

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

«Σύνθεση και βιολογική αποτίμηση τροποποιημένων στη βάση άκυκλων
νουκλεοζιτών με πιθανή αντι-ιική και αντικαρκινική δράση»

“Synthesis and biological evaluation of base-modified acyclic nucleosides
with potential antiviral and anticancer activity”

ΚΑΡΕΤΣΟΥ ΒΑΡΒΑΡΑ
ΛΑΡΙΣΑ



Τριμελής επιτροπή

- **ΜΗΤΣΟΣ ΧΡΗΣΤΟΣ**

Μέλος Ε.ΔΙ.Π. του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ**

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **ΤΖΙΟΥΜΑΚΗ ΝΙΚΗ**

Επιστημονικός συνεργάτης του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Βιοοργανικής Χημείας κ. Κομιώτη Δημήτριο, το χρονικό διάστημα Οκτώβρη 2017- Ιούνιο 2018. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά αρχικά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε επιλέγοντας με για την διεξαγωγή της πτυχιακής εργασίας και έπειτα για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του. Η αμεσότητα στην προσπάθεια του να μεταλαμπαδεύσει τις γνώσεις του, το ήθος της διδασκαλίας του και ο σεβασμός απέναντι στους φοιτητές του, αποτέλεσε το κίνητρο για να απευθυνθώ σε αυτόν για το σημαντικό αυτό κομμάτι των σπουδών μου.

Φυσικά, θα ήθελα να απευθύνω ειλικρινείς ευχαριστίες στον εξίσου σπουδαίο υποψήφιο διδάκτορα, τον κ. Κολλάτο Νικόλαο για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την στήριξη του κατά την διάρκεια της εργασίας μου. Οι σημαντικές υποδείξεις και συμβουλές του με κατεύθυναν σ' ένα σωστό τρόπο σκέψης πάνω απ' όλα και μου προσέφεραν σημαντικά εφόδια για την μετέπειτα ζωή μου. Επίσης, οφείλω με χαρά μου να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου που συνεργαστήκαμε κατά την περίοδο εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, Λιόλιο Βασίλειο και Γιαννακά Χρήστο για την συμβολή τους στο να εξοικειωθώ με το χώρο του εργαστηρίου και να συνυπάρχουμε ομαλά σε αυτόν.

Τελειώνοντας, ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου την οικογένεια μου που ήταν δίπλα μου καθ' όλη την διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων, που με αγαπάει, στηρίζει κάθε βήμα μου και πιστεύει στις δυνατότητες μου.

Καρέτσου Βαρβάρα

Περίληψη

Οι αντιμεταβολίτες νουκλεοζιτών έχουν επηρεάσει σημαντικά τη θεραπεία του καρκίνου και των μολύνσεων από ιούς. Η στενή τους ομοιότητα με τα φυσικά ανάλογα τους δίνει τη δύναμη να παρεμβαίνουν σε ποικίλους ενδοκυτταρικούς στόχους, οι οποίοι από τη μια πλευρά τους δίνουν υψηλή ισχύ, αλλά από την άλλη πλευρά προκαλούν σοβαρές παρενέργειες, ιδιαίτερα των χημειοθεραπευτικών που χρησιμοποιούνται κατά των κακοηθειών. Επομένως, η ανάπτυξη νέων αναλόγων νουκλεοζιτών με διευρυμένα θεραπευτικά παράθυρα αντιπροσωπεύει έναν ελκυστικό στόχο σε συνθετικούς οργανικούς και φαρμακευτικούς χημικούς.

Τα φυσιολογικά δεοξυριβονουκλεοτίδια απαιτούνται για την αντιγραφή, την επιδιόρθωση και τη σύνθεση του DNA. Οποιαδήποτε ανακρίβεια σε αυτή τη διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα το μπλοκάρισμα της σύνθεσης DNA μέχρι να διορθωθεί το σφάλμα. Εάν τα κυτταρικά ένζυμα δεν είναι σε θέση να διορθώσουν το σφάλμα, παράγεται σήμα για να επέλθει απόπτωση. Αυτός ο μηχανισμός είναι ο κύριος στόχος για ανάλογα νουκλεοσιδίων. Επίσης αλληλεπιδρούν με το μεταβολισμό των φυσιολογικών νουκλεοζιτών και συνεπώς έχουν μεγάλο αριθμό ενδοκυτταρικών στόχων για να επάγουν κυταροτοξικότητα.

Συγκεκριμένα, στην καινούργια αυτή εποχή εξέλιξης των νουκλεοζιτικών φαρμάκων, χημικοί από εργαστήρια σε όλο τον κόσμο συνεργάζονται και μοιράζονται ιδέες για νέες τροποποιήσεις που μπορούν να μετατρέψουν ένα νουκλεοζίτη σε μόριο με εξαιρετικές αντικαρκινικές και αντι-ιικές ιδιότητες.

Στην παρούσα μελέτη, έχοντας ως βάση αυτά, μελετάται η αντικαρκινική και αντι-ιική δραστηριότητα νουκλεοζιτών τροποποιημένων στη βάση αλλά και στο σάκχαρο. Η επιλογή των συγκεκριμένων νουκλεοζιτών έγινε μετά από μελέτη ήδη γνωστών δραστικών νουκλεοζιτών που χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική βιομηχανία.

Abstract

Nucleoside and nucleobase antimetabolites have substantially impacted treatment of cancer and infections. Their close resemblance to natural analogs gives them the power to interfere with a variety of intracellular targets, which on one hand gives them high potency, but on the other hand incurs severe side effects, especially of the chemotherapeutics used against malignancies. Therefore, the development of novel nucleoside analogs with widened therapeutic windows represents an attractive target to synthetic organic and medicinal chemists.

Normal deoxyribonucleotides are required for DNA replication, repair and synthesis. Any inaccuracy in this process results in blockage of DNA synthesis until the error is corrected. If the cellular enzymes are unable to correct the error, a signal is generated to induce apoptosis. This mechanism is the main target for nucleoside analogs. They also interact with the metabolism of normal nucleosides and therefore have a large number of intracellular targets to induce cytotoxicity.

In particular, in this new age of nucleoside development, chemists from laboratories around the world are collaborating and sharing ideas for new modifications that can transform a nucleoside into a molecule with excellent anti-cancer and antiviral properties.

In this study, based on these, the antitumor and antiviral activity of nucleosides modified on both base and on sugar is studied. Selection of these nucleosides was made after studying already known active nucleosides used in the pharmaceutical industry.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

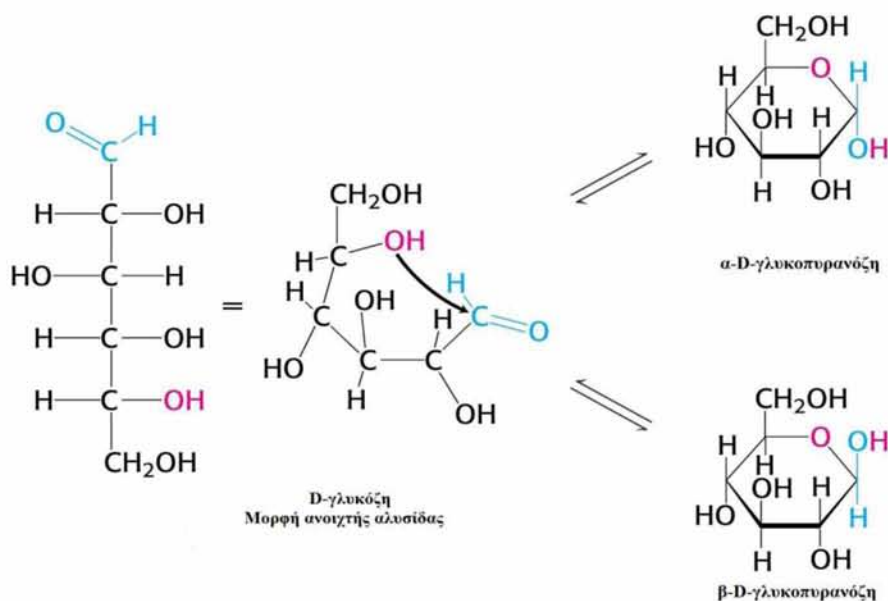
Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	3
Abstract.....	4
Περιεχόμενα.....	5
I. Εισαγωγή.....	6
i. Σάκχαρα.....	6
ii. Νουκλεοζίτες.....	7
iii. Εισαγωγή νουκλεοζιτών στην ιατρική.....	8
iv. Νουκλεοζιτικά ανάλογα.....	9
v. Ενεργοποίηση νουκλεοζιτών με φωσφορυλίωση.....	10
vi. Μηχανισμός δράσης αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών παραγώγων.....	10
vii. Τοξικότητα αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών αναλόγων.....	12
viii. Αντι-ιικά νουκλεοζιτικά παράγωγα.....	13
ix. Τροποποιημένοι Νουκλεοζίτες.....	15
x. Τοξικότητα αντι-ιικών νουκλεοζιτικών αναλόγων.....	17
xi. Ενδοκυτταρική πρόσληψη και μεταβολισμός νουκλεοζιτών.....	18
xii. Πρώτοι άκυκλοι νουκλεοζίτες ως αντι-ιικά φαρμάκα.....	19
xiii. ANPs.....	21
II. Σκοπός Μελέτης.....	23
III. Γενικές Μέθοδοι.....	25
i. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	25
ii. Χρωματογραφία στήλης.....	26
iii. Ξήρανση διαλυτών.....	27
iv. Ταυτοποίηση ενώσεων.....	28
IV. Πειραματικό μέρος.....	29
i. Σύνθεση της 1 – (5' - O – τρίτυλ – β- D – ριβοφουρανόζυλο) – 5 – ίωδοουρακίλης.....	29
ii. Σύνθεση του 1-(1-((1,3-διύδροξυπροπαν-2-υλ)οξυ)-2-υδροξυαίθυλ)-5- ίωδοουρακίλη.....	30
iii. Σύνθεση των C5 αλκύνυλο 1-(1-((1,3-διύδροξυπροπαν-2-υλ)οξυ)-2- υδροξυαίθυλ)-ουρακίλη.....	30
V. Ταυτοποίηση με ¹ H NMR.....	32
VI. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	33

Βιβλιογραφία.....36

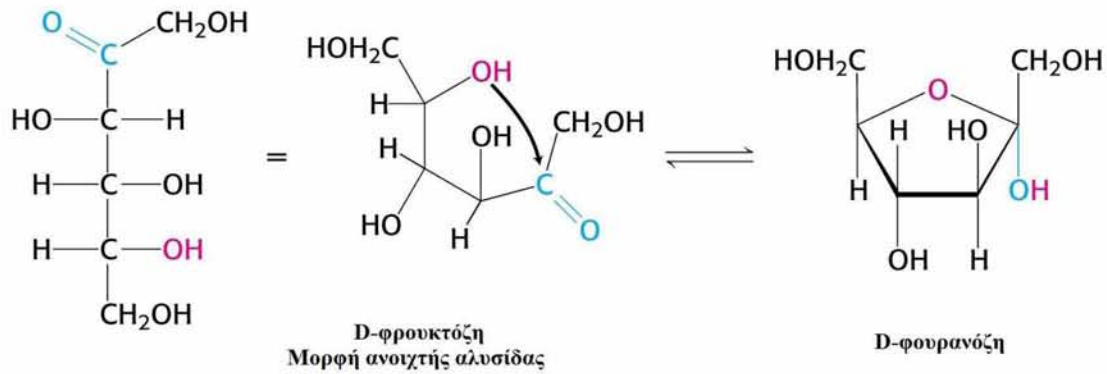
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

i. Σάκχαρα

Ένας υδατάνθρακας είναι ένα βιομόριο που αποτελείται από άτομα άνθρακα (C), υδρογόνου (H) και οξυγόνου (O), συνήθως με λόγο υδρογόνου-οξυγόνου 2:1 (όπως στο νερό). Οι υδατάνθρακες είναι τεχνικά ένυδροι άνθρακες. Από δομικής άποψης είναι πιο ακριβές να τα θεωρούμε ως αλδοζίνες και κετόζες. Ο όρος είναι πιο κοινός στη βιοχημεία, όπου είναι συνώνυμο του σακχαρίτη, μιας ομάδας που περιλαμβάνει τα σάκχαρα, το άμυλο και την κυτταρίνη. Οι σακχαρίτες χωρίζονται σε τέσσερις χημικές ομάδες: μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. Οι πολυσακχαρίτες χρησιμεύουν για την αποθήκευση ενέργειας (π.χ. άμυλο και γλυκογόνο) και ως δομικά συστατικά (π.χ. κυτταρίνη σε φυτά). Η ριβόζη, ένας μονοσακχαρίτης με πέντε άνθρακες, είναι ένα σημαντικό συστατικό των συνενζύμων (π.χ. ATP, FAD και NAD) και της ραχοκοκαλιάς του γενετικού μορίου που είναι γνωστό ως RNA. Η σχετική δεοξυριβόζη είναι ένα συστατικό του DNA. Η ριβόζη είναι μια αλδοπεντόζη (ένας μονοσακχαρίτης που περιέχει πέντε άτομα άνθρακα) που, στην ανοικτή αλυσίδα του, έχει μια λειτουργική ομάδα αλδεΐδης στο ένα άκρο. Στο συμβατικό σχήμα αρίθμησης για μονοσακχαρίτες, τα άτομα άνθρακα αριθμούνται από C1' (στην ομάδα αλδεΐδης) έως C5'. Το παράγωγο δεοξυριβόζης που βρίσκεται στο DNA διαφέρει από την ριβόζη έχοντας ένα άτομο υδρογόνου στη θέση της υδροξυλομάδας στο C2'.



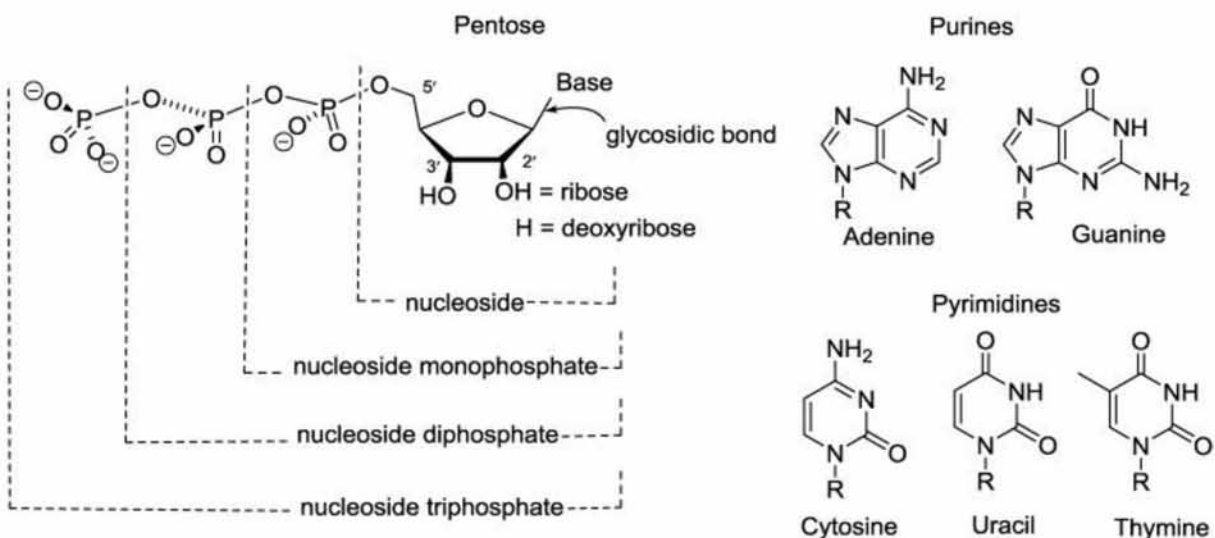
Σχήμα 1: Σχηματισμός πυρανόζης



Σχήμα 2: Σχηματισμός φουρανόζης

ii. Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες ανήκουν σε μια κατηγορία οργανικών ενώσεων με τις δομές τους να αποτελούνται από μια ετεροκυκλική νουκλεοβάση (αζωτούχος βάση), που περιέχει άζωτο, και ένα σάκχαρο με πέντε άνθρακες. Σε ένα νουκλεοζίτη, ο ανωμερικός άνθρακας συνδέεται μέσω ενός γλυκοσιδικού δεσμού με το N9 μιας πουρίνης ή το N1 μίας πυριμιδίνης. Παραδείγματα νουκλεοζιτών περιλαμβάνουν κυτιδίνη, ουριδίνη, αδενοσίνη, γουανοσίνη, θυμιδίνη και ινοσίνη. Η φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτών στην πρωτοταγή ομάδα υδροξυλίου του σακχάρου σχηματίζει νουκλεοτίδια, τα δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Δηλαδή, οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοζυλαμίνες που μπορούν να θεωρηθούν νουκλεοτίδια χωρίς φωσφορική ομάδα. Και οι νουκλεοζίτες και τα νουκλεοτίδια είναι ζωτικά συστατικά όλων των ζωντανών κυττάρων και εμπλέκονται σε διάφορες θεμελιώδεις βιολογικές διεργασίες.



Σχήμα 3: Οι δομικές συνθέσεις νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων

iii. Εισαγωγή νουκλεοζιτών στην ιατρική

Ανακαλύψεις που έγιναν στον κλάδο των νουκλεοζιτών πουρίνης και πυριμιδίνης και της χημείας των νουκλεοτιδίων έχουν συμβάλει ουσιαστικά στην καλύτερη κατανόηση των βιολογικών διεργασιών σε μοριακά επίπεδα. Διαπιστώθηκε ότι η πλειονότητα των νουκλεοζιτικών αναλόγων που εμφανίζουν αντι-ιικές και/ή αντικαρκινικές δράσεις δεν είναι δραστικά ως έχουν, αλλά αποκτούν δραστηριότητα αφού μετασχηματιστούν σε νουκλεοτίδια με ενδοκυτταρικά ένζυμα. Στην περίπτωση αντι-ιικών παραγόντων, οι 5'-τριφωσφορικοί νουκλεοζίτες είναι συχνά αναστολείς ιικών DNA ή RNA πολυμερασών. Σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί με ιό, το πρώτο κρίσιμο στάδιο της ενεργοποίησης των αντιϊκών νουκλεοζιτών περιλαμβάνει 5'-μονοφωσφορυλίωση καταλυόμενη από κινάσες που κωδικοποιούνται από ιούς. Η τελική μορφή είναι η τριφωσφορυλιωμένη η οποία είναι και η δραστική μορφή. Σε μερικές περιπτώσεις, οι πολυμεράσες εισάγουν ένα ανάλογο του φυσικού υποστρώματος στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη της αλυσίδας ή παράγουν ένα λειτουργικά ανίκανο βιοπολυμερές. Χορηγούνται ως νουκλεοζίτες επειδή τα φορτισμένα νουκλεοτίδια δεν μπορούν εύκολα να διασχίσουν κυτταρικές μεμβράνες.

iv. Νουκλεοζιτικά ανάλογα

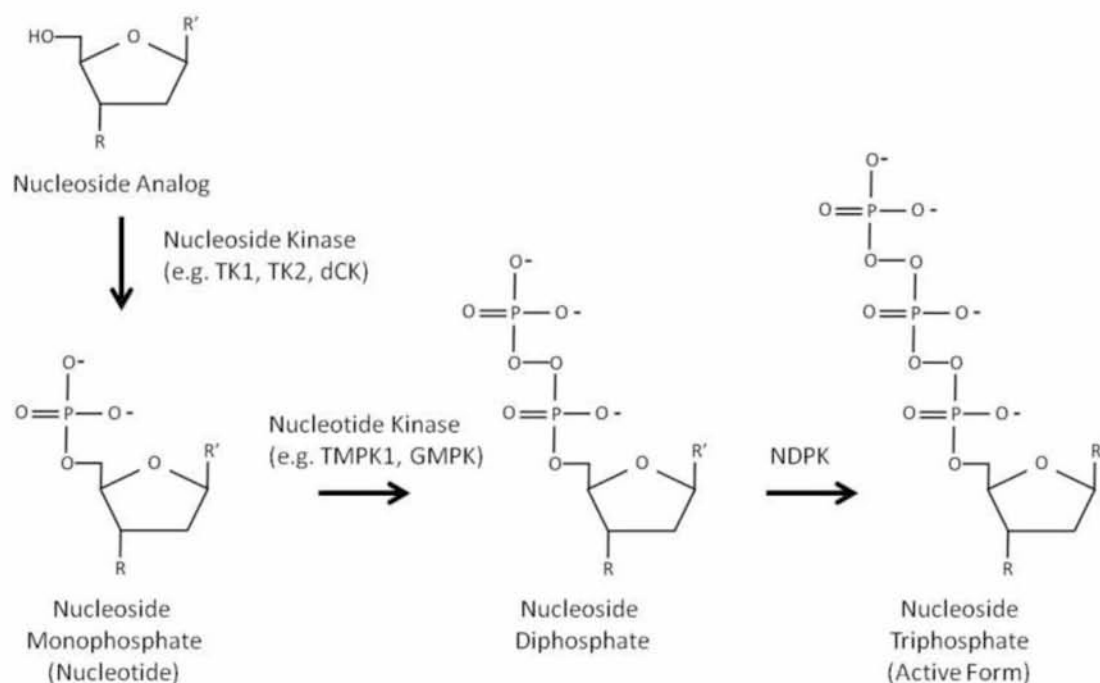
Η ανακάλυψη του σημαντικού ρόλου των νουκλεοζιτών ως τα βασικά δομικά συστατικά του DNA και RNA, ώθησε τους ερευνητές στη διεξαγωγή συστηματικών μελετών όσον αφορά τη χημική συμπεριφορά και βιολογική δράση των εν λόγω ενώσεων. Οι φυσικοί νουκλεοζίτες μπορούν να τροποποιηθούν τόσο στο τμήμα του σακχάρου όσο και στο τμήμα της βάσης, παράγοντας πληθώρα αναλόγων, τα οποία επέδειξαν σημαντική αντικαρκινική, αντιϊκή, αντιβακτηριδιακή και αντιοξειδωτική δράση.

Οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες δρουν ως αντιμεταβολίτες, δηλαδή ανταγωνίζονται τους φυσικούς και αλληλεπιδρούν με ενδοκυττάρους στόχους, προκαλώντας την αντιϊκή ή αντικαρκινική τους δράση. Ένας μεγάλος αριθμός χημικά τροποποιημένων νουκλεοζιτών, έχει χρησιμοποιηθεί, τα τελευταία χρόνια, στην θεραπευτική αντιμετώπιση τόσο καρκινικών όγκων, όσο και ιικών μολύνσεων. Είναι χαρακτηριστικό ότι τα τελευταία χρόνια έχουν εγκριθεί από τη Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) αρκετά φάρμακα που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο, αποδεικνύοντας την ισχυρή δυναμική της συγκεκριμένης κατηγορίας ενώσεων, όσον αφορά την κλινική χρήση τους. Σύγχρονες έρευνες έχουν ρίξει φως στους πιθανούς μηχανισμούς της βιολογικής τους δράσης προσφέροντας σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά τους μεταβολικούς μετασχηματισμούς στους οποίους υπόκεινται καθώς και στους μηχανισμούς μεταβολικής απενεργοποίηση τους.

v. Ενεργοποίηση νουκλεοζιτών με φωσφορυλίωση

Τα ανάλογα νουκλεοζιτών πιστεύεται ότι φωσφορυλιώνονται με τα ίδια ένζυμα με τα φυσικά νουκλεοτίδια. Για παράδειγμα, η κινάση θυμιδίνης (TK) και θυμιδυλική κινάση καταλύουν το πρώτο και δεύτερο βήμα στη φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων

Εισάγονται στο κύτταρο ως νουκλεοζίτες, αυτοί φωσφορυλιώνονται στην ενεργή τους μορφή του τριφωσφορικού παραγώγου με κυτταρικές κινάσες από τον ξενιστή. Το τελευταίο στάδιο αυτής της σειράς φωσφορυλιώσεων εκτελείται από την κινάση νουκλεοζιτική διφωσφορική (NDPK), ένα ένζυμο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιήσει αμφότερα την πουρίνη ή την πυριμιδίνη και τα οξυ- ή δεοξυνουκλεοτίδια ως υποστρώματα.

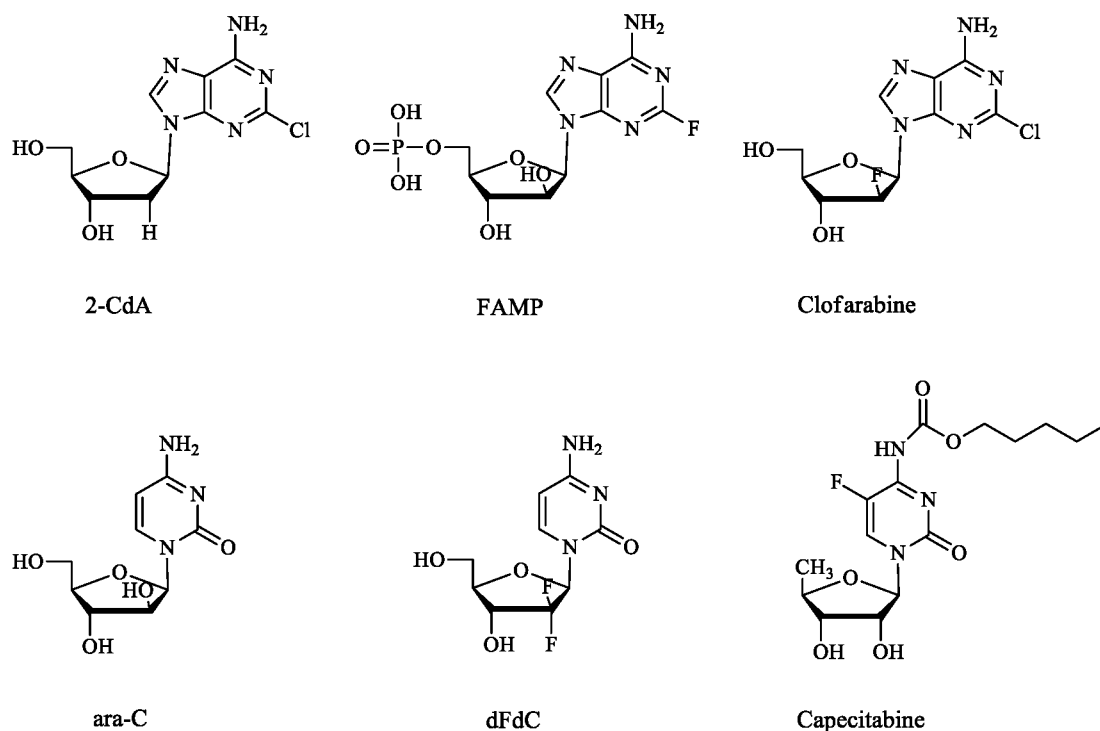


Σχήμα 4: Στάδια φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων

vi. Μηχανισμός δράσης αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών παραγώγων

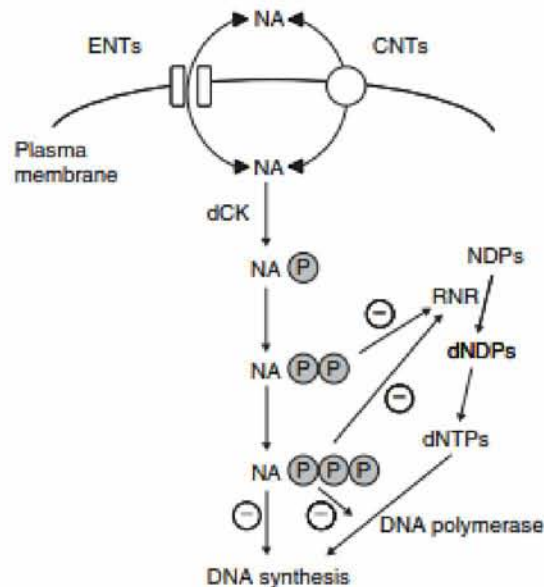
Τα ανάλογα νουκλεοζιτών τα οποία εμφανίζουν αντιμεταβολική δραστηριότητα σε κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη θεραπεία διαφόρων όγκων. Νουκλεοζίτες όπως η 1-βήτα-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC), η 6-μερκαπτοπουρίνη, η φλουδαραβίνη και η κλαντριβίνη παίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία των λευχαιμιών, ενώ η γεμισταβίνη, η 5-φθοροουρακίλη και τα προφάρμακα της χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία πολλών τύπων συμπαγών όγκων. Όλες αυτές οι ενώσεις μεταβολίζονται όμοια

με ενδογενείς νουκλεοζίτες και νουκλεοτιδία. Οι δραστικοί μεταβολίτες αλληλεπιδρούν με την de νονο σύνθεση νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων ή αναστέλλουν την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA αφού ενσωματωθούν στον κλώνο DNA ως τερματιστές. Επιπλέον, οι αντιμεταβολίτες νουκλεοζιτών που ενσωματώνονται στον κλώνο του DNA προκαλούν θραύσεις των κλώνων και τελικά προκαλούν απόπτωση.



Σχήμα 5: Παραδείγματα αντικαρκινικών φαρμάκων

Τα αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα μεταφέρονται διαμέσου της μεμβράνης του πλάσματος με μεταφορείς νουκλεοσιδίων ENTs και / ή CNTs. Τα NA φωσφορυλιώνονται με νουκλεοσιδικές κινάσες, όπως dCK, κινάση μονοφωσφορικού νουκλεοσιδίου και κινάση διφωσφορικού νουκλεοζίτη σε δραστικά 5'-τριφωσφορικά παράγωγα. Τα δραστικά 5'-τριφωσφορικά παράγωγα των NA ενσωματώνονται στο DNA, οδηγώντας σε τερματισμό της σύνθεσης αλυσίδας DNA και κυτταρικό θάνατο. Επιπροσθέτως, τα φωσφορικά παράγωγα ορισμένων αναλόγων νουκλεοζιτών μπορούν να αποκλείσουν την αντιγραφή του DNA αναστέλλοντας την DNA πολυμεράση ή αναστέλλοντας το RNR (ριβονουκλεοτιδική ρεδοκτάση) που με τη σειρά του μειώνει τη μετατροπή των NDPs σε dNDPs και dNTPs. Η μείωση της συγκέντρωσης dNTP μειώνει τη σύνθεση του DNA και ευνοεί την ενσωμάτωση δραστικών 5'-τριφωσφορικών παραγώγων των NA στο DNA.



Σχήμα 6: Μηχανισμός δράσης

Οι αντιμεταβολίτες νουκλεοζιτών στοχεύουν ένα ή περισσότερα συγκεκριμένα ένζυμα. Ο τρόπος ανασταλτικής δράσης στο ένζυμο στόχο δεν είναι πάντα παρόμοιος ακόμη και μεταξύ των αντιμεταβολιτών νουκλεοζιτών που έχουν την ίδια νουκλεοσιδική βάση, όπως araC και γεμισιταβίνη. Παρόλο που και οι δύο νουκλεοζίτες φωσφορυλιώνονται με κινάση δεοξυκυτιδίνης και είναι επίσης καλά υποστρώματα της κυταδίνης δεαμινάσης, μόνο η γεμισιταβίνη δείχνει αντικαρκινική δραστηριότητα έναντι συμπαγών όγκων. Αυτό υποδηλώνει ότι οι διαφορές στη φαρμακολογική δραστηριότητα αυτών των αντιμεταβολιτών νουκλεοζιτών μπορεί να αντικατοπτρίζουν διαφορετικούς τρόπους δράσης επί των μορίων στόχων.

vii. Τοξικότητα αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών αναλόγων

Τα αντικαρκινικά ανάλογα νουκλεοζιτών παρουσιάζουν τοξικότητες που μοιράζονται με σχετικές ενώσεις και εκείνες που είναι μοναδικές. Όπως και με τα αντίικά ανάλογα νουκλεοζιτών, η τοξικότητα αυτών των αναλόγων είναι πολυπαραγοντική με την πρόσληψη μεταφορέα να συμβάλλει στην κυτταρική τοξικότητα. Αυτές οι ενώσεις έχουν σχεδιαστεί για να αναστέλλουν την κυτταρική αντιγραφή των καρκινικών κυττάρων και να προάγουν τον κυτταρικό θάνατο. Οι τοξικότητες που προκύπτουν από αυτές τις ενώσεις οφείλονται στην ανεπιθύμητη αναστολή κυττάρων-ξενιστών θηλαστικών που απαιτούν αναδιπλασιασμό για να διατηρηθεί η σωστή ομοιόσταση. Αν και όλα τα ταχέως αναδιπλασιαζόμενα κύτταρα θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως στόχοι, μία σημαντική ομάδα περιλαμβάνει αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα και τα πολυδύναμα κύτταρα που

προέρχονται από αυτά. Η προκύπτουσα τοξικότητα οδηγεί σε μείωση των γραμμών των κυττάρων του αίματος από την καταστολή του μυελού των οστών, ένα αποτέλεσμα που ευτυχώς είναι αναστρέψιμο μετά από διακοπή της αντικαρκινικής θεραπείας.

Nucleoside Analog	Abbreviation	Analogous to:	Used to Treat:	Toxicity
Gemcitabine	dFdC	Cytidine	ovarian cancer, breast cancer, pancreatic cancer, non-small cell lung cancer	Anemia, neutropenia, thrombocytopenia, pulmonary toxicity, hepatic impairment, renal impairment
Cytarabine	ARA-C	Cytidine	acute nonlymphocytic leukemia, acute lymphocytic leukemia	Anemia, neutropenia, thrombocytopenia, renal impairment, stomatitis, peripheral neuropathy
Clofarabine	Cl-F-ARA-A	Adenosine	acute lymphoblastic leukemia	Anemia, neutropenia, thrombocytopenia, hepatic impairment, renal failure, systemic inflammatory response syndrome
Cladribine	CdA	Adenosine	Hairy cell leukemia	Anemia, neutropenia, thrombocytopenia, peripheral neuropathy, renal failure
Fludarabine	F-ARA-A	Adenosine	chronic B-cell lymphocytic leukemia	Anemia, neutropenia, thrombocytopenia, pulmonary toxicity, autoimmune reaction, neurological toxicity

Σχήμα 7: Πίνακας γνωστών αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών αναλόγων, χρήσεις τους σε θεραπείες και τοξικότητες που προκαλούν

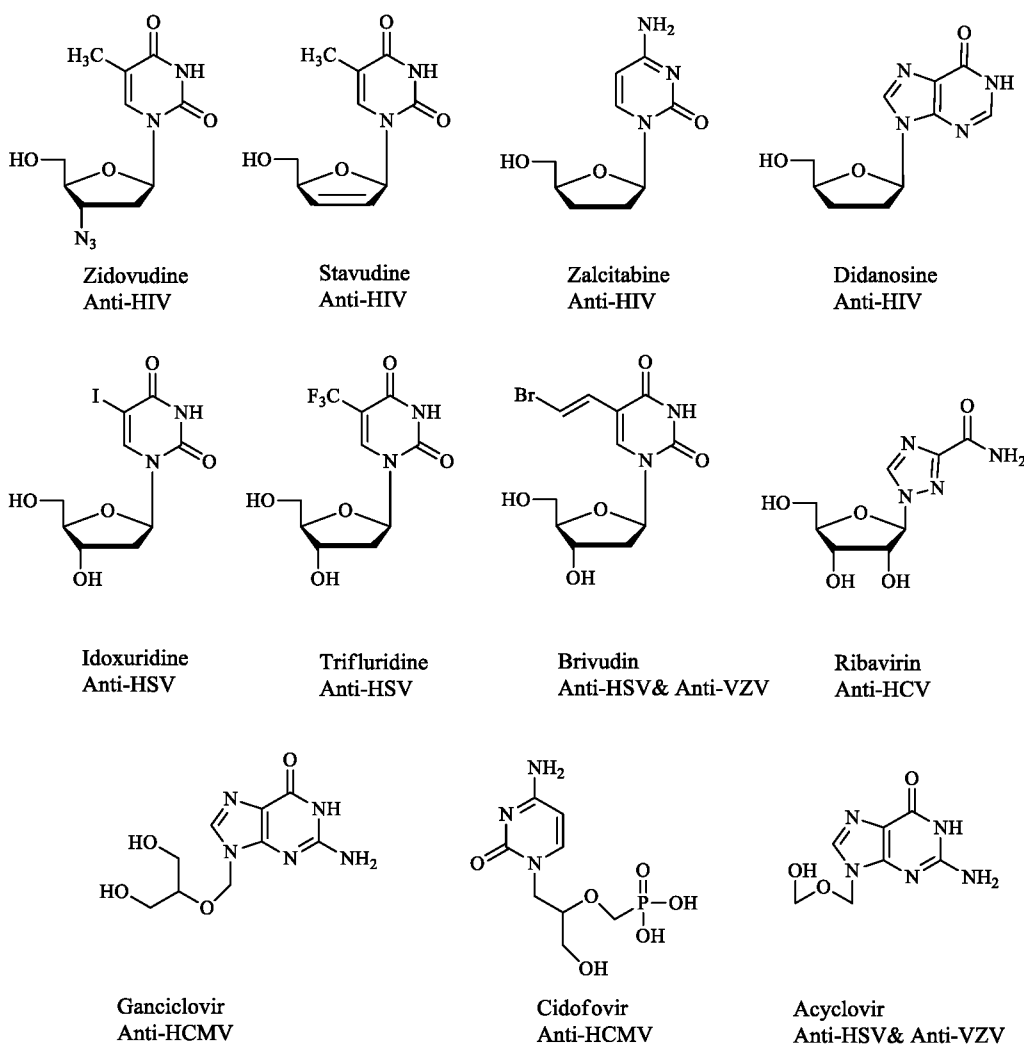
Η τοξικότητα των αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών αναλόγων απαιτεί πρόσληψη στο κύτταρο και αναστολή της κυτταρικής αντιγραφής με αναστολή της αντιγραφής του πυρηνικού DNA. Η κυτταρική πρόσληψη διαμεσολαβείται κυρίως από ENT και CNT. Η πρόσληψη στο πυρηνικό διαμέρισμα δεν φαίνεται να προκαλείται από μεταφορείς νουκλεοζιτών καθώς δεν παρατηρείται μεταβολή συγκέντρωσης σε όλη την πορώδη πυρηνική μεμβράνη. Δεδομένου ότι όλα τα αντιγραφόμενα κύτταρα χρησιμοποιούν παρόμοιους μηχανισμούς αναδιπλασιασμού DNA, η τοξικότητα των αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών αναλόγων εξαρτάται από τη στόχευση των αντιγραφόμενων κυττάρων και την έκφραση των μεταφορέων νουκλεοζιτών που μεσολαβούν στην πρόσληψη του αναλόγου νουκλεοζίτη.

viii. Αντι-ιικά νουκλεοζιτικά παράγωγα

Όπως αναφέρεται παραπάνω, ιδανικά, τα νουκλεοζιτικά παράγωγα μιμούνται τη δομή ενός φυσικού νουκλεοζίτη έτσι ώστε να αναγνωρίζονται από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, εντούτοις λόγω τροποποιήσεων στη δομή τους, οδηγούν σε διάσπαση ή/και τερματισμό αντιγραφής ή άλλες βιολογικές διεργασίες. Δεδομένου ότι η αναγνώριση ενζύμων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων του σχήματος και των δεσμών υδρογόνου, είναι δυνατόν να σχεδιαστεί ένα ανάλογο που μπορεί να έχει δραστηριότητα

έναντι συγκεκριμένου βιολογικού στόχου, ιδιαίτερα εάν ο μηχανισμός δράσης είναι γνωστός και πληροφορίες σχετικά με τη θέση πρόσδεσης είναι διαθέσιμες.

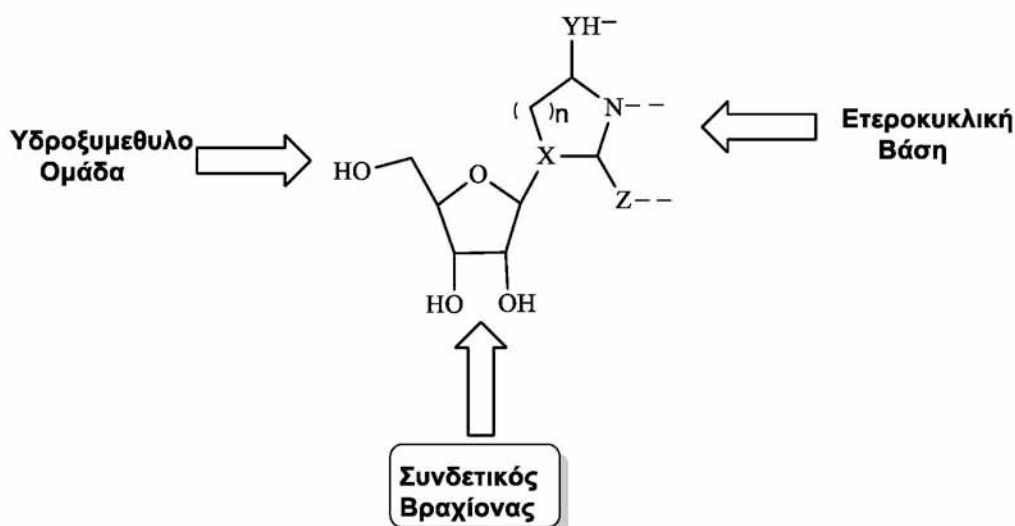
Όταν εξετάζονται ενδεχόμενες τροποποιήσεις στο σκελετό του νουκλεοζίτη, μπορεί να εξεταστούν διάφορες διαφορετικές θέσεις: το τμήμα σακχάρου, η αρωματική ετεροκυκλική βάση, ο γλυκοσιδικός δεσμός που συνδέει το σάκχαρο με την ετεροκυκλική βάση ή/και την φωσφορική ομάδα του νουκλεοτιδίου. Τροποποιήσεις μπορούν να γίνουν με απλή προσθήκη ενός υποκαταστάτη ή ομάδας στην ετεροκυκλική βάση ή σάκχαρο, αντικαθιστώντας ένα άτομο σε οποιαδήποτε ομάδα, μετακινώντας ένα άτομο σε διαφορετική θέση ή συνδυασμός αυτών των προσεγγίσεων. Παρόμοιες τροποποιήσεις μπορούν επίσης να γίνουν στις φωσφορικές ομάδες σε ανάλογα νουκλεοτιδίων. Ακόμη και η θέση του γλυκοσιδικού δεσμού μπορεί να μετατοπιστεί, για παράδειγμα, σε άλλο άνθρακα, ωστόσο, η τελευταία είναι παραδοσιακά λιγότερο συνηθισμένη τροποποίηση. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν επίσης να γίνουν σε συνδυασμό, επιτρέποντας έτσι μια μεγάλη ποικιλία στη δομή και λειτουργία των νουκλεοζιτών.



Σχήμα 8: Παραδείγματα αντι-ιικών νουκλεοζιτικών παραγώγων

ix. Τροποποιημένοι Νουκλεοζίτες

Οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες έχουν αναγνωρισθεί ως σημαντικό εργαλείο για την θεραπεία διάφορων ασθενειών. Ως εκ τούτου είναι διαρκής η προσπάθεια ανάπτυξης νέων αναλόγων, με τροποποίηση τόσο στο τμήμα του σακχάρου όσο και στο τμήμα της βάσης, για την βελτίωση των αντιικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων τους. Η ετεροκυκλική βάση αναγνωρίζεται από τα ένζυμα και προστίθεται στο συμπληρωματικό κλώνο κατά τη σύνθεση του DNA. Το τμήμα του σακχάρου λειτουργεί σαν συνδετικός βραχίονας μεταξύ της νουκλεοβάσης και μιας υδροξυμέθυλο ομάδας η οποία αναγνωρίζεται από τις κυτταρικές κινάσες που ενεργοποιούν τον νουκλεοζίτη (φωσφορυλίωση). Η βιολογική δράση των νουκλεοζιτών, όπως προκύπτει από τα παραπάνω, καθορίζεται τόσο από την φύση του συνδετικού βραχίονα (σάκχαρο), όσο και από την φύση της ετεροκυκλικής βάσης.

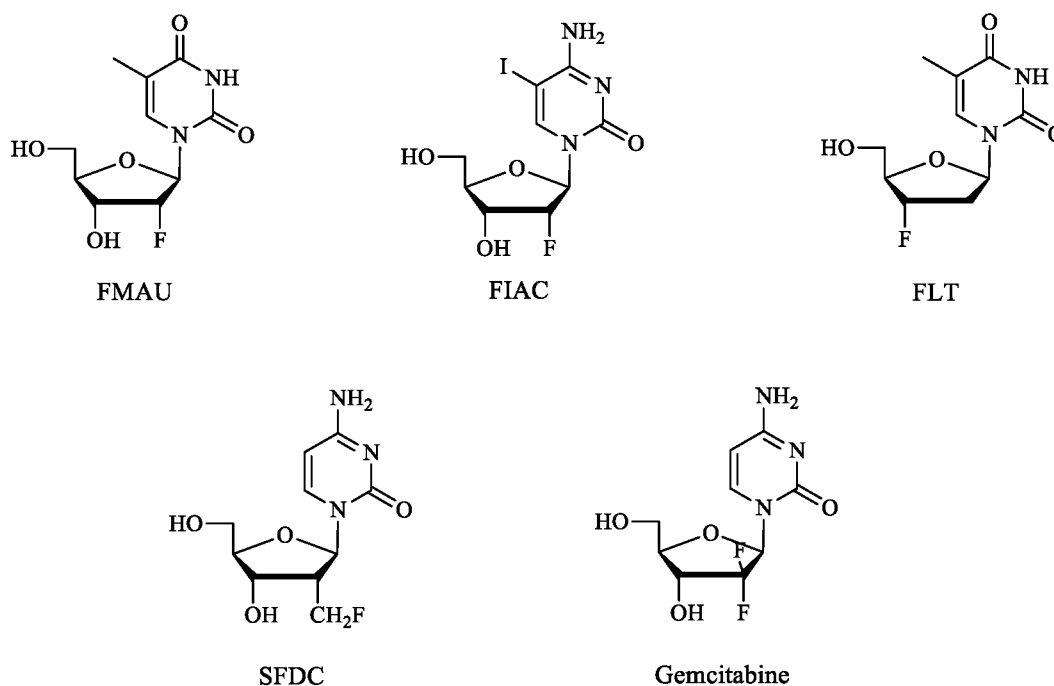


Σχήμα 9: Βασική δομή Νουκλεοζιτών

Οι τροποποιήσεις, στο τμήμα του σακχάρου περιλαμβάνουν, αντιστροφή στη διαμόρφωση των υδροξυλομάδων, υποκαταστάσεις (υδροξυλομάδας) με διάφορες φαρμακοφόρες ομάδες, αποσπάσεις οδηγώντας σε δέοξυ ή διδέοξυ ανάλογα και σε άνοιγμα του δακτυλίου δίνοντας άκυκλους νουκλεοζίτες, με στόχο την αναγνωρισή τους από την DNA πολυμεράση και την ενσωμάτωσή τους στην νουκλεοτιδική αλυσίδα. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι και οι C5-υποκατεστημένες πυριμιδίνες αποτελούν εξαιρετικό υπόστρωμα για την DNA πολυμεράση με αποτέλεσμα, το ερευνητικό ενδιαφέρον να στραφεί και προς την σύνθεση νουκλεοζιτών με τροποποίηση στην ετεροκυκλική βάση.

1. Τροποποιήσεις στο σάκχαρο

Ορισμένα από τα πρώτα παραδείγματα αναλόγων νουκλεοζιτών παρουσίαζαν τροποποιήσεις στο σάκχαρο. Αυτά τα ανάλογα αύξησαν σημαντικά τις γνώσεις μας για τις φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις νουκλεοζιτών, αλλά και τον τρόπο με τον οποίο αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούσαν να αξιοποιηθούν για ιατρικούς σκοπούς. Αυτές οι τροποποιήσεις περιλαμβάνουν την προσθήκη ή την αφαίρεση υποκαταστατών στο δακτύλιο φουρανόζης, την αλλαγή του μεγέθους του δακτυλίου ή ακόμη και την αφαίρεση του οξυγόνου της φουρανόζης για να δημιουργηθεί μια εντελώς νέα κατηγορία νουκλεοζιτών.

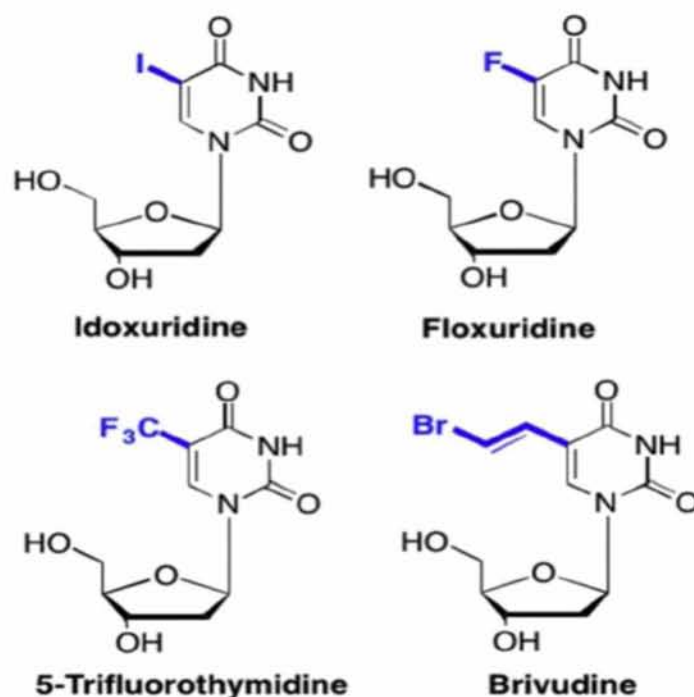


Σχήμα 10: Παραδείγματα χαρακτηριστικών τροποποιήσεων στο σάκχαρο νουκλεοζιτών

2. Τροποποιήσεις στον δακτύλιο πυριμιδίνης

Αν και μπορούν να γίνουν διάφορες τροποποιήσεις στον δακτύλιο πυριμιδίνης, μία από τις συνηθέστερες πρώιμες τροποποιήσεις στον σχεδιασμό νουκλεοζιτικών φαρμάκων περιλαμβάνει την προσθήκη υποκαταστατών στη θέση C5 του δακτυλίου πυριμιδίνης. Αυτή η τροποποίηση μπορεί δυνητικά να μεταβάλλει το ηλεκτρονιακό περιβάλλον και ακόμη και τις αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου μεταξύ της θέσης σύνδεσης ενζύμου και του νουκλεοζιτικού αναλόγου. Ένας πρώιμος νουκλεοζίτης που χρησιμοποιήθηκε αυτή την τροποποίηση ήταν η Ιδοξουριδίνη, ένα ανάλογο 2'-δεοξουριδίνης με ένα ιώδιο στη θέση C5 στον δακτύλιο ουριδίνης. Η Ιδοξουριδίνη ήταν ένα από τα πρώτα παραδείγματα ενός αναλόγου πυριμιδίνης και αρχικά αναπτύχθηκε ως

αντικαρκινικός παράγοντας, ωστόσο, μετέπειτα μελέτες αργότερα κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η θεραπεία με Ιδοξουριδίνη συσχετίστηκε επίσης με βαθιά αντι-ιική δραστηριότητα, κυρίως έναντι ιών DNA όπως ο HSV. Άλλα αξιοσημείωτα τροποποιημένα ανάλογα C5 που αναπτύχθηκαν νωρίς περιελάμβαναν 5-τριφθοροθυμιδίνη (Trifluridine), η οποία χρησιμοποιήθηκε κυρίως για μολύνσεις από έρπητα του οφθαλμού και 5-βρωμοβινυλ δεοξουριδίνη (Brivudine), η οποία χρησιμοποιήθηκε για την αγωγή του έρπητα ζωστήρα.



Σχήμα 11: Παραδείγματα χαρακτηριστικών ετεροκυκλικών τροποποιήσεων στην 5-θέση της χαρακτηριστικής ομάδας πυριμιδίνης.

χ. Τοξικότητα αντι-ιικών νουκλεοζιτικών αναλόγων

Τα αντιικά νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν τόσο μοναδική όσο και κοινή χαρακτηριστική τοξικότητα. Οι παρατηρούμενες τοξικότητες πιθανώς αντανάκλουν τη δραστηριότητα ενός συνδυασμού παραγόντων περιλαμβανομένων των μεταφορέων που χρησιμοποιούνται για την είσοδο στα κύτταρα, του μεταβολισμού της ένωσης στην ενεργό της μορφή, της εξειδίκευσης της ένωσης για τον επιθυμητό στόχο και της κάθαρσης της ένωσης μετά από βιολογική απενεργοποίηση. Ο συνδυασμός αυτών των επιδράσεων μπορεί να προάγει τη δυσλειτουργία των κυττάρων και των ιστών που είναι χαρακτηριστική μιας οικογένειας ενώσεων. Για τις αντιιικές ενώσεις, ένα αναγνωρισμένο τοξικό αποτέλεσμα προκαλείται από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που σχετίζεται με την αναστολή της μιτοχονδριακής πολυμεράσης, ρο1 γ. Η αναστολή της αντιγραφής του mtDNA οδηγεί σε μείωση της παραγωγής ενέργειας και

επακόλουθη αύξηση των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και δυσλειτουργία των ιστών.

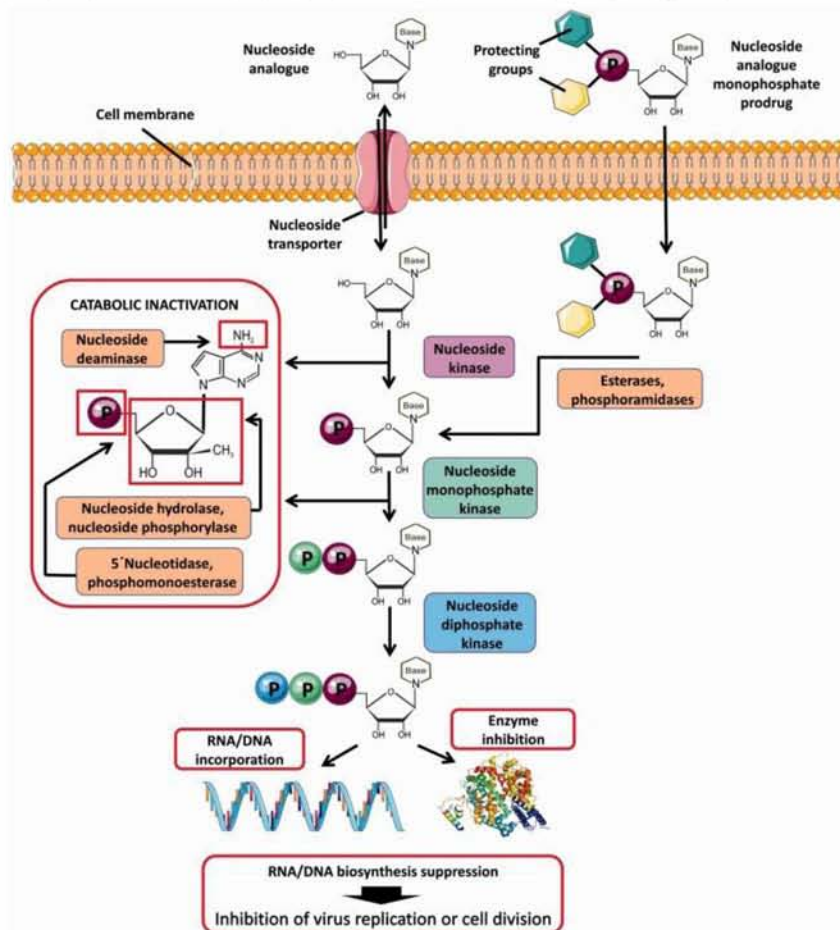
Όπως συμβαίνει με ολόκληρη την τάξη τέτοιων ενώσεων, η τοξικότητα των αντιικών εξαρτάται από την είσοδο του αναλόγου νουκλεοζίτη στο κύτταρο και την πρόσληψή του στο μιτοχονδριακό διαμέρισμα. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αντιϊκά ανάλογα νουκλεοσιδίου μπορούν να μεταφερθούν διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης μέσω πρόσληψης από ENTs, CNTs, OCTs και OATs. Αυτό επιτρέπει στην ένωση να αποκτήσει πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα του κυτάρου. Ο μηχανισμός με τον οποίο τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μεταφέρονται στο μιτοχονδριακό διαμέρισμα εξακολουθεί να συζητείται. Η έρευνα αρχικά πρότεινε ότι ο φορέας δεοξυνουκλεοσιδίου (DNC) μεταφέρει αντιρετροϊκές ενώσεις κατά μήκος της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτό το εύρημα αμφισβητήθηκε όταν η DNC αποδείχθηκε ότι δεν συνέβαλε στην εξάντληση του mtDNA που προκλήθηκε από τους NRTIs. Ενώ ο μηχανισμός πρόσληψης νουκλεοζιτικών αναλόγων στα μιτοχόνδρια δεν είναι οριστικός, η παρουσία των ENT και των CNT στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη δείχνει μία πιθανή οδό αναλογικής πρόσβασης στο μιτοχονδριακό διαμέρισμα.

xi. Ενδοκυτταρική πρόσληψη και μεταβολισμός νουκλεοζιτών

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα εισέρχονται στα κύτταρα μέσω ειδικών διαμεμβρανικών μεταφορέων νουκλεοζιτών. Μέσα στο κύτταρο, οι ενώσεις φωσφορυλιώνονται από κυτταρικές νουκλεοζιτικές κινάσες με αποτέλεσμα το σχηματισμό μονο-, δι- και τριφωσφορικών νουκλεοζιτών. Η πρώτη φωσφορυλίωση είναι το στάδιο περιορισμού της ταχύτητας της μετατροπής τριφωσφορικού άλατος, το οποίο μπορεί να ξεπεραστεί με την προσέγγιση του μονοφωσφορικού προφαρμάκου που βασίζεται στην εισαγωγή μιας φωσφορυλιωμένης ομάδας στη θέση 5' του νουκλεοζίτη. Η φωσφορυλιωμένη ομάδα περιλαμβάνει τμήματα προστασίας για να αυξήσει την υδροφοβικότητα και να διευκολύνει την κυτταρική πρόσληψη του προφαρμάκου.

Τα μονοφωσφορικά προφάρμακα εισάγονται στα κύτταρα ανεξάρτητα από τους μεταφορείς μεμβράνης και οι προστατευτικές ομάδες απομακρύνονται με ενδοκυτταρικές εστεράσες ή φωσφοραμιδάσες μετά από την εισαγωγή στα κύτταρα. Τα τριφωσφορικά άλατα των νουκλεοζιτικών ειδών αντιπροσωπεύουν τις δραστικές μορφές των νουκλεοζιτικών αναλόγων που δρουν αναστέλλοντας κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, όπως DNA/RNA πολυμεράσες. Κατά την αντιγραφή DNA/RNA, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα ενσωματώνονται σε λανθάνοντες DNA ή RNA αλυσίδες με αποτέλεσμα τον τερματισμό της σύνθεσης νουκλεϊκού οξέος ή τη συσσώρευση μεταλλάξεων σε ιικά γονιδιώματα για την καταστολή της ιικής αντιγραφής λόγω καταστροφής μέσω σφαλμάτων. Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι

συγκεντρώσεις των ενδοκυτταρικών νουκλεοζιτών διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα λόγω των καταβολικών οδών νουκλεοζιτών/νουκλεοτιδίων, όπως η απαμίνωση (οξειδωση) της ετεροκυκλικής βάσης, η υδρόλυση ή η φωσφορόλυση της ετεροκυκλικής βάσης και η υδρόλυση των δεσμών φωσφομονοεστέρα. Αυτές οι καταβολικές αντιδράσεις επίσης αφορούν τα περισσότερα ανάλογα νουκλεοζιτών που περιέχουν τον φυσικό N-γλυκοσιδικό δεσμό και / ή τις αποικοδομήσιμες λειτουργικές ομάδες της ετεροκυκλικής βάσης.

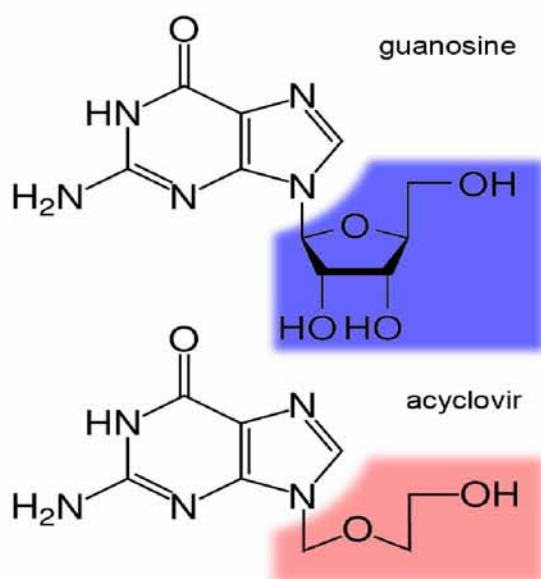


Σχήμα 12: Ενδοκυτταρική πρόσληψη και μεταβολισμός των νουκλεοζιτικών αναλόγων και των προφαρμάκων τους.

χii. Πρώτοι άκυκλοι νουκλεοζίτες ως αντι-ιικά φαρμάκα

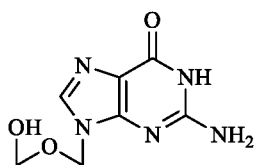
Μία σειρά πειραμάτων που είχε ως σκοπό τον έλεγχο αντι-ιικών φαρμάκων ξεκίνησε στο Burroughs Wellcome στη δεκαετία του 1960 και είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη της Ακυκλοβίρης (Acyclovir, ACV) [9- (2-υδροξυεθοξυμέθυλ) γουανίνη] το 1974, ενός αναλόγου της γουανοσίνης. Η προκλινική έρευνα έφερε το φάρμακο σε κλινικές δοκιμές το 1977 και η πρώτη μορφή του φαρμάκου (τοπική) ήταν διαθέσιμη για τους γιατρούς το 1982. Η δραστηριότητα της Ακυκλοβίρης είναι μεγαλύτερη κατά του έρπητα 1 και του έρπητα 2, λιγότερο δραστήρια έναντι του έρπητα ζωστήρα (VZV), ακόμη λιγότερο

κατά του ιού Epstein-Barr (προκαλεί λοιμώδη μονοπυρήνωση) και πολύ λίγο κατά του κυτταρομεγαλοϊού (HCMV). Η Ακυκλοβίρη μετατρέπεται σε αντι-ϊικό παράγοντα μόνο αφού φωσφορυλιωθεί σε μολυσμένα κύτταρα από μια επαγόμενη από τον ιό κινάση θυμιδίνης. Η μονοφωσφορυλιωμένη Ακυκλοβίρη φωσφορυλιώνεται σε διφωσφορικές και τριφωσφορικές μορφές με κυτταρικά ένζυμα στο μολυσμένο κύτταρο ξενιστή όπου το φάρμακο συγκεντρώνεται. Η τριφωσφορική Ακυκλοβίρη απενεργοποιεί την ιογενή πολυμεράση δεοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (DNA polymerase). Η ενσωμάτωση της Ακυκλοβίρης στην αναπτυσσόμενη ιική αλυσίδα δεοξυριβονουκλεϊνικού οξέος προκαλεί τον τερματισμό της αλυσίδας.

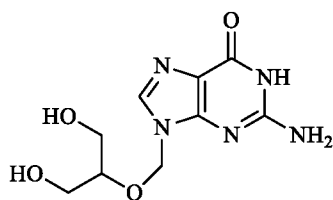


Σχήμα 13: Σύγκριση δομών γουανοσίνης και ακυκλοβίρης

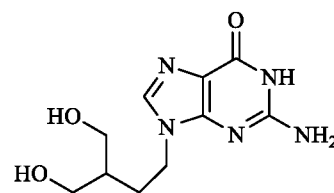
Παρόλο που η δραστηριότητα της Ακυκλοβίρης κατά του έρπητα 1 και 2 είναι αρκετά αποτελεσματική χωρίς να προκαλεί ιδιαίτερη κυτταροτοξικότητα, το γεγονός ότι δεν είναι αρκετά αποτελεσματική εναντίων του έρπητα ζωστήρα και του κυτταρομεγαλοϊού οδήγησε στην ανακάλυψη δύο άλλων μορίων για την αντιμετώπιση αυτών των ιών. Το πρώτο είναι η Γκανσικλοβίρη (Ganciclovir) η οποία προέκυψε από την πρόσθεση μίας υδροξυμέθυλο ομάδας στην Ακυκλοβίρη και όπως αποδείχθηκε μέσω προκλινικών πειραμάτων είναι ιδιαίτερα δραστική έναντι του κυτταρομεγαλοϊού (HCMV). Το δεύτερο μόριο δημιουργήθηκε με την αντικατάσταση του αιθερικού οξυγόνου με μία μέθυλο ομάδα στο άκυκλο τμήμα της Γκανσικλοβίρης, ονομάστηκε Πενσικλοβίρη (Penciclovir) και δρα αποτελεσματικά εναντίων του έρπητα ζωστήρα (VZV).



Acyclovir
Anti-HSV& Anti-VZV



Ganciclovir
Anti-HCMV



Penciclovir
Anti-VZV

Σχήμα 14: Δομές χαρακτηριστικών αντι-ιικών φαρμάκων (Ακυκλοβίρη, Γκανσικλοβίρη και Πενσικλοβίρη)

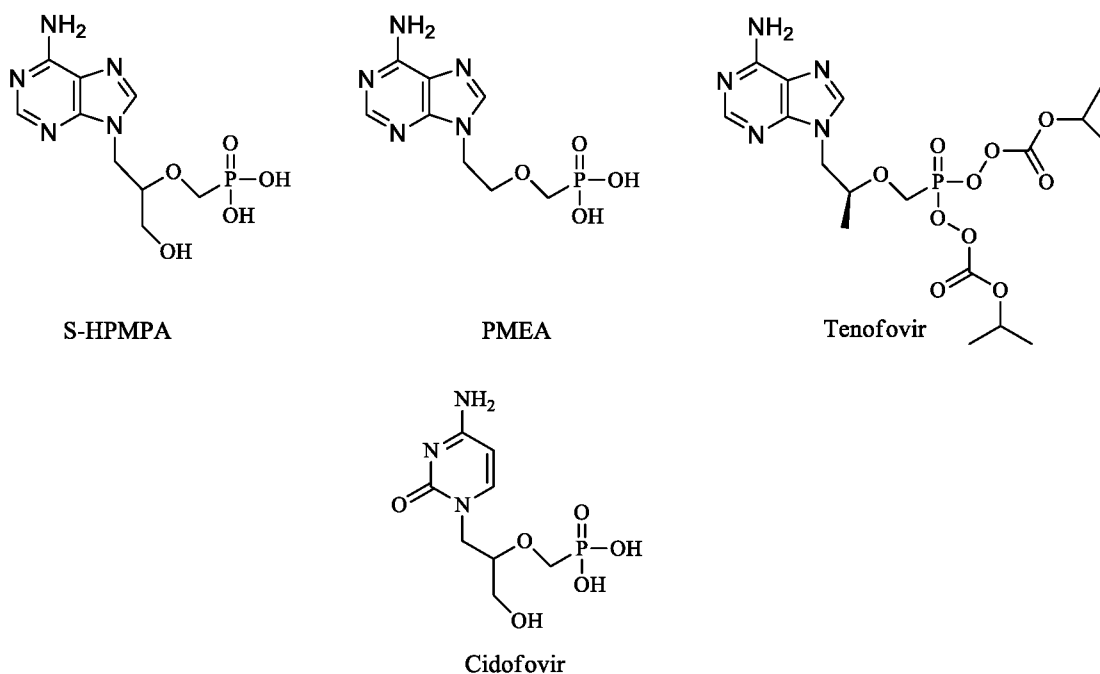
xiii. ANPs

Οι άκυκλοι φωσφονικοί νουκλεοζίτες διαθέτουν μια φωσφονική ομάδα προσαρτημένη στο ακυκλικό νουκλεοζιτικό τμήμα μέσω ενός σταθερού αιθερικού δεσμού P-C. Σε αντίθεση με την φωσφορική ομάδα (η οποία συνδέεται μέσω ενός δεσμού P-O-C), μια φωσφονική ομάδα δεν μπορεί να αποκοπεί με κυτταρικές υδρολάσες (εστεράσες). Δεδομένου ότι οι άκυκλοι φωσφονικοί νουκλεοζίτες ήδη περιέχουν μια φωσφορικο-μιμητική ομάδα, σταθερά προσαρτημένη μέσω ενός δεσμού P-C, χρειάζονται μόνο δύο, αντί για τρία, στάδια φωσφορυλίωσης για να φτάσουν στο στάδιο του ενεργού μεταβολίτη. Έτσι, οι άκυκλοι φωσφονικοί νουκλεοζίτες δεν εξαρτώνται από την ιική κινάση για να ασκήσουν την αντι-ιική τους δράση και, "παρακάμπτοντας" το στάδιο της νουκλεοσιδικής κινάσης, οι άκυκλοι φωσφονικοί νουκλεοζίτες αναμένεται να δράσουν εναντίον ευρέως φάσματος ιών DNA (ιός ηπατίτιδας B [HBV]) και ρετροϊοί (ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας [HIV]), δηλαδή όλοι οι ιοί που χρησιμοποιούν για την αντιγραφή τους DNA πολυμεράση μέσω της οποίας οι δραστικοί μεταβολίτες των ακυκλικών φωσφονικών νουκλεοζιτών μπορούν να εισέλθουν σε ανταγωνισμό με τα κανονικά υποστρώματα (dNTPs).

Μεταξύ των ακυκλικών φωσφονικών νουκλεοζιτών που έχουν ταυτοποιηθεί ως αντι-ιικοί παράγοντες είναι η (S)-9-[3-Υδροξύ-2-(φωσφονομεθοξύ)πρόπτυλ]αδενίνη [(S)-HPMPA], η Cidofovir (HPMPC) [(S)-1-(3-υδροξύ-2-φωσφονυλμεθοξυπυροπυλ)κυτοσίνη], η Adefovir (PMEA) [9-(2φωσφονυλμεθοξυαιθυλ)αδενίνη] και η Tenofovir (PMPA) [(R)-9-(2-φωσφονυλμεθοξυπυροπυλ)αδενίνη].

Υπάρχουν 3 μεγάλες ομάδες ANPs που διακρίνονται σε εκείνα που δρουν έναντι DNA ιών, σε εκείνα που δρουν έναντι DNA και RNA ιών και σε εκείνα που δρουν έναντι RNA ιών. Στην πρώτη κατηγορία ανήκει η (S)-HPMPA η οποία έχει αποδειχθεί η δράση της έναντι του απλού έρπητα 1 και 2, του ιού Epstein-Barr και του ανθρώπινου αδενοϊού. Το ανάλογο της (S)-HPMPA είναι η Cidofovir που έχει δράση έναντι του κυτταρομεγαλοϊού (CMV). Στη δεύτερη ομάδα ανήκει η Adefovir που είναι δραστική έναντι των ιών του έρπητα (HSV-1, HSV-2 και VV)

και του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV) καθώς και RNA ιών όπως ο ιός της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας HIV τύπου 1 και 2 (HIV-1, HIV-2). Στην τρίτη ομάδα ανήκει η Τενοφοβίρ η οποία έχει έντονη δραστηριότητα έναντι του HIV.



Σχήμα 15: Δομές χαρακτηριστικών ANPs με αντι-ιική δραστηριότητα

II. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

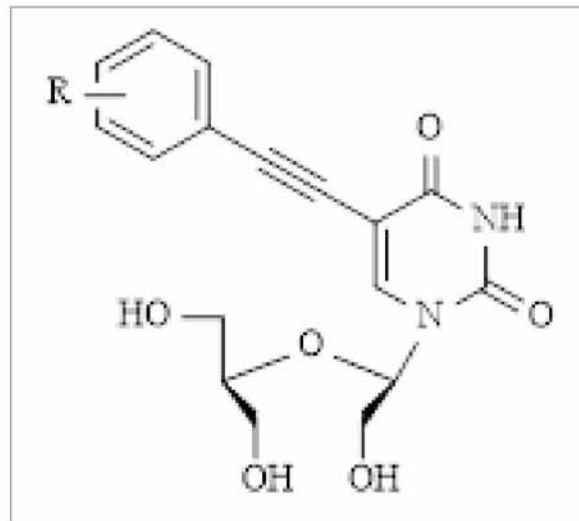
Οι νουκλεοζίτες μαζί με τα ανάλογά τους αποτελούν το θεμελιώδη λίθο για την ανάπτυξη ενώσεων με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη κυτταροτοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες σε σχέση με τις μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενες. Η ραγδαία ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά πληθώρας φαρμάκων που ως δραστική ουσία περιέχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο.

Όταν ένας ιός εισέλθει σε έναν οργανισμό, η αντίστροφη μεταγραφάση του ιού μετατρέπει το RNA του ιού σε DNA το οποίο ενσωματώνεται στο DNA του ξενιστή. Η αναστολή της δημιουργίας DNA μεταγράφων του ιικού γενετικού υλικού είναι μια σημαντική στρατηγική για την αντιμετώπιση των ιών και αποτελεί κύριο μοριακό στόχο για το σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων αντι-ιικών φαρμάκων.

Λαμβάνοντας υπόψη μελέτες που υποδεικνύουν ότι νουκλεοζιτικά ανάλογα, όπως οι C'5 τροποποιημένοι 3'-δέοξυ και 3'-δέοξυ-3'-C-μέθυλ της ουρακίλης νουκλεοζίτες καθώς και οι νουκλεοζίτες που φέρουν υποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο με τα αλογόνα φθορίου (F) και χλωρίου (Cl), εμφάνισαν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση έναντι μίας πληθώρας ιών, στόχος της παρούσης εργασίας αποτελεί η σύνθεση νέων ισχυρότερων αναστολέων-φαρμάκων, αλογονωμένων στη βάση πυρανονουκλεοζιτών, ως εν δυνάμει αντι-ιικά και αντικαρκινικά φάρμακα.

Ειδικότερα, η τροποποίηση, γίνεται στην βάση που συνδέεται με τον δακτύλιο και συγκεκριμένα στη 5 θέση της ουρακίλης, όπου εισάγεται το ιώδιο, το φθόριο και τέλος το χλώριο όπως επίσης και στο σάκχαρο του νουκλεοζίτη καθώς σπάει ο δεσμός ανάμεσα στον τρίτο και τέταρτο άνθρακα. Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων των νέων νουκλεοζιτικών παραγώγων καταδεικνύει -όπως αναφέρεται και στα συμπεράσματα της παρούσης εργασίας- τη δυνατότητα αξιοποίησής τους ως θεραπευτικά μέσα έναντι ενός αριθμού ιών και καρκίνων.

Η δομή των μορίων που στόχευσαν οι συνθετικές μας πορείες φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



Σχήμα 16: R = 2- F (α), 2- Cl (β), 2- I (γ)

III. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

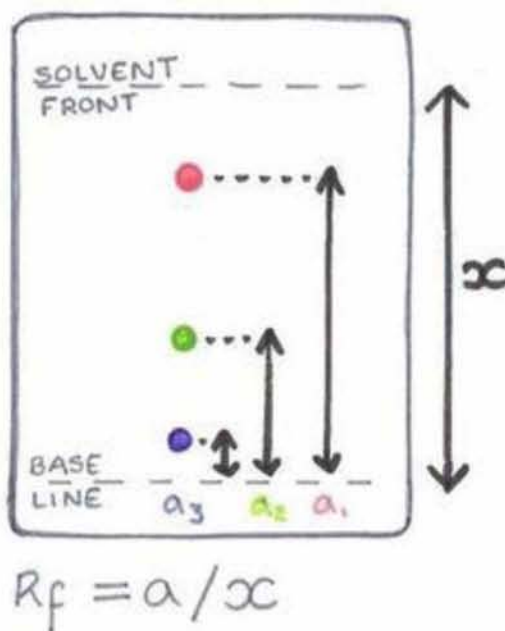
i. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silicagel (MerckKiesel60F₂₄) πάχους 0,2mm.

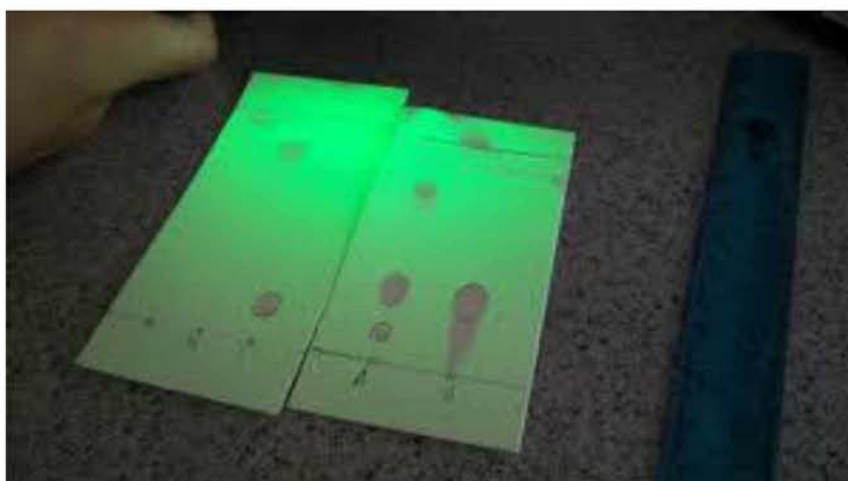
Το υπό εξέταση δείγμα τοποθετείται ως κηλίδα στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2cm από τη βάση. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται αεροστεγώς σε ένα θάλαμο στον οποίο έχει ήδη εισχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Ακολούθως ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη και να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Ύστερα η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητά τους και φαίνονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε μορίου στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης R_f, που ορίζεται από τον λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από τον διαλύτη (α). Η τιμή R_f ενός συγκεκριμένου μορίου χρησιμεύει για την ταυτοποίηση μια άγνωστης ουσίας. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254nm ή 356nm) ή μετά από ψεκασμό με διάλυμα H₂SO₄ (θειικού οξέος) 30%.



Σχήμα 17: Θάλαμος με το σύστημα διαλυτών



Σχήμα 18: Προσδιορισμός Rf



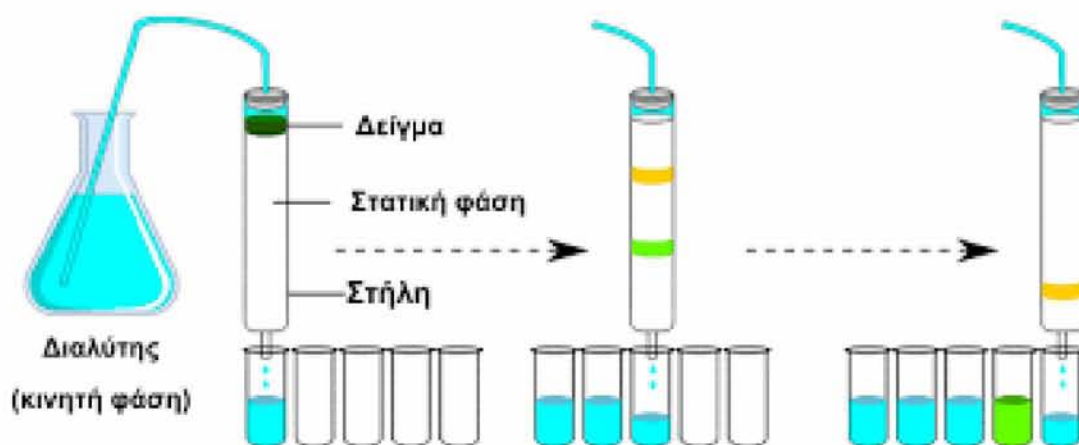
Σχήμα 19: Προσδιορισμός της απόστασης που διένυσε κάθε ένωση

ii. Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από παραπροϊόντα και διαλύτες. Ο καθαρισμός οργανικών ενώσεων πραγματοποιείται κατά κόρον μέσω χρωματογραφίας μιας τεχνικής κατά την οποία το επιθυμητό προϊόν διαλύεται σε έναν οργανικό διαλύτη ή σύστημα διαλυτών με συγκεκριμένη αναλογία κάθε φορά και στη συνέχεια αφήνεται να διαρρεύσει μέσω ενός γυάλινου κατακόρυφου σωλήνα ο οποίος είναι γεμάτος με προσροφητικό υλικό. Το προς διαχωρισμό μείγμα ονομάζεται κινητή φάση ενώ το προσροφητικό υλικό εντός του σωλήνα στατική φάση. Επειδή οι διάφορες ενώσεις προσροφώνται στην στατική φάση με διαφορετική έκταση,

μετακινούνται διαμέσου αυτής με διαφορετικές ταχύτητες και τια το λόγο αυτό, εξέρχονται από τη στήλη- εκλύονται από το άκρο της με διαφορετική ταχύτητα. Ο χρόνος έκλουσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα από την πολικότητά της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες προσροφώνται κατά κανόνα εντονότερα και άρα μετακινούνται βραδύτερα μέσω της στατικής φάσης, σε σχέση με τα περισσότερα άπολα.

Η χρωματογραφία στήλης πραγματοποιείται για τον καθορισμό προϊόντων και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flashchromatography) σε silicagel (240-400, Merckgrade).



Σχήμα 20: Στήλη χρωματογραφίας και κλάσματα της ένωσης

iii. Ξήρανση διαλυτών

Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων, απαιτείται η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο, τολουόλιο και μεθανόλη.

Η ξήρανση του ακετονιτριλίου και του τολουολίου γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA (molecularsieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4\AA , όπου και αποθηκεύτηκε. Η ξήρανση της μεθανόλης γίνεται σε φιάλη με μοριακό κόσκινα 3\AA (molecularsieves) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου για μια ώρα.

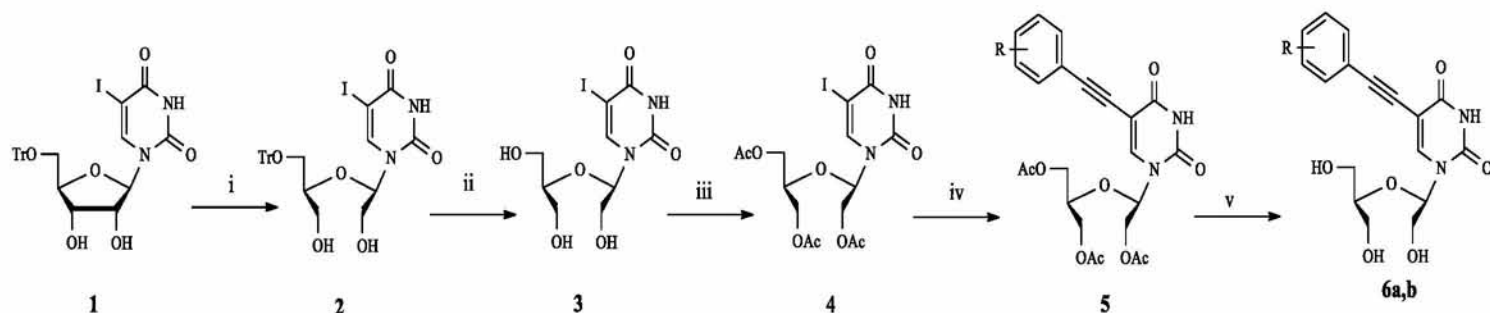
iv. Ταυτοποίηση ενώσεων

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι η χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική μέθοδος που έχουν στη διάθεσή τους οι οργανικοί χημικοί. Αυτό συμβαίνει γιατί παρέχει τον χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα του σε ένα οργανικό μόριο.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που παρασκευάστηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (NuclearMagneticResonance). Τα φάσματα ^1H -NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο BrukerAVAMCEIII 300, χρησιμοποιώντας chloroform-d (CDCl_3), methanol-d4 (CD_3OD). Το τριμέθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^1H .

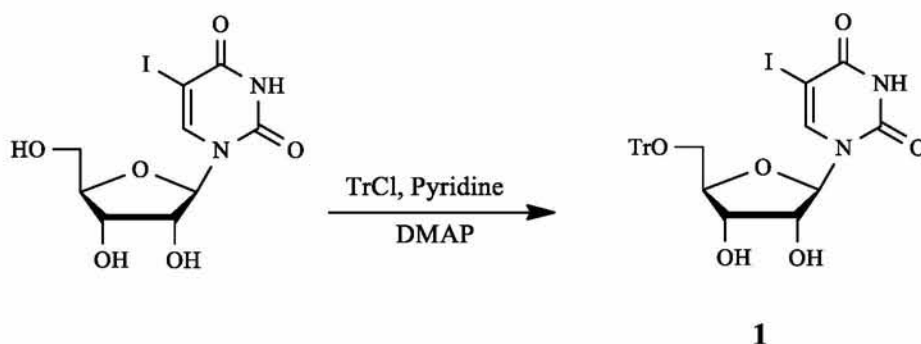
V. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Επισκόπηση της συνθετικής πορείας



R= 2-F (α); 2-Cl (β); 2,5-CH₃ (γ)

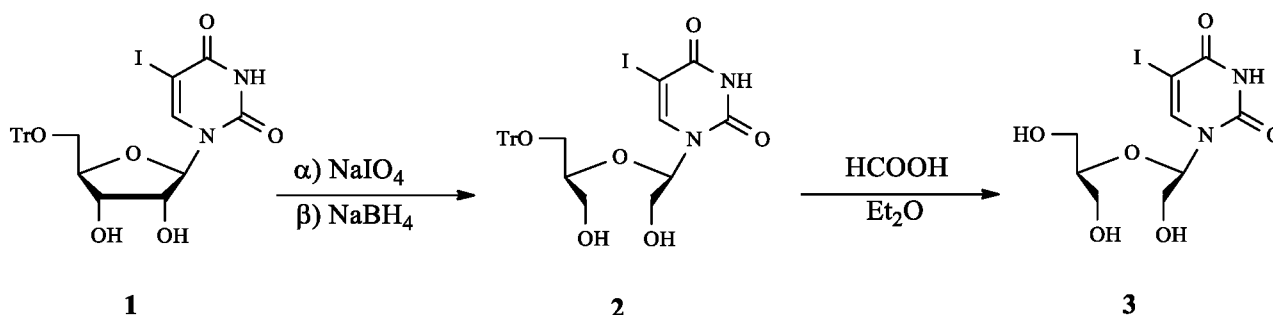
1. Σύνθεση της 1 – (5'- O – τριτυλ – β- D – ριβοφουρανόζυλο) – 5 – ιώδοουρακίλης



Ο ριβοφούρανονουκλεοζίτης της 5-ιώδοουρακίλης, συντέθηκε με συμπύκνωση της ακετυλιωμένης ριβόζης με την νουκλεοβάση της 5-ιώδοουρακίλης και εν συνεχεία απακετυλίωση του προστατευμένου νουκλεοζίτη με μεθανολική αμμωνία. Το επόμενο βήμα της σύνθεσης περιλαμβάνει την εκλεκτική τριτυλίωση του πρωτοταγούς υδροξυλίου του νουκλεοζίτη, η οποία λαμβάνει χώρα μέσω κατεργασίας με τριφαινυλομεθυλοχλωρίδιο (TrCl) σε πυριδίνη, παρουσία καταλυτικής ποσότητας 4,4-διμεθυλαμινοπυριδίνης

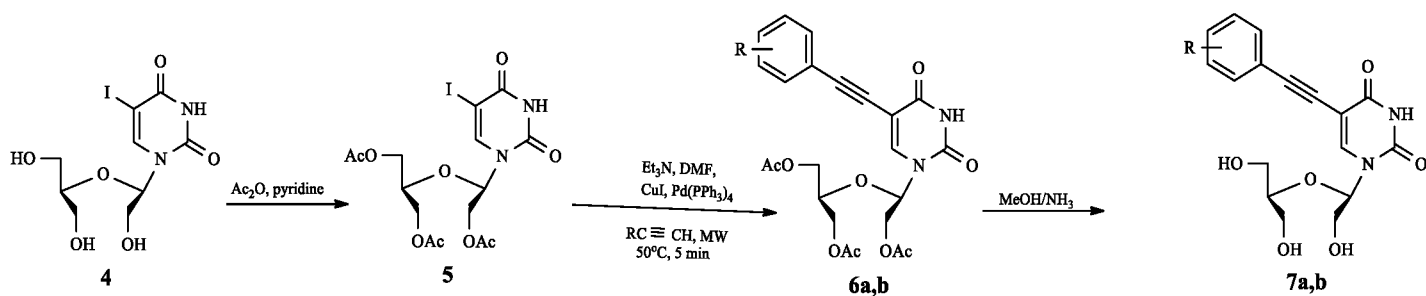
(DMAP), οπότε το μερικώς προστατευμένο νουκλεοζιτικό ανάλογο 1 λαμβάνεται σε πολύ καλή απόδοση (82%).

2. Σύνθεση της 1-(1-((1,3-διύδροξυπροπαν-2-υλ)οξυ)-2-υδροξυαιθύλ)-5-ιώδοουρακίλη



Η επόμενη αντίδραση είναι μία οξειδωτική διάσπαση της cis – διόλης στην 2',3'- θέση του νουκλεοζίτη 1 χρησιμοποιώντας υπερϊοδικό νάτριο (NaIO_4) σε μίγμα νερού και αιθανόλης και στη συνέχεια αναγωγή με βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH_4) της διαλδεΰδης που προέκυψε, οδήγησε στον άκυκλο νουκλεοζίτη 2. Η αποτριτυλίωση του νουκλεοζίτη 2 πραγματοποιήθηκε μέσω κατεργασίας του με μίγμα μυρμιγκικού οξέος (HCOOH) και διαιθυλαιθέρα (Et_2O), με αποτέλεσμα τη λήψη του άκυκλου νουκλεοζίτη της 5-ιώδοουρακίλης (3).

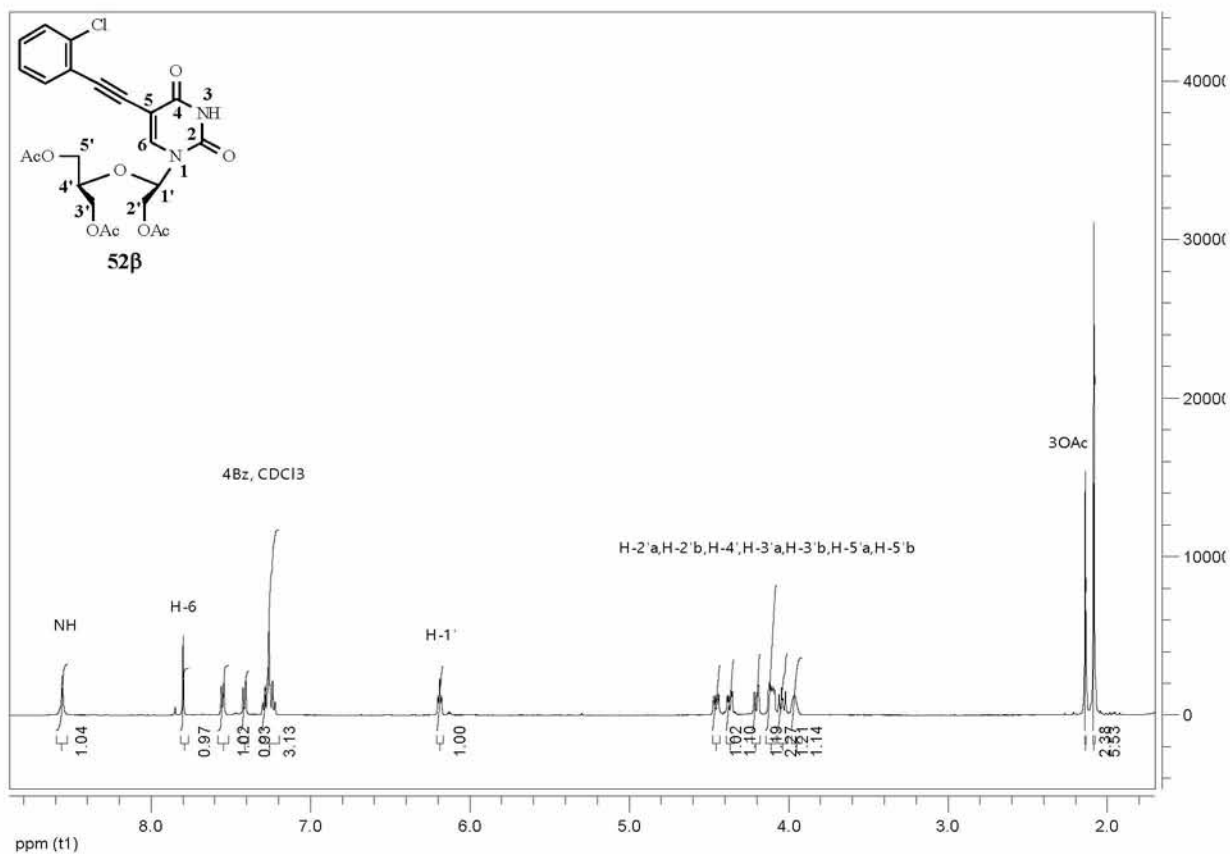
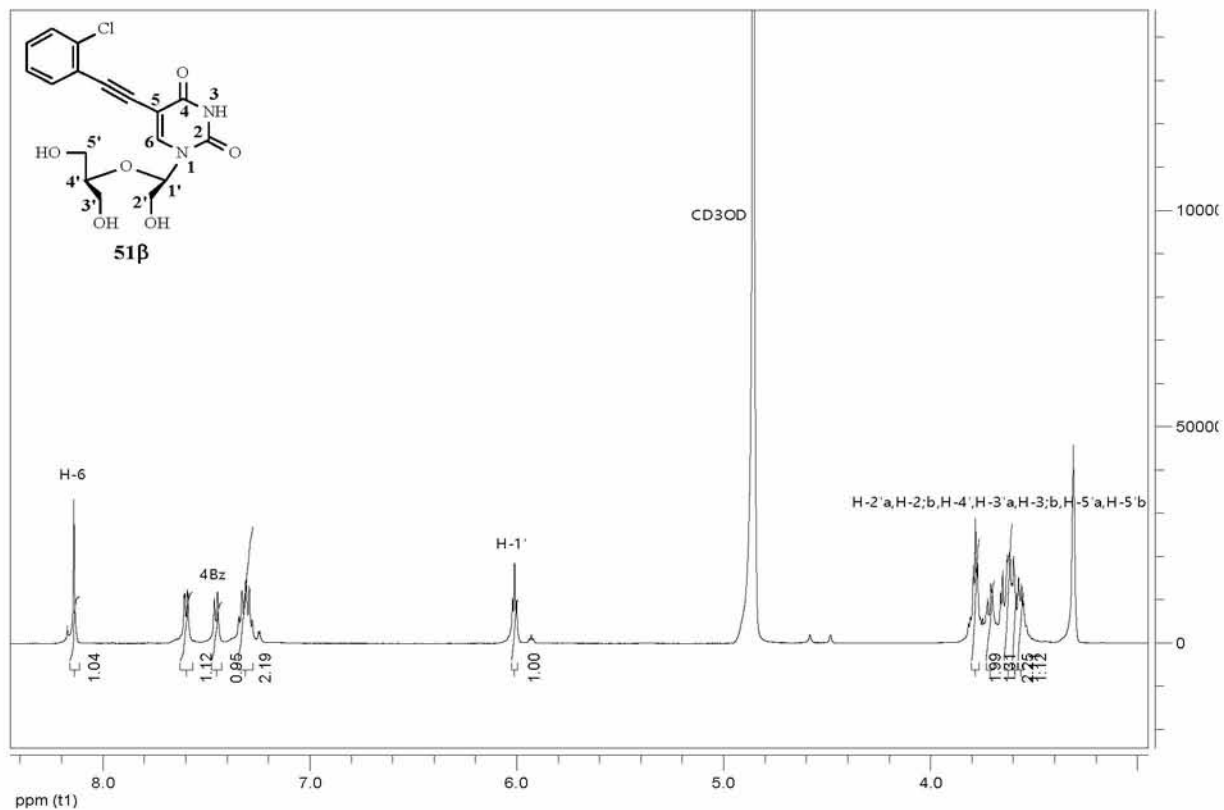
3. Σύνθεση των C5 αλκύνυλο 1-(1-((1,3-διύδροξυπροπαν-2-υλ)οξυ)-2-υδροξυαιθύλ)-ουρακίλη



R= 2-F (α); 2-Cl (β)

Το επόμενο στάδιο, της σύνθεσης, περιλαμβάνει την ακετυλίωση των υδροξυλομάδων του νουκλεοζίτη 4 με την χρήση οξικού ανυδρίτη παρουσία πυριδίνης καταλήγοντας στον ακετυλιωμένο παράγωγο 5. Η εισαγωγή των αλκινίων στον C5 της ιώδοουρακίλης πραγματοποιήθηκε με την αντίδραση Sonogashira, όπου ο άκυκλος νουκλεοζίτης της ιώδοουρακίλης 5 διαλύθηκε σε DMF και προστέθηκε Et_3N , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ως καταλύτης CuI ως συγκαταλύτης, το κατάλληλο αλκίνιο και το μίγμα θερμάνθηκε στους 50°C για δεκαπέντε λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης έγινε έκπλυση του μίγματος με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl) και οξικού αιθυλεστέρα, ενώ το επιθυμητό προϊόν ελήφθηκε καθαρό μετά από στήλη χρωματογραφίας. Τέλος τα μόρια απακετυλιώθηκαν χρησιμοποιώντας κορεσμένο διάλυμα μεθανόλης με αμμωνία (MeOH/NH_3) με αποτέλεσμα να συντεθούν τα παράγωγα 7a,b.

vi. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR



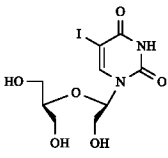
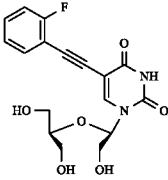
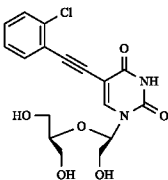
vii. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προέκυψε από τις προσπάθειες των ερευνητών για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως οι κακοήθεις νεοπλασίες και οι ιικές μολύνσεις. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών 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 ικανοποιητικές.

Πιο συγκεκριμένα, σύνθεση της 1 – (5' – O – τρίτυλ – β- D – ριβοφουρανόζυλο) – 5 – ίωδοουρακίλης (1) με απόδοση 82%, 1-(1-((1,3-διύδροξυπροπαν-2-υλ)οξυ)-2-υδροξυαίθυλ)-5-ιώδοουρακίλη (3) με απόδοση 90% και των C5 αλκύνυλο 1-(1-((1,3-διύδροξυπροπαν-2-υλ)οξυ)-2-υδροξυαίθυλ)-ουρακίλη (7α,β)) με απόδοση 94%. Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹HNMR.

Η ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (L1210, HeLa, CEM) από τους νεοσυντιθέμενους άκυκλους νουκλεοζίτες απεικονίζεται στον παρακάτω Πίνακα:

Προϊόν	IC ₅₀ (μM)	Πανκρεατικό αδενοκαρκίνωμα Capan-1	Χρόνια μυελογενής λευχαιμία Har-1	Καρκίνος όρθου HCT-116	Καρκίνος πνεύμονα NCI-H460	οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία DND-41	Οξεία μυελογενής λευχαιμία HL-60	Χρόνια μυελογενής λευχαιμία K-562	non- Hodgkin λέμφωμα Z-138
Μέσος Όρος									
	μM	>100	>100	>100	44,6	>100	>100	>100	>100
50									
	μM	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
54α									
	μM	>100	>100	>100	47,0	>100	>100	>100	>100
54β									

Οι ενώσεις αξιολογήθηκαν για την κυτταροστατική τους δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (Capan-1), χρόνιας μυελογενής λευχαιμίας (Har-1), καρκινώματος του όρθου (HCT-116), καρκίνου του πνεύμονως (NCI-H460), οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (DND-41), οξεία μυελογενής λευχαιμία (HL-60), χρόνια μυελογενής λευχαιμία (K-562) και μη-Hodgkin λέμφωμα (Z-138). Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC₅₀, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%. Κανένα από τα μόρια δεν εμφάνισε αξιόλογη κυτταροστατική δράση. Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικής δράσης παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα. Οι νέες ενώσεις μελετήθηκαν

ως προς τις αντίκες τους ιδιότητες έναντι διαφόρων DNA και RNA ιών, χωρίς όμως να παρουσιάσουν κάποια ενδιαφέρουσα δράση.

Βιβλιογραφία

1. A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacobozzo, A. Guagliardi, M. Burla, G. Polidori, M. Camalli, SIRPOW.92: a program for automatic solution of crystal structures by direct methods optimized for powder data, *J. Appl. Cryst.* 27 (1994) 435–443.
2. A. Markham, D. Faulds, Ganciclovir: an update of its therapeutic use in cytomegalovirus infections, *Drugs* 48 (1994) 455–484.
3. A.C. Moffat (Ed.), *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, second ed., The Pharmaceutical Press, London, 1989.
4. A.K. Field, M.E. Davies, C. DeWitt, H.C. Perry, R. Liou, J. Germershausen,
5. B. Alhede, F.P. Clausen, J. Juhl-Christensen, K.K. McCluskey, H.F. Preikschat, A simple and efficient synthesis of 9-substituted guanines. Cyclodesulfurization of 1-substituted 5-[(thiocarbamoyl)amino]imidazole-4-carboxamide under aqueous basic conditions, *J. Org. Chem.* 56 (1991) 2139–2143.
6. Balzarini J., Herdewijn P., De Clercq E. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 6127–6133
7. Blakley R. L., Harwood F. C., Huff K. D. (1990) *Mol. Pharmacol.* 37, 328–332
8. C.S. Crumpacker, Ganciclovir: a review, *N. Engl. J. Med.* 335 (1996) 721–729.
9. Cherfils J., Moréra S., Lascu I., Veron M., Janin J. (1994) *Biochemistry* 33, 9062–9069
10. Chiadmi M., Moréra S., Lascu I., Dumas C., LeBras G., Veron M., Janin J. (1993) *Structure* 1, 283–293
11. Copeland W. C., Chen M. S., Wang T. S. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 21459–21464
12. CrystalStructure, version 3.5.1, Crystal Structure Analysis Package, Rigaku and Rigaku/MSK, 2000–2003.
13. D. Faulds, R.C. Heel, Ganciclovir: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections, *Drugs* 39 (1990) 597–638.
14. D.K. Kim, H.K. Kim, Y.-B. Choe, Design and synthesis of 6-fluoropurine acyclonucleosides: potential prodrugs of acyclovir and ganciclovir, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4 (1994) 1309–1312.
15. de Miranda, P, Blum, MR. Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous and oral administration. *J Antimicrob Chemother.* 1983;12:29–37
16. de Miranda, P, Krasny, HC, Page, DA, Elion, GB. The disposition of acyclovir in different species. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981;219:309–315
17. de Miranda, P, Krasny, HC, Page, DA, Elion, GD. Species differences in the disposition of acyclovir. *Am J Med.* 1982;73:31–35
18. Dumas C., Lascu I., Moréra S., Glaser P., Fourme R., Wallet V., Lacombe M.-L., Veron M., Janin J. (1992) *EMBO J.* 11, 3203–3208

19. Elion, GB, Furman, TA, Fyfe, JA, de Miranda, P, Beauchamp, L, Schaeffer, HJ. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74:5716–57120
20. Elion, GB. Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am J Med*. 1982;73:7–13
21. Elion, GB. The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J Antimicrob Chemother*. 1983;12:9–17
22. Furman P. A., Fyfe J. A., St. Clair M. H., Weinhold K., Rideout J. L., Freeman G. A., Lehrman S. N., Bolognesi D. P., Broder S., Mitsuya H., Barry D. W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 8333–8337
23. G.H. Hakimelahi, A. Khalafi-Nezhad, Catalytic effect of tetrabutyl ammonium fluoride in the preparation of seco-ribo nucleosides, *Helv. Chim. Acta* 72 (1989) 1495–1500.
24. Gilles A. M., Presecan E., Vonica A., Lascu I. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 8784–8789
25. Hoard D. E., Ott G. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* 87, 1785–1788
26. Holmes, E. R., and Robins, K. R. (1964). Purine nucleosides. VII. Direct bromination of adenosine, deoxyadenosine, guanosine, and related purine nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1242–1245. doi: 10.1021/ja01060a057
27. J. Boryski, B. Golankiewicz, A facile synthesis of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine (ganciclovir) from guanosine, *Synthesis* 4 (1999) 625–628.
28. J.C. Martin, C.A. Dvorak, D.F. Smee, T.R. Matthews, J.P.H. Verheyden, 9-[(1,3-Dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine: a new potent and selective antiherpes agent, *J. Med. Chem.* 26 (1983) 759–761.
29. J.D. Karkas, W.T. Ashton, D.B. Johnston, R.L. Tolman, 9-[(2-Hydroxy)-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl guanine: as selective inhibitor of herpes group virus replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80 (1983) 4139–4143.
30. J.K. McGavin, K.I. Gao, Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infections and disease in transplant recipients, *Drugs* 61 (2001) 1153–1183.
31. K.K. Ogilvie, N. Nguyen-Ba, M.F. Gillen, B.K. Radatus, U.O. Cheriyan, H.R. Hanna, Synthesis of a purine acyclonucleoside series having pronounced antiviral activity. The glyceropurines, *Can. J. Chem.* 62 (1984) 241–252.
32. K.K. Ogilvie, U.O. Cheriyan, B.K. Radatus, Biologically active acyclonucleoside analogues, II. The synthesis of 9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl]guanine (BIOLF-62), *Can. J. Chem.* 60 (1982) 3005–3010.
33. L.J. Farrugia, ORTEP III, *J. Appl. Cryst.* 22 (1997) 389.
34. Lacombe M.-L., Wallet V., Troll H., Veron M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 10012–10018

35. M.J. O'Neil (Ed.), *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, 14th ed., Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, 2006, p. 380. Monograph 2282.
36. Manta, S., Kiritsis, C., Dimopoulou, A., Parmenopoulou, V., Kollatos, N., Tsotinis, A., et al. (2014). Unsaturation: an important structural feature to nucleosides' antiviral activity. *Anti Infect. Agents* 12, 2–57. doi: 10.2174/22113525113119990106
37. McGuirt, PV, Furman, PA, Acyclovir inhibition of viral DNA chain elongation in herpes simplex virus-infected cells. *Am J Med.* 1982;73:67–71
38. Moréra S., Chiadmi M., Lascau I., Janin J. (1995) *Biochemistry* 34, 11062–11070
39. Moréra S., Dumas C., Lascau I., Lacombe M.-L., Veron M., Janin J. (1994) *J. Mol. Biol.* 243, 873–890
40. Moréra S., Lacombe M.-L., Yingwu X., LeBras G., Janin J. (1995) *Structure* 3, 1307–1314
41. Moréra S., Lascau I., Dumas C., LeBras G., Briozzo P., Veron M., Janin J. (1994) *Biochemistry* 33, 459–467
42. Munoz-Dorado J., Inouye M., Inouye S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 2702–2706
43. Parks R. E. J., Agarwal R. P. (1973) *Enzymes (Basel)* 8, 307–334
44. Postel E. H., Berberich S. J., Flint S. J., Ferrone C. A. (1993) *Science* 261, 478–480
45. Pronovost, AD, Lucia, HL, Dann, PR, Hsiung, GD. Effect of acyclovir on genital herpes in guinea pigs. *J Infect Dis.* 1982;145:904–908
46. R. Sariri, G. Khalili, A novel approach to the synthesis of the purine anti-viral agent ganciclovir, *Indian J. Chem.* 42 (2003) 651–654.
47. R.M. Sarbajna, A. Preetam, A.S. Devi, M.V. Suryanarayana, M. Sethi, D. Dutta, Studies on crystal modifications of ganciclovir, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 537 (2011) 141–154.
48. Rosengard A. M., Krutzsch H. C., Shearn A., Biggs J. R., Barker E., Margulies I. M. K., King C. R., Liotta L. A., Steeg P. S. (1989) *Nature* 342, 177–180
49. S. Noble, D. Faulds, Ganciclovir. An update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients, *Drugs* 56 (1998) 115–146.
50. S.C. Sweetman (Ed.), *Martindale: The Complete Drug Reference*, 37th ed., Pharmaceutical Press, London, 2009. Electronic version.
51. Schaeffer, HJ, Beauchamp, L, de Miranda, P, Elion, GB, Bauer, DJ, Collins, P. 9-(2-Hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature.* 1978;272:583–585
52. Schaeffer, HJ. Acyclovir chemistry and spectrum of activity. *Am J Med.* 1982;73:4–6
53. Stahl J. A., Leone A., Rosengard A. M., Porter L., King C. R., Steeg P. S. (1991) *Cancer Res.* 51, 445–449

54. Stanberry, LR, Kern, ER, Richards, JT, Abbott, TM, Overall, JC Jr. Genital herpes in guinea pigs: pathogenesis of the primary infection and description of recurrent disease. *J Infect Dis.* 1982;146:397–404
55. T. Kawamura, N. Hirayama, X-ray Structure Analysis Online, Crystal structure of ganciclovir. *vol. 25, 2009, pp. 51–52.*
56. T.W. Chan, H.T. Nguyen, Anhydrous crystalline 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine, U.S. patent application number 4,642,346, Assignee Syntex (USA) Inc., 1987.
57. Tener G. M. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* 83, 159–168
58. Tepper A., Dammann H., Bominaar A. A., Veron M. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 32175–32180
59. Tornevik Y., Ullman B., Balzarini J., Wahren B., Eriksson S. (1995) *Biochem. Pharmacol.* 49, 829–37
60. Tucker, WE, Johnson, RE, Macklin, AW et al, Preclinical toxicology studies with acyclovir: ophthalmic and cutaneous tests. *Fundam Appl Toxicol.* 1983;3:569–572
61. Tucker, WE, Krasny, HC, de Miranda, P et al, Preclinical toxicology studies with acyclovir: carcinogenicity bioassays and chronic toxicity tests. *Fundam Appl Toxicol.* 1983;3:579–586
62. Tucker, WE, Macklin, AW, Szot, RJ et al, Preclinical toxicology studies with acyclovir: acute and subchronic tests. *Fundam Appl Toxicol.* 1983;3:573–578
63. U. Thewalt, C.E. Bugg, R.E. Marsh, The crystal structure of guanosine dihydrate and inosine dehydrate, *Acta Crystallogr. B* 26 (1970) 1089–1101.
64. V.V.N.K.V.P. Raju, V. Ravindra, S.S. Kamath, V.T. Mathad, P.K. Dubey, P.P. Reddy, A facile synthesis of potent antiherpes drug substance, ganciclovir, 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine, using a new masked glycerol derivative, *Arkivoc* 12 (2009) 296–301.
65. W.C. Ashton, J.D. Karleas, A.K. Field, R.L. Tolman, Activation of thymidine kinase and potent activity of 20-nor-20-deoxyguanosine (20-NDG), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108 (1982) 1716–1721.
66. Wallet V., Mutzel R., Troll H., Barzu O., Wurster B., Veron M., Lacombe M.-L. (1990) *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1199–1202
67. Webb P. A., Perisic O., Mendola C. E., Backer J. M., Williams R. L. (1995) *J. Mol. Biol.* 251, 574–587
68. Williams R. L., Oren D. A., Munoz-Dorado J., Inouye S., Inouye M., Arnold E. (1993) *J. Mol. Biol.* 234, 1230–1247