

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **240353**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430182**

(22) Data zgłoszenia: **07.06.2019**

(51) Int.Cl.

A61P 31/18 (2006.01)

C07D 309/10 (2006.01)

C07D 309/14 (2006.01)

C07H 5/04 (2006.01)

C07H 5/06 (2006.01)

C07H 15/04 (2006.01)

(54)

**3-azotowe pochodne 2,3-dideoksy-D-rybo-heksopiranozydów metylu
do zastosowania jako inhibitor odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

14.12.2020 BUP 26/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

21.03.2022 WUP 12/22

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET GDAŃSKI, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ALEKSANDRA MAŁGORZATA DĄBROWSKA,
Gdańsk, PL**

RAJMUND KAŻMIERKIEWICZ, Gdańsk, PL

ANNA MARIA BARABAŚ, Smętowo, PL

**GRZEGORZ ALEKSANDER NOWIAK,
Grudziądz, PL**

INGA BLANKA JAMROŹEK, Darżyno, PL

MARIUSZ MAKOWSKI, Gdańsk, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Justyna Pawłowska

PL 240353 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest para anomerów 3-azydo-2,3-dideoksy-D-*rybo*-heksopiranozydów metylu i para anomerów 3-amino-2,3-dideoksy-D-*rybo*-heksopiranozydów metylu do zastosowania jako nienukleozydowy (tj. zawierający jedynie glikon i grupę metoksyłową jako aglikon) inhibitor odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1.

Szybka replikacja wirusa HIV-1 (*Human immunodeficiency Virus* zwany ludzkim wirusem zespołu nabytego braku odporności) i błędy popełnione podczas tego procesu powodują szybki jego wzrost, a to jest powodem trudności związanych z farmakoterapią. Jak dotąd wiadomo, że jedyną opcją kontroli oraz zapobiegania progresji choroby jest terapia antywirusowa. Niestety, HIV-1 wykazuje oporność na dostępne leki, które dodatkowo wykazują się dużą toksycznością. Dlatego poszukiwanie coraz to nowych farmaceutyków o lepszym indeksie terapeutycznym, mniejszej toksyczności i większej selektywności ciągle jeszcze stanowi wyzwanie.

Miejscami działania znanych leków są trzy enzymy wirusowe: odwrotna transkryptaza (RT), integraza (IN) i proteaza (PR). Do tej pory znane są dwa różne typy inhibitorów RT, jakimi są analogi nukleozydów (NRTI – *Zidovudine*) i nienukleozydów (NNRTI – *Nevirapine*), które blokują aktywność polimerazy w RT. Ciągłe jednak prowadzone są badania mające na celu lepsze zrozumienie struktury i funkcji RT oraz mechanizmów inhibicji, co skutkować może powstaniem lepszych leków, a w szczególności takich, które będą skuteczne przeciwko obecnym lekoopornym szczepom wirusa HIV-1.

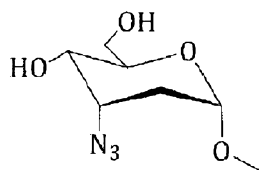
Odwrotna transkryptaza (RT) wirusa HIV-1 jest wielofunkcyjnym enzymem niezbędnym do replikacji tego wirusa. RT składa się z dwóch podjednostek: p66 oraz p51. Enzym posiada DNA- oraz RNA-zależną aktywność polimerazy DNA oraz aktywność rybonukleazy H. Za aktywność polimerazy oraz rybonukleazy H odpowiedzialna jest podjednostka p66, natomiast podjednostka p51 pełni rolę strukturalną. Odwrotna transkryptaza HIV-1 służy temu retrowirusowi do przepisywania swojego materiału genetycznego w postaci RNA na cząsteczkę DNA, która jest wbudowywana przez jego integrazę do materiału genetycznego gospodarza, jakim jest jedna z komórek ludzkiego układu odpornościowego.

Tenofowir (TFO) jest związkiem organicznym, znany także pod nazwą PMPA, czyli *R-9-(2-(fosforanometoksypropylo)adenina*, zaliczany jest do klasy leków antyretrowirusowych jako nukleotydowy analog będący inhibitorem odwrotnej transkryptazy. Tenofowir podawany jest w postaci proleku – dizeoproksylu tenofowiru. *In vivo* prekursor ulega przemianie do substancji czynnej – tenofowiru – analogu monofosforanu nukleozydu (nukleotydu). Połączenie kowalencyjne RT z tenofowirem stanowi zakończenie primera DNA należącego do kompleksu RT i jako fosfonianowy inhibitor primera DNA kompleksu RT stanowi jego analog nukleotydu. Wśród znanych leków przeciwretrowirusowych jest również azydotymindyna AZT, która również ma działanie inhibujące względem odwrotnej transkryptazy HIV i stanowi pochodną nukleotydów ze szkieletem dideoksypiranozyli.

Arabinozydy cytozyny i innych związków mają praktyczne zastosowanie przeciwbiałaczkowe, a arabinozyd adeniny przeciwdziała zapaleniu mózgu wywołanemu przez Herpes. Nukleozydy zawierające resztę sacharydową w postaci 2-deoksy-beta-D-*rybo*-heksofuranozyli są słabo poznane, jednak ze względu na podobieństwo do naturalnie występujących nukleozydów 2-deoksy-D-*rybo*-furanozyli (nukleozydy 2-deoksy-D-*erythro*-pentofuranozyli) znajdują się w centrum zainteresowania. W porównaniu do związków stanowiących przedmiot wynalazku, znane są pento-D-*rybo*-furanozydy, czyli pentozy, a nie heksozy, które mają zastosowanie np. jako „modyfikatory” antybiotyków czy związków o działaniu terapeutycznym czy też jako np. nośniki leków o działaniu cytotoksycznym. Epimery o konfiguracji D-*arabino* są znane i opisywane już od lat 80-tych XX w., ale mają zastosowanie np. w terapii nowotworów. Znane są nitrozoureidowe pochodne sacharydów o konfiguracji D-*arabino*, które zostały zbadane pod względem toksyczności i skuteczności przeciwnowotworowej. Szczególne właściwości wykazuje 3-(2-chloroetylo)-2,3-dideoksy-3-nitrozoureido-alfa-D-*arabino*-heksopiranozyd metylu, o udowodnionej wzmożonej aktywności w stosunku do nowotworów białaczki L1210, czerniaka B16 i raka płuc.

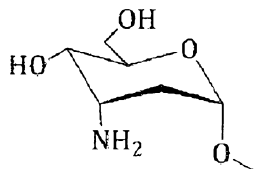
Wynalazek dotyczy 4 związków: dwóch par anomerów 3-amino-2,3-dideoksy-D-*rybo*-heksopiranozydów metylu i 3-azydo-2,3-dideoksy-D-*rybo*-heksopiranozydów metylu, pokazanych na wzorze 1, stanowiących dideoksyheksopiranozowe analogi azydotymidyny AZT, pokazanych na odrębnych wzorach 1a–1d do zastosowania jako inhibitor odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1.

Szczegółowo według wynalazku opracowano związki do zastosowania jako inhibitor odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1:



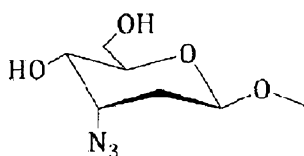
Wzór 1a

3-azydo-2,3-dideoksy-*alfa*-D-rybo-heksopiranozyd metylu, w opisie oznaczany skrótowo jako ARN3OMe.



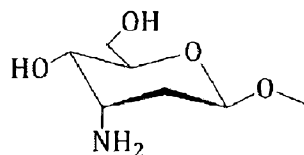
Wzór 1b

3-amino-2,3-dideoksy-*alfa*-D-rybo-heksopiranozyd metylu, w opisie oznaczany skrótowo jako ARNH2OMe.



Wzór 1c

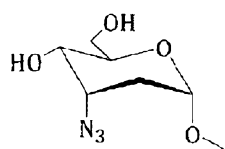
3-azydo-2,3-dideoksy-*beta*-D-rybo-heksopiranozyd metylu, w opisie oznaczany skrótowo jako BRN3OMe.



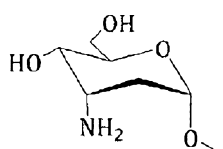
Wzór 1d

3-amino-2,3-dideoksy-*beta*-D-rybo-heksopiranozyd metylu, w opisie oznaczany skrótowo jako BRNH2OMe.

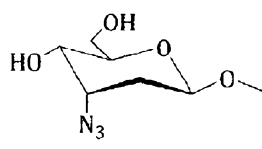
Według wynalazku, zastosowanie medyczne wyżej wymienionych związków dotyczy zastosowania jako inhibitor odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1.



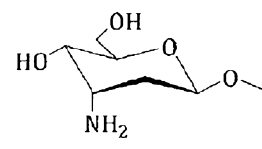
ARN3OMe



ARNH2OMe



BRN3OMe



BRNH2OMe

Wzór 1. Związki według wynalazku

Związki te według wynalazku mają zastosowanie w przyłączaniu się do miejsca aktywnego enzymu wirusa HIV – odwrotnej transkryptazy – hamując w ten sposób proces replikacji wirusa w zainfekowanej komórce. Zastosowanie tych związków obejmuje więc działanie jako nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy wirusa HIV na podobieństwo działania AZT. Dokładnie cztery zadokowane

związki – czyli związki przyłączone do odwrotnej transkryptazy HIV-1 – stanowią pochodne azydowe (ARN3OMe i BRN3OMe) i aminowe (ARNH2OMe i BRNH2OMe), ich zadokowane struktury zostały przedstawione na Fig. 3–6 wraz z ich orientacją względem miejsca aktywnego enzymu HIV-1. Struktury kompleksów zostały uzyskane na drodze dokowania molekularnego modeli tych analogów do znanej struktury krystalograficznej odwrotnej transkryptazy HIV-1 przedstawionej na Fig. 1 – stan techniki.

Na Fig. 1 została przedstawiona ta struktura enzymu, która następnie została użyta podczas procedury dokowania wszystkich związków według wynalazku – zamiennie opisywanych jako analogi AZT. Motywacją do wyboru właśnie tej struktury enzymu były następujące przesłanki: a) jest to kompletna struktura odwrotnej transkryptazy, nie brakuje w niej żadnych współrzędnych atomów, b) zawiera ona oryginalną sekwencję odwrotnej transkryptazy ludzkiego wirusa HIV-1, to znaczy nie zawiera mutacji. Został wykorzystany fragment kwasu nukleinowego składający się z mci wzorca o sekwencji nukleotydowej: 5'-ATGGTCGGCGCCCGAACAGGGACTGTG-3' oraz z nici primeru o sekwencji nukleotydowej: 5'-ACAGTCCCTGTTCTGGGCGCC-3'.

Obecność fragmentu kwasu nukleinowego w tej strukturze jest potrzebna do analizy związków według wynalazku, ponieważ sam enzym, bez kwasu nukleinowego, nie mógłby pełnić swej roli biologicznej. Dodatkowo, obecność fragmentu kwasu nukleinowego oraz inhibitora (w strukturze krystalicznej występuje inhibitor – tenofowir) w centrum aktywnym w strukturze krystalicznej enzymu zapewnia, że mamy do czynienia z formą aktywną tej cząsteczki enzymu. Obecność inhibitora w centrum aktywnym informuje także o tym, gdzie dokładnie w strukturze białka znajduje to centrum (bez potrzeby jego szukania), jest to korzystne gdyż na ogół konkretne położenie centrum aktywnego w danym białku nie jest jednoznaczne. Dodatkowym uzasadnieniem wykorzystania akurat tej struktury jest fakt, że została ona opisana w prestiżowym czasopiśmie (*Nature Structural & Molecular Biology* 11, 469–474 (2004), <https://www.nature.com/articles/nsmb760>).

W związku z powyższym w celu opracowania nowych związków mających zastosowanie w terapii zakażeń wirusem HIV-1 – jako inhibitorów odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1 dokonano badań w zakresie modelowania molekularnego oraz syntezy tych nowych związków. Modelowanie molekularne polegające na dokowaniu struktur nowych związków o funkcji hamowania aktywności odwrotnej transkryptazy HIV-1 (RT) zostało wykonane na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG-GUMed, w Pracowni Symulacji Układów Biomolekularnych, zaś syntezę związków przeprowadzono w Katedrze Chemii Bionieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Dokowanie molekularne miało dwa cele: potwierdzenie *in silico* możliwości bezpośredniego oddziaływania badanych analogów AZT z centrum aktywnym enzymu RT, oraz ilościowe oszacowanie entalpii swobodnej ΔG oddziaływania każdego analogu z centrum aktywnym RT. Ujemne wartości entalpii swobodnej świadczą o możliwości spontanicznego tworzenia się takich kompleksów w przyrodzie. Wykazano, że badane związki oddziałują z centrum aktywnym odwrotnej transkryptazy HIV-1, blokując jednocześnie to centrum aktywne, stanowiąc konkurencję dla standardowych nukleotydów. Każdy badany analog AZT wykazuje charakterystyczny dla siebie profil oddziaływania (zestaw reszt aminokwasowych i nukleotydów, z którymi bezpośrednio oddziałuje) dokładnie w centrum aktywnym enzymu RT. Na podstawie podobieństwa strukturalnego tych związków do AZT oraz możliwości ich oddziaływania z centrum aktywnym enzymu RT oparto ich postulowane właściwości biologiczne tj. wiązanie do kwasu nukleinowego za pośrednictwem wiązań kowalencyjnych, blokowanie jego rozbudowy, hamowanie działania odwrotnej transkryptazy HIV-1 i w konsekwencji utrudnianie lub całkowite uniemożliwienie tworzenia nowych cząstek wirusa. Każdy z badanych analogów ma potencjalne miejsce fosforylacji warunkującej ich wbudowywanie w strukturę kwasu nukleinowego. Opracowane związki stanowią analogi AZT – inhibitora RT. Dokładne wyniki badania przedstawiono w dalszej części opisu.

Przeprowadzono dokowanie molekularne czyli wielokrotne losowe przyłączanie dokowanej cząsteczki do RT i wybieraniu takich konformacji, które mają najniższą entalpię swobodną ΔG . Ze względu na zastosowaną metodę dokowania (algorytm genetyczny wykorzystujący teorię Lamarcka) każda kolejna znaleziona konfiguracja kompleksu była lepiej zoptymalizowana i bardziej przypominała rzeczywiste kompleksy występujące w przyrodzie. Struktur biopolimerów nie zmieniano, ligandy mogły, w ograniczonym stopniu, zmieniać swoją konformację (kształt). W ligandach zachowano w każdym przypadku konformację pierścieni. W trakcie dokowania zmieniano przede wszystkim położenie i orientację liganda względem nieruchomego biopolimeru.

Na podstawie badań doświadczalnych opracowano i zsyntezowano nowe związki – cztery pochodne 3-azydo- i 3-amino-2,3-dideoksy-D-rybo-heksopiranozydy metylu, które stanowią analogi AZT.

Na podstawie badań naukowych wymodelowano ich oddziaływanie z cząsteczką odwrotnej transkryptazy HIV-1, a tym samym działanie jako inhibitorów RT HIV-1.

Wynalazek opisano bliżej w przykładach wykonania oraz zobrazowano na rysunku na którym, poszczególne figury przedstawiają:

Fig. 1.A: schematyczne przedstawienie struktury trzeciorzędowej kompleksu odwrotnej transkryptazy HIV – RT HIV-1,

Fig. 1.B: centrum aktywne odwrotnej transkryptazy HIV (źródło, strona WWW: <https://www.rcsb.org/structure/1t03>),

Fig. 2: wyniki badania mutagenności – liczba kolonii bakteryjnych wyhodowanych na płytkach wraz z wartościami odchyłeń standardowych,

Fig. 3: przestrzenne położenie związku oznaczanego jako ARN3OMe w miejscu aktywnym enzymu RT HIV-1,

Fig. 4: przestrzenne położenie związku oznaczanego jako BRN3OMe w miejscu aktywnym enzymu RT HIV-1,

Fig. 5: przestrzenne położenie związku oznaczanego jako ARNH2OMe w miejscu aktywnym enzymu RT HIV-1,

Fig. 6: przestrzenne położenie związku oznaczanego jako BRNH2OMe w miejscu aktywnym enzymu RT HIV-1,

Fig. 7: przestrzenne położenie AZT w miejscu aktywnym enzymu jako porównanie do właściwości wynalazku.

Przykład 1

Sposób otrzymywania nowych związków i potwierdzenie ich otrzymania

- a) otrzymywanie 3-azydo-2,3-dideoksy-alfa-D-rybo-heksopiranozydu metylu i 3-azydo-2,3-dideoksy-beta-D-rybo-heksopiranozydu metylu

Naważkę 3,4,6-tri-O-acetylo-1,5-anhydro-2-deoksy-D-*arabino*-heks-1-enitolu (3 g, 0,01 mola) rozpuszczono w 1,4-dioksanie (15 ml) i nie przerywając mieszania dodano katalityczną ilość HgSO_4 (0,15 g) i roztwór H_2SO_4 (5 mM, 60 ml). Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez kolejne 2 godziny. Po tym czasie (cały substrat powinien ulec rozpuszczeniu) do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono azydek sodu (7,1 g, 0,1 mola) i lodowaty kwas octowy (15 ml). Po trzech godzinach (kontrola TLC) całą mieszaninę reakcyjną przelano do rozdzielacza i ekstrahowano ją za pomocą CHCl_3 (3 x 50 ml). Połączone ekstrakty chloroformowe przemywano nasyconym roztworem NaHCO_3 (do odczynu zasadowego) i kolejno wodą (do odczynu obojętnego), a na końcu suszono za pomocą MgSO_4 . Po odparowaniu do sucha otrzymano mieszaninę czterech izomerycznych 4,6-di-O-acetylo-3-azydo-2,3-dideoksy-D-heksopiranoz (3,95 g) w postaci oleju.

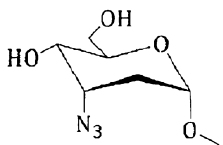
W kolejnym etapie syntezy całą porcję nierozdzielonej mieszaniny związków rozpuszczono w chlorku metylenu (70 ml), a następnie dodano do całości suchą s-kolidynę (12 ml) i chlorek metylosulfonylu (3,5 ml, 0,04 mola) i tak otrzymaną mieszaninę reakcyjną mieszano przez 0,5 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie wprowadzono do całości metanol (12 ml) i mieszanie kontynuowano przez kolejne 3 godziny (kontrola TLC). Po zakończeniu reakcji całą mieszaninę reakcyjną przelano do rozdzielacza i rozcieńczono ją CH_2Cl_2 (20 mL). Otrzymany roztwór przemywano kolejno HCl (1M), nasyconym roztworem NaHCO_3 i na końcu wodą. Otrzymane ekstrakty chloroformowe połączono i suszono za pomocą MgSO_4 . Po odparowaniu do sucha otrzymano mieszaninę czterech izomerycznych 4,6-di-O-acetylo-3-azydo-2,3-dideoksy-D-heksopiranozydów metylu (4,1 g) w postaci oleju. Do jej rozdzielania zastosowano chromatografię kolumnową, w której fazą stacjonarną stanowił żel krzemionkowy (Silica Gel 60, 0,08 mm, E. Merck), a eluentem był układ czterochlorek węgla: aceton (3 : 1 v/v). W wyniku rozdzielania otrzymano dwie frakcje stanowiące dwie dwuskładnikowe mieszaniny: 4,6-di-O-acetylo-3-azydo-2,3-dideoksy-D-heksopiranozydów metylu (1,88 g frakcji I i 2,0 g frakcji II).

a1) Do roztworu frakcji I (1,88 g) w absolutnym metanolu (80 mL) dodano świeżo przygotowany roztwór metanolanu sodu (1 M, 0,9 ml). Po upływie 0,5 godziny (kontrola TLC) roztwór zobojętniono za pomocą odpowiedniej porcji żywicy Dowex-50Wx8 (H^+), którą kolejno odsączono, a otrzymany roztwór odparowano do niewielkiej objętości. Do tak otrzymanego stężonego roztworu dodawano powoli porcjami mieszaninę octanu etylu i *n*-heksanu (1 : 3 v/v) (40 mL). Po wytrąceniu i odsączeniu krystalicznego związku stanowiącego D-*arabino*-izomer otrzymany roztwór odparowano do sucha uzyskując 3-azydo-2,3-dideoksy-β-D-*rybo*-heksopiranozyd metylu (BRN3OMe) (0,8 g) w postaci syropu.

a2) Do roztworu frakcji II (2,0 g) w absolutnym metanolu (80 mL) dodano świeżo przygotowany roztwór metanolami sodu (1 M, 0,9 ml). Po upływie 0,5 godziny (kontrola TLC) roztwór zobojętniono za pomocą odpowiedniej porcji żywicy Dowex-50Wx8 (H⁺), którą kolejno odsączono, a otrzymany roztwór odparowano do niewielkiej objętości. Do tak otrzymanego stężonego roztworu dodawano powoli porcjami mieszaninę octanu etylu i *n*-heksanu (1 : 3 v/v) (40 mL). Otrzymano w ten sposób 3-azydo-2,3-dideoksy- α -D-rybo-heksopiranozyd metylu (ARN3OMe) (0,7 g) w postaci syropu.

Potwierdzenie struktury otrzymanego związku a2):

Właściwości otrzymanego związku:



3-azydo-2,3-dideoksy-alfa-D-rybo-heksopiranozyd metylu (akronim ARN3OMe) (MW = 203,2)

Właściwości fizyczne:

Pomiar skręcalności optycznej wykonano za pomocą polarymetru. Roztwór analizowanego związku rozpuszczono w odpowiednim rozpuszczalniku, uzyskując zadane stężenie. Kolejno przeniesiono go do rurki polarymetrycznej i wykonano pomiar za pomocą polarymetru. Obliczono i zmierzono takie parametry jak: temperatura topnienia, wartość skręcalności optycznej mierzoną w chloroformie znaną metodą.

t.t. = 100-102 (heksan:aceton); $[\alpha]_D^{+252^\circ}$ (c 1,0 chloroform); $[\alpha]_D^{+210^\circ}$ (c 1,0 metanol); R_f 0,32 (cykloheksan: octan etylu 1 : 1); R_f 0,13 (*n*-heptan: octan etylu 1 : 2);

Charakterystyka spektroskopowa:

Obecność charakterystycznych grup obecnych w syntezowanych związkach wykazano znaną metodą za pomocą spektroskopii IR.

IR: (chloroform) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3629, 3564 (OH), 2127 (N₃); (chloroform) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3411 ν (OH), 2104 ν (N₃); (film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3413,78 ν (OH), 2933,66 ν (CH₂), 2104,85 ν (N₃), 1434,00 δ (CH₂)+ δ (OCH)+ δ (CCH); 1374,51 δ (OCH)+ δ (COH)+ δ (CCH); 1337,19 δ (CCH)+ δ (OCH); 1190,21 ν (CO)+ ν (CC); 1130,64 ν (CO); 984,76 ν (CO)+ ν (CC);

Molowe współczynniki ekstynkcji zostały wyznaczone znaną metodą.

UV: $\epsilon^{\lambda_{\text{nm}}}$ [M⁻¹.cm⁻¹]: ϵ^{270} 38,99 (woda); ϵ^{270} 42,90 (HCl); ϵ^{264} 1 45,55 (NaOH);

Struktura otrzymanych związków potwierdzona została za pomocą spektroskopii ¹H i ¹³C NMR (COSY i HSQC).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 4,73 (d, 1H, J_{1,2a} = 4 Hz, H-1); 4,10 (q, 1H, J_{3,2e} = 4 Hz, J_{3,2a} = 4 Hz, J_{3,4} = 4 Hz, H-3); 3,85-3,72 (m, 4H, H-4, H-5, H-6, H-6'); 3,37 (s, 3H, CH₃-O); 2,22 (m, 1H, J_{2e,2a} = 15 Hz, J_{2e,3} = 4 Hz, H-2e); 2,01 (m, 1H, J_{2a,2e} = 15 Hz, J_{2a,1} = 4 Hz, J_{2a,3} = 4 Hz, H-2a).

¹³C {¹H} NMR (700 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 96,66 (C-1); 67,83 (C-5); 67,56 (C-6); 62,75 (C-4); 58,40 (C--3); 55,50 (OCH₃); 32,37 (C-2);

Wartości pK_a zostały wyznaczone znaną metodą.

Stałe deprotonowania (woda) pK_a: 4,11; 10,21; 13,52 (met. spektrofotometryczna); 2,94; 7,37; 11,87; 12,34 (met. potencjometryczna).

Wartości log β_n dla trzech jonów metali zostały wyznaczone jedynie przez autorów patentu

Stałe trwałości log β_n : [Cu²⁺ $\leftarrow$ ARN3OMe] 3,22; 4,12; 6,19; [Ni²⁺ $\leftarrow$ ARN3OMe] 1,51; 3,37; 5,39; [VO²⁺ $\leftarrow$ ARN3OMe] 4,69; 8,02; 13,22.

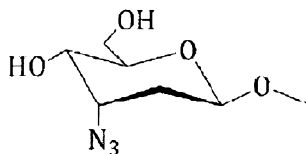
Wyniki potwierdzające czystość otrzymanych związków zostały wykonane znaną metodą.

Analiza elementarna dla C₇H₁₃N₃O₄ (MW = 203,2):

wyznaczona: C 41,38; H 6,45; N 20,68. Znaleziona: C 41,13; H 6,57; N 20,52; znaleziona: C 39,87; H 6,54; N 19,85.

Potwierdzenie struktury otrzymanego związku a1):

Właściwości otrzymanego związku:



3-azydo-2,3-dideoksy-beta-D-rybo-heksopiranozyd metylu (akronim BRN3OMe) (MW = 203,2)

Właściwości fizyczne:

Pomiar skręcalności optycznej wykonano za pomocą polarymetru. Roztwór analizowanego związku rozpuszczono w odpowiednim rozpuszczalniku, uzyskując zadane stężenie. Kolejno przeniesiono go do rurki polarymetrycznej i wykonano pomiar za pomocą polarymetru.

olej; $[\alpha]_D^{+10}$ (c 0,7 chloroform); $[\alpha]_D^{-27}$ (c 0,7 metanol); R_f 0,28 (cykloheksan: octan etylu 1 : 1), R_f 0,23 (n-heptan: octan etylu 1 : 2);

Charakterystyka spektroskopowa:

Obecność charakterystycznych grup obecnych w syntezowanych związkach wykazano za pomocą spektroskopii IR znaną metodą.

IR: (chloroform) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3411 ν (OH), 2098 ν (N₃); (film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 3398,34 ν (OH), 2933,41 ν (CH₂), 2103,92 ν (N₃), 1433,35 δ (CH₂)+ δ (OCH)+ δ (CCH); 1374,30 δ (OCH)+ δ (COH)+ δ (CCH); 1336,69 δ (CCH)+ δ (OCH); 1190,91 ν (CO) ν (CC); 1130,65 ν (CO); 984,76 ν (CO) ν (CC);

Molowe współczynniki ekstynkcji zostały wyznaczone znaną metodą.

UV: $\epsilon^{\lambda}_{[nm]}$ [M⁻¹·cm⁻¹]: ϵ^{266} 384,25 (woda); ϵ^{267} 400,45 (HCl); ϵ^{264} 145,55 (NaOH);

Struktura otrzymanych związków potwierdzona została za pomocą spektroskopii ¹H i ¹³C NMR (COSY i HSQC) znaną metodą.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 4,67 (dd, 1H, J_{1,2e} = 2 Hz, J_{1,2a} = 9 Hz, H-1); 4,13 (q, 1H, J_{3,2e} = 3,5 Hz, J_{3,2a} = 3,5 Hz, J_{3,4} = 3,5 Hz, H-3); 3,90-3,79 (m, 3H, H-4, H-6, H-6'); 3,68 (m, 1H, H-5); 3,49 (s, 3H, CH₃O); 2,12 (ddd, 1H, J_{2e,2a} = 14 Hz, J_{2e,1} = 2 Hz, J_{2e,3} = 3,5 Hz, H-2e); 1,77 (ddd, 1H, J_{2a,2e} = 14 Hz, J_{2a,1} = 9 Hz, J_{2a,3} = 3,5 Hz, H-2a).

¹³C {H} NMR (700 MHz, CDCl₃), δ [ppm]: 96,70 (C-1); 67,79 (C-5); 67,51 (C-6); 62,57 (C-4); 58,31 (C-3); 55,41 (OCH₃); 32,34 (C-2);

LRMS (CI,NH₃) m/z 221 [M + NH₄⁺], 204 [M + H⁺]; FDMS m/z 203 [M⁺].

Wartości pK_a zostały wyznaczone znaną metodą.

Stałe deprotonowania (woda) pK_a: 1,79; 9,43; 11,08; 12,21 (met. spektrofotometryczna); 4,01; 11,46; 12,47 (met. potencjometryczna).

Wartości log β_n dla trzech jonów metali zostały wyznaczone znaną metodą.

Stałe trwałości log β_n : [Cu²⁺ ← BRN3OMe] 2,23; 4,82; 7,57; [Ni²⁺ ← BRN3OMe] 2,12; 4,74; 7,52; [VO²⁺ ← BRN3OMe] 3,69; 7,73; 11,91.

Wyniki potwierdzające czystość otrzymanych związków zostały wykonane znaną metodą.

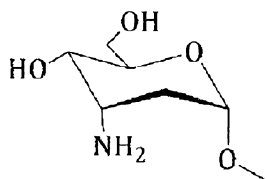
Analiza elementarna dla C₇H₁₃N₃O₄ (MW = 203,2):

wyznaczona: C 41,38; H 6,45; N 20,68; znaleziona: C 41,70; H 6,42; N 20,52; znaleziona: C 41,60; H 6,59; N 20,17.

b) Sposób otrzymywania 3-ammo-2,3-dideoksy-alfa-D-rybo-heksopiranozydu metylu

Naważkę 3-azydo-2,3-dideoksy-alfa-D-rybo-heksopiranozydu metylu (0,7 g, 3,44 mmola) rozpuszczano w 20 ml suchego metanolu i dodawano katalityczną ilość 10% Pd/C (40 mg). Przez tak przygotowany roztwór przepuszczano początkowo argon (10 minut) i kolejno wodór (z butli). Przebieg reakcji kontrolowano chromatograficznie (TL w układzie octan etylu: eter naftowy 1 : 2 v/v). Po zakończeniu reakcji odsączono węgiel aktywny, a otrzymany metanолоwый roztwór odparowano do sucha otrzymując 3-amino-2,3-dideoksy-alfa-D-rybo-heksopiranozyd metylu (0,65 g; 89%) w postaci syropu.

Potwierdzenie otrzymanego związku b):



3-amino-2,3-dideoxy-alfa-D-rybo-heksopiranozyd metylu (akronim ARNH2OMe)

Właściwości fizyczne:

Pomiar skręcalności optycznej wykonano za pomocą polarymetru. Roztwór analizowanego związku rozpuszczono w odpowiednim rozpuszczalniku, uzyskując zadane stężenie. Kolejno przeniesiono go do rurki polarymetrycznej i wykonano pomiar za pomocą polarymetru. Wartość skręcalności optycznej została zmierzona znaną metodą.

olej, $[\alpha]_D^{+71^\circ\text{C}}$ (c 0,6 metanol); R_f 0,22 (chloroform: metanol 1 : 2);

Charakterystyka spektroskopowa:

Obecność charakterystycznych grup obecnych w syntezowanych związkach wykazano za pomocą spektroskopii IR znaną metodą.

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 3335 $\nu(\text{OH}, \text{NH}_2)$, 1604 $\nu(\text{NH})$; (film) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 3368,05 $\nu(\text{NH})$, 3303,14 $\nu(\text{NH}_2)$, 2931,33 $\nu(\text{CH}_2)$, 1585,49 $\delta(\text{NH})$, 1432,00 $\delta(\text{CH}_2)+\delta(\text{OCH})+\delta(\text{CCH})$; 1362,51 $\delta(\text{OCH})+\delta(\text{COH})+\delta(\text{CCH})$; 1315,76 $\delta(\text{CCH})+\delta(\text{OCH})$; 1208,28 $\nu(\text{CO})+\nu(\text{CC})$; 1126,88 $\nu(\text{CO})$; 973,62 $\nu(\text{CO})+\nu(\text{CC})$;

Molowe współczynniki ekstynkcji zostały wyznaczone znaną metodą.

UV: $\epsilon^{\lambda[\text{nm}]}$ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]: ϵ^{297} 50,20 (NaOH); ϵ^{306} 63,57 (HCl); ϵ^{314} 26,42 (woda);

Struktura otrzymanych związków potwierdzona została za pomocą spektroskopii ^1H i ^{13}C NMR (COSY i HSQC) znaną metodą.

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD), δ [ppm]: 4,77 (d, 1H, $J_{1,2a} = 5,86$ Hz, H-1); 4,03 (dd, 1H, $J_{4,5} = 9,28$ Hz, H-4); 4,02 (m, 1H, $J_{5,6} = 5,86$ Hz, $J_{5,6'} = 3,42$ Hz, H-5); 3,46 (s, 3H, OCH_3); 3,41 (m, 1H, H-6'); 3,36 (m, 1H, $J_{3,4} = 2,93$ Hz, H-3); 3,02 (dd, 1H, $J_{6,6'} = 12,21$ Hz, H-6), 2,62 (szerokie, 1H, OH); 2,40 (dd, 1H, $J_{2e,3} = 1,96$ Hz, H-2e); 1,70 (dq, 1H, $J_{2a,2e} = 14,6$ Hz, $J_{2a,3} = 3,9$ Hz, H-2a).

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (500 MHz, CD_3OD), δ [ppm]: 97,89 (C-1); 74,73 (C-4); 69,71 (C-5); 55,58 (OCH_3); 52,96 (C-3); 46,54 (C-6); 32,12 (C-2).

Wartości pKa zostały wyznaczone znaną metodą.

Stałe deprotonowania (woda) pKa: 3,18; 7,90; 9,85; 12,29 (met. spektrofotometryczna); 4,59; 8,78; 9,93; 10,32 (met. potencjometryczna).

Wartości $\log\beta_n$ dla trzech jonów metali zostały wyznaczone znaną metodą.

Stałe trwałości $\log\beta_n$: $[\text{Cu}^{2+} \leftarrow \text{ARNH}_2\text{OMe}]$ 4,89; 7,89, 11,11; $[\text{Ni}^{2+} \leftarrow \text{ARNH}_2\text{OMe}]$ 3,37; 4,85; 6,06; $[\text{VO}^{2+} \leftarrow \text{ARNH}_2\text{OMe}]$ 4,47; 9,82; 10,22.

Wyniki potwierdzające czystość otrzymanych związków zostały wykonane znaną metodą.

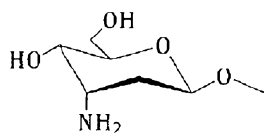
Analiza elementarna dla $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4$ (MW = 177,10):

wyznaczona: C 47,45; H 8,53; N 7,90. Znaleziona: N 7,91; znaleziona: C 46,18; H 8,58; N 7,01.

c) Sposób otrzymywania 3-amino-2,3-dideoxy-beta-D-rybo-heksopiranozydu metylu

Naważkę 3-azydo-2,3-dideoxy-beta-D-rybo-heksopiranozydu metylu (0,8 g, 3,93 mmola) rozpuszczano w 20 ml suchego metanolu i dodawano katalityczną ilość 10% Pd/C (40 mg). Przez tak przygotowany roztwór przepuszczano początkowo argon (10 minut) i kolejno wodór (z butli). Przebieg reakcji kontrolowano chromatograficznie (TLC w układzie octan etylu: eter naftowy 1 : 2 v/v). Po zakończeniu reakcji odsączono węgiel aktywny, a otrzymany metanolowy roztwór odparowano do sucha otrzymując 3-amino-2,3-dideoxy-beta-D-rybo-heksopiranozyd metylu (0,7 g; 96%) w postaci syropu.

Potwierdzenie otrzymanego związku c):



3-amino-2,3-dideoxy-beta-D-rybo-heksopiranozyd metylu (akronim BRNH2OMe)

Właściwości fizyczne:

Wartość R_f została wyznaczona znaną metodą.

R_f 0,23 (metanol);

Charakterystyka spektroskopowa:

Obecność charakterystycznych grup obecnych w syntezowanych związkach wykazano za pomocą spektroskopii IR znaną metodą.

IR: (film) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 3352,33 $\nu(\text{NH})$, 2923,45 $\nu(\text{CH}_2)$, 1450,17 $\delta(\text{CH}_2)+\delta(\text{OCH})+\delta(\text{CCH})$; 1377,92 $\delta(\text{OCH})+\delta(\text{COH})+\delta(\text{CCH})$; 1209,81 $\nu(\text{CO})+\nu(\text{CC})$; 1128,84 $\nu(\text{CO})$;

Molowe współczynniki ekstynkcji zostały wyznaczone znaną metodą.

UV: $\epsilon^{\lambda[\text{nm}]}$ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]: ϵ^{264} 68,67; ϵ^{309} 89,54 (HCl); ϵ^{271} 65,28; ϵ^{289} 66,79 (NaOH); ϵ^{307} 68,69 (woda);

Struktura otrzymanych związków potwierdzona została za pomocą spektroskopii ^1H i ^{13}C NMR (COSY i HSQC) znaną metodą

^1H NMR (700 MHz, CDCl_3), δ [ppm]: 4,75 (td, 1H, $J_{1,2a} = 8,69$ Hz, $J_{1,2e} = 2,39$ Hz, H-1); 3,92 (dd, 1H, $J_{6,6'} = 11,72$ Hz, H-6), 3,82 (dd, 1H, H-6'); 3,71 (m, 1H, $J_{5,6} = 7,74$ Hz, $J_{5,6'} = 5,06$ Hz, H-5); 3,63 (dd, 1H, $J_{4,5} = 9,10$ Hz, H-4); 3,53 (s, 3H, OCH_3); 3,43 (m, 1H, $J_{3,4} = 4,25$ Hz, H-3); 1,96 (dq, 1H, $J_{2e,3} = 1,69$ Hz, H-2e); 1,80 (dq, 1H, $J_{2a,2e} = 12,7$ Hz, $J_{2a,3} = 4,02$ Hz, H-2a); 1,62 (szerokie, 1H, NH);

^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR (700 MHz, CD_3OD), δ [ppm]: 98,80 (C-1); 74,20 (C-5); 68,3 (C-4); 63,90 (C-6); 56,50 (OCH_3); 47,40 (C-3); 37,50 (C-2).

Wartości pK_a zostały wyznaczone znaną metodą.

Stałe deprotonowania (woda) pK_a : 4,26; 9,26; 11,01 (met. spektrofotometryczna); 7,70; 9,04; 12,33 (met. potencjometryczna).

Wartości $\log\beta_n$ dla trzech jonów metali zostały wyznaczone znaną metodą.

Stałe trwałości $\log\beta_n$: $[\text{Cu}^{2+} \leftarrow \text{BRNH}_2\text{OMe}]$ 5,79; 8,28; 10,84; $[\text{Ni}^{2+} \leftarrow \text{BRNH}_2\text{OMe}]$ 2,02; 4,37; 7,03; $[\text{VO}^{2+} \leftarrow \text{BRNH}_2\text{OMe}]$ 4,06; 9,32; 16,02.

Wyniki potwierdzające czystość otrzymanych związków zostały wykonane znaną metodą.

Analiza elementarna dla $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4$ (MW = 177,10): wyznaczona: C 47,45; H 8,53; N 7,90. znaleziona: C 46,42; H 8,53; N 7,09.

Przykład 2

Badanie właściwości biologicznych opracowanych związków

Przygotowanie preparatów i płytek:

Sprzęty laboratoryjne, probówki Eppendorfa, szalki Petriego, głaszczki były wysterylizowane, a roztwory jałowe. Podczas przeprowadzania badań stosowano aseptyki, by nie zakazić bakterii oraz pożywek. Roztwory (pożywki bakteryjne, nocna kolonia *Salmonella*, histydyna z biotyną) sporządzano według typowych procedur. Do przeprowadzenia badań przygotowano następujące roztwory: roztwór D-(+)-glukozy, roztwór agaru bakteriologicznego, roztwór chlorku sodu NaCl, mieszaninę składników mineralnych (uwodniony siarczan(VI) magnezu $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, kwas cytrynowy $\text{HOOC-CH}_2\text{-C(OH)(COOH)-CH}_2\text{-COOH}$, wodorofosforan(V) potasu K_2HPO_4 , wodorofosforan(V) sodowo-amonowy czterowodny $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$), roztwór odpowiedniej pożywki bakteryjnej dla tych bakterii np. Nutrient Broth z dodatkiem ampicyliny, roztwory badanych związków ARN3OMe, ARNH2OMe, BRN3OMe i BRNH2OMe.

W celu przygotowania podłoża agarowego mieszano roztwór agaru, mieszaninę składników mineralnych oraz roztwór glukozy. Następnie całość wylewano na płytki umieszczone pod laminatem. Za-

szczepienie kolonii bakteryjnej wykonano 12 godzin przed posiewem. Do roztworu Nutrient Broth z ampicyliną dodano pobraną kolonię bakteryjną *S. typhimurium* i hodowano je w wytrząsarce-inkubatorze ES-20 np. firmy Grant-bio w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 100 rpm.

T a b e l a 1. Zestawienie liczby składników w kolejnych posiewach bakteryjnych.

Nr.	C sacharydu [ug/ płytkę]	V H ₂ O [μl]	V sacharydu [μl]	V NaCl [μl]	V bakterii [μl]	V całkowita [μl]
1	2000	----	300	150	300	750
2	1000	150	150	150	300	750
3	500	225	75	150	300	750
4	300	255	45	150	300	750
5	60	210	90 (10x)*	150	300	750
6	4	294	6 (10x)*	150	300	750
7	K -	300	----	150	300	750
8	K +	282	18 DOX	150	300	750

*(10x) oznacza 10-krotne rozcieńczenie poprzedniego roztworu sacharydu.

W celu przygotowania posiewów bakteryjnych mieszano składniki pożywki w odpowiedniej kolejności: wodę, roztwór NaCl, roztwór badanego sacharydu na końcu nocną kolonię bakterii. Dla badanych związków wykonano taką samą procedurę testu mutagenności: dwie próby kontrolne (ujemną i dodatnią) oraz sześć posiewów dla różnych stężeń sacharydu w roztworze w zakresie 4–2000 μg/płytkę (Tabela 1). Dla danego stężenia sacharydu (próbki nr 1–8) wykonano po trzy oddzielne posiewy (każdy na oddzielnej płytce). Ilości kolonii dla kolejnych próbek uśredniano z trzech płytek. Do kontroli pozytywnej (K+) zamiast roztworu sacharydu dodawano doksorubicynę (DOX), antybiotyk przeciwnowotworowy wywołujący mutacje powodujące wytwarzanie histydy w bakteriach *Salmonella*. Do kontroli negatywnej (K-) nie dodawano ani badanych związków, ani doksorubicyny.

Kolejno roztwory inkubowano przez 4 godziny w wytrząsarce (prędkość wytrząsania 220 rpm, temperatura 37°C). Po inkubacji roztwory wirowano przez 4 minuty z prędkością 13,4 rpm (wirówka *miniSpin Eppendorf*), zlewano supernatant i zawieszano w wodnym roztworze chlorku sodu. Ponownie wirowano, zlewano supernatant i zawieszano bakterie w mieszaninie składającej się z H₂O, NaCl, histydy i biotyny. Roztwory wysiewano na wcześniej przygotowane pożywki agarowe wykonując posiew standardowy przy pomocy kulek szklanych. Dla każdej z ośmiu próbek wykonano trzy płytki. Po naniesieniu bakterii płytki inkubowano w zaciemnionym pomieszczeniu w czasie 48 godzin w temperaturze 37°C.

Przebieg oznaczeń

Do oceny potencjalnych właściwości mutagennych i genotoksycznych substancji chemicznych stosowane są testy *in vivo* i *in vitro* wykonywane na zwierzętach, bakteriach lub komórkach hodowlanych. Mutagenność dwóch par anomerów sprawdzano za pomocą referencyjnego testu Amesa polegającego na ocenie zdolności wywoływania przez badane związki mutacji powrotnej (rewersji) w komórkach aukstotroficznych szczepów *Salmonella typhimurium*. Komórki bakteryjne, w których wystąpiła mutacja powrotna, w przeciwieństwie do komórek mutantów *S. typhimurium*, wykazują zdolność do wzrostu na podłożu minimalnym pozbawionym czynnika wzrostowego, w tym wypadku histydy i biotyny. Brak zdolności do syntezy tych aminokwasów sprawia, że komórki nie mogą rosnąć na pożywce minimalnej zawierającej jako źródło węgla glukozę i zestaw soli mineralnych, dopóki histydyna i biotyna nie zostaną dodane do podłoża wzrostowego.

Mutagen, działając na taki szczep, wywołuje mutację powrotną (rewersję mutacji istniejącej) do formy „dzikiej” – prototroficznej, przywracając komórkom zdolność do syntezy histydyny i biotyny oraz wzrostu.

Test mutagenności, przeprowadzono z wykorzystaniem szczepu bakterii *Salmonella typhimurium* TA102, w których można odwrócić mutację, prowadzącą do uzależnienia się szczepu bakterii od obecności histydyny w środowisku. Bakterie hodowano na pożywce minimalnej z dodatkiem glukozy, histydyny, biotyny i ampicyliny. Na 12 godzin przed posiewem bakterii zaszczerpiona została hodowla nocna w pożywce Nutrient Broth z dodatkiem ampicyliny. Bakterie *Salmonella* utrzymywano przez 4 h w temperaturze pokojowej, a następnie przez 8 h hodowano w Environmental Saker-Incubator ES-20 w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 100 rpm. Dla każdego badanego związku wykonano dwie próby kontrolne: dodatnią (gdzie jako wzorcowy mutagen zastosowano antybiotyk przeciwnowotworowy doksorubicynę (DOX), ujemną oraz sześć prób dla różnych stężeń każdego badanego związku. Roztwory stosowane w badaniach (histydyna z biotyną, pożywki bakteryjne, nocna kolonia *Salmonella*) sporządzano według typowej procedury.

Kolonie bakterii, jakie wyrosły na wszystkich pożywkach, były okrągłe i miały barwę jasnożółtą. Ich rozmieszczenie było równomierne co wskazywało na poprawność wysiewania *S. typhimurium* przy zachowaniu zasad aseptyki w pracy z bakteriami (na żadnej z wykorzystywanych płytek z pożywkami nie pojawiły się inne kolonie bakteryjne). Płytki kontroli ujemnej (K-), nie zawierające mutagennej doksorubicyny ani monosacharydu, posiadały niewielką ilość kolonii. Brak histydyny uniemożliwia dynamiczny rozwój bakterii. Pojawienie się kilku kolonii w tej kontroli, było spowodowane tym, że niewielka ilość *Salmonelli* ma zdolność do samoistnego mutowania i uzyskania zdolności do syntezy histydyny. W kontroli pozytywnej (K+), gdzie znajdowała się bardzo duża ilość kolonii bakterii dodano DOX (0,1 µg/płytkę). Wywołał on mutację powodując u bakterii możliwość samodzielnej syntezy histydyny. Warunki prowadzenia eksperymentów były takie same dla każdego sacharydu. Różnicę w wyrosniętych koloniach można wytłumaczyć tym, że badania przeprowadzono w długim przedziale czasowym, co było niekorzystne dla wzrostu spoczywających bakterii.

Wyniki

Liczbę wyrosniętych kolonii bakteryjnych, dla rozpatrywanych stężeń badanych związków przedstawiono w postaci diagramów jako uśrednienie ilości kolonii z trzech prób, co pokazano na fig. 2.

Z przeprowadzonych badań wynika, że żadne zsyntezowane związki nie wykazywały właściwości mutagennych w badanym przedziale stężeń. Ilości kolonii bakteryjnych były na poziomie kontroli ujemnej, co pokazano na fig. 2.

Z przeprowadzonych badań wynika, że: a) ARN3OMe nie wykazywał właściwości mutagennych w badanym przedziale stężeń. Ilości kolonii bakteryjnych były na poziomie kontroli ujemnej; b) BRN3OMe nie wykazywał właściwości mutagennych w badanym przedziale stężeń. Ilości kolonii bakteryjnych były na poziomie kontroli ujemnej; c) ARNH2OMe nie wykazywał właściwości mutagennych w badanym przedziale stężeń. Ilości kolonii bakteryjnych były na poziomie kontroli ujemnej; d) BRNH2OMe nie wykazywał właściwości mutagennych w badanym przedziale stężeń. Ilości kolonii bakteryjnych były na poziomie kontroli ujemnej.

Przykład 3

Wyniki badania dokowania molekularnego związków według wynalazku

Anomery 3-azydo-2,3-dideoksy-D-rybo-heksopiranozydów metylu i anomery 3-amino-2,3-dideoksy-D-rybo-heksopiranozydów metylu (O-glikozydy) badano pod kątem właściwości biologicznych.

Poniższy opis obejmuje wyniki dokowania dwóch par zsyntezowanych anomerów 3-amino-2,3-dideoksy-D-rybo-heksopiranozydów metylu według wynalazku w tej części opisywane jako: ARNH2OMe, BRNH2OMe i ich azydowych prekursorów ARN3OMe, BRN3OMe, stanowiących łącznie związki według wynalazku zamiennie nazywane analogami AZT.

Wyniki zobrazowano na fig. 3–6.

Przeprowadzone zostało dokowanie molekularne obejmujące poszukiwanie 44000 niskoenerygetycznych konfiguracji kompleksów odwrotnej transkryptazy HIV z każdą z czterech zsyntezowanych pochodnych zilustrowanych na wykresie oraz także dodatkowo dokowany był (dla porównania) AZT – fig. 7.

W sumie zostało uzyskane 220000 modeli struktur kompleksów. Dla każdego z czterech zsyntezowanych związków i dla AZT zostały znalezione najniższe energetyczne (to znaczy charakteryzujące się najniższą wartością entalpii swobodnej oddziaływania białko-ligand) konformacje kompleksów. Ich zbiory zostały podzielone na rodziny zawierające podobne wzajemne ułożenia. Dla każdej pochodnej deoksysacharydu i dla AZT została wybrana jedna konformacja kompleksu do szczegółowej analizy. Wyniki analizy zostały podsumowane w Tabeli 2.

T a b e l a 2. Lista reszt aminokwasowych bezpośrednio zaangażowanych w oddziaływanie z O-metylowymi glikozydami.

ARN3OMe	ARNH2OMe	BRN3OMe	BRNH2OMe	AZT
$\Delta G = -6,0$ kcal/mol	$\Delta G = -6,2$ kcal/mol	$\Delta G = -6,0$ kcal/mol	$\Delta G = -5,8$ kcal/mol	$\Delta G = -10,0$ kcal/mol
DNA				
DA T 705	DA T 705	DA T 705	DA T 705	DA T 705
DT T 706	DT T 706	DT T 706	DT T 706	DT T 706
DG T 707	DG T 707	DG T 707	DG T 707	DG T 707
DG T 708	-	-	-	DG T 708
-	-	-	-	DC T 709
-	-	-	-	DG T 710
-	-	-	-	DC P 818
-	-	-	-	DG P 819
-	-	-	-	DC P 820
DC P 821	DC P 821	DC P 821	DC P 821	DC P 821
białko				
TYR A 115	TYR A 115	TYR A 115	TYR A 115	-
-	PRO A 157	PRO A 157	PRO A 157	-
TYR A 183	-	TYR A 183	TYR A 183	-
MET A 184	MET A 184	MET A 184	MET A 184	MET A 184
-	ASP A 185	ASP A 185	-	-

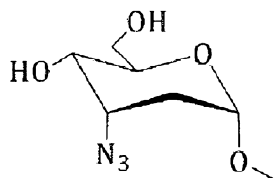
W Tabeli 2 są przedstawione reszty aminokwasowe występujące w miejscu aktywnym odwrotnej transkryptazy HIV, które znajdują się w odległości nie większej niż 5 Å (angstrémów) od zadokowanej pochodnej deoksysacharydu z grupą O-metylową jako aglikonem. Zastosowane oraz używane oznaczenia literowe i numeryczne stanowią przyjętą arbitralną konwencję (zostały wzięte bezpośrednio z pliku struktur białkowych o kodzie PDB: 1T03). Tabela 2 zawiera kolejno: entalpię swobodną ΔG oddziaływania dla najniższej energetycznej konfiguracji kompleksu, informacje o nazwie reszty aminokwasowej lub nukleotydu, nazwie łańcucha peptydowego lub nukleinowego oraz numerze reszty lub nukleotydu. W ostatniej kolumnie przedstawione są listy reszt aminokwasowych i nukleotydów znajdujących się w odległości nie większej niż 5 Å (angstrémów) od cząsteczki AZT, także dokowanej (dla porównania na Fig. 8). Warto zwrócić uwagę na nieco odmienny sposób dokowania AZT niż pozostałych związków w tej grupie. Różnice wynikają przede wszystkim z obecności w cząsteczce AZT względnie dużej grupy

(tyminy) oraz trzech reszt fosforanowych. Kilka różnic można także zaobserwować w grupie czterech pochodnych deoksysacharydów z grupą O-metylową jako aglikonem. Związek BRN3OMe oddziałuje z największą liczbą reszt aminokwasowych w miejscu aktywnym białka, natomiast najmniej takich oddziaływań obserwujemy dla związku ARN3OMe. Pozostałe dwa kompleksy zachowują się podobnie (z drobną różnicą dla pojedynczych reszt aminokwasowych). Wszystkie niskoenergetyczne kompleksy pochodnych deoksysacharydów (i AZT) charakteryzują ujemne wartości entalpii swobodnych oddziaływania tych związków z odwrotną transkryptazą HIV, co daje podstawy spontanicznego tworzenia kompleksów oraz potwierdza na wykorzystanie tych zsintezowanych O-glikozydów jako inhibitorów badanego enzymu.

Warto także zwrócić uwagę na fakt, że zarówno ujemne wartości entalpii swobodnych oddziaływania wszystkich analogów z białkiem jak i konfiguracje wszystkich kompleksów przypominające konfigurację tenofowiru z odwrotną transkryptazą HIV świadczą o możliwości spontanicznego tworzenia się tych kompleksów w przyrodzie jak i o możliwości wykorzystania badanych analogów jako inhibitorów badanego enzymu.

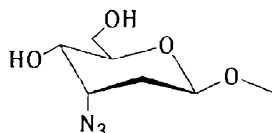
Zastrzeżenia patentowe

1. 3-azydo-2,3-dideoksy-*alfa*-D-rybo-heksopiranozyd metylu o wzorze strukturalnym:



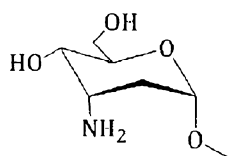
do zastosowania jako inhibitor odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1.

2. 3-azydo-2,3-dideoksy-*beta*-D-rybo-heksopiranozyd metylu o wzorze strukturalnym:



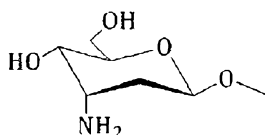
do zastosowania jako inhibitor odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1.

3. 3-amino-2,3-dideoksy-*alfa*-D-rybo-heksopiranozyd metylu o wzorze strukturalnym:



do zastosowania jako inhibitor odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1.

4. 3-amino-2,3-dideoksy-*beta*-D-rybo-heksopiranozyd metylu o wzorze strukturalnym:



do zastosowania jako inhibitor odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1.

Rysunki**A. B.**

Fig. 1

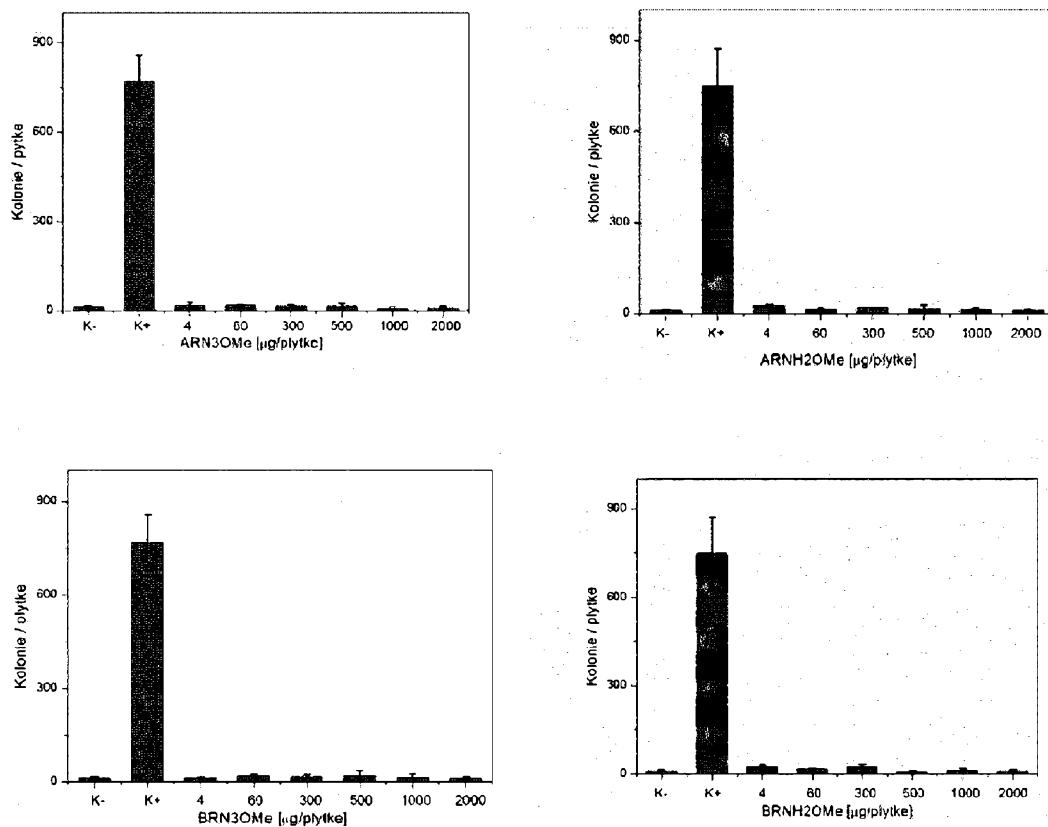
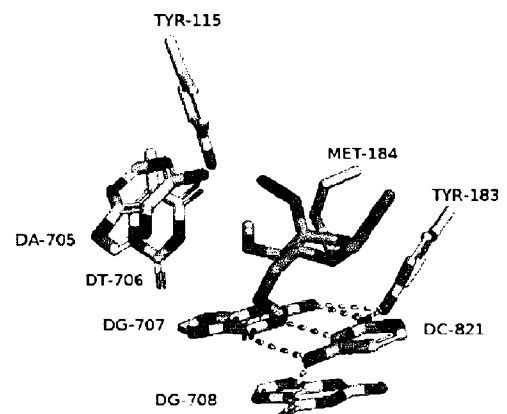


Fig. 2



Fig. 3



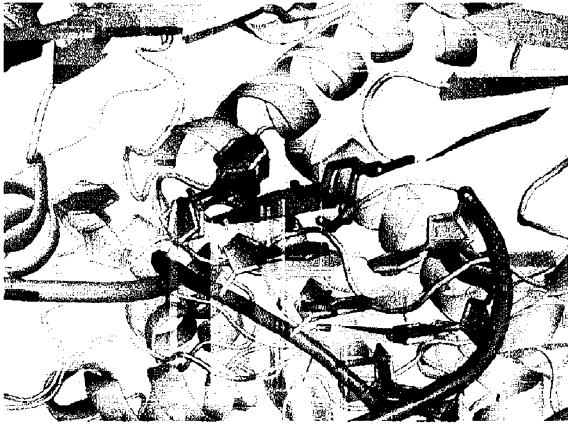


Fig. 4

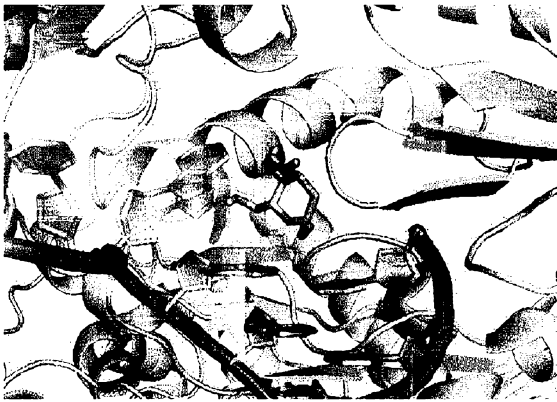
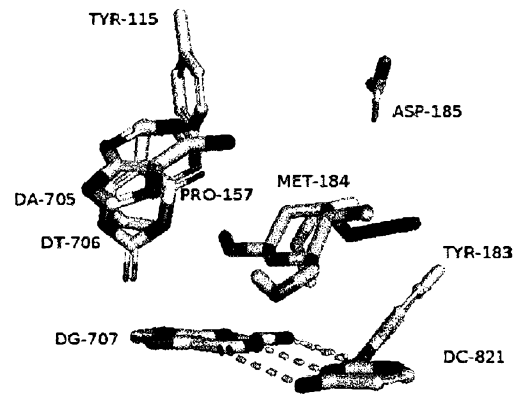


Fig. 5

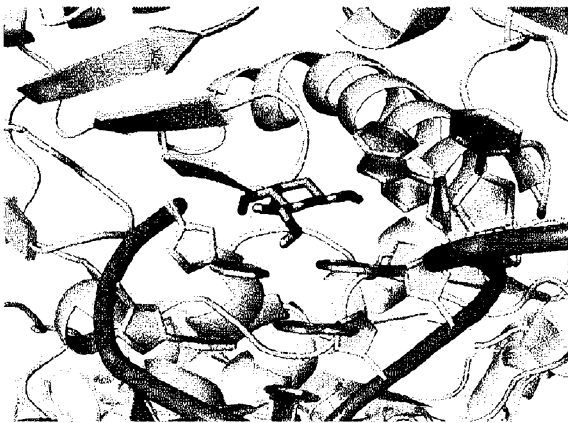
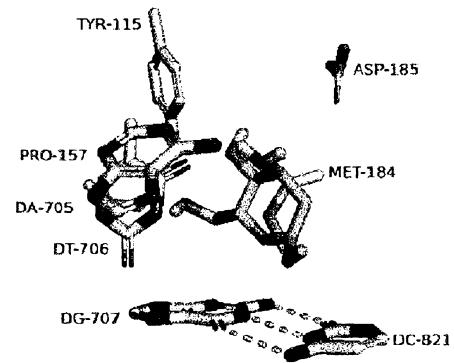
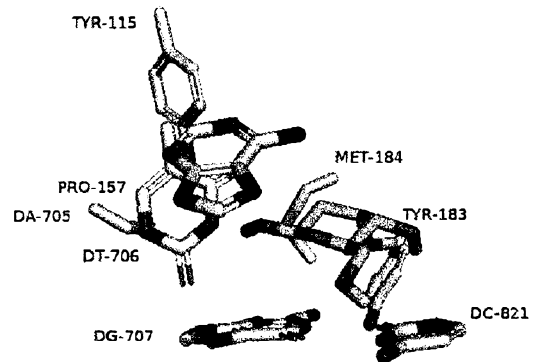


Fig. 6



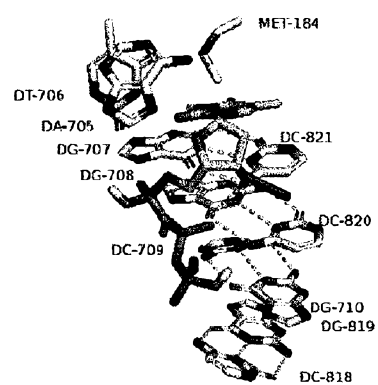


Fig. 7