w części I przeglądu, posiadają kodowany przez siebie enzym – odwrotną transkryptazę, która przepisuje wirusowe RNA na dwuniciowe DNA, które następnie ulega ekspresji w komórce gospodarza. Toteż inhibitory odwrotnej transkryptazy (enzymu) jak i inhibitory odwrotnej transkrypcji (procesu) – terminatory elongacji łańcucha nukleinowego, stanowią skuteczną metodę hamowania replikacji wirusa.

Aby efekt inhibitorowy został osiągnięty, konieczna jest fosforylacja analogów nukleozydowych do odpowiednich trifosforanów. Retrowirusy nie posiadają własnej kinazy nukleozydowej, dlatego proces fosforylacji musi zachodzić dzięki kinazom komórkowym, co od razu niesie ze sobą ograniczenie selektywności działania i zwiększenie toksyczności preparatu. Fosforylacja analogów nukleozydowych przez kinazy komórkowe zachodzi z małą wydajnością i jest to często etap limitujący ich transformację do trifosforanów. Zależy to od konkretnego organizmu i konkretnego nukleozydu. Np. w komórce ludzkiej AZT (1, zydowudyna, Retrovir®) jest w małym stopniu przekształcana do difosforanu i kumuluje się w komórce w postaci monofosforanu, który powstaje relatywnie łatwo [1]. Gdy już ulegnie pełnej fosforylacji działa skutecznie jako inhibitor kompetencyjny enzymu i terminator transkrypcji ze względu na brak grupy 3'OH. Jak już pisano wcześniej, AZT posiada wysoką aktywność przeciw wirusowi HIV-1. Wystarczy przytoczyć kilka parametrów: stała inhibicji AZT-TP wobec HIV-RT typu dzikiego wyniosła $K_i = 0,0075 \pm 0,003$ mM, wobec ludzkiej polimerazy α $K_i > 100$ mM, a wobec polimerazy β $K_i = 40 \pm 5$ mM, efektywne stężenie AZT w linii komórkowej zainfekowanej wirusem wyniosło $EC_{50} = 0,004$ μ M, przy cytotoksyczności określonej na poziomie $CC_{50} > 100$ μ M [2]. Wartości parametrów różnią się w zależności od stosowanej linii komórkowej. Jednak wszystkie wskazują na wysoką aktywność preparatu, a także zadowalającą biodostępność i lipofilowość pozwalającą na przenikanie bariery krew-mózg. Centralny układ nerwowy, czyli mózg, płyn mózgowy oraz płyn rdzeniowo-mózgowy uznaje się za rezerwuuar wirusa w późniejszych stadiach choroby, co utrudnia jego eradykację [3]. AZT doczekało się wprowadzenia do leczenia, jednak przy długotrwałym stosowaniu klinicznym ujawniają się efekty uboczne i trzeba uznać AZT za związek toksyczny [4]. Toksyczność AZT dotyczy głównie problemów hematologicznych jak niedokrwistość makrocytowa, leukopenia i neutropenia. Przy dłuższym stosowaniu może objawić się miopatia – choroba mięśniowa, spowodowana zmniejszoną ilością mitochondrialnego DNA w komórkach mięśni oraz supresją szpiku kostnego. Podawaniu AZT towarzyszą czasami także bezsenność, mdłości i bóle głowy. Dodatkowo, już po 6 miesiącach terapii można zaobserwować uodpornienie się wirusa [5].

Jednym z mechanizmów odporności wirusa HIV-1 na działanie AZT (także innych nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy – NRTI) jest zdolność sprawnego wycinania AZT-MP (monofosforan AZT) przez RT z końca syntezowanej nici. Reakcja ta może zajść jedynie wtedy, gdy powstający oligonukleotyd zakończony AZT-MP jest związany w miejscu wiązania nukleotydu (miejsce wiązania N, pretranslokacyjne miejsce wiązania), a nie w miejscu wiązania P (miejsce wiązania posttranslokacyjne, ang. *priming site*), do którego syntezowana nic jest

przenoszona, aby zwolnić miejsce wiązania kolejnego dNTP [6, 7]. Wirus HIV-1 odpowiada za 95% zakażeń na świecie. Wirus HIV-2 występuje głównie w Afryce zachodniej i w pozostałych częściach świata jego występowanie jest znikome. Pamiętać należy jednak, że niektóre leki nienukleozydowe wiążące się allosterycznie do HIV1-RT mogą być nieskuteczne wobec HIV-2.



Rysunek 1.2. Triazolowa pochodna AZT

Figure 1.2. The triazole derivative of AZT

Dzięki wspomnianej w części I reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydku z alkinami w 2013 r. otrzymano serię pochodnych AZT posiadających w pozycji 3' 1,2,3-triazol podstawiony w pozycji 5 dużymi pierścieniami aromatycznymi [8]. Choć wcześniejsze prace w tym kierunku wskazywały na utratę aktywności w wyniku zamiany grupy azydkowej na 1,2,3-triazol, jednak w tej pracy wykazano, że mogą one posiadać ciekawe właściwości. Związek **38** (Rys. 1.2.) posiada $EC_{50} = 0,067 \mu\text{M}$ względem wirusa HIV-1 oraz $CC_{50} = 61 \mu\text{M}$. Przy czym wykazuje zwiększoną odporność na usuwanie przez RT, co może wynikać z szybszej translokacji syntezowanej nici cDNA do miejsca P.

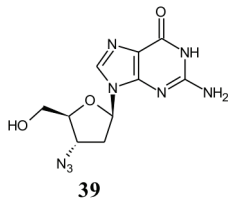
Didanozyna (ddI, 2',3'-dideoksyinozyna, Videx®, **35**) [4, 9, 10] została dopuszczona do leczenia na początku lat dziewięćdziesiątych jako drugi po AZT lek przeciw wirusowi HIV. Można go podawać osobom o zwiększonej nietolerancji AZT, chociaż również posiada właściwości toksyczne i może powodować np. neuropatię obwodową. Mechanizm działania polega także na terminacji transkrypcji wirusowego RNA i wymaga uprzedniej fosforylacji do trifosforanu. Aktywność *in vitro* ddI plasuje się na poziomie $IC_{50} = 0,01\text{--}10 \mu\text{M}$ w zależności od użytej linii komórkowej. Didanozyna ulega wewnątrz komórki fosforylacji do monofosforanu (ddI-MP) i następnie wykorzystując enzymy zaangażowane w biosyntezę nukleotydów *de novo* oraz enzymów tzw. szlaku rezerwowego (ang. *nucleotide salvage pathway*; inaczej „szlak ratunkowy”) jest przeprowadzana do trifosforanu dideoksyadenozyny (ddA-TP), który jest dopiero związkiem aktywnym. Za to ddA (**30**) jest łatwo przekształcane wewnątrzkomórkowo w ddI poprzez działanie deaminazy adenozynowej (ADA) również należącej do szlaku rezerwowego. Z tego względu można uważać ddI i ddA za formy alternatywne, jednak ddI cechuje się lepszą biodostępnością w podaniu ustnym. Didanozyna nie należy do leków o szerokim spektrum aktywności, posiada dłuższy od AZT czas półtrwania

w komórce i stosunkowo wysoki indeks selektywności w stosunku do innych dideoksynukleozydów. Przy okazji można wspomnieć, że ddA zgłoszono również jako związek aktywny przeciw różnym bakteriom gram ujemnym *in vitro*, a także *in vivo* w zainfekowanych myszach [11].

2',3'-Dideoksycytydina (zalcytabina, ddC, Hivid®, **32**) [4, 9, 12] jest kolejnym typowym przykładem nukleozydowego inhibitora odwrotnej transkryptazy (NRTI). Zsyntezowana w 1967 roku przez Horwita i in., w roku 1992 została dopuszczona w USA do leczenia jako trzeci NRTI w historii. Aktywność ddC *in vitro* przeciw wirusowi HIV-1 w badaniach prowadzonych przez zespół Perno i in. [13] wyniosła $IC_{95} = 0,01 \mu\text{M}$. W tym konkretnym układzie wykazała wyższą aktywność od AZT ($IC_{95} = 0,05 \mu\text{M}$). W innych badaniach ddC okazała się być nawet 10-krotnie bardziej aktywna. Także biodostępność jest lepsza, bo wynosi 87%. Stwierdzono również zdolność przenikania bariery krew-mózg. Aktywną formą związku jest jego trifosforan, który powstaje poprzez działanie enzymów: dCK (kinaza deoksycytydynowa), kinazy CMP (cytydynomonofosforanowa, cytydylowa) oraz kinazy NDP. Niestety ddC również posiada poważne właściwości toksyczne. Chociaż nie stwierdzono toksyczności hematologicznej jak w przypadku AZT, ale przy dawkach powyżej 0,09 mg/kg i przy dłuższym stosowaniu pojawia się bolesna neuropatia obwodowa oraz kardiomiopatia. Stosowaniu ddC towarzyszą także czasami wykwity skórne, wrzody, gorączka, zapalenie trzustki. Jednym ze stwierdzonych mechanizmów cytotoksycznych zalcytabiny jest inhibicja mitochondrialnej polimerazy γ przez jej trifosforan [14]. 2',3'-Dideoksycytydina wchodzi często w interakcje z innymi lekami antyretrowirusowymi, co utrudnia jej stosowanie w terapii. Zalcytabina posiada szersze działanie antyretrowirusowe. W 1987 roku Dahlberg i in. [15] wykazali, że ddC jest także skuteczna w hamowaniu rozwoju lentiwirusów (rodzaj wirusów z rodziny renowirusów) osiągając spadek miana wirusowego CAEV (wirus zapalenia stawów i mózgu kóz) o pięć rzędów wielkości już przy stężeniu 1,5 μM . Trifosforan ddC posiada też pewną aktywność przeciw wirusowi VSV [16]. W 2006 roku Hivid® został wycofany z użycia.

2',3'-Dideoksygwanozyna (**31**) wykazuje podobną aktywność przeciw wirusowi HIV-1 jak ddA (**30**) [9, 17, 18]. Zgłoszono również relatywnie wysoką aktywność przeciw wirusowi Visna [19] na poziomie $IC_{50} = 0,1 \mu\text{M}$. Wirus Visna należy także do lentiwirusów i w pewnym okresie był stosowany jako model w badaniach związków na aktywność antyretrowirusową. Na tej samej zasadzie określono aktywność ddG przeciw kaczemu wirusowi zapalenia wątroby typu B (DHBV), który jest modelem dla ludzkiego HBV. Okazało się, że jest równie wysoka [20]. W badaniach przeprowadzonych przez Wu i in. stała inhibicji trifosforanu ddG wobec HIV1-RT wyniosła $K_i = 0,009 \mu\text{M}$, a wobec SIV-RT (odwrotna transkryptaza małego wirusa niedoboru odporności) 0,011 μM , co w tym badaniu było lepszym wynikiem niż dla AZT-TP [21]. Jednak ddG nie doczekała się badań klinicznych i dopuszczenia do leczenia. Podobny los spotkał 3'-azydo-2',3'-dideoksygwanozynę (**39**, Rys. 1.3.). Wstępne badania wykazały selektywną inhibicję replikacji wirusa HIV *in vitro* na

poziomie $IC_{50} = 1,4 \mu M$, jednak związek ten nie przeszedł dalszych etapów badań [22].

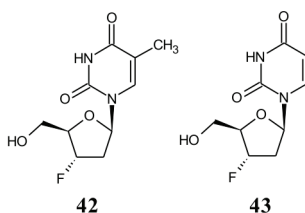


Rysunek 1.3. Struktura 3'-azydo-2',3'-dideoksyguanozyny
Figure 1.3. The structure of 3'-azido-2',3'-dideoxyguanosine

2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxymidyna (stawudyna, d4T, Zerit®, **36**) jest kolejnym ważnym związkiem z grupy NRTI. Została zsyntezowana już w 1964 przez Horwita i in. [23]. Tak samo jak AZT, stawudyna mogła wykazać swoją przydatność dopiero 20 lat później, gdy wybuchła epidemia AIDS. W 1994 roku FDA (ang. *Food and Drug Administration*) dopuściła stawudynę do leczenia tej choroby. Lek posiada wysoką biodostępność przy podaniu ustnym oraz korzystny profil farmakokinetyczny. Tak samo jak w przypadku pozostałych NRTI, aktywną formą związku jest jego trifosforan, który powstaje dzięki działaniu kinaz komórkowych. Trifosforan stawudyny inhibuje HIV1-RT konkurując z naturalnym trifosforanem tymidyny ($K_i = 0,0083-0,032 \mu M$) i powoduje terminację powstającego łańcucha nukleinowego wirusowego DNA. Trifosforan stawudyny, podobnie jak w przypadku pozostałych NRTI, inhibuje polimerazę γ oraz znacząco obniża ilość mitochondrialnego DNA. Aktywność *in vitro* stawudyny badano w różnych układach komórkowych i stężenie efektywne w przeprowadzonych badaniach mieściło się w przedziale $EC_{50} = 0,009-4 \mu M$. Badania wykazały też synergistyczne efekty stosowania stawudyny razem z innymi NRTI jak abakawir (**40**, Część III), didanozyna (**35**), tenofowir (**41**, Część III) i zalcytabina (**32**). Rybawiryne (**20**, Część I) za to obniżyła aktywność stawudyny 2–5 krotnie, a zydowudyna (AZT, **1**) hamowała fosforylację opisywanego leku. Stawudyna nie jest pozbawiona działań niepożądanych. W badaniach klinicznych stwierdzono występowanie neuropatii obwodowej, hepatotoksyczności, nudności, biegunki, leukopenii i wielu innych objawów, tak że można stwierdzić, że stawudyna jest dość toksycznym lekiem. Podobnie jak w przypadku innych NRTI, po pewnym czasie stosowania wirus wypracowuje sobie odporność na lek [25–28].

W części I przeglądu aktywności biologicznych pochodnych nukleozydowych wspomniano kilkukrotnie struktury posiadające w różnych miejscach podstawnik fluorowy. Nie jest to kwestią przypadku, ponieważ obecność atomu fluoru lub grupy trifluorometylowej w analogach naturalnie występujących związków organicznych często prowadzi do uzyskania ciekawych aktywności biologicznych. Wynika to z faktu, że podstawnik fluorowy potrafi imitować zarówno grupę hydroksylową oraz atom wodoru, wprowadzając jednocześnie duże zmiany w rozkładzie gęstości

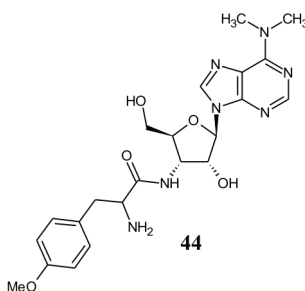
elektronowej. Podobieństwo do wodoru wynika ze zbliżonej wielkości promienia atomowego, więc podstawienie atomu wodoru atomem fluoru nie wprowadza wyraźnej zmiany sterycznej. Podobieństwo do grupy hydroksylowej z kolei wynika z faktu, że długość wiązania C-F (1,35 Å) jest podobna do długości wiązania C-O (1,43 Å). Atom fluoru stanowi dla grupy hydroksylowej tzw. izopolarny i izosteryczny zamiennik, więc mechanizmy rozpoznające substraty w organizmach żywych często dają się oszukać [29]. Idąc tym tropem zbadano aktywność anti-HIV dwóch analogicznych pod względem strukturalnym do AZT związków – 3'-fluoro-3'-deoksytymidyny (FddT, **42**, Rys. 1.4.) i 3'-fluoro-2',3'-dideoksyurydyny (FddU, **43**). Nie można ich pominąć w przeglądzie, ponieważ posiadają bardzo korzystny profil aktywności *in vitro* z ED_{50} wynoszącym odpowiednio 0,001 μM i 0,04 μM oraz $SI = 197$ (**42**) i $SI = 400$ (**43**) [30].



Rysunek 1.4. Struktury FddT i FddU

Figure 1.4. The structures of FddT and FddU

2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA POCHODNYCH 2' LUB 3'-DEOKSYRYBONUKLEOZYDÓW



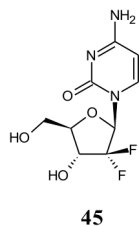
Rysunek 2.1. Struktura puromycyny

Figure 2.1. The structure of puromycin

Kolejnym przykładem nukleozydów modyfikowanych w układzie *cis*-diolowym jest puromycyna [31] (**44**, Rys. 2.1.) – 3'-modyfikowana pochodna adenozy. Jest związkiem aktywnym przeciwnowotworowo i przeciwbakteryjnie, którego skuteczną metodę syntezy opracowali Takatsuki i in. [32]. Puromycyna jest anti-

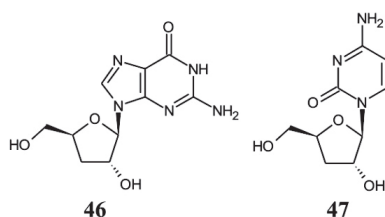
biotykiem pochodzenia naturalnego uzyskanym ze szczepu *Streptomyces alboniger*. Powoduje przedwczesną terminację łańcucha peptydowego w czasie translacji. Część cząsteczki przypomina koniec 3' tRNA połączonego z aminokwasem, dlatego zajmuje miejsce A w rybosomie, ulega transferowi do powstającego łańcucha peptydowego powodując jego przerwanie. Puromycyna jest aktywna zarówno wobec komórek prokariotycznych jak i eukariotycznych, dlatego zapewne nie znalazła zastosowania w medycynie. Wykazuje także działanie inhibitorowe wobec różnych enzymów jak np. proteaza serynowa.

W latach 80. XX wieku w laboratorium firmy Eli Lilly w zespole Hertela otrzymano serię nukleozydów 2'-deoksy-2'-difluororybofuranosylowych, z których pochodna cytydyny – gemcytabina (45, Gemzar®, Rys. 2.2.) [33] okazała się być najbardziej interesująca ze względów medycznych. W latach 90. chlorowodorek gemcytabiny został dopuszczony do użycia w USA i UK w leczeniu raka jajników, piersi, trzustki, pęcherza moczowego oraz niedrobnokomórkowego raka płuc. Lek ten był i jest przedmiotem wielu badań klinicznych zarówno w układzie z innymi lekami jak i osobno oraz tysięcy publikacji naukowych. Jest to typowy cytostatyk, który zabija wszystkie komórki w trakcie podziału. Komórki nowotworowe dzielą się szybciej i częściej, dlatego lek ten wykazuje większą toksyczność względem guzów nowotworowych niż zdrowych tkanek. Jednak zdrowe komórki np. skóry, śluzówki żołądka, szpiku kostnego również dzielą się szybko, dlatego podawanie gemcytabiny wiąże się z wieloma ciężkimi objawami ubocznymi: mielosupresją szpiku, krwiomoczem, wymiotami, bólem, gorączką, zaparciami, zmęczeniem, chorobami skóry i in. Formami aktywnymi leku są difosforan i trifosforan, które powstają w komórce na skutek działania odpowiednich kinaz. Difosforan oddziałuje z reduktazą rybonukleotydową (RNR) ze szlaku biosyntezy nukleotydów *de novo*. Trifosforan z kolei jest rozpoznawany przez polimerazy α i ϵ odpowiedzialne za replikację DNA [34] dzielącej się komórki w fazie S. Po wbudowaniu gemcytabiny do DNA następuje przyłączenie jeszcze jednego nukleotydu po czym następuje przerwanie syntezy DNA i apoptoza komórki [35–37]. Krótki czas półtrwania leku spowodowany działaniem deaminazy cytydynowej wymaga dużych dawek. Hydrofilowość związku uniemożliwia bierną dyfuzję przez błonę komórkową, transport zachodzi tylko dzięki odpowiednim transporterom nukleozydowym, co może prowadzić z czasem do pojawienia się oporności na lek. Aby obejść te problemy podjęto wiele wysiłków opracowania lepszych metod dostarczenia leku: polimerowe nanocząsteczki, liposomy, nanorurki węglowe, formy prolekowe maskujące pozycję N⁴ cytozyny. Dotychczasowe doniesienia wskazują na skuteczność tych starań, poprawę biodostępności, efektywności terapeutycznej oraz ograniczenie efektów ubocznych [38, 39].

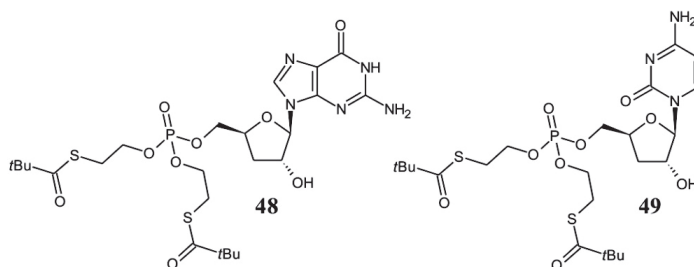


Rysunek 2.2. Struktura gemcytabiny
Figure 2.2. The structure of gemcitabine

W tym rozdziale można również wspomnieć o 3'-deoksyguanozynie (**46**, Rys. 2.3.) oraz 3'-deoksytydynie (**47**). Ich trifosforany, choć bardzo proste w swej strukturze, również posiadają pewne aktywności np. przeciw wirusowi HCV. Na poziomie badań enzymatycznych posiadają one IC_{50} równe odpowiednio $0,6 \mu\text{M}$ oraz $1,2 \mu\text{M}$ względem wirusowej RNA zależnej polimerazy RNA (RdRp). Jednak w teście względem subgenowego replikonu HCV w linii komórkowej HBI10A zarówno nukleozydy jak i ich trifosforany nie wykazały żadnych aktywności. Otrzymano jednak, bazując na wcześniejszych pracach Gosselina i Imbacha [40], prolektowe *S*-acylo-2-tioetylowe pochodne estrowe odpowiednich monofosforanów – 5'-SATE-3'-deoxy-G (**48**, $EC_{50} = 23 \mu\text{M}$, Rys. 2.4.) oraz 5'-SATE-3'-deoxy-C (**49**, $EC_{50} = 1,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$) [41], które wykazały aktywność przy braku cytotoksyczności. Tak przygotowane obojętne estry monofosforanów przedostają się do komórki dużo łatwiej dzięki biernej dyfuzji transbłonowej. Wewnątrz komórki ulegają hydrolizie do monofosforanów, które następnie zostają fosforylowane przez odpowiednie kinazy komórkowe. Pozwala to na ominięcie limitującego etapu pierwszej fosforylacji omawianych nukleozydów w komórce. Badania te, ze względu na dostępność innych lepszych terapeutyków, nie doczekały się kontynuacji.



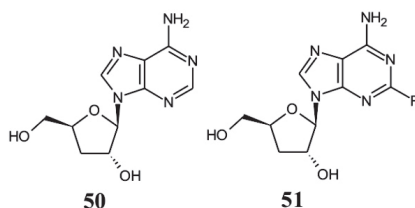
Rysunek 2.3. Struktura 3'-deoksyguanozyny i 3'-deoksytydyny
Figure 2.3. The structures of 3'-deoxyguanosine and 3'-deoxycytidine



Rysunek 2.4. Struktury pochodnych *S*-acylo-2-tioetylowych monofosforanów 3'-deoksyguanozyny oraz 3'-deoksytydyny

Figure 2.4. The structures of 3'-deoxyguanosine and 3'-deoxycytidine *S*-acyl-2-thioethyl monophosphates

Obok 3'-deoksyguanozyny oraz 3'-deoksytydyny należy wspomnieć również o 3'-deoksyadenozynie, czyli kordycepinie (**50**, Rys. 2.5.). Jakkolwiek struktura tego nukleozydu jest bardzo prosta, jednak zaskakuje on swoimi możliwościami oraz historią. Kordycepina (ang. *cordycepin*) po raz pierwszy została otrzymana z sfermentowanego ekstraktu grzyba *Cordyceps militaris*, co zostało opisane w *Nature* w 1950 r. [42]. Fakt ten miał znaczenie, ponieważ ekstrakty z grzybów rodzaju *Cordyceps* (zwłaszcza *C. militaris* i *C. sinensis*) są znane od setek lat w tradycyjnej medycynie chińskiej jako środki zwiększające odporność, libido, dodające sił fizycznych, intelektualnych oraz poprawiające nastrój. Zgłoszono ponad 30 bioaktywności preparatów z *Cordyceps sp.* jak immunomodulacja, aktywność antynowotworowa, przeciwzapalna i antyoksydacyjna. Aktywności te wynikają z obecności ponad 20 aktywnych biologicznie składników np.: polisacharydów, adenozyzny, manitolu, steroli, kordyminy, myriocyny, melaniny, lowostatyny, kwasu γ -aminomasłowego (GABA), kordysyny oraz kordycepiny [43, 44].



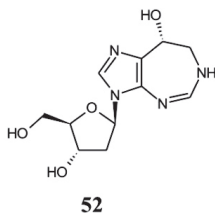
Rysunek 2.5. Struktura kordycepiny i jej pochodnej fluorowej

Figure 2.5. The structures of cordycepin and its fluorine derivative

Kordycepina była przedmiotem setek badań i publikacji naukowych. Wykazano w nich szereg istotnych aktywności np. hamowanie biosyntezy puryn przez inhibicję odpowiednich enzymów przez łatwo powstające w komórce formy mono-, di- i trifosforanowe; selektywną terminację biosyntezy RNA/DNA przez trifosforan kordycepiny; prawdopodobne hamowanie szlaku sygnałowego mTOR regulującego cykl komórkowy; indukcję apoptozy w komórkach raka jelita grubego (SW480) przez wzmocnienie ekspresji białek JNK, kinazy p38 oraz Bcl-2; indukcję apop-

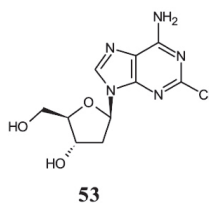
toży w komórkach raka piersi (MDA-MB-231) przez zwiększony transport białka Bax do mitochondrium; indukcję apoptozy komórek białaczki (U937, THP-1), komórek czerniaka (SK-Mel-2) i komórek nerwiaka zarodkowego (SK-NBE(2)-C) przez aktywację kaspaz; hamowanie przerzutów przez obniżenie poziomu ekspresji metaloproteaz odpowiedzialnych za degradację macierzy pozakomórkowej; hamowanie agregacji płytek krwi wokół komórek raka w naczyniach krwionośnych (ang. *tumor cell-induced platelet aggregation*, TCIPA) przez obniżenie stężenia jonów wapnia oraz tromboksanu A2 w osoczu; działanie przeciwzapalne poprzez zwiększenie ekspresji genów kodujących interleukinę 10 oraz zmniejszenie uwalniania mediatorów stanu zapalnego w badanych komórkach jak tlenek azotu, PGE2 (prostaglandyna 2), TNF- α (czynnik martwicy nowotworu α) i Il-1 β (interleukina 1 β), co również ma ograniczać proces rozwoju i przerzutów nowotworów; silne działanie *in vitro* (IC₅₀ = 0,03 \pm 0,01 μ M) przeciw świdrowcom (*Trypanosoma brucei*) odpowiedzialnym za śpiączkę afrykańską przy braku aktywności *in vivo*. 2-Fluorokordycepina (**51**) okazała się być obiecującym związkiem skutecznym również *in vivo* [45–50].

Obecnie nie ma w sprzedaży produktów farmaceutycznych zawierających kordycepinę, a są jedynie preparaty parafarmaceutyczne i suplementy na bazie ekstraktów *Cordyceps sp.* (handel apteczny oraz internetowy). Można to tłumaczyć dwójako: kalkulacją ekonomiczną – wysokie koszty badań klinicznych i wprowadzenia na rynek wobec silnej konkurencji ze strony parafarmaceutyków i ewentualnych leków generycznych, albo problemami z odpowiednią stabilnością kordycepiny i jej czasem półtrwania w organizmie, ze względu na deaminazę adenozynową (ADA) szlaku ratunkowego, która przekształca kordycepinę w formę nieaktywną. Obecnie jest prowadzone tylko jedno badanie kliniczne badające właściwości terapeutyczne kordycepiny razem z inhibitorem deaminazy pentostatyną (**52**, Nipent®, Rys. 2.6.). Jednak ostatnia publikacja w *Scientific Reports* należącym do grupy Nature opisująca wpływ kordycepiny na komórki białaczki U937 i K562 może zintensyfikować dalsze badania [51]. Pentostatyna również zasługuje na umieszczenie w przeglądzie. Prócz swej zdolności do inhibicji ADA posiada potwierdzoną klinicznie aktywność przeciw dwóm typom białaczki: przewlekłej białaczce limfatycznej oraz białaczce włochatokomórkowej [52].



Rysunek 2.6. Struktura pentostatyny
Figure 2.6. The structure of pentostatin

Ostatnią do omówienia w tym rozdziale pochodną nukleozydową pozostaje kładrybina (**53**, CdA, Leustatin®, Rys. 2.7.). Jest to bardzo ważny nukleozyd ze względu na szerokie spektrum wskazań terapeutycznych: przewlekła białaczka limfatyczna, chłoniak skórny T-komórkowy, białaczka włochatokomórkowa oraz chłoniaki nie-Hodgkina [53]. Zsyntezowana została po raz pierwszy w 1960 r. przez Vennera [54] i następnie w 1965 r. przez Ikeharę i Tadę jako produkty pośrednie w syntezie [55]. Pierwsze doniesienia o aktywności CdA wobec białaczkowej linii komórkowej L-1210 zostały opublikowane w 1972 r. [56]. Jednak dopiero prace Carsona i in. [57] doprowadziły do ustalenia aktywności wobec nowotworowych limfocytów T i ustalenia mechanizmu działania. Podstawowym założeniem tych prac było, żeby znaleźć pochodną odporną na działanie ADA, dzięki czemu będzie ona dostatecznie długo stabilna wewnątrz komórki aby ulec fosforylacji. Dodatkowo uważano, że pochodna będąca inhibitorem ADA będzie powodować zaburzenia w replikacji DNA ze względu na kumulację dATP i dADP. Wysokie poziomy tych metabolitów powodują inhibicję aktywności reduktazy rybonuklotydowej (RNR) na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego i zaburzają pulę dNTP potrzebnych do syntezy DNA. Udowodniono wcześniej, że jest to śmiertelne dla limfocytów T [58]. Założenia te spełniła kładrybina [59].



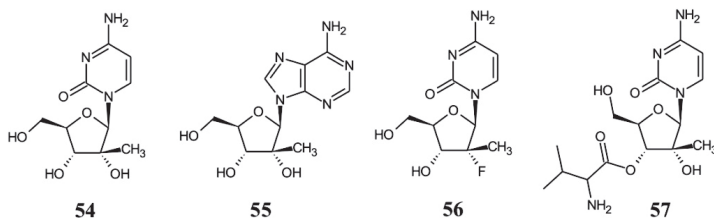
Rysunek 2.7. Struktura kładrybiny
Figure 2.7. The structure of cladribine

CdA po dostaniu się do komórki dzięki transporterom nukleozydowym (NT) z grupy CNT (ang. *concentrative nucleoside transporters*) oraz ENT (ang. *equilibrative nucleoside transporters*) ulega fosforylacji do monofosforanu dzięki działaniu kinazy dCK, co jest etapem limitującym. Następnie ulega on fosforylacji do difosforanu (CdA-DP) i trifosforanu (CdA-TP), które są formami aktywnymi. Trifosforan ulega inkorporacji do DNA i gdy zostaną wbudowane dwa kolejne nukleotydy CdA elongacja ulega przerwaniu [60]. CdA-TP jest również inhibitorem RNR [61], co jak wspomniano prowadzi do zaburzeń syntezy DNA oraz oddziałuje z metylotransferazą, co prowadzi do hipometylacji [62]. W części I przeglądu opisano znaczenie aktywności epigenetycznej w terapii chorób tkanek krwiotwórczych na przykładzie 5-azacytydyny (**18**). CdA nie jest pozbawiona wad. Wywołuje mielosupresję, co prowadzi do anemii, limfopenii i in. CdA jest rozpoznawana przez transporter ABCG2 (ang. *ATP-binding cassette sub-family G member 2*) zwany również transporterem oporności wielolekowej, który skutecznie wydalą CdA z komórki.

Jednak jak napisano wcześniej, CdA została dopuszczona do leczenia w przypadku kilku poważnych jednostek chorobowych.

3. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA POCHODNYCH 2'-ALKILOWANYCH

Inną grupą nukleozydów modyfikowanych w układzie *cis*-diolowym są analogi z podstawnikami alkilowymi w pozycjach 2' i 3', a sztandarowym przykładem z tej grupy jest 2'-C-metylocytydyna (**54**, Rys. 3.1.), która okazała się być selektywnym inhibitorem replikacji różnych wirusów RNA takich jak HCV, WNV (wirus Zachodniego Nilu) i DENV (wirus denga) [63, 64]. Najbardziej obiecująca wydaje się być aktywność przeciw wirusowi HCV, ponieważ terapia z wykorzystaniem interferonu α (INF- α) i rybawiryny (**20**) jest bardzo kosztowna, toksyczna i skuteczna jedynie u połowy pacjentów. 2'-C-Metylowe analogi nukleozydowe są silnymi inhibitorami wirusowej polimerazy RNA zależnej od RNA, czyli RdRp (ang. *RNA-dependent RNA polymerase*) wirusa HCV [65]. Stężenie efektywne **54** wobec HCV w komórkach ludzkiej hepatoblastomy (HuH6) wyniosło $EC_{50} = 0,07$ mg/mL, gdy w tym samym układzie aktywność rybawiryny wyniosła $EC_{50} = 6$ mg/mL [66].

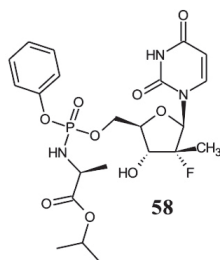


Rysunek 3.1. Struktury wybranych nukleozydów 2'-C-metylowych
Figure 3.1. The structures of exemplary 2'-C-methyl nucleosides

Podobne właściwości wykazała 2'-C-metyloadenozyna (**55**) z $EC_{50} = 0,17$ mg/ml w komórkach HuH₆, choć okazała się być podatna na działanie deaminazy adenozynowej oraz posiadała niską biodostępność u szczurów. Badania SAR (ang. *structure activity relationship*) analogów purynowych posiadających podstawnik 2'- lub 3'-C-metylowy względem polimerazy HCV zostały opisane w dwóch artykułach zespołu Eldrup i in. [67, 68]. W badaniach wykazano, że tylko grupa 2'-C-metylowa powodowała oczekiwaną aktywność i najczęściej analogi guaninowe były bardziej aktywne od adeninowych.

Związek **54** stał się strukturą liderową i tak powstały np. 2'-deoksy-2'-fluoro-2'-C-metylocytydyna (**56**) z EC_{90} wobec HCV na poziomie 5,40 μ M przy $CC_{50} > 100$ μ M oraz walopicytabina (NM 283, **57**), czyli 3'-O-L-walinowa pochodna estrowa 2'-C-metylocytydyny. Walopicytabina cechuje się lepszymi właściwościami fizykochemicznymi, biodostępnością i korzystnym profilem farmakologicznym. W komórce ulega hydrolizie i uwalnia 2'-C-metylocytydynam, która następnie ulega

fosforylacji do aktywnej formy trifosforanu. Prace nad tymi pochodnymi nabierają szczególnego znaczenia, gdy weźmie się pod uwagę, że w skali świata szacuje się, że ok. 170 mln osób jest zarażonych wirusem HCV. Związek ten zakwalifikował się do II fazy badań klinicznych prowadzonych przez firmę Novartis, jednak po uzyskaniu wyników dalsze prace zostały wstrzymane po opinii FDA, ze względu na niekorzystny profil korzyści do ryzyka (ang. *risk/benefit profile*). W nurt poszukiwań nowych pochodnych 2'-C-metylowych włączyli się także Januszczyk, Fogt i Boryski otrzymując serie pochodnych urydyny i cytydyny z dodatkowymi modyfikacjami w części zasadowej, uzyskując związki o aktywności $EC_{50} = 31-85 \mu\text{M}$ wobec HCV [69].



Rysunek 3.2. Struktura sofosbuwiru
Figure 3.2. The structure of sofosbuvir

Stosunkowo nowym odkryciem jest sofosbuwir (Sovaldi®, **58**, Rys. 3.2.) [70]. Lek ten przeszedł szybką ścieżkę i po odkryciu w 2007 roku przez M. Sofia z firmy Pharmasset (kupiona niedługo potem przez Gilead za 11 mld \$) już w 2013 r. został dopuszczony przez FDA. Sofosbuwir jest spektakularnym sukcesem zastosowania opracowanej przez zespół McGuigana pronukleotydowej strategii prolekowej Pro-Tide [71] dla analogów 2'-C-metylowych. Związek **58** po dostaniu się do komórki ulega aktywacji poprzez enzymy komórkowe do monofosforanu 2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-metylourydyny, który z kolei ulega szybkiej i wydajnej fosforylacji do trifosforanu będącego substratem dla wirusowej polimerazy. Sofosbuwir stosowany w kilkukomponentowym reżimie terapeutycznym m.in. razem z rybawiryną daje skuteczność w leczeniu infekcji HCV > 90% [72].

UWAGI KOŃCOWE

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

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

Reżimy terapeutyczne składają się zwykle z dwóch NRTI i dodatkowego składnika innej klasy. Umiejętne zonglowanie składnikami terapii pozwala na uniknięcie lub przynajmniej odsunięcie w czasie powstawania szczepów odpornych na terapię (ang. *multi-drug resistant strains*), powoduje, że AIDS zaczyna być uznawane za chorobę przewlekłą a nie śmiertelną i sukces ten można przypisać w znacznej mierze chemii nukleozydów. Również w części III przeglądu nukleozydy należące do NRTI będą istotną grupą pochodnych.

PODZIĘKOWANIA

Praca została napisana w Zakładzie Chemii Nukleozydów i Nukleotydów IChB PAN w Poznaniu, którego kierownikiem jest prof. Jerzy Boryski, dzięki wsparciu finansowym Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu KNOW oraz ze środków statutowych IChB PAN.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.P. Agarwal, A.M. Mian, *Biochem. Pharmacol.*, 1991, **42**, 905.
- [2] L.A. Agrofolio, S.R. Challand, *Acyclic, Carbocyclic and L-nucleosides*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1998.
- [3] R.J. Pomerantz, *Clin. Infect. Dis.*, 2002, **34**, 91.
- [4] K. Connolly, S. Hammer, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, **36**, 245.
- [5] E.M. Scholar, W.B. Pratt, *The Antimicrobial Drugs*, Second Edition, Oxford University Press, New York 2000.
- [6] S.G. Sarafianos, B. Marchand, K. Das, D.M. Himmel, M.A. Parniak, S.H. Hughes, E. Arnold, *J. Mol. Biol.*, 2009, **385**, 693.
- [7] S.G. Sarafianos, A.C. Jr. Clark, K. Das, S. Tuske, J.J. Birktoft, E. Arnold, *EMBO J.*, 2002, **21**, 6614.
- [8] V.R. Sirivolu, S.K. Vernekar, T. Ilina, N.S. Myshakina, M.A. Parniak, Z. Wang, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 8765.
- [9] H. Mitsuya, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**, 1911.
- [10] R. Yarchoan, H. Mitsuya, R.V. Thomas, J.M. Pluda, N.R. Hartman, C.F. Perno, K.S. Marczyk, J.P. Allain, D.G. Johns, S. Border, *Science*, 1989, **245**, 412.
- [11] G. Beskid, B. Eskin, R. Cleeland, J. Siebelist, A. Cappetta, A.D. Hill, R.H. Geiger, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1981, **19**, 424.

- [12] J.P. Horowitz, J. Chua, M. Noel, J.T. Donatt, *J. Org. Chem.*, 1967, **32**, 817.
- [13] C.-F. Perno, R. Yarchoan, D.A. Cooney, N.R. Hartman, S. Gartnar, M. Popovic, Z. Hao, T.L. Gerard, Y.A. Wilson, D.G. Johns, S. Broder, *J. Exp. Med.*, 1988, **168**, 1111.
- [14] C.-H. Chen, Y.-C. Chen, *J. Biol. Chem.*, 1989, **264**, 11934.
- [15] J.E. Dahlberg, H. Mitsuya, S.B. Blam, S. Broder, S.A. Aaronson, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 1987, **84**, 2469.
- [16] J.T. Patton, N.L. Davis, G.W. Wertz, *J. Gen. Virol.*, 1983, **64**, 743.
- [17] M.A. Waqar, M.J. Evans, K.F. Manly, R.G. Hughes, J.A. Huberman, *J. Cell Physiol.*, 1984, **121**, 402.
- [18] E.L. White, W.B. Parker, L.J. Macy, S.C. Shaddix, G. McCaleb, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, **161**, **2**, 393.
- [19] K.B. Frank, P.A. McKernan, R.A. Smith, D.F. Smee, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1987, **31**, 1369.
- [20] S. Suzuki, B. Lee, W. Luo, D. Tovell, M.J. Robins, D.L. Tyrrell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, **156**, 1144.
- [21] J.C. Wu, M. Chernov, R.E. Boehme, R.T. Suttman, M.J. McRoberts, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988, **32**, 1887.
- [22] M. Baba, R. Pauwels, J. Balzarini, P. Herdewijn, E. De Clercq, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, **145**, 1080.
- [23] J.P. Horwitz, J. Chua, M.A. Da Rooge, M. Noel, *Tetrahedron Lett.*, 1964, **5**, 2725.
- [24] M.M. Mansuri, M.J. Hitchcock, R.A. Buroker, C.L. Bregman, I. Ghazzouli, J.V. Desiderio, J.E. Starret, R.Z. Sterzycki, J.C. Martin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1990, **34**, 637.
- [25] M.J. Browne, K.H. Mayer, S.B. Chafee, M.N. Dudley, M.R. Posner, S.M. Steinberg, K.K. Graham, S.M. Geletko, S.H. Zinner, S.L. Denman, L.M. Dunkle, S. Kaul, C. McLaren, G. Skowron, N.M. Kouttab, T.A. Kennedy, A.B. Weitberg, G.A. Curt, *J. Infect. Dis.*, 1993, **167**, 21.
- [26] M. Baba, R. Pauwels, P. Herdewijn, E. De Clercq, J. Desmyter, M. Vandeputte, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, **142**, 128.
- [27] J. Balzarini, G.J. Kang, M. Dalal, P. Herdewijn, E. De Clercq, S. Broder, D.G. Johns, *Mol. Pharmacol.*, 1987, **32**, 162.
- [28] N. Dyatkina, S. Minassian, M. Kukhanova, A. Krayevsky, M. von Janta-Lipinsky, Z. Chidgeavadze, R. Beabealashvili, *FEBS Lett.*, 1987, **219**, 151.
- [29] W.-D. Menga, F.-L. Qing, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2006, **6**, 1499.
- [30] A. Van Aershot, P. Herdewijn, J. Balzarini, R. Pauwels, E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, 1989, **32**, 743.
- [31] R.J. Suhadolnik, *Nucleoside Antibiotics*, Wiley, New York 1970.
- [32] K.-I. Takatsuki, S. Ohgushi, S. Kohmoto, K. Kishikawa, M. Yamamoto, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2006, **25**, 719.
- [33] L.W. Hertel, J.S. Kroin, J.W. Misner, J.M. Tustin, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 2406.
- [34] P. Huang, S. Chubb, L.W. Hertel, G.B. Grindey, W. Plunkett, *Cancer Res.* 1991, **15**, 6110.
- [35] S. Noble, K.L. Goa, *Drugs* 1997, **54**, 447.
- [36] N.M. Cerqueira, P.A. Fernandes, M.J. Ramos, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 8507.
- [37] E. Mini, S. Nobili, B. Caciagli, I. Landini, T. Mazzei, *Ann. Oncol.*, 2006, **17**, Supl. 5, 7.
- [38] S. Dyawanapelly, A. Kumar, M.K. Chourasia, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 2017, **34**, 63.
- [39] R.D. Dubey, A. Saneja, P.K. Gupta, P.N. Gupta, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2016, **93**, 147.
- [40] I. Lefebvre, C. Perigaud, A. Pompon, A.-M. Aubertin, J.-L. Girardet, A. Kirn, G. Gosselin, J.-L. Imbach, *J. Med. Chem.*, 1995, **38**, 3941.
- [41] T.P. Prakash, M. Prhavc, A.B. Eldrup, P.D. Cook, S.S. Carroll, D.B. Olsen, M.W. Stahlhut, J.E. Tomassini, M. MasCoss, S.M. Galloway, C. Hilliard, B. Bhat, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 1199.
- [42] K.G. Cunningham, W. Manson, F.S. Spring, S.A. Hutchinson, *Nature*, 1950, **166**, 949.
- [43] H.S. Tuli, S.S. Sandhu, A.K. Sharma, *3 Biotech.*, 2014, **4**, 1.

- [44] H.-C. Lo, C. Hsieh, F.-Y. Lin, T.-H. Hsu, *J. Tradit. Complement. Med.*, 2013, **3**, 16.
- [45] H.S. Tuli, A.K. Sharma, S.S. Sandhu, D. Kashyap, *Life Sci.*, 2013, **93**, 863.
- [46] E.N. Kodama, R.P. McCaffrey, K. Yusa, H. Mitsuya, *Biochem. Pharmacol.*, 2000, **59**, 273.
- [47] Y. Liao, J. Ling, G. Zhang, F. Liu, S. Tao, Z. Han, S. Chen, Z. Chen, H. Le, *Cell Cycle*, 2015, **14**, 761.
- [48] S. Shin, S. Lee, J. Kwon, S. Moon, S. Lee, C.K. Lee, K. Cho, N.J. Ha, K. Kim, *Immune. Netw.*, 2009, **9**, 98.
- [49] J.W. Jeong, C.Y. Jin, C. Park, S.H. Hong, G.Y. Kim, *Toxicol. In Vitro*, 2011, **25**, 817.
- [50] S.K. Vodnala, T. Lundbäck, E. Yeheskieli, B. Sjöberg, A.L. Gustavsson, R. Svensson, G.C. Olivera, A.A. Eze, H.P. de Konig, L.G.J. Hammarström, M.E. Rottenberg, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 9861.
- [51] S.M. Liang, Y.J. Lu, B.S. Ko, Y.J. Jan, S.K. Shyue, S.F. Yet, J.Y. Liou, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 43930.
- [52] C. Sauter, N. Lamanna, M.A. Weiss, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2008, **4**, 1217.
- [53] C. Tortorella, M. Rovaris, M. Filippi, *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, 2001, **2**, 1751.
- [54] H. Venner, *Chem. Ber.*, 1960, **93**, 140.
- [55] M. Ikehara, H. Tada, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 606.
- [56] L.F. Christensen, A.D. Broom, M.J. Robins, A. Bloch, *J. Med. Chem.*, 1972, **15**, 735.
- [57] D.A. Carson, D.B. Wasson, J. Kaye, B. Ullman, D.W.J. Martin, R.K. Robins, J.A. Montgomery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1980, **77**, 6865.
- [58] J.G. Cory, D.A. Rey, G.L. Carter, P.E. Bacon, *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 12001.
- [59] H.M. Bryson, E.M. Sorkin, *Drugs*, 1993, **46**, 872.
- [60] W.B. Parker, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 2880.
- [61] W.B. Parker, A.R. Bapat, J.X. Shen, A.J. Townsend, Y.C. Cheng, *Mol. Pharmacol.*, 1988, **34**, 485.
- [62] B. Stefanska, K. Rudnicka, A. Bednarek, K. Fabianowska-Majewska, *Eur. J. Pharmacol.*, 2010, **638**, 47.
- [63] C. Pierra, S. Benzaria, A. Amador, A. Moussa, S. Mathieu, R. Storer, G. Gosselin, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2005, **24**, 767.
- [64] J.C. Lee, C.K. Tseng, Y.H. Wu, N. Kaushik-Basu, C.K. Lin, W.C. Chen, H.N. Wu, *Antiviral Res.*, 2015, **116**, 1.
- [65] J.L. Clark, L. Hollecker, J.C. Mason, L.J. Stuyver, P.M. Tharnish, S. Lostia, T.R. McBrayer, R.F. Schinazi, K.A. Watanabe, M.J. Otto, P.A. Furman, W.J. Stec, S.E. Patterson, K.W. Pankiewicz, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 5504.
- [66] L. Coelmont, J. Paeshuyse, M.P. Windisch, E. De Clercq, R. Bartenschlager, J. Neyts, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006, **50**, 3444.
- [67] A.B. Eldrup, C.R. Allerson, C.F. Bennett, C.F. Bera, B. Bhat, N. Bhat, M.R. Bosserman, J. Brooks, C. Burlein, S.S. Carroll, P.D. Cook, K.L. Getty, M. MacCoss, D.R. McMasters, D.B. Olsen, T.P. Prakash, M. Prhave, Q. Song, J.E. Tomassini, J. Xia, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 2283.
- [68] A.B. Eldrup, M. Prhavic, J. Brooks, B. Bhat, T.P. Prakesh, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 5284.
- [69] P. Januszczyk, J. Fogt, J. Boryski, I. Kunisuke, T. Onishi, J. Neyts, E. De Clercq, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2009, **28**, 713.
- [70] M.J. Sofia, D. Bao, W. Chang, J. Du, D. Nagarathnam, S. Rachakonda, P.G. Reddy, B.S. Ross, P. Wang, H.-R. Zhang, S. Bansal, C. Espiritu, M. Keilman, A.M. Lam, H.M. Steuer, C. Niu, M.J. Otto, P.A. Furman, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 7202.
- [71] C. McGuigan, S.A. Harris, S.M. Daluge, K.S. Gudmundsson, E.W. McLean, T.C. Burnette, H. Marr, R. hazen, L.D. Condreay, L. Johnson, E. De Clercq, J. Balzarini, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 3504.
- [72] R. Flisiak, J. Pogorzelska, M. Flisiak-Jackiewicz, *Liver Int.*, 2017, **37**, 26.