

**AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA MODYFIKOWNYCH  
NUKLEOZYDÓW. CZĘŚĆ I**

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF MODIFIED  
NUCLEOSIDES. PART I**

**Maurycy Szlenkier**

*Institut 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 posiadających modyfikacje w części zasadowej

2. Aktywność biologiczna nukleozydów posiadających inne zasady heterocykliczne

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

Every year, hundreds of new nucleoside analogues are obtained in laboratories around the world. As early as in 1964, 3'-azidothymidine (AZT) was first synthesized, which turned out to be the main weapon in the fight against HIV viruses 20 years later. Part I of the review includes nucleosides possessing modifications in the base moiety or having other heterocyclic bases. Nucleosides modified in the sugar residue, because of a broad spectrum of examples, will be a subject of part II and III of the review. In the group of analogues modified in the base moiety the following derivatives among others are listed: 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU), E-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU), capecitabine – prodrug form of fluorouracil, 7-deazaadenosine, BCX4430 (immucillin-A) – 9-deazaadenosine derivative active against filoviruses such as Ebola virus (EBOV). In the group of nucleosides having a different heterocyclic base the following derivatives are listed: ribavirin (RBV) and its analogues – RBV triphosphate is an inhibitor of many viral enzymes involved in the replication cycle, mizoribine (MZB) – a naturally occurring nucleosidic immunosuppressor, 5-ethynyl-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide (EICAR) which suppresses development of murine leukemia cell lines and has a broad spectrum of activity against RNA and DNA viruses. The C-nucleosides group includes e.g. oxazinomycin – a natural antibiotic with growth inhibitory properties against gram (+), gram (-) bacteria and sarcoma, and formycin A isolated from *Streptomyces lavendulae*, which has cytostatic and antiviral activity.

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

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

---

---

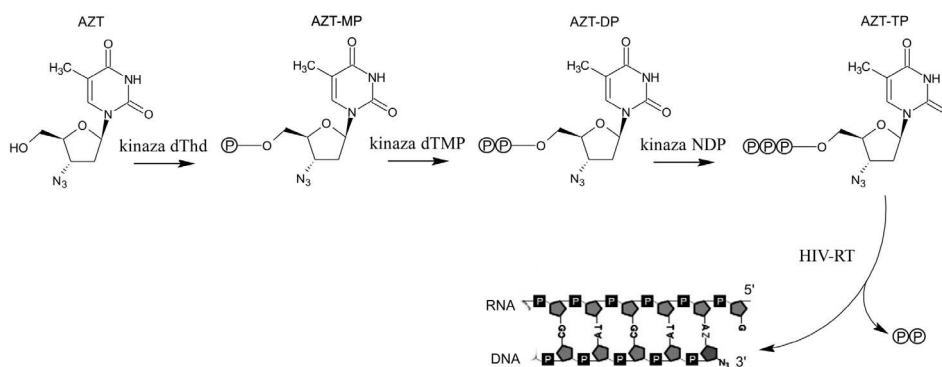
## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AZT	- 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
AZT-TP	- trifosforan AZT
BVDU	- E-5-(2-bromowinylo)-2'-deoksyurydyna
CC <sub>50</sub>	- stężenie cytotoksyczne
CMV	- <i>Cytomegalovirus</i>
CuAAC	- 1,3-dipolarna cykloaddycja azydek-alkin katalizowana miedzią
ddC	- 2',3'-dideoksytydina
dTK	- kinaza 2'-deoksytymidynowa
EICAR	- 5-etynylo-1-β-D-rybofuranozyl-imidazolo-4-karbo-ksyamid
EC <sub>50</sub>	- stężenie efektywne
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
HCV	- <i>Hepatitis C virus</i>
HSV	- <i>Herpes simplex virus</i>
HCMV	- <i>Human cytomegalovirus</i>
HIV-RT	- odwrotna transkryptaza wirusa HIV
IC <sub>50</sub>	- stężenie inhibitorowe
IDU	- 5-jodo-2'-deoksyurydyna
IMPDH	- dehydrogenaza inozynomonofosforanu
NT	- transporter nukleozydowy
RBV	- rybawiryna
RSV	- <i>Respiratory syncytial virus</i>
SI	- indeks selektywności
VSV	- <i>Vesicular stomatitis virus</i>
VZV	- <i>Varicella zoster virus</i>
VV	- <i>Vaccina virus</i>

## WPROWADZENIE

Każdego roku w laboratoriach na świecie powstają setki nowych analogów nukleozydowych. W procesie tym współpracują biolodzy, informatycy, chemicy, farmakolodzy i lekarze. Celem jest znalezienie nowych analogów o wysokiej aktywności biologicznej, możliwie niskiej toksyczności, które mogłyby być stosowane w medycynie. Zbiorowe wysiłki rzeszy naukowców przyniosły wyjątkowe rezultaty. Medycyna zdobyła nowe narzędzia w walce z czynnikami chorobotwórczymi, zwłaszcza z wirusami i nowotworami.

Już w 1964 roku zsyntezowano po raz pierwszy 3'-azydotymidynę (AZT, 1) [1], która 20 lat później okazała się być głównym orężem w walce z wirusami HIV [2]. Ogólny mechanizm aktywności antywirusowej oraz antynowotworowej analogów nukleozydowych, dzięki ich podobieństwu do substratów wykorzystywanych w procesach biosyntezy nukleozydów i replikacji kwasów nukleinowych (antymetabolity), polega na blokowaniu funkcyjnym zaangażowanych enzymów poprzez wiązanie się w centrum aktywnym (inhibicja) samych nukleozydów lub ich fosforanów albo poprzez wbudowanie do biosyntezowanego łańcucha DNA/RNA, upośledzając go poprzez przerwanie elongacji lub zaburzenia strukturalne. AZT na przykład po przedostaniu się do zainfekowanej komórki dzięki transporterom nukleozydowym (NT) systemu aktywnego i biernego, ulega serii reakcji enzymatycznych do aktywnej postaci trifosforanu AZT (AZT-TP). Następnie AZT-TP jest rozpoznawany przez wirusową odwrotną transkryptazę (HIV-RT) i ulega wbudowaniu w powstający łańcuch cDNA (komplementarne DNA) wirusa (Rys. 1) [3].



Rysunek 1. Mechanizm inhibicji transkrypcji RNA wirusa HIV-1 przez AZT

Figure 1. Mechanism of HIV-1 RNA transcription inhibition by AZT

Znalezienie nowych aktywnych związków nie jest częste, a wprowadzenie ich do aptek jest jeszcze rzadsze. Pomimo syntezy setek ciągle nowych analogów rocznie, nieliczne wykazują aktywność i pomyślnie przechodzą wszystkie testy oraz badania kliniczne. Inną rzeczą jest to, że wiele zsyntezowanych analogów nie zostało w pełni przebadanych. Na szczęście również na tym polu obserwuje się postęp dzięki

rozwojowi badań przesiewowych (ang. *high throughput screening*, HTS), które obejmują coraz więcej związków.

W badaniach przesiewowych wykonywanych *in vitro* określa się poziomy aktywności i cytotoksyczności wyrażonych na kilka sposobów. Do najczęściej spotykanych należą:

- $IC_{50}$  – stężenie inhibitorowe (ang. *inhibitory concentration*), stężenie substancji badanej, które hamuje w 50% patologiczne zmiany komórek wywołane przez czynnik chorobowy;
- $CC_{50}$  – stężenie cytotoksyczne (ang. *cytotoxic concentration*), stężenie badanej substancji powodujące zmiany cytopatogeniczne zdrowych komórek;
- $EC_{50}$  – stężenie efektywne (ang. *effective concentration*), stężenie powodujące zahamowanie w 50% namnażania wirusa lub komórek nowotworowych;
- SI – indeks selektywności (ang. *selectivity index*), to stosunek  $CC_{50}/IC_{50}$ .

Wartości  $IC_{50}$  oraz  $CC_{50}$  mogą być podawane jako stężenia mikromolarne ( $\mu M$ ) lub w mikrogramach na mililitr ( $\mu g/mL$ ). Im wyższa wartość  $CC_{50}$ , a wartość  $IC_{50}$  niższa, tym badany związek wydaje się bardziej obiecujący jako przyszły farmaceutyk. Związki wysoce aktywne i selektywne osiągają wartość  $IC_{50}$  rzędu 0,001  $\mu g/mL$ , a SI rzędu dziesiątków tysięcy. Jeżeli  $SI = 1$  oznacza to, że dany preparat jest równie szkodliwy dla wirusa jak i dla komórki gospodarza. Stwierdzona aktywność *in vitro* nie oznacza jeszcze, że związek jest aktywny *in vivo*, na co wpływają inne czynniki np. farmakokinetyczne jak uwolnienie (ang. *liberation*), wchłanianie (ang. *absorption*), dystrybucja (ang. *distribution*), metabolizm (ang. *metabolism*) czy usuwanie (ang. *elimination*) – w skrócie LADME. Inne wielkości określające aktywność biologiczną to:

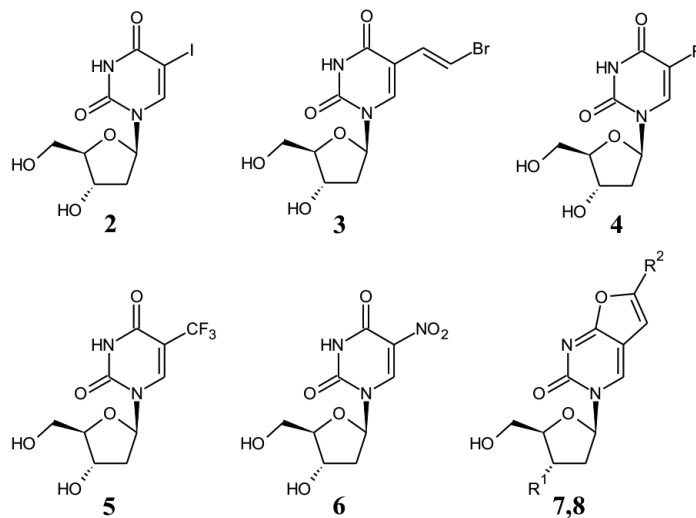
- $ID_{50}$  – dawka inhibitorowa (ang. *inhibitory dose*), dawka testowanego preparatu, która redukuje w 50% zmiany patologiczne wywołane przez czynnik chorobowy w jednowarstwowych kulturach bakterii;
- $ED_{50}$  – dawka efektywna (ang. *effective dose*), dawka badanego związku, która powoduje zahamowanie w 50% namnażania wirusa lub komórek nowotworowych w stacjonarnych kulturach komórkowych. W badaniach *in vivo* symbol ten oznacza dawkę, która powoduje 50% spadek śmiertelności wywołanej chorobą zwierząt doświadczalnych.

Poza tymi parametrami w testach inhibicji enzymatycznej stosuje się wartości używane w enzymologii: stałą Michaelisa  $K_M$  i stałą inhibicji  $K_i$ .

Poniżej zaprezentowano przegląd zgłaszanych aktywności biologicznych pochodnych nukleozydowych posiadających nienaturalny komponent zasadowy. Jest to pierwsza część z cyklu dotyczącego aktywności biologicznych modyfikowanych nukleozydów. Części druga i trzecia dotyczyć będą pochodnych modyfikowanych w części cukrowej. W założeniu przegląd ma zaprezentować wszystkie najważniejsze grupy pochodnych z wyszczególnieniem reprezentantów, którzy znaleźli zastosowanie w medycynie. Dołożono starań, aby przegląd był możliwie kompletny, zwięzły i obejmował najnowsze doniesienia.

## 1. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA NUKLEOZYDÓW POSIADAJĄCYCH MODYFIKACJE W CZĘŚCI ZASADOWEJ

W grupie analogów modyfikowanych w części zasadowej najwięcej jest pochodnych pirymidynowych [4]. Historycznie pierwszym opisanym analogiem nukleozydowym o działaniu antywirusowym była 5-jodo-2'-deoksyurydyna (IDU, **2**, Rys. 1.1.). Syntezę wykonał Prusoff [5] w 1959 r., a w 1961 r. Hermann [6] wykazał aktywność *in vitro* przeciw herpeswirusom. Ze względu na kardiotoxyczność, jest ona wykorzystywana jedynie do leczenia miejscowego i zewnętrznego np. w leczeniu infekcji rogówki. Modyfikacje w pozycji 5 nukleozydów pirymidynowych przyniosły wiele aktywnych biologicznie pochodnych. Poszukując pochodnych o lepszych właściwościach terapeutycznych – większej wartości SI, przebadano szereg związków i określono wymagania strukturalne dla podstawnika w pozycji 5. Podstawniki o charakterze nienasyconym, tworzące układ sprzężony z pierścieniem pirymidynowym okazały się najkorzystniejsze [7]. W 1976 r. w zespole Walkera otrzymano E-5-(2-bromowinylo)-2'-deoksyurydynę (BVDU, Zostex®, **3**) [8]. Wartość IC<sub>50</sub> przeciw herpeswirusom wyniosła 0,008 µg/mL przy SI > 25 000. Tak wyjątkową selektywność tłumaczy się selektywną fosforylacją wirusową kinazą tymidynową (dTCK), co ogranicza działanie tylko do zainfekowanych komórek.



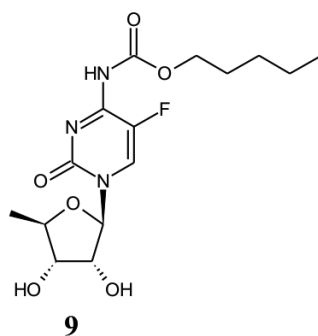
**7:** R<sup>1</sup> = OH, R<sup>2</sup> = alkil; **8:** R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = alkil.

Rysunek 1.1. Przykładowe analogi pirymidynowe modyfikowane w części zasadowej  
Figure 1.1. Exemplary pyrimidine analogues modified in the base residue

Inne analogi z tej grupy jak 5-fluoro-2'-deoksyurydyna (FDU, **4**), trifluorotymidyna (TFT, **5**), 5-nitro-2'-deoksyurydyna (**6**) nie są zależne od wirusowej kinazy

tymidynowej i ich mechanizm działania jest inny [9]. Działają jako inhibitory syntazy tymidylanowej i wykazują wysoką aktywność przeciw wirusom nieposiadającym własnej dTK jak np. mutant HSV TK<sup>-</sup>. FDU jest stosowane także w leczeniu raka jelita grubego jako cytostatyk [10]. Z nowszych osiągnięć można przytoczyć dwie analogiczne grupy związków **7** i **8** zgłoszonych przez McGuigana [11, 12]. Posiadają one charakterystyczny układ dwupierścieniowy 6-alkilo-2,3-dihydrofurano-[2,3-*d*] pirymidyn-2(1H)-onu. Pochodne **7** wykazały w badaniach *in vitro* bardzo wysoką aktywność przeciw wirusowi *Varicella-zoster* (VZV) – 300-krotny wzrost aktywności w porównaniu z acyklowirem. Związki z grupy **8** są nieaktywne wobec VZV, ale za to wykazują dobrą aktywność przeciw ludzkiemu cytomegalowirusowi (HCMV) na poziomie 1 μM przy cytotoksyczności na poziomie 300 μM.

TFT (**5**, Viroptic®) została zsyntezowana po raz pierwszy przez Heidelberga w 1964 r. [13]. Jest lekiem stosowanym w zewnętrznym leczeniu zapalenia rogówki i spojówki wywołanego wirusem HSV-1 i 2, a także w profilaktyce i leczeniu zakażenia oka wirusem VV [14, 15]. Już pierwsze badania w 1964 r. wskazały również na aktywność przeciwnowotworową tego związku. Jednak badania zostały wstrzymane na wiele lat z powodu niezadowalających wyników farmakokinetycznych. W komórce TFT jest fosforylowana przez ludzką kinazę tymidynową do aktywnej formy monofosforanowej, która jest skutecznym inhibitorem syntazy tymidylanowej wiążącym się w miejscu aktywnym enzymu. Dodatkowo monofosforan może być dalej fosforylowany do trifosforanu i inkorporowany do DNA zaburzając jego replikację [16]. Pochodna **5** jest szybko hydrolizowana w organizmie przez fosforylaze tymidynową. Podanie jej razem z inhibitorem fosforylaze – typiracylem poprawiło właściwości farmakokinetyczne i pod nazwą Lonsurf® produkt leczniczy z TFT został dopuszczony w 2015 r. przez FDA do stosowania w leczeniu złośliwego raka jelita grubego.

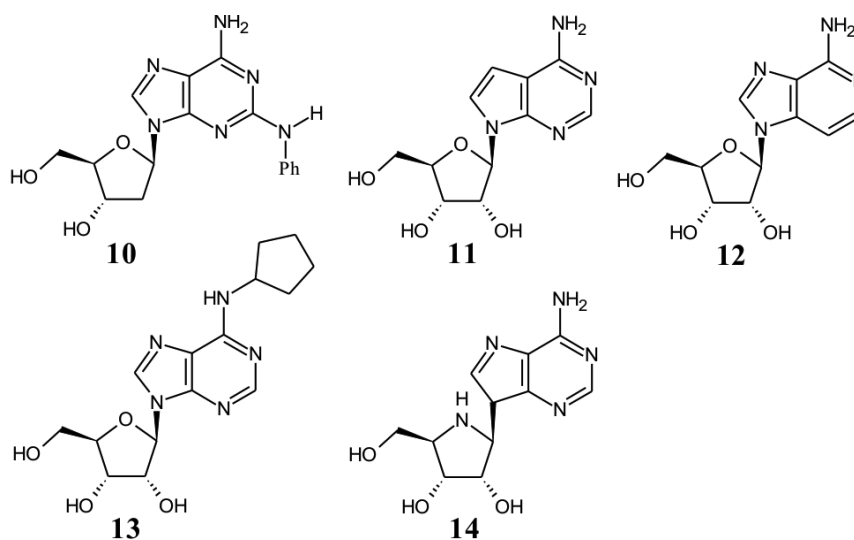


Rysunek 1.2. Struktura kapecytabiny  
Figure 1.2. Structure of capecitabine

Również do grupy pirymidynowych analogów modyfikowanych w części zasadowej można zakwalifikować kapecytabinę (**9**, Rys. 1.2.) [17]. Jest to nukleozyd hipermodyfikowany posiadający w części zasadowej podstawnik fluorkowy



w pozycji 5 cytozyny oraz podstawnik  $N^4$ -pentoksykarbonylowy. Dodatkowo związek jest pozbawiony grupy  $5'OH$ . Kapecytabina jest formą prolekową, która dzięki enzymom nadprodukowanym w guzie nowotworowym uwalnia fluorouracyl, który następnie jest przeprowadzany enzymatycznie w formy aktywne: monofosforan 5-fluoro-2'-deoksyurydyny będący inhibitorem syntazy tymidylanowej oraz trifosforan 5-fluoro-2'-deoksyurydyny ulegający inkorporacji do DNA. Ogranicza to występowanie poważnych efektów ubocznych obecnych przy bezpośrednim podaniu fluorouracylu. W pierwszym etapie grupę  $N^4$ -alkoksykarbonylową usuwa karboksylesteraza, następnie grupę egzoaminową cytozyny deaminaza cytydynowa przekształca w grupę karbonylową i ostatecznie fluorouracyl jest uwalniany dzięki fosforylacji tymidynowej. Kapecytabina (**9**) stosowana jest w leczeniu raka piersi, raka żołądka oraz jelita grubego i jest znana pod nazwą handlową Xeloda®.



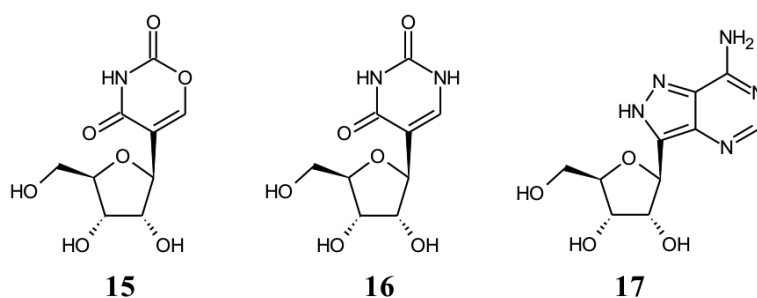
Rysunek 1.3. Przykładowe analogi purynowe modyfikowane w części zasadowej  
Figure 1.3. Exemplary purine analogues modified in the base residue

Wśród purynowych pochodnych posiadających modyfikacje w części zasadowej można wymienić  $N^2$ -alkilowane pochodne 2'-deoksyguanozyny, które wykazują właściwości inhibitorowe zarówno wobec polimeraz wirusowych jak i organizmów wyższych. Dodatkowo pochodna  $N^2$ -fenyłowa (**10**, Rys. 1.3.) [18] okazała się być selektywnym inhibitorem kinazy tymidynowej herpeswirusów. Odrębną grupą związków aktywnych są pochodne typu deazaadenozyny. Np. 7-deazaadenozyna (tubercydyna, **11**) badana przez De Clerq [19, 20] okazała się być aktywna przeciw wirusom DNA oraz RNA takim jak wirus polio ( $IC_{50} = 0,007 \mu\text{g/ml}$ ), rinowirus ( $IC_{50} = 0,03 \mu\text{g/ml}$ ) czy wirus zapalenia jamy ustnej VSV ( $IC_{50} = 0,007 \mu\text{g/ml}$ ). Jednak jest również bardzo toksyczna. 3-Deazaadenozyna (**12**) zsyntezowana w zespole Townsenda i Robinsa [21] w 1966 r. również okazała się aktywna przeciw wielu wirusom RNA jak RSV i VSV. Mechanizm działania polega na zakłócaniu

transmetylacji wirusowego RNA przez inhibicję procesu hydrolizy *S*-adenozylhomocysteiny (SAH) [19]. Ta pochodna nie ulega również enzymatycznej deaminacji, co przedłuża jej działanie w organizmie. Co więcej, uważa się, że może ulegać przekształceniu do 3-deazaadenozylhomocysteiny, która jest inhibitorem wirusowych metylotransferaz. Jako inhibitor SAH, pochodna **12** wykazuje również aktywność przeciwnowotworową. W linii komórkowej raka piersi MCF-7  $IC_{50}$  wyniosło  $0,055 \pm 0,013 \mu\text{M}$  [22].

Spośród pochodnych modyfikowanych w pozycji  $N^6$  można wymienić  $N^6$ -cyklopentyloadenozynę (**13**, CPA), która działa jako selektywny agonista receptora adenozynowego A1 o aktywności  $K_i = 0,0003 \mu\text{M}$  [23]. Receptory nukleotydowe są wszechobecne, oddziałują z nukleotydami uwalnianymi aktywnie na zewnątrz komórki zarówno w stanie normalnym jak i w stanach chorobowych. Receptory ulegają aktywacji i przekazują sygnały do wnętrza komórki w procesach regulujących takie funkcje jak skurcze mięśni, czynności serca czy przekazywanie sygnałów nerwowych [24]. CPA ma głównie działanie sercowo-naczyniowe o niewielkim wpływie behawioralnym. CPA jest powszechnie stosowana w badaniach nad receptorami adenozynowymi oraz stała się strukturą liderową dla wielu pochodnych.

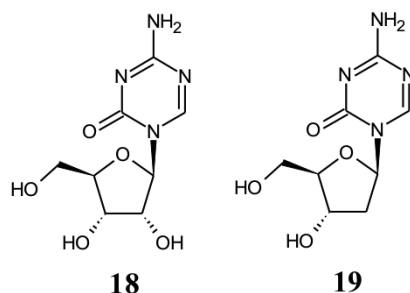
Najnowszym osiągnięciem w tej grupie związków jest pochodna oznaczona symbolem BCX4430 (**14**, immucylina-A, 9-(4'-amino-4'-deoxy- $\beta$ -D-rybofuranozyl)-9-deazaadenina) [25]. Jest to pochodna 9-dezaadenozyny, w której pierścieniu cukrowym atom tlenu zastąpiono azotem, dlatego można ją kwalifikować zarówno do pochodnych C-nukleozydowych oraz do nukleozydów modyfikowanych w części cukrowej (pochodna nitrocykliczna). Znaczenie tego związku wynika z potwierdzonej aktywności przeciwko filowirusom takim jak wirus Ebola (EBOV) oraz wirus Marburg na poziomie  $EC_{50} = 11,8 \mu\text{M}$ ,  $EC_{90} = 25,4 \mu\text{M}$  i  $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$  dla EBOV (szczep Kikwit) oraz  $EC_{50} = 4,4 \mu\text{M}$ ,  $EC_{90} = 10,5 \mu\text{M}$  i  $CC_{50} = 242 \mu\text{M}$  dla MARV (szczep Musoke), co zostało opisane w *Nature* w 2014 r. Związek ten wykazuje również aktywności wobec wielu innych rodzin wirusów.



Rysunek 1.4. Przykładowe C-nukleozydy  
Figure 1.4. Exemplary C-nucleosides

Do grupy C-nukleozydów należy także oksazymycyna [26] (**15**, Rys. 1.4.). W swej strukturze przypomina jeden z najczęściej spotykanych naturalnych mody-

fikowanych nukleozydów – pseudourydynę ( $\psi$ , **16**). Oksazynomycyna jest naturalnym antybiotykiem produkowanym przez niektóre bakterie z rodzaju *Streptomyces* i wykazuje właściwości hamujące wzrost bakterii gram-dodatnich, gram-ujemnych, a także niektórych typów nowotworów – mięsaków. Kolejnym przykładem C-nukleozydów może być formycyna A (**17**) wyizolowana ze *Streptomyces lavendula*. Formycyna A posiada pewne aktywności cytostatyczne, antywirusowe i może stanowić punkt wyjścia w poszukiwaniu nowych aktywnych związków [27].



Rysunek 1.5. Struktura azacytydyny (**18**) i decytabiny (**19**)  
Figure 1.5. Structure of azacitidine (**18**) and decitabine (**19**)

Zmiana usytuowania heteroatomu w pierścieniach zasad azotowych, wymiana endocyklicznego atomu azotu na atom węgla lub inny heteroatom nie są jedynie możliwymi modyfikacjami mogącymi przynieść nową aktywność biologiczną. Znane są również przykłady, gdy dodanie nowego heteroatomu również powoduje powstanie aktywności. Przedstawicielami tej grupy są zsyntezowana po raz pierwszy w 1964 r. przez Pískalaęgo i Šorma [28] 5-azacytydina (**18**, 5-AzaC, Vidaza®, Rys. 1.5.) i jej analog 2'-deoksyrybozowy decytabina (**19**, DAC, Dacogen®) [29]. 5-Azacytydina jest pirymidynowym analogiem inhibującym metylotransferazę DNA, jest antymetabolitem cytydyny, który po fosforylacji do trifosforanu ulega inkorporacji do RNA, a po deoksygenacji w pozycji 2' również do DNA, gdzie imituje cytydynę [30].

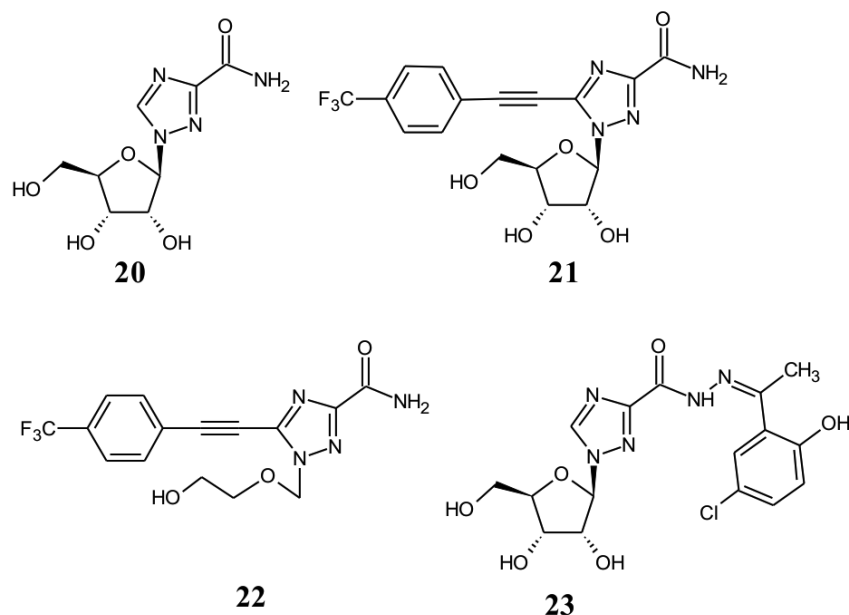
Metylotransferaza DNA rozpoznaje w nici dwunukleotydowe sekwencje 5-AzaCG jako miejsca substratowe i wiąże się kowalencyjnie z resztą 5-azacytozynową w pozycji 6. Z powodu obecności atomu azotu w sąsiedniej pozycji wiązanie to nie może ulec rozerwaniu po metylacji reszty azacytozynowej na normalnej drodze beta-eliminacji i enzym pozostaje trwale związany [31]. Metylacja DNA, czynnik epigenetyczny, jest odpowiedzialna za wytworzenie i utrzymywanie właściwej specyfikacji tkankowej poprzez regulację ekspresji odpowiednich genów. W komórkach nowotworowych obserwuje się zaburzony profil metylacji DNA np. hipermetylacja jest związana z progresją guzów, zatrzymaniem różnicowania, zespołem mielodysplastycznym i ostrą białaczką szpikową [32]. 5-AzaC i DAC są obecnie najbardziej zaawansowanymi lekami w epigenetycznych terapiach antynowotworowych. Uważa się, że za aktywność przeciwnowotworową

5-AzaC odpowiada zarówno wywoływana hipometylacja oraz bezpośrednia cytotoxyczność na nietypowe komórki hematopoetyczne (krwiotwórcze) szpiku kostnego. Hipometylacja może odtworzyć normalne funkcjonowanie genów odpowiedzialnych za różnicowanie i proliferację, efekt cytotoxyczny powoduje śmierć szybko dzielących się komórek nowotworowych, w których nie funkcjonują już mechanizmy kontroli wzrostu. Komórki dzielące się są w znacznej mierze odporne na działanie 5-azacytydyny.

Po dostaniu się do komórki dzięki odpowiednim transporterom nukleozydowym, 5-AzaC ulega fosforylacji do monofosforanu przez kinazę urydynowo-cytydynową (UCK), następnie do difosforanu przez kinazę PNMP (monofosforan pirymidynonukleozydowy) i w końcu do formy trifosforanowej przez kinazy NDP (difosforan nukleozydowy). Trifosforan 5-AzaC (5-AzaC-TP) ulega inkorporacji do syntezowanego RNA zaburzając jego dojrzewanie i hamując w ten sposób syntezę białek. Równolegle 5-AzaC-DP ulega deoksygenacji dzięki działaniu reduktazy rybonukleotydydowej dając pochodną 2-deoksyrybozową, czyli difosforan decytabiny. Kinazy NDP przeprowadzają finalną fosforylację tej pochodnej, która następnie ulega łatwo wbudowaniu do syntezowanej nici DNA. Azacytydyna jest najbardziej toksyczna w fazie S cyklu komórkowego. W leczeniu obserwuje się poważne objawy uboczne jak anemia, neutropenia, trombocytopenia, nudności, wymioty, gorączka i biegunka. Stosowana jest głównie w leczeniu zespołu mielodysplastycznego (MDS) – zaburzenia hematopoetycznych komórek macierzystych uniemożliwiającego różnicowanie i dojrzewanie komórek krwi, które może prowadzić do ostrych form białaczki szpikowej. W 2004 r. FDA zatwierdziło stosowanie 5-azacytydyny w tym przypadku. Z powodu toksyczności nerkowej próby zastosowania w innych chorobach nowotworowych nie powiodły się. Decytabina jest stosowna również w przypadku ostrej białaczki szpikowej. Znane są również doniesienia o aktywności 5-azaC względem wirusa HIV-1 [33] oraz wirusa HTLV-1 (ludzki wirus T-limfotropowy) towarzyszącego często MDS [34].

## 2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA NUKLEOZYDÓW POSIADAJĄCYCH INNE ZASADY HETEROCYKLICZNE

W tej grupie związków najwyższą aktywność antywirusową mają związki o heterocyklicznych pierścieniach pięcioczłonowych zawierających azot. Rybawiryna (**20**, Rys. 2.1.), czyli 1-( $\beta$ -D-rybofuranozylo)-3-karboksyamido-1,2,4-triazol (RBV) jest sztandarowym przykładem. Związek ten zaprojektowano i uzyskano w 1972 r. w zespole Robinsa i zgodnie z założeniem okazał się być aktywny zarówno przeciw wirusom DNA jak RNA [35]. RBV ulega fosforylacji w komórce dzięki kinazie adenyzydowej do 5'-monofosforanu i następnie dzięki odpowiednim kinazom do trifosforanu, który jest inhibitorem wielu enzymów wirusowych biorących udział w cyklu replikacyjnym np.: wirusowej polimerazy RNA (wirusy grypy), metylotransferazy poksywirusów, odwrotnej transkryptazy HIV [36].

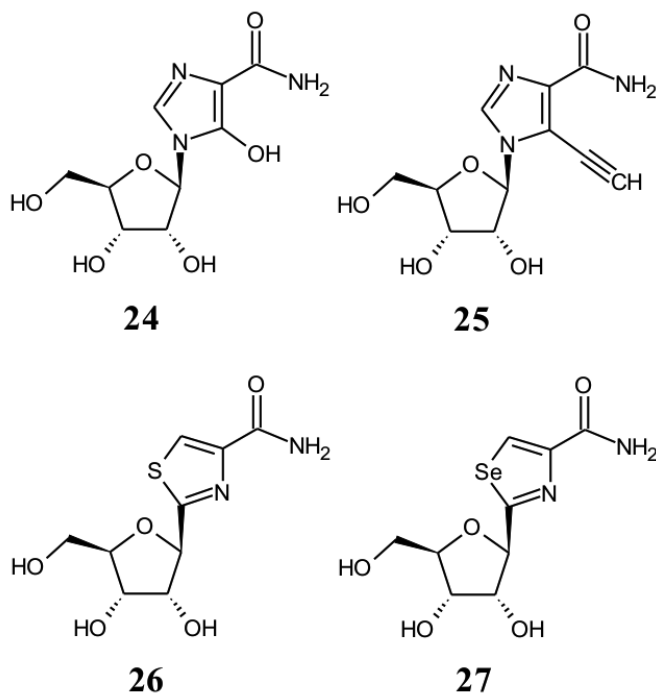


Rysunek 2.1. Rybawiryna i jej przykładowe analogi  
Figure 2.1. Ribavirin and its analogues

Innym mechanizmem działania rybawiryny o szczególnym znaczeniu jest jej mutagenność wynikająca z możliwości wbudowania jej do kwasów nukleinowych. W wyniku rotacji grupy karboksamidowej RBV może tworzyć pary zarówno z uracylem jak i cytozyną. Mutacja wirusów jest zjawiskiem częstym i naturalnym ponieważ mechanizmy naprawcze wirusowego materiału genetycznego są dużo bardziej prymitywne i ograniczone, niż w syntezie komórkowych kwasów nukleinowych. Szybkość mutowania wirusów jest ich przewagą, bo potrafią się łatwo uodparniać i dostosowywać. Jednak dodanie kolejnego czynnika mutującego może spowodować nadmiar zmian, które kończą się tzw. katastrofą z nadmiaru błędów, czyli masowym wymieraniem wirusa (ang. *error catastrophe*) [37]. Problemem jest toksyczność rybawiryny ( $CC_{50}$  = ok. 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), co może wynikać z faktu, że jej 5'-monofosforan jest inhibitorem dehydrogenazy inozynomonofosforanu (IMPDH) – istotnego enzymu w szlaku biosyntezy de novo nukleotydów purynowych, co w efekcie prowadzi do hamowania biosyntezy RNA i DNA w komórce. Dodatkowo, ze względu na brak w erytrocytach odpowiedniej fosfatazy do hydrolizy trifosforanu RBV, obserwuje się w nich kumulację RBV-TP. Prowadzi to do najczęściej spotykanego działania niepożądanego RBV – odwracalnej anemii hemolitycznej. Jednak ze względu na silną aktywność przeciw wielu wirusom (np. HCV) została dopuszczona do leczenia.

Rybawirynę wykorzystano jako związek liderowy i zsyntezowano wiele nowych pochodnych [38–40]. Modyfikowano zarówno część cukrową jak i zasadową poprzez wprowadzenie zamiast rybozy podstawnika acyklicznego, blokowanie grup OH lub wprowadzenie hydrofobowego podstawnika do pierścienia 1,2,4-triazolu. Na przy-

kład związek acykliczny **22** posiadający podstawnik fenyloalkinyłowy w pozycji 5, posiada ciekawe właściwości skierowane przeciw wirusowi HCV. Również przeciw wirusowi HCV aktywność wykazał związek **21**, który posiada zwykłą rybozę, ale różni się od rybawiryny w obrębie części zasadowej. Związek **23** z kolei wykazał zdolność hamowania namnażania się komórek raka płuc A549 [41].

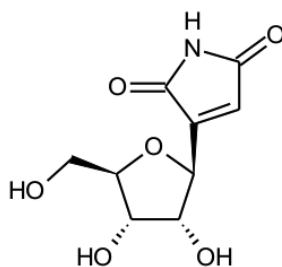


Rysunek 2.2. Inne azolowe analogi nukleozydowe  
Figure 2.2. Other azole nucleoside analogues

Inną grupą związków są pochodne typu mizorybiny [42] (**24**, Bredinin®, Rys. 2.2.) i 5-etynylo-1- $\beta$ -D-rybofuranazyloimidazolo-4-karboksyamidu [43] (EICAR, **25**) posiadające zamiast kanonicznej zasady azotowej imidazol. Mizorybina jest występującym naturalnie, dopuszczonym do handlu w Japonii lekiem immunosupresorowym. Hamuje syntezę zasad purynowych w limfocytach. Podobieństwo do rybozydu AICA (substrat w biosyntezie nukleozydów purynowych) powoduje, że jest dobrym inhibitorem IMPDH. Ta aktywność jest selektywna względem limfocytów, dlatego lek ten nie wykazuje silnej toksyczności i mógł zostać dopuszczony do handlu. EICAR z kolei wykazuje się działaniem hamującym rozwój białaczki w liniach komórkowych mysiej białaczki P388 i L1210, oraz szerokim spektrum aktywności przeciw RNA i DNA wirusom przewyższając rybawirynę często 10–100-krotnie pod względem aktywności. Więcej szczegółów dotyczących aktywności biologicznych analogów nukleozydowych posiadających pięcioczło-

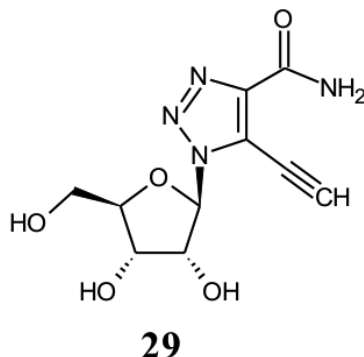
nowe pierścienie heterocykliczne zawierające azot można znaleźć w pracy Zeidler, Baraniak, Ostrowski [44].

W tym punkcie można wspomnieć również o tiazofurynie (**26**), czyli 2- $\beta$ -D-rybofuranozylotiazolo-4-karboksyamidzie [45, 46]. Jest to również związek posiadający związany wiązaniem glikozydowym pierścień pięcioczłonowy należący do klasy C-nukleozydów. Związek ten wykazuje silne działanie antybiałaczkowe. Otrzymano szereg azolowych nukleozydów różniących się aranżacją heteroatomów w pierścieniu pięcioczłonowym oraz podstawnikami. Wykazują one korzystne właściwości przeciw szczególnie niebezpiecznym wirusom jak arenawirusy, flawiwirusy i alfawirusy. Selenazofuryna [47] (**27**) różniąca się od tiazofuryny jedynie tym, że zamiast atomu siarki w pierścieniu azolowym posiada atom selenu, jest szczególnie aktywna przeciw wirusom żółtej febry oraz wirusom grypy A i B.

**28**

Rysunek 2.3. Struktura szowdomycyny  
Figure 2.3. Structure of showdomicine

Ważnym nukleozydem posiadającym pięcioczłonowy pierścień heterocykliczny, należącym do grupy C-nukleozydów jest szowdomycyna (**28**, 2- $\beta$ -D-rybofuranozylomaleimid, ang. *showdomycin*, Rys. 2.3.), która została wyodrębniona z *Streptomyces showdoensis* [48]. Związek ten hamuje wzrost bakterii gram-ujemnych i gram-dodatnich, a w szczególności jest aktywny w stosunku do bakterii *Streptococcus haemolyticus* i *Streptococcus pyogenes*. Wykazuje również aktywność przeciwnowotworową w stosunku do linii komórkowej raka szyjki macicy (HeLa). Reszta maleimidowa szowdomycyny tworzy wiązanie kowalencyjne z resztą tiolową cysteiny w miejscu aktywnym odpowiednich enzymów. Zastosowanie techniki ABPP (ang. *activity-based protein profiling*), która służy do typowania nowych celów terapeutycznych w szczepach bakterii, wykazało, że **28** działa jako inhibitor kompetencyjny enzymów odpowiedzialnych m.in. za biosyntezę ściany komórkowej, biosyntezę nukleotydów oraz odporność na stres oksydacyjny [49].



Rysunek 2.4. Struktura ETCAR  
Figure 2.4. Structure of ETCAR

Rosnącym zainteresowaniem cieszą się pochodne posiadające zamiast kanonicznej zasady azotowej ugrupowanie 1,2,3-triazolu. Powodem zainteresowania tą grupą związków na pewno jest łatwość syntezy (*click-chemistry* [50]) dzięki 1,3-dipolarnej cykloaddycji. Jednak jak do tej pory nie zgłoszono istotnych aktywności. Przykładem poszukiwań w tej grupie związków może być 5-etynylo-1- $\beta$ -D-rybofuranozyl-1H-[1,2,3]-triazolokarboksyamid (**29**, ETCAR, Rys. 2.4.) i jego pochodne [51]. W kontekście możliwości wykorzystania 1,3-dipolarnej cykloaddycji pomiędzy azydem a alkinem katalizowanej miedzią (CuAAC – ang. *Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*) w chemii nukleozydów warto przytoczyć szeroką pracę przeglądową Amblard'a [52].

#### UWAGI KOŃCOWE

Pomysłowość chemików, wspomagana obserwacją natury, pozwoliła otrzymać bogatą paletę pochodnych o różnych typach modyfikacji i wielu różnych aktywnościach biologicznych – przeciwwirusowych, antybiotykowych i antynowotworowych. Jakkolwiek pierwsze próby syntezy nukleozydów były prowadzone już w drugiej dekadzie XX w. przez Helfericha i Fischera, jednak dopiero prace sir Todda (Nagroda Nobla w 1957 r.) dały właściwy rozpęd do rozwoju chemii nukleozydów, która przeżywała swój rozkwit w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych XX wieku. Wybuch epidemii wirusa HIV-1 w następnej dekadzie dał kolejny impuls do poszukiwania nowych analogów nukleozydowych, gdy okazało się, że AZT skutecznie hamuje rozmnażanie się wirusa. Zainteresowanie chemią nukleozydów oraz ich aktywnościami biologicznymi trwa nieprzerwanie aż do dzisiaj. Ogrom pracy jaki już został wykonany, liczba i różnorodność otrzymanych pochodnych są tak duże, że nie sposób ich objąć w tak skrótowym opracowaniu. Wielu chemików bioorganików zadaje sobie dziś pytanie, czy aby chemia nukleozydów się nie wyczerpała i czy można jeszcze wymyślić coś nowego w tej dziedzinie. Jednak ostanie doniesienia



o aktywności immucyliny-A względem wirusa Ebola oraz dopuszczony w 2013 r. do handlu sofosbuwir (lek przeciw zakażeniu HCV), który będzie opisany w kolejnej części przeglądu sugerują, że chemia nukleozydów ciągle ma potencjał do zmienia-  
nia świata i warto się nią zajmować.

### 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] J.P. Horwitz, J. Chua, M. Noel, *J. Org. Chem.*, 1964, **29**, 2076.
- [2] H. Mitsuya, K.J. Weinhold, P.A. Furman, M.H. St Clair, S.N. Lehrman, R.C. Gallo, D. Bolognesi, D.W. Barry, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **82**, 7096.
- [3] E. De Clercq, J. Neyts, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2009, **189**, 53.
- [4] J. Boryski, *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inżynierii genetycznej oraz medycynie*, J. Barciszewski, K. Łastowski, T. Twardowski (Red.), Sorus, Poznań 1996.
- [5] W.H. Prusoff, *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, **32**, 295.
- [6] H.C. Herrmann, *Exp. Biol. Med.*, 1961, **107**, 142.
- [7] J. Milecki, *Na pograniczu chemii i biologii*, tom III, J. Barciszewski, H. Koroniak (Red.), Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 1999.
- [8] E. De Clercq, *Biochem. Pharmacol.*, 2004, **68**, 2301.
- [9] E. De Clercq, R.T. Walker, *Antiviral Drug Development. A Multidisciplinary Approach*, Plenum Press, New York 1988.
- [10] L. Geng, A.M. Huehls, J.M. Wagner, C.J. Huntoon, L.M. Karnitz, *PLoS One*, 2011, **6**, 1.
- [11] C. McGuigan, C.J. Yarnold, G. Jones, S. Velazquez, H. Barucki, A. Brancale, G. Andrei, R. Snoeck, E. De Clercq, J. Balzarini, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 4479.
- [12] C. McGuigan, R.N. Pathirana, R. Snoeck, G. Endrei, E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 1847.
- [13] C. Heidelberger, S.W. Anderson, *Cancer Res.*, 1964, **24**, 1979.
- [14] K.R. Wilhelmus, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2010, **12**, CD002898.
- [15] S. Altmann, C.R. Brandt, C.J. Murphy, R. Patnaikuni, T. Takla, *J. Infect. Dis.*, 2011, **203**, 683.
- [16] N. Suzuki, T. Emura, M. Fukushima, *Int. J. Oncol.*, 2011, **39**, 263.
- [17] N. Shimma, I. Umeda, M. Arasaki, C. Murasaki, K. Masubuchi, Y. Kohchi, M. Miwa, M. Ura, N. Sawada, H. Tahara, I. Kuruma, I. Horii, H. Ishitsuka, *Bioorg. Med. Chem.*, 2000, **8**, 1697.
- [18] F. Focher, C. Hildebrand, S. Freese, G. Ciarrocchi, T. Noonan, S. Sangalli, N. Brown, S. Spadari, G. Wright, *J. Med. Chem.*, 1988, **31**, 1496.
- [19] E. De Clercq, D.E. Bergstrom, A. Holý, J.A. Montgomery, *Antiviral Res.*, 1984, **4**, 119.
- [20] E. De Clercq, R. Bernaerts, D.E. Bergstrom, M.J. Robins, J.A. Montgomery, A. Holý, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1986, **29**, **3**, 482.
- [21] R.J. Rousseau, L.B. Townsend, R.K. Robins, *Biochemistry*, 1966, **5**, 756.
- [22] A. Hayden, P.W. Johnson, G. Packham, S.J. Crabb, *Breast Cancer Res. Treat.*, 2011, **127**, 109.

- [23] P. Franchetti, L. Cappellacci, S. Marchetti, L. Trincavelli, C. Martini, M.R. Mazzoni, A. Lucacchini, M. Grifantini, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 1196.
- [24] G. Burnstock, G.E. Knight, *Int. Rev. Cytol.*, 2004, **240**, 301.
- [25] T.K. Warren, J. Wells, R.G. Panchal, K.S. Stuthman, N.L. Garza, S.A. Van Tongeren, L. Dong, C.J. Retterer, B.P. Eaton, G. Pegoraro, S. Honnold, S. Bantia, P. Kotian, X. Chen, B.R. Taubenheim, L.S. Welch, D.M. Minning, Y.S. Babu, W.P. Sheridan, S. Bavari, *Nature*, 2014, **508**, 402.
- [26] T. Haneishi, T. Okazaki, T. Hata, C. Tamura, M. Nomura, A. Naito, I. Seki, M. Arai, *J. Antibiot.*, 1971, **11**, 797.
- [27] E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, 2016, **59**, 2301.
- [28] A. Píscala, F. Šorm, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1964, **29**, 2060.
- [29] D.J. Richel, L.P. Colly, E. Lurvink, R. Willemze, *Br. J. Cancer*, 1988, **58**, 730.
- [30] E. Kaminskas, A.T. Farrell, Y.C. Wang, R. Sridhara, R. Pazdur, *Oncologist*, 2005, **10**, 176.
- [31] C. Stresemann, F. Lyko, *Int. J. Cancer*, 2008, **123**, 8.
- [32] H. Kantarjian, J.P. Issa, C.S. Rosenfeld, J.M. Bennett, A. Albitar, J. DiPersio, V. Klimek, J. Slack, C. de Castro, F. Ravandi, R. Helmer, L. Shen, S.D. Nimer, R. Leavitt, A. Raza, H. Saba, *Cancer*, 2006, **106**, 1794.
- [33] M.J. Dapp, C.L. Clouser, S. Patterson, L.M. Mansky, *J. Virol.*, 2009, **83**, 11950.
- [34] P.T. Diamantopoulos, M. Michael, O. Benopoulou, E. Bazanis, G. Tzeletas, J. Meletis, G. Vayopoulos, N.-A. Viniou, *Virol. J.*, 2012, **9**, 1.
- [35] R.W. Sidwell, J.H. Huffman, G.P. Khare, L.B. Allen, J.T. Witkowski, R.K. Robins, *Science*, 1972, **177**, 705.
- [36] J.D. Graci, C.E. Cameron, *Rev. Med. Virol.*, 2006, **16**, 37.
- [37] S. Crotty, D. Maag, J.J. Arnold, W. Zhong, J.Y.N. Lau, Z. Hong, R. Andino, C.E. Cameron, *Nat. Med.*, 2000, **6**, 1375.
- [38] A. Krajczyk, *Nukleozydy 4,5-dipodstawione 1,2,3-triazolu i ich pochodne bicykliczne*, Rozprawa doktorska, IChB PAN, Poznań 2015.
- [39] R. Zhu, M. Wang, Y. Xia, F. Qu, J. Neyts, L. Peng, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 3321.
- [40] J. Wan, Y. Xia, Y. Liu, M. Wang, P. Rocchi, J. Yao, F. Qu, J. Neyts, J.L. Iovanna, L. Peng, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 1144.
- [41] W.Y. Liu, H.Y. Li, B.X. Zhao, D.S. Shin, S. Lian, J.Y. Miao, *Carbohydr. Res.*, 2009, **344**, 1270.
- [42] H. Ishikawa, *Curr. Med. Chem.*, 1999, **6**, 575.
- [43] N. Minakawa, T. Takeda, T. Sasaki, A. Matsuda, T. Ueda, *J. Med. Chem.*, 1991, **34**, 778.
- [44] J. Zeidler, D. Baraniak, T. Ostrowski, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **97**, 409.
- [45] P.C. Srivastava, M.V. Pickering, L.B. Allen, D.G. Streeter, M.T. Campbell, J.T. Witkowski, R.W. Sidwell, R.K. Robins, *J. Med. Chem.*, 1977, **20**, 256.
- [46] G. Tricot, H.N. Jayaram, G. Weber, R. Hoffman, *Int. J. Cell Cloning*, 1990, **8**, 161.
- [47] P.C. Srivastava, R.K. Robins, *J. Med. Chem.*, 1983, **26**, 445.
- [48] H. Nishimura, M. Mayama, Y. Komatsu, H. Kato, N. Shimaoka, Y. Tanaka, *J. Antibiot. (Tokoyo)*, 1964, **17**, 148.
- [49] T. Böttcher, S.A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 6964.
- [50] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004.
- [51] T. Ostrowski, P. Januszczyk, M. Cieslak, J. Kazmierczak-Baranska, B. Nawrot, E. Bartoszak-Adam-ska, J. Zeidler, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 4386.
- [52] F. Amblard, J.H. Cho, R.F. Schinazi, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 4207.