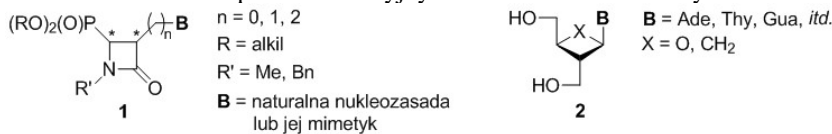


Cel naukowy projektu

Celem projektu jest rozpoznanie zakresu zastosowania nitronów fosfonianowych w reakcji Kinugasy z alkinami pochodnymi nukleozasad z zamiarem opracowania optymalnych warunków syntezy nowych 4-fosfonylowanych β -laktamów o ogólnym wzorze **1** i zbadanie ich właściwości przeciwwirusowych, a także przeciwnowotworowych (około 50 nowych 4-fosfonylowanych β -laktamów). Te związki są azetydynowymi analogami nukleotydów z grupy oksetanocyn **2**, których aktywność przeciwwirusowa jest dobrze udokumentowana. Ponadto obecność pierścienia β -laktamowego w związkach **1** uzasadnia celowo zbadanie właściwości przeciwbakteryjnych dla kilku źródeł nicowanych strukturalnie pochodzących.



Nowatorstwo projektu polega na tym, że w zaproponowanych strukturach β -laktamowych fosfonianowych analogów nukleozydów **1** w pozycji C4 znajduje się ugrupowanie dialkoksylfosfonylowe, którego obecność pozwala uniknąć pierwszego i zarazem najtrudniejszego etapu wewnątrzkomórkowej fosforylacji, a dodatkowo ugrupowanie to zapewnia dostateczną biodostępność związków **1**. Mimo że znane są w literaturze nieliczne przykłady analogów nukleozydów zawierających w miejscu ugrupowania cukrowego pierścień azetydynowy, to do tej pory nie otrzymano odpowiednich analogów nukleotydów zawierających fragment 4-(fosfonylo)azetydynonowy. Dlatego zaproponowaliśmy oryginalną strategię syntezy, stanowiącą alternatywę dla stosowanych do tej pory reakcji, polegającą na uyciu *N*-podstawionych *C*-(dialkoksylfosfonylo)nitronów w reakcji Kinugasy z odpowiednio sfunkcjonalizowanymi acetylenami.

Powyższe cele zamierzamy zrealizować przez:

1. szczegółowe zbadanie wpływu istotnych parametrów (struktura substratów i ich proporcje, rodzaj i ilość katalizatorów, rozpuszczalniki, temperatura) na wynik reakcji Kinugasy;
2. ustalenie optymalnych warunków badanej reakcji i zsyntetyzowanie próbek czystych β -laktamów o wzorze **1** w ilości około 30–40 mg (kadełgo);
3. wykonanie badań aktywności przeciwwirusowej otrzymanych związków (oznaczenie EC_{50}) wobec szerokiej gamy DNA i RNA wirusów (ponad 20 wirusów) w prestiżowym europejskim centrum badawczym Rega Institute for Medical Research, Leuven, Belgia.
4. równocześnie z badaniami aktywności przeciwwirusowej oznaczona zostanie cytotoksyczność (wyrażona jako MCC lub CC_{50}) zsyntetyzowanych związków w stosunku do uciążliwych niezainfekowanych linii komórkowych;
5. wykonanie badań aktywności cytostatycznej zsyntetyzowanych związków (oznaczenie IC_{50}) wobec następujących linii komórkowych: białaczki mysiej (L1210), ludzkiej białaczki limfocytów T (CEM) oraz raka szyjki macicy (HeLa);
6. określenie relacji między budową i aktywnością biologiczną (przeciwwirusowa i przeciwnowotworowa) 4-fosfonylowanych β -laktamów o wzorze ogólnym **1**.

Opracowane zostaną metody syntezy nowych 4-fosfonylowanych analogów nukleozydów zawierających ugrupowanie β -laktamowe o wzorze **1**, co z kolei wymaga będzie zoptymalizowania warunków syntezy *N*-podstawionych *C*-(fosfonylo)nitronów. Ustalona zostanie aktywność przeciwwirusowa i przeciwnowotworowa oraz zależność struktura-aktywność (SAR). Mamy nadzieję, że w efekcie końcowym projektu zaproponowane zostaną również struktury wiodące w tej nowej klasie analogów nukleotydów, a to z kolei w przyszłości pozwoli na ich praktyczne zastosowanie. Wyniki przeprowadzonych badań zostaną opublikowane w czasopiśmie naukowym z zakresu chemii organicznej i chemii medycznej oraz przedstawione w postaci komunikatów konferencyjnych.

Znaczenie projektu

Znane leki przeciwwirusowe mają znacznie ograniczony zakres zastosowania, a dla wielu wirusów nie odkryto jeszcze odpowiednich terapeutyków. Problem jest w najwyższym stopniu komplikowany przez możliwość szybkiej mutacji wirusów. Mimo udokumentowanych osiągnięć, poszukiwania nowych związków o aktywności przeciwwirusowej wciąż stanowi bardzo wąski obszar badań z zakresu chemii medycznej.

Prace nad strukturalnymi analogami nukleozydów i nukleotydów są w tym kierunku badań zmierzających do odkrycia skutecznych chemoterapeutyków. Ustalenie mechanizmu działania takich analogów, który w wielu przypadkach polega na ingerowaniu w proces wydłużania łańcuchów DNA, jak i RNA, spowodowało zintensyfikowanie prac nad tymi grupami związków. Oprócz acyklicznych analogów nukleotydów stanowiących najważniejszą grupę leków przeciwwirusowych (m.in. acyklowir, adefowir, tenofowir oraz cidofowir), otrzymano również inne aktywne pochodne, w strukturze których w miejsce fragmentu cukrowego wprowadzono inne ugrupowania heterocykliczne, nie tylko pięciocio- ale także trój- i czteroczłonowe. Pierścienie czteroczłonowe naładujące fragment cukrowy znajdują się w oksetanocynach, które stanowią ważną grupę związków o udokumentowanym działaniu przeciwwirusowym. Wyodrębniona ze rdoń naturalnych oksetanocyna A hamuje infekcję wywołaną przez HIV-1, podczas gdy jej tymidynowy analog A-732209 wykazuje aktywność przeciwko wirusom HSV-1, HSV-2 i VZV.

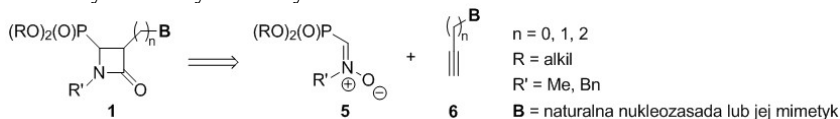
Wśród związków zawierających w swojej strukturze układ β -laktamowy znaleźliśmy również przykłady substancji o aktywności przeciwnowotworowej, przeciwcukrzycowej, przeciwmalarycznej, przeciwzapalnej, analgetycznej i działającej jako inhibitory trombiny itd.

W trakcie realizacji tego projektu otrzymane zostaną nowe 4-fosfonylowane analogi nukleozydów o wzorze ogólnym **1**, jako analogi oksetanocyn. Oczekujemy odkrycia związków o wyjątkowych właściwościach biologicznych (przeciwwirusowych,

przeciwnowotworowych i przeciwbakteryjnych), co pozwoli w przyszłości na ich terapeutyczne zastosowanie.

Koncepcja i plan badań

Realizacja celów projektu wymaga zbadania zakresu zastosowania fosfonylowanych nitronów **5** w reakcji Kinugasy z alkinami pochodnymi nukleozasad **6**, tj. szczegółowego ustalenia wpływu istotnych parametrów (struktura substratów i ich proporcje, rodzaj i ilość katalizatorów, rozpuszczalnik, temperatura) na przebieg reakcji Kinugasy i na podstawie tych wyników zoptymalizowania warunków syntezy zróżnicowanych strukturalnie 4-fosfonylowanych β -laktamów **1**, a następnie zsyntetyzowania laktamów **1** z N-podstawionych C-fosfonylowanych nitronów **5** i odpowiednich alkinów **6**, pochodnych naturalnych i modyfikowanych nukleozasad.



Planujemy uzyć co najmniej czterech C-fosfonylowanych nitronów **5** zakładając modyfikację ich struktury zarówno w części grupowania dialkoksylfosfonylowego (problem biodostępności), jak również w obrębie podstawnika przy atomie azotu ($R = \text{Me, Bn; - lipofilowo}$).

Planujemy uzyć co najmniej 15 alkinów **6**, pochodnych naturalnych nukleozasad (m.in. adeniny, uracylu, tyminy, cytozyny) oraz analogów nukleozasad (m.in. 5-bromouracyl, chinazolino-2,4-dion (benzuracyl), 6-chloropuryna, 2-amino-6-chloropuryna, 6-azauracyl), a także odpowiednio wyselekcjonowanych podstawionych pochodnych etynylobenzenu (jako niepolarnych izomerów nukleozasad).

Zostanie zsyntetyzowane co najmniej 30-40 mg każdego konkretnego produktu o wysokiej czystości.

Badania właściwości przeciwwirusowych i przeciwnowotworowe zostaną wykonane w zespole prof. Jana Balzariniego i prof. Dominika Scholsa w KU w Leuven (the Rega Institute for Medical Research).

Na podstawie uzyskanych wyników badań aktywności biologicznej zostanie przeprowadzona analiza zależności struktura-aktywność.