

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Σύνθεση νέων  
2-κετο-3-εξωμεθυλενικών  
πυρανονουκλεοζιτών ως νέοι αντιικοί και  
αντικαρκινικοί παράγοντες**

ΛΑΖΑΡΙΔΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

Λάρισα 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Σύνθεση νέων  
2-κετο-3-εξωμεθυλενικών  
πυρανονουκλεοζιτών ως νέοι αντιικοί και  
αντικαρκινικοί παράγοντες**

ΛΑΖΑΡΙΔΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

Λάρισα 2012

**Τριμελής εξεταστική επιτροπή**

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

Μαρκουλάτος Δημήτριος — Καθηγητής Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαντά Στυλιανή — ΠΔ 407 του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **Περίληψη**

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρουσιάζουν μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντικαρκινική, αντιβακτηριδιακή και αντιική δράση περιέχουν νουκλεοζίτες αποτελούμενους από μονοσακχαρίτες με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να οδηγήσει τους επιστήμονες στην σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών με εξαμελή δακτύλιο, οι οποίοι φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη αντιική και αντικαρκινική θεραπεία.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση εξωμεθυλενικών νουκλεοζιτών που έχουν ως βάση την ουρακίλη και την 5-φθοροουρακίλη και που έχει βρεθεί ότι μπορεί να έχουν αντιική και αντικαρκινική δράση και μπορεί να αποτελέσουν πιθανά φάρμακα για την αντιμετώπιση του καρκίνου και για την θεραπεία από ιικές μολύνσεις.

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Υδατάνθρακες .....	8
1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμος ημιακεταλών.....	9-11
1.3 Νουκλεοζίτες.....	11-12
1.4 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.....	13-14
1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες.....	14-15
1.6 Τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών.....	15-18
1.7 Πυρανονουκλεοζίτες.....	19
1.8 Νουκλεοζίτες με εξωκυκλικό μεθυλένιο.....	19
1.9 Κετο-πυρανονουκλεοζίτες.....	20
1.10 Ακόρεστοι νουκλεοζίτες.....	20-21
2. Ειδικό μέρος.....	22
2.1 Στόχος – Σκοπός μελέτης.....	22
2.2 Μεθοδολογία σύνθεσης.....	23-24
3. Γενικές μέθοδοι.....	25
3.1 Χρωματογραφία χάρτου.....	25
3.2 Χρωματογραφία στήλης .....	25
3.3 Ξήρανση διαλυτών.....	25-26
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων.....	26
3.5 Μέτρηση της οπτικής ενεργότητας.....	26
3.6 Φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας.....	26

4. Πειραματική διαδικασία.....	27
4.1 Σύνθεση της 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη (2).....	27
4.2 Σύνθεση της 1,2:5,6-Δι-Ο-Ισοπροπυλιδενο-3-δεσοξυ-3-μεθυλενο-D-γλουκοφουρανόζη(3).....	28
4.3 Σύνθεση της 3-Δεσοξυ-3-μεθυλενο-D-γλουκοπυρανόζη(4).....	29
4.4 Σύνθεση της 1,2,4,6-Τετρα-Ο-ακετυλο-3-δεσοξυ-3-μεθυλενο-D-γλυκοπυρανόζη(5).....	30
4.5 Σύνθεση της 1-(2',4',6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-δεσοξυ-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλ)ουρακίλη(6a).....	31
4.6 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλ)ουρακίλη(7a).....	32
4.7 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-4'6'-Ο-ισοπροπυλιδένιο-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοσυλ)ουρακίλη(8a).....	33
4.8 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-4',6'-Ο-ισοπροπυλιδένιο-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο-2'-ουλοζ) ουρακίλη(9a).....	34
4.9 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο-2'-ουλοζ)ουρακίλη(10a).....	35
4.10 Σύνθεση της 1-(2',4',6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-δεσοξυ-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθορο-ουρακίλη (6b).....	36
4.11 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθορο-ουρακίλη(7b).....	37
4.12 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-4',6'-Ο-ισοπροπυλιδενιο-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθορο-ουρακίλη(8b).....	38
4.13 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-4',6'-Ο-ισοπροπυλιδένιο-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο-2'-ουλοζο)5-φθορο-ουρακίλη(9b).....	39
4.14 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο-2'-ουλοζο)5-φθορο-ουρακίλη(10b).....	40
5. Ταυτοποίηση με <sup>1</sup> H NMR.....	41

<b>6. Συζήτηση.....</b>	<b>42-44</b>
<b>7. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>45-49</b>

## 1.Εισαγωγή

### 1.1 Υδατάνθρακες

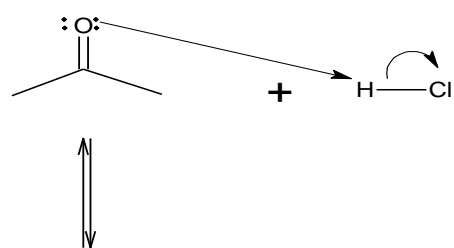
Οι υδατάνθρακες ή σάκχαρα είναι οργανικές χημικές ουσίες οι οποίες αποτελούν πολυυδροξυλιωμένα παράγωγα των αλδεϋδών και των κετονών δηλαδή το κάθε άτομο άνθρακα της ένωσης είναι ενωμένο με ένα υδροξύλιο εκτός από ένα που είναι συνδεδεμένο με μια καρβονυλομάδα. Το όνομα σάκχαρα δόθηκε πριν από έναν αιώνα σε ορισμένες οργανικές ενώσεις οι οποίες έχουν παρόμοιες χημικές ιδιότητες και γλυκία γεύση όπως είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η σακχαρόζη κ.α. Μετά από παρατηρήσεις ότι οι ενώσεις αυτές αλλά και πολλές άλλες ακόμη απλές ή πολύπλοκες αντιστοιχούσαν όλες στον γενικό τύπο  $C_n(H_2O)_n$ . Έτσι προτάθηκε η ονομασία υδατάνθρακες λόγω της παρουσίας υδρογόνου και οξυγόνου σε αναλογίες όμοιες με αυτές του ύδατος. Οι ενώσεις αυτές έχουν μεγάλη σημασία για τους ζωντανούς οργανισμούς γιατί αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας. Γενικά χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες:

- **Μονοσακχαρίτες** ή απλά σάκχαρα τα οποία είναι μονομερείς ενώσεις, που αποτελούνται από 3-6 άτομα άνθρακα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η γλυκόζη και η φρουκτόζη, που αποτελούν τα μονομερή για τη σύνθεση πολυπλοκότερων δομών.
- **Δισακχαρίτες** που αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες συνδεδεμένους με ομοιοπολικό δεσμό. Ο ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ των μονοσακχαριτών ονομάζεται γλυκοζιτικός δεσμός. Οι κυριότεροι δισακχαρίτες είναι: η μαλτόζη που προκύπτει από τη συμπύκνωση δύο μορίων γλυκόζης, η σακχαρόζη που προκύπτει από την ομοιοπολική σύνδεση ενός μορίου γλυκόζης και ενός μορίου φρουκτόζης και η λακτόζη που προκύπτει από τη συμπύκνωση ενός μορίου γλυκόζης και ενός μορίου γαλακτόζης. Η μαλτόζη αποτελεί προϊόν της διάσπασης του αμύλου. Η σακχαρόζη είναι συστατικό των φρούτων και πηγή γλυκόζης για ζωικούς οργανισμούς. Η λακτόζη είναι το σάκχαρο του γάλακτος.
- **Ολιγοσακχαρίτες**, οι οποίοι παρασκευάζονται με σύνδεση μερικών μονοσακχαριτών, συνήθως αποτελούνται από 20-30 μονοσακχαρίτες.
- **Πολυσακχαρίτες**, οι οποίοι προκύπτουν από τον πολυμερισμό πολλών μορίων μονοσακχαριτών, όπως το άμυλο, το γλυκογόνο, η κυτταρίνη, και πολλά άλλα σημαντικά βιολογικά μόρια.

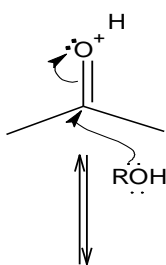


## 1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών : σχηματισμός ημιακεταλών

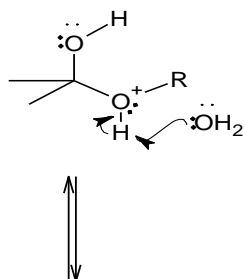
Οι υδατάνθρακες όπως αναφέραμε και προηγουμένως είναι αλδεϋδικές ή κετονικές ενώσεις με πολλή υδροξυλικές ομάδες. Τα σάκχαρα που αποτελούνται από πέντε άτομα άνθρακα ονομάζονται πεντόζες και αυτά που αποτελούνται από έξι άτομα άνθρακα ονομάζονται εξόζες. Γενικά, μια καρβονυλική ένωση αντιδρά με μια αλκοόλη για να σχηματίσει μια ημιακετάλη (Εικόνα 1).



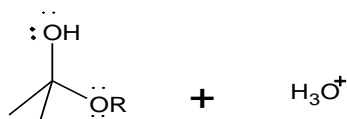
**Η πρωτονύλιωση του καρβονυλικού οξυγόνου πολώνει έντονα το καρβονύλιο**



**Ενεργοποιεί την καρβονυλική ομάδα για πυρηνόφιλη προσβολή από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου της αλκοόλης**



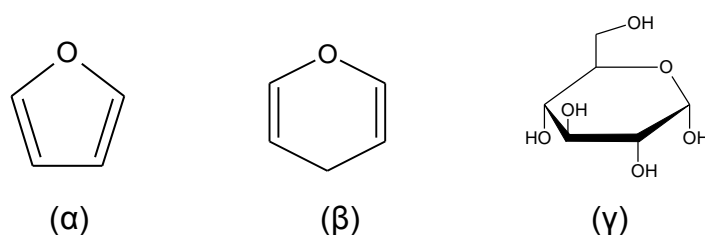
**Απόσπαση ενός πρωτονίου οδηγεί σε ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, μια ουδέτερη ημιακετάλη**



**Εικόνα 1.** Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης

Εάν η υδροξυλομάδα βρίσκεται στο ίδιο μόριο μπορεί να λάβει χώρα μια ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη που οδηγεί στο σχηματισμό μιας ημιακετάλης. Στην περίπτωση της γλυκόζης, η C-1 αλδεϋδική ομάδα του τύπου ανοικτής αλυσίδας αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 και σχηματίζει μια ενδομοριακή ημιακετάλη. Απόρροια της παραπάνω αντίδρασης αποτελεί η παραγωγή του

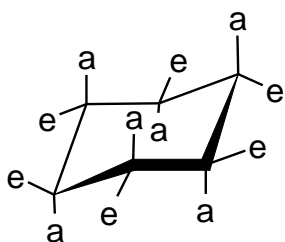
εξαμελούς δακτυλίου του σακχάρου (Εικόνα 2γ), που ονομάζεται πυρανόζη, λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο (Εικόνα 2β). Στην περίπτωση της φρουκτόζης, η κετονική ομάδα στον C-2 του τύπου της ανοικτής αλυσίδας αντιδρά με την υδροξυλική ομάδα του C-5 και σχηματίζει μία ενδομοριακή ημιακετάλη. Ως αποτέλεσμα επέρχεται ο σχηματισμός πενταμελούς δακτυλίου, που ονομάζεται φουρανόζη, λόγω της ομοιότητας του με το φουράνιο (Εικόνα 2α).



**Εικόνα 2.** (α) Φουράνιο, (β) Πυράνιο (γ) γλυκόζη

Κατά την κυκλοποίηση της γλυκόζης δημιουργείται ένα πρόσθετο στερεογονικό κέντρο. Συγκεκριμένα, ο άνθρακας C-1, ο καρβονυλικός άνθρακας στην ανοικτή αλυσίδα, μετατρέπεται σε ένα στερεογονικό κέντρο στο δακτύλιο. Υπάρχει το ενδεχόμενο να προκύψουν δύο δομές, η  $\alpha$ -D-γλυκοπυρανόζη και η  $\beta$ -D-γλυκοπυρανόζη. Στην περίπτωση της  $\alpha$ -D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός « $\alpha$ » υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση trans ως προς τον υποκαταστάτη  $-CH_2OH$  του C-5 (δηλαδή βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). Στην περίπτωση της  $\beta$ -D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός « $\beta$ » υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση cis ως προς τον υποκαταστάτη  $-CH_2OH$  του C-5 (δηλαδή βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου). Ο άνθρακας C-1 καλείται ανωμερής και έτσι οι μορφές  $\alpha$  και  $\beta$  καλούνται ανωμερείς. Όσον αφορά τον φουρανοζικό δακτύλιο της φρουκτόζης, ο άνθρακας C-2 είναι ανωμερής και η ονοματολογία εφαρμόζεται με τον ίδιο τρόπο δεδομένου ότι οι μορφές  $\alpha$  και  $\beta$  αναφέρονται στο υδροξύλιο που είναι ενωμένο στον άνθρακα C-2. Υπάρχουν δύο ειδών υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου: οι αξονικοί και οι ισημερινοί. Οι αξονικοί δεσμοί είναι διατεταγμένοι κάθετα στο δακτύλιο δηλαδή παράλληλα στον άξονα του δακτυλίου. Οι ισημερινοί δεσμοί διατάσσονται περίπου στο ίδιο επίπεδο του δακτυλίου δηλαδή γύρω από τον ισημερινό του (Εικόνα 3). Οι αξονικοί υποκαταστάτες, πλην του υδρογόνου, παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλο, εάν ξεπροβάλουν από την ίδια πλευρά του δακτυλίου. Αντίθετα, υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για τους ισημερινούς υποκαταστάτες, γι' αυτό ο υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην

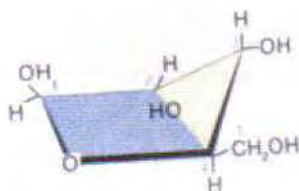
ισημερινή απ' ότι στην αξονική θέση. Η ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στα αξονικά και στα ισημερινά διαμορφομερή οφείλεται στη στερεοχημική τάση που προκαλείται από της λεγόμενες 1,3-διαξονικές αλληλεπιδράσεις. Το ακριβές μέγεθος της 1,3-διαξονικής στερεοχημικής τάσης σε μία συγκεκριμένη ένωση εξαρτάται από τη φύση και το μέγεθος του αξονικού υποκαταστάτη.



**Εικόνα 3.** Μορφή ανάκλιντρου μιας πυρανόζης

(e= ισημερινός υποκαταστάτης , a= αξονικός υποκαταστάτης)

Ο πενταμελής δακτύλιος της φουρανόζης δεν είναι επίπεδος. Μπορεί να έχει πτυχωμένη μορφή έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού. Η διαμόρφωση αυτή καλείται «μορφή φακέλου» επειδή η δομή αυτή μοιάζει με ανοιχτό φάκελο με το πίσω μέρος ανασηκωμένο (Εικόνα 4). Οι δακτύλιοι της φουρανόζης αλληλομετατρέπονται ταχύτατα σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις και είναι πολύ πιο ευέλικτοι από τους δακτυλίους της πυρανόζης. Η παρατήρηση αυτή εξηγεί την επιλογή της ως συστατικών του RNA και DNA.

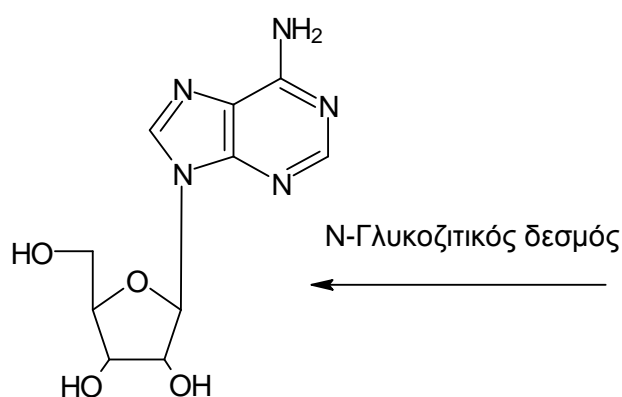


**Εικόνα 4.** Μορφή φακέλου της  $\beta$ -D-ριβόζης

### 1.3 Νουκλεοζίτες

Νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες που προέρχονται από την ένωση μιας νουκλεοβάσης (αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, θυμίνη, ουρακίλη) και της ριβόζης (ριβονουκλεοζίτες) ή της δεοξυριβόζης (δεοξυριβονουκλεοζίτες).

Ο νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης ενωμένη στη θέση 1 μιας πεντόζης με  $\beta$ -*N*-γλυκοζιτικό δεσμό. Ο ανωμερής άνθρακας ενός σακχάρου είναι σε θέση να ενωθεί με το άζωτο μιας αμίνης με ένα *N*-γλυκοζιτικό δεσμό. Ο συγκεκριμένος τρόπος γλυκοζιτικής σύνθεσης είναι συνήθης σε πολλά βασικά μακρομόρια, όπως νουκλεοτίδια, RNA και DNA. Οι *N*-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη  $\beta$ , δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου(Εικόνα 5).



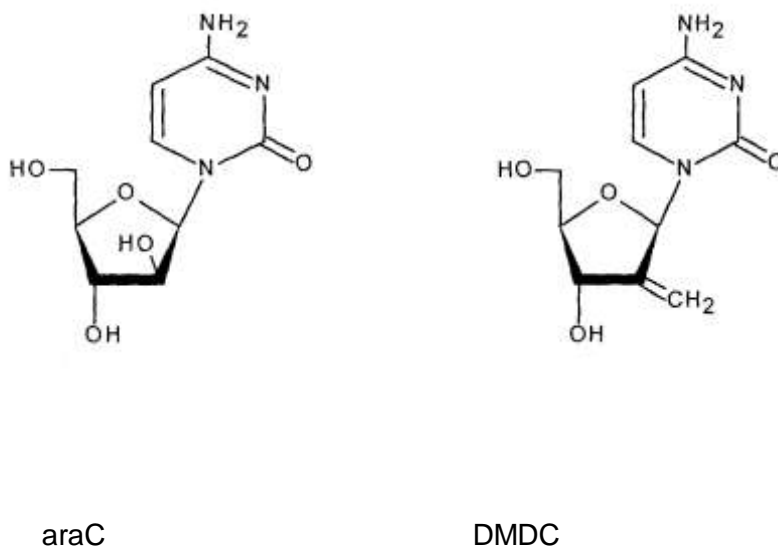
**Εικόνα 5.** Αδενοσίνη

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των ιδιοτήτων τους που τα καθιστούν αντικαρκινικούς, αντιβακτηριδιακούς, αντιικούς παράγοντες, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως αντιοξειδωτικά. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. Συνεπώς έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους.

#### 1.4 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σ' έναν υγιή οργανισμό υπόκειται πάντα σε αυστηρές ρυθμίσεις, που επιτρέπουν στα κύτταρα να αυξηθούν, να διαφοροποιηθούν και να λειτουργήσουν αρμονικά μέσα στον οργανισμό. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις ρυθμίσεις αυτές, αν και οι περισσότεροι παραμένουν ακατανόητοι, περιλαμβάνουν ένα σύστημα χημικών μηνυμάτων με τη διαμεσολάβηση, για παράδειγμα, ορμονών και συγκεκριμένων μεμβρανικών υποδοχέων. Τα κύτταρα σε καλλιέργεια, σταματούν την διαίρεσή τους όταν έρθουν σ' επαφή το ένα με το άλλο. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται και η μιτωτική διαίρεση ορισμένων κυττάρων συνεχίζεται άναρχα, χωρίς να υπακούει σε περιοριστικούς κανόνες. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία όγκων ή καρκινωμάτων. Τα κύτταρα χάνουν τη διαφοροποιημένη μορφή τους και περνούν σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μπορεί να είναι περιορισμένος (καλοήθεις όγκοι), ή έντονος με μεταστάσεις σε άλλους ιστούς (κακοήθεις όγκοι), οι οποίοι θεραπεύονται κυρίως με χημειοθεραπεία. Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία διαθέτουν αυξημένη δραστικότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν μελετηθεί ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες. Ένας μεγάλος αριθμός αναλόγων φυσικών νουκλεοζιτών χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια στην ιατρική για τη θεραπεία του καρκίνου. Μία εκτενής μελέτη των αντικαρκινικών φαρμάκων που έχουν ήδη εγκριθεί από τη Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA), έδειξε ότι οι νουκλεοζίτες αποτελούν μία σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών φαρμάκων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι από τα εξήντα αντικαρκινικά μόρια που έχουν εγκριθεί μέχρι σήμερα από τον FDA, έντεκα είναι αντιμεταβολίτες και δέκα από τα έντεκα είναι νουκλεοζίτες ή συγγενικά μόρια, τα οποία επηρεάζουν τη σύνθεση του DNA με διάφορους τρόπους. Επιπρόσθετα αξίζει να σημειωθεί ότι το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία το 15% των αντικαρκινικών φαρμάκων σχετίζονταν με νουκλεοζιτικά ανάλογα. Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες, όπως οι 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (**araC**), 1-(2'-δεοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθροπεντο-φουρανοζυλο)κυτοσίνη (**DMDC**), που φαίνονται στην εικόνα 6, έχουν

μελετηθεί ως προς τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες και είναι αποτελεσματικές ενώσεις όχι μόνο ενάντια στη λευχαιμία και τα λεμφώματα, αλλά και σε κακοήθεις όγκους



**Εικόνα 6:** Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες araC και DMDC

### **1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες**

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους, παρεμβαλλόμενοι στη σύνθεση του DNA και του RNA, μπορούν να επηρεάσουν εκτός από τη σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων των καρκινικών κυττάρων, τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αποτελούν το θεμελιώδη λίθο και για την ανάπτυξη αντιικών παραγόντων. Το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία, το 55% των αντιικών φαρμάκων σχετίζονταν με νουκλεοζιτικά ανάλογα. Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός, ότι έξι από τα δεκαπέντε φάρμακα, τα οποία διατίθενται για τη θεραπεία του AIDS (AZT, ddC, ddI, d4T, 3TC και abacavir), είναι νουκλεοζιτικά ανάλογα (νουκλεοζίτες, αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης, NRTIs) μαζί με τρία μη – NRTIs (nevirapin, delavirdin και efavirenz), καθώς και έξι αναστολείς της πρωτεάσης ( saquinavir, indinavir, ritonavir, neflinavir, amprenavir, lopinavir). Μεταξύ των NRTIs, η 3TC είναι το φάρμακο, το οποίο χρησιμοποιείται επίσης και για τη θεραπεία της μόλυνσης από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και είναι το μόνο που έχει εγκριθεί από τον FDA, εκτός από την

ιντερφερόνη-α. Εννέα ακόμη νουκλεοζίτες idoxuridine (ιδοξουριδίνη, IdU), trifluridine (τριφλουριδίνη, TFT), acedurid (ασεδουρίδη, EdU), vidarabine (βιδαραβίνη, araA), acyclovir (ακυκλοβίρη, ACV), valaciclovir (βαλακυκλοβίρη, val-ACV), ganciclovir (γανσικλοβίρη, DHPG), famciclovir (φαμσικλοβίρη, FCV) και cidofovir (σιντοφοβίρη, HPMPC), χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ασθενειών που προκαλούνται από ερπητοϊούς, όπως από τον ιό απλού έρπητα τύπου 1 (Herpes Simplex Virus, HSV-1) και τύπου 2 (HSV-2), τον κυτταρομεγαλοϊό (cytomegalovirus, HCMV) και τον ιό έρπητα ζωστήρα (varicella-zoster virus, VZV) . Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται μόρια, όπως το acyclovir (ακυκλοβίρη), το οποίο χρησιμοποιείται επί δεκαετίες και ακόμη εξακολουθεί να κατατάσσεται μεταξύ των πιο αποτελεσματικών φαρμάκων ενάντια στους ερπητοϊούς. Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα ενάντια στον ιό του έρπητα , μειώνουν την διάρκεια των συμπτωμάτων και επιταχύνουν τη θεραπεία. Τα ανάλογα νουκλεοζιτών χρησιμοποιούνται χαρακτηριστικά στα πρώτα συμπτώματα ενός προερχόμενου από τον ιό ξεσπάσματος για να μειώσουν την διάρκεια του ξεσπάσματος και να βελτιώσουν την θεραπεία του τραύματος. Τέλος, το ribavirin (ριμπαβιρίνη), ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο που περιέχει μία μη φυσική βάση, έχει εγκριθεί για τη θεραπεία του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού και επιπλέον είναι το μόνο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία της μόλυνσης από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), σε συνδυασμό με την interferon-α (ιντερφερόνη-α) και τον ιό έρπητα ζωστήρα (VZV).

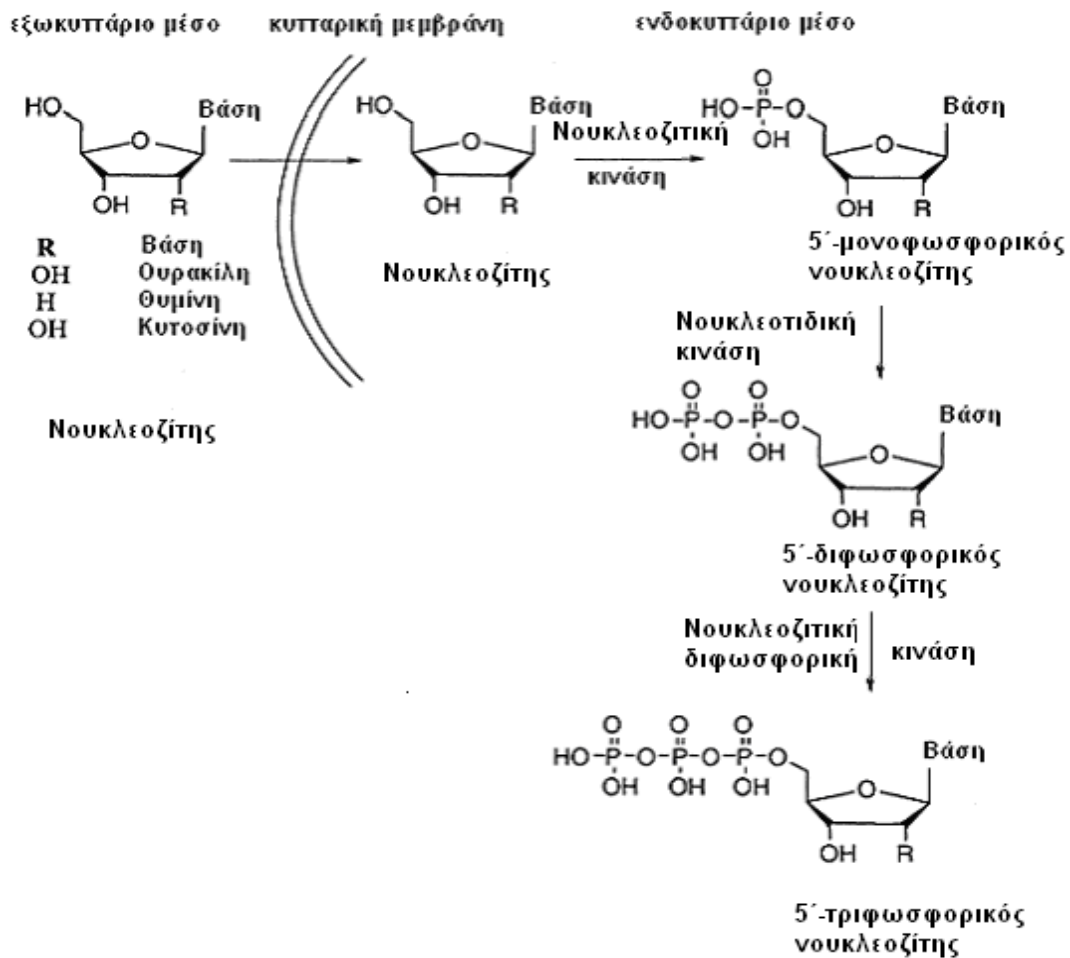
### **1.6 Τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών**

Η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών όπως είναι γνωστό πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά αλλά έχουν και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επίσης πραγματοποιείται ενδοκυτταρική τροποποίησή τους με σκοπό την παραγωγή των νουκλεοτιδίων. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν τα νουκλεοτίδια ως βασικές δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA. Με βάση την παραπάνω αναφορά για παθητική διάχυση, χρησιμοποιήθηκε η παρούσα ιδιότητα για την εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων, μορίων που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, ως αντιικών και αντικαρκινικών παραγόντων για τη θεραπεία πολλών ασθενειών . Τα φάρμακα, που ως δραστική ουσία έχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο, επιβάλλεται να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μοριακό στόχο προκειμένου να είναι δραστικά. Στην κατηγορία των μοριακών στόχων των νουκλεοζιτικών αναλόγων υπάγονται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα . Οι πιο κοινοί τύποι πρωτεϊνών με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα φάρμακα είναι οι υποδοχείς, οι δίαυλοι ιόντων, τα ενζυμα και τα

μόρια μεταφορείς. Ο βασικός λόγος που τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου και του AIDS, είναι ότι μπορούν να τροποποιηθούν δομικά, έτσι ώστε να παράγουν φαρμακολογικώς ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας τις περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Στη συνέχεια, μπορούν να παρέμβουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, έτσι ώστε να προωθήσουν είτε αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα. Τα αντικαρκινικά και τα αντιικά ανάλογα εμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό και την επισκευή του κυτταρικού DNA και τον αναδιπλασιασμό του ιικού γενώματος. Αυτά τα θεραπευτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση. Αν και τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, τα μη φωσφορυλιωμένα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες - μεταφορείς νουκλεοζιτών. Φωσφορυλιώνονται κατόπιν προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Οι ιικές πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντιικό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντιικών φαρμάκων. Μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοζιτών, τα αντιικά φάρμακα νουκλεοζιτικών αναλόγων ενσωματώνονται στο ιικό γονιδίωμα από τις ιικές πολυμεράσες, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του γενετικού υλικού. Αυτό το γεγονός εξασθενίζει τη σύνθεση ή τη λειτουργία του ιικού γονιδιώματος που προκύπτει και επομένως καταστέλλει την αντιγραφή του ιού. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα πιθανόν να είναι κατάλληλα για τη θεραπεία χρόνιων ιικών ασθενειών. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ως φάρμακα έχουν γενικά υψηλή εκλεκτικότητα, εξαιρετική δραστική ικανότητα και μεγάλη διάρκεια δράσης. Επίσης τα ανάλογα των νουκλεοζιτών μπορούν να δράσουν και ως προφάρμακα, δεδομένου ότι πρέπει να φωσφορυλιωθούν στην 5' θέση του υδατάνθρακα από τις κυτταρικές κινάσες για να μπορέσουν να δράσουν κι αυτό είναι το «κλειδί» στην επιλεκτικότητά τους. Η φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων στο κύτταρο, τα ενεργοποιεί και ανταγωνίζονται με τα φυσικά νουκλεοτίδια για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Επειδή η αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων είναι κοινή για όλες τις μορφές ιών, τα ανάλογα νουκλεοζιτών έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντιική θεραπεία. Επειδή οι φωσφορυλιωμένες ενώσεις ιονίζονται συνήθως στο σώμα λόγω του

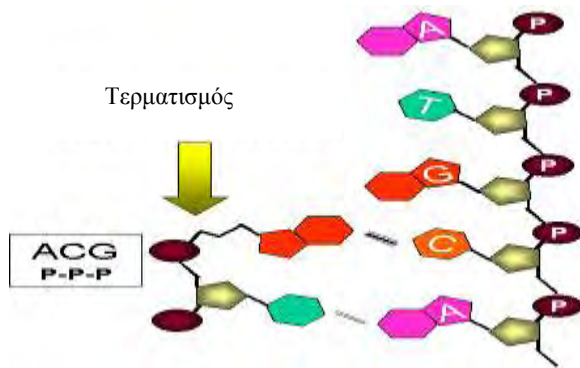


διαφορετικού pH στα διάφορα διαμερίσματα, δεν μεταφέρονται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Οι ενεργές μορφές των νουκλεοτιδίων αποτελούν τριφωσφορικά άλατα, με όλες τις αντικαταστάσεις φωσφορικών στην 5'-θέση από ειδικές ιικές-κινάσες που συχνά καταλύουν την πρώτη 5'-φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων, με την επόμενη φωσφορυλίωση από τις κυτταρικές κινάσες. Η πρώτη φωσφορυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (MP) συνήθως καταλύεται από μία νουκλεοζιτική κινάση που κωδικοποιείται από το κύτταρο-ξενιστή ή τον ιό που μολύνει το κύτταρο-ξενιστή. Η μετατροπή των νουκλεοζιτών-MP προς τις αντίστοιχες 5'-διφωσφορικές και τριφωσφορικές δομές πραγματοποιείται από νουκλεοτιδικές κινάσες, καθώς και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντίστοιχα (Εικόνα 7). Συνεπώς, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι ιικές κινάσες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών.



**Εικόνα 7 . Φωσφορυλίωση των ανάλογων νουκλεοζιτών**

Αυτό μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση των ανάλογων φωσφορυλιωμένων νουκλεοτιδίων κυρίως στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί με ιό. Τα τμήματα των νουκλεϊκών οξέων διαμορφώνονται από τις κυτταρικές πολυμεράσες, οι οποίες συνδέουν το 5'-νουκλεοτίδιο στην ομάδα 3'-υδροξυλίου ενός άλλου νουκλεοτιδίου. Σε αυτή την διαδικασία, απελευθερώνεται πυροφωσφορική ομάδα (PPi) και οι δύο ζάχαρες συνδέονται με φωσφοδιεστερική γέφυρα. Το σάκχαρο, είναι το τμήμα του νουκλεοζίτη που χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τις κινάσες και τις πολυμεράσες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την επιμήκυνση των αλυσίδων. Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας (Εικόνα 8).



**Εικόνα 8 .** Τερματισμός αλυσίδας νουκλεϊκών οξέων

Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών στον καρκίνο δεν έχει προσδιοριστεί. Πιο συγκεκριμένα οι ελεύθερες ρίζες σχετίζονται ιδιαίτερα με την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας. Όταν οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν φυσιολογικά κύτταρα προκαλείται βλάβη στο DNA, η οποία αποτελεί βασική προϋπόθεση για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας. Ωστόσο, οι επιδράσεις των ελεύθερων ριζών στα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν. Όταν οι ελεύθερες ρίζες παράγονται στα καρκινικά κύτταρα, φαίνεται να έχουν ευεργετική δράση καθώς προκαλούν την καταστροφή αυτών των κυττάρων με διάφορους μηχανισμούς. Έχει αποδειχθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες παίζουν ρόλο στη μείωση των τελομερών των κυττάρων, τα οποία στα καρκινικά κύτταρα διατηρούνται σε ένα συγκεκριμένο μέγεθος και συμβάλλουν στη διατήρηση του καρκινικού κυτταρικού φαινότυπου .

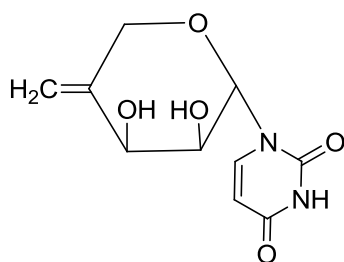
### **1.7 Πυρανονουκλεοζίτες**

Πληθώρα ερευνητικών προγραμμάτων με σκοπό την παραγωγή φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, επικεντρώθηκαν στη χρήση νουκλεοζιτικών αναλόγων με σάκχαρο μια πεντόζη. Όμως, ορισμένα προβλήματα που προέκυψαν από τη χρήση των φουρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως ο ανεπαρκής μεταβολισμός προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, η χημική ή ενζυμική απενεργοποίηση 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 και ειδικότερα αυτών που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη .Η έρευνα για την ανακάλυψη αντιικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτών με

εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είχε μείνει αρκετά βήματα πίσω σε σχέση με αυτή των βιολογικών ενεργών νουκλεοζιτών με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίους. Παρόλα αυτά, νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντιικές και αντιβιοτικές τους ιδιότητες καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων .

### **1.8 Νουκλεοζίτες με εξωκυκλικό μεθυλένιο**

Οι νουκλεοζίτες με εξωκυκλικό μεθυλένιο είναι μία ομάδα νουκλεοζιτικών αναλόγων που προκύπτουν από την αντικατάσταση μίας καρβονυλικής ομάδας από ένα εξωκυκλικό μεθυλένιο . Σύμφωνα με μελέτες έχει αποδειχθεί ότι αυτού του είδους οι νουκλεοζίτες επιδεικνύουν ισχυρή τόσο αντιική όσο και αντικαρκινική δράση. Συγκεκριμένα, σε πιο πρόσφατες μελέτες νουκλεοζιτικά ανάλογα της γαλακτόζης , της μαννόζης και της λυξόζης που έφεραν εξωκυκλικό μεθυλένιο στο δακτύλιο του σακχάρου, έδειξαν αυξημένη αντιική και αντικαρκινική δράση (Εικόνα9).



**Εικόνα 9.** Νουκλεοζίτης με εξωκυκλικό μεθυλένιο 1-(4-deoxy-4-methylene-*α*-L-erythro-pentopyranosyl)uracil

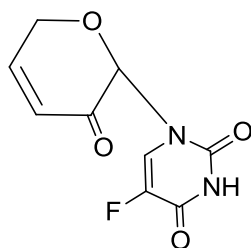
### **1.9 Κετο- πυρανονουκλεοζίτες**

Μία ενδιαφέρουσα τάξη πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων αποτελούν οι κετο-πυρανονουκλεοζίτες, οι οποίοι περιλαμβάνουν μία κετονομάδα στο τμήμα του σακχάρου, ως αποτέλεσμα της οξειδωσης ενός ασύμμετρου ατόμου άνθρακα. Παρόλο που τα κετο-παράγωγα των φουρανονουκλεοζιτών, αποδείχθηκαν ασταθή, τα κετο-παράγωγα των νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο έδωσαν το έναυσμα για τη μελέτη μιας νέας και ενδιαφέρουσας χημείας. Η διαθεσιμότητα αυτών των μορίων ήταν καθοριστική για τη βιολογική έρευνα, αφού άνοιξε νέους ορίζοντες προς τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των αντιβιοτικών, δεδομένου ότι οι κετο-πυρανονουκλεοζίτες αποτελούν απαραίτητα ενδιάμεσα στη βιοσύνθεση πολλών φυσικών νουκλεοζιτικών αντιβιοτικών. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα μόρια

εμφανίζουν το πλεονέκτημα ότι οδηγούν σε σύνθετους νουκλεοζίτες μεγάλου βιολογικού ενδιαφέροντος. Ειδικότερα, νουκλεοζίτες με διακλαδισμένη αλυσίδα στο τμήμα του σακχάρου, καθώς και νουκλεοζίτες που φέρουν αμινοσάκχαρα, λήφθηκαν από τους κετονουκλεοζίτες με απευθείας πυρηνόφιλη προσθήκη. Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι οι κετο-πυρανονουκλεοζίτες παίζουν σημαντικό ρόλο σε συνθετικές και βιοσυνθετικές διαδικασίες και επιπλέον ένας σημαντικός αριθμός αυτών εμφανίζει ενδιαφέρουσα αντικαρκινική και αντιική δράση.

### **1.10 Ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες**

Μία ασυνήθιστη κατηγορία νουκλεοζιτών με τροποποιημένο εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο αποτελούν οι ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες, οι οποίοι διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικών και αντιικών ιδιοτήτων. Στα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα ο δακτύλιος του σακχάρου περιλαμβάνει ένα διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα σε  $\alpha,\beta$ -θέση ως προς την κετονομάδα. Οι ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες έχουν καθιερωθεί για την αντινεοπλασματική δραστηριότητα και τα ανοσοκατασταλτικά τους χαρακτηριστικά. Αποδείχθηκε ότι όχι μόνο παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης διάφορων καρκινικών κυτταρικών σειρών *in vitro* και της λευχαιμίας L1210 *in vivo* αλλά επίσης ότι αποτελούν και σημαντικά συνθετικά ενδιάμεσα στο πεδίο των νουκλεοζιτών, λόγω της χημικής τους σταθερότητας στα διάφορα μέσα. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αυτών των νουκλεοζιτών, αποτελεί η ένωση 1-(3',4'-dideoxy- $\alpha$ -pent-3'-enopyranosyl-2'-ulose)-5-fluorouracil (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10.** 1-(3',4'-dideoxy- $\alpha$ -pent-3'-enopyranosyl-2'-ulose)-5-fluorouracil

Οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για να προσδιοριστεί η σχέση δομής-δράσης των ακόρεστων κετονουκλεοζιτών, απέδειξαν ότι μοναδική δομική απαίτηση για την εμφάνιση της αντικαρκινικής τους δράσης αποτελεί η ύπαρξη του ηλεκτρονιόφιλου C=C-C=O συστήματος στο τμήμα του σακχάρου. Επιπλέον, η δράση αυτή εμφανίστηκε να είναι ανεξάρτητη από την ανωμερική απεικόνιση, την

αξονική ή ισημερινή θέση της βάσης και τέλος την *L*- ή *D*- διάταξη του σακχάρου. Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης αυτών των ενώσεων δεν είναι σαφής, φαίνεται ότι παρεμποδίζουν τη σύνθεση του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών και ότι αντιδρούν με τις πρωτεϊνικές ομάδες σουλφυδρυλίου. Μία άλλη σημαντική παράμετρος που συνεισφέρει στη βιολογική σπουδαιότητα των παραπάνω μορίων αποτελεί η ύπαρξη του διπλού δεσμού στο τμήμα του σακχάρου, ο οποίος προκαλεί ακαμψία στο δακτύλιο, όμοια με αυτή ενός φουρανονουκλεοζίτη, με αποτέλεσμα να μπορούν να θεωρηθούν ως (βιο)ισσοστερή των φυσικών νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων.

## **2. Ειδικό μέρος**

### **2.1 Στόχος – σκοπός μελέτης**

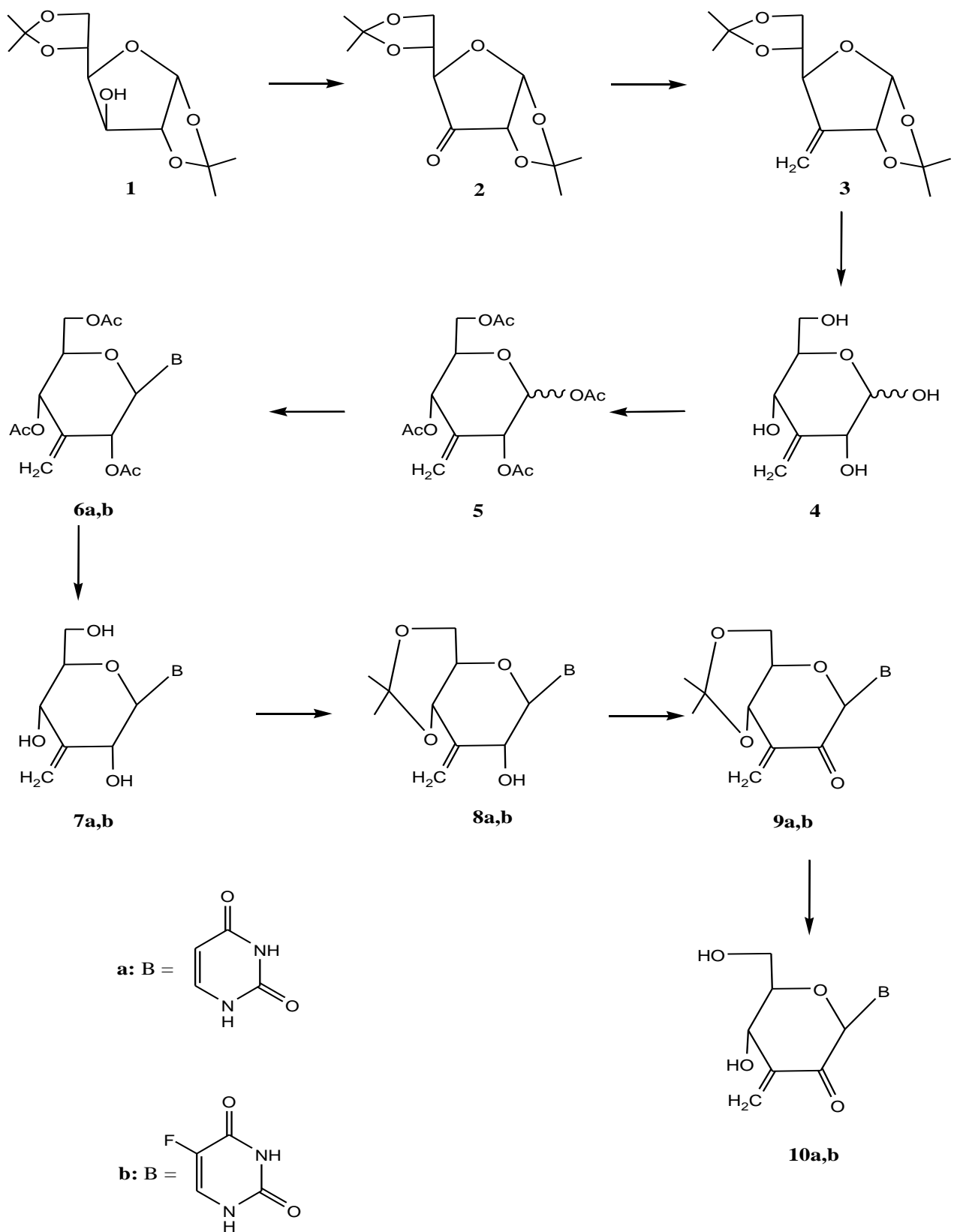
Τα αντιβακτηριδιακά, αντιικά και αντικαρκινογόνα φάρμακα είναι απ' τα πιο σημαντικά φάρμακα που ανακαλήφθηκαν τον εικοστό αιώνα και έχουν αλλάξει δραστικά τη θεραπευτική αγωγή για πολλές ασθένειες, μειώνοντας τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα. Τροποποιημένα νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξαμελή δακτύλιο έχουν επιδείξει σημαντική αντιική, αντικαρκινική και αντιβιοτική δράση.

Μια σημαντική κατηγορία αποτελούν οι ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες, οι οποίοι αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης αποτελούν το κλειδί που μεσολαβεί σε συνθετικές και βιοσυνθετικές διαδικασίες, πολλές από τις οποίες έχουν ως αποτέλεσμα αντιογκογονική δράση. Από την άλλη, νουκλεοζιτικά ανάλογα

που φέρουν εξωκυκλικό μεθυλένιο έδειξαν επίσης αντικαρκινική και αντιική δράση . Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που φέρουν το  $\alpha,\beta$ -κετοακόρεστο σύστημα στο τμήμα του σακχάρου, εμφανίστηκαν αποτελεσματικά έναντι των ROO<sup>·</sup> ριζών, αφού η παρουσία του διπλού δεσμού σε  $\alpha,\beta$ -θέση ως προς την κετονομάδα προκαλεί σημαντική σταθεροποίηση και αυξάνει την παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των εξωμεθυλενικών νουκλεοζιτών και μελετήθηκε η βιολογική τους δράση.

## **2.2 Μεθοδολογία σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων**



**Εικόνα 12 :** Σύνθεση νουκλεοζιτικών αναλόγων

Το πρώτο στάδιο της συνθετικής διαδικασίας περιλαμβάνει την οξείδωση της εμπορικά διαθέσιμης, 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-γλυκοφουρανόζης (DAG) (1) παρουσία



PDC και  $Ac_2O$  σε διχλωρομεθάνιο, με την οποία λαμβάνεται η ένωση 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη (**2**). Ακολουθεί η αντίδραση Wittig επί της ένωσης (**2**) που περιλαμβάνει την εισαγωγή της εξωμεθυλενικής ομάδας στη 3-θέση του σακχάρου, η οποία πραγματοποιείται με προσθήκη  $Ph_3PCH_2Br$ ,  $NaH$  σε THF και t-αμυλοαλκοόλης. Η συνθετική πορεία συνεχίζεται με την υδρόλυση της φουρανόζης (**3**) με ένα θερμό υδατικό διάλυμα όξινης ρητίνης IR-120  $H^+$ , η οποία οδηγεί στο σάκχαρο (**4**), το οποίο λαμβάνεται με καλή απόδοση. Τέλος, με ακετυλίωση του προϊόντος (**4**) παρουσία  $Ac_2O$  και πυριδίνης, λαμβάνεται το επιθυμητό σάκχαρο 1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-3-δεσοξυ-3-μεθυλενο-D-γλυκοπυρανόζη (**5**). Ακολουθεί η αντίδραση σύζευξης του σακχάρου (**5**) με τις σιλυλιωμένες ετεροκυκλικές βάσεις ουρακίλη και 5-φθοροουρακίλη, με αποτέλεσμα τη λήψη των επιθυμητών 1-(2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-3'-δεσοξυ-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)νουκλεοζιτών της ουρακίλης (**6a**) και της 5-φθοροουρακίλης (**6b**). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται απακετυλίωση των ενώσεων (**6a,b**) με κατεργασία με μεθανολική αμμωνία, λαμβάνοντας τα πλήρως αποπροστατευμένα παράγωγα (**7a,b**), σε πολύ καλές αποδόσεις. Η εκλεκτική προστασία των υδροξυλίων στις 4',6'-θέσεις του σακχάρου των νουκλεοζιτών (**7a,b**) με μία ισοπροπυλιδενική ομάδα, πραγματοποιείται με κατεργασία τους με 2,2-διμεθοξυπροπάνιο σε ακετόνη, οδηγώντας στα παράγωγα (**8a,b**). Οι επιθυμητοί 2'-κετο-3'-εξωμεθυλενικοί νουκλεοζίτες (**9a,b**) λαμβάνονται με οξειδωση των παραγώγων (**8a,b**) με επίδραση DMSO,  $Ac_2O$  και οξικού αιθυλεστέρα. Είναι σημαντικό να τονιστεί, ότι η συγκεκριμένη αντίδραση οξειδωσης αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο της συνθετικής πορείας. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι η αντίδραση των ενώσεων (**8a,b**) με 12-l-5-periodinane οδήγησε μεν στις επιθυμητές ενώσεις (**9a,b**) αλλά ο διαχωρισμός τους από το ιωδο-παραπροϊόν δεν κατέστη δυνατός. Επίσης, η κατεργασία των ενώσεων (**8a,b**) με DMSO και δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμίδιο (DCC), με τριοξείδιο του χρωμίου, πυριδίνη και  $Ac_2O$ , με DMSO και οξαλυλοχλωρίδιο, και τέλος με PDC και 3E μοριακά κόσκινα οδήγησαν σε μίγματα αδιαχώριστων παραπροϊόντων. Ακολουθεί η κατεργασία των ενώσεων (**9a,b**), με αέριο υδροχλώριο σε μεθανόλη η οποία οδηγεί στις ενώσεις (**10a,b**). Αξιοσημείωτο είναι τέλος, ότι η κατεργασία των ενώσεων (**9a,b**) με μίγμα μυρμηκικού οξέος και διχλωρομεθανίου, με τριφθοροοξικό οξύ σε μεθανόλη, με PPTS σε μεθανόλη, με όξινη ρητίνη IR-120  $H^+$ , και τέλος με π-τολουολοσουλφονικό οξύ σε μεθανόλη, δεν οδήγησαν στις επιθυμητές ενώσεις (**10a,b**), παρά μόνο σε ανεπιθύμητα παραπροϊόντα.

### 3. Γενικές μέθοδοι

### **3.1 χρωματογραφία χάρτου (TLC: Thin Layer Chromatography)**

Οι αντιδράσεις ελέγχονται με χρωματογραφία χάρτου, με πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με silica gel F<sub>254</sub> (0.2 mm) της εταιρίας E.Merck. Γενικά, οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων (TLC) είναι ορατές υπό λυχνία υπεριώδους (UV) και με ψεκασμό με διάλυμα θειικού οξέος 30% και θέρμανση στους 120 °C. Εξαιρέση αποτελούν οι κετονουκλεοζίτες, τα TLC χρωματογραφήματα των οποίων, ψεκάζονται με διάλυμα 2,4-δινιτροφαινυλυδραζίνης (0.1%).

Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- Διάλυμα Α : Οξικός Αιθυλεστέρας
- Διάλυμα Β: Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 4/6
- Διάλυμα Γ : Οξικός Αιθυλεστέρας / Μεθανόλη 9/1
- Διάλυμα Δ : Οξικός Αιθυλεστέρας / Μεθανόλη 9.5/0.5
- Διάλυμα Ε: Οξικός αιθυλεστέρας/ εξάνιο 6/4

### **3.2 Χρωματογραφία στήλης**

Η χρωματογραφία στήλης, επιτεύχθηκε με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση σε silica gel 60 (230-400 mesh) της εταιρίας E. Merck και οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω:

- Διάλυμα Α : Οξικός αιθυλεστέρας
- Διάλυμα Β: Εξάνιο/Οξικός αιθυλεστέρας 60/40
- Διάλυμα Γ: Εξάνιο/Οξικό αιθυλεστέρας 40/60
- Διάλυμα Δ: 95 διχλωρομεθάνιο /5 μεθανόλη.

### **3.3 Ξήρανση διαλυτών**

Οι αντιδράσεις που περιελάμβαναν άνυδρους διαλύτες ή ουσίες ευαίσθητες στην ατμόσφαιρα έλαβαν χώρα κάτω από αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε. Το ακετονιτρίλιο, το τολουόλιο και το Ν,Ν-διμεθυλοφορμαμίδιο αποστάχθηκαν υπεράνω υδριδίου του ασβεστίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å, όπου και αποθηκεύτηκε. Η πυριδίνη αποστάχθηκε παρουσία υδροξειδίου του καλίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με

μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε. Το THF αποστάχθηκε από νάτριο/βενζοφαινόνη, αμέσως πριν από τη χρήση του. Τέλος, το DMSO αποθηκεύτηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å.

### **3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων**

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR μετρήθηκαν με το φωτόμετρο Bruker 400 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για  $^1\text{H}$ . Η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (doublet), dd (doublet doublet), dtr (doublet triplet), m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

### **3.5 Μέτρηση της οπτικής ενεργότητας**

Οι μετρήσεις της γωνίας στροφής πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με τη βοήθεια του πολωσιμέτρου, τύπου Autopol I.

### **3.6 Φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας**

Τα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο τύπου PG Instruments Ltd. Ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης  $\epsilon$ , προσδιορίστηκε από την εξίσωση

$$\epsilon = \log(I_0/I) / (C \times d)$$

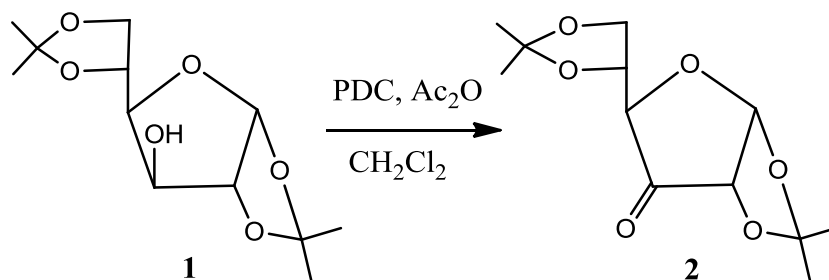
όπου  $\log(I_0/I)$  = οπτική πυκνότητα μετρημένη στο μέγιστο της απορρόφησης ( $\lambda_{\text{max}}$ )

C = η συγκέντρωση της ουσίας σε mol/L

d = το μήκος της κυψελίδας σε cm

## **4. Πειραματική διαδικασία**

#### 4.1. Σύνθεση της 1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδανο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη (2)

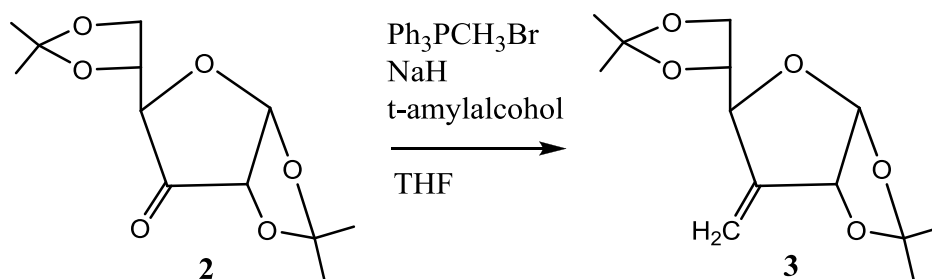


Η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδανο-α-D-γλυκοφουρανόζη (DAG) (**1**) (5.0 g, 19.20 mmol) διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο (57.2 ml) και στη συνέχεια προστέθηκε  $\text{Ac}_2\text{O}$  (5.43 mL, 57.60 mmol). Στο προκύπτον μίγμα προστέθηκε PDC (8.67 g, 23.05 mmol) και ακολούθησε θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης στο μίγμα προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας (AcOEt) και το προκύπτον παχύρρευστο διάλυμα μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel). Πραγματοποιήθηκε έκλουση με οξικό αιθυλεστέρα και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα, που περιείχε  $\text{Ac}_2\text{O}$  αραιώθηκε με τολουόλιο και στη συνέχεια με απόσταξη εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Το επιθυμητό προϊόν (**2**) (4.26 g) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Η απόδοση είναι 86%. Στον πίνακα 1 φαίνονται τα αποτελέσματα.

**Πίνακας 1**

TLC (AcOEt)	$R_f = 0,41$
Απόδοση	86 %
$[\alpha]_{\text{D}22}$	2.00(c=0.500χλωροφόρμιο)
$\lambda_{\text{max}}$	245 nm ( $\epsilon$ 6089)

#### 4.2. Σύνθεση της 1,2:5,6-Δι-O-ισοπροπυλιδανο-3-δεσοξυ-3-μεθυλενο-D-γλυκοφουρανόζη (3)

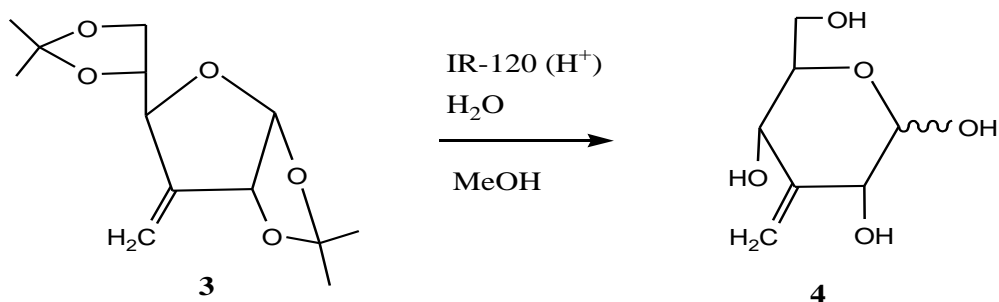


Σε ένα υπό ανάδευση μείγμα αποτελούμενο από  $\text{Ph}_3\text{PCH}_3\text{Br}$  (19.50 g, 54.48 mmol) και t-amyl alcohol (59.44 mmol, 6.51 mL) σε dry THF (268.11 mL) προστέθηκε NaH (95.10 mmol, 2.28 g) στους  $0^\circ\text{C}$  υπό άζωτο και το μίγμα αναδεύτηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το κίτρινο υλίδιο του φωσφόρου προστέθηκε διάλυμα της ένωση (**2**) (4.26g, 16.51 mmol) σε dry THF (26.28 mL) υπό άζωτο. Έπειτα το μείγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα  $\text{NaHCO}_3$  αραιώθηκε με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και εκχυλίστηκε με νερό. Η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και μετά από διήθηση συμπυκνώθηκε. Καθαρίστηκε σε χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης εξάνιο. Η ένωση συλλέχθηκε, συμπυκνώθηκε και το επιθυμητό προϊόν (**3**) ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού (3.17 g) (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2**

TLC (ΔιάλυμαB)	$R_f =$ 0,82
Απόδοση	75 %
$[\alpha]_D^{22}$	-2.0°(c=0.500 χλωροφόρμιο)
$\lambda_{\text{max}}$	237 nm ( $\epsilon$ 6078)

#### **4.3. Σύνθεση της 3-Δεσοξυ-3-μεθυλενο-D-γλουκοπυρανόζη (4)**

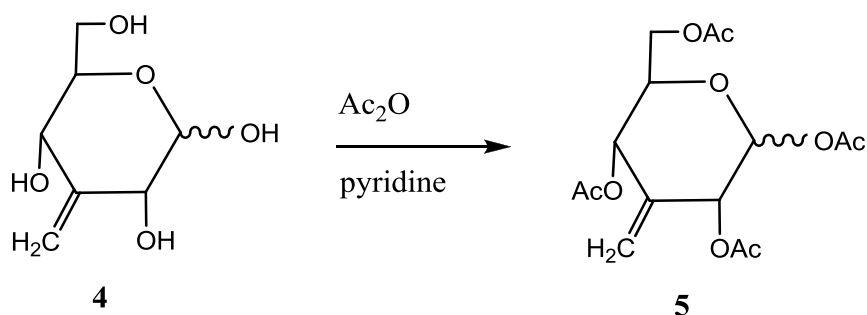


Ένα διάλυμα της ένωσης **(3)** (3.17g, 12.38 mmol) σε MeOH (19.54 mL) και νερό (110.56 mL) αναδεύτηκε στους 65 °C με ρητίνη Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>) ( 6.38 g). Μετά από θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα, για ένα βράδυ, το μίγμα διηθήθηκε και από το διήθημα απομακρύνθηκαν οι διαλύτες υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **(4)** (1.85g) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό (πίνακας 3).

### Πίνακας 3

TLC (Διάλυμα Γ)	R <sub>f</sub> = 0,41
Απόδοση	85 %
[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup>	-8.0(c=0.500 μεθανόλη)
λ <sub>max</sub>	227 nm (ε 6171)

#### 4.4. Σύνθεση της 1,2,4,6-Τετρα-Ο-ακετυλο-3-δεσοξυ-3-μεθυλενο-D-γλυκοπυρανόζη (5)

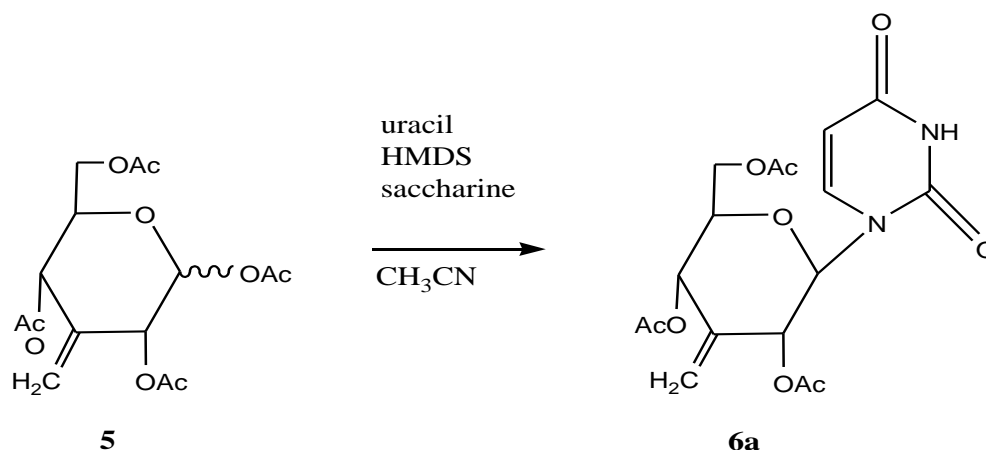


Σε ένα διάλυμα της ένωσης **(4)** (1.85 gr, 10.53 mmol) σε pyridine (37.12 mL) προστέθηκε  $\text{Ac}_2\text{O}$  (19.37 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) το διάλυμα κρύωσε στους  $0\text{ }^\circ\text{C}$  και προστέθηκε μεθανόλη (9.66 mL) για να καταστείλει την αντίδραση. Οι διαλύτες απομακρύνθηκαν υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε AcOEt και εκχυλίστηκε αρχικά με κορεσμένο διάλυμα  $\text{NaHSO}_4$  και στη συνέχεια με κορεσμένο διάλυμα  $\text{NaHCO}_3$ . Η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , διηθήθηκε και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **(5)** (3.55 gr) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού με άριστη απόδοση 98%.

**Πίνακας 4**

TLC (Διάλυμα Δ)	$R_f = 0,54$
Απόδοση	98 %
$[\alpha]_D^{22}$	$10.0^0$ (c=0.500 χλωροφόρμιο)
$\lambda_{\text{max}}$	233 nm ( $\epsilon$ 6123)

#### 4.5 Σύνθεση της 1-(2',4',6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-δεσοξυ-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλη (6a)



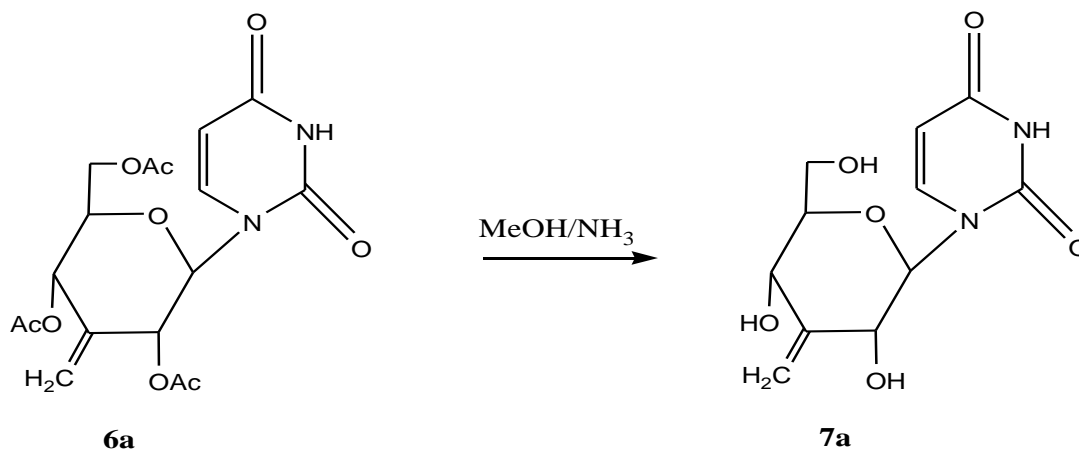
Διάλυμα αποτελούμενο από ουρακίλη (1.57 g, 14.0 mmol), HMDS (3.67 mL, 17.4 mmol) και σακχαρίνη (117.97 mg, 0.6 mmol) σε άνυδρο  $\text{CH}_3\text{CN}$  (44 mL) θερμαίνεται με κάθετο ψυκτήρα για 30 λεπτά στους  $120^\circ\text{C}$  και στη συνέχεια προστίθεται η 1,2:4,6-τετρα-*O*-ακετυλο-3-δεσοξυ-3-μεθυλενο-*D*-γλυκοπυρανόζη (**5**) (3.44 g, 10.0 mmol) καθώς και το  $\text{SnCl}_4$  (1.6 mL, 14.0 mmol). Ακολουθεί θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα για περίπου 1h (TLC), ψύξη του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη κορεσμένου διαλύματος  $\text{NaHCO}_3$ , και εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (700 mL). Η οργανική φάση πλένεται με νερό (20 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας/εξανιο(60/40). Το επιθυμητό προϊόν **6a** (2.1 g, 53%) παραλαμβάνεται με λευκή αφρώδη υφή.

#### Πίνακας 5

TLC	$R_f = 0,3$
Απόδοση	53%
$[\alpha]_D^{22}$	$-2.0^\circ$ (c=0.500 χλωροφόρμιο)
$\lambda_{\text{max}}$	257 nm ( $\epsilon$ 6139)

#### 4.6 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλ)ουρακίλη (7a)



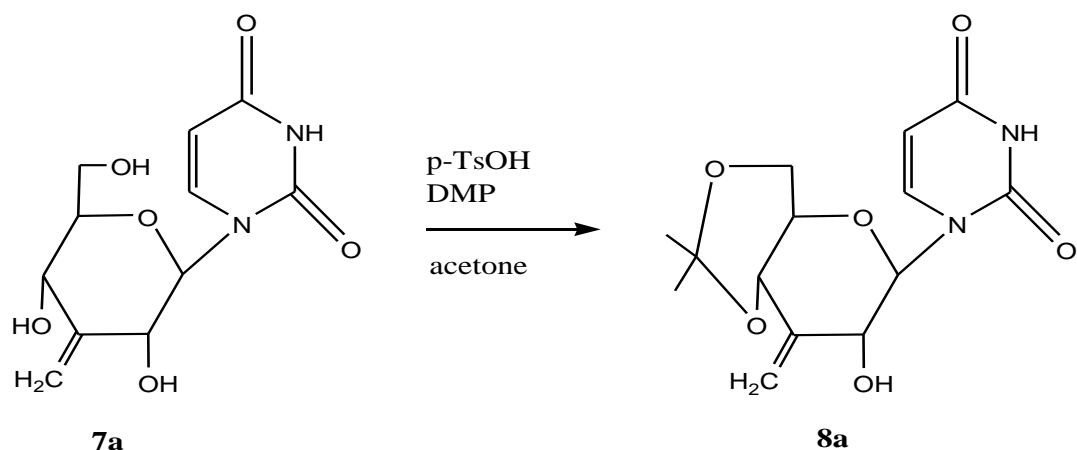


Για την ένωση (**7a**) χρησιμοποιήθηκε η ένωση (**6a**) (199.5mg, 0.48 mol) που ελήφθη από την προηγούμενη διαδικασία, προστέθηκε σε 20.13 mL κορεσμένου διαλύματος στους 0 °C, αμμωνίας/MeOH. Το διάλυμα αναδεύτηκε ολόκληρη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώθηκε υπό μειωμένη πίεση. Το προϊόν ήταν 1.29 g. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC, διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα (πίνακας 6).

**Πίνακας 6:**

TLC	R <sub>f</sub> = 0.25
Απόδοση	90 %
[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup> =	+ 2.0 <sup>0</sup> (c=0.142 μεθανόλη)
λ <sub>max</sub>	261 nm (ε 7795)

**4.7 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-4',6'-Ο-ισοπροπυλιδενιο-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλ)ουρακίλη (8a)**

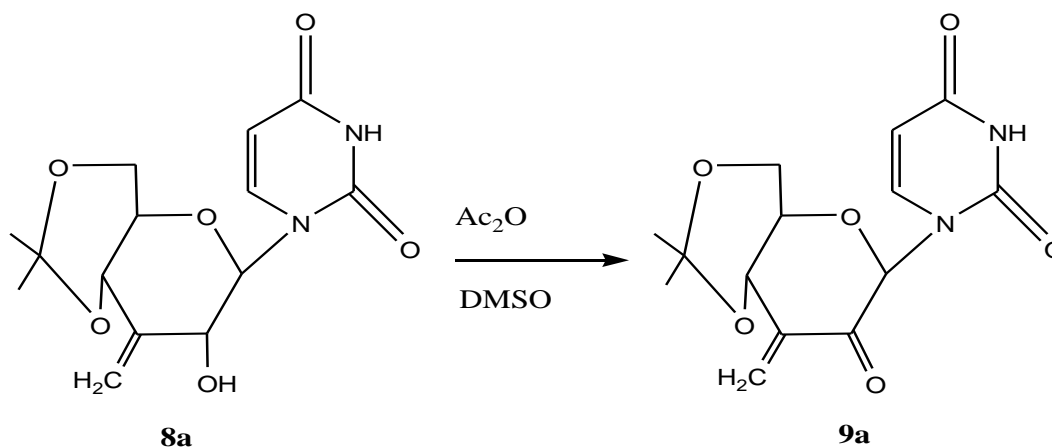


Σε ένα υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης (**7**) (1.55 g, 5.45 mmol) με άνυδρη ακετόνη (93.12 mL) και DMP (4.87 mL) προστέθηκε p-TsOH (176.24 mg, 0.93 mmol). Μετά από 3 ώρες το μίγμα της αντίδρασης εξουδετερώθηκε με τριαιθυλαμίνη. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC σε AcOEt (πίνακας 7). Στη συνέχεια από το μίγμα απομακρύνθηκαν οι διαλύτες υπό υψηλό κενό και ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα (60εξάνιο/40οξικός αιθυλεστέρας). Το επιθυμητό προϊόν (**8**) ήταν (1.11g) υπο μορφή λευκών κρυστάλλων. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 75 %.

**Πίνακας 7:**

TLC (AcOEt)	$R_f=0.15$
Απόδοση	75 %
$[\alpha]_D^{22}$	$4.0^0$ (c = 0.472 χλωροφόρμιο)
$\lambda_{\max}$	261 nm ( $\epsilon$ 7314)

#### **4.8 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-4'6'-Ο-Ισοπυροπυλιδένιο-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο-2'-ουλοζ)ουρακίλη (9a)**

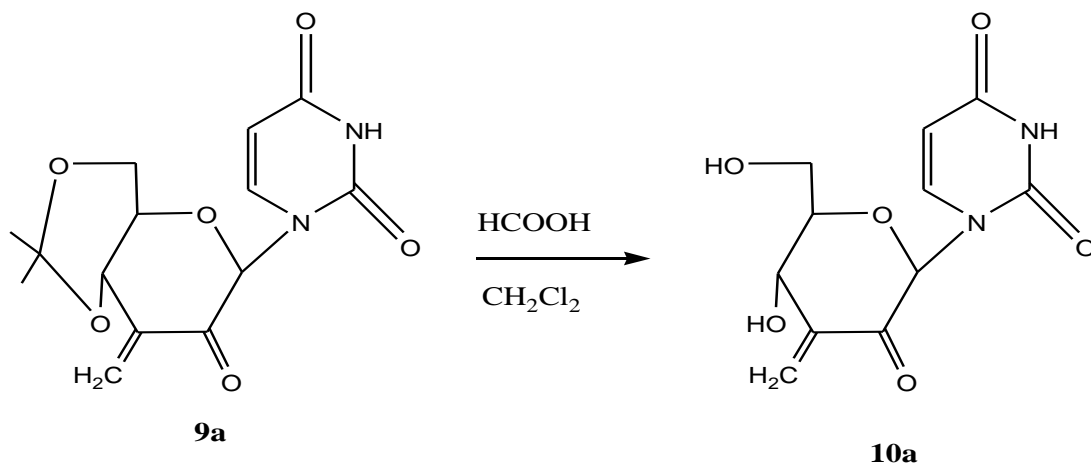


Η ένωση (**8a**) αναμιγνύεται με dry DMSO (19.05 mL) και Ac<sub>2</sub>O (9.58 mL) και θερμαίνεται με κάθετο ψυκτήρα στους 98 °C για 8 λεπτά υπό άζωτο. Το μίγμα της αντίδρασης υφίσταται μερική συμπύκνωση υπό κενό και στη συνέχεια εκχυλίζεται με CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και πλένεται με H<sub>2</sub>O. Στην οργανική φάση προστέθηκε άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ακολούθως διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα (5 εξάνιο / 5 οξικός αιθυλεστέρας). Το επιθυμητό προϊόν (**9a**) (0.61 g) ελήφθη με απόδοση της 55 % υπο μορφή λευκού αφρώδους στερεού. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC (πίνακας 8).

**Πίνακας 8**

TLC	R <sub>f</sub> = 0,2
Απόδοση	55 %
[α] <sub>D</sub> 22	4.00 (c=0.472 g/100 mL)
λ <sub>max</sub>	259nm (ε 7311)

#### 4.9 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο-2'-ουλοζ)ουρακίλη (10a)



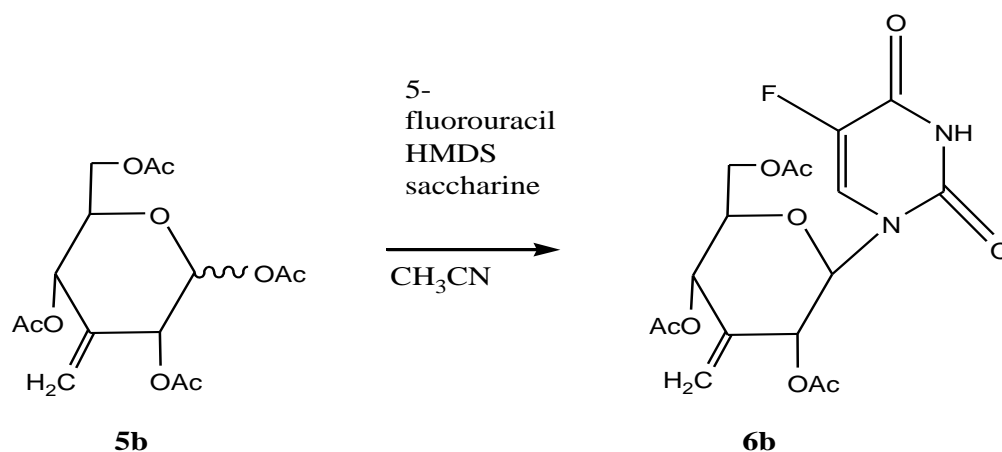
Η ένωση (**9a**) (0.61 g, 1.88 mmol) που ελήφθη από την προηγούμενη διαδικασία, διαλύθηκε σε ένα μίγμα διχλωρομεθανίου (6.41 mL) και HCOOH (6.41 mL, 90%). Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό άζωτο, διαλύθηκε σε τολουόλιο, έπειτα σε μεθανόλη και στη συνέχεια συμπυκνώθηκε υπό κενό μέχρις ξηρού. Ακολούθησε ο καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης AcOEt. Το επιθυμητό προϊόν (**10a**) (0.32 g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC (πίνακας 9)

**Πίνακας 9**

TLC	$R_f = 0,1$
Απόδοση	60
$[\alpha]_D^{22}$	$+ 2.0^0$ (c = 0.111, μεθανόλη)
$\lambda_{\max}$	259 nm ( $\epsilon$ 7220)

Τα βήματα για την σύνθεση των νουκλεοζιτικών αναλόγων με βάση την 5-φθορο-ουρακίλη από την ένωση 1 έως την ένωση 5 είναι όμοια. Το μόνο που αλλάζει είναι η βάση του νουκλεοζίτη που σ' αυτήν την περίπτωση είναι η 5-φθορο-ουρακίλη.

**4.10 Σύνθεση της 1-(2',4',6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-δεσοξυ-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)5-φθο-ροουρακίλη (6b)**

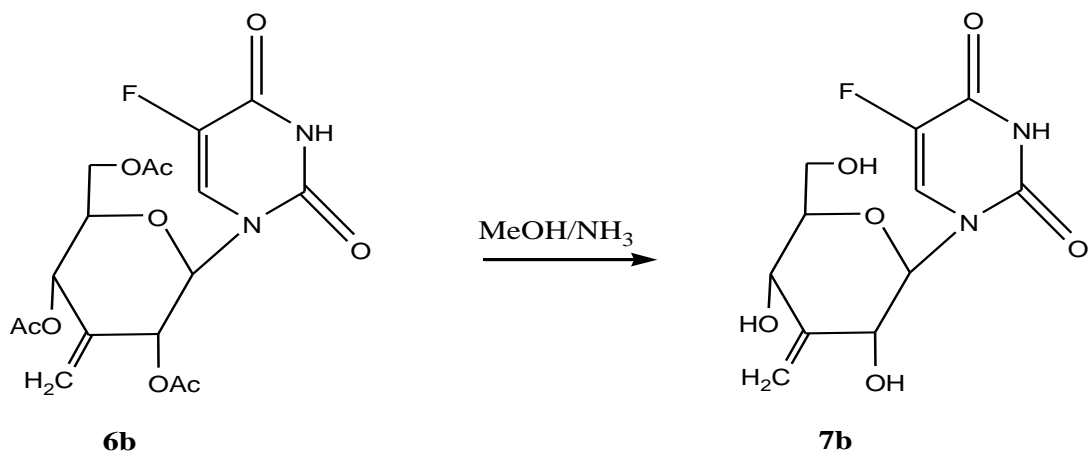


Η σύνθεση της ένωσης (**6b**) (2.57g) έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράψαμε παραπάνω για την ένωση (**6a**). Τα αποτελέσματα της σύνθεσης της ένωσης (**6b**) φαίνονται στον πίνακα 10.

**Πίνακας 10**

TLC	R <sub>f</sub> = 0,3
Απόδοση	58%
[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup>	2.0° (c=0.283 χλωροφόρμιο)
λ <sub>max</sub>	261 nm (ε7446)

**4.11 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη (7 b)**

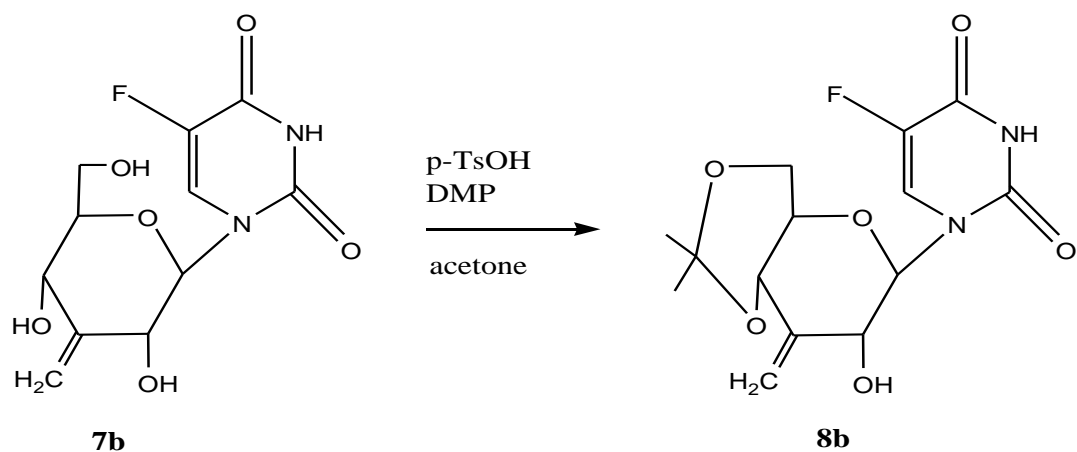


Η σύνθεση της ένωσης (**7b**) (1.65g) έγινε με τον ίδιο τρόπο με την σύνθεση της ένωσης (**7a**). Τα αποτελέσματα από την σύνθεση της ένωσης (**7b**) φαίνονται στον πίνακα 11

**Πίνακας 11:**

TLC	$R_f = 0.25$
Απόδοση	92%
$[\alpha]_D^{22}$	$+ 10.0^0$ (c=0.660 μεθανόλη)
$\lambda_{\max}$	269 nm ( $\epsilon$ 6019)

**4.12 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-4',6'-O-ισοπυροπυλιδενιο-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη (8b)**

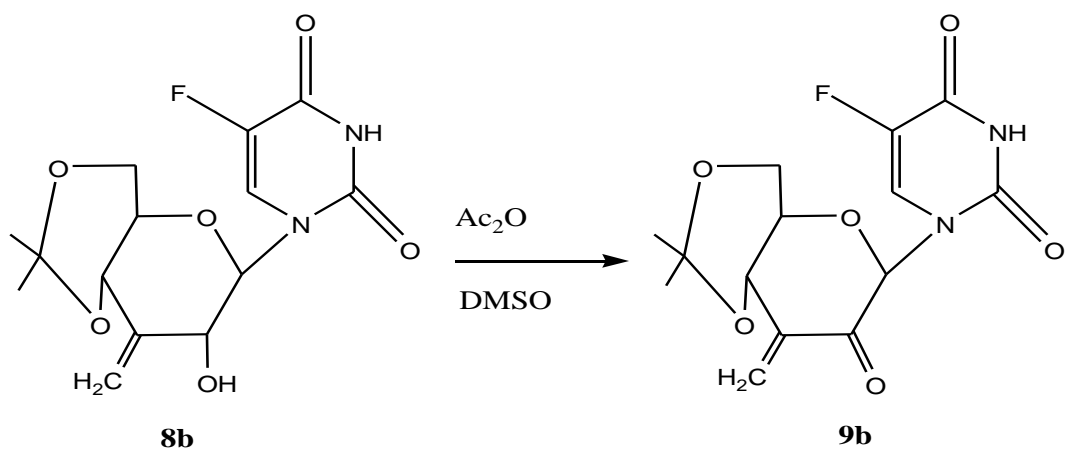


Η σύνθεση της ένωσης (**8b**) (1.27g) έγινε με τον ίδιο τρόπο με την σύνθεση της ένωσης (**8a**). Τα αποτελέσματα της σύνθεσης της ένωσης (**8b**) φαίνονται στον πίνακα 12

**Πίνακας12**

TLC (AcOEt)	$R_f=0,15$
Απόδοση	68%
$[\alpha]_D^{22}$	$8.0^0$ (c = 0.428 χλωροφόρμιο)
$\lambda_{\max}$	267 nm ( $\epsilon$ 6018)

**4.13 Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-4',6'-O-ισοπροπυλιδενιο-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο-2'-ουλοζο)5-φθοροουρακίλη (9b)**



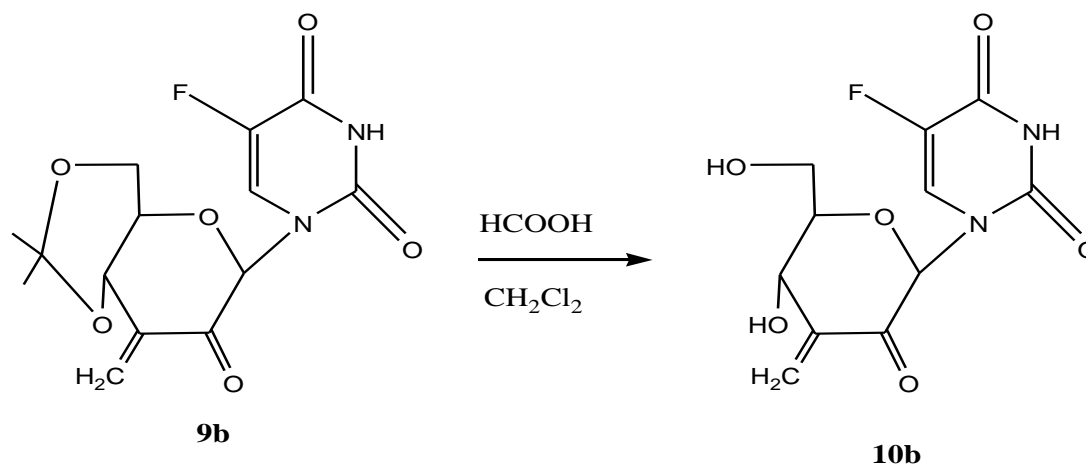
Η σύνθεση της ένωσης **(9b)** (0.58g) έγινε με την ίδια πειραματική διαδικασία με την σύνθεση της ένωση **(9a)**. Τα αποτελέσματα της σύνθεσης της ένωσης **(9b)** φαίνονται στον πίνακα 13.

**Πίνακας 13**

TLC	$R_f = 0,2$
Απόδοση	46%
$[\alpha]_{D22}$	8.00(c=0.428χλωροφόρμιο)
$\lambda_{max}$	262 nm ( $\epsilon$ 6009)



**4.14. Σύνθεση της 1-(3'-Δεσοξυ-3'-μεθυλενο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο-2'-ουλοζο)5-φθοροουρακίλη (10b)**



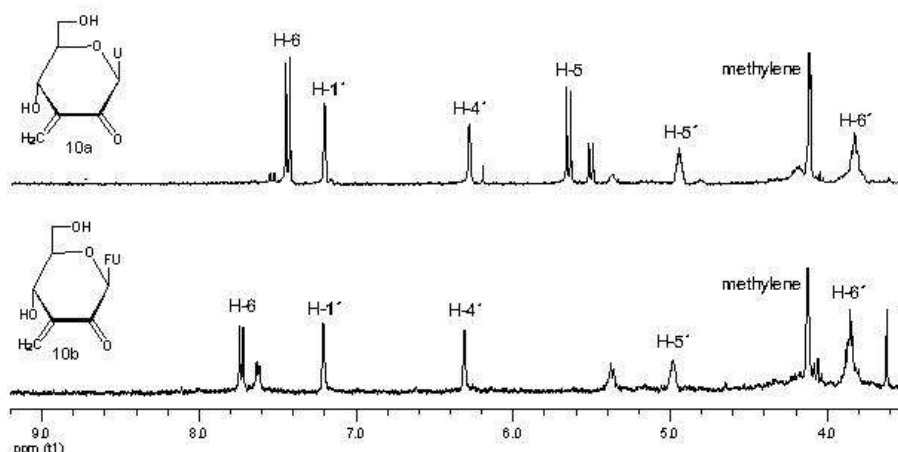
Η ίδια πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την σύνθεση της ένωσης **(10a)** χρησιμοποιήθηκε και για την σύνθεση της **(10b)**. Τα αποτελέσματα της σύνθεσης της ένωσης **(10b)** (0.28g) φαίνονται στον πίνακα 14

**Πίνακας 14**

TLC (AcOet)	$R_f = 0,1$
Απόδοση	55%
$[\alpha]_D^{22}$	$-26.0^0$ (c=0.367, μεθανόλη)
$\lambda_{max}$	262 nm ( $\epsilon$ 9525)

**5. Ταυτοποίηση με  $^1H$  NMR**

Από τη μελέτη των φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  των κετο-εξωμεθυλενικών νουκλεοζιτών (**10a,b**) σε δευτεριωμένη ακετόνη εμφανίζεται το σήμα του πρωτονίου  $\text{H-1}'$  γύρω στα 7.21 ppm ως απλή κορυφή και για τις δύο ενώσεις, επιβεβαιώνοντας την έλλειψη του πρωτονίου στη θέση 2' του σακχάρου. Και για τους δύο νουκλεοζίτες, η ευρεία απλή κορυφή γύρω στην περιοχή των 6.22 ppm, αντιστοιχεί στο σήμα του πρωτονίου  $\text{H-4}'$  του σακχάρου, ενώ η επόμενη ευρεία απλή κορυφή που διακρίνεται γύρω στην περιοχή των 4.98 ppm, αντιστοιχεί στο σήμα του πρωτονίου  $\text{H-5}'$  του σακχάρου. Τα δύο πρωτόνια της εξωμεθυλενικής ομάδας εμφανίζονται ως μία απλή κορυφή και για τους δύο νουκλεοζίτες γύρω στην περιοχή των 4.12 ppm. Τέλος, και στα δύο φάσματα διακρίνεται το σήμα των δύο πρωτονίων  $\text{H-6}'$  του υδατανθρακικού δακτυλίου, γύρω στα 3.88-3.76 ppm ως πολλαπλή κορυφή. Τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  για τις ενώσεις (**10a,b**) φαίνονται στην εικόνα 13.

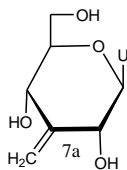
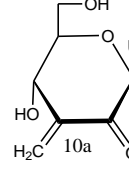
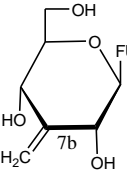
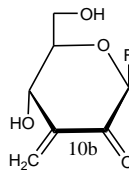


## 6.Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης γλυκοπυρανονουκλεοζιτών. Η νέα αυτή τάξη αποτελείται από πυρανονουκλεοζίτες που φέρουν ως ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη και την 5-φθορο-ουρακίλη εξωμεθυλένιο στη θέση 3' και κετονομάδα στη θέση 2' του σακχάρου. Η πιθανή αντιική, αντικαρκινική και βιολογική δράση αποτέλεσε το έναυσμα για την εύρεση μιας σχετικά εύκολης πειραματικής διαδικασίας, με σύντομα βήματα, για την σύνθεση αυτών των γλυκοπυρανονουκλεοζιτών. Η ταυτοποίηση των παραπάνω ενώσεων έγινε μέσω του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού <sup>1</sup>H NMR. Η σύνθεση και η βιολογική δράση των πυρανονουκλεοζιτών που έχουν ουρακίλη και 5-φθορο-ουρακίλη ως ετεροκυκλική βάση, εξωμεθυλένιο στη θέση 3' και κετονομάδα στη θέση 2' του σακχάρου αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες συντελούν στην αντιμετώπιση και στη θεραπεία ασθενειών δρώντας ως αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες. Οι κετονουκλεοζίτες αποτελούν το «κλειδί» που μεσολαβεί σε συνθετικές και βιοσυνθετικές διαδικασίες, πολλές από τις οποίες έχουν ως αποτέλεσμα αντιογκογονική δράση. Έχει βρεθεί ότι οι κετονουκλεοζίτες επιδεικνύουν αξιόλογη αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Επίσης, νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξωμεθυλένιο χρησιμοποιούνται ως αποτελεσματικά φάρμακα για την αντιμετώπιση ασθενειών ή βρίσκονται υπό κλινικές μελέτες με σκοπό μακροπρόθεσμα να εφαρμοστεί η δράση τους. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που περιέχουν εξωμεθυλένιο φωσφορυλιώνονται από κινάση του κυττάρου ξενιστή και ενεργοποιούνται. Αυτή η ενεργός τους μορφή αναστέλλει τη δράση της ιικής DNA πολυμεράσης, επειδή δεσμεύονται στην ενεργό περιοχή του ενζύμου. Με αυτόν τον τρόπο δεν ολοκληρώνεται η αντιγραφή του γενετικού υλικού του ιού και έτσι ο ιός δεν καταφέρνει να επιβιώσει, να πολλαπλασιαστεί και να εξελιχθεί έτσι ώστε να δυσχεραίνει την υγεία του ασθενούς. Η ραγδαία ανάπτυξη της φαρμακολογίας και της φαρμακευτικής χημείας συνετέλεσε στην αύξηση του βιοτικού επιπέδου, στη διεύρυνση των ορίων ηλικίας και στην αντιμετώπιση ασθενειών που δυσχεραίνουν τη ζωή του ατόμου. Φάρμακα που ως δραστική ουσία έχουν νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία θανατηφόρων ασθενειών όπως η ηπατίτιδα Β (HBV), AIDS και καρκίνος. Παρόλα τα θετικά αποτελέσματα που έχουν, υπάρχει και ένα πλήθος αρνητικών συνεπειών. Φαρμακευτικά σκευάσματα που περιέχουν νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι λογικό να έχουν παρενέργειες. Ένα μεγάλο μέρος της τοξικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων, συσχετίζεται άμεσα με το βαθμό, στον οποίο οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για τις ανθρώπινες κινάσες και πολυμεράσες. Οι περισσότεροι νουκλεοζίτες που χρησιμοποιούνται, παρουσιάζουν ήπια συμπτώματα όπως ναυτία, διάρροια, ίλιγγο, υπνηλία. Για το λόγο αυτό, οι έρευνες

εντείνονται προκειμένου να βελτιωθεί η δράση τέτοιου τύπου φαρμακευτικών σκευασμάτων και να μειωθούν οι παρενέργειες. Τα αποτελέσματα από αυτές τις έρευνες είναι ενθαρρυντικά. Στα πλαίσια αυτού του ερευνητικού ενδιαφέροντος έγινε η σύνθεση μίας νέας τάξης πυρανοουκλεοζιτικών αναλόγων με μία κετονομάδα και μία εξωμεθυλενική ομάδα στο δακτύλιο του σακχάρου, που είναι πιθανόν να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων ειδικευμένων θεραπευτικών ενώσεων, ικανών να αντιμετωπίσουν με επιτυχία σοβαρές ασθένειες. Οι νέες ενώσεις εξετάστηκαν για την πιθανή ανασταλτική τους δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων CEM, καθώς επίσης και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa).

**Πίνακας 15.** Ανασταλτική δράση ( $IC_{50}$ ,  $\mu M$ ) των ενώσεων **7a,b** και **10a,b** έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων CEM και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa).

<u>Προϊόν</u>	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )						
	L1210	CEM	HeLa	<u>Προϊόν</u>	L1210	CEM	HeLa
 7a	>200	>200	>200	 10a	84±10	101±14	92
 7b	>200	>200	>200	 10b	0.56±0.21	9.4±3.0	1.5±0.0
<b>5-FU</b>	0.49±0.13	18±5	0.54±0.12				

Από τις τιμές  $IC_{50}$  του πίνακα 15 προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι κετο εξωμεθυλενικοί νουκλεοζίτες **10a,b** παρουσίασαν αυξημένη κυτταροστατική δράση σε σχέση με τους κορεσμένους εξωμεθυλενικούς νουκλεοζίτες **7a,b** γεγονός που αποδεικνύει ότι η παρουσία της κετονομάδας στο τμήμα του σακχάρου είναι απολύτως αναγκαία. Χαρακτηριστική είναι η αυξημένη κυτταροτοξική δράση που εμφάνισε ο κετο εξωμεθυλενικός νουκλεοζίτης της 5-φθοροουρακίλης **10b**. Οι νέοι πυρανονουκλεοζίτες **7a,b** και **10a,b** δεν παρουσίασαν αντική δράση έναντι μίας σειράς DNA και RNA ιών. Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, διαπιστώθηκε ότι απαραίτητη δομική προϋπόθεση για την εμφάνιση βιολογικής δράσης, αποτελεί η ύπαρξη του εξωμεθυλενικού-κετο συστήματος, στο τμήμα του σακχάρου των νουκλεοζιτών.

## **6 Βιβλιογραφία**

Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botic, T.; Cencic, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5448.

Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Tselios, T.; Botic, T.; Cencic, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1366.

Alaoui, M.; Lasnes, C.; Antonakis, K.; Chouroulinkov, I. *Mutagenesis* **1986**, *1*, 411.

Antonakis, K. "Hexopyranose nucleosides". In *Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C)*; Elsevier, Amsterdam, **1989**, *4*, p. 241.

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

Antonakis, K.; Chouroulinkov, I. *Biochem. Pharmacol.* **1974**, *23*, 2095.

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

Antonakis, K.; Egron, M. J. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 468.

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.; Halmos, T.; Bach, J.; Chouroulinkov, I. *Eur. J. Med. Chem.* **1980**, *15*, 237.

Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* **1995**, *67*, 155.

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

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

Benjamin Lewin, *Genes* VIII:6- 8.

Berg, J. M.; Tymoczko, J. L., Stryer L. (2001). *Βιοχημεία (Τόμος Ι) Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης* (p) 329-351.

Brady, R. C.; Bernstein, D. I. *Antiviral Res.* **2001**, *61*, 73.

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

Chong, Y.; Gumina, G.; Mathew, J. S.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2003** *45*, 3245.

Chouroulinkov, I.; Antonakis, K. *C. R. Acad. Sci. Hebd Seances Acad. Sci. D.* **1977**, *285*, 1021.

Clark, J. L.; Mason, J. C.; Hollecker, L.; Stuyver, L. J.; Tharnish, P. M.;McBrayer, T. R.; Otto, M. J.; Furman, A. P.; Schinazi, R. F.; Watanabe, K. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1712.

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

Christopher, J. Burns, Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Hepatitis C Virus (HCV), Current Medicinal Chemistry- Anti-Infective Agents, Vol. 4, No. 2, 2005.

De Clercq, E. *Biochim Biophys Acta.* **2002**, *1587*, 258.

Elion, G. B. The purine path to chromatography . *Science* **1989**, *244*, 41.

Gumina, G.; Song, G. Y.; Chu, C. K. *FEMS Microbiology Letters* **2001**, *202*, 9.

Gunaga, P.; Baba, M.;Jeong L.S. *J. Org. Chem.* **2004**,*69*, 3208.

Halliwell, B., **(2001)**. Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopaedia of life sciences*

Halmos, T.; Cardon, A.; Antonakis, K. *Chem.-Biol. Interactions* **1983**, *46*, 11.

Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4963.

Herdewijn, P.; De Clercq, E., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1591.

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

Jeong, L.S. ; Yoo, S.J. *Bioorg.Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 847.

John M. Clark, Jr and Robert L. Switzer, Πειραματική βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1992.

- Khan, A. R.; Mulligan, K. X.; Redda, K. K.; Ollapally, A. P. *Synth. Commun.* **2002**, *32*, 1023.
- Komiotis, D.; Agelis, G.; Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E. *J. Carb. Chem.* **2006**, *25*, 441.
- Komiotis, D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides Nucleotides* **1991**, *10*, 431.
- Komiotis, D.; Lim, C. T.; Dieter, J. P.; Le Breton, G. C.; Venton, D. L. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3033.
- Komiotis, D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, *7*, 219.
- Leclercq, F.; Antonakis, K. *Carbohydr. Res.* **1988**, *181*, 217 and references cited therein.
- Leclercq, F.; Antonakis, K. *Carbohydr. Res.* **1989**, *193*, 307.
- Lee, K.; Choi, Y.; Gumina, G.; Zhou, W.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1313.
- 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.
- MacCoss, M.; Robins, M. J. "Anticancer Pyrimidines, Pyrimidine Nucleosides and Prodrugs". In the chemistry of Antitumor Agents; Wilman, D. E. V. Ed.; Chapman and Hall: New York, **1990**, p. 261.
- 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.
- Matsuda, A.; Takenuki, K.; Sasaki, T.; Ueda, T. *J. Med. Chem.* **1991a**, *34*, 812.
- 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.



McMurry, John Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, (2000) : 151-152, 905

Ollapally, A. P.; Dorange, I. B.; Whitaker, T. L. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*, 703.

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.

Pastor-Anglada, M.; Felipe, A.; Casado, J. *TiPS* **1998**, *19*, 424.

Paterson, J.; Uriel, C.; Egron, M. J.; Herscovici, J.; Antonakis, K.; Alaoui, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 779.

Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* **1992**, *11*, 903.

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.

Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Ramsey, C. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2005**, *45*,287.

Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis, D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *International Journal of Molecular Sciences* **2007** *8*, 695

Takenuki, K.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T.; Fujii, A.; Yamagami, K. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1063.

Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Manta, S.; Agelis, G.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Archiv der Pharmazie* **2009**, *342*, 353.

Undurti N.Das, *Med Sci Monit*, **2002** *8*, 79.

Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3154.

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

Vender, M.D.; Sherman, P.D.; Luciano, P.D.; Tsakoulos, D.M.; Φυσιολογία του ανθρώπου: μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού. Εκδόσεις Πασχαλίδης (8<sup>η</sup> έκδοση) **2001**.

Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2033.

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.

[www.cf.ac.uk/phrmy/chemEd/presentations.html](http://www.cf.ac.uk/phrmy/chemEd/presentations.html)

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

Yoo S. J.; Kim, H.O.; Lim Y.; Kim J.; Jeong, L. S.; *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10,215.

Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3399.