

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte

Organiskās ķīmijas tehnoloģijas institūts

Bioloģiski aktīvo savienojumu ķīmijas tehnoloģijas katedra

RIGA TECHNICAL UNIVERSITY

Faculty of Material Science and Applied Chemistry

Institute of Technology of Organic Chemistry

Department of Chemical Technology of Biologically Active Compounds

Irina NOVOSJOLOVA

Doktora studiju programmas “Ķīmija” doktorante

Student of the Doctoral program “Chemistry”

TRIAZOLILPURĪNU NUKLEOZĪDU

SINTĒZE UN PIELIETOJUMS

Promocijas darba kopsavilkums

SYNTHESIS AND APPLICATIONS

OF TRIAZOLYLPURINE NUCLEOSIDES

Summary of Doctoral Thesis

Zinātniskie vadītāji (Supervisors)

Dr. chem., prof. M. TURKS

Dr. chem., prof. Ē. BIZDĒNA

RTU Izdevniecība

Rīga 2015

Novosjlova I. Triazolilpurīnu nukleozīdu sintēze un pielietojums. Promocijas darba kopsavilkums. — R.: RTU Izdevniecība, 2015. — 92 lpp.

Iespiests saskaņā ar RTU P-01 2015. gada 5. februāra lēmumu, protokols Nr. 14.

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā «Atbalsts RTU doktora studiju īstenošanai».



This work has been supported by the European Social Fund within the project «Support for the implementation of doctoral studies at Riga Technical University».

ISBN 978-9934-10-676-7

PROMOCIJAS DARBS
IZVIRZĪTS ĶĪMIJAS DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI
RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs ķīmijas doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2015. gada 14. maijā Rīgas Tehniskās universitātes Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātē, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Profesors, *Dr. habil. chem.* Raimonds Valters (Rīgas Tehniskā universitāte, Latvija)
Vadošais pētnieks, *Dr. chem.* Mārtiņš Katkevičs (Latvijas Organiskās sintēzes institūts, Latvija)
Profesors, *Dr. habil.* Sigītas Tumkevičius (Viļņas Universitāte, Lietuva)

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājis doto promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē ķīmijas doktora grāda iegūšanai. Promocijas darbs nav iesniegts nevienā citā universitātē zinātniskā grāda iegūšanai.

Irina Novosjolova
(paraksts)

Datums

Promocijas darbs sagatavots kā tematiski vienota zinātnisko publikāciju kopa. Tas satur kopsavilkumu, 6 publikācijas, 7 patentus un 5 rakstus konferenču pilna teksta rakstu krājumos. Publikācijas uzrakstītas angļu valodā un to kopējais apjoms, ieskaitot elektroniski pieejamo papildinformāciju, ir 162 lpp. Patenti uzrakstīti latviešu valodā un to kopējais apjoms ir 86 lpp.

SATURS

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS.....	5
Tēmas aktualitāte.....	5
Pētījuma mērķis un uzdevumi	6
Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti.....	6
Darba struktūra un apjoms.....	6
Darba aprobācija un publikācijas	7
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI.....	12
1. 2,6-Diazidopurīnu nukleozīdu sintēze.....	13
2. 2,6-Bis-triazolilpurīnu nukleozīdu sintēze	15
3. 2,6-Bis-triazolilatvasinājumu reakcijas ar <i>N</i> -nukleofiliem.....	17
4. 6-Tio-2-triazolilpurīnu nukleozīdu sintēze.....	19
4.1. 2,6-Dihlorpurīna nukleozīda reakcijas ar <i>S</i> -nukleofiliem	20
4.2. 2,6-Bis-triazolilatvasinājumu reakcijas ar <i>S</i> -nukleofiliem	21
4.3. 2,6-Diazidopurīnu nukleozīdu reakcijas ar tioliem	23
4.3.1. C(2) Alkiltiopurīnu nukleozīdu sintēze.....	23
4.3.2. C(2) un C(6) ariltiopurīnu nukleozīdu sintēze	26
5. Triazolilpurīnu nukleozīdu fluorescentās īpašības	30
6. Triazolilpurīnu nukleozīdu bioloģiskā aktivitāte.....	32
6.1. Iedarbība uz adenoziņa un purīnerģiskiem receptoriem.....	32
6.2. Pretvīrusu iedarbība.....	35
6.3. Citotoksicitātes pētījumi.....	38
SECINĀJUMI	41
PATEICĪBAS.....	44
LITERATŪRAS SARAKSTS	45

PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

Tēmas aktualitāte

Nukleozīdiem un nukleotīdiem ir nozīmīga loma dažādos šūnu dzīvības procesos, tie piedalās DNS un RNS sintēzē, šūnu signalizācijas procesos, enzīmu regulēšanā un metabolismā. Nukleozīdu un nukleotīdu analogi ir sintētiski modificēti savienojumi, kuri ir līdzīgi dabiskajiem ekvivalentiem un var tikt izmantoti šūnu metabolismā vai tikt iekļauti DNS un RNS sastāvā un tādējādi kavēt šūnu dalīšanos vai vīrusu replikāciju, piemēram, tie var nomākt vēža šūnu dalīšanos procesu.

Modificēti purīnu atvasinājumi ir izmantojami: 1) pretaudzēju terapijā, piemēram, purīnu nukleozīdi kā antimetabolīti (fludarabīns, tioguanīns, klofarabīns un kladribīns);¹ 2) pretvīrusu terapijā,² piemēram, vidarabīns, abakavīrs, entekavīrs un aciklovīrs; 3) kā adenoziņa un purīnerģisko receptoru agonisti un antagonisti.³ Piemēram, A₁ receptoru agonistus var izmantot kā preparātus pret arteriālo aritmiju, 2. tipa diabētu un kā insulīna jutīgos aģentus. Tie ir svarīgi sāpju novēršanā un stenokardijas ārstēšanā. Savukārt, adenoziņa receptoru A_{2A} agonisti ir lieliski pretiekaisuma aģenti (piemēram, apadenozens, regadenozens, binodenozens). Adenoziņa receptoru antagonistus izmanto arī kā prestatmatiskos un pretiekaisuma aģentus.

Bioloģiskajā un bioorganiskajā ķīmijā ir izplatīta fluorescento iezīmju izmantošana. Tās lieto, lai pētītu biomolekulu struktūras un dinamiku un veiktu to atpazīšanu. Fluorescento nukleozīdu analogus var izmantot kā DNS un RNS molekulu marķierus, pētīt nukleīnskābju struktūru sarežģīto dinamiku, izmantot ģenētiskajās analīzēs un diagnostikā. Tie var kalpot arī kā fluorescentie sensori, kurus var izmantot metālu jonu mērīšanai dzīvajās sistēmās.

Apkopojot informāciju par zināmajām purīnu nukleozīdu bāzu modifikācijām, jāsecina, ka ar azoliem aizvietotu purīnu nukleozīdu ķīmiskās, bioloģiskās un fotofizikālās īpašības līdz šim ir maz pētītas. Šis fakts ļauj attīstīt jaunas un patentējamas pieminēto molekulāro platformu izmantošanas iespējas, pateicoties gan to bioloģiskajai aktivitātei, gan fotofizikālajām īpašībām. Līdz šim aprakstīti tikai daži 2- vai 6-(1,2,3-triazolil)purīnu nukleozīdi.⁴

Promocijas darba aktualitāte saistīta ar (1,2,3-triazolil)purīnu nukleozīdu kā azolil aizvietotu purīna analogu klases paplašināšanu, iegūstot jauna tipa aizvietotāju kombinācijas purīna ciklā. Balstoties uz faktiem par azolilpurīnu analogu bioloģiskajām aktivitātēm, plānotās savienojuma sērijas ir nozīmīgas no medicīnas ķīmijas viedokļa. Jauna tipa purīna nukleozīdu analogu iegūšana veicina purīna ķīmijas attīstību un dod informāciju

par līdz šim neap praksītiem purīna cikla aizvietošanas paņēmieniem. Savukārt dati par jaunizveidoto un patentbrīvo molekulāro platformu bioloģisko aktivitāti un fluorescentajām īpašībām paver ceļu jaunu produktu un metožu attīstībai bioloģiskajā un medicīnas ķīmijā.

Pētījuma mērķis un uzdevumi

Promocijas darba mērķis ir sintēzes metožu izstrāde jaunu C(2)- un C(6)-modificētu triazolilpurīnu nukleozīdu analoģu iegūšanai, ieskaitot 2,6-bis-(1,2,3-triazolil)purīnu nukleozīdus, un to bioloģisko aktivitāšu skrīnings un fluorescento īpašību pētījumi.

Darba mērķa īstenošanai izvirzīti sekojoši uzdevumi:

Paplašināt (1,2,3-triazolil)purīnu nukleozīdu klāstu, izmantojot vara(I) katalizētas azīdu-alkīnu 1,3-dipolārās ciklopievienošanās reakcijas. Izstrādāt un optimizēt attiecīgo izejvielu sintēzes metodes.

Pētīt jauniegūto bis-triazolilpurīnu nukleozīdu reaģētspēju un salīdzināt to ar attiecīgo 2,6-dihlorpurīna un 2,6-diazidopurīna nukleozīdiem.

Veikt fluorescento īpašību izpēti jauniegūtajiem savienojumiem.

Sadarbībā ar citām zinātniskajām grupām noteikt jauno savienojumu aktivitāti uz adenoīna un purīnerģiskiem receptoriem, izpētīt to citotoksicitāti uz vēža šūnām un noteikt antivirālo potenciālu.

Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

Pētījumu rezultātā izstrādātas vairākas metodes dažādi aizvietotu 1,2,3-triazolilpurīnu nukleozīdu iegūšanai. 2,6-Bis-triazolilpurīnu, 2,6-diazidopurīna un 2,6-dihlorpurīna nukleozīdu gadījumā izpētītas reakcijas ar dažādiem nukleofiliem un salīdzināta savienojumu reaģētspēja. Atklāts, ka 1,2,3-triazolilgredzens purīna C(6) pozīcijā darbojas kā laba aizejošā grupa. Pierādīts, ka ar nukleofiliem aizvietotiem monotriazolilsavienojumiem piemīt izteiktas fluorescējošas īpašības. Virknei jauniegūto savienojumu atklātas vērā ņemamas bioloģiskās aktivitātes: agonista aktivitāte pret adenoīna A_3 un purīnerģiskā P2Y₁₂ receptoriem; antivirālais efekts pret dzeltenā drudža, Čikungunja vīrusu un enterovīrusu un citotoksicitāte uz vēža HT-1080 un MG-22A šūnu līnijām.

Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs sagatavots kā tematiski vienota zinātnisko publikāciju kopa par triazolilpurīnu nukleozīdu sintēzi un īpašībām. Tas satur publikācijas recenzētos zinātniskajos

izdevumos, kas iekļauti starptautiskajās datubāzēs, patentus, RTU Zinātniskos rakstus un rakstus konferenču pilna teksta rakstu krājumos.

Darba aprobācija un publikācijas

Promocijas darba rezultāti izklāstīti 5 zinātniskajās oriģinālpublikācijās, 1 apskatrakstā un 7 patentos.

Zinātniskās publikācijas:

1. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis and Applications of Azolyl Purine and Azolyl Purine Nucleoside Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, pieņemts publicēšanai, DOI: 10.1002/ejoc.201403527.
2. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis of Novel 2- and 6-Alkyl/Arylthiopurine Derivatives. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **2015**, pieņemts publicēšanai, DOI: 10.1080/10426507.2014.989435.
3. **Novosjolova, I.**; Stepanovs, D.; Bizdēna, Ē.; Mishnev, A.; Turks, M. 2,6-Dichloro-9-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9*H*-purine. *Acta Cryst.* **2014**, E70, Part 2, o108–o109.
4. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Application of 2,6-Diazidopurine Derivatives in the Synthesis of Thiopurine Nucleosides. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 6557–6561; **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Corrigendum to “Application of 2,6-Diazidopurine Derivatives in the Synthesis of Thiopurine Nucleosides” [Tetrahedron Lett. 54 (2013) 6557–6561]. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 4972.
5. Kovaļovs, A.; **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Bižāne, I.; Skardziute, L.; Kazlauskas, K.; Jursenas, S.; Turks, M. 1,2,3-Triazoles as Leaving Groups in Purine Chemistry: a Three-Step Synthesis of *N*⁶-Substituted-2-Triazolyl-Adenine Nucleosides and Photophysical Properties Thereof. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 850–853.
6. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Belyakov, S.; Turks, M. Synthesis and X-ray Studies of 6-Pyrrolidinyl-2-Triazolyl Purine Arabinonucleoside. *RTU zinātniskie raksti: Materiālzinātne un lietišķā ķīmija* **2013**, 28, 39–44.

Latvijas Republikas patenti:

1. **Novosjolova, I.**; Bārzdaīne, M.; Mandriķa, I.; Petrovska, R.; Bizdēna, Ē.; Kloviņš, J.; Turks, M. Triazolilpurīna atvasinājumi kā adenoīna un purīna receptoru agonisti. **LV14851B**, 20.07.2014.

2. **Novosjolova, I.**; Bārzdaīne, M.; Mandrika, I.; Petrovska, R., Bizdēna, Ē.; Kloviņš, J.; Turks, M. Triazolilpurīna atvasinājumi kā pretvīrusu preparāti. **LV14852B**, 20.07.2014.
3. Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Turks, M. 2,6-Diazidopurīna atvasinājumu izmantošana tiopurīna nukleozīdu sintēzē. **LV14756B**, 20.03.2014.
4. Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Turks, M. Arabinofuranozilpurīna nukleozīdu sintēze. **LV14757B**, 20.03.2014.
5. Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Turks, M. 6-Tio-2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-9*H*-purīna nukleozīdu atvasinājumu sintēzes paņēmieni. **LV14758B**, 20.03.2014.
6. Turks, M.; Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Bižāne, I.; Kovaļovs, A. 6-Amino-2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-9*H*-purīna nukleozīdu sintēze un pielietojums. **LV14634B**, 20.04.2013.
7. Turks, M.; Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Bižāne, I.; Kovaļovs, A. 2,6-Bis-(1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-9*H*-purīna nukleozīdu sintēze un pielietojums. **LV14591B**, 20.01.2013.

Raksti konferenču pilna teksta rakstu krājumā:

1. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Derivatives of 2,6-Diazidopurine and 2,6-Bis-(1,2,3-Triazol-1-yl) Purine as Useful Intermediates in the Synthesis of Modified Purine Nucleosides. *Collection Symposium Series of 16th Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components (M. Hocek, Ed.)*, Český Krumlov, Czech Republic, June 8–13, **2014**, pp 332–336.
2. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Mandrika, I.; Petrovska, R.; Kloviņš, J.; Turks, M. Biological Activity Profile of Triazolylpurine Nucleosides. *Collection Symposium Series of 16th Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components (M. Hocek, Ed.)*, Český Krumlov, Czech Republic, June 8–13, **2014**, pp 337–339.
3. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. New Achievements in the Chemistry of Triazolyl Purine Nucleosides. *Proceedings of the International Conference in the Chemistry and Chemical Technology*, Kaunas, Lithuania, April 25, **2014**, pp 178–181.
4. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. 2,6-Bis-(1,2,3-Triazolyl)-Purine Nucleosides and Their Reactivity towards Different Nucleophiles. *Proceedings of Scientific Conference on Organic Chemistry*, Kaunas, Lithuania, April 24, **2013**, pp 7–11.
5. **Novosjolova, I.**; Kovaļovs, A.; Bižāne, I.; Skardziute, L.; Kazlauskas, K.; Jursenas, S.; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis and Properties of Ditriazolylpurine Nucleosides. *Proceedings of Scientific Conference on Organic Chemistry*, KTU, Kaunas, Lithuania, April 25, **2012**, pp 51–55.

Darba rezultāti prezentēti sekojošās konferencēs:

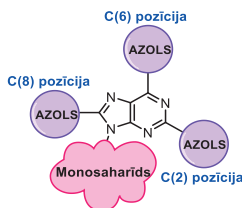
1. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis and Applications of 2- and 6-Alkyl/Arylthiopurine Derivatives. *Proceedings of International Conference of Lithuanian Chemical Society "Chemistry and Chemical Technology 2015"*, Vilnius, Lithuania, January 23, **2015**, pp 191.
2. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. 2,6-Diazidopurine Nucleosides as Useful Intermediates for the Synthesis of Novel Triazolyl Purine Analogs. *Abstracts of Riga Technical University 55th International Scientific Conference*, RTU Press, Riga, Latvia, October 14–17, **2014**, pp 18.
3. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis of Novel 2- and 6-Alkyl/Arylthiopurine Derivatives. *Proceedings of 26th International Symposium on the Organic Chemistry of Sulfur*, Istanbul, Turkey, August 24–29, **2014**, pp 19.
4. Laķis, E.; **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Reactivity Studies of 2,6-Bis-(1,2,3-triazolyl)purine Nucleosides with Hydrazines and Amino Acids. *Proceedings of XXI International Round Table of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, Poznań, Poland, August 24–28, **2014**, pp 32.
5. **Novosjolova, I.**; Stepanovs, D.; Bizdēna, Ē.; Mishnev, A.; Turks, M. Synthetic Applications of 2,6-Diazidopurine Nucleosides Leading to Modified Triazolylpurine Derivatives. *Proceedings of International Conference on Organic Synthesis "BOS 2014"*, Vilnius, Lithuania, July 6–9, **2014**, pp 110.
6. Laķis, E.; **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. S_NAr Reaction of 2,6-Bis-(1,2,3-triazolyl)purine Nucleosides with Hydrazines. *Proceedings of International Conference on Organic Synthesis "BOS 2014"*, Vilnius, Lithuania, July 6–9, **2014**, pp 90.
7. **Novosjolova, I.**; Bārzdaīne, M.; Bizdēna, Ē.; Belyakov, S.; Turks, M. New Approach to the Synthesis of Triazolyl Purine Nucleosides. *Abstracts of Riga Technical University 54th International Scientific Conference*, Riga, Latvia, October 11, **2013**, RTU press, pp 35.
8. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Belyakov, S.; Turks, M. 2,6-Bis-(1,2,3-Triazolyl)-Purine Nucleosides and Their Reactivity towards Different Nucleophiles. *Proceedings of 18th European Symposium on Organic Chemistry*, Marseille, France, **2013**, July 7–12, pp 86.
9. Bizdēna, Ē.; Šišulīns, A.; **Novosjolova, I.**; Turks, M. New Synthetic Strategies towards 2,6-Disubstituted Purine Derivatives Based on Their Diazido Intermediates.

- Proceedings of 18th European Symposium on Organic Chemistry*, Marseille, France, **2013**, July 7–12, pp 53.
10. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Regioselective Nucleophilic Aromatic Substitution of 2,6-Bis-(1,2,3-Triazolyl)-Purine Derivatives with Various Nucleophiles. *Proceedings of 14th Tetrahedron Symposium*, Vienna, Austria, June 25–28, **2013**, P1-147.
 11. **Novosjolova, I.** Application of Triazolyl Purine Derivatives in Nucleophilic Aromatic Substitution Reactions. *RTU Zinātniskie raksti: Materiālzinātne un lietišķā ķīmija*, **2013**, 27, pp 84.
 12. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Belyakov, S.; Turks, M. Synthesis of *N*⁶-Substituted-2-Triazolyl-Adenine Derivatives. *Proceedings of XVth Conference on Heterocycles in Bio-organic Chemistry*, Riga, Latvia, May 27–30, **2013**, pp 96.
 13. Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Turks, M. 2,6-Bis-(1,2,3-triazolyl)purines in Reactions with *S*-Nucleophiles. *Proceedings of XVth Conference on Heterocycles in Bio-organic Chemistry*, Riga, Latvia, May 27–30, **2013**, pp 59.
 14. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis and Photophysical Studies of *N*⁶-Substituted-2-Triazolyl Adenine Derivatives. *Proceedings of Scientific Conference on Organic Chemistry*, Kaunas, Lithuania, April 24, **2013**, pp 17.
 15. Bārzdaīne, M., Bizdēna, Ē., **Novosjolova, I.** Purīna bistrizolilatvasinājumu reakcijas ar nukleofiliem un iegūto produktu fluorescento īpašību izpēte. *RTU 54. Studentu zinātniskās un tehniskās konferences materiāli*, Rīga, Latvija, **2013**. gada 18. aprīlis, 130. lpp.
 16. **Novosjolova, I.**; Kovaļovs, A.; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Properties and Structure Studies of New 2,6-Bis-(1,2,3-Triazolyl) Substituted Purine Arabinonucleosides. *Proceedings of RTU 53rd International Scientific Conference: Dedicated to the 150th Anniversary and the 1st Congress of World Engineers and Riga Polytechnical Institute*, Riga, RTU Publishing House, Latvia, October 11–12, **2012**, pp 247.
 17. Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Bižāne, I.; Turks, M. Studies of Novel 2,6-Bis-(1,2,3-Triazolyl) Substituted Purine Ribonucleosides. *Proceedings of RTU 53rd International Scientific Conference: Dedicated to the 150th Anniversary and the 1st Congress of World Engineers and Riga Polytechnical Institute*, Riga, RTU Publishing House, Latvia, October 11–12, **2012**, pp 254.
 18. **Novosjolova, I.**; Kovaļovs, A.; Bižāne, I.; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Click, Substitute and Fluoresce: Synthesis and Applications of 2,6-Di-(1,2,3-triazolyl)-purine

- Nucleosides. *Proceedings of XX International Round Table of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, Montreal, Canada, August 5–9, **2012**, pp 134.
19. Kovaļovs, A.; **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Reactivity Studies of 2,6-ditriazolylpurine Nucleosides with Nucleophiles. *Proceedings of XX International Round Table of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, Montreal, Canada, August 5–9, **2012**, pp 112.
20. **Novosjolova, I.**; Kovaļovs, A.; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Efficient Synthesis of 6-Amino-2-Triazolyl Purine Arabinonucleosides via 2,6-Ditriazolyl Derivatives and Fluorescent Properties Thereof. *Proceedings of International Conference on Organic Synthesis “BOS 2012”*, Tallinn, Estonia, July 1–4, **2012**, pp 145.
21. Bižāne, I.; **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. A Novel Method for C(6)-Derivatization of Purine Ribonucleosides. *Proceedings of International Conference on Organic Synthesis “BOS 2012”*, Tallinn, Estonia, July 1–4, **2012**, pp 59.
22. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Purīnu arabinopiranozil- un arabinofuranozilnukleoziādu sintēze un struktūras pētījumi. *RTU 53. Studentu zinātniskās un tehniskās konferences materiāli: Organisko savienojumu ķīmijas un tehnoloģijas sekcija*, Rīga, Latvija, **2012**. gada 18. aprīlis, 201. lpp.

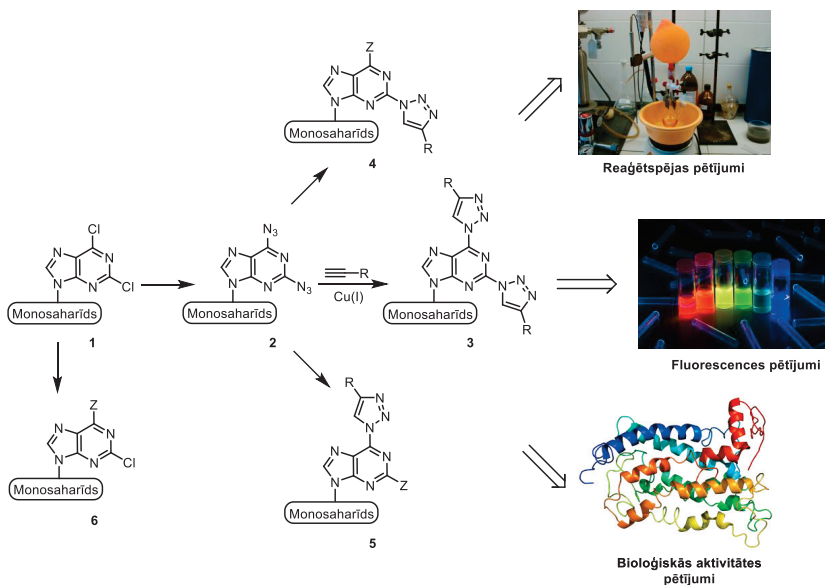
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

Modificēti purīnu nukleozīdu analogi ir plaši lietoti bioloģiskajā un medicīniskajā jomā. Daudzi no tiem jau ir pieejami aptiekās kā efektīvas zāles. Purīnu nukleozīdu bāzu modificēšanu var veikt purīna C(2), C(6) un C(8) vietā (1. attēls). Nukleozīda struktūrā var ievadīt dažādus azolcilciklus, tā iegūstot purīnu-azolu konjugātus, kas ir jauni purīnu atvasinājumi, kuri satur slāpekli saturošus pieclocēkļu aromātiskus heterociklus. Šim nolūkam var izmantot dažādas metodes, piemēram, S_NAr , ciklizācijas un pārejas metālu katalizētās šķērssametnāšanas reakcijas. Pēdējā desmitgadē purīnu-azolu konjugātu sintēzes metodes attīstās arvien plašāk, bet virkne loģiski iedomājamo molekulāro platformu ar daļēji paredzamām bioloģiskām aktivitātēm nav vēl iegūtas. Maz informācijas ir arī par 1,2,3-triazolu ievadīšanu purīnu nukleozīdu C(2) un C(6) pozīcijās, šādu struktūru ķīmiskajām, fotofizikālajām un bioloģiskajām īpašībām.



1. attēls. Purīna-azola konjugāts vispārējā veidā

Promocijas darba ietvaros pievērsāmies jaunu metožu izstrādei, lai iegūtu C(2) un C(6) vietā modificētus 1,2,3-triazolilpurīnu nukleozīdu analogus. Izvēloties vara(I) katalizētu azīdu-alkīnu 1,3-dipolārās ciklopievienošanās ($CuAAC$) pieeju triazolu konstruēšanai, sākotnēji ieguvām stratēģiskos diazīdus **2**, kurus tālāk izmantojām reakcijās ar dažādiem terminālajiem alkīniem un ieguvām iepriekš nezināmus 2,6-bis-triazolilatvasinājumus **3** (1. shēma). Pētījām iegūto atvasinājumu reaģētspēju ar dažādiem *N*- un *S*-nukleofiliem, jo par 1,2,3-triazolilcikla apmaiņu purīna C(6) vietā iepriekš nekas nebija zināms. Uzsākām arī bioloģisko aktivitāšu un fotofizikālo īpašību pētījumus.



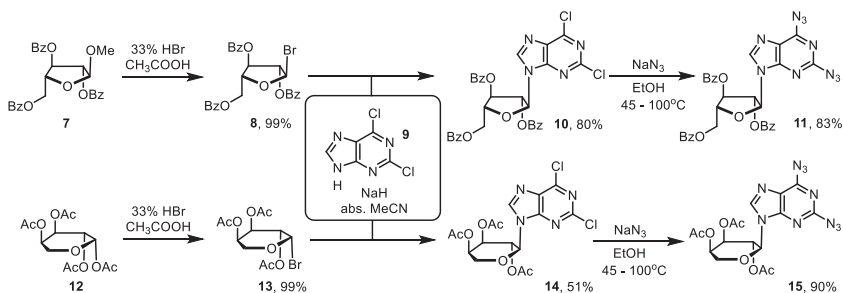
1. 2,6-Diazidopurīnu nukleozīdu sintēze

Vara(I) katalizēto azīdu-alkīnu 1,3-dipolārās ciklopievienošanās reakciju izpildei pirmais uzdevums bija iegūt stratēģiskās diazīdu izejvielas ar vispārējo formulu **2** (1. shēma).

Purīnā modificētu nukleozīdu sintēzes ir iespējams veikt pēc lineārās vai konverģentās metodes. Lineārā metode ir pakāpeniska katra nākamā starpprodukta iegūšana ceļā uz produktu. Savukārt, konverģentā metode nozīmē atsevišķu katra ķīmiskā būvbloka sintēzi un to turpmāku reakciju savā starpā. Lineārajā sintēzē kopējais iznākums vispār krītas ar katru nākamo soli, savukārt konverģentajā metodē iznākumi mēdz būt augstāki, un tādēļ šai metodei bieži tiek dota priekšroka salīdzinājumā ar lineāro metodi.

Forbrugena [Vorbrüggen] glikozilēšanas apstākļi⁵ paredz glikozīdiskās saites izveidi reakcijā starp sililēto heterociklisko bāzi un elektrofilo monosaharīda atvasinājumu Luisa [Lewis] skābes klātbūtnē. Svarīgi, ka iepriekš Forbrugena [Vorbrüggen] glikozilēšanas apstākļi nekad netika lietoti attiecībā uz 2,6-diazidopurīnu, bet lielākoties uz adenīna vai guanozīna atvasinājumiem.⁶

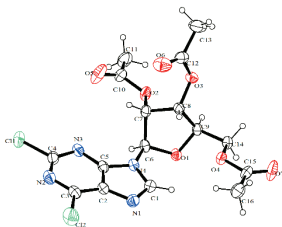
Diazīds **11** tika iegūts pēc lineārās metodes. Reakcijā starp bromīdu **8** un ar NaH deprotonētu 2,6-dihlorpurīnu **9**, iegūst produktu **10**, un tad nākamajā stadijā, reaģējot ar NaN₃, ieguvām vajadzīgo 2,6-diazidopurīna nukleozīdu **11** ar 83% iznākumu (2. shēma).



2. shēma. Arabinofuranozilsērījas un arabinopiranozilsērījas purīnu nukleozīdu **11** un **15** sintēze

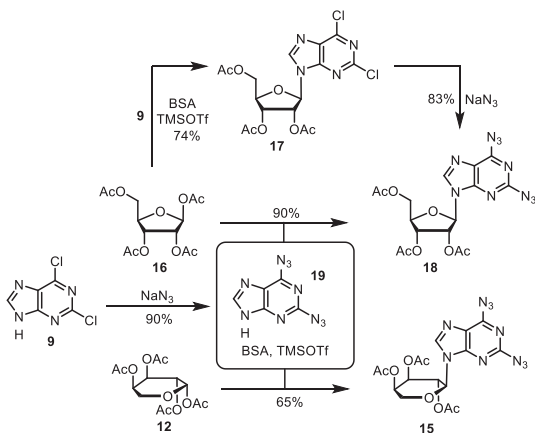
Arabinopiranozilsērījas purīna nukleozīdu **15** arī var iegūt pēc 2. shēmā aprakstītās metodes. Sākumā diastereoselektīvā veidā ieguvām 2,3,4-tri-*O*-acetil-1-brom-β-D-arabinopiranozi **13**. Tad tā reaģē ar deprotonētu 2,6-dihlorpurīnu **9** pēc nukleofilās aizvietošanas mehānisma un rodas 2,6-dihlorpurīna nukleozīds **14** ar 51% iznākumu. Tad veicot reakciju ar NaN₃, ieguvām vajadzīgo diazīdu **15** ar 90% iznākumu.

Lineārajā metodē starp 2,6-dihlorpurīnu **9** un peracilēto ribofuranozi **16** Forbrugena [*Vorbrüggen*] glikozilēšanas apstākļos ieguvām 2,6-dihlorpurīna nukleozīdu **17** (3. shēma).⁷ Tā kristāliskā struktūra pirmo reizi iegūta šajā darbā (2. attēls).⁸ Tad secīgā reakcijā ar NaN₃ ieguvām ribofuranozilsērījas diazīdu **18** ar 83% iznākumu.



2. attēls. 2,6-Dihlorpurīna nukleozīda **17** kristāliskā struktūra

Pēc konverģentās metodes Forbrugena [*Vorbrüggen*] glikozilēšanas apstākļos reakcija tika veikta starp aizsargātu ribofuranozi **16** vai arabinopiranozi **12** un iepriekš pagatavotu 2,6-diazidopurīnu **19**, BSA un TMSOTf klātbūtnē. Produkti **18** un **15** tika iegūti ar 90% un 65% iznākumu (3. shēma).



3. shēma. 2,6-Diazidopurīnu nukleozīdu **18** un **15** sintēze

Kā redzams, pēc lineārās metodes diazīdus **11**, **15** un **18** var iegūt ar kopējiem iznākumiem — 66%, 45% un 61%. Savukārt konverģentās metodes gadījumā diazīdu **15** un **18** kopējie iznākumi ir 59% un 81%.

Glikozildonoru reakcija ar sililētām nukleobāzēm Luisa skābes klātbūtnē tiek plaši izmantota nukleozīdu sintēzē, bet iepriekš tā netika izmantota 9-(tri-*O*-acetil-β-D-ribofuranozil)-2,6-diazidopurīna **18** un 9-(tri-*O*-acetil-α-D-arabinopiranozil)-2,6-diazidopurīna **15** ieguvei.

Savienojuma **14** struktūra tika pētīta ar HMBC un NOESY spektriem. HMBC spektri pierādīja, ka monosaharīda atlikums ir piranozes formā, bet NOESY spektrs un spinu sadarbības konstanšu analīze, ka nukleozīda **14** monosaharīda komponente pastāv α-konfigurācijā.⁹

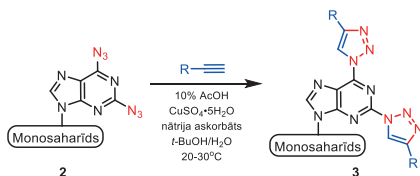
Novērojām, ka iegūtie 2,6-diazidopurīnu nukleozīdu atvasinājumi **11**, **15** un **18** ir nestabili dienas gaismā un paaugstinātās temperatūrās, tāpēc glabāt tos ilgāku laika periodu ieteicams tumšā pazeminātā temperatūrā (<5 °C).

Originālpublikācijas par šīs nodaļas pētījumiem atrodamas IV–VII pielikumos.

2. 2,6-Bis-triazolilpurīnu nukleozīdu sintēze

Tālāk attīstījām 2,6-bis-triazolilatvasinājumu **3** iegūšanas metodi azīdu-alkīnu ciklopievienošanās reakcijās, izmantojot Cu(I) katalīzi.¹⁰ Tā ir viena no pēdējā laikā plaši lietotām reakcijām “klik” koncepcijas ietvaros.¹¹ Arī bioorganiskās un medicīnas ķīmijas jomā ērti iegūstamais 1,2,3-triazola saistītājtiltīnš ir guvis plašu atsaucību.¹² Jāatzīmē, ka

daudzām triazola fragmentu saturošām molekulārajām platformām ir novērotas daudzveidīgas bioloģiskās aktivitātes.



4. shēma. 2,6-Bis-triazolilatvasinājumu 3 sintēze

Mūsu gadījumā par katalītisko sistēmu kalpoja $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ kombinācijā ar nātrija askorbātu kā reducētāju (4. shēma). Reakcijas tika realizētas *tert*-butanola ūdens vidē. Reakcijas ātrumu palielināšanai tiek pievienoti 10 mol% AcOH, jo pēc B. F. Strauba [B. F. Straub] uzskatiem ir neizdevīgi Cu-C saites protodemetalēšanai izmantot H_2O vai alkīnu kā protona avotu. Tāpēc ir ieteikts izmantot etišķābi katalītiskos daudzumos, tā palielinot 1,3-dipolārās reakcijas ātrumu un iznākumu.¹³ Tā mūsu reakcijas pēc 10 mol% AcOH šķīduma pievienošanas un atkarībā no alkīna notika no dažām minūtēm līdz 4 h. Salīdzinājumam: bez etišķābes pievienošanas reakcijas ilgā 24–36 h.

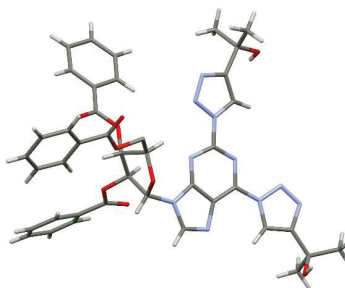
Kā alkīnu saturošus reagentus izmantojām terminālos alkīnus, kur R ir sānu ķēdē aizvietoti vai neaizvietoti alkil-, arilaizvietotāji vai heterocikliskie aizvietotāji (1. tabula). Dažus alkīnus sintezējām no attiecīgā aldehīda, izmantojot Ohira-Bestmana [Ohira-Bestmann] reāģentu.

1. tabula. 2,6-Bis-triazolilatvasinājumu 3 sintēze saskaņā ar 4. shēmu

R	Produkts 3	R	Produkts 3
Ribofuranozilsērija Monosaharīds = 2',3',5'-tri-O-acetil-β-D-ribofuranozil-			
	3a, 83%		3f, 70%
	3b, 67%		3g, 58%
	3c, 56%		3h, 51%
	3d, 30%		3i, 28%
	3e, 64%		3j, 42%

R	Produkts 3	R	Produkts 3
Arabinopiranozilsērija			
Monosaharīds = 2',3',4'-tri- <i>O</i> -acetil- α -D-arabinopiranozil-			
	3k , 78%		3n , 47%
	3l , 46%		3o , 50%
	3m , 75%		3p , 60%
Arabinofuranozilsērija			
Monosaharīds = 2',3',5'-tri- <i>O</i> -benzoiļ- α -D-arabinofuranozil-			
	3q , 33%		3r , 45%

Savienojuma **3r** struktūra tika pierādīta, izmantojot rentgenstruktūranalīzi. Tika apstiprināti savienojuma **11** kodolmagnētiskās rezonanses dati par tā α -konfigurāciju, kā arī papildus pierādīta 1,2,3-triazolu rašanās 1,4-reģioselektivitāte (3. attēls). Tā ir pirmā rentgenstruktūra bis-azolilpurīnu rindā. Kā redzams no kristāla struktūras, tad bāze attiecībā pret monosaharīda atlikumu atrodas *syn* orientācijā. Dabas nukleotīdos pamatā ir pārsvarā sastopama *anti* orientācija.



3. attēls. Savienojuma **3r** kristāliskā struktūra

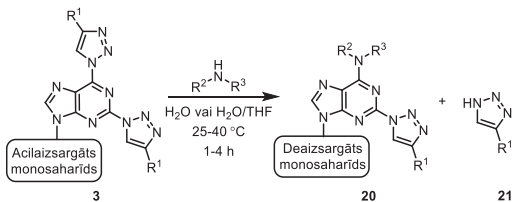
Originālpublikācija un patents par šīs nodaļas pētījumiem atrodami VI un XIV pielikumos.

3. 2,6-Bis-triazolilatvasinājumu reakcijas ar *N*-nukleofiliem

No nedaudziem literatūras piemēriem bija zināms, ka 1,2,4-triazolilaizvietotājs purīna C(6) pozīcijā darbojas kā laba aizejošā grupa nukleofilajās reakcijās, bet plaši šis pārvērtības nebija pētītas. Te var minēt K. Rīzes [C. Reese], M. Robinsa [M. Robins] un J. Išido [Y. Ishido] darbus.¹⁴ Savukārt, par 1,2,3-triazoliem kā aizejošām grupām nebija nekādu ziņu.

Mūsu pētījumi pierādīja, ka arī 1,2,3-triazols purīna C(6) vietā darbojas kā laba aizejošā grupa, izmantojot 2,6-bis-(1,2,3-triazol-1-il)purīnu atvasinājumus **3** nukleofilajās

heteroaromātiskajās aizvietošanas reakcijās. Tas paver iespēju interesantiem bioloģiskās aktivitātes un biokonjugācijas pētījumiem. Tas ļāva mums izstrādāt jaunu N^6 -aizvietotu 2-triazoliladenīna nukleozīdu **20** sintēzes pieeju (5. shēma, 2. tabula). Tika atklāts, ka iegūtiem produktiem piemīt izteiktas fluorescentās īpašības.



5. shēma. 2,6-Bis-triazolilatvasinājumu **3** reakciju ar *N*-nukleofliem vispārējā shēma

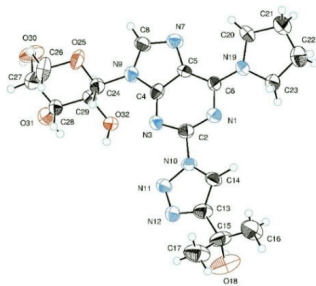
2. tabula. 2,6-Bis-triazolilatvasinājumu **3** nukleoflās heteroaromātiskās apmaiņas reakcijas ar amīniem

Nr. p. k.	R ¹	-NR ² R ³	Produkts 20
Ribofuranozilsērija			
Monosaharīds = β-D-ribofuranozil-			
1		-NHMe	20a , 92%
2		-NMe ₂	20b , 64%
3			20c , 96%
4			20d , 89%
5			20e , 86%
Arabinopiranozilsērija			
Monosaharīds = α-D-arabinopiranozil-			
6			20f , 88%
7		-NMe ₂	20g , 91%
8		-NHMe	20h , 73%
9			20i , 96%
10		-NHMe	20j , 82%
11			20k , 69%
Arabinofuranozilsērija			
Monosaharīds = α-D-arabinofuranozil-			
12		-NHMe	20l , 46%
13			20m , 97%
14		-NMe ₂	20n , 96%
15		-NHMe	20o , 39%

Reakcijās tika izmantoti tādi *N*-nukleofli kā metilamīns, dimetilamīns, piperidīns un pirrolidīns. Reakcijas parasti notika amīna ūdens šķīdumā 30–40 °C temperatūrā 30 minūšu

līdz 6 stundu laikā. Reakciju rezultātā tiek nošķeltas arī acetil- un benzoilaizsarggrupas (5. shēma, 2. tabula).

Arabinopiranozilsērijas gadījumā savienojuma **20k** struktūra tika pierādīta, izmantojot rentgenstruktūranalīzi (4. attēls). No kristāla struktūras redzams, ka aizvietošana notiek reģioselektīvi C(6) vietā. Savienojums veido monohidrātu, ja to kristalizē no ūdens.⁹



4. attēls. Savienojuma **20k** ORTEP struktūra

Mūsu metode ir konkurētspējīga ar iepriekš aprakstītajām metodēm, piemēram, S. van Kalenberga [S. van Calenbergh] grupā 9-(β-D-ribofuranozil)-2-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-6-metilamino-9*H*-purīns **20a** tika sintezēts piecās stadijās ar maksimālo iznākumu 27%.^{4a} Savukārt, mēs demonstrējam minētā savienojuma jaunu trīs stadiju sintēzi ar kopējo iznākumu 69%.

Kā *N*-nukleofilus var izmantot gan aminoskābes, gan hidrazīnus, bet reakcijas ar tiem notiek daudz lēnāk un ar zemākiem iznākumiem un vairāk piemaisījumiem. Piemērotāki apstākļi šo reakciju veikšanai vēl tiek meklēti.

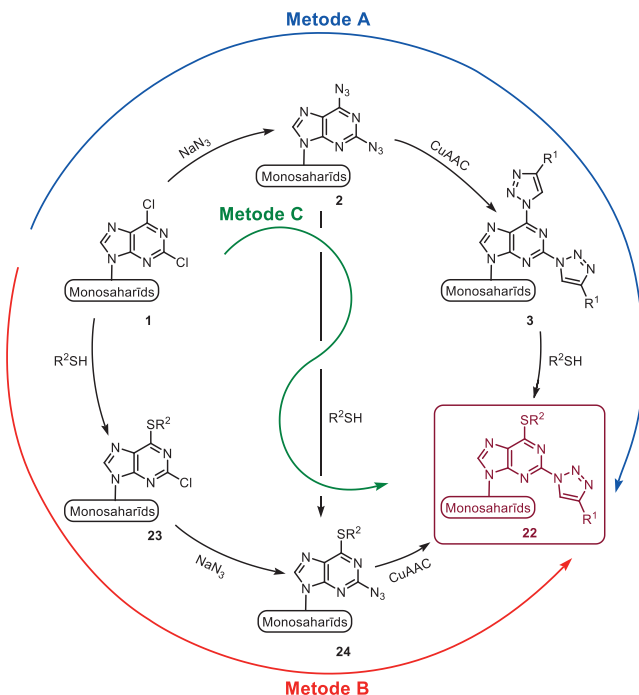
Oriģinālpublikācijas un patents par šīs nodaļas pētījumiem atrodami VI–VII un XIII pielikumos.

4. 6-Tio-2-triazolilpurīnu nukleozīdu sintēze

Tiopurīnu atvasinājumi pieder plašajai purīna antimetabolītu klasei. Tie tiek plaši lietoti vēža un autoimūno slimību ārstēšanai.¹⁵ 6-Tioguanīns un 6-merkaptopurīns tiek plaši izmantoti, lai ārstētu limfoleikēmiju bērniem.¹⁶

Pētījuma laikā izvirzījām vairākās hipotēzes 6-tio-2-triazolilpurīnu nukleozīdu **22** ieguvei (6. shēma). Pirmkārt, mērķa savienojumus **22** var iegūt no 2,6-dihlorpurīna atvasinājumiem **1**, veicot hlorīda apmaiņu ar azīdu. Tad Cu(I) katalizētās 1,3-dipolārās ciklopievienošanās reakcijas (CuAAC) rezultātā ar dažādiem terminālajiem alkīniem var iegūt

iepriekš aprakstītos 2,6-bis-triazolilatvasinājumus, kurus tālāk izmantot nukleofilajās heteroaromātiskajās aizvietošanās ar dažādiem tioliem (Metode A: **1**→**2**→**3**→**22**; 6. shēma). Otrkārt, var mainīt reakciju secību un sākotnēji veikt divas secīgas S_NAr reakcijas, iegūstot no dihlorīda **1** monotioaduktu **23**, kuru tālāk pārvērš par starpproduktu **24**. Šo savienojumu pakļaujot CuAAC reakcijai, varētu iegūt mērķsavienojumu **22** (Metode B: **1**→**23**→**24**→**22**; 6. shēma). Kombinējot metodes A un B, iegūst metodi C, kurā domāts lietot diazīdu **2** S_NAr reakcijās, iegūstot starpproduktu **24** (Metode C: **1**→**2**→**24**→**22**; 6. shēma).

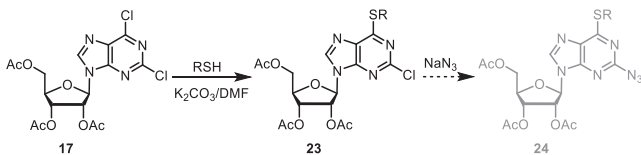


6. shēma. Iespējamās metodes 6-tio-2-triazolilpurīnu nukleozīdu **22** sintēzei

4.1. 2,6-Dihlorpurīna nukleozīda reakcijas ar *S*-nukleofiliem

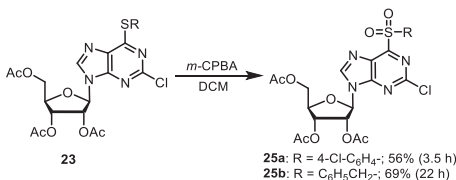
Hipotēžu pierādīšanās procesā veicām nukleofilās aizvietošanas reakcijas starp 2,6-dihlorpurīna nukleozīdu **17** un dažādiem tioliem, iegūstot rezultātus, kas sasniedz pat 98% (3. tabula). Bet monohlorsavienojuma **23** pārvēršana par azidoatvasinājumu **24** līdz šim bija neveiksmīga. Reakcijas veicām ar nātrija azīdu tādos šķīdinātājos kā EtOH vai DMF temperatūru robežās no 35 °C līdz 120 °C.

3. tabula. 2,6-Dihlorpurīna 17 reakcijas ar tioliem



Nr. p. k.	RSH	Laiks, h	Produkts 23
1	$C_6H_5CH_2SH$	20	23a , 59%
2	$CH_3(CH_2)_{11}SH$	24	23b , 88%
3	$n-C_6H_9SH$	3	23c , 94%
4	$c-C_6H_{11}SH$	4	23d , 90%
5	$4-Cl-C_6H_4SH$	1	23e , 98%
6	$4-Br-C_6H_4SH$	0.36	23f , 79%
7	$4-t-Bu-C_6H_4SH$	0.25	23g , 93%
8	$4-F-C_6H_4SH$	1.5	23h , 96%

Veicām arī dažu iegūto produktu oksidēšanu ar *m*-CPBA, iegūstot sulfonus **25** (7. shēma).¹⁷ Šādi atvasinājumi varētu būt interesanti no sintētiskās un medicīnas ķīmijas viedokļa.¹⁸



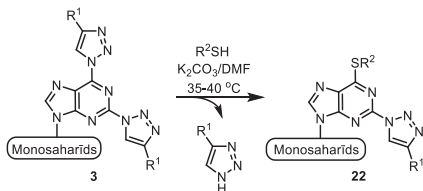
7. shēma. Sulfonu **25** vispārējā iegūšanas shēma

Originālpublikācija par šīs nodaļas pētījumiem atrodama III pielikumā.

4.2. 2,6-Bis-triazolilatvasinājumu reakcijas ar *S*-nukleofiliem

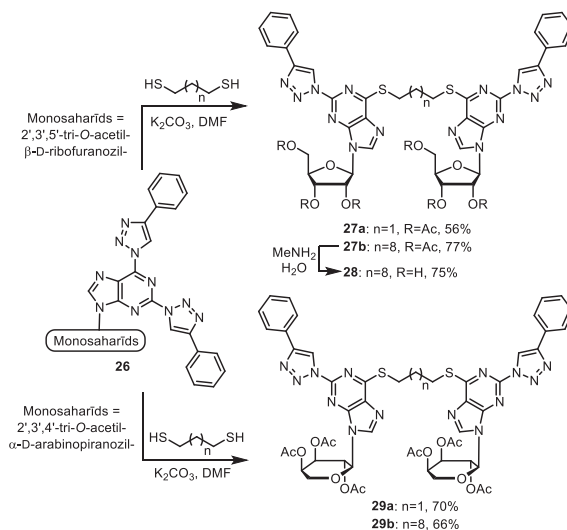
Izpētot 2,6-bis-triazolilatvasinājumu reakcijas ar amīniem, tika pierādīts, ka triazolilgredzens purīna C(6) pozīcijā darbojas kā laba aizejošā grupa. Tāpēc saskaņā ar 6. shēmas C variantu, nolēmām pievērsties nukleofilajām reakcijām ar tioliem. Aizvietošana tiolu gadījumā arī notiek C(6) pozīcijā. Reakciju var paātrināt, lietojot bāzes (piem., K_2CO_3 , NaH, Et_3N u.c.), kas atkarībā no pK_B vai nu izveido tiolāta anjonu vai arī deprotonē onija jonu. Kā šķīdinātāju var izmantot DMF vai THF. Kā *S*-nukleofilus izmantojām butāntiolu, cikloheksāntiolu, benziltiolu, oktāntiolu, dodekāntiolu, tiofenolu, 4-hlortiofenolu, 4-bromtiofenolu un citus un ieguvām produktus līdz pat kvantitatīviem iznākumiem (4. tabula). Acetilaisargrupas dotajos reakcijas apstākļos parasti nenošķēļas vai nošķēļas daļēji, tāpēc monosaharīdā neaizsargātu nukleozīdu iegūšanai produktu papildus apstrādā ar metilamīna vai amonjaka H_2O/THF šķīdumu.

4. tabula. 2,6-Bis-triazoliatvasinājumu **3** reakcijas ar tioliem



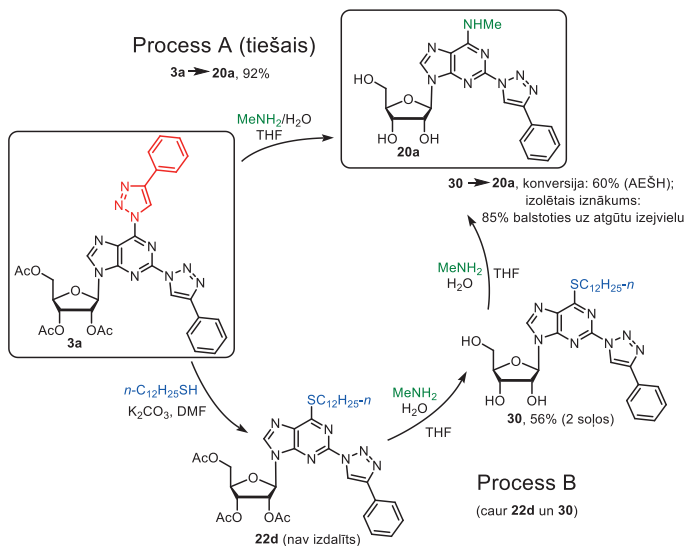
Nr. p. k.	Monosaharīds	R ¹	R ²	Produkts 22
1		C ₆ H ₅ -	4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ -	22a , 47%
2		C ₆ H ₅ -	4-Br-C ₆ H ₄ -	22b , 90%
3		C ₆ H ₅ -	4-Cl-C ₆ H ₄ -	22c , 68%
4		4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ -	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ -	22d , 65%
5		H ₃ COOC-	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ -	22e , 99%
6		H ₃ COOC-	4-Cl-C ₆ H ₄ -	22f , 59%
7		C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ CH ₂ -	22g , 95%
8		C ₆ H ₅ -	<i>n</i> -C ₄ H ₉ -	22h , kvant.
9		C ₆ H ₅ -	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁ -	22i , 97%
10		C ₆ H ₅ -	<i>n</i> -C ₈ H ₁₇ -	22j , 92%
11		4-Br-C ₆ H ₄ -	C ₆ H ₅ CH ₂ -	22k , 77%
12		C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -	C ₆ H ₅ CH ₂ -	22l , 89%
13		HO(CH ₃) ₂ C-	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ -	22m , 68%
14		HO(CH ₃) ₂ C-	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ -	22n , 99%

Lietojot tādus ditiolus kā 1,3-propānditiols un 1,10-dekānditiols un 2 ekvivalentus bis-triazola **26**, ieguvām dimērus **27–29** ar 56–77% iznākumu (8. shēma).



8. shēma. Bis-triazoliatvasinājuma **26** reakcijas ar ditioliem

C(6) Reģioselektivitāte *S*-nukleofīlu gadījumā tika pierādīta, izmantojot bis-triazolilatvasinājuma **3a** reakciju ar dodekāntiolu un iegūstot savienojumu **22d**. Tam uzmanīgi pievienojot metilamīnu, sākumā nošķēlas acetilgrupas un tiek iegūts starpsavienojums **30**, bet ilgstoši turpinot reakciju ar metilamīnu, mēs iegūstam jau iepriekš zināmu un pierādītu savienojumu **20a**, kuru var iegūt arī tiešā procesā reakcijā starp bis-triazolilatvasinājumu **3a** un metilamīnu (9. shēma). attiecīgā reģioselektivitāte tiešā veidā apstiprināta arī ar savienojuma **22c** rentgenstruktūranalīzi (skat. 8. attēls 4.3.2. nodaļā).



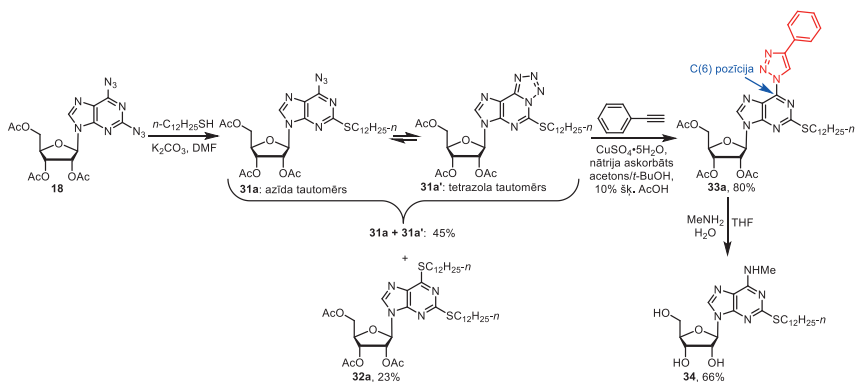
Originālpublikācija un patents par šīs nodaļas pētījumiem atrodami V un XII pielikumos.

4.3. 2,6-Diazidopurīnu nukleozīdu reakcijas ar tioliem

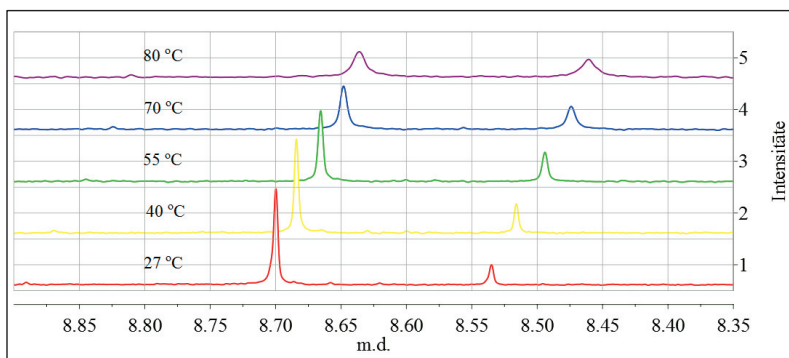
4.3.1. C(2) Alkiltiopurīnu nukleozīdu sintēze

Meklējot ekonomiskākus apstākļus mērķa savienojumu sintēzei, pievērsāmies citai sintēzes pieejai, sākotnēji veicot nukleofīlo aizvietošanas reakciju un tad sekojošu 1,3-dipolāro ciklopievienošanu. Literatūrā ir maz ziņu par azidogrupas apmaiņu ar nukleofīliem purīnu nukleozīdos. Veicot virkni reakciju starp 2,6-diazidopurīna nukleozīdu **18** un dažādiem alkiltioliem, nonācām pie secinājuma, ka aizvietošana alkiltioliu gadījumā notiek ar daļēju C(2) selektivitāti. Atvasinājuma **18** reakcijā ar dodekāntiolu pārsvarā radās

2-dodeciltio-6-azidopurīna nukleozīds **31**, kas pastāv divās tautomēras formās — azīda **31a** un tetrazola **31a'** formā (10. shēma). Azidopurīna-tetrazolo[5,1-i]purīna līdzsvaru pētījām ar KMR palīdzību dažādos šķīdinātajos un dažādās temperatūrās (5. attēls, 5. tabula). Balstoties uz tetrazola cikla elektronu atvelkošiem efektiem, tautomēra **31a'** H-C(8) signāls ^1H -KMR spektrā ir nobīdīts vājākos laukos nekā azīda **31a** H-C(8) signāls. Savukārt mazāk polārs šķīdinātājs un augstāka temperatūra nobīda līdzsvaru vairāk uz azīda formu. To arī pierāda 5. tabulā apkopotie rezultāti. Kā nukleofilās apmaiņas reakcijas blakusprodukts tika izdalīts savienojums **32a**.



10. shēma. Purīnu nukleozīdu **31**, **33** un **34** iegūšanas shēma



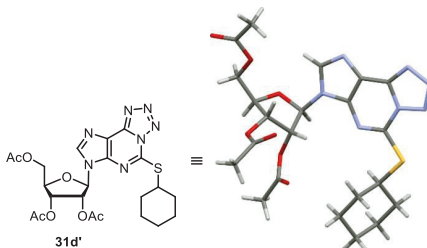
6. attēls. Tautomērā līdzsvara **31a**↔**31a'** KMR pētījumi DMSO- d_6 (300 MHz)

5. tabula. Azidopurīna-tetrazolo[5,1-i]purīna līdzsvara pētījumi CDCl₃ un DMSO-d₆

Nr. p. k.	Temp. (°C)	Attiecība azīds 31a : tetrazols 31a'
Šķīdinātājs: CDCl ₃		
1	25	80:20
2	40	87:13
3	55	89:11
Šķīdinātājs: DMSO-d ₆		
4	27	18:82
5	40	25:75
6	55	32:68
7	70	39:61
8	80	45:55

Tālāk veicām sekojošu 1,3-dipolārās ciklopievienošanās reakciju CuSO₄·5H₂O/nātrija askorbāta klātbūtnē un ieguvām produktu **33a** ar triazolilgredzenu C(6) pozīcijā. Iepriekš paši pierādījām, ka triazols purīna C(6) pozīcijā darbojas kā laba aizejošā grupa, tāpēc veicām iegūtā savienojuma **33a** reakciju ar metilamīnu, iegūstot produktu **34** ar 66% iznākumu.

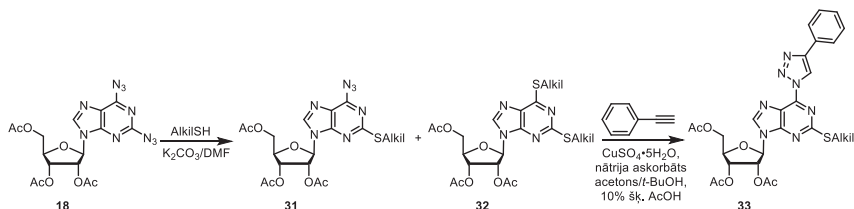
Tika veiktas arī 2,6-diazidopurīna **18** reakcijas arī ar citiem alkiltioliem, un 2-alkiltioproduktu izdalītie iznākumi tajās sasniedz līdz pat 74% (6. tabula). Pierādījums C(2) aizvietošanas selektivitātei ir produkta **31d'** tetrazola tautomēra kristāliskā struktūra (6. attēls), kura iegūta, kristalizējot no etanola. Savukārt šķīdumā (CDCl₃, KMR dati) produkts **31d** pastāv kā azīda un tetrazola maisījums ar azīda : tetrazola attiecību 78 : 22%.



6. attēls. Savienojuma **31d'** kristāliskā struktūra

Tālāk CuAAC reakcijā, kā alkīnu izmantojot fenilacetilēnu, no monoazido atvasinājumiem **31** tika iegūta jauna 2-alkiltio-6-triazolilpurīnu nukleozīdu **33** klase (6. tabula). Savienojumi **33** varētu tikt plaši izmantoti medicīnas ķīmijā un citu purīnu nukleozīdu sintēzē, piemēram, ar tiem var veikt nukleofilās aizvietošanas reakcijas ar dažādiem nukleofīliem, izmantojot triazolilgredzenu C(6) pozīcijā kā labo aizejošo grupu.

6. tabula. 2-Alkiltiopurīnu nukleozīdu sintēzes rezultāti

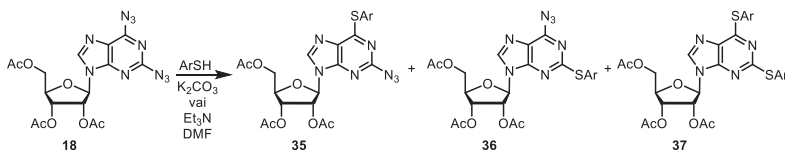


AlkilSH	Laiks, h	Produkts 31	Blakusprodukts 32	Produkts 33
C ₆ H ₅ CH ₂ SH	1	31b , 74%	—	33b , 91%
<i>n</i> -C ₄ H ₉ SH	72	31c , 74%	32c , 8%	33c , 89%
<i>c</i> -C ₆ H ₁₁ SH	24	31d , 62%	32d , 13%	33d , 81%

Oriģinālpublikācija par šīs nodaļas pētījumiem atrodama V pielikumā.

4.3.2. C(2) un C(6) ariltiopurīnu nukleozīdu sintēze

Pētījumu laikā nonācām pie secinājuma, ka ariltiolu gadījumā 2,6-diazidopurīnu nukleozīdu nukleofilā aizvietošana nav selektīva. Tā notiek gan C(2), gan C(6) purīna vietā. Kā blakusprodukts rodas 2,6-aizvietots produkts **37** (11. shēma). Reakcijā iegūto produktu **35–37** maisījumu ir ļoti grūti sadalīt, izmantojot kolonnas hromatogrāfiju. Nukleofilajā aizvietošanā kā ariltiolus izmantojām tiofenolu, 4-hlortiofenolu, 4-bromtiofenolu, 4-fluortiofenolu, 4-*t*-butiltiofenolu. Reakcijas veicām absolūtā DMF K₂CO₃ vai Et₃N klātbūtnē. Kā redzams no tabulas, tad Et₃N izmantošana samazina blakusprodukta **37** rašanos (11. shēma, 7. tabula).

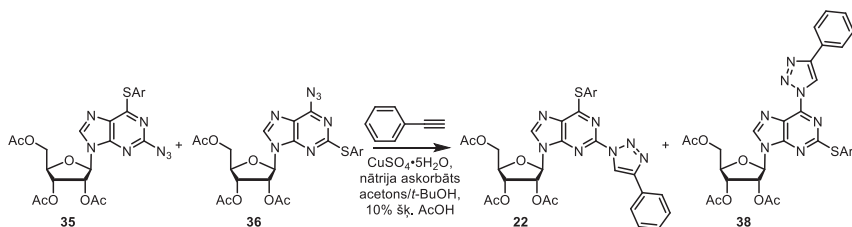


11. shēma. 2,6-Diazidopurīna nukleozīda **18** reakcijas ar ariltioliem

7. tabula. Iznākumi 2,6-diazidopurīna nukleozīda **18** reakcijās ar ariltioliem

Nr. p. k.	ArSH	Bāze	Laiks, h	Produkta 35 + 36 iznākums, %	Produkta 37 iznākums, %
1	C ₆ H ₅ SH	K ₂ CO ₃	4	21%	—
2	4-Cl-C ₆ H ₄ SH	K ₂ CO ₃	6	22%	4%
3	4-Br-C ₆ H ₄ SH	K ₂ CO ₃	3.5	38%	23%
4	4-F-C ₆ H ₄ SH	K ₂ CO ₃	0.17	48%	12%
5	4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ SH	K ₂ CO ₃	0.12	73%	10%
6	4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ SH	Et ₃ N	0.17	60%	1%
7	4-F-C ₆ H ₄ SH	Et ₃ N	0.17	34%	6%
8	C ₆ H ₅ SH	Et ₃ N	0.17	70%	2%

Iegūtos monoazidoatvasinājumu izdalītos produktus **35** un **36** izmantojām 1,3-dipolārajās ciklopievienošanās reakcijās ar fenilacetilēnu un salīdzinājām ar produktiem, kuri bija iegūti “tiešajā” procesā, veicot attiecīgā 2,6-bis-triazolilatvasinājuma nukleofīlu aizvietošanu ar dažādiem tioliem, kuru C(6) reģioselektivitāte bija pierādīta ķīmiskā ceļā. Secinājām, ka monoazidoatvasinājumu reakciju rezultātā iegūstām produktu maisījumu, kur ir gan 2-triazolilprodukts **22**, gan 6-triazolilprodukts **38** (12. shēma, 8. tabula).



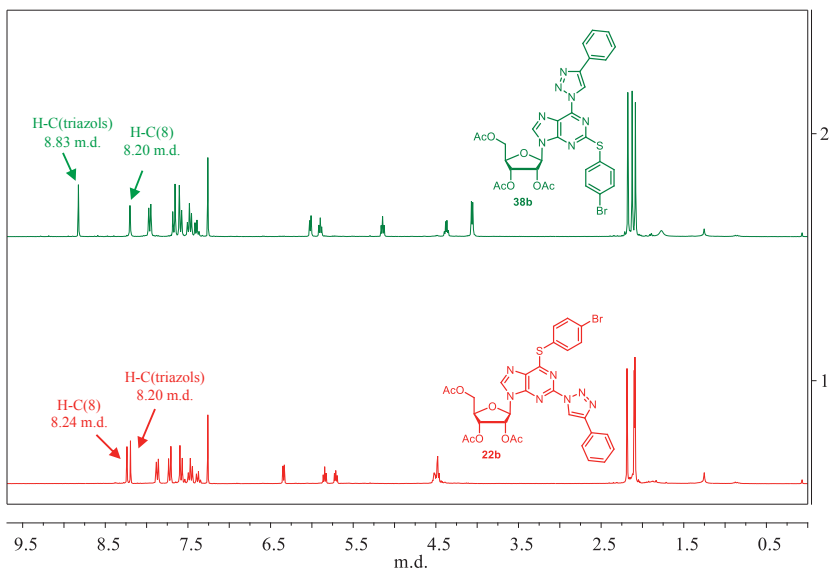
12. shēma. 1,3-Dipolārās ciklopievienošanās reakcija produktu **22** un **38** iegūšanai

8. tabula. 2-Triazolilproduktu **22** un 6-triazolilproduktu **38** reakciju rezultāti

Nr. p. k.	Ar-	Reakcijā lietota produktu 35 : 36 maisījuma AĒŠH attiecība	Laiks, h	Produkta 22 iznākums, %	Produkta 38 iznākums, %
1	4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ -	82% : 18%	2	22a , 55%	—
2		2% : 98%*	21	—	38a , 65%
3	4-Br-C ₆ H ₄ -	55% : 45%	4	22b , 29%	38b , 27%
4		42% : 58%	22	22b , 28%	38b , 34%
5	4-Cl-C ₆ H ₄ -	100%	3	22c , 91%	—

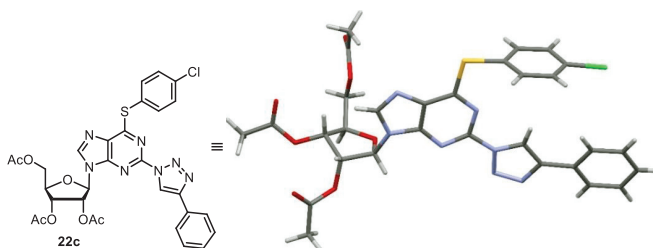
*Nukleofīlā heteroaromātiskā aizvietošana veikta Et₃N klātbūtnē

Salīdzināšanai ir attēloti produktu **22b** un **38b** ¹H-KMR spektri, no kuriem redzams, kā nobīdās signāli atkarībā no aizvietotāju novietojuma. C(6) Aizvietotam produktam **22b** purīna H-C(8) signāls ir pie 8.24 m. d., bet H-C(triazola) signāls pie 8.20 m. d., savukārt C(2) produktam **38b** H-C(triazola) signāls ir nobīdījies uz vājākiem laukiem un ir pie 8.83 m. d., bet purīna H-C(8) vietas signāls pie 8.20 m. d. (7. attēls).



7. attēls. Savienojumu **22b** un **38b** ^1H -KMR spektru salīdzinājums

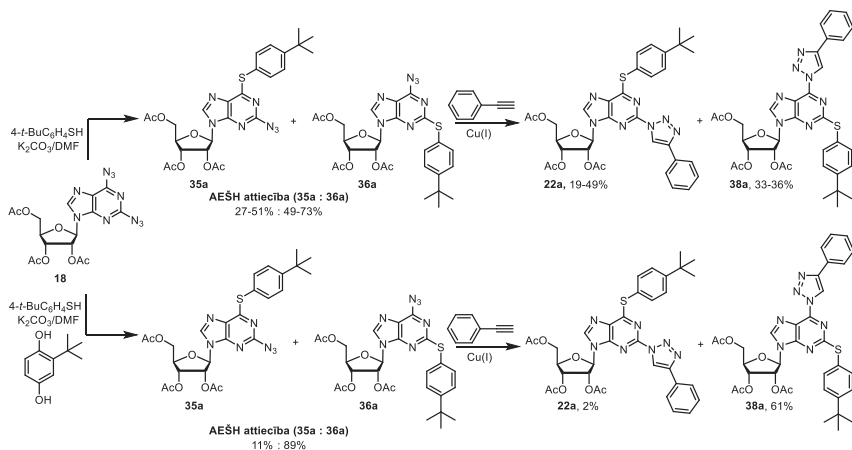
Vienam no iegūtiem C(6)-aizvietošanas produktiem izdevās iegūt kristālisko struktūru, kas arī konkrētajā gadījumā pierādīja nukleofilās aizvietošanas C(6) reģioizomēru (8. attēls).



8. attēls. Savienojuma **22c** kristāliskā struktūra

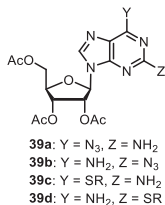
Tika uzsākti arī 2,6-diazidopurīnu nukleofilās apmaiņas mehānisma pētījumi. Zināms, ka atkarībā no apstākļiem aizvietošana var notikt pēc diviem mehānismiem: 1) pēc pievienošanās-atšķelšanās mehānisma, kas ietver Meizenheimera [Meisenheimer] kompleksa rašanos; 2) pēc elektrona pārneses mehānisma. Tika veikti divi neatkarīgi eksperimenti. Pirmajā gadījumā veicām 2,6-diazidopurīna **18** reakciju ar *t*-Bu-C₆H₄SH bez piedevām, bet otrajā gadījumā reakcijas maisījumam pievienojām *t*-butilhidrohinonu. Tad, neizdalot

atsevišķi produktus **35a** un **36a**, veicām tālāku reakciju ar fenilacetilēnu *t*-butanolā Cu(I) klātbūtnē. Kā redzams no 13. shēmas, tad reakcija, kas tika veikta bez piedevām, pagaidām ir ar vāju atkārtotamību. Taču var apgalvot, ka tajā ir novērojama sliktāka reģioselektivitāte nekā tas ir *t*-butilhidrohinona piedevas klātienē, kad daudz lielākā pārkumā radies C(2) aizvietots produkts **38a**.



13. shēma. 2,6-Diazidopurīna nukleozīda **18** nukleofilās reakcijas mehānisma pētījumi

2,6-Diazidopurīna nukleozīda **18** reakcijās ar ariltioliem kā blakusproduktus izdalījām un ar šķidrums hromatogrāfijas ar maselektīvo detektoru palīdzību definējām arī sākotnējās izejvielas un produkta reducētās formas **39a–d**, kas varētu liecināt, ka nukleofilā aizvietošana tiešām notiek pēc elektronu pārnese mehānisma (9. attēls). Šie pētījumi tiks turpināti.

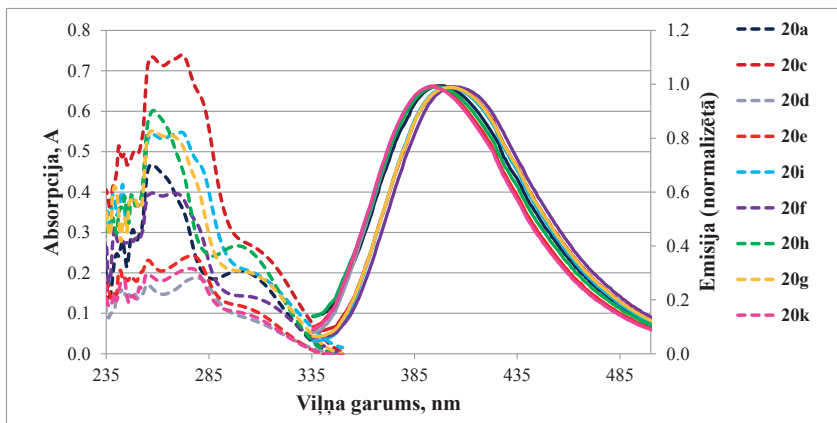


9. attēls. Izejvielas un produkta reducētās formas **39a–d**

5. Triazolilpurīnu nukleozīdu fluorescentās īpašības

Pēc definīcijas, fluorescence notiek tad, kad molekula pēc ierosināšanas no zemākā ierosināta līmeņa atgriežas vienā no svārstību pamata līmeņiem. Šajā procesā tiek emitēta gaisma ar garāku viļņa garumu nekā ierosināšanas starojumam. Šis process ir ļoti ātrs, un ilgst 10^{-8} līdz 10^{-6} s pēc ierosināšanas. Fluorescences metodes plaši pielieto analīzes un vizualizācijas mērķiem analītiskajā, bioloģiskajā un medicīnas ķīmijā. No literatūras bija zināms, ka purīnu nukleozīdiem ar azolilgredzenu C(8) pozīcijā un aminogrupu C(6) pozīcijā piemīt fluorescentās īpašības. Interesanti, ka iekļaujot šādu purīna nukleozīdu DNS struktūrā, fluorescentās īpašības joprojām saglabājas.¹⁹ Tas varētu kalpot par pamatu bioloģisko sensoru veidošanai, kas varēt būt viena no jaunām purīnu nukleozīdu pielietošanas iespējām.

Balstoties uz informāciju par azolilpurīnu potenciālajām fotofizikālajām īpašībām, nolēmām pārbaudīt mūsu jaunsintezētos savienojumus. Novērojam, ka *N*⁶-aizvietotie 2-triazoliladenīna nukleozīdi **20** fluorescē pie 392–404 nm, ja ierosināšana notiek pie 250–280 nm (10. attēls (absorbcijas spektri — pārtraukta līnija, emisijas spektri — nepārtraukta līnija), 9. tabula). Kā redzams no 10. attēla, absorbcijas spektriem raksturīgi divi maksimumi. Absorbcijas spektru paraugiem $c = 1,1 \dots 2,3 \cdot 10^{-5}$ M, bet emisijas spektru paraugiem $c = 1,1 \cdot 10^{-5}$ M. Šo fluorescējošo savienojumu kvantu iznākumi sasniedz 53%.

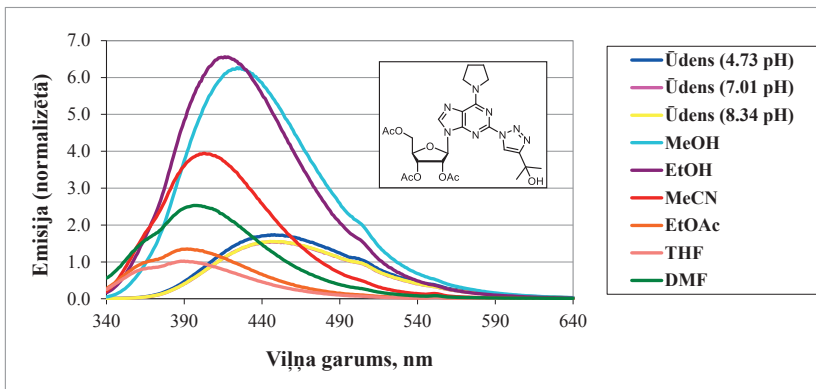


10. attēls. Ar nukleofiliem aizvietotu savienojumu **20** absorbcijas un emisijas spektri DMSO

9. tabula. Savienojumu **20** absorbcijas un emisijas spektru raksturlielumi

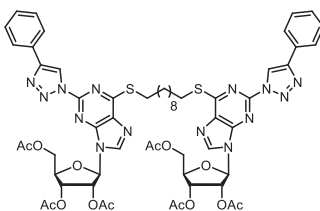
Nr. p. k.	R ¹	-NR ² R ³	Produkts 20	λ _{max} (Abs), (nm) (DMSO)	λ _{max} (Emis), (nm) (DMSO)	Kvantu iznākums, %
Ribofuranozilsērija						
Monosaharīds = β-D-ribofuranozil-						
1		-NHMe	20a , 92%	257/300	398	32
2			20c , 96%	257/271	402	50
3			20d , 89%	255/278	394	38
4			20e , 86%	255/296	394	33
Arabinopiranozilsērija						
Monosaharīds = α-D-arabinopiranozil-						
5			20f , 88%	257/267	404	53
6		-NMe ₂	20g , 91%	258/266	402	50
7		-NHMe	20h , 73%	258/299	396	33
8			20i , 96%	257/271	401	51
9			20k , 69%	255/275	393	34

Tālāk ir parādīti ribofuranozilatvasinājuma **20p** emisijas spektri dažādos šķīdinātājos (11. attēls). Kā redzams, lielāka intensitāte piemīt emisijas spektriem MeOH un EtOH šķīdumos ar emisijas maksimumiem pie 420–430 nm, savukārt, emisijas spektri ūdens vidē ir ar zemu intensitāti un ir nobīdīti bathromi un to maksimumi ir pie 450 nm. Pētāmā savienojuma **20p** šķīdumu koncentrācijas bija $1,19 \cdot 10^{-5}$ līdz $1,55 \cdot 10^{-5}$ M un ierosināšanas viļņa garums bija 277 nm.

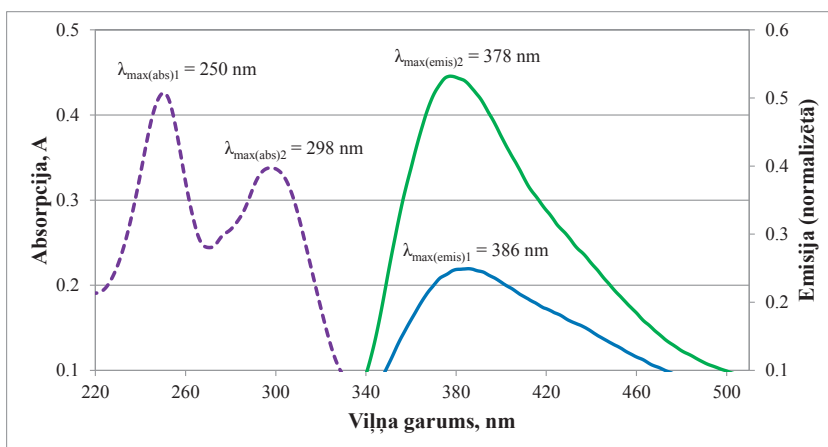


11. attēls. 9-(β-D-Ribofuranozil)-2-(4-(2-hidroksiropān-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-6-(pirrolidin-1-il)-9H-purīna **20p** emisijas spektri dažādos šķīdinātājos

Ar *S*-nukleofīliem aizvietotiem savienojumiem fluorescentās īpašības ir daudz vājākās. Kā piemērs parādīti dimēra **27b** absorbcijas un emisijas spektri MeOH (12. attēls, 13. attēls).



12. attēls. Dimēra **27b** struktūra



13. attēls. Savienojuma **27b** absorbcijas un emisijas spektri MeOH

Originālpublikācija par šīs nodaļas pētījumiem atrodama VI pielikumā.

6. Triazolipurīnu nukleozīdu bioloģiskā aktivitāte

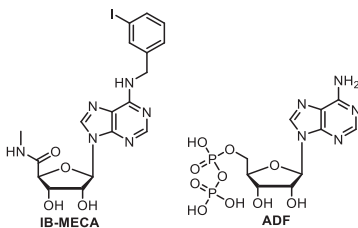
6.1. Iedarbība uz adenoziņa un purīnērgiskiem receptoriem

Adenoziņa receptori (AR) ir ar *G*-proteīnu saistītie receptori, kam šobrīd zināmas četras apakšklases — A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3 . Adenoziņa receptors A_1 izrāda augstu, bet A_3 zemu afinitāti pret adenoziņu. Tie abi iedarbojas inhibējoši uz adenilciklāzes aktivitātes regulēšanu. Augstas afinitātes A_{2A} un zemas afinitātes A_{2B} apakštipu aktivēšana stimulē adenilciklāzi, kuras rezultātā palielinās cAMP līmenis. Sākotnējais farmakoloģiskais pierādījums AR esamībai bija metilksantīna, kofeīna un teofilīna specifiskais antagonisms uz adenoziņa

inducēto efektu sirdī un smadzenēs. Adenozīna receptori ir izvietoti pa visu ķermeni, un to esamība gandrīz katrā šūnā padara tos par interesantiem farmakoloģiskiem mērķiem daudzās patofizioloģiskajās situācijās, kas saistītas ar adenozīna līmeņa palielināšanos. Iedarbošanās uz adenozīna receptoriem ir kļuvusi par daudzsoļu stratēģiju neiroloģisko traucējumu, astmas un sirds un nieru mazspējas ārstēšanai.²⁰

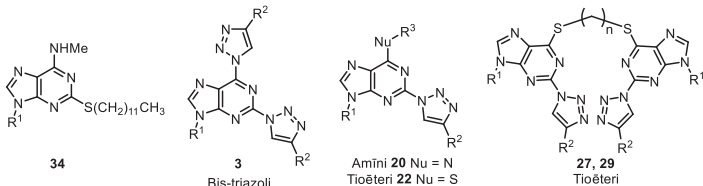
Purīnērgiskie receptori ir membrānas receptori, kas iedalās P1 (adenozīna receptores) un P2 (nukleotīdu receptores).^{3b, 3c, 21} P2 receptori tiek aktivēti gan ar pirimidīna, gan ar purīna nukleotīdiem. ADF uzsāk trombocītu agregāciju, vienlaicīgi aktivējot divus ar *G*-proteīnu saistītos receptorus — P2Y1 un P2Y12. P2Y1 aktivācija aktivizē fosfolipāzi C un izsauc formas izmaiņas, kamēr P2Y12 piesaistās pie guanozīna 5-trifosfāta saistoša proteīna (Gi), samazinot adenilciklāzes aktivitāti. P2Y12 receptors ir mērķis tādām antitrombocītu zālēm kā klopidoģrels un tiklopidīns.²²

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra pētnieces Ramona Petrovska un Ilona Mandrika jaunsintezētiem savienojumiem noteica to spēja iedarboties uz adenozīna un purīna receptoriem. Izpētē tika izmantotas cilvēka A₃ receptoru stabili transfektētas Flp-In-Hek293 šūnas un P2Y12 ekspresējošā šūnu līnija C6 (žurkas glioblastoma). Tā kā A₃ un P2Y12 receptoru ligandi veic daļu no fizioloģiskajām funkcijām, inhibējot adenilātciklāzi, tad to funkcionālā aktivitāte tika pārbaudīta ar intracelulārā cAMF līmeņa noteikšanas metodi. cAMF līmeņa izmaiņas tika mērītas 3 μM forskolīna klātbūtnē, kas paaugstina šūnu bazālo cAMF līmeni. Rezultāti attēloti kā vidējais mērījums ± vidējā standartklūda no 2–3 neatkarīgiem eksperimentiem. Rezultāti atspoguļoti kā forskolīna stimulētā cAMF līmeņa (100%) inhibēšana 50 μM liganda (pētāmais savienojums) klātienē. Kā standartvielas cAMF līmeņa noteikšanai eksperimentu laikā izmantoja literatūrā zināmu selektīvu A₃ adenozīna receptora agonistu IB-MECA²³ un P2Y12 receptora agonistu adenozīna difosfātu (ADF) (14. attēls).^{3b, 3c, 21} IB-MECA tika ņemts 50 μM koncentrācijā un tas uzrādīja vidējo aktivitāti 61 ± 6%. ADF kā standartviela tika ņemts 10 μM koncentrācijā un tas uzrādīja vidējo aktivitāti 86 ± 10% (10. tabula).



14. attēls. Standartvielas: IB-MECA un ADF

10. tabula. Purīnu nukleozīdu iedarbība uz adenoziņa un purīnērgiskiem receptoriem



Savienojumi	R ¹	R ²	NuR ³	Forskolinā stimulētā cAMF līmeņa inhibēšana (%)	
				A ₃ receptori	P2Y ₁₂ receptori
34	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetil-β-D-ribofuranozil-	—	—	37 ± 5	14 ± 3
3c		4-Br-C ₆ H ₄ -	—	34 ± 13	47 ± 7
3d		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -	—	32 ± 11	60 ± 12
3s		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -	—	33 ± 11	18 ± 9
3t		4-MeO-C ₆ H ₄ -	—	48 ± 2	61 ± 1
3u		4-Me ₂ N-C ₆ H ₄ -	—	92 ± 3	88 ± 3
22p	2',3',4'-Tri- <i>O</i> -acetil-α-D-arabinopiranozil-	C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	NA	21 ± 8
20g	α-D-Arabinopiranozil-	C ₆ H ₅ -	Me ₂ N-	NA	23 ± 8
22g	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetil-β-D-ribofuranozil-	C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	NA	31 ± 10
20e	β-D-Ribofuranozil-	HO(CH ₃) ₂ C-		NA	21 ± 8
20p		HOCH ₂ -	Me ₂ N-	NA	31 ± 7
20q		4-Me-C ₆ H ₄ -		42 ± 5	43 ± 15
20r		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -		43 ± 11	28 ± 6
20s		4-F-C ₆ H ₄ -		42 ± 9	14 ± 7
20t		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -		52 ± 12	40 ± 1
20u		4-Br-C ₆ H ₄ -		50 ± 11	46 ± 15
20v		4-MeO-C ₆ H ₄ -		35 ± 14	12 ± 3
20w		4-Me-C ₆ H ₄ -		37 ± 9	40 ± 11
20x		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -		26 ± 8	50 ± 14
20y		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -		61 ± 4	62 ± 21
20z		4-Br-C ₆ H ₄ -		29 ± 15	44 ± 10
20aa		4-MeO-C ₆ H ₄ -		41 ± 8	NA
29a	2',3',4'-Tri- <i>O</i> -acetil-α-D-arabinopiranozil-	C ₆ H ₅ -	<i>n</i> = 3	NA	14 ± 6
29b		C ₆ H ₅ -	<i>n</i> = 10	NA	29 ± 11
27b	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetil-β-D-ribofuranozil-	C ₆ H ₅ -	<i>n</i> = 10	NA	23 ± 11
1B-MECA				61 ± 6	—
ADF				—	86 ± 10

Apskatītiem savienojumiem piemīt adenoziņa A₃ un purīnērgiskā P2Y₁₂ receptoru agonista aktivitāte. Kā piemērus var minēt savienojumus **3d**, **3t**, **3u**, **20y**, kuri ir iekrāsoti

10. tabulā gaiši zilā krāsā, kuru aktivitātes ir līdzvērtīgas standartvielu aktivitātēm vai lielākas. Piemēram, savienojums **3u** inhibē forskolīna stimulēto cAMF līmeni par $92 \pm 3\%$ A_3 receptora gadījumā, bet standarts IB-MECA inhibē par $61 \pm 6\%$.

Vielas tika pārbaudītas arī uz adenoizīna A_{2A} un A_{2B} receptoriem, kas saistīti ar stimulējošo *G*-proteīnu, bet attiecībā uz šiem receptoriem vielas nav aktīvas.

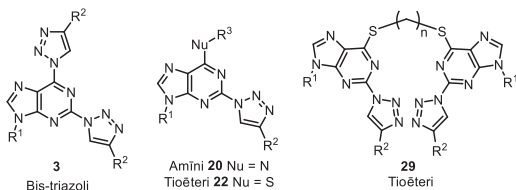
Līdz ar to var teikt, ka savienojumi ir selektīvi pret receptoriem, kas saistīti ar inhibējošo *G*-proteīnu (A_3 un P2Y12). Atklātās īpašības varētu izmantot jaunu farmaceitiski aktīvu preparātu dizainam, kurus veiksmes gadījumā turpmāk varētu lietot, piemēram, sirds un asinsvadu slimību ārstēšanai.

Patents par šīs nodaļas pētījumiem atrodams VIII pielikumā.

6.2. Pretvīrusu iedarbība

Sadarbībā ar Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centru uzsakām pretvīrusu aktivitātes izpēti ar jauniegūto purīnu nukleoizīdu analoģu iedarbību uz cilvēka enterovīrusu ECHO-7. Eksperimentos tika izmantotas cilvēka rābdomiosarkomas šūnas, kuras sākumā 4 stundas preinkubē ar $100 \mu\text{M}$ vielu šķīdumiem bezseruma vidē, pēc tam 1 stundu inficē ar cilvēka enterovīrusu ECHO-7 (Enteric Cytopathic Human Orphan virus) citopatogēnā devā ($106 \text{ CPD}_{50}/\text{ml}$). Pēc infekcijas šūnas noskalo un tālāk kultivē bezseruma vidē $100 \mu\text{M}$ vielu klātbūtnē. Kā kontroli izmanto šūnas, kas kultivētas bezseruma vidē ar/bez vīrusa. Citolītisko efektu novērtē vizuāli gaismas mikroskopā 48 stundas pēc infekcijas, kad 100% inficētas kontroles šūnas ir lizētas, bet neinficētās šūnas saglabā 100% monoslāni (11. tabula). tabulā apkopoti savienojumi, kuri kavē vīrusa citolītisko efektu.

11. tabula. Savienojumi, kuri izsauc vīrusa citolītiska efekta kavēšanu



Savienojums	R ¹	R ²	NuR ³
3c	2',3',5'-Tri- <i>O</i> - acetil-β-D- ribofuranozil-	4-Br-C ₆ H ₄ -	—
3d		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -	—
20ab		HO(CH ₃) ₂ C-	H ₂ N-
22p		C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-
20f		C ₆ H ₅ -	
20ac	α-D-Arabino- piranozil-		H ₂ NHN-

Savienojums	R ¹	R ²	NuR ³
20p	β-D-Ribofuranozil-	4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -	
20r		4-F-C ₆ H ₄ -	
20s		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -	
29b	2',3',4'-Tri-O-acetil-α-D-arabinopiranozil-	C ₆ H ₅ -	n = 10

Sadarbībā ar REGA institūtu Beļģijā Dr. Pīters Leisens mūsu purīnu nukleoīdus pārbaudīja uz virkni dažādu citu vīrusu, piemēram, Čikungunja vīrusu (*Chikungunya virus*), peļu norovīrusu, enterovīrusu 71 un dzeltenā drudža vīrusu.

Čikungunja ir vīrusu slimība, ko pārnēsā moskīti, kuri izplatīti Āfrikā, Dienvidēiropā, Dienvidaustrumāzijā un Indijas un Klusā okeāna salās. Tas ir alfavīruss, kas pieder pie *Togaviridae* vīrusu dzimtas. Tam ir sfēriska forma (60–70 nm diametrā). Čikungunja genoms sastāv no vienas pozitīvi virzītās RNS molekulas, kur ir kodēti 4 nestrukturālie un 3 strukturālie proteīni. Saslimšana parasti izpaužas kā drudzis un smagas locītavu sāpes, dažreiz arī kā galvassāpes, muskuļu sāpes un locītavu pietūkums vai izsitumi. Līdz šim vēl nav atrasti medikamenti, kas varētu izārstēt šo slimību, bet ir tādi, kas samazina drudzi un sāpes. Vīruss lielākoties ietekmē aknas, muskuļus, locītavas un smadzenes, dažos gadījumos tās var izraisīt arī ilgstošu akūto saslimšanu.²⁴

Dzeltenā drudža vīruss, kas oriģināli saucams arī par vīrusa hemorāģisko drudzi, ir sistēmiska saslimšana, ko raksturo augsta virēmija, aknu, nieru un miokarda bojājumi, asiņošana un augsts mirstības līmenis. Tās var ietekmēt centrālo nervu sistēmu, izsaucot delīriju, krampjus un pat komu. Vīruss pieder *Flaviviridae* vīrusu dzimtai un ir viens no RNS vīrusiem, ko parasti pārnēs moskīti vai ērces. Vīruss ir mazs (40–60 nm diametrā), sfērisks, ar īsu virsmas projekciju. Tās satur viendaļīgu RNS genomu un vienkodola proteīnu (C proteīnu), kas ieskaits ar lipīdu dubultslāņi. Vīruss bieži sastopams Āfrikas un Dienvidamerikas tropiskajos un subtropiskajos reģionos. 30 000 cilvēku mirst katru gadu no šī nežēlīga vīrusa, 90% no tiem dzīvo Āfrikā. Līdz šim zāļu tā ārstēšanai nav. Vienīgi vakcinēšanas varētu pasargāt no inficēšanas.²⁵

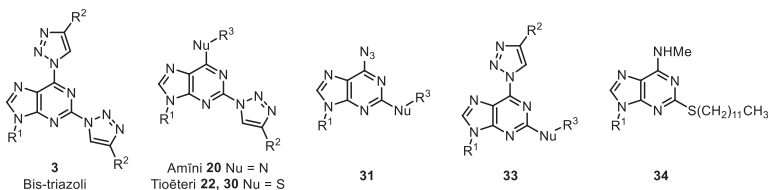
Enterovīruss 71 arī pieder RNS vīrusu klasei. Tās izsauc roku, pēdu, mutes, nagu sērgu, aseptisku meningītu un galvas smadzeņu encefalītu. Lielākoties no šī vīrusa cieš bērni.²⁶ Arī šim vīrusam nav atrasts efektīvs ārstēšanas veids.

Peļu norovīruss ir RNS vīruss, kas skar peles un izsauc tām caureju, svara zudumu un sekojošo nāvi.²⁷

Ir atklāts, ka daži no mūsu savienojumiem ir aktīvi pret dzeltenā drudža vīrusu (12. tabula), bet daži no tiem savukārt ir aktīvi pret Čikungunja vīrusu (13. tabula). Daži no savienojumiem izrāda aktivitāti arī pret enterovīrusu 71. Savukārt, neviens no savienojumiem

neizrādīja selektīvu antivirālu efektu pret peļu norovīrusu. Tika atklāts, ka daži savienojumi turklāt ir toksiski dzīvajām neinficētajām šūnām.

12. tabula. Purīnu nukleozīdu antivirālā aktivitāte uz dzeltenā drudža vīrusu



Savienojums	R ¹	R ²	NuR ³	Dzeltenais drudzis 17D Stamaril	
				EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
3p	2',3',4'-Tri- <i>O</i> - acetil-α-D- arabinopiranozil-	CH ₃ (CH ₂) ₄ -	—	>153	
3k		C ₆ H ₅ -	—	4,11 ± 0,727	6,44 ± 1,03
3o		CH ₃ (CH ₂) ₃ -	—	>160	
3v		2-F-C ₆ H ₄ -	—	1,08 ± 0,306	4,31 ± 1,35
3r	2',3',5'-Tri- <i>O</i> - benzoi-α-D- arabinofuranozil-	HO(CH ₃) ₂ C-	—		1,29
3c	2',3',5'-Tri- <i>O</i> - acetil-β-D- ribofuranozil-	4-Br-C ₆ H ₄ -	—	66,5	>122
3t		4-MeO-C ₆ H ₄ -	—	33	3,05
3u		4-Me ₂ N-C ₆ H ₄ -	—	3,37	11,3 ± 0,484
20ad	α-D- Arabinopiranozil-	C ₆ H ₅ -	(CH ₃ (CH ₂) ₂) ₂ N-		
20j		HOCH ₂ -	MeNH-	8,08	10,3 ± 1,82
20ae		HO(CH ₃) ₂ C-	Me ₂ N-	43,6	72,6 ± 5,89
20n	α-D- Arabinofuranozil-	HO(CH ₃) ₂ C-	Me ₂ N-	3,48	4,61 ± 0,643
20af	β-D- Ribofuranozil-	4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ -	MeNH-		
20q		4-Me-C ₆ H ₄ -		87	127 ± 41,1
20r		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -		8,42	32,1 ± 1,1
20s		4-F-C ₆ H ₄ -		24 ± 4,79	125 ± 21,5
20t		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -		4,29	8,03 ± 0,148
20u		4-Br-C ₆ H ₄ -		30,2 ± 8,29	108 ± 43
20ag		4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ -		3,16 ± 0,372	6,27 ± 1,88
20c		C ₆ H ₅ -		13 ± 0,593	35,6 ± 16,6
20w		4-Me-C ₆ H ₄ -		6,46 ± 0,697	15,1 ± 3,62
20x		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -		27,9 ± 23,7	110 ± 23,9
20z		4-Br-C ₆ H ₄ -		18,5 ± 8,15	42,9 ± 28,4
22m	2',3',4'-Tri- <i>O</i> - acetil-α-D- arabinopiranozil-	H ₃ COOC-	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ S-	3,19 ± 0,365	9,81 ± 1,86
22g	2',3',5'-Tri- <i>O</i> - acetil-β-D- ribofuranozil-	C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	4,48 ± 0,356	10,7 ± 1,94
22q		C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ S-	>159	
22e		H ₃ COOC-	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ S-	9,33 ± 4,85	30,3 ± 18,8
22f		H ₃ COOC-	4-Cl-C ₆ H ₄ S-	6,03 ± 2,09	16,8 ± 3,64
22i		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	1,76	2,81 ± 0,258
22k		4-Br-C ₆ H ₄ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	6,74 ± 5,57	18,4 ± 8,48
22r		H ₃ COOC-	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁ S-	34,7 ± 1,14	52,2 ± 6,08
22h		C ₆ H ₅ -	<i>n</i> -C ₄ H ₉ S-	7,61	10,6 ± 3
22c		C ₆ H ₅ -	4-Cl-C ₆ H ₄ S-	6,73	12,9 ± 3,87
22i		C ₆ H ₅ -	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁ S-		30,3
30	β-D- Ribofuranozil-	C ₆ H ₅ -	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ S-	3,68 ± 0,575	54,8 ± 18,5

Savienojums	R ¹	R ²	NuR ³	Dzeltenais drudzis 17D Stamaril	
				EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
31b	2',3',5'-Tri-O-acetil-β-D-ribofuranozil-	—	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	>185	
31c		—	<i>n</i> -C ₄ H ₉ S-	91,2 ± 5,27	117 ± 22,1
31d		—	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁ S-		
33a		C ₆ H ₅ -	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ S-	4,69 ± 1,98	47,1 ± 19,2
33b		C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	6,49 ± 0,468	16,8 ± 0,876
33c		C ₆ H ₅ -	<i>n</i> -C ₄ H ₉ S-	12,9 ± 4,41	19,4 ± 4,41
33d		C ₆ H ₅ -	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁ S-	2,85 ± 0,552	7,02 ± 1,04
34		—	—	23,5 ± 6,07	116 ± 34,1

Zaļa krāsa — savienojumam piemīt antivirālais efekts (savienojums pilnīgi aizsargā šūnu pret vīrusa izraisīto šūnu bojāeju, bez nelabvēlīgām sekām uz saimnieka šūnu vai vienslāņa morfoloģiju), atkārtojami rezultāti; gaiši zaļa krāsa — savienojumam piemīt antivirālais efekts, bet rezultāti nav atkārtojami; dzeltena krāsa — savienojums neatbilst atlasē kritērijiem; sarkana krāsa — savienojums ir neaktīvs.

13. tabula. Purīnu nukleozīdu antivirālā aktivitāte uz Čikungunja vīrusu

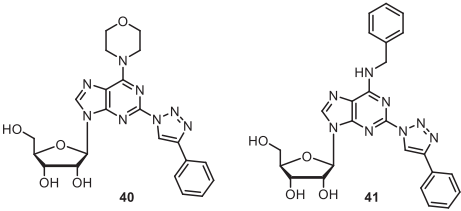
Savienojums	Čikungunja vīruss 899	
	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
20ad	4,12 ± 1,78	143 ± 58,1
20ag	3,38 ± 0,839	12,7 ± 2,4
22m	7,03 ± 1,17	14,6 ± 2,79
22e	26,6 ± 6,82	30,4 ± 17,9
22r	53,6 ± 21	144
22h	3,67 ± 0,593	10,2 ± 1,89
22c	7,29 ± 3,84	37,6 ± 22,1
31b	13,7 ± 3,63	75,4 ± 43,2
31d	43 ± 10,3	127 ± 3,81
33d	2,76 ± 0,2	7,92 ± 1,8

Savienojumu vispārējās struktūras skat. 12. tabulā.

Patents par šīs nodaļas pētījumiem atrodams IX pielikumā.

6.3. Citotoksicitātes pētījumi

2012. gadā M. K. Lakšmana [M. K. Lakshman] grupā sintezētie C(2) triazoliladenozīna analogi **40** un **41** demonstrēja izteiktu antiproliferatīvo aktivitāti cilvēka olnīcu un taisnās zarnas vēža šūnu kultūrās (15. attēls). attiecībā uz DNS un RNS vīrusiem, daži C(2) triazolilinozīna atvasinājumi parādīja vāju inhibējošo aktivitāti pret citomegalovīrusu.^{4c}

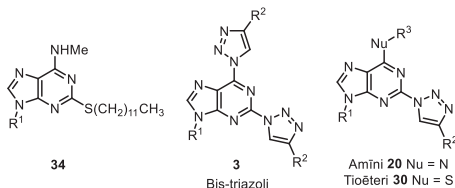


15. attēls. M. K. Lakšmana grupā sintezēti savienojumi **40** un **41**

Šie savienojumi bija vienīgie līdz šim zināmie bioloģiski aktīvie triazolilpurīnu atvasinājumi. Savukārt, purīnu 2,6-bis-triazolilatvasinājumi un 2-triazolil-6-tiopurīnu atvasinājumi šajā kontekstā vispār nav zināmi.

Daļai no mūsu savienojumiem Latvijas Organiskās sintēzes institūtā Irina Šestakova un vadošais pētnieks Grigorijs Veinbergs pārbaudīja pretvēža aktivitāti uz šūnu līnijām HT-1080 (cilvēka plaušu fibrosarkoma), MG-22A (peļu hepatoma) un uz normālās šūnu līnijas NIH 3T3 (peļu embrija fibroblasti). Rezultāti pierāda, ka savienojumiem **3a**, **3k**, **3r**, **20w**, **20x** raksturīgs augsts citotoksisks efekts uz abām šūnu līnijām, savienojumam **3v** piemīt augsts citotoksisks efekts uz šūnu līniju MG-22A, bet uz šūnu līniju HT-1080 efekta nav. Savukārt, savienojumiem **3f**, **3m**, **3s**, **20d**, **20ak** citotoksisks efekts nepiemīt. Savienojuma **3p** piemīt augsts citotoksisks efekts uz MG-22A, bet vidējs uz HT-1080. Savienojumam **20y** raksturīgs augsts citotoksisks efekts uz HT-1080 un zems uz MG-22A. Savukārt, savienojumiem **3b**, **3w**, **20c**, **20e**, **20f**, **20z**, **20aa** un **30** ir vidējs citotoksisks efekts uz abām šūnu līnijām. Interesanti, ka savienojums **3c** ir vidēji toksisks uz MG-22A, bet uz HT-1080 šūnām tam efekta nav. Savukārt savienojumam **34** piemīt augsts citotoksisks efekts uz HT-1080 šūnām, bet vidējs uz MG-22A. Nozīmīgi ir tas, ka gan **3c**, gan **34** ir klasificējami kā nekaitīgi dzīvajām šūnām (14. tabula).

14. tabula. Savienojumu salīdzinošais raksturojums pēc IC₅₀ (μg/ml)



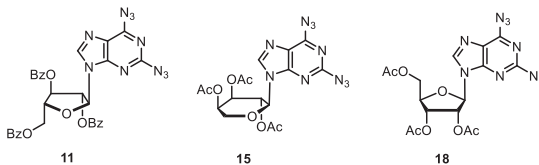
Savienojums	R ¹	R ²	NuR ³	HT-1080	MG-22A	3T3	
				IC ₅₀ (μg/ml) MTT	IC ₅₀ (μg/ml) MTT	IC ₅₀ (μg/ml) NR	LD ₅₀ (mg/kg)
3a	2',3',5'-Tri-O-acetil-β-D-ribofuranozil-	C ₆ H ₅ -	—	4	1	2	199
3b		4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ -	—	42	53	940	3902
3c		4-Br-C ₆ H ₄ -	—	>100	15	*	>2000
3f		HO(CH ₂) ₂ C-	—	>100	*	>1000	>2000
3s		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -	—	*	*	*	>2000
3t		4-MeO-C ₆ H ₄ -	—	>100	25	*	>2000
3u		4-Me ₂ N-C ₆ H ₄ -	—	*	25	*	>2000
3w		4-F-C ₆ H ₄ -	—	49	15	>1000	>2000
3k	2',3',4'-Tri-O-acetil-α-D-arabino-piranozil-	C ₆ H ₅ -	—	10	3	3	266
3m		HO(CH ₂) ₂ C-	—	*	*	>1000	>2000
3n			—	54	>100	246	1896
3p		H ₃ C(CH ₂) ₄ -	—	38	9	19	587
3v		2-F-C ₆ H ₄ -	—	>100	2	1	140
20ak		HOCH ₂ -	H ₂ N-	*	*	711	2634

Savienojums	R ¹	R ²	NuR ³	HT-1080 IC ₅₀ (µg/ml) MTT	MG-22A IC ₅₀ (µg/ml) MTT	3T3	
						IC ₅₀ (µg/ml) NR	LD ₅₀ (mg/kg)
3r	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -benzoyl- α -D-arabino-furanozil-	HO(CH ₃) ₂ C-	—	2	3	6	407
20e	β -D-Ribo-furanozil-	C ₆ H ₅ -		55	44	>1000	>2000
20c		C ₆ H ₅ -		21	32	12	407
20d		HOCH ₂ -		*	*	>1000	>2000
20w		4-Me-C ₆ H ₄ -		6	2	16	443
20x		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -		6	3	364	2021
20y		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -		10	88	>1000	>2000
20z		4-Br-C ₆ H ₄ -		21	13	147	1335
20aa		4-MeO-C ₆ H ₄ -		29	56	224	1474
20f	α -D-Arabino-piranozil-	C ₆ H ₅ -		13	41	791	2415
20ac		C ₆ H ₅ -	H ₂ NHN-	*	20	>1000	>2000
30	β -D-Ribo-furanozil-	C ₆ H ₅ -	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ S-	29	20	*	>2000
34	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetyl- β -D-ribofuranozil-	—	—	6	35	642	2614

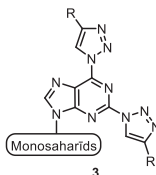
„*” — savienojumam nav citotoksiskā efekta

SECINĀJUMI

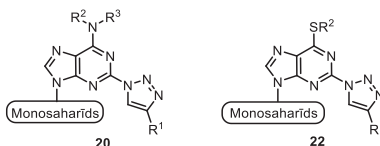
1. Izstrādātas metodes 2,6-diazidopurīnu nukleozīdu **11**, **15** un **18** iegūšanai. Konverģentā metode, kas balstās uz 2,6-diazidopurīna Forbrugena glikozilēšanas apstākļiem, deva augstāku kopējo iznākumu. 2,6-Diazidopurīns ir labi piemērots sililēšanai un tālākai reakcijai Luisa skābes klātienē.



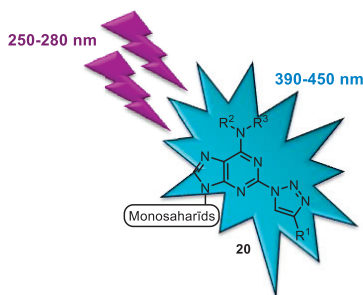
2. Iegūta jauna iepriekš nezināma 2,6-bis-(1,2,3-triazol-1-il)purīnu nukleozīdu **3** klase, izmantojot Cu(I) katalizētu 1,3-dipolāro ciklopievienošanos (CuAAC) reakciju starp 2,6-diazidopurīnu atvasinājumiem un dažādiem alkil-, hidroksialkil-, aril- un monosaharīda fragmentu saturošiem terminālajiem alkīniem. CuAAC reakciju iznākumus var uzlabot, reakcijas maisījumam pievienojot 10% AcOH šķīdumu. Produktu iznākumi var sasniegt pat 83%.



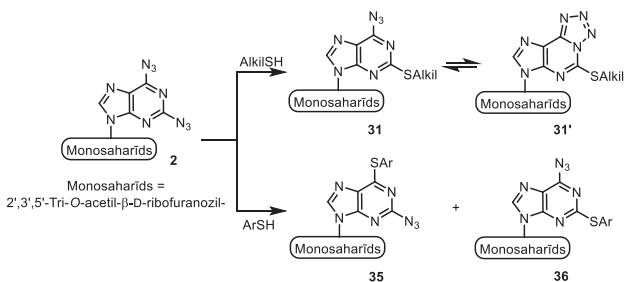
3. 2,6-Bis-triazolilatvasinājumu nukleoofilajās heteroaromātiskajās reakcijās ar dažādiem amīniem un tioliem tika pierādīts, ka 1,2,3-triazolilgrupa purīna C(6) pozīcijā darbojas kā laba aizejošā grupa. *N*⁶-Aizvietotu 2-triazoliladenīna nukleozīdi **20** tika iegūti ar iznākumiem līdz 97% un 6-tio-2-triazolilpurīnu nukleozīdi **22** ar iznākumiem no 59% līdz 99%.



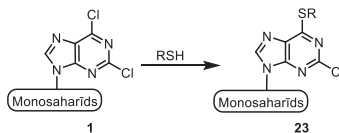
4. *N*⁶-Aizvietotiem 2-triazoliladenīna nukleozīdiem **20** piemīt izteiktas fluorescentās īpašības. Šo savienojumu kvantu iznākumi dimetilsulfoksīdā sasniedz 53%.



5. 2,6-Diazidopurīna nukleozīda **2** reakcijās ar alkiltioliem ar labu reģioselektivitāti var iegūt 2-alkiltiopurīnu nukleozīdus, kuri šķīdumā pastāv — azīda **31** un tetrazola **31'** tautomērajās formās. Savukārt, **2** reakcijās ar ariltioliem ir vājāka reģioselektivitāte un rodas 6-aizvietotu un 2-aizvietotu produktu **35** un **36** maisījums.



6. Atfīstīta metode 2,6-dihlorpurīna nukleozīda **1** aizvietošanas reakcijām ar *S*-nukleofiliem, iegūstot produktus **23** ar iznākumiem no 59% līdz 98%. Iegūtie monohlorīdi **23** tiešā veidā veidā pārbaudītajos apstākļos neiesaistās nukleofīlajās aromātiskajās aizvietošanas reakcijās ar azīdiem.



7. Ir uzsākti pētījumi reaģētspējas salīdzināšanai 2,6-bis-triazolilpurīnu, 2,6-diazidopurīna un 2,6-dihlorpurīna atvasinājumu starpā. Pēc pirmējiem rezultātiem droši var apgalvot, ka 2,6-bis-triazolilatvasinājumi visvieglāk iesaistās nukleofīlajās heteroaromātiskajās aizvietošanas reakcijās — reakcijas notiek ātrāk un ar nenozīmīgu blakusproduktu daudzumu.

PATEICĪBAS

Īpaši vēlos pateikties:

- Syntagon Baltic SIA un profesoram Edvardam Liepiņam (LOSI) par kodolu magnētiskās rezonanses pētījumiem;

- Vadošajam pētniekam Sergejam Beļakovam, vadošajam pētniekam Anatolijam Mišņevam un Dmitrijam Stepanovam par savienojumu rentģenstruktūranalīzi;

- Kristīnei Lazdovičai, Viktorijai Makarovai, Ilzei Neiboltei un profesoram Valdim Kamparam (Rīgas Tehniskā universitāte), Linai Skardziutei, Karolim Kazlauskasam un profesoram Sauliusam Jursenasam (Viļņas Universitāte) un Igoram Kļimenkovam (Latvijas Universitāte) par absorbcijas un emisijas spektriem;

- Ramonai Petrovskai, Ilonai Mandrikai (Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs), Irinai Šestakovai un vadošajam pētniekam Grigorijam Veinbergam (Latvijas Organiskās sintēzes institūts), profesoram Džonam Neitam (Johan Neyts) un Pīteram Leisenam (Pieter Leyssen) (Rega Zāļu pētījumu Institūts, Lēvenes Universitāte, Beļģija) par bioloģiskās aktivitātes pētījumiem;

- Armandam Kovaļovam, Ingai Bižānei, Madarai Bārzdainei, Edgaram Laķim par ieguldījumu šī zinātniskā pētījuma tapšanā;

- Evijai Rolavai un Jevgeņijai Lugiņinai par ogļhidrātu fragmentu saturošiem alkāniem.

Visīpašākie paldies mana darba zinātniskajiem vadītājiem — profesoram Mārim Turkam un profesorei Ērikai Bizdēnai par bezgalīgo pacietību, sapratni un jaunajām idejām. Paldies profesorei Ērikai Bizdēnai par iepazīstināšanu ar purīna nukleoazīdu pasauli un viņas nemītīgo azartu un sirsnību. Paldies profesoram Mārim Turkam par uzklaušīšanu, palīdzību problēmu risināšanā un mūžīgo entuziasmu.

Izsaku lielāku pateicību ģimenei, draugiem un kolēģiem par nemītīgu atbalstu, palīdzību, uzmundrinājumiem un ticību maniem spēkiem. Bez visiem šiem cilvēkiem nebūtu iespējama šī darba tapšana.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. a) Lech-Maranda, E.; Korycka, A.; Robak, T. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 575; b) Robak, T.; Korycka, A.; Lech-Maranda, E.; Robak, P. *Molecules* **2009**, *14*, 1183; c) CLL Trialists' collaborative group. *Haematologica* **2012**, *97*, 428.
2. Gumina, G.; Choi, Y.; Chu, C. Recent advances in antiviral nucleosides. In *Antiviral Nucleosides: Chiral Synthesis and Chemotherapy*; Chu, C. K., Ed.; Elsevier, **2003**; pp 1.
3. a) Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Müller, C. E. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 1; b) Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 527; c) Khakh, B. S.; Burnstock, G.; Kennedy, C.; King, B. F.; North, R. A.; Seguela, P.; Voigt, M.; Humphrey, P. P. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 107.
4. a) Cosyn, L.; Palaniappan, K. K.; Kim, S.-K.; Duong, H. T.; Gao, Z.-G.; Jacobson, K. A.; van Calenbergh, S. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7373; b) Gupte, A.; Boshoff, H. I.; Wilson, D. J.; Neres, J.; Labello, N. P.; Somu, R. V.; Xing, C.; Barry III, C. E.; Aldrich, C. C. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7495; c) Lakshman, M. K.; Kumar, A.; Balachandran, R.; Day, B. W.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Balzarini, J. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 14, 5870; d) Lakshman, M. K.; Singh, M. K.; Parrish, D.; Balachandran, R.; Day, B. W. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2461; e) Mathew, S. C.; By, Y.; Berthault, A.; Virolleaud, M.-A.; Carrega, L.; Chouraqui, G.; Commeiras, L.; Condo, J.; Attolini, M.; Gaudel-Siri, A.; Ruf, J.; Rodriguez, J.; Parrain, J.-L.; Guieu, R. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3874.
5. Vorbrüggen, H. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 509.
6. a) Bennua, B.; Vorbrüggen, H. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1339; b) Bennua-Skalmovski, B.; Kroliekiewicz, K.; Vorbrüggen, H. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7845; c) Ashcroft, C. P.; Dessi, Y.; Entwistle, D. A.; Hesmondhalgh, L. C.; Longstaff, A.; Smith, J. D. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 470.
7. a) Robins, M. J.; Uznański, B. *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 2608; b) Nair, V.; Richardson, S. G. *Synthesis* **1982**, *8*, 670; c) Francom, P.; Janeba, Z.; Shibuya, S.; Robins, M. J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6788; d) Francom, P.; Robins, M. J. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 666; e) Gerster, J. F.; Robins, R. K. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 3258.
8. Novosjolova, I.; Stepanovs, D.; Bizdēna, Ē.; Mishnev, A.; Turks, M. *Acta Cryst.* **2014**, *E70*, Part 2, o108.

9. Novosjolova, I.; Bizdēna, Ē.; Belyakov, S.; Turks, M. Synthesis and X-ray Studies of 6-Pyrrolidinyl-2-Triazolyl Purine Arabinonucleoside. *RTU zinātniskie raksti: Materiālzinātne un lietišķā ķīmija* **2013**, 28, 39.
10. Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 4207.
11. a) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 10, 565; b) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004.
12. a) Dedola, S.; Nepogodiev, S. A.; Field, R. A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 1006; b) Dondoni, A. *Chem. Asian J.* **2007**, 2, 700.
13. a) Nolte, C.; Mayer, P.; Straub, B. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 2101; b) Shao, C.; Wang, X.; Xu, J.; Zhao, J.; Zhang, Q.; Hu, Y. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 7002.
14. a) Reese, C. B.; Ubasawa, A. *Tetrahedron Lett.* **1980**, 21, 2265; b) Kamaike, K.; Takahashi, M.; Utsugi, K.; Tomizuka, K.; Ishido, Y. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 91; c) Kamaike, K.; Takahashi, M.; Utsugi, K.; Tomizuka, K.; Okazaki, Y.; Tamada, Y.; Kinoshita, K.; Masuda, H.; Ishido, Y. *Nucleosides Nucleotides* **1996**, 15, 749; d) Miles, R. W.; Samano, V.; Robins, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5951; e) Robins, M. J.; Miles, R. W.; Samano, M. C.; Kaspar, R. L. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8204.
15. Fotoohi, A. K.; Coulthard, S. A.; Albertioni, F. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, 79, 1211.
16. Elgemeie, G. L. *Curr. Pharm. Design* **2003**, 9, 2627.
17. Novosjolova, I.; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis of Novel 2- and 6-Alkyl/Arylthiopurine Derivatives. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **2015**, in press, DOI: 10.1080/10426507.2014.989435.
18. a) Núñez, M. C.; Rodríguez-Serrano, F.; Marchal, J. A.; Caba, O.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M. *Tetrahedron* **2007**, 63, 183; b) Brændvang, M.; Gundersen, L.-L. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 7144; c) Legrauerend, M. *Tetrahedron* **2008**, 64, 8585; d) Musicki, B.; Widlanski, T. S. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1267.
19. a) Dierckx, A.; Dinér, P.; El-Sagheer, A. H.; Kumar, J. D.; Brown, T.; Grøtli, M.; Wilhelmsson, L. M. *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39, 4513; b) Dyrager, C.; Börjesson, K.; Dinér, P.; Elf, A.; Albinsson, B.; Wilhelmsson, L. M.; Grøtli, M. *European J. Org. Chem.* **2009**, 1515.
20. Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A.; Gessi, S.; Borea, P. A. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 238.
21. a) Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Knight, G. E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K. A.;

- Weisman, G. A. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 281; b) Burnstock, G. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1471; c) Borrmann, T.; Abdelrahman, A.; Volpini, R.; Lamdertucci, C.; Alksnis, E.; Gorzalka, S.; Knospe, M.; Schiedel, A. C.; Cristalli, G.; Müller, C. E. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5974.
22. Zhan, C.; Yang, J.; Dong, X.-C.; Wang, Y.-L. *J. Mol. Graphics Modell.* **2007**, *26*, 20.
23. a) Gao, Z.-G.; Jeong, L. S.; Moon, H. R.; Kim, H. O.; Choi, W. J.; Shin, D. H.; Elhalem, E.; Comin, M. J.; Melman, N.; Mamedova, L.; Gross, A. S.; Rodriguez, J. B.; Jacobson, K. A. *Biochemical Pharmacology* **2004**, *67*, 893; b) Ezeamuzie, C. I.; Philips, E. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *300*, 712; c) Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Moro, S.; Spalluto, G.; Pastorin, G.; Ros, T. D.; Klotz, K.-N.; Varani, K.; Gessi, S.; Borea, P. A. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 770.
24. a) Caglioti, C.; Lalle, E.; Castilletti, C.; Carletti, F.; Capobianchi, M. R.; Bordi, L. *New Microbiologica* **2013**, *36*, 211; b) Lo Presti, A.; Lai, A.; Cella, E.; Zehender, G.; Ciccozzi, M. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2014**, 925.
25. a) Monath, T. P. *The Lancet Infectious Disease* **2001**, *1*, 11; b) Marfin, A. A.; Monath, T. P. Yellow fever virus in Encyclopedia of virology 3rd ed., BWJ Mahy and MHV Vam Regenmortel (eds.) Academic Press, San Diego, CA, **2008**, pp: 469–476.
26. Ooi, M. H.; Wong, S. C.; Lewthwaite, P.; Cardoso, M. J.; Solomon, T. *The Lancet Neurology* **2010**, *9*, 1097.
27. Wobus, C. E.; Thackray, L. B.; Virgin IV, H. W. *J. Virol.* **2006**, *80*, 11, 5104.

CONTENTS

GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS	49
Introduction	49
Aims and objectives	50
Scientific novelty and main results	50
Structure and volume of the thesis	51
Publications and approbation of the thesis	51
MAIN RESULTS OF THE THESIS	56
1. Synthesis of 2,6-diazidopurine nucleosides	57
2. Synthesis of 2,6-bis-triazolylpurine nucleosides	59
3. 2,6-Bis-triazolylderivatives in the reactions with <i>N</i> -nucleophiles	61
4. Synthesis of 6-thio-2-triazolylpurine nucleosides	63
4.1. 2,6-Dichloropurine nucleoside in the reactions with <i>S</i> -nucleophiles	65
4.2. 2,6-Bis-triazolylderivatives in the reactions with <i>S</i> -nucleophiles	66
4.3. 2,6-Diazidopurine nucleosides in the reactions with thiols	68
4.3.1. Synthesis of C(2) alkylthiopurine nucleosides	68
4.3.2. Synthesis of C(2) and C(6) arylthiopurine nucleosides	71
5. Fluorescent properties of triazolylpurine nucleosides	74
6. The biological activity of triazolylpurine nucleosides	77
6.1. Effects on adenosine and purinergic receptors	77
6.2. Antiviral activity	79
6.3. Cytotoxicity studies	83
CONCLUSIONS	86
ACKNOWLEDGEMENTS	89
REFERENCES	90

GENERAL OVERVIEW OF THE THESIS

Introduction

Nucleosides and nucleotides play an important role in various cellular processes. They participate in DNA and RNA synthesis, cell signalling processes, enzyme regulation and metabolism. Nucleoside and nucleotide analogues are chemically modified compounds that are similar to their natural counterparts and may be used to influence cell metabolism or be included in the composition of DNA and RNA. The latter act can prevent cell division or viral replication.

There are at least three distinct areas of application of purines and purine nucleosides: anticancer therapy with antimetabolic purine nucleosides, which among others include fludarabine, thioguanine, clofarabine and cladribine;¹ antiviral purine derivatives² with prominent examples being vidarabine, abacavir, entecavir and acyclovir; agonists and antagonists of adenosine receptors.³ Thus, the agonists of A₁ receptor have provided clinical candidates for atrial arrhythmias, type 2 diabetes and insulin-sensitizing agents, pain management, and angina. To continue, adenosine receptor A_{2A} agonists are excellent anti-inflammatory agents (apadenoson, regadenoson, binodenoson). Antagonists of adenosine receptors are usually used in the treatment of asthma and as anti-inflammatory drugs.

On the other hand, fluorescent labels are widely used in bioorganic and medicinal chemistry. They are exploited to perform the recognition of biomolecules and to study their structure and dynamics. Fluorescent nucleoside analogues can be used as DNA and RNA molecular markers, in the studies of complex dynamics of nucleic acids and in genetic tests and diagnostics. Fluorescent purine analogues are also known as probes to measure the metal ions in living systems.

A vast amount of various nucleoside analogues have been synthesized and their chemical, biological and photophysical properties have been tested in the past 50 years. However, azolypurine derivatives constitute only a small fraction of the latter. Among azolypurine derivatives only few 2- or 6-(1,2,3-triazolyl)purine nucleosides are described so far. This fact allows to develop new and patentable applications of the aforementioned molecular platforms due to both the biological activity and photophysical properties.⁴

This thesis deals with the extension of the class of azolyl substituted purine analogues with 1,2,3-triazolylpurine nucleosides. This leads to the novel type of substitution combinations in the purine cycle. The existing literature data on biological activities of azolyl purine derivatives allow the prediction of interesting properties of our products from

medicinal chemistry point of view. The quest for novel type of purine nucleoside analogues promotes the development of purine chemistry and gives the chance to uncover yet unknown substitution techniques of the purine cycle. Additionally, the data on biological activities and fluorescent properties of the newly created and generic molecular platforms open the way for the development of novel products and methods in biological and medicinal chemistry.

Aims and objectives

The aim of this doctoral thesis is to develop synthetic methodologies towards different types of novel C(2) and C(6) modified triazolylpurine nucleoside analogues, including 2,6-bis-(1,2,3-triazolyl)purine nucleosides, screening of their biological activity and study of their fluorescent properties.

In order to achieve the aims the following tasks were set:

To extend the range of (1,2,3-triazolyl)purine nucleosides, using copper (I) catalysed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reactions. To develop and optimize the method for the synthesis of starting materials.

To study the reactivity of novel 2,6-bis-(1,2,3-triazolyl)purine nucleosides and compare it with 2,6-dichloropurine and 2,6-diazidopurine nucleosides.

To study fluorescent properties of the obtained products.

To explore in collaboration with other research groups the influence of the obtained compounds on adenosine and purinergic receptors, study their cytotoxicity to cancer cells and determine their antiviral potential.

Scientific novelty and main results

Several synthetic methodologies towards differently substituted 1,2,3-triazolylpurine nucleosides have been developed during this thesis. The nucleophilic substitution reactions of 2,6-bis-triazolylpurine, 2,6-diazidopurine and 2,6-dichloropurine nucleosides with different nucleophiles have been studied and the reactivity of these key-intermediates has been compared. It is demonstrated that triazolyl ring at the C(6) position of purine is acting as a good leaving group in nucleophilic heteroaromatic substitution reactions. Substituted monotriazolylproducts possess interesting fluorescent properties. A number of novel triazolyl compounds have promising biological activities: agonist activity of adenosine A₃ and purinergic P2Y₁₂ receptors; antiviral activity against yellow fever virus, Chikungunya and enteroviruses. These compounds are also cytotoxic for cancer cell lines HT-1080 and MG-22A.

Structure and volume of the thesis

The thesis is presented as a set of thematically unified scientific publications on the synthesis and properties of triazolympurine nucleosides. It consists of publications in peer-reviewed scientific journals included in international scientific databases, patents, articles in Scientific Journal of RTU and full text conference articles.

Publications and approbation of the thesis

Results of the thesis are discussed in 5 original research articles, 1 review article and 7 patents.

Scientific publications:

1. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis and Applications of Azolyl Purine and Azolyl Purine Nucleoside Derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, in press, DOI: 10.1002/ejoc.201403527.
2. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis of Novel 2- and 6-Alkyl/Arylthiopurine Derivatives. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **2015**, in press, DOI: 10.1080/10426507.2014.989435.
3. **Novosjolova, I.**; Stepanovs, D.; Bizdēna, Ē.; Mishnev, A.; Turks, M. 2,6-Dichloro-9-(2',3',5'-tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-9*H*-purine. *Acta Cryst.* **2014**, E70, Part 2, o108–o109.
4. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Application of 2,6-Diazidopurine Derivatives in the Synthesis of Thiopurine Nucleosides. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 6557–6561; **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Corrigendum to “Application of 2,6-Diazidopurine Derivatives in the Synthesis of Thiopurine Nucleosides” [Tetrahedron Lett. 54 (2013) 6557–6561]. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 4972.
5. Kovaļovs, A.; **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Bižāne, I.; Skardziute, L.; Kazlauskas, K.; Jursenas, S.; Turks, M. 1,2,3-Triazoles as Leaving Groups in Purine Chemistry: a Three-Step Synthesis of *N*⁶-Substituted-2-Triazolyl-Adenine Nucleosides and Photophysical Properties Thereof. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 850–853.
6. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Belyakov, S.; Turks, M. Synthesis and *X*-ray Studies of 6-Pyrrolidinyl-2-Triazolyl Purine Arabinonucleoside. *Scientific Journal of Riga Technical University: Materials Sciences and Applied Chemistry* **2013**, 28, 39–44.

Latvian patents:

1. **Novosjolova, I.**; Bārzdaïne, M.; Mandrika, I.; Petrovska, R., Bizdēna, Ē.; Kloviņš, J.; Turks, M. Triazolylpurine Derivatives as Agonists of Adenosine and Purine Receptors. **LV14851B**, 20.07.2014.
2. **Novosjolova, I.**; Bārzdaïne, M.; Mandrika, I.; Petrovska, R., Bizdēna, Ē.; Kloviņš, J.; Turks, M. Triazolylpurine Derivatives as Antiviral Agents. **LV14852B**, 20.07.2014.
3. Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Turks, M. The Use of 2,6-Diazidopurine Derivatives in the Synthesis of Thiopurine Nucleosides. **LV14756B**, 20.03.2014.
4. Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Turks, M. The Synthesis of Arabinofuranosylpurine Nucleosides. **LV14757B**, 20.03.2014.
5. Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Turks, M. Method for the Synthesis of 6-Thio-2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-9*H*-purine Nucleoside Derivatives. **LV14758B**, 20.03.2014.
6. Turks, M.; Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Bižāne, I.; Kovaļovs, A. Synthesis of 6-Amino-2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-9*H*-purine Nucleosides. **LV14634B**, 20.04.2013.
7. Turks, M.; Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Bižāne, I.; Kovaļovs, A. Synthesis of 2,6-Bis-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-9*H*-purine Nucleosides and Uses Thereof. **LV14591B**, 20.01.2013.

Full text conference articles:

1. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Derivatives of 2,6-Diazidopurine and 2,6-Bis-(1,2,3-Triazol-1-yl) Purine as Useful Intermediates in the Synthesis of Modified Purine Nucleosides. *Collection Symposium Series of 16th Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components (M. Hocek, Ed.)*, Český Krumlov, Czech Republic, June 8–13, **2014**, pp 332–336.
2. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Mandrika, I.; Petrovska, R.; Kloviņš, J.; Turks, M. Biological Activity Profile of Triazolylpurine Nucleosides. *Collection Symposium Series of 16th Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components (M. Hocek, Ed.)*, Český Krumlov, Czech Republic, June 8–13, **2014**, pp 337–339.
3. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. New Achievements in the Chemistry of Triazolyl Purine Nucleosides. *Proceedings of the International Conference in the Chemistry and Chemical Technology*, Kaunas, Lithuania, April 25, **2014**, pp 178–181.
4. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. 2,6-Bis-(1,2,3-Triazolyl)-Purine Nucleosides and Their Reactivity towards Different Nucleophiles. *Proceedings of Scientific Conference on Organic Chemistry*, Kaunas, Lithuania, April 24, **2013**, pp 7–11.

5. **Novosjolova, I.**; Kovaļovs, A.; Bižāne, I.; Skardziute, L.; Kazlauskas, K.; Jursenas, S.; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis and Properties of Ditrizolylpurine Nucleosides. *Proceedings of Scientific Conference on Organic Chemistry*, KTU, Kaunas, Lithuania, April 25, **2012**, pp 51–55.

Results of the thesis were presented at the following conferences:

1. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis and Applications of 2- and 6-Alkyl/Arylthiopurine Derivatives. *Proceedings of International Conference of Lithuanian Chemical Society "Chemistry and Chemical Technology 2015"*, Vilnius, Lithuania, January 23, **2015**, pp 191.
2. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. 2,6-Diazidopurine Nucleosides as Useful Intermediates for the Synthesis of Novel Triazolyl Purine Analogs. *Abstracts of Riga Technical University 55th International Scientific Conference*, RTU Press, Riga, Latvia, October 14–17, **2014**, pp 18.
3. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis of Novel 2- and 6-Alkyl/Arylthiopurine Derivatives. *Proceedings of 26th International Symposium on the Organic Chemistry of Sulfur*, Istanbul, Turkey, August 24–29, **2014**, pp 19.
4. Laķis, E.; **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Reactivity Studies of 2,6-Bis-(1,2,3-triazolyl)purine Nucleosides with Hydrazines and Amino Acids. *Proceedings of XXI International RoundTable of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, Poznań, Poland, August 24–28, **2014**, pp 32.
5. **Novosjolova, I.**; Stepanovs, D.; Bizdēna, Ē.; Mishnev, A.; Turks, M. Synthetic Applications of 2,6-Diazidopurine Nucleosides Leading to Modified Triazolylpurine Derivatives. *Proceedings of International Conference on Organic Synthesis "BOS 2014"*, Vilnius, Lithuania, July 6–9, **2014**, pp 110.
6. Laķis, E.; **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. S_NAr Reaction of 2,6-Bis-(1,2,3-triazolyl)purine Nucleosides with Hydrazines. *Proceedings of International Conference on Organic Synthesis "BOS 2014"*, Vilnius, Lithuania, July 6–9, **2014**, pp 90.
7. **Novosjolova, I.**; Bārzdaīne, M.; Bizdēna, Ē.; Belyakov, S.; Turks, M. New Approach to the Synthesis of Triazolyl Purine Nucleosides. *Abstracts of Riga Technical University 54th International Scientific Conference*, Riga, Latvia, October 11, **2013**, RTU press, pp 35.
8. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Belyakov, S.; Turks, M. 2,6-Bis-(1,2,3-Triazolyl)-Purine Nucleosides and Their Reactivity towards Different Nucleophiles. *Proceedings of*

- 18th European Symposium on Organic Chemistry, Marseille, France, **2013**, July 7–12, pp 86.
9. Bizdēna, Ē.; Šišulīns, A.; **Novosjolova, I.**; Turks, M. New Synthetic Strategies towards 2,6-Disubstituted Purine Derivatives Based on Their Diazido Intermediates. *Proceedings of 18th European Symposium on Organic Chemistry*, Marseille, France, **2013**, July 7–12, pp 53.
 10. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Regioselective Nucleophilic Aromatic Substitution of 2,6-Bis-(1,2,3-Triazolyl)-Purine Derivatives with Various Nucleophiles. *Proceedings of 14th Tetrahedron Symposium*, Vienna, Austria, June 25–28, **2013**, P1-147.
 11. **Novosjolova, I.** Application of Triazolyl Purine Derivatives in Nucleophilic Aromatic Substitution Reactions. *Scientific Journal of Riga Technical University: Materials Sciences and Applied Chemistry* **2013**, 27, pp 84.
 12. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Belyakov, S.; Turks, M. Synthesis of N⁶-Substituted-2-Triazolyl-Adenine Derivatives. *Proceedings of XVth Conference on Heterocycles in Bio-organic Chemistry*, Riga, Latvia, May 27–30, **2013**, pp 96.
 13. Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Turks, M. 2,6-Bis-(1,2,3-triazolyl)purines in Reactions with S-Nucleophiles. *Proceedings of XVth Conference on Heterocycles in Bio-organic Chemistry*, Riga, Latvia, May 27–30, **2013**, pp 59.
 14. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis and Photophysical Studies of N⁶-Substituted-2-Triazolyl Adenine Derivatives. *Proceedings of Scientific Conference on Organic Chemistry*, Kaunas, Lithuania, April 24, **2013**, pp 17.
 15. Bārzdaine, M., Bizdēna, Ē., **Novosjolova, I.** Nucleophilic Reactions of Bis-triazolylpurine Derivatives and Studies of Fluorescent Properties of Obtained Compounds. *Proceedings of RTU 54th Student Scientific and Technical Conference*, Riga, Latvia, **2013**, April 18, pp 130.
 16. **Novosjolova, I.**; Kovalovs, A.; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Properties and Structure Studies of New 2,6-Bis-(1,2,3-Triazolyl) Substituted Purine Arabinonucleosides. *Proceedings of RTU 53rd International Scientific Conference: Dedicated to the 150th Anniversary and the 1st Congress of World Engineers and Riga Polytechnical Institute*, Riga, RTU Publishing House, Latvia, October 11–12, **2012**, pp 247.
 17. Bizdēna, Ē.; **Novosjolova, I.**; Bižāne, I.; Turks, M. Studies of Novel 2,6-Bis-(1,2,3-Triazolyl) Substituted Purine Ribonucleosides. *Proceedings of RTU 53rd International Scientific Conference: Dedicated to the 150th Anniversary and the 1st Congress of*

World Engineers and Riga Polytechnical Institute, Riga, RTU Publishing House, Latvia, October 11–12, **2012**, pp 254.

18. **Novosjolova, I.**; Kovaļovs, A.; Bižāne, I.; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Click, Substitute and Fluoresce: Synthesis and Applications of 2,6-Di-(1,2,3-triazolyl)-purine Nucleosides. *Proceedings of XX International Round Table of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, Montreal, Canada, August 5–9, **2012**, pp 134.
19. Kovaļovs, A.; **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Reactivity Studies of 2,6-ditriazolylpurine Nucleosides with Nucleophiles. *Proceedings of XX International Round Table of Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, Montreal, Canada, August 5–9, **2012**, pp 112.
20. **Novosjolova, I.**; Kovaļovs, A.; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Efficient Synthesis of 6-Amino-2-Triazolyl Purine Arabinonucleosides via 2,6-Ditriazolyl Derivatives and Fluorescent Properties Thereof. *Proceedings of International Conference on Organic Synthesis “BOS 2012”*, Tallinn, Estonia, July 1–4, **2012**, pp 145.
21. Bižāne, I.; **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. A Novel Method for C(6)-Derivatization of Purine Ribonucleosides. *Proceedings of International Conference on Organic Synthesis “BOS 2012”*, Tallinn, Estonia, July 1–4, **2012**, pp 59.
22. **Novosjolova, I.**; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis and Structure Studies of Arabinopyranosyl- and Arabinofuranosylpurine Nucleosides. *Proceedings of RTU 53rd Student Scientific and Technical Conference*, Riga, Latvia, **2012**, April 18, pp 201.

MAIN RESULTS OF THE THESIS

Modified purine nucleoside analogues are widely used in biological and medicinal chemistry. Many of them are already available in pharmacies as effective drugs. Purine nucleosides can be modified at C(2), C(6) and C(8) positions of purine (Figure 1). Several azoles can be introduced in the structure of purine, resulting in purine-azole conjugates, which are novel purine derivatives with five membered nitrogen containing heterocyclic aromatic rings in the structure. A variety of methods can be used for this purpose, such as S_NAr reactions, cyclization approaches and transition metal catalysed cross-coupling reactions. In the last decade synthetic techniques towards purine-azole conjugates are developing, but a series of logical molecular platforms with a partially predictable biological activity has not been obtained yet. Only few reports have dealt with the introduction of 1,2,3-triazolyl ring at C(2) and C(6) positions of purine nucleosides and the chemical, photophysical and biological properties of such analogues.

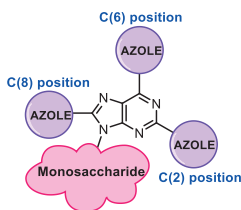
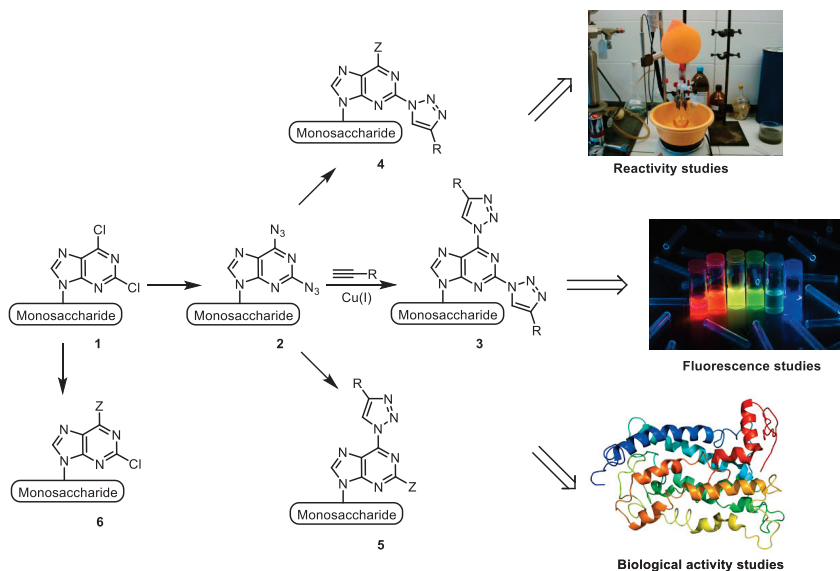


Figure 1. General structure of purine-azole conjugate

In this thesis we focused our attention on the development of new methodologies for the synthesis of C(2) and C(6) modified 1,2,3-triazolylpurine nucleosides. A copper (I) catalysed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition (CuAAC) reaction was chosen as the key-transformation in the synthesis of target compounds. Therefore, starting materials **2** were required. CuAAC reactions with various terminal alkynes resulted in previously unknown 2,6-bis-triazolyl derivatives **3** (Scheme 1). The reactivity of the obtained compounds towards different *N*- and *S*-nucleophiles has been studied because there was no information about the substitutions of 1,2,3-triazolyl ring at the C(6) position of purine. The studies of biological activity and photophysical properties have been initiated.



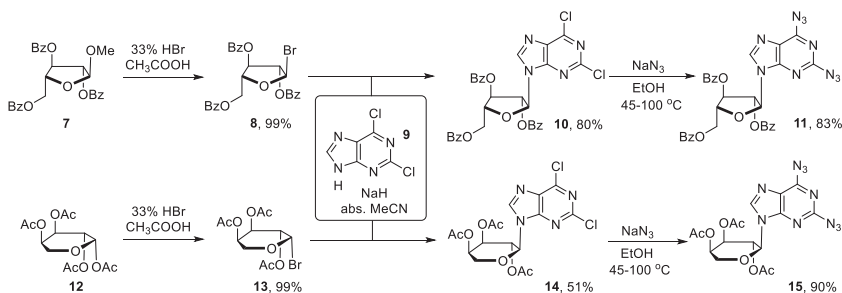
Scheme 1. General Scheme for the synthesis of target products and their applications

1. Synthesis of 2,6-diazidopurine nucleosides

The first task was to obtain diazide starting materials with general formula **2** for copper (I) catalysed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reactions (Scheme 1).

Synthesis of modified purine nucleosides can be performed according to the linear or convergent syntheses. Linear synthesis is the gradual building of each additional intermediate towards the product. On the other hand, convergent approach includes the synthesis of advanced individual chemical building blocks and the subsequent reaction between them. In linear synthesis the overall yield quickly drops with each reaction step while in convergent synthesis the overall yields tend to be higher. Therefore, very often the convergent synthesis is preferred over the linear synthesis.

Diazide **11** was obtained by a linear synthesis. In the key step the reaction was carried out between bromide **8** and deprotonated (NaH) 2,6-dichloropurine **9**. The resulting product **10** was then treated with NaN₃ and gave the expected 2,6-diazidopurine nucleoside **11** in 83% yield (Scheme 2).



Scheme 2. Synthesis of arabinofuranosyl series and arabinopyranosyl series purine nucleosides **11** and **15**

Purine nucleoside **15** from arabinopyranosyl series was also obtained by the linear synthesis (Scheme 2). Firstly, 2,3,4-*O*-acetyl-1-bromo- β -D-arabinopyranose **13** was synthesized diastereoselectively. Secondly, intermediate **13** reacted with deprotonated 2,6-dichloropurine **9** in nucleophilic substitution reaction, resulting in 2,6-dichloropurine nucleoside **14** in 51% yield. Finally, the reaction between nucleoside **14** and NaN_3 gave diazide **15** in 90% yield.

2,6-Dichloropurine nucleoside **17** was also obtained by linear synthesis, but in Vorbrüggen⁵ glycosylation between 2,6-dichloropurine **9** and peracetylated ribofuranose **16** (Scheme 3).⁶ The crystal structure of **17** was firstly obtained in this work (Figure 2).⁷ Next, diazide **18** from ribofuranosyl series was obtained in the following reaction with NaN_3 in 83% yield.

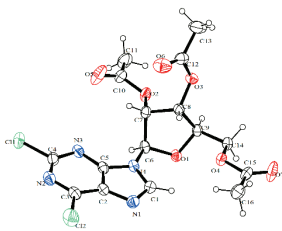
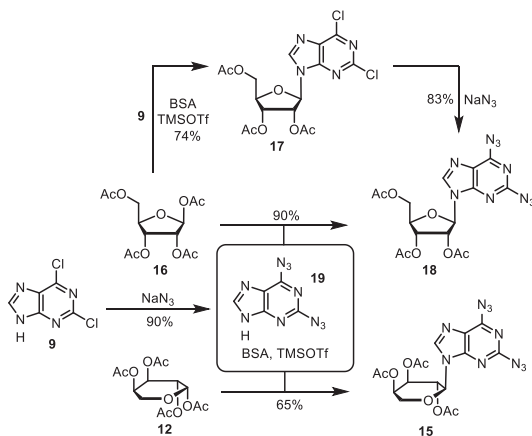


Figure 2. Crystal structure of 2,6-dichloropurine nucleoside **17**

On the other hand, products **18** and **15** were obtained by convergent synthesis in 90% and 65% yields, respectively. By this approach 2,6-diazidopurine **19** was glycosylated under Vorbrüggen conditions with protected ribofuranose **16** or protected arabinopyranose **12** in the presence of BSA and TMSOTf (Scheme 3).



Scheme 3. Synthesis of 2,6-diazidopurine nucleosides **18** and **15**

We can conclude, the linear approach provided diazides **11**, **15** and **18** in 66%, 45% and 61% overall yields. By contrast, the convergent approach gave diazides **15** and **18** in 59% and 81% overall yields, which are considerably higher.

Reaction between glycosyl donor and silylated nucleobases in the presence of a Lewis acid is widely used for the formation of nucleosidic bond. But this approach was not previously used for the synthesis of 9-(tri-*O*-acetyl- β -D-ribofuranosyl)-2,6-diazidopurine **18** and 9-(tri-*O*-acetyl- α -D-arabinopyranosyl)-2,6-diazidopurine **15**. To the best of our knowledge the Vorbrüggen glycosylation conditions have never been used on 2,6-diazidopurine before.⁸

The structure of compound **14** was studied by HMBC and NOESY spectra. HMBC spectrum has proven that arabinose moiety of nucleoside exists in a pyranose form rather than in a furanose form. In turn, the NOESY spectrum in combination with the coupling constant analysis has shown that the nucleoside has the α -configuration.⁹

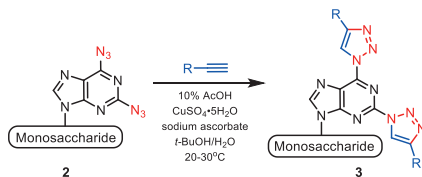
We observed that 2,6-diazidopurine nucleosides **11**, **15** and **18** are rather unstable in daylight and at elevated temperatures, but can be stored without considerable degradation at low temperatures (< 5 °C).

The research publications covering the topics of this chapter can be found in appendixes IV–VII.

2. Synthesis of 2,6-bis-triazolypurine nucleosides

Next, we developed the synthesis of 2,6-bis-triazolypurine nucleosides **3** by Cu(I) catalysed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction (CuAAC).¹⁰ It is one of the most

widely used reactions under the concept of “click” chemistry.¹¹ Also 1,2,3-triazoles as linkers are well-accepted structural entities in bioorganic and medicinal chemistry.¹² They show diverse biological activities in different molecular platforms.



Scheme 4. Synthesis of 2,6-bis-triazolylderivatives **3**

In our case, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and sodium ascorbate were used as catalytic system for 1,3-dipolar cycloadditions (Scheme 4). Reactions were carried out in *tert*-butanol-water solvent system. The reaction rate was increased with addition of 10 mol% AcOH. B. F. Straub *et. al.* have suggested that the use of H_2O or alkyne as proton source for Cu-C bond protodemetalation is disadvantageous. So it is suggested to use the catalytic amount of acetic acid, thus increasing the rate and outcome of 1,3-dipolar cycloaddition reaction.¹³ After the addition of 10 mol% AcOH and depending on alkyne full conversion was achieved in few minutes up to 4 hours. By comparison, in the absence of the acetic acid the reaction times increased to 24–36 h.

We exploited the terminal alkynes with alkyl, aryl and heterocyclic substituents in the structure of product **3** (Table 1). Some alkynes were synthesized from the corresponding aldehydes with Ohira-Bestmann reagent.

Table 1. Synthesis of 2,6-bis-triazolylderivatives **3** according to Scheme 4

R	Yield of product 3	R	Yield of product 3
Ribofuranosyl series Monosaccharide = 2',3',5'-tri- <i>O</i> -acetyl- β -D-ribofuranosyl			
	3a , 83%		3f , 70%
	3b , 67%		3g , 58%
	3c , 56%		3h , 51%
	3d , 30%		3i , 28%
	3e , 64%		3j , 42%

R	Yield of product 3	R	Yield of product 3
Arabinopyranosyl series Monosaccharide = 2',3',4'-tri- <i>O</i> -acetyl- α -D-arabinopyranosyl			
	3k , 78%		3n , 47%
	3l , 46%		3o , 50%
	3m , 75%		3p , 60%
Arabinofuranosyl series Monosaccharide = 2',3',5'-tri- <i>O</i> -benzoyl- α -D-arabinofuranosyl			
	3q , 33%		3r , 45%

The structure of compound **3r** was confirmed by *X*-ray analysis. This confirmed the α -configuration of derivative **11** which was previously determined from the NMR data and the 1,4-regioselectivity of the formation of 1,2,3-triazoles (Figure 3). It is the first *X*-ray structure in the series of bis-azolympurine derivatives. As appears from the crystal structure, compound **3r** has *syn* orientation according to the *N*-glycosidic bond. It is interesting to note, that *anti* orientation usually predominates in naturally occurring nucleotides.

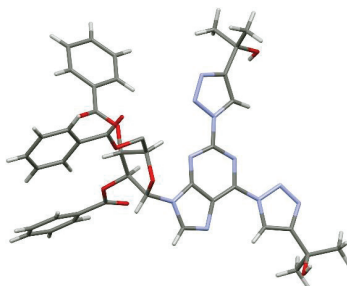


Figure 3. Crystal structure of compound **3r**

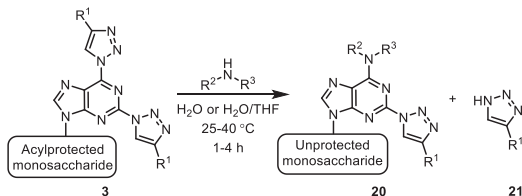
The research publication and patent covering the topics of this chapter can be found in appendixes VI and XIV.

3. 2,6-Bis-triazolylderivatives in the reactions with *N*-nucleophiles

The groups of C. Reese, M. Robins and Y. Ishido have described the use of 1,2,4-triazoles at the C(6) position of purines as good leaving groups in S_NAr reactions, but this was not explored in detail.¹⁴ On the other hand, there was no information about 1,2,3-triazoles as leaving groups.

Our studies proved that 1,2,3-triazolyl moiety is acting as a good leaving group at the C(6) position of purine when the heteroaromatic nucleophilic substitution reactions of 2,6-bis-(1,2,3-triazol-1-yl)purine intermediates **3** are made. This opens the possibility for interesting

studies of biological activities and bioconjugation of the obtained compounds. This allowed us to develop a new way of synthesis of novel *N*⁶-substituted 2-triazolyl adenine nucleosides **20** (Scheme 5, Table 2). We have also discovered that the title compounds show useful levels of fluorescence.



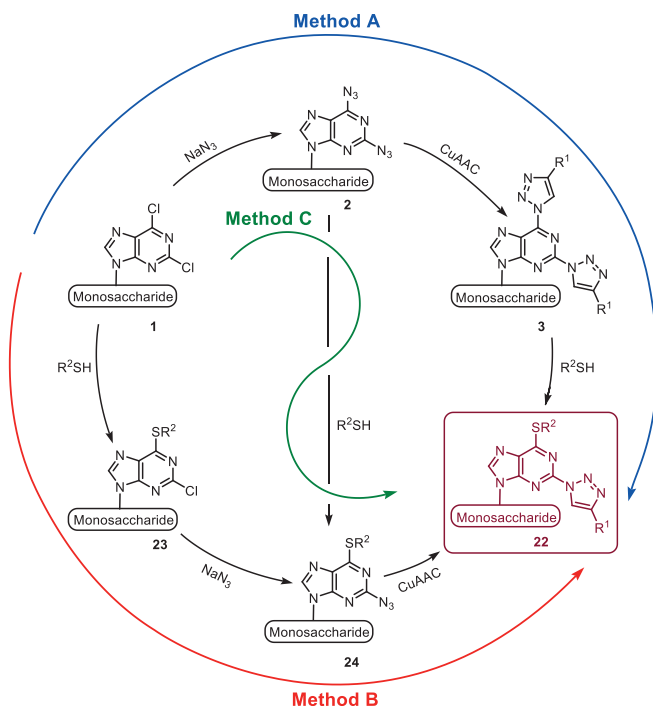
Scheme 5. General Scheme of reactions of 2,6-bis-triazolyl derivatives **3** and *N*-nucleophiles

Table 2. Nucleophilic heteroaromatic substitution reactions between 2,6-bis-triazolyl derivatives **3** and amines

Entry	R ¹	-NR ² R ³	Yield of product 20
Ribofuranosyl series Monosaccharide = β-D-ribofuranosyl			
1		-NHMe	20a , 92%
2		-NMe ₂	20b , 64%
3			20c , 96%
4			20d , 89%
5			20e , 86%
Arabinopyranosyl series Monosaccharide = α-D-arabinopyranosyl			
6			20f , 88%
7		-NMe ₂	20g , 91%
8		-NHMe	20h , 73%
9			20i , 96%
10		-NHMe	20j , 82%
11			20k , 69%
Arabinofuranosyl series Monosaccharide = α-D-arabinofuranosyl			
12		-NHMe	20l , 46%
13			20m , 97%
14		-NMe ₂	20n , 96%
15		-NHMe	20o , 39%

N-Nucleophiles such as methylamine, dimethylamine, piperidine and pyrrolidine were successfully used in the nucleophilic substitutions **3**→**20**. The reactions were carried out

During the study we envisaged a number of approaches for the synthesis of 6-thio-2-triazolylpurine nucleosides **22** (Scheme 6). Firstly, the target compounds **22** can be obtained from 2,6-dichloropurine derivatives **1** carrying out the exchange of chloride with azide. Then, the described 2,6-bis-triazolyl derivatives **3** can be obtained *via* CuAAC. The latter 2,6-bis-triazolyl derivatives **3** can be used in nucleophilic heteroaromatic substitution reactions with different thiols (Method A: **1**→**2**→**3**→**22**, Scheme 6). In the second approach, it is possible to change the order of the reactions: S_NAr reaction between **1** and thiols would lead to the intermediate **23** which in a consecutive S_NAr reaction with NaN_3 would give **24**. Finally, CuAAC reaction would result in the target compound **22** (Method B: **1**→**23**→**24**→**22**, Scheme 6). The combination of methods A and B gave us method C which would use intermediate **24** obtained from **2** *via* S_NAr reaction (Method C: **1**→**2**→**24**→**22**, Scheme 6).

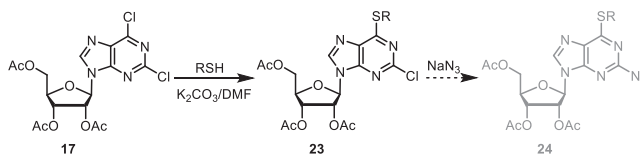


Scheme 6. Potential methods for synthesis of 6-thio-2-triazolylpurine nucleosides **22**

4.1. 2,6-Dichloropurine nucleoside in the reactions with *S*-nucleophiles

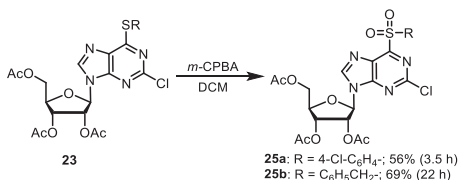
To prove the hypothesis we made a variety of nucleophilic substitution reactions between 2,6-dichloropurine nucleoside **17** and various thiols. The expected products **23** were obtained with isolated yields up to 98% (Table 3). Next, we tried to substitute chlorine atom at the C(2) position of compounds **23** with azide group under different conditions (solvents: EtOH, DMF; temperatures: 35–120 °C), but we did not obtain the desired products **24** which would be ready to use for CuAAC reactions.

Table 3. Reactions of 2,6-dichloropurine nucleoside **17** with thiols



Entry	RSH	Time, h	Yield of product 23
1	C ₆ H ₅ CH ₂ SH	20	23a , 59%
2	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ SH	24	23b , 88%
3	<i>n</i> -C ₄ H ₉ SH	3	23c , 94%
4	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁ SH	4	23d , 90%
5	4-Cl-C ₆ H ₄ SH	1	23e , 98%
6	4-Br-C ₆ H ₄ SH	0.36	23f , 79%
7	4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ SH	0.25	23g , 93%
8	4-F-C ₆ H ₄ SH	1.5	23h , 96%

Additionally, we have performed the oxidation of the monothioproducts with *m*-CPBA to produce sulfones **25** (Scheme 7).¹⁷ These are interesting substances due to the wide applications of purine-derived sulfones in medicinal and synthetic chemistry.¹⁸



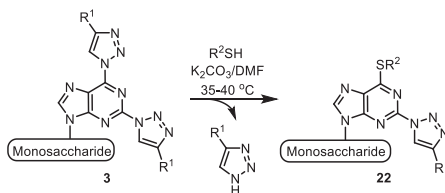
Scheme 7. General Scheme for the synthesis of sulfones **25**

The research publication covering the topics of this chapter can be found in appendix III.

4.2. 2,6-Bis-triazolylderivatives in the reactions with *S*-nucleophiles

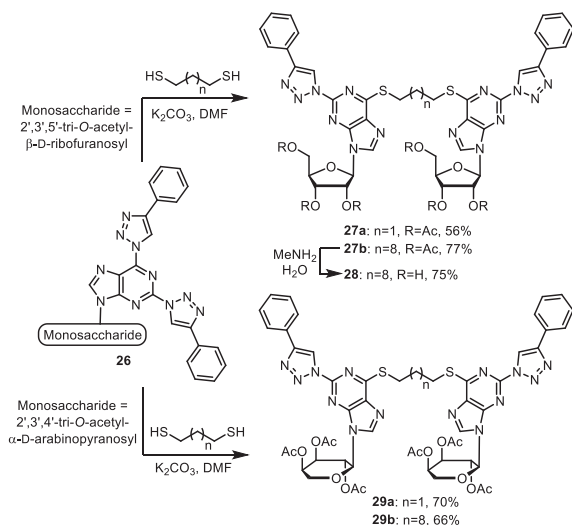
We demonstrated that 1,2,3-triazolyl ring at the C(6) position of purine is acting as a good leaving group in nucleophilic substitution reactions between 2,6-bis-triazolylderivatives and amines. Therefore, according to the proposed method A in Scheme 6, we decided to focus on the S_NAr reactions of 2,6-bis-triazolylderivatives with thiols. Substitution with thiols proceeded similarly like with amines at the C(6) position of purine. The reaction can be accelerated in the presence of the base (eg., K_2CO_3 , NaH, Et_3N , etc.), which generates thiolate anion or deprotonates the corresponding onium ion depending on pK_B value. DMF or THF can be used as solvents. As *S*-nucleophiles were used butanethiol, cyclohexanethiol, benzylthiol, octanethiol, dodecanethiol, thiophenol, 4-chlorothiophenol, 4-bromothiophenol and others. The products were obtained up to quantitative yields (Table 4). Acetyl protecting groups were not cleaved or were partly cleaved under the described conditions. Therefore, to obtain unprotected sugar moieties we used the water solution of methylamine or ammonia in THF for the subsequent step.

Table 4. Reactions of 2,6-bis-triazolylderivatives **3** with thiols

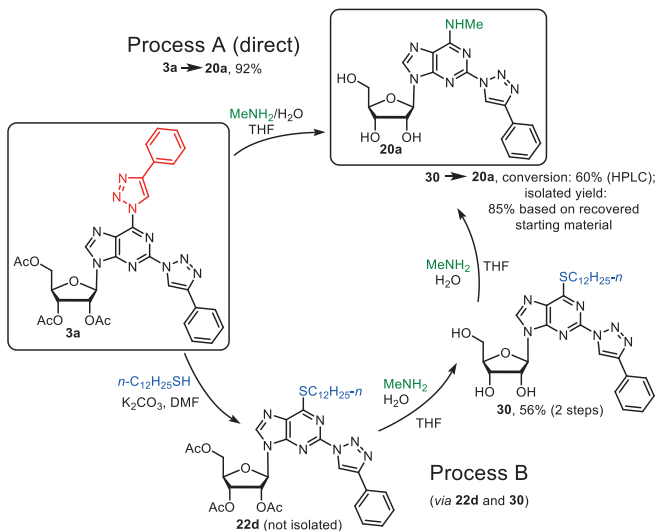


Entry	Monosaccharide	R ¹	R ²	Yield of product 22
1		C ₆ H ₅ -	4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ -	22a , 47%
2		C ₆ H ₅ -	4-Br-C ₆ H ₄ -	22b , 90%
3		C ₆ H ₅ -	4-Cl-C ₆ H ₄ -	22c , 68%
4		4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ -	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ -	22d , 65%
5		H ₃ COOC-	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ -	22e , 99%
6		H ₃ COOC-	4-Cl-C ₆ H ₄ -	22f , 59%
7		C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ CH ₂ -	22g , 95%
8		C ₆ H ₅ -	<i>n</i> -C ₄ H ₉ -	22h , quant.
9		C ₆ H ₅ -	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁ -	22i , 97%
10		C ₆ H ₅ -	<i>n</i> -C ₈ H ₁₇ -	22j , 92%
11		4-Br-C ₆ H ₄ -	C ₆ H ₅ CH ₂ -	22k , 77%
12		C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -	C ₆ H ₅ CH ₂ -	22l , 89%
13		HO(CH ₂) ₂ C-	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ -	22m , 68%
14		HO(CH ₂) ₂ C-	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ -	22n , 99%

Dimeric structures **27–29** in 56–77% yields were obtained in reactions between 2 equivalents of bis-triazole **26** and dithiols such as 1,3-propanedithiol and 1,10-decanedithiol (Scheme 8).



Scheme 8. Bis-triazolylderivative **26** in reactions with dithiols



Scheme 9. The proof of C(6) regioselectivity in the reactions with thiols

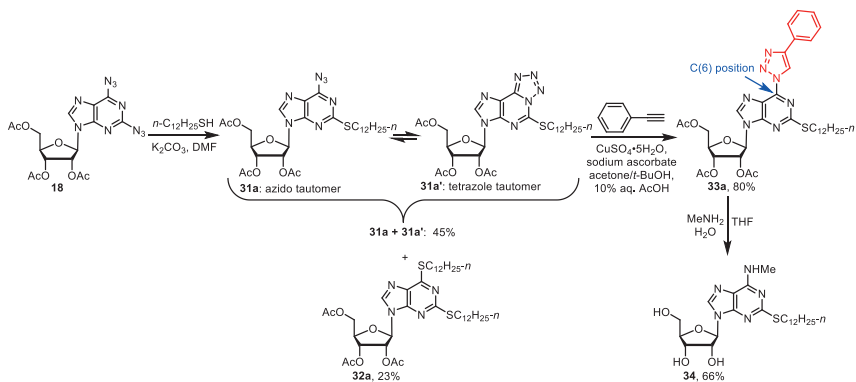
C(6) Regioselectivity in the reactions with *S*-nucleophiles was proved in the chemical way. In the process B, firstly, bis-triazolylderivative **3a** was exposed to the treatment with dodecanethiol, resulting in compound **22d**. Then acetyl protecting groups were cleaved by a careful addition of methylamine to compound **22d** and as a result the intermediate **30** was obtained. Further exposure of **30** to methylamine provided previously synthesized product **20a**. Compound **20a** can also be obtained in a direct process *via* the nucleophilic substitution reaction between methylamine and bis-triazolylderivative **3a** (Scheme 9). The relevant regioselectivity was directly confirmed by *X*-ray analysis of compound **22c** (see Figure 8, chapter 4.3.2.).

The research publication and patent covering the topics of this chapter can be found in appendixes V and XII.

4.3. 2,6-Diazidopurine nucleosides in the reactions with thiols

4.3.1. Synthesis of C(2) alkylthiopurine nucleosides

In the search for the economical synthesis pathway of the previously mentioned substituted purine nucleosides, we elaborated the method C (Scheme 6). According to this approach the S_NAr reactions with thiols on 2,6-diazidopurine derivatives should be carried out first, followed by CuAAC. In the literature there are a few reports on the exchange of azidogroup with nucleophiles in purine nucleosides. We performed a series of reactions between 2,6-diazidopurine nucleoside **18** and different alkylthiols and we concluded that substitution occurs with partial C(2) regioselectivity. Reaction of derivative **18** and dodecanethiol gave 2-dodecylthio-6-azidopurine nucleoside **31**. It was observed that 6-azidopurine derivative **31a** was in equilibrium with its tetrazole tautomer **31a'** (Scheme 10). The dependence of the equilibrium of **31a**↔**31a'** from different solvents and temperatures was studied by NMR (Figure 5, Table 5). Due to the electron-withdrawing effect of the fused tetrazole, H-C(8) signal of tautomer **31a'** was shifted to lower field in the ¹H-NMR spectrum than H-C(8) of azide **31a**. Furthermore, increase of the temperature and the use of less polar solvent shifted equilibrium towards the azide form (Table 5). In addition, compound **32a** was obtained as a by-product in the nucleophilic substitution reaction.



Scheme 10. The synthesis of purine nucleosides **31**, **33** and **34**

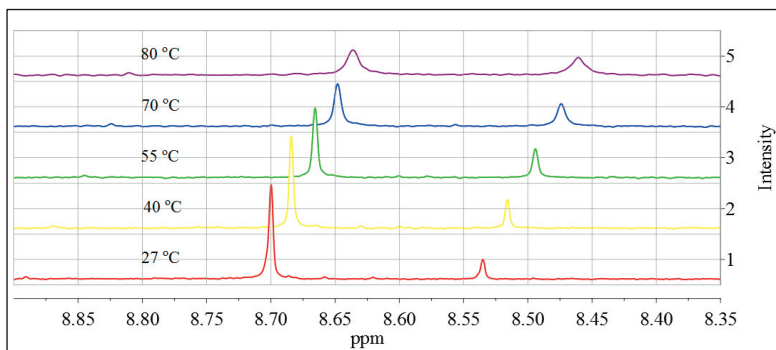


Figure 6. NMR studies of tautomer equilibrium **31a**↔**31a'** in DMSO- d_6 (300 MHz)

Table 5. Equilibrium studies of azidopurine–tetrazolo[5,1-*i*]purine in $CDCl_3$ and DMSO- d_6

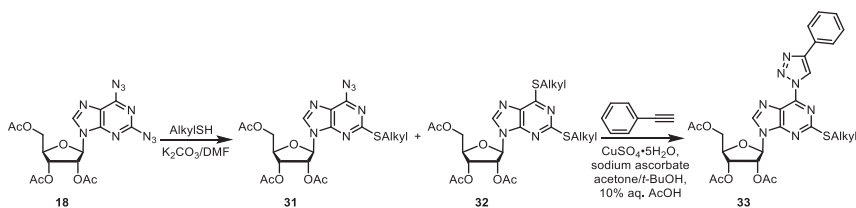
Entry	Temp. (°C)	Ratio azide 31a : tetrazole 31a'
Solvent: $CDCl_3$		
1	25	80:20
2	40	87:13
3	55	89:11
Solvent: DMSO- d_6		
4	27	18:82
5	40	25:75
6	55	32:68
7	70	39:61
8	80	45:55

Next, we performed the planned 1,3-dipolar cycloaddition reaction in the presence of $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ and sodium ascorbate and obtained product **33a** with triazolyl ring at the C(6) position. Knowing that triazolyl ring at the C(6) position of purine is acting as a good leaving

group, we performed the reaction between methylamine and compound **33a** and obtained product **34** in 66% yield (Scheme 10).

Additionally, reactions between 2,6-diazidopurine **18** and other alkylthiols were made and 2-alkylthioderivatives **31** were obtained up to 74% yield (Table 6). The C(2) regioselectivity was proved by X-ray structure of tetrazole **31d'**. Compound **31d'** was crystallized from ethanol. On the other hand, in the solution (CDCl₃, NMR data) compound **31d** exists as a mixture of azide and tetrazole tautomers with azide : tetrazole ratio 78 : 22%.

Table 6. The yields of 2-alkylthiopurine nucleosides



AlkylSH	Time, h	Yield of product 31	Yield of by-product 32	Yield of product 33
C ₆ H ₅ CH ₂ SH	1	31b , 74%	—	33b , 91%
<i>n</i> -C ₄ H ₉ SH	72	31c , 74%	32c , 8%	33c , 89%
<i>c</i> -C ₆ H ₁₁ SH	24	31d , 62%	32d , 13%	33d , 81%

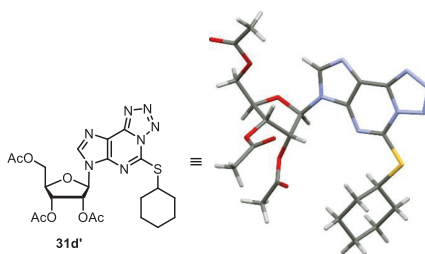


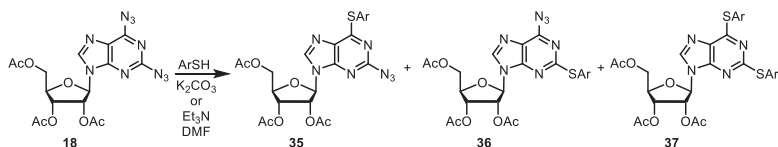
Figure 6. The crystal structure of compound **31d'**

The novel class of 2-alkylthio-6-triazolylpurine nucleosides **33** was obtained by CuAAC reaction between phenylacetylene and monoazide derivatives **31** (Table 6). Synthesized compounds can be used in medicinal chemistry and in the synthesis of other purine analogues, for example, they can be used in the nucleophilic substitution reactions with different nucleophiles, using triazolyl ring at the C(6) position of purine as a good leaving group.

The research publication covering the topics of this chapter can be found in appendix V.

4.3.2. Synthesis of C(2) and C(6) arylthiopurine nucleosides

In the case of arylthiols the substitution with thiols was not selective: it occurred at C(2) and C(6) positions of purine. 2,6-Substituted products **37** were obtained as by-products (Scheme 11). There were difficulties in the separation of products **35–37** by column chromatography. Such arylthiols as thiophenol, 4-chlorothiophenol, 4-bromothiophenol, 4-fluorothiophenol, 4-*t*-butylthiophenol were used in our studies. Reactions were made in dry DMF in the presence of K₂CO₃ or Et₃N. We observed that the amount of by-product **37** decreased in the presence of Et₃N (Scheme 11, Table 7).

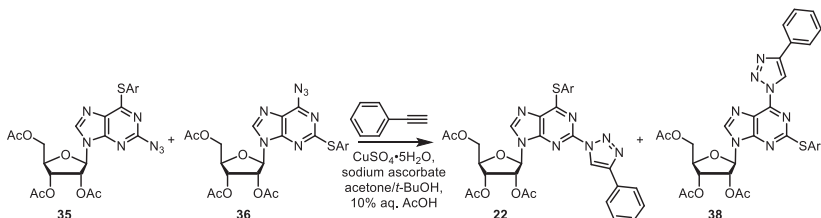


Scheme 11. 2,6-Diazidopurine nucleoside **18** in the reactions with arylthiols

Table 7. Obtained yields in the nucleophilic reactions between 2,6-diazidopurine nucleoside **18** and arylthiols

Entry	ArSH	Base	Time, h	Yield of products 35 + 36 , %	Yield of product 37 , %
1	C ₆ H ₅ SH	K ₂ CO ₃	4	21%	—
2	4-Cl-C ₆ H ₄ SH	K ₂ CO ₃	6	22%	4%
3	4-Br-C ₆ H ₄ SH	K ₂ CO ₃	3.5	38%	23%
4	4-F-C ₆ H ₄ SH	K ₂ CO ₃	0.17	48%	12%
5	4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ SH	K ₂ CO ₃	0.12	73%	10%
6	4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ SH	Et ₃ N	0.17	60%	1%
7	4-F-C ₆ H ₄ SH	Et ₃ N	0.17	34%	6%
8	C ₆ H ₅ SH	Et ₃ N	0.17	70%	2%

With monoazidoderivatives **35** and **36** in hand, subsequent CuAAC reactions with phenylacetylene were made. The obtained products were compared to the products from the direct process of substitution when 2,6-bis-triazolylderivatives reacted with *S*-nucleophiles and C(6) regioselectivity of the products was proved in the chemical way. In conclusion, the CuAAC reaction of compounds **35** and **36** resulted in a mixture of 2-triazolylcompound **22** and 6-triazolylcompound **38** (Scheme 12, Table 8).



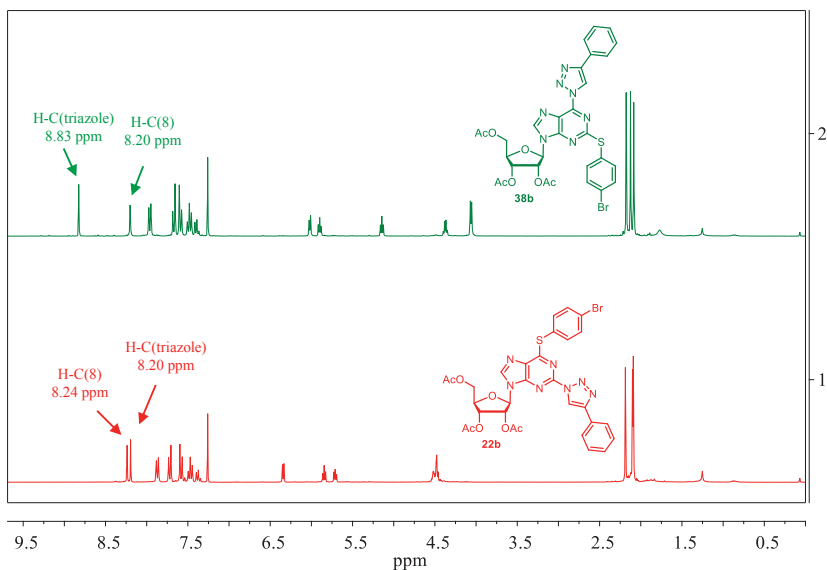
Scheme 12. Synthesis of products **22** and **38** in 1,3-dipolar cycloaddition reaction

Table 8. Obtained yields of 2-triazolylproduct **22** and 6-triazolylproduct **38**

Entry	Ar-	HPLC ratio of products 35 and 36	Time, h	Yield of product 22 , %	Yield of product 38 , %
1	4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ -	82% : 18%	2	22a , 55%	—
2		2% : 98%*	21	—	38a , 65%
3	4-Br-C ₆ H ₄ -	55% : 45%	4	22b , 29%	38b , 27%
4		42% : 58%	22	22b , 28%	38b , 34%
5	4-Cl-C ₆ H ₄ -	100%	3	22c , 91%	—

* Nucleophilic substitution was made in the presence of Et₃N

The chemical shifts of compounds **22b** and **38b** differ quite significantly (Figure 7). H-C(8) signal of C(6) substituted product **22b** was at 8.24 ppm, but its H-C(triazole) signal at 8.20 ppm. On the other hand, H-C(triazole) signal of C(2) substituted product **38b** appeared at the lower field (8.83 ppm) than that of C(6) substituted product **22b** and its H-C(8) appeared at 8.20 ppm (Figure 7).

**Figure 7.** Comparison of ¹H-NMR spectra (300 MHz, CDCl₃) of products **22b** and **38b**

Finally, the regioselectivity of one of the C(6) substituted products was proved by crystal structure analysis of **22c** (Figure 8).

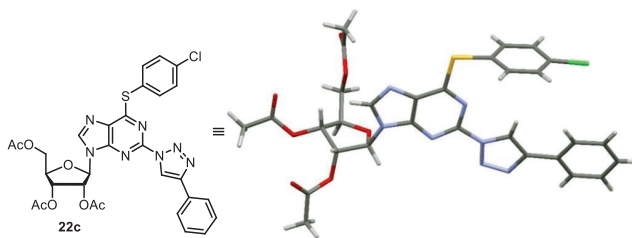
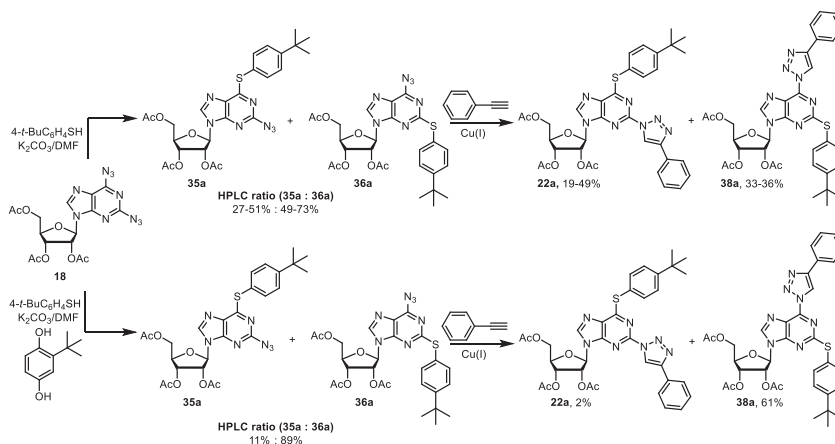


Figure 8. The crystal structure of compound **22c**

The mechanistic studies of nucleophilic substitution reactions between 2,6-diazidopurine **18** and arylthiols are in the preliminary stage in our laboratory. Theoretically, the S_NAr substitution of 2,6-diazidopurine derivatives with thiols can occur by two mechanisms: 1) the addition-elimination mechanism *via* formation of Meisenheimer complex; 2) single electron transfer mechanism. We made two independent experiments. In the first case, the reaction between 2,6-diazidopurine **18** and 4-*t*-Bu-C₆H₄SH was performed without additives, but in the second case, *t*-butylhydroquinone was added to the mixture of azide and thiol. Then the CuAAC reaction on the crude mixture of products **35a** and **36a** and phenylacetylene was carried out in *t*-BuOH. The reaction, which was carried out without additives gave poor reproducibility (Scheme 13). However, one can argue that this reaction gave worse regioselectivity in the comparison with the reaction which was carried out in the presence of *t*-butylhydroquinone. In the latter case C(2) substituted product **38a** was obtained in excess.



Scheme 13. Mechanistic studies of nucleophilic reactions between 2,6-diazidopurine nucleoside **18** and arylthiols

Reduced forms of the starting material and target products (**39a–d**) were also obtained as side products in the nucleophilic substitution reactions of 2,6-diazidopurine **18** and arylthiols (Figure 9). These were defined by liquid chromatography with mass selective detector. The reduction process might indicate that the substitution is initiated by single electron transfer mechanism. These studies will be continued.

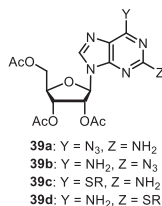


Figure 9. Reduced forms of starting materials and target products **39a–d**

5. Fluorescent properties of triazolylpurine nucleosides

By definition, fluorescence occurs when a molecule after excitation from the lowest excited level returns to one of the basic levels of oscillation. In this process the emitted light has a longer wavelength than the absorbed radiation. This process is very fast, and lasts 10^{-8} to 10^{-6} s after the excitation. Fluorescence techniques are widely used in the analysis and visualization purposes in analytical, biological and medicinal chemistry. It was known that purine nucleosides with azolyl ring at the C(8) position of purine and amino group at the C(6) position of purine possess fluorescent properties. Interestingly, that this fluorescent compound conserves the fluorescent properties also inside the DNA strain.¹⁹ It can be used as a basis for the creation of biological sensors, which could be one of the novel applications of purine nucleosides.

Based on the information regarding the potential photophysical properties of azolylpurines, we decided to test also our newly synthesized compounds. We observed that *N*⁶-substituted 2-triazolyladenine nucleosides **20** possess fluorescence at 392 to 404 nm, when the excitation takes place at 250–280 nm (Figure 10 (absorption spectra — dashed line, emission spectra — solid line), Table 9). As can be seen from Figure 10, absorption spectra are characterized by two maxima. The concentration of samples for the absorption studies were $c = 1.1...2.3 \cdot 10^{-5}$ M, but for the emission $c = 1.1 \cdot 10^{-5}$ M. The quantum yields of fluorescent compounds reach 53%.

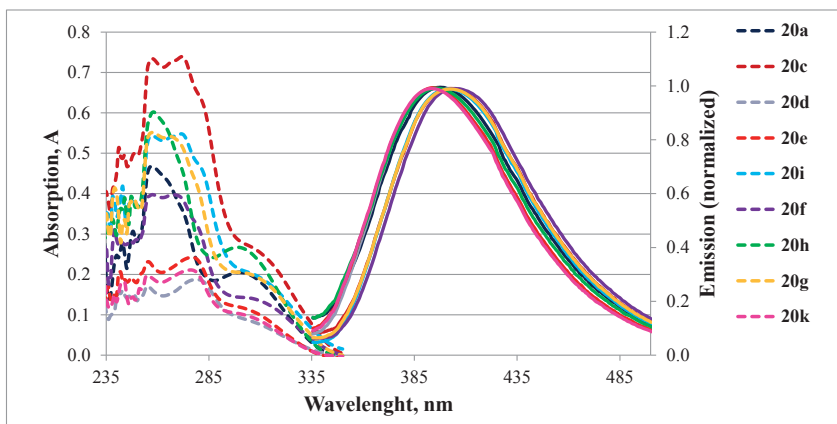


Figure 10. Absorption and emission spectra of compounds **20** in DMSO

Table 9. The photophysical characterization of compounds **20**

Entry	R ¹	-NR ² R ³	Product 20	λ_{max} (Abs), (nm) (DMSO)	λ_{max} (Emis), (nm) (DMSO)	Quantum yield, %
Ribofuranosyl series						
Monosaccharide = β -D-ribofuranosyl						
1		-NHMe	20a , 92%	257/300	398	32
2			20c , 96%	257/271	402	50
3			20d , 89%	255/278	394	38
4			20e , 86%	255/296	394	33
Arabinopyranosyl series						
Monosaccharide = α -D-arabinopyranosyl						
5			20f , 88%	257/267	404	53
6		-NMe ₂	20g , 91%	258/266	402	50
7		-NHMe	20h , 73%	258/299	396	33
8			20i , 96%	257/271	401	51
9			20k , 69%	255/275	393	34

Next, we studied emission properties of ribofuranosylderivative **20p** in different solvents (Figure 11). Its emission maxima were in the range from 420 to 430 nm in MeOH and EtOH and the emission spectra had the greater intensity in these solvents. On the other hand, emission maxima in aqueous solutions were around 450 nm and the spectra showed the lower intensity and bathochromic shift. The concentrations of the studied compound **20p** were in the range from $1.19 \cdot 10^{-5}$ till $1.55 \cdot 10^{-5}$ M and the excitation wavelength was 277 nm.

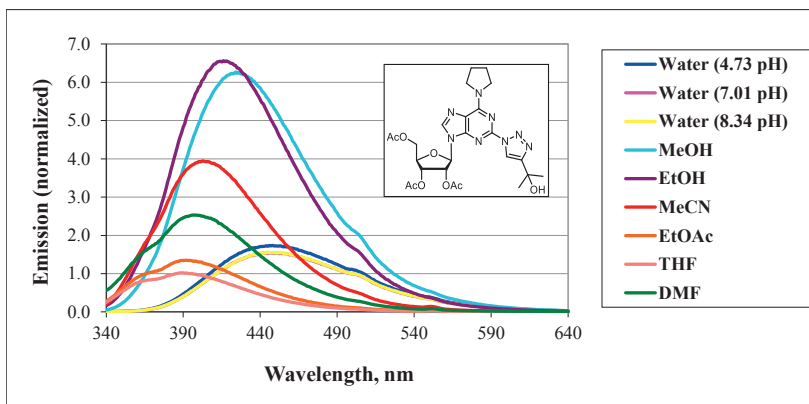


Figure 11. Emission spectra of 9-(β-D-ribofuranosyl)-2-(4-(2-hydroxypropan-2-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-6-(pyrrolidin-1-yl)-9H-purine **20p** in different solvents

In comparison, compounds substituted with *S*-nucleophiles possessed weaker fluorescent properties. As example are shown absorption and emission spectra of dimer **27b** in MeOH (Figures 12–13).

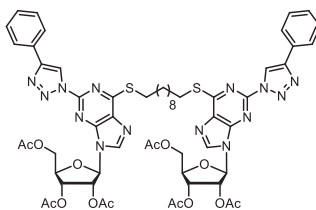


Figure 12. Dimer **27b** structure

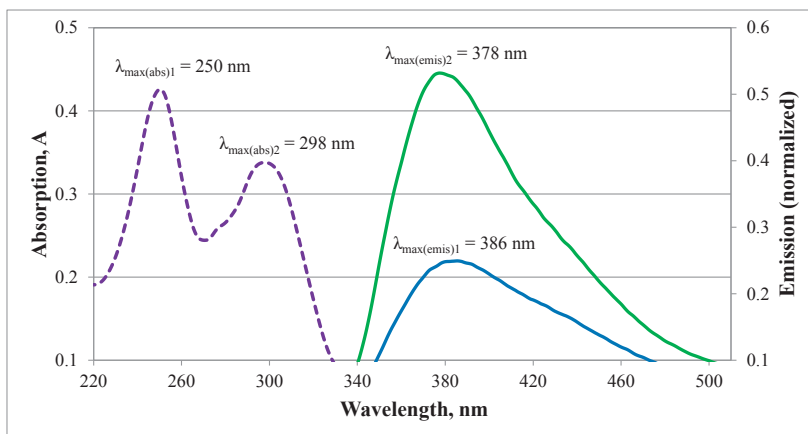


Figure 13. Absorption and emission spectra of **27b** in MeOH

The research publication covering the topics of this chapter can be found in appendix VI.

6. The biological activity of triazolympurine nucleosides

6.1. Effects on adenosine and purinergic receptors

Adenosine receptors (AR) are *G*-protein coupled receptors with currently known four subclasses — A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃. Adenosine A₁ receptor has high, but A₃ — low affinity on adenosine. They both inhibit activity of adenylate cyclase. Contrary, subtype A_{2A} has high affinity and A_{2B} — low affinity and they both stimulate activity of adenylate cyclase, which results in increase of cAMP levels. The initial pharmacological evidence of the existence of AR was specific antagonism on adenosine-induced effects in the heart and brain of methylxanthine, caffeine and theophylline. Adenosine receptors are located through all the body, and their presence in almost every cell makes them interesting pharmacological targets in many pathophysiological situations associated with increased levels of adenosine. Effect on adenosine receptors have a promising strategy for the treatment of neurological disorders, asthma and heart and kidney failures.²⁰

Purinergic receptors are membrane receptors which are divided into P1 (adenosine receptors) and P2 (nucleotide receptors).^{3b, 3c, 21} P2 receptors are activated with pyrimidine and purine nucleotides. ADP initiates platelet aggregation and at the same time activates *G*-protein coupled receptors — P2Y₁ and P2Y₁₂. Activation of P2Y₁ activates phospholipase C and causes changes in its conformation, while P2Y₁₂ binds to guanosine 5-triphosphate binding protein Gi and decreases activity of adenylate cyclase. P2Y₁₂ receptor is the target of anti-platelet drugs such as clopidogrel and ticlopidine.²²

Researchers Ramona Petrovska and Ilona Mandrika from the Latvian Biomedical Research and Study Centre have studied our compounds for their ability to interact with adenosine and purinergic receptors. Flp-In-Hek293 cells, which are stably transfected with human A₃ receptor, and P2Y₁₂ expressing cell line C6 (rat glioblastoma) were used in these studies. Due to the fact that ligands of A₃ and P2Y₁₂ receptors take part in the physiological functions and inhibit adenylate cyclase, their functional activity was tested by intracellular detection method of cAMP level. The cAMP levels were measured in the presence of 3 μM forskolin which increases the cellular basal cAMP levels. The results are presented as the average measurement ± average standard error of 2–3 independent experiments. Results are reported as inhibition of forskolin-stimulated cAMP level (100%) in the presence of 50 μM of ligand (the tested compound). As standards for the determination of cAMP levels were used

selective A₃ adenosine receptor agonist IB-MECA²³ and P2Y₁₂ receptor agonist adenosine diphosphate (ADP) (Figure 14).^{3b, 3c, 21} IB-MECA was taken in 50 μM concentration and showed an average activity of 61 ± 6%. ADP was taken in 10 μM concentration and showed an average activity of 86 ± 10% (Table 10).

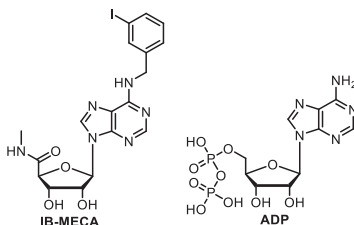
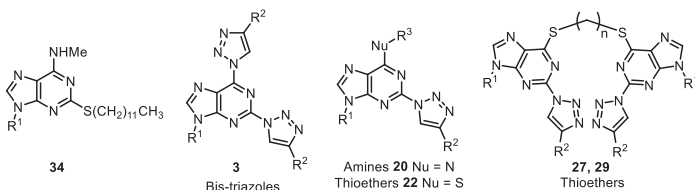


Figure 14. Standards: IB-MECA and ADP

Table 10. Interaction of novel purine nucleosides with adenosine and purinergic receptors



Compound	R ¹	R ²	NuR ³	Inhibition of forskolin stimulated cAMP level (%)	
				A ₃ receptors	P2Y ₁₂ receptors
34	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetyl-β-D-ribofuranosyl	—	—	37 ± 5	14 ± 3
3c		4-Br-C ₆ H ₄ -	—	34 ± 13	47 ± 7
3d		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -	—	32 ± 11	60 ± 12
3s		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -	—	33 ± 11	18 ± 9
3t		4-MeO-C ₆ H ₄ -	—	48 ± 2	61 ± 1
3u		4-Me ₂ N-C ₆ H ₄ -	—	92 ± 3	88 ± 3
22p	2',3',4'-Tri- <i>O</i> -acetyl-α-D-arabinopyranosyl	C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	NA	21 ± 8
20g	α-D-Arabinopyranosyl	C ₆ H ₅ -	Me ₂ N-	NA	23 ± 8
22g	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetyl-β-D-ribofuranosyl	C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	NA	31 ± 10
20e	β-D-Ribofuranosyl	HO(CH ₃) ₂ C-		NA	21 ± 8
20p		HOCH ₂ -	Me ₂ N-	NA	31 ± 7
20q		4-Me-C ₆ H ₄ -		42 ± 5	43 ± 15
20r		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -		43 ± 11	28 ± 6
20s		4-F-C ₆ H ₄ -		42 ± 9	14 ± 7
20t		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -		52 ± 12	40 ± 1
20u		4-Br-C ₆ H ₄ -		50 ± 11	46 ± 15
20v		4-MeO-C ₆ H ₄ -		35 ± 14	12 ± 3

Compound	R ¹	R ²	NuR ³	Inhibition of forskolin stimulated cAMP level (%)	
				A ₃ receptors	P2Y ₁₂ receptors
20w	β-D-Ribofuranosyl	4-Me-C ₆ H ₄ -		37 ± 9	40 ± 11
20x		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -		26 ± 8	50 ± 14
20y		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -		61 ± 4	62 ± 21
20z		4-Br-C ₆ H ₄ -		29 ± 15	44 ± 10
20aa		4-MeO-C ₆ H ₄ -		41 ± 8	NA
29a	2',3',4'-Tri- <i>O</i> -acetyl-α-D-arabinopyranosyl	C ₆ H ₅ -	<i>n</i> = 3	NA	14 ± 6
29b		C ₆ H ₅ -	<i>n</i> = 10	NA	29 ± 11
27b	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetyl-β-D-ribofuranosyl	C ₆ H ₅ -	<i>n</i> = 10	NA	23 ± 11
IB-MECA				61 ± 6	-
ADP				-	86 ± 10

To conclude, the tested compounds possessed agonist activity of adenosine A₃ and purinergic P2Y₁₂ receptors. For example, compounds **3d**, **3t**, **3u**, **20y**, which are coloured in Table 10 in light blue, have equivalent or higher agonist activities compared to standards. Compound **3u** inhibited forskolin stimulated cAMP level by 92 ± 3% in the case of adenosine receptor A₃ (IB-MECA inhibited the same only by 61 ± 6%).

Compounds were examined also on the adenosine receptors A_{2A} and A_{2B}, which are related to stimulating *G*-protein. In the result, compounds were not active against them.

Thus, it can be said that the compounds are selective to receptors which are related to inhibiting *G*-protein (A₃ and P2Y₁₂). These uncovered properties can be used in the design of novel pharmaceutically active compounds, which in the future can be used for the treatment of cardiovascular diseases.

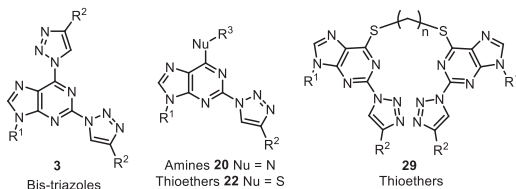
The research patent covering the topics of this chapter can be found in appendix VIII.

6.2. Antiviral activity

In the collaboration with the Latvian Biomedical Research and Study Centre the initial studies of antiviral activity of novel purine nucleosides on example of human enterovirus ECHO-7 have been started. For the experiment we used human rhabdomyosarcoma cells which were preincubated with 100 μM solutions of the test compounds in serum-free medium for 4 hours, than infected with human enterovirus ECHO-7 (Enteric Cytopathic Human Orphan virus) in cytopathogenic dose (106 CPD50/ml) for 1 hour. The cells were rinsed after infection and further cultivated in serum-free medium in the presence of 100 μM of the studied substances. The cells cultivated in the serum-free medium with/without virus were used as the control cells. Cytolytic effect was observed

visually by light microscope in 48 hours after infection when 100% of the infected control cells were lysed but the uninfected cells retained 100% of the monolayer (Table 11). The Table below summarizes the compounds, which inhibited viral cytolytic effect.

Table 11. Compounds, which inhibited viral cytolitic effect of human enterovirus ECHO-7



Compound	R ¹	R ²	NuR ³
3c	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetyl-β-D-ribofuranosyl	4-Br-C ₆ H ₄ -	—
3d		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -	—
20ab	2',3',4'-Tri- <i>O</i> -acetyl-α-D-arabinopyranosyl	HO(CH ₃) ₂ C-	H ₂ N-
22p		C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-
20f	α-D-Arabinopyranosyl	C ₆ H ₅ -	
20ac			H ₂ NHN-
20p	β-D-Ribofuranosyl	4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -	
20r		4-F-C ₆ H ₄ -	
20s		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -	
20s		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -	
29b	2',3',4'-Tri- <i>O</i> -acetyl-α-D-arabinopyranosyl	C ₆ H ₅ -	<i>n</i> = 10

In collaboration with the REGA institute in Belgium, Dr. Pieter Leyssen tested our purine nucleosides on a range of other viruses, such as Chikungunya virus, murine Norovirus, enterovirus 71 and yellow fever virus.

Chikungunya is a viral disease that is transmitted to people by mosquitoes, which are widespread in Africa, Southern Europe, Southeast Asia, and the islands in the Indian and Pacific oceans. It is alphavirus, which belongs to the *Togaviridae* family. It has small spherical enveloped form with 60–70 nm diameter. A single-strand DNA molecule of positive polarity is forming the genome of this virus. There are four non-structural and three structural proteins inside it. The most common symptoms of Chikungunya are fever and severe joint pains, other symptoms may include headache, muscle pain, joint swelling or rash. The drugs that could cure this disease have not still found, but there are those that reduce fever and pain. The virus mainly affects the liver, muscles, joints and marrow, and, in some cases, it can cause long-term acute illness.²⁴

Yellow fever virus, which originally is called also “viral haemorrhagic fever”, is a systemic disease characterized by high viremia, liver, kidney and heart damages, haemorrhage

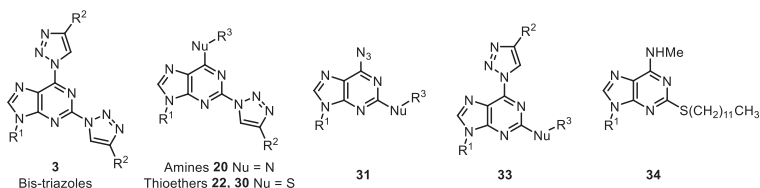
and a high lethality. It can affect the central nervous system, causing delirium, convulsions and even coma. The virus belongs to the *Flaviviridae* virus family and is one of the RNA viruses that are commonly transferred by mosquitoes or ticks. This virus is small (40–60 nm in diameter), spherical, with a short projection surface. It contains the single-strand RNA genome and a single core protein (C protein), which is surrounded by a lipid bilayer. The virus is often found in tropical and subtropical regions of Africa and South America. 30 000 people die each year from this cruel virus, 90% of them live in Africa. So far, the drugs for the treatment have not been found. Only vaccination can protect against this infection so far.²⁵

Enterovirus 71 also belongs to the class of RNA viruses. It causes diseases of hands, feet, mouth and nails, aseptic meningitis and brainstem encephalitis. Mainly children suffer from it.²⁶ The effective way of the treatment for this virus is still not found.

Murine Norovirus is a RNA virus that affects the mouse and cause them diarrhea, weight loss and following death.²⁷

It was found that some of our compounds were active against yellow fever virus (Table 12), but some against Chikungunya virus (Table 13). Some of the compounds showed certain activity also against enterovirus 71, but did not meet the selection criteria for hit compounds. On the other hand, none of the compounds showed selective antiviral effect against murine Norovirus. Moreover, it was discovered that certain compounds are toxic to uninfected living cells.

Table 12. Antiviral activity of purine nucleosides against yellow fever virus



Compound	R ¹	R ²	NuR ³	Yellow fever virus 17D Stamaril	
				EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
3p	2',3',4'-Tri- <i>O</i> -acetyl-α-D-arabinopyranosyl	CH ₃ (CH ₂) ₄ -	—	>153	
3k		C ₆ H ₅ -	—	4.11 ± 0.727	6.44 ± 1.03
3o		CH ₃ (CH ₂) ₃ -	—	>160	
3v		2-F-C ₆ H ₄ -	—	1.08 ± 0.306	4.31 ± 1.35
3r	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -benzoyl-α-D-arabinofuranosyl	HO(CH ₃) ₂ C-	—		1.29
3c	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetyl-β-D-ribofuranosyl	4-Br-C ₆ H ₄ -	—	66.5	>122
3t		4-MeO-C ₆ H ₄ -	—	33	3.05
3u		4-Me ₂ N-C ₆ H ₄ -	—	3.37	11.3 ± 0.484

Compound	R ¹	R ²	NuR ³	Yellow fever virus 17D Stamaril	
				EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
20ad	α-D-Arabinopyranosyl	C ₆ H ₅ -	(CH ₃ (CH ₂) ₂) ₂ N-		
20j		HOCH ₂ -	MeNH-	8.08	10.3 ± 1.82
20ae		HO(CH ₃) ₂ C-	Me ₂ N-	43.6	72.6 ± 5.89
20n	α-D-Arabinofuranosyl	HO(CH ₃) ₂ C-	Me ₂ N-	3.48	4.61 ± 0.643
20af	β-D-Ribofuranosyl	4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ -	MeNH-		
20q		4-Me-C ₆ H ₄ -		87	127 ± 41.1
20r		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -		8.42	32.1 ± 1.1
20s		4-F-C ₆ H ₄ -		24 ± 4.79	125 ± 21.5
20t		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -		4.29	8.03 ± 0.148
20u		4-Br-C ₆ H ₄ -		30.2 ± 8.29	108 ± 43
20ag		4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ -		3.16 ± 0.372	6.27 ± 1.88
20c		C ₆ H ₅ -		13 ± 0.593	35.6 ± 16.6
20w		4-Me-C ₆ H ₄ -		6.46 ± 0.697	15.1 ± 3.62
20x		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -		27.9 ± 23.7	110 ± 23.9
20z		4-Br-C ₆ H ₄ -		18.5 ± 8.15	42.9 ± 28.4
22m	2',3',4'-Tri- <i>O</i> -acetyl-α-D-arabinopyranosyl	H ₃ COOC-	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ S-	3.19 ± 0.365	9.81 ± 1.86
22g	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetyl-β-D-ribofuranosyl	C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	4.48 ± 0.356	10.7 ± 1.94
22q		C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ S-	>159	
22e		H ₃ COOC-	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ S-	9.33 ± 4.85	30.3 ± 18.8
22f		H ₃ COOC-	4-Cl-C ₆ H ₄ S-	6.03 ± 2.09	16.8 ± 3.64
22l		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	1.76	2.81 ± 0.258
22k		4-Br-C ₆ H ₄ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	6.74 ± 5.57	18.4 ± 8.48
22r		H ₃ COOC-	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁ S-	34.7 ± 1.14	52.2 ± 6.08
22h		C ₆ H ₅ -	<i>n</i> -C ₄ H ₉ S-	7.61	10.6 ± 3
22c		C ₆ H ₅ -	4-Cl-C ₆ H ₄ S-	6.73	12.9 ± 3.87
22i		C ₆ H ₅ -	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁ S-		30.3
30	β-D-Ribofuranosyl	C ₆ H ₅ -	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ S-	3.68 ± 0.575	54.8 ± 18.5
31b	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetyl-β-D-ribofuranosyl	—	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	>185	
31c		—	<i>n</i> -C ₄ H ₉ S-	91.2 ± 5.27	117 ± 22.1
31d		—	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁ S-		
33a		C ₆ H ₅ -	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ S-	4.69 ± 1.98	47.1 ± 19.2
33b		C ₆ H ₅ -	C ₆ H ₅ CH ₂ S-	6.49 ± 0.468	16.8 ± 0.876
33c		C ₆ H ₅ -	<i>n</i> -C ₄ H ₉ S-	12.9 ± 4.41	19.4 ± 4.41
33d		C ₆ H ₅ -	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁ S-	2.85 ± 0.552	7.02 ± 1.04
34		—	—	23.5 ± 6.07	116 ± 34.1

Green colour — the compound has antiviral activity (full protection of the cells against virus-induced cell death without adverse effects on host cell or monolayer morphology), it is reproducible hit match; light green colour — the compound has antiviral activity, but it is not reproducible hit match; yellow colour — the compound does not meet the selection criteria; red colour — the compound is not active.

Table 13. Antiviral activity of purine nucleosides against Chikungunya virus 899

Compound	Chikungunya virus 899	
	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
20ad	4.12 ± 1.78	143 ± 58.1
20ag	3.38 ± 0.839	12.7 ± 2.4
22m	7.03 ± 1.17	14.6 ± 2.79
22e	26.6 ± 6.82	30.4 ± 17.9
22r	53.6 ± 21	144
22h	3.67 ± 0.593	10.2 ± 1.89
22c	7.29 ± 3.84	37.6 ± 22.1
31b	13.7 ± 3.63	75.4 ± 43.2
31d	43 ± 10.3	127 ± 3.81
33d	2.76 ± 0.2	7.92 ± 1.8

General structures of compounds see in Table 12.

The research patent covering the topics of this chapter can be found in appendix IX.

6.3. Cytotoxicity studies

In 2012, the group of M. K. Lakshman synthesized C(2) triazolyl adenosine analogues **40** and **41** which showed a pronounced antiproliferative activity in human ovarian and colorectal cancer cells (Figure 15). In the case of DNA and RNA viruses, some of the C(2) triazolylinosine derivatives showed weak inhibitory activity against cytomegalovirus.^{4c}

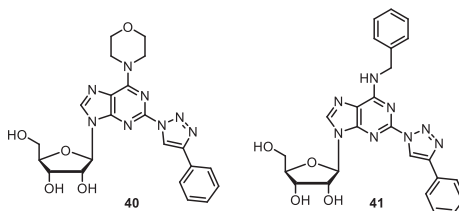


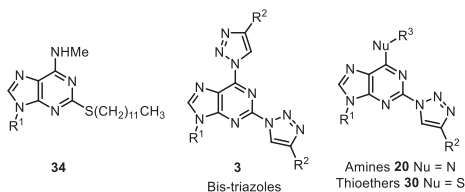
Figure 15. In M. K. Lakshman group synthesized compounds **40** and **41**

These compounds were the only to date known biologically active triazolylpurine compounds. To the best of our knowledge, 2,6-bis-triazolylpurine and 2-triazolyl-6-thiopurine derivatives in this context remain unknown.

In collaboration with Irina Šestakova and Grigory Veinberg from the Latvian Institute of Organic Synthesis several our compounds were tested for their cytotoxic activity on the cell lines HT-1080 (human lung fibrosarcoma), MG-22A (mouse hepatoma) and normal cell line NIH 3T3 (mouse embryonic fibroblasts). According to the results compounds **3a**, **3k**, **3r**, **20w**, **20x** possessed a high cytotoxic activity on both cell lines, compound **3v** possessed a high cytotoxic activity on the cell line MG-22A, but on the cell line HT-1080 had

no activity. On the other hand, compounds **3f**, **3m**, **3s**, **20d**, **20ak** were not cytotoxic. Compound **3p** had a high cytotoxic effect on MG-22A, but medium on HT-1080. Compound **20y** had a high cytotoxic effect on HT-1080 and a low on MG-22A. Next, compounds **3b**, **3w**, **20c**, **20e**, **20f**, **20z**, **20aa** and **30** had moderate cytotoxic effect on both cell lines. The interesting results showed compounds, which were toxic on one of the cell lines and were harmless to the living cells. Such as compound **3c**, which was moderately toxic on MG-22A, but had no effect on HT-1080 cells and compound **34**, which possessed a high cytotoxic effect on HT-1080 cells and medium on MG-22A and were classified as harmless to the living cells (Table 14).

Table 14. Characterization of compounds by IC₅₀ (µg/ml)



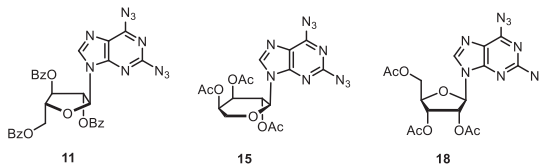
Compound	R ¹	R ²	NuR ³	HT-1080 IC ₅₀ (µg/ml) MTT	MG-22A IC ₅₀ (µg/ml) MTT	3T3	
						IC ₅₀ (µg/ml) NR	LD ₅₀ (mg/kg)
3a	2',3',5'-Tri-O-acetyl-β-D-ribofuranosyl	C ₆ H ₅ -	—	4	1	2	199
3b		4- <i>t</i> -Bu-C ₆ H ₄ -	—	42	53	940	3902
3c		4-Br-C ₆ H ₄ -	—	>100	15	*	>2000
3f		HO(CH ₃) ₂ C-	—	>100	*	>1000	>2000
3s		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -	—	*	*	*	>2000
3t		4-MeO-C ₆ H ₄ -	—	>100	25	*	>2000
3u		4-Me ₂ N-C ₆ H ₄ -	—	*	25	*	>2000
3w	2',3',4'-Tri-O-acetyl-α-D-arabino-pyranosyl	4-F-C ₆ H ₄ -	—	49	15	>1000	>2000
3k		C ₆ H ₅ -	—	10	3	3	266
3m		HO(CH ₃) ₂ C-	—	*	*	>1000	>2000
3n			—	54	>100	246	1896
3p		H ₃ C(CH ₂) ₄ -	—	38	9	19	587
3v		2-F-C ₆ H ₄ -	—	>100	2	1	140
20ak		HOCH ₂ -	H ₂ N-	*	*	711	2634
3r	2',3',5'-Tri-O-benzoyl-α-D-arabino-furanosyl	HO(CH ₃) ₂ C-	—	2	3	6	407
20e	β-D-Ribo-furanosyl	C ₆ H ₅ -		55	44	>1000	>2000
20c		C ₆ H ₅ -		21	32	12	407
20d		HOCH ₂ -		*	*	>1000	>2000
20w		4-Me-C ₆ H ₄ -		6	2	16	443
20x		4-F ₃ C-C ₆ H ₄ -		6	3	364	2021
20y		4-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₄ -		10	88	>1000	>2000
20z		4-Br-C ₆ H ₄ -		21	13	147	1335
20aa		4-MeO-C ₆ H ₄ -		29	56	224	1474

Compound	R ¹	R ²	NuR ³	HT-1080 IC ₅₀ (μg/ml) MTT	MG-22A IC ₅₀ (μg/ml) MTT	3T3	
						IC ₅₀ (μg/ml) NR	LD ₅₀ (mg/kg)
20f	α-D-Arabinopyranosyl	C ₆ H ₅ -		13	41	791	2415
20ac			H ₂ NHN-	*	20	>1000	>2000
30	β-D-Ribofuranosyl	C ₆ H ₅ -	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ S-	29	20	*	>2000
34	2',3',5'-Tri- <i>O</i> -acetyl-β-D-ribofuranosyl	—	—	6	35	642	2614

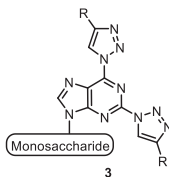
„*“ — compounds are not cytotoxic

CONCLUSIONS

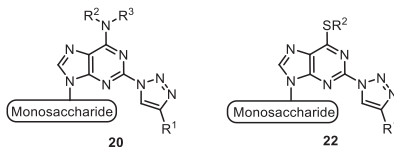
1. The methods for the synthesis of 2,6-diazidopurine nucleosides **11**, **15** and **18** have been developed. The higher overall yield was obtained by a convergent approach of synthesis which was based on Vorbrüggen glycosylation conditions of 2,6-diazidopurine which is well suited for the silylation reaction and further reaction in the presence of Lewis acid.



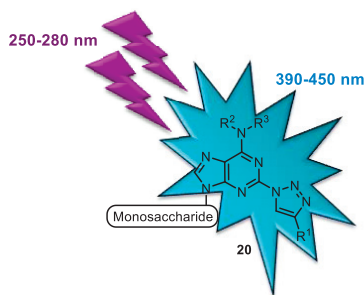
2. Previously unknown class of 2,6-bis-(1,2,3-triazol-1-yl)purine nucleosides **3** have been synthesized in Cu(I) catalysed 1,3-dipolar cycloaddition (CuAAC) reactions between 2,6-diazidopurine derivatives and various terminal alkynes which possessed alkyl, hydroxyalkyl, aryl and monosaccharide containing fragments. The isolated yields from CuAAC reactions can be improved by addition of 10% aqueous AcOH and can reach 83%.



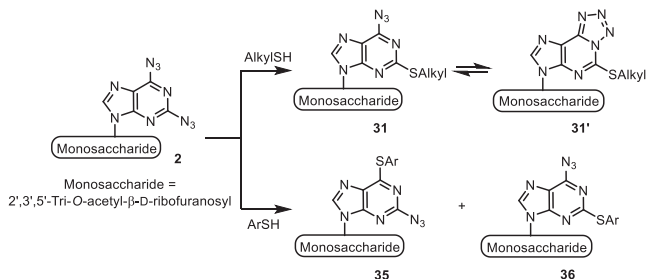
3. 1,2,3-Triazolylgroup at the C(6) position of purine is acting as a good leaving group in the nucleophilic heteroaromatic substitution reactions between 2,6-bis-triazolylpurine nucleosides and amines or thiols. *N*⁶-Substituted 2-triazolyladenine nucleosides **20** have been obtained in the yields up to 97% and 6-thio-2-triazolylpurine nucleosides **22** — in the range from 59 till 99%.



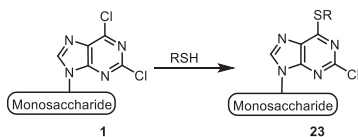
4. *N*⁶-Substituted 2-triazolyl adenine nucleosides **20** possess useful levels of fluorescence. The determined quantum yields in dimethylsulfoxide reached up to 53%.



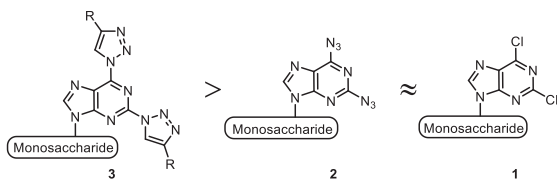
5. Novel 2-alkylthiopurine nucleosides have been obtained in the reactions between 2,6-diazidopurine nucleoside **2** and alkylthiols with good regioselectivity. In the solution products exist in two tautomeric forms — azide **31** and tetrazole **31'**. In the contrast, reactions between diazide **2** and arylthiols occur with bad regioselectivity; they result in the mixture of products **35** and **36**.



6. The method of nucleophilic substitution reactions between 2,6-dichloropurine nucleoside **1** and different *S*-nucleophiles was developed. Products **23** were obtained with the isolated yields from 59 till 98%. Monochloride derivatives **23** were inert to azide in direct nucleophilic aromatic substitution reactions.

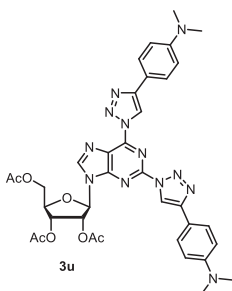


7. The initial studies of the reactivity between 2,6-bis-triazolylpurine, 2,6-diazidopurine and 2,6-dichloropurine nucleosides are started. The preliminary results show that 2,6-bis-triazolylpurine derivatives undergo the nucleophilic heteroaromatic substitution reactions with great ease. Their S_NAr reactions occur faster than those of 2,6-diazo- and 2,6-dichloropurines and with a negligible amount of by-products.

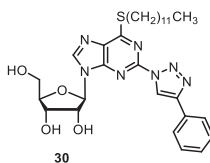


8. A number of novel triazolylpurine nucleosides have promising biological activities:

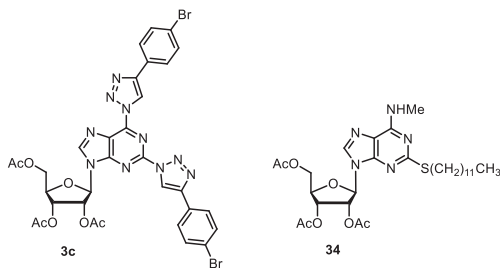
- agonist activity on adenosine A₃ and purinergic P2Y₁₂ receptors, for example, derivative **3u**;



- antiviral activity against yellow fever virus, Chikungunya and enteroviruses, for example, derivative **30**;



- cytotoxicity on cancer cell lines HT-1080 and MG-22A, for example, derivatives **3c** and **34**.



ACKNOWLEDGEMENTS

Especially I would like to thank:

- Syntagon Baltic SIA and professor Edvards Liepiņš (Latvian Institute of Organic Synthesis (LIOS)) for the nuclear magnetic resonance studies;
- Senior researcher Sergey Belyakov, senior researcher Anatoly Mishnev and Dmitrijs Stepanovs (LIOS) for *X*-ray diffraction analyses;
- Kristīne Lazdoviča, Viktorija Makarova, Ilze Neibolte and professor Valdis Kampars (Riga Technical University), Lina Skardziute, Karolis Kazlauskas and professor Saulius Jursenas (Vilnius University) and Igors Kļimenkovs (University of Latvia) for absorption and emission spectra;
- Ramona Petrovska, Ilona Mandrika (Latvian Biomedical Research and Study Centre), Irina Šestakova and senior researcher Grigory Veinberg (LIOS), professor Johan Neyts and Pieter Leyssen (Rega Institute for Medical Research, University of Leuven, Belgium) for biological activity studies;
- Armands Kovaļovs, Inga Bižāne, Madara Bārzdaine, Edgars Laķis for the contribution in the synthetic work;
- Evija Rolava and Jevgeņija Lugiņina for monosaccharide fragment containing alkynes.

The most specific thanks I would like to devote to my supervisors — professor Māris Turks and professor Ērika Bizdēna for endless patience, understanding and new ideas. Thanks to professor Ērika Bizdēna for the introduction with the world of purine nucleosides and her incessant ardour and sincerity. Thanks to professor Māris Turks for a hearing, assistance in solving problems and eternal enthusiasm.

I express my gratitude to family, friends and colleagues for their continuous support, help, encouragement, and for believing in my efforts. This work would not be possible without all these people.

REFERENCES

1. a) Lech-Maranda, E.; Korycka, A.; Robak, T. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 575; b) Robak, T.; Korycka, A.; Lech-Maranda, E.; Robak, P. *Molecules* **2009**, *14*, 1183; c) CLL Trialists' collaborative group. *Haematologica* **2012**, *97*, 428.
2. Gumina, G.; Choi, Y.; Chu, C. Recent advances in antiviral nucleosides. In *Antiviral Nucleosides: Chiral Synthesis and Chemotherapy*; Chu, C. K., Ed.; Elsevier, **2003**; pp 1.
3. a) Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Müller, C. E. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 1; b) Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Klotz, K. N.; Linden, J. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 527; c) Khakh, B. S.; Burnstock, G.; Kennedy, C.; King, B. F.; North, R. A.; Seguela, P.; Voigt, M.; Humphrey, P. P. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 107.
4. a) Cosyn, L.; Palaniappan, K. K.; Kim, S.-K.; Duong, H. T.; Gao, Z.-G.; Jacobson, K. A.; van Calenbergh, S. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7373; b) Gupte, A.; Boshoff, H. I.; Wilson, D. J.; Neres, J.; Labello, N. P.; Somu, R. V.; Xing, C.; Barry III, C. E.; Aldrich, C. C. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7495; c) Lakshman, M. K.; Kumar, A.; Balachandran, R.; Day, B. W.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Balzarini, J. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 14, 5870; d) Lakshman, M. K.; Singh, M. K.; Parrish, D.; Balachandran, R.; Day, B. W. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2461; e) Mathew, S. C.; By, Y.; Berthault, A.; Virolleaud, M.-A.; Carrega, L.; Chouraqui, G.; Commeiras, L.; Condo, J.; Attolini, M.; Gaudel-Siri, A.; Ruf, J.; Rodriguez, J.; Parrain, J.-L.; Guieu, R. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3874.
5. Vorbrüggen, H. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 509.
6. a) Robins, M. J.; Uznański, B. *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 2608; b) Nair, V.; Richardson, S. G. *Synthesis* **1982**, *8*, 670; c) Francom, P.; Janeba, Z.; Shibuya, S.; Robins, M. J. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6788; d) Francom, P.; Robins, M. J. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 666; e) Gerster, J. F.; Robins, R. K. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 3258.
7. Novosjolova, I.; Stepanovs, D.; Bizdēna, Ē.; Mishnev, A.; Turks, M. *Acta Cryst.* **2014**, *E70*, Part 2, o108.
8. a) Bennua, B.; Vorbrüggen, H. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1339; b) Bennua-Skalmovski, B.; Krolkiewicz, K.; Vorbrüggen, H. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7845; c) Ashcroft, C. P.; Dessi, Y.; Entwistle, D. A.; Hesmondhalgh, L. C.; Longstaff, A.; Smith, J. D. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 470.

9. Novosjolova, I.; Bizdēna, Ē.; Belyakov, S.; Turks, M. Synthesis and *X*-ray Studies of 6-Pyrrolidinyl-2-Triazolyl Purine Arabinonucleoside. *Scientific Journal of RTU: Materials Sciences and Applied Chemistry* **2013**, *28*, 39.
10. Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4207.
11. a) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 10, 565; b) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
12. a) Dedola, S.; Nepogodiev, S. A.; Field, R. A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1006; b) Dondoni, A. *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 700.
13. a) Nolte, C.; Mayer, P.; Straub, B. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2101; b) Shao, C.; Wang, X.; Xu, J.; Zhao, J.; Zhang, Q.; Hu, Y. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7002.
14. a) Reese, C. B.; Ubasawa, A. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 2265; b) Kamaike, K.; Takahashi, M.; Utsugi, K.; Tomizuka, K.; Ishido, Y. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 91; c) Kamaike, K.; Takahashi, M.; Utsugi, K.; Tomizuka, K.; Okazaki, Y.; Tamada, Y.; Kinoshita, K.; Masuda, H.; Ishido, Y. *Nucleosides Nucleotides* **1996**, *15*, 749; d) Miles, R. W.; Samano, V.; Robins, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5951; e) Robins, M. J.; Miles, R. W.; Samano, M. C.; Kaspar, R. L. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8204.
15. Fotoohi, A. K.; Coulthard, S. A.; Albertioni, F. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79*, 1211.
16. Elgemeie, G. L. *Curr. Pharm. Design* **2003**, *9*, 2627.
17. Novosjolova, I.; Bizdēna, Ē.; Turks, M. Synthesis of Novel 2- and 6-Alkyl/Arylthiopurine Derivatives. *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **2015**, in press, DOI: 10.1080/10426507.2014.989435.
18. a) Núñez, M. C.; Rodríguez-Serrano, F.; Marchal, J. A.; Caba, O.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 183; b) Brændvang, M.; Gundersen, L.-L. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7144; c) Legraverend, M. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 8585; d) Musicki, B.; Widlanski, T. S. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1267.
19. a) Dierckx, A.; Dinér, P.; El-Sagheer, A. H.; Kumar, J. D.; Brown, T.; Grøtli, M.; Wilhelmsson, L. M. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 4513; b) Dyrager, C.; Börjesson, K.; Dinér, P.; Elf, A.; Albinsson, B.; Wilhelmsson, L. M.; Grøtli, M. *European J. Org. Chem.* **2009**, 1515.
20. Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A.; Gessi, S.; Borea, P. A. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 238.
21. a) Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Knight, G. E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K. A.;

- Weisman, G. A. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 281; b) Burnstock, G. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1471; c) Borrmann, T.; Abdelrahman, A.; Volpini, R.; Lamdertucci, C.; Alksnis, E.; Gorzalka, S.; Knospe, M.; Schiedel, A. C.; Cristalli, G.; Müller, C. E. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5974.
22. Zhan, C.; Yang, J.; Dong, X.-C.; Wang, Y.-L. *J. Mol. Graphics Modell.* **2007**, *26*, 20.
23. a) Gao, Z.-G.; Jeong, L. S.; Moon, H. R.; Kim, H. O.; Choi, W. J.; Shin, D. H.; Elhalem, E.; Comin, M. J.; Melman, N.; Mamedova, L.; Gross, A. S.; Rodriguez, J. B.; Jacobson, K. A. *Biochemical Pharmacology* **2004**, *67*, 893; b) Ezeamuzie, C. I.; Philips, E. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *300*, 712; c) Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Moro, S.; Spalluto, G.; Pastorin, G.; Ros, T. D.; Klotz, K.-N.; Varani, K.; Gessi, S.; Borea, P. A. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 770.
24. a) Caglioti, C.; Lalle, E.; Castilletti, C.; Carletti, F.; Capobianchi, M. R.; Bordi, L. *New Microbiologica* **2013**, *36*, 211; b) Lo Presti, A.; Lai, A.; Cella, E.; Zehender, G.; Ciccozzi, M. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2014**, 925.
25. a) Monath, T. P. *The Lancet Infectious Disease* **2001**, *1*, 11; b) Marfin, A. A.; Monath, T. P. Yellow fever virus in Encyclopedia of virology 3rd ed., BWJ Mahy and MHV Vam Regenmortel (eds.) Academic Press, San Diego, CA, **2008**, pp: 469–476.
26. Ooi, M. H.; Wong, S. C.; Lewthwaite, P.; Cardoso, M. J.; Solomon, T. *The Lancet Neurology* **2010**, *9*, 1097.
27. Wobus, C. E.; Thackray, L. B.; Virgin IV, H. W. *J. Virol.* **2006**, *80*, 11, 5104.