

CHEMIE FOSFONÁTOVÝCH ANALOGŮ NUKLEOTIDŮ A OLIGONUKLEOTIDŮ – STRUČNÁ REMINISCENCE A SOUČASNOST

IVAN ROSENBERG

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
ivan@uochb.cas.cz

Došlo 29.10.13, přijato 5.12.13.

Klíčová slova: oligonukleotidy, fosfonáty, fosforylasa,
RNasa H, RNasa L, nukleotidas, hybridizace

Obsah

1. Úvod
2. Nukleosidfosfonové kyseliny
 - 2.1. Nukleosidfosfonové kyseliny s pyrrolidinovým kruhem
 - 2.2. Nukleosidfosfonové kyseliny s prolinolovým kruhem
 - 2.3. Nukleosidfosfony
 - 2.4. 5'-Deoxynukleosid-4'-oxymethylfosfonáty
 - 2.5. Nukleosidfosfonové kyseliny s tetrahydrofuranovým kruhem
 - 2.6. 3',4'-Didehydronukleosid-5'-aldehidy a 3',4'-didehydronukleosid-5'-hydroxyfosfonáty
 - 2.7. 4'-Alkoxy-2',3'-dideoxydidehydronukleosidy
 - 2.8. Lipofosfonoxiny
3. Inhibitory enzymů „salvage pathway“
4. Isopolární fosfonátové analogy oligonukleotidů
 - 4.1. Isosterní fosfonátové oligodeoxynukleotidy
 - 4.2. Neisosterní fosfonátové oligodeoxynukleotidy
 - 4.3. Neisosterní fosfonátové oligoribonukleotidy
 - 4.4. Fosfonátové oligoadenyláty s 2',5' vazbou – efekторы ribonukleazy L (RNase L)
 - 4.5. Fosfodiesterové 4'-alkoxyoligodeoxynukleotidy
5. Závěr

1. Úvod

Více než 40 let přitahují pozornost organických chemiků, biochemiků a biologů analogy nukleotidů (nukleosidfosfátů), mezi kterými představují isoelektronické (isopolární) nukleosidfosfonové kyseliny (NFK) významnou skupinu látek vyznačující se přítomností fosfonátové P–C vazby místo fosfoesterového P–O seskupení. Hybnou silou stále trvajících zájmu o NFK je absolutní stabilita P–C vazby vůči působení fosfomonoesteras a nukleotidas, hydrolytický štěpících fosfoesterové P–O

vazby, spojená s možným využitím NFK jako stabilních antimetabolitů vhodných k regulaci metabolických drah. Přestože první syntetizované NFK nevykazovaly prakticky žádné biologické účinky *in vivo*, staly se neocenitelným nástrojem při studiu mechanismů spojených se štěpením fosfoesterové a fosfodiesterové vazby a přenosem fosforylskupiny. V roce 1986 byla publikována práce v časopise *Nature* (DeClercq a spol., 1986)¹, prezentující výrazné protivirové účinky nové skupiny NFK, tzv. acyklických nukleosidfosfonových kyselin. Po téměř dvou dekáдах byly tři z této velmi rozsáhlé skupiny látek, objevených na ÚOCHB ve skupině Antonína Holého, zavedeny americkou firmou Gilead Sciences do klinického použití – *Vistide* [(S)-1-(1-cytosinyl)-3-hydroxy-2-propoxymethylfosfonová kyselina] proti zánětu sítnice indukovaného cytomegalovirem u pacientů s AIDS, *Viread* [(R)-1-(9-adeninyl)-2-propoxymethylfosfonová kyselina] určený pro léčbu pacientů s AIDS a *Hepsera* [2-(9-adeninyl)ethoxymethylfosfonová kyselina] pro léčbu chronické hepatitidy typu B. Po několika dekáдах výzkumu se tak sen o biologických aplikacích nukleosidfosfonových kyselin stal skutečností.

Extenzivní výzkum v oblasti chemie a biochemie složek nukleových kyselin, nukleobází, nukleosidů a nukleotidů, započatý v 50. letech minulého století, silně stimuloval také výzkum v oblasti chemie nukleových kyselin a jejich krátkých štěpů, oligonukleotidů (ON). V roce 1953 Watson a Crick poprvé, na základě dat Franklinové a Wilkinse, postulovali model sekundární struktury molekuly DNA – model dvoušroubovice DNA. V téže roce byl založen Ústav organické chemie a biochemie AV ČR (ÚOCHB), který se začal zabývat, kromě jiných oblastí, také chemií a biochemií nukleových kyselin a jejich složek. Nukleosidová a nukleotidová chemie byla celosvětově na svém počátku a o možnostech syntézy DNA a RNA se jenom uvažovalo. V roce 1966 rozluštili Nirenberg, Ochoa a Khorana genetický kód. V této souvislosti stojí určitě za zmínku, že v 60. letech se na ÚOCHB otázkou genetického kódu intenzivně zabývala skupina pracovníků kolem Ivana Rychlíka. V průběhu 60. a 70. let dochází k rychlému rozvoji metodik syntézy oligonukleotidů. Původní fosfodiesterová metoda syntézy v roztoku (Khorana) byla brzy nahrazena mnohem účinnější fosfortriesterovou metodou (Letsinger) a ta byla posléze vytěsňena metodou H-fosfonátovou (Todd, Froehler, Matteucci) a fosfitovou (Letsinger), která vytvořila základ fosforamiditové metody (Caruthers); poslední jmenovaná metoda je v současnosti jedinou prakticky používanou metodou syntézy oligonukleotidů na pevné fázi.

V roce 1977 došlo k rozdělení ÚOCHB a část laboratoří přešla pod ÚMG. Zajímavostí je, že tento „rozpad“, ruku v ruce s požadavky molekulární biologie na syntetické oligonukleotidy, umožnil rychlý rozvoj československé oligonukleotidové chemie pod vedením Jiřího Smrta na

ÚOCHB. Ve spolupráci s Vývojovými dílnami ÚOCHB vyvinul Jiří Smrť během velmi krátké doby dva syntetizátory oligonukleotidů (*SynGen-1* a *SynGen-2*) a vypracoval praktickou aplikaci chlorfosfitové metody syntézy oligonukleotidů na pevné fázi. Za tuto práci obdržel celý kolektiv v čele s Jiřím Smrtem na počátku 80. let Státní cenu za chemii.

Vyřešení chemické syntézy přirozených oligonukleotidů na pevné fázi na jedné a sekvenace DNA na druhé straně znamenaly zásadní převrat v biologických vědách. Teorie o antisensním působení nukleových kyselin při regulaci exprese genetické informace v buňkách vyslovená Zamecníkem položila základy genové terapie a otevřela tak dveře do úžasného světa strukturně modifikovaných antisensních oligonukleotidů (ASO) komplementárních k jednovláknovým úsekům RNA. Systematický výzkum vzájemných interakcí oligonukleotidů vedl k poznatku, že hybridní duplex může být substrátem enzymu ribonukleasy H (RNasa H), která rozštěpí RNA vlákno, zatímco DNA vlákno zůstane intaktní. Na druhé straně vytvoření velmi stabilního hybridního duplexu může vést ke sterickému bloku při proteosyntéze (translation) nebo při sestřihu genetické informace (splicing). Ve všech třech případech dochází k potlačení exprese určitého genu. Použití ASO *in vivo* je limitováno stabilitou fosfodiesterové internukleotidové vazby, zejména vůči endonukleasám, které nemodifikovaný ASO rychle hydrolyzují. Proto je zcela ultimativním požadavkem na ASO jejich nukleasová stabilita. V průběhu posledních dvou dekad bylo syntetizováno několik stovek různých modifikací ASO, které se týkaly nukleobáze, pentofuranosového kruhu nebo fosfodiesterové internukleotidové vazby s cílem zvýšit hydrolytickou stabilitu a hybridizaci, zajistit průnik ASO do buněk a v neposlední řadě zvýšit selektivitu účinku ASO. Triumfem tohoto výzkumu bylo v roce 1998 schválení preparátu s názvem *Vitraven* (od americké firmy ISIS Pharmaceuticals, Inc.), určeného proti zánětu sítnice způsobené cytomegalovirem (ASO byl cílen k potlačení exprese virové DNA polymerasy). *Vitraven* je plně fosforothioátový ASO, ve kterém byla fosfodiesterová $-O-P(=O)-O-$ internukleotidová vazba nahrazena nukleasově stabilnější chirální fosforothioátovou $-O-P(=S)-O-$ vazbou, která umožňuje takto modifikovaným ASO pronikat lépe do buněk a stimulovat hydrolytickou aktivitu RNasy H. *Vitraven* byl více než 10 let jediným ASO zavedeným do klinické praxe. Až v roce 2013 byl americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválen ke klinickému použití další, opět plně fosforothioátový oligonukleotid pod názvem *Kynamro*, cílený proti dědičné hypercholesterolemii. Nicméně výsledky posledních 20 let ukázaly, že fosforothioátové ASO vykazují, v důsledku přítomnosti lipofilního atomu síry, celou řadu nespecifických interakcí s enzymy a dalšími proteiny, což vede ke zvýšené toxicitě a při experimentech *in vivo* k nežádoucím fyziologickým projevům. V důsledku přítomnosti nemetylovaných C v CG sekvencích byla také pozorována interference s přirozeným imunitním systémem buněk (interakce s toll-like re-

ceptorem 9). Všechna tato zjištění doslova „zmrazila“ počáteční nadšení a na určitou dobu přestaly být ASO vlajkovou lodí cílené inhibice exprese genomu. Mezitím byla propracována geniální metoda tlumení genů (gene silencing) aplikací krátkých nemodifikovaných RNA-RNA duplexů (siRNA, RNAi) a objevem onkogenních miRNA byla znovu oživena problematika ASO a zdůrazněna nutnost přípravy a studia nových chemických modifikací ASO. Výzkum v oblasti antisensních látek jako účinných a selektivních chemoterapeutik je předmětem zájmu řady firem, mezi nimiž jsou ISIS Pharmaceuticals a Alnylam Pharmaceuticals (obě USA) světovými lídry.

V roce 1993 byla ustavena na ÚOCHB nová skupina oligonukleotidů, která si vytkla za cíl syntézu a studium vlastností oligonukleotidů s modifikovanou internukleotidovou vazbou fosfonátového typu. V té době byly stále intenzivně studovány nové typy nukleosidfosfonových kyselin s možnými protivirovými účinky. Řada těchto sloučenin, která neprošla sítím protivirového testování, byla částečně vrácena do hry ve formě vhodně chráněných monomerů k zabudování do krátkých modifikovaných oligonukleotidů, u kterých byly zkoumány základní vlastnosti oligonukleotidů, jakými jsou schopnost párování (hybridizace) s komplementárními úseky DNA a RNA a odolnost vůči štěpení fosfonátové internukleotidové vazby *exo-* a *endonukleasami*. Vzhledem k tomu, že zavádění fosfonátových a přirozených jednotek do oligonukleotidového řetězce na pevné fázi vyžaduje použití dvou chemických různých, avšak vzájemně kompatibilních kondenzačních metod (fosfortriesterové a fosforamiditové nebo fosfortriesterové a H-fosfonátové), byl vyvinut na ÚOCHB syntetizátor oligonukleotidů (GenSyn), který tento požadavek na kombinovanou „step-by-step“ syntézu splňuje. Příprava fosfonátových oligonukleotidů s různými typy modifikované cukr-fosfátové páteře (sugar-phosphate backbone) je podmíněna syntézou strukturně diverzifikovaných nukleosidfosfonových kyselin (NFK) jako základních stavebních jednotek možných ASO, které navíc představují potenciální antimetabolity – inhibitory enzymů záchranného enzymového mechanismu, který dovoluje zpětné využití produktů katabolismu nukleových kyselin – nukleobází, nukleosidů a nukleotidů (purine and pyrimidine salvage pathway).

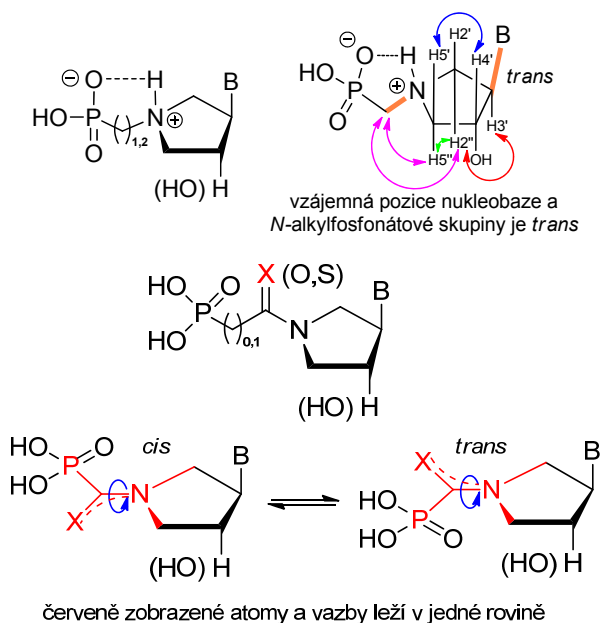
V současné době je ÚOCHB na mezinárodním poli jediné pracoviště, které se systematicky zabývá chemií isopolárních fosfonátových analogů oligonukleotidů a studiem jejich fyzikálně-chemických, biochemických a biologických vlastností. Tento článek je redukováným průřezem řešené tematiky ve Skupině nukleotidů a oligonukleotidů na ÚOCHB. Vědecký program Skupiny nukleotidů a oligonukleotidů je zaměřen na dvě skupiny látek: (i) strukturně diverzifikované nukleosidfosfonové kyseliny (NFK) s modifikovanou cukernou částí a látky příbuzné jako možné antimetabolity a (ii) chimerické fosfonátové oligonukleotidy s antisensními a regulačními účinky.

2. Nukleosidfosfonové kyseliny

2.1. Nukleosidfosfonové kyseliny s pyrrolidinovým kruhem^{2–5}

Syntéza této skupiny látek vychází z pyrrolidinových nukleosidů s volnou sekundární aminoskupinou pyrrolidinového kruhu (obr. 1).

Vytvořením amidické vazby přímou reakcí s fenyl-diisopropylfosfonoformiátem nebo s diisopropylfosfonoctovou kyselinou za přítomnosti karbodiimidu byly získány příslušné *N*-fosfonokarbonyl- a *N*-fosfonoacetyl-deriváty a reakcí s *S*-methyl-diisopropylfosfonodithioformiátem byly připraveny fosfonothiokarbonylové sloučeniny. Mannichova reakce sekundární aminoskupiny s formaldehydem a dialkylfosfitem poskytla *N*-fosfonomethyl-deriváty a Michaelovou adicí na vinylfosfonát byly připraveny *N*-(2-fosfono)ethyl-deriváty. Pokud jde o konformaci pyrrolidinových nukleosidů s *N*-fosfonoacetyl- a *N*-fosfonothioacetyl-skupinou, spektroskopická analýza pomocí NMR ukázala planarizaci pyrrolidinového kruhu v důsledku hyperkonjugace π -orbitalů ketoskupiny *N*-fosfonoacetylového uskupení a π -orbitalů atomu dusíku a vznik *cis* a *trans* rotamerů. V případě fosfonothiokarbonyl-derivátů bylo dokonce možné oba rotamery rozdělit na reverzní fázi; po oddělení však došlo k rychlé ekvilibraci. Také *N*-fosfonoalkyl-deriváty vykazují zajímavé konformační chování. NMR studie ukázala kromě úplné protonace pyrrolidinového atomu dusíku ve velmi širokém rozmezí pH také jednoznačnou *trans* orientaci nukleobáze



Obr. 1. Konformace pyrrolidinových nukleosid *N*-alkyl a *N*-acylfosfonových kyselin

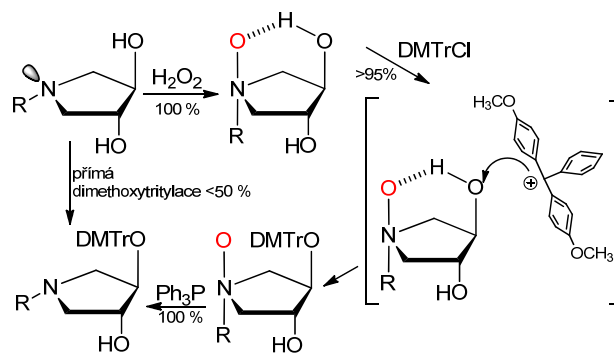


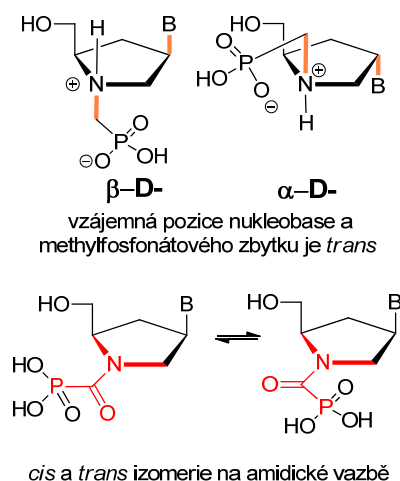
Schéma 1. Řízená dimethoxytritylace hydroxylu intramolekulárně akcelerovaná atomem kyslíku *N*-oxidu

a *N*-fosfonoalkylového zbytku.

V důsledku protonace atomu dusíku může docházet ke vzniku pěti, případně šestičlenného cyklu (v závislosti na délce alkylového řetězce) stabilizovaného vodíkovou vazbou. Při syntéze pyrrolidinových nukleosidů jsme objevili zajímavou reakci⁶, která nám umožnila přípravu *O*-dimethoxytrityl-derivátu *N*-alkyl-*D-trans*-3,4-dihydroxypyrrolidinu v téměř kvantitativním výtěžku (Schéma 1). Dimethoxytritylace do prvního stupně je silně akcelerována přítomností *N*-oxidoskupiny, která silně zvyšuje reaktivitu hydroxylu nacházejícího se v poloze *cis* k atomu kyslíku *N*-oxidu. Následná deoxygenace působením trifenylofosfinu poskytla požadovaný dimethoxytrityl-derivát v kvantitativním výtěžku.

2.2. Nukleosidfosfonové kyseliny s prolinolovým kruhem⁷

Tyto látky jsou další skupinou zajímavých analogů nukleotidů, které velice věrně mimikují přirozené



Obr. 2. Konformace prolinolových nukleosid *N*-alkyl a *N*-acylfosfonových kyselin

D-nukleosid-3'-fosfáty (obr. 2). Konformační charakteristiky těchto prolinolových nukleosidfosfonátů jsou obdobné jako v případě látek, uvedených v odstavci 2.1.

N-Fosfononokarbonylderiváty rovněž vykazují rotační *cis* a *trans* isomerii kolem N–C(O) vazby a nukleotidy s *N*-fosfonomethylskupinou jsou plně protonovány na atomu dusíku pyrrolidinového kruhu s *trans* vzájemnou orientací nukleobáze a *N*-fosfonomethylskupiny. Vzhledem k úplné isosterii těchto analogů s přirozenými nukleotidy jsou tyto fosfonáty jasnými kandidáty pro syntézu modifikovaných oligodeoxynukleotidů s cílem studia konformační adaptability v souvislosti s hybridizačními vlastnostmi.

2.3. Nukleosidfosfony⁸

V rámci výzkumu nových typů monomerů vhodných pro oligonukleotidovou chemii – nukleosid 5'-*O*-methylfosfonátů rozvětvených na atomu uhlíku fosfonátového uskupení, jsme zkoumali stereochemické aspekty přípravy sedmičlenných nukleosidfosfonů (schéma 2).

Tyto látky jsou dostupné elektrofilní inzercí chlordiethylfosfitu do 1,3-dioxanového kruhu nukleosid-3',5'-*O*-acetalů nebo ketalů za katalýzy SnCl₄. Byl navržen mechanismus inserce, která probíhá jak s úplnou regio-, tak i stereoselektivitou. NMR spektra ukázala vznik jednoho, pro naše účely však nevhodného, regioisomeru. Tento typ nukleosidfosfonů je hydrolyticky extrémně stabilní; sedmičlenný kruh se nepodařilo otevřít, aniž bychom nedestruovali celou molekulu. Nicméně tento typ látek představuje analogy cyklických fosfátů (cAMP, cGMP, cCMP), a bude proto dále zkoumán.

2.4. 5'-Deoxynukleosid-4'-oxymethylfosfonáty⁹

Tyto nové typy isosterních analogů nukleosid-5'-

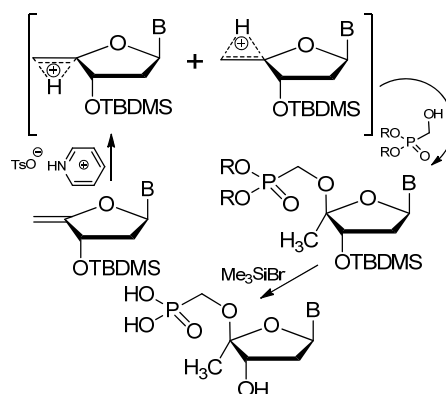


Schéma 3. Elektrofilní adice hydroxymethanfosfonátu na exocyklickou vinyleterovou vazbu

-fosfátů s ketalovým uspořádáním se vyznačují přítomností fosfonomethoxyskupiny vázané na C4', která je regioisomerní s přirozenou fosfoesterovou funkcí. Přítomná methylová skupina pochází z původního C5' atomu uhlíku nukleosidu (Schéma 3). Tyto fosfonové kyseliny jsou dostupné elektrofilní adicí dialkylhydroxymethanfosfonátu na vinyleterovou vazbu 4',5'-didehydronukleosidů v přítomnosti nadbytku pyridinium-tosylátu jako elektrofilního činidla. Reakce neprobíhá regioselektivně, vznikají oba C4' epimerní fosfonomethoxyderiváty.

O vlastnostech těchto látek bude podrobněji diskutováno v souvislosti s jejich inkorporací do oligonukleotidů.

2.5. Nukleosidfosfonové kyseliny s tetra-furanosovým kruhem¹⁰

Vzhledem k přirozeným 5'-nukleotidům jsou tyto

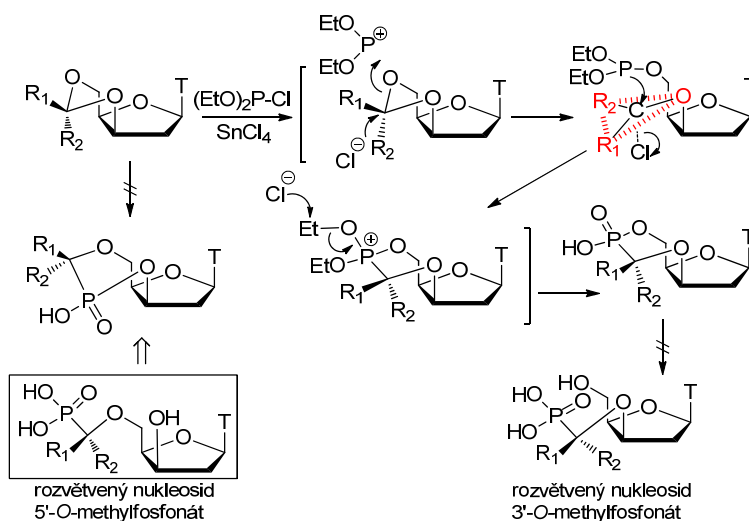


Schéma 2. Navržený mechanismus vzniku sedmičlenného nukleosidfosfonu

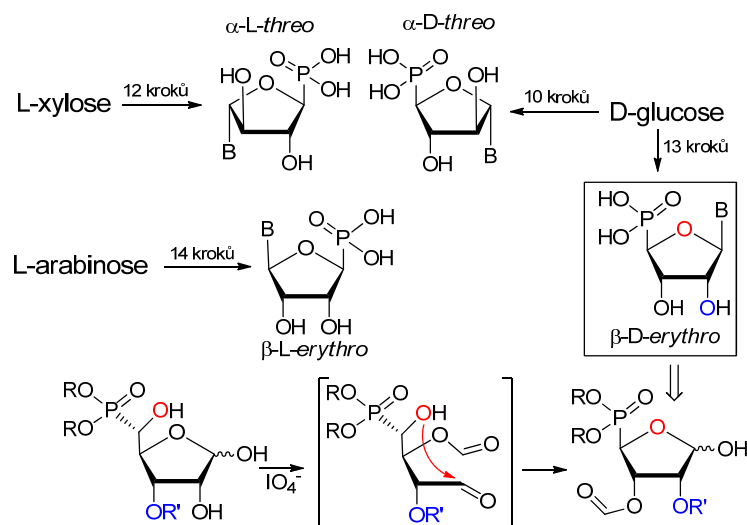
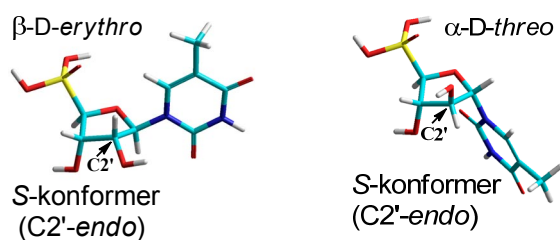


Schéma 4. Syntetický přístup k nukleosidfosfonovým kyselinám s tetrafuranosovým kruhem



Obr. 3. NMR konformace cukerného kruhu dvou typů nukleosidfosfonových kyselin s tetrafuranosovým kruhem

analogy neisosterní – fosforylskupina je přímo vázána na C4' tetrafuranosového kruhu. Tyto látky jsou dostupné multistupňovými syntézami z aldopentos a hexos. Klíčovým krokem celé syntézy je oxidativní štěpení C1–C2 vazby cukerného 5(*S*)-hydroxyfosfonátu jodistanovým aniontem za vzniku tetrafuranosylfosfonátu, který je syntonem pro nukleosidační reakci (Schéma 4).

Výsledky konformační analýzy provedené pomocí NMR ukázaly, že ve všech čtyřech uvedených typech fosfonových kyselin je vysoce preferována *S*-konformace (DNA typ; C2'-*endo* > 80 %) tetrafuranosového kruhu (obr. 3). To by mohlo být zajímavé z hlediska inkorporace nukleotidu s β-*D*-*erythro* konfigurací nebo jeho 2'-deoxyderivátu do DNA oligonukleotidů s preorganizovanou strukturou cukr-fosfátové páteře.

2.6. 3',4'-Didehydronukleosid-5'-aldehdy a 3',4'-didehydronukleosid-5'-hydroxyfosfonáty^{11,12}

Studium chránících skupin *cis*-diolového uspořádání

ribonukleosidů v návaznosti na možnou oxidaci zbývajících primárního 5'-hydroxyly na aldehyd vedlo, při použití 2',3'-*O*-orthoesterového chránění, k eliminační reakci za vzniku 3'-deoxy-3',4'-didehydronukleosid-5'-aldehdy v kvantitativním výtěžku (příprava těchto látek víceetapovou syntézou s nízkými výtěžky a obtížným čištěním byla

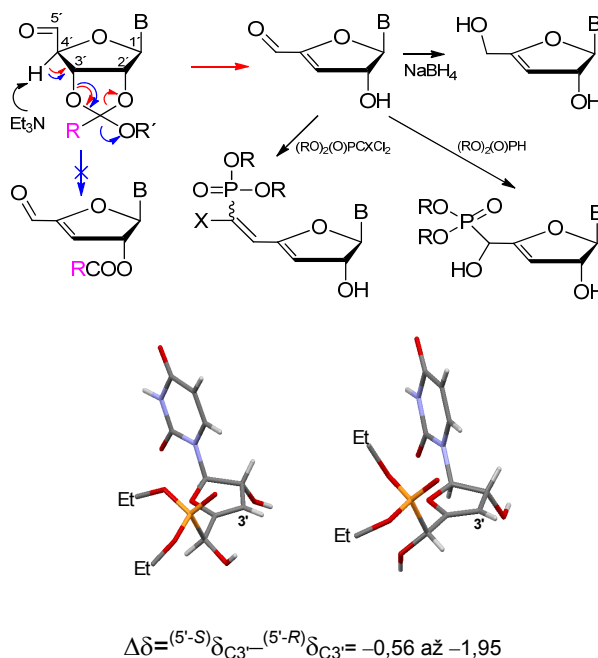


Schéma 5. Syntéza, NMR konformace a konfigurační přiřazení 5'-epimerů 3',4'-didehydronukleosid-5'-hydroxyfosfonátů

v literatuře již zmíněna) (Schéma 5).

Odstupující skupinou je v tomto případě orthoesterová funkce. Získané aldehydy jsou důležitým syntonem pro nukleofilní adici a Wittigovu reakci, které vedou k různým nukleosidfosfonátům. Nukleofilní adicí dialkylfosfitu na aldehydickou skupinu jsme získali v kvantitativním výtěžku epimerní směs hydroxyfosfonátů, kterou se podařilo rozdělit, čisté epimery vykrystalovat a určit krystalovou strukturu. Korelace s parametry získanými z měření NMR spekter umožnila přiřazení epimerů ve směsi na základě rozdílu $\delta_{C3'}$, chemických posunů obou epimerů, který ve všech případech nabýval záporných hodnot. V důsledku přítomnosti endocyklické dvojné vazby je dihydrofuranový kruh prakticky planární útvar. NMR studie dále ukázala na majoritní přítomnost *cis* C4'-C5' rotameru, vztaheno na vzájemnou pozici nukleobáze a fosforylskupiny. Z tohoto pohledu tyto látky mimikují nukleosid-5-fosfáty a budou dále studovány.

2.7. 4'-Alkoxy-2',3'-dideoxydidehydronukleosidy¹³

Tato nová skupina nukleosidů se vyznačuje přítomností 4'-alkoxyskupiny, která významně zvyšuje stabilitu nukleosidové vazby. Příprava těchto nukleosidů vychází

z 3'-deoxy-3',4'-didehydronukleosidů zmíněných v odstavci (2.6.). V přítomnosti alkoholu a dimethylacetalu DMF dochází k allylovému přesmyku Ferriera typu za vzniku C4'-epimerních 4'-alkoxy-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-nukleosidů, které lze chromatograficky separovat.

Navržený reakční mechanismus vzniku β -D a α -L epimerů (Schéma 6) objasňuje i vedlejší reakce – štěpení nukleosidové vazby a eliminaci 2'-hydroxyly za vzniku furanového derivátu. β -D a α -L epimery představují zcela novou skupinu látek, jejichž biologické vlastnosti jsou průběžně studovány.

2.8. Lipofosfonoxiny¹⁴

Studium konjugátů s nukleotidy a azacukry vedlo k objevu nové skupiny látek nazvaných lipofosfonoxiny (obr. 4), které sestávají ze čtyř strukturních motivů – modulů: (i) nukleosidový modul, (ii) iminocukerný modul, (iii) hydrofobní modul (lipofilní alkylový řetězec) a (iv) spojovací modul (fosfonátová funkce). Lipofosfonoxiny vykazují výraznou antibakteriální aktivitu proti Gram-pozitivním bakteriím včetně multirezistentních kmenů v rozmezí hodnot MIC (minimum inhibitory concentration) 1–12 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Cytotoxicita vůči eukaryotním buňkám

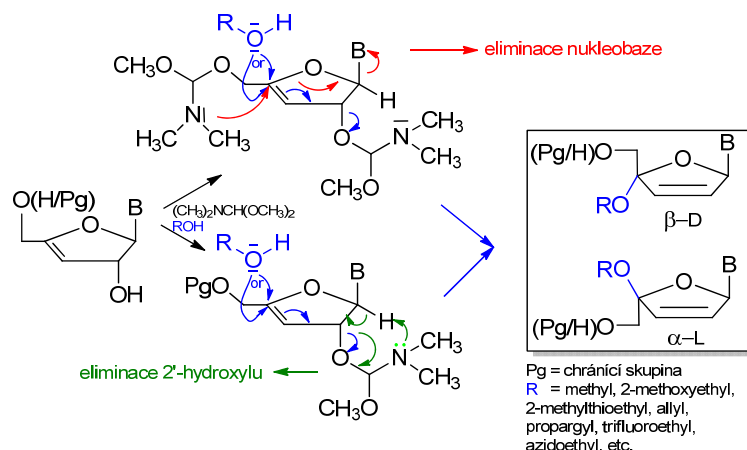
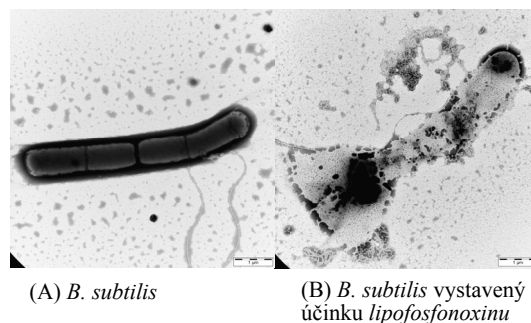
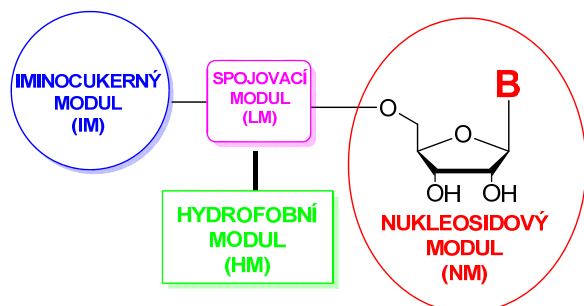


Schéma 6. Allylový přesmyk Ferriera typu a doprovodné reakce



Obr. 4. Modulární struktura nové generace protibakteriálních látek - lipofosfonoxinu a jejich účinek na bakterii *B. subtilis*

leží výrazně nad těmito hodnotami. Důležitou vlastností těchto látek je relativně snadná kombinace jednotlivých modulů, a tudíž také tvorba chemických knihoven pro vyhledávání antibakteriální látek. V současné době probíhá studie zaměřená na odhalení mechanismu účinku lipofosfonoxinů. Lipofosfonoxiny jsou baktericidní a způsobují destrukci bakteriální buňky (obr. 4). Z dosud provedených experimentů se zdá být pravděpodobné, že tyto látky působí na úrovni bakteriální buněčné membrány. Pro nejúčinnější látku se dosud nezdařila selekce rezistentního kmenu modelového mikroorganismu *Bacillus subtilis*, což je ideální vlastnost potenciálního nového antibiotika.

3. Inhibitory enzymů „salvage pathway“

Významnou součástí naší práce je studium inhibice enzymů „nucleoside and nucleotide salvage pathway“. Tyto enzymy byly rozpoznány jako vhodné cíle pro zásah chemoterapeutik při léčbě rakoviny. Právě mezi nukleosidfosfonovými kyselinami jsme našli účinné inhibitory některých těchto enzymů, např. nukleosidfosforylas^{15,16}, hypoxantin-guanin-xantin-fosforibosyltransferas¹⁷ a pyrimidin specifických 5'(3')-nukleotidas¹⁸.

4. Isopolární fosfonátové analogy oligonukleotidů

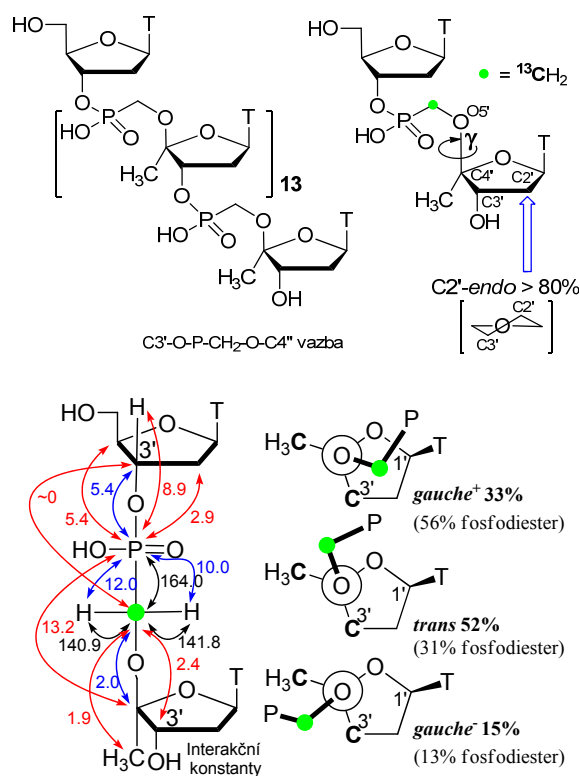
4.1. Isosterní fosfonátové oligodeoxynukleotidy^{19,20}

Zajímavou modifikací internukleotidové vazby je typ C3'–O–P–CH₂–O–C4'', isosterní s přirozenou fosfodiesterovou vazbou C3'–O–P–O–CH₂–C4'' (obr. 5).

Pentofuranosový kruh se nachází převážně v C2'-endo konformaci (> 80 %), což odpovídá DNA typu. Překvapivě však duplex modifikovaného oligothymidylátu s komplementárními rA₁₅ a dA₁₅ vykazuje velmi nízké teplotní stability. Jak bylo prokázáno hybridizační studií s fosfodiesterovými C4'-methyl-oligothymidyláty, je vliv methylskupiny v poloze C4' na teplotní stabilitu duplexu zcela zanedbatelný. Proto byla provedena pomocí NMR konformační studie fosfonátové internukleotidové vazby v TpT dimeru, jehož můstková CH₂ skupina v poloze alfa k atomu fosforu byla označena izotopem atomu uhlíku ¹³C. Toto značení umožnilo získat klíčové interakční konstanty $J(^{13}\text{C}-\text{O}-\text{C}4'-\text{C}3')$ a $J(^{13}\text{C}-\text{O}-\text{C}4'-\text{CH}_3)$ pro výpočet torzního úhlu γ a relativní zastoupení jednotlivých rotamerů *gauche*⁺, *trans* a *gauche*[–] (rotamery kolem C4'–C5' vazby). Z obrázku jsou patrné rozdíly v relativním zastoupení jednotlivých rotamerů pro fosfonátovou C3'–O–P–CH₂–O–C4'' a fosfodiesterovou C3'–O–P–O–CH₂–C4'' vazbu. Z výsledků vyplývá, že vysoká populace *gauche*⁺ rotamerů je zásadní faktor pozitivně ovlivňující stabilitu duplexu.

4.2. Neisosterní fosfonátové oligodeoxynukleotidy

Inkorporace vybraných NFK dala vzniknout několika typům oligodeoxynukleotidů (obr. 6) s neisosterní pro-



Obr. 5. NMR konformační analýza izosterní fosfonátové internukleotidové vazby modifikovaných oligothymidylátů

dlouženou fosfonátovou vazbou (i) regioisomerního typu C3'–O–P–CH₂–O–C5'' (1) a C3'–O–CH₂–P–O–C5'' (2), které se liší polohou CH₂ skupiny ve vazbě, (ii) konformačně fixovaného typu C2',3'–O,O=C(R)–P–O–C5'' (3) a (iii) zkráceného hydroxyfosfonátového typu C3'–O–P–(HO)C5'' (4), jejichž základní fyzikálně-chemické vlastnosti, tj. schopnost tvořit teplotně stabilní duplexy s komplementárními úseky DNA a RNA a biochemické vlastnosti byly a jsou průběžně studovány. Příklad vzniku vazby typu (1) je zobrazen ve schématu 7. Stabilita duplexu modifikovaného oligonukleotidu s RNA (a) vzrůstá s počtem vazeb 1 ($\Delta T_m \approx 2^\circ\text{C}/\text{modifikaci}$) až do poměru 1:1 s fosfodiesterovými vazbami a (b) rychle klesá s rostoucím počtem vazeb typu 2. Přítomnost vazby typu 3 v heteroduplexu silně zvyšuje jeho stabilitu ($\Delta T_m > 5^\circ\text{C}/\text{modifikaci}$) a rovněž vazba typu 4 má stabilizující účinek ($\Delta T_m \approx 2^\circ\text{C}/\text{modifikaci}$). Zde je třeba poukázat na složitost chování modifikovaných oligonukleotidů v duplexu. Jak vysvětlit, že inkorporace vazby typu 1, která je o jeden atom delší než přirozená vazba, má stabilizující účinek? Další stupeň volnosti by se měl projevit ve zvýšení entropie a růstu nestability systému. Otázka zní, čím je toto kompenzováno? MDS nepotvrdily možnou přítomnost nových vodíkových vazeb, které by mohly entropický faktor kompenzovat. Domníváme se, že prodloužená internukleotidová vazba typu 1 umožňuje v rámci duplexu energeticky mno-

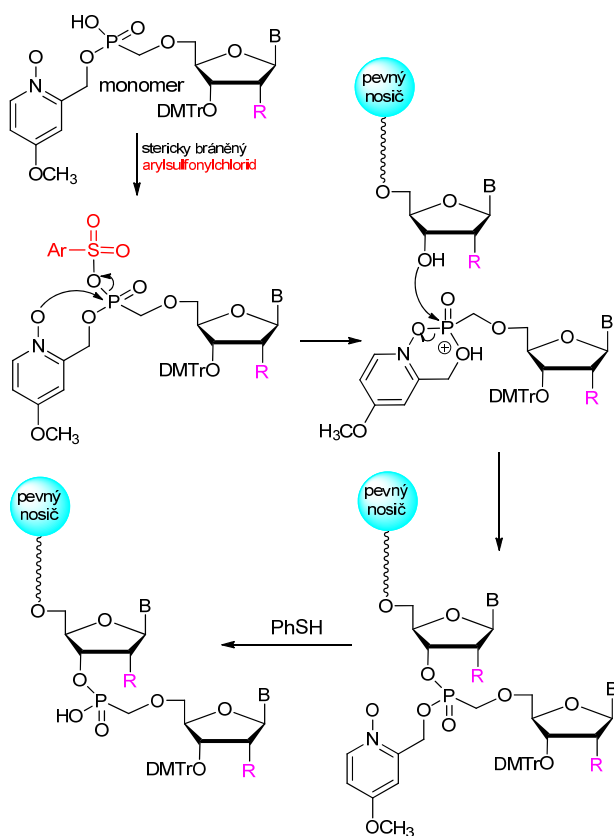


Schéma 7. Příklad syntézy fosfonátové internukleotidové vazby na pevné fázi

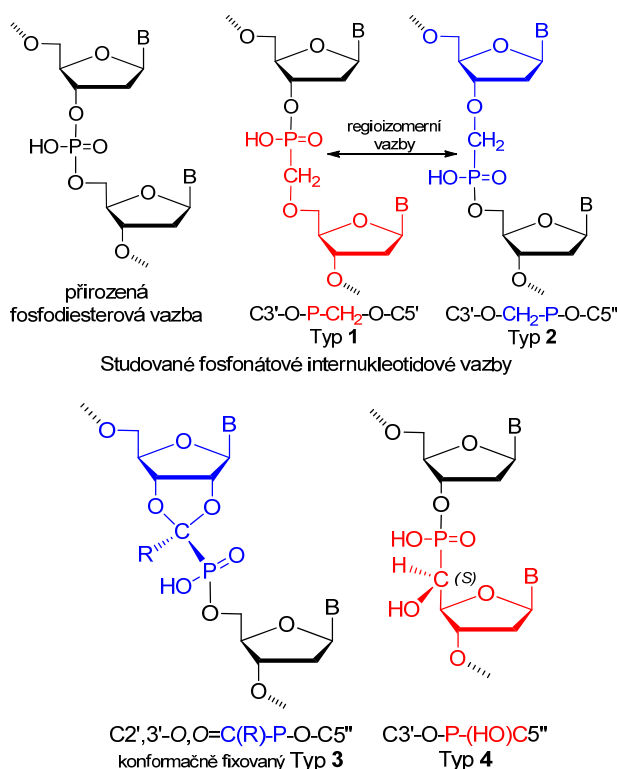
hem výhodnější „stacking“ interakce, které vzrůst entropie kompenzují. Nelze také vyloučit, že v důsledku prodloužení internukleotidové vazby se zvýší flexibilita přechodu mezi S- a N-tem konformací cukerné části, a tím i k výhodnější vzájemné akomodaci obou vláken v duplexu. Otázkou však stále zůstává, proč se typ vazby 2 nechová stejně jako typ 1, když jsou regioisomerní, a proč konformačně fixovaný typ vazby 3, který je jakousi „mezí konformací“ typu 2, vykazuje vynikající stabilizaci duplexu.

V popředí našeho zájmu jsou kromě fyzikálně-chemických vlastností zejména biologické vlastnosti fosfonátových oligonukleotidů jako možných antisensních látek s použitím při regulaci exprese genomu. Jedna z nedávných studií ukázala, že oligodeoxynukleotidy, které obsahují jak přirozené vazby, tak i modifikované vazby typu 1, stimulují v heteroduplexu aktivitu ribonukleasy H (RNasa H), která štěpí RNA vlákno s počáteční rychlostí, která několikanásobně převyšuje rychlost štěpení přirozeného heteroduplexu²¹. Tento poznatek dává šanci fosfonátovým oligonukleotidům k použití v biochemických a biologických experimentech.

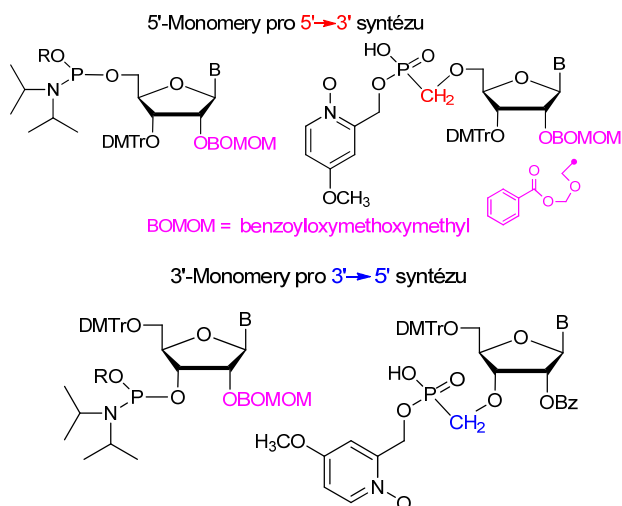
4.3. Neisosterní fosfonátové oligoribonukleotidy²²

Modifikované oligoribonukleotidy tvoří nejméně zastoupenou skupinu analogů oligonukleotidů. Důvodem je skutečnost, že biologické aplikace jednovláknových oligoribonukleotidů prakticky nebyly zapotřebí. S nástupem dvouvláknových RNA známých jako siRNA, které se využívají k selektivnímu tlumení genů, se však pohled na potřebu chemicky modifikovaných vláken RNA začíná měnit a nukleasová stabilita internukleotidové vazby v oligoribonukleotidech začíná opět nabývat na důležitosti (obr. 7).

V rámci našeho výzkumu jsme se zaměřili na syntézu monomerů nukleosid-5'-O- a 3'-O-methylfosfonátů, které po zabudování do internukleotidového řetězce vytváří regioisomerní fosfonátové vazby (C3'-O-CH₂-P-O-C5'' a C3'-O-P-CH₂-O-C5''), a právě vlastnosti těchto regioisomerních oligoribonukleotidů jsou předmětem našeho zájmu. Klíčovým krokem při syntéze monomerních nukleosid-5'-O-methylfosfonátů bylo nalezení vhodné chránicí skupiny 2'-hydroxyly. Byla vyvinuta 2'-O-benzoyloxy-methoxymethyl skupina (BOMOM), kterou jsme úspěšně aplikovali i na chránění 2'-hydroxyly přirozených monomerů (obr. 7). Je to první nesilylová chránicí skupina použitá pro reverzní syntézu oligoribonukleotidů na pevné fázi. Její výhodou je odstranění bez použití fluoridových



Obr. 6. Studované neizosterní fosfonátové internukleotidové vazby modifikovaných oligonukleotidů



Obr. 7. Příklady monomerů pro syntézu fosfonátových oligonukleotidů na pevné fázi

aniontů, a tím i podstatné zjednodušení deprotečního a purifikačního protokolu při finálním zpracování oligoribonukleotidů. Oba regioisomerní typy vazeb v oligoribonukleotidech vykazují rezistenci vůči ribonukleaze A a fosfodiesterase I a II. Dále byly nalezeny velké rozdíly v hybridizačních vlastnostech obou regioisomerních oligoribonukleotidů. Zatímco přítomnost 5'-*O*-methylfosfonátové jednotky (C3'-O-P-CH₂-O-C5'' vazba) teplotní stabilitu RNA-RNA duplexu snižuje o $\Delta T_m = -1,8$ °C/modifikaci, přítomnost 3'-*O*-methylfosfonátové jednotky (C3'-O-CH₂-P-O-C5'' vazba) RNA-RNA duplex silně destabilizuje ($\Delta T_m = -5,7$ °C/modifikaci). Tento dramatický rozdíl se podařilo vysvětlit na základě MD simulací.

V případě 5'-*O*-methylfosfonátového oligoribonukleotidu byla nalezena vodíková vazba 2'-O-H...O-5'' mezi sousedními nukleotidy jednoho řetězce, která pravděpodobně stabilizuje příznivější konformaci C3'-O-P-CH₂-OC5'' vazby v duplexu (obr. 8). 5'-*O*-Methylfosfonátové oligonukleotidy vykazují vhodný hybridizační potenciál pro využití v biologických aplikacích, např. součást siRNA.

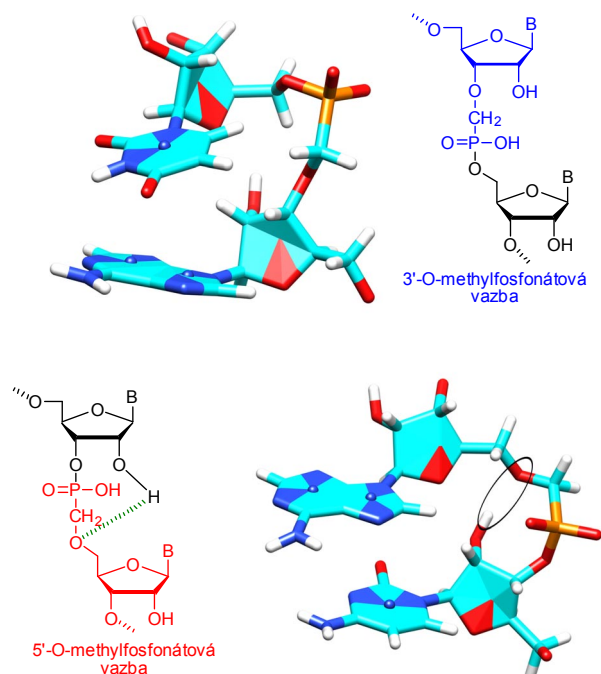
4.4. Fosfonátové oligoadenyláty s 2',5'-internukleotidovou vazbou – efekторы ribonukleazy L (RNase L)

RNasa L hraje významnou roli v rámci přirozeného obranného mechanismu buněk indukovaného a řízeného interferonem (2-5A pathway). Latentní enzym je aktivován (vznik homodimeru) unikátními agonisty – krátkými 5'-fosforylovanými 2',5'-oligoadenyláty (3–4 jednotky), které jsou syntetizovány z ATP dsRNA-závislými oligoadenylátsyntetasami. Pro funkci agonisty je zcela zásadní přítomnost alespoň jedné fosfátové skupiny na 5'-konci. Během virové a bakteriální infekce štěpí aktivovaná RNasa L jednovláknovou patogenní RNA. Je prokázáno, že

přímá aplikace oligoadenylátů do buněk zvyšuje jejich odolnost vůči infekci a naopak potlačení aktivity RNasy L tuto odolnost značně snižuje. Navíc je prokázána klíčová účast enzymu při buněčné apoptóze, což řadí tento enzym mezi terapeutické cíle (např. při rakovině prostaty). Výzkum v této oblasti by mohl přinést metabolicky stabilní agonisty a antagonisty RNasy L, perspektivní z medicínského hlediska.

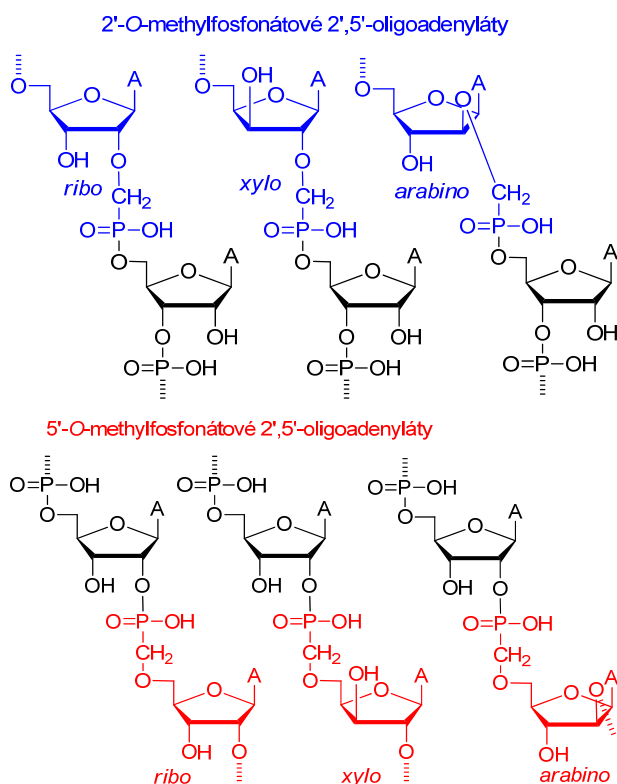
Pro přípravu fosfonátových 2',5'-oligoadenylátů (obr. 9) jsou vhodnými stavebními jednotkami adeninové NFK. V naší dřívější studii²³ jsme připravili všechny kombinace tetramerů, které zahrnovaly 2'-*O*-methylfosfonáty odvozené od *ribo*, *xylo* a *arabino*-adenosinu (7 tetramerů od každé skupiny). Mezi 21 tetramery jsme našli dva potentní agonisty myší RNasy L **pApAp^{ribo}Ap_cA** ($EC_{50} = 8,3$ nM) a **pApAp^{xylo}Ap_cA** ($EC_{50} = 1,3$ nM) a jednoho silného antagonistu **pApAp^{ara}Ap_cA** ($EC_{50} = 3,6$ nM). Hodnoty EC_{50} a relativní rychlost štěpení jednovláknové RNA v přítomnosti agonistů 0,7 (*ribo*) a 2,3 (*xylo*) vztahená k rychlosti štěpení v přítomnosti přirozeného **pA₄** ($EC_{50} = 1$ nM) ukazují na potenciál těchto látek v biologických experimentech.

Na základě těchto výsledků byly připraveny všechny kombinace tetramerů, které zahrnovaly regioisomerní 5'-*O*-methylfosfonáty odvozené od *ribo*, *xylo* a *arabino*-adenosinu (15 tetramerů od každé skupiny, tj. 45 tetramerů). Ve skupině těchto látek nás zajímaly zejména tetramery nesoucí na 5'-konci 5'-*O*-methylfosfonátové seskupení (místo fosfoesterového), které je zcela stále vůči



Obr. 8. Rozdíly mezi dvěma regioizomerními internukleotidovými vazbami

enzymové defosforylaci. Naměřené relativní rychlosti štěpení jednovláknové RNA (vztaženo k přirozenému pA_4) – 1,8 ($\text{p}_c\text{A}^{\text{ribo}}\text{pApApA}$) a 2,2 ($\text{p}_c\text{A}^{\text{ara}}\text{pApApA}$) ukazují opět na biologický potenciál těchto látek. Tetramer $\text{p}_c\text{A}^{\text{xylo}}\text{pApApA}$ neindukoval žádné štěpení RNA a je zkoumán jako možný antagonist myší RNasy L. Všechny připravené tetramery byly také zkoumány jako efekторы lidské RNasy L, která, jak se ukázalo, je citlivější na přítomnost modifikací v tetrameru²⁴. Ze souboru více než 70 tetramerů byly nalezeny čtyři látky s nanomolární vazebnou afinitou. Ukázalo se, že přítomnost adeninového nukleotidu ve čtvrté pozici (lidskému enzymu stačí k dimerizaci trimerní pA_3) ovlivňuje významně vazebnou schopnost agonisty, jak o tom svědčí nalezené hodnoty EC_{50} [pA_4 (17 nM), $\text{pApApAp}_c\text{A}^{\text{ribo}}$ (15 nM), $\text{pApApAp}_c\text{A}^{\text{ara}}$ (6,5 nM) a $\text{pApApAp}_c\text{A}^{\text{xylo}}$ (4,2 nM)]. Pokud jde o tetramer s 5'-koncovým fosfonátem, tak zde byla nalezena dramatická závislost [$\text{p}_c\text{A}^{\text{ribo}}\text{pApApA}$ (53 nM), $\text{p}_c\text{A}^{\text{ara}}\text{pApApA}$ (>1000 nM) a $\text{p}_c\text{A}^{\text{xylo}}\text{pApApA}$ (300 nM)]. Z těchto výsledků je patrné, že je třeba soustředit pozornost na syntézu nových typů adeninových nukleosid-5'-fosfonátů, protože přítomnost enzymově stabilního fosfoesterového mimika na 5'-konci oligoadenylátu, který bude akceptován RNasou L, je zásadním požadavkem na terapeuticky zajímavou látku.



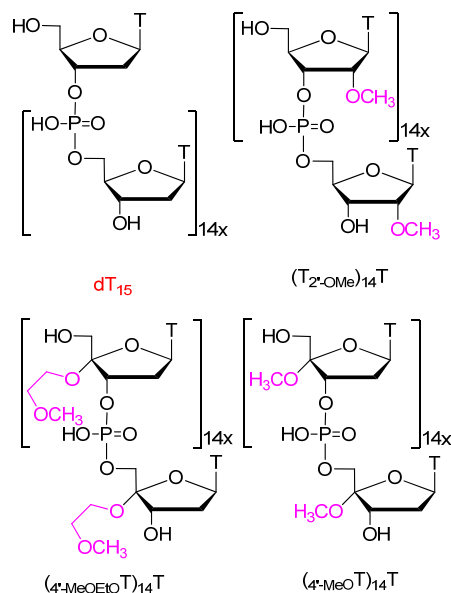
Obr. 9. Část struktury 2'-5' oligoadenylátů s regioizomerními internukleotidovými vazbami

4.5. Fosfodiesterové 4'-alkoxyoligodeoxynukleotidy²⁵

Výzkum v oblasti nukleosidových analogů a jejich inkorporace do oligonukleotidů odhalil novou a slibnou alternativu k existujícím fosfodiesterovým oligonukleotidům (obr. 10). Oligomery 4'-methoxy a 4'-(2-methoxyethoxy)thymidinu vedla k modelovým oligothymidylátům ($(4'\text{-MeO})_{14}\text{T}$ a $(4'\text{-MeOEtO})_{14}\text{T}$), jejichž duplexy s komplementárními dA_{15} a rA_{15} vykazovaly vysoké teplotní stability srovnatelné se stabilitami 2'-O-methyloligothymidylátů (2'-O-methyl modifikace se dnes běžně používá v antisensních oligonukleotidech). Podobně jako známé 2'-O-methylnukleosidy, nabývají i 4'-alkoxynukleosidy převážně C3'-endo konformace cukerné části (N-typ), a proto 4'-alkoxyoligonukleotidy vykazují vyšší hybridizaci s RNA než s DNA, což se potvrdilo na studovaných homooligomerech v přítomnosti sodných iontů (tab. I).

Přestože jsou pyrimidinové 4'-alkoxynukleosidy relativně snadno dostupné, syntéza purinových 4'-alkoxynukleosidů ve výtěžcích vyšších než 2–3 % nebyla dosud publikována, což prakticky vylučuje použití těchto látek pro přípravu komplexních 4'-alkoxyoligonukleotidů. V nedávné době se nám podařilo úspěšně vyřešit syntézu purinových 4'-alkoxynukleosidů (rukopis v přípravě) a tak připravit řadu komplexních 4'-alkoxyoligonukleotidů.

Nyní studujeme jejich hybridizační chování a stabilitu. Poslední výsledky odhalily vysokou stabilitu fosfodiesterové vazby v 4'-alkoxyoligonukleotidech jak vůči exo-, tak i endonukleasám. V tomto případě brání pravděpodobně 4'-alkoxyskupina správnému nasednutí nukleasy. Navíc se zdá, že vlastnosti těchto oligonukleotidů lze modulovat



Obr. 10. 4'-Alkoxyoligodeoxynukleotidy – nová generace fosfodiesterových oligonukleotidů s C3'-endo konformací cukerného kruhu

Tabulka I

Srovnání teplotních stabilit komplexů 4'-alkoxyoligonukleotidů s komplementárními deoxy a ribooligoadenyláty a porovnání se standardy

Modifikovaný dT ₁₅	Teplota tání T _m [°C] Typ komplexu			
	deoxyA ₁₅		riboA ₁₅	
	Na ⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺
dT₁₅	38 duplex	48 duplex	36 duplex	36 triplex
(T _{2'-OMe}) ₁₄ T	25 --	54 duplex	48 duplex	55 duplex
(4'-MeOEtO) ₁₄ T	20 --	49 duplex	48 duplex	57 triplex
(4'-MeO) ₁₄ T	39 --	55 triplex	51 duplex	55 duplex

typem 4'-alkoxyskupiny. Věříme, že tato modifikace má značný potenciál v antisensních technologiích při vytváření chimerických oligonukleotidů a jejich konjugátů.

5. Závěr

Výzkum v oblasti chemie analogů nukleosidů a nukleotidů ve skupině nukleotidů a oligonukleotidů na ÚOCHB poskytl během posledních deseti let řadu zajímavých strukturně diverzifikovaných NFK, mezi kterými byly objeveny potentní inhibitory některých enzymů metabolické dráhy „salvage pathway“. V úzké spolupráci s dalšími specializovanými pracovišti u nás i v zahraničí se snažíme o důkladné biologické zhodnocení nových typů nukleosidfosfonových kyselin s cílem jejich možného medicínálního využití.

V oblasti fosfonátových oligonukleotidů jsme našli unikátní modifikaci, která v duplexu silně stimuluje štěpící aktivitu RNasy H. Studium hybridizačních vlastností nových oligonukleotidů odhalilo silně hybridizující látky, které mohou být využity pro konstrukci tzv. gapmerů, chimerických oligonukleotidů s dobře hybridizujícími oběma konci a centrální sekvencí stimulující RNasu H. V této souvislosti se zabýváme typy vazeb se sníženou konformační volností, u kterých předpokládáme určitý stupeň preorganizace řetězce vstupujícího do duplexu. Nalezli jsme enzymově stálé fosfonátové 2',5'-oligoadenyláty, které jsou účinnými agonisty RNasy L. V současnosti řešíme velký projekt fosfonátových oligonukleotidů s CpG motivem jako látek s možnými imunostimulačními účinky (interakce s toll-like receptorem, TLR-9) a celou řadu dalších projektů ve spolupráci s dalšími pracovišti. Navázali jsme kontakty s firmami v USA, které projeví zájem o spolupráci v oblasti oligonukleotidů. Jsme přesvědčeni o smysluplnosti naší práce a věříme v perspektivu nukleotidové a oligonukleotidové chemie na ÚOCHB.

Příspěvek k 60. výročí založení ÚOCHB by nemohl být napsán bez nadšení a vysokého pracovního nasazení všech mých dlouholetých spolupracovníků, Ivany Dvořákové (Kavenové), Vladimíry Klímové (Hurychové), Petra Kočalky, Radka Libosky, Pavla Nováka, Ondřeje Pačesa, Ondřeje Páva, Magdaleny Petrové (Endové), Dominika Rejmana, Šárky Rosenbergové (Králikové), Ondřeje Šimáka, Zdeňka Točíka a Evy Zborníkové a pracovníků oddělení NMR spektroskopie, Mileny Masojídkové a Miloše Buděšínského. Poděkování patří také Pavlu Fiedlerovi z oddělení infračervené spektroskopie a všem pracovníkům hmotnostní spektrometrie za dlouholetou úzkou spolupráci při řešení všech projektů. V neposlední řadě vyjadřuji svůj dík pracovníkům Vývojových dílen ÚOCHB za jejich profesionalitu při konstrukci DNA syntetizátorů.

Tato práce byla podpořena projektem GAČR 13-26526S.

LITERATURA

- Declercq E., Holý A., Rosenberg I., Sakuma T., Balzarini, J., Maudgal P. C.: *Nature* 323, 464 (1986).
- Rejman D., Kočalka P., Buděšínský M., Pohl R., Rosenberg I.: *Tetrahedron* 63, 1243 (2007).
- Rejman D., Pohl R., Kočalka P., Masojídková M., Rosenberg I.: *Tetrahedron* 65, 3673 (2009).
- Rejman D., Kočalka P., Pohl R., Točík Z., Rosenberg I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 935 (2009).
- Kočalka P., Rejman D., Vaněk V., Rinnová M., Tomečková I., Králíková Š., Petrová M., Páv O., Pohl R., Buděšínský M., Liboska R., Točík Z., Panova N., Votruba I., Rosenberg I.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 862 (2010).
- Rejman D., Kočalka P., Buděšínský M., Barvík I., Rosenberg I.: *Tetrahedron: Asymmetry* 18, 2165 (2007).
- Vaněk V., Buděšínský M., Rinnová M., Rosenberg I.: *Tetrahedron* 65, 862 (2009).
- Páv O., Barvík I., Buděšínský M., Masojídková M., Rosenberg I.: *Org. Lett.* 9, 5469 (2007).
- Točík Z., Dvořáková I., Buděšínský M., Masojídková M., Liboska R., Rosenberg I.: *Tetrahedron* 63, 4516 (2007).
- Poláková I., Buděšínský M., Točík Z., Rosenberg I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 76, 503 (2011).
- Petrová M., Buděšínský M., Rosenberg I.: *Tetrahedron Lett.* 51, 6874 (2010).
- Petrová M., Buděšínský M., Klepetářová B., Rosenberg I.: *Tetrahedron* 67, 4227 (2011).
- Petrová M., Buděšínský M., Zborníková E., Fiedler P., Rosenberg I.: *Org. Lett.* 13, 4200 (2011).
- Rejman D., Rabatinová A., Pombinho A. R., Kovačková S., Pohl R., Zborníková E., Kolář M., Bogdanová K., Nyč O., Šanderová H., Látal T., Bartůněk P., Krásný L.: *J. Med. Chem.* 54, 7884 (2011).
- Košiová I., Šimák O., Panova N., Petrová M., Buděšínský M., Rejman D., Liboska R., Páv O., Rosenberg I.: *Eur. J. Med. Chem.* 2013, v redakčním řízení.
- Rejman D., Panova N., Klenner P., Maswabi B., Pohl

- R., Rosenberg I.: J. Med. Chem. 55, 1612 (2012).
17. Keough D. T., Hocková D., Rejman D., Špaček P., Vrbková S., Krečmerová M., Eng W. S., Jans H., West N. P., Naesens L. M. J., de Jersey J., Guddat L. W.: J. Med. Chem. 56, 6967 (2013).
 18. Šimák O., Páchl P., Fábry M., Buděšínský M., Řezáčová P., Petrová M., Brynda K., Rosenberg I.: J. Med. Chem. 2013, v redakčním řízení.
 19. Točík Z., Barvík I., Buděšínský M., Rosenberg I.: Biopolymers 83, 400 (2006).
 20. Točík Z., Buděšínský M., Barvík I., Rosenberg I.: Biopolymers 91, 514 (2009).
 21. Šipová H., Špringer T., Rejman D., Šimák O., Petrová M., Novák P., Rosenbergová Š., Páv O., Liboska R., Štěpánek J., Rosenberg I., Homola J.: Nucleic Acids Res. 42, 1 (2014).
 22. Páv O., Košíková I., Barvík I., Pohl R., Buděšínský M., Rosenberg I.: Org. Biomol. Chem. 9, 6120 (2011).
 23. Páv O., Protivínská E., Pressová M., Collinsová M., Jiráček J., Snášel J., Masojdková M., Buděšínský M., Rosenberg I.: J. Med. Chem. 49, 3955 (2006).
 24. Páv O., Panova N., Snášel J., Zborníková E., Rosenberg I.: Bioorg. Med. Chem. Lett. 22, 181 (2012).
 25. Liboska R., Snášel J., Barvík I., Buděšínský M., Pohl R., Točík Z., Páv O., Rejman D., Novák P., Rosenberg I.: Org. Biomol. Chem. 9, 8261 (2011).

I. Rosenberg (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Chemistry of Phosphonate Analogs of Nucleotides and Oligonucleotides – Brief Reminiscence and the Present**

Our investigation in the chemistry of nucleoside phosphonates has provided an impressive number of novel structurally diverse compounds. Among them, several potent inhibitors of enzymes of nucleosides and nucleotide salvage pathways were found. The findings obtained in synthesis of nucleoside phosphonates are unique. The nucleoside phosphonates provided several types of monomers for the synthesis of modified oligonucleotides. The first non-silyl protecting group was developed and used in the solid-phase synthesis of modified oligoribonucleotides in the reverse direction. The superior nuclease stability of phosphonate internucleotide linkages, their ability to enhance hybridization together with the ability to elicit RNase H activity may classify these compounds as useful in biochemistry and biology.