



Joanna Romanowska

**„Synteza i niektóre właściwości arylo
nukleozydo fosforanów i ich analogów
jako nowych, potencjalnych
pronukleotydów anti-HIV”**

*Praca doktorska
wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Kraszewskiego
w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu*

Poznań 2009



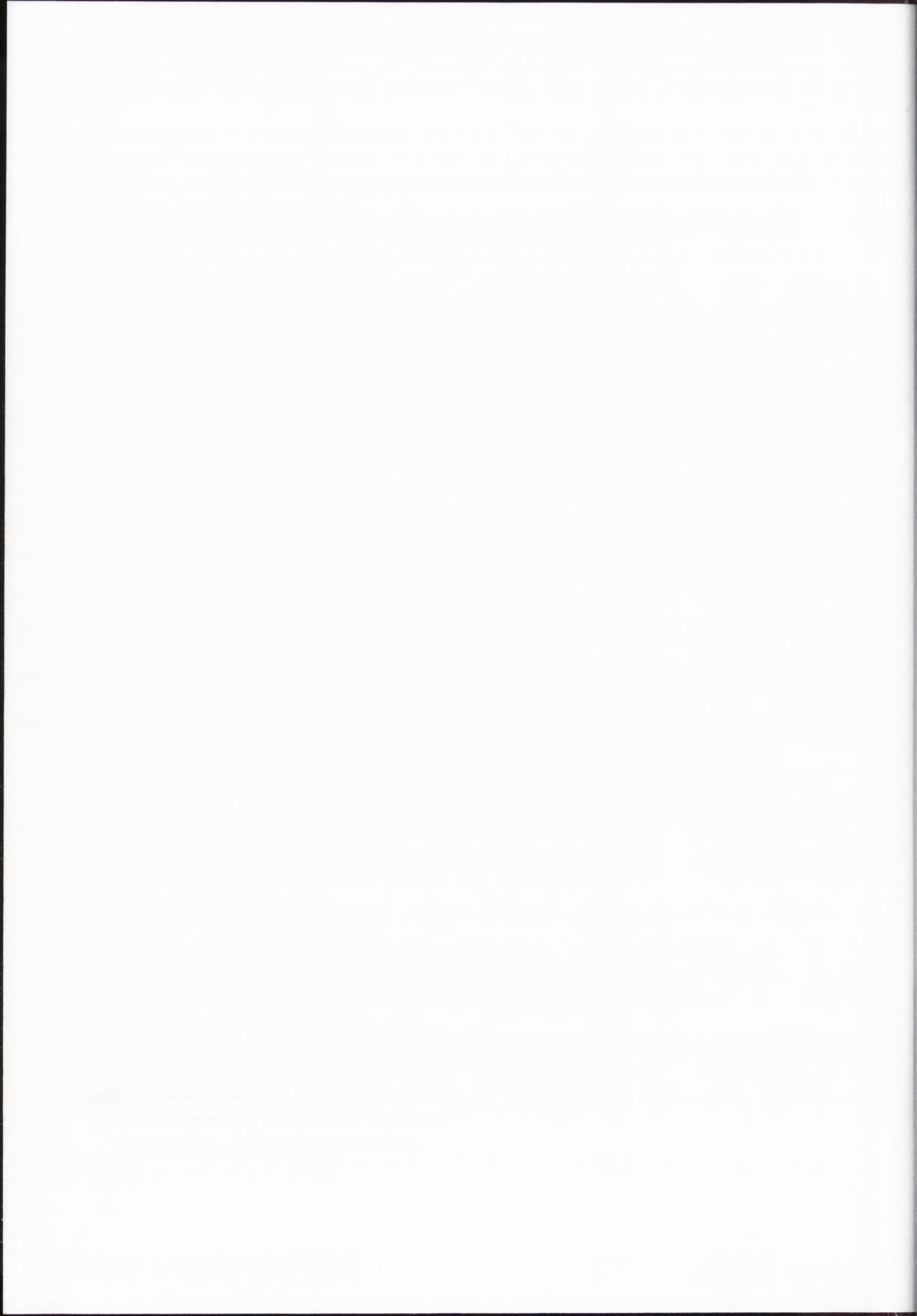
*Pracę tę dedykuję
moim Ukochanym Rodzicom i Mężowi
za cierpliwość i wsparcie jakie wykazali
w trakcie jej realizacji*



*Mojemu promotorowi,
Panu prof. dr hab. Adamowi Kraszewskiemu
za wskazanie niezwykle interesującego tematu,
kierownictwo naukowe, życzliwość i wszechstronną pomoc
w trakcie wykonywania pracy
składam serdeczne podziękowania*



*Panu prof. dr hab. Jackowi Stawińskiemu
za cenne wskazówki i dyskusje naukowe
składam serdeczne podziękowania*



*Bardzo dziękuję dr Michałowi Sobkowskiemu
za cierpliwość i nieocenioną pomoc*

*oraz całemu zespołowi Pracowni Analogów
Nukleotydów i Oligonukleotydów
i koleżankom i kolegom z IBCh PAN Poznań
za wspaniałą atmosferę współpracy*

INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań, tel. 061 852-85-03
Regon 000849327
"9"

D-167

SPIS TREŚCI

I. WPROWADZENIE	1
II. PRACE NAUKOWE OPUBLIKOWANE W TRAKCIE WYKONYWANIA NINIEJSZEJ ROZPRAWY	3
III. SKRÓTY STOSOWANE W PRACY	4
IV. WSTĘP LITERATUROWY	5
1. RETROWIRUSY I POCHODZENIE HIV	5
2. ZAKAŻENIE HIV I PRZEBIEG INFEKCJI	6
3. BUDOWA WIRUSA HIV	7
4. CYKL REPLIKACYJNY WIRUSA HIV	8
4.1. Przyłączenie i wniknięcie wirusa do komórki	9
4.2. Synteza wirusowego DNA przez odwrotną transkrypcję	10
4.3. Integracja wirusowego DNA	11
4.4. Ekspresja genów wirusa HIV i składanie wirusowych cząstek potomnych	12
5. LECZENIE	13
5.1. Inhibitory wiązania i fuzji wirusa HIV z komórką gospodarza	15
5.2. Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji wirusa HIV	17
5.3. Nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy wirusa HIV	22
5.4. Inhibitory integrazy HIV	24
5.5. Inhibitory proteazy HIV	25
5.6. Politerapia HAART (<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>)	27
5.7. Pronukleotydy	28
5.7.1. Estry fosforowe analogów nukleozydów	29
5.7.2. 2',3'-Dideoksynukleozydo fosforanotriestry z grupami fosforoestrowymi, których usuwanie inicjowane jest enzymatycznie	38
5.7.3. Dinukleozydowe fosforany	46
5.7.4. Amidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów	49
6. PODSUMOWANIE WSTĘPU LITERATUROWEGO	56
V. WYNIKI I DYSKUSJA	57
1. WPROWADZENIE	57
2. H-FOSFONIANOMONOESTRY 2',3'-DIDEOKSYNUKLEOZYDÓW	60
2.1. Synteza (9 <i>H</i> -fluoren-9-yl)ometylo H-fosfonianu	60
2.2. Synteza nukleozydo H-fosfonianomonoestrów	61
3. ARYLO NUKLEOZYDO FOSFORANODIESTRY	63
3.1. Synteza arylo nukleozydo fosforanodiestrów	64
3.2. Rozkład arylo nukleozydo fosforanodiestrów	69
4. DIARYLO NUKLEOZYDO FOSFORANOTRIESTRY	72
4.1. Synteza diarylo nukleozydo fosforanotriestrów	72
4.1.1. Klasyczna metoda fosforanotriestrowa	72
4.1.2. Metody z wykorzystaniem reakcji oksydatywnej kondensacji	74
4.2. Trwałość i ścieżki rozkładu diarylo nukleozydo fosforanotriestrów	79
4.3. Lipofilowość diarylo nukleozydo fosforanotriestrów	85
4.4. Aktywność anti-HIV i cytotoksyczność diarylo nukleozydo fosforanotriestrów - komentarz	89
5. DIARYLO DINUKLEOZYDO REZORCYNILO DIFOSFORANOTRIESTRY	91
5.1. Synteza dinukleozydowych difosforanów	91
5.2. Właściwości dinukleozydowych difosforanów	95
6. ARYLO NUKLEOZYDO AMIDOFOSFORANODIESTRY	97
VI. PODSUMOWANIE	103
VII. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	108
VIII. LITERATURA	128
IX. SUPLEMENT	136

1. THE INDEX

2. THE INDEX

3. THE INDEX

4. THE INDEX

5. THE INDEX

6. THE INDEX

7. THE INDEX

8. THE INDEX

9. THE INDEX

10. THE INDEX

11. THE INDEX

12. THE INDEX

13. THE INDEX

14. THE INDEX

15. THE INDEX

16. THE INDEX

17. THE INDEX

18. THE INDEX

19. THE INDEX

20. THE INDEX

21. THE INDEX

22. THE INDEX

23. THE INDEX

24. THE INDEX

25. THE INDEX

26. THE INDEX

27. THE INDEX

28. THE INDEX

29. THE INDEX

30. THE INDEX

31. THE INDEX

32. THE INDEX

33. THE INDEX

34. THE INDEX

35. THE INDEX

36. THE INDEX

37. THE INDEX

38. THE INDEX

39. THE INDEX

40. THE INDEX

41. THE INDEX

42. THE INDEX

43. THE INDEX

44. THE INDEX

45. THE INDEX

46. THE INDEX

47. THE INDEX

48. THE INDEX

49. THE INDEX

50. THE INDEX

51. THE INDEX

52. THE INDEX

53. THE INDEX

54. THE INDEX

55. THE INDEX

56. THE INDEX

57. THE INDEX

58. THE INDEX

59. THE INDEX

60. THE INDEX

61. THE INDEX

62. THE INDEX

63. THE INDEX

64. THE INDEX

65. THE INDEX

66. THE INDEX

67. THE INDEX

68. THE INDEX

69. THE INDEX

70. THE INDEX

71. THE INDEX

72. THE INDEX

73. THE INDEX

74. THE INDEX

75. THE INDEX

76. THE INDEX

77. THE INDEX

78. THE INDEX

79. THE INDEX

80. THE INDEX

81. THE INDEX

82. THE INDEX

83. THE INDEX

84. THE INDEX

85. THE INDEX

86. THE INDEX

87. THE INDEX

88. THE INDEX

89. THE INDEX

90. THE INDEX

91. THE INDEX

92. THE INDEX

93. THE INDEX

94. THE INDEX

95. THE INDEX

96. THE INDEX

97. THE INDEX

98. THE INDEX

99. THE INDEX

100. THE INDEX

I. WPROWADZENIE

Pojawienie się i rozpoznanie zespołu chorobowego AIDS wywołało u ludzi poczucie realnego zagrożenia trudną do opanowania epidemią, wywołaną wirusem powodującym utratę odporności immunologicznej (HIV) u człowieka. Medycyna szybko rozpoznała metody i zareagowała prewencyjnie, zapobiegając niekontrolowanym infekcjom HIV i rozprzestrzenianiu się AIDS. Pomimo tego, liczba zakażeń wirusem wolno, ale stale rośnie, i rośnie także liczba chorych z zespołem AIDS. Dotyczy to szczególnie rejonów świata, gdzie profilaktyka medyczna nie dociera, lub z innych względów nie może być stosowana.

Od początku skojarzenia zespołu AIDS z infekcją HIV rozpoczęto bardzo intensywne prace nad znalezieniem skutecznych leków, by zahamować namnażanie lub całkowicie wyeliminować HIV ze środowiska człowieka. Pierwsze stosunkowo proste i skuteczne leki, jak np. 3'-azydo-3'-deoksytymidyna (AZT, Retrovir®), wydawały się spełniać oczekiwania medycyny, by w niedalekiej perspektywie opanować, a być może zniszczyć ten „nowy” patogen. Niestety, równie szybko okazało się, że sprawa jest bardzo trudna, gdyż HIV jest wirusem niezwykle szybko mutującym. Stwierdzono, że w czasie jego szybkiej replikacji (10^5 kopii dziennie), w której bierze udział jego własna polimeraza [odwrotna transkryptaza (HIV RT)] nieposiadająca właściwości naprawczych, powstają kopie potomne zawierające mutacje, które jeśli nie są letalne, to generują nowe genotypy wirusa, o nowych właściwościach, np. wirusy lekooporne. Jest oczywiste, że te ostatnie są naturalnie wyselekcjonowane w obecności zastosowanego leku, gdyż tylko lekooporne mutanty mogą przetrwać w takim środowisku, a pozostałe ulegając działaniu leku giną. Sytuacja wygląda więc raczej mało nadziejnie, gdyż w scenariuszu pesymistycznym można zakładać, że jesteśmy skazani na HIV, bez możliwości jego definitywnej eliminacji. Scenariusz pozytywny zakłada, kontrolowanie namnażania wirusa poprzez stosowanie różnego rodzaju inhibitorów jego cyklu replikacyjnego, co ukształtowało chyba słuszny na dzień dzisiejszy pogląd, że im więcej i bardziej różnorodnych inhibitorów będziemy stosować, tym skuteczniej będziemy kontrolować propagację infekcji HIV, a tym samym będziemy mogli zapobiegać ujawnieniu się chorobowego zespołu AIDS. Jest więc zrozumiałym, że w wielu ośrodkach na świecie trwają ciągłe prace nad nowymi związkami hamującymi rozwój HIV z nadzieją, że nowe leki nadażą za naturalną zmiennością genetyczną wirusa, i że w ten sposób medycyna będzie dysponować lekami chroniącymi człowieka przed AIDS.

Dotychczas stosowane leki przeciw HIV to produkt wysiłku intelektualnego i maestrii warsztatowej chemików, biologów, mikrobiologów i lekarzy. Jednym z zadań tych ostatnich jest podpowiadanie, jakie warunki w kontekście właściwości chemicznych, fizykochemicznych

1975

The first part of the report deals with the general situation of the country in 1975. It is a year of transition, a year of change. The political system is in a state of flux, and the economy is struggling to recover from the effects of the previous year's crisis. The government is trying to stabilize the situation, but it is facing many difficulties.

In the second part, we look at the economic situation. The economy is in a state of stagnation. There is a high level of unemployment, and the inflation rate is rising. The government is trying to stimulate the economy, but it is facing many difficulties.

The third part of the report deals with the social situation. There is a high level of poverty, and the social services are inadequate. The government is trying to improve the social services, but it is facing many difficulties.

In the fourth part, we look at the political situation. The government is trying to stabilize the situation, but it is facing many difficulties. There is a high level of corruption, and the political system is in a state of flux.

The fifth part of the report deals with the international situation. The country is facing many international problems. There is a high level of foreign debt, and the country is facing many international challenges.

In the sixth part, we look at the future of the country. There are many challenges ahead, but there are also many opportunities. The government needs to take decisive action to stabilize the situation and to improve the economy and the social services.

i strukturalnych powinny spełniać nowe związki, by mogły zadziałać jako inhibitory HIV. Zadaniem chemii, oprócz oczywistego uczestnictwa w całym multidyscyplinarnym przedsięwzięciu intelektualnym, jest wyprodukowanie tych związków, możliwie szybko i tanio. To, na etapie projektowania nowych związków, wymaga wysiłku intelektualnego, sprzężonego w innymi wspomnianymi dyscyplinami nauki, a później opracowania nowych strategii, nowych metod syntezy, trików wykonawczych i całego, najlepiej najdoskonalszego aparatu syntetycznego.

Podejmując rozwiązanie problemów związanych z projektowaniem, syntezą i badaniami nowych, potencjalnych inhibitorów HIV zdawałam sobie sprawę z trudności, jakie mogą napotkać na drodze do choćby częściowego sukcesu. Jednakże, całkowicie uzasadniony „dobrowolny” przymus poszukiwania nowych związków anty-HIV, a także rysująca się perspektywa badań w obszarze analogów nukleotydów, były dla mnie wystarczającym powodem i zachętą do podjęcia badań opisanych w tej pracy doktorskiej.



**II. PRACE NAUKOWE OPUBLIKOWANE W TRAKCIE WYKONYWANIA
NINIEJSZEJ ROZPRAWY**

1. Romanowska, J.; Szymańska-Michalak, A.; Boryski, J.; Stawiński, J.; Loddo, R.; Sanna, G.; Collu, G.; Secci, B.; La Colla, P.; Kraszewski, A. „Aryl nucleoside H-phosphonates. Part 16: Synthesis and anti-HIV-1 activity of di-aryl nucleoside phosphotriesters”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, *17*(9), 3489-3498.
2. Romanowska, J.; Szymańska-Michalak, A.; Pietkiewicz, M.; Sobkowski M.; Boryski, J.; Stawiński, J.; Kraszewski, A. „A new, efficient entry to non-lipophilic H-phosphonate monoesters – preparation of anti-HIV nucleotide analogues”, *Letters in Organic Chemistry*, **2009**, *6*, w druku.

THE EFFECT OF ...

The first part of the study ...

The second part of the study ...

The third part of the study ...

The fourth part of the study ...

The fifth part of the study ...

The sixth part of the study ...

The seventh part of the study ...

The eighth part of the study ...

The ninth part of the study ...

The tenth part of the study ...

III. SKRÓTY STOSOWANE W PRACY

- Ade - adenina
- AZT - 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
- AZTDP - 5'-difosforan AZT
- AZTMP - 5'-monofosforan AZT
- AZTTP - 5'-trifosforan AZT
- B - *base* (zasada purynowa lub pirymidynowa)
- BBB - *blood brain barrier* (bariera krew- mózg)
- CC_{50} - *cytotoxic concentration* (stężenie cytotoksyczne)
- Cyt - cytozyna
- ddA - 2',3'-dideoksyadenozyna
- ddI - 2',3'-dideoksyinozyna
- ddNMP - 5'-monofosforan 2',3'-dideoksynukleozydu
- ddN - 2',3'-dideoksynukleozyd
- ddU - 2',3'-dideoksyurydyna
- d4T - 2',3'-didehydro-3'-deoksytymidyna
- DPCP - difenylochlorofosforan(V)
- EC_{50} - *effective concentration* (stężenie efektywne)
- ekw. - ekwiwalent
- FBS/FCS - *fetal bovine/calf serum* (surowica z płodów bydłych/cielęcych)
- FDA - *Food and Drug Administration* (Urząd ds. Leków i Żywności)
- FluMe - (9H-fluoren-9-ylo)metyl
- HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* (wysokosprawna chromatografia cieczowa)
- HRMS - *High Resolution Mass Spektrometry* (wysokorozdzielcza chromatografia masowa)
- IN - integraza
- NDP - 5'-difosforan nukleozydu
- N-MeIm - N-metyloimidazol
- NMP - 5'-monofosforan nukleozydu
- NNRTI - *non - nucleoside inhibitors of reverse transcriptase* (nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy)
- NRTI - *nucleoside inhibitors of reverse transcriptase* (nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy)
- NTP - 5'-trifosforan nukleozydu
- PR - proteaza
- PvCl - chlorek piwaloilu (chlorek trimetyloacetylu)
- Py - pirydyna
- RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institut*
- RT - *reverse transcriptase* (odwrotna transkryptaza)
- SI - *selectivity index* (indeks selektywności)
- $t_{1/2}$ - czas połowicznego rozkładu
- T - tymidyna
- Thy - tymina
- TMP - 5'-monofosforan tymidyny
- TO3'-Ac - 3'-acetylo-3'-deoksytymidyna
- TTP - 5'-trifosforan tymidyny
- TPSCI - chlorek 2,4,6-triizopropylobenzenosulfonowy

RESOLUTIONS OF THE SENATE

1	1977-1978
2	1978-1979
3	1979-1980
4	1980-1981
5	1981-1982
6	1982-1983
7	1983-1984
8	1984-1985
9	1985-1986
10	1986-1987
11	1987-1988
12	1988-1989
13	1989-1990
14	1990-1991
15	1991-1992
16	1992-1993
17	1993-1994
18	1994-1995
19	1995-1996
20	1996-1997
21	1997-1998
22	1998-1999
23	1999-2000
24	2000-2001
25	2001-2002
26	2002-2003
27	2003-2004
28	2004-2005
29	2005-2006
30	2006-2007
31	2007-2008
32	2008-2009
33	2009-2010
34	2010-2011
35	2011-2012
36	2012-2013
37	2013-2014
38	2014-2015
39	2015-2016
40	2016-2017
41	2017-2018
42	2018-2019
43	2019-2020
44	2020-2021
45	2021-2022
46	2022-2023
47	2023-2024
48	2024-2025
49	2025-2026
50	2026-2027
51	2027-2028
52	2028-2029
53	2029-2030
54	2030-2031
55	2031-2032
56	2032-2033
57	2033-2034
58	2034-2035
59	2035-2036
60	2036-2037
61	2037-2038
62	2038-2039
63	2039-2040
64	2040-2041
65	2041-2042
66	2042-2043
67	2043-2044
68	2044-2045
69	2045-2046
70	2046-2047
71	2047-2048
72	2048-2049
73	2049-2050
74	2050-2051
75	2051-2052
76	2052-2053
77	2053-2054
78	2054-2055
79	2055-2056
80	2056-2057
81	2057-2058
82	2058-2059
83	2059-2060
84	2060-2061
85	2061-2062
86	2062-2063
87	2063-2064
88	2064-2065
89	2065-2066
90	2066-2067
91	2067-2068
92	2068-2069
93	2069-2070
94	2070-2071
95	2071-2072
96	2072-2073
97	2073-2074
98	2074-2075
99	2075-2076
100	2076-2077

IV. WSTĘP LITERATUROWY

1. RETROWIRUSY I POCHODZENIE HIV

Retrowirusy są jednym z najbardziej intensywnie badanych czynników zakaźnych. Wywołują one wiele chorób u ptaków oraz ssaków, w tym także u naczelnych.¹ Mimo ogromnego zróżnicowania retrowirusy wykazują kilka cech wspólnych ze względu na budowę czy materiał genetyczny (RNA o dodatniej polarności, co oznacza, że wirionowy RNA może bezpośrednio pełnić funkcje mRNA).² Ponadto dzięki unikalnemu procesowi odwrotnej transkrypcji wirusy te mają zdolność przepisania informacji genetycznej, zawartej w RNA, na dwuniciowy DNA, który integruje się z genomem gospodarza i służy jako matryca do replikacji RNA wirusa. Inną cechą wyróżniającą retrowirusy jest ich ogromna zmienność genetyczna, powodowana zjawiskiem rekombinacji w trakcie replikacji.¹ Cecha ta bardzo utrudnia lub uniemożliwia skuteczną walkę z większością retowirusów.

W 1978 r. Robert Gallo, z Narodowego Instytutu Zdrowia w USA, wyizolował retrowirusa z limfocytów pacjenta chorego na białaczkę.³ Wcześniej także Japończycy znaleźli u chorego na białaczkę retrowirusa, którego późniejsza analiza sekwencji nukleotydów wykazała, że był on identyczny z izolatem Gallo.⁴ Taki splot przypadków nasunął epidemiologom podejrzenie etiologii zakaźnej, a odkryty retrowirus nazwano ludzkim wirusem białaczki z komórek T typu I (HTLV-I – ang. *human T-cell leukemia virus type I*). Drugi z tej serii wirus, HTLV-II, wyizolowano w Seattle (USA) z komórek pacjenta chorego na rzadką białaczkę kosmatokomórkową⁵, lecz jak dotąd niewiele wiadomo na jego temat. W 1981 r. zdiagnozowano nową jednostkę chorobową, charakteryzującą się głębokim upośledzeniem odporności i nazwaną zespołem nabytego upośledzenia odporności (AIDS – ang. *acquired immunodeficiency syndrome*). Choroba rozwijała się u pacjentów zakażonych niezidentyfikowanym retrowirusem i ustalono, że do zakażenia może dojść poprzez kontakt z krwią chorego.² Wirusy wywołujące AIDS zostały wyizolowane niezależnie w kilku laboratoriach. Pierwszy, przez L. Montagniera i F. Barré-Sinoussi w Instytucie Pasteura w Paryżu (1983 r.), otrzymał nazwę LAV (ang. *lymphadenopathy-associated virus*).⁶ Rok później Gallo i współpracownicy opisali izolację retrowirusa z limfocytów krwi obwodowej pacjentów z AIDS i nazwali go HTLV-III (ang. *human T-lymphotropic virus type III*).⁷ Analiza sekwencji obydwu wirusów ukazała, że ich genomy są prawie identyczne. W 1985 r. z azjatyckich makaków wyizolowano wirusa wywołującego chorobę o objawach bardzo podobnych do AIDS. Ze względu na jego duże podobieństwo do HTLV-III, wirus otrzymał nazwę STLV-III (ang. *simian T-lymphotropic virus type III*).⁸ Czwarty ludzki wirus, HIV-2,

THE HISTORY OF THE ...

THE HISTORY OF THE ...

History is the study of the past, and its purpose is to provide a better understanding of the present and the future. It is a discipline that has evolved over time, from a simple record of events to a complex analysis of human behavior and society. The study of history allows us to see the patterns of human development and to learn from the mistakes of the past. It is a field that is constantly growing and changing, as new discoveries and interpretations are made. The history of the world is a long and complex one, and it is the task of the historian to piece together the fragments of the past and to present them in a clear and coherent way. This is a challenging task, but it is one that is essential to our understanding of ourselves and the world around us.

The history of the world is a long and complex one, and it is the task of the historian to piece together the fragments of the past and to present them in a clear and coherent way. This is a challenging task, but it is one that is essential to our understanding of ourselves and the world around us. The study of history allows us to see the patterns of human development and to learn from the mistakes of the past. It is a field that is constantly growing and changing, as new discoveries and interpretations are made. The history of the world is a long and complex one, and it is the task of the historian to piece together the fragments of the past and to present them in a clear and coherent way. This is a challenging task, but it is one that is essential to our understanding of ourselves and the world around us.

The history of the world is a long and complex one, and it is the task of the historian to piece together the fragments of the past and to present them in a clear and coherent way. This is a challenging task, but it is one that is essential to our understanding of ourselves and the world around us. The study of history allows us to see the patterns of human development and to learn from the mistakes of the past. It is a field that is constantly growing and changing, as new discoveries and interpretations are made. The history of the world is a long and complex one, and it is the task of the historian to piece together the fragments of the past and to present them in a clear and coherent way. This is a challenging task, but it is one that is essential to our understanding of ourselves and the world around us.

The history of the world is a long and complex one, and it is the task of the historian to piece together the fragments of the past and to present them in a clear and coherent way. This is a challenging task, but it is one that is essential to our understanding of ourselves and the world around us.

wyzolowany został od pacjentów z niedoborami immunologicznymi zamieszkujących Afrykę zachodnią.²

Na podstawie badań genetycznych ustalono, że zarówno ludzkie, jak i małpie wirusy wywołujące AIDS, można zakwalifikować do rodzaju *Lentivirus* (lentiwirusy) z rodziny *Retroviridae* (retrowirusy).¹ Opisane wirusy otrzymały odpowiednio nazwy: ludzki wirus upośledzenia odporności (HIV – ang. *human immunodeficiency virus*) oraz małpi wirus upośledzenia odporności (SIV – ang. *simian immunodeficiency virus*).⁹ Znane dotychczas dwa typy ludzkich wirusów HIV-1 i HIV-2 powodują AIDS. HIV-1 jest zdecydowanie bardziej rozpowszechniony i występuje na wszystkich kontynentach. Z kolei HIV-2 rozprzestrzenił się głównie w Afryce zachodniej.¹⁰ Obydwa wirusy charakteryzuje ogromna różnorodność wewnątrzgatunkowa, ponadto różnią się między sobą organizacją genomu i pochodzeniem.¹¹

Zakłada się, że człowiek nie jest pierwotnym gospodarzem HIV, a przodek HIV prawdopodobnie przekroczył barierę międzygatunkową na początku ubiegłego wieku. Uważa się, że HIV pochodzi od SIV, który infekuje małpy naczelne zamieszkujące Afrykę.¹² Sprawa pochodzenia HIV-II wydaje się być oczywista, ze względu na znaczne podobieństwo strukturalne genomów HIV-II i SIVsm (szczep infekujący małpę szarą) i fakt, że oba infekują małpy i ludzi zamieszkujących tę samą strefę geograficzną.¹⁰ Natomiast w przypadku pochodzenia HIV-I, istnieje bardzo wiele wątpliwości. Jak dotąd nie wiadomo gdzie, kiedy i w jaki sposób doszło do pierwszych zakażeń HIV-I. Przypuszczalnie lentiwirusy infekują naczelne od setek tysięcy lat ale do zróżnicowania genetycznego SIV doszło całkiem niedawno. Większość małp zamieszkujących kontynent afrykański jest nosicielami SIV, choć nie obserwuje się u nich żadnych objawów chorobowych. Jednak, kiedy tylko wirus przekroczy barierę międzygatunkową, infekcja nowego gospodarza może zapoczątkować epidemię. Hipotez tłumaczących wybuch epidemii AIDS jest kilka, jednakże najczęściej postuluje się, że SIV przekroczył barierę międzygatunkową poprzez kontakt człowieka z zakażoną krwią małp.¹¹ Prosta niewiedza, a później brak dostatecznej świadomości społecznej, co do sposobu przenoszenia się i patogenności wirusa, używanie niesterylnych igieł i masowe transfuzje zakażonej krwi, doprowadziły do zakażenia setek tysięcy ludzi na świecie.

2. ZAKAŻENIE HIV I PRZEBIEG INFEKCJI

HIV-1 dostaje się do organizmu z zakażoną krwią. Wirus ten jest silnie cytopatyczny, powoduje zlewanie się komórek, tworząc ogromne syncytia, co prowadzi do śmierci komórki. Występująca na powierzchni zakażonej komórki glikoproteina wirusowa może połączyć się z receptorami CD4 przylegających zdrowych komórek i w ten sposób rozprzestrzeniać zakażenie. HIV niszczy i upośledza funkcje limfocytów T pomocniczych.¹³ W następnej

The first part of the paper discusses the importance of the study. It highlights the need for a comprehensive understanding of the subject matter. The authors emphasize that this research is crucial for advancing the field and addressing the current challenges. They also mention the scope of the study and the methods used to collect and analyze the data.

The second part of the paper presents the results of the study. The authors provide a detailed analysis of the data, showing the trends and patterns observed. They discuss the implications of these findings and how they relate to the research objectives. The results are presented in a clear and concise manner, supported by relevant statistics and figures.

The third part of the paper discusses the conclusions and future research. The authors summarize the key findings of the study and provide recommendations for further research. They also discuss the limitations of the study and the potential for future work in this area. The conclusions are based on the evidence presented throughout the paper.

The final part of the paper is a reference list, which includes all the sources cited in the text. The references are listed in alphabetical order and provide a comprehensive overview of the literature related to the study. This section is essential for readers who want to explore the topic further and verify the information presented in the paper.

kolejności zaburzeniu ulegają funkcje limfocytów B, wytwarzających przeciwciała tylko we współpracy z limfocytami T.¹⁴ Zniszczenie limfocytów T pomocniczych mocno osłabia naturalną odpowiedź immunologiczną. Pojawiają się zakażenia wywołane przez drobnoustroje oportunistyczne, w zdrowym organizmie normalnie zwalczane, wobec których zakażony organizm staje się bezbronny.¹⁵ Wirus atakuje także makrofagi, które mogą pełnić rolę rezerwuaru wirusa. Przyjmuje się również, że wirus może także infekować i replikować się w komórkach dendrytycznych, co prowadzi do zniszczenia komórek mózgu i pojawienia się zaburzeń neurologicznych.¹⁶

Nieleczona infekcja HIV rozwija się stosunkowo wolno, prowadząc ostatecznie do śmierci chorego po 10-15 latach.¹⁷ Po około 2 tygodniach od zakażenia rozwija się infekcja pierwotna, której grypopodobne objawy utrzymują się średnio od 2 do 6 tygodni, a następnie ustępują samoistnie. Proces chorobowy ucisza się i rozpoczyna się okres bezobjawowego przewlekłego zakażenia HIV, który trwa około 8-10 lat. W tym czasie wirus prowadzi do stopniowego wyniszczenia układu immunologicznego chorego. Skutkiem zaburzenia tej funkcji są zakażenia oportunistyczne, choroby nowotworowe, neurologiczne i psychiczne, rozwija się pełnoobjawowy AIDS, którego zwiastunem są zwykle pleśniawki i półpasiec.^{2,11} Innym, bardzo charakterystycznym objawem AIDS jest mięsak Kaposiego, nowotwór objawiający się zmianami skórnymi w różnych miejscach na skórze i błonach śluzowych.¹⁸

Pierwszej fazie, po zakażeniu HIV, towarzyszy znaczna wiremia, wysokie stężenia HIV RNA w surowicy oraz drastyczny spadek limfocytów T CD4. Szybkość, z jaką dochodzi do spadku liczby limfocytów CD4 zależy od poziomu wiremii, a obniżanie się ich liczby jest szybsze w późniejszym stadium choroby. Wraz z ustąpieniem objawów klinicznych ostrej fazy zakażenia, stwierdza się redukcję wiremii, wynikającą z odpowiedzi układu immunologicznego chorego, wskutek działania limfocytów T cytotoksycznych. Również bardzo wysokie stężenie HIV RNA w okresie ostrej fazy choroby ulega obniżeniu i utrzymuje się przez lata na nieco niższym poziomie. Jednak wraz z trwaniem zakażenia, poziom HIV RNA wzrasta ponownie, liczba limfocytów T CD4 spada, osiągając w końcowych stadiach choroby wartość poniżej 200 komórek/mm³. Od tego momentu średni maksymalny czas przeżycia pacjentów wynosi 3 lata.¹¹

3. BUDOWA WIRUSA HIV

Wirion HIV ma kształt sferyczny o średnicy ok. 110 nm. Złożony jest z białkowo-lipidowej otoczki i stożkowatego nukleokapsydu, w którego wnętrzu znajdują się dwie identyczne lub prawie identyczne genomowe cząsteczki (+)RNA o długości ok. 10 000 nukleotydów² (Rysunek 1).

...the research on intimate partner violence (IPV) has been largely limited to the study of physical and psychological consequences of IPV. However, recent research has begun to explore the role of IPV in the development of personality disorders (PDs). This research suggests that IPV may be associated with the development of PDs, particularly borderline personality disorder (BPD). The current study aims to explore the relationship between IPV and BPD symptoms.

The current study was a cross-sectional study of 200 women who had experienced IPV. The women were recruited from a community-based sample. The study used a validated measure of IPV (the Conflict Tactics Scales) and a validated measure of BPD symptoms (the Inventory of Women's Experiences of Abuse). The results of the study showed that women who had experienced IPV were more likely to have BPD symptoms than women who had not experienced IPV. This relationship was found to be significant after controlling for age, education, and socioeconomic status.

The findings of this study suggest that IPV is associated with BPD symptoms. This relationship may be due to the fact that IPV is a traumatic experience that can lead to the development of BPD. The current study has several limitations. First, it was a cross-sectional study, so it cannot establish a causal relationship between IPV and BPD symptoms. Second, the study used a community-based sample, so the results may not be generalizable to all women. Finally, the study did not control for other factors that may be associated with both IPV and BPD symptoms, such as childhood trauma.

REFERENCES

American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). Washington, DC: Author.

Briere, J., & Runtz, M. (1987). *Journal of Interpersonal Violence, 2*(1), 6-14.

Carroll, J. M., & Nuro, M. (2002). *Journal of Interpersonal Violence, 17*(1), 10-18.

Carroll, J. M., & Runtz, M. (1987). *Journal of Interpersonal Violence, 2*(1), 15-23.

Genom wirusa HIV zawiera trzy geny strukturalne *gag*, *pol* i *env*, których produktami są prekursorowe poliproteiny, dające liczne białka wirusowe. Dodatkowo można wyróżnić geny regulacyjne *tat* i *rev*, kodujące białka niezbędne do replikacji wirusa. W odróżnieniu od onkogennych wirusów w tej rodzinie, HIV nie zawiera genu *onc*. Posiada jednak w swym genomie tzw. geny dodatkowe lub pomocnicze, *vif*, *vpr*, *vpu* i *nef*.¹¹ Materiał genetyczny HIV, w formie dwuniciowego DNA, powstaje w procesie odwrotnej transkrypcji i jest dłuższy od genomowego RNA o dwa fragmenty powtórzeń terminalnych (ang. *long terminal repeat*, LTR).^{2, 20}

Dominującą formą białka kodowanego przez gen *env* jest glikoproteina gp160. W wyniku jej proteolizy powstają dwie podjednostki: gp120, nazwana inaczej SU, oraz gp41, (TM). Białka SU i TM zakotwiczone są w zewnętrznej otoczce osłaniającej nukleokapsyd. Białko SU jest hydrofilowe, zajmuje zewnętrzną powierzchnię błony wirionu i zawiera domenę rozpoznającą i wiążącą receptory CD4 limfocytów T pomocniczych (ang. *T-helper lymphocytes*). Transbłonowe białko TM jest hydrofobowe i zakotwicza wypustki w otoczce wirusowej. Jego funkcja związana jest z udziałem w fuzji błon.²⁰

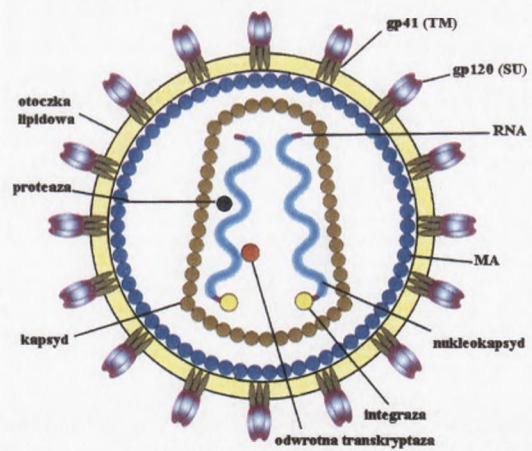
Błona otaczająca HIV-1 jest pochodzenia komórkowego, choć różni się ona znacząco od błony nieinfekowanych komórek gospodarza zawartością cholesterolu i fosfolipidów.¹¹

Kapsyd wirusa HIV zbudowany jest z białek będącymi produktami genu *gag*. W wyniku ekspresji tego genu powstaje poliproteina Pr55^{gag} dająca początek białkom: MA (ang. *matrix protein*), CA (ang. *capsid protein*) i NC (ang. *nucleocapsid protein*).

Gen *pol* koduje poliproteinę Pr60^{gag-pol}, prekursor wirusowych enzymów: proteazy (ang. *protease*, PR), odwrotnej transkryptazy (ang. *reverse transcriptase*, RT), oraz integrazy (ang. *integrase*, IN), zlokalizowanych wewnątrz nukleokapsydu. Białka te odgrywają kluczową rolę w prawidłowym przebiegu cyklu replikacyjnego wirusa HIV.²⁰

4. CYKL REPLIKACYJNY WIRUSA HIV

Cykl replikacyjny wirusa HIV podzielony jest na dwie fazy, wczesną i późną, a każda z nich obejmuje kilka etapów. Przebiega on zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze komórkowym zakażonej komórki i jest warunkowany przez specyficzne interakcje białek wirusa z białkami gospodarza. Poznanie mechanizmów molekularnych poszczególnych etapów cyklu życiowego



Rysunek 1. Budowa wirionu HIV-1¹⁹



The first part of the report is devoted to a general description of the project and its objectives. It is followed by a detailed account of the methods used in the study, and a discussion of the results obtained. The final section contains conclusions and suggestions for further work.

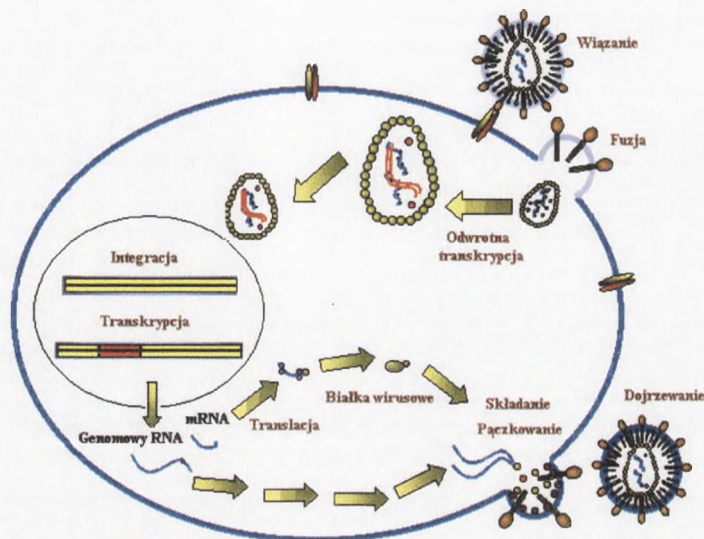
It is hoped that this report will be of interest to all those concerned with the study of the subject.

The following table shows the results of the experiments conducted under various conditions. It is seen that the rate of reaction increases with increasing temperature, and also with increasing concentration of the reactants. The effect of the catalyst is also clearly shown, as the rate of reaction is greatly increased in its presence.

The results of the experiments conducted under various conditions are shown in the following table. It is seen that the rate of reaction increases with increasing temperature, and also with increasing concentration of the reactants. The effect of the catalyst is also clearly shown, as the rate of reaction is greatly increased in its presence.

The following table shows the results of the experiments conducted under various conditions. It is seen that the rate of reaction increases with increasing temperature, and also with increasing concentration of the reactants. The effect of the catalyst is also clearly shown, as the rate of reaction is greatly increased in its presence.

wirusa HIV, pozwala uzyskać informacje pomocne w projektowaniu nowych leków przeciwko HIV. Kluczowe dla replikacji HIV etapy – przyłączenie i wniknięcie do komórki, odwrotna transkrypcja, integracja, ekspresja materiału genetycznego oraz składanie cząstek wirusowych, stanowią bowiem potencjalne cele dla terapii antywirusowej (Rysunek 2).



Rysunek 2. Replikacja HIV

4.1. Przyłączenie i wniknięcie wirusa do komórki

Wirus HIV infekuje głównie komórki układu odpornościowego, czyli limfocyty T pomocnicze i makrofagi. Obecność wirusa zaobserwowano jednak również w komórkach mikrogleju oraz w komórkach endotelium mózgu. Szczepy HIV o tropizmie do makrofagów, namnażają się w makrofagach i limfocytach T wykorzystując receptor CCR5. Ten typ wirusa, nazwany R5, występuje we wszystkich szczepach pierwotnych HIV i jest najczęściej przekazywany między ludźmi, stąd jego obecność jest wykrywana we wczesnej fazie zakażenia. Szczepy HIV o tropizmie do limfocytów T, replikują się w tych komórkach wykorzystując jako koreceptor, receptor CXCR4. Ten typ wirusa nazwano X4, i jest on odpowiedzialny za tworzenie się ogromnych syncytiów zakażonych komórek.^{21,22}

Faza wczesna cyklu replikacyjnego wirusa HIV rozpoczyna się, gdy infekujące wiriony HIV wiążą się do specyficznych receptorów CD4 na powierzchni komórek gospodarza. HIV wiąże się do receptorów CD4 poprzez glikoproteinę gp120, która zawiera domenę rozpoznającą i wiążącą receptory CD4. Skutkiem tego wiązania są zmiany konformacyjne glikoproteiny w obrębie gp41, w wyniku których dochodzi do interakcji z koreceptorem (CCR5 lub CXCR4) i zbliżenia się błon obu komórek, ułatwiającego wniknięcie wirusa.²³ Wirus łatwo pokonuje barierę, jaką jest błona komórkowa, na drodze fuzji otoczki z błoną gospodarza. W przypadku

The following information was obtained from the records of the...
The patient's condition was stable during the hospital stay...



These findings are consistent with the clinical picture...

Discussion

The present study has demonstrated that the use of...
The results of this study are similar to those reported by...
It is suggested that further studies be conducted...

In conclusion, the findings of this study support the...
The authors thank the staff of the hospital for their...
This study was supported by a grant from the National...
The authors have no conflicts of interest.

makrofagów, wniknięcie nukleokapsydu do cytoplazmy, może zachodzić także na drodze endocytozy.²⁴ Gdy HIV znajdzie się w cytozolu, zainicjowany zostaje proces replikacji jego genomu.

4.2. Synteza wirusowego DNA przez odwrotną transkrypcję

Kluczowym etapem cyklu życiowego wirusa HIV jest odwrotna transkrypcja, podczas której dochodzi do przepisania jednoniciowego RNA na dwuniciowy DNA.²⁵ Do inicjacji syntezy, odwrotna transkryptaza wykorzystuje starter zaopatrzony w wolny koniec 3'OH, którym w przypadku HIV jest tRNA^{Lys3}, pochodzący z komórki gospodarza i tworzący specyficzny kompleks z genomowym RNA wirusa. tRNA^{Lys3} przyłącza się do miejsca wiążącego starter PBS (ang. *primer binding site*). Po rozpoznaniu kompleksu, odwrotna transkryptaza rozpoczyna syntezę DNA(-) przez wydłużanie końca 3' startera w kierunku 5' matrycowej cząsteczki wirusowego RNA. W ten sposób powstaje heterodupleks, RNA matrycowy-DNA potomny. Gdy odwrotna transkryptaza osiągnie koniec 5' genomowego RNA, powstaje pierwszy produkt pośredni syntezy DNA, (-)s-sDNA (ang. *strong stop DNA*), komplementarny do rejonu U5 i R na 5' końcu genomowego RNA. Na tym etapie włącza się aktywność RNazy H, degradującej RNA w heterodupleksie RNA-DNA, co powoduje odszczepienie się (-)s-sDNA od rejonu R.²⁰

Przez homologię rejonów R na obu końcach wirusowego RNA, (-)s-sDNA może przyłączyć się do komplementarnego rejonu R na 3' końcu genomowego RNA, uruchamiając dalszą syntezę (-)DNA na matrycy RNA. Etap ten określany jest jako pierwszy przeskok rekombinacyjny, a ze względu na obecność w wirionie dwóch identycznych cząsteczek RNA, proces ten może mieć charakter między- lub wewnątrzcząsteczkowy.²⁶

Starterami do syntezy nici (+)DNA są rejonu bogate w puryny, tzw. PPT (ang. *polypurine track*), w pobliżu rejonu 3'LTR i cPPT (ang. *central polypurine track*), które są odporne na hydrolizę przez RNazę H. Synteza (+)DNA trwa do momentu, gdy odwrotna transkryptaza osiągnie koniec 5' (-)DNA. Z miejscem tym związany jest starter tRNA^{Lys3}, posiadający sygnał terminacji syntezy (+)DNA, którym najczęściej jest metylowana adenozyne. Powstającym produktem pośrednim tego procesu jest (+)s-sDNA.

W kolejnym etapie RNaza H usuwa tRNA^{Lys3} oraz miejsca bogate w puryny.^{27,28} Do kontynuacji syntezy nici (+)DNA wymagany jest drugi przeskok rekombinacyjny, w którym następuje przeniesienie (+)s-sDNA na 3' koniec (-)DNA, gdzie ulega przyłączeniu dzięki komplementarności zasad w rejonie PBS. Proces ten ma charakter wewnątrzcząsteczkowy²⁶ i generuje kolisty homodimer DNA-DNA. Na tym etapie powstają długie powtórzenia terminalne (na 3' i 5' końcu odpowiednio 3'LTR i 5'LTR), gdyż koniec 5' nici (+) służy jako

The first step in the synthesis of the poly(amide-imine) was the reaction of the diamine with the dianhydride in the presence of a catalyst. The reaction was carried out in a dry, inert solvent at a temperature of 120°C for 24 hours. The resulting poly(amide-imine) was then purified by reprecipitation from a concentrated sulfuric acid solution into methanol.

3.1. Synthesis of poly(amide-imine)s

The poly(amide-imine)s were synthesized by the reaction of the diamine with the dianhydride in the presence of a catalyst. The reaction was carried out in a dry, inert solvent at a temperature of 120°C for 24 hours. The resulting poly(amide-imine) was then purified by reprecipitation from a concentrated sulfuric acid solution into methanol.

The poly(amide-imine)s were synthesized by the reaction of the diamine with the dianhydride in the presence of a catalyst. The reaction was carried out in a dry, inert solvent at a temperature of 120°C for 24 hours. The resulting poly(amide-imine) was then purified by reprecipitation from a concentrated sulfuric acid solution into methanol.

The poly(amide-imine)s were synthesized by the reaction of the diamine with the dianhydride in the presence of a catalyst. The reaction was carried out in a dry, inert solvent at a temperature of 120°C for 24 hours. The resulting poly(amide-imine) was then purified by reprecipitation from a concentrated sulfuric acid solution into methanol.

The poly(amide-imine)s were synthesized by the reaction of the diamine with the dianhydride in the presence of a catalyst. The reaction was carried out in a dry, inert solvent at a temperature of 120°C for 24 hours. The resulting poly(amide-imine) was then purified by reprecipitation from a concentrated sulfuric acid solution into methanol.

The poly(amide-imine)s were synthesized by the reaction of the diamine with the dianhydride in the presence of a catalyst. The reaction was carried out in a dry, inert solvent at a temperature of 120°C for 24 hours. The resulting poly(amide-imine) was then purified by reprecipitation from a concentrated sulfuric acid solution into methanol.

The poly(amide-imine)s were synthesized by the reaction of the diamine with the dianhydride in the presence of a catalyst. The reaction was carried out in a dry, inert solvent at a temperature of 120°C for 24 hours. The resulting poly(amide-imine) was then purified by reprecipitation from a concentrated sulfuric acid solution into methanol.

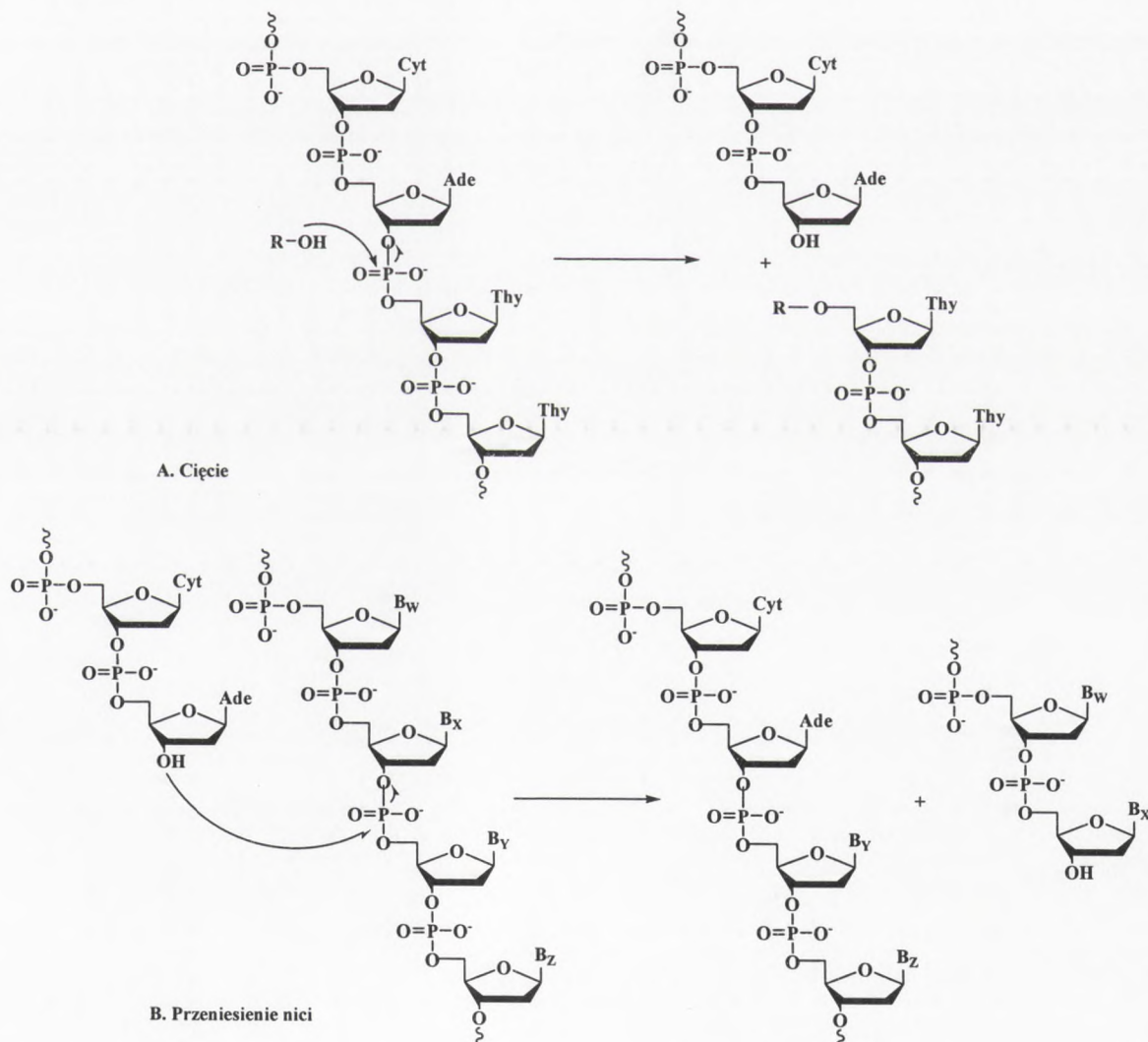
The poly(amide-imine)s were synthesized by the reaction of the diamine with the dianhydride in the presence of a catalyst. The reaction was carried out in a dry, inert solvent at a temperature of 120°C for 24 hours. The resulting poly(amide-imine) was then purified by reprecipitation from a concentrated sulfuric acid solution into methanol.

The poly(amide-imine)s were synthesized by the reaction of the diamine with the dianhydride in the presence of a catalyst. The reaction was carried out in a dry, inert solvent at a temperature of 120°C for 24 hours. The resulting poly(amide-imine) was then purified by reprecipitation from a concentrated sulfuric acid solution into methanol.

matryca do ukończenia nici (-), a koniec 5' nici (-) jest matrycą do ukończenia nici (+). Terminacja syntezy nici (+)DNA następuje w obrębie rejonu CTS (ang. *central termination signal*), znajdującego się poniżej miejsca cPPT. Około 100 nukleotydów pomiędzy rejonem cPPT i CTP musi ulec przesunięciom w parowaniu zasad, aby ostatecznie utworzyć dwuniciowy heliakalny DNA, zaopatrzone w jednakowe końce LTR zawierające sekwencje sygnałowe dla kolejnych etapów replikacji HIV.²⁰

4.3. Integracja wirusowego DNA

W kolejnym etapie cyklu, produkt odwrotnej transkrypcji - liniowy dsDNA wraz z białkami matriksowymi (MA) oraz integrazą (IN), tworzące kompleks preintegracyjny, zostają przeniesione do jądra zainfekowanej komórki, gdzie wirusowy DNA ulega integracji z genomem gospodarza.^{20,29}



Schemat 1. Mechanizm cięcia i przeniesienia nici za pośrednictwem integrazy (IN) HIV

The authors are indebted to the National Science Foundation for the support of this work. The authors also wish to thank Dr. J. H. Duerksen for his helpful discussions during the course of this work.

References

1. J. H. Duerksen, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **10**, 1085 (1972).
2. J. H. Duerksen, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **11**, 1085 (1973).
3. J. H. Duerksen, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **12**, 1085 (1974).
4. J. H. Duerksen, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **13**, 1085 (1975).
5. J. H. Duerksen, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **14**, 1085 (1976).



Figure 1. Polymerization of a monomer with a functional group.

Dzięki aktywności endonukleolitycznej, integraza rozpoznaje specyficzne sekwencje na końcach LTR i odcina dwa nukleotydy na końcach 3' każdej z nici dsDNA (etap cięcia). Jednocześnie wirusowy DNA przyłącza się do DNA gospodarza w tzw. etapie przeniesienia nici (ang. *strand transfer*, ST)¹. Przyłączenie to następuje w reakcji transestryfikacji, w której wolne grupy 3'-OH wirusowego DNA atakują centrum fosforowe wiązania internukleotydowego komórkowego DNA (Schemat 1).³⁰

Na skutek przyłączenia się retrowirusowego DNA, nici DNA gospodarza zostają tak przecięte, że powstają lepkie końce 5' o długości 4-6 nukleotydów. W tym momencie uruchamia się system naprawczy komórkowego DNA, który wypełnia powstałe przerwy, a po przycięciu wystających końców 5' wirusowego DNA, obie cząsteczki są połączone. Na skutek integracji, w miejscu włączenia DNA retrowirusowego, generowane są podwójne sekwencje flankujące DNA gospodarza, o długości 4-6 nukleotydów.^{1,31}

W wyniku integracji HIV staje się prowirusem, co oznacza, że jego materiał genetyczny jest powielany z DNA komórkowym.³²

4.4. Ekspresja genów wirusa HIV i składanie wirusowych cząstek potomnych

Faza późna cyklu replikacyjnego wirusa HIV rozpoczyna się od transkrypcji prowirusowego DNA. Ekspresja genów wirusowych jest złożonym procesem wymagającym udziału zarówno białek wirusowych jak i białek gospodarza. Transkrypcja prowirusowego DNA zachodzi w jądrze z udziałem komórkowej polimerazy II. Rozpoznaje ona sekwencję promotorową w regionie U3 przy końcu 5'LTR. Transkrypty RNA są poliadenylowane i mogą ulec splicingowi, po czym transportowane są do cytoplazmy. Początkowo syntetyzowane są tzw. białka „wczesne”, Tat, Rev i Naf, które pełnią funkcje regulatorowe i umożliwiają powstanie genomowego RNA oraz pozostałych białek (tzw. „późnych”). RNA, które nie uległy splicingowi, ulegają transkrypcji, w wyniku czego powstają poliproteiny strukturalne Gag (Pr55^{gag}), Gag-Pol (Pr160^{gag-pol}) i Env (gp160), a także białka pomocnicze (Vif, Vpr, Vpu).^{20,33}

W następnym etapie, prekursorowe białka strukturalne są transportowane do błony komórkowej, gdzie zostają utworzone wiriony potomne. Rolę w przekształcaniu poliprotein w funkcjonalne składniki nukleokapsydu odgrywa wirusowa proteaza, która wycina się autokatalitycznie z poliproteiny Pr160^{gag-pol}. Uwolnione białko katalizuje kolejne etapy rozcinania poliproteiny, w rezultacie czego powstają białka strukturalne i enzymy wirusowe.²⁰ Po opłaszczeniu, wirusowe cząstki potomne opuszczają komórkę gospodarza i rozpoczynają inwazję na kolejne niezainfekowane komórki.

5. LECZENIE

Od ponad dwudziestu lat naukowcy trują się w poszukiwaniu związków, które hamowałyby rozwój wirusów, a jednocześnie nie wpływałyby na normalną aktywność komórkową. Znajomość mechanizmów molekularnych każdego z etapów cyklu życiowego wirusa HIV pozwala wskazać potencjalne cele działania leków przeciwwirusowych. Jak się okazało, nie jest to łatwe zadanie.

Niezwykła zmienność genetyczna HIV sprawia, że nie dysponujemy odpowiednimi środkami farmakologicznymi, które umożliwiłyby jego efektywne zwalczanie. W trakcie trwania zakażenia HIV wzrasta liczba mutantów opornych na stosowane leki.³⁴ HIV niezwykle szybko wytworza szczepy oporne na dany lek.³⁵ Dodatkowo, przypuszcza się, że warianty wirusa potencjalnie oporne na różne terapeutyki mogą występować w organizmie pacjenta już nawet przed rozpoczęciem leczenia.³⁶

Źródłem zmienności HIV są między innymi mutacje punktowe.³⁷ Są one wprowadzane do genomu wirusa głównie na skutek jego nieprecyzyjnej replikacji podczas procesu odwrotnej transkrypcji. Odwrotna transkryptaza nie posiada bowiem naprawczej 3'→5' aktywności egzonukleolitycznej.³⁸ Równocześnie enzym ten posiada zdolność kontynuowania syntezy DNA w przypadku braku komplementarności włączanego nukleotydu, co powoduje, że każdy potomny genom HIV zawiera średnio jedną zmianę w stosunku do genomu macierzystego.³⁹

Innym procesem przyczyniającym się do genetycznej zmienności HIV są rearanżacje genomu na skutek rekombinacji genetycznej. Dzieje się tak na przykład w wyniku podwójnej infekcji. Zainfekowana komórka zawiera wówczas dwa różne prowirusy, a w skład wirionów potomnych wchodzi dwa transkrypty pochodzące z każdego prowirusa. W takim przypadku, w trakcie odwrotnej transkrypcji może dojść do powstania zrekombinowanego genomu i powstania wirionów nowego typu.⁴⁰ Uważa się, że spośród szczepów zidentyfikowanych u ludzi zakażonych HIV, 10% to rekombinanty.⁴¹

Zaprojektowanie skutecznego leku przeciwko HIV jest utrudnione także ze względu na obecność wirusa w całym organizmie. Dostarczenie leku do wszystkich komórek będących jego siedliskiem jest niezwykle trudne. Zwykle po dożylnym lub doustnym podaniu leku, efektywne stężenie można uzyskać już w ciągu kilku minut, jednak często okres półtrwania aktywnego związku w organizmie jest zbyt krótki i znaczna jego część jest wydalana z moczem, w niezmienionej postaci.

Należy również pamiętać, że wszystkie leki przeciw HIV obciążone są niepożądanymi działaniami ubocznymi, co też wpływa na bilans aktywności przeciwwirusowej.⁴²

W podejściu zmierzającym do zaprojektowania aktywnego leku istotną rolę odgrywa farmakokinetyka, czyli jego wchłanianie, dystrybucja, metabolizm i sposoby usuwania

REFERENCES

1. The authors are indebted to the following for their assistance in the collection of material: Dr. J. H. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...
11. ...
12. ...
13. ...
14. ...
15. ...
16. ...
17. ...
18. ...
19. ...
20. ...
21. ...
22. ...
23. ...
24. ...
25. ...
26. ...
27. ...
28. ...
29. ...
30. ...
31. ...
32. ...
33. ...
34. ...
35. ...
36. ...
37. ...
38. ...
39. ...
40. ...
41. ...
42. ...
43. ...
44. ...
45. ...
46. ...
47. ...
48. ...
49. ...
50. ...
51. ...
52. ...
53. ...
54. ...
55. ...
56. ...
57. ...
58. ...
59. ...
60. ...
61. ...
62. ...
63. ...
64. ...
65. ...
66. ...
67. ...
68. ...
69. ...
70. ...
71. ...
72. ...
73. ...
74. ...
75. ...
76. ...
77. ...
78. ...
79. ...
80. ...
81. ...
82. ...
83. ...
84. ...
85. ...
86. ...
87. ...
88. ...
89. ...
90. ...
91. ...
92. ...
93. ...
94. ...
95. ...
96. ...
97. ...
98. ...
99. ...
100. ...

z organizmu. Szybkość wchłaniania i czas zadziałania leku zależą od drogi podania, jednak o skuteczności dotarcia związku do miejsca działania decydują jego właściwości fizykochemiczne. Do podstawowych cech potencjalnego leku należy jego trwałość chemiczna, decydująca o skuteczności dotarcia związku w odpowiedniej formie do miejsca działania. Na przykład, jeżeli związek został podany doustnie, powinien przetrwać kwasowe środowisko żołądka, a w płynach ustrojowych winien być stabilny i odporny na działanie enzymów metabolicznych. Równie istotny jest odpowiednio zrównoważony charakter lipofilowo-hydrofilowy związku. Decyduje on o jakże ważnej rozpuszczalności substancji w środowiskach polarnych, np. w osoczu krwi, oraz wymaganym jednocześnie zachowaniu zdolności przenikania przez błony komórkowe i ustrojowe.

Jednym z podstawowych parametrów farmakokinetycznych, dostarczającym pomocnych informacji przy projektowaniu leków jest okres półtrwania ($t_{50\%}$ lub $t_{1/2}$) związku. Wartość ta oznacza czas, zwykle podany w minutach lub godzinach, w którym stężenie leku we krwi lub w całym ustroju obniża się o połowę.⁴³

Związki chemiczne o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym powinny cechować odpowiednie parametry aktywności antywirusowej i cytotoksyczności, takie jak: IC_{50} – stężenie inhibitorowe (ang. *inhibitory concentration*), stężenie związku, które redukuje w 50% zmiany patologiczne wywołane przez wirus; EC_{50} – stężenie efektywne (ang. *effective concentration*), stężenie powodujące zahamowanie w 50% replikacji wirusa; CC_{50} – stężenie cytotoksyczne (ang. *cytotoxic concentration*), stężenie związku powodujące zmiany cytopatogeniczne u połowy badanych zdrowych komórek; SI - indeks selektywności (ang. *selectivity index*), obliczony ze stosunku CC_{50} i EC_{50} , jest miarą przydatności terapeutycznej związku i im większa jego wartość, tym mniejsze niebezpieczeństwo wystąpienia objawów toksyczności badanego leku.

Pomimo obiecujących wyników badań przedklinicznych, jest jeszcze bardzo długa droga, zanim związek chemiczny zostanie wprowadzony na rynek jako lek. Bardzo obiecujące wyniki otrzymane w doświadczeniach laboratoryjnych, a nawet przedklinicznych, nie zapewniają wprowadzenia związku na rynek. Jest to proces, który przebiega według ściśle określonych procedur, z ogromnym nakładem kosztów, a wiele nawet bardzo obiecujących związków zostaje wyeliminowana, nie zdołając przejść wszystkich wymaganych testów przedklinicznych i klinicznych. Cały cykl tych badań, do momentu zarejestrowania związku jako lek, trwa zwykle do dziesięciu lat.

Pomimo usilnych starań, dotychczas nie udało się stworzyć skutecznej szczepionki czy wynaleźć leku powodującego całkowitą eliminację wirusa z organizmu. Przypadek HIV jest faktycznie wyjątkowo trudnym celem dla chemioterapii, dlatego naukowcy stale intensywnie poszukują nowych leków, prowadząc równocześnie intensywne badania nad ulepszeniem leków

The first part of the paper discusses the theoretical background of the study. It starts with a review of the literature on the effects of social support on mental health. The authors argue that social support is a key factor in the development and maintenance of mental health. They then discuss the different types of social support, such as emotional support, instrumental support, and informational support. The authors also discuss the different ways in which social support can be provided, such as through family, friends, and professional help.

The second part of the paper describes the methodology of the study. The authors used a cross-sectional design to examine the relationship between social support and mental health. They recruited a sample of 1000 participants from a community-based organization. The participants completed a series of questionnaires that measured their levels of social support and mental health. The authors also conducted interviews with a subset of the participants to explore their experiences in more detail.

The results of the study are presented in the third part of the paper. The authors found that there was a significant positive relationship between social support and mental health. Participants who reported higher levels of social support also reported lower levels of depression and anxiety. The authors also found that the relationship between social support and mental health was mediated by the participants' sense of self-efficacy. This means that social support helped to increase the participants' confidence in their ability to cope with their problems, which in turn led to better mental health outcomes.

The authors conclude that social support is an important factor in the promotion and maintenance of mental health. They suggest that interventions that aim to increase social support, such as group therapy and support groups, may be effective in improving mental health outcomes. They also suggest that further research is needed to explore the mechanisms through which social support exerts its effects on mental health.

już istniejących. Obecnie celem terapii przeciwwirusowej jest przedłużenie oraz poprawa jakości życia pacjenta zakażonego HIV. Wśród dotychczas stosowanych chemioterapeutyków znajdują się nukleozydowe inhibitory syntezy DNA, inhibitory odwrotnej transkryptazy, czy inhibitory proteazy.⁴⁴ Trwają też prace nad lekami, których działanie nacelowane jest na inne etapy namnażania się wirusa, jak na przykład adsorpcja wirusa z komórkowym miejscem wiążącym receptor wirusowy, inhibitory fuzji⁴⁵ oraz integracji prowirusa.⁴⁶

5.1. Inhibitory wiązania i fuzji wirusa HIV z komórką gospodarza

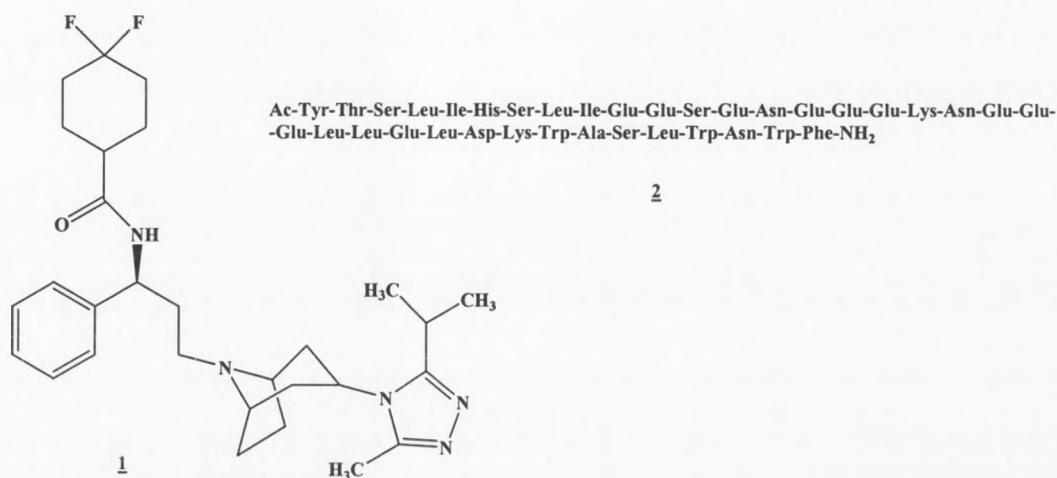
Terapia anty-HIV blokująca wczesną fazą infekcji pozwoliłaby zahamować rozprzestrzenianie się zintegrowanych z komórkami gospodarza prowirusów. Leczenie takie polegałoby więc na hamowaniu wiązania i fuzji wirusa z komórką gospodarza.

Istotnym postępem dla opracowania leków działających na wczesne etapy replikacji wirusa było wykazanie w 1995 r., że do zakażenia komórki przez HIV niezbędne są receptory dla chemikina CCR5 czy CXCR4.⁴⁷ Infekcja HIV jest inicjowana interakcją glikoproteiny otoczki wirusa gp120 i gp41 z receptorem CD4, przy udziale koreceptorów CCR5 i CXCR4.⁴⁸ Dlatego dążąc do optymalnego zahamowania zakażenia HIV na etapie wiązania wirusa, projektuje się substancje potencjalnie blokujące koreceptory.

Kiedy koreceptor CCR5 jest zablokowany, HIV o tropizmie R5 nie może oddziaływać z receptorami CD4 i infekować T limfocytów. W badaniach nad hamowaniem funkcji koreceptorów niezwykle ważne jest, by nie ograniczać ich naturalnych zadań. Receptory CCR5 i CXCR4 są funkcjonalnie ważne dla procesów immunologicznych, a od ich rodzaju zależy podatność komórek na zakażenie. Zasadność blokowania koreceptora CXCR4 jest wciąż dyskutowana, głównie z obawy wywołania niepożądanych skutków ubocznych. CXCR4 lokalizuje się na liczniejszej grupie komórek o znaczeniu funkcjonalnym.⁴⁹ Odkrycie analogów chemokinin RANTES, AOP-RANTES (aminoooksypentano-RANTES), przyniosło znaczny postęp w badaniach nad blokowaniem CCR5, będących swoistymi receptorami dla tych chemokin. Zauważono, że chemicznie zmodyfikowana forma RANTES działa jako antagonistą dla CCR5, blokując jego potencjalne miejsce interakcji z kompleksem gp120-CD4, jednocześnie nie powodując upośledzenia samego receptora.⁴⁵

W rezultacie licznych badań nad blokowaniem koreceptorów, FDA (ang. *Food and Drug Administration*) dopuścił do stosowania klinicznego (2007 r.) pierwszy lek hamujący wnikanie HIV do komórek, marawirok (Celsentri®). Jest to też pierwszy specyfik przeciwko AIDS, który działa na komórki ludzkie a nie na samego wirusa. Związek ten blokuje receptor CCR5, który HIV używa jako koreceptor wiązania i wnikania do limfocytów T pomocniczych i makrofagów.

Marawirok **1** (Rysunek 3) jest antagonistycznym receptorem chemokinin. Wiąże się on z ludzką chemokininą, hamując jej interakcje z gp120 i blokuje receptory CCR5, które HIV wykorzystuje do infekcji limfocytów T. Lek ten stosuje się tylko do pacjentów, u których wirus HIV wykazuje tropizm R5. Marawirok opóźnia wystąpienie objawów AIDS, redukuje miano wirusa o tropizmie do CCR5 utrzymując je na niskim poziomie⁵⁰, jednak jego stosowanie ma sens tylko w skojarzeniu z innymi lekami przeciwko HIV.



Rysunek 3. Inhibitory wiązania-**1** i fuzji-**2** HIV-1

Z kolei w badaniach nad inhibitorami procesu fuzji, kluczowe znaczenie ma wiązanie receptora CD4 przez glikoproteinę 120. Gp120 cechuje się dużą zmiennością i może wykazywać nawet 20% zróżnicowanie aminokwasowe białka otoczkowego. Z tego powodu trudno jest zaprojektować inhibitory tego etapu cyklu życiowego HIV.⁵¹

Pierwszym uznanym przez FDA (2003r.) i jak dotąd jedynym inhibitorem fuzji jest enfuwirtyd (T-20, pentafulzyd, Fuzeon[®])- **2** (Rys. 3). Związek ten jest syntetycznym 36-aminokwasowym peptydem z sekwencjami reszt aminokwasowych 127-162 cząsteczki gp41.⁵² Enfuwirtyd posiada zdolność nieodwracalnego hamowania wnikania HIV do komórki, a jego działanie polega na blokowaniu zmian konformacyjnych glikoproteiny gp41, zaangażowanej w proces fuzji błon. Enfuwirtyd przyłącza się do gp41 na zewnątrz komórki, zapobiegając tworzeniu „kanału” wejściowego dla kapsydu wirusa.⁵³

Ze względu na swoją budowę, T-20 może być podawany tylko pozajelitowo, wywołując przez to objawy poiniekcyjne⁵². Dotychczasowe, choć krótkie doświadczenie kliniczne wskazuje, że Fuzeon **2**, podobnie jak marawirok **1**, powinien być stosowany w połączeniu z innymi terapeutykami anti-HIV. Ponadto, pojawienie się mutacji w obrębie gp41 rodzi słuszną obawę o skuteczność działania tych związków.⁵⁴

...the polymerization of styrene in the presence of a catalyst...
 ...the reaction proceeds through a series of steps...
 ...the rate of polymerization is dependent on the concentration of the monomer and the catalyst...
 ...the polymerization is exothermic and the heat of polymerization is approximately 100 kJ/mol...
 ...the polymerization is a free-radical process and the mechanism involves the formation of a radical species...

TABLE I
 Kinetic data for the polymerization of styrene in the presence of a catalyst

Run	[M]₀ (mol/l)	[C]₀ (mol/l)	kₚ (l/mol·s)	kₜ (l/mol·s)
1	0.10	0.001	1.5 × 10⁴	1.0 × 10⁷
2	0.20	0.001	1.5 × 10⁴	1.0 × 10⁷
3	0.10	0.002	1.5 × 10⁴	1.0 × 10⁷
4	0.10	0.005	1.5 × 10⁴	1.0 × 10⁷

...the data show that the rate of polymerization is proportional to the square root of the monomer concentration...
 ...the rate of polymerization is independent of the catalyst concentration...

...the polymerization is a free-radical process and the mechanism involves the formation of a radical species...
 ...the rate of polymerization is dependent on the concentration of the monomer and the catalyst...
 ...the polymerization is exothermic and the heat of polymerization is approximately 100 kJ/mol...

...the polymerization is a free-radical process and the mechanism involves the formation of a radical species...
 ...the rate of polymerization is dependent on the concentration of the monomer and the catalyst...
 ...the polymerization is exothermic and the heat of polymerization is approximately 100 kJ/mol...

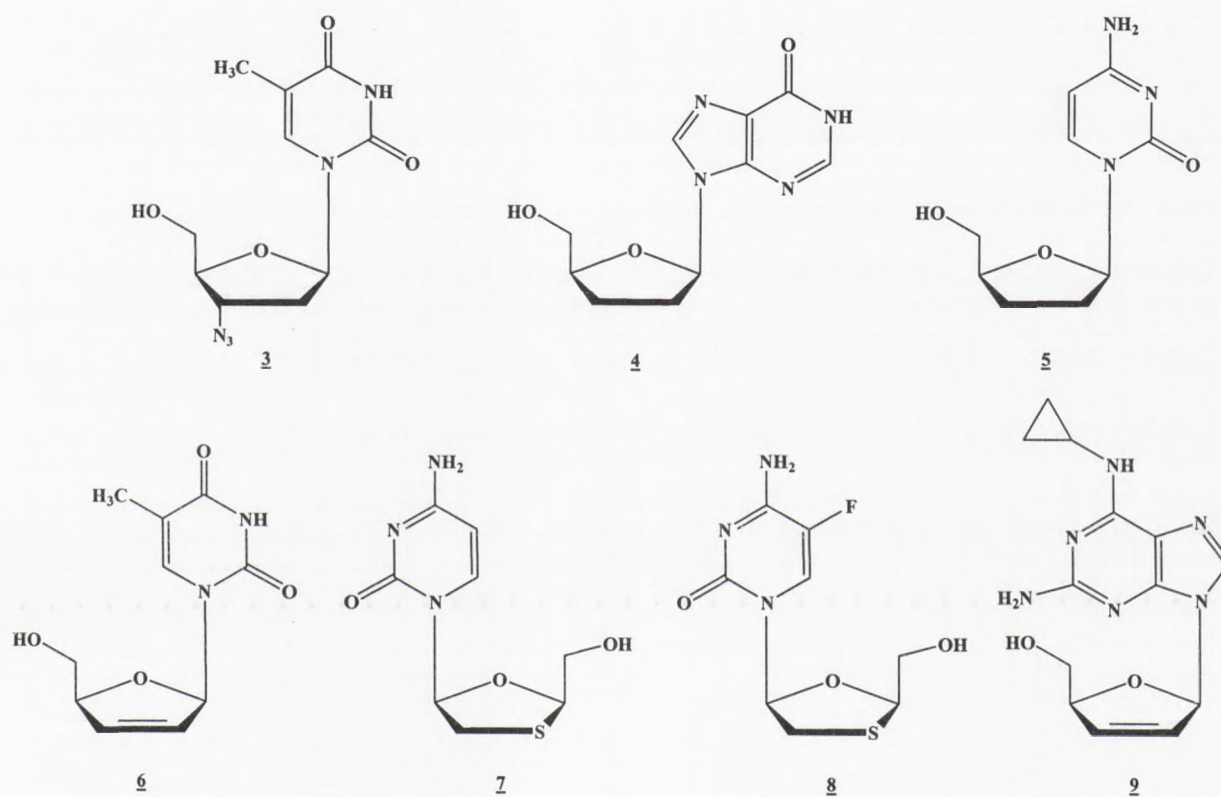
...the polymerization is a free-radical process and the mechanism involves the formation of a radical species...
 ...the rate of polymerization is dependent on the concentration of the monomer and the catalyst...
 ...the polymerization is exothermic and the heat of polymerization is approximately 100 kJ/mol...

...the polymerization is a free-radical process and the mechanism involves the formation of a radical species...
 ...the rate of polymerization is dependent on the concentration of the monomer and the catalyst...
 ...the polymerization is exothermic and the heat of polymerization is approximately 100 kJ/mol...

...the polymerization is a free-radical process and the mechanism involves the formation of a radical species...
 ...the rate of polymerization is dependent on the concentration of the monomer and the catalyst...
 ...the polymerization is exothermic and the heat of polymerization is approximately 100 kJ/mol...

5.2. Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji

Pierwszym dopuszczonym przez FDA do stosowania klinicznego (1987r.) lekiem dla chorych na AIDS była 3'-azydo-3'-deoksytymidyna (AZT, zidovudina, Retrovir[®])⁵⁵, **3** (Rysunek 4). Obecnie w leczeniu AIDS stosuje się kilka innych analogów nukleozydów. Są to: 2',3'-dideoksyinozyna (ddI, didanozyna, Videx[®]), **4**; 2',3'-dideoksycytydina (ddC, zalcitabina, Hivid[®]), **5**; 2',3'-didehydro-3'-deoksytymidyna (d4T, stavudina, Zerit[®]), **6**; L-3'-tia-2',3'-dideoksycytydina (3TC, lamivudyna, Epivir[®]), **7**; 5-fluoro-L-3'-tia-2',3'-dideoksycytydina (FTC, emtricitabina, Emtriva[®]), **8**; 2',3'-didehydro-2',3'-dideoksy-2-amino-6-cyklopropyloaminopurynorybonukleozyd (ABC, abacavir, Ziagen[®]), **9**⁵² (Rys. 4).



Rysunek 4. Struktura chemiczna analogów nukleozydów, inhibitorów odwrotnej transkrypcji

Nukleozydy jako takie nie są aktywne i muszą zostać ufosforylowane do odpowiednich 5'-trifosforanów, aby mogły być włączone do rosnącego łańcucha DNA. W pierwszej fosforylacji, z udziałem kinazy tymidynowej, utworzony zostaje 5'-monofosforan nukleozydu, NMP (**11** i/lub **12**). W kolejnych etapach, katalizowanych przez kinazy nukleotydylanowe powstają kolejno 5'-difosforan, NDP (**13** i/lub **14**) i 5'-trifosforan nukleozydu, NTP (**15** i/lub **16**)⁵⁶ [Schemat 2].

1. The first part of the paper is devoted to the study of the

structure of the group G and its subgroups.

2. In the second part, we consider the action of G on the

cosets of a subgroup H of G .

3. The third part is devoted to the study of the

structure of the group G and its subgroups.

4. In the fourth part, we consider the action of G on the

cosets of a subgroup H of G .

5. The fifth part is devoted to the study of the



6. The sixth part is devoted to the study of the

structure of the group G and its subgroups.

7. In the seventh part, we consider the action of G on the

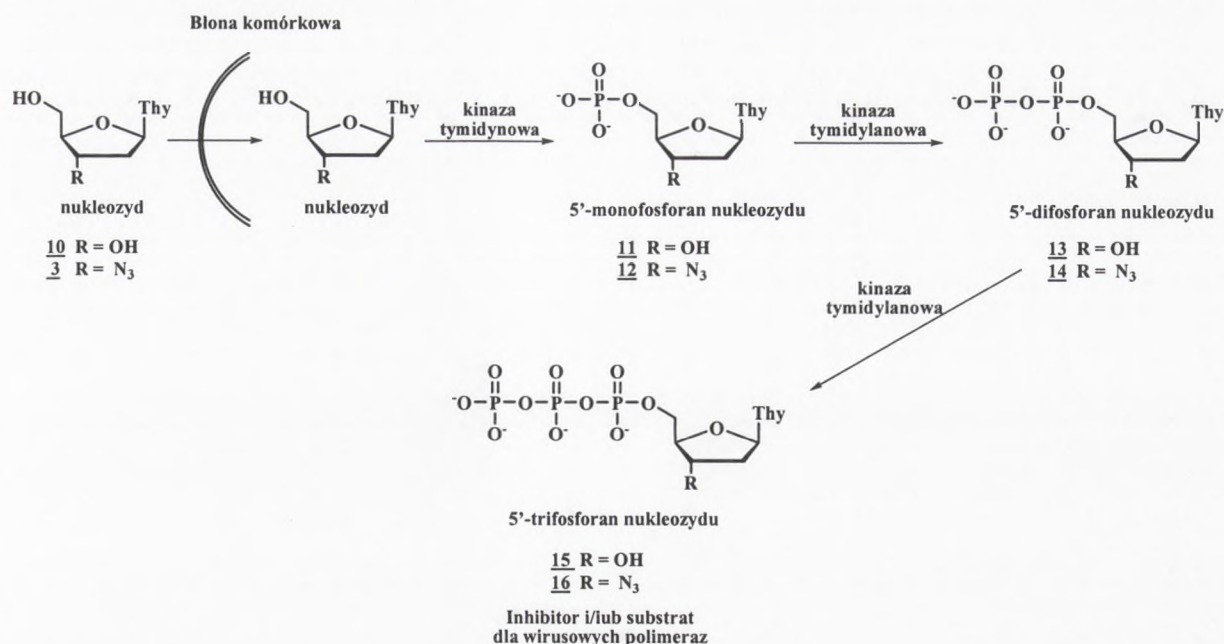
cosets of a subgroup H of G .

8. The eighth part is devoted to the study of the

structure of the group G and its subgroups.

9. In the ninth part, we consider the action of G on the

cosets of a subgroup H of G .



Schemat 2. Wewnątrzkomórkowy metabolizm nukleozydów

Biologicznie aktywną formą, zdolną do inhibicji procesu odwrotnej transkrypcji, jest więc 5'-trifosforan 2',3'-dideoksynukleozydu (NTP) np. **16** (Schemat 2). NTP analogu nukleozydu może działać na dwa sposoby. Pierwszy, i jak sądzę podstawowy, polega na włączeniu w trakcie odwrotnej transkrypcji, na koniec rosnącego łańcucha DNA, jednostki nukleozydowej nieposiadającej funkcji 3'-OH, co blokuje dalszą syntezę DNA wirusa, a tym samym blokuje jego replikację.⁵⁷ Drugi sposób działania to inhibicja kompetycyjna, polegająca na blokowaniu centrum aktywnego HIV RT przez 5'-trifosforan analogu nukleozydu, co uniemożliwia dokowanie właściwego nukleotydu i hamuje proces odwrotnej transkrypcji.⁵⁸

Skuteczność działania 2',3'-dideoksynukleozydów jako inhibitorów odwrotnej transkrypcji HIV-1, zależy od czterech głównych czynników: ich komórkowej absorpcji, fosforylacji przez kinazy komórkowe, inhibicji kompetycyjnej i inkorporacji w powstający wirusowy DNA.⁵⁷

Wśród dostępnych leków w terapii anti-HIV, AZT **3** jest nadal jednym z najefektywniejszych. Terapia z użyciem AZT hamuje rozwój HIV przedłużając życie pacjenta z zaawansowanym AIDS. Farmakodynamika, farmakokinetyka i skuteczność terapeutyczna AZT była dokładnie badana. Istnieje wiele dowodów na to, że AZT jest inhibitorem wirusa HIV ($EC_{50} = 0.002 \mu\text{M}$, $CC_{50} = > 100 \mu\text{M}$, komórki CEM). Stwierdzono, że wskutek jego działania, u kobiet w ciąży zredukowana zostaje transmisja wirusa z matki na dziecko. Ponadto, u pacjentów przyjmujących AZT zaobserwowano ogólną poprawę funkcji neuropsychologicznych.⁵⁹

The first part of the document is a list of names and titles, including:

 1. [Name] [Title]

 2. [Name] [Title]

 3. [Name] [Title]

 4. [Name] [Title]

 5. [Name] [Title]

 6. [Name] [Title]

 7. [Name] [Title]

 8. [Name] [Title]

 9. [Name] [Title]

 10. [Name] [Title]

The second part of the document is a list of names and titles, including:

 1. [Name] [Title]

 2. [Name] [Title]

 3. [Name] [Title]

 4. [Name] [Title]

 5. [Name] [Title]

 6. [Name] [Title]

 7. [Name] [Title]

 8. [Name] [Title]

 9. [Name] [Title]

 10. [Name] [Title]

THE SECOND PART OF THE DOCUMENT

This section contains a detailed list of names and titles, including:

 1. [Name] [Title]

 2. [Name] [Title]

 3. [Name] [Title]

 4. [Name] [Title]

 5. [Name] [Title]

 6. [Name] [Title]

 7. [Name] [Title]

 8. [Name] [Title]

 9. [Name] [Title]

 10. [Name] [Title]

 11. [Name] [Title]

 12. [Name] [Title]

 13. [Name] [Title]

 14. [Name] [Title]

 15. [Name] [Title]

 16. [Name] [Title]

 17. [Name] [Title]

 18. [Name] [Title]

 19. [Name] [Title]

 20. [Name] [Title]

This section contains a detailed list of names and titles, including:

 1. [Name] [Title]

 2. [Name] [Title]

 3. [Name] [Title]

 4. [Name] [Title]

 5. [Name] [Title]

 6. [Name] [Title]

 7. [Name] [Title]

 8. [Name] [Title]

 9. [Name] [Title]

 10. [Name] [Title]

 11. [Name] [Title]

 12. [Name] [Title]

 13. [Name] [Title]

 14. [Name] [Title]

 15. [Name] [Title]

 16. [Name] [Title]

 17. [Name] [Title]

 18. [Name] [Title]

 19. [Name] [Title]

 20. [Name] [Title]

Należy mieć na uwadze, że komórki ośrodkowego układu nerwowego stanowią główny rezerwuuar wirusa, przez co komórki obwodowe mogą być nieprzerwanie, wtórnie zarażane. Z tego powodu niezwykle istotne jest, by lek łatwo przekraczał barierę krew - mózg (ang. *blood – brain barrier*, BBB) aż do osiągnięcia stężenia terapeutycznego, bez wzrostu toksyczności. AZT jest na tyle lipofilowy ($\log P = 0.08$ w układzie oktanol/bufor fosforanowy, $\text{pH} = 7.4$), że łatwo przedostaje się do płynu mózgowo - rdzeniowego (ang. *cerebrospinal fluid*, CSF) na drodze dyfuzji biernej, a także transportu aktywnego. Pomimo tego, że AZT stosunkowo łatwo przenika z CSF do tkanki mózgowej, to lek nie osiąga stężenia terapeutycznego i nie wywołuje efektu leczniczego. Stwierdzono, że niskie stężenie AZT w mózgowiu, niekoniecznie jest spowodowane jego słabym wchłanianiem, ale raczej szybkim wydostawaniem się związku z mózgowia.⁵⁹

Pomimo że AZT jest tak skuteczny w hamowaniu replikacji HIV, to nie zapobiega on „produkcji” wirusa przez przewlekle zakażone komórki, jak również nie hamuje zakażenia zdrowych komórek (syncytia). Inne główne problemy związane z chemioterapią AZT to jego krótki okres półtrwania we krwi ($t_{1/2}$ około 1h) i niskie stężenie w mózgowiu. Powoduje to, że pacjenci muszą często przyjmować lek, by utrzymać jego stężenie terapeutyczne w organizmie. Dawka AZT jest ograniczona jego toksycznością, co wynika z małego tzw. okna terapeutycznego, odzwierciedlającego różnicę pomiędzy minimalną dawką leczniczą a maksymalną tolerowaną.⁵⁹ Skutkami ubocznymi w chemioterapii AZT jest jego toksyczność dla komórek szpiku kostnego, powodująca anemię i neutropenię, a także miopatia, zanik mięśni czy dolegliwości wątrobowe.⁶⁰

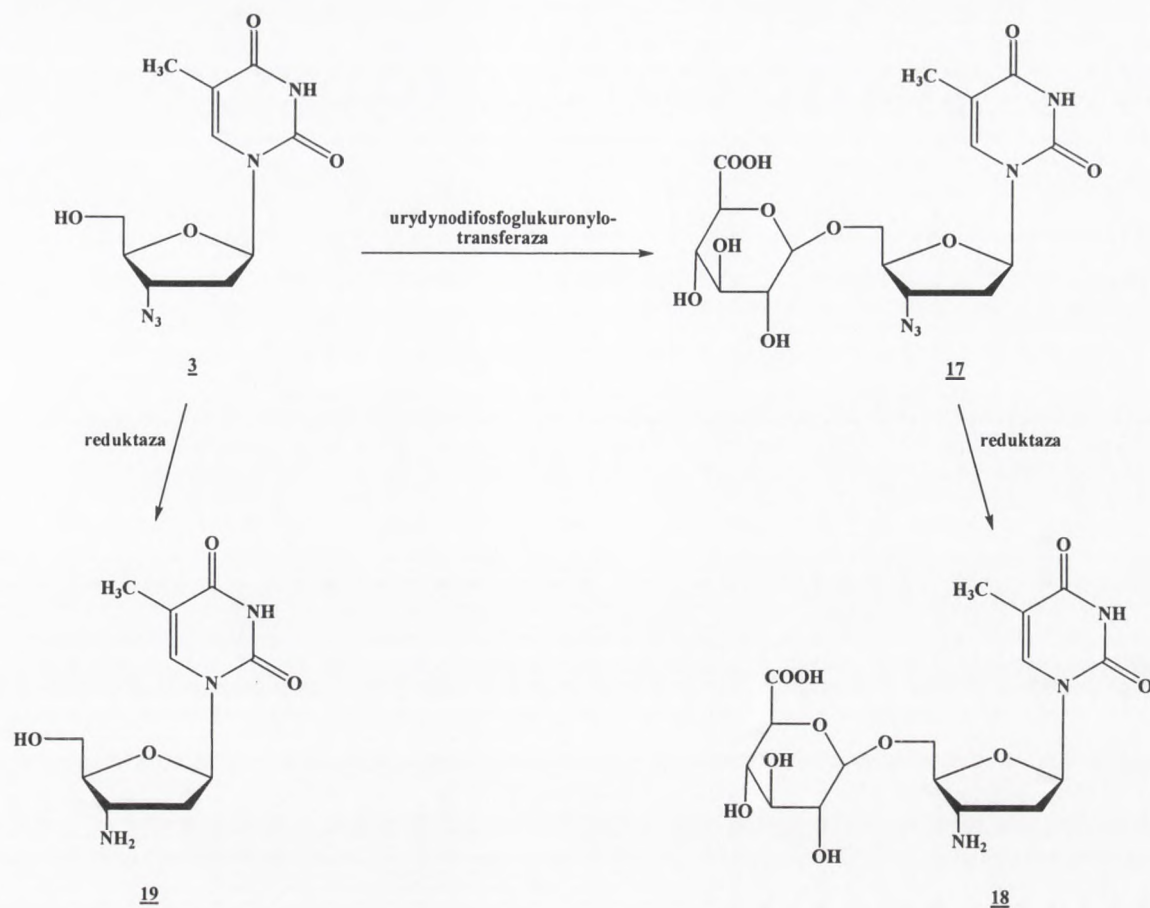
Jedną z głównych przyczyn toksyczności AZT jest akumulacja AZTMP **12** w komórkach. AZT **3** jest fosforylowane wewnątrzkomórkowo do AZTMP **12** przez tę samą kinazę tymidynową, która fosforyluje tymidynę **10**. Na skutek zbliżonego powinowactwa **10** i **3** do tego enzymu (K_m , odpowiednio $2.9 \mu\text{M}$ i $3.0 \mu\text{M}$), szybkość tej reakcji dla AZT stanowi ok. 60% szybkości fosforylacji T **10**. AZTMP fosforylowane następnie przez kinazę tymidylianową do AZTDP **14** silniej wiąże się z tym enzymem aniżeli TMP **11** (K_m , odpowiednio $8.6 \mu\text{M}$ vs $4.1 \mu\text{M}$) i jest znacznie wolniej fosforylowany do AZTDP (V_{\max} stanowi 0.3% szybkości fosforylacji TMP).⁵⁸ Efekt jest taki, że na skutek szybkiej fosforylacji AZT i tworzenia AZTMP, oraz wolnej dalszej fosforylacji do AZTDP, w komórce następuje kumulacja AZTMP i „zablokowanie” kinazy tymidylianowej, której właściwą funkcję fizjologiczną (synteza TTP **15**) uniemożliwia silnie z nią związany AZTMP.⁶¹ Warto zaznaczyć, że jest to podstawowe źródło cytotoksyczności AZT.

The first part of the book is devoted to a general introduction to the study of the history of the United States. The author discusses the importance of the study of the history of the United States and the role of the historian in the study of the history of the United States. The author also discusses the importance of the study of the history of the United States and the role of the historian in the study of the history of the United States.

The second part of the book is devoted to a general introduction to the study of the history of the United States. The author discusses the importance of the study of the history of the United States and the role of the historian in the study of the history of the United States. The author also discusses the importance of the study of the history of the United States and the role of the historian in the study of the history of the United States.

The third part of the book is devoted to a general introduction to the study of the history of the United States. The author discusses the importance of the study of the history of the United States and the role of the historian in the study of the history of the United States. The author also discusses the importance of the study of the history of the United States and the role of the historian in the study of the history of the United States.

The fourth part of the book is devoted to a general introduction to the study of the history of the United States. The author discusses the importance of the study of the history of the United States and the role of the historian in the study of the history of the United States. The author also discusses the importance of the study of the history of the United States and the role of the historian in the study of the history of the United States.



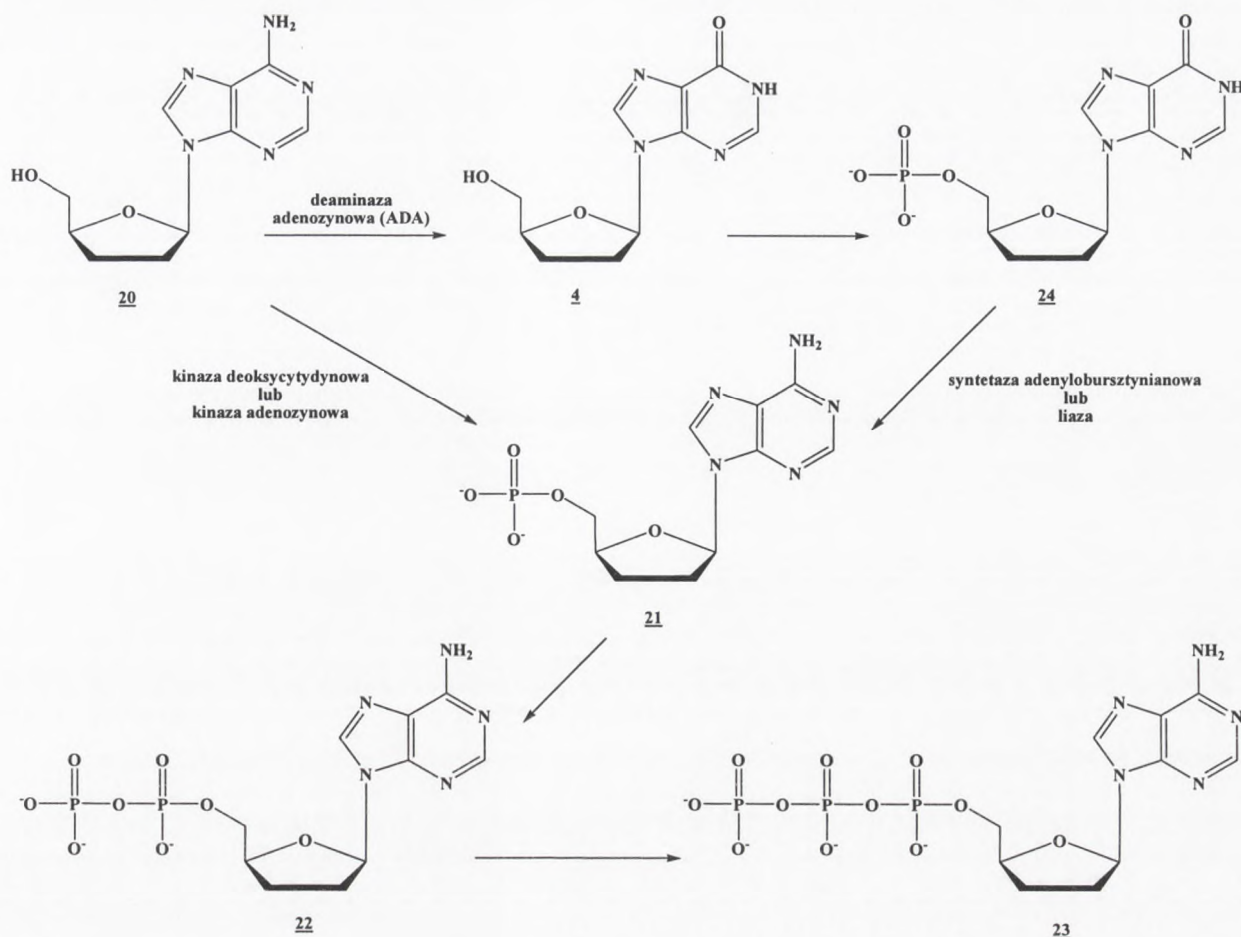
Schemat 3. Szlak kataboliczny AZT w komórkach wątroby

Po podaniu doustnym, absorpcja AZT jest szybka i prawie całkowita. Zaobserwowano, że AZT zostaje częściowo wyeliminowany z organizmu w niezmienionej postaci. Ponadto ustalono, że jego dominującym (80%) produktem katabolizmu w wątrobie jest 5'-*O*-glukuronian AZT **17**, wydalany z moczem. Może on jednak ulec dalszym przemianom do toksycznego 5'-*O*-glukuronianu 3'-aminotymidyny **18**. W drugim szlaku katabolicznym, następuje redukcja grupy azydkowej w AZT, co generuje silnie toksyczną dla komórek szpiku kostnego 3'-aminotymidynę **19**. Powyższe szlaki przemian (Schemat 3) dodatkowo pomniejszają jego terapeutyczną efektywność.^{62,63}

Szlaki metaboliczne innych 2',3'-dideoksynukleozydów okazały się być jeszcze bardziej złożone. Na przykład, ddA **20** (Schemat 4) po wnikięciu do komórki może zostać ufosforylowana przez kinazy komórkowe do ddAMP **21**, a następnie do ddADP **22** i ddATP **23**, ale znacznie szybciej ulega ona deaminacji do ddI **4**, działaniem deaminazy adenozykowej (ADA). ddI, jest fosforylowane do ddIMP **24**, a następnie ulega aminacji z odtworzeniem ddAMP **21**, który w dalszych fosforylacjach przekształcony jest w bioaktywny ddATP **23**.⁶⁴

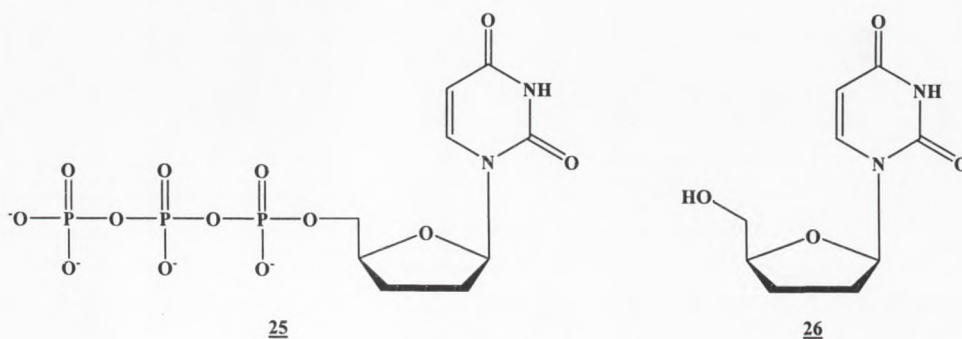


[The text in this section is extremely faint and illegible, appearing as a series of horizontal lines.]



Schemat 4. Szlak metaboliczny ddA

Jak opisałam powyżej, skuteczność generowania 5'-trifosforanu 2',3'-dideoksynukleozydu, jest miarą wywoływanego przez te związki efektu terapeutycznego. Dowiedziono, że 5'-trifosforan-2',3'-dideoksyurydyny **25** (Rysunek 5) jest bardzo efektywnym i selektywnym inhibitorem RT HIV. Jednakże 2',3'-dideoksyurydyna **26** jako taka jest nieaktywna w blokowaniu infekcji HIV. Wykazano, że brak oczekiwanego potencjału anti-HIV tego dideoksynukleozydu wiąże się z faktem, że nie jest on substratem kinaz komórkowych i nie może być przekształcony w ddUMP.⁶⁵



Rysunek 5



Reaction scheme showing the synthesis of a cyclic diene derivative.

The reaction scheme shows the synthesis of a cyclic diene derivative. The diene (1,3-butadiene derivative) reacts with the dienophile (maleic anhydride derivative) to form the cyclic diene derivative. The reaction is carried out under conditions of heat and pressure.



W przypadku innego analogu nukleozydu, d4T **6** (Rysunek 4), fosforylacja do jego 5'-monofosforanu przez kinazę tymidynową zachodzi niemal 500 razy wolniej w porównaniu z AZT **3**, gdyż d4T ma znacznie mniejsze powinowactwo do tego enzymu. Właśnie ten etap fosforylacji kształtuje jego aktywność anty-HIV, ponieważ następne fosforylacje z udziałem kinazy tymidylanowej i tworzenie d4TDP i d4TTP zachodzą znacznie szybciej.⁶⁶

W porównaniu z innymi analogami nukleozydów, 3TC **7** jest słabym inhibitorem RT. Dzieje się tak, dlatego że w ciągu kilku tygodni od podania tego leku, następuje wzrost liczby mutacji punktowych M184I. Stwierdzono, że w trakcie trwania terapii, populacja tych mutacji jest szybko zastępowana przez kolejną, M184V, a poziom HIV RNA wraca wówczas do stanu początkowego.⁶⁷ Występowanie tych lekoopornych mutacji punktowych znacznie ogranicza monoterapię lamiwudyną.

Mimo że większość przeciwwirusowych dideoksynukleozydów jest substratami kinaz komórkowych, to zdarza się, że nie ulegają one fosforylacji. Chodzi o to, że w niektórych komórkach (monocyty, makrofagi) występuje deficyt enzymów fosforylujących (TK²), co powoduje, że lek jest kompletnie nieaktywny. Ta ścisła zależność od kinaz komórkowych, występowanie lekoopornych mutacji oraz efekty uboczne wywoływane przez nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji powodują, że związki te, aczkolwiek skuteczne, to nie są idealnymi terapeutykami przeciwko HIV.

5.3. Nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy

Nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NNIRT) reprezentowane są przez chemicznie różnorodne, policykliczne związki, które nie wymagają wewnątrzkomórkowej aktywacji. Wszystkie te związki wiążą się do kieszeni hydrofobowej (ang. *non - nucleoside inhibitor - binding pocket*, NNIBP) ulokowanej w pobliżu miejsca aktywnego RT. W rezultacie, wymuszają zmiany konformacyjne enzymu i blokują jego katalityczną efektywność.^{68,69}

Obecnie cztery nienukleozydowe inhibitory RT są dopuszczone przez FDA do stosowania klinicznego: newirapina (NVP, Viramune[®]) **27**, delawurdyna (DLV, Rescriptor[®]) **28**, efawienz (EFV, Sustiva[®]) **29** i etrawiryna (Intelence[®]) **30**⁷⁰ (Rysunek 6).

Niestety, z przyczyn nie do końca wyjaśnionych obserwuje się szybkie nabywanie oporności HIV na NNIRT i dlatego zaleca się stosowanie tych związków w terapii kombinowanej (w połączeniu z nukleozydowymi inhibitorami RT). W lekoopornych wariantach wirusa obserwuje się zmiany pojedynczych aminokwasów w obrębie kieszeni hydrofobowej, co uniemożliwia wiązanie się NNIRT. Na przykład, mutant RT oporny na newirapinę (NVP) **27**, zawiera mutację w pozycji 181, gdzie w miejsce tyrozyny występuje cysteina (Y181C RT). Ten rodzaj mutantu jest mniej wrażliwy na NVP oraz na inne NNIRT

THE HISTORY OF THE UNITED STATES

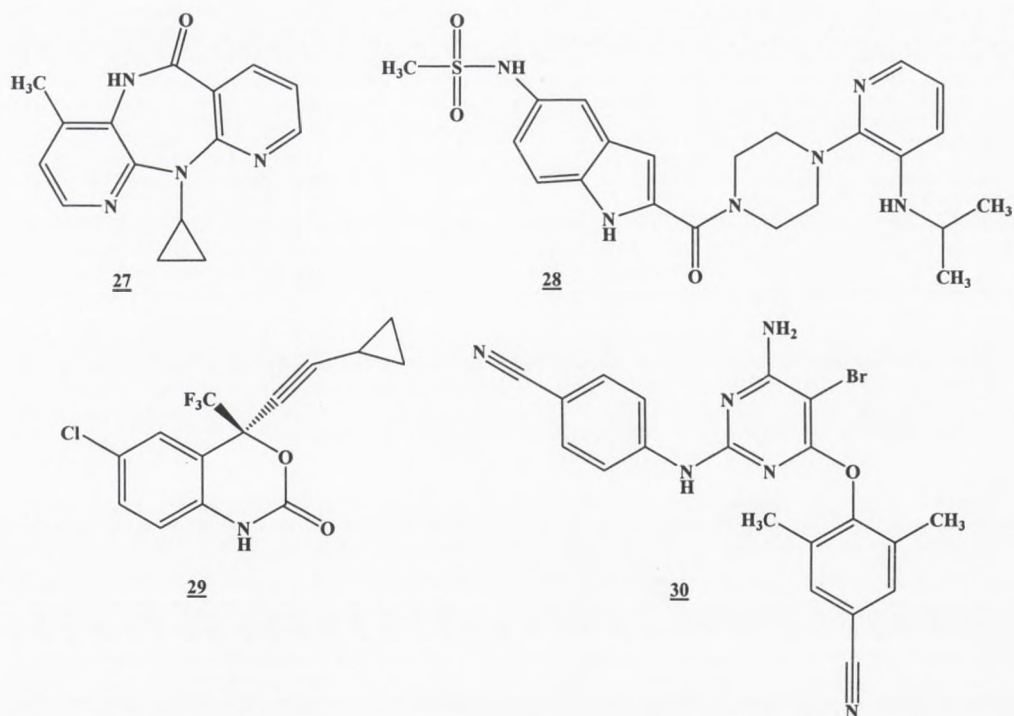
The history of the United States is a story of growth and change. From the first European settlers to the present day, the nation has expanded its territory and diversified its economy. The American dream of freedom and opportunity has attracted millions of immigrants from all over the world. The country has played a leading role in the world, both as a peacemaker and as a defender of its principles.

The American Revolution was a turning point in the nation's history. It was a struggle for independence from British rule, and it resulted in the creation of a new government based on the principles of democracy and the rule of law. The Constitution of 1787 established the framework for the federal government, and it has since been amended to reflect the needs and values of the American people.

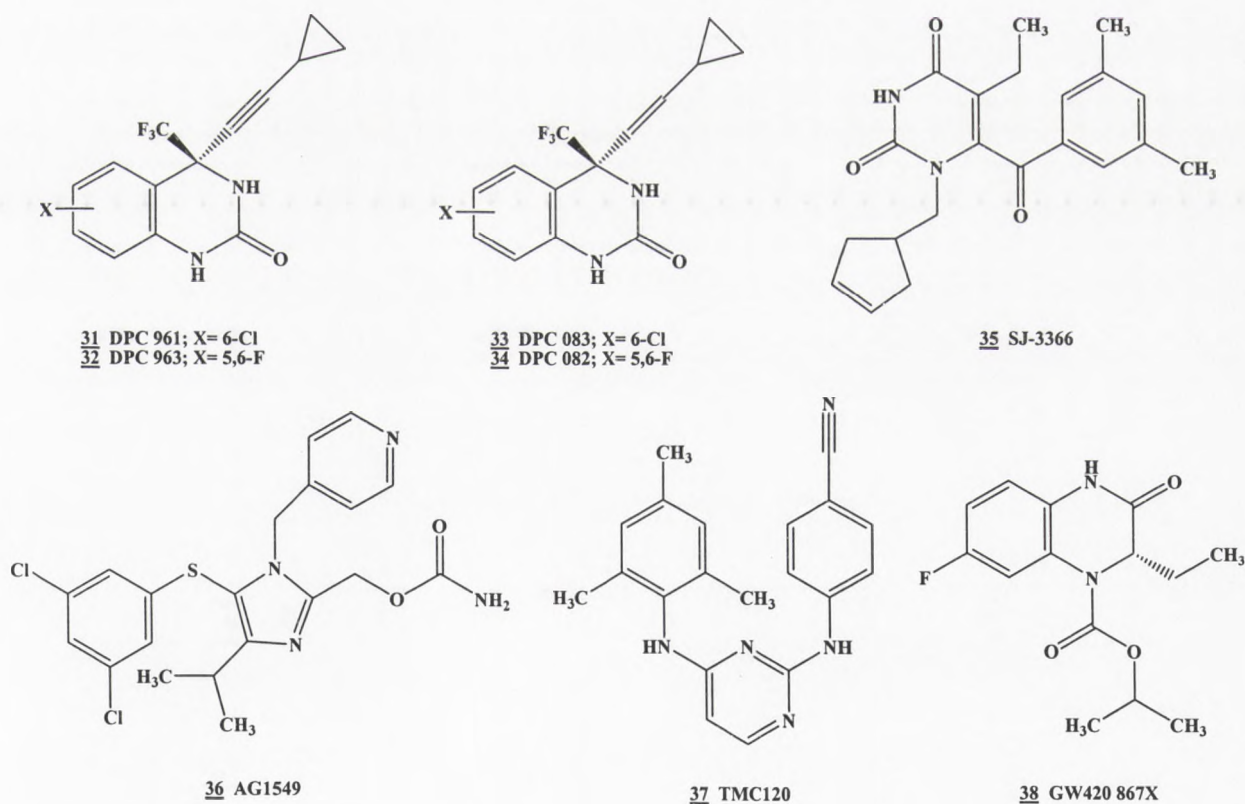
The Civil War was another major event in the nation's history. It was a conflict between the free states and the slave states, and it resulted in the abolition of slavery. The war also led to the Reconstruction era, which was a period of rebuilding and reform. The Reconstruction era was a time of great change and progress, but it was also a time of struggle and hardship.

The American West was a land of opportunity and adventure. It was a place where men and women sought their fortunes and built a new life. The West was a land of discovery and exploration, and it played a vital role in the nation's expansion. The West was also a land of conflict and struggle, as different groups vied for control of the land and its resources.

The American West was a land of opportunity and adventure. It was a place where men and women sought their fortunes and built a new life. The West was a land of discovery and exploration, and it played a vital role in the nation's expansion. The West was also a land of conflict and struggle, as different groups vied for control of the land and its resources.



Rysunek 6. Uznane przez FDA NNIRT HIV-1



Rysunek 7. Nowe NNIRT w trakcie badań przedklinicznych i klinicznych



w porównaniu z dzikim typem enzymu.⁷¹ Dlatego w przypadku nowych nienukleozydowych inhibitorów RT, obok badań standardowych, bada się aktywność przeciwko mutantom posiadającym takie mutacje jak Y181C, Y188L, czy K103N. Przykłady NNIRT nowej generacji, przedstawione na Rysunku 7, posiadają lepsze właściwości farmakokinetyczne i są obecnie badane w testach przedklinicznych i klinicznych.⁷²

GW420 867X **38**, AG1549 **36** i TMC120 **37** wykazują aktywność anty-HIV wobec mutantów Y181C i K103N. DCP 961 **31**, DCP 963 **32**, DCP 082 **34** i DCP 083 **33**, są związkami strukturalnie podobnymi do EFV **29**, jednak w odróżnieniu od niego są aktywne przeciwko mutantowi K103N. Równie interesującym nowym NNIRT jest SJ-3366 **35**, u którego wykazano aktywność przeciwko obu typom R5 i X4 wirusa HIV-1, oraz przeciwko HIV-2. Wydaje się także, że hamuje on infekcję na etapie wnikania.⁷²

5.4. Inhibitory integrazy

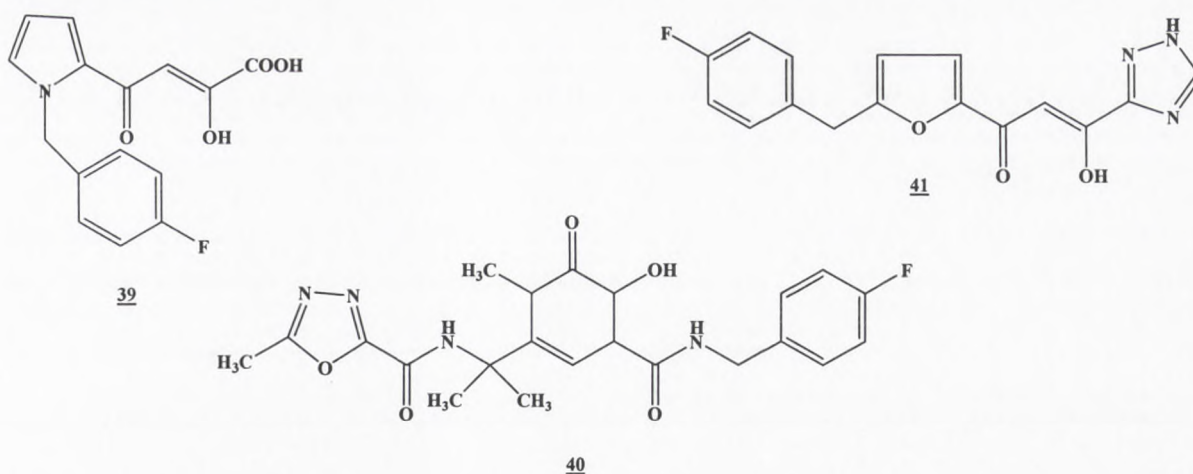
Na przestrzeni mniej więcej 20 lat opisano różne związki chemiczne, które w testach *in vitro* wykazywały znaczną aktywność hamowania integrazy HIV.⁴⁶ Pionierem w poszukiwaniu związków anty-IN był Hazuda, który zaproponował diketokwasy, jako nową klasę związków hamujących replikację HIV w zainfekowanych komórkach na etapie działania integrazy. Diketokwasy posiadają zdolność osłabiania (lub blokowania) aktywności IN, przez oddziaływanie z jej domeną katalityczną na etapie przeniesienia nici (ang. *strand transfer*, ST). Jeden z tych związków, L731 988 **49** (Rysunek 8), został opatentowany przez firmę Merck i jest w trakcie dalszych badań nad jego wartością terapeutyczną.⁷³ Ponieważ niezbędnym warunkiem dla aktywności katalitycznej integrazy jest obecność jonu magnezu (Mg^{2+}) lub manganu (Mn^{2+}), inhibitory integrazy silnie wiążąc się z tymi jonami blokują miejsce aktywne enzymu.⁷⁴

Można sądzić, że przyczyną braku efektywnych terapeutyków działających na etapie integracji wirusa HIV z genomem gospodarza, był brak selektywności i/lub specyficzności anty-IN badanych związków. Jednakże niedawno powstał pierwszy lek [uznany przez FDA (2007r. - USA, 2008r. - Europa)], raltegrawir (Isentress[®]) **40** (Rys. 8), inhibitor integrazy HIV⁷⁰, który jest znacznie skuteczniejszy od poprzednich. U pacjentów zakażonych wirusem HIV, którzy przyjmują raltegrawir w połączeniu ze zoptymalizowaną terapią podstawową, obserwuje się znaczną redukcję wirerii i wzrost komórek CD4.⁷⁵ Obiecujące są również wyniki, jakie otrzymano dla inhibitora integrazy S-1360 **41** ($EC_{50} = 0.14 \mu M$ i $CC_{50} = 110 \mu M$), który to związek jest obecnie w fazie badań klinicznych (Rys. 8).⁵²

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records and the role of the auditor in this process. It highlights the need for transparency and accountability in financial reporting, particularly in the context of public sector organizations. The text emphasizes that proper record-keeping is essential for ensuring the integrity of the financial statements and for facilitating effective oversight by stakeholders.

In addition, the document outlines the specific responsibilities of the auditor, including the requirement to conduct a thorough review of the accounting records and to provide an independent opinion on their accuracy. It notes that the auditor must adhere to established professional standards and maintain objectivity throughout the audit process. The text also discusses the potential consequences of non-compliance with these standards, including the risk of reputational damage and legal action.

Finally, the document concludes by reiterating the significance of the auditor's role in promoting financial transparency and trust. It encourages all parties involved in the financial reporting process to work together to ensure the highest standards of accuracy and integrity. The text serves as a clear guide for auditors and other stakeholders, providing a comprehensive overview of the requirements and expectations for financial reporting.



Rysunek 8. Inhibitory integrazy HIV-1

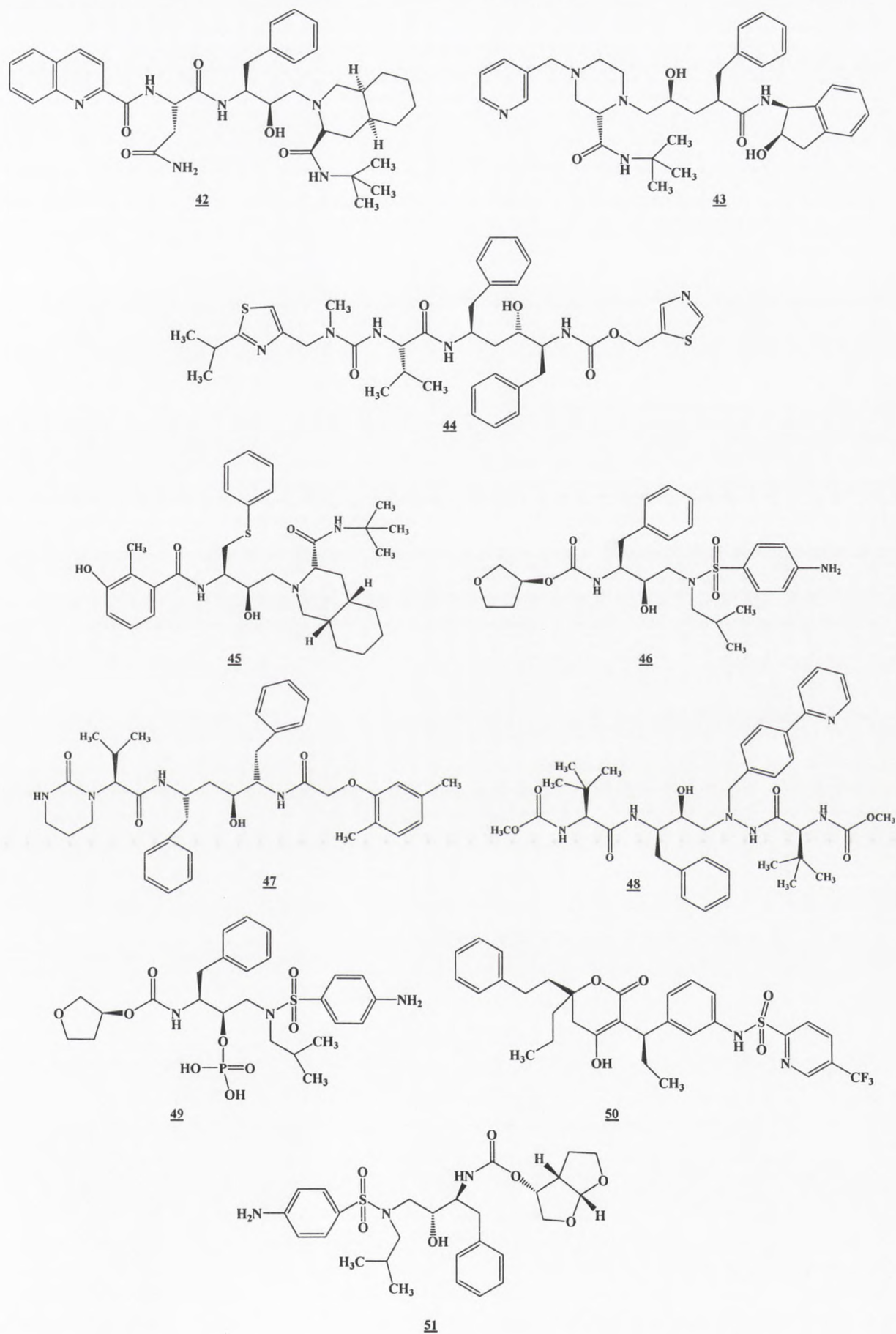
5.5. Inhibitory proteazy

Proteaza (PR) HIV jest kolejnym atrakcyjnym celem antywirusowej terapii. Inhibitory PR wiążą się kompetycyjnie do miejsca aktywnego enzymu, dezaktywując jego proteolityczną zdolność, co uniemożliwia tworzenie dojrzałych, infekujących wirionów. Pierwsze projektowane terapeutyki anti-PR były peptydowymi związkami przypominającymi proteolityczną część poliprotein Gag i Gag-Pol. Jednak z powodu ich niezbyt korzystnych parametrów farmakokinetycznych, nie prowadzono dalszych badań.⁷⁶ Spośród projektowanych obecnie związków anti-PR wyróżnia się inhibitory niepeptydowe oraz peptydopodobne. Te ostatnie, nie posiadają rdzenia peptydowego, ale zawierają w swej strukturze grupy funkcyjne, które sprawiają, że związki te są peptydopodobnymi analogami substratów dla proteazy HIV, i umożliwiają przez to hamowanie aktywności enzymu.⁷⁷

Obecnie inhibitory proteazy stanowią najliczniejszą grupę terapeutyków anti-HIV dopuszczonych do stosowania przez FDA (Rysunek 9). Należą do nich: saquinawir (SQU, Invirase[®]/Fortovase[®]) **42**, indinawir (IDV, Crixivan[®]) **43**, ritonawir (RTV, Norvir[®]) **44**, nelfinawir (NFV, Viracept[®]) **45**, amprenawir (APV, Agenerase[®]) **46**, lopinawir (LPV, Kaletra[®]) **47**, atazanawir (ATV, Reyataz[®]) **48**, fosamprenawir (Fos-APV, Lexiva[®]) **49**, tipranawir (TPV, Aptivus[®]) **50**, darunawir (DRV, Prezista[®]) **51**.⁷⁰

Cechuje je wysoka selektywność do HIV-1 PR i znaczna aktywność antywirusowa. W praktyce stosuje się je zwykle w kombinacji z innymi terapeutykami przeciwwirusowymi, głównie nukleozydowymi inhibitorami RT. Długotrwałe przyjmowanie tych związków





Rysunek 9. Uznane przez FDA inhibitory proteazy wirusa HIV

powoduje niestety skutki uboczne, a do najczęstszych należą lipodystrofia, hiperlipidemia czy odporność na insulinę.⁷⁸ Podczas długotrwałej terapii objawia się lekooporność na inhibitory PR, tym silniejsza im więcej mutacji pojawia się w enzymie.³⁴

Wprowadzone ostatnio do terapii inhibitory PR, nie wywołują tak łatwo lekooporności jak leki anty-PR wcześniej stosowane. Peptydopodobny lopinawir **47** jest silnie aktywny przeciwko szczepom wirusa opornym na ritonawir **44**.⁷² Wśród niepeptydowych inhibitorów PR, tipranawir **50** wykazuje pełną aktywność przeciwko mutantom wirusa, na które nie są aktywne m. in. ritonawir **44** i indinawir **43**.⁷⁹ Ze względu na pojawiającą się lekooporność wirusa, w trakcie terapii lekami anty-PR, zaleca się stosowanie przynajmniej dwóch różnych inhibitorów tego enzymu. Dodatkowo, z powodu zwykle krótkiego okresu półtrwania leku w organizmie, pacjenci z AIDS muszą przyjmować ponad kilkanaście tabletek dziennie. W tej grupie związków atazanawir **48**, wysoce aktywny przeciwko szczepom wirusa opornym na ritonawir **44** i nelfinawir **45**, nie wymaga częstego podawania leku i ze względu na bardzo wysoką aktywność, można było ograniczyć jego dawkę do jednej tabletki dziennie.⁸⁰ Podobnie działającym terapeutycznym jest fosamprenawir **49**, który w organizmie jest metabolizowany do amprenawiru **46**, jako faktycznie aktywnego leku. Dzięki temu amprenawir jest dłużej biodostępny, a stosowanie fosamprenawiru **49**, redukuje liczbę tabletek przyjmowanych przez chorego (w przypadku APV konieczność zażywania co 8 godzin⁸¹). Odkąd Fos-APV **49** stał się lekiem dostępnym dla pacjentów z AIDS (2003/2004r.), zaprzestano produkcji amprenawiru **46**.⁷⁰ Ostatni zaakceptowany przez FDA (2006r.) inhibitor PR, darunawir **51**, jest lekiem drugiej generacji. Wykazuje on aktywność przeciwko szczepom wirusa opornym na inne związki anty-PR i dzięki wysokiej aktywności, redukuje do jednej liczbę tabletek przyjmowanych dziennie przez chorych na AIDS. Te osiągnięcia niewątpliwie ułatwiały terapię pacjentom stosującym dotąd na przykład indinawir **43**, który jest wydalany z organizmu tak szybko, że muszą oni przyjmować każdą kolejną dawkę w odstępach cogodzinnych. Niestety, wraz z poprawą jakości leków rosną także koszty ich wytwarzania i terapii, które w przypadku leczenia DRV **51** wynoszą 9000\$ rocznie.^{82,83}

5.6. Politerapia HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*)

Postęp w badaniach nad patogenezą i terapią zakażeń HIV, doprowadził do opracowania metod leczenia hamujących proliferację wirusa w takim stopniu, że wiremia jest niewykrywalna nawet przez 2-3 lata. Uważa się, że kompleksowa terapia antywirusowa powinna hamować poszczególne etapy replikacji wirusa oraz wpływać wzmacniająco na odpowiedź immunologiczną.



Zgodnie z przyjętymi standardami, od 1996r. jednym z podstawowych podejść w leczeniu zakażeń HIV jest politerapia HAART (ang. *Highly Active Antiretroviral Therapy*; wysoce aktywna terapia antyretrowirusowa). Terapia HAART polega na jednoczesnym stosowaniu przez pacjenta co najmniej trzech leków przeciwwirusowych, najczęściej według schematu: dwa nukleozydowe inhibitory syntezy DNA i jeden nienukleozydowy inhibitor proteazy lub inhibitor odwrotnej transkryptazy. Terapię rozpoczyna się od równoczesnego zastosowania trzech leków, a leczenie prowadzi się zwykle do końca życia chorego.

Terapia HAART ma zapobiegać powstawaniu lekooporności. Zastosowanie trzech leków zmniejsza szansę powstania rodziny wirusów odpornych jednocześnie na trzy związki. Ponadto, dodatkowym celem HAART jest obniżenie toksyczności podawanych leków, przez zmniejszenie ich dawki. W rezultacie, u pacjentów poddanych leczeniu techniką HAART obserwuje się zahamowanie replikacji wirusa do stanu niewykrywalności i wzrost liczby limfocytów CD4. Wady politerapii HAART to wysokie koszty, brak całkowitej eliminacji wirusa z organizmu oraz liczne powikłania, jak zespół lipodystrofii, kwasica mleczanowa, odporność na insulinę i zmiany hepatotoksyczne. W przypadku pojawienia się skutków ubocznych rozważa się wybór innego schematu, lub stosuje się podejście tzw. Mega - HAART, czyli podanie dodatkowych dwóch, trzech leków i stosowanie ich z wcześniejszymi, albo zwiększa się dawkę. Testowano również podejście, w którym stosowano całkowite odstawienie leków na pewien okres czasu, celem odbudowy populacji wirusa nieopornego na lek, który w normalnym cyklu chorobowym przeważa, ale podejście to okazało się mało skuteczne.^{84,85,86}

5.7. Pronukleotydy

W związku z ograniczeniami stosowania analogów nukleozydów w terapii anty-HIV, zrodziła się idea pronukleotydów. Pronukleotydy są to proleki jako takie niewykazujące aktywności farmakologicznej, ale które w organizmie po chemicznych lub/i enzymatycznych przemianach uwalniają lub tworzą aktywne biologicznie związki, wywołujące pożądany efekt terapeutyczny. W tej koncepcji chodzi o dostarczenie do komórki 5'-fosforanu nukleozydu, po to by ominąć kluczowy i konieczny dla aktywności biologicznej, pierwszy etap fosforylacji ddN w komórce. Dostarczony 5'-fosforan nukleozydu powinien w sposób niezaburzony ulegać dalszym fosforylacjom do NTP (Schemat 5).⁸⁷

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

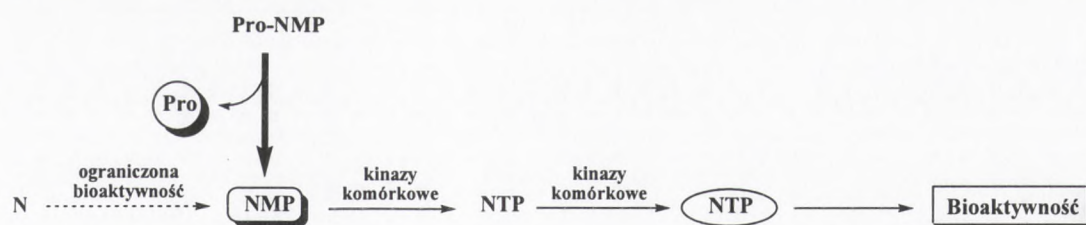
...

...

...

...

...



Schemat 5. Ogólna zasada działania pronukleotydów

5'-Fosforany nukleozydów w środowisku fizjologicznym ($\text{pH} = 7.4$) występują jako aniony i są zbyt hydrofilowe, aby pokonać bogatą w lipidy błonę komórkową. Obecność w płynach ustrojowych, i w komórkach fosfohydrolaz (fosfatazy, 5'-nukleotyduazy) powoduje, że mogą one być przekształcane w nukleozydy, co jest wysoce niepożądane. Po to, by umożliwić transport do komórek i działanie według koncepcji pronukleotyduowej, 5'-fosforany nukleozydów przeprowadza się w obojętne estry fosforanowe, stosując odpowiednie grupy maskujące resztę fosforanową. Dzięki temu, związki te mają szansę przenikać przez błony komórkowe, a wewnątrz komórki ulegać będą metabolizmowi do odpowiednich 5'-fosforanów nukleozydów. Idealny pronukleotyd powinien być zatem stabilny w środowisku zewnątrzkomórkowym i odpowiednio lipofilowy, aby w dyfuzji biernej pokonać błony biologiczne. Wewnątrz komórki pronukleotyd powinien szybko ulegać chemicznym lub/i enzymatycznym przemianom dostarczając aktywny nukleotyd, jednocześnie nie generując toksycznych metabolitów.⁸⁸

Podstawowe różnice w koncepcjach pronukleotydów anty-HIV polegają na sposobie dostarczenia i uwalniania 5'-monofosforanu nukleozydu w komórce. Wszystkie opisane w tej części rozprawy strategie uwalniania aktywnego leku i ich lipofilowych prekursorów, opierają się na różnych wariantach reakcji czysto chemicznych i tych wspomaganymi enzymami. W moim odczuciu, znalezienie tego najlepszego leku jest i jak sądzę będzie w najbliższym czasie motorem, jakże pożądanego rozwoju badań nad pronukleotydami anty-HIV oraz pewnie innych retrowirusów.

5.7.1. Estry fosforowe analogów nukleozydów

5.7.1.1. Alkilowe i aryłowe fosforanodiestry 2',3'- dideoksynukleozydów

Badania nad pronukleotydami rozpoczęto od fosforanodiestrów nukleozydów. Jest to może trochę dziwne, gdyż w samej koncepcji zakłada się, że związek powinien być lipofilowy i najlepiej bez ładunku ujemnego. Wszystkie fosforanodiestry są w warunkach fizjologicznych



Figure 1. A typical feedback control loop.

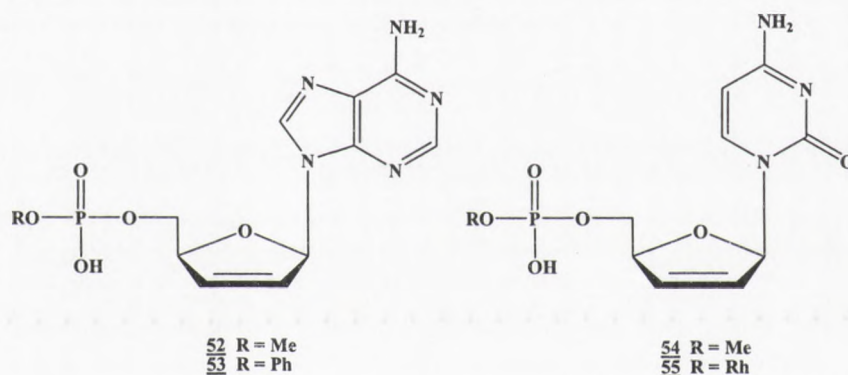
The first step in the design of a control system is to determine the desired performance. This is usually done by specifying the steady-state error, the settling time, and the overshoot. The next step is to choose a controller. There are many different types of controllers, but the most common are the proportional, integral, and derivative (PID) controllers. The PID controller is a good choice for many applications because it can be designed to meet a wide range of performance specifications. The final step in the design process is to tune the controller. This is done by adjusting the gains of the controller until the system meets the desired performance specifications.

There are many different methods for tuning a PID controller. One common method is the Ziegler-Nichols method. This method involves finding the ultimate gain and ultimate period of the system, and then using these values to calculate the PID gains. Another common method is the Cohen-Coon method. This method involves finding the process time constant and process dead time, and then using these values to calculate the PID gains. There are also many other methods for tuning a PID controller, and the choice of method depends on the specific application.

In addition to the PID controller, there are many other types of controllers that can be used. For example, the fuzzy logic controller is a type of controller that uses fuzzy logic to make control decisions. The neural network controller is another type of controller that uses a neural network to learn the control strategy. There are also many other types of controllers, and the choice of controller depends on the specific application. The design of a control system is a complex task, and it is important to choose the right controller and tune it properly to achieve the desired performance.

anionami, ale badania podejmowano z nadzieją, że jedno podstawienie na reszcie fosforanowej nukleotydu wystarczy do pokonania błon komórkowych, bądź też, że komórki uruchomią inne, nieznanne dotąd mechanizmy internalizacji, by związki te mogły się znaleźć w cytozolu. W latach 90-tych ubiegłego wieku ukazało się szereg prac opisujących ten typ potencjalnych pronukleotydów i pomimo, że wiele z tych koncepcji zasługuje na wyróżnienie, jeżeli chodzi o wartości poznawcze, to żaden z opisanych związków ze względów opisanych poniżej, nie „wyszedł” poza laboratoria.

Mullah i współpracownicy opisali, że w medium zawierającym 10% surowicy (RPMI/FCS), metylo i fenylo fosforanodiestry d4A **52**, **53** i d4C **54**, **55** (Rysunek 10) mogą działać jako proleki, gdyż generują odpowiednie nukleozydy i ich 5'-monofosforany. Jednakże wyniki aktywności anti-HIV wskazują, że związki te posiadają *in vitro* aktywność anti-HIV i cytotoksyczność porównywalną z odpowiednimi nukleozydami. Można więc sądzić, że pochodne **52** - **55** zewnątrzkomórkowo uwalniają jedynie d4T i d4A, a zatem nie działają jako pronukleotydy.⁸⁹

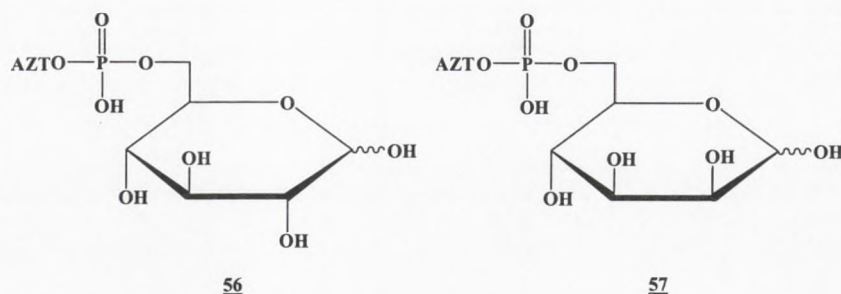


Rysunek 10

Spośród licznych strategii mających na celu pokonanie błony komórkowej przez fosforanodiestry, jednym z podejść jest wykorzystanie pochodnych węglowodanów (D-glukozy czy D-mannozy) na reszcie fosforanowej. Tego typu grupy mogą być bardzo pomocne przy internalizacji dołączonych do nich innych związków przez węglowodano - specyficzne receptory na powierzchni komórki. Wykazano, że fosforanodiestrowe pochodne **56** i **57** (Rysunek 11) posiadają mniejszą aktywność anti-HIV aniżeli AZT w 22 dniu poinfekcyjnym, ale są też mniej cytotoksyczne. Referencyjny AZT wykazuje $CC_{50} = 22 \mu\text{M}$ i $EC_{50} = 0.45 \mu\text{M}$ wobec HIV-1 w komórkach CEM-C113, podczas gdy w tych samych warunkach dla glukozo-6-fosforanodiestru AZT **56** wartości CC_{50} i EC_{50} wynoszą odpowiednio $35 \mu\text{M}$ i $0.9 \mu\text{M}$.⁹⁰ Związki te, nie posiadają zatem wyraźnego potencjału antywirusowego. Dodatkowo,

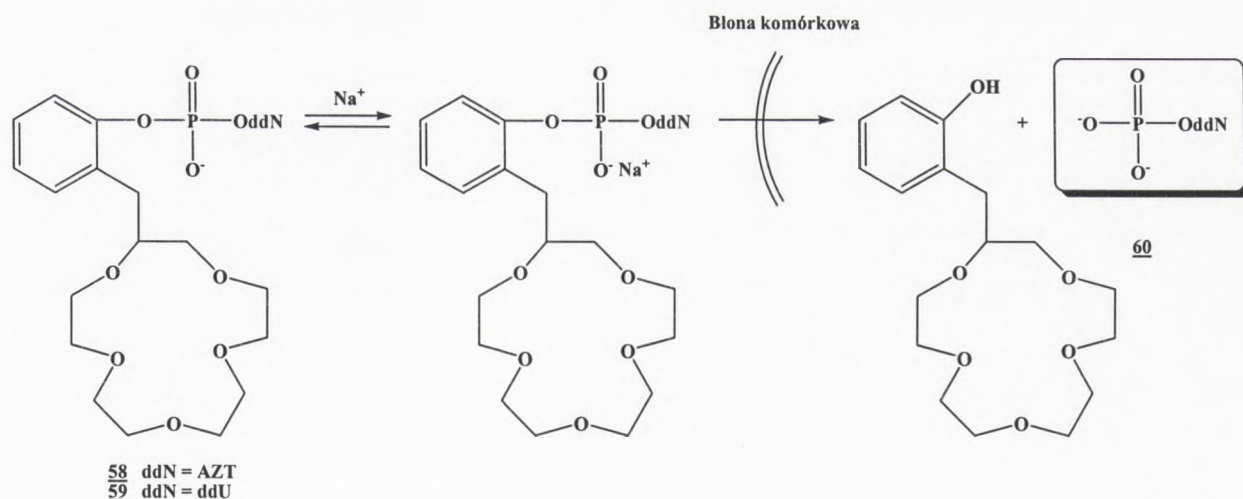


w późniejszych badaniach na ekstraktach komórkowych wykazano, że fosforanodiestry **56** i **57** ulegają niemal całkowitej hydrolizie do AZT⁹¹, co czyni je mało atrakcyjnymi w pronukleotyduwej koncepcji anty-HIV.



Rysunek 11

Inną klasą potencjalnych pronukleotydów są zaproponowane przez Morina pochodne nukleotydów, w których aryłowa grupa maskująca resztę fosforanową połączona jest z jonoforowym eterem 15-korona-5. Badania objęły 5'-fosforandiesterowe pochodne AZT **58** i ddU **59** (Schemat 6). Ze względu na obecność ładunku ujemnego związki te są hydrofilowe, jednak w wyniku asocjacji z kationem metalu powstaje lipofilowy kompleks jonowo – asocjacyjny, zdolny do pokonania dwuwarstwowej błony komórkowej. W konsekwencji wewnątrzkomórkowego rozszczepienia fosforanodiestru (**58** lub **59**) powstaje ddNMP **60**, który może być enzymatycznie ufosforylowany do bioaktywnego ddNTP. Autorzy przekonują, że w fizjologicznym pH związki te, jako aniony, będą rozpuszczalne w środowisku polarnym, a po asocjacji z kationem metalu utworzą neutralny i lipofilowy kompleks przenikający przez błony komórkowe (Schemat 6).



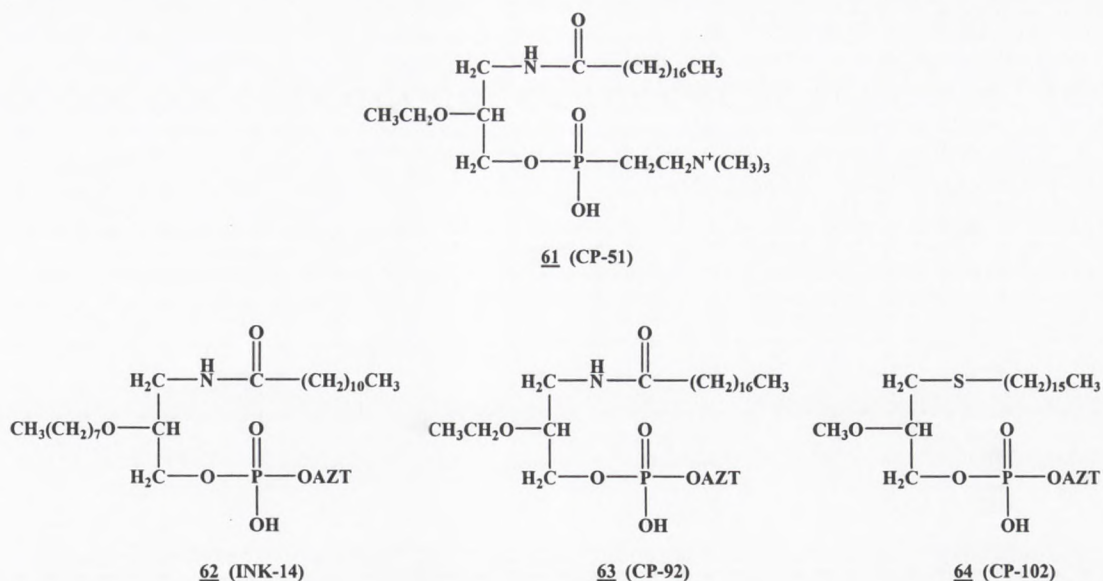
Schemat 6



W testach anty-HIV prowadzonych w komórkach CEM-SS okazało się jednak, że AZT **3** jest ponad 14 razy bardziej aktywny od związku **58**, choć pochodna **59** wykazuje w przybliżeniu 11 razy większą aktywność od ddU (**26**). Na podstawie wyników aktywności pochodnych ddU autorzy sugerują, że związki te mogą uwalniać w komórce aktywny 5'-monofosforan nukleozydu **60**, jednak nie zostały wykonane badania w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej (CEM/TK⁻), które potwierdziłyby te przypuszczenia.⁹²

Ciekawą grupą związków są opisane przez Kucerę i wsp. różne etero- lub tioetero-analogi lipidów, spośród których najwyższą aktywność przeciw HIV ($EC_{50} = 0.11 \mu\text{M}$, $SI = 130$) posiadała 1-oktadekanoamido-2-etoksypropylo-3-fosfocholina, CP-51 **61** (Rysunek 12). Te lipofilowe związki gromadzą się w błonie komórkowej T-limfocytów oraz monocytów/makrofagów, uniemożliwiając wiązanie się wirusa HIV do receptorów CD4.⁹³ Na tej podstawie zaproponowano fosforanodiestrowe pochodne będące kombinacją lipidowych analogów z antywirusowym AZT, **62** – **64** (Rys. 12). W tak zaprojektowanych związkach, lipofilowy charakter części lipidowej pochodnych **62** - **64** umożliwiałby ich przenikanie do komórki, wewnątrz której ulegałyby one rozkładowi do dwóch aktywnych cząsteczek. Badania aktywności anty-HIV prowadzone w komórkach CEM-SS wykazały, że fosforanodiester **62** (INK-14) posiada niższą od AZT aktywność przeciwko HIV ($EC_{50} = 0.08 \mu\text{M}$ vs $0.009 \mu\text{M}$), ale jest jednocześnie mniej cytotoksyczny ($CC_{50} = >100 \mu\text{M}$ vs $3.7 \mu\text{M}$). Jak tłumaczą autorzy, redukcja toksyczności wynika ze sposobu, w jakim uwalniany jest AZT w komórce. Przekraczając błonę komórkową, część lipidowa pochodnej **62** zostaje w niej zakotwiczona a związek jest wolno metabolizowany, generując AZT w stężeniach niższych w porównaniu gdy stosuje się nukleozyd jako taki. Konsekwencją tego jest znacznie wyższy indeks selektywności fosforanodiestrów **62** i **63** (CP-92) w porównaniu z AZT (odpowiednio > 1250 i 1793 dla **62** i **63** vs 411 dla AZT).^{93,94} Jeżeli jednak rezultatem rozkładu etero-lipidowych fosforanodiestrów miałyby być AZT, to związki te działają raczej jako nośniki nukleozydu, a nie jak zakłada koncepcja pronukleotydów, 5'-monofosforanu. Aby wyjaśnić możliwy sposób rozkładu tych związków w komórce, grupa Kucery zsyntetyzowała radioaktywny analog [³H]CP-102 tioetero-lipidowego fosforanodiestru CP-102 (**64**), który również posiada znacznie wyższy indeks selektywności anty-HIV ($SI = 1465$) w porównaniu z samym AZT.⁹⁴ Badania prowadzone w ekstraktach komórkowych (CEM-SS) wykazały jednak, że [³H]CP-102 jest enzymatycznie metabolizowany do AZTMP **60**, jako głównego nukleotydowego produktu⁹⁵, co może świadczyć o tym, że etero-lipidowe fosforanodiestry mają szansę działać jako pronukleotydy.





Rysunek 12

Wydaje się, że spośród licznych opisanych w literaturze fosforanodiesterowych potencjalnych pronukleotydów największą szansę na pokonanie błon biologicznych mają związki, w których aktywne cząsteczki przyłączone są do lipofilowego nośnika (np. wspomniane powyżej propozycje Kucery i wsp.). Dodatkowo, kombinacja dwóch aktywnych związków w tego typu prolekach może zmniejszyć ryzyko pojawienia się lekooporności czy zredukować toksyczność AZT. Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że silnie lipofilowy charakter leku może powodować lokalną biokumulację związku, co niesie ze sobą pojawienie się skutków ubocznych. Mimo wielu interesujących strategii, zdecydowana większość fosforanodiesterów projektowanych w koncepcji pronukleotydów raczej zawodzi, gdyż związki te działają głównie jako wehikuly nukleotydów.

5.7.1.2. Alkilowe i aryłowe fosforanotriestry 2',3'-dideoksynukleozydów

Częściowe niepowodzenia z fosforanodiesterowymi pochodnymi skłoniły do badań, nad wykorzystaniem fosforanotriesterów w strategii pronukleotydów. Ich aktywność antywirusowa byłaby ściśle uzależniona od zdolności uwalniania monofosforanu nukleozydu w komórce. Jako obojętne chemicznie cząsteczki, związki te powinny łatwo pokonywać błony komórkowe, a wewnątrz komórki ulegać rozkładowi do odpowiednich monofosforanów. Fosforanotriestry muszą być najpierw przekształcone do odpowiednich fosforanodiesterów, z których w wyniku dalszych reakcji powstaje pożądaný ddNMP. Ponieważ zarówno w surowicy jak i wewnątrz komórki nie istnieje jakakolwiek enzymatyczna aktywność fosforanotriestrowa, związki te na pierwszym etapie muszą ulec hydrolizie chemicznej. Można więc postulować, że etap ten,

The first part of the paper discusses the general theory of the firm, focusing on the relationship between the firm's production function and its cost function. It is shown that the firm's cost function is derived from its production function and the prices of its inputs. The second part of the paper discusses the firm's profit function, which is derived from its cost function and the price of its output. The firm's profit function is shown to be a concave function of the firm's output, and the firm's profit-maximizing output is determined by the equality of marginal revenue and marginal cost.

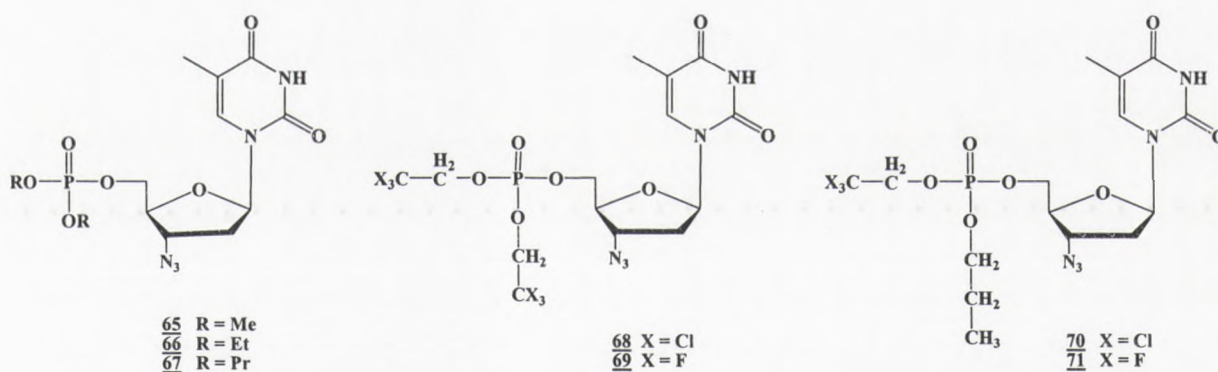
APPENDIX

In this appendix, we derive the firm's cost function from its production function. Let the firm's production function be given by $Q = f(K, L)$, where Q is the firm's output, K is the firm's capital input, and L is the firm's labor input. Let the firm's cost function be given by $C = C(Q, K, L)$, where C is the firm's total cost, Q is the firm's output, K is the firm's capital input, and L is the firm's labor input. The firm's cost function is derived from its production function and the prices of its inputs, r and w .

The firm's cost function is derived from its production function and the prices of its inputs, r and w . The firm's cost function is a function of the firm's output, Q , and the prices of its inputs, r and w . The firm's cost function is derived from its production function and the prices of its inputs, r and w . The firm's cost function is a function of the firm's output, Q , and the prices of its inputs, r and w .

przynajmniej częściowo, decyduje o sukcesie całej koncepcji pronukleotydu. Dalej, projektowany fosforanotriester musi być odpowiednio stabilny w medium fizjologicznym, aby jako taki wniknął do zakażonej komórki, wewnątrz której będzie ulegał selektywnym biotransformacjom do formy aktywnej biologicznie. Dlatego, przy projektowaniu fosforanotriestrów o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym, sprawą najwyższej wagi jest dobór odpowiednich grup maskujących resztę fosforanową.

Różne alkilowe i aryłowe fosforanotriestry nukleozydów były badane przez grupę C. McGuigana (Rysunek 13). W przypadku prostych dialkilowych fosforanotriestrów (**65** - **67**) stwierdzono całkowity brak aktywności antywirusowej.⁹⁶ Niektóre halogenoalkilowe fosforanotriestry, jak na przykład AZT 5'-O-bis(2,2,2-trifluoroetylo) fosforan **69** wykazują widoczną aktywność przeciwko HIV ($EC_{50} = 0.4 \mu\text{M}$; dla AZT $EC_{50} = 0.004 \mu\text{M}$). Wprowadzenie atomu halogenu do łańcucha alkilowego poprawia aktywność anti-HIV związków, przez zwiększenie labilności grup fosfoestrowych. Fosforanotriestrowe pochodne z tylko jedną grupą trihalogenoetylową **70** i **71** są jednak 4-10 razy mniej aktywne. Pomimo że bis(trihalogenoetylo) fosforanotriestry AZT **68** i **69** wykazują najwyższą aktywność przeciwwirusową w tej grupie, to są one nadal stukrotnie mniej aktywne aniżeli AZT.⁹⁷



Rysunek 13

McGuigan w mocno ograniczonym zakresie badał również diaryłowe fosforanotriestry AZT. W przypadku tych związków, aktywność antywirusowa była silnie związana z naturą aryłowego podstawnika, a w szczególności z obecnością w pierścieniu grup silnie wyciągających elektrony. Efekt ten ujawnił się w wysokich aktywnościach anti-HIV związków **73** i **74** ($EC_{50} \approx 0.0032 \mu\text{M}$) w porównaniu do AZT **3** ($EC_{50} = 0.008 \mu\text{M}$)^{98,99,100} [Rysunek 14].

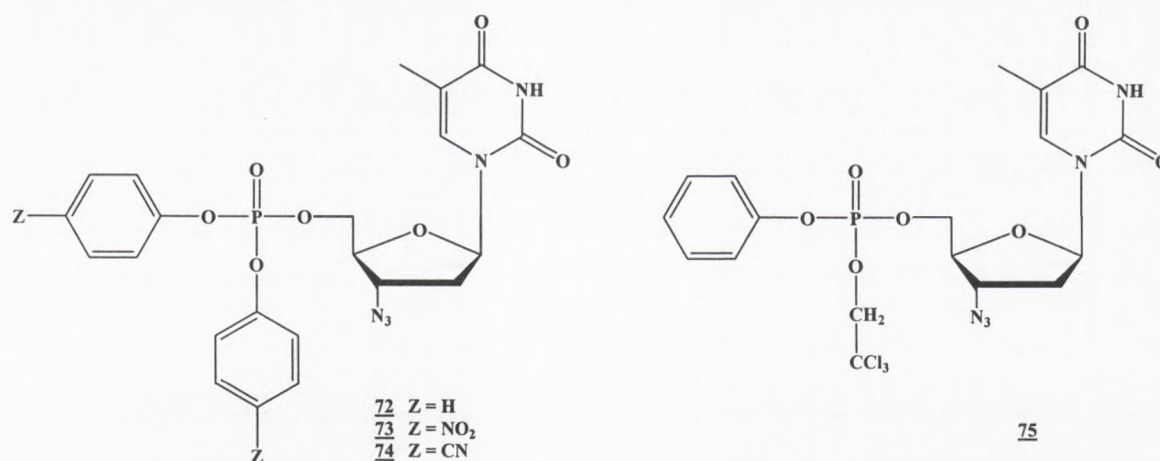
The first part of the paper describes the synthesis of the copolymers and the results of the copolymerization. The second part describes the characterization of the copolymers by infrared, ultraviolet, and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The third part describes the thermal stability of the copolymers.

The copolymers were prepared by the free-radical copolymerization of styrene and acrylonitrile in benzene solution at 60°C. The copolymerization was carried out in the presence of benzoyl peroxide as initiator. The copolymerization was carried out in the presence of benzoyl peroxide as initiator. The copolymerization was carried out in the presence of benzoyl peroxide as initiator.



Fig. 1. Copolymers I, II, and III.

The copolymers were prepared by the free-radical copolymerization of styrene and acrylonitrile in benzene solution at 60°C. The copolymerization was carried out in the presence of benzoyl peroxide as initiator. The copolymerization was carried out in the presence of benzoyl peroxide as initiator.



Rysunek 14

Poszukując korelacji można zaobserwować, że aktywność była odwrotnie proporcjonalna do pKa fenolu, co oznacza, że bardziej kwasowy fenol będzie lepszą grupą odchodzącą (stabilizacja energią rezonansu) i będzie zwiększać labilność wiązania P-O-Ar. Diarylowe fosforanotriestry z podstawnikami silnie wyciągającymi elektrony (*para*-NO₂ lub -CN) **73** i **74** były bardziej aktywne anty-HIV aniżeli niepodstawiony diarylowy fosforanotriester **72**, ponieważ są one bardziej podatne na hydrolizę, generując 5'-monofosforan nukleozydu.^{98,99} Jednakże McGuigan doniósł, że fosforanotriestry **73** i **74** są wyjątkowo słabymi inhibitorami replikacji wirusa (EC₅₀ > 100 μM) w komórkach, w których występuje deficyt kinazy tymidynowej (CEM/TK⁻). Jest to dowód na to, że najbardziej aktywne związki są raczej pronukleozydami, gdyż zanim dotrą do komórki, ulegają zewnątrzkomórkowej chemiczno-enzymatycznej przemianie do odpowiednich nukleozydów. Co więcej, aktywność anty-HIV związku **73** traci wartość terapeutyczną ze względu na jego wysoką toksyczność obserwowaną już przy tak niskim stężeniu jak 40 μM, co tłumaczy się uwalnianiem cytotoksycznego *para*-nitrofenolu.¹⁰⁰

Związki **67** (z dwoma fenyłowymi podstawnikami) i **70** (z fenyłowymi i trichloroetylowym podstawnikiem) wykazują podobną antywirusową aktywność w komórkach C8166, (odpowiednio EC₅₀ = 0.3 μM i 0.2 μM dla **67** i **70**). Podstawniki te wpływają na poprawę aktywności anty-HIV związków, w porównaniu z prostymi alkilowymi grupami, których pochodne jak wcześniej wspominałam są nieaktywne.^{98,100}

5.7.1.3. Cyklosaligenianowe (*CycloSal*) fosforanotriestry 2',3'-dideoksynukleozydów

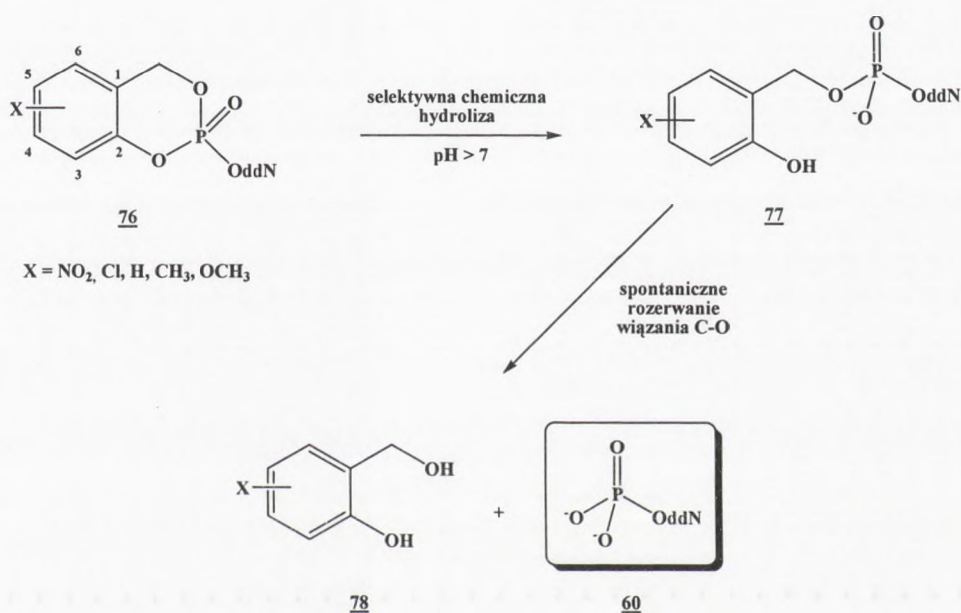
Całkowicie nowymi pronukleotydamy były zaprojektowane przez Meiera fosforanotriestry ulegające selektywnej i zależnej od pH hydrolizie. W odróżnieniu od innych



Figure 14

The following text is extremely faint and largely illegible. It appears to be a multi-paragraph document, possibly a report or a technical manual. The text is arranged in several paragraphs, with some lines indented. The content is difficult to discern but seems to follow a standard narrative or descriptive structure. The text is located in the lower two-thirds of the page, below the diagram and its caption.

koncepcji fosforanotriestrowych proleków, idea *cycloSal* opiera się na dostarczeniu do komórki ddNMP poprzez kontrolowaną, chemiczną hydrolizę lipofilowego fosforanotriestru, zawierającego w strukturze swej cząsteczki dwa rodzaje wiązań fosforoestrowych: fenylo- i benzyloestrowe **76** (Schemat 7). koncepcja tych potencjalnych pronukleotydów bazuje na różnicach w stabilności tych fosforoestrowych wiązań. Wiązanie fenyloestrowe jest bardziej labilne, dlatego w pierwszej kolejności ulega ono rozerwaniu z wytworzeniem 2-hydroksybenzylofosforanodiestru 2',3'-dideoksynukleozydu **77**. Następnie, w wyniku spontanicznego rozerwania wiązania C-O w fosforoestrowej grupie benzylowej, powstaje pożądaný monofosforan nukleozydu **60** oraz alkohol salicylowy **78** (Schemat 7).¹⁰¹



Schemat 7

Jak podkreślają autorzy, w odróżnieniu od wielu innych pronukleotydów, w trakcie hydrolizy *cycloSal* nukleotydów nie powstają toksyczne metabolity. Co warto podkreślić to fakt, że oba etapy przekształcania *cycloSal* fosforanotriestru **76** do ddNMP **60** (Schemat 7), zachodzą wyłącznie na drodze chemicznej hydrolizy, bez udziału enzymów komórkowych. Takie uniezależnienie od enzymów, w transformacji **76** → ddNMP **60**, może być traktowane jako zaleta *cycloSal* pronukleotydów typu **76**. Ponadto, związki te charakteryzuje znaczna lipofilowość, przez co są zdolne do dyfuzji przez błony komórkowe czy przenikanie przez BBB, i pomimo wysokiej lipofilowości są również dość dobrze rozpuszczalne w wodzie. Liczne eksperymenty prowadzone w różnych wodnych buforach, w medium hodowlanym komórek - RPMI, czy w RPMI zawierającym 10% surowicy z płodów cielęcych (FCS), potwierdziły

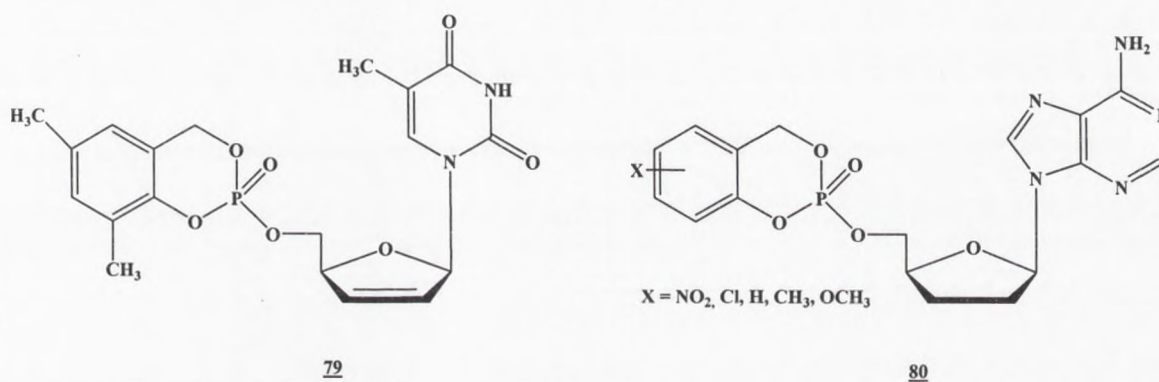
The first part of the paper is devoted to a review of the literature on the effects of the environment on the development of the human brain. The second part is devoted to a review of the literature on the effects of the environment on the development of the human brain. The third part is devoted to a review of the literature on the effects of the environment on the development of the human brain. The fourth part is devoted to a review of the literature on the effects of the environment on the development of the human brain. The fifth part is devoted to a review of the literature on the effects of the environment on the development of the human brain. The sixth part is devoted to a review of the literature on the effects of the environment on the development of the human brain. The seventh part is devoted to a review of the literature on the effects of the environment on the development of the human brain. The eighth part is devoted to a review of the literature on the effects of the environment on the development of the human brain. The ninth part is devoted to a review of the literature on the effects of the environment on the development of the human brain. The tenth part is devoted to a review of the literature on the effects of the environment on the development of the human brain.



The following table shows the results of the experiment. The first column shows the number of subjects in each group. The second column shows the number of correct responses. The third column shows the number of incorrect responses. The fourth column shows the number of subjects who were correct on all trials. The fifth column shows the number of subjects who were correct on at least one trial. The sixth column shows the number of subjects who were correct on at least two trials. The seventh column shows the number of subjects who were correct on at least three trials. The eighth column shows the number of subjects who were correct on at least four trials. The ninth column shows the number of subjects who were correct on at least five trials. The tenth column shows the number of subjects who were correct on at least six trials. The eleventh column shows the number of subjects who were correct on at least seven trials. The twelfth column shows the number of subjects who were correct on at least eight trials. The thirteenth column shows the number of subjects who were correct on at least nine trials. The fourteenth column shows the number of subjects who were correct on at least ten trials.

postulowany mechanizm degradacji nukleotydów *cycloSal*, zachodzący według zależnej od pH chemicznej hydrolizy.

Efektywność przeciwwirusowa cyklsaligenianowych fosforanotriestrów była badana dla pochodnych różnych analogów nukleozydów, jak ddT, d4T, ddA, czy AZT. W większości przypadków, związki te wykazują porównywalną lub wyższą aktywność przeciwko HIV-1 i HIV-2 (komórki CEM/O) od odpowiednich nukleozydów. Szczególnie dobre wyniki aktywności anti-HIV uzyskano dla pochodnych 3- i 5-metylo- oraz 3,5-dimetylo-*cycloSal*-d4T (**79**) fosforanotriestrów ($EC_{50} = 0.09 \mu\text{M}$ dla **79**; $EC_{50} = 0.18 \mu\text{M}$ dla d4T **6**) [Rysunek 15]. Dodatkowo, badania na liniach komórkowych z deficytem kinazy tymidynowej (CEM/TK) dowodzą, że związki te działają jako pronukleotydy, dostarczając d4TMP do komórki.^{87,101}



Rysunek 15

Koncepcja *cycloSal* została również z sukcesem zastosowana dla pochodnych ddA. Cyklosaligenianowe fosforanotriestry ddA **80** (Rysunek 15) wykazują bardzo wysoką aktywność przeciwwirusową w komórkach CEM/O ($EC_{50} = 0.03 \mu\text{M}$), ponad stukrotnie wyższą niż ddA **20** ($EC_{50} = 3.17 \mu\text{M}$) i 15 razy wyższy indeks selektywności w porównaniu z jako takim nukleozydem. Stwierdzono, że pochodne ddA typu **80** są całkowicie odporne na enzymatyczną deaminację z udziałem deaminazy adenozynowej (ADA) czy deaminazy adenozyłomonofosforanowej⁸⁷, dzięki temu biologiczna aktywność tych związków ujawnia się bezpośrednio, z pominięciem szlaku „inozynowego” (Schemat 4). Pronukleotydowe podejście *cycloSal* było również zastosowane do AZT. Co jest godne zauważenia to fakt, że *cycloSal*-AZT fosforanotriestry okazały się słabo aktywne lub nieaktywne w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej (CEM/TK).¹⁰² Nie znalazłam w literaturze wyjaśnienia tej dość dziwnej anomalii, tym bardziej zaskakującej, że takie same (w części fosforowej) pochodne d4T czy ddA wykazały w komórkach TK⁻ wyjątkowo wysoką aktywność anti-HIV, dowodząc swojego pronukleotydowego sposobu działania. Ta trudna do wytłumaczenia, ale niezwykle intrygująca,



odmienność właściwości pochodnych AZT może być swoistym sygnałem, nakazującym dużą ostrożność w ocenie przydatności badanego związku jako potencjalnego leku, gdyż może się tak zdarzyć, że pierwsze bezkrytycznie przyjęte wyniki mogą wyeliminować, być może cenne, kandydatury na nowy lek.

5.7.2. 2',3'-Dideoksynukleozydo fosforanotriestry z grupami fosforoestrowymi, których usuwanie inicjowane jest enzymatycznie

W komórce, ze względu na brak odpowiednich enzymów, większość fosforanotriestrów hydrolizowana jest chemicznie, na drodze ataku cząsteczki wody na atom fosforu. Trwałość takich związków zależy wyłącznie od reaktywności centrum fosforowego lub też innych czynników natury fizykochemicznej, np. zawady przestrzennej centrum reakcyjnego. Znacznym poszerzeniem koncepcji pronukleotydu w tym kontekście były związki, których labilność zależna była od reakcji zachodzących w grupach maskujących reszty fosforowe, i to reakcji inicjowanych enzymami. Uwalniane w reakcjach wspomaganych enzymami reaktywne ugrupowania, wyzwały kaskadę reakcji odsłaniających resztę fosforową nukleotydu. Związki działające na tej zasadzie nazwano pronukleotydami biolabilnymi lub bioaktywowanymi.⁸⁸

5.7.2.1. Bis(*S*-acylo-2-tioetylo) fosforanotriestry 2',3'-dideoksynukleozydów (SATE)

Zaproponowane przez grupę Imbacha pronukleotydy SATE typu **86** (Schemat 8), posiadają w swej strukturze labilizowane enzymatycznie *S*-acylo-2-tioetylowe grupy maskujące resztę fosforanową. Pierwsze badania nad przydatnością anti-HIV pochodnych bis(SATE), zostały przeprowadzone na pochodnych AZT. Zaprojektowano i badano różne bis(*S*-acylo-2-tioetylo) fosforanotriestry AZT, jak **81** - **83** (Rysunek 16). W badaniach *in vitro* wszystkie te pochodne wykazały wysoką aktywność anti-HIV. Wobec zmierzonego w komórkach CEM-SS $EC_{50} = 0.006 \mu\text{M}$ dla AZT, wartości te dla wspomnianych fosforanotriestrów **81**, **82** i **83** wynoszą odpowiednio 0.022, 0.046 i 0.015 μM . W odróżnieniu jednak od AZT, związki **81** - **83** okazały się być inhibitorami replikacji HIV w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej CEM/TK⁻, w zakresie stężeń EC_{50} 0.049 - 0.52 μM , przy czym **81** wyłonił się jako najlepszy potencjalny inhibitor, posiadając najwyższy indeks selektywności (> 2500).¹⁰³

Wyższa aktywność anti-HIV większości bis(SATE) nukleotydów w porównaniu z ich nukleozydami, została stwierdzona w różnych komórkach, jak CEM-SS, MT-4 (ludzkie T - limfocyty), w monocytach krwi obwodowej (PBM), makrofagach i CEM/TK⁻, co dowodziło, że bis(SATE)-5'-fosforan nukleozydu był wprowadzany jako taki do tych komórek. Bis(SATE) fosforanotriester d4T **84** (Rys. 16) wykazał znacznie wyższą aktywność antywirusową w porównaniu z d4T, zwłaszcza w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej (dla **84**

The first part of the paper discusses the general theory of the model. It is shown that the model is well-posed and that the solution is unique. The second part of the paper discusses the numerical solution of the model. It is shown that the numerical solution is stable and that the error is of order $O(\Delta t^2)$.

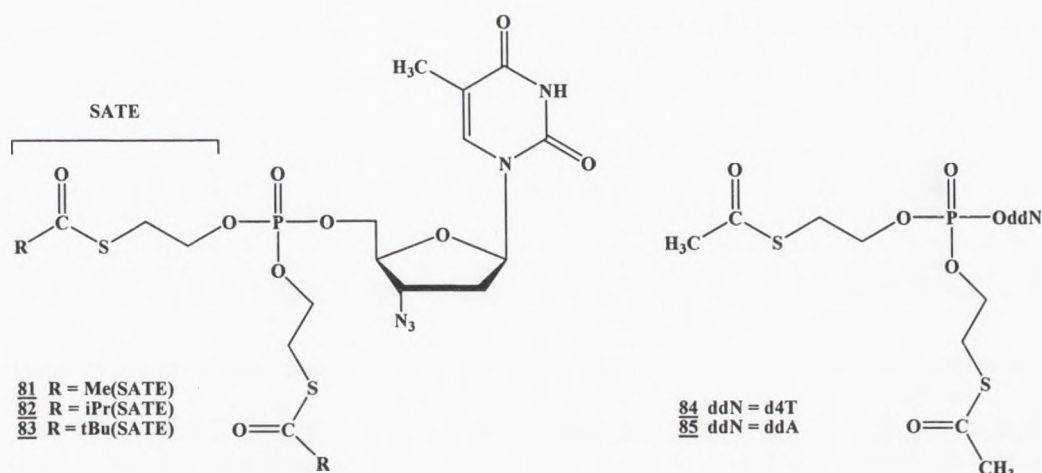
2.1. The general theory of the model

The general theory of the model is based on the following assumptions: (i) the domain is bounded and connected; (ii) the boundary is smooth; (iii) the initial data is smooth; (iv) the forcing term is smooth. Under these assumptions, it is shown that the model is well-posed and that the solution is unique. The proof is based on the energy method and the Gronwall inequality.

2.2. The numerical solution of the model

The numerical solution of the model is based on the finite difference method. The spatial domain is discretized with a grid of size Δx and the time domain is discretized with a time step of size Δt . The numerical solution is shown to be stable and that the error is of order $O(\Delta t^2)$. The numerical solution is compared with the exact solution and it is shown that the numerical solution is in good agreement with the exact solution.

$EC_{50} = 0.011 \mu\text{M}$ a $SI = 5456$ vs 8.3 dla d4T, komórki CEM/TK⁻).¹⁰⁴ Wysoki potencjał antyretrowirusowy obserwowano także w przypadku bis(SATE) pochodnych ddA. Szczególnie dobre wyniki otrzymano dla bis(MeSATE) fosforanotriestru ddA **85** ($EC_{50} = 0.00056 \mu\text{M}$ vs $EC_{50} = 0.54 \mu\text{M}$ dla ddA, komórki CEM-SS). Pomimo, że **85** (Rys. 16) posiadał widoczną cytotoksyczność ($CC_{50} = 24 \mu\text{M}$), to jego indeks selektywności pozostawał nadal bardzo wysoki ($SI = 42860$)¹⁰⁴.



Rysunek 16

Mechanizm, według którego bis(SATE) fosforanotriestry ddN typu **86** są przekształcane w ddNMP **60** (Schemat 8) polega na tym, że w pierwszym etapie następuje katalizowana karboksyesterazą hydroliza tioestrowej reszty w jednej z grup SATE i powstaje niestabilny 2-merkaptotiofosforanotriester **87**. Związek ten, wskutek nukleofilowego ataku anionu tiolanowego (miękką zasadą) z pozycji β na tetraedyczny atom węgla α (miękki kwas), spontanicznie rozpada się, uwalniając episiarczek **88** i mono(SATE) fosforanodiester ddN **89**. Aby powstał 5'-monofosforan nukleozydu **60**, fosforanodiester **89** może być hydrolizowany przez wewnątrzkomórkowe fosfodiesterazy lub alternatywnie, może ulec (analogicznie do pierwszego etapu) hydrolizie inicjowanej przez karboksyesterazy, jak powyżej. Katalizowana enzymami hydroliza estru karboksylowego przebiega jednak znacznie wolniej, gdyż posiadające ładunek fosforanodiestry **89** nie są już tak dobrymi substratami dla karboksyesteraz, jak lipofilowe fosforanotriestry. Dodatkowo, obecność ładunku ujemnego znacznie redukuje efektywność wewnątrzcząsteczkowej substytucji nukleofilowej, koniecznej do rozerwania wiązania C-O w estrze fosforowym. Ostatecznie, 5'-fosforanomonoester ddN **60** zostaje utworzony z 2-merkaptotiofosforanodiestru **90** przez spontaniczne, ale wolne, utworzenie

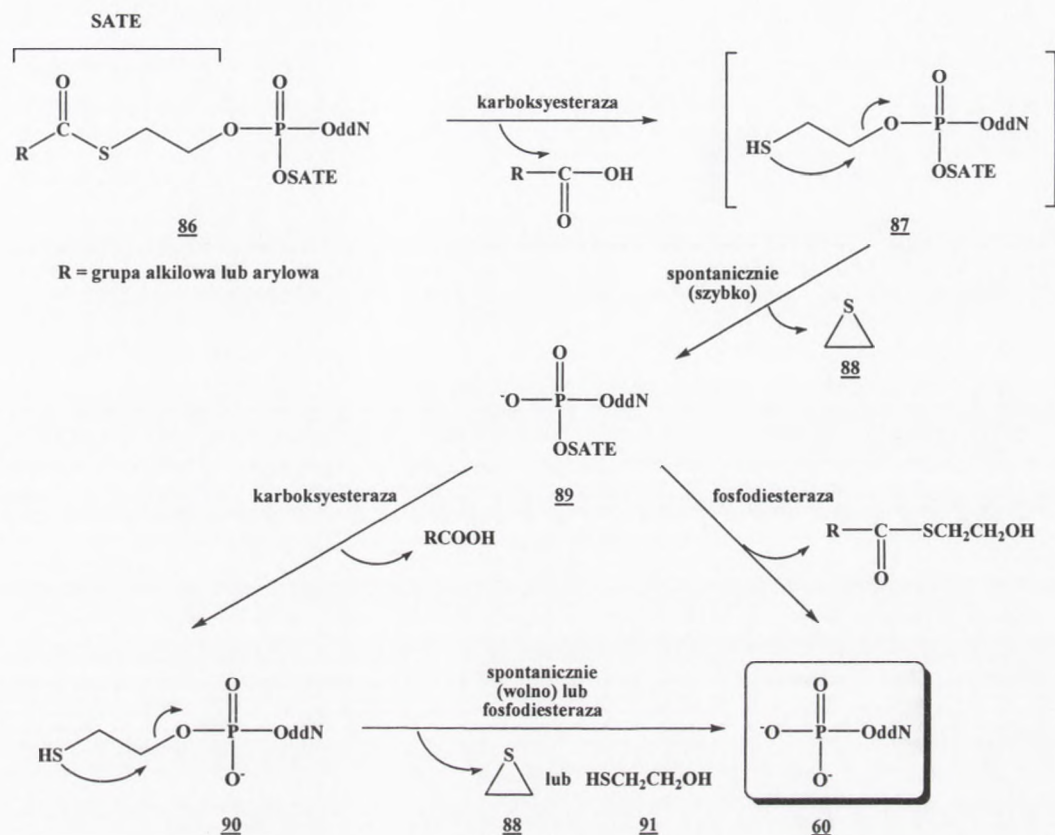
The first part of the report deals with the general situation in the country during the year 1950-1951. It is noted that the economy has shown a marked improvement over the previous year, with a steady increase in production and a corresponding rise in the standard of living. The government has taken various measures to stabilize the economy and to promote growth, and these efforts have been largely successful.



Figure 1

The second part of the report discusses the specific measures taken by the government to address the economic challenges of the year. These include the implementation of a new tax system, the expansion of public works programs, and the introduction of price controls in certain key sectors. The government has also focused on improving infrastructure and promoting agricultural development. These policies have helped to reduce inflation, create jobs, and increase the overall productivity of the economy. The report concludes that the government's actions have been effective in stabilizing the economy and setting the stage for long-term growth.

episiarczku (jak w pierwszym etapie) lub z uwolnieniem tioetanolu **91**, na skutek działania na **90** komórkowych fosfodiesteraz.¹⁰⁵



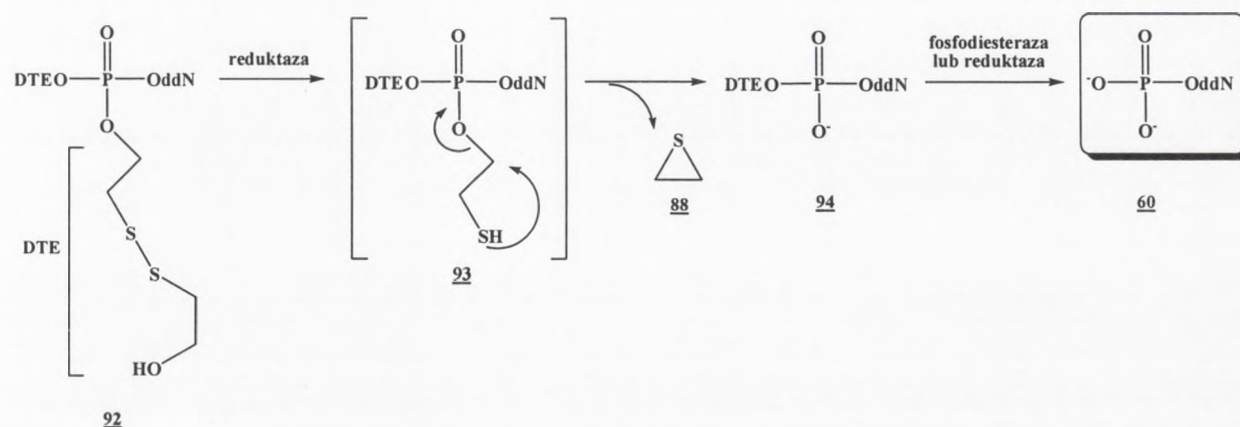
Stabilność pronukleotydów posiadających różne grupy SATE zależy ściśle od rodzaju reszty tioestrowej. Najbardziej labilne, *S*-acetylo-2-tioetylowe (MeSATE) pochodne, posiadały najwyższą aktywność przeciwko HIV, natomiast najbardziej optymalną stabilność, przy zachowaniu wciąż wysokiej aktywności anti-HIV, wykazały fosforanotriestry z lipofilowymi *S*-piwaloilo-2-tioetylowymi grupami (*t*BuSATE).¹⁰⁵

Pomimo mocno zadowalającego działania bis(SATE) pronukleotydów jako związków przeciwwirusowych, ich wadą jest cytotoksyczność powodowana rozpadem reszt SATE, skutkiem którego generowane są toksyczne metabolity, jak kwasy karboksylowe i episiarczki. Jednakże właściwości anti-HIV pronukleotydów bis(SATE), takie jak wysoka aktywność w komórkach normalnych i TK⁻, działanie pronukleotydowe i przekraczanie bariery krew - mózg powodują, że związki te są atrakcyjnymi obiektami dla przemysłu farmaceutycznego, który sponsoruje daleko już zaawansowane badania kliniczne.



5.7.2.2. Bis(ditioetylo) fosforanotriestry 2',3'-dideoksynukleozydów (DTE)

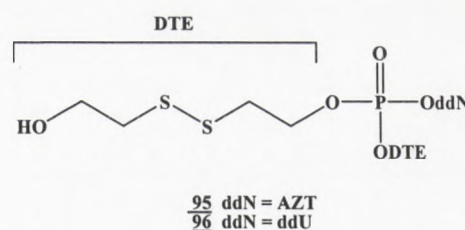
Koncepcja bis(ditioetylo) fosforanotriestrów nukleozydów typu **92** (Schemat 9) również powstała w zespole Imbacha i jest ona podobna w wielu punktach do opisanych powyżej SATE pronukleotydów.¹⁰⁴



Schemat 9

Rozkład bis(DTE) analogów **92** do ddNMP **60** inicjowany jest przez komórkowe reduktazy, które rozrywają wiązanie disiarczkowe (Schemat 9). W rezultacie powstaje niestabilny 2-merkaptioetylo fosforanoester **93**, z którego po wewnątrzcząsteczkowym przegrupowaniu uwalniany jest episiarczek **88**. MonoDTE fosforanodiester **94** może następnie ulec hydrolyzowi za pośrednictwem fosfodiesteraz albo analogicznie jak w pierwszym etapie, rozkładać się z udziałem reduktaz, generując w obu przypadkach 5'-monofosforan nukleozydu **60** (Schemat 9).

Bis(DTE) fosforanotriester AZT **95** (Rysunek 17) wykazał niższy potencjał anti-HIV aniżeli AZT w komórkach CEM-SS ($EC_{50} = 0.023 \mu\text{M}$; dla AZT $EC_{50} = 0.006 \mu\text{M}$), ale nie jest cytotoksyczny ($CC_{50} = > 100 \mu\text{M}$). Ponadto zachowuje wysoką aktywność antywirusową w komórkach CEM/TK⁻, w których AZT jest całkowicie nieaktywny. Dodatkowo, bis(DTE) fosforanotriester ddU **96**



Rysunek 17

(Rys. 17) okazał się być znacznie bardziej aktywny przeciwko HIV-1 niż ddU w komórkach CEM-SS i CEM/TK⁻ dowodząc, że bis(DTE) pochodne nukleotydy dostarczają do komórek 5'-monofosforan nukleozydu **60** i są pronukleotydami.^{104,106}

... ..

... ..

... ..

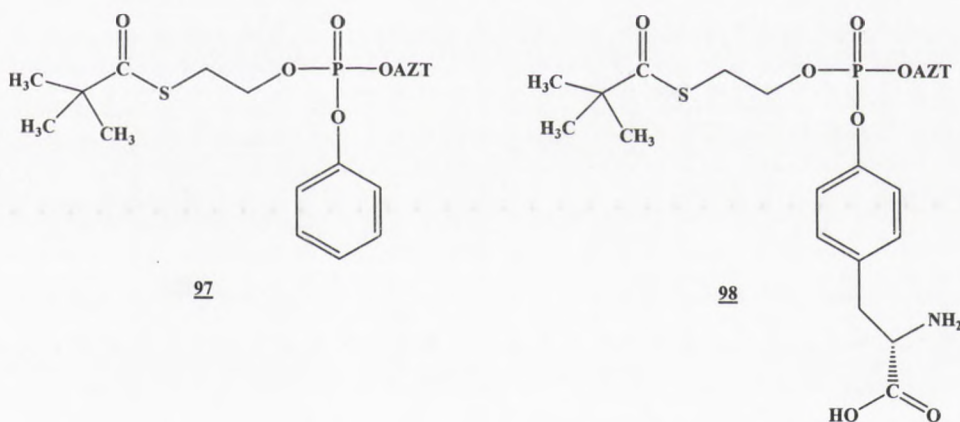
... ..

... ..

5.7.2.3. Arylo (*S*-piwaloilo-2-tioetylo) fosforanotriestry 2',3'-dideoksynukleozydów [mono(SATE)]

Ze względu na trudność przekształcania na drugim etapie bis(SATE) fosforanotriestrow w ddNMP (**60**), badano również związki posiadające obok grupy SATE inną grupę fosforoestrową. W zespole Imbacha otrzymano serię mieszanych związków, zawierających jedną grupę maskującą SATE, a drugą, usuwaną w inny sposób niż SATE. W tej koncepcji zaproponowano dwa rodzaje pochodnych mono(SATE), posiadających albo estrową grupę aryłową – arylo SATE fosforanotriestry, albo posiadającą obok SATE ugrupowanie fosforoamidowe, np. pochodną aminokwasową - SATE amidofosforanodiestry, opisane w dalszej części rozprawy (5.7.4.1).¹⁰⁷

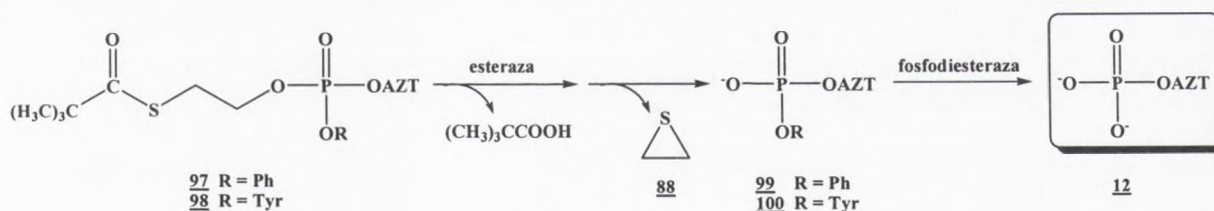
Koncepcja arylo SATE fosforanotriestrow analogów nukleozydów opierała się na znacznym powinowactwie nukleotydocowych fosforanodiesteraż do aryłowych substratów fosforodiestrowych, które mogą być hydrolizowane przez te enzymy do ich odpowiednich fosforanomonoestrów. Pierwszymi otrzymanymi i przebadanymi związkami z tej klasy były fenilo *S*-piwaloilo-2-tioetylo i *L*-tyrozynylo *S*-piwaloilo-2-tioetylo fosforanotriestry AZT (**97** i **98**)¹⁰⁷ [Rysunek 18].



Rysunek 18

Proponowany mechanizm rozkładu związków **97** i **98** do AZTMP **12** w komórce przebiega przez rozkład karboksytioestrowej reszty SATE, dzięki aktywności esterazowej i spontaniczne uwolnienie episiarczku **88**. W kolejnym etapie powstały arylo fosforanodiestry AZT (**99** i **100**) ulega hydrolizie do pożądanego 5'-fosforanomonoestru AZT **12** (Schemat 10), z udziałem komórkowej fosfodiesterazy.¹⁰⁵





Schemat 10

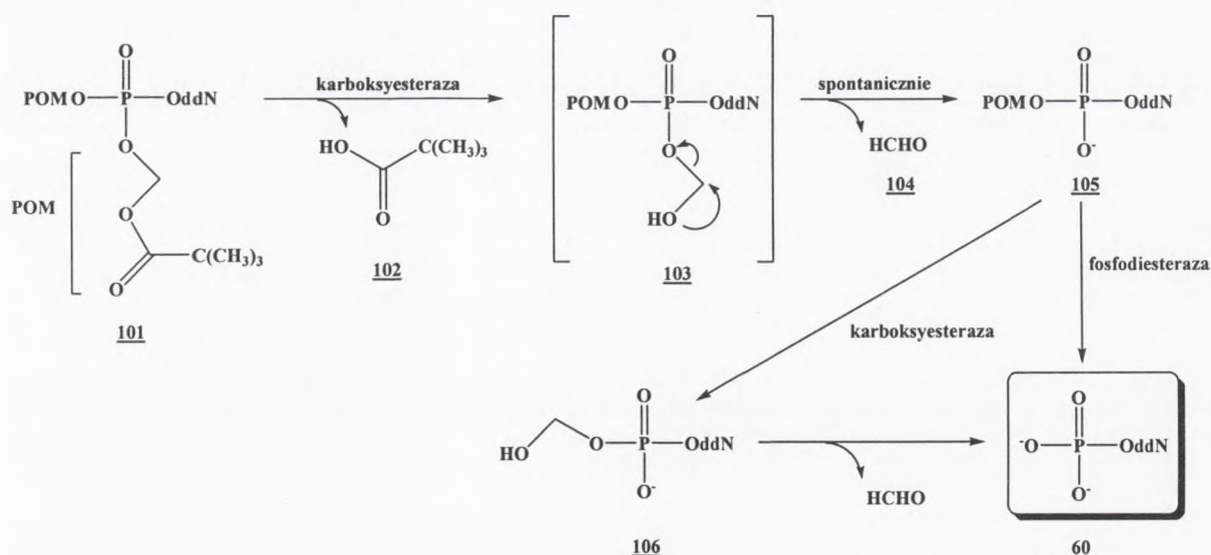
Oba arylo SATE fosforanotriestry AZT (**97** i **98**) są stabilne w medium hodowlanym komórek ($t_{1/2} \geq 3$ dni), podczas gdy łatwo ulegają rozkładowi w ekstraktach komórkowych, co jest zgodne z pronukleotydową koncepcją. Zarówno fenylo *t*BuSATE jak i L-tyrozylo *t*BuSATE fosforanotriestry AZT wykazują potencjał aktywności anty-HIV porównywalny do AZT ($EC_{50} = 0.001, 0.006, 0.006 \mu\text{M}$ odpowiednio dla **97**, **98** i AZT **3**) w komórkach CEM-SS. Jednakże w odróżnieniu od AZT, związki te wykazują aktywność w komórkach z deficytem kinazy komórkowej CEM/TK, z wartościami $EC_{50} = 3.5$ i $29 \mu\text{M}$ odpowiednio dla **97** i **98**, podczas gdy AZT **3** jest całkowicie nieaktywny w tych komórkach, nawet przy wysokich stężeniach (ponad $100 \mu\text{M}$).¹⁰⁷

5.7.2.4. Bis(piwaloiloksymetylo) fosforanotriestry 2',3'-dideoksynukleozydów (POM)

Opisane po raz pierwszy przez D. Farquhara i współpracowników bis(piwaloiloksymetylo) fosforanotriestry analogów nukleozydów typu **101** (Schemat 11) są nieco inną od pochodnych SATE, kolejną klasą pronukleotydów, wykorzystujących wewnątrzkomórkową aktywność enzymatyczną dla zainicjowania procesu powstania aktywnego leku.

Rozkład pochodnych bis(POM) **101** do 5'-fosforanu nukleozydu **60** (Schemat 11) rozpoczyna się usunięciem kwasu piwaloilowego **102** z jednej z grup maskujących resztę fosforanową, w reakcji katalizowanej przez karboksyesterazy. Skutkiem tego działania jest powstanie hydroksymetylowego fosforanotriestru **103**, z którego spontanicznie uwalnia się formaldehyd **104**, generując POM fosforanodiester **105**. Niezbędna, jako czynnik inicjujący, karboksyesteraza jest enzymem powszechnie występującym w komórkach. Ponieważ w celu otrzymania wolnego nukleotydu **60** konieczne jest powtórzenie obu reakcji (aktywacja karboksyesterazą do hydroksymetylowego fosforanodiestru **106**, z którego usuwany jest formaldehyd), a POM fosforanodiestry są gorszymi substratami karboksyesteraz, etap ten jest znacznie wolniejszy ale alternatywnie może zachodzić działaniem fosfodiesteraz.¹⁰⁸

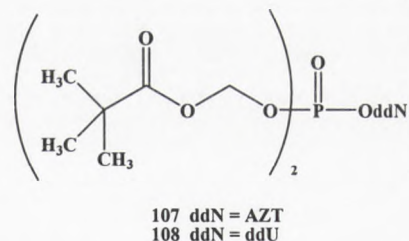




Schemat 11

Piwaloiloksymetylowe (POM) grupy maskujące resztę fosforanową zostały zaproponowane dla wielu bioaktywowanych monofosforanów nukleozydów, jako łatwo przechodzące przez błony komórkowe prekursorzy ddNMP 60. Wyniki uzyskane z inkubacji bis(piwaloiloksymetylo) fosforanotriestru AZT 107 (Rysunek 19) w komórkach z deficytem kinazy komórkowej (CEM/TK⁻) dowiodły, że związek ten działa jako pronukleotyd.¹⁰⁴ Podobnie jednoznaczne wyniki uzyskano dla bis(POM) fosforanotriestru ddU 108 (Rys. 19) w przypadku, którego stwierdzono tworzenie się ddUDP i dalej ddUTP.¹⁰⁹

Niestety, w następstwie rozkładu w komórce jednej cząsteczki bis(POM) nukleotydu, uwalniane są po dwa ekwiwalenty toksycznych kwasu piwaloilowego i formaldehydu. Wygenerowany w trakcie degradacji bis(POM) fosforanotriestru typu 101 formaldehyd, jest źródłem długoterminowej cytotoksyczności, wynikającej z reakcji formaldehydu z różnymi centrami nukleofilowymi w komórce, obecnymi w białkach, DNA czy RNA.⁸⁷



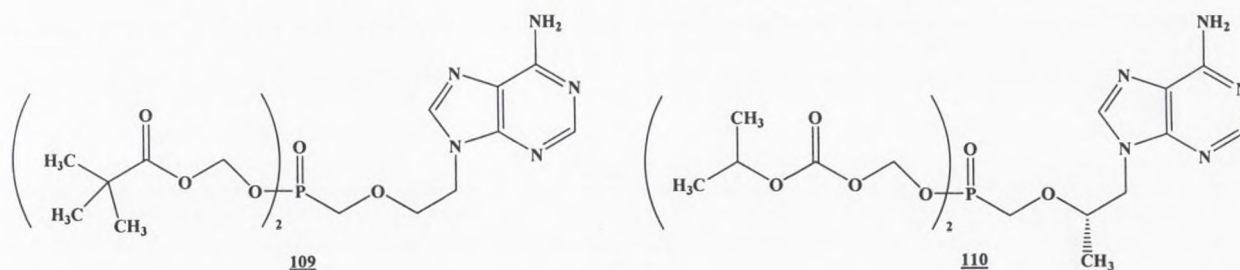
Rysunek 19

5.7.2.5. Bis(piwaloiloksymetylo) i bis(izopropylksykarbonyloksymetylo) fosforanotriestry acyklicznych analogów nukleozydów

Spośród licznych przeciwwirusowych strategii projektowane są również acykliczne analogi nukleozydów. Związki te, podobnie jak analogi 2',3'-dideoksynukleozydów, mogą działać jako inhibitory odwrotnej transkrypcji HIV-1, gdyż po wnikięciu do komórki mogą



zostać ufosforylowane przez kinazy komórkowe do aktywnych trifosforanów i jako takie, włączone przez RT do powstającego wirusowego DNA, powodować jego terminację. W rezultacie zastosowania acyklicznych analogów nukleozydów w pronukleotydowym podejściu anti-HIV, powstały wysoce aktywne związki przeciwwirusowe. Wśród nich wyłaniają się bis(POM)-9-[2-fosfonylometoksy)etylo] adenina (PMEA) **109** i bis(POC)-9-(2-fosfonylometoksypropylo) adenina (PMPA) **110**¹¹⁰ (Rysunek 20).



Rysunek 20

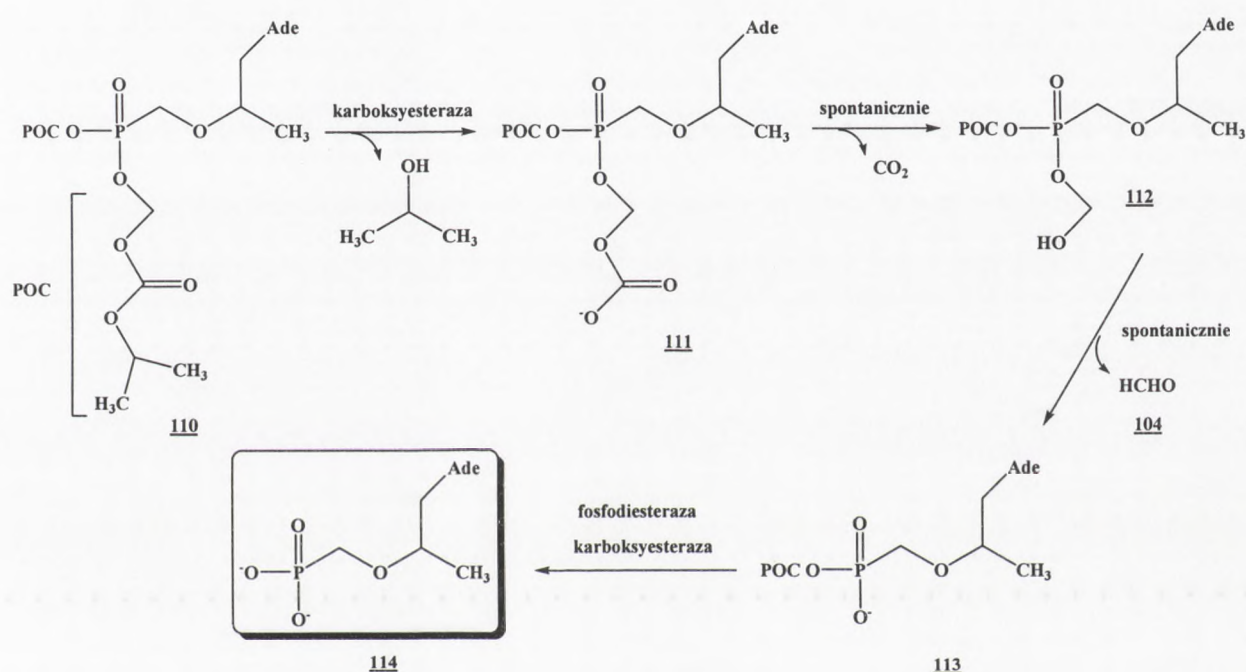
Ideą powstania tych związków było połączenie opisanego powyżej podejścia bis(POM) oraz jego modyfikacji bis(POC), z acyklicznym analogiem nukleozydu anti-HIV, PMPA. Grupy POC i POM zostały zastosowane w tej koncepcji, jako maskujące resztę fosforanową w PMPA, co miało na celu zwiększenie lipofilowości tej fosforanowej pochodnej. Już w pierwszych wynikach aktywności anti-HIV w ludzkich limfocytach krwi obwodowej zaobserwowano, że bis(POC)-PMPA **110** był 35 razy bardziej aktywny od PMPA i nie był cytotoksyczny. Badania nad metabolizmem **110** (z zastosowaniem [³H]-bis(POC)-PMPA) wykazały, że związek ten szybko przedostaje się do komórek, wewnątrz których ulega rozkładowi do pożądanego PMPA **114**.⁸⁷

Mechanizm rozkładu bis(POC)-PMPA **110** (Schemat 12) polega na tym, że w pierwszym etapie następuje katalizowana karboksyesterazą hydroliza estru *izopropylowego* z jednej z grup maskujących resztę fosforanową i usunięcie *izopropanolu*. W rezultacie powstaje reaktywny karbonyloksymetylowy fosforanotriester **111**, który spontanicznie rozpada się do hydroksymetylowego fosforanotriestru **112**, z którego uwalniany jest formaldehyd, generując POC fosforanodiester **113**. Powstały fosforanodiester **113** może ulec hydrolizie za pośrednictwem fosfodiesteraz lub analogicznie jak w pierwszym etapie, z udziałem karboksyesteraz, generując w obu przypadkach monofosforan acyklicznego nukleozydu (PMPA) **114**.¹¹¹

W rezultacie licznych badań bis(POC)-PMPA (tenofowir, Viread[®]) jest pierwszym dopuszczonym przez FDA do stosowania klinicznego prolekiem anti-HIV. Produkowany jest



w postaci rozpuszczalnego fumaranu dizoproksylu (Tenofowir DF), o wyższej niż tenofowir biodostępności. Po podaniu doustnym i działaniu enzymów jelitowych uwalniany jest tenofowir, który następnie ulega rozkładowi (Schemat 12) i fosforylacji przez enzymy komórkowe do aktywnego przeciw HIV difosforanu tenofowiru. Kliniczne dane dowodzą, że tenofowir jest bezpiecznym lekiem i znacznie redukuje poziom wirerii u pacjentów z HIV. W badaniach *in vitro* w monocytach/makrofagach i limfocytach krwi obwodowej, posiada on aktywność w zakresie stężeń $EC_{50} = 0.04-8.5 \mu M$. Ponadto długi wewnątrzkomórkowy okres półtrwania ($t_{1/2} = 12-50 \text{ h}$) difosforanu tenofowiru, obserwowany przy jednodniowej dawce, jest istotnym czynnikiem pozwalającym na efektywne działanie leku *in vivo*.¹¹²



Schemat 12

5.7.3. Dinukleozydowe fosforany

Dinukleozydowe fosforany, pochodne 2',3'-dideoksynukleozydów, są kolejnym ciekawym przykładem pronukleotydydowego podejścia anty-HIV. Z natury rzeczy, związki te podczas hydrolizy chemicznej bądź enzymatycznej muszą wytwarzać jedną cząsteczkę nukleozydu i jedną cząsteczkę nukleotydu. Zatem związki te, są w połowie pronukleotydami a w połowie wehikulami nukleozydów. Ta jednocześnie i zaleta i wada jest dostatecznym uzasadnieniem podejmowania badań nad dinukleozydowymi fosforanami, jako potencjalnymi prolekami zwalczającymi HIV. Ponadto, w trakcie prac nad stosowaniem dwóch lub więcej

The first part of the paper discusses the importance of the research and the objectives of the study. It highlights the need for a comprehensive understanding of the subject matter and the role of the researcher in this process. The second part of the paper describes the methodology used in the study, including the data collection methods and the analysis techniques. The third part of the paper presents the results of the study and discusses the implications of the findings. The final part of the paper concludes the study and provides recommendations for future research.

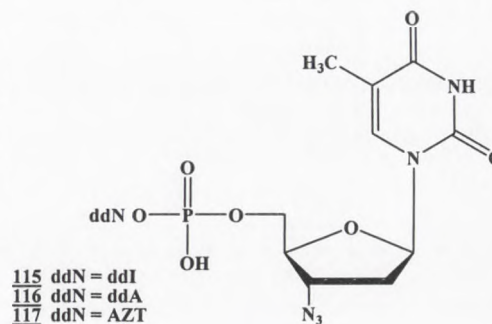


The results of the study indicate that there is a significant correlation between the variables studied. The findings suggest that the proposed model is a valid representation of the phenomenon being investigated. The study also identifies several key factors that influence the outcome of the process. These findings have important implications for practice and theory. The study concludes by emphasizing the need for further research to explore the underlying mechanisms and to test the model in different contexts.

nukleozydów jednocześnie do inhibowania proliferacji i infekcji HIV, ujawniły się takie efekty jak wzmacnione działanie (synergizm, AZT i ddA) czy maskowanie cytotoksyczności (T lub U i AZT), co dodatkowo zachęcało do badań nad dinukleozydo fosforanami.

5.7.3.1. Dinukleozydowe fosforanodiestry

5' → 5' dinukleozydowe fosforanodiestry zostały zaproponowane jako potencjalne pronukleotydy, ponieważ postulowano ich przekształcanie się w komórce do nukleotydów i nukleozydów przez fosforodiesterazy. Właściwości anti-HIV i cytotoksyczność dla różnych hetero- i homodimerów (Rysunek 21), jak AZT-P-ddI **115**, AZT-P-ddA **116** AZT-P-AZT **117**, były badane w zainfekowanych HIV komórkach MT-2 oraz w CEM i PBM.



Rysunek 21

Związki te wykazują wzrost aktywności anti-HIV w porównaniu do odpowiednich monomerów, przy czym względny potencjał aktywności można uszeregować następująco: AZT-P-ddA ≥ AZT-P-ddI > AZT > AZT-P-AZT > ddA > ddI. Wynika z tego, że na przykład AZT-P-ddI jest bardziej aktywny przeciwko HIV aniżeli stosowane osobno AZT, ddI czy kombinacja obu tych nukleozydów (komórki PBM). Dodatkowo wykazano, że cytotoksyczność dimerów była niższa, niż gdy stosowano dwa nukleozydy oddzielnie. Wzrost indeksu terapeutycznego dinukleozydowych fosforanów względem ich monomerów, można by tłumaczyć ich wewnątrzkomórkowym rozkładem do nukleozydu i 5'-fosforanu nukleozydu, ale wątpliwym jest czy związki te jako takie mogą przechodzić przez błony komórkowe.⁵⁹

To ostatnie zostało potwierdzone przez Zhou i wsp., którzy badali farmakokinetykę AZT-P-ddI **115** na pacjentach z HIV. Zaobserwowali oni brak monofosforanowych pochodnych w osoczu, prawdopodobnie ze względu na wysoki poziom fosfataz obecnych we krwi. Po podaniu dożylnym, poziom niezmienionego **115** w osoczu obniżał się bardzo szybko i był niewykrywalny już po 45 minutach, a po podaniu doustnym, AZT-P-ddI był w ogóle nie obserwowany.¹¹³ Wyniki te wskazują, że w organizmie związek **115** zanim dotrze do komórki, rozkładany jest enzymatycznie do dwóch nukleozydów - AZT **3** i ddI **4**, które następnie niezależnie ulegają dalszym przemianom, jak opisałam wcześniej.

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

...the ... of ...

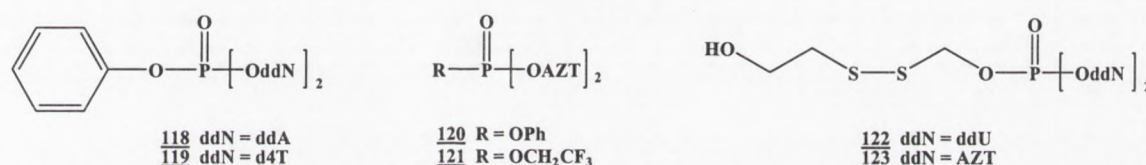
...the ... of ...

...the ... of ...

5.7.3.2. Dinukleozydowe fosforanotriestry

Niepowodzenia i zrozumienie ich źródeł w próbach stosowania dinukleozydo fosforanodiestrów jako inhibitorów HIV, były powodem podjęcia analogicznych badań nad dinukleozydo fosforanotriestrami. Zakładano, że związki będąc obojętne, będą miały szanse spontanicznej dyfuzji przez błony komórkowe do cytozolu i tam będą ulegały przemianom chemicznym i enzymatycznym, tworząc odpowiednie monofosforany nukleozydów – pronukleotydy.

Badano różne arylo bis(5'-nukleozydylo) fosforany pochodne AZT, ddA, czy d4T (Rysunek 22). Fosforanotriestrowe pochodne ddA **118** okazały się być 8-11 razy, a pochodne d4T **119** do 14 razy bardziej aktywne przeciwko HIV-1 i HIV-2 niż odpowiednie fosforanodiestry. Symetryczny arylo bis(nukleotydyowy) dimer AZT **120** był słabym inhibitorem wirusa HIV a zastąpienie grupy fenylowej przez 2,2,2-trifluoroetylową **121** niewiele zmieniło. Wartości EC_{50} dla związków **120** i **121** wynoszą odpowiednio $0.8 \mu\text{M}$ i $0.4 \mu\text{M}$ ($CC_{50} = 500 \mu\text{M}$ i $600 \mu\text{M}$) i świadczą o znacznie słabszej aktywności anti-HIV w porównaniu z AZT.⁵⁹



Rysunek 22

Ciekawą koncepcją jest zaproponowana przez Puecha i współpracowników seria dinukleozydo *S*-(2-hydroksyetylosulfohydrylo)-2-tioetylo fosforanotriestrów (Rys. 22), których rozkład do fosforanodiestrów w komórce może być aktywowany przez reduktazy. Dinukleozydowe fosforanotriestry ddU **122** wykazały znacznie wyższą niż ddU (**26**) aktywność anti-HIV-1 w komórkach MT-4, CEM-SS, CEMX-174, a także w CEM/TK⁻. Świadczy to o tym, że związki tego typu są pronukleotydami. Dinukleozydowe pochodne AZT **123** wykazały wyższy potencjał anti-HIV w porównaniu z AZT w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej (CEM/TK⁻), i jednocześnie związek **122** posiada prawie identyczną z AZT aktywność przeciwwirusową w komórkach MT-4, CEM-SS i CEMX-174.¹¹⁴ Wyniki te świadczą, że di-AZT fosforanotriester **122** bez wątpienia dostarcza do komórki 5'-monofosforan AZT **12** (aktywność w CEM/TK⁻) i może być przykładem struktury pronukleotydy.

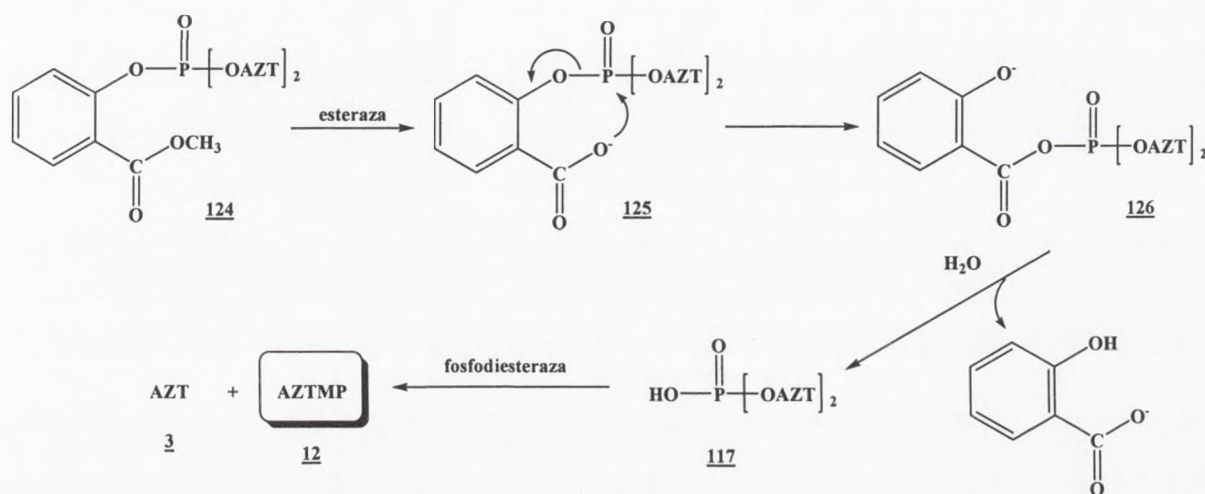
Ciekawą propozycją były salicylowe pochodne dinukleotydydowych triestrów AZT **124** (Schemat 13), zaprojektowane jako potencjalne pronukleotydy. Postulowany mechanizm ich

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. The second part details the procedures for handling discrepancies and errors, including the steps to be taken when a mistake is identified. The third part outlines the requirements for the annual audit, including the submission of financial statements and supporting documents. The final part provides information on the contact details of the relevant authorities and the consequences of non-compliance with the regulations.

Section 2

This section describes the specific rules and regulations that apply to the reporting of income and expenses. It includes detailed instructions on how to calculate taxable income and how to claim various tax reliefs and allowances. The text also covers the requirements for maintaining a separate record of business expenses and the conditions under which these can be deducted. Furthermore, it discusses the implications of different tax rates and the impact of changes in tax law. The section concludes with a summary of the key points and a reminder to consult a professional advisor for more detailed guidance.

rozkładu zakłada, że po wnikięciu związku **124** do komórki, esterazy hydrolizują ester salicylowy. Następnie, na skutek wewnątrzcząsteczkowego ataku anionu karboksylowego na centrum fosforowe w **125**, pęka wiązanie estrowe i generowany jest nietrwały mieszany bezwodnik **126**, który łatwo hydrolizuje w środowisku wodnym. W ostatnim etapie, fosforanodiester **117** jest enzymatycznie przekształcany do 5'-monofosforanu **12** i nukleozydu **3**.



Schemat 13

Niestety okazało się, że w komórkach CEM, AZT jest niemal 35 razy bardziej aktywny od fosforanotriestru **124**, który był nieaktywny także w komórkach CEM/TK⁻. Zatem aktywność anti-HIV takich związków wynika najprawdopodobniej z ich rozkładu do wolnego nukleozydu, a nie jak zakładano, do jego 5'-monofosforanu.¹¹⁵

5.7.4. Amidofosforany 2',3'-dideoksynukleozydów

Inną, bardzo ciekawą klasą związków zdolnych do przenikania przez błony komórkowe i dostarczających 5'-monofosforany do komórek, są amidofosforanowe pochodne 2',3'-dideoksynukleozydów.

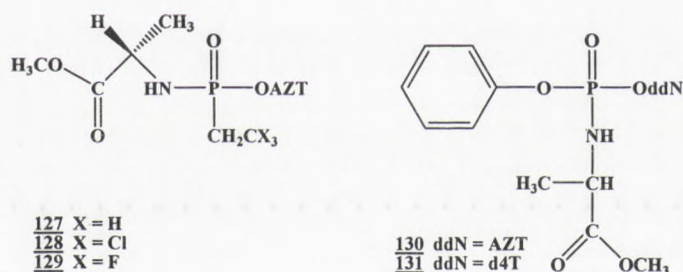
5.7.4.1. Diestry amidofosforanów pochodne 2',3'-dideoksynukleozydów

Najbardziej obiecującymi pronukleotydami okazały się różnego typu fosforanotriestry, alkilowe lub aryłowe. Każdy z nich, ulegając rozkładowi chemicznemu lub enzymatycznemu, generował oprócz pożądanego nukleotydu, także związki obce dla środowiska komórki, np. episiarczki czy fenole. Z początkiem lat 1990 pojawiła się idea zaopatrzenia potencjalnych pronukleotydy w grupy ochronne, które będą rozkładane do oczekiwanego nukleotydu i do nietoksycznych związków naturalnych np. aminokwasów. W ten sposób zrodził się



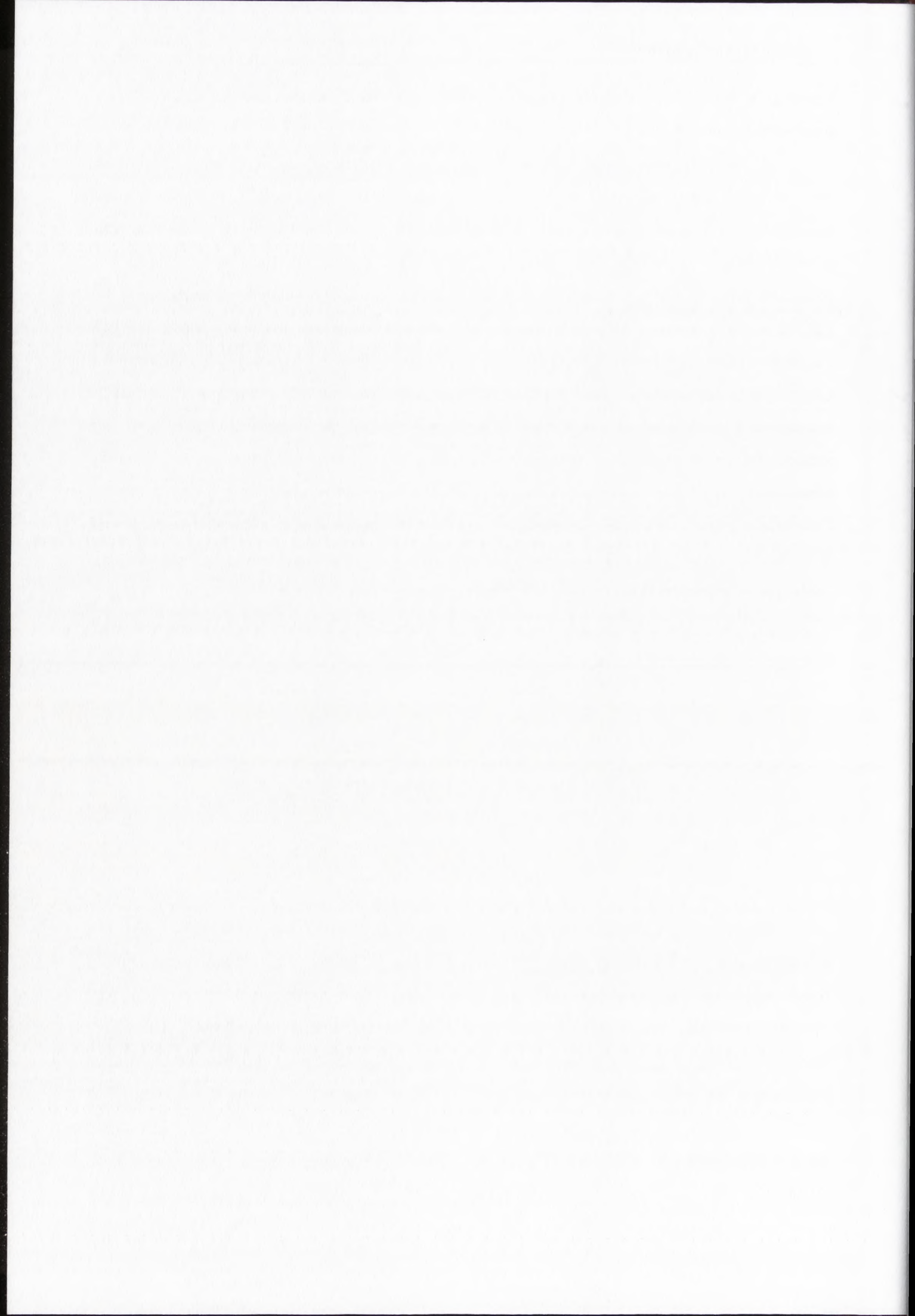
zapoczątkowany przez C. McGuigana¹¹⁶ nowy nurt badawczy nad pronukleotydami amidofosforanowymi.

Jak wcześniej wspomniałam, bis(trihalogeno) fosforanotriestry AZT posiadały aktywność anti-HIV. Na podstawie tych wyników, grupa McGuigana otrzymała i przebadła serie związków, będących kombinacją halogenoetylo aminokwasowych pochodnych amidofosforanów (Rysunek 23). Jednakże, poza jednym wyjątkiem, otrzymane związki nie posiadały wyraźnej aktywności antywirusowej. Jedynie trichloroetylo alaninowa pochodna AZT **128** (Rys. 23) okazała się być ponad 30 razy bardziej aktywna od etylowej **127** i trifluoroetylowej pochodnej **129** ($EC_{50} = 0.08 \mu\text{M}$ dla **128** vs $3 \mu\text{M}$ dla **127** i **129**, komórki C8166). Co interesujące, nie obserwowano podobnego wzrostu aktywności anti-HIV w przypadku analogicznych pochodnych glicyny czy waliny. McGuigan stwierdził więc, że amidofosforanowe diestry są efektywne w dostarczaniu 5'-monofosforanu **60** do komórki szczególnie wtedy, gdy zastosowaną aminową grupą maskującą jest ester metylowy alaniny.¹¹⁷ Co ciekawe, zaobserwował też, że spośród naturalnych α -aminokwasów, L-alaninowa pochodna w związkach typu **130** i **131** (Rys. 23) wykazuje najwyższą efektywność, podczas gdy D-alaninowy enancjomer ma znacznie obniżoną (30 razy) bioaktywność.¹¹⁸



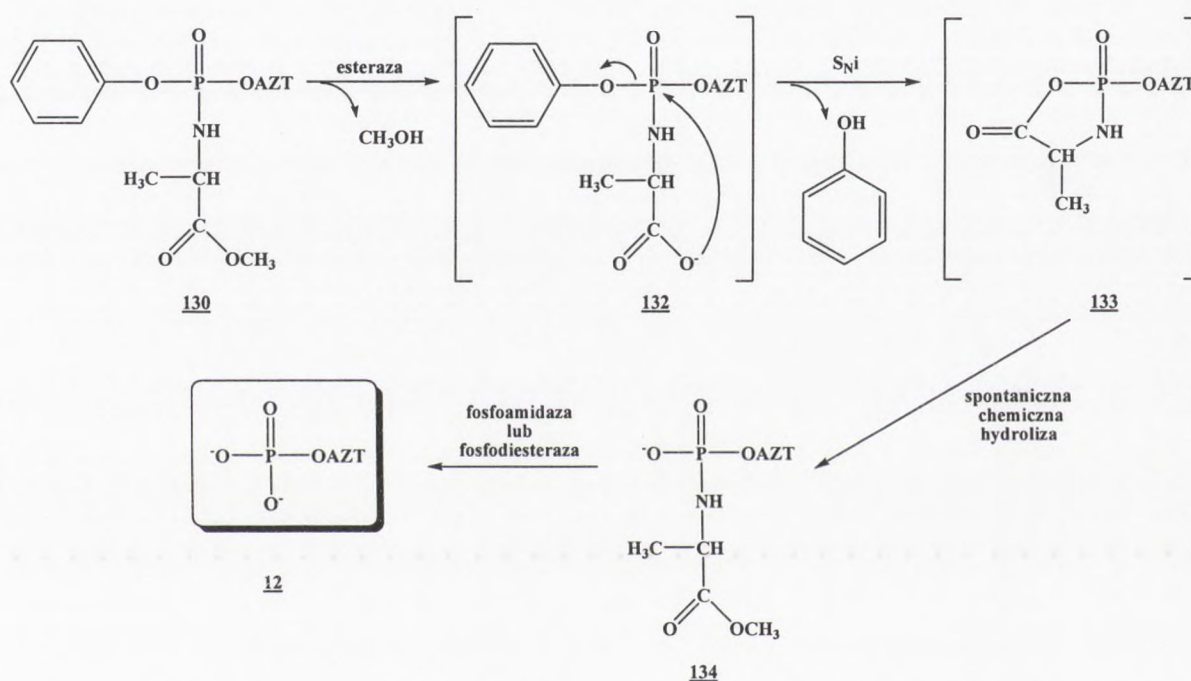
Rysunek 23

Stwierdzono, że istotny wpływ na aktywność anti-HIV związków **130** i **131** ma zastosowanie grupy fenylowej. Pomimo że AZT **3** okazał się być bardziej aktywny niż alaninylo fenylo amidofosforanowy diester AZT **130** to wykazano, że w przeciwieństwie do AZT, **130** ujawnił aktywność anti-HIV w komórkach z deficytem kinazy tymidynowej CEM/TK⁻. Dodatkowo związek **130** jest względnie nietoksyczny ($CC_{50} = 500 \mu\text{M}$), co znacznie podwyższa jego indeks selektywności w porównaniu z AZT.¹¹⁸ W testach *in vitro* na komórkach CEM i MT-4 wykazano także, że arylo amidofosforanowy diester d4T **131** posiada nieznacznie wyższą aktywność anti-HIV niż d4T **6**, ale co ważniejsze, wyraźnie wyższą od **6** w komórkach CEM/TK⁻, oraz w monocytach/makrofagach i PBM.¹¹⁹ Wyniki te dowodzą, że arylo



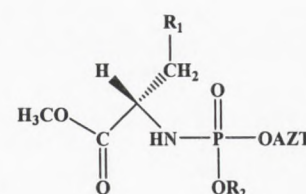
amidofosforanowe pochodne, jak **130** i **131** dostarczają 5'-monofosforan do komórki i mogą działać jako potencjalne pronukleotydy.

Ścieżki rozkładu aminokwasowych arylo amidofosforanowych diestrów były badane między innymi przez grupę Imbacha, na przykładzie pochodnej AZT **130**. W proponowanym mechanizmie (Schemat 14), etapem inicjującym rozpad tych związków jest hydroliza z udziałem enzymów estru karboksylowego reszty aminokwasowej i wygenerowanie nukleofilowego anionu karboksylowego w pochodnej **132**. Następnie, w wyniku ataku wewnątrzcząsteczkowego na atom fosforu i uwolnienia fenolu, powstaje nietrwały, pięcioczłonowy cykliczny związek przejściowy **133**, który jest szybko hydrolizowany do amidofosforanowego monoestru **134**, przekształcanego w 5'-monofosforan **12** przez komórkowe fosforoamidazy.¹⁰⁵



Schemat 14

Grupa Wagnera otrzymała i przebadła różne fenyloalaninowe i tryptofanowe alkilamidofosforanowe pochodne AZT, w których drugą grupą maskującą były grupa metylowa lub cyjanoetylowa **135** - **138** (Rysunek 24). Efektywność hamowania replikacji wirusa HIV-1 przez te związki, wyrażona wartością EC_{50} , wynosi odpowiednio 1 μM dla **135**, 0,4 μM dla **136**, 0,09 μM dla **137** μM i 0,3 μM dla **138** (w komórkach PBM). Niestety, pomimo że żaden z tych związków nie wykazuje cytotoksyczności w stężeniu do 100 μM , to również żaden z nich nie jest bardziej aktywny



- 135** R₁ = fenyl; R₂ = cyjanoetyl
136 R₁ = 3-indolil; R₂ = cyjanoetyl
137 R₁ = fenyl; R₂ = metyl
138 R₁ = 3-indolil; R₂ = cyjanoetyl

Rysunek 24

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.

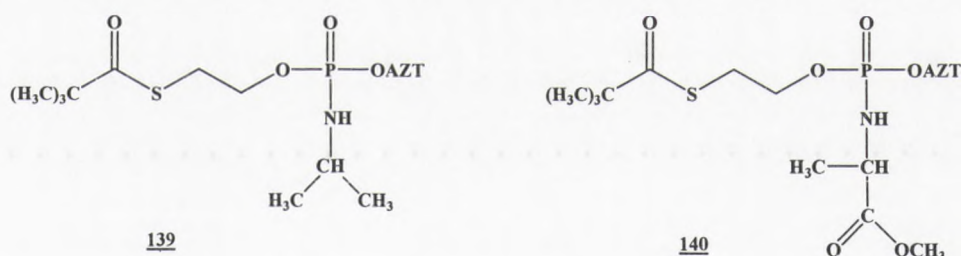


Faint, illegible text located below the diagram, possibly a caption or descriptive text.

Faint, illegible text at the bottom of the page, possibly a conclusion or footer.

przeciwko HIV-1 od AZT ($EC_{50} = 0.08 \mu\text{M}$).^{120,121} Te wyniki wskazują na wyższość fosforestrowych grup arylowych w pronukleotydach amidofosforanowych podobnego typu, co jest zrozumiałe mając na uwadze mechanizm ich rozpadu.

Badania nad ścieżkami rozkładu różnych fenylowych amidofosforanowych diestrów AZT, zainspirowały Imbacha by zaprojektować i badać amidofosforanowe diestry, w których grupę fenylową zastąpiłaby grupa *S*-piwaloilo-2-tioetylowa (*t*BuSATE). Otrzymano wiele *t*BuSATE amidofosforanowych diestrów z różnymi estrami aminokwasów lub pochodnymi amin alifatycznych i aromatycznych. W przeciwieństwie do AZT, większość tych pochodnych wykazywała dużą efektywność w zainfekowanych HIV-1 komórkach CEM/TK⁻, dowodząc ich pronukleotydowego działania. Interesujący wynik otrzymano dla amidofosforanu diestru z grupą izopropylaminową **139** (Rysunek 25), który to związek posiada najwyższą spośród badanych zdolność inhibicji wirusa HIV ($EC_{50} = 0.75 \mu\text{M}$) w komórkach CEM/TK⁻. Tym samym autorzy dowiedli, że w podejściu „monoSATE”, obecność reszty aminokwasowej nie jest warunkiem koniecznym dla aktywności anty-HIV. Dodatkowo, alaninowa pochodna monoSATE amidofosforanowego diestru AZT **140** (Rys. 25) jest znacznie bardziej aktywna w CEM/TK⁻ aniżeli jej fenylowy odpowiednik **130**, prawdopodobnie ze względu na bardziej efektywny sposób generowania AZTMP.^{105,122}



Rysunek 25

Proponowana przez Imbacha i współpracowników ścieżka rozkładu monoSATE amidofosforanowych pochodnych AZT **140**, zakłada hydrolizę estru karboksylowego z udziałem karboksyesterazy i powstanie nietrwałego, amidofosforanowego diestru **141**, z którego spontaniczne usuwany jest episiarczek **88**. W kolejnym etapie, powstały amidofosforanowy monoester AZT **134** ulega katalizowanej enzymami hydrolizie do pożądanego 5'-monofosforanu AZT **12**¹²² (Schemat 15).

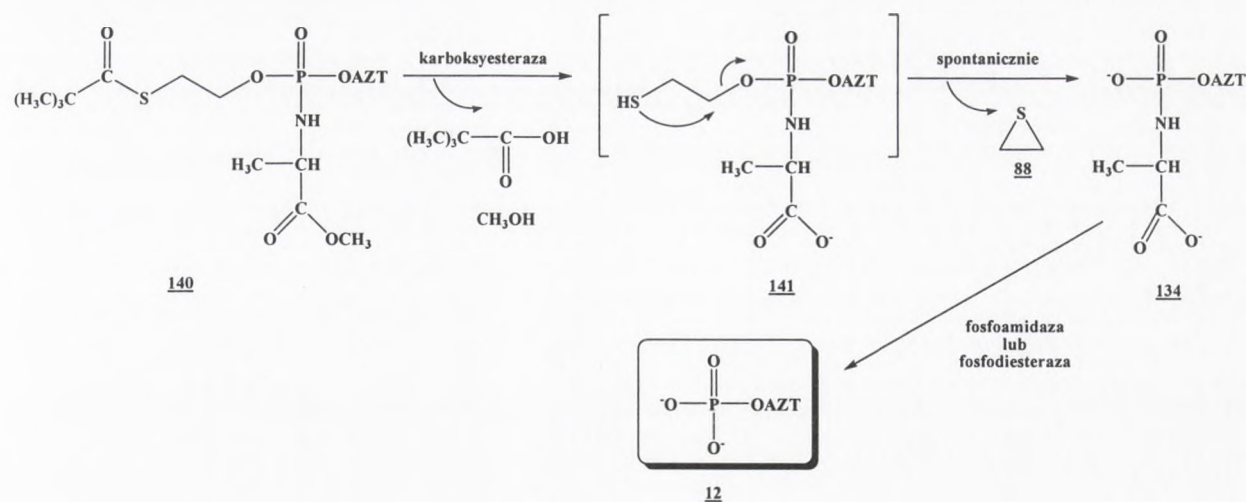
The first part of the study was a pilot study to determine the feasibility of the study. The pilot study was conducted in a small number of patients and showed that the study was feasible and that the patients were able to tolerate the treatment.

The second part of the study was a randomized, controlled trial. The patients were randomized to receive either the treatment or the control. The results of the study showed that the treatment was significantly more effective than the control. The patients who received the treatment had a significantly higher response rate and a significantly lower rate of adverse events compared to the control group.



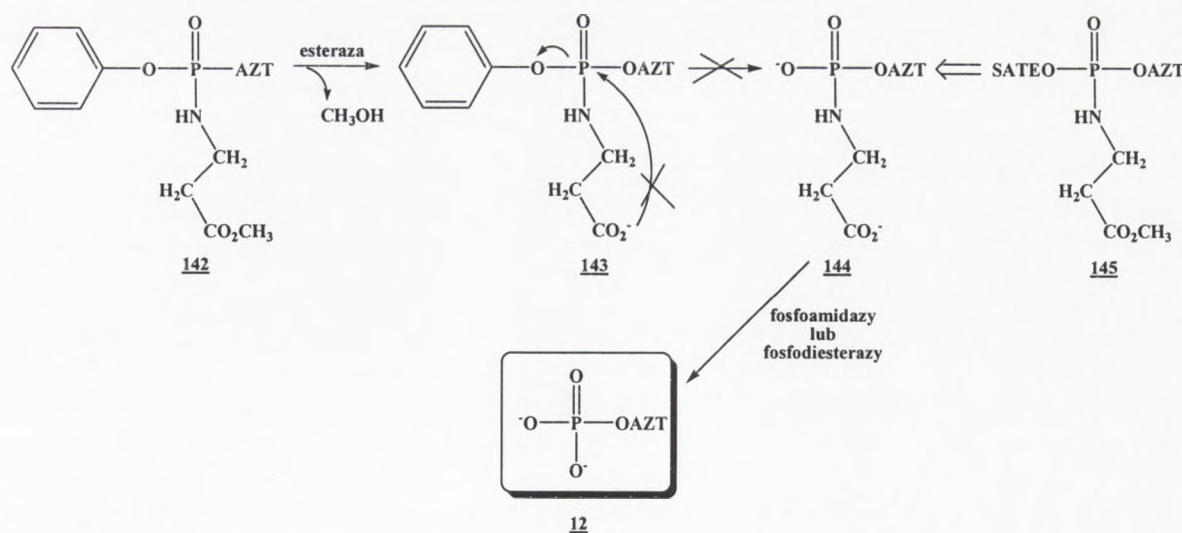
Figure 1

The results of the study are consistent with the hypothesis that the treatment is more effective than the control. The patients who received the treatment had a significantly higher response rate and a significantly lower rate of adverse events compared to the control group. These findings suggest that the treatment is a promising option for the treatment of the condition.



Schemat 15

Co ciekawsze, w monoSATE amidofosforanach obecność α -aminokwasu nie jest strukturalnym wymogiem aktywności antywirusowej. Związek **145** z resztą β -alaninową jest również aktywny przeciwko HIV, podczas gdy ta sama aminokwasowa pochodna posiadająca grupę arylową zamiast SATE **142** jest całkowicie nieaktywna (Schemat 16). W przypadku β -alaninowych pochodnych **142**, amidofosforanowy monoester **144** nie mógł zostać utworzony, ze względu na trwałość aryloamidofosforanowego diestru **143**, który nie ulega wewnątrzcząsteczkowej substytucji (sześcioczłonowy cykliczny związek przejściowy jest mniej korzystny termodynamicznie aniżeli pięcioczłonowy). Mechanizm rozkładu mono(SATE) amidofosforanowych diestrów daje zatem szersze możliwości w projektowaniu związków, które wewnątrzkomórkowo mogą generować bioaktywny 5'-monofosforan.¹²³



Schemat 16



The first part of the paper discusses the general theory of the... and the second part discusses the application of the theory to the...

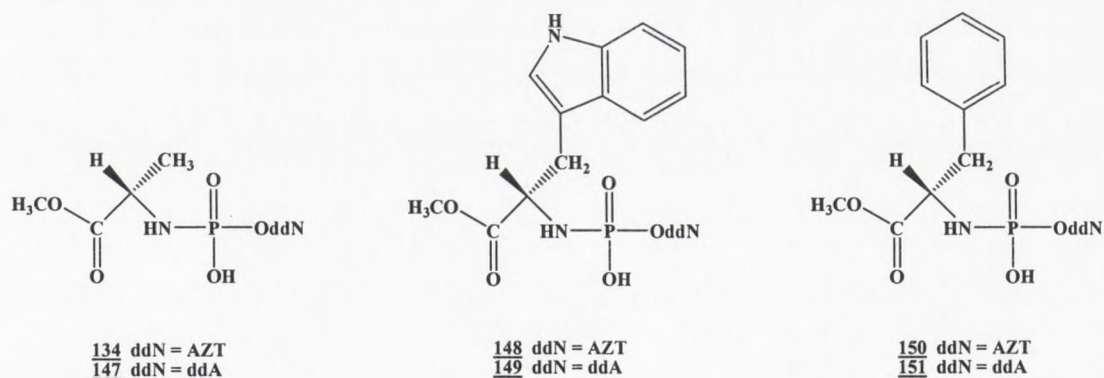
The first part of the paper discusses the general theory of the... and the second part discusses the application of the theory to the... The first part of the paper discusses the general theory of the... and the second part discusses the application of the theory to the...

The first part of the paper discusses the general theory of the... and the second part discusses the application of the theory to the... The first part of the paper discusses the general theory of the... and the second part discusses the application of the theory to the...



The first part of the paper discusses the general theory of the... and the second part discusses the application of the theory to the... The first part of the paper discusses the general theory of the... and the second part discusses the application of the theory to the...

aktywnością anti-HIV tych związków były prowadzone w komórkach PBMC i CEM. Niestety, nie wykonano badań na komórkach z deficytem kinazy tymidynowej CEM/TK⁻, gdyż jak twierdzą autorzy, amidofosforany monoestrów ddN nie były w ogóle absorbowane przez te komórki. Tym niemniej, badania na komórkach PBMS, które posiadają jedynie 5% aktywności kinazy tymidynowej wskazują, że alaninowy ester metylowy amidofosforanowego estru AZT **134** (Rysunek 26) wykazuje najwyższą aktywność anti-HIV ($EC_{50} = 0.03 - 0.05 \mu\text{M}$) w tej grupie związków, niewiele niższą od AZT ($EC_{50} = 0.003 - 0.01 \mu\text{M}$). Ten sam efekt nie był jednak obserwowany dla alaninowej pochodnej ddA **147** ($EC_{50} = 2.2 - 3.5 \mu\text{M}$; dla ddA $EC_{50} = 0.58 - 0.6 \mu\text{M}$), w której zastąpienie prostego alifatycznego aminokwasu fenyloalaniną czy tryptofanem, znacznie wpłynęło na poprawę aktywności antywirusowej. L-tryptofanowy ester metylowy amidofosforanowego estru ddA **149** posiada najwyższy potencjał anti-HIV ($EC_{50} = 0.3 - 0.4 \mu\text{M}$) wśród przebadanych przez Wagnera pochodnych typu **146** tego nukleozydu, i jest to wynik porównywalny do aktywności, jaką wykazała również pochodna AZT **148** ($EC_{50} = 0.3 - 0.35 \mu\text{M}$). W przypadku amidofosforanów z grupą fenyloalaninową, korzystne wyniki aktywności przeciwwirusowej otrzymano dla pochodnych ddA **151** ($EC_{50} = 0.15 - 0.8 \mu\text{M}$), jednak znacznie zredukowane dla amidofosforanowego estru AZT **150** ($EC_{50} = 15 - 30 \mu\text{M}$). Dodatkowo zaobserwowano, że zastosowanie estru zamiast amidu metylowego aminokwasu, znacznie poprawia wyniki aktywności anti-HIV w przypadku pochodnych ddA (**147**, **149**, **151**), choć tej samej reguły nie zastosowano dla pochodnych AZT (**134**, **148**, **150**)¹²⁴ [Rysunek 26].



Rysunek 26

Ponieważ amidofosforanowe monoestry ddN wykazują znaczną stabilność ($t_{1/2} \geq 6$ dni), nie jest prawdopodobne, aby były zewnątrzkomórkowo, szybko przekształcane w wolne nukleozydy. Różnice w aktywnościach przeciwwirusowych między amidofosforanami a ich odpowiednimi nukleozydami, nie wynikają z trudności w dostarczaniu monofosforanu do



komórki, ale dotyczą raczej szybkości ich przemiany do ddNMP **60**. Ze względu na niską toksyczność ($CC_{50} > 100 \mu\text{M}$)¹²⁴ i korzystne parametry farmakokinetyczne, monoestry amidofosforanów są wciąż przedmiotem intensywnych badań nad ich wykorzystaniem jako pronukleotydów.

6. Podsumowanie wstępu literaturowego

Przedstawione w tym rozdziale liczne propozycje, stanowią jedynie część związków, projektowanych jako potencjalne terapeutyki przeciwko HIV. Dają one jednak pogląd na skalę zagadnienia, uświadamiając jednocześnie, jak trudnym zadaniem jest znalezienie efektywnych metod leczenia zakażeń HIV. Pomimo ogromnego nakładu pracy wielu laboratoriów na świecie, nie udało się dotąd stworzyć skutecznego leku, powodującego całkowitą eliminację wirusa z organizmu chorego. Niezwykła zmienność genetyczna HIV powoduje, że wciąż nie dysponujemy odpowiednimi środkami farmakologicznymi umożliwiającymi jego pokonanie. Wydaje się, że dokładniejsze poznanie biologii HIV, w tym mechanizmów powodujących zmienność genetyczną wirusa, na skutek stosowanych w terapii AIDS preparatów, pozwoli uzyskać informacje pomocne w projektowaniu nowych metod leczenia. Obecnie zwraca się uwagę, na wielokierunkowość badań i uwzględnienie coraz liczniejszych punktów ataku dla terapii - stąd stosowanie mieszanki wielu preparatów.

Na przestrzeni lat można było obserwować stały postęp w leczeniu AIDS. Postęp ten był możliwy dzięki rozpracowaniu mechanizmów cyklu życiowego HIV i dzięki pomysłowości badaczy, którzy projektowali, otrzymywali i badali nowe związki. Pomimo dużych wysiłków (niezwykła intensyfikacja badań i zaangażowanie środków), osiągnięto tylko (a może aż) możliwość utrzymania wirusa na poziomie nie wywołującym AIDS, ale pod warunkiem ciągłego zażywania odpowiednich leków. Jest więc oczywiste, że jeżeli myślimy o całkowitym wyeliminowaniu HIV, to istnieje pilna i coraz pilniejsza (*vide* eksplozja AIDS w Rosji) potrzeba opracowania nowych i udoskonalania znanych związków przeciw temu niezwykle kłopotliwemu terapeutycznie wirusowi. To ostatnie oraz profil naukowy i możliwości badawcze pracowni, w której prowadziłam późniejsze doświadczenia, było bezpośrednią przyczyną podjęcia tematu rozprawy i podjęcia jej realizacji, co opisałam w dalszych częściach swojej pracy doktorskiej.

The first part of the book is devoted to a general introduction to the study of the history of the world, and to a discussion of the various methods and sources of historical research.

The second part of the book is devoted to a detailed study of the history of the world, and to a discussion of the various methods and sources of historical research.

The third part of the book is devoted to a detailed study of the history of the world, and to a discussion of the various methods and sources of historical research.

The fourth part of the book is devoted to a detailed study of the history of the world, and to a discussion of the various methods and sources of historical research.

The fifth part of the book is devoted to a detailed study of the history of the world, and to a discussion of the various methods and sources of historical research.

The sixth part of the book is devoted to a detailed study of the history of the world, and to a discussion of the various methods and sources of historical research.

The seventh part of the book is devoted to a detailed study of the history of the world, and to a discussion of the various methods and sources of historical research.

The eighth part of the book is devoted to a detailed study of the history of the world, and to a discussion of the various methods and sources of historical research.

The ninth part of the book is devoted to a detailed study of the history of the world, and to a discussion of the various methods and sources of historical research.

The tenth part of the book is devoted to a detailed study of the history of the world, and to a discussion of the various methods and sources of historical research.

V. WYNIKI I DYSKUSJA

1. Wprowadzenie

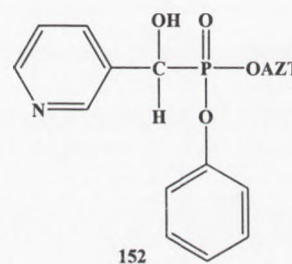
Spośród opisanych w literaturze różnorodnych typów pronukleotydów anty-HIV, prostym dialkilo lub diarylo nukleozydo fosforanotriestrom nie poświęcono wiele uwagi, pomimo że oferta liczby i różnorodności zarówno grup alkilowych jak i arylowych jest bardzo duża. Sądzę, że za ten stan rzeczy odpowiedzialne są pierwsze, mało zachęcające wyniki słabej aktywności przeciw HIV, otrzymane dla bis-alkilo i bis-arylo nukleozydo fosforanotriestrów. Jednakże analizując te wyniki, można zauważyć wyraźne tendencje, jeśli próbować korelować aktywność anty-HIV ze strukturą badanych fosforanotriestrów. Otóż, proste, niepodstawione dialkilo i diarylo nukleozydo fosforanotriestry były mało aktywne, natomiast ich pochodne, w których wprowadzono podstawniki labilizujące wiązania fosfoestrowe (np. 2,2,2-trichloroetyl, 4-nitrofenyl) wykazywały znaczne aktywności anty-HIV. Bis-(4-nitrofenyl) AZT fosforanotriester **73** był porównywalnie aktywny jak AZT **3**, ale jak później dowiedziono, związek ten nie był pronukleotydem, a jedynie nośnikiem nukleozydu do komórki, po uprzednim stopniowym rozkładzie do odpowiednich, fosforanodiestru, AZTMP i końcowej defosforylacji do nukleozydu.^{100,116}

Powyższe wyniki pozwalają przypuszczać, że można tak dobrać fosforoestrowe grupy maskujące w pronukleotydzie, że będą one odsłaniać resztę fosforanową fosforanotriestru z szybkościami zapewniającymi wniknięcie związku do komórki (forma niezmieniona), a następnie jego hydrolizę chemiczną do odpowiedniego fosforanodiestru i dalej, najprawdopodobniej z udziałem enzymów komórkowych, do nukleozydo monofosforanu. Tak więc, dobierając odpowiednie grupy maskujące resztę fosforanową należy rozwiązać problem kinetyczny wieloetapowej chemiczno-enzymatycznej transformacji pronukleotydu w nukleotydu. Warto zauważyć, że dalszy anabolizm nukleozydo monofosforanu do odpowiedniego di- i trifosforanu, zależny jest wyłącznie od enzymów komórkowych, od aktywności, na które nie mamy wpływu.

Obok problemu kinetycznego w koncepcji pronukleotydu należy rozwiązać drugi problem, związany z penetracją błon komórkowych i wnikaniem związku do wnętrza komórki. Znany jest fakt, że zdecydowana większość związków naładowanych ujemnie nie może pokonać także ujemnie naładowanej błony komórkowej. Dowiedziono, że np. AZT czy niektóre elektrycznie obojętne pronukleotydy, mogą pokonywać błonę komórkową w procesie spontanicznej dyfuzji.⁵⁹ Można więc zakładać, że obojętny elektrycznie bis-arylo nukleozydo fosforanotriester, będzie mógł w miarę swobodnie dostawać się do wnętrza komórki i dalej działać według zaprogramowanego chemicznie (fosforoestrowe grupy ochronne) scenariusza,

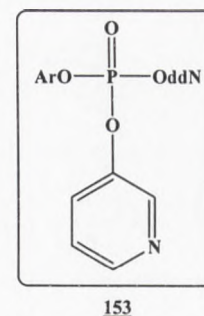
według koncepcji pronukleotydu. Sprawa neutralności i lipofilowości pronukleotydu nie jest tak prosta jak by mogło się wydawać, zważywszy na fakt, że wszystkie reakcje i transport do komórek zachodzą w mocno polarnym środowisku wodnym. Mając na uwadze wymagania stawiane pronukleotydom, spotkały się w tym miejscu dwa antagonistyczne żądania - możliwe wysoka lipofilowość i dobra rozpuszczalność w wodzie. Ten pozornie błahy problem jest bardzo dużym utrudnieniem, nie tyle w syntezie nukleozydo fosforanotriestru, ile później w badaniach jego właściwości fizykochemicznych, wymagających odpowiedniej rozpuszczalności związków w warunkach najczęściej zbliżonych do fizjologicznych (np. środowisko hodowli komórkowych). Tak więc w tym kontekście, optymalnym pronukleotydem (poza odpowiednią trwałością) byłby związek obojętny elektrycznie i dostatecznie dobrze rozpuszczający się w wodzie, co w przypadku planowanych obiektów badań – bis-arylo nukleozydo fosforanotriestrow, wydaje się być kryterium mocno wygórowanym.

Jednakże, w trakcie wcześniejszych badań nad nukleozydo α -hydroksyfosfonianami¹²⁷ typu **152** (Rysunek 27) prowadzonych w Pracowni Analogów Nukleotydów i Oligonukleotydów, w której realizowałam swoją pracę doktorską, stwierdzono, że wprowadzenie atomu azotu do szkieletu węglowego pierścienia aromatycznego, drastycznie zmienia lipofilowość takich związków, przy zachowaniu ich zerowego ładunku elektrycznego. Właśnie takie cechy były pożądane w przypadku związków, które są tytułowymi obiektami badań w mojej pracy doktorskiej.



Rysunek 27

Adoptując wyniki tych obserwacji dla swoich potrzeb, przyjąłam proste zasady w wyborze arylowych grup ochronnych, w projektowanych pronukleotydach typu **153** (Rysunek 28). Mianowicie, pronukleotyd oprócz analogu nukleozydu o znanej aktywności anti-HIV, powinien zawierać resztę fosforanową (z konieczności zawsze w pozycji 5') maskowaną dwoma grupami aryłowymi, przy czym jedna z nich powinna być którymś z pirydynoli lub jego pochodną (Rys. 28). Ta grupa ma pełnić funkcję dwojaką, tzn. ma być grupą o określonej trwałości i przede wszystkim ma być odpowiedzialna za rozpuszczalność związku w środowiskach wodnych (bufory, środowisko hodowli komórkowych), umożliwiającą badania jego wybranych właściwości chemicznych i fizykochemicznych. Natomiast druga, modyfikowana na różne sposoby grupa aryłowa, miała spełniać funkcję modulatora trwałości, umożliwiającego kontrolowanie kinetyki transformacji pronukleotydu do



Ar = fenyl lub pirydynyl
ddN = AZT; ddU; ddA

Rysunek 28



biologicznie aktywnego nukleotydu. Inne, także ważne, ale bardziej szczegółowe kryteria doboru fosforoestrowych grup maskujących projektowanych pronukleotydów, a także wybór odpowiedniego antywirusowego analogu nukleozydu, przedstawiłam w rozdziałach opisujących ich syntezę i badania ich właściwości.

W pierwszej kolejności podjęłam badania nad opracowaniem możliwie uniwersalnych metod syntezy diarylo nukleozydo fosforanotriestrów, posiadających takie same lub różne grupy aryłowe, a następnie przebadalam ich te właściwości chemiczne i biologiczne, które mogłyby być istotne w ocenie ich aktywności anty-HIV. Mając na uwadze wymienione wyżej kryteria, przyjąłam następujące cele cząstkowe prezentowanej rozprawy:

- ◆ opracowanie metody fosfonylacji 2',3'-dideoksynukleozydów i synteza nukleozydo H-fosfonianomonoestrów, substratów w syntezie arylo nukleozydo fosforanów,
- ◆ synteza arylo nukleozydo fosforanodiestrów i diarylo nukleozydo fosforanotriestrów,
- ◆ przebadanie trwałości chemicznej otrzymanych związków oraz sposobu ich rozkładu w środowisku hodowli komórek,
- ◆ przebadanie podatności na hydrolizę z udziałem enzymów arylo nukleozydo fosforanodiestrów, jako produktów rozkładu odpowiednich fosforanotriestrów,
- ◆ próba skorelowania właściwości fizykochemicznych i struktury badanych związków z ich aktywnością anty-HIV i cytotoksycznością, wyznaczoną przez laboratoria współpracujące.

Zasady numeracji związków przyjęte w niniejszej rozprawie

Dla opisanych w tej części rozprawy, serii otrzymanych związków, przyjąłam następujące zasady ich numeracji:

- cyfra lub liczba oznacza numer kolejnego związku,
- mała litera alfabetu (**a-e**) wskazuje na rodzaj analogu nukleozydu w nukleotydzie,
- duże litery alfabetu (**A-N**) opisują podstawniki aryłowe w fosforanodiestrach lub fosforanotriestrach.

Przyjmując ten sposób numeracji, moim zamiarem było, aby z numerycznego opisu związku można było uzyskać informacje o typie związków (fosforanodiestr, fosforanotriester), rodzaju nukleozydu oraz liczbie i typie podstawników aryłowych. Na przykład, według przyjętych zasad fosforanotriester fenylo 3-pirydynylowy posiada numer **153dAH** (Rysunek 29).

The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work done during the year. It also mentions the various projects and the results achieved.

The second part of the report deals with the financial situation of the country and the progress of the work done during the year. It also mentions the various projects and the results achieved.

The third part of the report deals with the administrative situation of the country and the progress of the work done during the year. It also mentions the various projects and the results achieved.

The fourth part of the report deals with the economic situation of the country and the progress of the work done during the year. It also mentions the various projects and the results achieved.

The fifth part of the report deals with the social situation of the country and the progress of the work done during the year. It also mentions the various projects and the results achieved.

The sixth part of the report deals with the cultural situation of the country and the progress of the work done during the year. It also mentions the various projects and the results achieved.

The seventh part of the report deals with the health situation of the country and the progress of the work done during the year. It also mentions the various projects and the results achieved.

The eighth part of the report deals with the education situation of the country and the progress of the work done during the year. It also mentions the various projects and the results achieved.

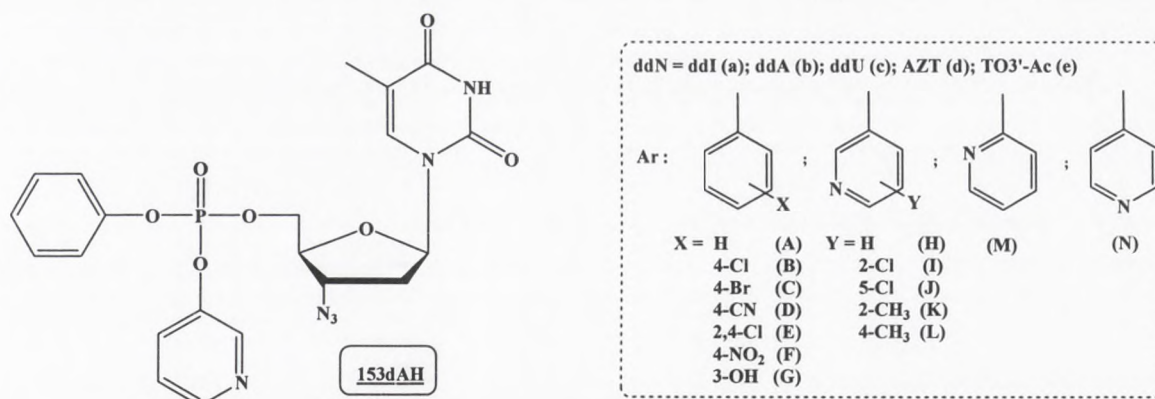
The ninth part of the report deals with the environment situation of the country and the progress of the work done during the year. It also mentions the various projects and the results achieved.

The tenth part of the report deals with the international situation of the country and the progress of the work done during the year. It also mentions the various projects and the results achieved.

The eleventh part of the report deals with the future prospects of the country and the progress of the work done during the year. It also mentions the various projects and the results achieved.

The twelfth part of the report deals with the conclusion of the work done during the year and the progress of the work done during the year. It also mentions the various projects and the results achieved.

The thirteenth part of the report deals with the appendix of the work done during the year and the progress of the work done during the year. It also mentions the various projects and the results achieved.



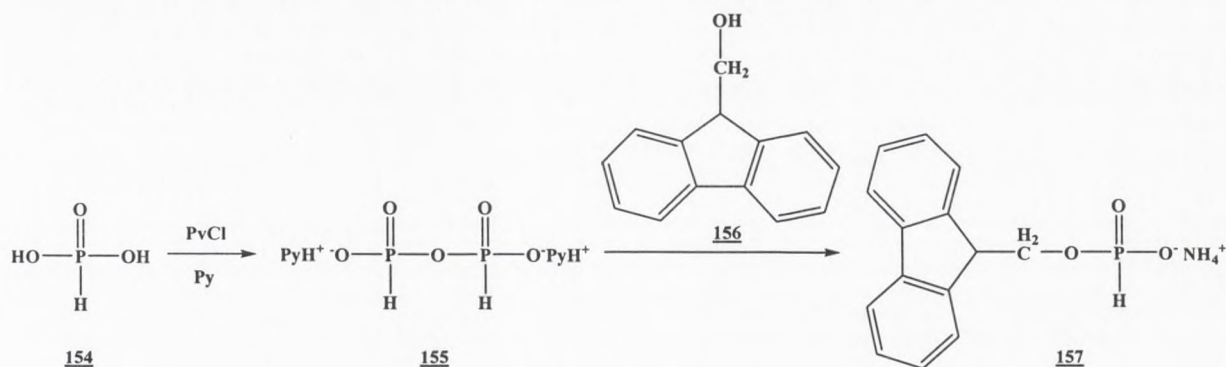
Rysunek 29

2. H-fosfonianomonoestry 2',3'-dideoksynukleozydów

Pochodne H-fosfonianowe są jednymi z najbardziej użytecznych prekursorów fosforanowych w syntezie nukleotydów, oligonukleotydów i ich analogów.¹²⁸ Otrzymywane są przez fosforylację odpowiednio chronionych lub niechronionych nukleozydów z zastosowaniem różnego typu czynników fosforylujących.¹²⁹ Znanych jest kilka skutecznych reagentów i systemów fosforylujących, ale są one dostosowane najczęściej do lipofilowych substratów.^{130,131} W przypadku mniej lipofilowych komponentów hydroksylowych, jakimi są np. 2',3'-dideoksynukleozydy (np. ddA, ddU, ddI), stosowane systemy fosforylacji posiadają znaczne ograniczenia, gdyż po reakcji fosforylacji, polarne produkty wymagają uciążliwych i pracochłonnych metod oczyszczania. Z tych powodów podjęłam badania nad opracowaniem nowych procedur i systemów fosforylacji, bardziej odpowiednich dla fosforylacji komponentów hydroksylowych o obniżonej lipofilowości. Dążyłam do opracowania możliwie prostej i jednocześnie skutecznej metody otrzymywania H-fosfonianów nukleozydów, gdyż to warunkowało możliwość realizacji dalszych celów rozprawy.

2.1 Synteza (9H-fluoren-9-ylo)metylo H-fosfonianu

Jednym z rozwiązań dla wspomnianych powyżej niedogodności w otrzymywaniu H-fosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów, mogło być zastosowanie czynnika fosforylującego niosącego w swej strukturze ugrupowania lipofilowe. Warunki te wydawał się spełniać kwas (9H-fluoren-9-ylo)metylo H-fosfonowy, zaproponowany przez Yanga¹³² i zastosowany do fosforylacji 5'-O-trytylo nukleozydów. Niestety niełatwa synteza z handlowo niedostępnych substratów jak PCl₃, czyni ten reagent trudno osiągalnym w naszych warunkach. W tej sytuacji musiałam opracować inną metodę syntezy (9H-fluoren-9-ylo)metylo H-fosfonianu **157**, a jej koncepcję przedstawia Schemat 18.



Schemat 18. Schemat reakcji otrzymywania (9*H*-fluoren-9-yl)metylo H-fosfonianu NH_4^+ (**157**)

W podejściu tym stosowane odczynniki są tanie (kwas fosfonowy **154**), nietoksyczne i handlowo dostępne, a sama procedura jest łatwa do wykonania. W metodzie tej wykorzystałam dwie właściwości H-fosfonianów. Pierwsza to fakt, że kwas fosforowy(III) aktywowany chlorkiem piwaloilu (PvCl) w pirydynie, tworzy bardzo łatwo piro-H-fosfonian **155**.¹³³ Ten ostatni jest wciąż na tyle aktywny, że zastosowany w odpowiednim nadmiarze reaguje z (9*H*-fluoren-9-yl)metanołem **156**, tworząc H-fosfonian **157** i kwas fosforowy(III). Po całkowitym przereagowaniu substratu hydroksylowego **156** i dodaniu wody, w mieszaninie reakcyjnej obecne są jedynie dwa fosforowe związki tj. kwas fosforowy(III) i monoester H-fosfonianowy **157**. Stosując prostą ekstrakcję w układzie CH_2/Cl_2 – woda, w warstwie organicznej znajdujemy wyłącznie rozpuszczony, lipofilowy H-fosfonian **157**, a w wodzie wyłącznie hydrofilowy H_3PO_3 . Wymiana kationu pirydyniowego na amonowy (NH_4^+) w produkcie **157** następuje przez dodanie nadmiaru amoniaku. Odparowanie rozpuszczalników z takiej mieszaniny, wobec nadmiaru propanolu-2 powoduje wytrącanie soli amonowej (9*H*-fluoren-9-yl)metylo H-fosfonianu **157** w formie białego proszku. Procedurę otrzymywania powyższego związku opisałam szczegółowo w *Części Doświadczalnej* rozprawy i została ona opublikowana (Romanowska, J. i wsp., *Letters in Organic Chemistry*, 2009).¹³⁴

Podsumowując, powyższa metoda angażuje tanie i dostępne handlowo reagenty oraz pozwala otrzymywać (9*H*-fluoren-9-yl)metylo H-fosfonian **157** w sposób zdecydowanie prostszy od zaproponowanego przez grupę Yanga¹³². Podejście to mogę z całą pewnością polecać jako dogodną i wydajną metodę syntezy tego czynnika fosfonylującego.

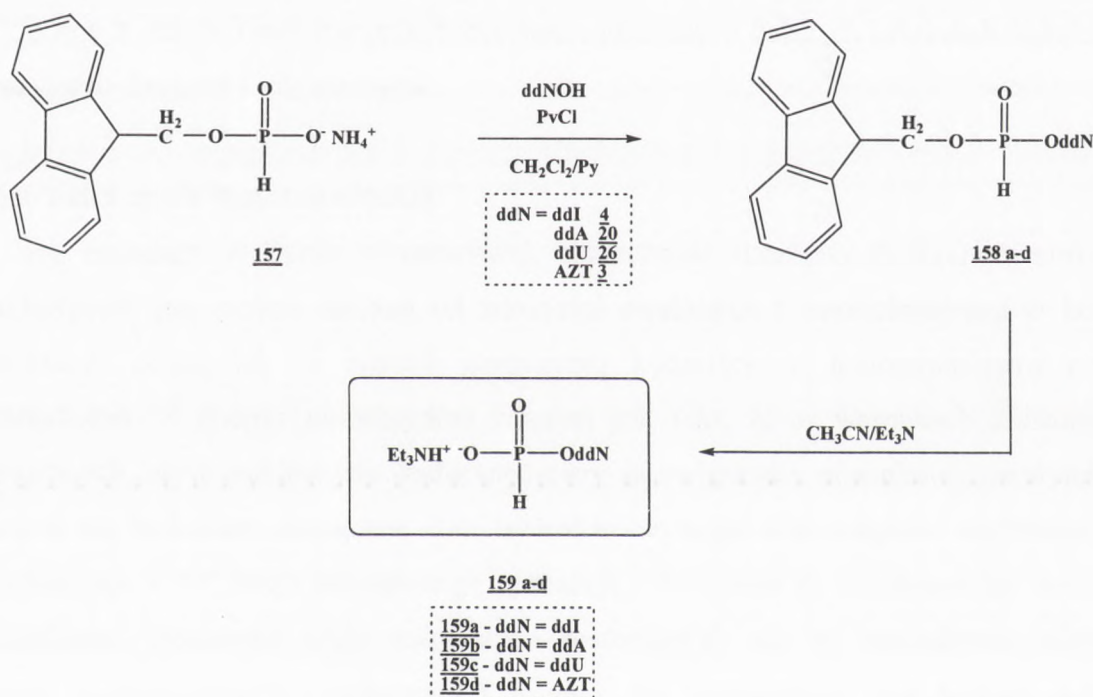
2.2. Synteza H-fosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów

Mając łatwy dostęp do (9*H*-fluoren-9-yl)metylo H-fosfonianu **157** przystąpiłam do syntezy H-fosfonianów 2',3'-dideoksynukleozydów **159** (ddI, ddA, ddU oraz AZT).



Spodziewałam się, że zastosowanie tego lipofilowego czynnika fosfonylującego znacznie ułatwi mi pracę podczas syntezy i oczyszczania końcowych produktów nukleotydowych.

H-Fosfonian (9*H*-fluoren-9-ylometylowy **157** odparowałam z pirydyną zawierającą trietyloaminę (4:1 v/v), wprowadzając tym samym kation trietyloamoniowy w miejsce amonowego, w celu zwiększenia rozpuszczalności czynnika fosfonylującego w warunkach prowadzenia reakcji, chlorek metylenu/pirydyna (95:5, v/v). Następnie usuwałam śladowe ilości wody z substratów przez odparowanie z bezwodną pirydyną. Odpowiedni dideksynukleozyd (w niewielkim nadmiarze 1.05 ekw. mol. w stosunku do czynnika fosfonylującego) oraz H-fosfonian (9*H*-fluoren-9-ylometylowy kondensowałam w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (5% objętościowych) wobec chlorku piwaloilu jako aktywatora (1.5 molowy nadmiar).



Schemat 19. Schemat reakcji otrzymywania H-fosfonianomonoestrów 2',3'-dideksynukleozydów typu **159**

Reakcja H-fosfonylacji nukleozydu zachodziła praktycznie ilościowo w ciągu 1 godziny (TLC, ^{31}P NMR) i jedynym obserwowanym produktem był nukleotydowy H-fosfonianodiester **158**, generujący w widmie ^{31}P NMR dwa sygnały (dwa diastereoizomery) w rejonie 8 ppm. Mieszaninę reakcyjną, po rozcieńczeniu chlorkiem metylenu, ekstrahowałam wodą, w której dobrze rozpuszczały się pozostałości z czynnika kondensującego i nadmiar nieprzereagowanego dideksynukleozydu. Otrzymany w ten sposób (9*H*-fluoren-9-ylometylo

The first part of the paper discusses the importance of the study and the objectives of the research. It also provides a brief overview of the methodology used in the study. The second part of the paper presents the results of the study and discusses the implications of the findings. The third part of the paper concludes the study and provides some final thoughts on the research.



Figure 1: A flowchart illustrating the process flow of the study. The flow starts from the top left and moves towards the bottom right.

The results of the study show that there is a significant difference between the two groups. The first group performed better than the second group. This suggests that the intervention had a positive effect on the outcome. The findings of this study have important implications for practice and research.

nukleozydo H-fosfonianodiester **158** był wystarczająco czysty, aby bez dodatkowego oczyszczania przeprowadzić go w H-fosfonianomonoester **159**. Dlatego po odparowaniu rozpuszczalników, surowy produkt rozpuściłam w mieszaninie bezwodnego acetonitrylu z trietyloaminą (2:1, v/v), w którym to środowisku, w reakcji β -eliminacji, nastąpiło usunięcie grupy (9*H*-fluoren-9-ylometylowej z H-fosfonianodiestru **158**. Po izolacji na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym otrzymywałam czyste (^1H -, ^{31}P NMR, TLC, HPLC) nukleozydo H-fosfoniany **159** (Schemat 19) z wysokimi wydajnościami (72-90%).

Powyższą metodę z powodzeniem zastosowałam w syntezie H-fosfonianomonoestrów różnych dideoksynukleozydów **159a-d** (ddI, ddA, ddU, czy AZT) [Schemat 19] i stwierdziłam, że (9*H*-fluoren-9-ylometylo H-fosfonian **157** sprawdził się doskonale jako czynnik fosforylujący wprowadzający resztę H-fosfonianową do nukleozydów.¹³⁴

Otrzymane według powyższej procedury nukleozydo H-fosfoniany **159a-d** służyły mi jako dogodne w użyciu i łatwe w przechowywaniu substraty w dalszych syntezach różnych arylo nukleozydo fosforanów i ich analogów.

3. Arylo nukleozydo fosforanodiestry

Jak opisałam w części literaturowej, skuteczność działania fosforanotriestrów jako pronukleotydu jest mocno zależna od zdolności uwalniania 5'-monofosforanu w komórce. W pierwszej kolejności, w reakcji chemicznej hydrolizy, z fosforanotriestru powstaje fosforanodiester. Z chemii nukleotydu znanym jest fakt, że w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, arylo nukleozydo fosforanodiestry są związkami stosunkowo trwałymi, mało podatnymi na hydrolizę chemiczną. Ich hydroliza wymaga wspomagania enzymami, które drastycznie (np. $> 10^6$ razy) przyspieszają tę reakcję i tworzenie się oczekiwanego nukleozydo monofosforanu. Ponieważ arylo nukleozydo fosforany(V) nie są naturalnymi substratami enzymów hydrolizujących (fosfoesteraz), trudno jest przewidzieć czy badany nukleotydu z aryłową grupą fosforoestrową będzie substratem dla enzymów komórkowych. Łatwo wyobrazić sobie sytuację, w której powstały w komórce fosforanodiester nie będzie substratem dla enzymów komórkowych i wówczas cała koncepcja fosforanotriestrowego pronukleotydu załamuje się.

Dlatego zanim przystąpiłam do projektowania i syntezy fosforanotriestrów typu **153** otrzymałam w pierwszej kolejności te arylo nukleozydo fosforanodiestry typu **162** (Schemat 20), których powstawanie spodziewane było podczas rozkładu fosforanotriestrów, potencjalnych pronukleotydu.

Le premier chapitre de l'ouvrage est consacré à l'étude de la situation économique et sociale de la région de la capitale, en particulier à l'analyse des conditions de vie des populations et des problèmes de développement. L'auteur aborde également les aspects politiques et administratifs de la région, ainsi que les perspectives de développement à long terme. Les données statistiques et les observations de terrain sont soigneusement analysées pour fournir une vue d'ensemble précise de la situation.

Le deuxième chapitre traite de la structure économique de la région, en examinant les secteurs agricoles, industriels et commerciaux. L'auteur discute des tendances actuelles et des défis à relever pour promouvoir une croissance économique durable et équilibrée.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude des infrastructures de transport et de communication, soulignant leur rôle crucial dans le développement régional. L'auteur propose des recommandations pour améliorer ces infrastructures et faciliter l'intégration de la région au reste du pays.

Le quatrième chapitre aborde les questions de planification et de gestion régionale, en discutant des mécanismes de prise de décision et des rôles des différents acteurs impliqués. L'auteur insiste sur l'importance d'une approche participative et transparente dans la planification régionale.

Le cinquième chapitre traite des aspects sociaux et culturels de la région, en analysant les besoins éducatifs, sanitaires et sociaux de la population. L'auteur propose des stratégies pour améliorer les services sociaux et promouvoir le développement humain.

Le sixième chapitre est consacré à l'étude des ressources naturelles de la région, en examinant les potentialités agricoles, forestières et minières. L'auteur discute des stratégies pour exploiter durablement ces ressources et protéger l'environnement.

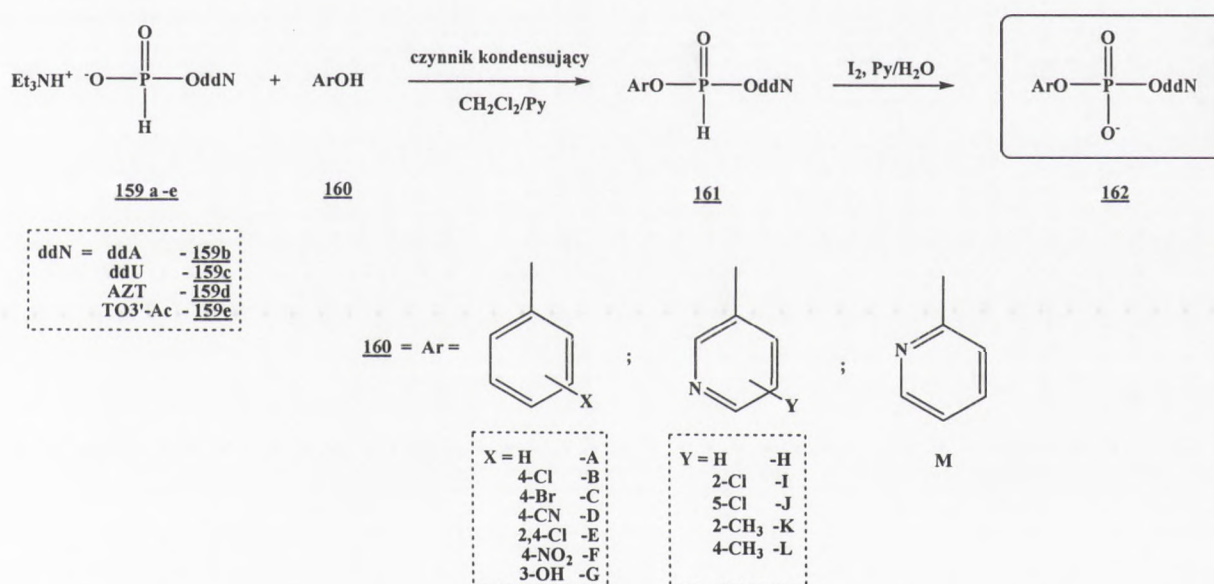
Le septième chapitre traite des aspects juridiques et institutionnels de la région, en analysant le cadre légal et les structures administratives existantes. L'auteur propose des réformes pour améliorer l'efficacité de l'administration régionale.

Le huitième chapitre est consacré à l'étude des perspectives de développement régional, en synthétisant les conclusions de l'ouvrage et en proposant des recommandations stratégiques. L'auteur insiste sur l'importance d'une vision claire et d'un engagement politique fort pour réaliser le développement régional.

3.1 Synteza arylo nukleozydo fosforanodiestrów

Zdecydowaną większość arylo nukleozydo fosforanodiestrów otrzymałam standardową metodą¹³⁵ opracowaną w Pracowni Analogów Nukleotydów i Oligonukleotydów. Wydawała się ona najbardziej dogodna ze względu na łatwą dostępność substratów (nukleozydo H-fosfoniany **159** proste w syntezie, a fenole, pirydnole i czynniki kondensujące dostępne handlowo) i możliwość prowadzenia reakcji w tych samych warunkach.

I tak, H-fosfoniany 2',3'-dideoksynukleozydów **159** kondensowałam z odpowiednim fenolem lub pirydnolem typu **160** wobec czynnika kondensującego (DPCP lub PvCl), w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (10% v/v), generując odpowiednie arylo nukleozydo H-fosfonianodiestry **161**. Utlenienie powstałych H-fosfonianodiestrów typu **161** jodem w obecności wody prowadziło w szybkiej reakcji (< 3 min., ³¹P NMR) do odpowiednich arylo nukleozydo fosforanodiestrów **162** (Schemat 20), które izolowałam przy pomocy chromatografii na kolumnie wypełnionej żelami krzemionkowymi. Czyste (¹H-, ³¹P NMR, TLC, HRMS, HPLC) produkty końcowe (**162**) otrzymałam z wysokimi wydajnościami (54-94%).



Schemat 20. Schemat reakcji otrzymywania arylo nukleozydo fosforanodiestrów typu **162**

Badając przebieg reakcji kondensacji (³¹P NMR) nukleozydo H-fosfonianu **159** z komponentami hydroksylowymi **160A-N** o zróżnicowanej kwasowości (Tabela 1), wobec niewielkich nadmiarów molowych chlorku piwaloilu (1.2-1.5 ekw.) obserwowałam, że w przypadku najbardziej kwasowego z badanych, 4-nitrofenolu **160F** (pKa = 7.16), w powyższych warunkach tworzyły się dwa produkty: arylo nukleozydo H-fosfonianodiestr **161F** i mieszany bezwodnik piwaloilu H-fosfonianowy, będące w równowadze (w stosunku 3:1).

The following results were obtained from the experiments described above. The results are summarized in Table I. The results show that the rate of synthesis of DNA is increased by the presence of the enzyme. The rate of synthesis is increased by the presence of the enzyme in the presence of the substrate. The rate of synthesis is increased by the presence of the enzyme in the presence of the substrate. The rate of synthesis is increased by the presence of the enzyme in the presence of the substrate.

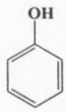
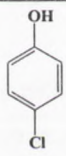

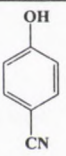
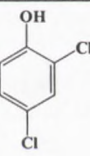

The results show that the rate of synthesis of DNA is increased by the presence of the enzyme. The rate of synthesis is increased by the presence of the enzyme in the presence of the substrate. The rate of synthesis is increased by the presence of the enzyme in the presence of the substrate. The rate of synthesis is increased by the presence of the enzyme in the presence of the substrate. The rate of synthesis is increased by the presence of the enzyme in the presence of the substrate.

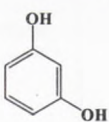
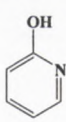
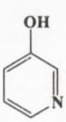
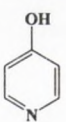
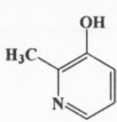
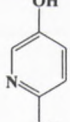


Fig. 1. The effect of the enzyme on the rate of synthesis of DNA. The results are summarized in Table I. The results show that the rate of synthesis of DNA is increased by the presence of the enzyme. The rate of synthesis is increased by the presence of the enzyme in the presence of the substrate. The rate of synthesis is increased by the presence of the enzyme in the presence of the substrate. The rate of synthesis is increased by the presence of the enzyme in the presence of the substrate.

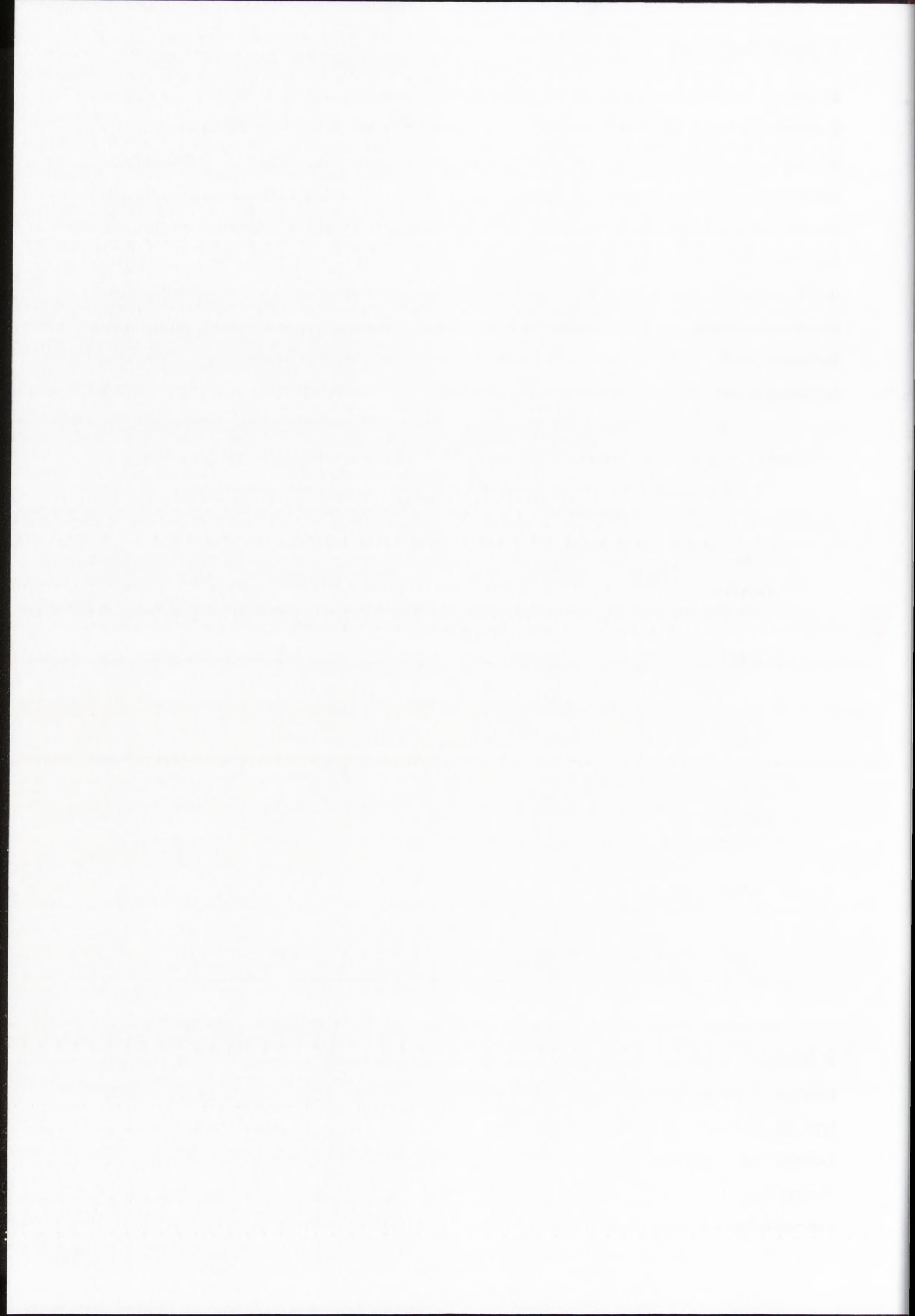
Przyjęłam, że powstały anion kwasu piwaloilowego atakuje centrum fosforowe powstałego H-fosfonianodiestu **161** współzawodnicząc jako nukleofil z 4-nitrofenolem.¹³⁶ Podobną sytuację obserwowano wcześniej w analogicznym przypadku, ale z udziałem 3'-H-fosfonianów nukleozydów. Sprawę rozwiązano stosując chlorofosforan difenyłowy (DPCP) jako aktywator i wtedy reakcja tworzenia 4-nitrofenylo H-fosfonianodiestu typu **161** zachodziła praktycznie ilościowo.^{137,138} Zastosowałam więc to rozwiązanie do swoich potrzeb i także w przypadku moich związków, otrzymałam w szybkiej (< 3 min., ³¹P NMR) i czystej reakcji oczekiwany H-fosfonianodiester **161F**. Utlenienie jodem w warunkach opisanych powyżej, prowadziło do fosforanodiestu **162F**, który oczyściłam chromatograficznie i otrzymałam z wysoką wydajnością (86%).

Tabela 1. Wartości pKa fenoli i pirydynoli^{139,140,141} stosowanych w reakcjach kondensacji z H-fosfonianami (w przypadku **160I** oraz **160J** brak danych literaturowych)

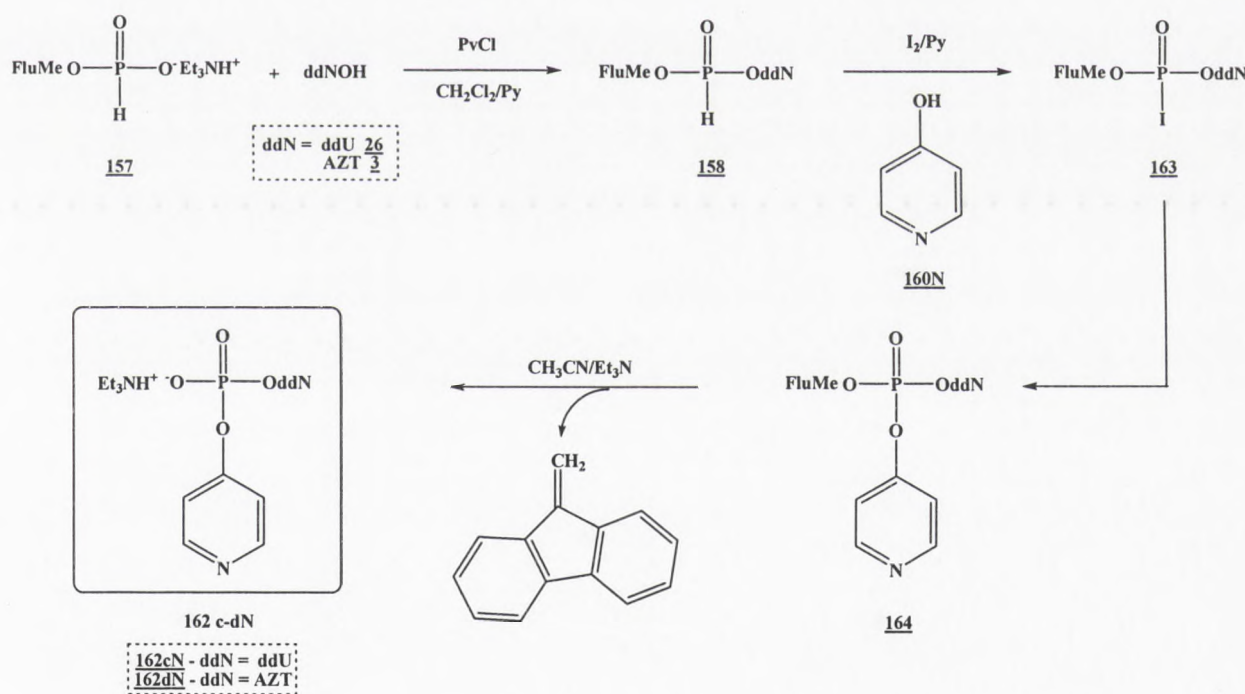
Nr związku	160A	160B	160C	160D	160E	160F
ArOH						
pKa	9.98	9.38	10.00	7.95	7.85	9.15; 11.32

Nr związku	160G	160M	160H	160N	160K	160L
ArOH						
pKa	7.16	11.62	8.60	7.74	9.50	8.90

Na osobną uwagę zasługuje synteza fosforanodiestu **162N** (Schemat 21). Chodzi o to, że w przypadku 4-pirydynolu **160N** stosując warunki kondensacji z H-fosfonianem nukleozydu, takie jak z innymi fenolami czy 2- lub 3-pirydynolem, nie otrzymałam pożądanego produktu typu **161**, bez względu na stosowane do aktywacji PvCl lub DPCP. Ponieważ, żadne dodatkowe zabiegi, jak zamiana pirydyny na bardziej zasadową lutydynę, czy zastosowanie N-metyloimidazolu nie zmieniały sytuacji, musiałam opracować dla związku **162N** indywidualny tok syntetyczny. Wykorzystałam znaną mi z własnych doświadczeń, łatwość



i czystość tworzenia 9-fluorenometylo nukleozydo H-fosfonianodiestru typu **158** (Schemat 19, 21), który w zamyśle mógłby posłużyć jako dogodny substrat w oksydatywnej kondensacji z 4-pirydynolem¹⁴², stosując jod jako utleniacz. Wybrałam oksydacyjną kondensację jako metodę godną sprawdzenia, gdyż aktywnym związkiem generowanym w reakcji jodu z H-fosfonianodiestrem **158** jest odpowiedni jodofosforan typu **163** (Schemat 21), który ulega estryfikacji w reakcji z alkoholami. Przyznaje, że jedyną racjonalną przesłanką zachęcającą mnie do przebadania tej reakcji była znana, bardzo wysoka reaktywność jodofosforanów.¹²⁹ Liczyłam na to, że z tak reaktywnym związkiem reakcja z 4-pirydynolem będzie zachodziła nawet wtedy, gdy udział czynników sprzyjających tej reakcji będzie niewielki (*vide* dyskusja poniżej). Już pierwsze próby ukazały, że podczas utleniania jodem H-fosfonianodiestru **158** w obecności 4-pirydynolu powstaje związek, o strukturze oczekiwanego fosforanotriestru typu **164**, o czym mogło świadczyć jego przesunięcie chemiczne (ok. – 8 ppm) w widmie ³¹P NMR i analiza TLC (duża ruchliwość w niepolarnych fazach rozwijających np. CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1 v/v). Po standardowym przerobie mieszaniny reakcyjnej, związek o domniemanej strukturze jak **164** był praktycznie jedynym obserwowanym (TLC, ³¹P NMR) produktem nukleotydowym, co zachęciło mnie do usunięcia grupy 9-fluorenometylowej w reakcji β-eliminacji, bez jego izolacji.



Schemat 21. Schemat reakcji otrzymywania fosforanodiestrów typu **162N**

Traktowanie surowego produktu dużym nadmiarem trietyloaminy (acetonitryl/trietyloamina 2:1, v/v) w warunkach bezwodnych, prowadziło w szybkiej i czystej reakcji do związków typu

The first part of the article deals with the general principles of the law of the sea. It states that the high seas are open to all States, whether coastal or landlocked. This principle is known as the freedom of the high seas. The article also mentions that the freedom of the high seas includes freedom of navigation, freedom of overflight, freedom of laying submarine cables and pipelines, freedom of fishing, and freedom of scientific research.

The second part of the article deals with the specific freedoms of the high seas. It states that all States have the right to sail ships on the high seas. This is known as the right of innocent passage. The article also states that all States have the right to fly their flag on the high seas. This is known as the right of flag. The article also states that all States have the right to fish on the high seas. This is known as the right of fishing. The article also states that all States have the right to conduct scientific research on the high seas. This is known as the right of scientific research.

The third part of the article deals with the specific freedoms of the high seas. It states that all States have the right to sail ships on the high seas. This is known as the right of innocent passage. The article also states that all States have the right to fly their flag on the high seas. This is known as the right of flag. The article also states that all States have the right to fish on the high seas. This is known as the right of fishing. The article also states that all States have the right to conduct scientific research on the high seas. This is known as the right of scientific research.



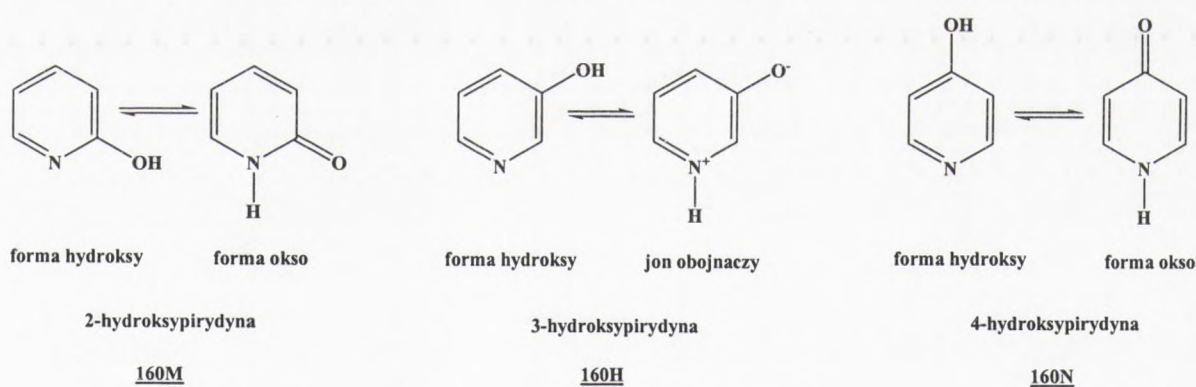
The article concludes with a statement that the provisions of this article are without prejudice to the provisions of the Convention on the Law of the Sea, 1982, and to the provisions of any other international instrument relating to the law of the sea.

162N (Schemat 21), które po izolacji, z pomocą chromatografii na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym, otrzymałam z dobrymi wydajnościami (ok. 80%). Strukturę otrzymanych produktów typu **162N** udowodniłam na podstawie analizy widm ^1H - i ^{31}P NMR oraz HRMS. W moim przekonaniu, powyższa metoda, która pozwoliła otrzymać związki **162cN** i **162dN**, może być polecana jako alternatywa i godna sprawdzenia w przypadkach, gdy inne podejścia zawodzą.

Wracając do sprawy niepowodzenia tworzenia H-fosfonianodiestru typu **161** w standardowych i modyfikowanych warunkach kondensacji 4-pirydynolu **160N** z nukleozydo H-fosfonianami **159**. Przyznaje, że nie potrafię zaproponować jednoznacznego wyjaśnienia tej anomalii, ale tych różnic można i chyba należy szukać w strukturze 2-, 3- i 4-pirydynoli, która jest mocno odmienna od fenoli¹⁴³, a także wewnątrz samych regioizomerycznych pirydynoli. W przypadku fenoli, ich nukleofilowość można korelować wprost z wartościami ich pKa. Natomiast w przypadku pirydynoli taka korelacja jest mocno niebezpieczna. Wynika to z faktu obecności w pirydynolach dwóch centrów protonoakceptorowych – egzocykliczny atom tlenu i endocykliczny atom azotu, i występowania tych związków w równowadze tautomerycznej^{144,145} (Rysunek 30). Jeżeli rozważać różnice tylko między tautomerami 2-, 3- i 4-hydroksypirydynolowymi można postulować, że ich właściwości chemiczne będą zależne od reaktywności grupy hydroksylowej, która będzie zależna od efektu indukcyjnego pierścienia pirydynowego. Sytuacja zmienia się radykalnie, gdy rozważyć naturę i potencjalne właściwości chemiczne tautomerów, w których proton usytuowany jest na endocyklicznym atomie azotu. W przypadku 2-pirydynolu **160M** otrzymujemy tautomer, który jest laktamem, w przypadku 3-pirydynolu **160H** powstaje jakże różny jon obojnaczy, a w przypadku 4-pirydynolu **160N** powstaje 4-keto-didehydropiperydyna, która może być traktowana jak drugorzędowa cykliczna amina.¹⁴⁶ Każdy z tych tautomerów, wywodzący się z pozornie podobnych związków macierzystych jest zupełnie różnym związkiem chemicznym. Problem równowagi tautomerycznej hydroksy \leftrightarrow okso pirydynoli był przedmiotem niezwykle ciekawych badań w wielu ośrodkach naukowych. Najwięcej wniósł wyniki otrzymane komplementarnymi metodami doświadczalnymi i obliczeniowymi, które ukazują, że przeniesienie protonu z jednego centrum na drugie nie jest tak proste jak to może wynikać z tzw. „chemii papierowej”. I tak, obliczenia dla 2-hydroksypirydyny w wodzie dowiodły, że w przeniesieniu protonu z atomu tlenu na atom azotu tej samej cząsteczki zaangażowane są trzy cząsteczki wody. Obliczenia dowiodły, że bezpośredni wewnątrzcząsteczkowy lub międzycząsteczkowy transfer protonu w wodzie jest energetycznie nieuprzywilejowany. W przypadku 4-hydroksypirydyny sytuacja wydaje się być jeszcze bardziej złożona, przy czym ustalono, że w roztworach wodnych związek ten występuje w formie okso a w fazie gazowej w formie hydroksy^{147,148} (Rysunek 30). Z tych



badania mogłam wnioskować, że pirydynole w zależności od usytuowania grupy hydroksylowej i w zależności od środowiska, mogą tworzyć struktury sprzyjające lub utrudniające planowane reakcje, co w moich badaniach uwidoczniło się w przypadku reakcji z 4-pirydynolem. W reakcjach kondensacji H-fosfonianów z 2- i 3-pirydynolami obserwowałam tworzenie się oczekiwanych nukleozydo pirydynylo H-fosfonianodiestrów. Widocznie w środowisku reakcji udział formy okso (tylko ten tautomer może reagować z utworzeniem estru fosforowego) dla tych pirydynoli jest na tyle wysoki, że reakcja zachodzi do odpowiedniego H-fosfonianodiestru **161**. W przypadku analogicznej reakcji z udziałem 4-pirydynolu, oczekiwany H-fosfonianodiester nie tworzył się, gdyż jak zakładam, udział formy hydroksy jest tak niewielki, że reakcja praktycznie nie zachodzi. Jeśli tak faktycznie jest, to można by spodziewać się produktu reakcji formy okso, ale z utworzeniem amidofosfonianu (utworzenie wiązania P-N), a nie fosfonianoestru. W badanej przeze mnie reakcji, bez względu na sposób aktywacji H-fosfonianu **159** nie obserwowałam tworzenia się żadnego z powyższych związków i przyznaję, że nie potrafię tego faktu wytłumaczyć. Jest prawdopodobnym, że w wieloskładnikowej mieszaninie reakcyjnej, w trakcie kondensacji rodzaj i udział różnych składników tej mieszaniny (kwas piwaloilowy i jego sole, chlorowódor i jego sole) tak modulują strukturę 4-pirydynolu, że przyjmuje on formę niereaktywną (np. N-protonowana forma okso) w stosunku do aktywowanego H-fosfonianu **159** i dlatego nie tworzy się oczekiwany H-fosfonianodiester **161**.



Rysunek 30

Podsumowując tę część moich badań mogę stwierdzić, że pokonanie trudności syntetycznych pozwoliło mi otrzymać wszystkie planowane arylo nukleozydo fosforanodiestry **162A-N**, niezbędne w dalszych badaniach ich właściwości w mediach hodowlanych komórek oraz właściwości substratowych w reakcjach hydrolizy z udziałem enzymów.

The synthesis of poly(2-vinylpyridine) (P2VP) is a well-known process, but the synthesis of block copolymers containing P2VP segments is more challenging. In this study, we have developed a novel method for the synthesis of P2VP-b-PAA block copolymers. The synthesis involves the sequential addition of monomers to a living polymer chain. First, P2VP is synthesized using a living anionic mechanism. Then, the living P2VP chain is reacted with anhydride monomers to form a living poly(anhydride) (PAA) segment. The resulting P2VP-b-PAA block copolymer is then reacted with a diacid to form the final block copolymer. The molecular weight and polydispersity of the block copolymers were determined by gel permeation chromatography (GPC). The results show that the block copolymers have a narrow molecular weight distribution and high molecular weight. The block copolymers were characterized by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The FTIR spectra show the characteristic absorption bands of P2VP and PAA. The NMR spectra show the characteristic peaks of P2VP and PAA. The block copolymers were also characterized by dynamic mechanical analysis (DMA). The results show that the block copolymers have a high glass transition temperature (T_g) and a high modulus. The block copolymers were also characterized by thermogravimetric analysis (TGA). The results show that the block copolymers have a high thermal stability.

Table I. Molecular Weights and Polydispersities of P2VP-b-PAA Block Copolymers

Sample	Molecular Weight (M _w)	Polydispersity (M _w /M _n)
P2VP	~100,000	~1.05
P2VP-b-PAA	~200,000	~1.10
P2VP-b-PAA	~300,000	~1.15
P2VP-b-PAA	~400,000	~1.20

The results of the GPC analysis are shown in Table I. The molecular weight and polydispersity of the P2VP-b-PAA block copolymers increase with increasing the amount of anhydride monomers. The results of the FTIR and NMR analysis are shown in Figures 1 and 2, respectively. The FTIR spectra show the characteristic absorption bands of P2VP and PAA. The NMR spectra show the characteristic peaks of P2VP and PAA. The results of the DMA analysis are shown in Figure 3. The results show that the block copolymers have a high glass transition temperature (T_g) and a high modulus. The results of the TGA analysis are shown in Figure 4. The results show that the block copolymers have a high thermal stability.

3.2 Rozkład arylo nukleozydo fosforanodiestrów

Trwałość arylo nukleozydo fosforanodiestrów **162A-N** obserwowałam w medium hodowlanym komórek RPMI-1640 (pH = 7.6) oraz w mieszaninie RPMI z 10% objętościowymi surowicy z płodów bydłych, FBS. Do badań stosowałam 2 μ M roztwory (zawierające 5% objętościowych DMSO) poszczególnych fosforanodiestrów. Związki inkubowane były w 37°C a ich rozkład śledziłam za pomocą analizy HPLC. Wyznacznikiem trwałości badanych fosforanodiestrów w RPMI i RPMI/FBS były czasy ich połowicznego rozkładu ($t_{1/2}$).

Badania nad trwałością fosforanodiestrów typu **162** w RPMI, miały dostarczyć informacji o podatności tych związków na hydrolizę chemiczną. Natomiast analogiczne badania w RPMI z dodatkiem FBS (9:1), niosącego aktywności fosfoesterazowe, miały określić podatność tych związków na hydrolizę katalizowaną enzymami. W RPMI arylo nukleozydo fosforanodiestry **162A-N** okazały się związkami trwałymi (bez zmian po 6 dniach), czego można było się spodziewać na podstawie wcześniejszych doniesień literaturowych. Inaczej przedstawia się ich trwałość w środowisku niosącym aktywności fosfoesteraz - RPMI/FBS, w którym fosforanodiestry **162A-N** ulegały rozkładowi do 5'-monofosforanów **60** (Schemat 27), a szybkość tego procesu zależała od rodzaju fosforoestrowej grupy aryłowej i rodzaju 2',3'-dideoksynukleozydu (Tabela 2).

Wśród fosforanodiestrów pochodnych AZT (**162dA-N**) nie obserwowałam różnic w szybkości rozkładu, w zależności od wpływu podstawników w pierścieniu aromatycznym. Rozkład fenylowych fosforanodiestrów AZT następował znacznie szybciej, jeżeli do pierścienia aromatycznego przyłączone były podstawniki elektronoakceptorowe, co jest szczególnie widoczne w przypadku pochodnej 2,4-dichlorofenyłowej **162dE**, która ulegała hydrolizie najszybciej. Można więc postulować, że obserwowana podatność na hydrolizę katalizowaną enzymami, w badanej serii fosforanodiestrów **162dA-N**, zależała od stabilizacji anionu aryloksylogowego jako grupy opuszczającej (energia rezonansu). Takiej stabilizacji sprzyjają oczywiście podstawniki wyciągające elektrony z pierścienia aromatycznego, czego skutki obserwowano w powyższych doświadczeniach. W serii pirydynyloowych fosforanodiestrów AZT, pochodne z grupą 3-pirydynyłową **162H** i 4-pirydynyłową **162N** ulegały hydrolizie z udziałem enzymów najszybciej. Również i w tym przypadku zaznaczał się wpływ podstawników w pierścieniu pirydynyłowym. Fosforanodiestry **162dK-L** z podstawnikami dostarczającymi elektrony (-CH₃) w części aryłowej były wyraźnie trwalsze, natomiast te, z podstawnikami elektronoakceptorowymi (-Cl) **162I-J** były mniej trwałe. Zastanawiające jest, że w przypadku pochodnych 3-pirydynyloowych, bez względu na rodzaj podstawienia, były one dużo trwalsze niż fosforanodiestry **162H** zawierający niepodstawioną resztę pirydynyłową. Być może za większą trwałość fosforoestrowego wiązania pochodnych **162I-L** vs **162H** mogą

THE EFFECTS OF ...

The first part of the study ...

The second part of the study ...

The third part of the study ...

The fourth part of the study ...

The fifth part of the study ...

The sixth part of the study ...

The seventh part of the study ...

The eighth part of the study ...

The ninth part of the study ...

The tenth part of the study ...

The eleventh part of the study ...

The twelfth part of the study ...

The thirteenth part of the study ...

The fourteenth part of the study ...

The fifteenth part of the study ...

The sixteenth part of the study ...

The seventeenth part of the study ...

The eighteenth part of the study ...

The nineteenth part of the study ...

The twentieth part of the study ...

The twenty-first part of the study ...

The twenty-second part of the study ...

The twenty-third part of the study ...

The twenty-fourth part of the study ...

The twenty-fifth part of the study ...

The twenty-sixth part of the study ...

The twenty-seventh part of the study ...

The twenty-eighth part of the study ...


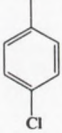

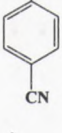
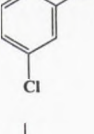
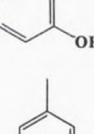
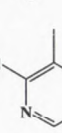
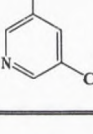

The twenty-ninth part of the study ...

The thirtieth part of the study ...

odpowiadać inne efekty związane z obecnością podstawników w pierścieniu pirydynylowym, np. takie, które utrudniałyby wiązanie substratu w centrum aktywnym enzymu.

Arylowe fosforanodiestry ddU typu **162c** i ddA **162b** wydają się być gorszymi substratami enzymów hydrolitycznych, ale one także ulegały hydrolizie do odpowiednich 5'-monofosforanów (Schemat 27), co sugeruje, że także i one mogą być przekształcane w komórkach do odpowiednich 5'-trifosforanów.

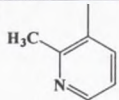
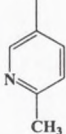
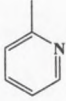
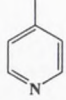
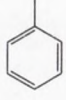
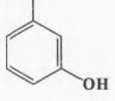
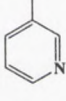
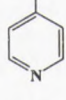

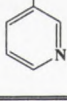
Tabela 2. Trwałość arylo nukleozydo fosforanodiestrów typu **162** w RPMI/FBS

Nr związku	ddN	Ar	$t_{1/2}$ [min]
162dA	AZT		568
162dB	AZT		330
162dC	AZT		478
162dD	AZT		425
162dE	AZT		182
162dG	AZT		108
162dH	AZT		233
162dI	AZT		976
162dJ	AZT		436

The Board of Directors has the honor to acknowledge the cooperation and assistance of the various departments of the University of California, Berkeley, in the preparation of this report. The Board also wishes to express its appreciation to the many individuals who have contributed to the success of the University's activities during the past year.

Table 1. Financial Statement of the University of California, Berkeley, for the year ending June 30, 1954.

Category	1953-54	1952-53	1951-52
Operating Expenses	1,200,000	1,100,000	1,000,000
Operating Income	800,000	700,000	600,000
Net Income	200,000	150,000	100,000
Reserve for Depreciation	100,000	100,000	100,000
Reserve for Contingencies	50,000	50,000	50,000
Reserve for Uncontingent Liabilities	50,000	50,000	50,000
Reserve for Unliquidated Obligations	50,000	50,000	50,000
Reserve for Unliquidated Claims	50,000	50,000	50,000
Reserve for Unliquidated Debts	50,000	50,000	50,000
Reserve for Unliquidated Taxes	50,000	50,000	50,000
Reserve for Unliquidated Other	50,000	50,000	50,000
Total Reserves	500,000	500,000	500,000
Total Assets	1,700,000	1,600,000	1,500,000
Total Liabilities	500,000	500,000	500,000
Total Equity	1,200,000	1,100,000	1,000,000

Nr związku	ddN	Ar	t _{1/2} [min]
<u>162dK</u>	AZT		949
<u>162dL</u>	AZT		1732
<u>162dM</u>	AZT		2567
<u>162dN</u>	AZT		484
<u>162cA</u>	ddU		1506
<u>162cG</u>	ddU		888
<u>162cH</u>	ddU		3013
<u>162cN</u>	ddU		1414
<u>162bA</u>	ddA		2166
<u>162bH</u>	ddA		3850

Podsumowując tę część, mogę stwierdzić, że wszystkie otrzymane przeze mnie arylo nukleozydo fosforanodiestry typu **162** są substratami dla enzymów hydrolizujących obecnych w FBS i prawdopodobnie również w komórkach mogą być hydrolizowane do pożądanych monofosforanów. To, że wielkości t_{1/2} hydrolizy enzymatycznej badanych fosforanodiestrów typu **162** (Tabela 2) były zróżnicowane (108 min. – 3850 min.) odnotowałam jako korzystne, gdyż projektując na następnym etapie diarylo nukleozydo fosforanotriestry, mogłam wykorzystać te różnice jako jeden z czynników warunkujących kinetykę transformacji pronukleotydów do odpowiednich 5'-monofosforanów nukleozydów.



4. Diarylo nukleozydo fosforanotriestry

Zgodnie z przyjętym planem przystąpiłam do syntezy diarylo nukleozydo fosforanotriestrow typu **153**, projektowanych w koncepcji pronukleotydów. Obecność w ich cząsteczce dwóch grup aromatycznych otwierało możliwość modyfikowania właściwości tych związków, przez dobór różnych podstawników (elektronoakceptorowych lub elektronodonorowych) w pierścieniu aromatycznym. Dzięki temu miałam możliwość projektowania związków, które mogłyby spełniać zakładane właściwości potencjalnych pronukleotydów, jak np. odpowiednia trwałość chemiczna, podatność na hydrolizę z udziałem enzymów, czy odpowiednio dobrana lipofilowość. Przy wszystkich powyższych założeniach, planowane do syntezy związki musiały spełniać jeden podstawowy warunek, a mianowicie, metoda ich syntezy winna być możliwie uniwersalna, prosta i efektywna oraz wspólna dla wszystkich fosforanotriestrow typu **153**.

4.1 Synteza diarylo nukleozydo fosforanotriestrow

Znanych jest kilka metod syntezy fosforanotriestrow. W swoich badaniach, potrzebowałam jednak podejścia w miarę uniwersalnego, pozwalającego szybko i efektywnie otrzymywać różnorodne fosforanotriestrowe pochodne typu **153**. Dlatego postanowiłam przebadać różne podejścia i wybrać takie, które umożliwiłyby mi uzyskanie całych serii pożądaných produktów.

4.1.1 Klasyczna metoda fosforanotriestrowa

Dysponując szerokim spektrum arylo nukleozydo fosforanodiestrow **162A-N**, w pierwszej kolejności postanowiłam przebadać użyteczność dla moich celów klasycznej metody fosforanotriestrowej^{149,150} (Schemat 22 i 23). Jako pierwszy zastosowałam 3-pirydynyloowy fosforanodiester AZT **162dH**, który kondensowałam z fenolem wobec chlorku 2,4,6-triizopropylobenzenosulfonowego (TPSCI) w chlorku metylenu zawierającym N-metyloimidazol (10% objętościowych) jako katalizator nukleofilowy. W badanych reakcjach użyłam 3 molowy nadmiar fenolu w stosunku do fosforanodiestru i 3 ekwiwalenty molowe czynnika kondensującego. Reakcja przebiegła ilościowo i szybko (< 5 min., ³¹P NMR), generując oczekiwany fenilo 3-pirydynylo fosforanotriester AZT **153dAH**, o przesunięciu chemicznym w widmie ³¹P NMR ok. -11ppm. Podobny rezultat uzyskałam w reakcji kondensacji 2,4-dichlorofenilo fosforanodiestru **162dE** z 3-pirydynolem, otrzymując 2,4-dichlorofenilo 3-pirydynylo fosforanotriester AZT **153dEH**. Z pewnym zaskoczeniem obserwowałam, że w tych samych warunkach, kondensacja fenilo fosforanodiestru AZT **162dA** z 3-pirydynolem zachodziła bardzo powoli, generując mieszaninę produktów, spośród których

1. Introduction

The first part of the report deals with the general situation of the country in 1950. It is a year of transition, a year when the old order is being replaced by a new one. The economy is in a state of flux, and the government is struggling to maintain order and stability. The report discusses the various challenges facing the country and the steps being taken to address them. It also touches upon the social and political climate of the time.

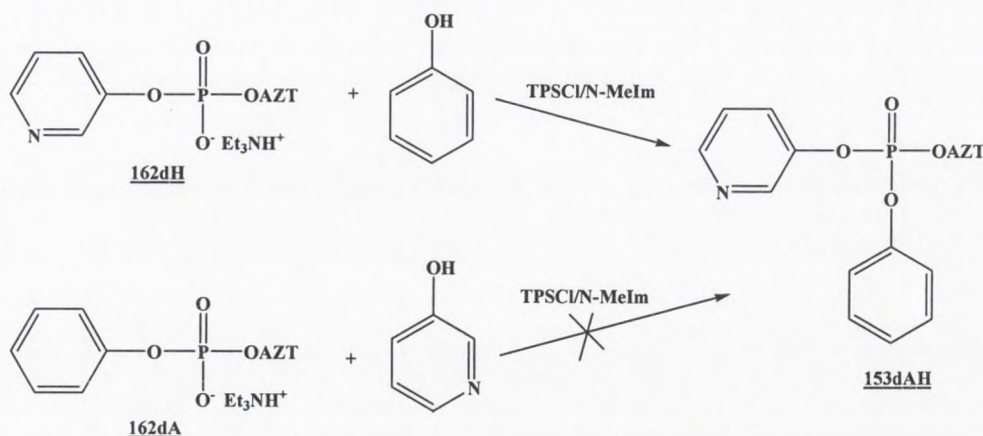
2. Economic Situation

The economic situation in 1950 is characterized by a period of uncertainty. There is a significant gap between the demand for goods and the supply available. Inflation is a major concern, and the government is implementing measures to control it. The report provides a detailed analysis of the economic indicators and the impact of the government's policies.

3. Social and Political Conditions

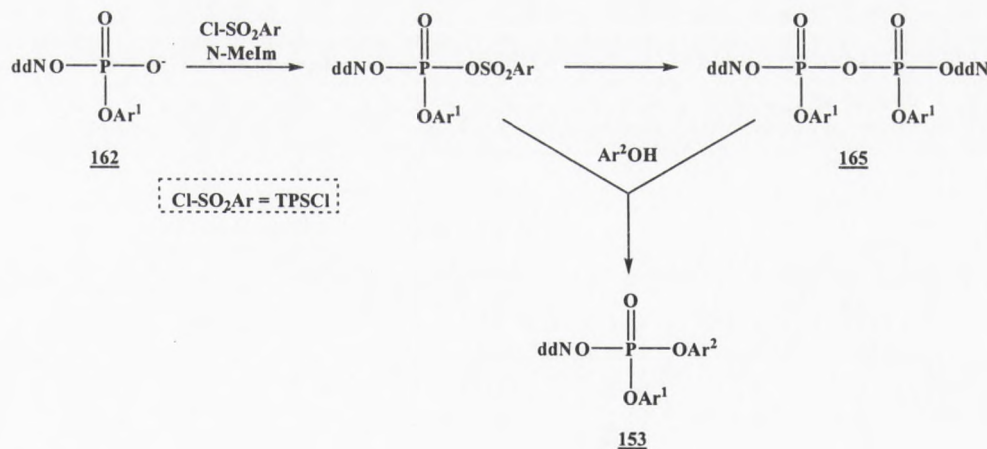
The social and political conditions in 1950 are also in a state of flux. There is a growing awareness among the population of their rights and responsibilities. The government is working to improve the social services and to ensure that the needs of all citizens are met. The report discusses the various social and political movements and the role of the government in addressing them. It also touches upon the international relations of the country at the time.

fosforanotriester **153dAH** stanowił ostatecznie jedynie 16% (> 3 godz., ^{31}P NMR). Wyniki te tłumaczyłam różnicą w reaktywności fosforanodiestrów, związaną z efektem indukcyjnym fosforoestrowej grupy arylowej (Schemat 22).



Schemat 22

Wyjaśnienie tak drastycznych różnic w tworzeniu fosforanotriestrów w badanych warunkach można wyjaśnić, biorąc pod uwagę mechanizm ich tworzenia. Badania Michalskiego i Cramera¹⁵¹ dowiodły, że o szybkości tworzenia fosforanotriestrów w dyskutowanej metodzie decyduje reaktywność powstającego związku pośredniego – symetrycznego diarylo dinukleozydo pirofosforanu typu **165** (Schemat 23).



Schemat 23. Schemat aktywacji fosforanodiestrów typu **162** chlorkiem 2,4,6-triizopropylbenzenosulfonowym (TPSCl)



Jeśli pominąć czynniki zewnętrzne (np. kataliza nukleofilowa czy temperatura), to reaktywność tego związku jest bardzo silnie zależna od fosforoestrowych grup arylowych. Już we wczesnych pracach zaobserwowano bardzo duże różnice w szybkościach tworzenia fosforanotriestrów wtedy, gdy grupą arylową w substracie fosforanodiestrowym był niepodstawiony fenyl i kiedy aryłem był 2-(lub 4-)chlorofenyl. Sądzę, że w moim przypadku napotkałam jeszcze bardziej drastyczny przykład, w którym dojście do tego samego produktu (3-Py i Ph) silnie zależało od kolejności wprowadzania grup arylowych. Jeśli substratem był fenylowy fosforanodiestr **162dA** to jego aktywacja prowadziła do difenilo dinukleozydo pirofosforanu, który z racji obecności słabo aktywujących centra fosforowe grup fenylowych, był niereaktywny i praktycznie nie tworzył oczekiwanego związku **153dAH** z 3-pirydynolem. W przypadku, gdy substratem był 3-pirydynylowy fosforanodiestr **162dH** tworzył się pirofosforan, którego centra fosforowe były silniej (w porównaniu z fenolem) aktywowane przez grupy pirydynylowe i związek ten, w reakcji z fenolem, efektywnie tworzył oczekiwany fosforanotriester **153dAH**.

Sądzę, że powyższe obserwacje i wnioski mogą być bardzo pomocną wskazówką dla każdego, kto chce zastosować klasyczną metodę fosforanotriestrową. Przystępując do syntezy, warto rozważyć, jakie grupy ochronne zastosować w substracie fosforanodiestrowym, gdyż to właśnie one wpływają na reaktywność symetrycznego pirofosforanu **165**, decydującego o totalnej kinetyce tworzenia fosforanotriestru tą metodą. Warto dodać, że w przypadku pochodnych arylowych, jeżeli stosować arylole o odpowiednio wysokiej kwasowości (w moim przypadku 2,4-dichlorofenol pKa 7.85 i 3-pirydynol pKa 8.72), to kolejność wprowadzania poszczególnych aryli nie ma większego znaczenia, gdyż w każdym przypadku tworzący się pirofosforan jest dostatecznie reaktywny by utworzył się pożądaný fosforanotriester typu **153dEH**.

4.1.2 Metody z wykorzystaniem reakcji oksydatywnej kondensacji

Znacznie skuteczniejsze w syntezie fosforanotriestrów typu **153** okazało się podejście z użyciem reakcji oksydatywnej kondensacji. Ten rodzaj reakcji, został odkryty i opisany przez Todda i współpracowników^{152,153} dla diestrów H-fosfonianowych sprzęganych z N-nukleofilami wobec CCl₄ i jest do dziś stosowany w syntezie analogów nukleotydów i oligonukleotydów oraz wielu innych pochodnych fosforowych. Podejście to opiera się na przekształceniu H-fosfonianodiestrów typu **161** w reaktywne pochodne chlorofosforanowe, które w obecności alkoholi tworzą odpowiednie estry fosforowe. Adaptacja tego podejścia dla moich celów wydawała się szczególnie użyteczna, gdyż pozwoliłaby szybko, skutecznie i bez konieczności izolowania związków pośrednich otrzymywać fosforanotriestrowe pochodne, planowane w mojej pracy do dalszych badań.

The following table shows the results of the survey conducted in 1975, 1976, and 1977. The data is presented in three columns corresponding to the years. The rows represent different categories of respondents. The percentages are calculated based on the total number of respondents for each year.

Category	1975 (%)	1976 (%)	1977 (%)
Category 1	15	20	25
Category 2	30	35	40
Category 3	45	40	35
Category 4	10	5	15



Figure 1

The following table shows the results of the survey conducted in 1975, 1976, and 1977. The data is presented in three columns corresponding to the years. The rows represent different categories of respondents. The percentages are calculated based on the total number of respondents for each year.



Figure 2

Dodatkowo, do prób syntezy fosforanotriestrów typu **153** według tego podejścia, zachęciły mnie pomyślne wcześniejsze rezultaty otrzymywania (9*H*-fluoren-9-yl)metylu 4-pirydynylo fosforanotriestru nukleozydowego typu **164** (w syntezie **162N**; Schemat 21), gdzie również stosowałam jod jako utleniacz. Wyniki te pozwoliły mi przypuszczać, iż pomimo zróżnicowanej nukleofilowości reagentów hydroksylowych, które miałam zamiar zastosować, metoda ta pozwoli na otrzymanie pożądanych związków i umożliwi realizację dalszych etapów rozprawy.

Zanim przystąpiłam do syntezy diarylo nukleozydo fosforanotriestrów podjęłam badania nad optymalizacją warunków oksydatywnej kondensacji, najdogodniejszych dla moich potrzeb. W reakcji tej, H-fosfonianodiestry ulegają utlenieniu jodem w obecności pirydyny do reaktywnych związków przejściowych, które w reakcji z nukleofilami (fenole lub pirydynole) tworzą oczekiwane produkty. Ze względów oczywistych, tego typu reakcje należy prowadzić w warunkach całkowicie bezwodnych. W przeciwnym razie, produktami ubocznymi będą odpowiednie, niepożądane arylo nukleozydo fosforanodiestry.

Postuluje się, że reakcja oksydatywnej kondensacji inicjowana jest przez wygenerowanie jodofosforanu **166**, który w obecności pirydyny, prowadzi do adduktu pirydyniowego **167**, który z kolei jako wysoce reaktywny produkt pośredni, w reakcji np. z nukleofilami hydroksylowymi, prowadzi do tworzenia się pożądanych fosforanotriestrów¹⁵⁷ (Schemat 25). Udział adduktu pirydyniowego typu **167**, w omawianym cyklu reakcji oksydatywnej kondensacji, był postulowany od dłuższego czasu. Chcąc poznać, we własnych doświadczeniach i na nukleofilach aryloksylowych, wpływ pirydyny jako katalizatora zasadowo-nukleofilowego, przeprowadziłam kilka prostych, modelowych reakcji, w których oksydacyjną kondensację dietylowego H-fosfonianu z fenolem prowadziłam w rozpuszczalnikach obojętnych (acetonitryl, chlorek metylenu) bez i wobec pirydyny. Jeśli w mieszaninie reakcyjnej nie było pirydyny, nie obserwowałam tworzenia się dietylo fenylo fosforanotriestru. Natomiast te same reakcje wobec pirydyny zachodziły bardzo szybko i ilościowo (³¹P NMR). Zatem, rola katalizy nukleofilowej w reakcji oksydatywnej kondensacji jest niezwykle istotna i decyduje o skuteczności tworzenia pożądanych produktów. Ponadto, pirydyna może również aktywować komponent hydroksylowy poprzez wytworzenie bardziej nukleofilowego anionu alkoksylowego, a więc działać także jako katalizator zasadowy, co dodatkowo może przyspieszać reakcję. W reakcjach, które prowadziłam, H-fosfonianodiestry poddawałam *in situ* kondensacji z odpowiednim komponentem hydroksylowym, w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (10% objętościowych) i dodatkowo wprowadzałam do reakcji pirydynę wraz z rozpuszczonym jodem, co sprzyjało szybkim i efektywnemu tworzeniu fosforanotriestrowych produktów typu **153** (< 3 min., ³¹P NMR).

The first part of the report is devoted to a general description of the project and its objectives. It is followed by a detailed description of the methodology used in the study. The results of the study are presented in the following section, and the conclusions are drawn in the final section.

The methodology used in this study is based on a combination of qualitative and quantitative methods. The qualitative methods include interviews, focus groups, and content analysis. The quantitative methods include surveys and statistical analysis.

The results of the study show that there is a significant relationship between the variables studied. The findings suggest that the independent variable has a positive effect on the dependent variable.

In conclusion, the study has provided valuable insights into the relationship between the variables studied. The findings have important implications for practice and further research.

Na szybkość i wydajność reakcji oksydacyjnej kondensacji wpływała również ilość zastosowanego jodu.¹⁵⁸ W modelowych reakcjach, w których zastosowałam równomolowe ilości jodu wobec H-fosfonianodiestru, zachowując stały nadmiar komponentu hydroksylowego, kondensacja przebiegała bardzo wolno i po godzinie obserwowałam jedynie kilka procent powstałego fosforanotriestrowego produktu (³¹P NMR). Natomiast stosując nieduży nadmiar jodu (1.5 - 2 ekw. mol.), reakcja była zakończona w ciągu kilku minut, a przy większych nadmiarach (3 - 5 ekw. mol.), nawet poniżej 1 minuty. W przypadku syntezy tytułowych diarylo nukleozydo fosforanów typu **153**, 1.5 - 2 molowy nadmiar jodu był wystarczający, by reakcje oksydacyjnej kondensacji przebiegały szybko i praktycznie ilościowo.

W przeprowadzonych reakcjach oksydacyjnej kondensacji stosowałam również 5 molowy nadmiar odpowiedniego komponentu hydroksylowego. Taka ilość, niekoniecznie niezbędna, zabezpieczała przed potencjalnie możliwym tworzeniem się symetrycznych fosforanotriestrów, w reakcji z nieprzereagowanym fenolem pozostałym z poprzedzającej kondensacji do H-fosfonianodiestru.

W dodatkowych badaniach modelowych obserwowałam także, że na wynik reakcji utleniania i kondensacji prowadzonych *in situ* wpływała obecność poszczególnych reagentów. I tak, niedostatecznie szybkie dostarczenie odpowiedniego komponentu hydroksylowego do medium reakcyjnego powodowało, że wygenerowane związki pośrednie (**166** i **167**) reagując z różnymi nukleofilami obecnymi w środowisku reakcji, a także między sobą, generowały złożone mieszaniny trudnych do zidentyfikowania produktów (³¹P NMR). Dlatego przeprowadzając reakcje oksydacyjnej kondensacji, do arylo nukleozydo H-fosfonianu **161** najpierw dodawałam odpowiedni fenol lub pirydynol (osuszony przez odparowanie z pirydyną) a w następnej kolejności, jod w pirydynie. Prowadząc reakcję w taki sposób tzn., w pierwszej kolejności dodając reagent hydroksylowy a następnie (po ok. 10 sekundach) jod w pirydynie, otrzymywałam wszystkie oczekiwane fosforanotriestry typu **153**, nie obserwując tworzenia się potencjalnie możliwych produktów innych reakcji (³¹P NMR).

Mając dobrze rozpoznane warunki reakcji oksydacyjnej kondensacji, techniki ich wykonania i możliwie optymalne stosunki reagentów, przystąpiłam do syntezy wszystkich planowanych diarylo nukleozydo fosforanotriestrów typu **153**. Nukleozydo H-fosfoniany **159** kondensowałam z odpowiednimi fenolami lub pirydynolmi wobec czynnika kondensującego (najczęściej chlorofosforan difenylowy - 1.1 ekw. mol.), w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (10% objętościowych) [0.1 mmol/1ml]. W reakcji użyłam niewielki, lecz wystarczający, 1.1 - 1.2 molowy nadmiar komponentu hydroksylowego (Ar¹OH) w stosunku do nukleozydo H-fosfonianu. Reakcje kondensacji zachodziły szybko (< 5 min. i < 20 min. odpowiednio dla PvCl i DPCP; ³¹P NMR) i czysto, generując arylo nukleozydo

The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the war. It is followed by a detailed account of the military operations in the various theaters of war. The author then discusses the political and economic conditions of the country and the impact of the war on the population. The report concludes with a summary of the findings and a list of recommendations.

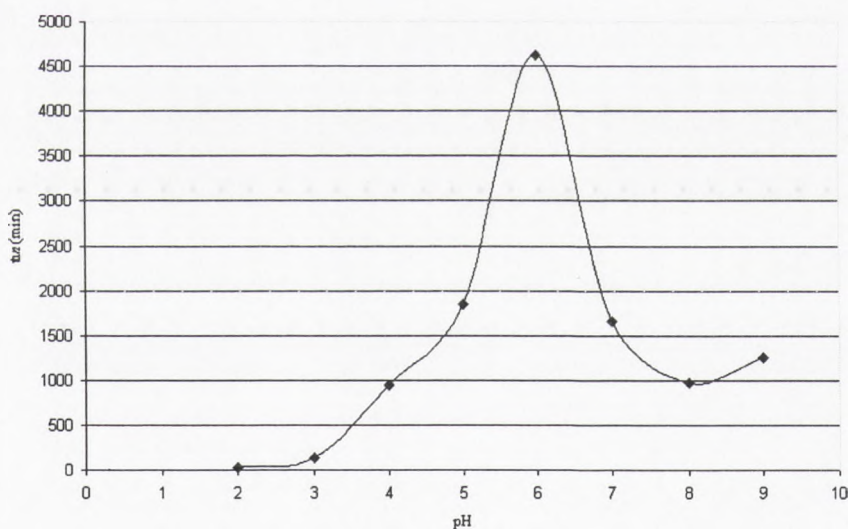
Year	Population	Production	Exports	Imports
1910	10,000,000	100,000,000	50,000,000	50,000,000
1911	10,500,000	110,000,000	55,000,000	55,000,000
1912	11,000,000	120,000,000	60,000,000	60,000,000
1913	11,500,000	130,000,000	65,000,000	65,000,000
1914	12,000,000	140,000,000	70,000,000	70,000,000
1915	12,500,000	150,000,000	75,000,000	75,000,000
1916	13,000,000	160,000,000	80,000,000	80,000,000
1917	13,500,000	170,000,000	85,000,000	85,000,000
1918	14,000,000	180,000,000	90,000,000	90,000,000
1919	14,500,000	190,000,000	95,000,000	95,000,000
1920	15,000,000	200,000,000	100,000,000	100,000,000

The second part of the report deals with the specific details of the military operations. It includes a description of the tactics used by the various armies and the results of the battles. The author also discusses the role of the navy and the air force in the war. The report concludes with a list of the names of the officers and soldiers who were killed in action.

4.2 Trwałość i ścieżki rozkładu diarylo nukleozydo fosforanotriestrów

Jak już wspomniałam, bardzo ważnym aspektem przy projektowaniu potencjalnych proleków jest ich trwałość chemiczna i odporność na degradację enzymatyczną, decydująca o formie, w jakiej związki dotrą do miejsca działania. Rozpoznanie sposobu rozkładu fosforanotriestrów typu **153** jest sprawą kluczową, gdyż pozwala na ocenę czy związki te zdolne są do generowania produktów biologicznie aktywnych. Ponadto, na tym etapie można próbować korelować ich strukturę z aktywnością anti-HIV i cytotoksycznością.

Pierwsze informacje dotyczące trwałości diarylowych fosforanotriestrów 2',3'-dideoksynukleozydów **153** uzyskałam badając ich rozkład w zależności od pH środowiska. Dane te pozwoliły mi wstępnie ocenić potencjalną stabilność diarylowych fosforanotriestrów w medium fizjologicznym (pH = 7.4) i kierunek ich rozkładu, ale również dostarczyły mi wskazówek pomocnych w trakcie prac syntetycznych nad tymi związkami. W tym celu zastosowałam 1M bufor fosforanowy KH_2PO_4 w zakresie pH = 2 - 9, a proces śledziłam przy pomocy HPLC, na przykładzie modelowego fenylo 3-pirydynylo fosforanotriestru 3'-acetylotymidyny **153eAH**. Trwałość tego związku w poszczególnym pH określiłam wyznaczając $t_{1/2}$ a wyniki tego eksperymentu przedstawiłam na wykresie 1.



Wykres 1. Czas połowicznego rozkładu fenylo 3-pirydynylo fosforanotriestru 3'-acetylotymidyny **153eAH** w zależności od pH środowiska

Jak wynika z wykresu, stabilność badanego fosforanotriestru jest najwyższa w środowisku o pH = 6. Dostarczyło mi to wstępnych informacji, które z fosforoestrowych wiązań jest trwalsze i tym samym, który fosforanodiester będzie generowany w przewodzie w warunkach fizjologicznych.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

RESEARCH REPORT

NO. 100

BY

DR. J. H. HARRIS

AND

DR. W. R. HARRIS

CHICAGO, ILL.

1900

PRINTED BY

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

CHICAGO, ILL.

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

1900

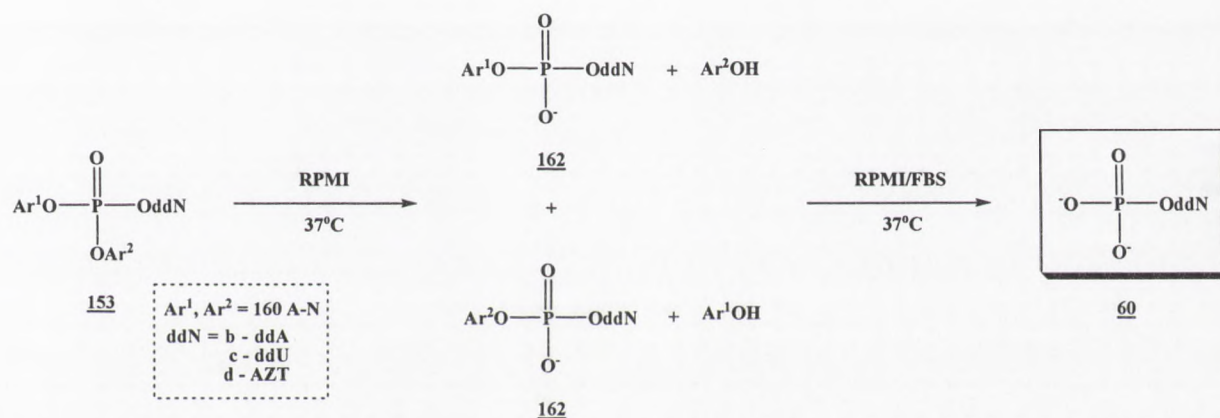
1900

1900

1900

1900

Następnie przebadalam trwałość wszystkich otrzymanych przeze mnie diarylo nukleozydo fosforanotriestrów typu **153** w medium hodowlanym komórek, RPMI-1640 (pH = 7.6). Związki inkubowałam w 37°C, a proces ich rozkładu monitorowałam przy pomocy HPLC. Dla poszczególnych fosforanotriestrów wyznaczyłam $t_{1/2}$, a tworzące się podczas ich hydrolizy produkty identyfikowałam przez dodawanie do próbek odpowiednich wzorców. Ponieważ w środowisku RPMI-1640 nie występuje aktywność enzymatyczna, rozkład fosforanotriestrów zachodził wyłącznie z udziałem hydrolizy chemicznej. Badając ścieżki rozkładu analizowanych związków (HPLC) obserwowałam ścisłą zależność ich trwałości z charakterem grupy arylovej i właściwościami elektronowymi podstawników pierścienia aromatycznego. W przypadku niesymetrycznych fosforanotriestrów, tworzące się produkty hydrolizy (Schemat 27) powstawały w różnych stosunkach (Tabela 3 i 4), co można korelować ze zróżnicowaniem grup odchodzących.



Schemat 27. Schemat rozkładu diarylo nukleozydo fosforanotriestrów **153** w RPMI i arylo nukleozydo fosforanodiestrów **162** w RPMI/FBS, 37°C

Dodatkowo zaobserwowałam, że trwałość diarylowych fosforanotriestrów typu **153** silnie zależy od reszty nukleozydowej. Związki niosące takie samo ugrupowanie diarylo fosforoestrowe, lecz inny nukleozyd, ulegają rozkładowi do tych samych produktów w porównywalnych proporcjach, ale w różnym czasie. Fosforanotriestrowe pochodne ddU i ddA wykazały znacznie większą stabilność w porównaniu z odpowiednimi pochodnymi AZT. Prawdopodobnie, różnice te są spowodowane obecnością elektronoakceptorowej grupy 3'-azydkowej w AZT, która pomimo znacznego dystansu, widocznie zwiększa elektrofilowość centrum fosforowego. Podobne efekty związane z podstawnikami w nukleozydzie obserwowałam w przypadku pochodnych 3'-acetylotymidyny, w których obecność funkcji acetylowej wpływała w widoczny sposób na reaktywność centrum fosforowego.

The first part of the paper discusses the importance of the user's perspective in the design of information systems. It argues that a user-centred design approach is essential for ensuring that the system meets the needs of its intended users. This involves understanding the user's tasks, goals, and constraints, and then designing the system to support these. The second part of the paper describes a methodology for user-centred design, which includes the following steps: 1. Understanding and specifying the context of use. 2. Specifying the user requirements. 3. Producing design solutions. 4. Evaluating the design solutions. The paper concludes by emphasizing the need for a holistic approach to user-centred design, one that takes into account the entire user experience, from the initial interaction with the system to the final outcome.



Figure 1. The user-centred design process.

The user-centred design process is a iterative one, and it is important to recognize that the steps are not strictly linear. Often, designers will need to return to previous steps as they learn more about the user's needs and the system's requirements. The goal of user-centred design is to create a system that is easy to use, efficient, and effective. This requires a deep understanding of the user's perspective and a commitment to involving users throughout the design process. The paper concludes by noting that user-centred design is not just a methodology, but a mindset. It is a way of thinking about the design process that puts the user at the center of everything.

W Tabeli 3 przedstawiłam wyniki połowicznego rozkładu przykładowych diarylowych fosforanotriestrów pochodnych 3'-acetylo-3'-deoksytymidyny typu **153e**. Związki te użyłam jako modelowe, i przedstawiłam wyniki ich stabilności w celu wskazania podobieństw i wychwycenia różnic, w zależności od rodzaju reszt arylowych i nukleozydowej. Dane ilustrujące trwałość i sposób rozkładu poszczególnych fosforanotriestrów rozważanych jako potencjalne pronukleotydy (**153**), zamieściłam w Tabeli 4. Dodatkowo przedstawiłam uzyskane przeze mnie wyniki rozkładu diarylowych fosforanotriestrów AZT (**153dAA**, **153dFF**), opisanych w literaturze (Tabela 4).

Tabela 3. Trwałość diarylowych fosforanotriestrów 3'-O-acetylo tymidyny typu **153e** w RPMI (37°C) oraz produkty ich rozkładu




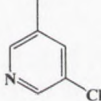








Nr związku	ddN	Ar ¹	Ar ²	t _{1/2} (min) RPMI	Produkty rozkładu
153eAH	TO3'-Ac			924	162eA > 162eH ~3:1
153eAJ	TO3'-Ac			753	162eA
153eHH	TO3'-Ac			430	162eH

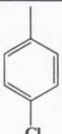
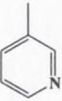

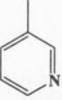


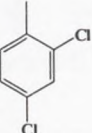
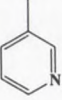
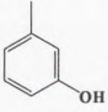
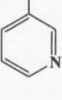
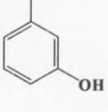
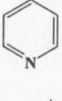

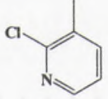

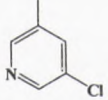
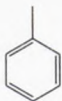
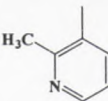
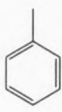
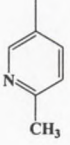
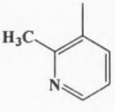
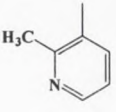
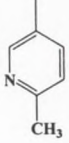
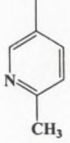
Tabela 4. Trwałość diarylowych fosforanotriestrów 2',3'-dideoksynukleozydów typu **153b-d** w RPMI (37°C) oraz produkty ich rozkładu

Nr związku	ddN	Ar ¹	Ar ²	t _{1/2} (min) RPMI	Produkty rozkładu
153dAH	AZT			3013	162dA > 162dH ~3:1
153dAN	AZT			770	162dA
153dAM	AZT			7701	162dA > 162dM ~3:1

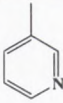
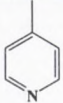
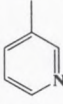
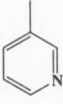
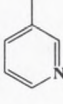
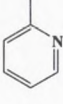
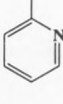
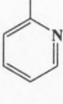
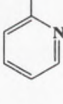
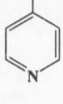
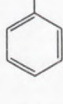
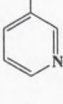
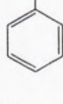
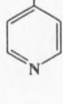
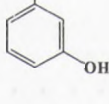
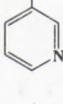
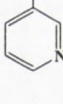
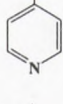

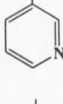
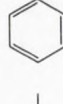

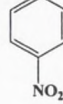
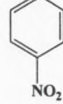
Faint, illegible text in the upper section of the page, possibly a header or introductory paragraph.

Main body of faint, illegible text, appearing to be several lines of a document.

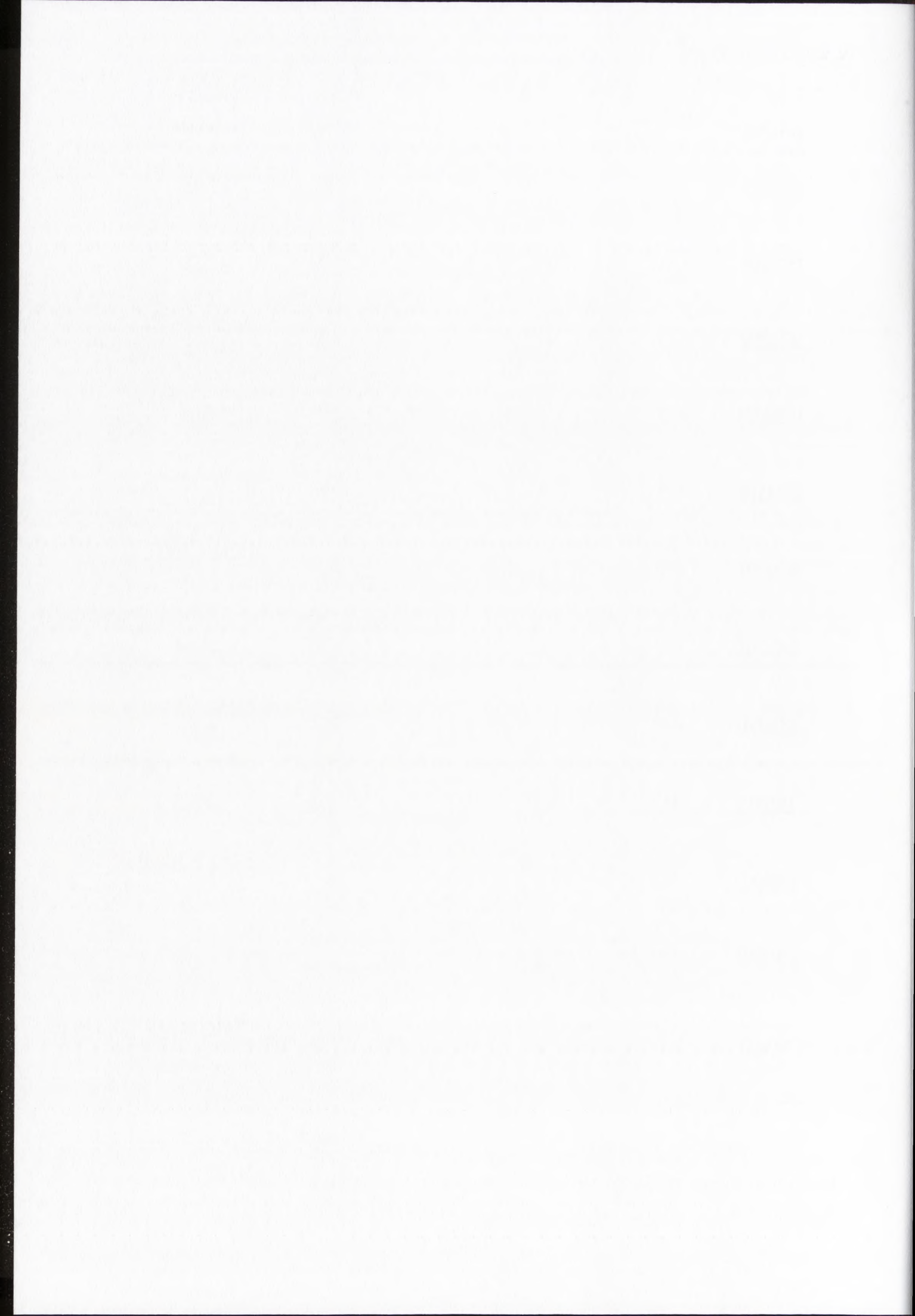
Lower section of faint, illegible text, possibly a conclusion or footer area.

Nr związku	ddN	Ar ¹	Ar ²	t _{1/2} (min) RPMI	Produkty rozkładu
<u>153dBH</u>	AZT			3300	<u>162dB</u> > <u>162dH</u> ~2:1
<u>153dCH</u>	AZT			2660	<u>162dC</u> > <u>162dH</u> ~2:1
<u>153dDH</u>	AZT			174	<u>162dH</u>
<u>153dEH</u>	AZT			396	<u>162dH</u>
<u>153dGH</u>	AZT			1444	<u>162dG</u> > <u>162dH</u> ~3:1
<u>153dGN</u>	AZT			797	<u>162dG</u>
<u>153dAI</u>	AZT			963	<u>162dA</u>
<u>153dAJ</u>	AZT			1506	<u>162dA</u>
<u>153dAK</u>	AZT			4951	<u>162dK</u>
<u>153dAL</u>	AZT			2665	<u>162dL</u>
<u>153dKK</u>	AZT			1034	<u>162dK</u>
<u>153dLL</u>	AZT			1283	<u>162dL</u>

Case No.	Case Name	Case Type	Case Status	Case Date	Case Location
1001	John Doe	Medical	Completed	2023-01-15	New York
1002	Jane Smith	Medical	In Progress	2023-02-01	California
1003	Michael Johnson	Medical	Completed	2023-02-10	Texas
1004	Sarah Williams	Medical	Completed	2023-02-20	Florida
1005	David Brown	Medical	In Progress	2023-03-05	Illinois
1006	Emily Davis	Medical	Completed	2023-03-15	Ohio
1007	Robert Miller	Medical	Completed	2023-03-25	Georgia
1008	Laura Wilson	Medical	In Progress	2023-04-01	Arizona
1009	Christopher Moore	Medical	Completed	2023-04-10	Colorado
1010	Amanda Taylor	Medical	Completed	2023-04-20	Washington
1011	Matthew Anderson	Medical	In Progress	2023-05-01	Oregon
1012	Olivia White	Medical	Completed	2023-05-10	Idaho
1013	Benjamin Green	Medical	Completed	2023-05-20	Montana
1014	Sophia Black	Medical	In Progress	2023-06-01	Wyoming
1015	Lucas Gray	Medical	Completed	2023-06-10	Utah
1016	Isabella Blue	Medical	Completed	2023-06-20	Nebraska
1017	Ethan Red	Medical	In Progress	2023-07-01	Kansas
1018	Ava Purple	Medical	Completed	2023-07-10	Oklahoma
1019	Noah Yellow	Medical	Completed	2023-07-20	Missouri
1020	Charlotte Pink	Medical	In Progress	2023-08-01	Arkansas

Nr związku	ddN	Ar ¹	Ar ²	t _{1/2} (min) RPMI	Produkty rozkładu
<u>153dHN</u>	AZT			295	<u>162dH</u>
<u>153dHH</u>	AZT			513	<u>162dH</u>
<u>153dHM</u>	AZT			990	<u>162dH</u> > <u>162dM</u> ~1:1
<u>153dMM</u>	AZT			1925	<u>162dM</u>
<u>153dMN</u>	AZT			307	<u>162dM</u> > <u>162dN</u> ~4:1
<u>153cAH</u>	ddU			3850	<u>162cA</u> > <u>162cH</u> ~3:1
<u>153cAN</u>	ddU			1610	<u>162cA</u>
<u>153cGH</u>	ddU			2475	<u>162cG</u> > <u>162cH</u> ~2:1
<u>153cHN</u>	ddU			420	<u>162cH</u>
<u>153bAH</u>	ddA			5331	<u>162bA</u> > <u>162bH</u> ~3:1
<u>153dAA</u>	AZT			trwały (6dni)	-
<u>153dFF</u>	AZT			86	<u>162dF/AZT 3</u> 1:1

Na podstawie uzyskanych wyników mogę stwierdzić, że wszystkie zaprojektowane i otrzymane diarylo nukleozydo fosforanotriestry typu 153 ulegają rozkładowi do odpowiednich fosforanodiestrów, a czas ich połowicznego rozkładu w większości przypadków można



korelować z wartością pKa reszty arylowej. W serii fosforanotriestrowych pochodnych zawierających grupę 3-pirydynylową a różne podstawniki fenyłowe, najniższą trwałość obserwowalam w przypadku pochodnych 4-cyjano- (**153dDH**) i 2,4-dichlorofenyłowych (**153dEI**). Te najbardziej kwasowe spośród badanych fenoli, z podstawnikami silnie wyciągającymi elektrony, okazały się najlepszymi grupami odchodzącymi i dlatego w wyniku ataku nukleofilowego cząsteczki wody na centrum fosforowe tworzył się fosforanodiester 3-pirydynylowy **162dH** jako jedyny produkt. Wpływ podstawników na labilność wiązania fosforoestrowego widoczny jest również w przypadku serii pochodnych z różnymi grupami 3-pirydynylowymi. Obecność atomu chloru w pierścieniu 3-pirydynylowym znacznie obniża $t_{1/2}$ fosforanotriestrów **153dAI** i **153dAJ** w porównaniu z **153dAH**. Z kolei fosforanotriestry z metylowymi podstawnikami, indukcyjnie dostarczającymi elektrony do pierścienia 3-pirydynylowego (**153dAK** i **153dAL**) okazały się być wyraźnie trwalsze. Wysoka stabilność fosforanotriestru **153dAK** może być najprawdopodobniej związana z zawadą przestrzenną wnoszoną przez grupę metylową w pozycji *orto*, co może utrudniać dostęp i substytucję na atomie fosforu. W przypadku hydroksypirydynylowych pochodnych, najmniejszą trwałość wykazują fosforanotriestry z resztą 4-pirydynylową, a stabilność fosforanotriestrów ze względu na rodzaj fosforoestrowej grupy pirydynylowej można przedstawić w następującym szeregu: Py-2 > Py-3 > Py-4. Bez większego ryzyka można przyjąć, że za wysoką labilność wiązania fosforoestrowego 4-pirydynylowych pochodnych odpowiada kwasowy charakter 4-pirydynolu (pKa = 7.74).¹⁴¹

Dodatkowo przebadalam trwałość i sposób rozkładu difenylo (**153dAA**) i di-*para*-nitrofenylo (**153dFF**) fosforanotriestrów AZT. Związki te, jak opisałam we *Wstępie Literaturowym*, zostały otrzymane i przebadane przez C. McGuigana. Chciałam jednak porównać podatność na hydrolizę tych związków, z fosforanotriestrami otrzymanymi przeze mnie, w tych samych warunkach. Zgodnie z przewidywaniami, opisana niska aktywność difenyłowego fosforanotriestru AZT **153dAA** ($EC_{50} = 0.3 \mu\text{M}$) mogła być związana ze znaczną stabilnością tego związku, który w trakcie przeprowadzonych przeze mnie badań pozostawał niezmienny przez ponad 6 dni (RPMI-1640). Z kolei wysokiej aktywności di-4-nitrofenylowego fosforanotriestru AZT **153dFF** towarzyszyła wysoka toksyczność. Zgodnie z tym, co opisał C. McGuigan, wynika ona z toksyczności uwalnianego 4-nitro-fenolu i AZT¹⁰⁰. Istotnie, badając rozkład tej pochodnej, obserwowalam powstawanie 4-nitrofenylowego fosforanodiestru **162dF**, który szybko generował nukleozyd ($t_{1/2} = 86$ min). Mając na uwadze, że żaden z zaprojektowanych fosforanotriestrów nie jest tak trwały jak **153dAA**, ani nie generuje wolnego nukleozydu jak **153dFF**, a powstające z ich rozkładu

fosforanodiestry są substratami dla komórkowych enzymów hydrolizujących, to być może związki te mogą być rozważane jako potencjalne pronukleotydy.

Podsumowując, badania nad trwałością i sposobem rozkładu diarylo nukleozydo fosforanotriestrów typu **153** w medium hodowlanym komórek wskazują, że produktami ich chemicznej hydrolizy są różne fosforanodiestry, oraz fenole i hydroksypirydiny. Szerokie spektrum grup arylowych z różnymi podstawnikami elektronoakceptorowymi i elektronodonorowymi pozwala modulować właściwości tych związków, przez dobór rozmaitych podstawników. Na podstawie uzyskanych wyników mogę stwierdzić, że zastosowanie różnych reszt arylowych pozwala kontrolować reaktywność fosforanotriestrów, co z całą pewnością warto wziąć pod uwagę projektując nowego typu proleki.

4.3 Lipofilowość diarylo nukleozydo fosforanotriestrów

Aktywność biologiczna związków chemicznych powiązana jest bezpośrednio z ich właściwościami fizykochemicznymi. Jedną z istotniejszych właściwości związków biologicznie aktywnych jest ich lipofilowość. Cecha ta charakteryzuje powinowactwo cząsteczki do fazy lipidowej i wodnej a jej miarą jest współczynnik podziału P (najczęściej wyrażany w formie logarytmu), definiowany jako:

$$P = \frac{\text{stężenie związku w 1-oktanolu}}{\text{stężenie związku w roztworze wodnym}}$$

Jak zatem wynika z przedstawionego równania, związki o wyższym współczynniku podziału P (lub logP) cechuje większa lipofilowość. Standardowym rozpuszczalnikiem stosowanym do wyznaczania współczynnika podziału jest 1-oktanol, ponieważ spośród wielu układów modelowych odpowiada on najbardziej układowi faz polarnych i niepolarnych.¹⁶⁰ Lipofilowość jest istotnym czynnikiem charakteryzującym zachowanie się związku chemicznego *in vivo*, i pozwala wstępnie ocenić jego zdolność do „rozpuszczania” w ustroju oraz zdolność do penetracji przez błony biologiczne (komórkowe czy BBB). Związki o zbyt wysokiej hydrofilowości nie są zdolne do przenikania przez błony biologiczne i często są wydalane z ustroju w niezmięnionej postaci. Z kolei związki zbyt lipofilowe mają wysoki potencjał biokumulacji, są nierozpuszczalne w osoczu i również niezdolne do pokonania dwuwarstwowej błony komórkowej, w której mogą być zatrzymywane. Jedynie związki o zrównoważonych właściwościach lipofilowo-hydrofilowych posiadają umiejętność przenikania przez błony

The first part of the report deals with the general situation in the country. It is noted that the economy is still in a state of depression, and that the government is facing a serious financial crisis. The report then goes on to discuss the various measures that have been taken to deal with these problems, and the results of these measures. It is concluded that the situation is still very serious, and that further action is needed.

2.1. The situation in the various provinces

The report then discusses the situation in the various provinces. It is noted that the situation is generally similar in all provinces, with a high level of unemployment and a serious financial crisis. However, there are some differences in the extent of the crisis in different provinces. The report then goes on to discuss the measures that have been taken in each province, and the results of these measures.

2.2. The situation in the various districts

The report then discusses the situation in the various districts. It is noted that the situation is generally similar in all districts, with a high level of unemployment and a serious financial crisis. However, there are some differences in the extent of the crisis in different districts. The report then goes on to discuss the measures that have been taken in each district, and the results of these measures.

2.3. The situation in the various municipalities

The report then discusses the situation in the various municipalities. It is noted that the situation is generally similar in all municipalities, with a high level of unemployment and a serious financial crisis. However, there are some differences in the extent of the crisis in different municipalities. The report then goes on to discuss the measures that have been taken in each municipality, and the results of these measures.

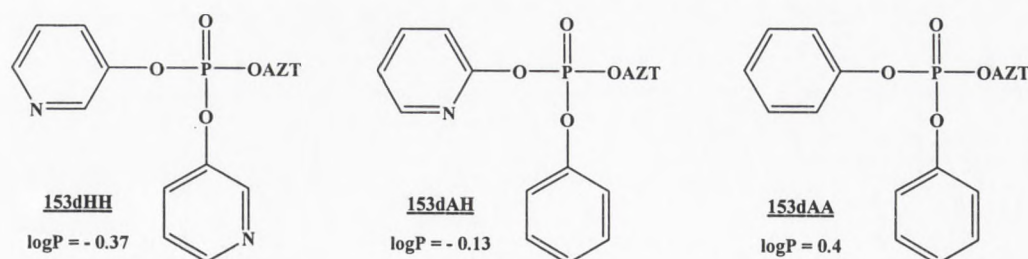
2.4. The situation in the various parishes

The report then discusses the situation in the various parishes. It is noted that the situation is generally similar in all parishes, with a high level of unemployment and a serious financial crisis. However, there are some differences in the extent of the crisis in different parishes. The report then goes on to discuss the measures that have been taken in each parish, and the results of these measures.

biologiczne. Dlatego przy projektowaniu związków biologicznie aktywnych istotnym zagadnieniem jest określenie współczynnika podziału.

Projektując diarylo nukleozydo fosforanotriestry typu **153** zakładałam, że odpowiednio zrównoważony charakter lipofilowo-hydrofilowy tych związków może być osiągnięty przez zastosowanie różnych grup arylowych. Ponieważ pierścień fenyloyy wnosi znaczną lipofilowość, dla zrównoważenia wprowadzałam do ich struktury pierścień pirydynyowy, posiadający fragmenty hydrofilowe (endocykliczny atom azotu). Aby przekonać się o tym, czy tak zaprojektowane związki spełniły przyjęte założenia, w pierwszej kolejności wyznaczyłam współczynniki podziału dla fosforanotriestrów bis-3-pirydynyowego **153dHH**, fenylo 3-pirydynyowego **153dAH** i bis-fenyloyowego **153dAA**.

Współczynnik podziału można wyznaczyć doświadczalnie np. przez pomiar względnej rozpuszczalności w układzie 1-oktanol/woda lub można określić drogą teoretycznych obliczeń (obliczając wówczas tzw. ClogP), przy wykorzystaniu programów komputerowych. Dla wspomnianych związków wyznaczyłam współczynnik podziału w układzie 1-oktanol/woda. Na podstawie uzyskanych wyników (Rysunek 31) mogłam stwierdzić, że pochodna fenylo pirydynyowa **153dAH** posiada wyższy współczynnik partycji aniżeli pochodna bis-pirydynyowa **153dHH**, i tak jak zakładałam, największą lipofilowością cechuje się fosforanotriester bis-fenyloyowy **153dAA**. Wprowadzenie pierścienia pirydynyowego do struktury zaprojektowanych diaryloyowych fosforanotriestrów wyraźnie wpłynęło na wzrost hydrofilowości tych związków. Dzięki temu mogę stwierdzić, że związki te będą rozpuszczalne w płynach ustrojowych, co przy projektowaniu związków o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym może mieć wpływ na szybkość uwalniania substancji leczniczej. Obecność pierścienia fenyloyowego wpłynęła z kolei na wzrost lipofilowości, co może pozwolić tym związkom na pokonywanie błon biologicznych. Uważam, że dążąc do optymalnej lipofilowości potencjalnych proleków, diaryloyowe fosforanotriestry typu **153** jak najbardziej mogą spełniać to kryterium.



Rysunek 31

Dear Sir,

I am writing to you regarding the matter of the...

The information provided to me indicates that...

It is my understanding that the situation is...

I would appreciate it if you could provide...

Thank you for your attention to this matter.

Yours faithfully,

[Signature]

[Name]

[Address]

[City]

[Country]

[Phone Number]

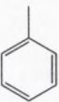
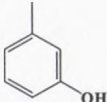
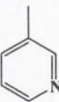
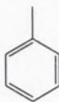
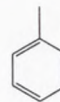
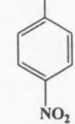
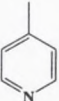
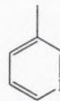
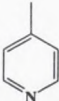

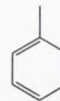
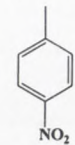
[Email Address]

[Fax Number]

[Website]

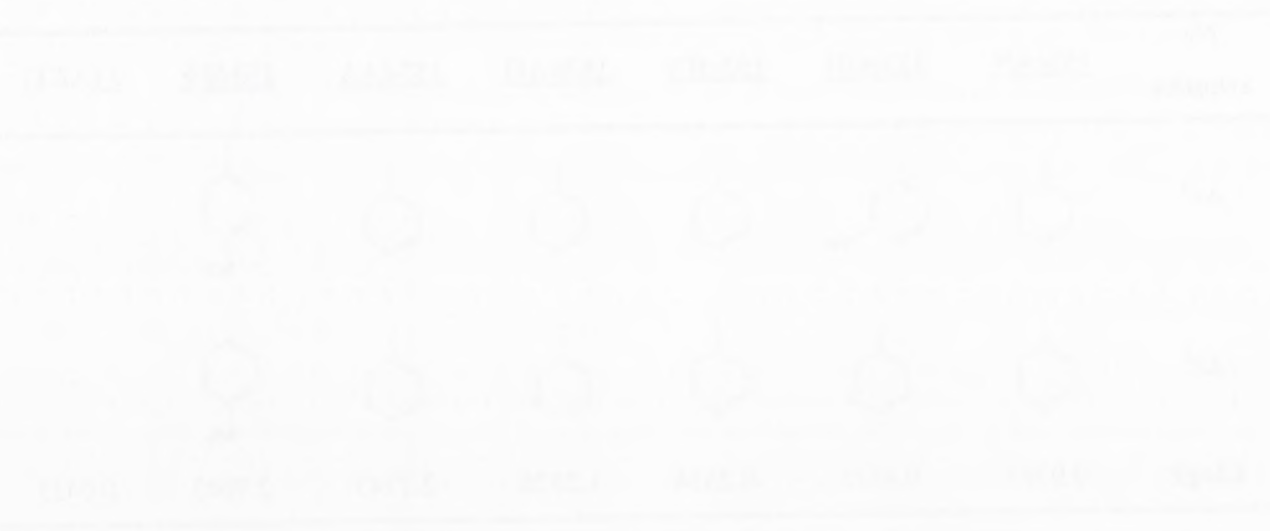
[Social Media]

[Footer]

Nr związku	<u>153cAN</u>	<u>153cGH</u>	<u>153cHN</u>	<u>153bAH</u>	<u>153dAA</u>	<u>153dFF</u>	<u>3 (AZT)</u>
Ar ¹							-
Ar ²							-
ClogP	0.9763	0.4538	-0.2534	1.2328	2.7743	2.7683	0.0435

Uzyskane metodą obliczeniową wartości współczynników podziału wyraźnie różnią się od tych wyznaczonych eksperymentalnie. Choć metody tego typu są stosowane przez wielu badaczy, otrzymane przeze mnie wyniki wskazują, jak znacznie mogą być one odmienne w zależności od zastosowanego podejścia. Niemniej jednak na podstawie obliczonych współczynników podziału mogę stwierdzić, że zachowana została zakładana tendencja obniżania lipofilowości przez fosforoestrowe grupy pirydynylowe i jej wzrostu przez grupy fenyłowe. Również i w tym przypadku pochodne fenylo pirydynylowe 153AH posiadają wyższy współczynnik partycji aniżeli np. pochodne bis-pirydynylowe 153HH. Analogicznie, wyznaczone przeze mnie wartości ClogP dla literaturowo opisanych fosforanotriestrów bis-fenyłowych 153dAA i 153dFF są wyższe w porównaniu z pochodnymi zawierającymi w swej strukturze fosforoestrową grupę pirydynylową. Z obliczonych wartości ClogP wynika także, że na wzrost współczynnika podziału wpływa obecność metylowych podstawników (w pochodnych 153dAK, 153dAL, 153dKK, 153dLL) w pierścieniu pirydynylowym, czy halogenowych, a ich udział jest wyraźnie zaznaczony zarówno dla pochodnych fenyłowych (153dBH, 153dCH, 153dEH) jak i pirydynylowych (153dAI, 153dAJ). Wyraźne różnice w wartościach ClogP widoczne są także w zależności od reszty nukleozydowej. I tak, pochodne ddU (153c) charakteryzuje znacznie niższa lipofilowość aniżeli pochodne ddA (153b) czy AZT (153d). Najniższą wartość współczynnika partycji metodą ClogP otrzymałam dla pochodnej ddU posiadającej dwie reszty pirydynylowe (153cHN) o niskiej lipofilowości. Wynik ten można tłumaczyć wysoką hydrofilowością ddU, której współczynnik lipofilowości, według uzyskanych przeze mnie obliczeń, wynosi ClogP = -1.2335.

Na podstawie wyznaczonych współczynników podziału mogę wnioskować, że znakomita większość przygotowanych przeze mnie diarylo nukleozydo fosforanotriestrów typu 153 posiada odpowiednio zrównoważony charakter lipofilowo-hydrofilowy, umożliwiający ich rozpuszczalność w płynach ustrojowych i nadający im zdolności do przenikania przez błony



The following text is extremely faint and largely illegible. It appears to be a multi-paragraph scientific or technical description, possibly related to the diagrams in Figure 1. The text is oriented vertically on the page.

biologiczne. Sądę, że przedstawione wyniki upoważniają mnie do wyrażenia opinii, że opisane w mojej rozprawie diarylo nukleozydo fosforanotriestry typu **153** mają szanse przenikania przez błony komórkowe i działać jako pronukleotydy anty-HIV.

4.4 Aktywność anty-HIV i cytotoksyczność diarylo nukleozydo fosforanotriestrów - komentarz

Po zaprojektowaniu, otrzymaniu i przebadaniu niektórych właściwości fizykochemicznych diarylo nukleozydo fosforanotriestrów, kolejny etap obejmował określenie ich właściwości biologicznych. Aktywność anty-HIV oraz cytotoksyczność wybranych fosforanotriestrów **153** została wyznaczona w Cagliari we Włoszech (grupa prof. P. La Colla). Badania były prowadzone na komórkach MT-4 zainfekowanych dzikim szczepem wirusa HIV-1 ($wt_{III B}$ oraz $wt_{III R F}$), a AZT był stosowany jako związek referencyjny. Dodatkowo, przeprowadzono badania na komórkach MT-4 zainfekowanych lekoopornymi szczepami HIV-1, jak EFV^R (oporne na efawirenz) oraz posiadające mutacje Y181C, K103N/Y181C, a także AZT^R (oporne na AZT) i MDR-1 (oporne na leki wieloskładnikowe). Ponieważ w tych badaniach nie brałam udziału, wyniki zamieściłam w suplemencie niniejszej rozprawy.

Kolejno otrzymywane wyniki aktywności anty-HIV i cytotoksyczności pozwoliły mi na bieżąco weryfikować słuszność wybranego kierunku syntezy oraz ukierunkować projektowanie kolejnych związków. Na podstawie otrzymanych danych o aktywności anty-HIV, próbowałam znaleźć zależności pomiędzy strukturą związku a jego aktywnością biologiczną i cytotoksycznością.

Wszystkie badane diarylo nukleozydo fosforanotriestry wykazują znaczny potencjał anty-HIV. Wśród fosforanotriestrowych pochodnych AZT **153d** aktywność przeciwwirusową porównywalną do AZT wykazują najmniej trwałe (RPMI) związki **153dAN**, **153dDH**, **153dEH**, **153dGN**, **153dHN**, **153dHH** czy **153dKK** ($t_{1/2}$ 174-1034 min.). W przypadku pochodnych zawierających różne fosforoestrowe grupy fenyłowe, efekt ten jest szczególnie widoczny w fosforanotriestrach posiadających najbardziej kwasowe reszty aryłowe ($pK_a = 7.85$ i 7.95 dla **153dEH** i **153dDH** odpowiednio). Podobne wnioski mogłam wysunąć na podstawie uzyskanych wyników aktywności anty-HIV pochodnych posiadających różne fosforoestrowe grupy pirydynylowe, spośród których najwyższe aktywności biologiczne posiadały fosforanotriestry **153dAN**, **153dHN** z kwasową resztą 4-pirydynyłową ($pK_a = 7.74$). Na uwagę zasługują również dipirydynyłowe pochodne **153dHN** i **153dHH**, które w odróżnieniu od difenyłowego fosforanotriestru **153dAA** (opisany literaturowo) posiadają znaczny potencjał antywirusowy ($EC_{50} = 0.01 \mu M$ i $0.02 \mu M$ vs $0.3 \mu M$, odpowiednio). Nasuwa się stąd wniosek, że skoro

The first part of the report deals with the general situation of the country and the main trends of development. It is followed by a detailed analysis of the economic situation and the role of the state in the economy.

2. Economic Situation and Development

The economy of the country has shown a steady growth over the past few years. The main sectors contributing to this growth are the manufacturing industry, the services sector, and the construction sector.

The manufacturing industry has been the main driver of economic growth, with a significant increase in production and exports. The services sector has also shown strong growth, particularly in the financial and retail sectors.

The construction sector has also contributed to the overall growth, with a focus on infrastructure development and housing. The government has played a key role in supporting these sectors through various policies and programs.

Despite the overall growth, there are still some challenges facing the economy, such as inflation and unemployment. The government is working to address these issues through a combination of monetary and fiscal policies.

The future of the economy is expected to be bright, with continued growth and development. The government is committed to maintaining a stable and prosperous economy for the benefit of all citizens.

In conclusion, the country's economy has shown strong resilience and growth over the past few years. The government's policies and programs have played a crucial role in supporting this growth and addressing the challenges facing the economy.

The report concludes with a series of recommendations for the government to continue to support economic growth and development. These include maintaining a stable macroeconomic environment, improving the business environment, and investing in infrastructure and human capital.

wysokiej aktywności anty-HIV towarzyszy niższa trwałość związku, odpowiednio zaprojektowany fosforanotriester typu **153** powinien posiadać przynajmniej jedną z fosfoestrowych grup arylowych o pK_a niższym od fenolu ($pK_a = 9.98$).

W powyższej dyskusji próbowałam korelować aktywność anty-HIV badanych fosforanotriestrów **153** z ich podatnością na hydrolizę chemiczną. Bez odpowiedzi wciąż pozostaje zasadnicze pytanie, czy badane diarylo nukleozydo fosforanotriestry działają jako pronukleotydy? Jak opisałam we *Wstępie Literaturowym*, doskonałym narzędziem rozstrzygającym te kwestie jest przebadanie pochodnej ddU o analogicznej strukturze co analizowana pochodna, np. AZT. ddU nie jest substratem dla kinaz komórkowych i nie może być przekształcana w 5'-fosforan. Natomiast, jeśli fosforanowa pochodna ddU jest aktywna, to wskazuje to jednoznacznie, że do komórki wnika chroniony fosforan ddU, który dalej przekształcany, bez udziału nukleozydowych kinaz komórkowych, działa jako typowy pronukleotyd. Badania diarylowych fosforanotriestrów ddU **153c** wykazały, że związki te inhibują namnażanie HIV, co jest silnym dowodem na to, że pochodne o takiej aranżacji reszty fosforanowej są pronukleotydami.

Ponieważ projektowany w koncepcji proleku związek, ani jego metabolity, nie może wykazywać cytotoksyczności, również i ta właściwość dla fosforanotriestrów **153**, oraz fenoli i pirydynoli została przebadana przez grupę prof. P. La Colla. Uzyskane wyniki wskazują, że żaden spośród wszystkich badanych komponentów hydroksylowych nie wykazuje cytotoksyczności w stężeniu poniżej 100 μM . Znakomita większość diarylo nukleozydo fosforanotriestrów **153** również nie wykazała toksyczności. Jedynie pochodne **153dCH** i **153dDH** posiadały zauważalną cytotoksyczność ($CC_{50} < 100 \mu\text{M}$), która mogłaby pochodzić z uwalnianych fenoli, choć wbrew oczekiwaniom, gdyż poszczególne fenole okazały się być nietoksyczne.

Podsumowując, analiza wyników aktywności wirusowej otrzymanych przeze mnie diarylo nukleozydo fosforanotriestrów typu **153**, będących przedmiotem rozprawy, pozwala postulować, że związki te można traktować jako nowe pronukleotydy anty-HIV lub ich prekursorzy. Muszę w tym miejscu zwrócić uwagę, że nie wiem, jaka porcja badanego związku wnika do komórek i ulega metabolizmowi szlakiem pronukleotydowym. Zdaję sobie sprawę, że ta część związku, która wcześniej uległa hydrolizie do odpowiedniego fosforanodiestru nie traci właściwości pronukleotydu, ze względów wcześniej w tej rozprawie omawianych. Ta sprawa jest pospolita w badaniach, jakie są tutaj dyskutowane. Wiadomo jest, że uzyskanie dokładnej odpowiedzi na pytanie, jaka część związku działa w komórce w formie, w jakiej został podany, jest bardzo trudne i wymaga zwykle bardzo kosztownych badań *in vivo*. Nie potrafię wskazać

prac z obszaru dyskutowanej materii, w których na powyżej postawione pytanie uzyskano jednoznaczną odpowiedź.

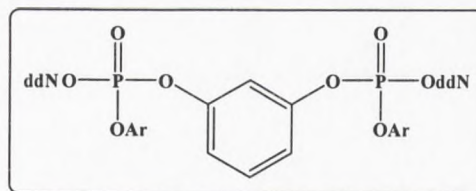
5. Diarylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanotriestry

Pomyślne wyniki syntezy i właściwości diarylowych fosforanotriestków posiadających pirydynylowe grupy maskujące resztę fosforanową (**153**) zachęciły mnie do zaprojektowania i otrzymania dinukleotydocowych analogów 2',3'- dideoksynukleozydoców typu **168** czy **169** (Rysunek 32), o jak się spodziewałam, interesujących właściwościach biologicznych.

Projektowane w koncepcji potencjalnych pronukleotydoców, diarylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanotriestry **168** i **169** wydawały się być ciekawymi związkami, gdyż ulegając degradacji do dwóch prekursorów związków biologicznie aktywnych, w wyniku dalszych przemian, dostarczałyby do komórki pożądaną 5'-monofosforan AZT **12** w podwójnej ilości. Dodatkowo, poprzez wcześniejsze doświadczenia nad wspieraną jodem reakcją oksydacyjnej kondensacji H-fosfonianodiesterów z O-nukleofilami, spodziewałam się otrzymać równie zadawalające rezultaty w układzie, w którym zaangażowane są dwa centra fosforowe. Aby się o tym przekonać, mając jednocześnie na uwadze ciągłą potrzebę poszukiwania nowych związków aktywnych przeciwko wirusowi HIV, przystąpiłam do syntezy diarylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanotriestków.

5.1 Synteza fosforanów dinukleotydocowych

Planując syntezę dinukleotydocowych fosforanów wybrałam podejście, które znakomicie sprawdziło się w celu otrzymania diarylowych fosforanotriestków typu **153**, a mianowicie kondensacja nukleozydo H-fosfonianu z odpowiednim fenolem wobec czynników kondensujących, a następnie utlenienie powstałego nukleozydo H-fosfonianodiestru i kondensacja z kolejnym komponentem hydroksylowym. Projektując związki **168** i **169** postanowiłam zastosować 1,3-dihydroksybenzen (rezorcynol) jako wspólną grupę aryłową dla obu funkcji fosforanowych, która mogłaby służyć jako łącznik pomiędzy dwoma jednostkami nukleotydocowymi. Podejmując badania nad opracowaniem warunków



168 ; Ar = 3-pirydynyl
169 ; Ar = 4-pirydynyl
 ddN = AZT

Rysunek 32

The first part of the paper discusses the general situation of the economy in the early 1980s. It notes that the economy was in a state of recession, with a high unemployment rate and a low rate of inflation. The government had implemented a series of measures to stimulate the economy, but these had not been sufficient to bring about a recovery. The paper then discusses the impact of the recession on different sectors of the economy. It notes that the manufacturing sector was particularly hard hit, with many firms closing down and a large number of workers losing their jobs. The services sector, however, was less affected, and in some cases even grew during the recession. The paper also discusses the impact of the recession on the government's budget. It notes that the government had to increase its borrowing, and that its budget deficit had increased significantly. The paper concludes by discussing the prospects for the economy in the future. It notes that the government had implemented a series of measures to stimulate the economy, and that it was hoped that these would lead to a recovery in the near future.

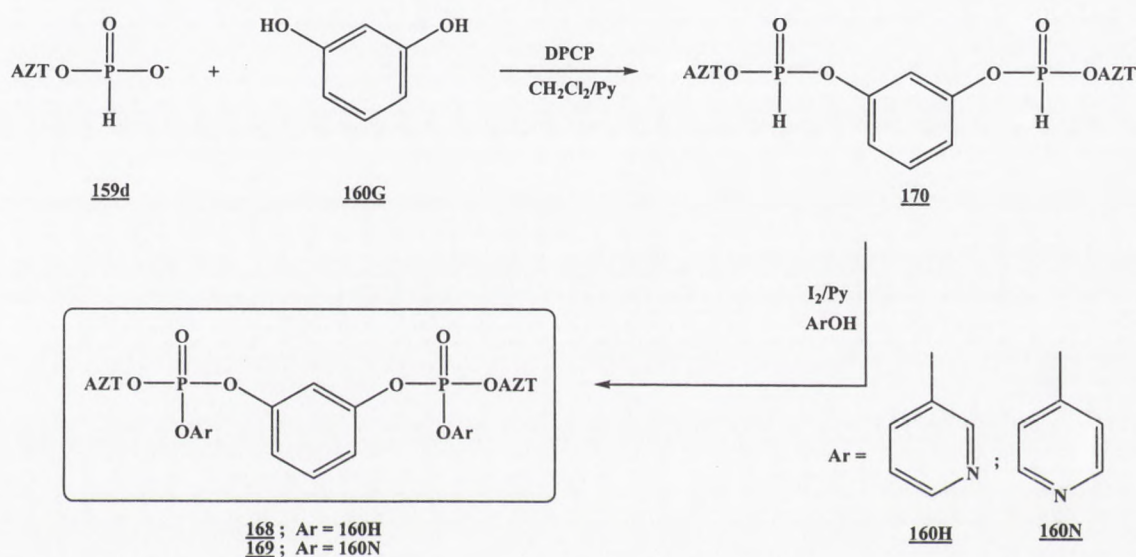
The second part of the paper discusses the impact of the recession on different sectors of the economy. It notes that the manufacturing sector was particularly hard hit, with many firms closing down and a large number of workers losing their jobs. The services sector, however, was less affected, and in some cases even grew during the recession. The paper also discusses the impact of the recession on the government's budget. It notes that the government had to increase its borrowing, and that its budget deficit had increased significantly. The paper concludes by discussing the prospects for the economy in the future. It notes that the government had implemented a series of measures to stimulate the economy, and that it was hoped that these would lead to a recovery in the near future.



The graph shows the relationship between the two variables over time. The x-axis represents the year, and the y-axis represents the value. The line starts at a low point, rises to a peak, then falls to a trough, and finally rises again to a higher peak than the first one. This indicates a cyclical pattern in the data being presented.

syntezy dinukleozydowych difosforanotriestrów spodziewałam się, że ze względu na równocенność obu centr nukleofilowych w cząsteczce rezorcynolu, stosowanie odpowiednich nadmiarów reagentów pozwoli mi otrzymywać pożądane produkty na drodze szybkich i wydajnych reakcji.

W pierwszym etapie syntezy diarylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanotriestrów (**168** i **169**) skondensowałam H-fosfonian nukleozydowy **159** (stosując jego nadmiar, 2.5 ekw.) z rezorcynolem **160G** wobec chlorofosforanu difenyłowego. Przy zastosowanym nadmiarze H-fosfonianu nukleozydu reakcja kondensacji do symetrycznego dinukleozydo rezorcynylo di-H-fosfonianodiestru **170** (Schemat 28) zachodziła szybko i czysto (10 min., ^{31}P NMR).



Schemat 28. Schemat syntezy diarylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanotriestrów **168** i **169**

W przypadku, gdy stosowałam mniejsze nadmiary (2.1 ekw.) H-fosfonianowego substratu, wspomniane dinukleozydo rezorcynylo di-H-fosfonianodiestry tworzyły się z wydajnością 80% (^{31}P NMR). Pozostałą część nukleotydocowych produktów obserwowanych w widmach ^{31}P NMR stanowiły związki generujące sygnały również w regionie ok. 5 ppm, których układ sygnałów wskazywał na obecność wiązania P-H, ze stałą sprzężeń $^1J_{\text{HP}}$ wynosząca ok. 720 Hz charakterystyczną dla większości diestrów H-fosfonianów. Na podstawie tych informacji mogłam przypuszczać, że użyty nadmiar nukleozydo H-fosfonianu jest niewystarczający do ilościowego otrzymania pożądanych produktów, w wyniku czego generowane są również rezorcynylo nukleozydo H-fosfoniany typu **161**. Ponieważ izolacja tego typu produktów jest niemożliwa ze względu na ich nietrwałość, strukturę zakładanych produktów ubocznych dowiodłam przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej wygenerowanego w odrębnej syntezie

The first step in the synthesis of polyacetylene is the polymerization of acetylene. This is typically done using a Ziegler-Natta catalyst system, such as TiCl_4 and AlR_3 , where R is an alkyl group. The reaction is carried out in a solvent, such as benzene or toluene, at low temperatures. The resulting polyacetylene is a long, linear chain of alternating single and double bonds.

The second step in the synthesis of polyacetylene is the purification of the polymer. This is typically done by reprecipitation from a solution. The polyacetylene is dissolved in a solvent, such as benzene, and then precipitated into a non-solvent, such as methanol. This process removes any catalyst residues and other impurities. The purified polyacetylene is then dried to remove any remaining solvent.



The third step in the synthesis of polyacetylene is the characterization of the polymer. This is typically done using a variety of techniques, including infrared (IR) spectroscopy, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, and elemental analysis. IR spectroscopy is used to identify the characteristic absorption bands of the polyacetylene chain, such as the $\text{C}\equiv\text{C}$ stretching band at approximately 2100 cm^{-1} and the C-H stretching band at approximately 3300 cm^{-1} . NMR spectroscopy is used to determine the structure of the polymer chain and to identify any impurities. Elemental analysis is used to determine the empirical formula of the polymer.

rezorcynylo nukleozydo H-fosfonianodiestru typu **161** (jednakowe przesunięcie chemiczne i stała sprzężeń). W kolejnym etapie otrzymywania dinukleozydowych fosforanotriestrów, odpowiednio wygenerowany dinukleozydo rezorcynylo di-H-fosfonian **170** traktowałam jodem w bezwodnej pirydynie i dodawałam nadmiar pirydynolu. Dinukleozydowe di-H-fosfoniany typu **170** w reakcji oksydatywnej kondensacji z pirydynolem w obecności jodu szybko (< 3 min., ^{31}P NMR) prowadziły do docelowych diarylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanotriestrów **168** i **169** (Schemat 28), które po izolacji na żelu krzemionkowym otrzymywałam z dobrymi wydajnościami (ok. 70%).

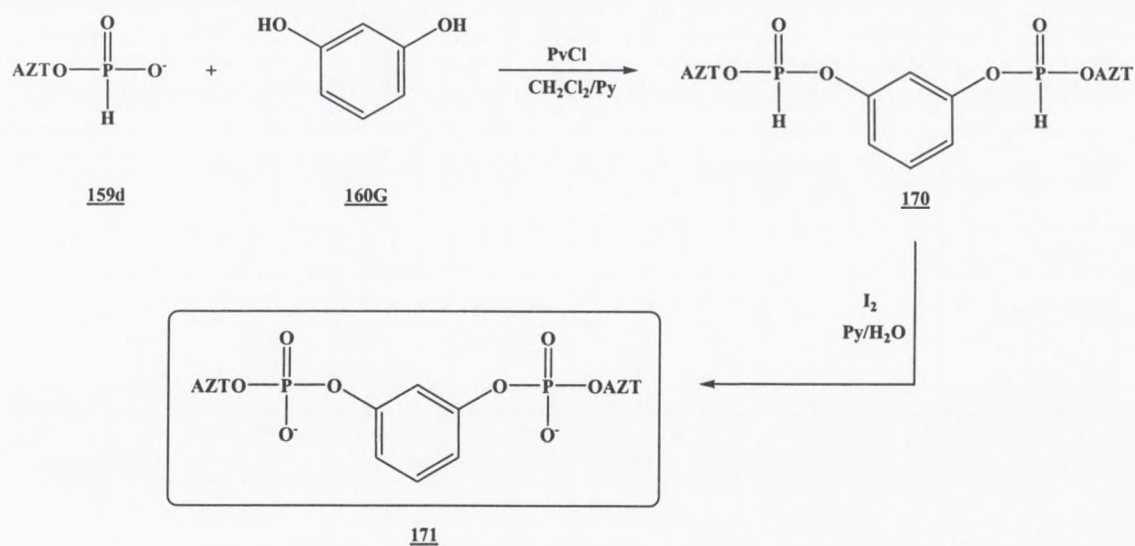
Jak wykazały wyniki badań nad trwałością niesymetrycznych diarylowych fosforanotriestrów typu **153**, struktura tworzących się produktów rozkładu silnie zależy od właściwości fosfoestrowych grup opuszczających. Również w przypadku diarylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanotriestrów spodziewałam się, że zróżnicowany charakter elektronowy grup arylowych w ich cząsteczce, będzie miał wpływ na łatwość pękania poszczególnych wiązań P-O w części fosfoestrowej podczas ataku cząsteczki wody na atom fosforu. Ponieważ w przypadku pirydynylo rezorcynylowych fosforanotriestrów typu **153** udział hydrolizy wiązania fosfoestrowego jest znacznie większy, gdy grupą arylową jest 3- lub 4-pirydynol vs rezorcynol zakładałam, że podobne rezultaty uzyskam badając hydrolityczną stabilność diarylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanotriestrów **168** i **169**. Biorąc pod uwagę możliwy sposób rozkładu omawianych związków postanowiłam zsyntetyzować dinukleozydo rezorcynylo difosforanodiestery **171** (Schemat 29) oraz pochodną arylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanoestru typu **172** (Schemat 30), jako potencjalne produkty rozkładu związków **168** i **169**. Otrzymanie pochodnych **171** i **172** pozwoliło mi w późniejszych badaniach na lepsze poznanie sposobu rozkładu zaprojektowanych dinukleozydowych fosforanów **168** i **169** oraz identyfikację tworzących się produktów ich rozpadu.

Dinukleozydowy difosforanodiestery typu **171** otrzymałam w kondensacji H-fosfonianu AZT **159d** użytego w nadmiarze (2.5 ekw.) z cząsteczką rezorcynolu wobec chlorku piwaloilu jako aktywatora. Następnie powstały dinukleozydo rezorcynylo di-H-fosfonian typu **170** utleniałam jodem wobec wody otrzymując szybko i czysto (< 3 min, ^{31}P NMR) pożądany produkt ($\delta_{\text{P}} = -6$ ppm). Wygenerowany w ten sposób dinukleozydo rezorcynylo difosforanodiestery **171** (Schemat 29) oczyszczałam na żelu krzemionkowym otrzymując czysty spektralnie (^{31}P NMR, ^1H NMR) i chromatograficznie (HPLC) produkt.

The first part of the paper discusses the importance of the... (faint text)

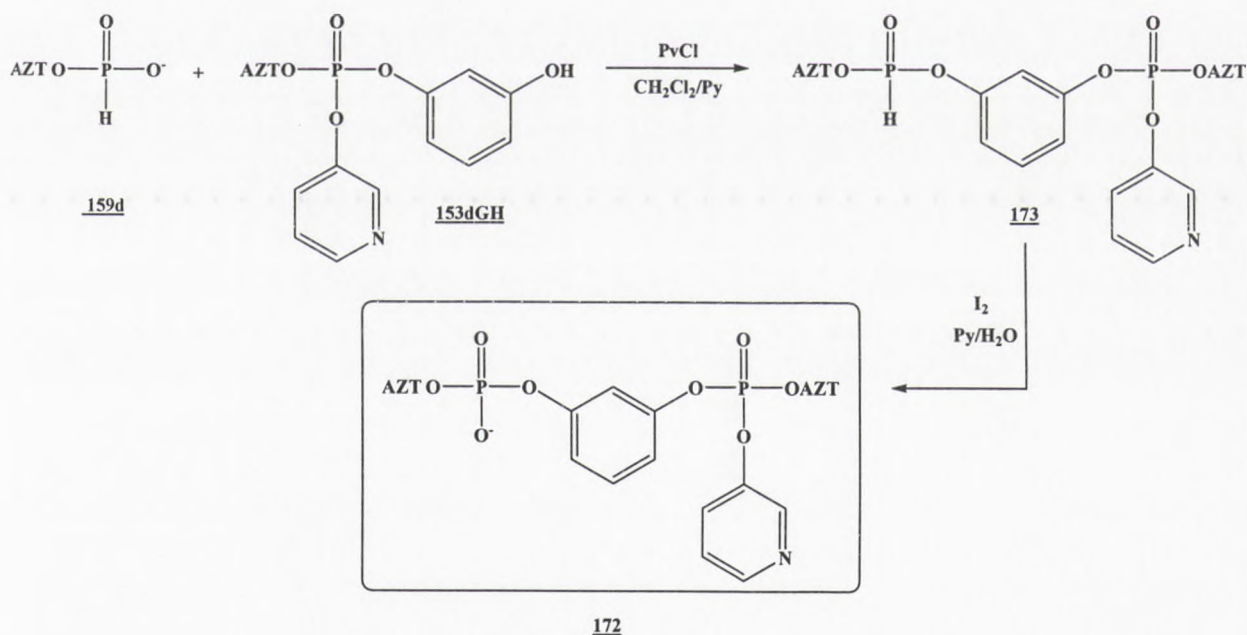
The second part of the paper discusses the importance of the... (faint text)

The third part of the paper discusses the importance of the... (faint text)



Schemat 29. Schemat syntezy dinukleozydo rezorcynylo difosforanodiestu typu **171**

Obecność wolnej grupy hydroksylowej w części rezorcynylowej cząsteczki fosforanotriestu typu **153GH** pozwoliła mi na wykorzystanie tego związku jako komponentu nukleofilowego w syntezie pochodnej **172** (Schemat 30).



Schemat 30. Schemat syntezy 3-pirydylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanoestu **172**

W pierwszym etapie syntezy 3-pirydylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanoestu **172** kondensowałam nukleozydo H-fosfonian **159d** z 3-pirydynylo rezorcynylo fosforanotriestrem AZT **153dGH** wobec chlorku piwaloilu jako aktywatora. H-fosfonian AZT reagował



The diagram illustrates the relationship between the cell wall and the cell membrane. The cell wall is the outermost layer, providing structural support and protection. The cell membrane is located just inside the cell wall, acting as a selective barrier for the cell's internal environment.

Diagram 1: Structure of a plant cell wall and membrane.

The cell wall is composed of cellulose fibers, which are arranged in a complex, layered structure. This structure allows the cell wall to be both strong and flexible. The cell membrane, on the other hand, is a phospholipid bilayer that contains various proteins and transporters.



The diagram illustrates the structure of a cell membrane. It shows a phospholipid bilayer with hydrophilic heads facing outwards and hydrophobic tails facing inwards. Embedded within this bilayer are various proteins, including integral and peripheral proteins, which facilitate the movement of substances across the membrane.

Diagram 2: Structure of a cell membrane.

The cell membrane is a dynamic and fluid structure. It allows for the movement of lipids and proteins within the bilayer, a process known as the fluid mosaic model. This flexibility is essential for the cell's ability to respond to its environment and maintain its internal balance.

z fosforanotriestrem szybko i po ok. 10 min. w widmie ^{31}P NMR obserwowałam całkowite przereagowanie substratu. Utlenienie wygenerowanego 3-pirydynylo dinukleozydo rezorcynylo H-fosfoniano-fosforanu typu **173** (Schemat 30) jodem w obecności wody pozwoliło mi na efektywne otrzymanie pożądanego 3- pirydylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanoestru **172**, który w widmie ^{31}P NMR generował sygnały świadczące o obecności dwóch różnych centr fosforowych w cząsteczce **172**, przy $\delta_{\text{P}} = -6$ ppm (część fosforanodiestrowa) i $\delta_{\text{P}} = -11$ ppm (część fosforanotriestrowa) o integracji 1:1. Po zakończeniu reakcji (< 5 min., ^{31}P NMR), oczyszczeniu na żelu krzemionkowym i liofilizacji otrzymałam czysty produkt **172** z wydajnością 80%, który mógł mi posłużyć w dalszych badaniach.

Sądzę, że opisane powyżej procedury można traktować jako uniwersalne metody syntezy dinukleozydowych fosforanów typu **168**, **169**, **171**, czy **172**. Zarówno w reakcjach H-fosfonianów nukleozydów z rezorcynolem jak i z fosforanotriestrowymi pochodnymi rezorcinolu, mogłam szybko i czysto (^{31}P NMR) generować *in situ* dinukleozydowe di-H-fosfoniany **170** lub H-fosfoniano-fosforany **173**, które w kolejnym etapie łatwo tworzyły planowane difosforanowe pochodne. Dodatkowo, zastosowanie rezorcynylowych fosforanotriestrów typu **153**, jako komponentów hydroksylowych, otwiera możliwość syntezy wielu interesujących pochodnych dinukleotydocowych, posiadających w swej strukturze np. dwa różne anty-wirusowe nukleozydy, co może stanowić cenną wskazówkę ukierunkowującą projektowanie nowego typu proleków. Wykorzystanie metod opartych na reakcji oksydatywnej kondensacji wobec jodu, pozwoliło mi w sposób kontrolowany, w warunkach „one-pot”, efektywnie otrzymywać pożądanые dinukleotydocowe produkty, gotowe do dalszych badań.

5.2 Właściwości dinukleozydowych difosforanów

Diarylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanotriestry **168** i **169** zostały zaprojektowane jako potencjalne pronukleotydy, zdolne do dostarczenia do komórki, aktywnego przeciwko HIV, 5'-fosforanu 2',3'-dideoksynukleozydu **12**. Aby się o tym przekonać, przystąpiłam do przebadania trwałości i ścieżek rozkładu otrzymanych dinukleozydowych fosforanów typu **168**, **169** i **172**.

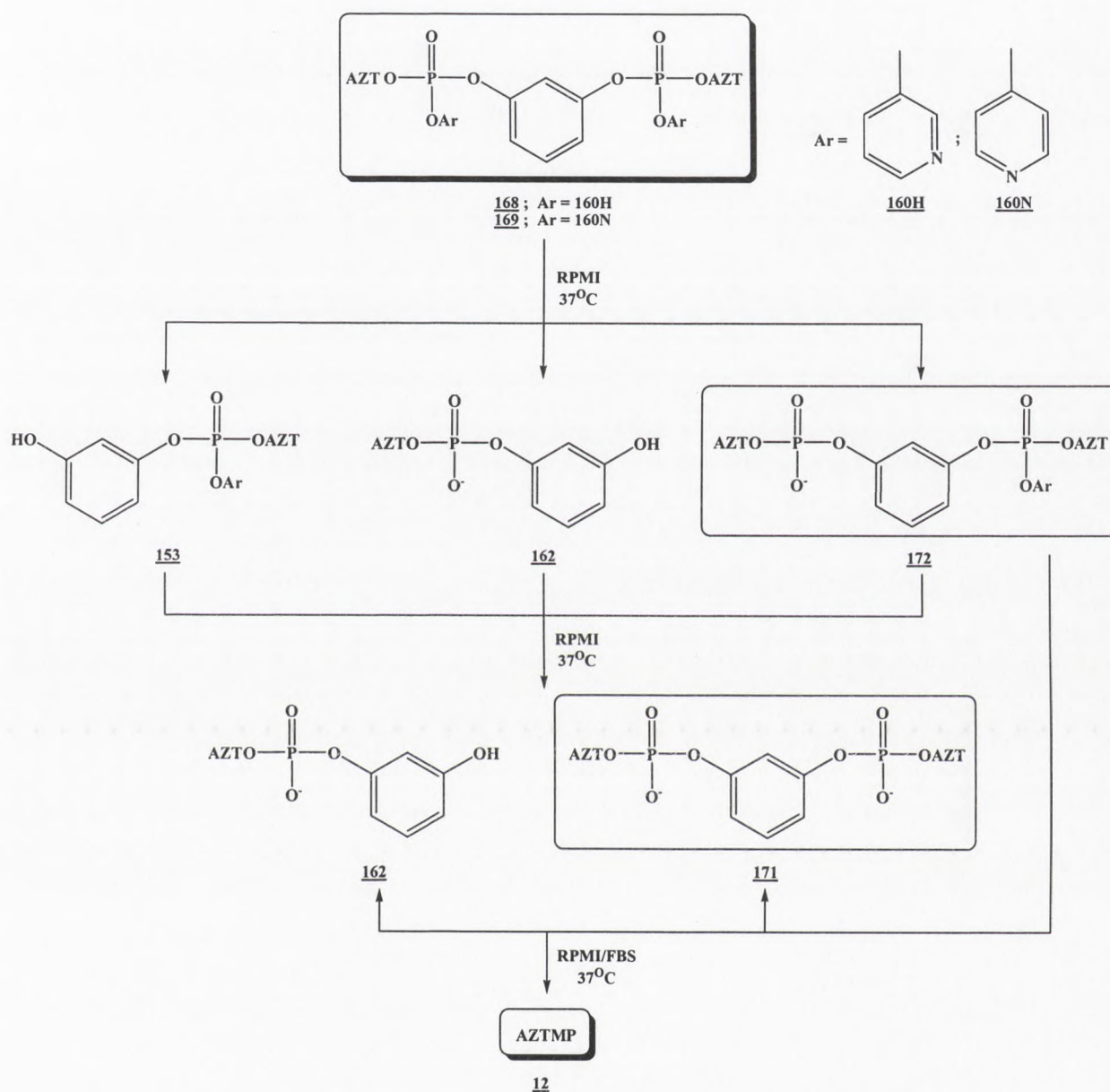
Badając sposób rozkładu analizowanych pochodnych (za pomocą HPLC) w RPMI-1640, obserwowałam ścisłą zależność ich trwałości od charakteru grupy arylovej. Podobnie jak w przypadku diarylowych fosforanotriestrów **153**, udział hydrolizy wiązania fosforoestrowego jest znacznie większy, gdy grupą arylową jest 4-pirydynol aniżeli 3-pirydynol. Dlatego znacznie niższą trwałość obserwowałam w przypadku di-4-pirydynylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanotriestru **169** aniżeli w przypadku di-3-pirydynylovej pochodnej **168** ($t_{1/2} = 608$ min.

The first part of the paper discusses the importance of the research and the objectives of the study. It also provides a brief overview of the methodology used in the study. The second part of the paper presents the results of the study and discusses the implications of the findings. The third part of the paper concludes the study and provides some final thoughts on the research.

The results of the study show that there is a significant relationship between the variables studied. The findings suggest that the independent variable has a positive effect on the dependent variable. This is supported by the statistical analysis conducted in the study. The implications of these findings are discussed in detail, highlighting the potential applications of the research in the field. The study concludes by emphasizing the need for further research in this area to explore the underlying mechanisms and to validate the findings in a larger sample.

In conclusion, the study has provided valuable insights into the relationship between the variables. The findings are consistent with the theoretical framework and have practical implications for the field. The study also identifies some limitations and suggests directions for future research. Overall, the research contributes to the understanding of the phenomenon under investigation and provides a solid foundation for further exploration.

vs 1034 min.). Dodatkowo, rodzaj generowanego produktu hydrolizy związków **168** i **169** zależy od pKa grupy odchodzącej. I tak, poprzez atak nukleofilowy cząsteczki wody na centra fosforowe w dinukleotyдовых pochodnych **168** i **169**, tworzyły się głównie rezorcynylowy fosforanodiester **162dG** oraz dinukleozydo rezorcynilo difosforanodiester **171** a nie pochodne zawierające bardziej kwasowe grupy pirydynylowe, np. **162dH** (Schemat 31).



Schemat 31. Sposób rozkładu dinukleozydowych difosforanów

W następnej kolejności przebadalam trwałość i sposób rozkładu dinukleozydowych fosforanów **171** i **172** w środowisku aktywności enzymatycznej (RPMI/FBS). Ich podatność na hydrolizę z udziałem enzymów, była istotnym czynnikiem warunkującym o potencjalnej możliwości przekształcenia w komórce zaprojektowanych dinukleotyдовых pochodnych,



w monofosforan AZT **12**. Rozkład związków **171** oraz **172** do AZTMP **12** w RPMI/FBS (Schemat 31) zachodził odpowiednio w ciągu $t_{1/2} = 2475$ min. i 172 min. Na podstawie uzyskanych wyników mogę stwierdzić, że obie pochodne, **171** i **172**, są substratami dla fosfodiesteraz obecnych w FBS i prawdopodobnie także w komórkach mogą być przekształcane w pożądaną w pronukleotydowym podejściu AZTMP **12**.

Aktywność anti-HIV i cytotoksyczność dinukleotydowych pochodnych AZT **168**, **169** i **172** zostały wyznaczone przez grupę prof. P. La Colla. Wyniki badań biologicznych wykazały dużą zdolność do hamowania replikacji wirusa HIV-1 przez te związki ($EC_{50} = 0.01 \mu\text{M}$, $0.005 \mu\text{M}$ i $0.01 \mu\text{M}$, odpowiednio dla **168**, **169** i **172**). Dodatkowo, wysokie wartości potencjału antywirusowego tych pochodnych, uzyskano dla lekoopornych szczepów HIV ($EC_{50} = 0.003 - 0.008 \mu\text{M}$). Analogicznie jak obserwowałam w przypadku diarylowych fosforanotriestrów **153**, wysokiej aktywności anti-HIV towarzyszy niższa trwałość związku, jak w przypadku pochodnej z kwasowymi resztami 4-pirydynylowymi **169** ($pK_a = 7.74$). Niestety, wysokiej aktywności dinukleozydowego fosforanu **169** towarzyszy cytotoksyczność, $CC_{50} = 61 \mu\text{M}$, co wpłynęło na obniżenie wartości indeksu selektywności tego związku. Wynik ten okazał się nieco zaskakujący, gdyż dotąd przebadane możliwe metabolity **169** nie generowały cytotoksyczności. Zarówno pochodna **168**, jak i **172** nie wykazują cytotoksyczności poniżej stężenia $100 \mu\text{M}$. Ponadto, produkty ich rozkładu są substratami dla fosfodiesteraz, co być może świadczy o tym, że związki o takiej strukturze mogą być pronukleotydami. Niestety na obecnym etapie badań, nie potrafię jednoznacznie odpowiedzieć na to pytanie. Do momentu złożenia niniejszej rozprawy nie zostały przebadane właściwości biologiczne pochodnych ddU o analogicznej strukturze, co dyskutowane związki, które mogłyby rozstrzygnąć czy dinukleozydowe fosforany **168** i **169** działają jako pronukleotydy.

Podsumowując, pragnę wyrazić przekonanie, że na podstawie wyników dotychczasowych badań nad właściwościami związków typu **168**, **169** czy **172**, zaprojektowane i przedstawione w tej części rozprawy dinukleotydowe pochodne, stanowią ciekawą i obiecującą propozycję nowych pronukleotydów anti-HIV.

6. Arylo nukleozydo amidofosforanodiestry

Jak opisałam we *Wstępie Literaturowym*, amidofosforanowe pochodne zajmują silnie ugruntowaną pozycję wśród związków projektowanych w koncepcji antywirusowych pronukleotydów. Amidofosforanodiestry strukturalnie przypominają fosforanotriestry, gdyż obecność grup maskujących resztę fosforanową czyni je obojętne i przez to potencjalnie zdolne do pokonywania błon komórkowych. Znakomita większość opisanych amidofosforanowych

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions and activities. It emphasizes the need for transparency and accountability in financial reporting.

2. The second part of the document outlines the various methods and techniques used to collect and analyze data. It includes a detailed description of the experimental procedures and the tools used for data collection.

3. The third part of the document presents the results of the study. It includes a series of tables and graphs that illustrate the findings of the research. The data shows a clear trend in the relationship between the variables being studied.

4. The fourth part of the document discusses the implications of the findings. It highlights the potential applications of the research in various fields and the need for further investigation in this area.

5. The fifth part of the document concludes the study. It summarizes the key findings and provides a final statement on the overall significance of the research. The authors express their gratitude to the funding agencies and the participants who made the study possible.

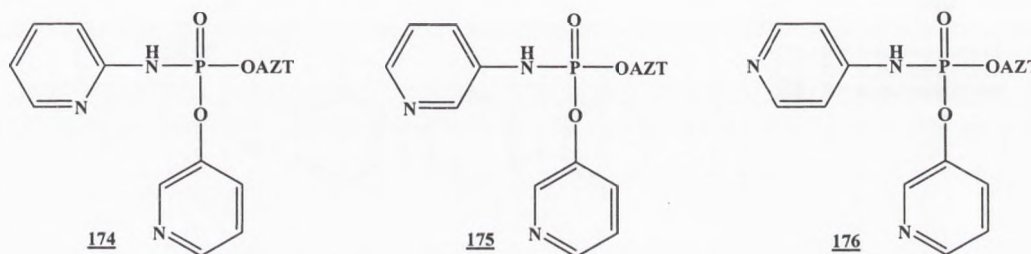
6. The sixth part of the document includes a list of references and a list of figures. The references cite the works of other researchers in the field, and the figures provide a visual representation of the data presented in the text.

7. The seventh part of the document is a list of appendices. These appendices provide additional information and data that are not included in the main body of the document. They include raw data, detailed calculations, and supplementary figures.

8. The eighth part of the document is a list of tables. These tables provide a structured and organized way to present the data. They include the names of the tables, the variables being measured, and the units of measurement.

9. The ninth part of the document is a list of figures. These figures provide a visual representation of the data. They include the titles of the figures, the variables being measured, and the units of measurement.

pronukleotydów to pochodne aminokwasowe. Zarówno w podejściu zaproponowanym przez C. McGuigana czy J. L.- Imbacha i wsp., rozkład amidofosforanodiestrów inicjowany jest przez karboksyesterazy, a w następnym etapie powstałe amidofosforanowe monoestry są hydrolizowane przez fosfoamidazy do nukleozydo monofosforanu.¹⁰⁵ Zatem cały proces generowania pożądanego fosforanu nukleozydu jest mocno uzależniony od aktywności enzymatycznych w komórce. Na tym tle wydawało się być ciekawym, i może ważnym, zaprojektowanie i otrzymanie takich amidofosforanowych pochodnych, których mechanizm rozkładu do amidofosforanowych monoestrów nie wymagałby wspomagania enzymami, a byłby skutkiem tylko ich hydrolizy chemicznej. Zachęcona właściwościami, jakie znalazłam u fosforanotriestrowych pochodnych pirydynoli, zaprojektowałam amidofosforanodiestry **174**, **175** i **176**, posiadające różne aminopirydynowe grupy maskujące resztę amidofosforanową (Rysunek 33).



Rysunek 33

Szczególnie ciekawe wydawało się pytanie o trwałość wiązania fosforoamidowego i sposób rozkładu tych amidofosforanodiestrowych pochodnych. Związki te, jako potencjalne pronukleotydy mogłyby ulegać hydrolizie do fosforanodiestru i amidofosforanowego monoestru, które w kolejnym etapie z udziałem komórkowych enzymów hydrolizujących mogłyby generować pożądaną 5'-fosforan nukleozydu. Podejmując badania nad arylo nukleozydo amidofosforanami, musiałam opracować metody ich syntezy a następnie planowałam poznać ich wybrane właściwości.

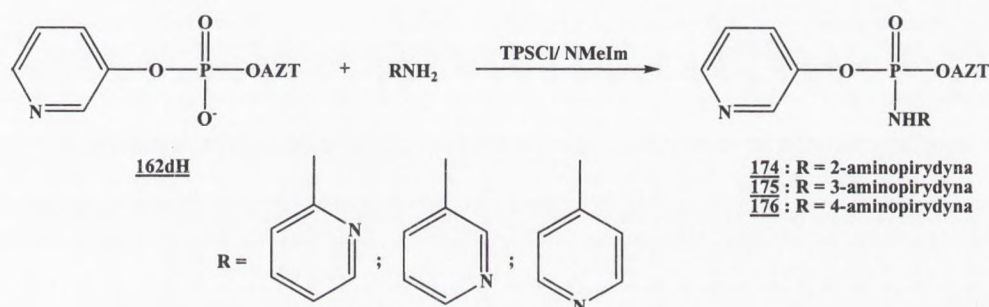
Poszukując metod syntezy arylo nukleozydo amidofosforanodiestrów przebrałam dwa podejścia. W pierwszym z nich wykorzystałam metodę Efimova, którą wcześniej zastosowałam w syntezie fosforanotriestrowych. Podejście to, zawiodło w syntezie pochodnych typu **153**, gdyż nie posiadało istotnych dla otrzymania różnych diarylowych fosforanotriestrowych (**153**) cech uniwersalności. Jednakże analizując uzyskane wyniki przypuszczałam, że zastosowanie fosforanodiestru **162dH** z podstawnikiem wyciągającym elektrony w pierścieniu aromatycznym (endocykliczny atom azotu w pochodnej 3-pirydynylowej), pozwoli mi otrzymać planowane

The first part of the paper discusses the importance of the study and the objectives of the research. It highlights the need for a comprehensive understanding of the subject matter and the role of the researcher in this process. The second part of the paper describes the methodology used in the study, including the data collection methods and the analysis techniques. The third part of the paper presents the results of the study and discusses their implications. The final part of the paper concludes the study and provides recommendations for future research.



The following section discusses the findings of the study and their implications. It highlights the key results and the significance of the research. The final part of the paper concludes the study and provides recommendations for future research. The paper is organized into several sections, each focusing on a different aspect of the study. The first section is the introduction, which sets the context for the research. The second section is the methodology, which describes the methods used to collect and analyze the data. The third section is the results, which presents the findings of the study. The fourth section is the discussion, which interprets the results and discusses their implications. The final section is the conclusion, which summarizes the study and provides recommendations for future research.

produkty **174**, **175** i **176**. W tym celu 3-pirydynyowy fosforanodiester AZT (**162dH**) kondensowałam z odpowiednią aminopirydyną (Schemat 32) wobec TPSCl. Kondensacja fosforanodiestru z 2- i 3-aminopirydyną przebiegała ilościowo i szybko (< 5 min., ^{31}P NMR), z utworzeniem odpowiednich amidofosforanodiestrów **174** i **175** (diastereoizomery dla pochodnych 2- i 3-aminopirydynowych odpowiednio $\delta_{\text{p}} = -1.4$ i -1.61 ppm oraz -0.76 i -0.91 ppm). Jedynie w przypadku kondensacji diestru **162dH** z 4-aminopirydyną, oprócz pożądanego amidofosforanodiestru **176**, w mieszaninie reakcyjnej obecne były (ok. 20%) trudne do zidentyfikowania inne produkty (^{31}P NMR). Po przerobieniu mieszaniny reakcyjnej i oczyszczeniu chromatograficznym otrzymałam tą metodą planowane amidofosforanodiestry typu **174**, **175** i **176** z wydajnościami 65-90%.



Schemat 32

Ponieważ synteza arylo nukleozydo amidofosforanodiestrów metodą fosforanotriestrową wymaga każdorazowo otrzymania i izolacji odpowiedniego fosforanodiestru, postanowiłam przebadać potencjalnie praktyczniejszą dla moich celów reakcję oksydacyjnej kondensacji. Do tego wyboru zachęciły mnie nie tylko pomyslnie wyniki syntezy fosforanotriestrową tą metodą, ale również wysoka reaktywność amin w reakcjach z halogenofosforanami.¹⁶¹ Na tym tle, wydawało się interesujące, zbadać jak przebiega reakcja arylo nukleozydo H-fosfonianu utlenionego jodem z różnymi aminopirydynami. I tak, H-fosfonianodiester generowałam w kondensacji H-fosfonianu AZT z 3-pirydynolem w chlorku metylenu z pirydyną (9:1 v/v) wobec PvCl lub DPCP jako aktywatorów. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodawałam nadmiar odpowiedniej aminopirydyny (5 ekw. mol.) i jod rozpuszczony w niewielkiej ilości bezwodnej pirydyny. Wydajności oczekiwanych amidofosforanów **174** - **176** w tych reakcjach były jednak na ogół niskie (ok. 40%), co spowodowane było tworzeniem się różnego rodzaju produktów ubocznych (^{31}P NMR). Znacznie lepsze wyniki uzyskałam w podejściu, gdzie najpierw generowałam odpowiednie amido-H-fosfoniany **178** - **180**, które następnie kondensowałam z 3-pirydynolem wobec jodu (Schemat 33). W syntezie amido-H-fosfonianów

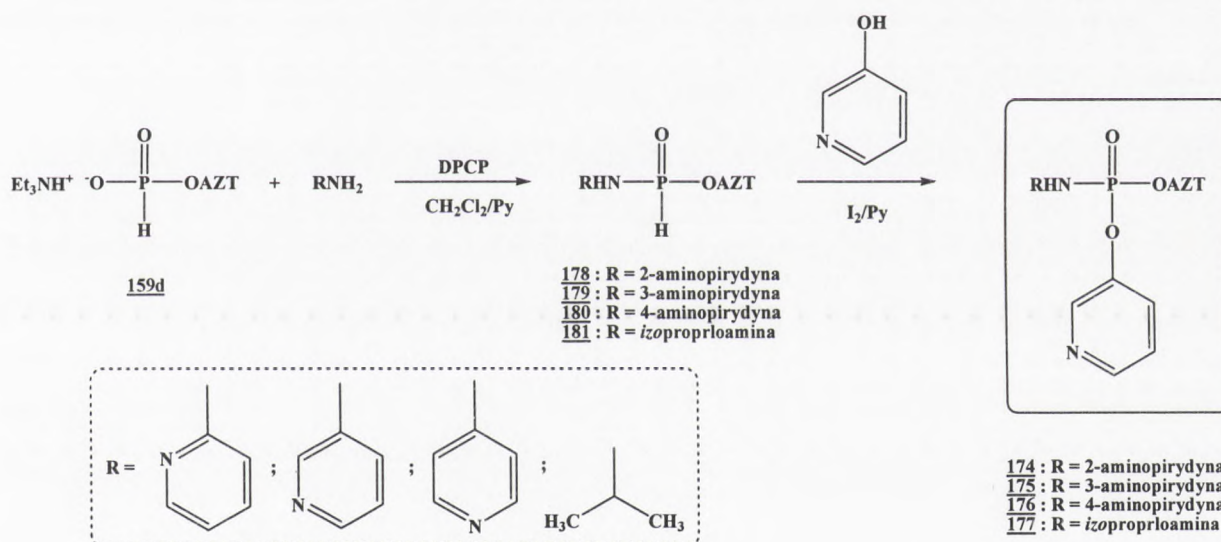
The first part of the paper discusses the general approach to the study of the structure of the human brain. It is shown that the brain is a complex system of interconnected parts, and that the study of its structure is a complex task. The second part of the paper discusses the methods used in the study of the brain, and the third part discusses the results of the study.



Figure 1

The results of the study show that the brain is a complex system of interconnected parts, and that the study of its structure is a complex task. The study has shown that the brain is a complex system of interconnected parts, and that the study of its structure is a complex task. The study has shown that the brain is a complex system of interconnected parts, and that the study of its structure is a complex task.

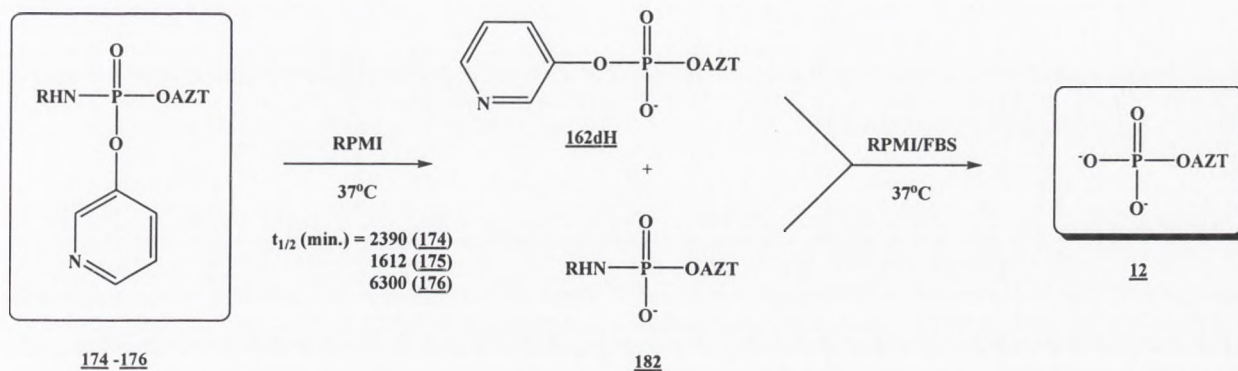
stosowałam chlorofosforan difenylowy (DPCP) jako czynnik aktywujący H-fosfonian nukleozydu ze względu na to, że chlorki arylowe (np. PvCl) w tych reakcjach nie dawały zadowalających wyników (równoległe reakcje z aminami).^{162,163} W pierwszej serii doświadczeń, do mieszaniny nukleozydo H-fosfonianu i odpowiedniej aminopirydyny (1.5 ekw. mol.), rozpuszczonych w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (9:1 v/v), dodałam DPCP (1.2 ekw. mol.). We wszystkich przypadkach reakcje zachodziły bardzo szybko (< 5 min.) a oczekiwane nukleozydo amido-H-fosfoniany **178** – **180**, tworzyły się ilościowo (^{31}P NMR). W następnym etapie do mieszaniny reakcyjnej dodawałam odpowiednio osuszony 3-pirydynol (5 ekw. mol.) i jod (1.5 ekw. mol.) rozpuszczony w bezwodnej pirydynie. Reakcje oksydatywnej kondensacji zachodziły bardzo szybko (< 3 min., ^{31}P NMR) i jedynymi produktami nukleotydomi obecnymi w mieszaninach poreakcyjnych były odpowiednie arylo nukleozydo amidofosforany **174** – **176** (Schemat 33). Po zakończeniu reakcji, pożądane produkty izolowałam za pomocą chromatografii na żelu krzemionkowym, otrzymując czyste (^1H -, ^{31}P NMR, HPLC) produkty końcowe z wydajnościami ok. 70%.



Schemat 33

Wyniki doświadczeń nad reakcjami oksydatywnej kondensacji amido-H-fosfonianów z 3-pirydynolem wobec jodu, zachęciły mnie do przebadania użyteczności tej metody w syntezie innych amidofosforanowych pochodnych np. aniliny czy *N-izopropiloaminy*. Stosując te same warunki reakcji, jak dla aminopirydyn, w obu przypadkach reakcje kondensacji do amido-H-fosfonianów wobec DPCP zachodziły równie szybko i czysto (^{31}P NMR), a powstałe amido-H-fosfoniany ulegały utlenianiu i kondensacji z 3-pirydynolem do oczekiwanych amidofosforanodiestrów.

Powyższa metoda syntezy pozwoliła mi otrzymać planowane amidofosforanodiestry **174**, **175** i **176**, które poddałam dalszym badaniom. I tak, badane amidofosforanodiestry **174** – **176** w RPMI-1640 ulegały rozkładowi do odpowiednich fosforanodiestrów i amidofosforanowych monoestrów (Schemat 34), które identyfikowałam przez dodawanie do próbek odpowiednich wzorców, otrzymanych w niezależnych syntezach.



Schemat 34. Trwałość ($t_{1/2}$ [min]) i sposób rozkładu amidofosforanodiestrów **174** – **176** w RPMI-1640

Otrzymane wyniki sugerowały, że na szybkość hydrolizy badanych związków może mieć wpływ charakter aminopirydynowej grupy opuszczającej. I tak, amidofosforanowa pochodna 3-aminopirydyny, o najniższej zasadowości ($\text{pK}_a = 5.92$)¹³⁹ **175**, ulegała hydrolizie najszybciej, a pochodna najbardziej zasadowej 4-aminopirydyny ($\text{pK}_a = 9.25$) **176**, zdecydowanie najwolniej ($t_{1/2} = 1612$ vs 6300 min.; Schemat 34). Obserwacja ta byłaby zgodna z wynikami, jakie uzyskałam badając podatność na hydrolizę chemiczną amidofosforanowej pochodnej N-izopropylaminy, o najwyższej spośród badanych zasadowości ($\text{pK}_a = 10.63$), **177** (Schemat 33), otrzymanej w celu porównania niektórych właściwości fizykochemicznych. Związek ten, w RPMI-1640 pozostawał niezmienny przez kilka dni. Dodatkowo przebadalam trwałość amidofosforanowych monoestrów typu **182**, produktów rozkładu odpowiednich amidofosforanodiestrów, w medium z surowicą z płodów bydłych, RPMI/FBS i jak się okazało, związki te mogą być hydrolizowane do pożądanego 5'-monofosforanu AZT **12** (Schemat 34).

Spośród trzech badanych amidofosforanodiestrów **174**, **175** i **176**, jedynie pochodna 2-aminopirydynowa **174** wykazała wysoką aktywność anty-HIV ($\text{EC}_{50} = 0.01 \mu\text{M}$). Jednakże obserwowana cytotoksyczność ($\text{CC}_{50} = 80 \mu\text{M}$) może stanowić przeszkodę w zastosowaniu tego związku jako potencjalnego antywirusowego proleku. Na obecnym etapie badań trudno jest mi



wytłumaczyć brak aktywności antywirusowej tych związków. Być może niska aktywność anti-HIV związana jest z małą szybkością tworzenia monofosforanu AZT.

Pomimo, że otrzymane przeze mnie amidofosforanodiestry nie wykazały oczekiwanych właściwości biologicznych, to jednak związki te, wydają się być niewątpliwie interesujące jako proleki. Korzystne właściwości fizykochemiczne pochodnych typu **174** - **176** i wysoka aktywność anti-HIV amidofosforanodiestru **174** zachęcają do projektowania nowych tego typu potencjalnych pronukleotydów. Prace te są kontynuowane w Pracowni Analogów Nukleotydów i Oligonukleotydów.

The first part of the paper discusses the general theory of the firm, focusing on the relationship between the firm's production function and its cost function. It is shown that the firm's cost function is derived from its production function and the prices of its inputs. The second part of the paper discusses the firm's profit function, which is derived from its cost function and the price of its output. The third part of the paper discusses the firm's supply function, which is derived from its profit function and the price of its output.

The fourth part of the paper discusses the firm's demand function, which is derived from its supply function and the price of its output. The fifth part of the paper discusses the firm's equilibrium, which is determined by the intersection of its supply and demand functions. The sixth part of the paper discusses the firm's response to changes in the price of its output, showing that the firm's supply function is upward sloping and its demand function is downward sloping.

The seventh part of the paper discusses the firm's response to changes in the price of its inputs, showing that the firm's cost function is upward sloping and its profit function is downward sloping. The eighth part of the paper discusses the firm's response to changes in the price of its output and its inputs, showing that the firm's supply function is upward sloping and its demand function is downward sloping.

The ninth part of the paper discusses the firm's response to changes in the price of its output and its inputs, showing that the firm's supply function is upward sloping and its demand function is downward sloping. The tenth part of the paper discusses the firm's response to changes in the price of its output and its inputs, showing that the firm's supply function is upward sloping and its demand function is downward sloping.

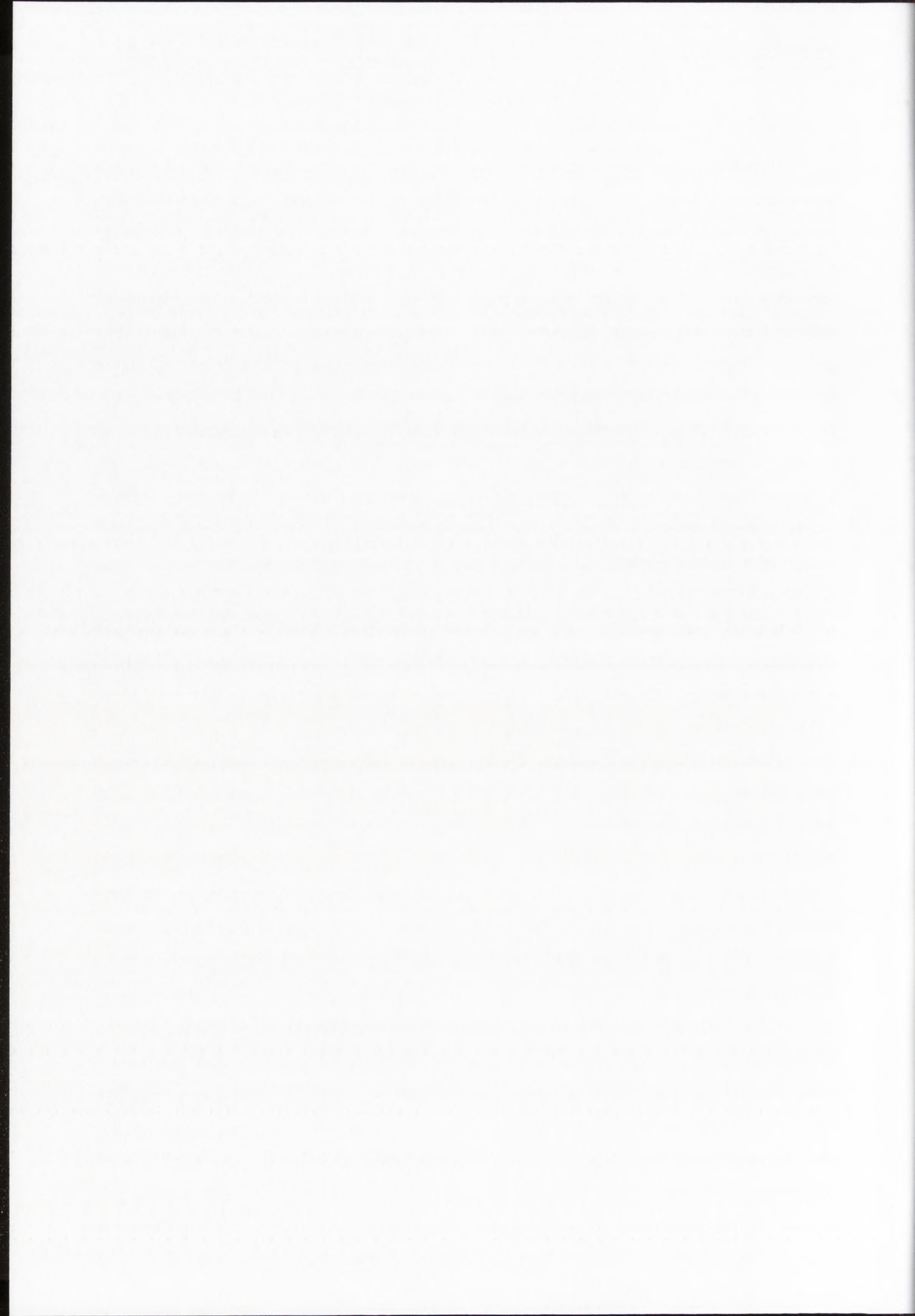
The eleventh part of the paper discusses the firm's response to changes in the price of its output and its inputs, showing that the firm's supply function is upward sloping and its demand function is downward sloping. The twelfth part of the paper discusses the firm's response to changes in the price of its output and its inputs, showing that the firm's supply function is upward sloping and its demand function is downward sloping.

VI. PODSUMOWANIE

Podstawowym i najważniejszym celem mojej rozprawy doktorskiej było uzyskanie odpowiedzi na pytanie – czy opierając się na ogólnie znanych w chemii organicznej regułach rządzących reaktywnością związków chemicznych, można racjonalnie projektować i otrzymywać pochodne nukleotydydowe, o zaprogramowanych w strukturze właściwościach antywirusowych. Wspomniane znane reguły to np. efekty indukcyjne podstawników decydujących o reaktywności wybranych centrów lub całych grup w cząsteczce, to charakter grup opuszczających decydujących o przebiegu i kinetyce reakcji (w tym reakcji katalizowanych enzymami), a także wpływ podstawników i ugrupowań na solwatację samych związków, decydujących o ich rozpuszczalności w środowiskach zbliżonych do fizjologicznych. Te pytania – cele, w znacznym stopniu narzuciły mi wybór typu pochodnych nukleotydydowych, a mianowicie tytułowych diarylo nukleozydo fosforanotriestrów jako tych, których programowanie w aspekcie oczekiwanych właściwości chemicznych (i w pewnym stopniu także właściwości substratowych w reakcjach enzymatycznych) było w moim przekonaniu najbardziej oczywiste. Chodzi o to, że w szeregu fenoli, manewrując odpowiednio podstawnikami w pierścieniu aromatycznym fosforoestrowych grup maskujących, można otrzymywać (przynajmniej potencjalnie) związki o bardzo zróżnicowanej trwałości i w znacznym stopniu o zróżnicowanej np. rozpuszczalności w roztworach wodnych, jakże istotnej dla całości badań nad tymi związkami, łącznie z oznaczaniem ich aktywności anty-HIV.

Przegląd literatury opisującej syntezę diarylo nukleozydo fosforanów(V) pozwolił zaobserwować regułę, że dostępność syntetyczna diarylo nukleotydydów zależała od dostępności syntetycznej czynników fosforylujących, a ta, szczególnie w przypadku niesymetrycznych diarylo nukleozydo fosforanotriestrów, była bardzo ograniczona. Dlatego moim pierwszym, ważnym zadaniem było opracowanie metod i podejść syntetycznych takich, które umożliwiłyby otrzymywanie, jeśli nie dowolnych, to przynajmniej dużej gamy diarylo nukleozydo fosforanów(V), o zróżnicowanych właściwościach chemicznych i fizykochemicznych istotnych dla moich potrzeb.

Osiągnięcie tego celu umożliwiła mi chemia H-fosfonianów, na której oparłam strategię syntetyczną związków tytułowych. Jednakże, dla realizacji swoich celów musiałam opracować nowe metody syntezy, które uczyniły proponowane w rozprawie podejścia syntetyczne efektywne i zachęcająco wygodne preparatywnie. Dlatego opracowałam nową metodę syntezy H-fosfonianów mało lipofilowych analogów nukleozydów (AZT, ddA, ddI i ddU), która obejmowała opracowanie nowej metody syntezy (9*H*-fluoren-9-yl)metylo H-fosfonianu jako czynnika fosfonylującego i jego zastosowanie w syntezie nukleozyd-5'-yl H-fosfonianów.



Synteza (9*H*-fluoren-9-yl)metylo H-fosfonianu, angażująca łatwo dostępne reagenty w prostej procedurze, prowadziła do trwałego produktu krystalicznego, gotowego do użycia bez dodatkowych przygotowań. Lipofilowość, wnoszona grupą fluorenylową czynnika fosfonylującego, pozwoliła mi na łatwy do wykonania przerób mieszanin poreakcyjnych (proste ekstrakcje) po fosfonylacji nukleozydów i otrzymanie końcowych produktów o wysokiej czystości i z wysokimi wydajnościami. Pragnę zauważyć, że zasady azotowe (adenina, hipoksantyna, uracyl czy tymina) nukleozydów, w całym toku syntetycznym nie wymagały dodatkowej ochrony, co w moim przekonaniu, czyni powyższą metodę szczególnie godną polecenia. Prace te zostały opublikowane w *Letters in Organic Chemistry* w 2009 r. Dostępność syntetyczna nukleozyd-5'-yl H-fosfonianów otworzyła mi drogę do realizacji drugiego, chyba najważniejszego celu cząstkowego rozprawy – synteza diarylo nukleozydo fosforanów(V).

Łatwy dostęp do H-fosfonianów nukleozydów zachęcił mnie do wysondowania tzw. klasycznego podejścia w syntezie diarylo nukleozydo fosforanów(V), tzn. podejścia, w którym aktywowany chlorkami arylosulfonowymi arylo nukleozdo fosforanodiester był sprzęgany z drugim komponentem hydroksylowym (w moim przypadku byłby to drugi arylo). Tak się złożyło, że w Pracowni, w której realizowałam swoją pracę doktorską, znane były bardzo efektywne metody syntezy różnych arylo nukleozydo fosforanodiesterów, w których jako substratów używano H-fosfoniany nukleozydów i odpowiednie fenole. W odpowiednich warunkach, reakcje kondensacji tych związków prowadziły do arylo nukleozydo H-fosfonianodiesterów, a te utleniane jodem wobec wody, w szybkich i wydajnych reakcjach prowadziły do arylo nukleozydo fosforanodiesterów. Wydawało się więc uzasadnionym, sprawdzenie czy można dochodzić do różnych, asymetrycznych diarylo nukleozydo fosforanów(V) przyłączając cząsteczkę drugiego arylołu do wspomnianych fosforanodiesterów. Wyniki doświadczeń ukazały, że w metodzie klasycznej obowiązują reguły ograniczające liczbę osiągalnych tą metodą diarylo nukleozydo fosforanów(V). Chodzi o to, że pochodne fenoli o $pK_a > 9$ były na tyle niereaktywne, że reakcje kondensacji z innymi arylołami zachodziły bardzo wolno i najczęściej prowadziły do złożonych mieszanin reakcyjnych. W przypadku arylo fosforanodiesterów, pochodnych bardziej kwasowych fenoli, analogiczne reakcje kondensacji zachodziły dość łatwo i pożądane produkty można było otrzymać z zadowalająco wysokimi wydajnościami. Tak więc, podejście to okazało się skuteczne, ale w ograniczonym zakresie.

Chcąc mieć dostęp do możliwie szerokiej gamy tytułowych diarylo nukleozydo fosforanów(V), poszukiwałam metody bardziej uniwersalnej i jednocześnie takiej, która uczyniłaby syntezę tych związków szybką i nieobarczoną koniecznością stosowania unikalnych warunków (czy aparatury) decydujących o powodzeniu ich syntezy. Taką metodą okazała się metoda oksydatywnej kondensacji arylo nukleozydo H-fosfonianu z arylołami wobec jodu,

The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the war. It is followed by a detailed account of the military operations in the various theaters of the war. The author then discusses the political and economic conditions of the country and the impact of the war on the population. The report concludes with a summary of the findings and a list of recommendations.

The second part of the report contains a detailed account of the military operations in the various theaters of the war. It is followed by a discussion of the political and economic conditions of the country and the impact of the war on the population. The author then discusses the findings and makes a list of recommendations.

The third part of the report contains a detailed account of the military operations in the various theaters of the war. It is followed by a discussion of the political and economic conditions of the country and the impact of the war on the population. The author then discusses the findings and makes a list of recommendations.

The fourth part of the report contains a detailed account of the military operations in the various theaters of the war. It is followed by a discussion of the political and economic conditions of the country and the impact of the war on the population. The author then discusses the findings and makes a list of recommendations.

The fifth part of the report contains a detailed account of the military operations in the various theaters of the war. It is followed by a discussion of the political and economic conditions of the country and the impact of the war on the population. The author then discusses the findings and makes a list of recommendations.

The sixth part of the report contains a detailed account of the military operations in the various theaters of the war. It is followed by a discussion of the political and economic conditions of the country and the impact of the war on the population. The author then discusses the findings and makes a list of recommendations.

The seventh part of the report contains a detailed account of the military operations in the various theaters of the war. It is followed by a discussion of the political and economic conditions of the country and the impact of the war on the population. The author then discusses the findings and makes a list of recommendations.

The eighth part of the report contains a detailed account of the military operations in the various theaters of the war. It is followed by a discussion of the political and economic conditions of the country and the impact of the war on the population. The author then discusses the findings and makes a list of recommendations.

The ninth part of the report contains a detailed account of the military operations in the various theaters of the war. It is followed by a discussion of the political and economic conditions of the country and the impact of the war on the population. The author then discusses the findings and makes a list of recommendations.

The tenth part of the report contains a detailed account of the military operations in the various theaters of the war. It is followed by a discussion of the political and economic conditions of the country and the impact of the war on the population. The author then discusses the findings and makes a list of recommendations.

w warunkach bezwodnych. W tym podejściu, w pierwszej reakcji kondensując H-fosfonian nukleozydu z dowolnym (pośród badanych) arylolem generowałam arylo nukleozydo H-fosfonian. Reakcja ta zachodziła szybko (< 5 min) i praktycznie ilościowo. W drugiej reakcji, arylo nukleozydo H-fosfonian utleniany jodem tworzył bardzo szybko (z chwilą dodania) odpowiedni, wysoce reaktywny jodofosforan, a ten reagował równie szybko do pożądanego diarylo nukleozydo fosforanotriestrów, które to związki po izolacji metodami chromatograficznymi otrzymywałam z wysokimi wydajnościami. To podejście można określić jako uniwersalne, gdyż dobrze pracowało bez względu na rodzaj i sekwencje stosowanych aryli. Ponadto, jest to metoda typu „w jednej kolbie” (ang. *one-pot approach*) prowadząca szybko i w stosunkowo prostych i wygodnych procedurach do końcowych produktów.

Powyższą reakcję i opanowane techniki jej wykonania, stosowałam z powodzeniem w syntezie związków o bardziej złożonych strukturach, takich jak tych zawierających ugrupowania aryłowe pochodne aromatycznych dioli np. 1,3-rezocynolu. Stosując odpowiednie nadmiary substratów mogłam otrzymywać mono- lub di-podstawione pochodne nukleotydowe rezorcynolu, związki o bardzo obiecujących możliwościach wariacji strukturalnych, w kontekście aktywności biologicznej.

Reakcje oksydatywnej kondensacji okazały się równie skuteczne w przypadku syntezy (N-arylo)amidofosforanów(V), aczkolwiek badając warianty tej reakcji natrafiłam na dość zaskakujące obserwacje. Pewnym zaskoczeniem był fakt, że (N-arylo)amido-H-fosfoniany utleniane jodem [generowanie jodo (N-arylo)amidofosforanów(V)] bardzo łatwo i wydajnie reagowały z arylołami tworząc oczekiwane arylo nukleozydo (N-arylo)amidofosforany(V), w czystych i wydajnych reakcjach. Było to dla mnie zaskakujące, gdyż wcześniejsze próby utleniania (N-alkilo)amido-H-fosfonianów jodem w warunkach standardowych tej reakcji, zakończyły się niepowodzeniem (A. Kraszewski – dane nieopublikowane). Ponieważ wątek amidofosforanów nie był głównym w mojej rozprawie, pozostawiłam tę sprawę tak jak opisałam, ze świadomością, że jej wyjaśnienie jest z pewnością godne dodatkowych badań, których zakresu nie potrafię w tej chwili przewidzieć.

Warto może w tym miejscu zauważyć, że reakcja oksydatywnej kondensacji została opisana przez A. Todda ponad pięćdziesiąt lat temu i na przestrzeni tych lat była raczej okazjonalnie wykorzystywana. Na podstawie doświadczeń zebranych podczas realizacji mojej pracy doktorskiej pozwalałam sobie wyrazić pogląd, że jest to reakcja o znacznie większych możliwościach zastosowania niż te, opisane dotychczas. Mam wielką nadzieję, że w swoich dalszych pracach będę mogła ten pogląd zweryfikować pozytywnie.

Po uporaniu się z problemami syntezy związków, przystąpiłam do badania ich wybranych właściwości, takich, które będą pomocne w wyjaśnianiu bądź przewidywaniu ich

The first part of the paper discusses the general theory of the firm, focusing on the relationship between the firm's production function and its cost function. It shows how the firm's optimal output level is determined by the intersection of its marginal revenue and marginal cost curves. The second part of the paper discusses the firm's optimal input levels, showing how the firm's optimal input levels are determined by the intersection of its marginal product of each input and its marginal cost of each input. The third part of the paper discusses the firm's optimal price, showing how the firm's optimal price is determined by the intersection of its marginal revenue and marginal cost curves.

The fourth part of the paper discusses the firm's optimal investment, showing how the firm's optimal investment level is determined by the intersection of its marginal benefit of investment and its marginal cost of investment. The fifth part of the paper discusses the firm's optimal financing, showing how the firm's optimal financing level is determined by the intersection of its marginal benefit of financing and its marginal cost of financing. The sixth part of the paper discusses the firm's optimal distribution, showing how the firm's optimal distribution level is determined by the intersection of its marginal benefit of distribution and its marginal cost of distribution.

The seventh part of the paper discusses the firm's optimal growth, showing how the firm's optimal growth rate is determined by the intersection of its marginal benefit of growth and its marginal cost of growth. The eighth part of the paper discusses the firm's optimal innovation, showing how the firm's optimal innovation level is determined by the intersection of its marginal benefit of innovation and its marginal cost of innovation. The ninth part of the paper discusses the firm's optimal risk, showing how the firm's optimal risk level is determined by the intersection of its marginal benefit of risk and its marginal cost of risk. The tenth part of the paper discusses the firm's optimal exit, showing how the firm's optimal exit level is determined by the intersection of its marginal benefit of exit and its marginal cost of exit.

The final part of the paper discusses the firm's optimal performance, showing how the firm's optimal performance level is determined by the intersection of its marginal benefit of performance and its marginal cost of performance. The paper concludes by discussing the firm's optimal overall strategy, showing how the firm's optimal overall strategy is determined by the intersection of its marginal benefit of overall strategy and its marginal cost of overall strategy.

aktywności antywirusowej, czyli tych, pozwalających korelować właściwości chemiczne z aktywnością biologiczną. Badania te, ograniczyłam do środowisk, w których związki miały być testowane na ich aktywność anti-HIV, a więc środowisko hodowli komórkowych (RPMI-1640) jako takie i wzbogacone surowicą bydlęcą (FBS). W tych badaniach używałam wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) jako metody analitycznej, wyznaczając $t_{1/2}$ rozpadu związków w reakcjach chemicznych lub katalizowanych enzymami. Ze względów opisanych wcześniej, w pierwszej kolejności badane były właściwości substratowe arylo nukleozydo fosforanodiestrów w środowisku niosącym aktywności enzymatyczne (RPMI/FBS), które wykazały, że wszystkie wśród badanych są dobrymi substratami enzymów hydrolitycznych, i że aktywności te zależały nie tylko od fragmentu fosforanowego, ale w dużym stopniu od reszty nukleozydowej. Te wyniki nie były dla mnie szczególnie zaskakujące i odkrywcze, ale wyznaczając $t_{1/2}$ dla każdego związku miałam porównanie parametryczne w obrębie całej serii badanych związków, co otwierało szanse na dostrzeżenie elementów struktury, wpływających na podatność badanych związków na enzymatyczną degradację. Druga seria badań podobnej natury, to określenie trwałości maskowanych fosforanotriestrów w RPMI. W tym przypadku uzyskałam parametryczne dane (ponownie $t_{1/2}$), które mogłam dość dobrze skorelować z właściwościami chemicznymi (wpływ podstawników w pierścieniu aromatycznym) fosforoestrowych grup maskujących na trwałość związku w badanych warunkach. Te i poprzednie parametry kinetyczne opisujące trwałość związków w badanych warunkach, były później korelowane z cytotoksycznością i aktywnościami anti-HIV, zmierzoną w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu w Cagliari, Włochy. Muszę przyznać, że korelacje te nie zawsze były jednoznaczne, ale można było wyznaczyć zakresy $t_{1/2}$, które odpowiadały związkom o najwyższej aktywności. Pragnę poinformować, że wyniki badań nad syntezą i właściwościami diarylo nukleozydo fosforanów(V) oraz ich aktywnością anti-HIV zostały opublikowane w *Bioorganic Medicinal Chemistry* w 2009 roku.

Na koniec sprawa lipofilowości badanych związków, która w wielu pracach traktowana jest jako jedna z najważniejszych, jako ta decydująca o możliwości penetracji błon i wnikaniu do wnętrza komórek. Jest oczywiste, że nadmierna lipofilowość jest niepożądana, gdyż utrudnia lub wyklucza całkowicie badania związku w środowiskach zbliżonych do fizjologicznych. Z drugiej strony, związki polarne, dobrze rozpuszczalne w wodzie nie mogą lub trudno pokonują błony komórkowe. W swojej rozprawie jako obiekty badań celowo wybrałam związki zawierające pirydynylowe fosforoestrowe grupy maskujące, co profitowało w dobrej (a przynajmniej znacznie lepszej w porównaniu z analogicznymi grupami fenyłowymi) rozpuszczalności tych związków w roztworach wodnych, umożliwiającą przeprowadzenie całego zakresu badań, od trwałości chemicznej w środowisku hodowli komórkowych do oznaczenia aktywności anti-HIV.



Sprawę rozbieżności wielkości parametrów $\log P$, wyznaczonych doświadczalnie i tych uzyskanych metodami obliczeniowymi zostawiam niewyjaśnioną i otwartą. Sądzę, że wymaga ona zdecydowanie szerszych i inaczej zaprogramowanych badań, znacznie przekraczających merytorycznie zakres badań planowanych w mojej rozprawie.

Dysponując wszystkimi powyższymi wynikami mogłam odpowiedzieć na pytanie postawione na początku *Podsumowania*. Twierdzę, że można tak dobrać aryłowe fosforoestrowe grupy maskujące pronukleotydów, by otrzymać związki o parametrach farmakokinetycznych, czyniących je lepszymi potencjalnymi prolekami niż nukleozydy, od których się wywodzą. Ponadto, chociaż wiem, że moje wyniki nie wyczerpują problemu, to na ich podstawie czuje się upoważniona wyrazić przekonanie, że opierając się na ogólnie znanych w chemii organicznej regułach rządzących reaktywnością związków chemicznych, można racjonalnie projektować i otrzymywać pochodne nukleotydowe, o zaprogramowanych w strukturze właściwościach antywirusowych.



VII. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały i metody

Widma NMR rejestrowane były na spektrometrze Varian Unity 300 lub 400MHz. Eksperymenty ^{31}P NMR przeprowadzane były w temperaturze 25°C, w probówkach o średnicy 5 mm, przy stężeniach związków zawierających fosfor wynoszących 0.1 mmol/ml. Wzorzec zewnętrzny - 2% H_3PO_4 w D_2O . Widma masowe rejestrowano na spektrometrach JOEL MS SX 102 i Autoflex II firmy Bruker, stosując następujące metody jonizacji: LSIMS dla H-fosfonianomonoestrów i fosforanodiestrów, FAB dla fosforanotriestrów, MALDI TOF dla dinukleozydowych fosforanów.

Analizy HPLC wykonywałam na chromatografie Waters 2487, stosując kolumnę Hypersil ODS (4,6 x 250 mm, 5 μm), z przepływem 1.5 ml/min. Roztwory: A – 0,01 M octan trietyloamoniowy pH = 7.4 i B – acetonitryl/A, 4:1 [v/v]. Profil gradientu: 5 min. A 100%, 40 min. liniowy gradient B 0-100%, 10 min. przemywanie A 100%.

Chromatografię cienkowarstwową przeprowadzałam na płytkach z żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄ (Merck) stosując następujące fazy rozwijające [v/v]: A – chlorek metylenu/metanol 90:10; A₁ – chlorek metylenu/metanol 95:5; B – chlorek metylenu/2-propanol 90:10; B₁ – chlorek metylenu/2-propanol 95:5; C – chlorek metylenu/metanol/trietyloamina 85:10:5; D – 2-propanol/woda/25% woda amoniakalna 85:10:5; E – aceton/woda 60:40. Do chromatografii kolumnowej używałam żelu krzemionkowego Merck 60 (0.063-0.200 mm) lub żelu krzemionkowego silanizowanego (0.063-0.200 mm).

W celu wyznaczenia współczynnika podziału P, 1 ml 0.0001 M roztworu badanego związku w 1-oktanolu wraz z 1 ml wody wytrząsałam przez 15 min. (Thermomixer Comfort), i po rozdzieleniu warstw (15 min.), oznaczałam spektrofotometrycznie (UV) stężenie badanego związku w warstwie organicznej.

Zawartość wody w rozpuszczalnikach mierzyłam na kulometrze Metrom 684 KF, uznając jako suche rozpuszczalniki zawierające poniżej 20 ppm wody. Pirydyna (POCh) i chlorek metylenu (POCh) osuszane były przez destylację z P_2O_5 i przechowywane nad sitami molekularnymi 4Å. Acetonitryl (Merck) był przechowywany nad sitami molekularnymi 4Å. Chlorek piwaloilu (Merck) i chlorek trimetylosililu (POCh) były destylowane przed użyciem. Trietyloamina (Merck) i izopropyloamina (Aldrich) były przedestylowane i przechowywane nad wodorkiem wapnia (Aldrich). Kwas fosfonowy (Fluka), (9H-fluoren-9-ylo)metanol (Fluka), H-fosfonian difenyłowy (Aldrich), chlorofosforan difenyłowy (Aldrich), H-fosfonian dietyłowy (Janssen), chlorek 2,4,6-triizopropylobenzenosulfonowy (Janssen), jod (Aldrich), etanotiol (Aldrich), fenole (Aldrich), hydroksypirydyny (Aldrich), aminopirydyny (Aldrich) były używane bez



oczyszczania. RPMI-1640 (Sigma), FBS (Sigma). AZT (ChemGenes), ddU zsyntetyzowana przez zespół prof. J. Boryskiego (IChB PAN Poznań), ddA, ddI otrzymane dzięki uprzejmości dr Y. Hagiwara i dr K. Izawa (Ajinomoto Co., Inc., Kawasaki, Japonia). 3'-*O*-acetyo-3'-deoksytymidyna, 5'-fosforanomonoestry nukleozydów typu **60**, amidofosforanomonoestry AZT typu **182** były przygotowane według opublikowanych procedur.^{164,165}

Rozpuszczalniki: octan etylu, 2-propanol, były destylowane przed użyciem. Odparowanie rozpuszczalników prowadzone było pod zmniejszonym ciśnieniem (wyparka rotacyjna).

Przesunięcia chemiczne i stałe sprzężeń ³¹P NMR produktów pośrednich i końcowych przedstawiłam w Tabeli 6 (str. 124).

Otrzymywanie (9*H*-fluoren-9-yl)metyle H-fosfonianu **157 sól amonowa.**

Kwas fosfonowy (4.1 g, 50 mmoli) osuszyłam przez dwukrotne odparowanie z bezwodną pirydyną, następnie rozpuściłam w tym samym rozpuszczalniku (ok. 150 ml) i dodałam chlorek piwaloilu (3.5 ml, 0.55 ekw. mol.). Po utworzeniu kwasu pirofosfonowego (5 min., ³¹P NMR) dodałam (9*H*-fluoren-9-yl)metanol (4.9 g, 25 mmoli) i zatężyłam mieszaninę reakcyjną do ¼ jej objętości początkowej. Reakcję prowadziłam przez 48 godzin w temperaturze pokojowej lub przez 24 godz. w temperaturze 40°C. Po ochłodzeniu w łaźni z lodem, do mieszaniny reakcyjnej dodałam wodę (ok. 10 ml) i po 10 min. odparowałam rozpuszczalniki. Oleistą pozostałość rozcieńczyłam chlorkiem metylenu (150 ml) i przemyłam solanką (2 x 50 ml). Warstwę organiczną oddzieliłam a po osuszeniu nad bezw. Na₂SO₄, zatężyłam. Otrzymany (9*H*-fluoren-9-yl)metyle H-fosfonian w postaci soli pirydyniowej przekształcałam w sól amonową, dodając mieszaninę 2-propanolu zawierającego 5% objętościowych 25% wody amoniakalnej (50 ml [v/v]). Czysty produkt otrzymywałam przez wytrącanie się białych mikrokryształów z roztworu podczas odparowywania, które po odsączeniu i osuszeniu stanowiły krystaliczny, niehigroskopijny (9*H*-fluoren-9-yl)metyle H-fosfonian w postaci soli amonowej. Wydajność 90%. ¹H NMR, δ_H (D₂O) 7.46 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, ArH), 7.30 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, ArH), 7.15 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, ArH), 7.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, ArH), 6.47 (d, *J* = 635.4 Hz, 1H, H-P), 3.98 (dd, ³*J*_{H-P} = 7.2 Hz, *J*_{H-H} = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 3.86 (t, *J* = 6.0 Hz, 9-CH). ¹³C NMR, δ_C (D₂O) 143.75 (C-10 & C-13), 140.72 (C-11 & C-12), 127.6 (C-1 & C-8), 127.1 (C-4 & C-5), 124.95 (C-2 & C-7), 119.81 (C-3 & C-6), 65.52 (CH₂), 47.84 (C-9). HRMS [M - Et₃NH⁺]⁻ *m/z* 259.0502, liczone dla C₁₄H₁₂O₃P 259.0524. Temp. topnienia 174-176°C.



Ogólna procedura otrzymywania 5'-H-fosfonianomonoestrów 2',3'-dideoksynukleozydów typu 159.

(9H-fluoren-9-ylo)metylo H-fosfonian NH_4^+ (1 ekw. mol.) przekształcałam w sól trietyloamoniową poprzez odparowanie z pirydyną zawierającą trietyloaminę (4:1 v/v). Następnie dodałam odpowiedni dideoksynukleozyd (1.05 ekw. mol.) i osuszyłam substraty przez odparowanie z nadmiarem bezwodnej pirydyny. Pozostałość rozpuściłam w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (95:5 v/v; 0.1 mmol/ml) i dodałam chlorek piwaloilu (1.5 ekw. mol.). Po zakończeniu reakcji (60 min., TLC- faza A₁, ³¹P NMR) mieszaninę reakcyjną rozcieńczyłam chlorkiem metylenu i dwukrotnie przemywałam wodą. Warstwę organiczną osuszyłam bezw. Na_2SO_4 i odparowałam. Surowy produkt ((9H-fluoren-9-ylo)metylo nukleozydo H-fosfonianodiester typu **158**) rozpuściłam w mieszaninie bezwodnego acetonitrylu z trietyloaminą (2:1, v/v; 0.1 mmol/ml) usuwając w tym środowisku β -eliminacyjną grupę (9H-fluoren-9-ylo)metylową (20 min., TLC- faza A₁, ³¹P NMR). Po odparowaniu rozpuszczalników, produkt typu **159** izolowałam na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym, stosując gradient metanolu (0-30% v/v) w chlorku metylenu zawierającym trietyloaminę (3% v/v). Zebrane frakcje odparowałam, otrzymując czyste nukleozydo H-fosfoniany **159** w postaci suchych pian.

2',3'-dideoksyinozyn-5'-ylo H-fosfonian 159a sól trietyloamoniowa. Wydajność 72%. ¹H NMR, δ_{H} (D_2O) 8.34 (s, 1H, 8-H), 8.18 (s, 1H, 2-H), 6.63 (d, $J = 637.8$ Hz, 1H, H-P), 6.34 (dd, $J = 6.6$ Hz, $J = 2.7$ Hz, 1-H, 1'-H), 4.14-4.08 (m, 1H, 4'-H), 4.02-3.90 (m, 2H, 5',5''-H₂), 3.21 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.68-2.62 & 2.60-2.54 (2m, 2H, 3',3''-H₂), 2.30-2.23 & 2.3-2.14 (2m, 2H, 2',2''-H₂), 1.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_2CH_3). ¹³C NMR, δ_{C} (D_2O) 158.10 (C-4), 147.96 (C-6), 145.78 (C-8), 139.36 (C-2), 123.42 (C-5), 85.16 (C-5'), 81.02 (C-1'), 64.16 (C-4'), 46.60 (CH_2CH_3), 31.66 (C-2'), 23.71 (C-3'), 8.20 (CH_2CH_3). HRMS $[\text{M} - \text{Et}_3\text{NH}^+]^-$ m/z 299.0517, liczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5\text{P}$ 299.0545.

2',3'-dideoksyadenozyn-5'-ylo H-fosfonian 159b sól trietyloamoniowa. Wydajność 90%. ¹H NMR, δ_{H} (D_2O) 8.28 (s, 1H, H-8), 8.05 (s, 1H, H-2), 6.61 (d, $J = 637.8$ Hz, H-P), 6.19 (dd, $J = 6.8$ Hz, $J = 3.2$ Hz, 1H, 1'-H), 4.46-4.39 (m, 1H, 4'-H), 4.11-4.06 & 3.96-3.90 (2m, 2H, 5',5''-H₂), 3.15 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.65-2.55 & 2.47-2.41 (2m, 2H, 3',3''-H₂), 2.27-2.19 & 2.13-2.03 (2m, 2H, 2',2''-H₂), 1.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_2CH_3). ¹³C NMR, δ_{C} (D_2O) 154.50 (C-4), 151.55 (C-2), 147.84 (C-6), 139.65 (C-8), 118.22 (C-5), 84.78 (C-1'), 80.74 (C-5'), 64.44 (C-4'), 46.57 (CH_2CH_3), 31.57 (C-2'), 25.65 (C-3'), 8.16 (CH_2CH_3). HRMS $[\text{M} - \text{Et}_3\text{NH}^+]^-$ m/z 298.0719, liczone dla $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4\text{P}$ 298.0705.

2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo H-fosfonian 159c sól trietyloamoniowa. Wydajność 88%. ¹H NMR, δ_{H} (D_2O) 7.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 6-H), 6.76 (d, $J = 637.4$ Hz, 1H, H-P), 6.10 (dd, 1H,

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
1950

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
1950

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
1950

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
1950

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
1950

$J = 7.2$ Hz, $J = 3.2$ Hz, 1H, 1'-H), 5.88 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 5-H) 4.36-4.33 (m, 1H, 4'-H), 4.18-4.13 & 4.02-3.97 (2m, 2H, 5',5''-H₂), 3.20 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 2.48-2.42 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 2.20-2.09 (m, 2H, 2', 2''-H₂), 2.02-1.92 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH₂CH₃). ¹³C NMR, δ_C (D₂O) 166.26 (C-4), 151.55 (C-2), 142.10 (C-6), 101.69 (C-5), 86.39 (C-1'), 80.50 (C-5'), 64.31 (C-4'), 46.62 (CH₂CH₃), 31.24 (C-2'), 26.50 (C-3'), 8.40 (CH₂CH₃). HRMS [M - Et₃NH⁺] m/z 275.0408, liczone dla C₉H₁₂N₂O₆P 275.0433.

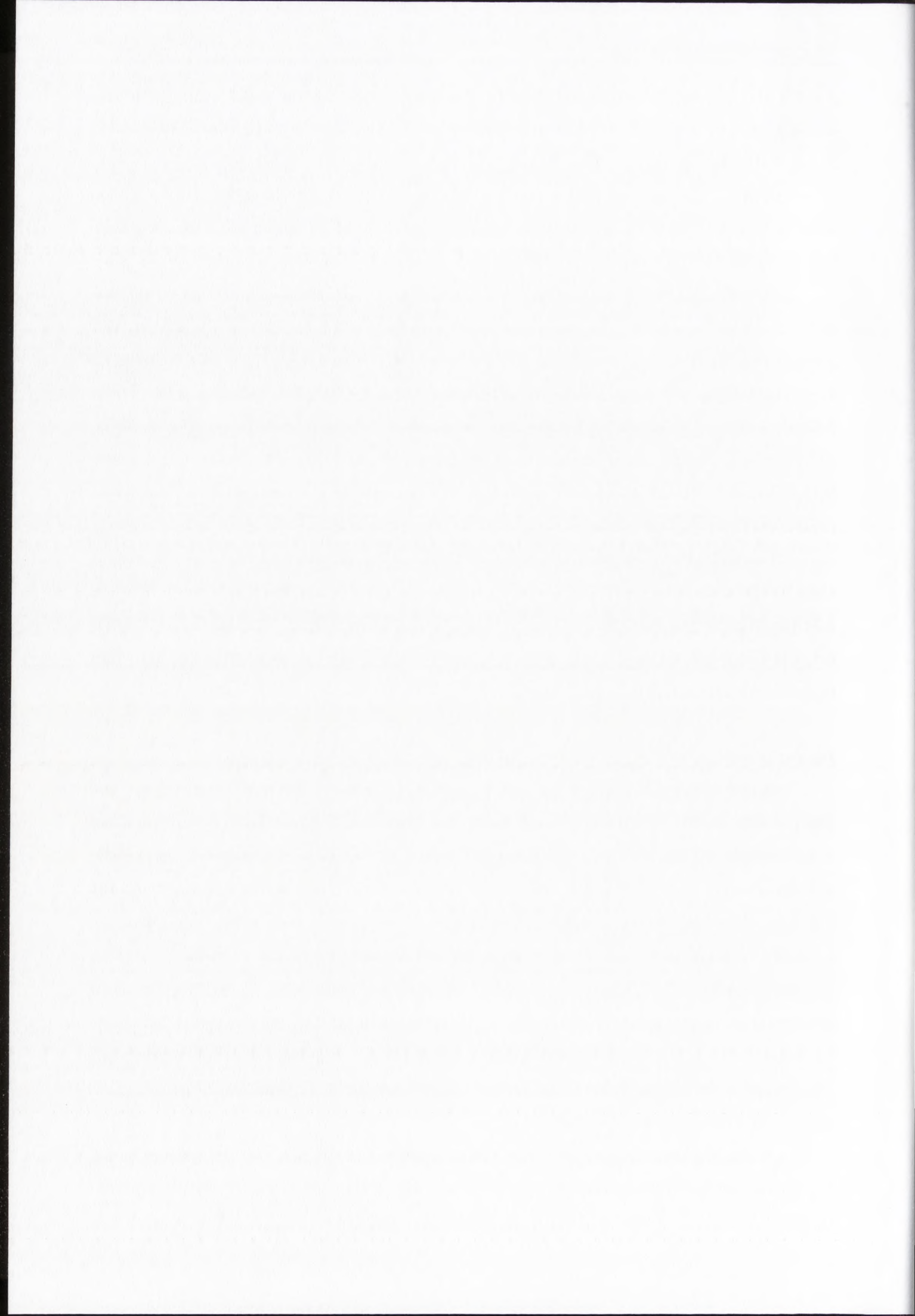
3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo H-fosfonian 159d sól trietyloamoniowa. Wydajność 85%. ¹H NMR, δ_H (D₂O) 7.71 (s, 1H, H-6), 6.80 (d, $J = 638.2$ Hz, 1H, H-P), 6.26 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.53-4.49 (m, 1H, 3'-H), 4.21-4.18 (m, 1H, 4'-H), 4.14-4.09 (m, 2H, 5',5''-H₂), 3.21 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 2.51 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, 2',2''-H₂), 1.92 (s, 3H, 5-CH₃), 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH₂CH₃). ¹³C NMR, δ_C (D₂O) 166.39 (C-4), 151.54 (C-2), 137.19 (C-6), 111.57 (C-5), 84.92 (C-1'), 82.89 (C-4'), 64.31 (C-5'), 60.48 (C-3'), 46.65 (CH₂CH₃), 36.27 (C-2'), 11.61 (5-CH₃), 8.41 (CH₂CH₃). HRMS [M - Et₃NH⁺] m/z 330.0576, liczone dla C₁₀H₁₃N₅O₆P 330.0603.

3'-acetylo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo H-fosfonian 159e sól trietyloamoniowa. Wydajność 82%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 7.81 (s, 1H, 6-H), 6.56 (d, $J = 556$ Hz, 1H, H-P), 6.35 (m, 1-H, 1'-H), 5.31 (m, 1H, 3'-H), 4.16-4.069 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.04-3.97 (m, 1H, 4'-H), 3.03 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 2.22-2.31 (2m, 2H, 2',2''-H₂), 2.07 (s, 3H, 5-CH₃), 1.88 (s, 3H, Ac-CH₃), 1.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH₂CH₃).

Ogólna procedura otrzymywania arylo nukleozydo fosforanodiestrów typu 162.

H-fosfonian nukleozydowy typu **159** (1 ekw. mol.) i odpowiedni fenol lub pirydynol typu **160** (1.5 ekw. mol.) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną. Następnie rozpuściłam w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (90:10, v/v; 0.1 mmol/ml) i dodałam chlorofosforan difenyłowy (1.2 ekw. mol.). Po utworzeniu odpowiednich H-fosfonianodiestrów typu **161** (20 min., ³¹P NMR) dodałam jod (1.5 ekw. mol.) rozpuszczony w niewielkiej ilości pirydyny, a po ok. 20 sekundach wodę (5 ekw. mol). Po zakończeniu reakcji (ok. 3 min., ³¹P NMR) dodałam niewielką ilość etanotolu, w celu rozłożenia nadmiaru jodu. Mieszaninę reakcyjną odparowałam, a pożądane produkty typu **162** izolowałam na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym, stosując liniowy gradient 2-propanolu (0-30%) w chlorku metylenu zawierającym 5% trietyloaminy (v/v). Frakcje zawierający czysty produkt reakcji odparowałam otrzymując białe, higroskopijne piany.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylo fosforan(V) 162dA sól trietyloamoniowa. Wydajność 94%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 7.73 (m, 1H, 6-H), 7.28-7.24 (m, 5H, ArH), 6.27 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, 1'-H), 4.33-4.28 (m, 1H, 3'-H), 4.22-4.18 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.03-4.01



(m, 1H, 4'-H), 3.04 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.33–2.23 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.89 (s, 3H, 5- CH_3), 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_2CH_3). HRMS $[\text{M} - \text{Et}_3\text{NH}^+]$: 422.0846, liczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}$: 422.0865.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 4-chlorofenylo fosforan(V) 162dB sól trietyloamoniowa. Wydajność 81%. ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3) 7.67 (s, 1H, 6-H), 7.19 (s, 4H, ArH), 6.26 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.36–4.31 (m, 1H, 3'-H), 4.24–4.11 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.00 (m, 1H, 4'-H), 3.05 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.38–2.21 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.88 (s, 3H, 5- CH_3), 1.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_2CH_3). HRMS $[\text{M} - \text{Et}_3\text{NH}^+]$: 456.0500, liczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_7\text{PCl}$: 456.0476.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 4-bromofenylo fosforan(V) 162dC sól trietyloamoniowa. Wydajność 87%. ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3) 7.64 (s, 1H, 6-H), 7.32 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.12 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 6.24 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.35–4.30 (m, 1H, 3'-H), 4.22–4.10 (m, 2H, 5',5''-H₂), 3.98 (m, 1H, 4'-H), 3.03 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.35–2.20 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.85 (s, 3H, 5- CH_3), 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_2CH_3). HRMS $[\text{M} - \text{Et}_3\text{NH}^+]$: 499.9960, liczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_7\text{PBr}$: 499.9971.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 4-cyjanofenylo fosforan(V) 162dD sól trietyloamoniowa. Wydajność 81%. ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3) 7.63 (s, 1H, 6-H), 7.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.35 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 6.22 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.33–4.31 (m, 1H, 3'-H), 4.20–4.08 (m, 2H, 5',5''-H₂), 3.99 (m, 1H, 4'-H), 3.06 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.32–2.21 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.88 (s, 3H, 5- CH_3), 1.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_2CH_3). HRMS $[\text{M} - \text{Et}_3\text{NH}^+]$: 447.0800, liczone dla $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_7\text{P}$: 447.0818.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 2,4-di-chlorofenylo fosforan(V) 162dE sól trietyloamoniowa. Wydajność 82%. ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3) 7.68 (s, 1H, 6-H), 7.57 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, ArH), 7.33 (s, 1H, ArH), 7.10 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, ArH), 6.26 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, 1'-H), 4.40–4.35 (m, 1H, 3'-H), 4.24–4.16 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.02–3.98 (m, 1H, 4'-H), 3.07 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.36–2.24 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.88 (s, 3H, 5- CH_3), 1.36 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_2CH_3). HRMS $[\text{M} - \text{Et}_3\text{NH}^+]$: 490.0065, liczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_7\text{PCl}_2$: 490.0086.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 4-nitrofenylo fosforan(V) 162dF sól trietyloamoniowa. Wydajność 86%. ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3) 8.11 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 7.59 (s, 1H, 6-H), 7.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, ArH), 6.19 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, 1'-H), 4.35–4.34 (m, 1H, 3'-H), 4.17 (m, 2H, 5',5''-H₂), 3.98 (m, 1H, 4'-H), 3.05 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.32–2.29 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.84 (s, 3H, 5- CH_3), 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_2CH_3).

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo rezorcynylo fosforan(V) 162dG sól trietyloamoniowa. Wydajność 79%. ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3) 7.7 (s, 1H, 6-H), 7.28 (m, 1H, ArH), 7.04–7.01 (m, 1H, ArH), 6.58–6.51 (m, 2H, ArH), 6.25 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, 1'-H), 4.39–4.34

The first part of the paper discusses the general theory of the model, and the second part discusses the numerical results. The model is based on the assumption that the system is in a steady state, and the results are compared with experimental data.

The model is based on the assumption that the system is in a steady state, and the results are compared with experimental data. The model is based on the assumption that the system is in a steady state, and the results are compared with experimental data.

The model is based on the assumption that the system is in a steady state, and the results are compared with experimental data. The model is based on the assumption that the system is in a steady state, and the results are compared with experimental data.

The model is based on the assumption that the system is in a steady state, and the results are compared with experimental data. The model is based on the assumption that the system is in a steady state, and the results are compared with experimental data.

The model is based on the assumption that the system is in a steady state, and the results are compared with experimental data. The model is based on the assumption that the system is in a steady state, and the results are compared with experimental data.

The model is based on the assumption that the system is in a steady state, and the results are compared with experimental data. The model is based on the assumption that the system is in a steady state, and the results are compared with experimental data.

The model is based on the assumption that the system is in a steady state, and the results are compared with experimental data. The model is based on the assumption that the system is in a steady state, and the results are compared with experimental data.

(m, 1H, 3'-H), 4.22-4.17 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.04-4.02 (m, 1H, 4'-H), 3.07 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 2.34-2.30 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.87 (s, 3H, 5-CH₃), 1.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H CH₂CH₃).

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 3-pirydynylo fosforan(V) 162dH sól trietyloamoniowa. Wydajność 86%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.50 (s, 1H, ArH), 8.24 (s, 1H, ArH), 7.65 (m, 2H, 6-H & ArH), 7.18 (m, 1H, ArH), 6.20 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.41-4.32 (m, 1H, 3'-H), 4.26-4.10 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.03-3.94 (m, 1H, 4'-H), 3.01 (q, $J = 7.2$ Hz, 6 CH₂CH₃), 2.32-2.23 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.80 (s, 3H, 5-CH₃), 1.28 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH₂CH₃). HRMS [M - Et₃NH⁺]: 423.0797, liczone dla C₁₅H₁₆N₆O₇P: 423.0818.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 2-chloro-3pirydynylo fosforan(V) 162dI sól trietyloamoniowa. Wydajność 71%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.07 (m, 1H, ArH), 7.97 (m, 1H, ArH), 7.66 (q, $J = 0.9$ Hz, 1H, 6-H), 7.16 (m, 1H, ArH), 6.26 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.46-4.37 (m, 1H, 3'-H), 4.28-4.17 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.04-4.01 (m, 1H, 4'-H), 3.06 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 2.40-2.25 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.89 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H, 5-CH₃), 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH₂CH₃). HRMS [M - Et₃NH⁺]: 457.0450, liczone dla C₁₅H₁₅N₆O₇PCl: 457.0429.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 5-chloro-3pirydynylo fosforan(V) 162dJ sól trietyloamoniowa. Wydajność 79%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.41 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, ArH), 8.26 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, ArH), 7.71 (dd, $J = 1.8$ Hz, $J = 1.5$ Hz, 1H, ArH), 7.62 (q, $J = 0.9$ Hz, 1H, 6-H), 6.26 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, 1'-H), 4.40-4.34 (m, 1H, 3'-H), 4.28-4.14 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.01 (m, 1H, 4'-H), 3.06 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 2.42-2.25 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.88 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H, 5-CH₃), 1.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH₂CH₃). HRMS [M - Et₃NH⁺]: 457.0420, liczone dla C₁₅H₁₅N₆O₇PCl: 457.0429.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 2-metylo-3pirydynylo fosforan(V) 162dK sól trietyloamoniowa. Wydajność 54%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.17 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, ArH), 7.74 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, ArH), 7.66 (q, $J = 0.9$ Hz, 1H, 6-H), 7.00 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 4.2$ Hz, 1H, ArH), 6.25 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.38 (m, 1H, 3'-H), 4.20 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.02 (m, 1H, 4'-H), 3.01 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 2.53 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.33 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.86 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H, 5-CH₃), 1.28 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH₂CH₃). HRMS [M - Et₃NH⁺]: 437.0983, liczone dla C₁₆H₁₈N₆O₇P: 437.0975.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 6-metylo-3pirydynylo fosforan(V) 162dL sól trietyloamoniowa. Wydajność 73%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.40 (s, 1H, ArH), 7.66 (q, $J = 0.9$ Hz, 1H, 6-H), 7.52 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.05 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, ArH), 6.26 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.38-4.33 (m, 1H, 3'-H), 4.27-4.13 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.01 (m, 1H, 4'-H), 3.05 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 2.47 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.39-2.24 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.85 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H, 5-CH₃), 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH₂CH₃). HRMS [M - Et₃NH⁺]: 437.0993, liczone dla C₁₆H₁₈N₆O₇P: 437.0975.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 2-pirydynylo fosforan(V) 162dM sól trietyloamoniowa. Wydajność 82%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3) 8.07 (br s, 1H, ArH), 7.67 (s, 1H, 6-H), 7.52 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, ArH), 7.01 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, ArH), 6.89 (br s, 1H, AH), 6.17 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, 1'-H), 4.41 (m, 1H, 3'-H), 4.19 (m, 2H, 5',5''-H₂), 3.95 (m, 1H, 4'-H), 2.98 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.34 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.75 (s, 3H, 5- CH_3), 1.18 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_2CH_3).

2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo fenylo fosforan(V) 162cA sól trietyloamoniowa. Wydajność 76%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3) 7.84 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 6-H), 7.22–7.15 (m, 4H, ArH), 6.98–6.93 (m, 1H, ArH), 6.00–5.96 (m, 1H, 1'-H), 5.51 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, 5-H), 4.24–4.18 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.07–4.00 (m, 1H, 4'-H), 2.97 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.29–2.22 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 1.97–1.87 (m, 3H, 2',2''-H₂, 3'- lub 3''-H), 1.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_2CH_3). HRMS [$\text{M} - \text{Et}_3\text{NH}^+$]: 367.0682, liczone dla $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}$: 367.0700.

2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo rezorcynylo fosforan(V) 162cG sól trietyloamoniowa. Wydajność 74%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3) 7.91 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 6-H), 7.20–7.18 (m, 1H, ArH), 7.03–6.98 (m, 1H, ArH), 6.58–6.55 (m, 2H, ArH), 6.01–5.99 (m, 1H, 1'-H), 5.62 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 5-H), 4.23 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.08–4.04 (m, 1H, 4'-H), 3.07 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.29–2.27 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 1.99–1.96 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.93 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 1.36 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_2CH_3).

2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo 3-pirydynylo fosforan(V) 162cH sól trietyloamoniowa. Wydajność 72%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3) 8.45 (s, 1H, ArH), 8.2 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, ArH), 7.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 6-H), 7.62 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, ArH), 7.17 (dd, $J = 8.8$ i 4.4 Hz, 1H, ArH), 5.97–5.95 (m, 1H, 1'-H), 5.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 5-H), 4.21–4.17 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.05–4.00 (m, 1H, 4'-H), 2.99 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.29–2.24 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 1.97–1.87 (m, 3H, 2',2''-H₂, 3'- lub 3''-H), 1.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_2CH_3). HRMS [$\text{M} - \text{Et}_3\text{NH}^+$]: 368.0642, liczone dla $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_7\text{P}$: 368.0648.

2',3'-dideoksyadenozyn-5'-ylo fenylo fosforan(V) 162bA sól trietyloamoniowa. Wydajność 84%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3) 8.55 (s, 1H, 8-H), 8.25 (s, 1H, 2-H), 7.29 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, ArH), 7.21 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, ArH), 6.98 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H, ArH), 6.34–6.32 (m, 1H, 1'-H), 4.38–4.30 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.16–4.10 (m, 1H, 4'-H), 3.04 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.50–2.41 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 2.37–2.26 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 2.18–2.06 (m, 1H, 2'- lub 2''-H), 2.03–1.96 (m, 1H, 2'- lub 2''-H), 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH_2CH_3). HRMS [$\text{M} - \text{Et}_3\text{NH}^+$]: 390.0975, liczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_5\text{P}$: 390.0967.

2',3'-dideoksyadenozyn-5'-ylo 3-pirydynylo fosforan(V) 162bH sól trietyloamoniowa. Wydajność 81%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3) 8.58 (s, 1H, 8-H), 8.53 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, ArH), 8.22 (s, 1H, 2-H), 8.18 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, ArH), 7.18 (dm, $J = 8.7$ Hz, 1H, ArH), 7.13 (dd,

The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the war. It is a very interesting and detailed account of the events of the year.

The second part of the report deals with the military operations of the year. It is a very detailed account of the campaigns and battles of the year.

The third part of the report deals with the political situation of the country. It is a very detailed account of the events of the year.

The fourth part of the report deals with the financial situation of the country. It is a very detailed account of the events of the year.

The fifth part of the report deals with the social situation of the country. It is a very detailed account of the events of the year.

The sixth part of the report deals with the foreign relations of the country. It is a very detailed account of the events of the year.

$J = 8.7$ & 4.8 Hz, 1H, ArH), 6.33 (dd, $J = 6.6$ and 3.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.41–4.29 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.16–4.10 (m, 1H, 4'-H), 3.06 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 2.52–2.40 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 2.38–2.28 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 2.2–2.08 (m, 1H, 2'- lub 2''-H), 1.99–1.92 (m, 1H, 2'- lub 2''-H), 1.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH₂CH₃). HRMS [M - Et₃NH⁺]⁻: 391.0914, liczone dla C₁₅H₁₆N₆O₅P: 391.0920.

Ogólna procedura otrzymywania arylo nukleozydo fosforanodiestrów typu **162N**.

(9H-fluoren-9-yl)ometylo H-fosfonian NH₄⁺ (1 ekw. mol.) przekształcałam w sól trietyloamoniową poprzez odparowanie z pirydyną zawierającą trietyloaminę (4:1 v/v). Następnie dodałam odpowiedni nukleozyd (1.05 ekw. mol.) i osuszyłam substraty przez dwukrotne odparowanie z bezwodną pirydyną. H-fosfonian i nukleozyd rozpuściłam w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (9:1 v/v; 0.1 mmol/ml) i dodałam chlorek piwaloilu (1.5 ekw. mol.). Po zakończeniu reakcji kondensacji (20 min., ³¹P NMR) dodałam 4-pirydynol (5 ekw. mol.) osuszony przez odparowanie z nadmiarem pirydyny oraz jod (1.5 ekw. mol.) rozpuszczony w niewielkiej ilości pirydyny. Po utworzeniu fosforanotriestru typu **164** (ok. 5 min. TLC- faza A, ³¹P NMR), nadmiar jodu rozłożyłam etanotiolem i odparowałam rozpuszczalniki. Pozostały olej rozpuściłam w chlorku metylenu i dwukrotnie przemywałam wodą. Warstwę organiczną osuszyłam bezw. Na₂SO₄ i odparowałam do sucha. Następnie surowy produkt typu **164** rozpuściłam w mieszaninie bezwodnego acetonitrylu z trietyloaminą (2:1, v/v; 0.1 mmol/ml) eliminując w tym środowisku fulwen (20 min., TLC- faza A₁, ³¹P NMR). Po odparowaniu rozpuszczalników, produkt typu **162** izolowałam na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym, stosując gradient 2-propanolu (0-30% v/v) w chlorku metylenu zawierającym trietyloaminę (3% v/v). Zebrane frakcje odparowałam, a po liofilizacji z benzenu otrzymałam czyste produkty w postaci białego higroskopijnego ciała stałego.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 4-pirydynylo fosforan(V) 162dN sól trietyloamoniowa. Wydajność 86%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.44 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, ArH), 7.63 (q, $J = 0.9$ Hz, 1H, 6-H), 7.20 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, ArH), 6.23 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.38–4.32 (m, 1H, 3'-H), 4.24–4.12 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.03–3.97 (m, 1H, 4'-H), 3.02 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃), 2.38–2.22 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.89 (d, $J = 0.9$ Hz, 3H, 5-CH₃), 1.28 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH₂CH₃). HRMS [M - Et₃NH⁺]⁻: 423.0815, liczone dla C₁₅H₁₆N₆O₇P: 423.0818.

2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo 4-pirydynylo fosforan(V) 162cN sól trietyloamoniowa. Wydajność 80%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 7.99 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 6-H), 7.88 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, ArH), 6.59 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, ArH), 6.10–6.04 (m, 1H, 1'-H), 5.86 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 5-H), 4.40–4.22 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.17–4.05 (m, 1H, 4'-H), 3.17 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH₂CH₃),



2.51–2.38 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 2.18–1.93 (m, 3H, 2',2''-H₂, 3'- lub 3''-H), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, CH₂CH₃). HRMS [M - Et₃NH⁺]: 368.0615, liczone dla C₁₄H₁₅N₃O₇P: 368.0648.

Ogólna procedura otrzymywania diarylowych fosforanotriestrów typu 153.

H-fosfonian nukleozydowy typu 159 (1 ekw. mol.) i odpowiedni fenol lub pirydynol typu 160 (1.2 ekw. mol.) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną. Następnie rozpuściłam w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (90:10 v/v; 0.1 mmol/ml) i dodałam chlorofosforan difenylowy (1.2 ekw. mol.) lub chlorek piwaloilu (1.5 ekw. mol.). Po utworzeniu H-fosfonianodiestru arylowo nukleozydowego (ok. 20 min., ³¹P NMR) mieszaninę reakcyjną przeniosłam do osuszonego przez odparowanie z bezwodną pirydyną kolejnego fenolu lub pirydynolu (5 ekw. mol.) a następnie dodałam jod (1.5-2 ekw. mol.) rozpuszczony w bezwodnej pirydynie (1 ml). Po zakończeniu reakcji (ok. 3 min., ³¹P NMR) nadmiar jodu rozłożyłam niewielką ilością etanoliu i odparowałam rozpuszczalniki. Oleistą pozostałość rozpuściłam w chlorku metylenu i dwukrotnie przemyłam wodnym 0.1 M roztworem KH₂PO₄ (pH = 6) Fazę organiczną osuszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄ i zateżyłam. Diarylowe fosforanotriestry izolowałam na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym stosując liniowy gradient 2-propanolu (0-12%) w chlorku metylenu lub w octanie etylu, albo za pomocą chromatografii w układzie odwróconym, stosując gradient acetonu (0-40%) w wodzie. Frakcje zawierające czysty produkt typu 153 odparowałam do niehigroskopijnych pian, z których po liofilizacji z benzenu otrzymywałam zwykle białe bezpostaciowe ciała stałe.

3'-acetylo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylo 3-pirydynylo fosforan(V) 153eAH.

Wydajność 75%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.52 (br s, 1H, ArH), 8.49 (br s, 1H, ArH), 7.82-7.56 (m, 2H, ArH, 6-H), 7.35-7.16 (m, 6H, ArH), 6.41-6.33 (m, 1H, 1'-H), 5.25-5.23 (m, 1H, 3'-H), 4.61-4.57 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.21 (m, 1H, 4'-H), 2.42-2.29 (m, 2H, 2',2''-H₂), 2.11 (s, 3H, Ac-CH₃), 1.76 (s, 3H, 5-CH₃).

3'-acetylo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylo 5-chloro-3-pirydynylo fosforan(V) 153eAJ.

Wydajność 74%. ¹H NMR, δ_H (DMSO) 8.57-8.55 (m, 1H, ArH), 8.52-8.48 (m, 1H, ArH), 7.94-7.88 (m, 1H, ArH), 7.68 (m, 1H, 6-H), 7.46-7.39 (m, 3H, ArH), 7.31-7.26 (m, 2H, ArH), 6.21 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H, 1'-H), 5.20 (m, 1H, 3'-H), 4.62-4.57 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.25-4.21 (m, 1H, 4'-H), 2.39-2.25 (m, 2H, 2',2''-H₂), 2.07 (s, 3H, Ac-CH₃), 1.63 (s, 3H, 5-CH₃).

3'-acetylo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo bis-3-pirydynylo fosforan(V) 153eHH.

Wydajność 78%. ¹H NMR, δ_H (DMSO) 8.54 (m, 2H, ArH), 8.49-8.45 (m, 2H, ArH), 7.78-7.72 (m, 2H, ArH, 6-H), 7.51-7.44 (m, 3H, ArH), 6.19 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, 1'-H), 5.21-5.19 (m, 1H, 3'-H), 4.65-4.54 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.24 (m, 1H, 4'-H), 2.49-2.23 (m, 2H, 2',2''-H₂), 2.07 (s, 3H, Ac-CH₃), 1.63 (s, 3H, 5-CH₃).

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylu 3-pirydynylo fosforan(V) 153dAH. Wydajność 89%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (DMSO) 8.51 (s, 1H, ArH), 8.47 (m, 1H, ArH), 7.72-7.69 (m, 1H, 6-H), 7.49-7.36 (m, 4H, ArH), 7.30-7.25 (m, 3H, ArH), 6.15 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.70-4.47 (m, 3H, 5',5''-H₂ & 3'-H), 4.10-4.02 (m, 1H, 4'-H), 2.45-2.30 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.65 (s, 3H, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺ 501.1311, C₂₁H₂₂N₆O₇P: 501.1288.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylu 4-pirydynylo fosforan(V) 153dAN. Wydajność 40%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (DMSO) 8.59 (m, 1H, ArH), 8.28 (m, 1H, ArH), 7.71 (s, 1H, 6-H), 7.44-7.39 (m, 2H, ArH), 7.32-7.14 (m, 4H, ArH), 7.04-6.92 (m, 1H, ArH), 6.17-6.09 (m, 1H, 1'-H), 4.59-4.37 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.06-3.95 (m, 2H, 3'-H & 4'-H), 2.51-2.21 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.74 & 1.66 (2s, 3H, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺ 501.1319, liczone dla C₂₁H₂₂N₆O₇P: 501.1288.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylu 2-pirydynylo fosforan(V) 153dAM. Wydajność 62%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl₃) 8.23 (m, 1H, ArH), 7.73 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, ArH), 7.44 (s, 1H, 6-H), 7.38-7.14 (m, 6H, ArH), 6.97-6.93 (m, 1H, ArH), 6.24 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.71-4.54 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.39 & 4.35 (2m, 1H, 4'-H), 4.07 (m, 1H, 3'-H), 2.44-2.2 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.74 & 1.72 (2s, 3H, 5-CH₃).

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 4-chlorofenylu 3-pirydynylo fosforan(V) 153dBH. Wydajność 65%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (DMSO) 8.52 (m, 1H, ArH), 8.47 (m, 1H, ArH), 7.73-7.69 (m, 1H, 6-H), 7.50-7.46 (m, 3H, ArH), 7.43-7.42 (m, 1H, ArH), 7.37-7.29 (m, 2H, ArH), 6.15 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.62-4.46 (m, 3H, 5',5''-H₂ & 4'-H), 4.08-4.04 (m, 1H, 3'-H), 2.45-2.30 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.65 (s, 3H, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺ 535.0891, liczone dla C₂₁H₂₁N₆O₇P: 535.0898.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 4-bromofenylu 3-pirydynylo fosforan(V) 153dCH. Wydajność 52%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl₃) 8.58-8.48 (m, 2H, ArH), 7.60-7.55 (m, 1H, 6-H), 7.50-7.43 (m, 2H, ArH), 7.35-7.23 (m, 1H, ArH), 7.21-20 (m, 1H, ArH), 7.13-7.08 (m, 2H, ArH), 6.15 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 4.61-4.44 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.35-4.28 (m, 1H, 4'-H), 4.08-4.03 (m, 1H, 3'-H), 2.51-2.32 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.64 (s, 3H, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺ 581.0376, liczone dla C₂₁H₂₁N₆O₇PBr: 581.0372.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 4-cyjanofenylu 3-pirydynylo fosforan(V) 153dDH. Wydajność 75%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl₃) 8.55 (s, 1H, ArH), 7.71-7.65 (m, 2H, ArH), 7.61-7.57 (m, 1H, 6-H), 7.37-7.33 (m, 4H, ArH), 7.17 and 7.16 (m, 1H, ArH), 6.10-6.05 (dd, $J = 6.4$ Hz, 1'-H), 4.61-4.49 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.37-4.30 (m, 1H, 4'-H), 4.07-4.04 (m, 1H, 3'-H), 2.49-2.45 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.83 & 1.82 (2d, $J = 1.2$ Hz, 3H, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺ 526.1226, liczone dla C₂₂H₂₁N₇O₇P: 526.1240.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 4-cyjanofenylu 3-pirydynylo fosforan(V) 153dEH. Wydajność 77%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl₃) 8.60-8.52 (m, 2H, ArH), 7.63-7.59 (m, 1H, 6-H), 7.46-

First paragraph of text, containing several lines of faint, illegible characters.

Second paragraph of text, continuing the faint, illegible content.

Third paragraph of text, with faint, illegible characters.

Fourth paragraph of text, containing faint, illegible text.

Fifth paragraph of text, with faint, illegible characters.

Sixth paragraph of text, containing faint, illegible text.

Seventh paragraph of text, with faint, illegible characters.

7.44 (m, 1H, ArH), 7.36 (s, 1H, ArH), 7.34–7.33 (m, 1H, ArH), 7.26–7.21 (m, 2H, ArH), 6.17–6.13 (m, 1H, 1'-H), 4.66–4.61 (m, 1H, 5'- lub 5''-H), 4.58–4.50 (m, 1H, 5'- lub 5''-H), 4.36–4.31 (m, 1H, 4'-H), 4.08–4.07 (m, 1H, 3'-H), 2.50–2.35 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.84 & 1.82 (2d, 3H, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺ 569.0489, liczone dla C₂₁H₂₀N₆O₇P: 569.0508.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 3-pirydynylo rezorcynylo fosforan(V) 153dGH.

Wydajność 73%. ¹H NMR, δ_H (DMSO) 8.49–8.46 (m, 1H, ArH), 7.71–7.66 (m, 1H, 6-H), 7.49–7.41 (m, 2H, ArH), 7.36 (m, 1H, ArH), 7.21–7.15 (m, 1H, ArH), 6.67–6.65 (m, 3H, ArH), 6.14 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, 1'-H), 4.60–4.46 (m, 3H, 5',5''-H₂ & 4'-H), 4.06 (k, *J* = 3.9 Hz, 1H, 3'-H), 2.45–2.29 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.65 (s, 3H, CH₃).

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 4-pirydynylo rezorcynylo fosforan(V) 153dGN.

Wydajność 56%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.59–8.55 (m, 2H, ArH), 7.36 (s, 1H, 6-H), 7.22 (m, 1H, ArH), 7.20–7.19 (m, 2H, ArH), 6.76–6.65 (m, 3H, ArH), 6.12 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, 1'-H), 4.57–4.46 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.35–4.31 (m, 1H, 4'-H), 4.04 (m, 1H, 3'-H), 2.48–2.39 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.79 (s, 3H, CH₃).

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylu 2-chloro-3-pirydynylo fosforan(V) 153dAI.

Wydajność 54%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.32–8.30 (m, 1H, ArH), 7.90 & 7.87 (2s, 1H, ArH), 7.52–7.39 (m, 4H, ArH, 6-H), 7.30–7.25 (m, 3H, ArH), 6.17–6.12 (m, *J* = 6.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.67–4.47 (m, 3H, 5',5''-H₂ & 4'-H), 4.11–4.05 (m, 1H, 3'-H), 2.48–2.30 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.66 (s, 3H, CH₃). HRMS [MH]⁺ 535.0906, liczone dla C₂₁H₂₂N₆O₇PCl: 535.0898.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylu 5-chloro-3-pirydynylo fosforan(V) 153dAJ.

Wydajność 71%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.47–8.40 (m, 2H, ArH), 7.64–7.61 (m, *J* = 1.2 Hz, 1H, 6-H), 7.41–7.31 (m, 2H, ArH), 7.28–7.18 (m, 4H, ArH), 6.18–6.13 (2t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.62–4.45 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.34–4.27 (m, 1H, 4'-H), 4.08–4.03 (m, 1H, 3'-H), 2.50–2.30 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.81 & 1.80 (2d, *J* = 1.2 Hz, 3H, CH₃). HRMS [MH]⁺ 535.0882, liczone dla C₂₁H₂₁N₆O₇PCl: 535.0898.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylu 2-metylo-3-pirydynylo fosforan(V) 153dAK.

Wydajność 64%. ¹H NMR, δ_H (DMSO) 8.32 & 8.31 (2d, *J* = 4.5 Hz, 1H, ArH), 7.66 & 7.63 (2s, 1H, 6-H), 7.45–7.38 (m, 3H, ArH), 7.30–7.23 (m, 4H, ArH), 6.15 & 6.14 (2t, *J* = 6.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.61–4.45 (m, 3H, 5',5''-H₂ & 4'-H), 4.10–4.04 (m, 1H, 3'-H), 2.44–2.30 (m, 2H, 2',2''-H₂), 2.36 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.65 (s, 3H, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺ 515.1455, liczone dla C₂₂H₂₄N₆O₇P: 515.1444.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fenylu 6-metylo-3-pirydynylo fosforan(V) 153dAL.

Wydajność 71%. ¹H NMR, δ_H (DMSO) 8.35 (br s, 1H, ArH), 7.60–7.54 (m, 1H, 6-H), 7.45–7.39 (m, 3H, ArH), 7.30–7.24 (m, 4H, ArH), 6.15 (t, *J* = 6.6 Hz, 1'-H), 4.60–4.46 (m, 3H, 5',5''-H₂ &

4'-H), 4.06 (m, 1H, 3'-H), 2.44 & 2.43 (2s, 3H, Ar-CH₃), 2.41-2.22 (m, 2H, 2',2''-H₂) 1.65 (s, 3H, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺ 515.1454, liczone dla C₂₂H₂₄N₆O₇P: 515.1444.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo bis-2-metylo-3-pirydynylo fosforan(V) 153dKK. Wydajność 62%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.38 (m, 2H, ArH), 7.62–7.58 (m, 2H, ArH), 7.19 (br s, 1H, 6-H), 7.17–7.10 (m, 2H, ArH), 6.09 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.60–4.46 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.33–4.27 (m, 1H, 4'-H), 4.08–4.03 (m, 1H, 3'-H), 2.52 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.50 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.47–2.40 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.83 (s, 3H, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺ 530.1571, liczone dla C₂₂H₂₅N₇O₇P: 530.1553.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo bis-6-metylo-3-pirydynylo fosforan(V) 153dLL. Wydajność 80%. ¹H NMR, δ_H (DMSO) 8.34 (br s, 2H, ArH), 7.63–7.57 (m, 2H, ArH), 7.37 (s, 1H, 6-H), 7.30 & 7.27 (2d, *J* = 8.9 Hz, 2H, ArH), 6.14 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.62–4.46 (m, 3H, 5',5''-H₂ & 4'-H), 4.08–4.04 (m, 1H, 3'-H), 2.45 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.44 (s, 3H, Ar-CH₃), 2.42–2.31 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.63 (s, 3H, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺ 530.1534, liczone dla C₂₂H₂₅N₇O₇P: 530.1553.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 3-pirydynylo 4-pirydynylo fosforan(V) 153dHN. Wydajność 30%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.62 (m, 2H, ArH), 8.56 & 8.51 (2m, 1H, ArH), 7.62–7.56 (m, 1H, 6-H), 7.36–7.29 (m, 1H, ArH), 7.22–7.17 (m, 3H, ArH), 6.15 (m, 1H, 1'-H), 4.63–4.47 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.37–4.29 (m, 1H, 4'-H), 4.09–4.02 (m, 1H, 3'-H), 2.47–2.42 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.84 & 1.83 (2s, 3H, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺ 502.1248, liczone dla C₂₀H₂₁N₇O₇P: 502.1240.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo bis-3-pirydynylo fosforan(V) 153dHH. Wydajność 68%. ¹H NMR, δ_H (DMSO) 8.55 (m, 2H, ArH), 8.47 (m, 2H, ArH), 7.76 & 7.74 (2m, 2H, ArH, 6-H), 7.51–7.41 (m, 3H, ArH), 6.15 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.67–4.48 (m, 3H, 5',5''-H₂ & 4'-H), 4.09–4.05 (m, 1H, 3'-H), 2.45–2.30 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.65 (s, 3H, 5-CH₃). HRMS [MH]⁺ 502.1253, liczone dla C₂₀H₂₁N₇O₇P: 502.1240.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 2-pirydynylo 3-pirydynylo fosforan(V) 153dHM. Wydajność 72%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.61 (br s, 1H, ArH), 8.49 (m, 1H, ArH), 8.26-8.21 (m, 1H, ArH), 7.81–7.75 (m, 1H, ArH), 7.72-7.68 (m, 1H, ArH), 7.43 (s, 1H, 6-H), 7.37-7.3 (m, 1H, ArH), 7.21 (m, 1H, ArH), 6.98-6.96 (, 1H, ArH), 6.23 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.77–4.39 (m, 3H, 5',5''-H₂ & 4'-H), 4.11 (m, 1H, 3'-H), 2.49–2.31 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.79 & 1.79 (2d, *J* = 0.9 Hz, 3H, 5-CH₃).

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo bis-2-pirydynylo fosforan(V) 153dMM. Wydajność 63%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.26 (m, 2H, ArH), 7.78 (m, 2H, ArH), 7.55 (q, 1H, *J* = 0.9 Hz, 6-H), 7.19 (m, 2H, ArH), 7.09-7.06 (m, 2H, ArH), 6.29 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.8–4.77 (m, 2H,

The first part of the paper discusses the general theory of the firm, focusing on the relationship between the firm's production function and its cost function. It shows how the firm's cost function is derived from its production function and how the firm's cost function is affected by changes in the firm's technology. The second part of the paper discusses the firm's cost function in more detail, focusing on the relationship between the firm's cost function and its production function. It shows how the firm's cost function is affected by changes in the firm's technology and how the firm's cost function is affected by changes in the firm's input prices.

The third part of the paper discusses the firm's cost function in more detail, focusing on the relationship between the firm's cost function and its production function. It shows how the firm's cost function is affected by changes in the firm's technology and how the firm's cost function is affected by changes in the firm's input prices. The fourth part of the paper discusses the firm's cost function in more detail, focusing on the relationship between the firm's cost function and its production function. It shows how the firm's cost function is affected by changes in the firm's technology and how the firm's cost function is affected by changes in the firm's input prices.

The fifth part of the paper discusses the firm's cost function in more detail, focusing on the relationship between the firm's cost function and its production function. It shows how the firm's cost function is affected by changes in the firm's technology and how the firm's cost function is affected by changes in the firm's input prices. The sixth part of the paper discusses the firm's cost function in more detail, focusing on the relationship between the firm's cost function and its production function. It shows how the firm's cost function is affected by changes in the firm's technology and how the firm's cost function is affected by changes in the firm's input prices.

The seventh part of the paper discusses the firm's cost function in more detail, focusing on the relationship between the firm's cost function and its production function. It shows how the firm's cost function is affected by changes in the firm's technology and how the firm's cost function is affected by changes in the firm's input prices. The eighth part of the paper discusses the firm's cost function in more detail, focusing on the relationship between the firm's cost function and its production function. It shows how the firm's cost function is affected by changes in the firm's technology and how the firm's cost function is affected by changes in the firm's input prices.

The ninth part of the paper discusses the firm's cost function in more detail, focusing on the relationship between the firm's cost function and its production function. It shows how the firm's cost function is affected by changes in the firm's technology and how the firm's cost function is affected by changes in the firm's input prices. The tenth part of the paper discusses the firm's cost function in more detail, focusing on the relationship between the firm's cost function and its production function. It shows how the firm's cost function is affected by changes in the firm's technology and how the firm's cost function is affected by changes in the firm's input prices.

5',5''-H₂), 4.61-4.56 (m, 1H, 4'-H), 4.16 (m, 1H, 3'-H), 2.43-2.38 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.72 (s, 3H, 5-CH₃).

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 2-pirydynylo 4-pirydynylo fosforan(V) 153dMN. Wydajność 48%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.54 (m, 2H, ArH), 8.17 (m, 1H, ArH), 7.67-7.54 (m, 2H, ArH, 6-H), 7.32-7.20 (m, 3H, ArH), 6.97 (m, 1H, ArH), 6.17 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.70-4.61 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.43 (m, 1H, 4'-H), 4.14 (m, 1H, 3'-H), 2.48-2.34 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.78 (s, 3H, 5-CH₃).

2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo fenyllo 3-pirydynylo fosforan(V) 153cAH. Wydajność 56%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃), 8.54 (br s, 1H, ArH), 8.49-8.47 (m, 1H, ArH), 7.61-7.56 (m, 1H, ArH), 7.51 & 7.49 (2d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 6-H), 7.40-7.18 (m, 6H, ArH), 6.07-6.03 (m, 1H, 1'-H), 5.57 & 5.56 (2d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 5-H), 4.57-4.50 (m, 1H, 4'-H), 4.43-4.28 (m, 2H, 5',5''-H₂), 2.46-2.35 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 2.16-1.85 (m, 3H, 3'- lub 3''-H & 2',2''-H₂). HRMS [MH]⁺ 446.1136, liczone dla C₂₀H₂₁N₃O₇P: 446.1117.

2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo fenyllo 4-pirydynylo fosforan(V) 153cAN. Wydajność 49%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃), 8.56 (br s, 2H, ArH), 7.51 & 7.48 (2d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 6-H), 7.40-7.32 (m, 2H, ArH), 7.26-7.16 (m, 5H, ArH), 6.07-6.03 (m, 1H, 1'-H), 5.58 & 5.57 (2d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 5-H), 4.58-4.50 (m, 1H, 4'-H), 4.43-4.28 (m, 2H, 5',5''-H₂), 2.47-2.34 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 2.13-1.87 (m, 3H, 3'- lub 3''-H & 2',2''-H₂). HRMS [MH]⁺ 446.1106, liczone dla C₂₀H₂₁N₃O₇P: 446.1117.

2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo 3-pirydynylo rezorcynylo fosforan(V) 153cGH. Wydajność 56%. ¹H NMR, δ_H (DMSO), 8.51-8.47 (m, 1H, ArH), 7.72-7.68 (2d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 6-H), 7.57-7.53 (m, 1H, ArH), 7.50-7.45 (m, 1H, ArH), 7.36 (m, 1H, ArH), 7.21-7.16 (m, 1H, ArH), 6.68-6.65 (m, 3H, ArH), 6.02-5.98 (m, 1H, 1'-H), 5.48-5.45 (2d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 5-H), 4.53-4.38 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.24 (m, 1H, 4'-H), 2.32-2.22 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 2.08-1.76 (m, 3H, 3'- lub 3''-H & 2',2''-H₂).

2',3'-dideoksyurydyn-5'-ylo 3-pirydynylo 4-pirydynylo fosforan(V) 153cHN. Wydajność 32%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃), 8.54 (br s, 1H, ArH), 8.22-8.11 (m, 3H, ArH), 7.72 & 7.71 (2d, *J* = 6.0, 1H, ArH), 7.53 and 7.52 (2d, *J* = 6.0 Hz, ArH), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 6-H), 7.20-7.14 (m, 2H, ArH), 6.04 & 6.02 (2d, *J* = 6.8 Hz, 1H, 1'-H), 5.61 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 5-H), 4.57-4.52 (m, 1H, 4'- lub 5'- lub 5''-H), 4.45-4.39 (m, 1H, 4'- lub 5'- lub 5''-H), 4.24-4.19 (m, 1H, 4'- lub 5'- lub 5''-H), 2.49-2.40 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 2.36-2.27 (m, 1H, 3'- lub 3''-H), 2.11-1.99 (m, 2H, 2',2''-H₂). HRMS [MH]⁺ 447.1059, liczone dla C₁₉H₂₀N₄O₇P: 447.1070.

2',3'-dideoksyadenozyn-5'-ylo fenyllo 3-pirydynylo fosforan(V) 153bAH. Wydajność 94%. ¹H NMR, δ_H (DMSO), 8.44 (br s, 1H, ArH), 8.43 (m, 1H, ArH), 8.27 (2s, 1H, 8-H), 8.13

The first part of the book is devoted to a study of the history of the concept of the state. It begins with a discussion of the ancient Greek and Roman conceptions of the state, and then moves on to the medieval and modern periods. The author argues that the concept of the state has evolved over time, and that it is now a central concept in political theory and practice.

The second part of the book is devoted to a study of the history of the concept of the nation. It begins with a discussion of the ancient Greek and Roman conceptions of the nation, and then moves on to the medieval and modern periods. The author argues that the concept of the nation has evolved over time, and that it is now a central concept in political theory and practice.

The third part of the book is devoted to a study of the history of the concept of the citizen. It begins with a discussion of the ancient Greek and Roman conceptions of the citizen, and then moves on to the medieval and modern periods. The author argues that the concept of the citizen has evolved over time, and that it is now a central concept in political theory and practice.

The fourth part of the book is devoted to a study of the history of the concept of the individual. It begins with a discussion of the ancient Greek and Roman conceptions of the individual, and then moves on to the medieval and modern periods. The author argues that the concept of the individual has evolved over time, and that it is now a central concept in political theory and practice.

The fifth part of the book is devoted to a study of the history of the concept of the community. It begins with a discussion of the ancient Greek and Roman conceptions of the community, and then moves on to the medieval and modern periods. The author argues that the concept of the community has evolved over time, and that it is now a central concept in political theory and practice.

(2s, 1H, 2-H), 7.65–7.60 (m, 1H, ArH), 7.41–7.13 (m, 6H, ArH), 6.29–6.25 (m, 1H, 1'-H), 4.52–4.45 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.44–4.36 (m, 1H, 1'-H), 2.55–2.42 (m, 2H, 3',3''-H₂), 2.19–2.12 (m, 2H, 2',2''-H₂). HRMS [MH]⁺ 469.1372, liczone dla C₂₁H₂₂N₆O₅P: 469.1390.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo bis-fenylo fosforan(V) 153dAA. Wydajność 92%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃), 7.35–7.25 (m, 6H, ArH, 6-H), 7.19 (m, 5H, ArH), 6.20 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, 1'-H), 4.53 (m, 1H, 5'- lub 5''-H), 4.47–4.45 (m, 1H, 5'- lub 5''-H), 4.25 (m, 1H, 4'-H), 4.04 (m, 1H, 3'-H), 2.41–2.37 (m, 1H, 2'-lub 2''-H), 2.24–2.17 (m, 1H, 2'- lub 2''-H), 1.76 (s, 3H, 5-CH₃).

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo bis-4-nitrofenylo fosforan(V) 153dFF. Wydajność 73%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃), 8.25 (t, *J* = 8 Hz, 4H, ArH), 7.39 (t, *J* = 8 Hz, 4H, ArH), 7.14 (m, 1H, 6-H), 6.02 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H, 1'-H), 4.60–4.54 (m, 2H, 5',5''-H₂), 4.37–4.35 (m, 1H, 4'-H), 4.07 (m, 1H, 3'-H), 2.54–2.45 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.85 (s, 3H, 5-CH₃).

Ogólna procedura otrzymywania diarylo dinukleozydo rezorcynylo difosforanotriestrów typu 168 i 169.

H-fosfonian AZT **159d** (2.5 ekw. mol.) i rezorcynol **160G** (1 ekw. mol.) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną. Następnie rozpuściłam w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (90:10 v/v; 0.1 mmol/ml) i dodałam chlorofosforan difenyłowy (2.2 ekw. mol.). Po utworzeniu się di-H-fosfonianodiestru **170** (10 min., ³¹P NMR) do mieszaniny reakcyjnej dodałam osuszony przez odparowanie z bezwodną pirydyną odpowiedni pirydynol (10 ekw. mol.), a następnie jod (5 ekw. mol.) rozpuszczony w niewielkiej ilości pirydyny. Po zakończeniu reakcji (ok. 3 min. ³¹P NMR) nadmiar jodu rozłożyłam dodając niewielką ilość etanotolu i odparowałam rozpuszczalniki. Pozostałość rozpuściłam w chlorku metylenu i dwukrotnie przemyłam wodnym 0.1 M roztworem KH₂PO₄ (pH = 6). Fazę organiczną osuszyłam nad bezw. Na₂SO₄, a po odparowaniu rozpuszczalnika, pożądane produkty **168** i **169** izolowałam na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym stosując liniowy gradient 2-propanolu (0–12%) w chlorku metylenu. Frakcje zawierający czysty produkt reakcji zateżałam i liofilizowałam z benzenu otrzymując białe proszki.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 3-[3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 3-pirydynylo fosforano(V)]fenylo 3-pirydynylo fosforan(V) 168. Wydajność 75%. ¹H NMR, δ_H (CDCl₃) 8.50 (m, 2H, ArH), 8.08 (s, 1H, ArH), 7.72–7.69 (m, 2H, 6-H), 7.41–7.05 (m, 9H, ArH), 6.06–5.94 (m, 2H, 1'-H), 4.56 (m, 4H, 5',5''-H₂), 4.46–4.42 (m, 2H, 3'-H), 4.06 (m, 2H, 4'-H), 2.65–2.43 (m, 4H, 2',2''-H₂), 1.82–1.80 (m, 6H, 5-CH₃). MALDI TOF [M-H]⁺ *m/z* 920.156, liczone dla C₃₆H₃₆N₁₂O₁₄P₂: 922.69.



3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 3-[3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 4-pirydynylo fosforano(V)]fenylo 4-pirydynylo fosforan(V) 169. Wydajność 68%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3) 8.60 (m, 4H, ArH), 7.36 (s, 2H, 6-H), 7.20-7.18 (m, 4H, ArH), 7.13-7.11 (m, 3H, ArH), 7.07 (m, 1H, ArH), 6.05-5.92 (m, 2H, 1'-H), 4.57-4.35 (m, 6H, 5',5''-H₂ & 3'-H), 4.07-4.04 (m, 2H, 4'-H), 2.68-2.37 (m, 4H, 2',2''-H₂), 1.83-1.78 (2q, $J = 0.9$ Hz, 6H, 5-CH₃).

Otrzymywanie 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 3-[3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo fosforano(V)]fenylo fosforanu(V) 171 sól trietyloamoniowa.

H-fosfonian AZT **159d** (2.5 ekw. mol.) i rezorcynol **160G** (1 ekw. mol.) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną, rozpuściłam w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (90:10 v/v; 0.1 mmol/ml) i dodałam chlorek piwaloilu (3 ekw. mol.). Po wygenerowaniu di-H-fosfonianodiestu **170** (10 min., $^{31}\text{P NMR}$) dodałam jod (1.5 ekw. mol.) rozpuszczony w bezwodnej pirydynie (1 ml), a następnie wodę. Po zakończeniu reakcji (ok. 3 min. $^{31}\text{P NMR}$) nadmiar jodu rozłożyłam niewielką ilością etanotolu, odparowałam rozpuszczalniki, a pozostałość naniosałam na kolumnę wypełnioną żelem krzemionkowym. Dinukleozydowy difosforanodiester **171** wymywałam stosując liniowy gradient 2-propanolu (0-30%) w chlorku metylenu z dodatkiem trietyloaminy (5% objętościowych). Frakcje zawierające czysty produkt odparowałam otrzymując białą, higroskopijną pianę. Wydajność 78%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3) 7.76 (s, 2H, 6-H), 7.06 (t, $J = 8$ Hz, 1H, ArH), 6.98 (br s, 1H, ArH), 6.79 (d, $J = 8$ Hz, 2H, ArH), 6.11 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, 1'-H), 4.27 (br s, 2H, 4'-H) 3.98-3.92 (m, 6H, 5',5''-H₂ & 3'-H), 2.99 (q, $J = 7.2$ Hz, 12H, CH₂CH₃), 2.37 & 2.25 (2m, 4H, 2',2''-H₂), 1.77 (s, 6H, 5-CH₃), 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 18H, CH₂CH₃). MALDI TOF $[\text{M}-2\text{Et}_3\text{NH}^+]^-$ m/z 766.43, liczone dla C₂₆H₂₈N₁₀O₁₄P₂: 766.51.

Otrzymywanie 3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 3-[3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 3-pirydynylo fosforano(V)]fenylo fosforanu(V) 172 sól trietyloamoniowa.

H-fosfonian AZT **159d** (1.3 ekw. mol.) i 3-pirydynylo rezorcynylo fosforanotriester AZT **153dGH** (1 ekw. mol.) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną, rozpuściłam w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (90:10 v/v; 0.1 mmol/ml) i dodałam chlorek piwaloilu (1.5 ekw. mol.). Następnie do wygenerowanego dinukleozydowego H-fosfoniano-fosforanu **173** dodałam jod (1.5 ekw. mol.) rozpuszczony w niewielkiej ilości pirydyny i po ok. 20 sekundach wodę. Po zakończeniu reakcji (ok. 3 min. $^{31}\text{P NMR}$) nadmiar jodu rozłożyłam etanotolem i odparowałam rozpuszczalniki. Produkt izolowałam na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym stosując liniowy gradient wody (0-5%) w 2-propanolu z dodatkiem trietyloaminy (3% objętościowych) lub na kolumnie wypełnionej żelem silanizowanym (faza

The first part of the paper discusses the theoretical background of the study, focusing on the role of the state in the development of the economy. It examines the impact of government intervention on the growth process, particularly in the context of developing countries. The author argues that a strong state is essential for the successful implementation of development policies.

The second part of the paper presents the empirical analysis. It uses a series of regression models to test the hypotheses derived from the theoretical framework. The data shows a positive relationship between government expenditure and economic growth, supporting the author's argument that state intervention is beneficial for development.

The third part of the paper discusses the policy implications of the findings. It suggests that governments in developing countries should continue to invest in infrastructure and social services to promote long-term growth. The author also notes the importance of maintaining macroeconomic stability to ensure the effectiveness of these policies.

The fourth part of the paper concludes the study by summarizing the main findings and suggesting areas for further research. It emphasizes the need for a balanced approach to state intervention, one that supports growth without leading to excessive bureaucracy or corruption.

The fifth part of the paper provides a detailed discussion of the methodology used in the study. It describes the data sources, the econometric models, and the statistical tests used to analyze the data. The author explains the limitations of the study and the potential sources of bias.

The sixth part of the paper discusses the broader context of the study, including the role of the state in the global economy. It compares the findings of this study with those of other research on state intervention and economic growth, highlighting the unique aspects of the current study.

The seventh part of the paper provides a detailed discussion of the policy implications of the findings. It suggests that governments in developing countries should continue to invest in infrastructure and social services to promote long-term growth. The author also notes the importance of maintaining macroeconomic stability to ensure the effectiveness of these policies.

The eighth part of the paper concludes the study by summarizing the main findings and suggesting areas for further research. It emphasizes the need for a balanced approach to state intervention, one that supports growth without leading to excessive bureaucracy or corruption.

The ninth part of the paper provides a detailed discussion of the methodology used in the study. It describes the data sources, the econometric models, and the statistical tests used to analyze the data. The author explains the limitations of the study and the potential sources of bias.

odwrócona), stosując liniowy gradient acetonu (0-12%) w wodzie. Frakcje zawierające czysty związek **172** zateżałam i liofilizowałam z benzenu. Wydajność 80%. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3) 5.52 (s, 1H, ArH), 8.47-8.45 (m, 1H, ArH), 7.68 (m, 1H, 6-H), 7.61 (m, 1H, 6-H), 7.36-7.08 (m, 5H, ArH), 6.89 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, ArH), 6.27-6.21 (dd, $J = 6.3$ Hz, 1H, 1'-H), 5.97-5.92 (m, 1H, 1'-H), 4.59-4.34 (m, 4H, 5',5''-H₂), 4.25-4.18 (m, 2H, 4'-H), 4.08-4.00 (m, 2H, 3'-H), 3.06 (q, $J = 7.2$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.62-2.31 (m, 4H, 2',2''-H₂), 1.87 (s, 3H, 5- CH_3), 1.80 (s, 3H, 5- CH_3), 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H CH_2CH_3). MALDI TOF $[\text{M-H-Et}_3\text{NH}^+]$ m/z 843.48, liczone dla $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_{11}\text{O}_{14}\text{P}_2$: 844.16.

Ogólna procedura otrzymywania arylo nukleozydo amidofosforanodiestrów (174** – **177**)**

- Metoda I (dotyczy **174, **175**, **176**)**

3-pirydynylowy fosforanodiester AZT **162dH** i odpowiednią aminopirydynę (3 ekw. mol.) osuszyłam przez odparowanie z bezwodną pirydyną. Następnie rozpuściłam oba reagenty w chlorku metylenu z N-metyloimidazolem (9:1 v/v; 0.1 mmol/1ml) i dodałam TPSCl (3 ekw. mol.). Po zakończeniu reakcji (ok. 30 min., TLC- faza A, $^{31}\text{P NMR}$) mieszaninę reakcyjną rozcieńczyłam chlorkiem metylenu i przemyłam wodą (2 razy). Fazę organiczną osuszyłam nad bezwodnym Na_2SO_4 i odparowałam do sucha. Produkty oczyszczałam na kolumnie z żelem krzemionkowym stosując liniowy gradient 2-propanolu (0-20%) w chlorku metylenu, lub na kolumnie z żelem silanizowanym (faza odwrócona) stosując gradient acetonu (0-25%) w wodzie. Frakcje zawierające czysty amidofosforanodiestry zateżyłam i liofilizowałam z benzenu.

- Metoda II (dotyczy **174, **175**, **176**, **177**)**

H-fosfonian AZT i odpowiednią aminopirydynę (1.5 ekw. mol.) osuszyłam przez odparowanie z pirydyną. Następnie rozpuściłam substraty w mieszaninie chlorku metylenu z pirydyną (9:1 v/v; 0.1 mmol/1ml) i dodałam DPCP (1.2 ekw. mol.). W przypadku syntezy **177** do osuszonego i rozpuszczonego w rozpuszczalnikach, jak opisałam wyżej, H-fosfonianu dodałam N-izopropylaminę i DPCP stosując analogiczne nadmiary reagentów. Po zakończeniu kondensacji (ok. 20 min., $^{31}\text{P NMR}$) mieszaninę reakcyjną przenieśliam do osuszonego przez odparowanie z pirydyną 3-pirydynolu (5 ekw. mol.), a następnie dodałam jod (1.5-2 ekw. mol.) rozpuszczony w niewielkiej ilości bezwodnej pirydyny. Po zakończeniu reakcji (ok. 3 min., $^{31}\text{P NMR}$) nadmiar jodu rozłożyłam etanotiolem i odparowałam rozpuszczalniki. Pozostałość rozpuściłam w chlorku metylenu i dwukrotnie przemyłam wodą. Fazę organiczną po oddzieleniu i wysuszeniu nad bezw. Na_2SO_4 odparowałam a oczyszczanie amidofosforanodiestrowych produktów przeprowadzałam według procedury opisanej w metodzie I.

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 3-pirydynylo (2-pirydynylo)amidofosforan(V) 174.

Wydajność 86%- metoda I, 72%- metoda II. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3) 8.50 (br s, 1H, ArH), 8.42-8.41 (m, 1H, ArH), 8.22 (m, 1H, ArH), 7.64-7.58 (m, 2H, ArH), 7.41 (m, 1H, 6-H), 7.28-7.24 (m, 1H, ArH), 7.01 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, ArH), 6.94 (m, 1H, ArH), 6.14 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.59-4.41 (m, 3H, 5',5''-H₂ & 4'-H), 4.10-4.05 (m, 1H, 3'-H), 2.48-2.40 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.78 & 1.76 (dd, $J = 1.2$ Hz, 3H, 5-CH₃).

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 3-pirydynylo (3-pirydynylo)amidofosforan(V) 175.

Wydajność: 91%- metoda I, 80%- metoda II. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3) 8.67 (br s, 1H, ArH), 8.54 (br s, 1H, ArH), 8.49 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H, ArH), 8.72 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H, ArH), 7.84 (m, 2H, ArH), 7.62-7.59 (m, 1H, ArH), 7.38 (m, 1H, 6-H), 7.20 (m, 1H, ArH), 6.01-5.93 (m, 1H, 1'-H), 4.49 (m, 3H, 5',5''-H₂ & 4'-H), 4.06 (m, 1H, 3'-H), 2.41-2.36 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.84 & 1.82 (2s, 3H, 5-CH₃).

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 3-pirydynylo (4-pirydynylo)amidofosforan(V) 176.

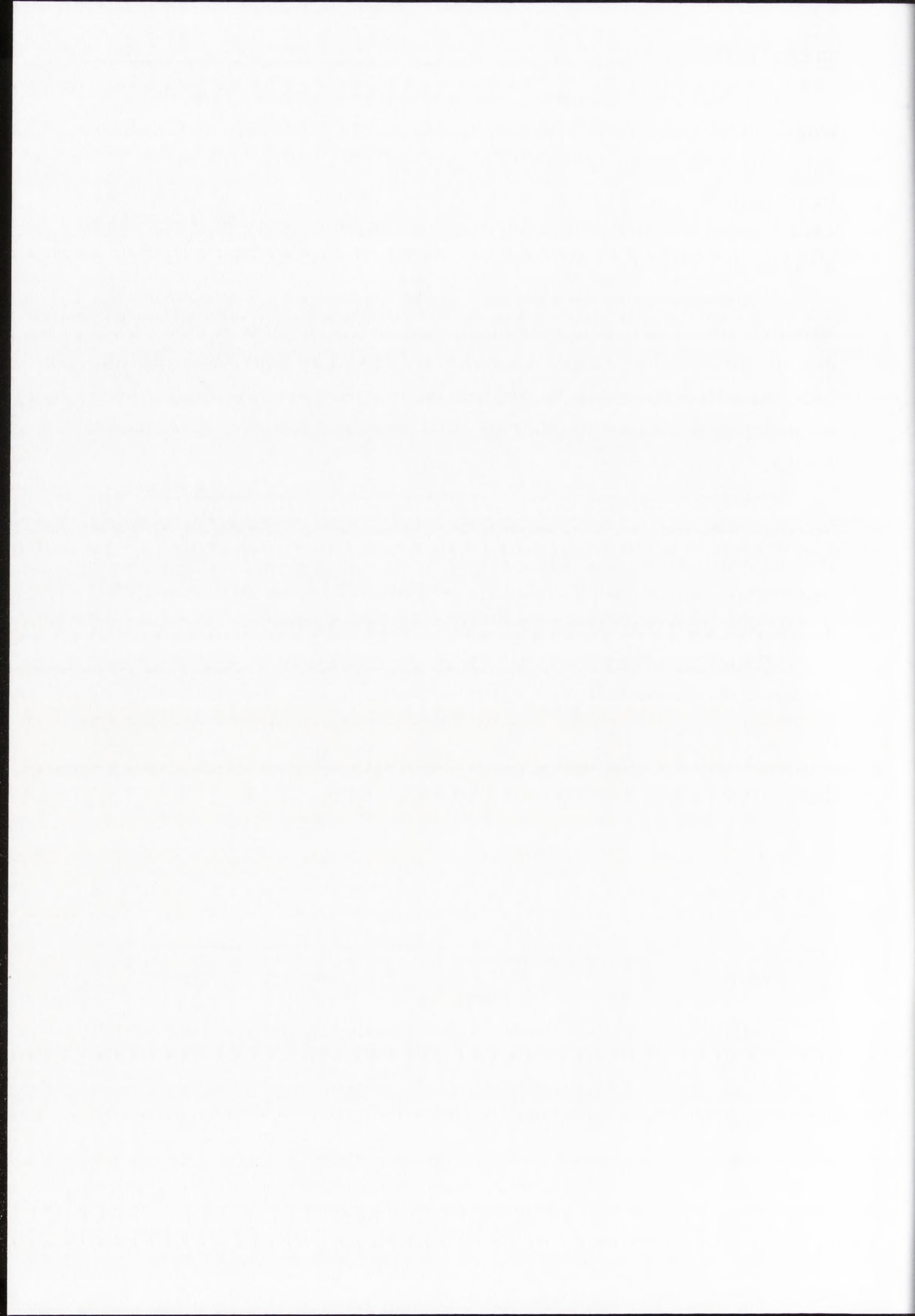
Wydajność: 65%- metoda I, 58%- metoda II. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3) 8.73 (br s, 1H, ArH), 8.55 (br s, 1H, ArH), 8.45 (br s, 2H, ArH), 7.74 (m, 1H, ArH), 7.59 (s, 1H, 6-H), 7.55-7.49 (m, 2H, ArH), 7.37 (m, 1H, ArH), 6.16 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.71-4.51 (m, 3H, 5',5''-H₂ & 4'-H), 4.22 (m, 1H, 3'-H), 2.78 & 2.53 (2m, 2H, 2',2''-H₂), 1.96 (s, 3H, 5-CH₃).

3'-azydo-3'-deoksytymidyn-5'-ylo 3-pirydynylo (izopropylo)amidofosforan(V) 177.

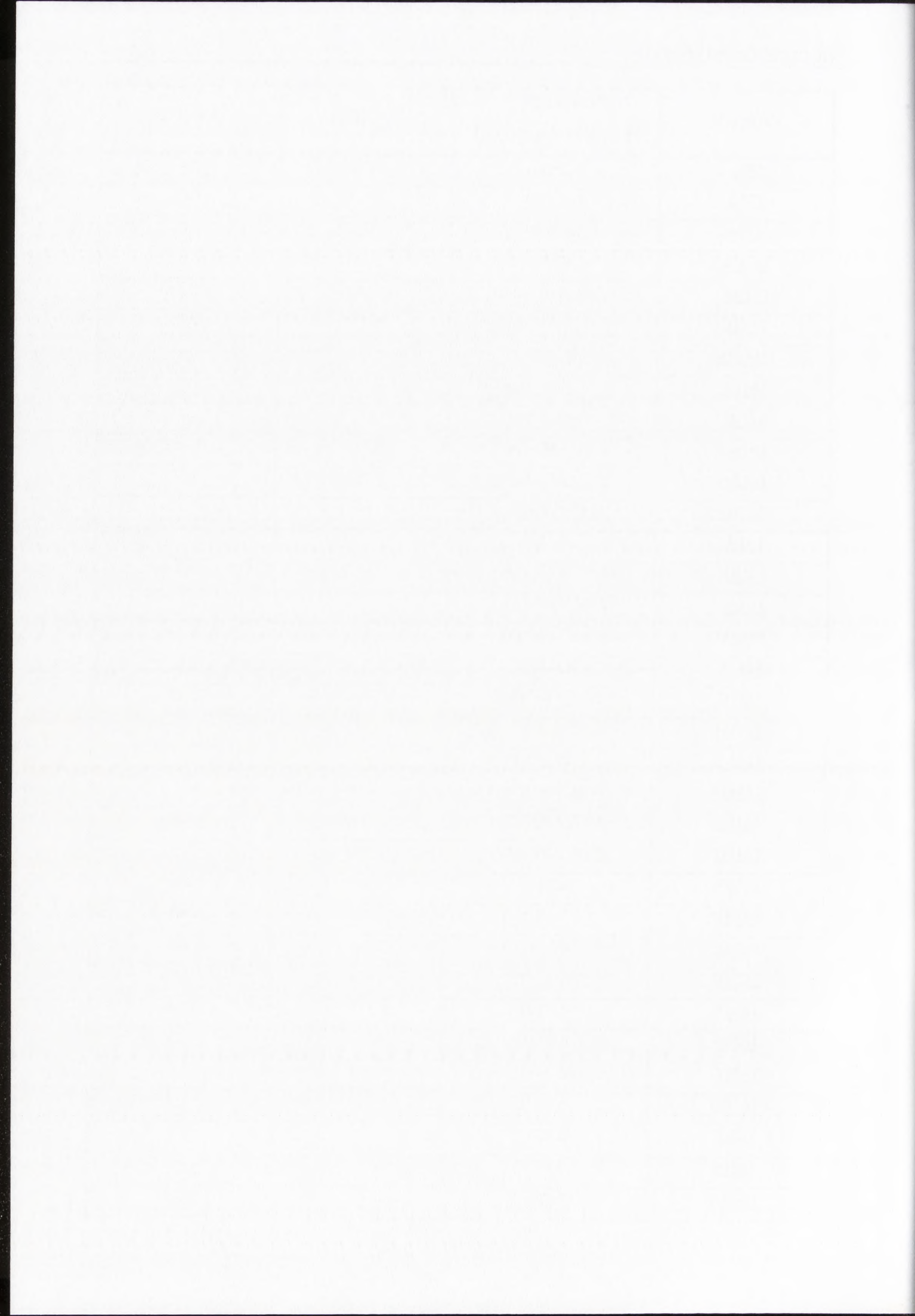
Wydajność: 68%- metoda II. $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3) 8.54 (m, 1H, ArH), 8.43 (m, 1H, ArH), 7.65 (q, $J = 0.9$ Hz, 1H, 6-H), 7.35-7.25 (m, 2H, ArH), 6.09 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, 1'-H), 4.38-4.30 (m, 3H, , 5',5''-H₂ & 4'-H), 4.05 (m, 1H, 3'-H), 3.03 (m, 1H, CHCH₃), 2.48-2.36 (m, 2H, 2',2''-H₂), 1.88 (q, $J = 0.9$ Hz, 3H, 5-CH₃), 1.18-1.13 (m, 6H, CHCH₃).

Tabela 6. Przesunięcia chemiczne i stałe sprzężeń $^{31}\text{P NMR}$ produktów pośrednich i końcowych

Związek	Przesunięcie chemiczne ¹ δ_{P} [ppm]	$^1J_{\text{PH}}$ [Hz]	$^3J_{\text{PH}}$ [Hz]
157	3.85 (dt)	613.4	7.3
158a	8.54, 8.09 ^a (2dm)	710.5	8.3
158b	8.65, 8.08 ^a (2dm)	711.5	8.3
158c	8.73, 8.14 ^a (2dm)	711.4	8.3
158d	8.62, 8.04 ^a (2dm)	711.4	8.3
159a	2.32 (dt)	601.6	7.3
159b	2.40 (dt)	617.2	6.4



Związek	Przesunięcie chemiczne ¹ δ_P [ppm]	$^1J_{PH}$ [Hz]	$^3J_{PH}$ [Hz]
<u>159c</u>	3.17 (dt)	615.4	6.4
<u>159d</u>	2.83 (dt)	616.3	6.4
<u>159e</u>	2.82 (dt)	613.6	6.4
<u>161dA</u>	5.31, 4.63 ^a (2dt)	722.6	8.3
<u>161dB</u>	5.362, 4.67 ^a (2dt)	721.3	8.2
<u>161dC</u>	5.21, 4.49 ^a (2dt)	731.2	8.7
<u>161dD</u>	4.75, 4.04 ^a		
<u>161dE</u>	4.71, 4.00 ^a (2dt)	741.8	8.7
<u>161dF</u>	4.64, 3.91		
<u>161dG</u>	5.28, 4.66 ^a (2dt)	720.4	8.25
<u>161dH</u>	5.53, 4.76 ^a (2dt)	735.8	8.7
<u>161dI</u>	4.71, 3.90 ^a		
<u>161dJ</u>	5.57, 4.68 ^a		
<u>161dK</u>	5.38, 4.61 ^a (2dt)	739.2	8.7
<u>161dL</u>	5.79, 5.00 ^a (2dt)		
<u>161dM</u>	3.36, 2.75 ^a (2dt)	740.3	8.24
<u>161cA</u>	5.31, 4.61 ^a		
<u>161cG</u>	5.24, 4.60 ^a (2dt)	722.5	8.25
<u>161cH</u>	5.65, 4.83 ^a		
<u>161bA</u>	5.22, 4.64 ^a		
<u>161bH</u>	5.60, 5.00 ^a (2dt)	725.7	8.2
<u>161eA</u>	5.52, 4.29 ^a (2dt)	723.4	8.24
<u>161eH</u>	5.84, 4.52 ^a (2dt)	734	
<u>162dA</u>	-5.83 (t)		6.4
<u>162dB</u>	-5.38 (t)		6.4
<u>162dC</u>	-5.53 (t)		6.4
<u>162dD</u>	-6.15 (t)		6.4
<u>162dE</u>	-5.88 (t)		6.4
<u>162dF</u>	6.99 (t)		5.5
<u>162dG</u>	-5.31 (t)		5.5
<u>162dH</u>	-6.09 (t)		6.4
<u>162dI</u>	-5.99 (t)		6.4
<u>162dJ</u>	-5.63 (t)		6.4
<u>162dK</u>	-5.23 (t)		6.4



Związek	Przesunięcie chemiczne ¹ δ_P [ppm]	¹ J_{PH} [Hz]	³ J_{PH} [Hz]
<u>162dL</u>	-5.46 (t)		6.4
<u>162dM</u>	-6.82 (t)		6
<u>162dN</u>	-6.27 (t)		5.5
<u>162cA</u>	-5.83 (t)		5.5
<u>162cG</u>	-5.71 (t)		5.5
<u>162cH</u>	-5.88 (t)		5.5
<u>162cN</u>	-6.03 (t)		5.5
<u>162bA</u>	-6.12 (t)		5.5
<u>162bH</u>	-6.09 (t)		5.5
<u>164dN</u>	-7.34, -7.55 (m)		
<u>164cN</u>	-6.98, -7.12 (m)		
<u>153eAH</u>	-11.54, -11.63 (2t)		7.3
<u>153eAJ</u>	-11.13, -11.38 (2t)		7.3
<u>153eHH</u>	-11.42 (t)		7.3
<u>153dAH</u>	-10.98, -11.03 (2t)		6.4
<u>153dAN</u>	-12.19 (m)		
<u>153dAM</u>	-12.61, -12.88 (2t)		6.4
<u>153dBH</u>	-11.12, -11.14 (m)		
<u>153dCH</u>	-11.86, -11.91 (2t)		6.4
<u>153dDH</u>	-12.52, -12.59 (2t)		6.4
<u>153dEH</u>	-12.20, -12.29 (m)		
<u>153dGH</u>	-12.05, 12.12 (2t)		6.4
<u>153dGN</u>	-13.04, 13.10 (2t)		7.3
<u>153dAI</u>	-12.18, -12.33 (2t)		7.2
<u>153dAJ</u>	-11.95, -12.02 (2t)		7.2
<u>153dAK</u>	-10.83, -10.85 (2t)		7.2
<u>153dAL</u>	-10.75, -10.84 (m)		
<u>153dKK</u>	-10.86 (t)		6.4
<u>153dLL</u>	-10.28 (t)		7.2
<u>153dHN</u>	-12.72, -12.75 (m)		
<u>153dHH</u>	-11.63 (t)		6.4
<u>153dHM</u>	-12.35, -12.59 (2t)		
<u>153dMM</u>	-13.56 (m)		
<u>153dMN</u>	-13.43, -13.75 (2t)		7.3

Związek	Przesunięcie chemiczne ¹ δ_P [ppm]	¹ J_{PH} [Hz]	³ J_{PH} [Hz]
<u>153cAH</u>	-11.49, -11.56 (2t)		8.2
<u>153cAN</u>	-12.59, -12.61 (m)		
<u>153cGH</u>	-11.76, -11.81 (2t)		6.4
<u>153cHN</u>	-12.47 (m)		
<u>153bAH</u>	-11.09, -11.14 (2t)		6.4
<u>153dAA</u>	-11.94 (t)		
<u>153dFF</u>	-13.76 (m)		
<u>168</u>	-12.19, -12.27 (2m)		
<u>169</u>	-13.05, -13.11 (2m)		
<u>170</u>	5.28, 4.59, 4.45 (4m)	734.6	8.25
<u>171</u>	-6.22 (t)		5.9
<u>172</u>	-5.60, -11.76, -11.82 (3m)		
<u>173</u>	5.11, 5.07, 4.58, 4.42, -12.05, -12.08 (4m, 2t)		
<u>174</u>	-2.23, -2.58 (2t)		6.4
<u>175</u>	-1.42, -1.54 (2t)		6.4
<u>176</u>	-2.95, -3.34 (2m)		
<u>177</u>	4.53, 4.27 (2m)		
<u>178</u>	8.47, 7.59 ^a (2dt)	667.14	7.3
<u>179</u>	7.55, 7.18 ^a (2dt)	650.64	8.1
<u>180</u>	6.62, 6.27 ^a (2dm)	652.86	
<u>181</u>	12.35, 12.28 ^a (2dm)	629.88	

¹ Przesunięcia chemiczne z widm wykonanych w CH₂Cl₂; ^a dwa diastereoizomery; dt- dublet trypletów; dm- dublet multipletów; t- tryplet; m- multiplet.

VIII. LITERATURA

1. Coffin, J. M., *Retroviridae: The Viruses and Their Replication*. In *Fields Virology*. Third Edition. Eds. Fields, B. N.; Knipe, D. M.; Howley, P. M. et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, **1996**, 1767-1847.
2. Collier, L.; Oxford, J., *Wirusologia. Podręcznik dla studentów medycyny, stomatologii i mikrobiologii*; Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, **1996**.
3. Poiesz, B. J.; Ruscetti, R. W.; Gazda, A. F.; Bunn, P. A.; Minna, J. D.; Gallo, R. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, *77*, 7415-7418.
4. Yoshida, M.; Miyoshi, I.; Hinuma, Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1982**, *79*, 2031-2035.
5. Kalyanaraman V. S.; Sarngadharan, M. G.; Robert-Guroff, M.; Miyoshi, I.; Golde, D.; Gallo, R. C., *Science*, **1982**, *218*, 571-573.
6. Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, G.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L., *Science*, **1983**, *220*, 868-871.
7. Gallo, R.; Salahuddin, S.; Popovic, M.; Shearer, G.; Kaplan, M.; Haynes, B.; Palker, T.; Redfield, R.; Oleske, J.; Safai, B., *Science*, **1984**, *224*, 500-503.
8. Letvin, N. L.; Daniel, M. D.; Sehgal, P. K., *Science*, **1985**, *230*, 71-73.
9. Coffin, J. M.; Haase, A.; Levy, J. A.; Montagnier, L.; Oroszlan, S.; Teich, N.; Temin, H.; Toyoshima, K.; Varmus, H.; Vogt, P. et al., *Science*, **1986**, *232*, 697.
10. Reeves, J. D.; Doms, R. W., *J. Gen. Virol.*, **2002**, *83*, 1253-1265.
11. Kurzyńska-Kokorniak, A.; Figlerowicz, M.; Jackowiak, P.; Figlerowicz, M., *Na pograniczu chemii i biologii*, **2004**, *10*, 384-400.
12. Gao, F.; Bailes, E.; Robertson, D. L.; Chen, Y.; Rodenburg, C. M.; Michael, S. F.; Cummins, L. B.; Arthur, L. O.; Peeters, M.; Shaw, G. M.; Sharp, P. M.; Hahn, B. H., *Nature*, **1999**, *397*, 436-441.
13. Sodroski, J.; Goh, W. C.; Rosen, C.; Campbell, K.; Haseltine, W. A., *Nature*, **1986**, *322*, 470-474.
14. Pope, M, Haase, A., *Nat. Med.*, **2003**, *9*, 847-852.
15. Lawn, S. D., *J. Infect. Dis.*, **2004**, *48*, 1-12.
16. Mitsuya, H.; Broder, S., *Nature*, **1987**, *325*, 773-778.
17. Buchbinder, S. P.; Katz, M. H.; Hessol, N. A.; O'Malley, P. M.; Holmberg, S. D., *Aids*, **1994**, *8*, 1123-1128.
18. Beral, V.; Peterman, T. A.; Berkelman, R. L.; Jaffe, H. V., *Lancet*, **1990**, *335*, 123-128.
19. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HIV_Virion-pl.svg
20. Luciw, P. A., *Human Immunodeficiency Viruses and Their Replication*. In *Fields Virology*. Third Edition. Eds. Fields, B. N.; Knipe, D. M.; Howley, P. M. et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, **1996**, 1881-1952.

1. The first part of the report deals with the general situation of the country and the position of the various groups of the population.

2. The second part deals with the economic situation and the development of the country.

3. The third part deals with the social situation and the development of the country.

4. The fourth part deals with the political situation and the development of the country.

5. The fifth part deals with the cultural situation and the development of the country.

6. The sixth part deals with the geographical situation and the development of the country.

7. The seventh part deals with the historical situation and the development of the country.

8. The eighth part deals with the future of the country and the development of the country.

9. The ninth part deals with the conclusion of the report.

10. The tenth part deals with the bibliography of the report.

21. Coakley, E.; Petropoulos, C. J.; Whitcomb, J. M., *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **2005**, *18*, 9-15.
22. Deng, H.; Liu, R.; Ellmeier, W.; Choe, S.; Unutmaz, D.; Burkhart, M.; Di Marzio, P.; Marmon, S.; Sutton, R. E.; Hill, C. M.; Davis, C. B.; Peiper, S. C.; Schall, T. J.; Littman, D. R.; Landau, N. R., *Nature*, **1996**, *381*, 661-666.
23. Chan, D.; Kim, P., *Cell*, **1998**, *93*, 681-684.
24. Maddon, P. J.; McDougal, J. S.; Clapham, P. R.; Dalglish, A. G.; Jemal, S.; Weiss, R. A.; Axel, R., *Cell*, **1988**, *54*, 865-874.
25. Zheng, Y. H.; Lovsin, N.; Peterlin, B. M., *Immunol. Lett.*, **2005**, *97*, 225-234.
26. Yu, H.; Jetzt, A. E.; Ron, Y.; Preston, B. D.; Dougherty, J. P., *J Biol Chem.*, **1998**, *273*(43), 28384-28391.
27. Smith, C. M.; Smith, J. S.; Roth, M. J., *J Virol.*, **1999**, *73*(8), 6573-6581.
28. Götte, M.; Li, X.; Wainberg, M. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **1991**, *365*, 199-210.
29. Fujiwara, T.; Mizuuchi, K., *Cell*, **1997**, *54*, 497-504.
30. Flint, S. J.; Enquist, L. W.; Krug, R. M.; Raconiello, U. R.; Skalka, A. M., *Principles of virology. Molecular biology, pathogenesis and control*; ASM Press, Washington D. C., **2000**.
31. Stryer, L., *Biochemia*; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, **1999**.
32. Turner, B. G.; Summers, M. F., *J. Mol. Biol.*, **1999**, *285*, 1-32.
33. Cullen, B. R.; Greene, W. C., *Cell*, **1989**, *58*, 423-426.
34. Yin, P. D.; Das, D.; Mitsuya, H., *Cell. Mol. Life Sci.*, **2006**, *63*, 1706-1724.
35. Coffin, J. M., *Science*, **1995**, *267*, 483-489.
36. Pathak, V. K.; Hu, W.-S., *Semin. Virol.*, **1997**, *8*, 141-150.
37. Figlerowicz, M.; Alejska, M.; Kurzyńska-Kokorniak, A.; Figlerowicz, M., *Med. Res. Rev.*, **2003**, *23*(4), 488-518.
38. Katz, R.A.; Skalka, A. M., *Ann. Rev. Biochem.*, **1994**, *63*, 133-173.
39. Burke, D. S., *Emerg. Infect. Dis.*, **1997**, *3*(3), 253-259.
40. Hu, W.-S.; Temin, H. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 1556-1560.
41. Quiñones-Mateu, M. E.; Arts, E. J., *AIDS Rev.*, **1999**, *1*, 89-100.
42. Becker, D. E., *Anesth. Prog.*, **2007**, *54*(1), 19-24.
43. Okulicz-Kozaryn, I.; Mikołajczak, P.; Bobkiewicz-Kozłowska, T., *Podstawy farmakologii ogólnej z elementami receptury*, Wydawnictwo Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań, **2001**.
44. Richman, D. D., *Nature*, **2001**, *410*, 995-1001
45. Hu, Q., Shattock, R., *Virologica Sinica*, **2007**, *22*(6), 451-461.

1. [Faint text]
2. [Faint text]
3. [Faint text]
4. [Faint text]
5. [Faint text]
6. [Faint text]
7. [Faint text]
8. [Faint text]
9. [Faint text]
10. [Faint text]
11. [Faint text]
12. [Faint text]
13. [Faint text]
14. [Faint text]
15. [Faint text]
16. [Faint text]
17. [Faint text]
18. [Faint text]
19. [Faint text]
20. [Faint text]
21. [Faint text]
22. [Faint text]
23. [Faint text]
24. [Faint text]
25. [Faint text]
26. [Faint text]
27. [Faint text]
28. [Faint text]
29. [Faint text]
30. [Faint text]
31. [Faint text]
32. [Faint text]
33. [Faint text]
34. [Faint text]
35. [Faint text]
36. [Faint text]
37. [Faint text]
38. [Faint text]
39. [Faint text]
40. [Faint text]
41. [Faint text]
42. [Faint text]
43. [Faint text]
44. [Faint text]
45. [Faint text]
46. [Faint text]
47. [Faint text]
48. [Faint text]
49. [Faint text]
50. [Faint text]

46. Akimov, D. V., Filimonov, D. A., Poroikov, V. V., *Pharmac. Chem. J.*, **2002**, **36**(11), 575-580.
47. Cocchi, F.; DeVico, A. L.; Garzino-Demo, A.; Arya, S. K.; Gallo, R. C.; Lusso, P., *Science*, **1995**, **270**, 1811-1815.
48. Martin, J.; LaBranche, C. C.; Gonzalez-Scarano, F.; *J. Virol.*, **2001**, **75**, 3568-3580.
49. Gładysz, A.; Knysz, B., *Śłużba zdrowia*, **2000**, **80**, 2973-2974.
50. Rodger, D.; MacArthur, Novak, R.M., *Clinical Infections Diseases*, **2008**; **47**, 236-241.
51. Balzarini, J.; Van Laethem, K.; Hatse, S.; Vermeire, K.; De Clercq, E.; Peumans, W.; Van Damme, E.; Vandamme, A.-M., Böhlstedt, A.; Schols, D., *J. Virol.*, **2004**, **78**, 10617-10627.
52. De Clercq, E., *Med. Chem. Res.*, **2004**, **13**:6/7, 439-478.
53. Mink, M.; Mosier, S. M.; Janumpalli, S.; Davison, D.; Jin, L.; Melby, T.; Sista, P.; Erickson, J.; Lambert, D.; Stanfield-Oakley, S. A.; Salgo, M.; Cammack, N.; Matthews, T.; Greenberg, M. L., *J. Virol.*, **2005**, **79**, 12447-12454.
54. Reeves, J. D.; Lee, F. H.; Miamidian, J.L.; Jabara, C. B.; Juntilla, M. M.; Doms, R. W., *J. Virol.*, **2005**, **79**, 4991-4999.
55. Mitsuya, H.; Weinhold, K. J.; Furman, P. A.; Clair, M. H. St.; Lehrman, S. N.; Gallo, R. C.; Bolognesi, D.; Barry, D. W.; Broder, S., *Medicinal Sciences*, **1958**, **82**, 7096-7100.
56. Balzarini, J., *Pharmacy World Sci.*, **1993**, **16**, 113-126.
57. Arts, E. J.; Wainberg, M. A., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, **40**, 527-540.
58. Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; St Clair, M. H.; Weinhold, K.; Rideout, J. L.; Freeman, G. A.; Nusinoff Lehrman, S.; Bolognesi, D. P.; Broder, S.; Mitsuya, H.; Barry, D. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, **83**, 8333-8337.
59. Parang, K.; Wiebe, L. I.; Knaus, E. E., *Current Medicinal Chemistry*, **2000**, **7**, 995-1039.
60. Martin, J. L.; Brown, C. E.; Matthew-Davis, N.; Reardon, J. E., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1994**, **38**, 2743-2749.
61. Mansuri, M. M.; Hitchcock, M. J. M.; Buroker, R. A.; Bregman, C. L.; Ghazzouli, I.; Desiderio, J. V.; Starrett, J. E.; Sterzycki, R. Z.; Martin, J. C., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1990**, **34**, 637-641.
62. Cretton, E. M.; Xie M.-Y.; Bevan, R. J.; Goudgaon, N. M.; Schinazi, R., F., Sommadossi, J.-P., *Molecular Pharmacology*, **1990**, **39**, 258-266.
63. De Miranda, P.; Good, S. S., *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, **1992**, **3**(2), 65-77.
64. Johnson, M. A.; Ahluwalia, G.; Connelly, M. C.; Cooney, D. A.; Broder, S.; Johns, D. G.; Fridland, A., *J. Biol. Chem.*, **1998**, **263**, 15354-15357.
65. Hao, Z.; Cooney, D. A.; Farquhar, D.; Perno, C. F.; Zhang, K.; Masood, R.; Wilson, W.; Hartman, N. R.; Balzarini, J.; Johns, D. G., *Mol. Pharmacol.*, **1990**, **37**, 157-163.
66. Ho, H. T.; Hitchcock, M. J. M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1989**, **33**, 844-849.
67. Schuurman, R.; Nijhuis, M.; van Leeuwen, R.; Schipper, P.; de Jong, D.; Collis, P.; Danner, S. A.; Mulder, J.; Loveday, C.; Christopherson, C., *J. Infect. Dis.*, **1995**, **171**, 1411-1419.

1. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...
11. ...
12. ...
13. ...
14. ...
15. ...
16. ...
17. ...
18. ...
19. ...
20. ...
21. ...
22. ...
23. ...
24. ...
25. ...
26. ...
27. ...
28. ...
29. ...
30. ...
31. ...
32. ...
33. ...
34. ...
35. ...
36. ...
37. ...
38. ...
39. ...
40. ...
41. ...
42. ...
43. ...
44. ...
45. ...
46. ...
47. ...
48. ...
49. ...
50. ...
51. ...
52. ...
53. ...
54. ...
55. ...
56. ...
57. ...
58. ...
59. ...
60. ...
61. ...
62. ...
63. ...
64. ...
65. ...
66. ...
67. ...
68. ...
69. ...
70. ...
71. ...
72. ...
73. ...
74. ...
75. ...
76. ...
77. ...
78. ...
79. ...
80. ...
81. ...
82. ...
83. ...
84. ...
85. ...
86. ...
87. ...
88. ...
89. ...
90. ...
91. ...
92. ...
93. ...
94. ...
95. ...
96. ...
97. ...
98. ...
99. ...
100. ...

68. Proudfoot, J. R.; Hargrave, K., D.; Kapadia, S., R.; Patel, U. R.; Grozinger, K. G.; McNeil, D. W.; Cullen, E.; Cardozo, M.; Tong, L.; Kelly, T. A.; Rose, J. David, E.; Mauldin, S. C.; Fuchs, V. U.; Vitous, J.; Hoermann, M. A.; Klunder, J. M.; Raghavan, P.; Skiles, J. W.; Mui, P.; Richman, D. D.; Sullivan, J. L.; Shih, C.-K.; Grob, P. M.; Adams, J., *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 4830-4838.
69. De Clercq, E., *Antiviral Res.*, **1998**, *38*, 153-179.
70. www.aidsinfo.nih.gov
71. Richman, D. D.; Havlir, D.; Corbeil, J.; Looney, D.; Ignacio, C.; Spector, S. A.; Sullivan, J.; Cheeseman, S.; Barringer, K.; Pauletti, D.; Shih, C. K.; Myers, M.; Griffin, J., *J Virol*, **1994**, *68*, 1660-1666.
72. Pani, A.; Loi, A. G.; Mura, M. Marceddu, T.; La Colla, P.; Maronigiu, M. E., *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, **2002**, *2*(1), 17-32.
73. Hazuda, D. J.; Felock, P.; Witmer, M.; Wolfe, A.; Stillmock, K.; Grobler, J. A.; Espeseth, A.; Gabryelski, L.; Schleif, W.; Blau, C.; Miller, M. D., *Science*, **2000**, *287*, 646-650.
74. Marchaud, C.; Johnson, A. A.; Karki, R. G.; Pais, G. C. G, Zhang, X.; Cowansage, K.; Patel, T. A.; Nicklaus, M. C.; Burke Jr., T. R.; Pommier, Y., *Mol. Pharmacol.*, **2003**, *64*, 600-609.
75. Grinsztejn, B.; Nguyen, B. Y.; Katlama, C.; Gattel, J. M.; Lazzarin, A.; Vittecoq, D.; Gonzalez, C. J.; Chen, J.; Harvey, C. M.; Isaacs, R. D., *Lancet*, **2007**, *369*, 1261-1269.
76. Hoetelmans, R. M. W.; Meenhorst, P. L.; Mulder, J. W.; Burger, D. M.; Koks, C. H. W.; Beijnen, J. H., *Pharm. World Sci.*, **1997**, *19*(4), 159-175.
77. Randolph, J. T.; DeGoey, D. A., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2004**, *4*, 1079-1095.
78. Carr, A.; Samaras, K.; Chisholm, D. J.; Cooper, D. A., *Lancet*, **1998**, *351* (9119), 1881-1883.
79. Rusconi, S.; La Seta, Catamancio, S.; Citterio, P.; Kurtagic, S.; Violin, M.; Balotta, C.; Moroni, M.; Galli, M.; d'Arminio-Monforte, A., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2000**, *44*, 1328-1332.
80. Gong, Y. F.; Robinson, B. S.; Rose, R. E.; Deminie, C.; Spicer, T. P.; Stock, D.; Colonno, R. J.; Lin, P. F., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2000**, *44*, 2319-2326.
81. De Clercq, E., *J. Clin. Virol.*, **2004**, *30*, 115-133.
82. Yoshimura, K.; Kato, R.; Kavlick, M. F.; Nguyen, A.; Maroun, V.; Maeda, K.; Hussain, K. A.; Ghosh, A. K.; Gulnik, S. V.; Erickson, J. W.; Mitsuya, H., *J. Virol.*, **2002**, *76*, 1349-1358.
83. Ghosh, A.; Dawson, Z. L.; Mitsuya, H., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15* (24), 7576-7580.
84. Staszewski, S.; Keiser, P.; Montaner, J.; Raffi, F.; Gathe, J.; Brotas, V.; Hicks, C.; Hammer, S. M.; Cooper, D.; Johnson, M; Tortell, S.; Cutrell, A.; Thorborn, D.; Isaacs, R.; Hetherington, S.; Steel, H.; Spreen, W., *JAMA*, **2001**, *285*, 1155-1163.
85. Dybul, M.; Fauci, A. S.; Bartlett, I. G., *Ann. Intern. Med.*, **2002**, *137*, 381-433.
86. Hammer, S. M.; Eron, J. J.; Reiss, P.; Schooley, R. T.; Thompson, M. A.; Walmsley, S.; Cahn, P.; Fischl, M. A.; Gattel, J. M.; Hirsch, M. S.; Jacobsen, D. M.; Montaner, J. S.; Richman, D. D.; Yeni, P. G.; Volberding, P. A., *JAMA*, **2008**, *300*(5), 555-570.
87. Meier, C., *Synlett* **1998**, 233-242.
88. Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J., *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417-451.

1. The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work during the year.

2. The second part of the report deals with the results of the work done during the year.

3. The third part of the report deals with the financial statement of the year.

4. The fourth part of the report deals with the general remarks and conclusions.

5. The fifth part of the report deals with the list of names of the members of the committee.

6. The sixth part of the report deals with the list of names of the members of the committee.

7. The seventh part of the report deals with the list of names of the members of the committee.

8. The eighth part of the report deals with the list of names of the members of the committee.

9. The ninth part of the report deals with the list of names of the members of the committee.

10. The tenth part of the report deals with the list of names of the members of the committee.

11. The eleventh part of the report deals with the list of names of the members of the committee.

12. The twelfth part of the report deals with the list of names of the members of the committee.

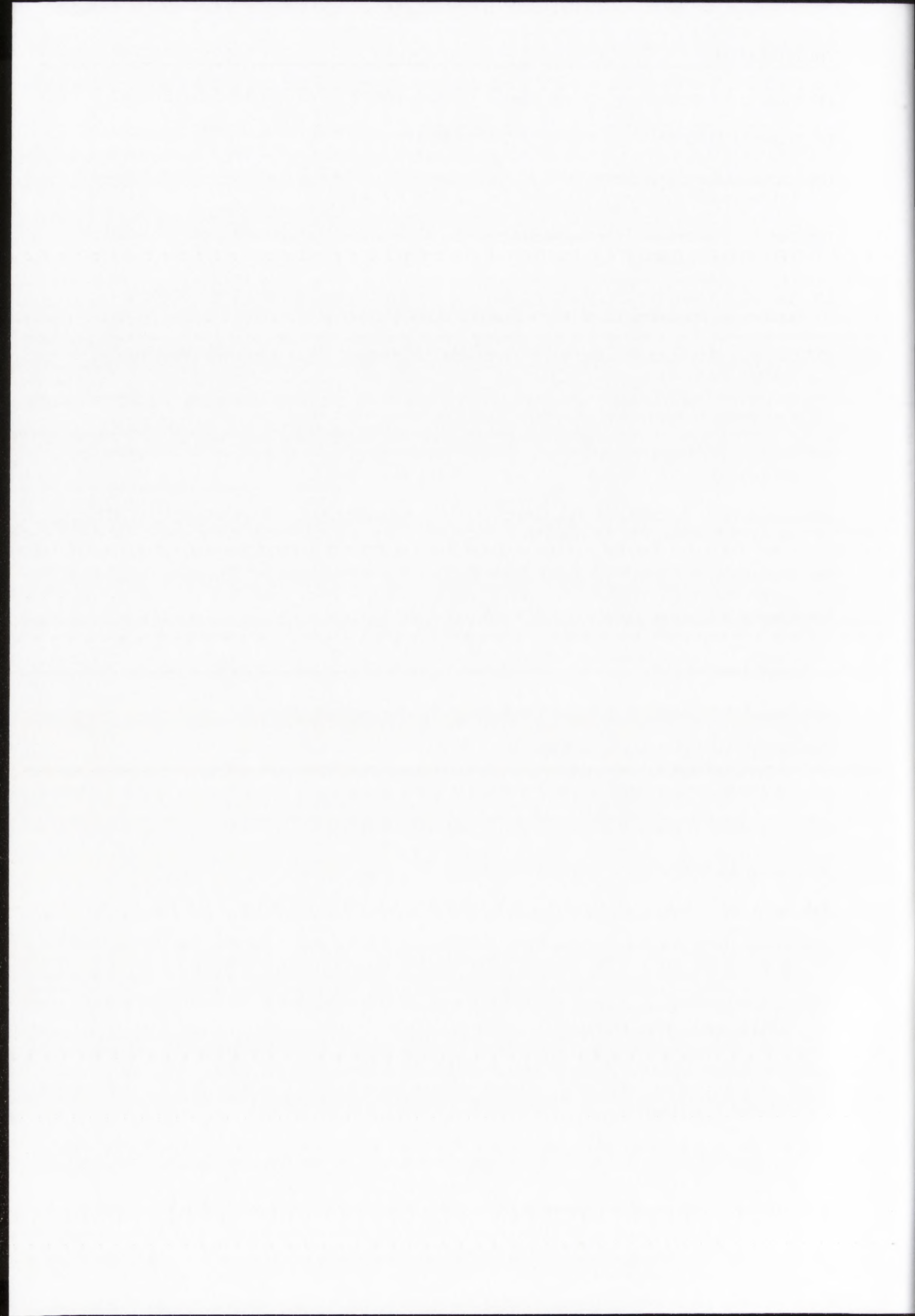
89. Mullah, K. B.; Rao, T. S.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Bentrude, W. G., *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 2728-2735.
90. Henin, Y.; Gouyette, C.; Schwartz, O.; Debouzy, J.-C.; Neumann, J.-M.; Huynh-Dinh, T., *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 1830-1837.
91. Namane, A.; Gouyette, C.; Fillion, M.-P.; Fillion, G.; Huynh-Dinh, T., *J. Med. Chem.*, **1992**, *35*, 3039-3044.
92. Morin, G. T.; Smith, B. D., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 3101-3104.
93. Kucera, L. S.; Iyer, N.; Morris-Natschke, S. L.; Chen, S. Y.; Gumus, F.; Ishaq, K.; Herrmann, D. B. J., *Antiviral Chem. Chemother.*, **1998**, *9*, 157-165.
94. Piantadosi, C.; Marasco Jr., C. J.; Morris-Natschke, S. L.; Meyer, K. L.; Gumus, F.; Surles, J. R.; Ishaq, K. S.; Kucera, L. S.; Iyer, N.; Wallen, C. A.; Piantadosi, S.; Modest, E. J., *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 1408-1414.
95. Kucera, G. L.; Goff, C. L.; Iyer, N.; Morris-Natschke, S.; Ishaq, K. S.; Wyrick, S. D.; Fleming, R. A.; Kucera, L. S., *Antiviral Res.*, **2001**, *50*, 129-137.
96. McGuigan, C.; Nicholls, S. R.; O'Connor, T. J.; Kinchington, D., *Antiviral Chem. Chemother.*, **1990**, *1*, 25-33.
97. McGuigan, C.; O'Connor, T. J.; Nicholls, S. R.; Nickson, C.; Kinchington, D., *Antiviral Chem. Chemother.*, **1990**, *1*, 355-360.
98. McGuigan, C.; Pathirana, R.; Mahmood, N.; Devine, K.; Hay, A., *Antiviral Res.*, **1992**, *17*, 311-321.
99. McGuigan, C.; Davies, M.; Pathirana, R.; Mahmood, N.; Hay, A., *Antiviral Res.*, **1994**, *24*, 69.
100. McGuigan, C.; Pathirana, R.; Davies, M.; Balzarini, J.; De Clercq, E., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 427-430.
101. Meier, C.; Balzarini, J., *Antiviral Research*, **2006**, *71* 282-292.
102. Meier, C.; De Clercq, E.; Balzarini, J., *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, 837-846.
103. Lefebvre, I.; Perigaud, C.; Pompon, A.; Aubertin, A.-M.; Girardet, J.-L.; Kirn, A.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L., *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 3941-3950.
104. Gosselin, G.; Girardet, J.-L.; Perigaud, C.; Benzaria, S.; Lefebvre, I.; Schlienger, N.; Pompon, A.; Imbach, J.-L., *Acta Biochimica Polonica*, **1996**, *43*(1), 195-208.
105. Peyrottes, S.; Egron, D.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L.; Perigaud, C., *Mini-Reviews in Med. Chem.* **2004**, *4*, 395-408.
106. Perigaud, C.; Gosselin, G.; Lefebvre, I.; Girardet, J.-L.; Benzaria, S.; Barber, I.; Imbach, J.-L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, *3*, 2521-2526.
107. Schlienger, N.; Beltran, T.; Perigaud, C.; Lefebvre, I.; Pompon, A.; Aubertin, A.-M.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 3003-3006.
108. Pompon, A.; Lefebvre, I.; Imbach, J.-L.; Kahn, S.; Farquhar, D., *Antiviral Chem. Chemother.*, **1994**, *5*, 91-98.
109. Sastry, K. J.; Nehete, P. N.; Khan, D.; Plunkett, W.; Arlinghaus, R. B.; Farquhar, D., *Mol. Pharmacol.*, **1992**, *41*, 441-445.



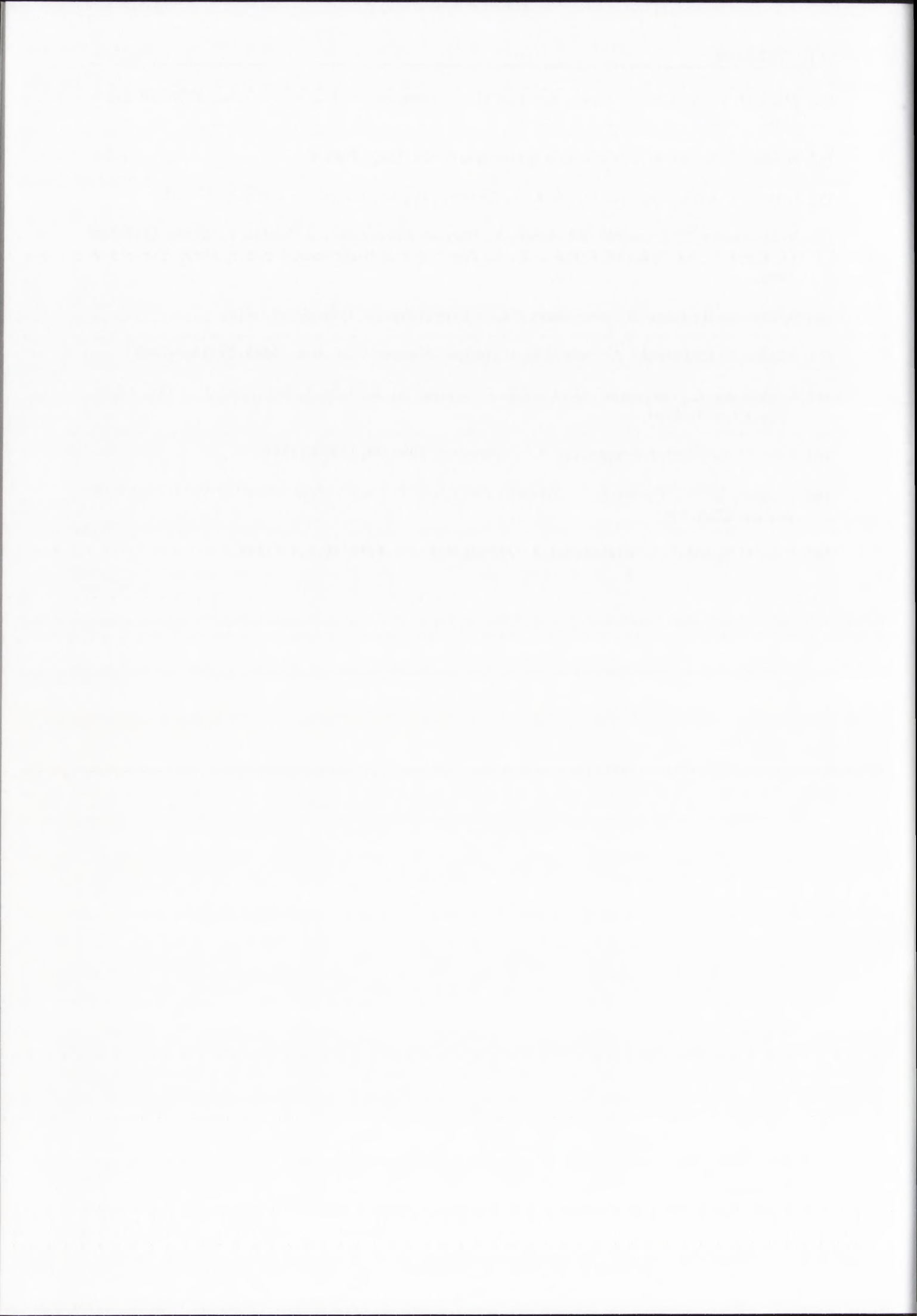
110. Anastasi, C.; Quéléver, G.; Burlet, S.; Garino, C.; Souard, F.; Kraus, J.-L., *Current Med. Chem.*, **2003**, *10*, 1825-1843.
111. Van Gelder, J.; Defrme, S.; Naesens, L.; De Clercq, E.; Van den Mooter, G.; Kinget, R.; Augustijns, P., *Drug Metab. Dispos.*, **2002**, *30*(8), 924-930.
112. Antoniou, T.; Park-Wyllie, L.-Y.; Tseng, A. L., *Pharmacotherapy*, **2003**, *23*(1), 29-43.
113. Zhou, X.-J.; Squires, K.; Pan-Zhou, X.-R.; Bernhard, S.; Agrofoglio, L.; Kirk, M.; Duchin, K.L.; Sommadossi, J.-P., *J. Clin. Pharmacol.*, **1997**, *37*, 201-213.
114. Puech, F.; Gosselin, G.; Lefebvre I.; Pompon, A.; Aubertin AM, Kirn, A.; Imbach, J.-L., *Antiviral Res.* **1993**, *22*, 155-174.
115. Khamnei, S.; Torrence P. F., *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4109-4115.
116. Cahard, D.; McGuigan, C.; Balzarini, J., *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2004**, *4*, 371-381.
117. McGuigan, C.; Devine, K. G.; O'Connor, T. J.; Kinchington, D., *Antiviral. Res.*, **1991**, *15*, 255-263.
118. McGuigan, C.; Pathirana, R. N.; Balzarini, J.; De Clercq, E., *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 1048-1052.
119. McGuigan, C.; Cahard, D.; Sheeka, H. M.; De Clercq, E.; Balzarini, J., *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 1748-1753.
120. Wagner, C. R.; McIntee, E., J.; Schinazi, R., F.; Abraham, T. W., *Bioorgan. Med. Chem. Lett.*, **1995**, *5*(16), 1819-1824.
121. McIntee, E. J.; Rimmel, R. P.; Schinazi, R. F.; Abraham, T. W.; Wagner, C. R., *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 3323-3331.
122. Egron, D.; Imbach, J.-L.; Gosselin, G.; Aubertin, A.-M.; Perigaud, C., *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 4564-4571.
123. Beltran, T.; Egron, D.; Lefebvre, I.; Perigaud, C.; Pompon, A.; Gosselin, G.; Aubertin, A.-M.; Imbach, J.-L., *Nucleosides & Nucleotides*, **1999**, *18*, 973-975.
124. Chang, S. L.; Griesgraber, G. W.; Wagner, C. R., *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2001**, *20*(8), 1571-1582.
125. Chang, S. L.; George, W.; Griesgraber, G. W.; Southern, P. J.; Wagner, C. R., *J. Med. Chem.*, **2001**, *44*, 223-231.
126. Wagner, C. R.; Chang, S. L.; Griesgraber, G. W.; Song, H.; McIntee, E. J.; Zimmerman, C. L., *Nucleosides & Nucleotides*, **1999**, *18*, 913-919.
127. Szymańska, A.; Szymczak, M.; Boryski, J.; Stawiński, J.; Kraszewski, A.; Collu, G.; Sanna, G.; Giliberti, G.; Loddo, R.; La Colla, P., *Bioorg. & Med. Chem.*, **2006**, *14*, 1924-1934.
128. Cieślak, J.; Sobkowski, M.; Jankowska, J.; Wenska, M.; Szymczak, M.; Imiołczyk, B.; Zagórska, I.; Shugar, D.; Stawiński, J.; Kraszewski, A., *Biochim. Pol.*, **2001**, *48*, 429-442.
129. Stawiński, J., *Handbook of Organophosphorus Chemistry*, **1992**, 377-433.
130. Jankowska, J.; Sobkowski, M.; Stawiński, J.; Kraszewski, A., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 3355-3358.
131. Stawiński, J.; Stromberg, R., *Trends in Org. Chem.*, **1993**, *4*, 31-66.



132. Yang, Z.-W.; Xu, Z.-S.; Shen, N.-Z.; Fang, Z.-Q., *Nucleosides & Nucleotides*, **1995**, *14*, 167-173.
133. Stawiński, J.; Thelin, M., *Nucleosides & Nucleotides*, **1990**, *9*, 129-135.
134. Romanowska, J.; Szymańska-Michalak, A.; Pietkiewicz, M.; Sobkowski M.; Boryski, J.; Stawiński, J.; Kraszewski, A., *Letters in Organic Chemistry*, **2009**, *6*, w druku.
135. Cieślak, J.; Jankowska, J.; Sobkowski, M.; Wenska, M.; Stawiński, J.; Kraszewski, A., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2002**, 31-37.
136. Cieślak, J.; Jankowska, J.; Kers, A.; Kers, I.; Sobkowska, A.; Sobkowski, M.; Stawiński, J.; Kraszewski, A., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1996**, *61*, 242-245.
137. Cieślak, J.; Szymczak, M.; Wenska, M.; Stawiński, J.; Kraszewski, A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1999**, 3327-3331.
138. Kraszewski, A.; Stawiński, J., *Trends In Organic Chemistry*, **2003**, *10*, 1-19
139. Kortum, G.; Vogel, W.; Andrussow, K. *Dissociation constants of Organic Acids in Aqueous Solution.*, Butterworths Scientific Publications, Ltd.: London, **1965**.
140. Lezina, V.P.; Kozlova, M. M.; Gashev, S. B.; Stepanyants, A. U.; Smirnow, L. D. *Chem. Heterocycl. Comp.* **1986**, *22*, 903-908.
141. Bradamante, S.; Pagani, G. A. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4737-4740.
142. Zhu, J.; Fu, H.; Jiang, ; Zhao, Y., *Synlett*, **2005**, *12*, 1927-1929.
143. Moher, H. S., *The chemistry of the pyridines, Heterocyclic Compounds*, J. W. & S., inc., Nowy York, **1950**.
144. Joule, J. A.; Smith, G. F., *Heterocyclic Chemistry*, V.N.R.C., Londyn, **1972**.
145. Huq, F.; Yu, J. Q. *J. Mol. Model*, **2002**, *8*, 81-86.
146. Raczyńska, E. D., *Polish J. Chem.*, **2000**, *74*, 1283-1297.
147. Tsuchida, N.; Yamabe, S., *J. Phys. Chem. A*, **2005**, *109*, 1974-1980.
148. Raczyńska, E. D., *Polish J. Chem.*, **1999**, *73*, 1863-1876.
149. Narang, S. A.; Itakura, K.; Wightman, R. H.; *Can. J. Chem.*, **1972**, *50*, 769-770.
150. Efimov, V. A.; Chakhmakhcheva, O. G.; Ovchinnikov, Yu. A., *Nucl. Acids Res.*, **1985**, *13*, 3651-3666.
151. Dąbrowski, W.; Skrzypczyński, Z.; Michalski, J. & Piel, N.; McLaughlin, L. W.; Cramer, F., *Nucleic AIDS Research*, **1984**, *12*, 9123-9135.
152. Michelson, A. M.; Todd, A. R. *J. Chem. Soc.*, **1955**, 2632-2636.
153. Atherton, F. R.; Openshaw, H. T.; Todd, A. R., *J. Chem. Soc.*, **1945**, 660-663.
154. Cieślak, J.; Sobkowski, M.; Kraszewski, A.; Stawiński, J.; *J. Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 4561-4564.
155. Troev, K.; Kirilv, E. M. G.; Roundhill, D. M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, *63*, 1284-1285.



156. Mungall, W. S.; Greene, G. L.; Heavner, G. A.; Letsinger, R. L., *J. Org. Chem.*, **1975**, *40*, 1659-1662.
157. Nilsson, J.; Stawiński, J., *Collection Symposium Series*, **2002**, *5*, 87-92.
158. Nilsson, J.; Kraszewski, A.; Stawiński, J., *Letters In Organic Chemistry*, **2005**, *2*, 297-307.
159. Romanowska, J.; Szymańska-Michalak, A.; Boryski, J.; Stawiński, J.; Loddo, R.; Sanna, G.; Collu, G.; Secci, B.; La Colla, P.; Kraszewski, A., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, *17*(9), 3489-3498.
160. Malewska, B.; Tabor, A., *Acta Polon. Pharm. Drug Research*, **1998**, *55*, 461-465.
161. Nilsson, J.; Kraszewski, A.; Stawiński, J., *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids*, **2003**, *22*, 1467-1469.
162. Sobkowska, A.; Sobkowski, M.; Cieślak, J.; Kraszewski, A.; Kers, I.; Stawiński, J., *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 4791-4794.
163. Kers, I.; Stawiński, J.; Kraszewski, A., *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 11579-11588.
164. Zorbach, W. W.; Tipson, R. S., *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry Vol.I*, John Wiley & Sons, USA, **1968**.
165. Kers, I.; Stawiński, J.; Kraszewski, A., *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 1219-1222.



IX. SUPLEMENT

Aktywność antywirusowa i cytotoksyczność niektórych związków opisanych w rozprawie „Synteza i niektóre właściwości arylo nukleozydo fosforanów i ich analogów jako nowych, potencjalnych pronukleotydów anti-HIV” wyznaczone przez grupę prof. P. La Colla w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu w Cagliari, Włochy.

Nr związku	CC ₅₀ MT-4	EC ₅₀					SI
		wt _{III B}	wt _{III RF}	EFV ^R	Y181C	AZT ^R	
<u>153dAH</u>	> 100	0.06	0.08	0.03	0.05	2.9	> 1666
<u>153dAN</u>	> 100	0.01	0.02	0.01	0.01	0.4	> 10000
<u>153dBH</u>	≥ 100	0.03	0.06	0.01	0.04	1.9	≥ 3333
<u>153dCH</u>	94	0.03	0.06	0.02	0.05	1.8	3133
<u>153dDH</u>	58	0.02	0.03	0.009	0.02	0.8	2900
<u>153dEH</u>	> 100	0.01	0.02	0.01	0.01	0.4	> 10000
<u>153dGH</u>	> 100	0.07	0.3	0.03	0.06	3.4	> 1428
<u>153dGN</u>	≥ 100	0.02	0.04	0.01	0.03	0.6	≥ 5000
<u>153dAI</u>	≥ 100	0.03	0.06	0.01	0.02	1.2	≥ 3333
<u>153dAJ</u>	100	0.04	0.06	0.01	0.05	1.5	2500
<u>153dAK</u>	> 100	0.1	0.2	0.09	0.08	4.7	1000
<u>153dAL</u>	> 100	0.09	0.1	0.07	0.08	7	> 1111
<u>153dKK</u>	> 100	0.02	0.04	0.02	0.03	0.8	> 5000
<u>153dLL</u>	> 100	0.04	0.05	0.03	0.05	0.8	> 2500
<u>153dHN</u>	> 100	0.01	0.03	0.01	0.01	0.7	> 10000
<u>153dHH</u>	> 100	0.02	-	-	-	-	> 5000
<u>153cAH</u>	> 100	38	40	20	30	> 100	> 2.6
<u>153cAN</u>	> 100	3	6	2	4	60	> 33.3
<u>153cGH</u>	> 100	6	13	3	4	100	> 16.6
<u>153cHN</u>	> 100	14	22	7	9	> 100	> 7.1
<u>153bAH</u>	> 100	23	54	16	30	40	> 4.3
<u>168</u>	> 100	0.01	0.02	0.007	0.008	0.3	> 10000
<u>169</u>	61	0.005	0.01	0.004	0.004	0.09	12200
<u>170</u>	>100	0.01	0.02	0.006	0.02	0.3	10000
<u>174</u>	80	0.01	-	-	-	-	8000

wt_{III B} i wt_{III RF} – dzikie szczepy wirusa HIV-1

EFV^R, Y181C, AZT^R – lekooporne szczepy wirusa HIV-1