

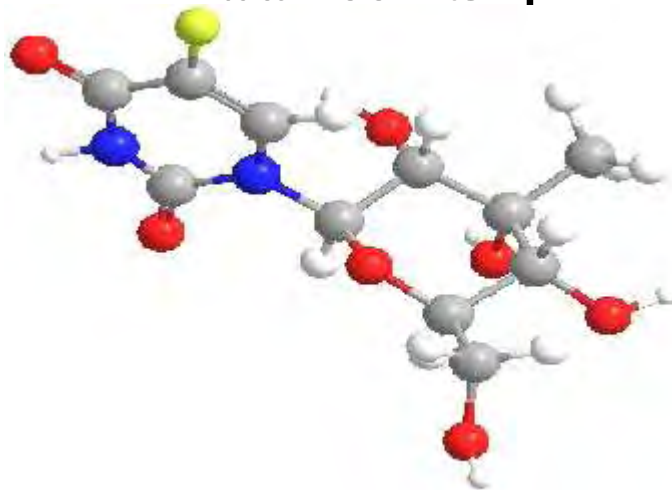


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ "ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ – ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ"

Διπλωματική Εργασία

3' - ΜΕΘΥΛΟ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ. ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ

Ιωάννου Ελένη



Λάρισα 2014

Διπλωματική εργασία

“3’ - Μέθυλο νουκλεοζίτες. Σύνθεση και βιολογική αποτίμηση.”

“3’ - Methyl nucleosides. Synthesis and biological evaluation.”

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Μαρκουλάτος Παναγιώτης – Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος – Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Επιβλέπων καθηγητής ήταν ο Καθ. Κομιώτης Δημήτριος τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά για το ενδιαφέρον, την υποστήριξη και εμπιστοσύνη που μου επέδειξε καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του “εντός και εκτός” του εργαστηρίου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη διδάσκουσα κα. Μαντά Στυλιανή και τον διδάκτορα κο. Κυρίτση Χρήστο για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κο. Κολλάτο Νικόλαο και την υποψήφια διδάκτορα κα. Δημοπούλου Αθηνά για τις επικοινωνητικές τους υποδείξεις για την περάτωση του πειραματικού μέρους αυτής της διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλο το υπόλοιπο προσωπικό και τα μέλη του εργαστηρίου για την υποδοχή και το κλίμα συνεργασίας που φρόντισαν να επικρατεί καθ’ όλη τη διάρκεια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Υδατάνθρακες	9
1.2. Υδατάνθρακες και σχηματισμός ημιακετάλης	9
1.3. Νουκλεοζίτες	12
1.4. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών	13
1.5. Νουκλεοζίτες με αντικαρκινική δράση	16
1.6. Νουκλεοζίτες με αντιική δράση	18
1.7. Πυρανονουκλεοζίτες	19
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	23
2.1. Σκοπός	23
3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	24
3.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)	24
3.2. Χρωματογραφία στήλης	24
3.3. Ξήρανση διαλυτών	25
3.4. Ταυτοποίηση ενώσεων	25
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	26
4.1. Επισκόπηση της σύνθεσης της 1-(3'-C- μέθυλο- 3'- υδροξυ -β-D- γλυκοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης	26
4.1.1. Μεθοδολογία σύνθεσης	27
4.1.2. Σύνθεση της 1,2:5,6-Δις-O-ισοπροπυλιδενο- α-D- ριβοεξοφουρανοζο- 3-ουλόξης	27
4.1.3. Σύνθεση της 3'-C- μέθυλο -1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D- αλλοφουρανόξης	28

4.1.4.	Σύνθεση της 3'-C-μέθυλο-3- υδροξυγλυκόζης	29
4.1.5.	Σύνθεση της 3'-C-μέθυλο-1,2,4,6- τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζης	30
4.1.6.	Σύνθεση της 1-(3'-C- μέθυλο- 3'- υδροξυ -2',4',6'-τρικς-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης	30
4.1.7.	Σύνθεση της 1- (3'- C- μέθυλο- 3'- υδροξυ- β- D- γλυκοπυρανοζυλο)- 5- φθοροουρακίλης	31
4.2.	Επισκόπηση της σύνθεσης της 1'-(3'-C- μέθυλο -3'-δεοξυ-β-D-αλλοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης	32
4.2.1.	Μεθοδολογία σύνθεσης	32
4.2.2.	Σύνθεση της 3'-C-δεοξυ-1,2,5,6- Δικς-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης	34
4.2.3.	Σύνθεση της 3'-C-μέθυλο-3'-δεοξυ-αλλοφουρανόζης	35
4.2.4.	Σύνθεση της 3'-C-μέθυλο-3'-δεοξυ-1,2,4,6- τετρα-O-ακετυλο αλλοφουρανόζης	35
4.2.5.	Σύνθεση της 1'-(3'-C- μέθυλο -3'-δεοξυ-2',4',6'-τρικς-O-ακετυλο-β-D-αλλοφουρανόζη)5-φθοροουρακίλης	36
4.2.6.	Σύνθεση της 1'-(3'-C-μέθυλο -3'-δεοξυ-β-D-αλλοφουρανόζη)5-φθοροουρακίλης	37
4.2.7.	Σύνθεση της 1'-(3'-C-μέθυλο -3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης	38
5.	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹ H NMR	39
6.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	40
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι νουκλεοζίτες και τα νουκλεοτίδια είναι από τα πιο σημαντικά στοιχεία για τα κύτταρα από το γεγονός ότι είναι συστατικά του DNA και του RNA. Επιπλέον, παίζουν σημαντικούς ρόλους στις πιο θεμελιώδεις κυτταρικές μεταβολικές οδούς, ως δότες ενέργειας, δεύτεροι αγγελιοφόροι και συμπαραγόντες για διάφορα ένζυμα. Ως εκ τούτου, αποτελούν μια πλούσια πηγή στην ανακάλυψη φαρμάκων που στοχεύει νουκλεοζίτες και νουκλεοτίδια.

Οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες αποτελούν ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο καθώς εμφανίζουν σημαντική αντικαρκινική, αντιακή και αντιβιοτική δράση. Πολλά τέτοια νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν συντεθεί, που φέρουν δομικές τροποποιήσεις και στο τμήμα του σακχάρου αλλά και στο τμήμα της βάσης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση του 3'-μεθυλο πυρανονουκλεοζίτη της 5'-φθοροουρακίλης καθώς και του 3'-μεθυλο-3'-δεοξυ φουρανονουκλεοζίτη της 5'-φθοροουρακίλης ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες. Αναλύονται οι συνθετικές οδοί που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή τους, η μέθοδος ταυτοποίησης τους καθώς και η βιολογική τους αποτίμηση.

ABSTRACT

Nucleosides and nucleotides are of the most important elements for cells by the fact that they are components of DNA and RNA. In addition they play important roles in the most fundamental cellular metabolic pathways such as energy donors, second messengers and cofactors for various enzymes. Therefore, there exists a rich source in drug discovery targeting nucleosides and nucleotides (Satoshi Ichikawa, 2008).

In recent years, many nucleoside analogues have been synthesized because it is recognized that many natural antibiotics with anticancer, antibacterial and antiviral action contain nucleosides consisting of monosaccharides with five or six-member ring connected to a ring-position hetero basis. Structural modifications occur both in the sugar and the base moiety.

This thesis describes the synthesis of 3'-methyl pyranonucleoside of 5'-fluorouracil and 3'-methyl-3'-deoxy furanonucleoside of 5'-fluorouracil as potential anticancer agents. The synthetic route, the method of structure identification as well as biological evaluation of the novel compounds are analyzed within.

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι πολυϋδροξυ- αλδεΐδες, πολυϋδροξυ- κετόνες ή ενώσεις που μπορούν να υδρολυθούν προς πολυϋδροξυκαρβονυλικές ενώσεις. Το όνομα υδατάνθρακες προέκυψε από το ότι οι ενώσεις αυτές έχουν κατά κανόνα το γενικό τύπο $C_n(H_2O)_m$, σαν να αποτελούνται από n άτομα άνθρακα και m μόρια νερού. Μονοσακχαρίτες καλούνται οι υδατάνθρακες που δε μπορούν να υδρολυθούν προς άλλους απλούστερους υδατάνθρακες (γλυκόζη, φρουκτόζη). Οι υδατάνθρακες που υδρολύονται προς δύο μόρια μονοσακχαρίτη ονομάζονται δισακχαρίτες (σουκρόζη, λακτόζη, μαλτόζη). Εκείνοι που υδρολύονται προς τρία μόρια μονοσακχαριτών ονομάζονται τρισακχαρίτες και γενικά οι υδρολυόμενοι προς πολλά μόρια μονοσακχαριτών ονομάζονται πολυσακχαρίτες (άμυλο, γλυκογόνο, κυτταρίνη). Η ονομασία σάκχαρα προέκυψε από τη στενή τους σχέση προς την κοινή σάκχαρη, που είναι δισακχαρίτης.

Οι μονοσακχαρίτες ή απλά σάκχαρα, ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα του μορίου τους, που είναι τρία ή περισσότερα, χαρακτηρίζονται σαν τριόζες, τετρόζες, πεντόζες, εξόζες, κλπ. Σπουδαιότεροι μονοσακχαρίτες είναι οι πεντόζες και οι εξόζες. Οι μονοσακχαρίτες χαρακτηρίζονται επίσης σαν αλδόζες ή κετόζες, ανάλογα με το αν περιέχουν στο μόριό τους αδεϋδικό ή κετονικό καρβονύλιο (Νικολαΐδης, 1996).

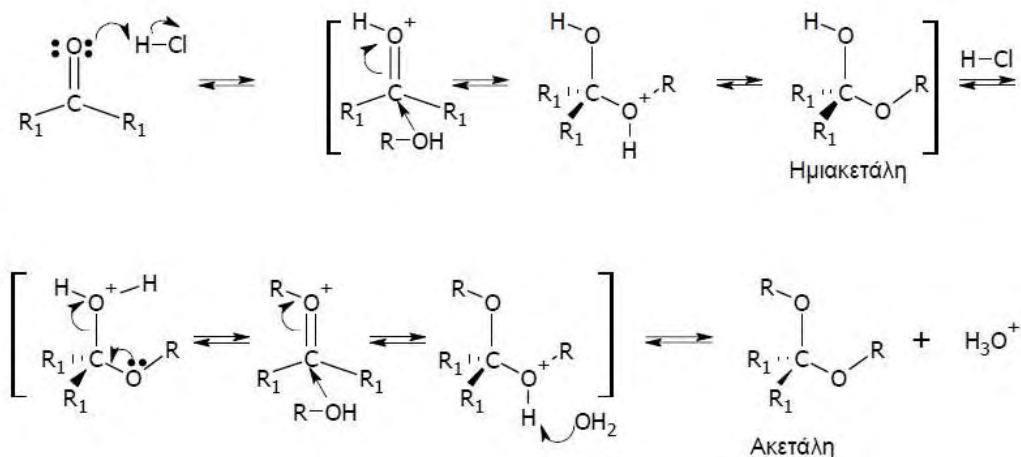
Η βιολογική τους σημασία είναι τεράστια αφού αποτελούν πηγή ενέργειας, δομικά στοιχεία των κυττάρων και άλλων μακρομορίων όπως οι γλυκοπρωτεΐνες, οι λιποπολυσακχαρίτες και τα νουκλεϊκά οξέα (ανάγοντες μονοσακχαρίτες, ριβόζη και δεοξυριβόζη).

1.2. Υδατάνθρακες και σχηματισμός ημιακετάλης

Όταν μια αλδεΐδη αντιδρά με ένα μόριο αλκοόλης, δίνει μία ημιακετάλη, ενώ όταν αντιδρά με ένα δεύτερο μόριο αλκοόλης, δίνει μια ακετάλη. Η ημιακετάλη, δεν είναι τόσο σταθερή όσο η ακετάλη, ενώ οι περισσότερες ημιακετάλες διασπώνται αυθόρμητα προς αλδεΐδη και αλκοόλη. Επομένως, οι ημιακετάλες σπάνια απομονώνονται. Οι ακετάλες είναι από τις πιο συνηθισμένες οργανικές ενώσεις στον κόσμο. Το επιτραπέζιο αλάτι, τα βαμβακερά υφάσματα και τα ξύλινα πλοία αποτελούνται από ακετάλες.

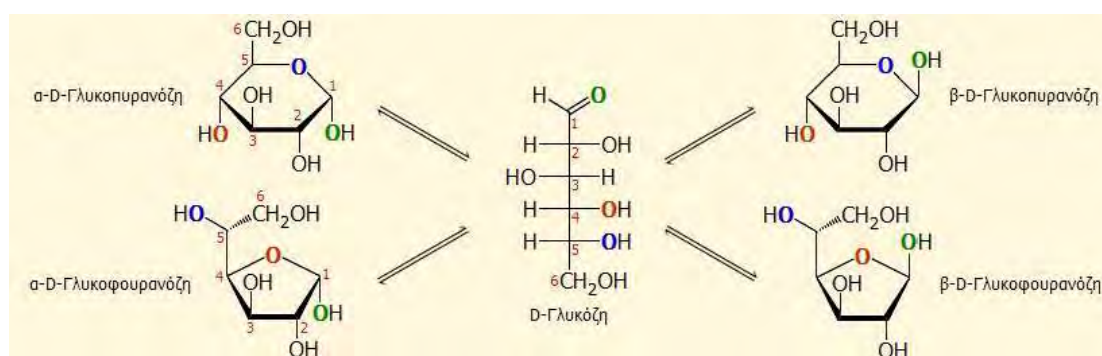
Ο μηχανισμός της αντίδρασης σχηματισμού ακεταλών μπορεί να διαιρεθεί σε δύο στάδια (σχήμα 1). Το πρώτο στάδιο είναι μια τυπική, καταλυόμενη από οξύ προσθήκη στην καρβονυλομάδα. Ο όξινος καταλύτης πρωτονιώνει την καρβονυλομάδα και η αλκοόλη (ασθενές πυρηνόφιλο) προσβάλλει το πρωτονιωμένο, ενεργοποιημένο καρβονύλιο. Με απώλεια ενός πρωτονίου από το θετικά φορτισμένο ενδιάμεσο παίρνουμε μια ημιακετάλη. Με την προσθήκη ενός

μορίου αλκοόλης, η ημιακετάλη βρίσκεται στα μισά της πορείας μετατροπής της σε «πλήρη» ακετάλη. Το δεύτερο μισό του μηχανισμού, είναι μια S_N1 υποκατάσταση της πρωτονιωμένης ημιακετάλης (L.G. Wade, J.R. 2012).



Σχήμα 1. Ο βασικός μηχανισμός σχηματισμού ακεταλών.

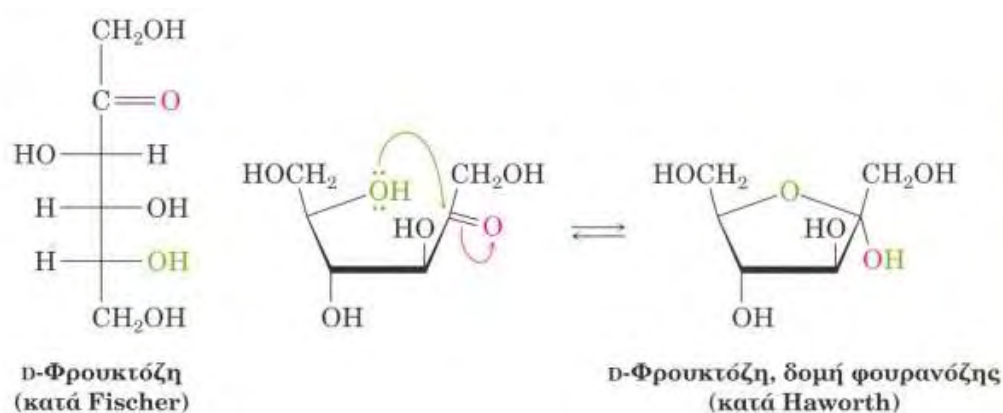
Αν η αλδεϋδομάδα και η υδροξυλομάδα ανήκουν στο ίδιο μόριο, προκύπτει μια κυκλική ημιακετάλη. Οι κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερές αν καταλήγουν σε πεντα- ή εξαμελείς δακτυλίους, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές της κλειστής και ανοικτής αλυσίδας. Οι αλδοεξόζες όπως η γλυκόζη, μπορούν να σχηματίσουν κυκλικές ημιακετάλες που περιέχουν πενταμελείς ή εξαμελείς δακτυλίους. Στην περίπτωση των πιο κοινών αλδοεξοζών, η ισορροπία ευνοεί εξαμελείς δακτυλίους με ημιακεταλικό δεσμό μεταξύ του αλδεϋδικού άνθρακα και της υδροξυλομάδας στο C5 (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Σχηματισμός κυκλικής ημιακετάλης της γλυκόζης (http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_glucose.htm)

Όλα τα σάκχαρα, δεν απαντούν ως εξαμελείς δακτύλιοι, στην ημιακεταλική μορφή τους. Ο πενταμελής, ημιακεταλικός δακτύλιος της φρουκτόζης, φαίνεται στο σχήμα 3. Πολλές αλδοπεντόζες και κετοεξόζες σχηματίζουν πενταμελείς

δακτυλίους. Οι πενταμελείς δακτύλιοι, δεν είναι τόσο πτυχωμένοι όσο οι εξαμελείς και έτσι απεικονίζονται συνήθως ως επίπεδες προβολές Haworth.

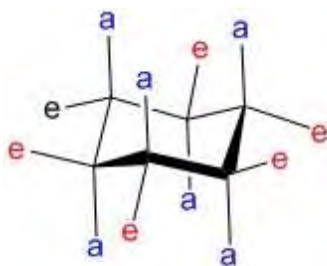


Σχήμα 3. Σχηματισμός φουρανόζης (http://www.biology.uoc.gr/courses/BIO6_Organiki_Ximia/Lectures/Lecture%2020.pdf).

Οι κυκλικές δομές των μονοσακχαριτών, ονομάζονται σύμφωνα με τους πεντα- ή εξαμελείς δακτυλίους τους. Οι εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες ονομάζονται πυρανόζες, από τον εξαμελή, κυκλικό αιθέρα πυράνιο. Οι πενταμελείς κυκλικές ημιακετάλες ονομάζονται φουρανόζες, από τον πενταμελή κυκλικό αιθέρα φουράνιο. Όταν ο δακτύλιος μιας πυρανόζης ή φουρανόζης, κλείνει, το ημιακεταλικό άτομο άνθρακα, μετατρέπεται από μία επίπεδη καρβονυλομάδα σε έναν ασύμμετρο άνθρακα. Ανάλογα με το ποιιά πλευρά της (πρωτονιωμένης) καρβονυλομάδας προσβάλλεται, η ημιακεταλική ομάδα -OH, μπορεί να κατευθύνεται πάνω ή κάτω. Οι δύο αυτοί προσανατολισμοί της ημιακεταλικής ομάδας -OH, δίνουν διαστερεομερή προϊόντα που ονομάζονται ανωμερή. Το ημιακεταλικό άτομο άνθρακα ονομάζεται ανωμερικός άνθρακας και αναγνωρίζεται εύκολα ως το μόνο άτομο άνθρακα που συνδέεται με δύο οξυγόνα (L.G. Wade, J.R. 2012). Για παράδειγμα, στη γλυκόζη με την αντιστρεπτή της κυκλοποίηση προκύπτουν δύο δομές, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη. Στην περίπτωση της α-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «α» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση trans ως προς τον υποκαταστάτη -CH₂OH του C-5 (δηλαδή βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). Στην περίπτωση της β-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «β» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση cis ως προς τον υποκαταστάτη -CH₂OH του C-5 (δηλαδή βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου).

Οι προηγούμενες δομές (Haworth) αν και εύχρηστες δεν μας παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης. Ο συγκεκριμένος δακτύλιος δεν είναι δυνατόν να είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα. Αντίθετα, οι δακτύλιοι της πυρανόζης μπορούν να υιοθετήσουν στερεοδιατάξεις ανάκλιτρου, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται

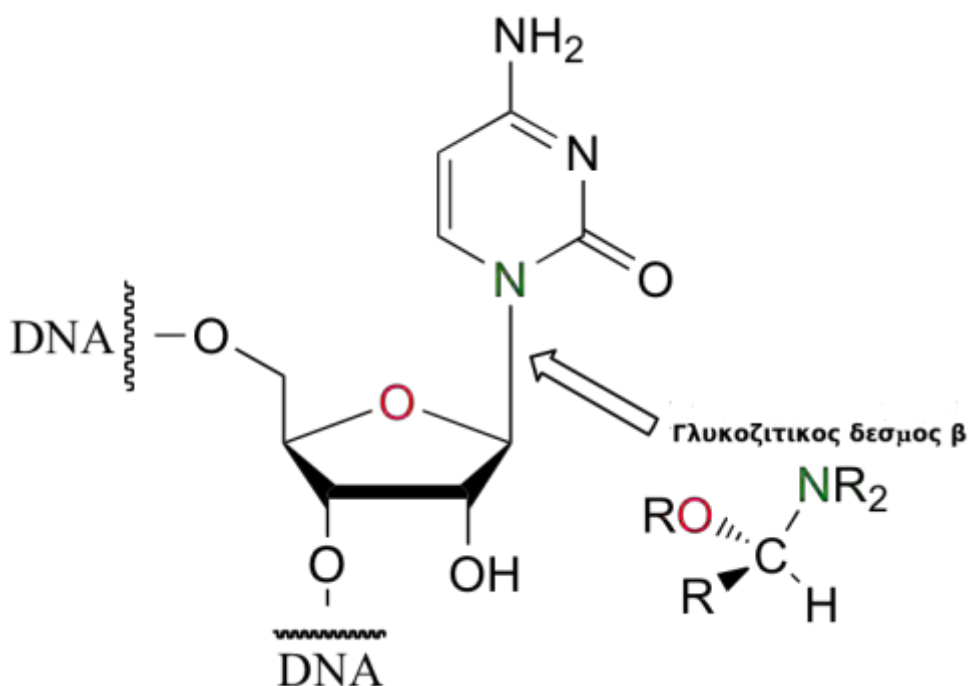
όλες οι τάσεις, εφόσον όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνιάς (McMurry, 2000, p. 151). Οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου είναι δύο ειδών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί (σχήμα 4). Οι αξονικοί δεσμοί είναι σχεδόν κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί δεσμοί είναι σχεδόν παράλληλοι προς το επίπεδο αυτό. Οι αξονικοί υποκαταστάτες προβάλλουν πάνω και κάτω από το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί υποκαταστάτες διατάσσονται στην περιφέρεια. Οι αξονικοί υποκαταστάτες, εκτός του υδρογόνου, παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλο, αν ξεπροβάλλουν από την ίδια πλευρά του δακτυλίου. Αντίθετα, υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για τους ισημερινούς υποκαταστάτες. Έτσι, ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ότι στην αξονική θέση.



Σχήμα 4. Μορφή ανάκλιντρου μιας πυρανόζης (e = ισημερινός υποκαταστάτης, a = αξονικός υποκαταστάτης)

1.3. Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς της φύσης καθώς αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Μια μονάδα που αποτελείται από μια βάση δεσμευμένη σε ένα σάκχαρο ονομάζεται νουκλεοζίτης. Οι τέσσερις μονάδες νουκλεοζιτών στο RNA ονομάζονται αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη και ουριδίνη, ενώ στο DNA ονομάζονται δεοξυαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυκυτιδίνη και θυμιδίνη. Σε κάθε περίπτωση, το N-9 μιας πουρίνης ή το N-1 μιας πυριμιδίνης συνδέεται στο C-1' του σακχάρου. Η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου όταν η δομή γράφεται με τον κλασικό τρόπο, δηλαδή η διαμόρφωση του γλυκοζιτικού δεσμού N είναι β (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Ο N- γλυκοζιτικός δεσμός β σε ένα νουκλεοζίτη (http://chemwiki.ucdavis.edu/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_With_a_Biological_Emphasis/Chapter_11%3A_Nucleophilic_carbonyl_addition_reactions/Section_11.5%3A_N-glycosidic_bonds).

Ένα νουκλεοτίδιο είναι ο φωσφορικός εστέρας του νουκλεοζίτη. Η πιο κοινή θέση εστεροποίησης σε ένα φυσικό νουκλεοτίδιο είναι η υδροξυλική ομάδα που συνδέεται στη θέση C-5' του σακχάρου. Μια ένωση που δημιουργείται από τη σύνδεση μιας φωσφορικής ομάδας στο C-5' του σακχάρου ενός νουκλεοζίτη ονομάζεται 5'- φωσφορικός νουκλεοζίτης ή 5'- νουκλεοτίδιο (L. Stryer, 2006).

Ανάλογα φυσικών νουκλεοζιτών έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των αντικαρκινικών, αντικικών, αντιβακτηριδιακών, καθώς και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους (Zhou *et al.* 2004, Perigaud *et al.* 1992, Robins *et al.* 1990, MacCoss *et al.* 1990). Ως εκ τούτου έχουν πραγματοποιηθεί πολλές τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα της βάσης όσο και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί ενδελεχώς το φάσμα των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων.

1.4. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Όπως είναι γνωστό, η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά, αλλά έχουν και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επιπλέον, αφού εισέλθουν, πραγματοποιείται ενδοκυτταρική τροποποίησή τους με σκοπό την παραγωγή των αντίστοιχων νουκλεοτιδίων τους, τα οποία χρησιμοποιούν οι πολυμεράσες ως βασικές δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA. Βασιζόμενοι στην παθητική διάχυση,

τα νουκλεοζιτικά ανάλογα, μόρια που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, χρησιμοποιήθηκαν ως αντικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες για τη θεραπεία πληθώρας ασθενειών (Zhou *et al.* 2004).

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αλληλεπιδρούν είτε με συγκεκριμένα ιικά ένζυμα είτε με κυτταρικά ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των πρόδρομων νουκλεοτιδίων του DNA και RNA, με το προκύπτων θεραπευτικό αποτέλεσμα να εξαρτάται από το ποιο ένζυμο έχει ανασταλεί. Τροποποιήσεις των φυσικών νουκλεοζιτών μπορούν να παράγουν τάξεις νουκλεοζιτών με πολύ συγκεκριμένα ένζυμα- στόχους. Με το αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για τα νουκλεοζιτικά ανάλογα, έχει δημιουργηθεί μια μεγάλη ποικιλία νουκλεοζιτικών δομών και ένα συνεχώς αυξανόμενο φάσμα ενζύμων- στόχων (Claire Simons, 2000).

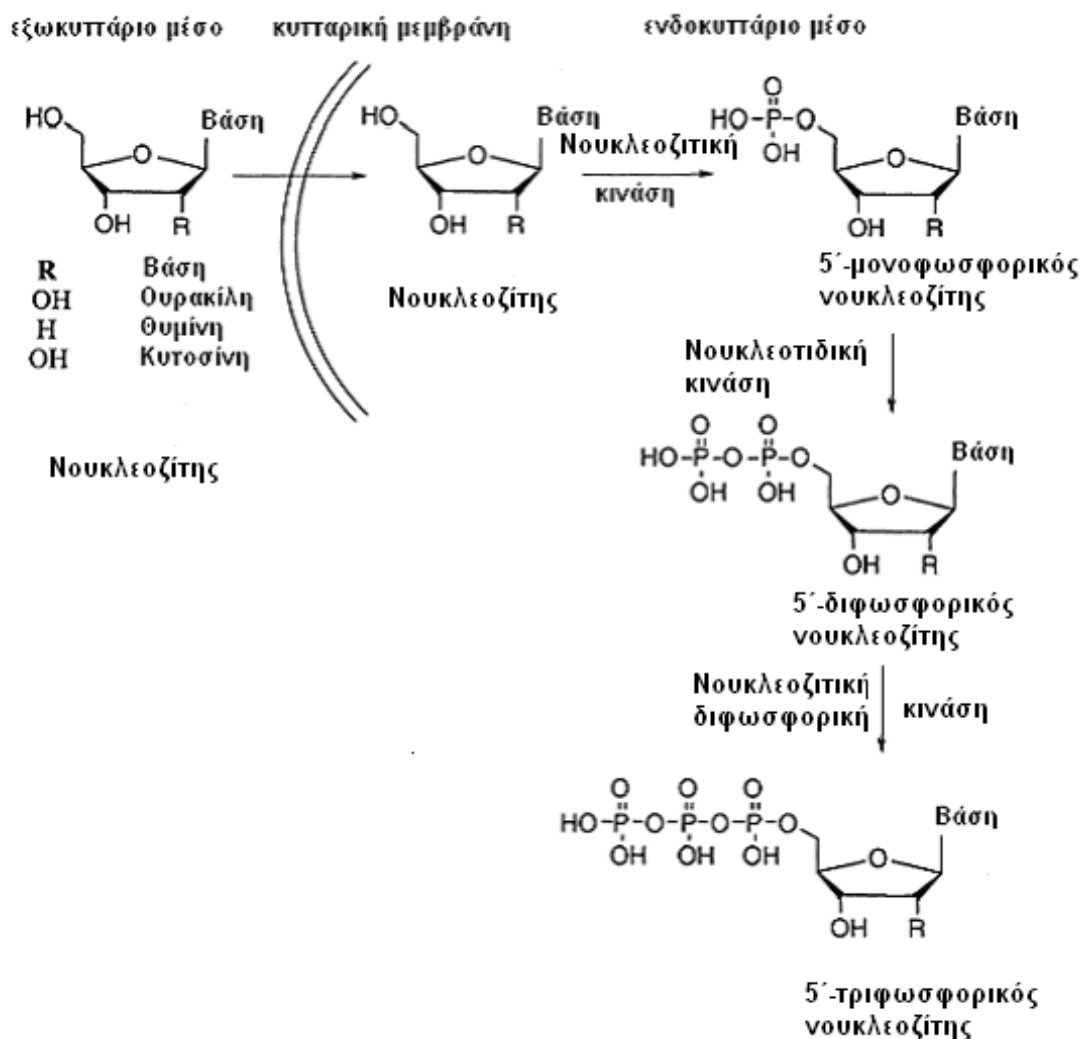
Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών αποτελούν στην πραγματικότητα ανενεργά προφάρμακα, τα οποία ενδοκυτταρικά πρέπει να τροποποιηθούν ώστε να μπορέσουν να δράσουν. Η διαδικασία αυτή συνίσταται στη φωσφορυλίωσή τους από τις κυτταρικές ή ιικές κινάσες (Arner and Eriksson, 1995). Αφού φωσφορυλιωθούν προς τις τριφωσφορικές τους δομές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA.

Ένας κοινός μηχανισμός αντιϊκής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωσή τους στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της. Οι κυτταρικές πολυμεράσες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με ταυτόχρονη απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων (Lewin 2003, Burns *et al.*, 2005). 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.

Εκτός του παραπάνω μηχανισμού, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα δρουν και μέσω άλλων μηχανισμών. Μπορούν να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της καταστολής αντιαποπτωτικών γονιδίων (Lui *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).

Για τους αντικοί νουκλεοζιτες, η φωσφορυλίωση αρχίζει με την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στην 5'-θέση του σακχάρου, η οποία καταλύεται από ειδικές ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες, προς τη δημιουργία ενός μονοφωσφορικού νουκλεοζιτη (Wagner *et al.* 2000, Balzarini 1993). Οι μετέπειτα φωσφορυλίωσεις προς τις διφωσφορικές και τριφωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών καταλύονται από νουκλεοτιδικές κινάσες και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντιστοίχως (Σχήμα 6). Η φωσφορυλίωση από ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες όπως επίσης και η χαμηλή ικανότητα διαπερατότητας των φωσφορυλιωμένων νουκλεοζιτών οδηγούν στην συσσώρευση των φαρμακολογικά ενεργών μορφών τους, στα κύτταρα που

έχουν προσβληθεί από τον ιό. Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, εντοπίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Μιμούμενα τους φυσικούς νουκλεοζίτες, τα αντικά ανάλογά τους μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τις πολυμεράσες και να ενσωματωθούν στο ικό γονιδίωμα. Η ενσωμάτωσή τους στο ικό γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει διακοπή της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, να το καταστήσει μη λειτουργικό και κατά συνέπεια να καταστείλει την αντιγραφή του ιού και την περαιτέρω παραγωγή ιοσωματιδίων. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος είναι συντηρημένος σε πολλά είδη ιών, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να παρουσιάσουν δράση έναντι μεγάλου φάσματος ιών (Chong *et al.* 2002). Αξίζει να σημειωθεί πως μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ική πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητα τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.



Σχήμα 6. Τροποποίηση των νουκλεοζιτικών αναλόγων προς την ενεργή τους μορφή μέσω ενδοκυτταρικής φωσφορυλίωσης.

Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών, οι οποίοι δρουν ως αντιβιοτικά βασίζεται είτε στο ότι καταστρέφουν συγκεκριμένα τμήματα των βακτηρίων, όπως τη μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμά τους, είτε στο ότι επιδρούν στην σύνθεση των πρωτεϊνών (Siev *et al.* 1969) και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης (Ahn *et al.* 2000).

1.5. Νουκλεοζίτες με αντικαρκινική δράση

Ο καρκίνος ευθύνεται για ένα μεγάλο ποσοστό των θανάτων στις βιομηχανικές χώρες. Εμφανίζεται αφού φυσιολογικά κύτταρα μετασχηματιστούν σε νεοπλασματικά, μέσω μεταβολής του γενετικού τους υλικού και ανώμαλης έκφρασης ορισμένων γονιδίων. Η θεραπεία ασθενών που πάσχουν από καρκίνο επιδιώκει να:

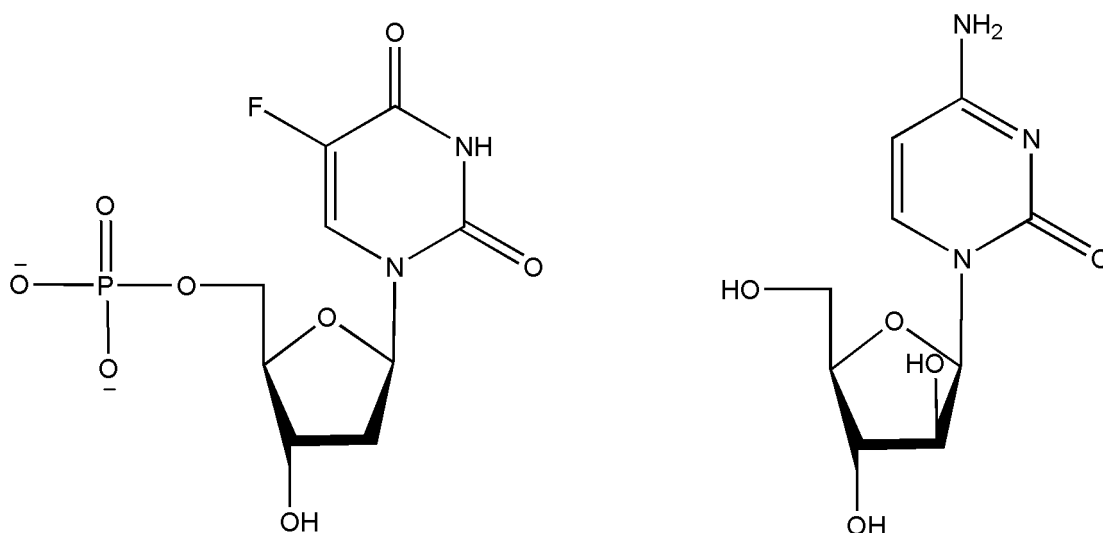
-προσφέρει ανακούφιση, για παράδειγμα άμεση ανακούφιση από δυσάρεστα συμπτώματα,

-επάγει την ύφεση ώστε να εξαφανιστούν όλα τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά του καρκίνου, ακόμη και αν είναι γνωστό πως η νόσος εξακολουθεί να υφίσταται και τέλος,

-θεραπεύσει, για το οποίο όλα τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να καταστραφούν.

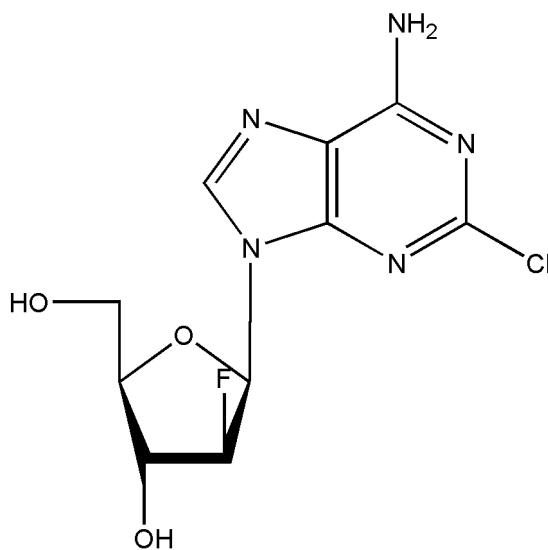
Οι επιλογές θεραπείας του καρκίνου είναι η εγχείρηση (πριν το 1955), η ακτινοθεραπεία (από το 1955 μέχρι περίπου το 1965), η χημειοθεραπεία (μετά το 1965) και τέλος, η ανοσοθεραπεία και η γονιδιακή θεραπεία.

Η αναγνώριση των αντικαρκινικών και κυτταροστατικών ιδιοτήτων των νουκλεοζιτών και των αναλόγων τους, αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Matsuda A. *et al.* 2004, Cory A. H. *et al.* 1994, Manta S. *et al.* 2010). Κάποια από τα πιο γνωστά αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα ανήκουν στην κατηγορία των αντιμεταβολιτών, μια κατάταξη των αντικαρκινικών φαρμάκων σύμφωνα με το βιοχημικό μηχανισμό της αντικαρκινικής δράσης τους. Ένα παράδειγμα τέτοιου μηχανισμού είναι η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων από πυριμιδινικούς [5'- fluorouracil, cytarabine (AraC), Σχήμα 7] και πουρινικούς ανταγωνιστές (Σχήμα 8) που έχουν υποσχόμενη δράση σε διάφορους ανθρώπινους στερεούς όγκους όπως του παγκρέατος, των ωθηκών και ο καρκίνος του πνεύμονα (Hardman J.G. *et al.* 2001).



Σχήμα 7. Οι δομές των πυριμιδινικών ανταγωνιστών 5-φθορο-ουρακίλη, φαίνεται ο ενεργός μεταβολίτης της 5'-FdUMP (αριστερά) και AraC (δεξιά).

Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).

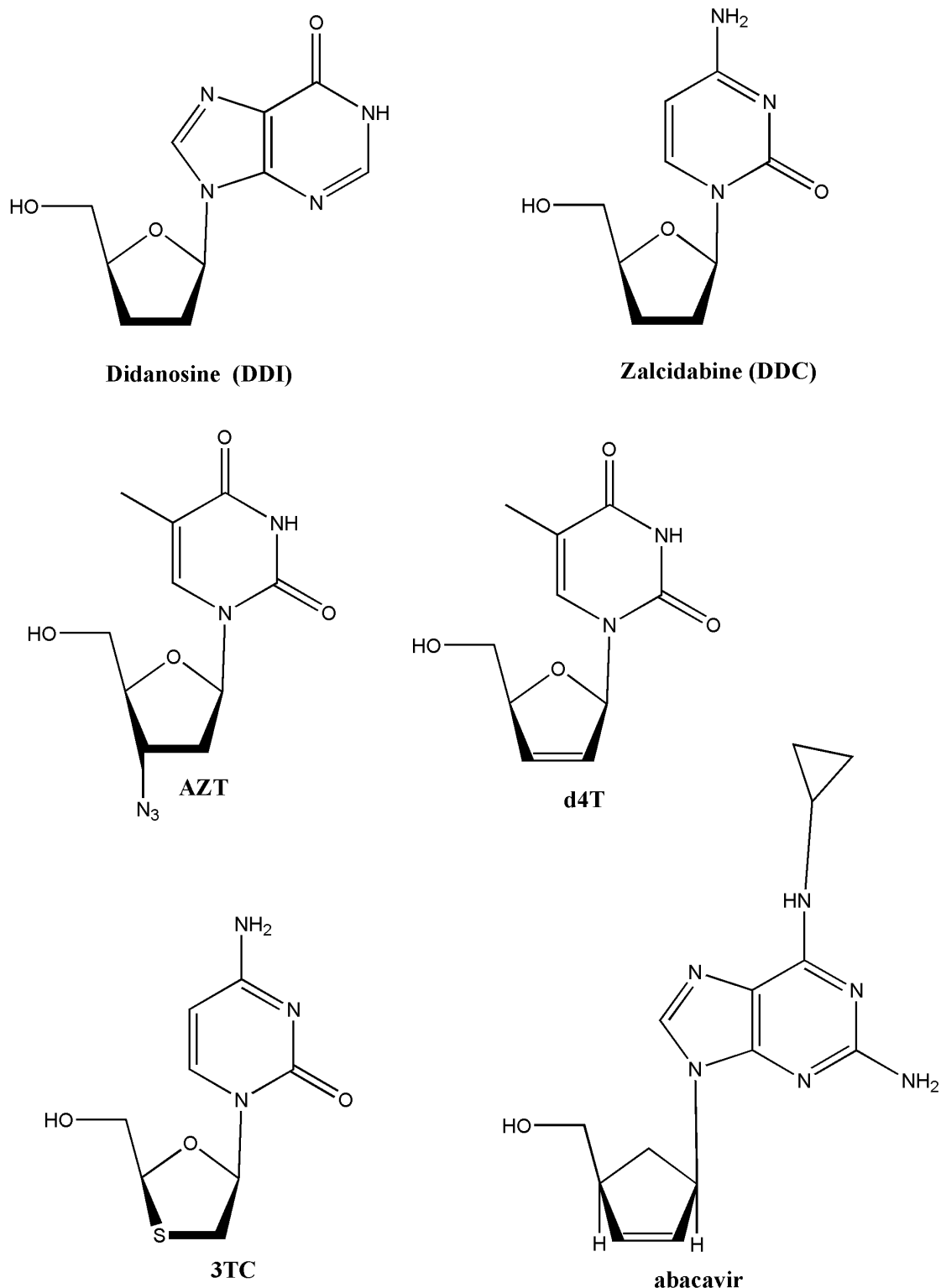


Σχήμα 8. Η δομή του Clofarabine, παράδειγμα ενός πουρινικού ανταγωνιστή (John A. Secrist, 2005).

1.6. Νουκλεοζίτες με αντιική δράση

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρεμβαλλόμενα στην σύνθεση του DNA και του RNA μπορούν να επηρεάσουν εκτός από την σύνθεση νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων και τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων (Komiotis D. *et al.* 2008, Zhou W. *et al.* 2004, Perigaund C. *et al.* 1992).

Ήδη πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στην ιατρική έναντι ιών όπως το ιού που προκαλεί το AIDS (HIV), του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV), των ερπητοϊών (HSV 1-2), του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) και του ιού του έρπητα ζωστήρα (VZV). Στην περίπτωση του HIV ανάμεσα στα νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά είναι τα ddC, AZT, ddI, d4T, abacavir και 3TC που δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού (Σχήμα 9). Για τον ιό HBV έχει ήδη εγκριθεί στην Αμερική και χρησιμοποιείται το 3TC σε συνδιασμό με ιντερφερόνη-α. Για τον CMV, τον HSV 1 και 2 και τον VZV χρησιμοποιείται πλήθος νουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως βιδαραβίνη, ακυκλοβίρη, ιδοξουριδίνη, τριφλουριδίνη, ασεδουρίδη, γανσικλοβίρη, βαλακυκλοβίρη και άλλα (Gumina G. *et al.* 2001).



Σχήμα 9. Οι δομές των νουκλεοζιτικών αναλόγων αναστολέων της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού του AIDS.

1.7. Πυρανονουκλεοζίτες

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντική ή/και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη και φέρουν τη β-απεικόνιση. Η σπουδαιότητα των πεντοζών αναγνωρίστηκε από τη στιγμή που

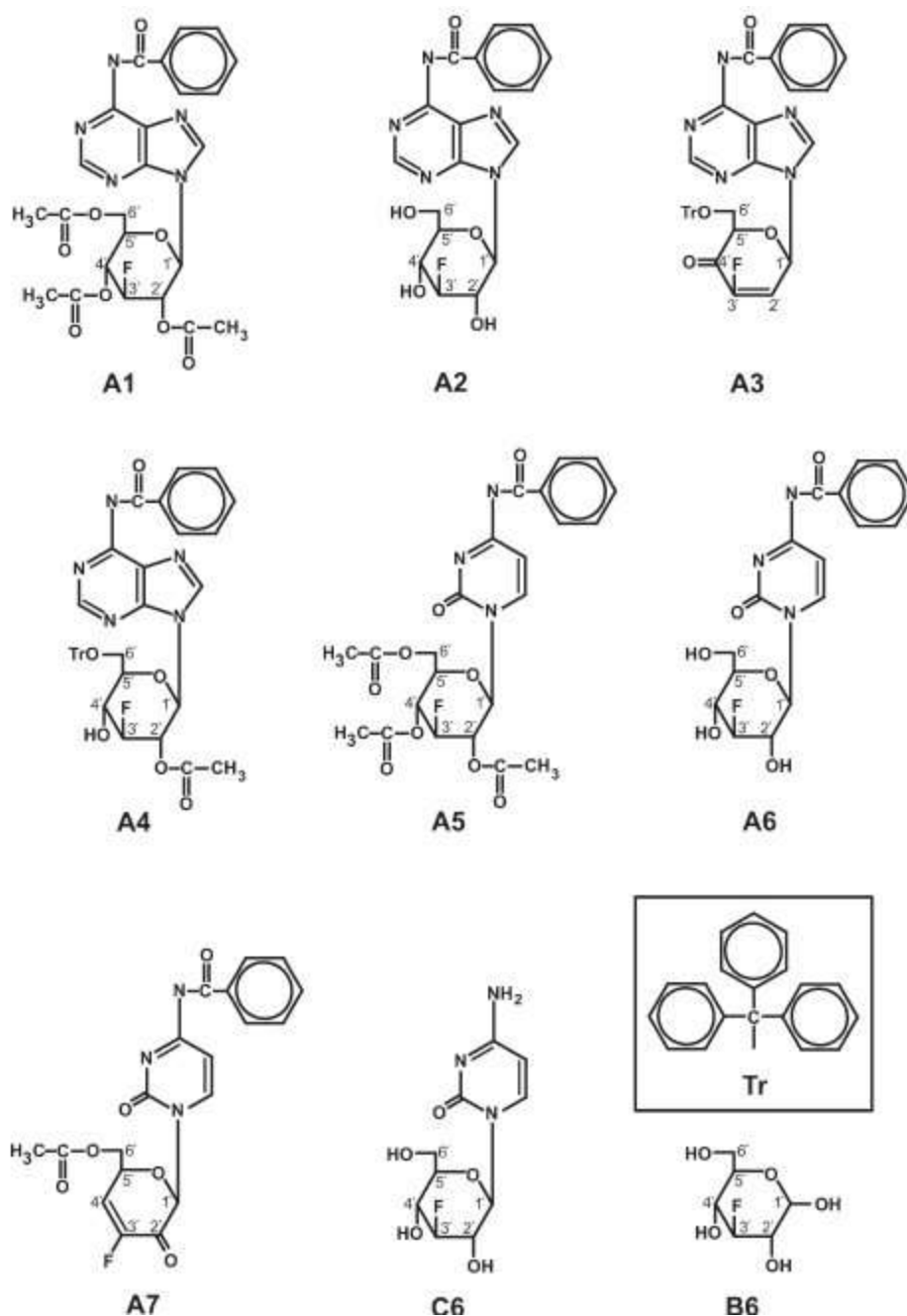
η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως συστατικά των νουκλεϊκών οξέων. Όλοι οι νουκλεοζίτες στο DNA και RNA αποτελούνται από ένα *D*-πεντοφουρανοζικό σάκχαρο συνδεδεμένο με μία ετεροκυκλική νουκλεοβάση (πουρίνη ή πυριμιδίνη), μέσω ενός β -*N*-γλυκοσιδικού δεσμού (Saenger 1984, Blackburn and Gait 1996, Bloomfield *et al.* 1999). Όμως, ορισμένα προβλήματα που προέκυψαν από τη χρήση των φουρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως ο ανεπαρκής μεταβολισμός προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, η χημική ή ενζυματική απενεργοποίησή τους, η τοξικότητα, η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και όγκων και τέλος ο μικρός χρόνος ημιζωής και κατά συνέπεια χρόνος δράσης τους, έστρεψαν το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντιικής δράσης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων και ειδικότερα αυτών που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη (www.cf.ac.uk/phrmy/ChemEd/presentations.html).

Θα πρέπει να τονιστεί ότι 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 (Verheggen *et al.* 1993, Verheggen *et al.* 1995, Maurinsh *et al.* 1997, Ostrowski *et al.* 1998), αντικαρκινικές (Antonakis 1989) και αντιβιοτικές τους ιδιότητες (Haouz *et al.* 2003), καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων (Vastmans *et al.* 2000, Vastmans *et al.* 2001).

Παρομοίως, η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων που φέρουν μεθυλομάδα σαν τροποποίηση στο τμήμα του σακχάρου τους, έχει περιοριστεί στη σύνθεση φουρανονουκλεοζιτικών αναλόγων (Mitsuhiro Kinoshita *et al.* 1975, Rosanne Bonjouklian *et al.* 1979, Olivier R. Martin *et al.* 1983). Κάποια από αυτά τα ανάλογα, όπως οι 3'-δεοξυ-3'- C- μεθυλο- β -D- ριβονουκλεοζίτες (Sarah Couturier *et al.* 2007) και 3'-δεοξυ-3'- C- μεθυλο ριβοφουρανοναζυλονουκλεοζίτες (Mohamed Aljarah *et al.* 2008), έχουν συντεθεί και έχουν εξεταστεί ως προς τις αντιικές τους ιδιότητες με πειράματα κυτταρικών καλλιιεργειών, αλλά καμιά ένωση δεν επέδειξε σημαντική δράση. Έχουν βέβαια συντεθεί και ενώσεις που έδειξαν αξιοσημείωτη κυτταροτοξική και αντιική δράση, όπως η (2S')- 2'- δεοξυ- 2'-C- μεθυλοκυτιδίνη (Akira Matsuda *et al.* 1991) με τιμή IC₅₀ 0.26 μ g/ml σε λευχαιμικά καρκινικά κύτταρα L1210 και οι 2'- δεοξυ-2'- C- μεθυλο- κυτιδίνες και -ουριδίνες (Hirokazu Awano *et al.* 1996) με τιμές IC₅₀ 0.14-0.22 μ g/ml έναντι του ιού HSV- 1. Φαίνεται πως το πεδίο των μεθυλονουκλεοζιτών είναι υποσχόμενο για την ανάπτυξη νέων δραστικότερων ενώσεων και ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύνθεση μεθυλο- πυρανονουκλεοζιτών.

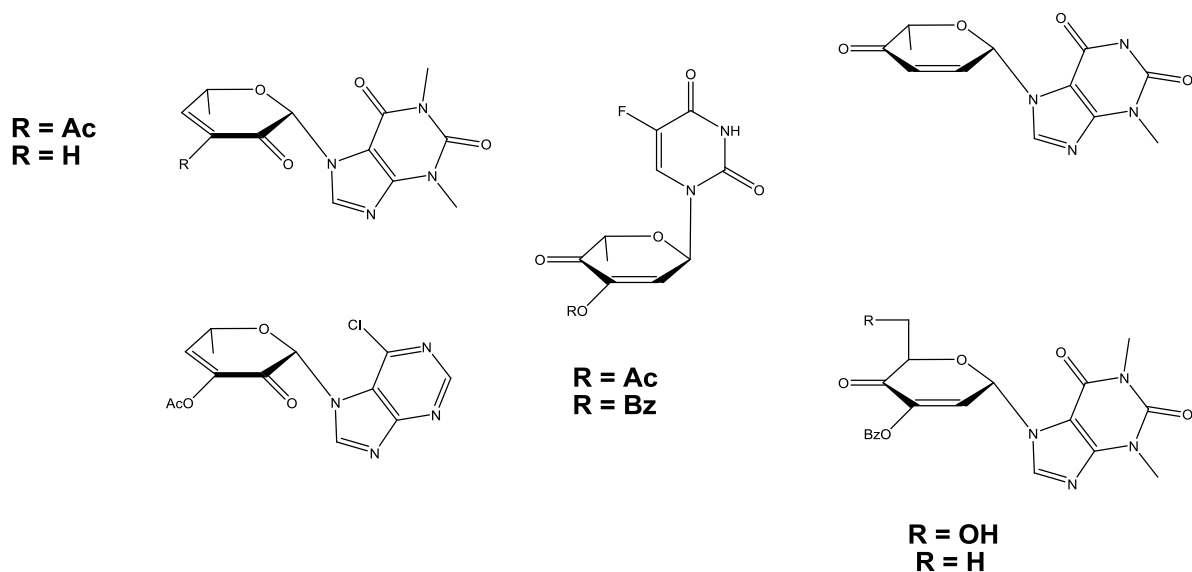
Στο εργαστήριο Βιο- Οργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έχουν συντεθεί φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Manta *et al.* 2007), οι οποίοι μειώνουν αποτελεσματικά τη δραστηριότητα της PARN, ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(A) ουράς) (Σχήμα 10). Τα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα

μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπες ενώσεις για την ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν την PARN (Balatsos *et al.* 2009).



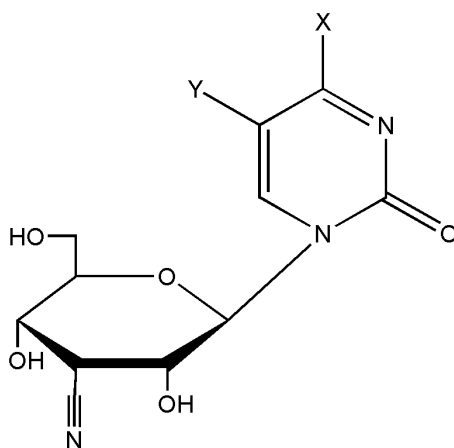
Σχήμα 10. Οι δομές φθοριωμένων πυρανοουκλεοζιτών.

Επιπρόσθετα, ακόρεστα κετο- πυρανοουκλεοζιτικά ανάλογα παρουσίασαν, σε προηγούμενες μελέτες, σημαντική ανασταλτική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων *in vitro* αλλά και *in vivo* (Komiotis *et al.* 1991, Patterson *et al.* 1998, Komiotis *et al.* 2008) (Σχήμα 11).



Σχήμα 11. Ακόρεστα κετο-πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα.

Πρόσφατα μια νέα τάξη πυρανονουκλεοζιτών που έχει μελετηθεί είναι αυτή των 3'-κυανιδρινών και 3'-δεοξυ-κυανο πυρανονουκλεοζιτών (Kiritsis *et al.* 2011). Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες αξιολογήθηκαν για την αντιική τους δράση έναντι μιας πληθώρας DNA και RNA ιών, ενώ παρουσίασαν σημαντική κυτταροστατική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και κατά του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa) (Σχήμα 12).



- a: X=OH, Y=F
- b: X=OH, Y=H
- c: X=OH, Y=CH₃
- d: X=NH₂, Y=H

Σχήμα 12. Η δομή των κυανο πυρανονουκλεοζιτών.

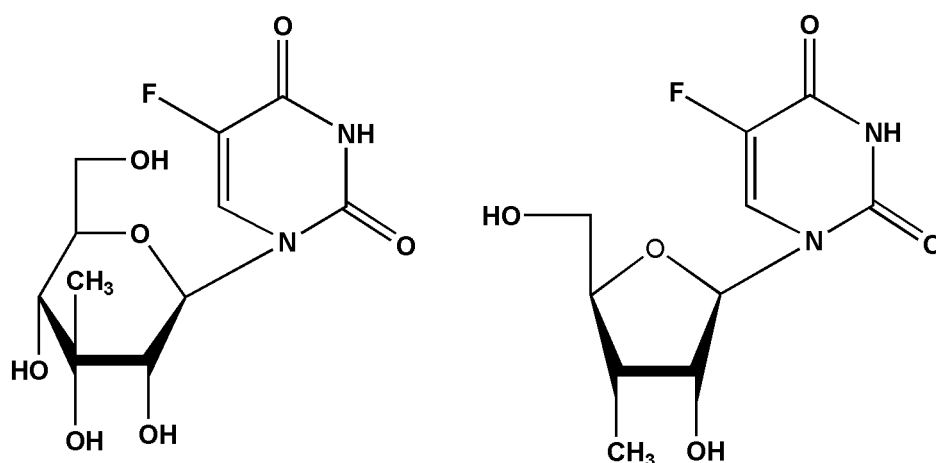
2) ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Σκοπός

Τις τελευταίες δεκαετίες, η έρευνα ήταν επικεντρωμένη στην ανακάλυψη πιο αποτελεσματικών, εκλεκτικών και μη τοξικών νουκλεοζιτικών αναλόγων. Οι προσπάθειες αυτές αφορούν τις χημικές τροποποιήσεις της βάσης και/ή του τμήματος του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών. Για τις τελευταίες, οι κύριες τροποποιήσεις περιλαμβάνουν αλλαγές του τμήματος του σακχάρου όπως, αναστροφή των διαμορφώσεων της υδροξυλομάδας, κατάργησή της που οδηγεί σε διδεοξυ- ή διδεοξυ- διδεϋδρο- νουκλεοζίτες, υποκατάστασή της από διάφορες συνθετικές ομάδες ή διάσπαση του δακτυλίου του σακχάρου που οδηγεί σε άκυκλους νουκλεοζίτες. Οι τροποποιήσεις του τμήματος του σακχάρου μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικές μεταβολές στο φάσμα της βιολογικής τους δράσης και στο βαθμό εκλεκτικής τοξικότητας καθώς και στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Αν και έχει γίνει αρκετή δουλειά στη σύνθεση μιας σειράς νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων, ελάχιστη έχει αναφερθεί, σύμφωνα με τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία, στη σύνθεση 3'-δεοξυ 3'-μέθυλο νουκλεοζιτών (Couturier *et al.* 2007).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση τροποποιημένων πυρανονουκλεοζιτών, που φέρουν τροποποιήσεις στο τμήμα του σακχάρου, ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί ή/και αντιϊικοί παράγοντες. Οι νέοι νουκλεοζίτες, φέρουν τη μεθυλοομάδα στην 3' θέση του σακχάρου (Σχήμα 13).

Τέλος, οι νεοσυντιθέμενες ενώσεις αποτιμήθηκαν βιολογικά ως προς τις αντικες και κυτταροτοξικές τους ιδιότητες.



Σχήμα 13. Δομή των νεοσυντιθέμενων ενώσεων. 3'-μεθυλο πυρανονουκλεοζίτης της 5'-φθοροουρακίλης (αριστερά) και 3'-μεθυλο-3'-δεοξυ ριβοφουρανονουκλεοζίτης της 5'-φθοροουρακίλης (δεξιά).

3) ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

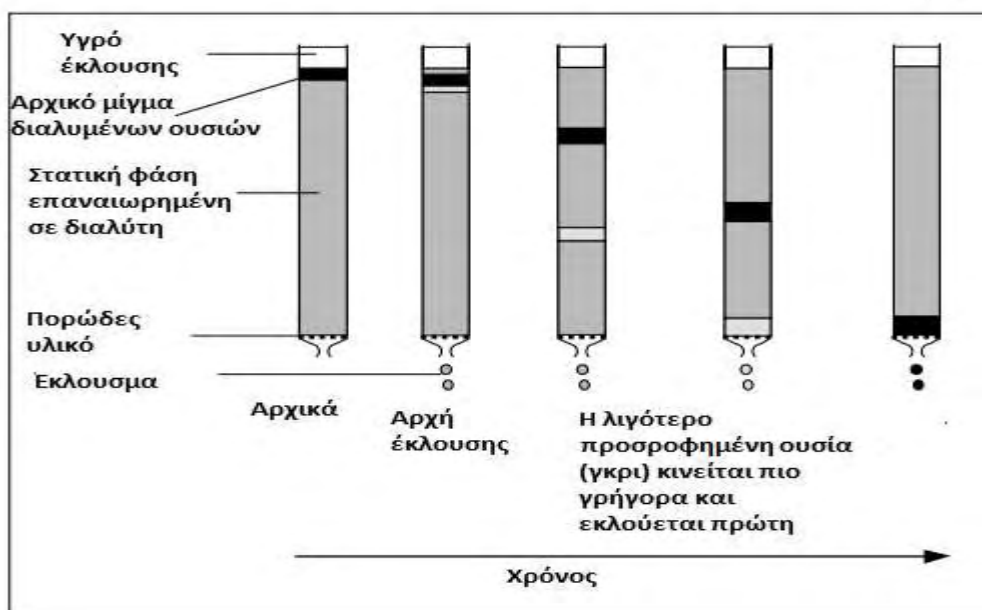
3.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Αυτή η μέθοδος, όπως και όλες οι χρωματογραφικές μέθοδοι, βασίζεται σε μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων κατανομής. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει: ένα κατάλληλο προσροφητικό (τη στατική φάση), διαλύτες ή μίγματα διαλυτών (η κινητή φάση) και τα μόρια- δείγματα. Στην TLC, το προσροφητικό είναι επικαλυμμένο ως ένα λεπτό στρώμα επάνω σε ένα κατάλληλο στήριγμα που είναι πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F254) πάχους 0.2 mm. Σε αυτό το στρώμα το μίγμα του δείγματος διαχωρίζεται με έκλυση με ένα κατάλληλο διαλύτη. Τα προϊόντα στα χρωματογραφήματα ανιχνεύονται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα H₂SO₄ (θειϊκού οξέος) 30%, είτε μέσω UV ακτινοβολίας (254nm). Η αρχή της TLC είναι γνωστή για περισσότερο από 100 χρόνια τώρα (M. W. Beyerinck, 1889).

3.2. Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης πραγματοποιήθηκε για τον καθαρισμό των προϊόντων με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography), η οποία στήλη πληρώθηκε με silica gel (240-400 mesh, Merck grade).

Η χρωματογραφία στήλης ή υγρή χρωματογραφία, χρησιμοποιεί υγρό ως κινητή φάση. Η στατική φάση είναι συνήθως ένα αδρανές στερεό όπως η silica gel. Όλες οι χρωματογραφικές τεχνικές βασίζονται σε ένα από τα ακόλουθα φαινόμενα: προσρόφηση, διαχωρισμός, ανταλλαγή ιόντων ή μοριακός αποκλεισμός. Η χρωματογραφία προσρόφησης είναι αυτή που αναπτύχθηκε πρώτη. Κάθε διαλυμένη ουσία έχει τη δική της ισορροπία μεταξύ προσρόφησης επάνω στην επιφάνεια του στερεού και διαλυτότητας στο διαλύτη, η λιγότερο διαλυτή ή καλύτερα προσροφημένη κινείται πιο αργά. Το αποτέλεσμα είναι ένας διαχωρισμός σε ζώνες που περιέχουν διαφορετικές διαλυμένες ουσίες. Η υγρή χρωματογραφία που χρησιμοποιεί μία στήλη που περιέχει silica gel είναι ένα παράδειγμα χρωματογραφίας προσρόφησης (Σχήμα 14). Ο διαλύτης ο οποίος έχει τεθεί σε μια στήλη ονομάζεται το υγρό έκλυσης, και το υγρό που ρέει έξω από το άκρο της στήλης ονομάζεται έκλουσμα. Ο χρόνος έκλυσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα και 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 περισσότερο άπολα (Ben Faust 1997).



Σχήμα 14. Χρωματογραφία στήλης.

3.3. Ξήρανση διαλυτών

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

Η ξήρανση του ακετονιτριλίου 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 (molecular sieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4\AA , όπου και αποθηκεύτηκε. Η δε πυριδίνη αποστάχθηκε παρουσία υδροξειδίου του καλίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4\AA , όπου και αποθηκεύτηκε.

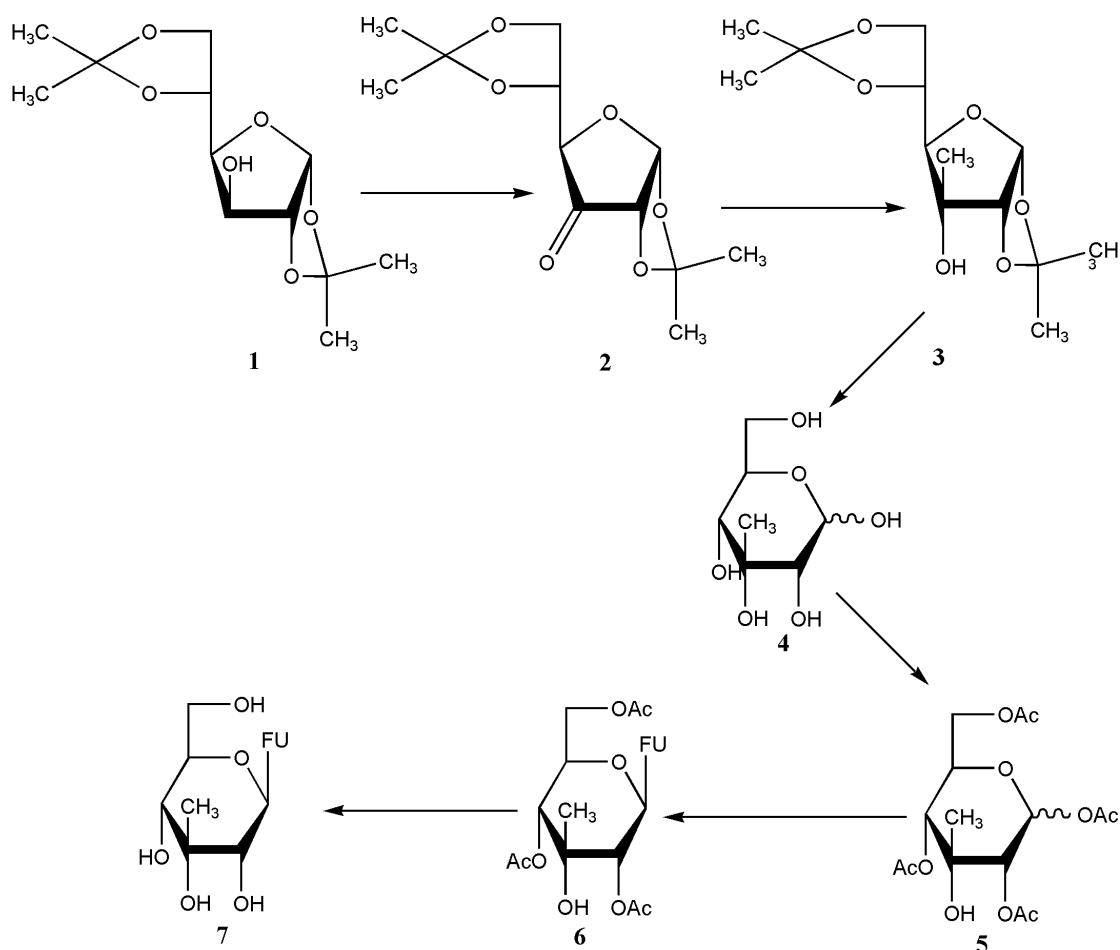
3.4. Ταυτοποίηση ενώσεων

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ καταγράφηκαν στα 300 MHz στο φωτόμετρο BrukerAVAMCEIII 300 και τα φάσματα $^{13}\text{C-NMR}$ καταγράφηκαν στα 75.5 MHz στο ίδιο φωτόμετρο, χρησιμοποιώντας chloroform-d (CDCl_3), methanol- d_4 (CD_3OD). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^1H .

Κατά τα τελευταία πενήντα χρόνια η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, που συνήθως αναφέρεται ως NMR, έχει γίνει η σημαντικότερη τεχνική για τον προσδιορισμό της δομής των οργανικών ενώσεων. Από όλες τις φασματοσκοπικές μεθόδους, είναι η μόνη για την οποία μια πλήρης ανάλυση και ερμηνεία ολόκληρου του φάσματος αναμένεται φυσιολογικά. Παρέχει ένα χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο. Παρόλο που απαιτούνται μεγαλύτερες ποσότητες του δείγματος από ό,τι για τη φασματοσκοπία μάζας, η NMR είναι μη καταστρεπτική για το δείγμα και με σύγχρονα μέσα, καλά δεδομένα μπορούν να ληφθούν από δείγματα που ζυγίζουν λιγότερο από ένα χιλιοστόγραμμα (<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/nmr/nmr1.htm>).

4) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1. Επισκόπηση της σύνθεσης της 1'-(3'-C- μέθυλο- 3'- υδροξυ -β-D- γλυκοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης



4.1.1. Μεθοδολογία σύνθεσης

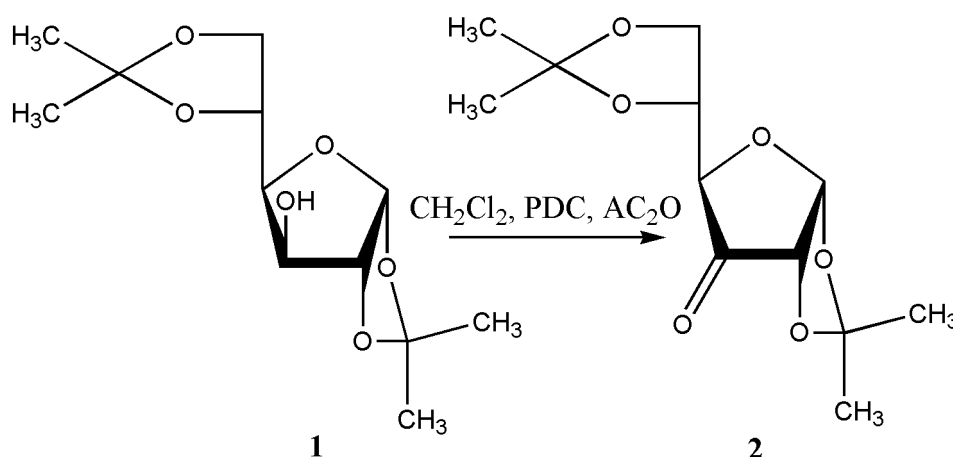
Η πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-γλυκοφουρανόζη (DAG) (**1**), η οποία οξειδώνεται προς 1,2:5,6-Δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη (**2**) χρησιμοποιώντας PDC παρουσία AC₂O σε διαλύτη CH₂Cl₂. Η αντίδραση προχωράει ποσοτικά με απόδοση 89%.

Η επόμενη αντίδραση είναι μία πυρηνόφιλη προσθήκη της μέθυλο ομάδας στην κετονομάδα. Λαμβάνουμε με αυτό τον τρόπο με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα την 3'-C-μέθυλο-1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (**3**).

Η σύνθεση συνεχίζεται με την υδρόλυση του προϊόντος **3** με ένα θερμό υδατικό διάλυμα της ρητίνης AmberliteR-120 (H⁺), η οποία οδηγεί στην ένωση **4**, με απόδοση (81%). Στη συνέχεια, με ακετυλίωση του προϊόντος **4** παρουσία οξικού ανυδρίτη (Ac₂O) σε πυριδίνη, λαμβάνεται το επιθυμητό σάκχαρο, 3'-C-μέθυλο-3'-υδροξυ-1,2,4,6-τετρακισ-Ο-ακετυλο γλυκοπυρανόζη (**5**), με απόδοση (64%).

Ακολουθεί η σύζευξη του σακχάρου **5** με τη βάση 5'-φθοροουρακίλη. Αρχικά, σιλυλιώνεται η βάση παρουσία του διαλύτη ακετονιτριλίου (MeCN), εξαμεθυλοδισιλαζανίου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης. Στη συνέχεια, προστίθεται στο σάκχαρο **5** και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα (Me₃SiOSO₂CF₃) και θέρμανση της αντίδρασης, λαμβάνοντας την επιθυμητή 1-(3'-C-μέθυλο-3'-υδροξυ-2',4',6'-τρικισ-Ο-ακετυλο-β-D γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη (**6**), σε απόδοση 82%. Τέλος, η σύνθεση ολοκληρώνεται με την απακετυλίωση του προϊόντος **6** σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας το τελικό προϊόν 1-(3'-C-μέθυλο-3'-υδροξυ-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη(**7**), με απόδοση 92%.

4.1.2. Σύνθεση της 1,2:5,6-Δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζης (**2**) (Elhalabi and Rice. 2004)

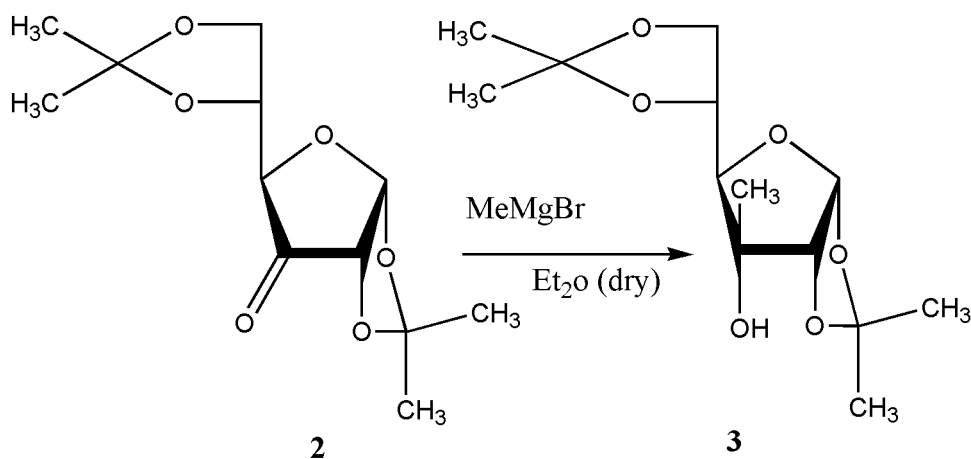


Η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-γλυκοφουρανόζη (DAG) (**1**) (2.05g, 7.9 mmol) διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο (29 ml) και στη συνέχεια προστέθηκε Ac₂O (2.23ml, 23.7mmol). Στο προκύπτον μείγμα προστέθηκε PDC (3.56g, 9.48 mmol) και ακολούθησε θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα για 2 ώρες στους 50^oC. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 1). Μετά το πέρας της αντίδρασης στο μείγμα προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας (150 ml) και το προκύπτον παχύρρευστο διάλυμα μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel). Πραγματοποιήθηκε έκλουση με διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα, που περιείχε Ac₂O αραιώθηκε με τολουόλιο και στη συνέχεια με απόσταξη εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Το επιθυμητό προϊόν **2** (1.75g) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρρευστου πρασινωπού ελαίου.

TLC (Διάλυμα Ε)	Rf: 0.3
Απόδοση	95%

Πίνακας 1. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1,2:5,6-Δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζης (**2**)

4.1.3. Σύνθεση της 3'-C- μέθυλο -1,2:5,6-δι-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (**3**) (Jean- Claude Fischer and Derek Horton. 1977)

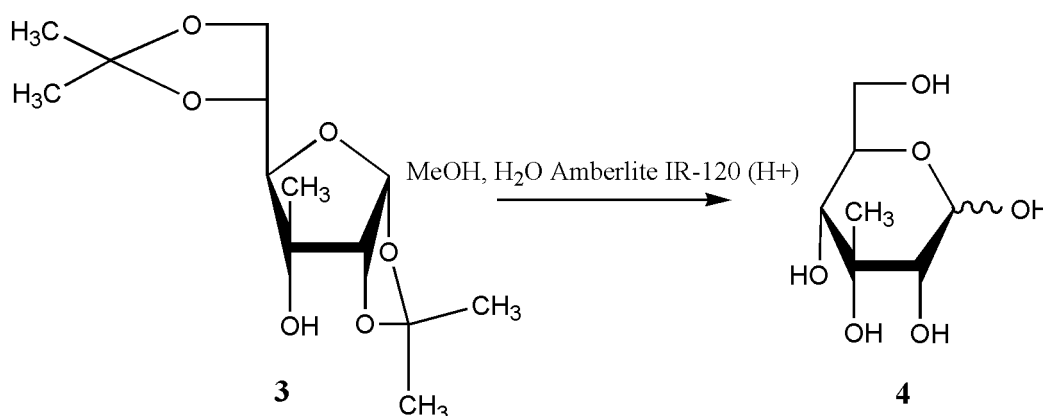


Σε 1gr του **2** διαλυμένο σε άνυδρο Et₂O (300ml, 29mmol) προστέθηκε στάγδην διάλυμα 1M MeMgBr (3eq). Το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία -20^oC για 3 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (2*300ml). Το διάλυμα συμπηκνώθηκε και το προϊόν μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel). Πραγματοποιήθηκε έκλουση με 40% οξικό αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **3** (1.15 g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα Ε)	Rf: 0.52
Απόδοση	90%

Πίνακας 2. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3'-C- μέθυλο -1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενό-α-D-αλλοφουρανόζης (**3**)

4.1.4. Σύνθεση της 3'-C-μέθυλο-3'- υδροξυγλυκόζης (4**) (Foster *et. al.* 1967, Tewson and Welsh. 1978)**

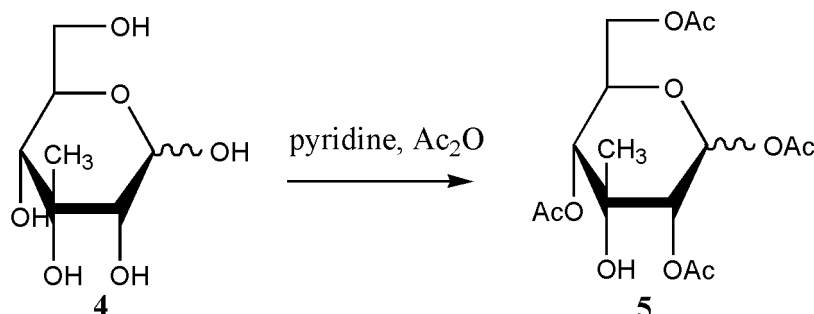


Ένα διάλυμα της ένωσης **3** (700mg, 2.13mmol) σε MeOH (3.31ml) και νερό (19ml) αναδεύτηκε στους 60-70 °C με ρητίνη AmberliteIR-120 (H⁺) (1.10mg). Μετά από 10 ώρες η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 3), το μείγμα διηθήθηκε και απομακρύνθηκαν οι διαλύτες από το διήθημα υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **4** (427mg) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

TLC (Διάλυμα Α)	Rf: 0.44
Απόδοση	81%

Πίνακας 3. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3'-C- μέθυλο -3'-υδροξυγλυκόζης (**4**)

4.1.5. Σύνθεση της 3'-C-μέθυλο-1,2,4,6-Τετρακίς-O-ακετυλογλυκοκυρανόζης (5) (Foster *et al.* 1967, Tewson *et al.* 1978)

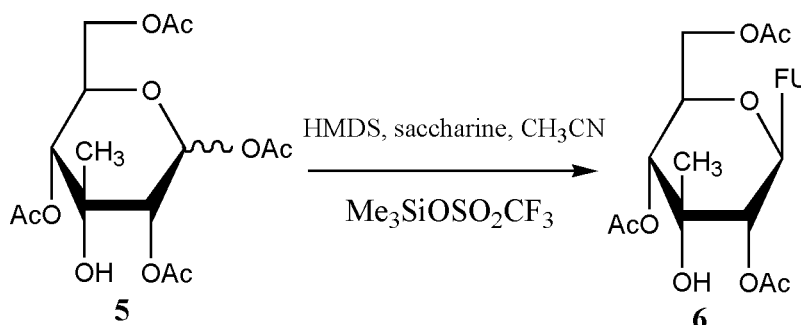


Σε ένα διάλυμα της ένωσης **4** (427mg, 2.2mmol) σε πυριδίνη (7.67ml) προστέθηκε Ac₂O (3.96ml). Το μείγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (πίνακας 4) το διάλυμα κρύωσε στους 0 °C και προστέθηκε μεθανόλη (0.89 ml) για να καταστείλει την αντίδραση. Η αντίδραση συμπυκνώνεται υπό κενό πολλές φορές με MeOH για να απομακρυνθεί η πυριδίνη. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 50% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο και το επιθυμητό προϊόν **5** (429 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα Β)	Rf: 0.57
Απόδοση	64%

Πίνακας 4. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3'-C- μέθυλο -3'-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοκυρανόζης (5).

4.1.6. Σύνθεση της 1'-(3'-C- μέθυλο- 3'- υδροξυ -2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)5- φθοροουρακίλης (6)



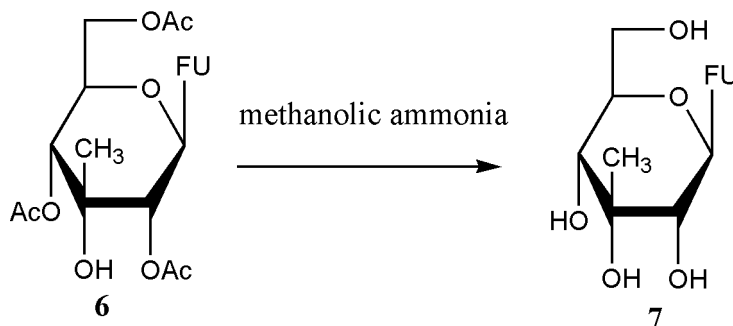
Ένα διάλυμα της φθοροουρακίλης (200mg, 0.55 mmol), του HMDS (0,684 mmol) και της σακχαρίνης (0.025 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (3.82 ml), θερμάνθηκε με

κάθετο ψυκτήρα για 1 ώρα στους 120 °C και αφότου το μείγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 3'-μέθυλο-3'-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλογλυκοκυρανόζη (**5**) (0.393 mmol) καθώς και ο Me₃SiOSO₂CF₃ (0.55 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες (TLC πίνακας 5) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 90°C. Στη συνέχεια το μείγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (90 ml) και εκχυλίστηκε μία φορά με νερό. Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% εξάνιο σε οξικό αιθυλεστέρα. Το επιθυμητό προϊόν **6** (352mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα Γ)	Rf: 0.46
Απόδοση	82%

Πίνακας 5. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1'-(3'-C- μέθυλο -3'-υδροξυ-2,4,6-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (**6**).

4.1.7. Σύνθεση της 1'-(3'-C- μέθυλο- 3'- υδροξυ- β- D- γλυκοκυρανοζυλο)-5- φθοροουρακίλης (**7**)

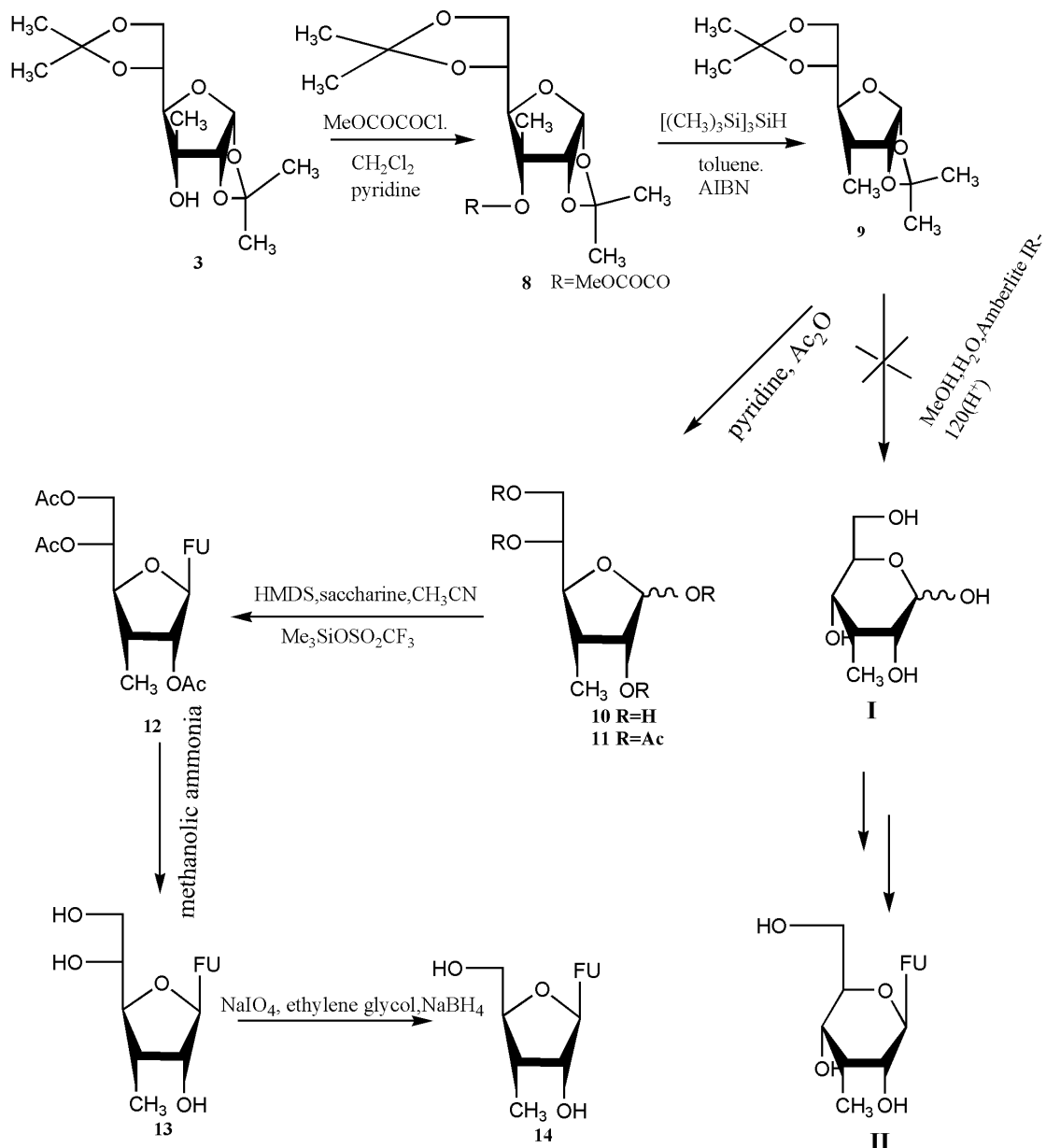


Σε διάλυμα της ένωσης **6** (352 mg, 0.814 mmol) και κορεσμένης με αέρια NH₃ μεθανόλης (34.2 ml) αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 ώρες. Το διάλυμα συμπυκνώνεται, μεταφέρεται σε χρωματογραφική στήλη και εκλούεται με οξικό αιθυλεστέρα όπου, παίρνουμε το τελικό προϊόν 1'-(3'-C-μέθυλο -3'-υδροξυ-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη (**7**) (299 mg).

TLC (Διάλυμα Γ)	Rf: 0.50
Απόδοση	92%

Πίνακας 6. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1'-(3'-C- μέθυλο -3'-υδροξυ -β-D-γλυκοκυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (**7**)

4.2. Επισκόπηση της σύνθεσης της 1'-(3'-C-μέθυλο-3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης



4.2.1. Μεθοδολογία σύνθεσης

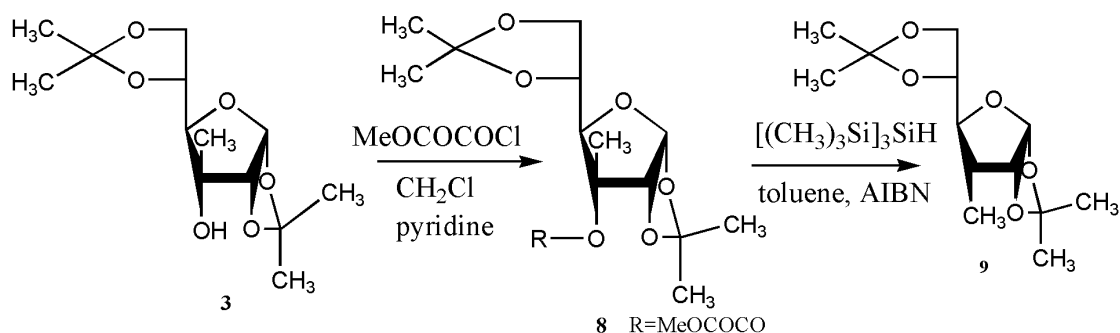
Επόμενο στόχο της παρούσης διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η σύνθεση της 1-(3'-C- μέθυλο -3'-δεοξυ-β-D-αλοφυρανόζυλο)5-φθοροουρακίλης (II). Η μεθοδολογία που επρόκειτο να ακολουθηθεί απεικονίζεται στο παραπάνω Σχήμα.

Αρχικά σχηματίζεται ο μεθοξυαλυσετέρας (8) χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο MeOCOCOCOC₂H₅ σε διαλύτη CH₂Cl₂, επί της ένωσης 3'-C-μεθυλο-1,2:5,6-δι-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλοφυρανόζης (3) που έχει ήδη παρασκευαστεί

(Pawan K. Sharma and Vasu Nair, 2000). Στη συνέχεια, η αναγωγή του προϊόντος **8** λαμβάνει χώρα παρουσία του τριςτριμεθυλοσιλσιλανιο ($[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]_3\text{SiH}$), καθώς και του αζωδης-ισοβουτυρονιτριλίου (AIBN) σε διαλύτη τολουόλιο στους 100°C , προς το προϊόν **9**. Έχοντας ως στόχο τη σύνθεση της επιθυμητής αλλοφυρανόζης **1**, πραγματοποιούμε υδρόλυση του προϊόντος **9** με ένα θερμό υδατικό διάλυμα της ρητίνης AmberliteIR-120 (H^+). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε αντίθεση με την προηγούμενη συνθετική πορεία, η υδρόλυση του δεοξυ φουρανοσακχάρου **9**, οδήγησε στη λήψη του αλλοφουρανοσακχάρου **10**, με απόδοση (85%). Η σύνθεση του προϊόντος **9** αποδεικνύεται από το φάσμα ^1H NMR του ακετυλιωμένου προϊόντος 1-(3'-C-μέθυλο-3'-δεοξυ-2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-αλλοφουρανόζη)5-φθοροουρακίλης, όπου η τιμή $J_{1,2}$ είναι 5.7 Hz. Ακόμη μία απόδειξη αποτελεί η αντίδραση γειτονικών διολών με το υπεριοδικό νάτριο (NaIO_4), μια αντίδραση ταυτοποίησης. Κατά τη συγκεκριμένη αντίδραση προκύπτει αποικοδόμηση κατά μία υδροξυμεθυλο ομάδα και ως εκ τούτου αποδεικνύεται η πενταμελής διαμόρφωση του σακχάρου. Στη συνέχεια, με ακετυλίωση του προϊόντος **10** παρουσία οξικού ανυδρίτη (Ac_2O) σε πυριδίνη, λαμβάνεται το σάκχαρο, 3'-C-μέθυλο-3'-δεοξυ-1,2,4,6-τετρακίς-O-ακετυλο αλλοφουρανοζυλο (**11**), με απόδοση 71%.

Ακολουθεί η σύζευξη του σακχάρου **11** με τη βάση 5'-φθοροουρακίλη. Αρχικά, σιλυλιώνεται η βάση παρουσία του διαλύτη ακετονιτριλίου (MeCN), εξαμεθυλοδισιλαζανίου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης. Στη συνέχεια, προστίθεται στο σάκχαρο **11** και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) και θέρμανση της αντίδρασης, λαμβάνοντας την 1'-(3'-C-μέθυλο-3'-δεοξυ-2,4,6-τρις-O-ακετυλο-β-D-αλλοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη (**12**), σε απόδοση 82%. Η σύνθεση συνεχίζεται με την απακετυλίωση του προϊόντος **12** σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας το προϊόν 1'-(3'-C-μέθυλο-3'-δεοξυ-αλλοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη(**13**), με απόδοση 92%. Τέλος, με την αντίδραση γειτονικών διολών με το υπεριοδικό νάτριο (NaIO_4) (Reichman *et. al.* 1975) παίρνουμε το τελικό 1'-(3'-C-μέθυλο-3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (**14**), με απόδοση 79%.

4.2.2. Σύνθεση της 3'-C-δεοξυ-1,2,5,6-Δις-O-ισοπροπυλιδανο-α-D-αλλοφουρανόζης (9) (Pawan K. Sharma and Vasu Nair, 2000)

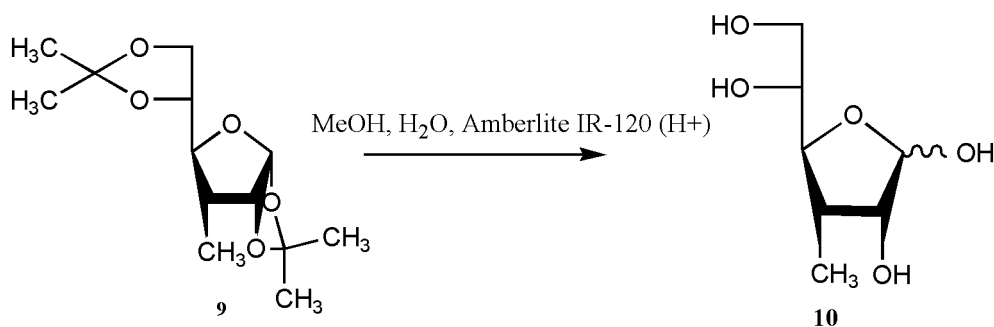


Σε διάλυμα που περιέχει το **3** (1g, 3.1mmol) και MeOCOCOCI (0.58ml, 6.2mmol) σε διαλύτη (0.8 ml, 8 mmol) σε CH₂Cl₂ (15.5ml). Το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 ώρα, στη συνέχεια εκχυλίστηκε με NaHCO₃ και στη συνέχεια συμπυκνώθηκε, ως κίτρινο έλαιο **8**. Στο παραπάνω διάλυμα προστέθηκε τολουόλιο (22 ml), τρις τριμεθυλοσιλυσιλαν ([(CH₃)₃Si]₃SiH) (1.33 ml, 4,34 mmol) και αζωδισ-ισοβουτυρονιτριλίου (AIBN) (2.17 mmol, 357 mg). Το διάλυμα συμπυκνώθηκε και το προϊόν μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel). Πραγματοποιήθηκε έκλουση με 5% οξικός αιθυλεστέρας σε διχλωρομεθάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **9** (504mg) ελήφθη υπό τη μορφή κίτρινου ελαίου.

TLC (Διάλυμα Ε)	Rf: 0.7
Απόδοση	52%

Πίνακας 7. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3'-C-δεοξυ-1,2,5,6-Δις-O-ισοπροπυλιδανο-α-D-αλλοφουρανόζης(**9**)

4.2.3. Σύνθεση της 3'-C-μέθυλο-3'-δεοξυ-αλλοφουρανόζης (10) (Pawan K. Sharma and Vasu Nair, 2000)

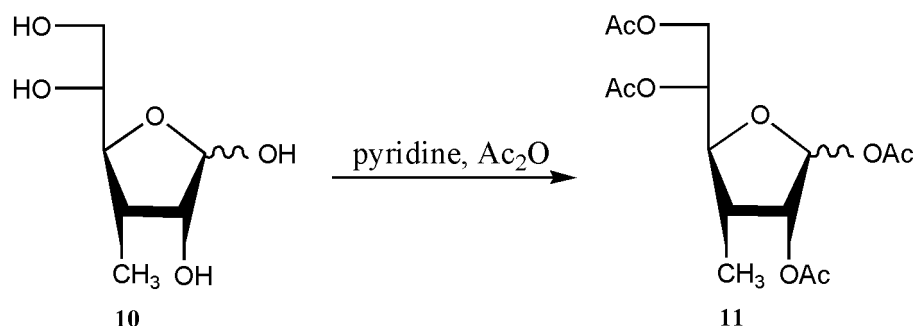


Ένα διάλυμα της ένωσης **9** (500mg, 1.6mmol) σε MeOH (2.5ml) και νερό (15ml) αναδεύτηκε στους 60-70 °C με ρητίνη Amberlite.IR-120 (H⁺) (832mg). Μετά από 10 ώρες η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 8), το μείγμα διηθήθηκε και απομακρύνθηκαν οι διαλύτες από το διήθημα υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **10** (316mg) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

TLC (Διάλυμα A)	Rf: 0.38
Απόδοση	85%

Πίνακας 8. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3'-C-μέθυλο-3'-δεοξυ-αλλοφουρανόζης (**10**)

4.2.4. Σύνθεση της 3-C-μέθυλο-3'-δεοξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλο αλλοφουρανόζης (11) (Foster et. al. 1967, Tewson et al. 1978)



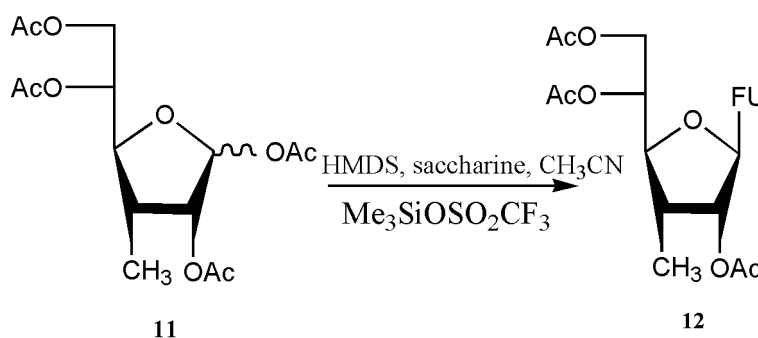
Σε ένα διάλυμα της ένωσης **10** (316mg, 1.36mmol) σε πυριδίνη (4,76ml) προστέθηκε Ac₂O (1.77ml). Το μείγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC πίνακας 4) το διάλυμα κρύωσε στους 0 °C και προστέθηκε μεθανόλη (0.7 ml) για να καταστείλει την αντίδραση. Η αντίδραση

συμπυκνώνεται υπό κενό πολλές φορές με MeOH για να απομακρυνθεί η πυριδίνη. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο και το επιθυμητό προϊόν **11** (390mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα A)	Rf: 0.64
Απόδοση	71%

Πίνακας 9. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3'-C- μέθυλο -3'-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλοαλλοφουρανόζης (**11**)

4.2.5. Σύνθεση της 1'-(3'-C- μέθυλο -3'-δεοξυ-2,4,6-τρις-O-ακετυλο-β-D-αλλοφουρανόζη) 5-φθοροουρακίλης (**12**)

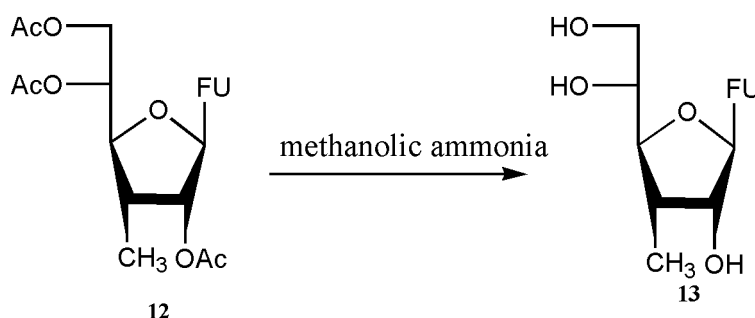


Ένα διάλυμα της φθοροουρακίλης (179mg, 1.37mmol), του HMDS (358 μl, 1.70mmol) και της σακχαρίνης (11.54mg, 0.063mmol) σε άνυδρο CH₃CN (6ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 1 ώρα στους 120 °C και αφότου το μείγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 3'-μέθυλο-3'-δεοξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλοαλλοφουρανόζη (**11**) (390mg, 0.98mmol) καθώς και ο Me₃SiOSO₂CF₃ (0.25ml, 1.37mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες (TLC πίνακας 9) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 90 °C. Στη συνέχεια το μείγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (90 ml) και εκχυλίστηκε μία φορά με νερό. Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% εξάνιο σε οξικό αιθυλεστέρα. Το επιθυμητό προϊόν **12** (377mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα Γ)	Rf: 0.45
Απόδοση	82%

Πίνακας 10. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3'-C- μέθυλο -3'-δεοξυ-2,4,6-τρις-O-ακετυλο-β-D-αλλοφουρανόζη) 5-φθοροουρακίλης (**12**)

4.2.6. Σύνθεση της 1'-(3'-C-μέθυλο -3'-δεοξυ-β-D-αλλοφουρανόζη)5-φθοροουρακίλης (**13**)

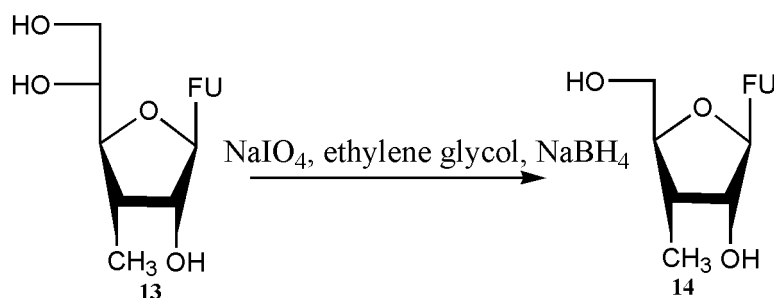


Σε διάλυμα της ένωσης **12** (352 mg, 0.75mmol) και κορεσμένης με αέρια NH₃ μεθανόλης (31.35ml) αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 ώρες. Το διάλυμα συμπυκνώνεται και μεταφέρεται σε χρωματογραφική στήλη και εκλύεται με οξικό αιθυλεστέρα και παίρνουμε το τελικό προϊόν 1'-(3'-C- μέθυλο - 3'-δεοξυ-β-D-αλλοφουρανόζη) 5-φθοροουρακίλη (**13**) (299 mg).

TLC (Διάλυμα Γ)	Rf: 0.50
Απόδοση	92%

Πίνακας 11. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1'-(3'-C- μέθυλο -3'-δεοξυ -β-D-αλλοφουρανόζη) 5-φθοροουρακίλης (**13**)

4.2.7. Σύνθεση της 1'-(3'-C-μέθυλο-3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (14)

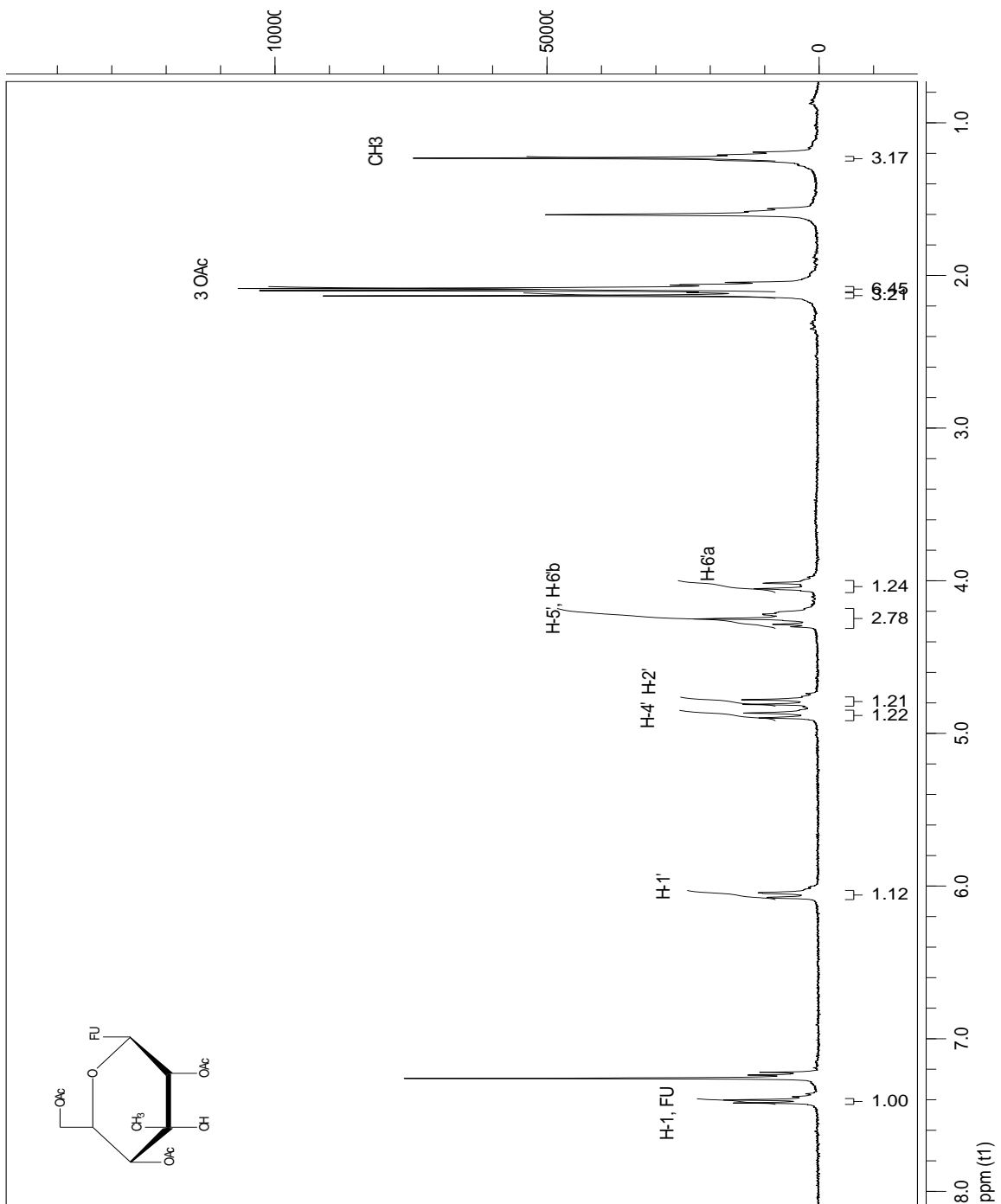


Σε 1,14 mmol (299 mg) της ένωσης (13) προσθέτουμε 1,3 mmol (278,057 mg, Mr 213,89) NaIO_4 , 4 ml H_2O , 4 ml MeOH και αναδεύουμε για 1h . Στη συνέχεια προσθέτουμε 1 σταγόνα αιθανοδιόλης και 2,6 mmol NaBH_4 (98,514 mg, Mr 37,89) και η ανάδευση συνεχίζεται για ακόμη 1h. Εξουδετερώνουμε το NaBH_4 με NaHCO_3 και εκχυλίζουμε με NaHSO_4 , συμπτηκνώνουμε και ακολουθεί χρωματογραφία στήλης (silicagel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% εξάνιο σε οξικό αιθυλεστέρα. Η επιθυμητή ένωση (14) λαμβάνεται ως ίζημα.

TLC (Διάλυμα Γ)	Rf: 0.42
Απόδοση	79%

Πίνακας 12. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1'-(3'-C-μέθυλο-3'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (14)

5) ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR

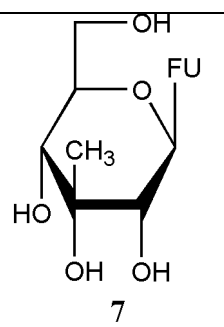
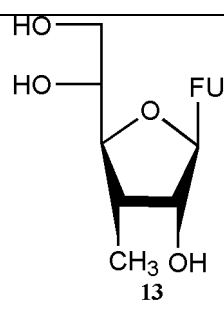


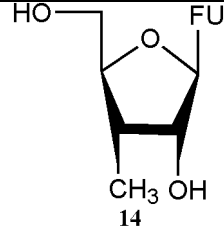
Φάσμα ^1H NMR του πυρανονουκλεοζίτη 6

6) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης νουκλεοζιτών με πιθανή αντική ή/και αντικαρκινική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, εύκολη, έχοντας πραγματοποιήσει σύντομα βήματα. Οι τελικές αποδόσεις που πήραμε από τη σύνθεση των τελικών νουκλεοζιτών ήταν ικανοποιητικές. Πιο συγκεκριμένα, σύνθεση 1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζης (**2**) με απόδοση 95%, 3'-C-μέθυλο -1,2:5,6-δι-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (**3**) με απόδοση 90%, 3'-C-μέθυλο -3'-υδροξυγλυκόζης(**4**) με απόδοση 81%, 3'-C-μέθυλο -3'-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλογλυκοπυρανόζης (**5**) με απόδοση 64% ,1'-(3'-C-μέθυλο -3'-υδρόξυ-2,4,6-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (**6**) με απόδοση 82%, 1'-(3'-C-μέθυλο -3'-υδρόξυ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (**7**) με απόδοση 92%. Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹HNMR.

Για την εκτίμηση της ικανότητας αναστολής του πολλαπλασιασμού διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (L1210, HeLa, CEM) από τους νεοσυντιθέμενους νουκλεοζίτες χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC50 (Πίνακας 13), η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%. Η δράση των νεοσυντιθέμενων ενώσεων συγκρίθηκε με αυτή του ήδη χρησιμοποιούμενου φαρμάκου 5-φθοροουρακίλη.

ΕΝΩΣΗ	IC50 (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
 <p>7</p>	>250	50	30
 <p>13</p>	20	40	50

	30	>250	>250
F- Uracil	0.49 ±0.13	18±5	0.54±0.12

Πίνακας 13

7) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Satoshi Ichikawa. (2008) 'Medicinal Chemistry Targeting Nucleosides and Nucleic Acids Based on Fine Synthetic Chemistry' *The Pharmaceutical Society of Japan*. 128(10) 1403 — 1430
- 2) Δ. Ν. Νικολαΐδης. (1996) 'Οργανική Χημεία' Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις ΖΗΤΗ
- 3) L. G. Wade, JR. (2012) 'Οργανική Χημεία' Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις ΤΖΙΟΛΑ
- 4) Θ. Βαλαβανίδης, Κ. Ευσταθίου. (2012) 'Η χημική ένωση του μήνα', http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_glucose.htm
- 5) 'Οργανική Χημεία Κεφάλαιο 26: Βιομόρια: Υδατάνθρακες', http://www.biology.uoc.gr/courses/BIO6_Organiki_Ximia/Lectures/Lecture%2020.pdf
- 6) McMurry J. (2000) 'Οργανική Χημεία. Τόμος Ι' Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης: Ηράκλειο
- 7) Tim Soderberg. (2012) 'Section 11.5: N-glycosidic bonds', http://chemwiki.ucdavis.edu/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_With_a_Biological_Emphasis/Chapter_11%3A_Nucleophilic_carbonyl_addition_reactions/Section_11.5%3A_N-glycosidic_bonds
- 8) J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. (2006) 'Βιοχημεία. Τόμος Ι' Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης: Ηράκλειο
- 9) Zhou W., Gumina G., Chong Y., Wang J., Schinazi R.F., Chu C.K. (2004) 'Synthesis, structure-activity relationships, and drug resistance of beta-d-3'-fluoro-2',3'-unsaturated nucleosides as anti-HIV Agents' *J Med Chem*. 17;47(13):3399-408.
- 10) Perigaud C., Gosselin G., Imbach J. L. (1992) 'Nucleosides analogues as chemotherapeutic agents: a review' *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 11, 903-945
- 11) Robins, R.K.; Kini, G.D. (1990) 'Purines and Purine Nucleoside Analogues as Antitumor Agents. In The Chemistry of Antitumor Agents' Wilman, D.E.V. Ed.; *Chapman and Hall*: New York pp 299-321.

- 12) MacCoss, M.; Robins, M.J. (1990) 'Anticancer Pyrimidines, Pyrimidine Nucleosides and Prodrugs. In the chemistry of Antitumor Agents' Wilman, D.E.V. Ed.; *Chapman and Hall*: New York, pp 261-298.
- 13) Claire Simons (2000) '*Nucleoside Mimetics: Their Chemistry and Biological Properties*' CRC Press
- 14) Arner E. S. J., Eriksson S. (1995) 'Mammalian deoxyribonucleoside kinases' *Pharmacol Ther.* 67:155–186.
- 15) Lewin B. (2003) '*Genes*' VIII, 6.
- 16) Burns C. J.(2005) *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, 4, 4.
- 17) Lui V.W.Y., Lau C.P.Y., Cheung C.S.F., Ho K., Ng M.H.L., Cheng S.H., Hong B., Tsao S.W., Tsang C.M., Lei K.I.K., Yamasaki Y., Mita A., Chan A.T.C. (2010) 'An RNA-directed nucleoside anti-metabolite, 1-(3-C-ethynyl-beta-d-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd), elicits antitumor effect via TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) downregulation' *Biochemical Pharmacology*. Volume 79, issue 12, p. 1772-1780.
- 18) Uppoor G. Bhat, Bulbul Pandit, Andrei L. Garte. (2010) 'ARC synergizes with ABT-737 to induce apoptosis in human cancer cells ' *Molecular Cancer Therapeutics*. 9(6):1688-1696.
- 19) Wagner C.R., Iyer V.V., McIntee E.J. (2000) 'Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides' *Med Res Rev.* 20(6):417-51.
- 20) Balzarini J. (1994) 'Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives' *Pharm. World Sci.* 16:113-126
- 21) Chong Y., Choo H., Choi Y., Mathew J., Schinazi R.F., Chu C.K. (2002) 'Stereoselective synthesis and antiviral activity of D-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-2'-fluoro-4'-thionucleosides' *JMed Chem.* 45(22):4888-98.
- 22) Siev M., Weinberg R., Penman S. (1969) 'The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in HeLa cells by cordycepin' *J Cell Biol.* 41(2):510–520.
- 23) Ahn Y.J., Park S.J., Lee S.G., Shin S.C., Choi D.H. (2000) 'Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp' *J Agri Food* 48: 2744- 2748.
- 24) Matsuda A., Sasaki T. (2004) 'Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides' *Cancer Sci.* 95:105-111
- 25) Cory A.H., Samano V., Robins M.J., Cory J.G. (1994) '2'-Deoxy-2'-methylene derivatives of adenosine, guanosine, tubercidin, cytidine and uridine as inhibitors of L1210 cell growth in culture' *Biochem Pharmacol.* 47(2):365-71.
- 26) Manta S., Tsoukala E., Tzioumaki N., Kiritsis C., Balzarini J., Komiotis D. (2010) 'Synthesis of 4,6-dideoxy-3-fluoro-2-keto-beta-D-glucopyranosyl analogues of 5-fluorouracil, N6-benzoyl adenine, uracil, thymine, N4-benzoyl cytosine and evaluation of their antitumor activities' *Bioorg Chem.* 38(2):48-55.

- 27) Hardman J.G., Limbird L.E. (eds, Gilman A.G. (cons. ed) (2001) '*The Pharmacological Basis of Therapeutics*' 10th ed., McGraw-Hill
- 28) John A. Secrist III. (2005) 'Nucleosides as anticancer agents: from concept to the clinic'. Series No. **49**. 15–16
- 29) Komiotis D., Manta S., Tsoukala E., Tzioumaki N. (2008) *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents*. **7**, 219.
- 30) Gumina G., Song G.Y. and Chu C. K. (2001) 'L-Nucleosides as chemotherapeutic agents' *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 9–15.
- 31) Saenger W. (1984) '*Principles of Nucleic Acid Chemistry*'. Springer-Verlag: New York
- 32) Blackburn G. M. and Gait M. J. (1996) '*Nucleic Acids in Chemistry and Biology*'. OxfordUniversity Press: New York
- 33) Bloomfield V. A., Crothers D. M., Tinoco I. (2000) '*Nucleic acids. Structures, properties, and functions*' University Science Books. Sausalito: California
- 34) www.cf.ac.uk/phrmy/ChemEd/presentations.html
- 35) Verheggen I., VanAerschot A., Toppet S., Snoeck R., Janssen G., Balzarini J., DeClercq E., Herdewijn P. (1993) 'Synthesis and Antiherpes Virus Activity of 1,5-Anhydrohexitol Nucleosides' *Journal of Medicinal Chemistry*. **36**. pp. 2033-2040.
- 36) 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. (1995) 'Synthesis, Biological Evaluation, and Structure Analysis of a Series of New 1,5-Anhydrohexitol Nucleosides' *J. Med. Chem.* **38**. 826.
- 37) Maurinsh Y., Schraml J., DeWinter H., Blaton N., Peeters O., Lescrinier E., Rozenski J., Van Aerschot A., DeClercq E., Busson R., Herdewijn P. (1997) 'Synthesis and Conformational Study of 3-Hydroxy-4-(Hydroxymethyl)-1-Cyclohexanyl Purines and Pyrimidines' *J. Org. Chem.* **62**. 2861-2871.
- 38) Ostrowski T., Wroblowski B., Busson R., Rozenski J., DeClercq E., Bennett M.S., Champness J.N., Summers W.C., Sanderson M.R., Herdewijn P. (1998) '5-Substituted Pyrimidines with a 1,5-Anhydro-2,3-dideoxy-d-arabino-hexitol Moiety at N-1: Synthesis, Antiviral Activity, Conformational Analysis, and Interaction with Viral Thymidine Kinase' *J. Med. Chem.* **41**. 4343-4353.
- 39) Antonakis, K. (1989) '*Hexopyranose nucleosides. In Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C)*' Elsevier: Amsterdam. **4**. p. 241.
- 40) Haouz A., Vanheusden V., Munier-Lechman H., Froeyen M., Herdewijn P., Van Galenbergh S., Delarue M. (2003) 'Enzymatic and Structural Analysis of Inhibitors Designed Against Mycobacterium Tuberculosis Thymidylate Kinase. New Insights into the Phosphoryl Transfer Mechanism' *J. Biol. Chem.* **278**:4963–4971.
- 41) Vastmans K., Pochet S., Peys A., Kerremans L., VanAerschot A., Hendrix C., Marliere P., Herdewijn P. (2000) 'Enzymatic Incorporation in DNA of 1,5-Anhydrohexitol Nucleotides' *Biochemistry*. vol. **39**. No. **42**. pp. 12757-12765.

- 42) Vastmans K., Froeyen M., Kerremans L., Pochet S., Herdewijn P. (2001) 'Reverse Transcriptase Incorporation of 1,5-Anhydrohexitol Nucleotides' *Nucleic Acids Res.* 29:3154–3163.
- 43) Kinoshita M. and Mariyama S. (1975) 'Synthesis of (2R, 3S, 4S) -4- Amino-3-hydroxy-2- methyl-5- (3-pyridyl)- pentanoic Acid Present in Antibiotic Pyridomycin' *Bulletin of The Chemical Society of Japan.* Vol. 48 (7). 2081-2083
- 44) Boujouklian R. and Ganem B. (1979) 'Alkyl and cyclopropyl sugars: approaches to branched- chain D- glucofuranose derivatives' *Carbohydrate Research.* 76. 245-251
- 45) Olivier R. Martin, Robert C. Nabinger, Yousif Ali, Dolatrai M. Vyas, Walter A. Szarik. (1983) 'Carbon- 13 nuclear magnetic resonance- spectral study of branched- chain and 3-*gem*-di-C-substituted aldohexofuranoid derivatives.' *Carbohydrate Research.* 121. 302-307.
- 46) Sarah Couturier, Mohamed Aljarah, Gilles Gosselin, Christophe Mathé and Christian Périgaud. (2007) 'Synthesis of 3'-deoxy-3' -C-methyl-b- D - ribonucleoside analogs.' *Tetrahedron* 63 . 11260–11266
- 47) Mohamed Aljarah, Sarah Couturier, Christophe Mathé, Christian Périgaud. (2008) 'Synthesis of 3'-deoxy-3'-C-methyl nucleoside derivatives.' *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16. 7436–7442
- 48) Akira Matsuda, J. Kenji Takenuki, Takuma Sasaki and Tohru Ueda. (1991) 'Nucleosides and Nucleotides. 94. Radical Deoxygenation of tert -Alcohols in 1-(2-C-Alkylpentofuranosyl)pyrimidines: Synthesis of (2'5)-2'-Deoxy-2'-C-methylcytidine, an Antileukemic Nucleoside' *Journal of Medicinal Chemistry.* Vol. 34, No. 1 234-239.
- 49) Hirokazu Awano, Satoshi Shuto, Takanori Miyashita, Noriyuki Ashida, Haruhiko Machida, Toshihiko Kira, Shiro Shigeta, and Akira Matsuda. (1996) 'Synthesis and Antiviral Activity of 5-Substituted (2'S)-2'-Deoxy-2'-C-Methylcytidines and - uridines' *Arch. Pharm. Pharm. Med Chem.* 329,66- 72
- 50) Manta S., Agelis G., Botic T., Cencic A., Komiotis D. (2007) 'Fluoro-Ketopyranosyl Nucleosides: Synthesis and Biological Evaluation of 3-Fluoro-2-Keto-β-d-Glucopyranosyl Derivatives of N⁴-Benzoyl Cytosine.' *Bioorg. Med. Chem.* 15:980–987
- 51) Nikolaos A. A. Balatsos, Dimitrios Vlachakis, Panagiotis Maragozidis, Stella Manta, Dimitrios Anastasakis, Athanasios Kyritsis, Metaxia Vlassi, Dimitri Komiotis, and Constantinos Stathopoulos. (2009) 'Competitive Inhibition of Human Poly(A)- Specific Ribonuclease (PARN) by Synthetic Fluoro-Pyranosyl Nucleosides' *Biochemistry.* 48. 6044–6051 DOI: 10.1021/bi900236k
- 52) Komiotis D., Delatre S., Holt L., Ollapally A., Balzarini J., De Clercq E., Ligo M. (1991) *Nucleosides Nucleotides.* 10, 431.
- 53) Paterson J., Uriel C., Egron M.J., Herscovici J., Antonakis K., Alaoui M. (1998) 'Antiproliferative and Apoptotic Activities of Ketonucleosides and Keto-C-

- Glycosides against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells with Intrinsic Drug Resistance.' *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:779–784.
- 54) Christos Kiritsis, Stella Manta, Vanessa Parmenopoulou, Jan Balzarini, Dimitri Komiotis. (2011) 'Branched-chain C-cyano pyranonucleosides: Synthesis of 3'-C-cyano & 3'-C-cyano-3'-deoxy pyrimidine pyranonucleosides as novel cytotoxic agents' *European Journal of Medicinal Chemistry.* 46 5668-5674
- 55) M. W. Beyerinck. (1889) *Z. Phys. Chem.* 3. 110
- 56) Ben Faust. (1997) '*Modern Chemical Techniques*' The Royal Society of Chemistry, Unilever
- 57) www.cf.ac.uk/phrmy/ChemEd/presentations.html
- 58) Elhalabi J., Rice K.G. (2004) 'Synthesis of uridine 5'-[2-S-pyridyl-3-thio-alpha-D-galactopyranosyl diphosphate]: precursor of UDP-thiogal sugar nucleotide donor substrate for beta-1,4-galactosyltransferase'. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 23(1-2):195-205.
- 59) Jean- Claude Fischer and Derek Horton. (1977) 'Grignard addition- reactions to Glycosulose Derivatives' *Carbohydrate Research.* 59.477-503
- 60) Foster A. B., Hems R., Webber J. M. (1967) 'Fluorinated carbohydrates, part I. 3-Deoxy-3-glucose-D-glucose.' *Carbohydr. Res.* 5. 292-301
- 61) Tewson T.J., Welch M.J. (1978) 'New approaches to the synthesis of 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose'. *J. Org. Chem.* 43:1090-1094
- 62) Pawan K. Sharma and Vasu Nair. (2000) 'Synthesis of 3'-Trifluoromethyl Nucleosides as Potential Antiviral Agents' *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* Volume 19. Issue 4. pages 757-774
- 63) Reichman U., Watanabe K.A., Fox J.J. (1975) 'A practical synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-D-arabinofuranose derivatives.' *Carbohydr Res.* 42(2):233-40.