

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 3'-ΑΖΙΔΟ-3'-ΔΕΟΞΥ ΑΛΛΟΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΗ
ΤΗΣ 5-ΦΘΟΡΟΥΡΑΚΙΛΗΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΣ ΑΝΤΙΪΚΟΣ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

ΜΑΡΙΑ ΖΙΩΓΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 3'-ΑΖΙΔΟ-3'-ΔΕΟΞΥ ΑΛΛΟΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΗ
ΤΗΣ 5-ΦΘΟΡΟΥΡΑΚΙΛΗΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΣ ΑΝΤΪΙΚΟΣ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ

ΜΑΡΙΑ ΖΙΩΓΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κομιώτης Δημήτριος – Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαντά Στυλιανή – Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαρκουλάτος Παναγιώτης — Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Κομιώτη Δημητρίου

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Κομιώτη για τη εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα αλλά και για τις εποικοδομητικές και πολύτιμες υποδείξεις του και την αμέριστη συμπαράστασή του.

Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδάκτορα Στυλιανή Μαντά για την καθημερινή της υποστήριξη καθ' όλη την περίοδο της παραμονής μου στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας. Η εργαστηριακή και επιστημονική της κατάρτιση, οι πολύτιμες συμβουλές της και η γενικότερη αρωγή της υπήρξαν καθοριστικοί παράγοντες για την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κυρίτση Χρήστο που με βοήθησε να ξεπεράσω τις δυσκολίες που συνάντησα στην εκπόνηση του πειραματικού μέρους αλλά και κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσης εργασίας. Επίσης ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου οργανικής χημείας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και τη φιλική τους διάθεση.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι υδατάνθρακες είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων που απαντώνται ευρέως στην φύση. Έχουν μεγάλη βιολογική σημασία καθώς αποτελούν σημαντικές συνιστώσες στη διατροφή όλων των ζωικών οργανισμών παρέχοντας τους την απαιτούμενη ενέργεια επιβίωσης. Μπορούν επίσης να αποτελέσουν δομικά στοιχεία των κυττάρων, και μέρος άλλων μακρομορίων, όπως γλυκοπρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα. Τέλος, κάποιοι από αυτούς χρησιμοποιούνται και ως φάρμακα.

Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι νουκλεοζίτες που φέρουν τροποποιήσεις στην ετεροκυκλική βάση, έχουν εμφανίσει αξιοσημείωτη αντιδιαβητική δράση. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντιϊική και αντικαρκινική δράση περιέχουν τροποποιημένους νουκλεοζίτες.

Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντι-ϊική και αντικαρκινική δράση περιέχουν νουκλεοζίτες αποτελούμενους από ολιγοσακχαρίτες συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μεγάλο μέρος της έρευνας σχετικά με την ανακάλυψη φαρμάκων με αντί-ϊικές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες να εστιάζεται στα ανάλογα των νουκλεοζιτών.

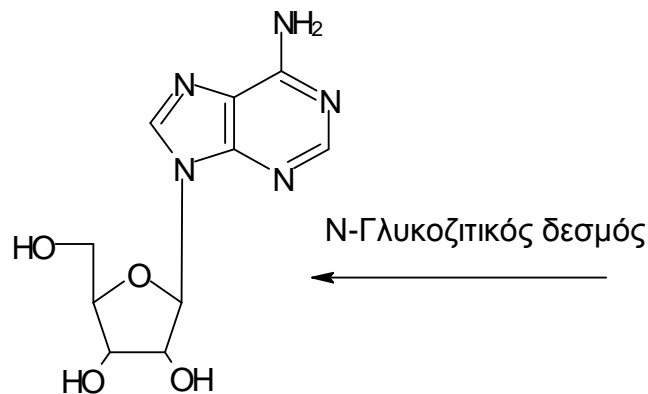
Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση του 3΄άζιδο-3΄δεοξυ αλλοπυρανονουκλεοζίτη της 5-φθοροουρακίλης ως πιθανός αντιϊικός και αντικαρκινικός παράγοντας. Αναλύεται η συνθετική οδός που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του καθώς και η μέθοδος ταυτοποίησής του. Το νέο μόρια θα αξιολογηθεί ως αντικαρκινικός και αντιϊικός παράγοντας.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Νουκλεοζιτικά ανάλογα, μόρια τα οποία προκύπτουν από δομικές τροποποιήσεις των φυσικών νουκλεοζιτών που ανήκουν στη γενικότερη κατηγορία των β-N-γλυκοζιτών, έχουν διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στη θεραπεία των ιογενών λοιμώξεων και του καρκίνου. Η συντριπτική πλειοψηφία των εγκεκριμένων φαρμάκων, από την Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA), για τη θεραπεία των ιογενών λοιμώξεων είναι νουκλεοζιτικά ανάλογα, συμπεριλαμβανομένων των Zidovudine, Didanosine, Zalcitabine, Lamivudine και Acyclovir. Επί του παρόντος, μία σειρά φαρμάκων, που βρίσκονται στο στάδιο των κλινικών, για την θεραπεία λοιμώξεων από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), είναι νουκλεοζιτικά ανάλογα και εμπίπτουν στην κατηγορία των αναστολέων της πολυμεράσης. Όσον αφορά στη χημειοθεραπεία, οι νουκλεοζίτες ή ανάλογα νουκλεοβάσεων, ήταν οι πρώτοι που θεσπίστηκαν για τη θεραπεία του καρκίνου. Μερικά παραδείγματα εγκεκριμένων από την FDA αντικαρκινικών νουκλεοζιτών είναι η Cytarabine (λευχαιμία), η 5-φθοροουρακίλη (5-FU, καρκίνος δέρματος), και η Gemcitabine (dFdC, καρκίνος μαστού, παγκρέατος, πνευμόνων και ωοθηκών). Μεγάλος αριθμός των νουκλεοζιτικών αναλόγων δρουν ως αντιμεταβολίτες, ανταγωνίζονται τους φυσικούς νουκλεοζίτες και αλληλεπιδρούν με έναν μεγάλο αριθμό των ενδοκυττάρων στόχων με σκοπό την πρόκληση κυτταροτοξικότητας. Πολλοί από αυτούς είναι αναστολείς ενζύμων και στοχεύουν την αντίστροφη μεταγραφάση και άλλες πολυμεράσες, κινάσες και υδρολάσες, και χρησιμοποιούνται έναντι πολυάριθμων και διαφορετικών βακτηριακών λοιμώξεων, όπως η ελονοσία και η φυματίωση. Άλλοι ενσωματώνονται κατά την αντιγραφή ή την επιδιόρθωση του DNA, οδηγώντας έτσι στον τερματισμό της διαδικασίας σύνθεσής του. Τέλος, έρευνες βρίσκονται σε εξέλιξη με σκοπό την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των μορίων-μεταφορέων των νουκλεοζιτών και των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό τους.

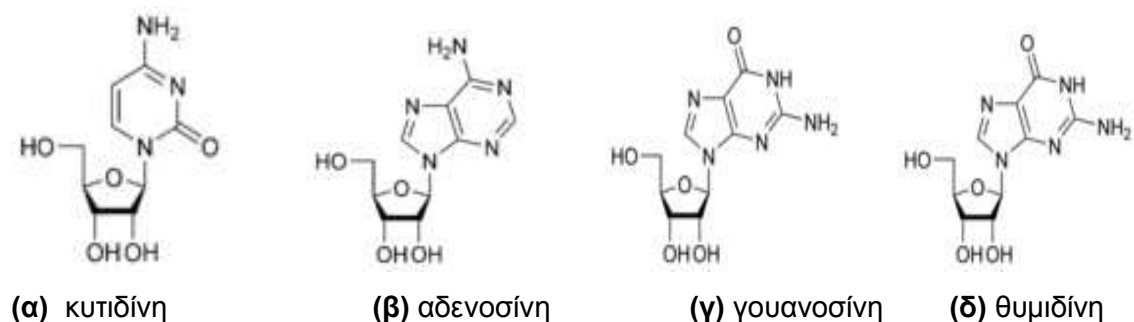
1.1 Νουκλεοζίτες

Είναι οι γλυκοζίτες των πουρινικών βάσεων με ριβόζη ή δεσοξυ-ριβόζη. Δηλαδή, οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες, οι οποίες προκύπτουν από την ένωση μιας εκ των βάσεων (θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, αδενίνη, ουρακίλη) και ενός σακχάρου που μπορεί να είναι είτε ριβόζη είτε δεοξυριβόζη. Σε κάθε νουκλεοζίτη η αζωτούχος βάση συνδέεται με τον 1' άνθρακα της πεντόζης μέσω ενός N-γλυκοζιτικού δεσμού (σχήμα 1) (Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1997: 4, 26).



Σχήμα 1: Η β-στερεοδιάταξη του N-γλυκοζιτικού δεσμού της αδενοσίνης ⁽²⁾

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στην φύση διότι αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Μερικά παραδείγματα τέτοιων ριβονουκλεοζιτών είναι η αδενοσίνη, η γουανοσίνη, η κυτιδίνη και η θυμιδίνη (σχήμα 2). Οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β (Lubert Stryer, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997:347-354.).



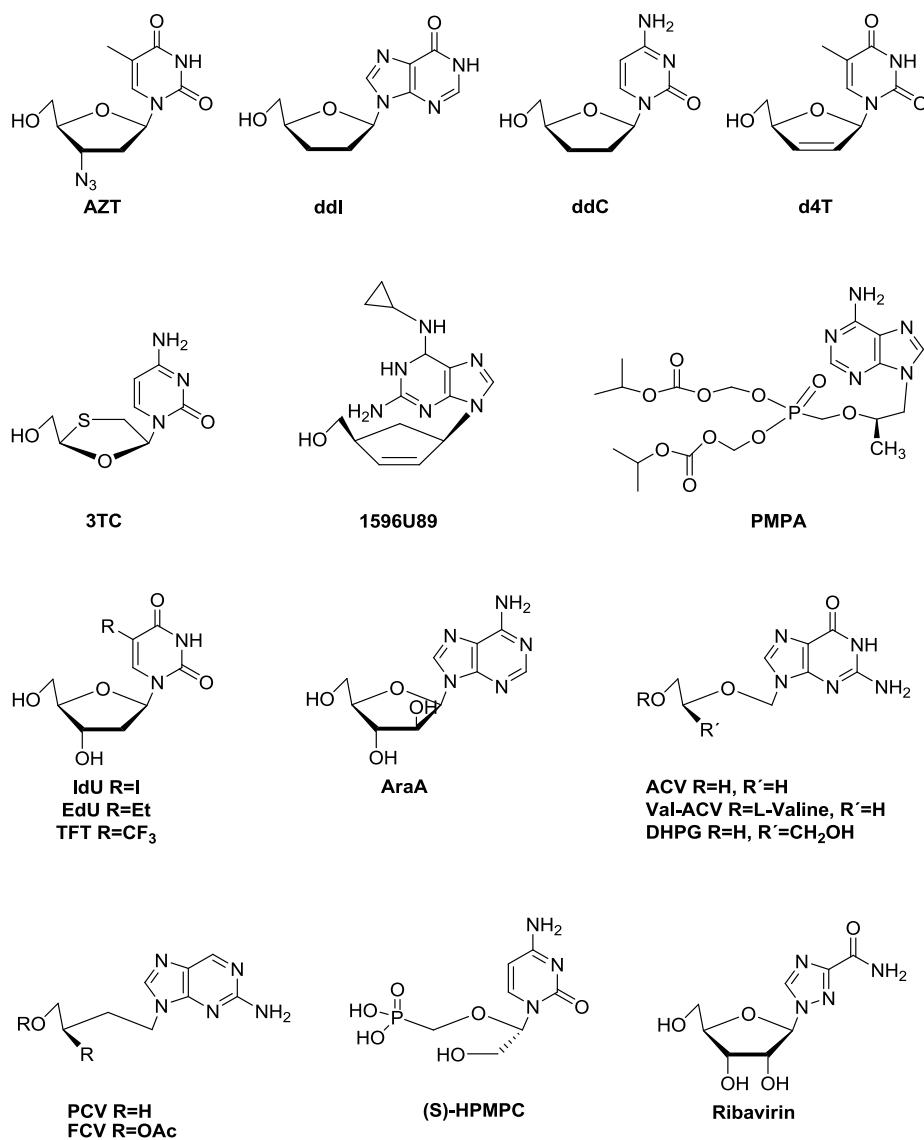
Σχήμα 2: Ριβονουκλεοζίτες

1.1.1. Αντιικοί νουκλεοζίτες

Κατά την τελευταία δεκαετία, η θεραπεία των ιικών μολύνσεων προοδεύει σημαντικά, λόγω των προσπαθειών των χημικών και των φαρμακολόγων, της ραγδαίας ανάπτυξης της μοριακής ιολογίας, καθώς και της συσσωρευμένης γνώσης επί λεπτομερειακών μηχανισμών δράσης των αντιικών ενώσεων (Kinchington 1999, Painsil and Cheng 2009, Field and Hodge 2008, Komiotis *et al.* 2008). Τελευταία, εμφανίζεται μία έκρηξη νέων και αναδυόμενων ιικών ασθενειών, όπως αυτές που προκαλούνται από νέα στελέχη του ιού της ηπατίτιδας και του απλού έρπητα, του ιού του Έμπολα και του δυτικού Νείλου, ιοί, οι οποίοι είναι ικανοί να προκαλέσουν πανδημία. Ωστόσο, αν και ο εμβολιασμός αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την αντιμετώπιση των ιικών λοιμώξεων, η δυσκολία οργάνωσης συναφών προγραμμάτων εμβολιασμού καθιστά την αντιική χημειοθεραπεία μία πιο πρακτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση επιδημικών ιογενών λοιμώξεων.

Μεταξύ των πιο επιτυχημένων αντιικών παραγόντων, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αποτελούν θεμελιώδη λίθο στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τον ιό του απλού έρπητα (Herpes Simplex Virus), γνωστό από τα αρχικά του ξενόγλωσσου ονόματός του ως HSV και περιλαμβάνει τα υποείδη HSV₁ και HSV₂, τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (Human Cytomegalovirus) ή HCMV, τον ιό ερπηζωστήρα (varicella-zoster virus) ή VZV, τον ιό της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας τύπου 1 (HIV₁) και τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και C (HCV). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι έχει ανακαλυφθεί μεγάλος αριθμός βιοδραστικών νουκλεοζιτών, πολλοί από τους οποίους χρησιμοποιούνται κλινικά για τη θεραπεία των μολύνσεων από τους HIV₁, HSV, αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV), HBV και HCV, ως συναγωνιστικοί αναστολείς των ιικών πολυμερασών, είτε της αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTIs) ή της DNA πολυμεράσης.

Ειδικότερα, μεταξύ των NRTIs, το Lamivudine [3TC, (-)-2',3'-διδεσοξυ-3'-θειακυτιδίνη] είναι το φάρμακο, το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της μόλυνσης από τον ιό HBV και είναι ένα από αυτά που έχουν εγκριθεί από τον FDA, ενώ το Zidovudine [AZT, (Retrovir), 3'-αζιδο-3'-δεσοξυθυμιδίνη] αποτελεί φάρμακο, το οποίο χορηγείται για τη θεραπεία των μολύνσεων από τον ιό HIV₁ (Σχήμα 3).



Σχήμα 3

Ακόμη, νουκλεοζιπικοί αναστολείς που αποτελούν εν χρήσει αντιικά φάρμακα είναι οι Idoxuridine (IdU, 5-ιωδο-2'-δεσοξουριδίνη), Trifluridine (TFT, 2'-δεσοξυ-5-τριφθορομεθυλουριδίνη), acedurid (ασεδουρίδη, EdU), Vidarabine [Ara-A, 9-(1 β -D-αραβινοφουρανοζυλ)αδενίνη)] κ.α., που χρησιμοποιούνται κατά των ερπητοϊών, τα φάρμακα Didanosine (ddl, 2',3'-διδεσοξυϊνισίνη), Stavudine (d4T) κ.α. που χρησιμοποιούνται κατά του ιού του AIDS, καθώς και το φάρμακο Ribavirine [(Virazol), 1-(1 β -D-ριβοφουρανοζυλο)-1H-1,2,4-τριαζολο-3-καρβοξαμίδιο] που χρησιμοποιείται κατά των ιών της ηπατίτιδας, της γρίππης και του AIDS (Πίνακας 1, Σχήμα 3).

Πίνακας 1. Αντιικοί νουκλεοζίτες που χρησιμοποιούνται κλινικά

Γενική Ονομασία	Ακρώνυμο	Ιοί-Στόχοι	Μηχανισμός Δράσης
Αντι-HIV παράγοντες			
Zidovudine	AZT	HIV-1	Αναστολείς της αντίστροφης Μεταγραφάσης Τερματισμός αλυσίδας
Didanosine	ddl	HIV-1	
Zalcitabine	ddC	HIV-1	
Stavudine	d4T	HIV-1	
Lamivudine	3TC	HIV-1	
Abacavir	1596U89	HIV-1	
Tenofovir disoproxil	PMPA	HIV-1	
Αντι-HBV παράγοντες			
Lamivudine	3TC	HBV	Αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης/Τερματισμός αλυσίδας
Αντι-Ερπητικοί παράγοντες			
Idoxuridine	IdU	HSV-1/2	Αναστολείς DNA πολυμεράσης
Trifluridine	TFT	HSV-1/2	
Acedurid	EdU	HSV-1/2	
Vidarabine	AraA	HSV-1/2	
Acyclovir	ACV	HSV-1/2, VZV	Εκλεκτικός αναστολέας ιικής DNA πολυμεράσης
Valaciclovir	val-ACV	HSV-1/2, VZV	Προφάρμακο του acyclovir
Penciclovir	PCV	HSV-1/2, VZV	Εκλεκτικός αναστολέας ιικής DNA πολυμεράσης
Famciclovir	FCV	HSV-1/2, VZV	Προφάρμακο του PCV
Ganciclovir	DHPG	HCMV	Εκλεκτικοί αναστολείς ιικής DNA πολυμεράσης
Cidofovir	(S)-HPMPC	HCMV	
Virazole	Ribavirin	RSV,HCV	Αναστολέας ιικής RNA πολυμεράσης

Στην κατηγορία των συναγωνιστικών αναστολέων ανήκουν και ενώσεις που δεν είναι χημικώς νουκλεοζίτες και χαρακτηρίζονται ως συναγωνιστικοί μη νουκλεοζιτικοί αναστολείς. Πρόκειται κυρίως για παράγωγα της πουρίνης ή της πυριμιδίνης που, αν και δεν είναι γλυκοζίτες (δεν περιέχουν σάκχαρο), παρουσιάζουν δομική αναλογία με τους νουκλεοζίτες.

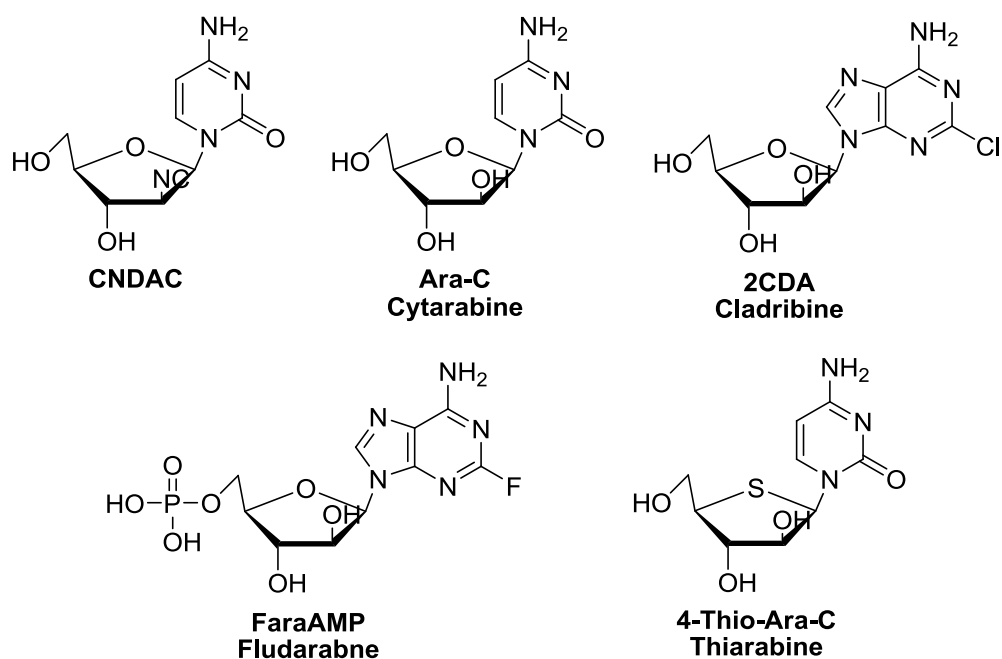
Παρά τα επιτεύγματα αυτά, είναι συνεχής η ανάγκη ανακάλυψης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων, προκειμένου να αντιμετωπιστούν προβλήματα, όπως η τοξικότητα, η μη μεταβολική σταθερότητα, και μεταξύ άλλων η εμφάνιση ανθεκτικών ιικών στελεχών και κατ' επέκταση νεοεμφανιζόμενων ιικών ασθενειών. Πολλές είναι οι μελέτες που έχουν δημοσιευθεί και αναφέρονται σε ιδιαίτερες τάξεις νουκλεοζιτών, σε θέματα που αφορούν τη χημεία τους, καθώς και στο φάσμα της αντιικής τους δράσης και των βιολογικών τους στόχων.

1.1.2. Αντικαρκινικοί νουκλεοζίτες

Αν και, η χημειοθεραπεία θεωρείται ως η πλέον κατάλληλη μέθοδος για τη θεραπεία των ιικών λοιμώξεων, στην περίπτωση αντιμετώπισης του καρκίνου συνιστάται ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς της μέσω της εύρεσης νέων αντικαρκινικών ουσιών, οι οποίες διαθέτουν αυξημένη δραστηριότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα νέων αντικαρκινικών ουσιών, οι οποίες έχουν μελετηθεί εντατικά, είναι οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους.

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν μελετηθεί ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (Plunkett and Gandhi 2001, Elion 1989, Robins and Kini 1990), ενώ ένας μεγάλος αριθμός αναλόγων φυσικών νουκλεοζιτών χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων. Μελέτες έδειξαν ότι οι νουκλεοζίτες απαρτίζουν μια σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών μέσων, τα οποία επηρεάζουν τη σύνθεση του DNA με διάφορους τρόπους. Για αυτό και δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι, νουκλεοζιτικά ανάλογα, όπως η Cytarabine (Matsuda and Sasaki 2004) (Σχήμα 4), 1-(2'-C-κυανο-2'-δεοξυ-β-D-αραβινο-πεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη (CNDAC) (Matsuda *et al.* 1991b, Azuma *et al.* 1993, Tanaka *et al.* 1992, Azuma *et al.* 1995, Matsuda and Azuma 1995), Cladribine (2-χλωρο-2'-δεοξυαδενοσίνη, 2CDA) και Fludarabine (5'-μονοφωσφορική 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-2-φθοροαδενίνη,

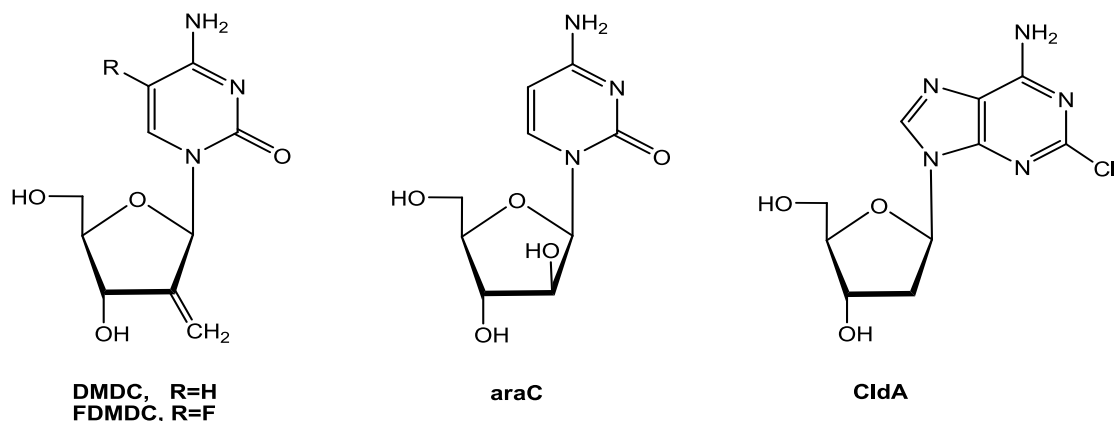
FaraAMP) (Matsuda and Sasaki 2004) (Σχήμα 2), έχουν μελετηθεί ως προς τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες και είναι αποτελεσματικές ενώσεις όχι μόνο κατά της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων, αλλά και κατά κακοήθων όγκων.



Σχήμα 4

Τα τελευταία χρόνια πολλά ερευνητικά προγράμματα έχουν εστιάσει στη μελέτη φαρμάκων χημειοθεραπείας τα οποία εμφανίζουν αυξημένη δραστικότητα, ενώ παράλληλα έχουν χαμηλή τοξικότητα. Για τη φαρμακευτική αντιμετώπιση πολλών νεοπλασιών χρησιμοποιείται πλήθος νουκλεοζιτοκών αντιμεταβολιτών οι οποίοι στοχεύουν στην παρεμπόδιση σύνθεσης νουκλεικών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα οι 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC), 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πεντοφουρανοζυλο)5-φθοροκυτοσίνη (FDMDC), 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC) και 2-χλωρο-2'-δεσοξυαδενοσίνη (CldA) (Σχλημα 5) έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών, όπως διάφοροι τύποι λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Cory et al. 1994, Pontikis et al. 1995, Yamagami et al. 1991, Lin et al. 1991, Baker et al. 1991, Matsuda and Sasaki 2004).

Σύμφωνα με πιο πρόσφατες μελέτες ορισμένοι νουκλεοζιτες είναι να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui et al. 2010, Bhat et al. 2010).



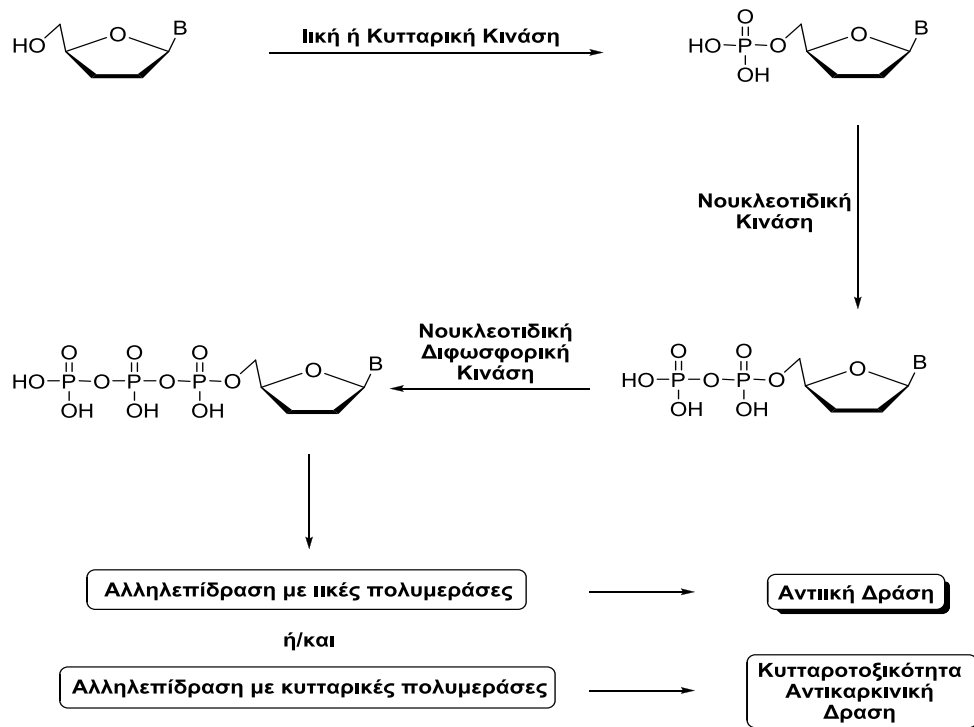
Σχήμα 5

1.2 Τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών

Γενικότερα, ο τρόπος δράσης των φαρμάκων έγκειται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό 'στόχο', ο οποίος μπορεί να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη, όπως ένας υποδοχέας, ένας δίαυλος ιόντων, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφορέας, είτε τα νουκλεϊνικά οξέα. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων που διαθέτουν αντιική ή/και αντικαρκινική δράση, τα οποία λόγω της δυνατότητας μεταφοράς τους εντός των κυττάρων με παθητική διάχυση είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία πολλών ασθενειών.

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών αποτελούν στην πραγματικότητα ανενεργά προφάρμακα, τα οποία ενδοκυτταρικά πρέπει να τροποποιηθούν ώστε να μπορέσουν να δράσουν. Η διαδικασία αυτή συνίσταται στη φωσφορυλίωσή τους από τις κυτταρικές ή ιικές κινάσες, που αποτελούν αρχικά το 'κλειδί' για την εκλεκτικότητά τους. Αφού φωσφορυλιωθούν προς τις τριφωσφορικές τους δομές (NTPs) από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA. Ειδικότερα, οι νουκλεοζίτες μπορούν να αναστείλουν τη δράση βασικών ενζύμων στο μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων ή/και μπορούν να ενσωματωθούν στα πρόσφατα συντεθειμένα νουκλεϊνικά οξέα προκαλώντας τον

τερματισμό των διαδικασιών σύνθεσής τους ή την παραγωγή μη λειτουργικών βιομορίων.



Η φωσφορυλίωση αρχίζει με την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στην 5'-θέση του σακχάρου, η οποία καταλύεται από ειδικές ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες, προς τη δημιουργία ενός μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (Wagner *et al.* 2000, Balzarini 1993). Οι μετέπειτα φωσφορυλιώσεις προς τις διφωσφορικές και τριφωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών καταλύονται από νουκλεοτιδικές κινάσες και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντιστοίχως. Η φωσφορυλίωση από ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες όπως επίσης και η χαμηλή ικανότητα διαπερατότητας των φωσφορυλιωμένων νουκλεοζιτών οδηγούν στην συσσώρευση των φαρμακολογικά ενεργών μορφών τους, στα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό. Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, εντοπίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Μιμούμενα τους φυσικούς νουκλεοζίτες, τα αντιικά ανάλογά τους μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τις πολυμεράσες και να ενσωματωθούν στο ιικό γονιδίωμα. Η ενσωμάτωσή τους στο ιικό γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει διακοπή της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, να το καταστήσει μη λειτουργικό και κατά συνέπεια να καταστείλει

την αντιγραφή του ιού και την περαιτέρω παραγωγή ιοσωματιδίων. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος είναι συντηρημένος σε πολλά είδη ιών, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να παρουσιάσουν δράση έναντι μεγάλου φάσματος ιών (Chong *et al.* 2003). Αξίζει να σημειωθεί πως μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιική πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητα τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η εκλεκτικότητα ανάμεσα στην αντιική και την κυτταροτοξική δράση των νουκλεοζιτών εξαρτάται από την εξειδίκευση του υποστρώματος των NTPs ως προς τις ιικές και κυτταρικές πολυμεράσες (Challand and Young 1997). Αντίθετα, η αποτελεσματικότητα των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών εξαρτάται από την ενεργοποίηση της δράσης του φαρμάκου από το ιικό ένζυμο ή/και από το γεγονός ότι οι ιικές πολυμεράσες μπορεί να είναι πολύ πιο ευαίσθητες στη δράση του φαρμάκου από ότι τα αντίστοιχα ένζυμα του κυττάρου ξενιστή. Επιπλέον, το ιικό ένζυμο δεν διαθέτει κάποια εξειδίκευση στη σύνδεσή του με το υπάρχον υπόστρωμα, εν αντιθέσει με το ένζυμο του κυττάρου ξενιστή. Οπότε, το ιικό ένζυμο μπορεί να δρα και σε φάρμακα της τάξης των νουκλεοζιτών αναλόγων (διαφορετικό υπόστρωμα) και να τα φωσφορυλιώνει, ενώ το ένζυμο του κυττάρου ξενιστή θα τα αφήνει ανεπηρέαστα, εφόσον δεν είναι εφικτή η σύνδεση ενζύμου-υποστρώματος. Ωστόσο, ένας μεγάλος αριθμός νουκλεοζιτών έχει ανακαλυφθεί, οι οποίοι ασκούν την αντιική τους δράση μέσω αναστολής και άλλων ενζύμων, όπως είναι η αφυδρογονάση της μονοφωσφορικής ινοσίνης.

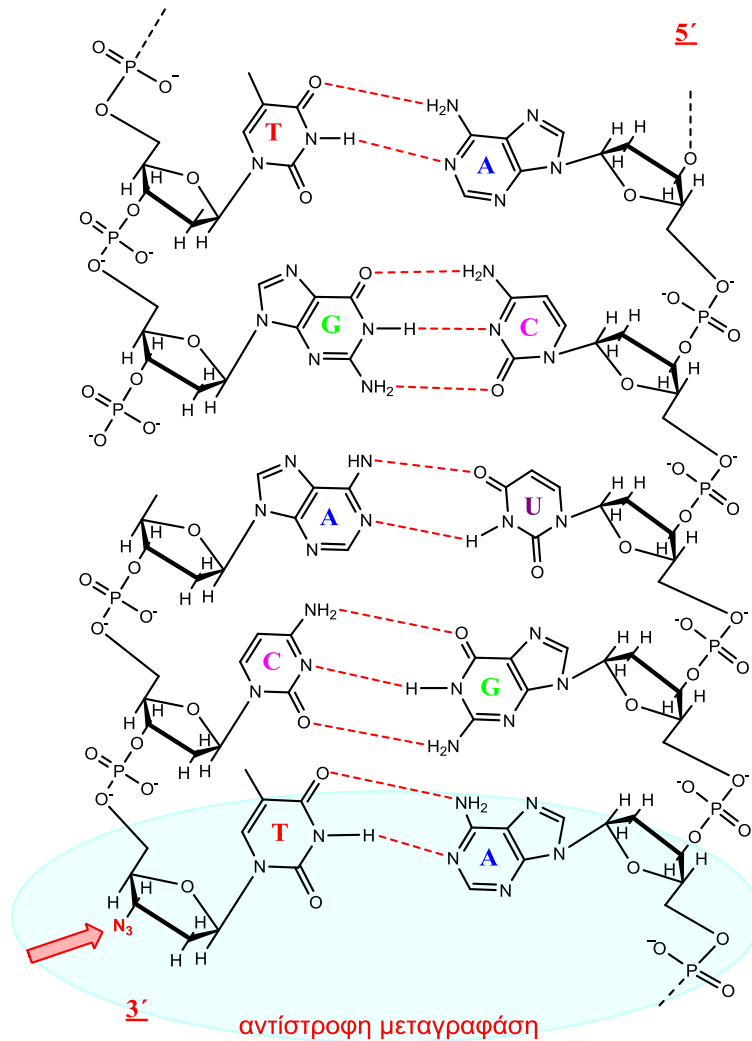
Οι φυσικοί νουκλεοζίτες συντίθενται εντός των κυττάρων αλλά είναι δυνατόν, να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Η παραπάνω ιδιότητα επιτρέπει το σχεδιασμό και τη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα διατηρούν χαρακτηριστικά των φυσικών μορίων αλλά είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε, όταν εισέλθουν στο κύτταρο και μεταβολιστούν να μπορούν να παρέμβουν στην σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και έτσι να ασκήσουν κυτταροστατική, αντιϊκή δράση

Η αναγνώριση των αντικαρκινικών, των αντιϊκών και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των νουκλεοζιτών αποτελεί αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών

σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν ως αντιικοί παράγοντες επηρεάζοντας τους μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών

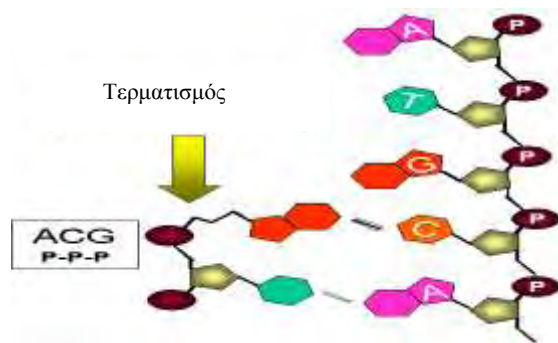
Τα φωσφορυλιωμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη σε αντίθεση με τα μη φωσφορυλιωμένα τα οποία εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες-μεταφορείς νουκλεοζιτών. Έπειτα φωσφορυλιώνονται προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και αφού γίνουν ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό πολλαπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA.

Ένας κοινός μηχανισμός αντιικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωση των νουκλεοζιτών στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της (Εικόνα 5). Η ένωση των νουκλεοτιδίων καταλύεται από κυτταρικές πολυμεράσες οι οποίες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των σακχάρων (Lewin 2003, Burns *et al.* 2005).



Εικόνα 1

Το σάκχαρο χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τις κινάσες και τις πολυμεράσες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την επιμήκυνση των αλυσίδων. Εάν ένα νουκλεοτιδικό ανάλογο δεν έχει μια $3'$ -υδροξυλομάδα, δεν μπορεί να ενωθεί με την $5'$ -φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της επιμήκυνσης της αλυσίδας (εικόνα 1).



Εικόνα 2. Τερματισμός αλυσίδας

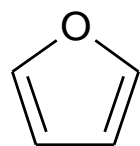
Οι νουκλεοζίτες μπορούν να ενεργήσουν με διαφορετικούς μηχανισμούς: μπορούν να αναστείλουν τη δράση βασικών ενζύμων στο μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων ή/ και μπορούν να ενσωματωθούν στα πρόσφατα συνθετημένα νουκλεϊκά οξέα προκαλώντας τον τερματισμό των αλυσίδων ή την παραγωγή μη λειτουργικών βιομορίων

Το πιο κοινό αποτέλεσμα των παραπάνω ενεργειών είναι ο κυτταρικός θάνατος, ο οποίος μπορεί να είναι επιθυμητός όσον αφορά τη θεραπεία του καρκίνου και των αυτοάνοσων νοσημάτων. Επιπλέον, οι ενώσεις που μπορούν να στοχεύσουν επιλεκτικά στα βακτηριακά ή στα προερχόμενα από ιό ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιβακτηριακοί ή αντιϊικοί παράγοντες.

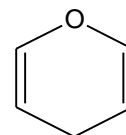
1.3. Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες

Η τροποποίηση του τμήματος του σακχάρου στη δομή ενός νουκλεοζίτη έχει οδηγήσει στην παρασκευή αναλόγων νουκλεοζιτών με σημαντική αντιική και αντικαρκινική δράση. Αν και, η φωσφορυλίωση των συνθετικών αυτών νουκλεοζιτών αποτελεί κοινό σημείο στον τρόπο δράσης τους (Verheggen *et al.* 1995), οι τροποποιήσεις που πραγματοποιούνται στοχεύουν στην καλύτερη λειτουργία τους ως υποστρώματα των DNA πολυμερασών, όπως προκύπτει από μελέτες σχέσεων δομής-δράσης (Vastmans *et al.* 2000). Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο κύριος παράγων για την αναγνώρισή τους από τις πολυμεράσες και την ενσωμάτωσή τους στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα είναι το τμήμα του σακχάρου.

Δύο από τις σημαντικότερες κατηγορίες τροποποιημένων νουκλεοζιτών, ως προς το τμήμα του σακχάρου, που έχουν μελετηθεί κυρίως για τη βιολογική τους δραστηριότητα, είναι οι φουρανο- και οι πυρανονουκλεοζίτες.



(α) φουράνιο ⁽²⁾



(β) Πυράνιο

Σχήμα 7

1.3.1. Φουρανονουκλεοζίτες

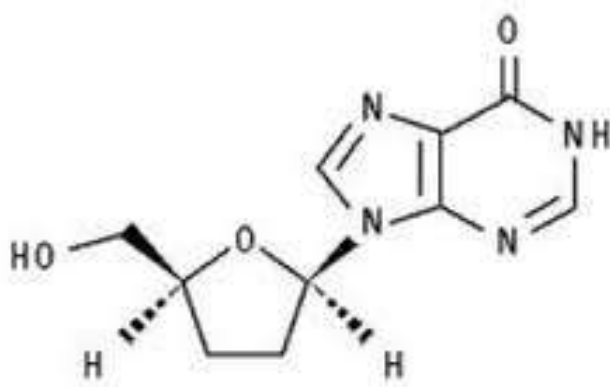
Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, αφορούν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη με β -απεικόνιση, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τις σχετικές δομές που παρατίθενται στα σχήματα 1 και 2. Έτσι, ένας μεγάλος αριθμός φουρανονουκλεοζιτών και παραγώγων τους έχουν συντεθεί λόγω του ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν ως βιολογικά δραστικά μόρια. Η σπουδαιότητα των πεντοζών αναγνωρίστηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως συστατικά των νουκλεϊνικών οξέων. Όλοι οι νουκλεοζίτες στο DNA και RNA αποτελούνται από ένα *D*-πεντοφουρανοζικό σάκχαρο συνδεδεμένο με μία ετεροκυκλική νουκλεοβάση (πουρίνη ή πυριμιδίνη), μέσω ενός β -*N*-γλυκοζιτικού δεσμού (Saenger 1984, Blackburn and Gait 1996, Bloomfield *et al.* 1999).

Τα ανάλογα νουκλεοζιτών αποτελούν προφάρμακα. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να τροποποιηθούν ενδοκυτταρικά έτσι ώστε να μπορέσουν να δράσουν. Η τροποποίηση που υφίστανται είναι η φωσφορυλίωση της 5'-θέσης του σακχάρου από ειδικές κυτταρικές κινάσες. Η φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτών τους μετατρέπει σε νουκλεοτίδια, τα οποία είναι μοριακοί δομικοί λίθοι του DNA και του RNA (Benjamin Lewin, Genes VIII:6- 8)

Μερικά από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα νουκλεοζιδικά ανάλογα είναι τα εξής: το Zidovudine azidothymidine (AZT), το Didanosine (DDI), το Zalcitabine (DDC) και η τριφθοριοθυμιδίνη. Αυτά τα νουκλεοζιδικά ανάλογα διαθέτουν για σάκχαρο μία πεντόζη.

DDI ή Didanosine

Το DDI (εικόνα 2) αποτελεί ένα νουκλεοζιδικό ανάλογο με αντιική δράση, αναστέλλοντας την αντιγραφή των ρετροϊών όπως του HIV. Παρεμποδίζει τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Το DDI (2',3'-dideoxyinosine), το οποίο πωλείται με το εμπορικό όνομα Videx, είναι ένας αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης, αποτελεσματικό ενάντια στον ιό HIV. Χρησιμοποιείται μαζί με άλλα αντιρετροϊκά φάρμακα ως μέρος της αντιρετροϊκής θεραπείας υψηλής δραστηριότητας (HAART). Το DDI, είναι ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο της γουανοσίνης, το οποίο διαφέρει από όλα τα άλλα νουκλεοσιδικά ανάλογα, καθώς δεν φέρει καμία από τις συνήθεις βάσεις στην πεντόζη αλλά αντί αυτού φέρει ένα μόριο υποξανθίνης. Μέσα στο κύτταρο, το DDI φωσφορυλιώνεται, από κυτταρικά ένζυμα, στο δραστικό μεταβολίτη τριφωσφορική διδεοξυαδενοσίνη, ddATP.

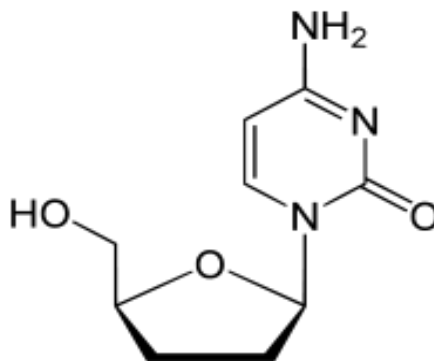


Εικόνα 2. Χημική δομή του DDI

DDC ή zalcitabine

Το DDC, (2'-3'-dideoxycytidine, ddC), ή διδεοξυκυτιδίνη (εικόνα 3) έχει παρόμοια δράση με το AZT και αποτελεί νουκλεοζιτικό ανάλογο που δρα ενάντια στον HIV. Δηλαδή χρησιμοποιείται ως αντιρετροϊκό φάρμακο.

Το DDC, , το οποίο ονομάζεται και dideoxycytidine, είναι ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο, το οποίο δρα ως αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης και πωλείται με την εμπορική ονομασία Hivid. Το Zalcitabine, (Εικόνα 10), είναι ένα ανάλογο της πυριμιδίνης. Είναι παράγωγο της φυσικής dideoxycytidine, το οποίο δημιουργείται με την αντικατάσταση ενός υδροξυλίου στη θέση 3 με ένα υδρογόνο. Φωσφορυλιώνεται στα T-κύτταρα και σε άλλα κύτταρα-στόχους του ιού HIV στην δραστική τριφωσφορική μορφή της, ddCTP. Αυτός ο ενεργός μεταβολίτης λειτουργεί ως υπόστρωμα για την αντίστροφη μεταγραφάση του HIV και προκαλεί τερματισμό της επιμήκυνσης του DNA, λόγω της έλλειψης του υδροξυλίου.



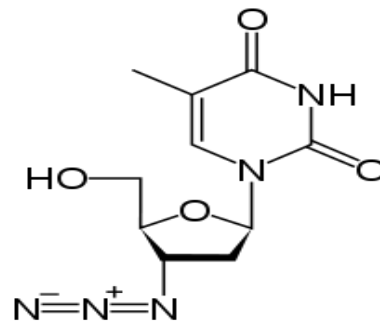
Εικόνα 3. Χημική δομή του DDC ⁽¹¹⁾

Τα φάρμακα αυτά δρουν ως συναγωνιστικοί αναστολείς των φυσιολογικών dNTPs, και κατόπιν ενσωμάτωσης τερματίζουν τον πολυμερισμό της ιϊκής DNA αλυσίδας.

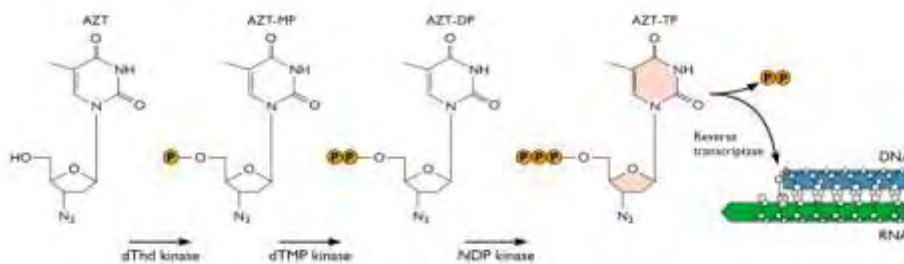
Zidovudine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine)

Αντιρετρο-ϊική δράση

Ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στο Zidovudine ή AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine (εικόνα 3) το οποίο είναι ο εκπρόσωπος της κατηγορίας των νουκλεοσιδικών αναστολέων του ιού της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας. Η ζιδοβουδίνη είναι ένα ανάλογο θυμιδίνης που αναστέλλει τους ιούς HIV-1, HIV-2, τον ιό της λευχαιμίας/λεμφώματος των T-λεμφοκυττάρων τύπου 1 και άλλους ρετροϊούς των θηλαστικών. Στην ίδια κατηγορία ανήκουν επίσης η διδεόξαδενοσίνη, η σταβουδίνη, η διδεόξυκυτιδίνη και η λαμβουδίνη. (Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1997: 456)

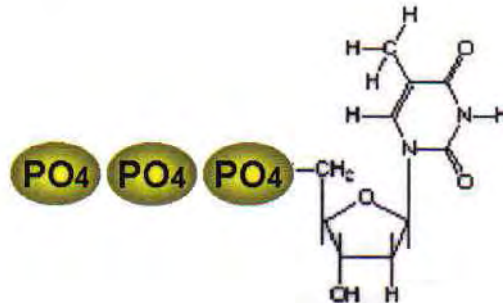


Εικόνα 3. Η χημική δομή του AZT



Εικόνα 4. Απουσία του 3'-υδροξυλίου στο zidovudine με αποτέλεσμα τον τερματισμό της αλυσίδας του DNA

Ο τερματισμός της αλυσίδας του DNA, είναι αποτέλεσμα της απουσίας της ομάδας του 3'-υδροξυλίου στο zidovudine, το οποίο καθιστά αδύνατη τη σύνδεση άλλων νουκλεοτιδίων.



Εικόνα 5. Ενεργή μορφή του AZT. Στη θυμιδίνη προστίθενται τρία φωσφορικά οξέα. Το ένα προστίθεται από το ιικό ένζυμο και τα υπόλοιπα δύο από τα κυτταρικά ένζυμα. ⁽⁹⁾

Ένα από τα πρώτα βήματα μετά από την είσοδο του ριβονουκλεϊκούγονιδιώματος στο κύτταρο είναι η αντίστροφη μεταγραφή, δηλαδή η μετατροπή του RNA σε ένα αντίτυπο DNA, μέσω της ενζυμικής δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης που περιέχεται στο ιοσωμάτιο. Το DNA που σχηματίζεται είναι ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο και συντίθεται στο κυτταρόπλασμα. Στο εσωτερικό ενός απεκδεδυμένου ιοσώματος.

Δεν είναι όλοι ρετροϊοί καρκινογόνοι. Η μόλυνση με ένα από αυτούς τους καρκινογόνους ιούς μπορεί να προκαλέσει μετασχηματισμό του κυττάρου και να οδηγήσει σε καρκινογένεση. Οι ιοί αυτοί φαίνεται ότι διαθέτουν κάποιο γονίδιο μετασχηματισμού, ένα ιικό ογκογονίδιο το οποίο κωδικεύει μια πρωτεΐνη που προκαλεί μετασχηματισμό του κυττάρου ξενιστή.

Γονίδια μετασχηματισμού ανάλογα του *src* έχουν βρεθεί σε καρκινικά κύτταρα του ανθρώπου. Παραδόξως, παρόμοια γονίδια έχουν ανιχνευθεί και φυσιολογικά κύτταρα. Αυτές οι γονιδιακές αλληλουχίες είναι τα πρωτογονογονίδια και είναι πρωταρχικής σημασίας για την κυτταρική αύξηση. Οι ρετροϊοί είναι ικανοί να ενσωματώνουν στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή τέτοιες φυσιολογικές αλληλουχίες, να τις μεταβάλλουν και να προκαλούν τη μη φυσιολογική έκφρασή τους.

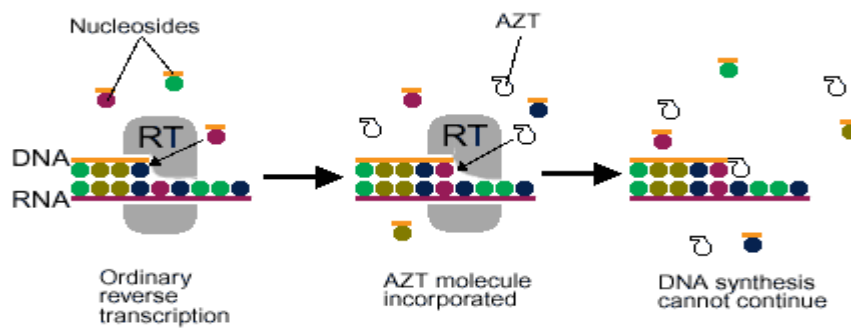
Ένας ιδιαίτερος ρετροϊός είναι ο HIV, ο ιός που προκαλεί το Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας στον άνθρωπο. Ο ιός αυτός μολύνει τα T βοηθητικά

λεμφοκύτταρα το οποία είναι ζωτικής σημασίας για το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου.

Η ρετροϊκή θεωρία του ιού του AIDS επιβεβαιώνει ότι ο κύκλος αντιγραφής του HIV αρχίζει με τη σύντηξη στην κυτταρική μεμβράνη και την εισαγωγή στο κύτταρο. Μέσα στο κύτταρο το ιϊκό RNA μεταγράφεται αντίστροφα σε DNA, το οποίο κατόπιν εισέρχεται στο κυτταρικό DNA σαν 'HIV προϊόν'. Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής καταλύεται από ένα ένζυμο γνωστό ως αντίστροφη μεταγραφάση. Ακολούθως, ο DNA προϊόν μεταγράφεται σε ιϊκό RNA, το οποίο με τη σειρά του μεταφράζεται σε ιϊκές. Τελικά, RNA και πρωτεΐνες αθροίζονται σε ιϊκά σωματίδια τα οποία απελευθερώνονται από την κυτταρική μεμβράνη όπου τα να ιϊκά σωματίδια μολύνουν νέα κύτταρα και ο κύκλος της αντιγραφής συνεχίζεται. Σύμφωνα με τους ερευνητές το AZT στην τριφωσφορυλιωμένη του μορφή είναι επιλεκτικός αναστολέας στην ιϊκή αντίστροφη μεταγραφάση, αναστέλλοντας τη δημιουργία του προ-ιϊκού DNA του HIV και συνεπώς διακόπτει τον κύκλο της νέας μόλυνσης ενώ αφήνει ανέπαφη την παραγωγή του ιού από τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί. Το AZT είναι το πρώτο φάρμακο που συστήθηκε για τη θεραπεία ενάντια στον ιό του HIV και παραμένει το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο φάρμακο γι' αυτό το σκοπό. Ο σχεδιασμός, η εκτέλεση και η ερμηνεία των κλινικών ευρημάτων αμφισβητήθηκαν από πολλούς. Χαρακτηριστικά οι John Lauritsen and Peter Duesberg υποστήριξαν ότι είναι εξαιρετικά τοξικό – «Δηλητήριο με ιατρική συνταγή», «AIDS με ιατρική συνταγή».

Το AZT είναι ανάλογο θυμίνης στο οποίο η 3'-υδροξύ (-OH) ομάδα έχει αντικατασταθεί από άζιδο (=N) ομάδα. Η 3' -υδροξύ (-OH) ομάδα είναι απαραίτητη για τα τριφωσφορυλιωμένα νουκλεοτίδια ώστε να ενσωματωθούν στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA. Επειδή στο AZT αυτή η χαρακτηριστική ομάδα απουσιάζει, από τη στιγμή που θα ενσωματωθεί το AZT στην αλυσίδα του DNA καμιά επιπλέον προσθήκη νουκλεοτιδίου δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί, συνεπώς η DNA αλυσίδα τερματίζεται. Τόσο το AZT, όσο και τα φυσικά νουκλεοτίδια πρέπει πρώτα να τριφωσφορυλιωθούν προκειμένου να ενσωματωθούν στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα. Ωστόσο παρόλο που το AZT χορηγείται φωσφορυλιωμένο, υποστηρίζεται ότι τριφωσφορυλιώνεται, όπως και τα φυσιολογικά νουκλεοτίδια, από τα κύτταρα. Από της στιγμή που το AZT χρησιμοποιείται σε επίπεδο ρουτίνας σε κλινική εφαρμογή για περισσότερα από 10 χρόνια, θα περίμενε κανείς ότι σήμερα θα υπήρχαν ενδείξεις ότι τα κύτταρα είναι

ικανά να μεταβολίσουν το AZT στην ενεργή του μορφή σε επίπεδα ικανά να να αναστείλουν την αντιγραφή τόσο in vitro όσο και in vivo και ότι το φάρμακο όντως αναστέλλει την αντιγραφή του HIV.



Εικόνα 7. Τρόπος δράσης του AZT

1.3.2. Πυρανονουκλεοζίτες

Παρόλο το μεγάλο αριθμό φουρανονουκλεοζιτών και παραγώγων αυτών που έχουν συντεθεί λόγω του ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν ως βιολογικά δραστικά μόρια, ορισμένα προβλήματα προέκυψαν από τη χρήση τους. Ο ανεπαρκής μεταβολισμός προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, η χημική ή ενζυματική απενεργοποίησή τους, η τοξικότητα, η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και όγκων και τέλος ο μικρός χρόνος ημιζωής και κατά συνέπεια χρόνος δράσης τους, έστρεψαν το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντιικής δράσης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων, που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη. Τις τελευταίες δεκαετίες, νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντιικές (Verheggen *et al.* 1993, Verheggen *et al.* 1995, Maurinsh *et al.* 1997, Ostrowski *et al.* 1998), αντικαρκινικές (Antonakis 1989) και αντιβιοτικές τους ιδιότητες (Haouz *et al.* 2003), καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων (Vastmans *et al.* 2000, Vastmans *et al.* 2001).

Φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες

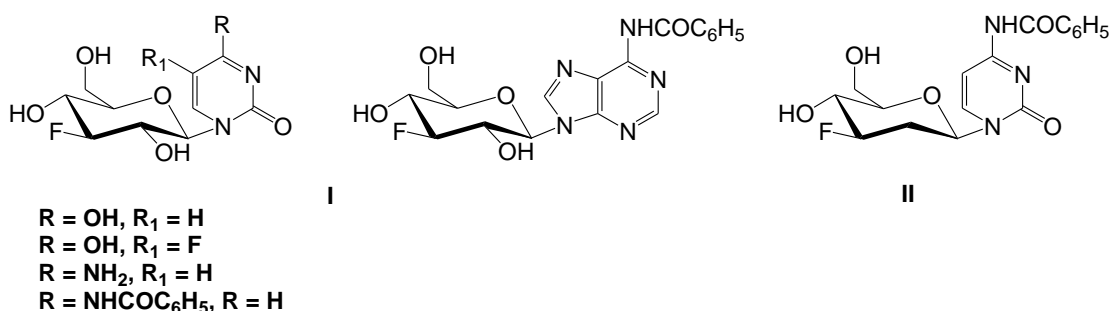
Η εισαγωγή ενός φθορίου είτε στο τμήμα του σακχάρου είτε στη νουκλεοβάση των φουρανονουκλεοζιτών, οδηγεί σε ενώσεις, οι οποίες διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα αντιικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων (Herdewijn *et al.* 1989, Tsuchiya 1990, Ternansky *et al.* 1993, Pankiewicz 2000). Ωστόσο, νέοι φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες έχουν συντεθεί και μελετηθεί τόσο για τις βιολογικές τους ιδιότητες ως αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες όσο και για τη δράση τους σε μοριακό επίπεδο.

Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε μια νέα σειρά φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων της N^4 -βενζοϋλοκυτοσίνης και της N^6 -βενζοϋλοαδενίνης (ενώσεις I, Σχήμα 8), αξιοσημείωτη αποδείχθηκε να είναι η δράση τους σε μοριακό επίπεδο. Οι συγκεκριμένες μελέτες εστιάστηκαν στην επίδραση, της νέας αυτής σειράς πυρανονουκλεοζιτών, στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(A) ουρά). Ένα ένζυμο-κλειδί σε αυτήν τη διεργασία της βράχυνσης είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN. Μετά από πρόσφατες αναφορές (Balatsos *et al.* 2008), ότι τα νουκλεοτίδια πουρινών

αναστέλλουν το συγκεκριμένο ένζυμο, πραγματοποιήθηκαν μελέτες με τις οποίες εξετάστηκε αν τα τροποποιημένα νουκλεοζιδικά ανάλογα της N^4 -βενζοϋλοκυτοσίνης και της N^6 -βενζοϋλοαδενίνης μπορούν να ρυθμίσουν την PARN.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν απέδειξαν ότι οι φθοριωμένοι νουκλεοζίτες της N^4 -βενζοϋλοκυτοσίνης και N^6 -βενζοϋλοαδενίνης (ενώσεις I, Σχήμα 8), μείωσαν αποτελεσματικά τη δραστηριότητα της PARN, δείχνοντας έτσι ότι αυτή μπορεί να ελεγχθεί από φυσικά νουκλεοτίδια *in vitro*, πιθανόν μέσω ενός απλού μηχανισμού ρύθμισης της αποικοδόμησης της πολυ(A) ουράς. Επιπλέον, τα ανάλογα νουκλεοζιδίων που εξετάστηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπες ενώσεις για την ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν την PARN (Balatsos *et al.* 2009).

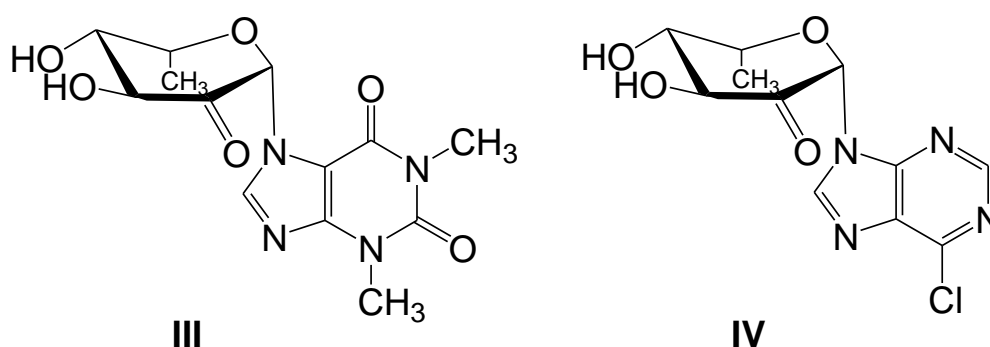
Ακόμη, φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες έχουν αξιολογηθεί και ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP), ένζυμο με κεντρικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου και υπεύθυνο για την παραγωγή γλυκόζης στο αίμα (γλυκογενόλυση). Η λεπτομερής ανάλυση των παραγόντων που καθορίζουν τη σύνδεση μικρομοριακών ενώσεων (αναστολέων) στη GP σε μοριακό επίπεδο, παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της ενζυμικής τους δράσης ή και της ανεπιθύμητης αποικοδόμησης γλυκογόνου, στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, όπου η υπεργλυκαιμία αποτελεί σοβαρό ιατρικό πρόβλημα. Συγκεκριμένα, φθοριωμένοι πυριμιδινικοί γλυκοπυρανονουκλεοζίτες (ενώσεις I, Σχήμα 8) καθώς και ένα φθοριωμένο δεοξυ-πυρανονουκλεοζιδικό ανάλογο της N^4 -βενζοϋλοκυτοσίνης (ένωση II, Σχήμα 8) αποδείχθηκαν ανταγωνιστικοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του μυϊκού γλυκογόνου (GPb) (Tsirkone *et al.* 2010).



Σχήμα 8

Φθοριωμένοι ακόρεστοι κετοπυρανονουκλεοζίτες

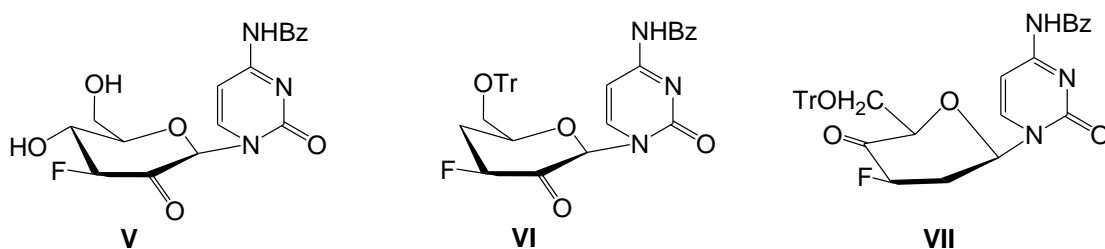
Παρόλο που τα κετο-παράγωγα των πεντονουκλεοζιτών, στις περισσότερες των περιπτώσεων, αποδείχθηκαν ασταθή, τα κετο-παράγωγα των νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο έδωσαν το έναυσμα για τη μελέτη μιας νέας και ενδιαφέρουσας χημείας (Antonakis and Leclercq 1970, Antonakis and Leclercq 1971). Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι κετο-πυρανονουκλεοζίτες αποτελούν συνθόνες σε συνθετικές και βιοσυνθετικές διαδικασίες και επιπλέον ένας σημαντικός αριθμός αυτών εμφανίζει ενδιαφέρουσα αντικαρκινική και αντιική δράση (Cook and Moffatt 1967, Antonakis 1975, Antonakis 1984, Komiotis *et al.* 1991, Khan *et al.* 2002). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της τάξης των νουκλεοζιτών, αποτελούν οι ενώσεις, 7-(6'-δεοξυ-β-D-λυξο-εξοπυρανοζυλο-2'-ουλοζο) θεοφυλλίνη (III, Σχήμα 9) (Antonakis and Arvor 1971, Antonakis 1972) και 9-(6'-δεοξυ-β-L-λυξο-εξοπυρανοζυλο-2'-ουλοζο)-6-χλωροπουρίνη (IV) (Antonakis and Bessodes 1973), οι οποίες βρέθηκε ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων KB, όπως επίσης και την ανάπτυξη της λευχαιμίας L1210 στα ποντίκια.



Σχήμα 9

Τελευταία, αξιοποιώντας τη διαθεσιμότητα αυτών των μορίων, η οποία αποδείχθηκε καθοριστική για τη βιολογική έρευνα, έχει πραγματοποιηθεί η σύνθεση μιας νέας ιδιαίτερης τάξης τροποποιημένων κετονουκλεοζιτικών αναλόγων που φέρουν ως σάκχαρο μία εξόζη, των φθοριωμένων κετονουκλεοζιτών. Από τις βιολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα νέα μόρια, αποδείχθηκε ότι τα 2'-κετο και 4'-κετονουκλεοζιτικά ανάλογα (ενώσεις V-VI, Σχήμα 10) (Manta *et al.* 2007, Manta *et al.* 2009) διαθέτουν ενδιαφέρουσες, αντιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι οι φθοριωμένοι 2'- και 4'-κετονουκλεοζίτες της N⁴-

βενζοϋλοκυτοσίνης μπορούν να θεωρηθούν ελπιδοφόροι για την ανάπτυξη αντι-εντεροϊικών φαρμάκων. Ακόμη, τόσο οι φθοριωμένοι 2'-κετονουκλεοζίτες της N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνης (ένωσεις **V**, **VI**), όσο και ο 4'-κετονουκλεοζίτης της ίδιας νουκλεοβάσης (ένωση **VII**), αποδείχθηκαν ότι αποτελούν εν δυνάμει αντι-αδενοκαρκινικούς παράγοντες, ενώ παρουσίασαν αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών και ειδικότερα έναντι των ανθρώπινων γαστρικών καρκινικών κυττάρων (AGS).



Tr = Τριτύλιο, Bz = Βενζοϋλομάδα

Σχήμα 10

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Στόχος - Σκοπός Μελέτης

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση και η μελέτη τροποποιημένων νουκλεοζιτών της 5-φθοροουρακίλης με σκοπό την εύρεση νέων αντικαρκινικών, αντιικών φαρμάκων με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα από τα μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενα.

Οι νουκλεοζίτες μαζί με τα ανάλογά τους αποτελούν το θεμελιώδη λίθο για την ανάπτυξη αποτελεσματικών, εκλεκτικών και μη τοξικών αντιικών και αντικαρκινικών παραγόντων. Εκτεταμένη έρευνα έχει διεξαχθεί για την εύρεση νέων τάξεων νουκλεοζιτών με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και αποτελεσματικότητα έναντι ανθεκτικών στελεχών των ιών.

Τα Αμινο - νουκλεοτιδία είναι γνωστό ότι διαθέτουν ισχυρές αντιβακτηριακές, αντικαρκινικές και ανασταλτικές της βιοσύνθεσης ιδιότητες . Ένα από τα πιο σημαντικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας των ενώσεων είναι το ruromycin, ένα μόριο που μιμείται το 3'-άκρο του αμινο-ακετυλο tRNA και είναι ένας ισχυρός προσδέτης της πεπτιδυλτρανσφεράσης του tRNA του ριβόσωματος. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η νουκλεοζιτική ρίζα του ruromycin, 6-*N,N*-διμεθυλο-3-αμινο-3-δεοξαδενοσίνη, παρουσιάζει δράση έναντι του *Trypanosoma equiperdum*.

Από την άλλη πλευρά, το 3-αζιδο-3-δεοξυθυμιδίνη (AZT), το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία των ασθενών με AIDS, παρουσιάζει την πιο ισχυρή ανασταλτική δράση κατά του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV). Τον τελευταίο καιρό, οι νουκλεοζίτες που φέρουν εξαμελή υδρογονανθρακικό δακτύλιο έχουν αξιολογηθεί για την πιθανή αντι-ιική τους, αντιοξειδωτική και αντιβιοτική τους δράση και μιμούνται τις ιδιότητες των φυσικών δομικών στοιχείων στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Τροποποιήσεις στο κατάλοιπο σακχάρου των παραπάνω νουκλεοζιτών, μπορούν να θεωρηθούν ως βιοισοστερή των φυσικών νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων και μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο σε διάφορους τομείς όπως η θεραπεία, η διάγνωση και τη βιοτεχνολογία.

Πρόσφατες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας του ΤΒΒ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας απέδειξαν ότι νέες τάξεις ασυνήθιστων φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών αποτελούν εν δυνάμει αντι-εντεροϊικούς παράγοντες, θεραπευτικά μέσα για τον καρκίνο του παχέος

εντέρου, καθώς και αποτελεσματικούς αναστολείς της ανάπτυξης καρκινικών όγκων. Βασιζόμενοι στην ομοιότητα του επαγωγικού φαινομένου της άζιδο-ομάδας με τα αλογόνα, καθώς επίσης και στις ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες των άμινο-νουκλεοζιτών, συντέθηκε μία νέα τάξη μορίων στα οποία μία άζιδο-ομάδα θα αντικαταστήσει το φθόριο. Στο παρόν πρόγραμμα, συντέθηκε μία νέα σειρά πυρανονουκλεοζιτών, οι οποίοι έφεραν άζιδο-ομάδα στην 3'-θέση του σακχάρου και ουρακίλη, θυμίνη και 5-φθοροουρακίλη ως ετεροκυκλικές βάσεις. Τα νέα μόρια θα αξιολογηθούν ως αντικαρκινικοί και αντι-ιικοί παράγοντες.

Η χημειοθεραπεία είναι μία από τις σημαντικότερες μεθόδους για τη θεραπεία του καρκίνου αν και μόνο 10 από τους 100 τύπους καρκίνων θεραπεύονται σήμερα με τη βοήθεια των αντι-νεοπλασματικών φαρμάκων. Παρόλο που τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί νέοι αντικαρκινικοί παράγοντες, το ποσοστό επιβίωσης των ασθενών παραμένει ακόμα χαμηλό. Επομένως, απαιτείται η εύρεση νέων φαρμάκων με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες σε σχέση με τα έως τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενα.

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα συμβάλουν καθοριστικά στη χημειοθεραπεία του καρκίνου και των ασθενειών που προκαλούνται από ιούς, αλλά η κλινική τους χρήση συχνά περιορίζεται λόγω εμφάνισης τοξικών παρενεργειών και ελλιπής αποτελεσματικότητάς τους έναντι ανθεκτικών στελεχών των ιών. Για τους λόγους αυτούς, η ερευνητική δραστηριότητα εστιάζεται στην ανακάλυψη νέων ενώσεων και νέα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται κλινικά ως αποτελεσματικοί παράγοντες για τη θεραπεία του AIDS, των ερπητοϊών και της ηπατίτιδας. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι προκλινικές και κλινικές μελέτες για την εύρεση νέων αντιικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών αναλόγων εξελίσσονται σχεδόν ταυτόχρονα (π.χ. το troxacitabine και το gemcitabine μελετήθηκαν αρχικά ως αντι-ιικοί παράγοντες, ενώ το entecavir μελετήθηκε επίσης ως αντικαρκινικός παράγοντας).

Πρόσφατες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας του ΤΒΒ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, απέδειξαν ότι νέες τάξεις ασυνήθιστων φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών αποτελούν εν δυνάμει αντι-εντεροϊικούς παράγοντες, θεραπευτικά μέσα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς και αποτελεσματικούς αναστολείς της ανάπτυξης καρκινικών όγκων. Λαμβάνοντας υπόψη τις ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες των ανωτέρω ενώσεων και βασιζόμενοι στην ομοιότητα του επαγωγικού φαινομένου της άζιδο-ομάδας με τα αλογόνα, καθώς επίσης και στις

ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες των άμινο-νουκλεοζιτών, αποφασίσαμε να διευρύνουμε τις μελέτες μας και να συνθέσουμε μία νέα τάξη μορίων στα οποία μία άζιδο-ομάδα και μία άμινο-ομάδα θα αντικαταστήσει το φθόριο. Συντέθηκε μία νέα σειρά πυρανονουκλεοζιτών, οι οποίοι έφεραν άζιδο-ομάδα ή άμινο-ομάδα στην 3'-θέση του σακχάρου και ουρακίλη, θυμίνη και 5-φθοροουρακίλη ως ετεροκυκλικές βάσεις. Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν ως αντικαρκινικοί και αντι-ιικοί παράγοντες.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₅₄) ώστε να ελεγχθεί η αντίδραση. Η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 30% είτε υπό λυχνία υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας (254 nm).

Τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω :

- Διάλυμα Α : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 90/10
- Διάλυμα Β : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 50/10
- Διάλυμα Γ : Μεθανόλη/Οξικός Αιθυλεστέρας 10/90
- Διάλυμα Δ : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 30/10
- Διάλυμα Ε : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 50/50

Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων και επιτυγχάνεται με υπό πίεση αέρα (flash chromatography), σε silica gel (240-400, Merck grade).

Ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι:

- Διάλυμα Α : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 90/10
- Διάλυμα Β : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 60/40
- Διάλυμα Γ : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 60/10
- Διάλυμα Δ : Μεθανόλη/Οξικός Αιθυλεστέρας 10/90

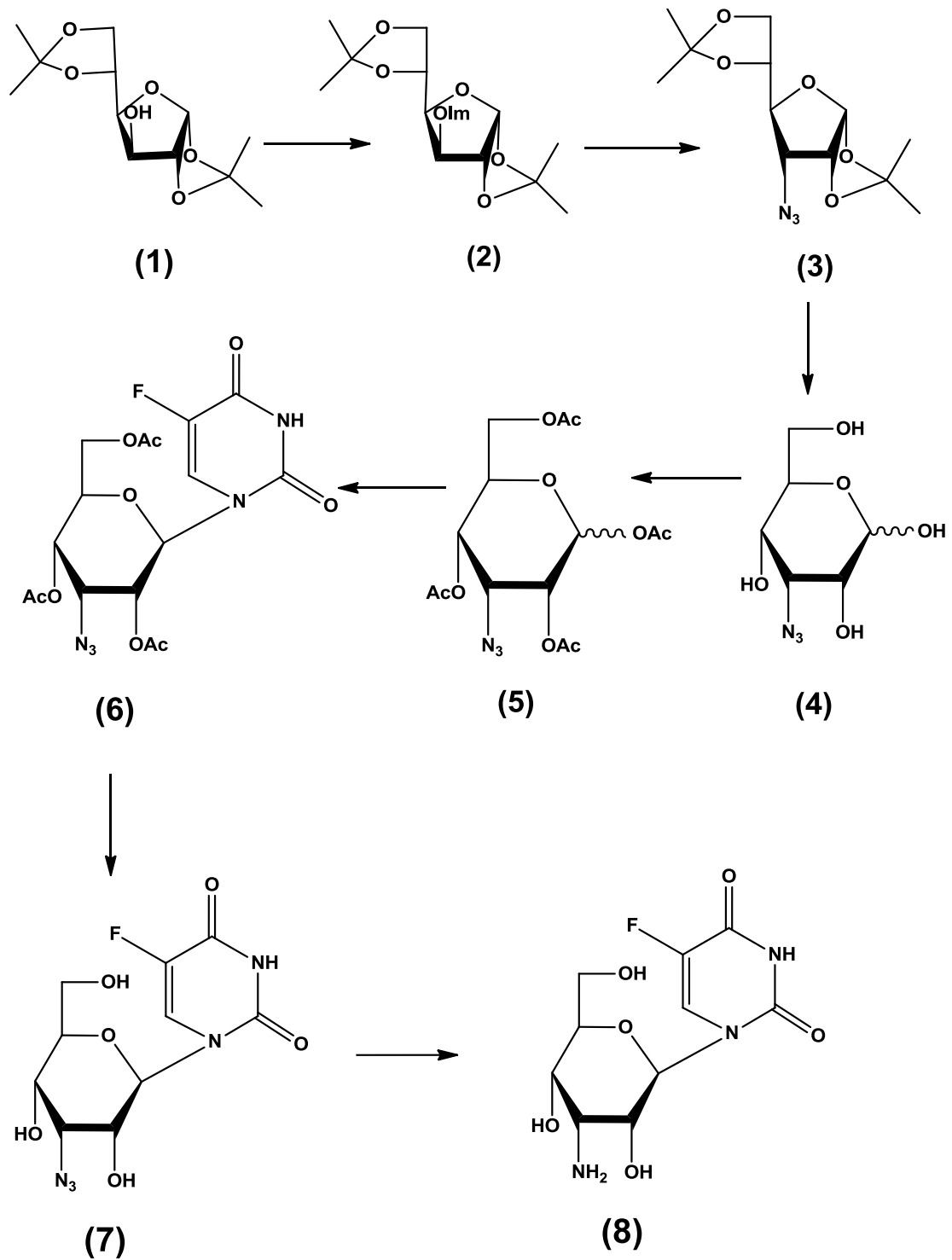
Ξήρανση διαλυτών

Ορισμένες από τις αντιδράσεις που περιγράφονται, επιβάλλουν την χρήση άνυδρων διαλυτών όπως CH_3CN και DMF . Η ξήρανση τους γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves).

Ταυτοποίηση ενώσεων

Μετά τη σύνθεση των ενώσεων γίνεται ταυτοποίηση με τη χρήση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με Bruker 500 MHz, χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) ή σε δευτεριωμένη μεθανόλη (CD_3OD). Το tetramethylsilane (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (double), m (multiple). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ



Μεθοδολογία σύνθεσης

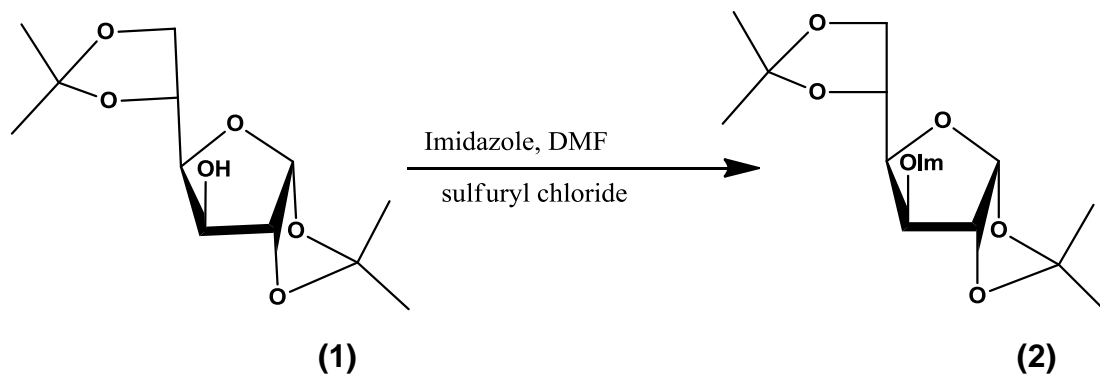
Από την εμπορικά διαθέσιμη ένωση **1** 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-γλυκοφουρανόζη (DAG) προέκυψε η ένωση **2** 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-ιμιδαζολο-α-D-γλυκοφουρανόζη υπό συνθήκες ψύξης στους -40°C και κατόπιν προσθήκης του sulfonyl chloride. Στη συνέχεια η ένωση **2** διαλύεται σε DMF και προστίθεται sodium azide (NaN_3). Το προϊόν που προκύπτει είναι η 3-C-άζιδο-3-δεόξυ-1,2:5,6-δι-Ο-ισοπροπυλιδένιο-α-D-αλλοφουρανόζη **3**.

Η συνθετική πορεία συνεχίζεται με την υδρόλυση του προϊόντος **3** με ένα θερμό υδατικό διάλυμα της ρητίνης Amberlite IR-120 (H^+), η οποία οδηγεί στην ένωση **4**, σε άριστη απόδοση 95%. Στη συνέχεια, με ακετυλίωση του προϊόντος **4** παρουσία Ac_2O σε πυριδίνη, λαμβάνεται το επιθυμητό σάκχαρο 1,2,4,6-τέτρα-Ο-ακέτυλο-3-C-άζιδο-3-δεόξυ-D-αλλοπυρανόζης **5**, σε κρυσταλλική μορφή και σε μέτρια απόδοση (60%).

Ακολουθεί η σύζευξη του σακχάρου **5** με τη βάση 5-φθοροουρακίλη. Σιλυλιώνεται πρώτα η βάση παρουσία του διαλύτη ακετονιτριλίου (CH_3CN), εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης. Αφού σιλυλιωθεί η βάση, προστίθεται στο σάκχαρο **5** και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) και θέρμανση της αντίδρασης, λαμβάνοντας την επιθυμητή ένωση 1-(2',4',6'-τρι-Ο-ακέτυλο-3'-C-άζιδο-3'-δεόξυ-β-D-αλλοπυρανοζης) της 5-φθορο-ουρακίλης **6**, με ικανοποιητική απόδοση (53%).

Ακολουθεί η απακετυλίωση του προϊόντος (**6**), η οποία επιτυγχάνεται μέσω προσθήκης μεθανολικής αμμωνίας και παραλαμβάνουμε το προϊόν 1-(3'-C-άζιδο-3'-δεόξυ-β-D-αλλοπυρανόζη)-5-φθοροουρακίλη (**7**). Τέλος, με την προσθήκη τριαιθυλαμίνης στο προϊόν (**7**), λάβαμε το τελικό προϊόν 1-(3'-C-άμινο-3'-δεόξυ-β-D-αλλοπυρανόζη)-5-φθοροουρακίλη (**8**).

3.1. Σύνθεση της 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδανο-3-ιμιδαζολο-α-D-γλυκοφουρανόζης (2)

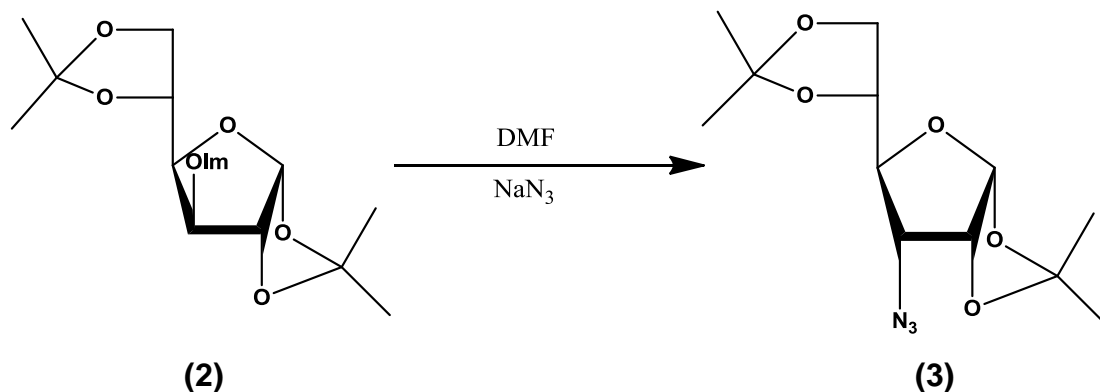


Η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδανο-α-D-γλυκοφουρανόζη (DAG) **1** (0,5 g, 1,2 mmol) διαλύθηκε σε DMF (9,6 ml) και στη συνέχεια προστέθηκε imidazylate (784mg, 11.52 mmol). Το προκύπτον διάλυμα ψύχθηκε στους -40°C και κατόπιν προστέθηκε το sulfuryl chloride και παρέμεινε για 30' υπό συνεχή ανάδευση. Η αντίδραση ελέγχθηκε μετά από 12 ώρες με TLC (πίνακας 1). Στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **2** (153mg) χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

TLC (Διάλυμα A)	$R_f = 0.4$
Απόδοση	20%

Πίνακας 2. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδανο-3-ιμιδαζολο-α-D-γλυκοφουρανόζης (**2**).

3.2. Σύνθεση 3-C-άζιδο-3-δεόξυ-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδένο-α-D-αλλοφουρανόζη (3).

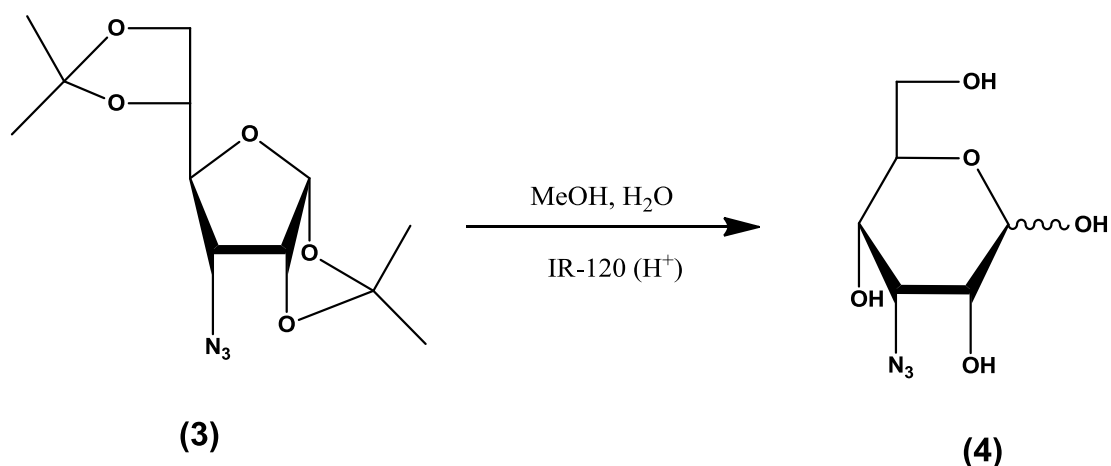


53 mg της ένωσης **2** διαλύονται σε DMF (0,7 ml) κι έπειτα προστίθεται NaN₃ (45.5 mg, 0,7 mmol). Το διάλυμα αναδεύεται υπό θέρμανση στους 90°C. Η αντίδραση ελέγχθηκε μετά από 12 ώρες με TLC (πίνακας 2). Παρατηρήθηκε ότι προκύπτουν δύο προϊόντα στη χρωματογραφία επί χάρτου. Ένα μαύρου χρώματος και ένα καφέ-κόκκινου χρώματος. Το τελευταίο είναι και το επιθυμητό έπειτα από ταυτοποίηση με NMR. Απομακρύνονται οι διαλύτες υπό κενό. Τα προϊόντα διαχωρίζονται με χρωματογραφία στήλης και απομονώνεται το επιθυμητό προϊόν. Προκύπτει υποκίτρινο ίζημα με τη μορφή ελαίου.

TLC (Διάλυμα B)	R _f =0.6
Απόδοση	45%

Πίνακας 3. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-άζιδο-3-δεόξυ-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδένο-α-D-αλλοφουρανόζη (**3**).

5.3. Σύνθεση 3-C-άζιδο-3-δεόξυ-α-D-αλλοπυρανόζης (4).

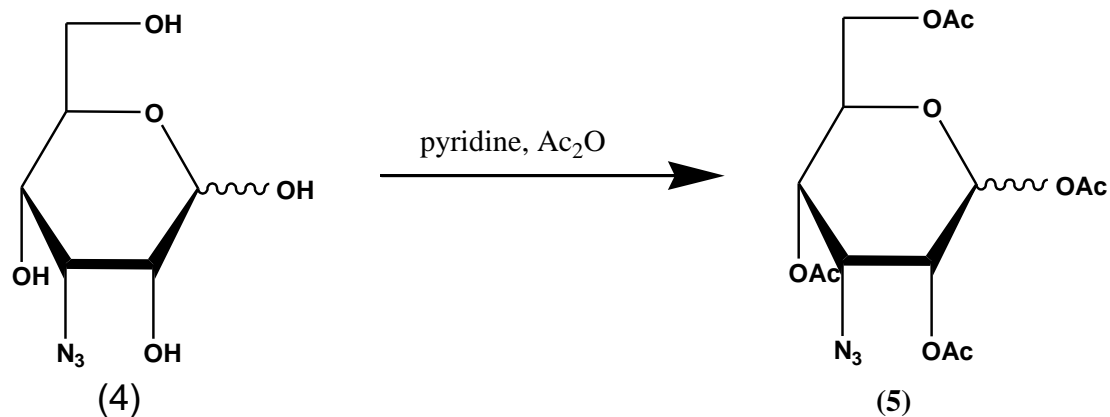


Σε διάλυμα του 3 (45 mg, 0,16 mmol) σε MeOH (0,25 ml) και νερό (0,91 ml) προστέθηκε ρητίνη Amberlite IR-120 (H⁺) (731.64 mg) και ακλούθησε θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα για όλη τη νύχτα. Μετά από 10 ώρες η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 3), το μίγμα διηθήθηκε και απομακρύνθηκαν οι διαλύτες από το διήθημα υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν 4 (21 mg) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

TLC (Διάλυμα A)	R _f =0.2
Απόδοση	65%

Πίνακας 4. Αποτελέσματα σύνθεσης 3-C-άζιδο-3-δεόξυ-α-D-αλλοπυρανόζης (4).

3.4. Σύνθεση της 1,2,4,6-τέτρα-Ο-ακέτυλο-3-С-άζιδο-3-δεόξυ-D-αλλοπυρανόζης (5).



Σε ένα διάλυμα της ένωσης **4** (70 mg, 0.34 mmol) σε πυριδίνη (2.6 ml) προστέθηκε Ac_2O (1.4 ml). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC πίνακας 4) το διάλυμα κρύωσε στους $0^\circ C$ και προστέθηκε μεθανόλη (0.7 ml) για να καταστείλει την αντίδραση. Η αντίδραση συμπυκνώνεται υπό κενό πολλές φορές με MeOH για να απομακρυνθεί η πυριδίνη. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Γ και το επιθυμητό προϊόν **5** (50mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα Α)	$R_f=0.6$
Απόδοση	40%

Πίνακας 5. Αποτελέσματα σύνθεσης της σύνθεσης της 1,2,4,6-τέτρα-Ο-ακέτυλο-3-С-άζιδο-3-δεόξυ-D-αλλοπυρανόζης (**5**).

3.5. Σύνθεση του 1-(2',4',6'-τρι-O-ακέτυλο-3'-C-άζιδο-3'-δεόξυ-β-D-άλλο-πυρανοζης) της 5-φθοροουρακίλης (6).

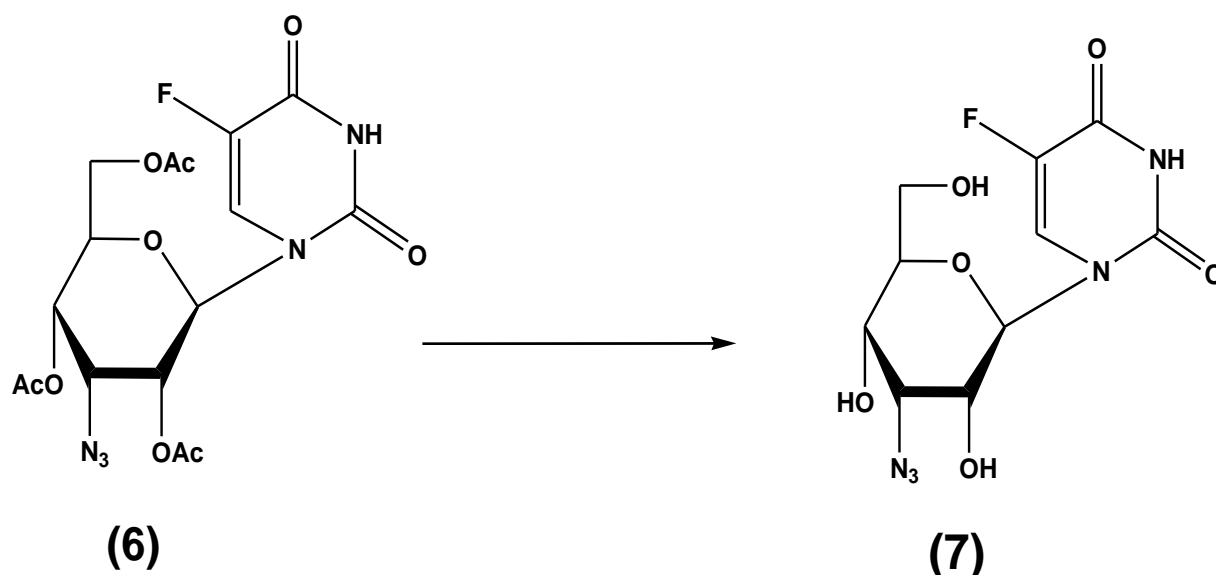


Ένα διάλυμα της ουρακίλης (29,14 mg, 0.224 mmol), του HMDS (58,6 μl, 0,27776 mmol) και της σακχαρίνης (1,89 mg, 0.0103 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (1 ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 30 λεπτά 120 °C και αφότου το μίγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 1,2,4,6-τέτρα-O-ακέτυλο-3-C-άζιδο-3-δεόξυ-D-αλλοπυρανόζη **5** (60 mg, 0.16 mmol) καθώς και ο Me₃SiOSO₂CF₃ (40 μl, 0,224 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στη 1 ώρα (TLC πίνακας 5) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 105 °C. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (90 ml) και εκχυλίστηκε μία φορά με νερό (1 x 5 ml). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Δ. Το επιθυμητό προϊόν **6** (37.6 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα Β)	R _f = 0.4
Απόδοση	53%
α _d ²²	+8 (CHCl ₃)
λ _{max}	265 nm (ε 3169)

Πίνακας 6. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',4',6'-τρι-O-ακέυλο-3'-C-άζιδο-3'-δεόξυ-β-D-άλλο-πυρανοζης)-5-φθοροουρακίλης (**6**).

3.6. Σύνθεση της 1-(3'-C-άζιδο-3'-δεόξυ-β-D-αλλοπυρανόζη)-5-φθοροουρακίλης (7).

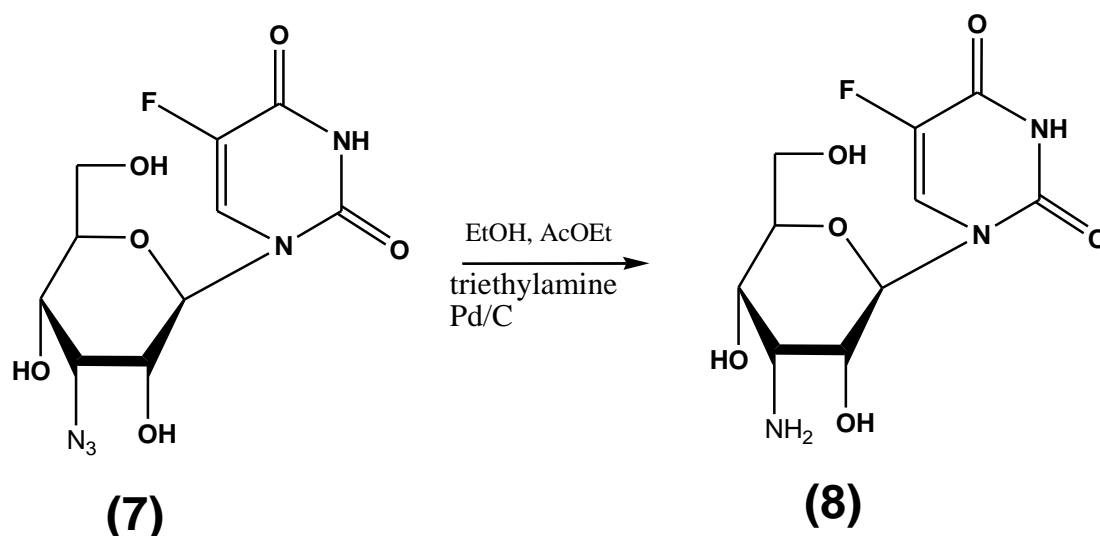


Διάλυμα της ένωσης **6** (20 mg, 0.045 mmol) σε μεθανολική αμμωνία αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Γ, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **7** (5.74g, 40%) με λευκή αφρώδη υφή.

TLC (Διάλυμα Δ)	R _f = 0.4
Απόδοση	40%
α _d ²²	+ 6 (c 0.20, MeOH)
λ _{max}	266 nm (ε 1671)

Πίνακας 7. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3'-C-άζιδο-3'-δεόξυ-β-D-αλλοπυρανόζη)-5-φθοροουρακίλης (7).

3.7. Σύνθεση της **1-(3'-C-άμινο-3'-δεόξυ-β-D-αλλοπυρανόζη)-5-φθοροουρακίλης (8)**.



Σε διάλυμα της ένωσης **7** (0.78 g, 2.57 mmol) σε EtOH (45.2 mL) και οξικό αιθυλεστέρα (45.2 mL) προστέθηκε τριαιθυλαμίνη (0.41 mL, 2.94 mmol) και παλλάδιο σε άνθρακα 10% (0.20 g). Το διάλυμα υδρογονώθηκε για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα το μίγμα διηθήθηκε και από το διήθημα απομακρύνθηκαν οι διαλύτες υπό κενό. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το Διάλυμα E και το επιθυμητό προϊόν **8** (m=0,43g) ελήφθη υπό τη μορφή υποκίτρινου αφρώδους στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης είναι α=60%,

TLC (Διάλυμα Δ)	R _f = 0.4
Απόδοση	50%
α _d ²²	+ 2 (c 0.20, DMSO)
λ _{max}	264 nm (ε 1012)

Πίνακας 7. Αποτελέσματα σύνθεσης της **1-(3'-C-άμινο-3'-δεόξυ-β-D-αλλοπυρανόζη)-5-φθοροουρακίλης(8)**

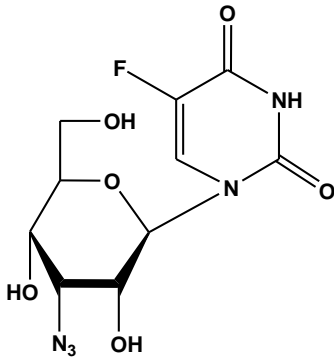
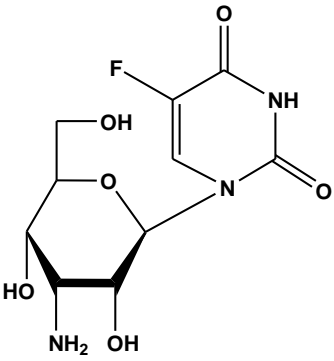
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη νουκλεοζιδικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προέκυψε από τις προσπάθειες των ερευνητών για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως κακοήθεις νεοπλασίες και οι ιικές μολύνσεις. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιδικών αναλόγων, τα οποία να παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και εκλεκτικότητα όσον αφορά στην δράση τους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών με πιθανή αντιική και αντικαρκινική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, εύκολη, έχοντας πραγματοποιήσει σύντομα βήματα. Οι τελικές αποδόσεις που πήραμε από τη σύνθεση των τελικών πυρανονουκλεοζιτών είναι αρκετά καλές. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση της 3-C-άζιδο-3-δεόξυ-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδένο-α-D-αλλοφουρανόζης (2) είχε απόδοση 20%, της **3-C-άζιδο-3-δεόξυ-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδένο-α-D-αλλοφουρανόζη (3)** είχε απόδοση 45%, **3-C-άζιδο-3-δεόξυ-α-D-αλλοπυρανόζης (4)** είχε απόδοση 65%. Η σύνθεση της **1,2,4,6-τέτρα-O-ακέτυλο-3-C-άζιδο-3-δεόξυ-D-αλλοπυρανόζης (5)** είχε απόδοση 40%, της **1-(2',4',6'-τρι-O-ακέτυλο-3'-C-άζιδο-3'-δεόξυ-β-D-άλλοπυρανοζης) της 5-φθοροουρακίλης (6)** είχε απόδοση 53%, της **1-(3'-C-άζιδο-3'-δεόξυ-β-D-αλλοπυρανόζη)-5-φθοροουρακίλης (5c)** είχε απόδοση 40% και της **1-(3'-C-άμινο-3'-δεόξυ-β-D-αλλοπυρανόζη)-5-φθοροουρακίλης (8)**

Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H NMR. Η ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (L1210, HeLa, CEM) από τους νεοσυντιθέμενους πυρανονουκλεοζίτες απεικονίζεται στον Πίνακα 9.

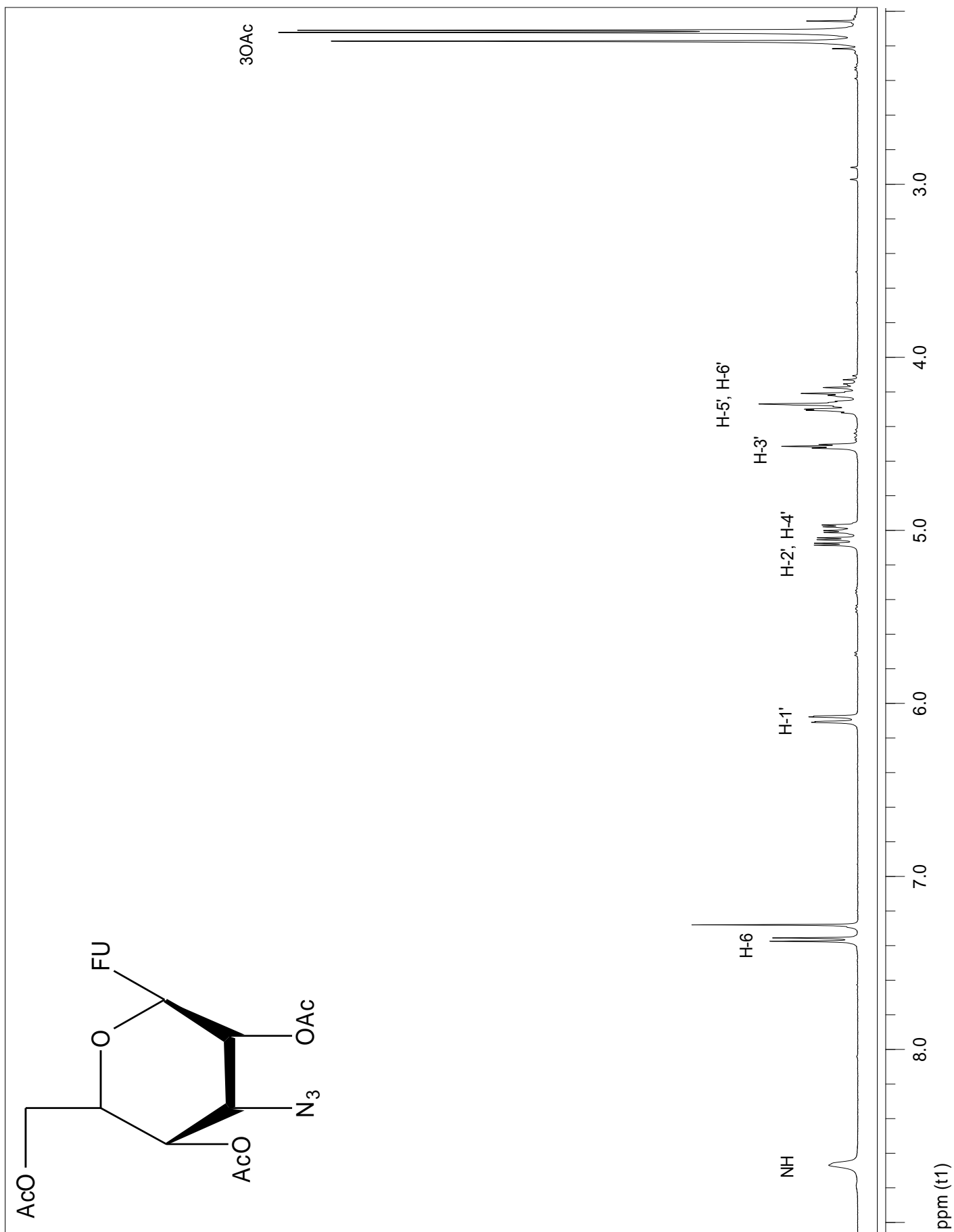
ΠΙΝΑΚΑΣ 9:

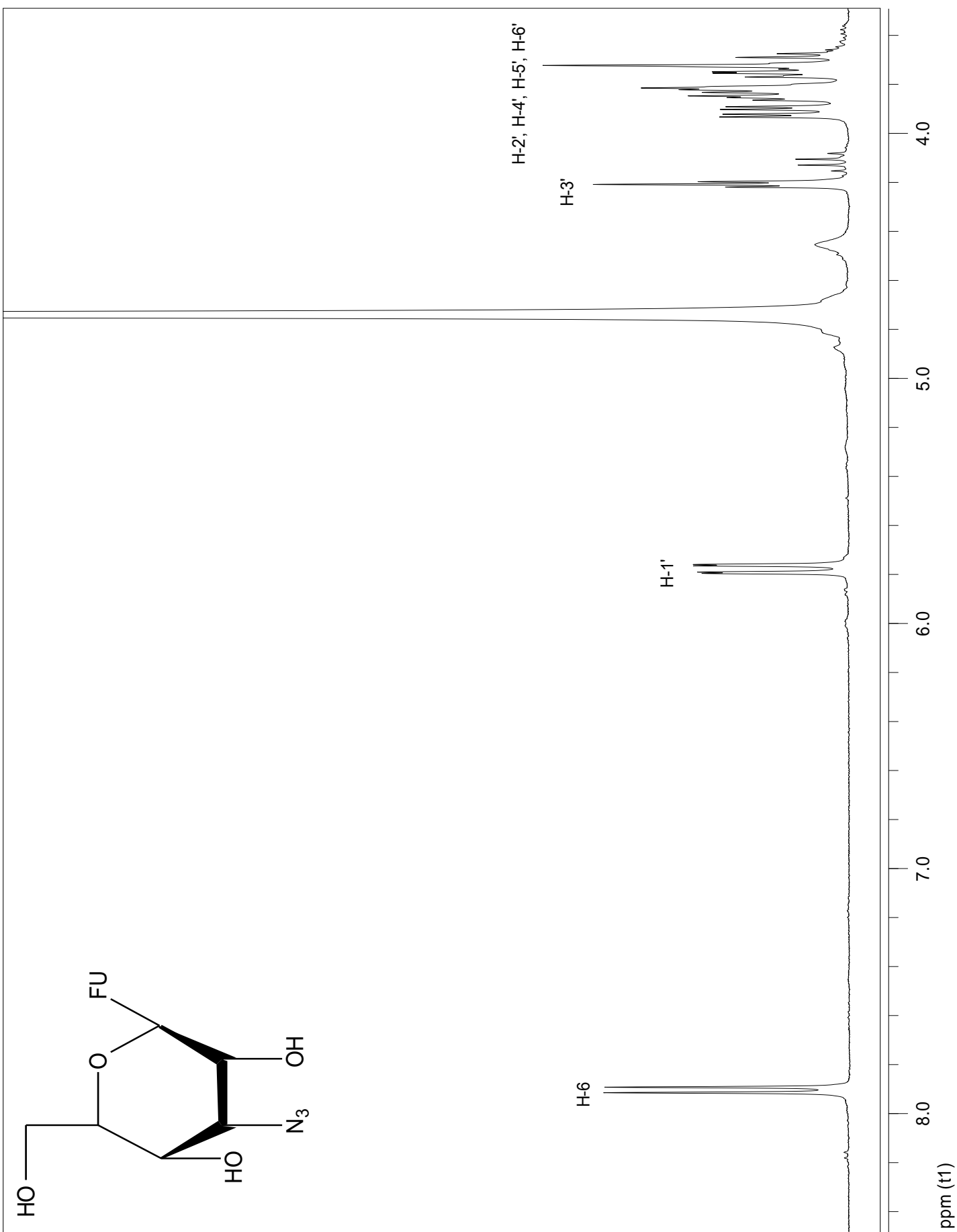
		7	8
ΕΝΩΣΕΙΣ			
IC₅₀ (μM)	L1210	>250	119 ± 10
	CEM	>250	>250
	Hela	≥ 250	174 ± 4

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω μόνο ο νεοσυντιθέμενος άμινο-αλλοπυρανονουκλεοζίτης παρουσίασε ανασταλτική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των λευχαιμικών κυττάρων (L1210), και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου (HeLa), ενώ τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά έναντι της ανάπτυξης των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM).

Οι νέες ενώσεις, οι οποίες εμφάνισαν μια ενδιαφέρουσα κυτταροστατική δράση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγοί για τη σύνθεση ανάλογων ενώσεων με βελτιωμένες κυτταροστατικές ιδιότητες.

6. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR





7. BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Antonakis, K. *Carbohydr. Res.* **1972**, *24*, 229

Antonakis, K. *Chimia* **1975**, *29*, 59

Antonakis, K. "Ketonucleosides". In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Tipson, R. S. and Horton, D. (Eds), Academic Press, New York, **1984**, *42*, p. 227

Antonakis, K. "Hexopyranose nucleosides". In *Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C)*; Elsevier, Amsterdam, **1989**, *4*, p. 241 **Antonakis, K.; Leclercq, F.** *C. R. Acad. Sci., Ser. C* **1970**, *271*, 1197.

Antonakis, K.; Leclercq, F. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1971**, 2142.

Antonakis, K.; Arvor, M. J. *C.R. Acad. Sci.* **1971**, 272-c, 1982.

Antonakis, K.; Bessodes, M. *Carbohydr. Res.* **1973**, *30*, 192

Azuma, A.; Hanaoka, K.; Kurihara, A.; Kobayashi, T.; Miyaushi, S.; Kamo, N.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3391

Azuma, A.; Nakajima, Y.; Nishizono, N.; Minakawa, N.; Suzuki, M.; Hanaoka, K.; Kobayashi, T.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 4183

Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1879

Balatsos, N. A. A.; Anastasakis, D.; Stathopoulos, C. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**

Balatsos, N.A.A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis, D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6044-6051

Balzarini, J. *Pharmacy World Sci.* **1993**, *16*, 113.

Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2033.

Blackburn, G. M.; Gait, M. J. "Nucleic Acids in Chemistry and Biology", Oxford University Press, New York, **1996**

Bloomfield, V. A.; Crothers, D. M.; Tinoco, I. "Nucleic Acids: Structure, Properties and Functions", University Science Books, Sausalito, California, **1999**

Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, **2005**, 4, 4

Challand, R.; Young, R. J. *Antiviral Chemotherapy* Mann, J. Ed.; UK, **1997**.

Chong, Y.; Choo, H.; Lee, S.; Choi, Y.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 4888

Cook, A. F.; Moffatt, J. G. *J. Amer. Chem. Soc.* **1967**, 89, 2697.

Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 47, 365

Field, J.H.; Hodge V.R.A. *Antiviral Agents, Encyclopedia of Virology* **2008**, 142

Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4343

Herdewijn, P.; Van Aerschot, A.; Kerremans, L. *Nucleosides Nucleotides* **1989**, 8, 65.

Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 4963

Kinchington, D. *J. Chin. Pathol.* **1999**, 52, 89.

Khan, A. R.; Mulligan, K. X.; Redda, K. K.; Ollapally, A. P. *Synth. Commun.* **2002**, 32, 1023

Komiotis, D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides Nucleotides* **1991**, 10, 431

Komiotis, D.; Manta S.; Tsoukala E.; Tzioumaki N. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents* **2008**, 7, 219

Lewin, B. *Genes* **2003**, VIII, 6.

Lin, T. S.; Luo, M. Z.; Liu, M. C.; Clarkatzenburg, R. H.; Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H.; Mancini, W. R.; Birnbaum, G. I.; Gabe, E.; Giziewicz, J. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2607

Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 980

Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevsek, A.; Pamulapati, R.T.; Matsuda, A.; Azuma, A. *Nucleosides Nucleotides* 1995, 14, 461.

Matsuda, A.; Nakajima, Y.; Azuma, A.; Tanaka, M.; Sasaki, T. *J. Med. Chem.* 1991b, 34, 2917

Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, 95, 105.

Maurinsh, Y.; Schraml, J.; De Winter, H.; Blaton, N.; Peeters, O.; Lescrinier, E.; Rozenski, J.; Van Aerschot, A.; De Clercq, E.; Busson, R.; Herdewijn, P. *J. Org. Chem.* 1997, 62, 2861

Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 2696

Ostrowski, T.; Wroblowski, B.; Busson, R.; Rozenski, J.; De Clercq, E.; Bennet, M. S.; Champness, J. N.; Summers, W. C.; Sanderson, M. R.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 4343

Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1997: 456

Paintsil, E.; Cheng, C.Y. *Antiviral Agents, Encyclopedia of Microbiology* 2009, 223

Pankiewicz, K.W. *Carbohydr. Res.* 2000, 327, 87

Pontikis, R.; Wolf, J.; Monneret, C.; Florent, J. –C. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 3523.

Plunkett W.; Gandhi V. Purine and pyrimidine nucleoside analogues, in: G. Giaccone, R. Schilsky, P. Sondel (Eds.), *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers*, Elsevier Science B. V., 2001, pp. 21-45.

Robins, R. K.; Kini, G. D. “Purines and Purine Nucleoside Analogues as Antitumor Agents”. In *The Chemistry of Antitumor Agents*; Wilman, D. E. V. Ed.; Chapman and Hall: New York, 1990, p.299. Elion, G. B. *Science* 1989, 244, 41.

Saenger, W. “Principles of Nucleic Acid Chemistry”, Springer-Verlag, New York, 1984

Tanaka, M.; Matsuda, A.; Terao, T.; Sasaki, T. *Cancer Lett.* 1992, 64, 67.

Skamnaki, T.V.; Drakou, C.; Zographos, E.S.; Komiotis, D.; Leonidas, D.D. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 3413

Ternansky, R. J.; Hertel, L. W. "Organofluorine Compounds in Medicinal Chemistry and Biomedical Applications". Filler, R.; Kobayashi, Y.; Yagupolski, L.M. (Eds), Elsevier, Amsterdam, **1993**, p. 23

Tsuchiya, T. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *48*, 91.

Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12757.

Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.;

Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Van Meervelt, L.; Rozenski, J.; Wiebe, L.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Claes, P.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 826

Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417.

Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2319.