

**AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA
MODYFIKOWANYCH NUKLEOZYDÓW. CZĘŚĆ III**

BIOLOGICAL ACTIVITY OF MODIFIED
NUCLEOSIDES. PART III

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 nukleozydów o zmienionej konfiguracji w pozycjach 2' i 3'
2. Aktywność biologiczna pozostałych nukleozydów posiadających modyfikacje w części cukrowej

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. uczestniczył w stażu 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 III of the review devoted to biological activities of nucleoside derivatives presents a further description of analogues modified in the sugar residue with particular focus on those with altered configuration in the 2' or 3' position, e.g. cytarabine – an old anticancer chemotherapy agent used to treat acute myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia, and non-Hodgkin's lymphomas; fludarabine – derivative of vidarabine used as a drug in the treatment of chronic lymphocytic leukemia, and non-Hodgkin lymphomas; clofarabine – approved by the FDA in 2004, a new-generation second-line drug for recurrent acute myeloid leukemia; and fialuridine – examined as a potential therapeutic for the treatment of HBV infection, however, clinical trials ended tragically. In the last section of the review derivatives with other modifications in the sugar moiety are described – carbocyclic and acyclic analogues, L-nucleosides and 5'-modified nucleosides. Among others, very important modified nucleosides are listed e.g. acyclovir, ganciclovir, DHPA, tenofovir, cyclopentenylcytosine, entecavir, carbovir, abacavir, lamivudine, telbivudine and sinefungin VA. All parts together make a possibly complete and concise review, including the latest reports, the most important groups of modified nucleosides, and should be considered as a whole. In the context of the activities description, there are references to the important molecular targets, mechanisms of action, pharmacodynamics, pharmacokinetics, toxicity, resistance, *in vitro* and *in vivo* tests or prodrug strategies, which can be a starting point for further study for chemists interested in medicinal chemistry.

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

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

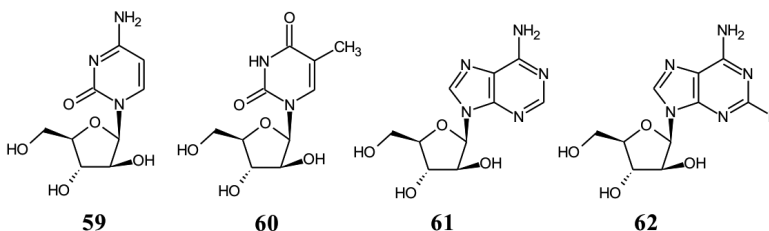
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

3TC	- lamiwudyna
ACV	- acyklowir
AIDS	- zespół nabytego niedoboru odporności
AZT	- 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
AZT-TP	- trifosforan AZT
CC ₅₀	- stężenie cytotoksyczne
CDG	- karbocykliczna 2'-deoksyguanozyna
CMV	- <i>Cytomegalovirus</i>
dCK	- kinaza 2'-deoksycytydynowa
ddC	- dideoksycytydyna
DHBV	- <i>Duck Hepatitis B virus</i>
DHPA	- dihydroksypropyloadenina
EBV	- <i>Epstein-Barr virus</i>
EC ₅₀	- stężenie efektywne
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
HCV	- <i>Hepatitis C virus</i>
HCMV	- <i>Human Cytomegalovirus</i>
HIV-RT	- odwrotna transkryptaza wirusa HIV
HSV-1	- <i>Herpes simplex virus type 1</i>
HSV-2	- <i>Herpes simplex virus type 2</i>
HSV-dTK	- wirusowa kinaza 2'-deoksytymidynowa wirusa HSV
IC ₅₀	- stężenie inhibitorowe
NRTI	- nukleozydowy inhibitor odwrotnej transkryptazy
NT	- transporter nukleozydowy
Pol γ	- mitochondrialna polimeraza gamma
RNR	- reduktaza rybonukleotydomowa
SAH	- S-adenozylhomocysteina
VSV	- <i>Vesicular stomatitis virus</i>
VZV	- <i>Varicella zoster virus</i>
VV	- <i>Vaccina virus</i>

WPROWADZENIE

W części III przeglądu aktywności biologicznych pochodnych nukleozydowych przedstawiono ciąg dalszy opisu analogów modyfikowanych w części cukrowej ze szczególnym uwzględnieniem tych posiadających zmienioną konfigurację w pozycji 2' lub 3' np. cytarabina, fludarabina, kłofarabina i fialurydyna. Przedstawiono także całą listę pochodnych posiadających inne modyfikacje w części cukrowej należących do grup nukleozydów karbocyklicznych, acyklicznych, 5'-modyfikowanych, spiro- oraz L-nukleozydów. Wszystkie części mają stanowić razem możliwie kompletny, zwięzły, obejmujący najnowsze doniesienia przegląd najważniejszych modyfikowanych nukleozydów aktywnych biologicznie i należy traktować je jako całość. W kontekście opisu aktywności pojawiają się odniesienia do najważniejszych celów molekularnych analogów nukleozydowych, mechanizmów działania, farmakodynamiki, farmakokinetyki, toksyczności, oporności, badań *in vitro* oraz *in vivo* czy strategii prolekowych, które mogą stanowić punkt wyjścia do dalszej lektury dla chemików interesujących się chemią medyczną.

1. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA NUKLEOZYDÓW O ZMIENIONEJ KONFIGURACJI W POZYCJACH 2' I 3'



Rysunek 1.1. Struktury wybranych nukleozydów arabinofuranosylowych
Figure 1.1. Structures of selected arabinofuranosyl nucleosides

Wśród aktywnych pochodnych nukleozydowych o zmienionej konfiguracji w pozycjach 2' i 3' można wymienić 1-β-D-arabinofuranosylcytozynę (cytarabina, araC, **59**, Rys. 1.1.) [1], 1-β-D-arabinofuranosylotyminę (araT, **60**) [2], 9-β-D-arabinofuranosyladeninę (widarabina, araA, **61**) [3] i 9-(β-D-arabinofuranosyl)-2-fluoroadeninę (fludarabina, FA, **62**) [4]. Cytarabina (np. Cytosar-U®) została otrzymana po raz pierwszy w roku 1959 przez Walwicka i in. Już w 1969 roku została dopuszczona do leczenia przez FDA. Od tamtej pory jest stosowana głównie w leczeniu białaczki szpikowej, ostrej białaczki limfoblastycznej i chłoniaków w kombinacji z innymi lekami. Z powodu niskiej ustnej biodostępności, podaje się ją w formie wlewów dożylnych. Jest typowym cytostatykiem, który powoduje poważne efekty uboczne. Mechanizm działania polega na wewnątrzkomórkowej

aktywacji poprzez fosforylacje do trifosforanu, który zaburza syntezę DNA w fazie S cyklu komórkowego. Cytarabina posiada również właściwości przeciwwirusowe, zwłaszcza wobec herpeswirusów. Jednak ze względu na swoją toksyczność nie jest wykorzystywana w leczeniu infekcji. Również araT (**60**), otrzymana po raz pierwszy w latach pięćdziesiątych XX wieku, wykazuje aktywność przeciw herpeswirusom takim jak EBV, HSV-1 i SVV (*simian varicella virus*) [5–7]. Jest to o tyle ciekawe, że araT nie wykazuje takiej toksyczności jak araC (**59**), choć nie jest jej pozbawiona. Cytarabina jak większość pochodnych nukleozydowych dostaje się do wnętrza komórki dzięki transporterom nukleozydowym (NT). Istnieje ciekawa praca opisująca wpływ dłuższego traktowania linii komórkowej ludzkich limfatycznych komórek H9 roztworem araC (0,5 μ M) na powstawanie oporności zależnej od NT oraz dCK (kinaza 2'-deoksytydynowa odpowiedzialna za fosforylację araC do araCMP) [8]. Otrzymana w ten sposób linia H9-araC wykazała ponad 600-krotnie zwiększoną oporność względem araC oraz zwiększoną oporność na inne analogi jak ddC (**32**), 3TC (lamiwudyna, **63**, Rys. 2.6.) i fludarabina (**62**). W porównaniu do linii H9 stwierdzono, że w linii H9-araC ilość skumulowanej araC-TP była mniejsza niż 1%, aktywność dCK spadła do 31,4%, zmalała wyraźnie ilość membranowego transportera ENT1 oraz białka Sp1 – czynnika regulującego transkrypcję genu kodującego dCK. AraC nie jest jedynym analogiem nukleozydowym, wobec którego obserwuje się wywoływanie oporności NT-zależnej.

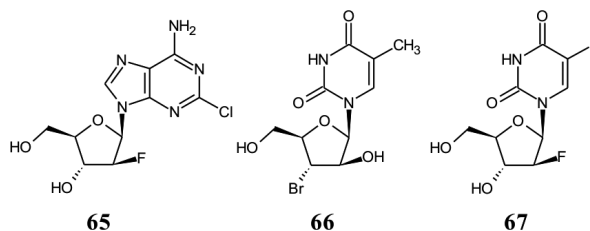
Widarabina (araA, **61**) z kolei jest aktywna wobec wirusów HSV i VZV. Zsyntezowano ją po raz pierwszy w 1960 r. w zespole Bakera [9], choć była pomyślana jako związek przeciwnowotworowy, to znalazła jednak zastosowanie w terapii antywirusowej. Po raz pierwszy jej aktywność wobec herpeswirusów została zgłoszona w 1964 r. przez Privat de Garilhe i de Rudder [10]. Znalazła ona zastosowanie w leczeniu do czasu wprowadzenia mniej toksycznych leków. Jedna publikacja sugeruje również, że aktywność widarabiny nie ogranicza się tylko do wirusów DNA, ponieważ zaobserwowano jej aktywność wobec wirusa Gross MLV (wirus mysiej białaczki) należącego do retrowirusów [11]. Mechanizm działania jest analogiczny – aktywną formą jest powstający w komórce w wyniku działań odpowiednich kinaz trifosforan (araA-TP), który jest inhibitorem kompetycyjnym wirusowej polimerazy DNA i zaburza syntezę wirusowego DNA. Niestety zaburza również syntezę ludzkiego DNA. Selektywność przeciwwirusowa opiera się na szybszej fosforylacji araA przez wirusowe kinazy tymidynowe (HSV i VZV) niż przez ludzką dTK. Odnotowano synergistyczny efekt araA w terapii HSV w połączeniu z acyklowirem (**64**, ACV, Rys. 2.1.) [12]. Znane są również właściwości inhibitorowe araA-TP wobec reduktazy rybonukleotydowej (RNR), co może powodować samowzmocnienie efektu cytostatycznego i przeciwwirusowego. AraA jest podatna na działanie deaminazy adenzynowej, która przekształca ją w raczej nieaktywny arabinozyd hipoksantyny. Aby wydłużyć czas półtrwania widarabiny, możliwe jest zastosowanie któregoś z inhibitorów tego enzymu. W 1969 r. Montgomery i Hewson z *Southern Research Institute* (USA) otrzymali pochodną 2-fluorową – fludarabinę (**62**), która nie ulega deaminacji.

Fludarabina (**62**) znalazła zastosowanie jako lek w terapii przewlekłej białaczki limfocytowej i chłoniaków nie-Hodgkina. Tak samo jak widarabina oddziałuje z RNR i polimerazą α w fazie S cyklu komórkowego. Zaburza pulę komórkowych deoksynukleotydów (inhibicja RNR), syntezę i naprawę DNA (inhibicja polimeraz), indukuje apoptozę i zaburza proces metylacji DNA poprzez inhibicję hydrolazy SAH oraz w pewnym stopniu C-5 DNA metylotransferazy ($EC_{50} = 47 \mu\text{M}$) [13, 14]. Co więcej, FA jest inhibitorem primazy DNA [15]. Można ją więc zakwalifikować do grupy leków wielocelowych [16]. Jest typowym cytostatykiem, który powoduje poważne efekty uboczne: limfopenię, a co za tym idzie również wzmoczoną podatność na infekcje i zakażenia oportunistyczne, wywołuje gorączkę, niewydolność nerek, zaburzenia widzenia, krwimocz, wymioty, biegunkę i inne. Stwierdzono również działanie teratogenne.

Podawanie dożylnie monofosforanu fludarabiny (FAMP, Fludara®) pozwala ograniczyć przenikanie jej do tkanek, co daje pewną selektywność względem komórek krwi. W osoczu FAMP jest hydrolizowany do FA przez ekto-5'-nukleotyduzę usytuowaną na zewnętrznej powierzchni błon komórkowych, która następnie jest transportowana przez NT takie jak ENT1, CNT2 do wnętrza komórek [17], gdzie ponownie ulega fosforylacji do form aktywnych. W badaniach *in vitro* w hodowli ludzkich białaczkowych limfoblastów (CCRF-CEM) określono poziom inhibicji syntezy DNA oraz przeżywalności komórek na poziomie $IC_{50} = 1,5 \mu\text{M}$ [18]. W badaniach na żywych mysich modelach zaszczepionych komórkami mysiej białaczki L1210 wykazano, że podanie fludarabiny zwiększyło medianę długości życia o 125% względem nieleczonych jednostek i zanotowano 4 na 15 przypadków wyleczenia [19]. Spośród wielu badań na pacjentach z przewlekłą białaczką limfocytową można podać dane z *M. D. Anderson Cancer Center* (USA) – w przypadku użycia FAMP jako leku I rzutu uzyskano 79% odsetek odpowiedzi na leczenie [20]. Znane są też doniesienia o synergistycznym efekcie łączenia FAMP z innymi terapeutykami. Fludarabina okazała się być podatna na enzymatyczne rozerwanie wiązania glikozydowego przez PNPazę (fosforylaza nukleozydów purynowych szlaku ratunkowego) dając 2-fluoroadeninę, która przy wykorzystaniu komórkowych enzymów jest przeprowadzana do wysoce toksycznego trifosforanu 2-fluoroadenozyny. Zespół naukowców z *Southern Research Institute* (USA) po wieloletnich poszukiwaniach metodą prób i błędów znalazł pochodną, która przy zachowaniu aktywności FA wykazała zdecydowanie większą odporność na hydrolyczne i fosforolityczne rozerwanie wiązania glikozydowego, a w przypadku jego rozerwania powstaje 2-chloroadenina, która jest dużo mniej toksyczna – pochodną tą jest kłofarabina (**65**) [21].

Kłofarabina (**65**, m.in. Clolar®, 9-(2'-deoxy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranozylo)-2-chloroadenina, Rys. 1.2.) jest zaaprobowanym przez FDA w 2004 r. w trybie warunkowym lekiem II rzutu w przypadku nawracającej ostrej białaczki szpikowej (ACC) u pacjentów w wieku 1–21 lat. Można ją traktować jako wypadkową dwóch struktur – fludarabiny (**62**) oraz kładrybiny (**53**). Podobnie jak fludarabina, kłofarabina po fosforylacji (etapem limitującym jest fosforylacja do difosforanu) przez

kinazy komórkowe zaburza proces syntezy DNA na drodze inhibicji reduktazy rybonukleotydu (RNR), polimerazy α oraz terminację elongacji biosyntezowanej nici DNA po inkorporacji monofosforanu klofarabiny [22]. Selektywność działania opiera się na wzmożonej aktywności dCK w komórkach nowotworowych. Efekt biologiczny ulega samowzmocnieniu, ponieważ ubytek właściwych dNTP ze względu na inhibicję RNR powoduje częstsze wbudowanie monofosforanu klofarabiny do DNA. Klofarabina (**65**) nie wykazuje silnej aktywności wobec mitochondrialnej Pol γ , za to powoduje uwalnianie z mitochondrium cytochromu c oraz innych czynników indukujących apoptozę (AIF, APAF1, kaspaza 9). Za transport klofarabiny do komórki odpowiada podobna grupa NT jak w przypadku FA (**62**) i na drodze ich modyfikacji może pojawiać się oporność, choć w przypadku **65** możliwy jest w pewnym stopniu bierny transport transblonowy. W kontekście klofarabiny pojawia się również problem aktywności transporterów typu ABC (ang. *ATP-binding cassette*), które są znane z usuwania pochodnych nukleotydu z komórki, choć akurat w tym przypadku uważa się, że transporter ABCG2 eksportuje klofarabinę, a nie jej monofosforan. Równoległe zastosowanie inhibitora tego transportera w terapii nowotworów posiadających ABCG2 może zwiększyć aktywność **65** [23, 24].

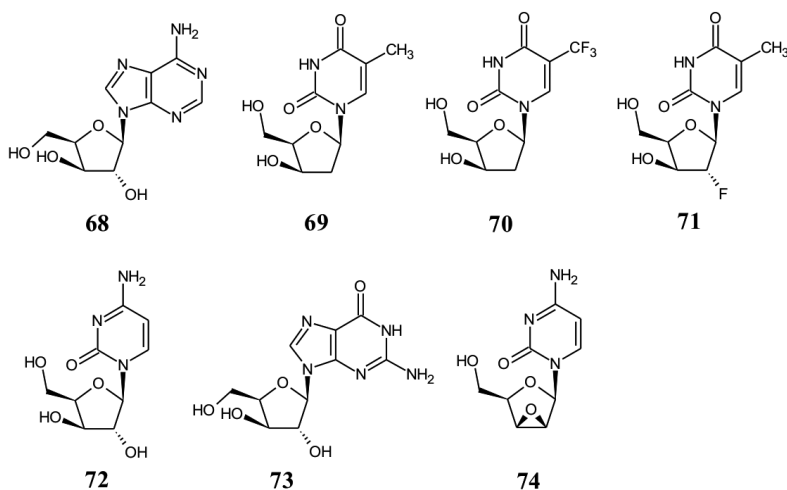


Rysunek 1.2. Struktury klofarabiny, 1-(3'-bromo- β -D-arabinofuranosyl)tyminy oraz fialurydyny
Figure 1.2. Structures of clofarabine, 1-(3'-bromo- β -D-arabinofuranosyl)thymine and fialuridyne

Inną pochodną arabinofuranosylową o istotnej aktywności jest 1-(3'-deoksy-3'-bromo- β -D-arabinofuranosyl)tymina (**66**). W testach przeciwko *Mycobacterium tuberculosis* wykazała $IC_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$ przeciw szczepowi H37Ra oraz $IC_{50} = 1\text{--}2 \mu\text{g/mL}$ przeciw szczepowi opornemu na ryfampicynę i izoniazyd (H37Rv) przy cytotoksyczności $CC_{50} > 100\text{--}200 \mu\text{g/mL}$ [25]. *M. tuberculosis* wywołuje gruźlicę, która jest ciągle powszechną i niebezpieczną chorobą zwłaszcza w krajach trzeciego świata oraz w przypadku osób o obniżonej odporności. Co roku z jej powodu umiera ponad milion ludzi na świecie. W 2015 roku znajdowała się na dziewiątej pozycji najczęstszych przyczyn zgonów w rankingu WHO (ang. *World Health Organization*).

Z pośród pochodnych arabinofuranosylowych należy wymienić jeszcze jeden słynny analog – fialurydynę (**67**, 1-(2'-deoksy-2'-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-5-jodouracyl, FIAU, Rys. 1.2.). Choć w tym przypadku jest to zła sława. Fialurydyna była badana jako potencjalny terapeutyk w leczeniu infekcji HBV. Pomimo korzystnych wyników badań *in vitro* oraz *in vivo* w układach zwierzęcych na eta-

pie przedklinicznym [26], podczas badań klinicznych przeprowadzonych w 1993 r. w NIH (*National Institute of Health*, USA) doszło do tragedii i 5 pacjentów z 15 zmarło z powodu silnej hepatotoksyczności [27]. Pozostałych dwóch wymagało przeszczepu wątroby. Po fakcie stwierdzono, że FIAU jest rozpoznawane i inkorporowane przez ssacze polimerazy DNA (α , γ , δ), dodatkowo stwierdzono silną aktywność inhibitorową FIAU-TP (trifosforan FIAU) wobec mitochondrialnej Pol γ na poziomie $K_i = 0,04 \mu\text{M}$, co każe się zastanowić nad jakością przeprowadzonych badań przedklinicznych [28]. Można też ubolewać, że prowadzący badania kliniczne nie potraktowali z dostateczną uwagą wcześniejszych doniesień o cytotoksyczności FIAU w badaniach poświęconych aktywności wobec HCMV i wyjątkowo szybkiej fosforylacji tej pochodnej przez mitochondrialną kinazę tymidynową, co mogło prowadzić to silnej kumulacji FIAU-TP właśnie w mitochondriach [29, 30].



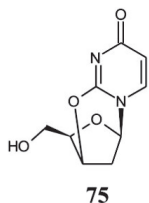
Rysunek 1.3. Struktury wybranych pochodnych β -D-ksylofuranosylowych (68-73) i 2',3'-anhydro- β -D-liksofuranosylcytozyny (74)

Figure 1.3. Structures of selected β -D-xylofuranosyl derivatives (68-73) and 2',3'-anhydro- β -D-lyxofuranosylcytosine (74)

Niektóre analogi arabinofuranosylowe nukleozydów, jak opisano powyżej, posiadają bardzo ciekawe aktywności. Czy podobnie jest z pochodnymi ksylofuranosylowymi? Wiele takich analogów zostało zsyntezowanych i część z nich rzeczywiście posiada pewne aktywności, choć ta grupa nie doczekała się przedstawiciela stosowanego w leczeniu. W 1965 r. Ellis i in. [31] po raz pierwszy zgłosili aktywność przeciwnowotworową 9- β -D-ksylofuranosyloadeniny (ksylo-A, 68, Rys. 1.3.), co dało asumpt do uznania ksylo-A za strukturę wartą dalszej pracy. Zostało to potwierdzone w kolejnych badaniach np. wobec linii komórkowej białaczki L1210, czy wobec komórek B-mix K-44/6, czyli szczyrzych komórek transformowanych RSV (*Rous sarcoma virus* – wirus mięsaka Rousa). Istotną aktywność przeciwwirusową *in vitro* 68 wykazała również wobec wirusów takich jak

wirus afrykańskiego pomoru świń należącego do Asfiwirusów (ASFV) oraz HSV-1 ($EC_{50} = 4,6 \text{ mg/mL}$) [32]. Problemem w stosowaniu ksylo-A okazała się jej szybka deaminacja w komórce przez deaminazę adozynową. Próba zniwelowania tego zjawiska poprzez modyfikację puryny w pozycji 8 nie przyniosła pozytywnych wyników.

Wirus HBV jest jeszcze bardziej rozpowszechniony niż HCV i szacuje się, że zarażonych na świecie jest ok. 2 mld ludzi [33]. W 2010 roku pojawiła się publikacja badająca przydatność różnych pochodnych o zmienionej konfiguracji w pozycjach 2' i 3' wobec infekcji DHBV i HBV [34]. Z przebadanych związków zasługującą na odnotowanie aktywność przeciw DHBV wykazały związki **69**, **70** i **71** w przedziale $EC_{50} = 3,84\text{--}4,13 \text{ }\mu\text{M}$ ($CC_{50} > 600 \text{ }\mu\text{M}$ dla komórek Huh-7 – linia komórek ludzkiego raka wątroby). Niestety wobec ludzkiego HBV okazały się być umiarkowanie aktywne z EC_{50} na poziomie $19,23\text{--}33,7 \text{ }\mu\text{M}$. W 1986 r. G. Gosselin i in. [35] przeprowadzili przesiewowe badania na aktywność przeciwwirusową podstawowych analogów ksylofuranazyliowych posiadających naturalne zasady azotowe wobec wirusów: HSV, VV, VSV, Polio, Coxsackie, Reowirusa 1 i Rinowirusa 9. W badaniu tym zaobserwowano umiarkowane aktywności ksylo-A, ksylo-C (**72**) i ksylo-G (**73**) wobec wirusów DNA jak HSV czy VV na poziomie $IC_{50} = 20\text{--}40 \text{ mg/mL}$. Ksylo-A wykazała także aktywność przeciw Rinowirusowi 9 będącemu wirusem RNA.



Rysunek 1.4. Struktura 2,3'-anhydro-2'-deoksyurydyny

Figure 1.4. The structure of 2,3'-anhydro-2'-deoxyuridine

W 1988 roku Webb i in. zgłosili aktywność 2,3'-anhydro- β -D-liksofuranazyliocytozyny (**74**) przeciwko wirusowi HIV [36]. Związek ten już przy stężeniu $0,5\text{--}1 \text{ }\mu\text{M}$ wykazał dużą zdolność ochrony zakażonych komórek zwiększając kilkakrotnie liczbę żywych komórek. Jednak przy stężeniu $5 \text{ }\mu\text{M}$ można było zauważyć wyraźny efekt cytotoksyczny. W 2010 roku pojawiła się za to praca pokazująca, że stanowiące często etap pośredni w syntezie pochodnych nukleozydowych modyfikowanych w części cukrowej związki 2,3'-anhydrocykliczne również mogą posiadać ciekawe aktywności. Wśród przebadanych pochodnych najlepszą aktywność wykazała 2,3'-anhydro-2'-deoksyurydina (**75**, Rys. 1.4.) z $EC_{50} = 2,5\text{--}5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ przeciw wirusowi DHBV i $EC_{50} = 5 \text{ }\mu\text{g/mL}$ przeciw HBV przy $CC_{50} > 200 \text{ }\mu\text{g/mL}$ [37].

2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA POZOSTAŁYCH NUKLEOZYDÓW POSIADAJĄCYCH MODYFIKACJE W CZĘŚCI CUKROWEJ

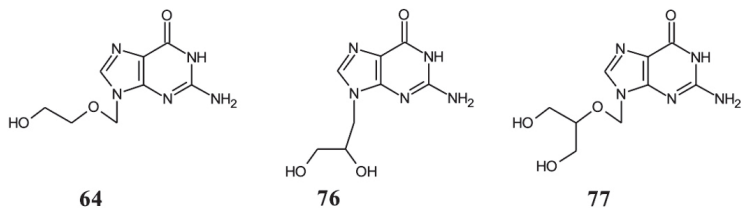
Aktywności nukleozydów posiadających modyfikacje w pozycjach 2' i 3' rybozy zostały szeroko omówione w II części przeglądu i w poprzednim rozdziale tej części. W tym miejscu zostaną przedstawione pokrótce inne modyfikacje części cukrowej. W tej kategorii związków na pierwszy plan wychodzą nukleozydy acykliczne, w których pierścień cukrowy został zastąpiony przez podstawnik (2-hydroksyetyloksy) metyloowy (np. acyklowir, ACV, Zovirax®, 64, Rys. 2.1.) lub 2,3-dihydroksypropyloowy (np. 9-(2,3-dihydroksypropylo)adenina, DHPA, 76). W pierwszej grupie została zachowana część odpowiadająca atomom C1', C4', O4' i C5', a w drugiej grupie została zachowana część z układem 2',3'-*cis*-diolowym. ACV i DHPA są szczególnymi przypadkami pochodnych z grupy *seco*, które posiadają przerwany pierścień cukrowy w jednej z pięciu pozycji np. 1',2' lub 2',3'. ACV można traktować, jako pochodną *triseco* z przerwanyimi trzema wiązaniami w pozycjach 1',2'; 2',3' i 3',4' [38].

Pochodne typu DHPA (76), nieposiadające sąsiadującego z wiązaniem glikozydowym atomu tlenu są formalnie alkilowymi pochodnymi zasad azotowych i otrzymuje się je w reakcjach alkilowania. Umieszczono je w tym rozdziale ze względów historycznych, bo tak do tej pory często były klasyfikowane. W przypadku pochodnych typu ACV (64) obecność atomu tlenu imitującego atom tlenu rybozy powoduje podobieństwo tych związków do nukleozydów również pod względem chemicznym. Możliwe jest otrzymanie takich pochodnych na drodze transpurynacji [39]. Mechanizm tej reakcji zakłada powstawanie acyklicznego kationu pseudocukrowego. Dlatego można takie związki klasyfikować jako pochodne nukleozydowe lub pseudonukleozydowe.

ACV po raz pierwszy opisany został przez Schaeffera i Elion w 1977 r. [40]. Prócz syntezy przedstawiono również pierwsze wyniki badań aktywności przeciw-wirusowej. Za swą pracę nad ACV i jego pochodnymi Elion otrzymała w 1988 roku nagrodę Nobla. ACV wykazuje wysoką i selektywną aktywność zwłaszcza przeciw herpeswirusom (HSV-1, HSV-2). Wartości IC_{50} przeciw różnym szczepom wynoszą 0,01–0,1 $\mu\text{g/mL}$. ACV po przedostaniu się do wnętrza komórki ulega fosforylacji przez wirusową kinazę deoksytymidynową HSV-dTK do postaci monofosforanu [41]. Następnie ulega fosforylacji przez ludzką kinazę GMP (guanozynomonofosforanu) do difosforanu i komórkowe kinazy NDP (nukleozydodifosforanowe) do trifosforanu. Trifosforan zostaje rozpoznany przez wirusową polimerazę DNA i wbudowany do wirusowego łańcucha nukleinowego. ACV nie jest substratem dla komórkowych kinaz, dlatego fosforylacja zachodzi tylko w zainfekowanych komórkach. ACV wykazuje aktywność również przeciw wirusowi VZV oraz umiarkowaną aktywność przeciw wirusowi CMV.

ACV wykorzystano jako strukturę liderową w dalszych poszukiwaniach, w wyniku których uzyskano m.in. gancyklowir (GCV, 9-(1,3-dihydroksy-2-propoksymetylo)guanina, Cytovene®, 77) [42–45]. GCV okazał się być aktywny przeciw

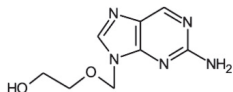
wirusom HSV-1 i 2, CMV, VZV a także EBV (wirus Epsteina-Barra). Co ciekawe, GCV jest także aktywny wobec zmutowanych, nieposiadających własnej kinazy tymidynowej szczepów HSV TK⁻, wobec których ACV nie jest aktywny. Zamiana guaniny na adeninę w strukturze ACV dała obniżenie aktywności, a wstawienie w to miejsce zasad pirymidynowych dało związki nieaktywne.



Rysunek 2.1. Nukleozydy acykliczne

Figure 2.1. Acyclic nucleosides

Inne modyfikacje części zasadowej mają na celu poprawę rozpuszczalności i poprawę parametrów wchłaniania przy podaniu doustnym. Przykładem takiej modyfikacji może być 6-deoksyacyklowir (**78**, Rys. 2.2.) [46], który w komórce zostaje utleniony przez oksydazę ksantynową do postaci ACV. Pozwala to na sześciokrotne zwiększenie stężenia ACV w organizmie.



78

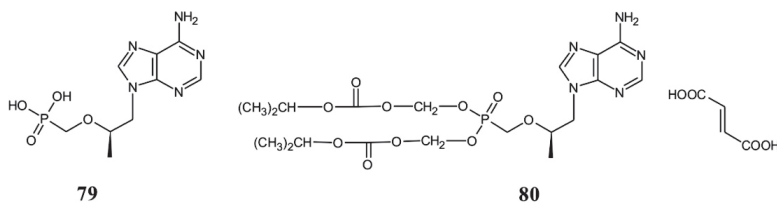
Rysunek 2.2. Struktura 6-deoksyacyklowiru

Figure 2.2. Structure of 6-deoxyacyclovir

Ważnym nukleozydem acyklicznym jest wspomniany wcześniej DHPA (**76**) [47], którego enancjomer o konfiguracji *S* jest tym aktywnym. Wykazuje on szerokie spektrum aktywności przeciw wirusom (+)RNA, (-)RNA, dsRNA (dwuniciowe RNA), a także w mniejszym stopniu przeciw wirusom DNA. Mechanizm działania jest mechanizmem typowym dla analogów adeninowych. Stanowi on inhibitor dla hydrolazy *S*-adenozylhomocysteiny (SAH). Inhibicja tego enzymu powoduje kumulowanie się w komórce *S*-adenozylhomocysteiny, która z kolei utrudnia m.in. metylację terminalnej guanozyny w strukturze *cap* mRNA i zakłóca dojrzewanie wirusowego RNA.

Tenofowir (**79** PMPA, [(*R*)-9-(2-fosfonylometoksypropylo)adenina, Rys. 2.3.) również zalicza się do analogów acyklicznych, choć w tym przypadku uważa się go za izosteryczny i izoelektryczny analog acyklonukleotydy. Należy on do acyklicznych fosfonianów nukleozydowych, których prekursorem w syntezie jest DHPA. Jest to bardzo ciekawa grupa związków przeciwwirusowych zsyntezowanych przez zespół Holý'ego [48]. Są stosowane w leczeniu wielu różnych zakażeń wirusowych

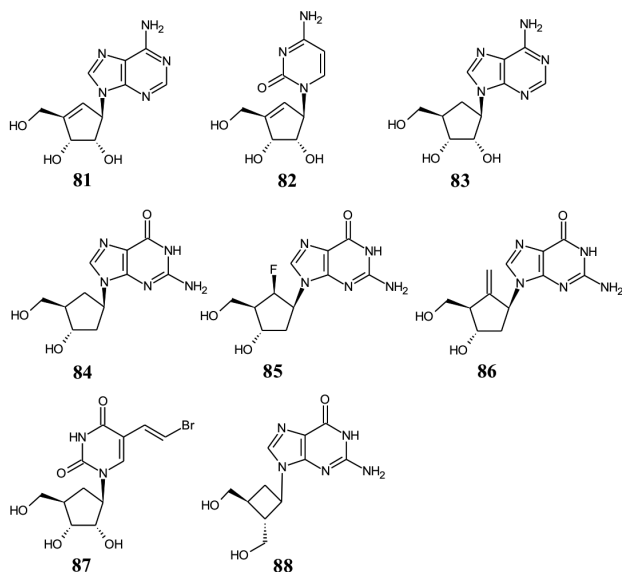
np. HCMV u pacjentów chorych na AIDS. Został dopuszczony do terapii przeciw wirusowi HIV w 2001 roku, a także przeciw wirusowi HBV w roku 2008. Ze względu na lepsze wchłanianie stosowany jest w postaci proleku – dizoproksylu tenofowiru, w którym grupa fosforanowa jest dodatkowo zestryfikowana dwiema resztami izopropylksoykarbonyloksymetylowymi. Po wnikięciu do komórki diester ten rozkłada się do aktywnego biologicznie tenofowiru. Forma doustna jest solą fumaranową dizoproksylu tenofowiru (TDF, **80**, Viread®). Z karty charakterystyki produktu leczniczego można wyczytać, że Viread jest stosowany w leczeniu dzieci zakażonych wirusem HIV-1 w wieku od 6 do 12 lat z opornością na NRTI lub przy zbyt dużej toksyczności leków pierwszego rzutu. Tenofowir może być stosowany w profilaktyce zakażeń w grupie wysokiego ryzyka.



Rysunek 2.3. Struktury tenofowiru i TDF

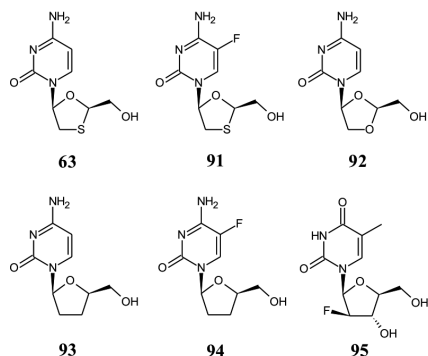
Figure 2.3. Structures of tenofovir and TDF

Prócz nukleozydów acyklicznych, znane są również nukleozydy karbocykliczne oraz L-nukleozydy, które także posiadają ciekawe właściwości biologiczne [49]. Należąca do nukleozydów karbocyklicznych neplanocyna A (**81**, Rys. 2.4.) [50] jest również inhibitorem hydrolazy SAH z $IC_{95} = 0,2 \mu\text{M}$. Neplanocyna A w komórce jest łatwo metabolizowana do nieaktywnej formy inozynowej przez deaminazę adenozykową, dlatego podjęto próby jej modyfikacji aby zwiększyć czas półtrwania w komórce, a także zmniejszyć jej cytotoksyczność poprzez utrudnienie fosforylacji przez kinazę adenozykową. IC_{50} neplanocyny względem wirusów VV, VSV, Reowirusa 1, Junin (wirus argentyńskiej gorączki krwotocznej, JUNV), CMV mieściło się w przedziale 0,3–7 $\mu\text{g/mL}$ [51, 52]. Badania prowadzono w komórkach $E_6\text{SM}$ (linia komórkowa ludzkich embrionalnych fibroblastów), HeLa (linia komórek raka szyjki macicy), Vero (linia komórek nabłonka nerki koczkodana) i HEL (linia komórek białaczki erytroblastycznej). Cytozynowy analog neplanocyny o nazwie zwyczajowej cyklopentynylocytozyna **82** (CPE-C) [53, 54], prócz aktywności przeciwwirusowej wobec ponad 20 różnych wirusów posiada również aktywność przeciwnowotworową inhibując w postaci trifosforanowej syntetazę trifosforanu cytydyny (CTP), która w komórkach nowotworowych ma zwiększoną aktywność. Jednak stwierdzona w I fazie badań klinicznych kardiotoxyczność opóźnia wprowadzenie go do leczenia. Arysteromycyna (**83**) [55, 56] to kolejny purynowy nukleozyd karbocykliczny, który również należy do grupy inhibitorów hydrolazy SAH, wykazuje właściwości sercowo-naczyniowe prawdopodobnie jako agonista receptora adenozynowego A2 [57] i stanowi strukturę liderową dla wielu aktywnych związków.



Rysunek 2.4. Nukleozydy karbocykliczne
Figure 2.4. Carbocyclic nucleosides

Karbocykliczna 2'-deoksyguanozyna (CDG, **84**) [58] należy do inhibitorów replikacji wirusowego DNA. Posiada szerokie spektrum aktywności przeciwwirusowej np. wobec HSV, HCMV i HBV. W celu wyjaśnienia mechanizmu działania CDG przeciw HSV badano poziom inkorporacji jej monofosforanu do komórkowego i wirusowego DNA. Okazało się, że trifosforan CDG jest lepszym substratem dla wirusowej polimerazy i działa jako inhibitor kompetycyjny, ale nie działa jako terminator elongacji łańcucha DNA [59]. CDG wykorzystano jako strukturę liderową i tak zgłoszono kolejne aktywne analogi. 6'-Fluoro-CDG (**85**) [60] okazała się być kilkukrotnie skuteczniejsza od ACV *in vitro* przeciw HSV-1 i 2, a entekawir (BMS-200475, **86**) [61] wykazał bardzo wysoką aktywność przeciw HBV ($EC_{50} = 0,003 \mu\text{M}$) przy cytotoksyczności zależnej od linii komórkowej 21-120 μM . Nie sposób wymienić wszystkich analogów karbocyklicznych, które zostały zsyntezowane i przebadane biologicznie, ale trzeba wspomnieć także o C-BVDU (**87**) [62] oraz C-oksetanocynie G (**88**) [63], które są karbocyklicznymi wariantami aktywnych nukleozydów i przedstawicielami dwóch grup związków. C-BVDU wykazuje porównywalną aktywność do BVDU (**3**), a przy okazji jest odporny na hydrolityczne działanie fosforylasy urydynowej i deoksytymidynowej, a C-oksetanocyna G wykazuje również ciekawe aktywności jak związek liderowy, jednak jest bezpieczniejsza w użyciu i może stanowić obiecujące rozwiązanie terapeutyczne w leczeniu infekcji HSV i HCMV. Związek **88** wykazuje również aktywność anti-HIV, jednak słabszą od znanych ddA (dideoksyadenozyna, **30**) i ddG (dideoksyguanozyna, **31**), które zostały omówione w części II.

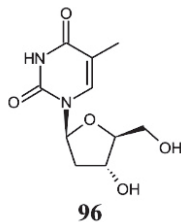


Rysunek 2.6. Struktury wybranych L-nukleozydów

Figure 2.6. L-nucleoside analogs

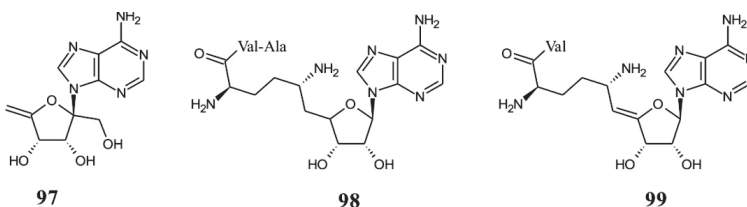
Kolejną grupą związków modyfikowanych w części cukrowej, którą trzeba opisać w tym rozdziale są analogi L-nukleozydów. Nie dziwi fakt, że od początku poszukiwań leków zajmowano się analogami D-enancjomerów nukleozydów, które występują naturalnie i można się było spodziewać, że to one będą wchodzić w interakcje w organizmach żywych. Zmiana nastąpiła na początku lat dziewięćdziesiątych ub.w. gdy pojawiły się pierwsze doniesienia o aktywnościach anty-HBV i anty-HIV nienaturalnych β-L-nukleozydów. Prekursorem okazała się być β-L-2'-deoksy-3'-tacytydyna (3TC, lamiwudyna, **63**, Rys. 2.6.) [66]. Pierwotnie uzyskano mieszaninę racemiczną, która poddana badaniom biologicznym wykazała bardzo dobrą aktywność przeciw wirusowi HIV (1 i 2) na poziomie $EC_{50} = 0,02-0,06 \mu M$. Później uzyskano oba enancjomery osobno i wykazano, że bardziej aktywnym oraz mniej toksycznym jest enancjomer L ($EC_{50} = 0,018 \mu M$). Podobną charakterystykę aktywności uzyskano przeciw wirusowi HBV. W komórce ulegają fosforylacji do trifosforanu dzięki kinazom komórkowym i blokują aktywność wirusowej HIV1-RT i HBV-Pol (polimeraza wirusa HBV) o aktywności RT, konkurując z naturalnym substratem. Enancjomer L wykazuje wysoką selektywność, podczas gdy enancjomer D wykazywał pewne powinowactwo do polimeraz gospodarza. Lamiwudyna doczekała się wprowadzenia do terapii przeciw wirusowi HIV i stała się strukturą liderową w dalszych poszukiwaniach. Tak uzyskano β-L-FTC (emtricytabina, **91**) [67], β-L-diokso-C (troksacytabina, **92**) [68], β-L-ddC (**93**, L-dideoksycytydyna), β-L-FddC (**94**, β-L-5-fluoro-2',3'-dideoksycytydyna) [69] i β-L-FMAU (**95**, 1-(2'-deoksy-2'-fluoro-β-L-arabino-furanozylo)-5-metylouracyl) [70]. Trifosforany związków **93** i **94** wykazały zdolność do selektywnej inhibicji HIV-RT z wartościami stałej inhibicji K_i niewiele gorszymi od 3TC-TP, choć dużo gorszymi od AZT-TP. Stwierdzono, że działają jako terminatory elongacji wirusowego DNA. Oba nukleozydy **93** i **94** okazały się być również bardzo aktywne przeciw HBV *in vitro* na poziomie $ED_{50} = 0,01 \mu M$. Oba wykazały zerową aktywność wobec mitochondrialnej polimerazy γ , co jest bardzo dobrym wynikiem, ponieważ uważa się, że głównym mechanizmem odpowiedzialnym za cytotoksyczność NRTI w leczeniu

AIDS jest właśnie inhibicja Pol γ oraz inkorporacja NRTI do mitochondrialnego DNA w komórce gospodarza [71]. Na przykład ddC (**32**) wykazuje aktywność inhibitorową wobec Pol γ na poziomie $K_i = 0,022 \mu\text{M}$ *in vitro* oraz silną aktywność terminatorową. Aktywność β -L-FTC (**91**) *in vitro* względem wirusa HIV charakteryzowała się wartością $EC_{50} = 0,0013 \mu\text{M}$ przy cytotoksyczności $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$ w dwóch różnych liniach komórkowych. Jest to doskonały rezultat i nie dziwi, że dopuszczono ją do leczenia w 2006 roku. Analog β -L-FMAU (**95**) wykazał za to dobrą aktywność przeciw wirusowi HBV na poziomie $EC_{50} = 0,1 \mu\text{M}$ przy zerowej cytotoksyczności [49].



Rysunek 2.7. Struktura telbivudyny
Figure 2.7. Structure of telbivudine

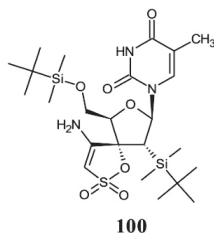
Innym ważnym przedstawicielem L-nukleozydów jest telbivudyna (β -L-2'-deoksytymidyna, **96**, Rys. 2.7.). Już w 1992 roku opisano, że telbivudyna ulega skutecznej fosforylacji przez kinazę tymidynową wirusa HSV-1 i hamuje jego wzrost [72]. Jednak dopiero prace związane z aktywnością przeciw wirusowi HBV nadały znaczenie temu związkowi ($EC_{50} = 0,19 \pm 0,09 \mu\text{M}$) [73]. Związek jest produkowany przez Novartis i dostępny w handlu w UE pod nazwą handlową Sebivo®.



Rysunek 2.8. Przykłady nukleozydów modyfikowanych w pozycji 5'
Figure 2.8. Examples of nucleosides modified in the 5'-position

Nakoniec przeglądu wypada zasygnalizować jeszcze istnienie innych grup modyfikowanych nukleozydów poprzez podanie kilku przykładów. Angustmycyna A (**97**, Rys. 2.8.) aktywna wobec bakterii gram (+) [74] jest analogiem modyfikowanym w pozycji 5' i 1'. Związki z tej grupy są najczęściej aktywne wobec enzymów biorących udział w reakcjach transmetylowania np. hydrolazy SAH. Sinefungina VA (**98**), 4',5'-didehydrosinefungina V (**99**) wykazują ciekawe aktywności przeciw pasożytom z gatunku świdrowców *Trypanosoma brucei* na poziomie $IC_{50} = 0,0026-0,15 \mu\text{g/mL}$ przy braku toksyczności przeciwko linii komórkowej MRC-5 (linia komórek fibro-

blastów tkanki płucnej). Podgatunki *Trypanosoma br. gambiense* i *Trypanosoma br. rhodesiense* są odpowiedzialne za śpiączkę afrykańską przenoszoną przez muchy tse-tse [75]. Analogi posiadające podstawnik 3'-spiro są specyficznymi inhibitorami HIV-1 RT. Nie są aktywne wobec innych retrowirusów. Wiążą się z niesubstratowym miejscem enzymu. Aby związek był aktywny musi posiadać w pozycjach 2' i 5' grupę *t*-butyldimetylosililową oraz konfigurację rybozy. Przykładem takiego związku jest TSAO-T (**100**, Rys. 2.9.) [76]. Wprowadzenie podstawnika alkilowego w pozycji N-3 tyminy znacznie obniża cytotoksyczność związku bez szkody dla aktywności.



Rysunek 2.9. Struktura 3'-spironukleozydu TSAO-T

Figure 2.9. Structure of 3'-spironucleoside – TSAO-T

UWAGI KOŃCOWE

Zainteresowanie chemią pochodnych nukleozydów oraz ich aktywnościami biologicznymi nie ustaje. XXI wiek to ciąg dalszy sukcesów tej grupy związków, co widać po wspomnianym odkryciu aktywności immucyliny-A wobec wirusa Ebola, opracowaniu i dopuszczeniu do leczenia sofosbuwiru (pronukleotydy), klofarabiny, azacytydyny, trifluorotymidyny, tenofowiru, telbiwudyny, lamiwudyny czy wprowadzeniu terapii HAART. Przynajmniej 32 pochodne nukleozydowe i pronukleotydy są obecnie w trakcie badań klinicznych, zarówno te znane od lat np. rybawiryna lub kordycepina, jak i zupełnie innowacyjne np. RX-3117 – karbocykliczna pochodna cytydyny lub MB-07133 – nowa pronukleotydydowa pochodna cytarabiny [77]. Trudno przewidzieć, czy pod względem chemicznym można oczekiwać nowych typów modyfikacji nukleozydów, skoro od czasów sir Alexandra Todda otrzymano dziesiątki tysięcy różnych analogów i pomysłowość chemików powoli się wyczerpuje. Poszukiwania będą raczej przypominać proces dochodzenia do struktury klofarabiny na drodze żmudnej pracy tworzenia dziesiątków wariantów i łączenia znanych rozwiązań strukturalnych. Jednak z całą pewnością będą powstawały lepsze metody syntezy – szybsze, tańsze, wydajniejsze, bardziej ekologiczne czy racjonalizujące aspekt technologiczny. Kolejne doniesienia o nowych aktywnościach będą stymulować ten proces. Niewątpliwie w ostatnich dwóch dekadach znaczenia nabrały pronukleotydydowe strategie prolekowe np. wspomniane *cycloSal*, *ProTide* i *SATE*, których celem jest obejście limitujących etapów fosforylacji w komórce przy

zapewnieniu właściwej biodostępności. Reasumując, można oczekiwać kolejnych sukcesów chemii nukleozydów w leczeniu wielu ciężkich chorób wirusowych i nowotworowych.

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] W.A. Creasy, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 1975, **38**, 232.
- [2] G.A. Gentry, J.F. Aswell, *Virology*, 1975, **65**, 1, 294.
- [3] T.W. North, S.S. Cohen, *Pharmacol. Ther.*, 1979, **4**, 81.
- [4] J.A. Montgomery, K. Hewson, *J. Med. Chem.*, 1969, **12**, 498.
- [5] L.B. Allen, H.C. Schröder, H.G. Löbering, A. Maidhof, W.E. Müller, *Chemotherapy*, 1987, **33**, 272.
- [6] T. Ooka, A. Calender, M. De Turenne, J. Daillie, *J. Virol.*, 1983, **46**, 187.
- [7] K.F. Soike, G. Baskin, C. Cantrell, P. Gerone, *Antiviral Res.*, 1984, **4**, 245.
- [8] M. Sarkar, T. Han, V. Damaraju, P. Carpenter, C.E. Cass, R.P. Agarwal, *Biochem. Pharmacol.*, 2005, **70**, 426.
- [9] W.W. Lee, A. Benitez, L. Goodman, B.R. Baker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 2648.
- [10] M. Privat de Garilhe, J. de Rudder, *C. R. Acad. Sci.*, 1964, **259**, 2725.
- [11] W.M. Shannon, L. Westbrook, F.M. Schabel, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1974, **145**, 542.
- [12] M. Suzuki, T. Okuda, K. Shiraki, *Antiviral Res.*, 2006, **72**, 2, 157.
- [13] L. Li, M.J. Keating, W. Plunkett, L.Y. Yang, *Mol. Pharmacol.*, 1997, **52**, 798.
- [14] D. Wyczechowska, K. Fabianowska-Majewska, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **65**, 219.
- [15] G.M. Carbone, C.V. Catapano, D.J. Fernandes, *Biochem. Pharmacol.*, 2001, **1**, 101.
- [16] P. Bojanowski, P.F. Lipiński, P. Czekąła, D. Plewczyński, *Biul. Wydz. Farm. WUM* 2013, **1**, 1.
- [17] T. Robak, A. Korycka, E. Lech-Maranda, P. Robak, *Molecules*, 2009, **14**, 1183.
- [18] L.W. Dow, D.E. Bell, L. Poulakos, A. Fridland, *Cancer Res.*, 1980, **40**, 1405.
- [19] R.W. Brockman, Y.-C. Cheng, F.M. Schabel, J.A. Montgomery, *Cancer Res.*, 1980, **40**, 3610.
- [20] M.J. Keating, P. McLaughlin, W. Plunkett, L.E. Robertson, S. O'Brien, *Ann. Oncol.*, 1994, **5**, Sup. 2, S79.
- [21] P.L. Bonate, L. Arthaud, W.R. Jr Cantrell, K. Stephenson, J.A. 3rd Secrist, S. Weitman, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2006, **5**, 855.
- [22] W.B. Parker, S.C. Shaddix, C.H. Chang, E.L. White, L.M. Rose, R.W. Brockman, A.T. Shortnacy, J.A. Montgomery, J.A. 3rd Secrist, L.L. Jr. Bennett, *Cancer Res.*, 1991, **51**, 2386.
- [23] K. Lotfi, E. Månsson, T. Spasokoukotskaja, B. Pettersson, J. Liliemark, *Clin. Cancer Res.*, 1999, **5**, 2438.
- [24] S. Nagai, K. Takenaka, D. Nachagari, C. Rose, K. Domoney, *Cancer Res.*, 2011, **71**, 1781.
- [25] N. Shakya, M.C. Srivastav, N. Desroches, B. Agrawal, D.Y. Kunitomo, R. Kumar, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 4130.
- [26] I. Fourel, J. Li, O. Hantz, C. Jacquet, J.J. Fox, C. Trépo, *J. Med. Virol.*, 1992, **37**, 122.

- [27] R. McKenzie, M.W. Fried, R. Sallie, H. Conjeevaram, A.M. Di Bisceglie, N. Engl. J. Med., 1995, **333**, 1099.
- [28] W. Lewis, R.R. Meyer, J.F. Simpson, J.M. Colacino, F.W. Perrino, Biochem., 1994, **33**, 14620.
- [29] Y.C. Cheng, G. Dutschman, J.J. Fox, K.A. Watanabe, H. Machida, Antimicrob. Agents Chemother., 1981, **20**, 420.
- [30] J.M. Colacino, C. Lopez, Antimicrob. Agents Chemother., 1983, **24**, 505.
- [31] D.B. Ellis, G.A. LePage, Mol. Pharmacol., 1965, **1**, 231.
- [32] J. Jansons, Y. Maurinsh, M. Lidaks, Nucleosides Nucleotides, 1995, **14**, 1709.
- [33] D. Lavanchy, J. Viral. Hepat., 2004, **11**, 97.
- [34] N.C. Srivastav, N. Shakya, M. Mak, B. Agrawal, D.L. Tyrell, R. Kumar, J. Med. Chem., 2010, **53**, 7156.
- [35] G. Gosselin, M.C. Bergogne, J. De Rudder, E. De Clercq, J.L. Imbach, J. Med. Chem., 1986, **29**, 203.
- [36] T.R. Webb, H. Mitsuya, S. Broder, J. Med. Chem., 1988, **31**, 1475.
- [37] N.C. Srivastav, M. Mak, B. Agrawal, D.L.J. Tyrrell, R. Kumar, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010, **20**, 6790.
- [38] E.S.H. El Ashry, Y. El Kilany, Adv. Heterocycl. Chem., 1997, **69**, 129.
- [39] J. Boryski, J. Chem. Soc., Perkin Trans 2, 1997, 649.
- [40] G.B. Elion, P.A. Furman, J.A. Fyfe, P. de Miranda, L. Beauchamp, H.J. Schaeffer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1977, **74**, 5716.
- [41] E. De Clercq, J. Neyts, Handb. Exp. Pharmacol., 2009, **189**, 53.
- [42] K.K. Ogilvie, U.O. Cheriyan, B.K. Radatus, K.O. Smith, K.K. Galloway, W.L. Kennell, Can. J. Chem., 1982, **60**, 3005.
- [43] A.K. Field, M.E. Davies, C. DeWitt, H.C. Perry, R. Liou, J. Germershausen, J.D. Karkas, W.T. Ashton, D.B. Johnston, R.L. Tolman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, **80**, 4139.
- [44] D.F. Smee, J.C. Martin, J.P.H. Verheyden, T.R. Matthews, Antimicrob. Agents Chemother., 1983, **23**, 676.
- [45] V.R. Freitas, D.F. Smee, M. Chernow, R. Boehme, T.R. Matthews, Antimicrob. Agents Chemother., 1985, **28**, 240.
- [46] T.A. Krenitsky, W.W. Hall, P. De Miranda, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, **81**, 3209.
- [47] E. De Clercq, J. Descamps, P. De Somer, A. Holý, Science, 1978, **200**, 563.
- [48] E. De Clercq, *Antiviral agents*, Elsevier, San Diego, 2013.
- [49] L.A. Agrofolio, S.R. Challand, *Acylic, Carbocyclic and L-nucleosides*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1998.
- [50] R. Borchardt, B. Keller, U. Patel-Thrombe, J. Biol. Chem., 1984, **259**, 4353.
- [51] E. De Clercq, Antimicrob. Agents. Chemother., 1985, **28**, 84.
- [52] S. Shuto, T. Obara, Y. Saito, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, A. Matsuda, J. Med. Chem., 1996, **39**, 2392.
- [53] E. De Clercq, J. Murase, V. Marquez, Biochem. Pharmacol., 1991, **41**, 1821.
- [54] V.E. Marquez, M.I. Lim, S.P. Treanor, J. Plowman, M.A. Priest, A. Markovac, M.S. Khan, B. Kaskar, J.S. Driscoll, J. Med. Chem., 1988, **31**, 1687.
- [55] M. Hasobe, H. Liang, D.B. Ault-Riche, D.R. Borcharding, M.S. Wolfe, R.T. Borchardt, Antivir. Chem. Chemother., 1993, **4**, 245.
- [56] E. De Clercq, Nucleos. Nucleot. Nucl., 2005, **24**, 1395.
- [57] E.W. Dunham, R. Vince, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1986, **238**, 954.
- [58] Y.F. Shealy, C.A. O'Dell, W.M. Shannon, G.J. Arnett, J. Med. Chem., 1984, **27**, 1416.
- [59] W.B. Parker, S.C. Shaddix, P.W. Allan, G. Arnett, L.M. Rose, W.M. Shannon, Y.F. Shealy, J.A. Montgomery, J.A. 3rd Secrist, L.L. Jr. Bennett, Mol. Pharmacol., 1992, **41**, 245.

- [60] A.D. Borthwick, B.E. Kirk, K. Biggadike, A.M. Exall, S. Butt, S.M. Roberts, D.J. Knight, J.A.V. Coates, D.M. Ryan, *J. Med. Chem.*, 1991, **34**, 907.
- [61] G.S. Bisacchi, S.T. Chao, C. Bachard, J.P. Daris, S. Innaimo, G.A. Jacobs, O. Kocy, P. Lapointe, A. Martel, Z. Merchant, W.A. Slusarchyk, J.E. Sundeen, M.G. Young, R. Colonno, R. Zahler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, **7**, 127.
- [62] J. Balzarini, E. De Clercq, H. Baumgartner, E. Bodenteich, H. Griengl, *Mol. Pharmacol.*, 1990, **37**, 395.
- [63] Y. Nishiyama, N. Yamamoto, K. Takahash, N. Shimada, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988, **32**, 1053.
- [64] R. Vince, M. Hua, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 17.
- [65] S.M. Daluge, S.S. Good, M.B. Faletto, W.H. Miller, M.H. St. Clair, L.R. Boone, M. Tisdale, N.R. Parry, J.E. Reardon, R.E. Dornsife, D.R. Averett, T.A. Krenitsky, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1997, **41**, 1082.
- [66] J.A.V. Coates, N. Cammack, H.J. Jenkinson, I.M. Mutton, B.A. Pearson, R. Storer, J.M. Cameron, C.R. Penn, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, **36**, 202.
- [67] R.F. Schinazi, A. McMillan, D. Cannon, R. Mathis, R.M. Lloyd, A. Peck, J.P. Sommadossi, M. St Clair, J. Wilson, P.A. Furman, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, **26**, 2423.
- [68] C.K. Chu, S. Ahn, H. Kim, J.W. Beach, A.J. Alves, L.S. Jeong, Q. Islam, P. Van Roey, R.F. Schinazi, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 3791.
- [69] G. Gosselin, R.F. Schinazi, J.P. Sommadossi, C. Mathé, M.C. Bergogne, A.M. Aubertin, A. Kirn, J.L. Imbach, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994, **38**, 1292.
- [70] C.K. Chu, T. Ma, K. Shanmuganathan, C. Wang, Y. Xiang, S.B. Pai, G.Q. Yao, J.P. Sommadossi, Y.C. Cheng, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995, **39**, 979.
- [71] W. Lewis, B.J. Day, W.C. Copeland, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, **2**, 812.
- [72] S. Spadari, G. Maga, F. Fochoer, G. Ciarrocchi, R. Manservigi, F. Arcamone, M. Capobianco, A. Carcuro, F. Colonna, A. Garbesi, *J. Med. Chem.*, 1992, **35**, 4214.
- [73] M.L. Bryant, E.G. Bridges, L. Placidi, A. Faraj, A.G. Loi, C. Pierra, D. Dukhan, G. Gosselin, J.L. Imbach, B. Hernandez, A. Juodawlkis, B. Tennant, B. Korba, P. Cote, P. Marion, E. Cretton-Scott, R.F. Schinazi, J.P. Sommadossi, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, **45**, 229.
- [74] D. Gotlieb, P.D. Shaw, *Antibiotics I Mechanism of Action*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg GmbH, 1967.
- [75] M. Niitsuma, J. Hashida, M. Iwatsuki, M. Mori, A. Ishiyama, M. Namatame, A. Nishihara-Tsukashima, A. Matsumoto, Y. Takahashi, H. Yamada, K. Otoguro, K. Shiomi, S. Omura, *J. Antibiot.*, 2010, **63**, 673.
- [76] S. Velazquez, A. San-Felix, M.J. Perez-Perez, J. Balzarini, E. De Clercq, M.J. Camarasa, *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 3230.
- [77] J. Shelton, X. Lu, J.A. Hollenbaugh, J.H. Cho, F. Amblard, R.F. Schinazi, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 14379.