

**PRONUKLEOTYDY O STRUKTURZE
AMIDOFOSFORANÓW I ICH
WEWNĄTRZKOMÓRKOWY MECHANIZM
AKTYWACJI**

**PHOSPHORAMIDATE PRONUCLEOTIDES
AND THEIR INTRACELLULAR ACTIVATION
MECHANISM**

Katarzyna Kulik^{1*}, Janina Baraniak^{1,2}

¹ *Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk,
Zakład Chemii Bioorganicznej
ul. Sienkiewicza 112, 90-262 Łódź*

² *Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Instytut Chemii i Ochrony Środowiska,
Akademia im. Jana Długosza,
Al. Armii Krajowej 13/15, 42-200 Częstochowa
e-mail: kpieta@cbmm.lodz.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Wewnątrzkomórkowa aktywacja pronukleotydów o strukturze amidofosfodiestrów
2. Wewnątrzkomórkowa aktywacja pronukleotydów o strukturze amidofosfomonoestrów
3. Aktywacja amidofosforanowych pronukleotydów przez białko Hint

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr Katarzyna Kulik ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2005 roku i w tym samym roku rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi. Stopień naukowy doktora uzyskała w 2013 roku. Jej zainteresowania naukowe dotyczą głównie projektowania, syntezy i badania wybranych właściwości biologicznych modyfikowanych nukleozydów o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym i przeciwwirusowym.

Dr hab. Janina Baraniak po ukończeniu studiów na Wydziale Chemii Politechniki Łódzkiej rozpoczęła pracę w CBMM PAN w Łodzi pod kierunkiem Prof. Wojciecha Steca, gdzie w 1986 roku uzyskała stopień naukowy doktora a w 2005 roku stopień doktora habilitowanego. Głównym przedmiotem zainteresowań naukowych jest chemia modyfikowanych nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów. Prowadzone badania są skoncentrowane nad syntezą związków o potencjalnych właściwościach terapeutycznych jak i istotnym znaczeniu poznawczym nakierowanym na badania mechanistyczne procesów biochemicznych. Jest promotorem dwóch prac doktorskich i współautorką 64 publikacji. Od 2006 roku pracuje również w Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie.

ABSTRACT

Nucleoside analogues have great therapeutic potential for the treatment of cancer and viral diseases. Once inside the cell, they are activated by a series of intracellular phosphorylation steps to produce 5'-triphosphate derivatives, which can be incorporated to DNA or RNA and act as terminators of growing polynucleotide chains [1c]. In many cases, nucleoside analogues are poor substrates for the cellular kinases needed for their activation [5]. It is clear that intracellular introduction of nucleoside analogues as phosphorylated metabolites (so called pronucleotides) could circumvent difficulties associated with the use of non-phosphorylated nucleoside analogues and could even activate inactive compounds or could increase the activity of the nucleoside analogues. However, polarity and a ready degradation by phosphatases make the use of free nucleotide analogues impractical. Therefore, much of the recent efforts have been focused on finding suitable prodrugs of nucleoside analogue monophosphates.

Among the current diverse prodrug approaches, nucleoside phosphoramidate derivatives appear to be an interesting class of antiviral and anticancer agents [1c]. These prodrugs, as are devoid of negative charge, should be able to cross the cell membrane either by diffusion or utilizing transport protein [1c].

Conducted cell extract studies have provided evidence of a bioactivation mechanism that relies on enzyme-catalyzed P-N bond hydrolysis in phosphoramidate pronucleotides [1a,b]. It was assumed that phosphoramidate derivatives should generate nucleoside monophosphates inside the cell at rates that are influenced by both the nature of the amino group and the pH of the medium. Then nucleoside monophosphates should be phosphorylated in two different steps to the corresponding 5'-O-triphosphates (NTP) which can inhibit polymerase or be incorporated into the DNA strand being synthesized in the cell.

Over the last decade extensive studies has been carried out to establish the mechanism of action of phosphoramidates and identification of enzymes responsible for bioactivation this pronucleotides to phosphorylated nucleosides [7, 21, 24]. Investigation of metabolism pathways provided evidence that phosphoramidase activity of Hint (histidine triad nucleotide-binding proteins) play a key role in the activation of phosphoramidate pronucleotides [23–27].

Keywords: pronucleotides, phosphoramidates, phosphoramidase activity, Hint (histidine triad nucleotide binding protein), prodrug

Słowa kluczowe: pronukleotydy, amidofosforany, aktywność fosforoamidazowa, Hint (białko triady histydynowej wiążącej nukleotydy), prolek

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Hint	- białko triady histydynowej wiążącej nukleotydy
NTP	- 5'-O-trifosforan nukleozydu
NMP	- 5'-O-monofosforan nukleozydu
AMP	- adenozyno-5'-monofosforan
AMPS	- adenozyno-5'-tiofosforan
AZT	- 3'-azydo-2',3'-dideoksytymidyna
D4T	- 2',3'-didehydro-2',3'-dideoksytymidyna
Ara-C	- 1- β -D-arabinofuranozylocytozyna
FUdR	- 5-fluoro-2'-deoksyurydyna
<i>E. Coli</i>	- pałeczka okrężnicy
HIV	- ludzki wirus niedoboru odporności
MT-4	- komórki ludzkich T-limfocytów
CEM	- komórki ostrej białaczki limfoblastycznej
PBMCs	- jednojądrzaste komórki krwi obwodowej

WPROWADZENIE

Analogi nukleozydów stanowią zasadniczą grupę stosowanych klinicznie leków przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Należą one do grupy proleków, gdyż same są nieaktywne i dopiero w organizmie człowieka ulegają przemianom do formy aktywnej. Biologicznie aktywną formą nukleozydów są ich 5'-trifosforany, gdyż w tej formie są one wbudowywane w rosnący łańcuch DNA lub RNA. Stąd też, aby analogi nukleozydów mogły przejawiać właściwości terapeutyczne muszą one ulegać trójstopniowemu procesowi fosforylacji katalizowanemu przez odpowiednie kinazy wirusowe lub kinazy komórek gospodarza. Dla wielu modyfikowanych nukleozydów pierwszy etap fosforylacji jest etapem decydującym o szybkości całego procesu, przez co bezpośrednio wpływa na aktywność biologiczną tych związków. Poszukując bardziej aktywnych leków przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych naukowcy projektują tzw. pronukleotydy, mające za zadanie omińnięcie pierwszego etapu aktywacji enzymatycznej.

Pronukleotydy są 5'-O-fosforanowymi pochodnymi nukleozydów, w których do grupy fosforanowej zostały przyłączone lipofilowe nośniki umożliwiające transport dokomórkowy. Wśród różnorodnych klas pronukleotydów od kilkudziesięciu lat zainteresowaniem wielu grup badawczych cieszą się związki o strukturze amidofosforanów. W tym przypadku reszty aminowe bądź amidowe pełnią funkcję grup maskujących ugrupowanie fosforanowe.

Przesłankę do zaprojektowania pierwszych pronukleotydów o strukturze amidofosforanowych pochodnych stanowiły prace dotyczące syntezy nukleozydo-5'-di- i trifosforanów, w których jako związki pośrednie były wykorzystane nukleozydo-5'-amidofosforanowe pochodne różnych amin [1a,b]. Badano ich reaktywność nie tylko w odniesieniu do tworzenia wiązania pirofosforanowego, lecz również ich podatność na hydrolizę. Okazało się, że amidofosforany były stosunkowo mało stabilne w środowisku wodnym, dzięki czemu w medium komórkowym ulegały szybkiej hydrolizie do odpowiednich fosforanów.

Opierając się na tych doświadczeniach zaprojektowano odpowiednie amidofosforanowe pronukleotydy, które będąc związkami pozbawionymi ładunku ujemnego powinny łatwo przenikać przez błony komórkowe na drodze biernej dyfuzji lub z wykorzystaniem białek transportujących nukleozydy [1c]. Natomiast po dostaniu się do komórki, jako bardziej podatne na hydrolizę niż ich fosforanowe analogi, amidofosforanowe pochodne powinny generować pożądany nukleozydomonofosforan z szybkością zależną od natury zastosowanej grupy aminowej oraz wartości pH medium komórkowego.

Zakładano, iż aktywacja amidofosforanowych pochodnych nukleozydów powinna przebiegać wewnątrz komórki drogą hydrolizy enzymatycznej. Przypuszczano, iż usunięcie amidowej grupy maskującej funkcję fosforanową może zachodzić w wyniku rozerwania wiązania P-N w reakcji katalizowanej przez enzym o aktywności fosforoamidazy. Uwolniony w ten sposób monofosforan nukleozydowego (NMP) leku przeciwwirusowego lub przeciwnowotworowego powinien

być następnie fosforylowany do 5'-trifosforanu nukleozydu (NTP) w procesie katalizowanym przez odpowiednie kinazy wirusowe lub kinazy komórek gospodarza. W kolejnym etapie utworzony NTP byłby wbudowywany w rosnący łańcuch DNA lub RNA powodując zahamowanie jego syntezy poprzez terminację elongacji łańcucha. Ponadto niektóre 5'-trifosforany modyfikowanych nukleozydów mogą inhibować kluczowe enzymy biorące udział w syntezie nukleozydów purynowych i pirymidynowych oraz w syntezie RNA [2].

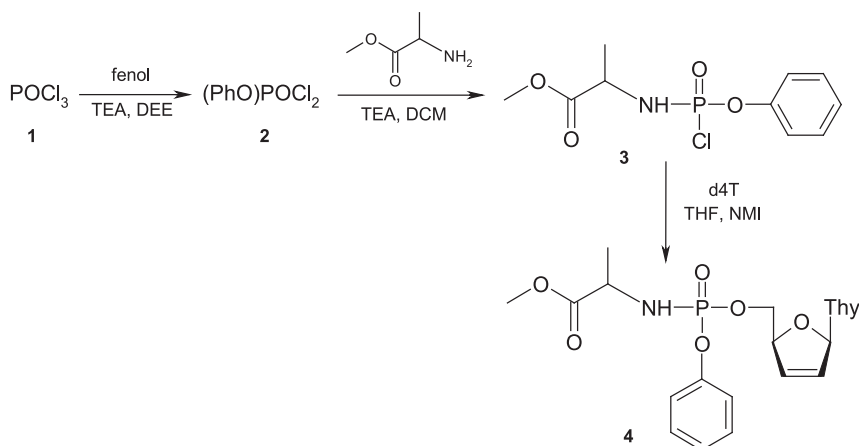
Fakt, iż związki zawierające ugrupowanie amidofosforanowe mogą ulegać hydrolizie enzymatycznej został po raz pierwszy odnotowany w 1959 roku przez Smitha i Burrowa [3]. Przeprowadzone badania eksperymentalne udowodniły, iż ekstrakt wybranych szczepów *E. Coli* posiada zdolność hydrolizowania amidofosforanu adenozy (AMP-NH₂).

Natomiast Shabarova w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku pokazała, iż fosforoamidaza wyizolowana z ekstraktów pochodzących z wątroby szczura oraz królika wykazuje wysoką specyficzność wobec amidofosforanonukleozydów i nie katalizuje hydrolizy fosforanów oraz amidofosforanów nie będących pochodnymi nukleozydów [4]. Przeprowadzone badania dotyczące zależności między strukturą substratów a ich aktywnością wykazały, iż fosforoamidaza najszybciej hydrolizuje pochodne nukleozydów purynowych zawierające niezatłoczone przestrzennie podstawniki aminowe oraz resztę aminokwasową o konfiguracji D. Dodatkowo zastąpienie pierścienia rybozy przez 2'-deoksyrybozę również zmniejszało szybkość hydrolizy badanego substratu. Postulowano, iż protonowanie atomu azotu w ugrupowaniu amidofosforanowym poprzedza rozszczepienie wiązania P-N.

1. WEWNĄTRZKOMÓRKOWA AKTYWACJA PRONUKLEOTYDÓW O STRUKTURZE AMIDOFOSFODIESTRÓW

Po raz pierwszy amidofosforanowe pochodne nukleozydów przeciwwirusowych zostały zaprojektowane przez McGuigana w 1993 roku jako potencjalne inhibitory odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1 [5].

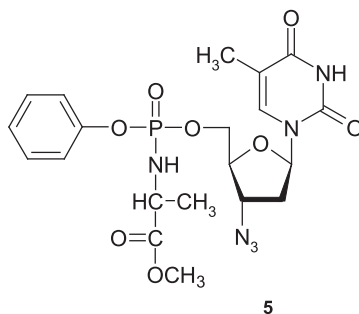
Pierwszy etap syntezy tych związków polegał na reakcji tlenochlorku fosforu (1) z fenolem. Otrzymany w ten sposób dichlorofosforan 2 reagował z chlorowodorkiem estru aminokwasu dając odpowiedni chlorofosforan 3 (Schemat 1). W kolejnym etapie przeprowadzona fosforylacja 5'-hydroksylowej grupy nukleozydu za pomocą chlorofosforanu 3 prowadziła do pożądaných amidofosfodiestrów 4. W przypadku, gdy ta ostatnia reakcja była prowadzona wobec *N*-metyloimidazolu związki 4 powstawały z wydajnością 30–50% natomiast zmiana warunków reakcji na mieszaninę pirydyna/*N*-metyloimidazol skutkowała wzrostem wydajności reakcji do 70%.



Schemat 1. Synteza pronukleotydów o strukturze amidofosfodiestrów
 Scheme 1. Synthesis phosphoramidate diester pronucleotides

Otrzymana seria amidofosfodiestrowych pochodnych AZT oraz d4T zawierająca w swej strukturze fragmenty naturalnych aminokwasów wykazała w wielu przypadkach wyższą aktywność przeciwwirusową niż niemodyfikowane nukleozydy [5, 6].

Wśród zsyntezowanych amidofosfodiestrowych pochodnych AZT, związek 5 (Rys. 1) zawierający w swej strukturze fragment alaniny oraz niepodstawioną grupę fenylową wykazywał największą aktywność inhibitorową wobec wirusa HIV-1 w komórkach MT-4 (komórki ludzkich T-limfocytów).

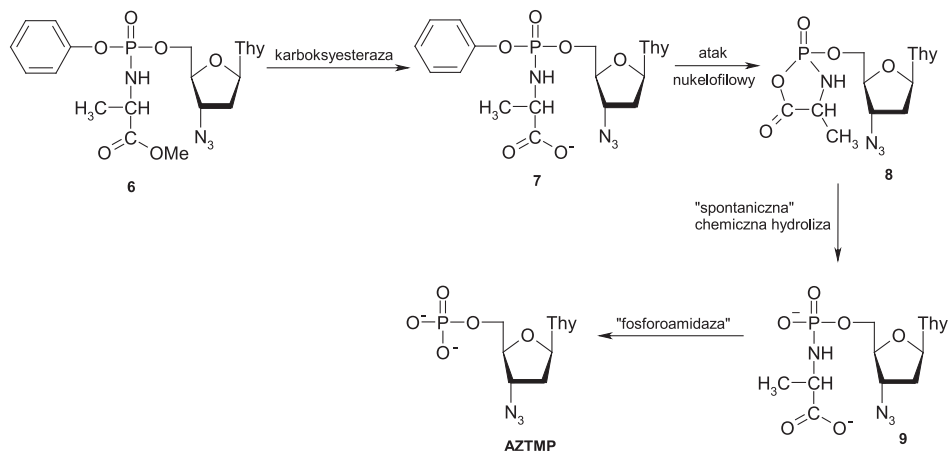


Rysunek 1. Struktura 5'-O-amidofosfodiestrowej pochodnej AZT
 Figure 1. Structure of 5'-O-phosphoramidate derivative of AZT

Ważnym wynikiem przeprowadzonych badań biologicznych było stwierdzenie, że amidofosforanowa pochodna d4T była zarówno aktywna w komórkach CEM/0 (komórki ostrej białaczki limfoblastycznej) jak i w komórkach CEM/TK⁻ (komórki ostrej białaczki limfoblastycznej z deficytem kinazy tymidynowej). Fakt ten potwierdzał, że koncepcja wyeliminowania pierwszego etapu fosforylacji nukleozydu, który w przypadku d4T jest etapem decydującym o szybkości całego procesu fosforylacji,

okazała się być trafna dla tego pronukleotydu. Natomiast wyraźnie niższa aktywność biologiczna amidofosforanowych pochodnych AZT w komórkach CEM/TK⁻ w stosunku do komórek CEM/0 wynikała z faktu, iż w przypadku tego nukleozydu konwersja odpowiedniego monofosforanu do difosforanu jest etapem ograniczającym szybkość trój etapowego procesu fosforylacji [6].

Prowadzone w kilku ośrodkach badawczych badania mające na celu poznanie metabolizmu amidofosforanowych pronukleotydów wskazywały, iż pierwszym etapem aktywacji tych związków jest katalizowana przez karboksyesterazę hydroliza ugrupowania karboksyestrowego we fragmencie aminokwasowym (**6**, Schemat 2) prowadząca do powstania związku **7** [7]. Następnie w wyniku wewnątrzcząsteczkowego ataku nukleofilowego grupy karboksylowej na atom fosforu dochodzi do utworzenia pięcioczłonowego, cyklicznego związku pośredniego **8**, czemu towarzyszy spontaniczna eliminacja fenolu. Związek ten jest nietrwały i na drodze hydrolizy chemicznej zostaje przekształcony w amidofosfomonoestrową pochodną **9** i następnie w kolejnym etapie w monofosforan nukleozydu (AZTMP). Jednakże naukowcom nie udało się jednoznacznie ustalić czy rozszczepienie wiązania P-N katalizowane jest głównie przez specyficzne fosfatazy, które zwykle wykorzystują jako substraty estry fosforanowe czy też przez fosforoamidazę specyficzną dla amidofosforanów [8]. Wolny nukleozyd (AZT), który był również jednym z metabolitów tworzy się najprawdopodobniej w wyniku katalizowanej przez fosfatazy bądź 5'-nukleotydyazy hydrolizy AZTMP. Na podstawie badań mechanizmu aktywacji amidofosforanowych pochodnych nukleozydów ustalono, iż warunkiem koniecznym w tym procesie jest obecność w cząsteczce pronukleotydu estru metylowego α -aminokwasu, który ulega hydrolizie w etapie poprzedzającym eliminację fenolu [9].

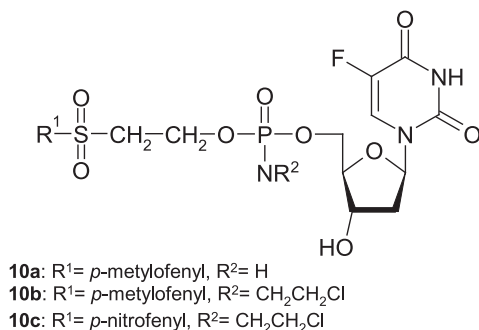


Schemat 2. Aktywacja pronukleotydów o strukturze amidofosfodiestrów

Scheme 2. The activation of the phosphoramidate diester pronucleotides

Inną grupę amidofosforanowych pochodnych pronukleotydów zaproponował Zespół Kwona [10]. W tym przypadku ugrupowanie sulfonyloetylowe stanowiło

grupę maskującą funkcję fosforanową w pochodnej 5-fluorodeoksyurydyny (**10a-c**, Rys. 2), nukleozydu o właściwościach przeciwnowotworowych hamującego aktywność syntazy tymidylanowej.



Rysunek 2. Struktura amidofosfodiesteru z ugrupowaniem sulfonyloetylowym
 Figure 2. Structure of phosphoramidate diester with sulfonylethyl group

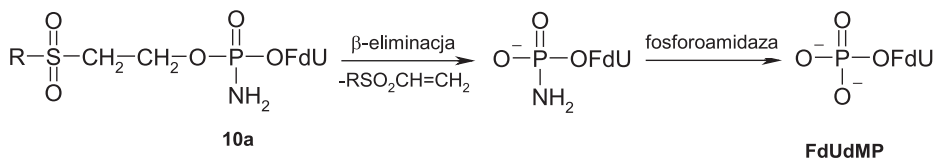
Zaproponowany mechanizm aktywacji tych związków zakładał w pierwszym etapie β -eliminację grupy sulfonyloetylowej prowadzącą do utworzenia odpowiedniego amidofosforanu i następnie zerwanie wiązania P-N z uwolnieniem FdUMP (Schemat 3).

Przypuszczano, iż enzym o aktywności fosforoamidazy będzie hydrolizował to wiązanie w przypadku pochodnej **10a** (Schemat 3a), natomiast proces generowania wolnego nukleotydu z pochodnej **10b** będzie przebiegał przez spontaniczną hydrolizę azyrydiniowego związku pośredniego **11** lub jego alkilowanej pochodnej **12** (Schemat 3b).

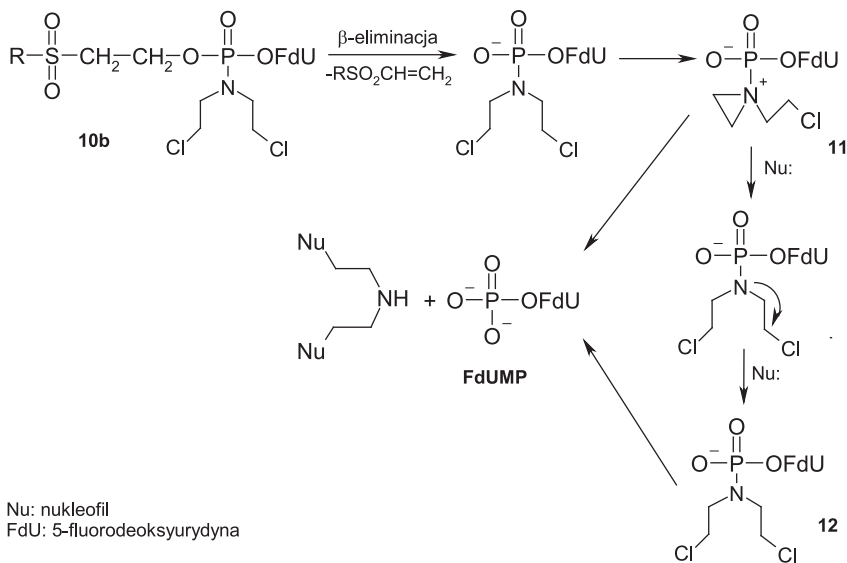
Badania stabilności otrzymanych związków potwierdziły, iż aktywacja zachodzi poprzez β -eliminację, której szybkość zależy od rodzaju podstawnika w grupie sulfonyloetylowej. Obecność elektronodonorowej grupy *p*-metylofenylowej obniża kwasowość α -protonu i zmniejsza szybkość hydrolizy w porównaniu ze związkiem posiadającym elektronoakceptorową grupę *p*-nitrofenylową. Ponadto pochodna **10a** zawierająca niepodstawioną grupę aminową okazała się być trwalsza niż jej *N,N*-bis(2-chloroetylowy) analog **10b**.

Otrzymane pronukleotydy wykazały większą aktywność inhibitorową wobec komórek linii V67 (fibroblasty płucne chomika chińskiego) niż odpowiednie pochodne urydyny zsyntezowane jako związki modelowe.

a.



b.



Nu: nukleofil

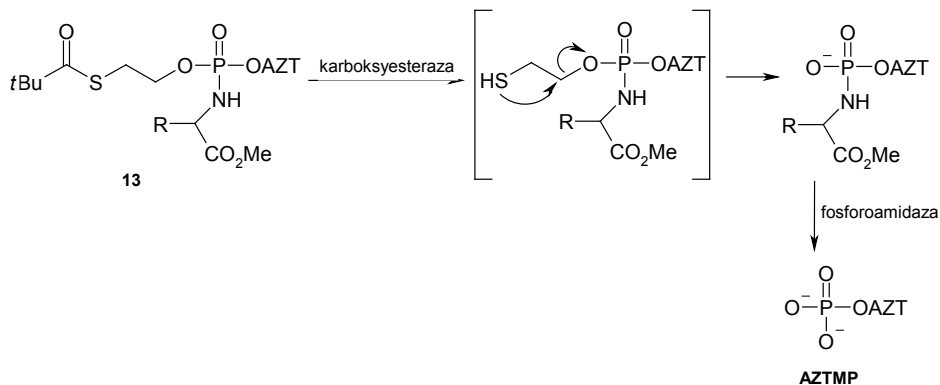
FdU: 5-fluorodeoksyrydina

Schemat 3. Aktywacja pronukleotydów zawierających grupę sulfonylową

Scheme 3. The activation pathway of the pronucleotides containing sulfonfyl group

Na uwagę zasługują także zsyntezowane w Zespole Imbacha amidofosfodiestrowe pochodne AZT (**13**, Schemat 4), w których grupę maskującą stanowiło również ugrupowanie aminokwasowe [11]. Natomiast biolabilna grupa S-pivaloilo-2-tioetylowa (tBuSATE) była wykorzystana jako drugi podstawnik maskujący funkcję fosforanową.

W przeciwieństwie do aryloamidofosfodiestrowych pochodnych nukleozydów zaprojektowanych przez McGuigana, związki zawierające ugrupowanie tBuSATE umożliwiały dostarczenie pożądanego 5'-monofosforanu nukleozydu wyłącznie drogą enzymatycznej aktywacji. W pierwszej kolejności w reakcji katalizowanej przez karboksyesterazę zachodziła hydroliza estru karboksylowego aminokwasu oraz eliminacja grupy SATE, a następnie pod działaniem enzymu o aktywności fosforoamidazy dochodziło do rozszczepienia wiązania P-N.

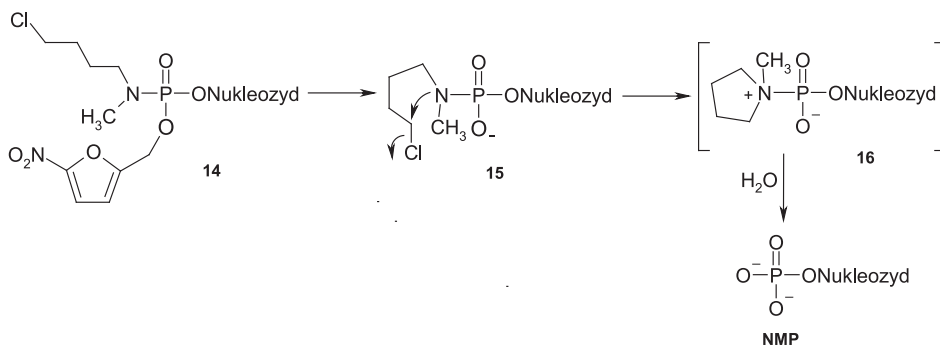


Schemat 4. Aktywacja SATE amidofosfodiestrów

Scheme 4. The activation of SATE phosphoramidate diesters

Większość otrzymanych amidofosfodiestrowych pochodnych była inhibitorami procesu replikacji wirusa HIV-1 zarówno w komórkach CEM/0 jak i CEM/TK. Interesujący wynik stanowiła aktywność biologiczna pochodnych posiadających modyfikacje zarówno w grupie SATE, jak i we fragmencie amidowym. W tym przypadku nawet zamiana podstawnika aminokwasowego na alkiloaminę nie obniżała właściwości przeciwwirusowych związku.

Głównym ograniczeniem koncepcji pronukleotydów o strukturze amidofosforanowych pochodnych aminokwasów była możliwość hydrolizy tych związków bezpośrednio przed wniknięciem do komórki w procesie katalizowanym przez powszechnie występujące niespecyficzne esterazy. Ponadto finalna hydroliza wiązania P-N przebiegała na tyle wolno, że następowała wewnątrzkomórkowa akumulacja nukleotydu [12]. Borch wraz ze współpracownikami zaprojektował amidofosforanowe pochodne nukleozydów, które zgodnie z założeniem miały eliminować te ograniczenia [13].



Schemat 5. Aktywacja pronukleotydów o strukturze nitrofuranylmetylowych amidofosforanów

Scheme 5. The activation of nitrofuranylmethyl phosphoramidate pronucleotides

Jako podstawnik zapewniający transport dokomórkowy nukleotydu zastosowano grupę nitrofurylową **14** (Schemat 5), która w wyniku bioredukcyjnej aktywacji nukleotydu **14** ulegała eliminacji prowadząc do utworzenia związku anionowego **15**. Grupę maskującą w **14** stanowiła halogenobutyloamina ulegająca w kolejnym etapie spontanicznej cyklizacji prowadzącej do piroolidynowego związku przejściowego **16**.

Wszystkie otrzymane według powyższej koncepcji amidofosforanowe pochodne FdUMP wykazały wysoką aktywność inhibitorową wobec mysich komórek białaczki L1210 (IC_{50} 0,5–3 nM). Wyniki badań aktywności syntazy tymidylanowej w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej potwierdziły, iż aktywacja pronukleotydu przebiega poprzez proponowany mechanizm obejmujący wewnątrzkomórkowe generowanie FdUMP.

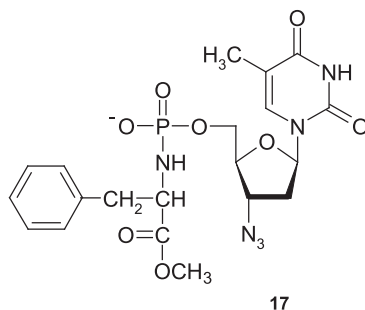
Poszerzając zastosowanie powyższej koncepcji amidofosforanowych pronukleotydów, Zespół Borchy zsyntetyzował serię pochodnych cytarabiny [$1-\beta$ -D-arabinofuranozylocytozyny (Ara-C)], nukleozydu stosowanego w terapiach przeciwnowotworowych [14]. Choć przypuszczano, iż Ara-CTP działa w oczekiwany sposób (hamuje wiązanie trifosforanu 2'-deoksycytydyny z polimerazą DNA a po wbudowaniu do wydłużającego się łańcucha DNA prowadzi do błędnej bądź niekompletnej syntezy nici DNA), to jego użyteczność była ograniczona przez słaby transport do wnętrza komórki oraz niską aktywność substratową względem kinaz pochodzących z komórek nowotworowych. Przeprowadzone badania aktywności biologicznej potwierdziły, że otrzymane pronukleotydy w porównaniu z niemodyfikowaną cytarabiną są znacznie bardziej aktywne wobec linii komórek z niedoborem kinazy deoksycytydynowej oraz linii odpornej na transport nukleozydu, co stanowi potwierdzenie mechanizmu obejmującego wewnątrzkomórkowy transport 5'-monofosforanu cytarabiny.

Grupa Borchy zsyntezowała również amidofosforanową pochodną gemcytabiny (dFdC) zawierającą jako grupę maskującą resztę *N*-metylo-*N*-4-chlorobutyloową, której aktywność badano w odniesieniu do linii komórek nowotworu płuc, jajników oraz białaczki [15]. Mimo, iż związek ten okazał się być mniej aktywny od dFdC w komórkach dzikiego typu, to w komórkach posiadających niedobór kinazy deoksycytydynowej był znacząco aktywniejszy od niemodyfikowanego nukleozydu.

2. WEWNĄTRZKOMÓRKOWA AKTYWACJA PRONUKLEOTYDÓW O STRUKTURZE AMIDOFOSFOMONOESTRÓW

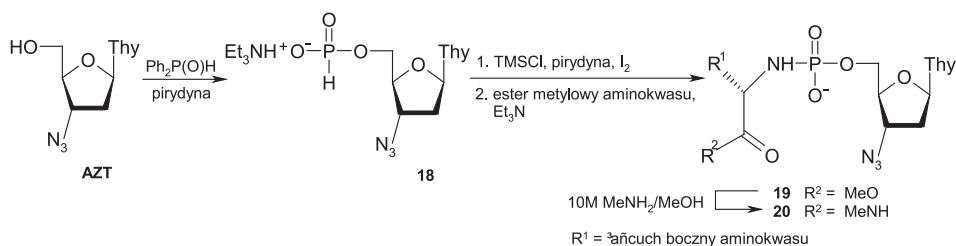
W 1994 roku Wagner zsyntezował w oparciu o metodę amidofosforynową i reakcję oksydacyjnego amidowania pronukleotydy o strukturze amidofosfomonoestrów (**17**, Rys. 3), w których grupę maskującą stanowiły aminokwasy [16, 17]. Przesłankę przemawiającą za ich syntezą stanowiło założenie, iż tego typu proleki powinny być lepiej rozpuszczalne w wodzie w porównaniu do diestrów, a podstawnik będący resztą hydrofobowego aminokwasu powinien umożliwiać efektywniej-

szy transport aktywnych nukleotydów do wnętrza komórki oraz zwiększać ich stabilność w osoczu.



Rysunek 3. Struktura amidofosfomonoestrowej pochodnej AZT
Figure 3. Structure of phosphoramidate monoester derivative of AZT

Niska wydajność związków zsyntezowanych w oparciu o metodę amidofosforynową jak również konieczność wielokrotnie powtarzanego procesu chromatograficznego w celu otrzymania czystych produktów, skłoniła autorów do poszukiwania wydajniejszego sposobu ich otrzymywania. Wykorzystanie *H*-fosfonianowych związków pośrednich okazało się wydajniejszą metodą otrzymania amidofosforanowych monoestrów [18a]. W tym celu nukleozydy poddawano reakcji z fosforynem difenylowym otrzymując odpowiednie 5'-*H*-fosfoniany nukleozydów **18** [18b], które następnie traktowano nadmiarem chloroku trimetylosililowego i utleniano jodem. Finalne sprzężanie z estrem metylowym aminokwasu wobec trytyloaminy prowadziło do powstania pożądaných amidofosfomonoestrów **19** z wydajnością 31–70%. Związki te poddane reakcji z 10M roztworem metyloaminy przekształcono następnie w odpowiednie *N*-metyloamidowe pochodne **20**.



Schemat 6. Synteza pronukleotydów o strukturze amidofosfomonoestrów
Scheme 6. Synthesis of phosphoramidate monoester pronucleotides

Otrzymane pronukleotydy o strukturze amidofosfomonoestrów w wielu przypadkach posiadały większą aktywność niż niemodyfikowane nukleozydy. Badania biologiczne tego typu pochodnych AZT wykonane na liniach komórkowych PBMCs (jednojądrzaste komórki krwi obwodowej) oraz CEM wykazały, iż pochodne fenylalaniny oraz tryptofanu są najaktywniejszymi związkami, co więcej w ich przypadku nie obserwowano efektu cytotoksycznego przy stężeniach 100 μM .

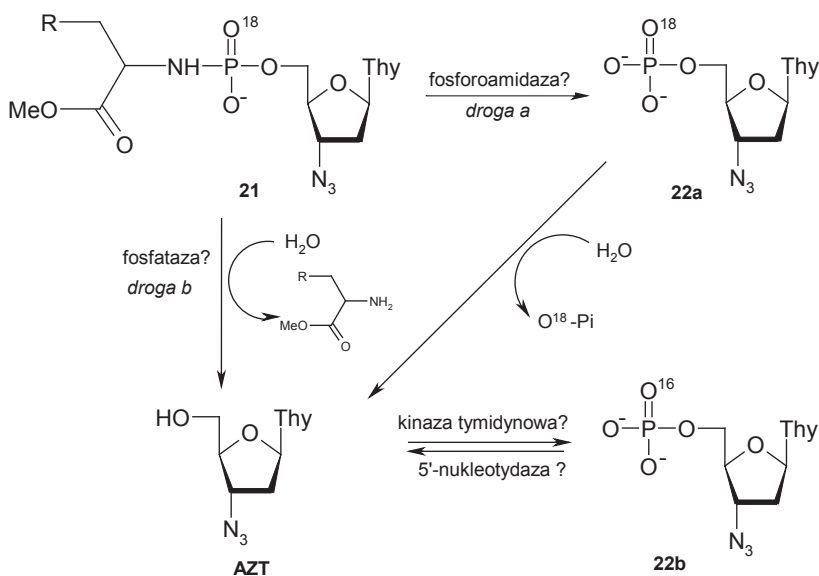
Zsyntezowane w Zespole Wagnera pronukleotydy o strukturze amidofosfomonoestrów odpowiadają pod względem strukturalnym aktywnym metabolitom amidofosfodiestrów zaprojektowanych przez McGuigana. Jakkolwiek aktywność biologiczna amidofosfodiestrów pochodnych była zależna od konfiguracji na chiralnym atomie węgla aminokwasu, to dla pronukleotydów zaprojektowanych przez Wagnera nie obserwowano takiej zależności [19]. Amidofosfomonoestry posiadające na aminokwasowym C-końcu nie ulegające hydrolizie pod działaniem karboksyesteraz ugrupowanie *N*-metyloamidowe, wykazywały porównywalną aktywność przeciwwirusową, a w niektórych przypadkach nawet większą niż odpowiednie pochodne z C-końcem w postaci estru metylowego [20a]. W oparciu o te wyniki założono, iż aktywacja amidofosfomonoestrów nie przebiega w taki sposób jak ich analogów amidofosfodiestrów, to jest poprzez poprzedzającą hydrolizę wiązania P-N konwersję do odpowiednich kwasów karboksylowych.

Aktywność przeciwwirusowa amidofosfomonoestrów jest ściśle związana z wewnątrzkomórkowym poziomem odpowiedniego monofosforanu nukleozydu (NMP). Przypuszczano, iż fragment aminokwasowy pronukleotydu decyduje o efektywności wewnątrzkomórkowej konwersji do NMP. W Laboratorium Wagnera przeprowadzono pierwsze badania dotyczące aktywacji amidofosfomonoestrów pochodnych 5-fluoro-2'-deoksyurydyny (FUdR) zawierających resztę tryptofanu lub fenyloalaniny, polegające na określeniu ilości generowanego FUdRMP oraz FUdR w komórkach CEM w danym przedziale czasowym [20b]. Naukowcy zaobserwowali, że chociaż początkowo odpowiedni 5'-monofosforan FUdR tworzył się znacznie wydajniej niż sam nukleozyd, to już po 2 godzinach szybkości generowania obu związków były niemal identyczne. Opierając się na tych wynikach autorzy wysnuli wniosek, iż aktywacja badanych pronukleotydów przebiega dwuetapowo i obejmuje rozszczepienie wiązania P-N przez nieznaną enzym o aktywności fosfoamidazy oraz następującą hydrolizę wiązania P-O katalizowaną przez odpowiednią fosfatazę.

Badania szlaku metabolicznego amidofosfomonoestrów pochodnych AZT potwierdziły hydrolazową aktywność ekstraktu linii komórek CEM [20a]. Zsyntezowane analogi AZT, których funkcję amidofosforanową zastąpiono ugrupowaniem karbaminianowym, hamowały proces generowania nukleotydu wykazując właściwości inhibitorowe. Aktywność przeciwwirusowa amidofosforanowej pochodnej AZT zawierającej resztę tryptofanu o konfiguracji L, przeczyła wcześniejszym przypuszczeniom, iż enzymem odpowiedzialnym za hydrolizę wiązania P-N w amidofosfomonoestrach jest opisana przez Shabarową fosforoamidaza 5'-rybonukleotydomowa pochodząca z ludzkich limfocytów [4].

Przeprowadzono szereg eksperymentów mających na celu poznanie mechanizmu wewnątrzkomórkowej aktywacji amidofosfomonoestrów [21]. Badania z wykorzystaniem techniki HPLC-ESI-MS/MS wykonano na pochodnej AZT (**21**, Schemat 7), w której fosforylowy atom tlenu został zastąpiony izotopem tlenu O^{18} . Pronukleotyd ten inkubowano z komórkami CEM i analizowano powstałe produkty

w różnych przedziałach czasowych. Obecność monofosforanu **22a** wskazywała, iż następuje katalizowana enzymatycznie hydroliza wiązania P-N (Schemat 7, droga a). Jednakże wewnątrzkomórkowa konwersja pochodnej **21** do monofosforanu **22b** może również przebiegać poprzez defosforylację katalizowaną najprawdopodobniej przez fosfatazę (Schemat 7, droga b) i następczą fosforylację prowadzącą do związku **22b**. Podwyższony poziom wewnątrzkomórkowego AZT i prawie zupełny zanik [^{18}O]-AZT-MP (**22a**) dowodził, iż tworząca się monofosforanowa pochodna AZT (**22b**) jest szczególnie podatna na defosforylację katalizowaną 5'-nukleotydazami. W przeciwieństwie do komórek CEM, eksperymenty przeprowadzone na komórkach PBMCs wykazały wyższy poziom [^{18}O]-AZT-MP (**22a**), natomiast ilość AZT była w nich niemal niewykrywalna. Powodem obserwowanego zróżnicowania jest niższy poziom ekspresji 5'-nukleotydazy w komórkach PBMCs w stosunku do komórek CEM.



Schemat 7. Aktywacja pronukleotydów o strukturze amidofosfomonoestrów

Scheme 7. The activation of the phosphoramidate monoester pronucleotides

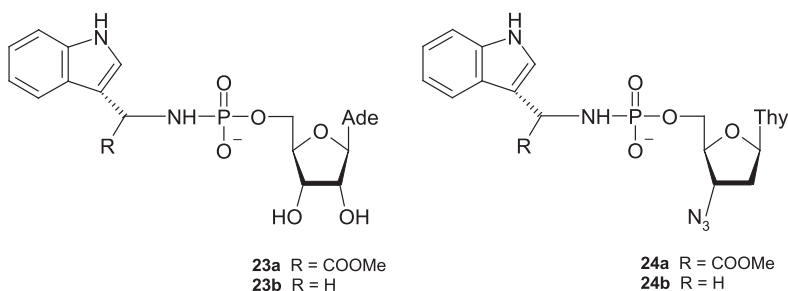
Na szczególną uwagę zasługują zsyntezowane w Zespole Kraszewskiego N-aryloamidofosforanowe pochodne AZT [22]. Jakkolwiek wszystkie te związki wykazywały aktywność anty-HIV, to pochodne aminopirydynylowe posiadały zarówno najwyższą aktywność przeciwwirusową ($\text{EC}_{50} < 0.002\mu\text{M}$) jak i bardzo niską cytotoksyczność ($\text{CC}_{50} \gg 200\mu\text{M}$).

3. AKTYWACJA AMIDOFOSFORANOWYCH PRONUKLEOTYDÓW PRZEZ BIAŁKO HINT

Prowadzone w ostatnich latach badania metabolizmu amidofosforanowych pochodnych nukleozydów wskazują, iż enzymem odpowiedzialnym za ich hydrolizę jest rodzina białek Hint (ang. *histidine triad nucleotide binding protein*) o aktywności fosforoamidazy nukleozydowej. Obecność w każdym sekwencjonowanym do tej pory genomie enzymów posiadających aktywność białka Hint świadczy, że białka te występują we wszystkich organizmach. Jakkolwiek białko Hint zostało opisane po raz pierwszy w 1997 roku to substraty dla tego białka i mechanizm jego działania zaproponowano dopiero w 2002 roku [23].

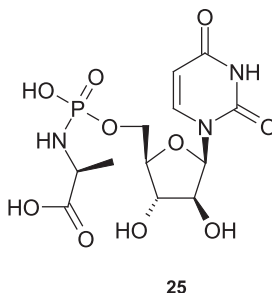
W laboratorium Brennera wykazano, że enzym wyizolowany zarówno z drożdży, jak i komórek ssaczych hydrolizuje adenozylo-5'-O-amidofosforan (AMP-NH₂) i AMP-N-ε-(N-α-acetylizynometyloester) do AMP. Był to pierwszy dowód świadczący o tym, że białko Hint posiada aktywność fosforoamidazową i może być ono enzymem odpowiedzialnym za aktywację pronukleotydów o strukturze amidofosforanów w warunkach *in vivo*. Powstała również hipoteza, że Hint w procesie ewolucji rozwinął się jako enzym spontanicznie hydrolizujący adenylowane białka, regulując w ten sposób ich funkcje *in vivo*.

Dalsze badania prowadzone w Laboratorium Wagnera dotyczące zależności pomiędzy aktywnością białka Hint a strukturą amidofosforanów wykazały, iż związki zawierające niezatłoczone przestrzennie grupy aminowe oraz grupę hydroksylową w pozycji 2', zarówno w α i β konfiguracji, powinny być łatwo bioaktywowane przez Hint [24]. Jednakże autorom opierającym swoje badania głównie na analizie ³¹P NMR nie udało się jednoznacznie potwierdzić, iż L-feniloalanyloamidofosforanowa pochodna AZT wykazująca aktywność przeciwwirusową oraz przeciwnowotworową jest substratem dla ludzkiego hHint1. Stąd też następne prace wykonane przy użyciu bakteriofagów T7 z zastosowaniem fagowej ekspozycji peptydów (ang. *phage display*), chromatografii powinowactwa i kinetyki stanu stacjonarnego dowiodły, iż jest wysoce prawdopodobnym, że hHint1 odpowiada za bioaktywację amidofosforanowych pochodnych AZT w komórkach PBMCs oraz CEM [25]. Autorzy porównywali szybkość z jaką hHint1 hydrolizuje amidofosforanowe pochodne adenozyliny oraz AZT zawierające reszty estru metylowego L-tryptofanu bądź grupę 3-indoiloową (23 i 24, Rys. 4). Zaobserwowano, iż w przypadku związków zawierających fragment tryptofanu amidofosforanowa pochodna 23a była 32-krotnie lepszym substratem dla enzymu niż analog 24a, natomiast usunięcie fragmentu karboksymetylowego w obrębie aminokwasu (23b, 24b) zwiększało blisko milion razy selektywność enzymu. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi danymi mówiącymi o tym, że pronukleotydy pochodne rybonukleotydów purynowych stanowią lepsze substraty dla rHint1.



Rysunek 4. Struktury amidofosforanowych substratów dla enzymu Hint
 Figure 4. Structures of phosphoramidate substrates for Hint enzyme

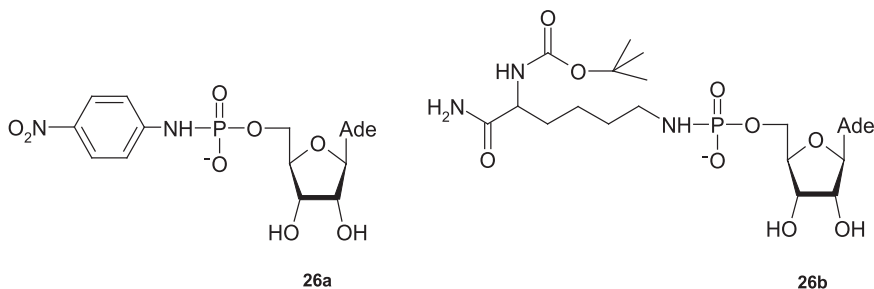
McGuigan poszukując przyczyny braku aktywności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej zszyntezowanych pronukleotydów pochodnych 2'- β -D-arabionourydyny przeprowadził eksperymenty mające na celu poznanie wewnątrzkomórkowego metabolizmu amidofosfodiesterów [26]. Badanie wykonane na surowym ekstrakcie linii komórek nowotworowych CEM wykazało, iż pronukleotydy zawierające resztę L-alaninową oraz L-glicylową ulegały konwersji do odpowiednich amidofosfomonoestrowych związków pośrednich, natomiast analog zawierający resztę D-alaniny takiej przemianie nie podlegał. Autorzy wykluczyli również możliwość rozszczepienia wiązania P-N w tworzącej się amidofosfomonoestrowej pochodnej nukleozydu przez karboksyesterazę. Wykorzystując metodę dokowania molekularnego próbowano określić konformację związku pośredniego **25** (Rys. 5), która umożliwiłaby wiązanie ugrupowania fosforanowego z miejscem katalitycznym Hint-1. Konformacja amidofosfomonoestru, w której zasada pirymidynowa dobrze dopasowywała się do hydrofobowej kieszeni enzymu, nie umożliwiała wiązania się grup hydroksylowych pierścienia cukrowego z resztą kwasu asparaginowego znajdującego się w miejscu aktywnym enzymu. Natomiast w przypadku konformerów zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych między fragmentem cukrowym pronukleotydu a resztą kwasu asparaginowego obserwowano wypychanie cząsteczki amidofosfomonoestru na zewnątrz hydrofobowej kieszeni enzymu.



Rysunek 5. Struktura amidofosfomonoestrowego substratu dla enzymu Hint
 Figure 5. Structures of phosphoramidate substrates for Hint enzyme

Dane te wskazywały jednoznacznie, iż hydroliza wiązania P-N w L-alanylowej pochodnej amidofosforanu AraU nie jest tak wydajna jak w przypadku AMP, co może być jedną z przyczyn niskiej aktywności przeciwwirusowej oraz cytotoksyczności badanej grupy pronukleotydów.

W Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi zsyntezowano adenozyno-5'-O-(*p*-nitrofenylo)amidofosforan (**26a**) oraz adenozyno-5'-O-[*N*- ϵ -(*N*- α -Boc-lizynoamido)]amidofosforan (**26b**), które były wykorzystane w Laboratorium Brennera do badania oddziaływania z białkiem Hint (Rys. 6).

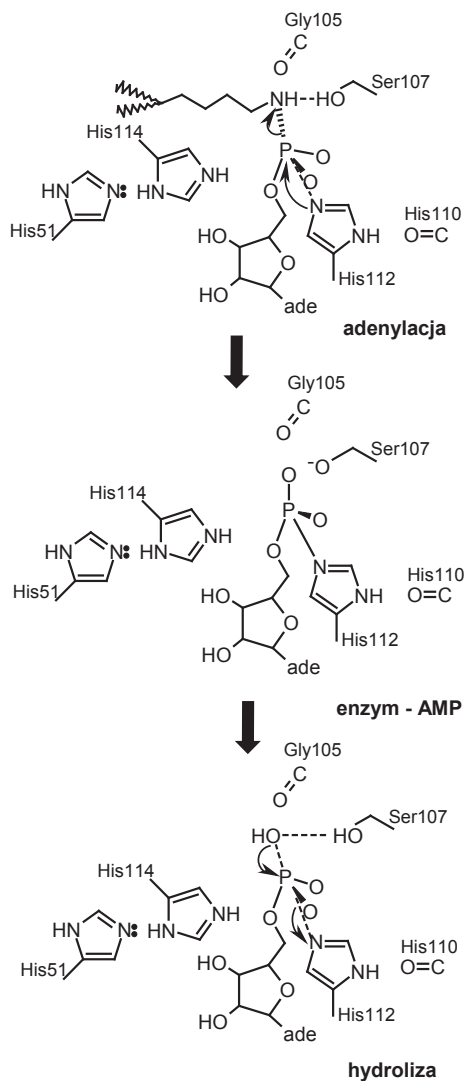


Rysunek 6. Struktury substratów dla enzymu Hint: AMP-*p*NA i AMP-*N*- ϵ -(*N*- α -Boc-lizynoamidu)
 Figure 6. Structures of substrates for Hint enzyme: AMP-*p*NA and AMP-*N*- ϵ -(*N*- α -Boc-lysinoamide)

Zespół Brennera śledząc hydrolizę związków **26a** i **26b** scharakteryzował centrum katalityczne białka Hint i zaproponował mechanizm jego działania [27]. Etap adenylacji enzymu prowadzi do rozerwania wiązania P-N w substracie nukleozydyloaminokwasowym (Schemat 8, **26b**). Znajdująca się w centrum aktywnym seryna 107 pełniąc rolę kwasowo-zasadowego katalizatora protonuje atom azotu adenylowanego białka np. ϵ -*N* lizyny. Utworzony związek pośredni enzym-substrat (HINT-His112)-AMP w wyniku ataku cząsteczki wody na atom fosforu ulega przekształceniu do AMP czemu towarzyszy uwolnienie cząsteczki enzymu.

Zaproponowany mechanizm aktywności hydrolazowej białka Hint jest zbliżony z przebiegiem hydrolizy katalizowanej przez białko FHIT, gdzie również tworzy się kowalencyjny związek pośredni enzym-substrat [28]. Białko FHIT należące do jednej z podklas białek HIT (białka traidy histydynowej), wśród których znajduje się także białko Hint, jest enzymem hydrolizującym dinukleotydy polifosforanowe Ap3A i Ap4A. Warto podkreślić, iż istnieją badania potwierdzające, iż białko FHIT hydrolizuje wiązanie P-N w 5'-O-amidofosforanie adenozyliny oraz wiązanie P-F w 5'-O-fluorofosforanie adenozyliny [29]

Natomiast w 2007 roku w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi ustalono stereochemię rozszczepienia wiązania P-N w *N*-typtofanyloamidowej pochodnej tiofosforanu adenozyliny [30]. Reakcja ta zachodzi z retencją konfiguracji na atomie fosforu. Autorzy wykazali, iż hydrolizie wiązania P-N towarzyszy enzymatyczna reakcja rozszczepienia wiązania P-S, przy czym szybkość konwersji AMPS do AMP jest większa niż szybkość rozszczepienia wiązania P-N.



Schemat 8. Proponowany katalityczny mechanizm działania hydrolazy Hint

Scheme 8. Proposed catalytic mechanism for Hint hydrolase

PODSUMOWANIE

Badania aktywności biologicznej amidofosforanowych pochodnych nukleozydów zawierających jako grupy maskujące reszty aminokwasowe, aryłowe, sulfonyłowe bądź halogenoalkilowe wykazały, że mogą one dostarczać nukleozydy do wnętrza komórek czyniąc je obiecującymi narzędziami wykorzystywanymi w terapiach przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Jakkolwiek przeprowadzone dotych-

czas badania metabolizmu amidofosforanowych pochodnych nukleozydów wskazują, iż enzymem odpowiedzialnym za aktywację tych związków jest rodzina białek Hint o aktywności fosforoamidazy nukleozydowej to sam mechanizm wewnątrzkomórkowej aktywacji pronukleotydów nie został w pełni poznany. W wielu laboratoriach badawczych prowadzone są intensywne prace mające na celu zidentyfikowanie wymagań substratowych enzymu odpowiedzialnego za rozerwanie wiązania P-N, które pozwoliłyby konstruować amidofosforanowe proleki o możliwie największej efektywności uwalnia aktywnego monofosforanu nukleozydu.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] a) J.G. Moffatt, H.G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, **83**, 649; b) J.W. Kozarich, A.C. Chinault, S.M. Hecht, *Biochemistry* 1973, **12**, 4458; C.R. Wagner, V.V. Iyer, E.J. McIntee, *Med. Res. Rev.* 2000, **20**, 417.
- [2] C.M. Galmarini, J.R. Mackey, C. Dumontet, *Leukemia*, 2001, **15**, 875.
- [3] R.S. Smith, D.J. Burrow, *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, **34**, 274.
- [4] a) Z.A. Shabarova, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 1970, **10**, 145; b) S.M. Dudkin, R.K. Ledneva, Z.A. Shabarova, M.A. Prokofiev, *FEBS Lett.*, 1971, **16**, 48.
- [5] C. McGuigan, R. N. Pathirana, J. Balzarini, E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 1048.
- [6] C. McGuigan, D. Cahard, H. M. Sheeka, E. De Clercq, J. Balzarini, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 1748.
- [7] a) J. Balzarini, H. Egberink, K. Hartmann, D. Cahard, T. Vahlenkamp, H. Thormar, E. De Clercq, C. McGuigan, *Mol. Pharmacol.*, 1996, **50**, 1207; b) D. Egron, I. Lefebvre, C. Perigaud, T. Beltran, A. Pompon, G. Gosselin, A.-M. Aubertin, J.-L. Imbach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 1045.
- [8] a) S.J. Kelly, D.E. Dardinger, L.G. Butler, *Biochemistry*, 1975, **14**, 4983; b) S.L. Snyder, I.B. Wilson, *Biochemistry*, 1972, **11**, 3220.
- [9] D. Saboulard, L. Naesens, D. Cahard, A. Salgado, R. Pathirana, S. Velazquez, C. McGuigan, E. De Clercq, J. Balzarini, *Mol. Pharmacol.*, 1999, **56**, 693.
- [10] Y.-W. Sun, K.-M. Chen, Ch.-H. Kwon, *Mol. Pharmaceutics*, 2006, **3**, 161.
- [11] D. Egron, J.-L. Imbach, G. Gosselin, A.-M. Aubertin, C. Perigaud, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 4564.
- [12] S.C. Tobias, R.F. Borch, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 4475.
- [13] W. Wu, R.F. Borch, *Mol. Pharm.*, 2006, **3**, 451.
- [14] S.C. Tobias, R.F. Borch, *Mol. Pharm.*, 2004, **1**, 112.
- [15] W. Wu, J. Sigmond, G.J. Peters, R.F. Borch, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 3743.
- [16] a) W.T. Abraham, C.R. Wagner, *Nucleosides & Nucleotides*, 1994, **13**, 1891; b) C.R. Wagner, E.J. McIntee, R.F. Schinazi, T.W. Abraham, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995, **5**, 1819.
- [17] E.J. McIntee, R.P. Rimmel, R.F. Schinazi, T.W. Abraham, C.R. Wagner, *J. Med. Chem.*, 1997, **40**, 3323.
- [18] a) V.V. Iyer, G.W. Griesgraber, M.R. Radmer, E.J. McIntee, C.R. Wagner, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 2266; b) J. Jankowska, M. Sobkowski, J. Stawinski, A. Kraszewski, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 3355.
- [19] C. McGuigan, A. Salgado, C. Yarnold, T.Y. Harries, E. De Clercq, J. Balzarini, *Antiviral Chem. Chemother.*, 1996, **7**, 184.
- [20] a) S. Chang, G.W. Griesgraber, P.J. Southern, C.R. Wagner, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 223; b) T.W. Abraham, T.I. Kalman, E.J. McIntee, C.R. Wagner, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 4569.
- [21] a) J. Kim, T. Chou, G.W. Griesgraber, C.R. Wagner, *Mol. Pharmaceutics.*, 2004, **1**, 102; b) J. Kim, S. Park, N.Y. Tretyakova, C.R. Wagner, *Mol. Pharm.*, 2005, **2**, 233.

- [22] J. Romanowska, M. Sobkowski, A. Szymańska-Michalak, K. Kołodziej, A. Dąbrowska, A. Lipniacki, A. Piasek, Z.M. Pietrusiewicz, M. Figlerowicz, A. Guranowski, J. Boryski, J. Stawiński, A. Kraszewski, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 6482.
- [23] P. Bieganowski, P.N. Garrison, S.C. Hodawadekar, G. Faye, L.D. Barnes, C. Brenner, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 10852.
- [24] T.-F. Chou, J. Baraniak, R. Kaczmarek, X. Zhou, J. Cheng, B. Ghosh, C.R. Wagner, *Mol. Pharmaceutics*, 2007, **4**, 208.
- [25] J. Cheng, X. Zhou, T.-F. Chou, B. Ghosh, B. Liu, C.R. Wagner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 6379.
- [26] Y. Mehellou, R. Valente, H. Mottram, E. Walsby, K.I. Mills, J. Balzarini, C. McGuigan, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 2439.
- [27] A. Krakowiak, H.C. Pace, G.M. Blackburn, M. Adams, A. Mekhalfia, R. Kaczmarek, J. Baraniak, W.J. Stec, C. Brenner, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 18711.
- [28] A. Abend, P. N. Garrison, L.D. Barnes, P.A. Frey, *Biochemistry*, 1999, **38**, 3668.
- [29] A. Guranowski, A.M. Wojdyła, J. Zimny, A. Wypijewska, J. Kowalska, M. Łukaszewicz, J. Jemielity, E. Darzynkiewicz, A. Jagiełło, P. Bieganowski, *New J. Chem.*, 2010, **34**, 888.
- [30] A. Krakowiak, R. Kaczmarek, J. Baraniak, M. Wieczorek, W.J. Stec, *Chem. Comm.*, 2007, 2163.

Praca wpłynęła do Redakcji 28 lipca 2014

