



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

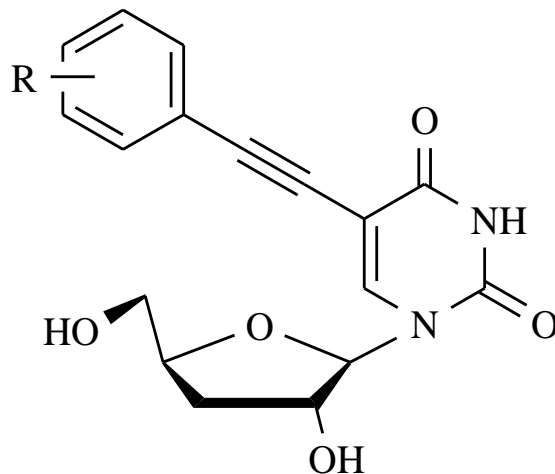
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΛΑΖΑΡΙΔΗ ΜΑΡΙΑ-ΑΓΑΠΗ

Διπλωματική Εργασία

**Νέοι τροποποιημένοι στο σάκχαρο και στη βάση
φουρανονουκλεοζίτες ως εν δυνάμει αντιϊικοί παράγοντες. Σύνθεση
και ταυτοποίηση με τεχνικές ενόργανης ανάλυσης-φασματοσκοπία.**



ΛΑΡΙΣΑ 2016

Διπλωματική Εργασία

Νέοι τροποποιημένοι στο σάκχαρο και στη βάση φουρανονουκλεοζίτες ως εν δυνάμει αντιϊκοί παράγοντες. Σύνθεση και ταυτοποίηση με τεχνικές ενόργανης ανάλυσης-φασματοσκοπία.

Novel sugar and base modified furanonucleosides as potential antiviral agents. Synthesis and spectroscopic identification.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κοιώτης Δημήτριος — Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μόσιαλος Δημήτριος — Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

*Στην μητέρα μου,
Ευαγγελία*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Κομιώτη Δημήτριο, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε και για τις εποικοδομητικές του υποδείξεις.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κολλάτο Νικόλαο για την άψογη συνεργασία, υπομονή, βοήθεια και τις πολύτιμες υποδείξεις του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, την κύρια ερευνήτρια Δρ. Μαντά Στυλιανή, για την υποστήριξή της, αλλά και για τις συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Δρ. Μάρα Παρασκευή ΕΕΔΙΠ του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης, για την συνεχή βοήθεια, υποστήριξη και καθοδήγησή της μέχρι και σήμερα, αλλά και στους συγγενείς και φίλους που στάθηκαν δίπλα μου όλη αυτή την περίοδο.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Υδατάνθρακες	8
1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακτεάλης	8
1.3 Νουκλεοζίτες.....	12
1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών	13
1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιϊικοί παράγοντες.....	15
1.5.1 Zidovudine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine)	16
1.5.2 DDI ή Didanosine	17
1.5.3 DDC ή Zalcitabine	18
1.6 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στο σάκχαρο και τη βάση	19
1.7 Συμπεράσματα.....	22
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	23
2.1 Σκοπός	23
3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	24
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)	24
3.2 Χρωματογραφία στήλης	25
3.3 Ξήρανση διαλυτών	25
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων	26
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
4.1.1 Επισκόπηση της σύνθεσης της (7).....	27
4.1.2 Μεθοδολογία Σύνθεσης	27
4.2.1 Σύνθεση της 5- <i>O</i> -βενζύλο-1,2- <i>O</i> -ισοπροπυλιδένιο- α - <i>D</i> -ξυλοφουρανόζης (2)	29
4.2.2 Σύνθεση της 1,2- <i>O</i> -ισοπροπυλιδένιο-5- <i>O</i> -βενζύλο-3-δεόξυ- α - <i>D</i> -ριβοφουρανόζης (3)	30
4.2.3 Σύνθεση της 1,2-δι- <i>O</i> -ακέτυλ-5- <i>O</i> -βενζύλο-3- <i>C</i> -δεόξυ- β - <i>D</i> -ριβοφουρανόζης (4) ..	31
4.2.4 Σύνθεση της 1-(2'- <i>O</i> -ακέτυλ-5- <i>O</i> -βενζύλο-3- <i>C</i> -δεόξυ- β - <i>D</i> -ριβοφουρανο)5- ιωδοουρακίλης (5).....	32
4.2.5 Σύνθεση της (6)	33
4.2.6 Σύνθεση της (7)	34
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR	35
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	38
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υδατάνθρακες απαντούν σε κάθε ζωντανό οργανισμό και αναφέρονται σε μια ευρεία κατηγορία πολύ-υδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών, που ονομάζονται κοινώς σάκχαρα. Τροποποιημένοι υδατάνθρακες συνιστούν μέρος του περιβλήματος των κυττάρων, άλλοι απαντούν στα μόρια του DNA που μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες, ενώ άλλοι χρησιμοποιούνται ως φάρμακα.

Οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες αποτελούν ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο καθώς εμφανίζουν σημαντική αντικαρκινική, αντιϊκή και αντιβιοτική δράση. Μια σημαντική κατηγορία αυτών είναι οι νουκλεοζίτες που φέρουν δομικές τροποποιήσεις στο τμήμα του σακχάρου. Πολλές τέτοιες ενώσεις έχουν συντεθεί και έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές βιολογικές τους ιδιότητες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση νέων τροποποιημένων στη βάση και στο σάκχαρο φουρανονουκλεοζιτών, ως νέοι αντιϊκοί παράγοντες. Αναλύονται οι συνθετικές οδοί που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή τους, η μέθοδος και τα αποτελέσματα ταυτοποίησής τους, καθώς και η βιολογική τους αποτίμηση.

ABSTRACT

Carbohydrates are found in every living organism and refer to a broad category of polyhydroxylated aldehydes and ketones, which are commonly known as sugars. Some modified nucleosides are part of the cells' outer layer, others are found in DNA molecules carrying genetic information, while others are used as medicines.

The modified nucleosides constitute a very important part of research, since they have essential anticancer, antiviral and antibiotic action. A very important category is the nucleosides, which have structural modifications on the sugar. Many of these compounds have been constructed and evaluated for their possible biological properties.

In the present thesis, the synthesis of new, base and sugar modified furanonucleosides, as novel antiviral agents, is described. The synthetic route for their preparation, the method and the results of identification, as well as their biological evaluation, are analyzed.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Υδατάνθρακες

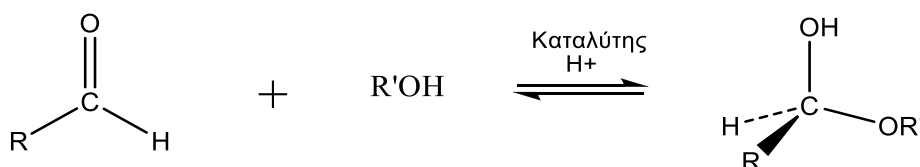
Οι υδατάνθρακες είναι πολύ-υδροξυαλδεΐδες, πολύ-υδροξυκετόνες, ή ενώσεις οι οποίες μπορούν να υδρολυθούν προς αυτές, με γενικό τύπο $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Ένας υδατάνθρακας ο οποίος δεν μπορεί να υδρολυθεί προς απλούστερες ενώσεις καλείται μονοσακχαρίτης, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Ένας υδατάνθρακας ο οποίος μπορεί να υδρολυθεί προς δύο μόρια μονοσακχαρίτη καλείται δισακχαρίτης, όπως το καλαμοσάκχαρο (σακχαρόζη), η λακτόζη και η μαλτόζη ενώ ένας υδατάνθρακας ο οποίος μπορεί να υδρολυθεί προς πολλά μόρια μονοσακχαρίτη καλείται πολυσακχαρίτης, όπως η κυτταρίνη, το άμυλο, και το γλυκογόνο.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ ενός μεγάλου ολιγοσακχαρίτη και ενός μικρού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτη, αφού αυτοί οι όροι στην πραγματικότητα χρησιμοποιούνται απλά για να περιγράψουν ενώσεις, των οποίων το μοριακό βάρος παρουσιάζει ένα ευρύ πεδίο τιμών.

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).

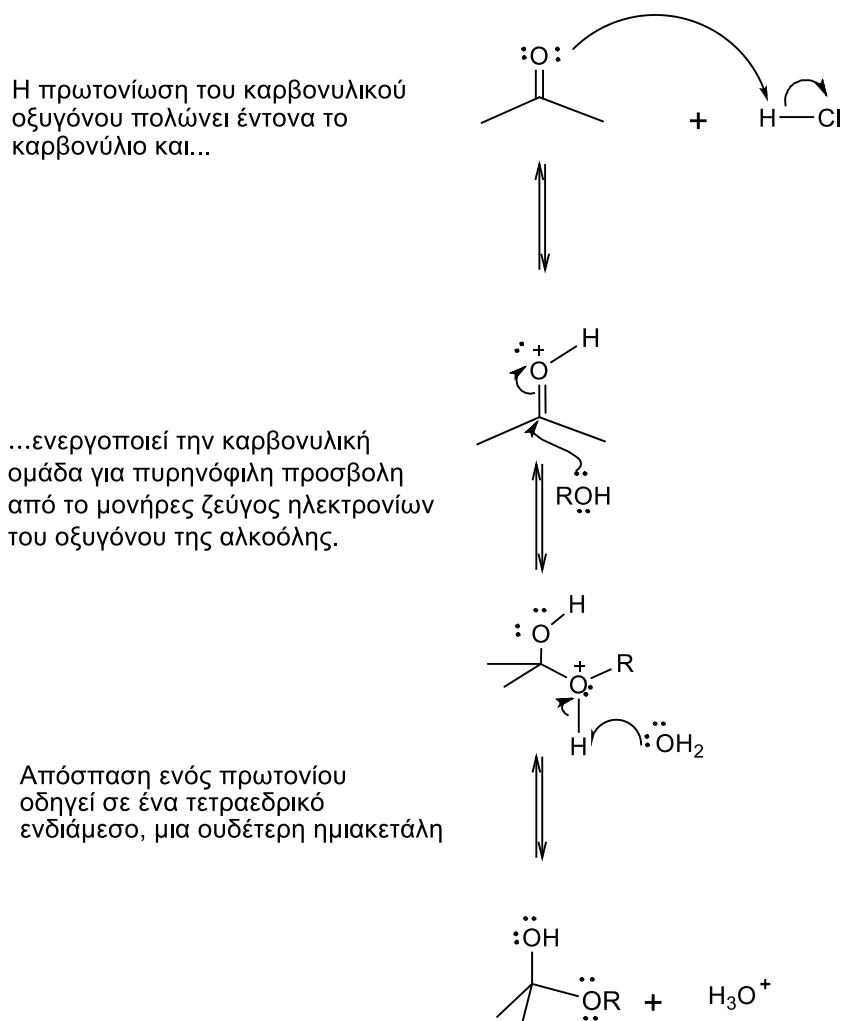
1.2.Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης

Μια ημιακετάλη σχηματίζεται κατά την προσθήκη του πυρηνόφιλου μορίου της αλκοόλης στην καρβονυλική ομάδα, αυτή είναι και τα δύο, ένας αιθέρας και μία αλκοόλη. Οι ημιακετάλες είναι ασταθείς ενώσεις (Morisson & Boyd, 1991, p. 758).



Σχήμα 1 : Σχηματισμός ημιακετάλης

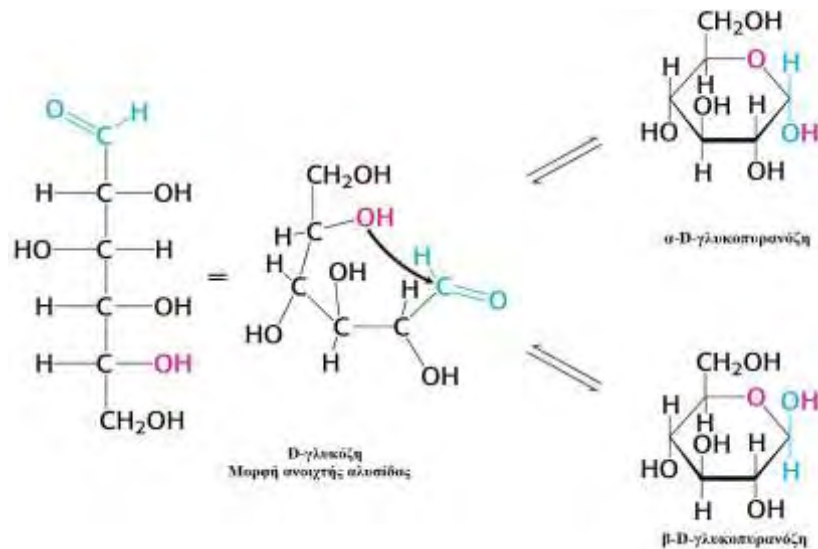
Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 2 (Mc Murry, 2000, p. 905):



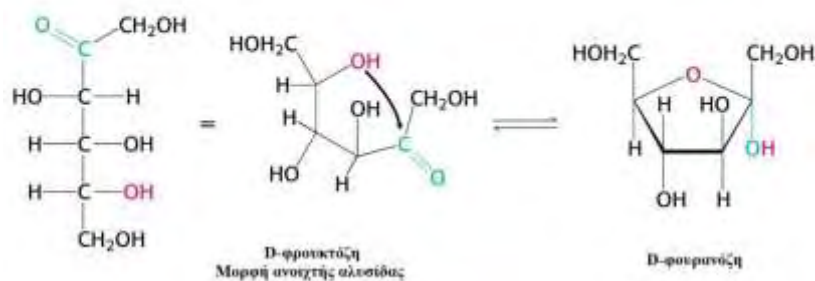
Σχήμα 2: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού ημιακετάλης

Όταν η υδροξυλομάδα και το καρβονύλιο βρίσκονται στο ίδιο μόριο, μπορεί να λάβει χώρα ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη, που οδηγεί στο σχηματισμό μιας κυκλικής ημιακετάλης. Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές της κλειστής και ανοικτής αλυσίδας. Για παράδειγμα, η γλυκόζη σε υδατικό διάλυμα απαντά με τη δομή του εξαμελούς δακτυλίου της πυρανόζης, που οφείλεται στην ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη του $-\text{OH}$ του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C1 (σχήμα 2). Η φρουκτόζη, αντίθετα, απαντά κατά 80% στην πυρανοζική δομή και κατά 20% στη δομή του πενταμελούς δακτυλίου της

φουρανόζης, που σχηματίζεται από την προσθήκη του $-OH$ του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C2 (σχήματα 3,4).



Σχήμα 3 : Σχηματισμός γλυκοπυρανόζης



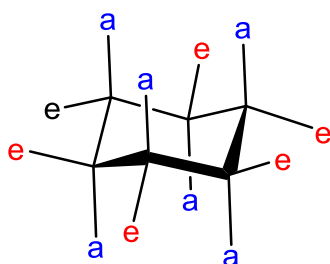
Σχήμα 4: Σχηματισμός φουρανόζης

Με την κυκλοποίηση της ανοικτής αλυσίδας, ένας μονοσακχαρίτης αποκτά τη δομή της φουρανόζης ή της πυρανόζης, όπου σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Τα δύο νέα διαστερομερή ονομάζονται ανωμερή και ο ημιακεταλικός άνθρακας ανωμερικό κέντρο (McMurry, 2000, p. 1249). Για παράδειγμα, στη γλυκόζη με την αντιστρεπτή της κυκλοποίηση προκύπτουν δύο δομές, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη(σχήμα 2). 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 $-CH_2OH$ 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).

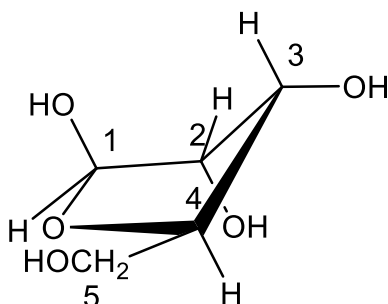
Στη φρουκτόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ίδια ονοματολογία για τα δυο της ανωμερή α και β. Η μόνη διαφορά είναι ότι αναφέρονται στο υδροξύλιο που είναι ενωμένο στον άνθρακα C-2, που είναι και ανωμερής.

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 ανάκλιντρο, 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 5). 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 5: Μορφή ανάκλιντρο μιας πυρανόζης (e = ισημερινός υποκαταστάτης, a = αξονικός υποκαταστάτης)

Κατά αναλογία ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να είναι πτυχωμένος, έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού (σχήμα 6). Αυτή η διαμόρφωση καλείται μορφή φακέλου. Οι δακτύλιοι της φουρανόζης είναι σε θέση να αλληλομετατρέπονται ταχύτατα σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις. Είναι πολύ πιο ευέλικτοι από τους δακτυλίους της πυρανόζης, γεγονός που εξηγεί την επιλογή τους ως συστατικών του RNA και DNA (Stryer, 1995).



Σχήμα 6: Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης

1.3.Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς της φύσης, καθώς αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης δεσμευμένης σε ένα σάκχαρο. Οι τέσσερις νουκλεοζιτικές μονάδες του DNA λέγονται δεοξαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυθυμιδίνη και δεοξυκυτιδίνη. Αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, τότε γίνεται λόγος για ριβονουκλεοζίτη και δεοξυριβονουκλεοζίτη αντίστοιχα. Σε ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο το άτομο C-1' της δεοξυριβόζης δεσμεύεται στο N-1 μιας πυριμιδίνης ή στο N-9 μιας πουρίνης. Η διαμόρφωση αυτού του νουκλεοζιτικού δεσμού είναι μορφής β, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Stryer, 1995).

Ανάλογα φυσικών νουκλεοζιτών έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των αντικαρκινικών, αντιϊκών, 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.

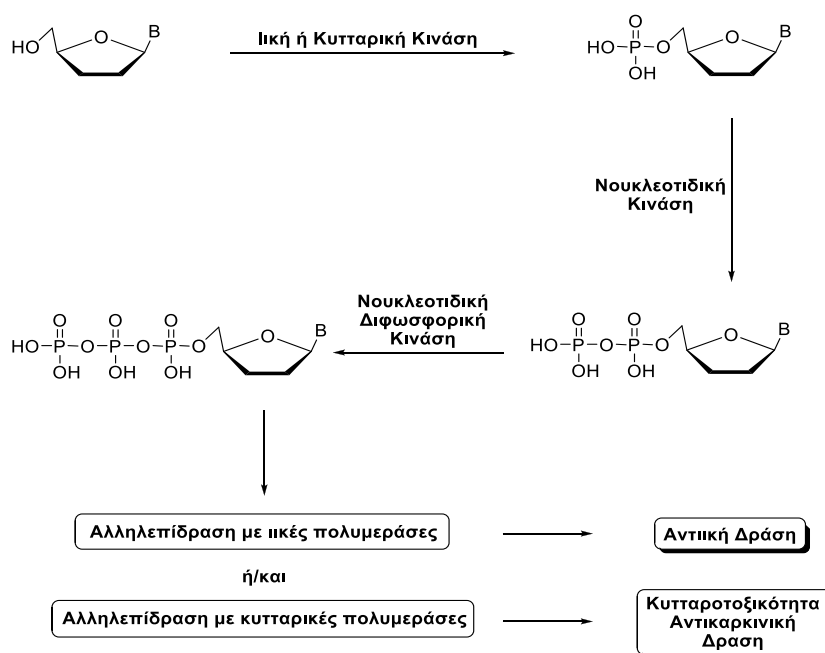
Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντιϊκή και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη με β -απεικόνιση. Τα νουκλεοτίδια, δηλαδή οι φωσφορυλιωμένες αλδοπεντόζες, ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μακρές αλυσίδες, οι οποίες απαρτίζουν τα νουκλεϊνικά οξέα, δηλαδή το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA). Τα νουκλεϊνικά οξέα ανακαλύφθηκαν στα μέσα του 19^{ου} αιώνα από τον Friedrich Miescher. Εντούτοις, μεσολάβησαν σχεδόν εκατό χρόνια μέχρι να γίνει γνωστό ότι στα μόρια του DNA βρίσκονται κωδικοποιημένες όλες οι πληροφορίες, οι οποίες προσδιορίζουν τη φύση του κυττάρου, ελέγχουν την ανάπτυξη και την διαίρεσή του και κατευθύνουν τη βιοσύνθεση των ενζύμων και των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τις φυσιολογικές λειτουργίες του.

1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Γενικά, ο τρόπος δράσης των φαρμάκων βασίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό στόχο, ο οποίος μπορεί να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη, όπως ένας υποδοχέας, ένας διάλυτος ιόντων, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφορέας, είτε τα νουκλεϊνικά οξέα. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων που διαθέτουν αντιϊκή ή αντικαρκινική δράση, τα οποία λόγω της δυνατότητας μεταφοράς τους εντός των κυττάρων με παθητική διάχυση είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία πολλών ασθενειών (Zhou *et al.* 2004).

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 ιϊκές κινάσες (Arner and Eriksson 1995). Αφού φωσφορυλιωθούν προς τις τριφωσφορικές τους δομές από κυτταρικά ή ιϊκά ένζυμα, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιϊκό διπλασιασμό, ή παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA (σχήμα 7).

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



Σχήμα 7: Φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες

νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας. Μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιϊκή πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητά τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

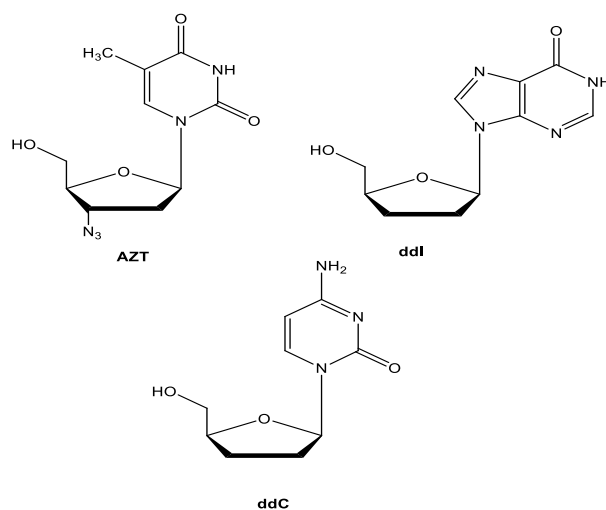
Εκτός του παραπάνω μηχανισμού, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα δρουν και μέσω άλλων μηχανισμών. Μπορούν να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της καταστολής αντιαποπτωτικών γονιδίων (Lui *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).

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 ως αντιϊκοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρεμβάλλονται στην σύνθεση του DNA και του RNA και μπορούν να επηρεάσουν εκτός από την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων και τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιϊκών φαρμάκων (Komiotis D. *et al.*, 2008, Zhou W. *et al.*, 2004, Perigaund C. *et al.*, 1993). Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, στηρίζεται στην ικανότητά αλληλεπίδρασης με τις ιϊκές πολυμεράσες. Οι αντιϊκοί νουκλεοζίτες αποτελούν θεμελιώδη λίθο στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τον ιό του απλού έρπητα (HSV), τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV), τον ιό του έρπη ζωστήρα (VZV), τον ιό της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV) και τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και C (HCV).

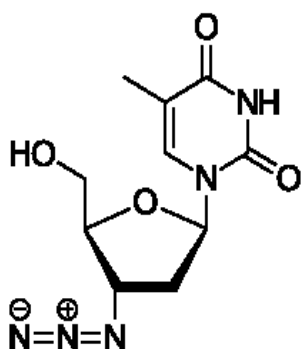
Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα από τα νουκλεοζιτικά αυτά ανάλογα είναι το zidovudine (AZT), το didanosine (ddI) και το zalcitabine (ddC), τα οποία χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα εναντίον του HIV (σχήμα 8). Πρέπει να τονίσουμε ότι τα νουκλεοσιδικά αυτά ανάλογα διαθέτουν για σάκχαρο μία πεντόζη.



Σχήμα 8: Χημικές δομές των AZT, ddI, ddC

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

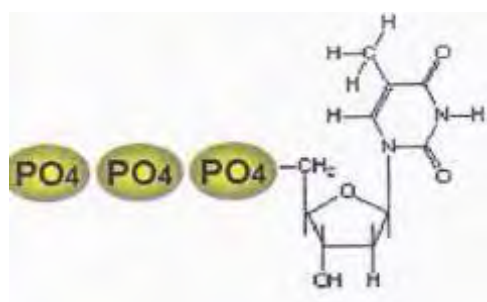
Το Zidovudine ή AZT. Το AZT (3'-αζιδο-2'-δεοξυθυμιδίνη) ήταν το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία του AIDS¹. Είναι ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης δηλαδή του ενζύμου που χρησιμοποιούν οι ιοί και συγκεκριμένα οι ρετροϊοί για να συνθέσουν DNA και να πολλαπλασιαστούν. Συνεπώς αποτελεί έναν τύπο αντιρετροϊκού φαρμάκου. Είναι ανάλογο της θυμιδίνης και



Σχήμα 9: Η χημική δομή του AZT

χορηγείται για την θεραπεία του AIDS δηλαδή της μόλυνσης από τον ιό της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1).

Πρόκειται για 2',3'-διδεοξυνουκλεοζίτες που προκύπτουν από την απομάκρυνση των υδροξυλομάδων από τις 2',3'-θέσεις του δακτυλίου της ριβόζης. Δρουν σαν αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Hiroyuki et al. 2004). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το ένζυμο που χρησιμοποιεί ο ιός για να συνθέσει το νέο DNA με μήτρα το ιικό RNA. Το ένζυμο αυτό συνθέτει μια αλυσίδα DNA συμπληρωματική με το RNA. Τα συγκεκριμένα ανάλογα νουκλεοσιτών αναστέλλουν τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή του ιικού DNA. Τα κυτταρικά ένζυμα μετατρέπουν το Zidovudine σε ενεργή μορφή 5'-τριφωσφορικού άλατος (Σχήμα 10).

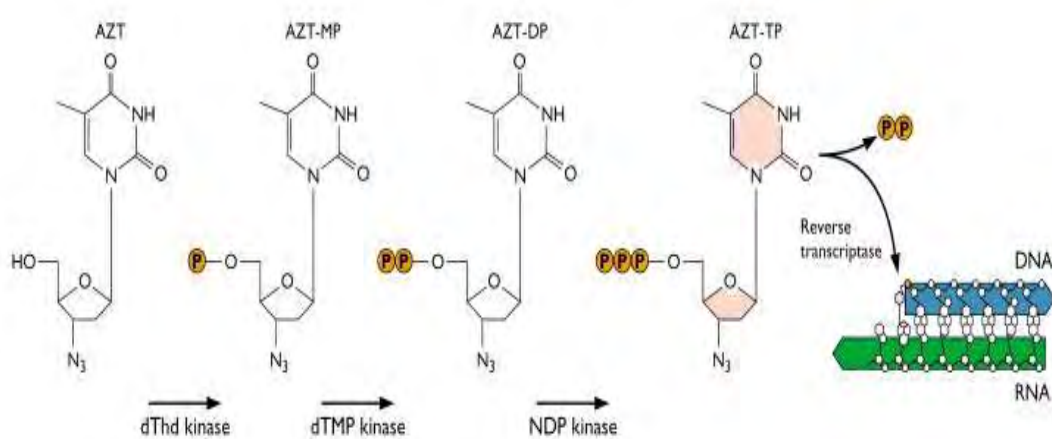


Σχήμα 10: Στη θυμιδίνη προστίθενται τρεις φωσφορικές ομάδες. Η πρώτη φωσφορυλίωση γίνεται από το ιικό ένζυμο και οι υπόλοιπες από τα κυτταρικά ένζυμα. ⁽¹³⁾

Έτσι, φωσφορυλιώνεται από τα κυτταρικά ένζυμα στην ενεργή του μορφή και δρα ως αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης τερματίζοντας την αλυσίδα μόλις συνδεθεί στο DNA (σχήμα 11). Επειδή έχει την αζιδο-ομάδα αντί για την

¹www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrv/

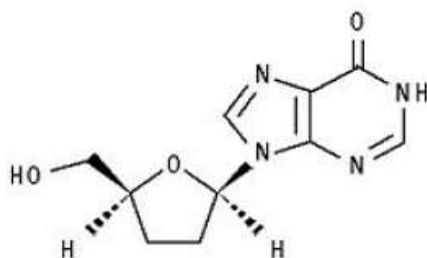
υδροξυλομάδα, η επόμενη βάση δεν μπορεί να ενωθεί και η σύνθεση της αλυσίδας σταματά.



Σχήμα 11: Τερματισμός της αλυσίδας του ιϊκού DNA από το φωσφορυλιωμένο AZT

1.5.2 DDI ή Didanosine

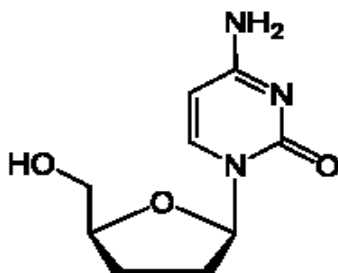
Το DDI είναι ένα συνθετικό πουρινικό νουκλεοσιδικό ανάλογο δραστικό ενάντια στον ιό της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1). Η δράση του είναι ανάλογη του AZT δηλαδή παρεμποδίζει την λειτουργία της ιϊκής αντίστροφης μεταγραφάσης.



Σχήμα 12: Η χημική δομή του DDI

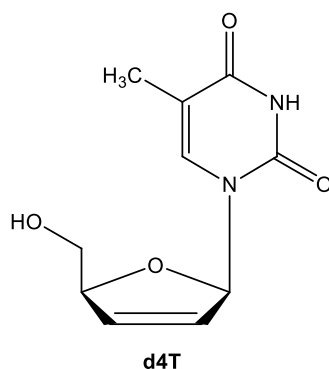
1.5.3 DDC ή Zalcitabine

Το DDC ή αλλιώς διδεοξυκυτιδίνη έχει παρόμοια δράση με το AZT και το DDI δηλαδή χρησιμοποιείται ως αντιρετροϊκό φάρμακο.



Σχήμα 13: Η χημική δομή του DDC

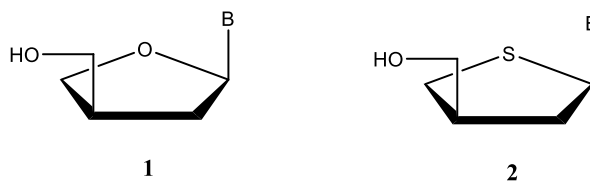
Το συνθετικό ενδιαφέρον στράφηκε επίσης στους 2',3'-ακόρεστους νουκλεοζίτες, όπου η 3'-δεοξυ-2',3'-διδεϋδροθυμιδίνη (d4T) δρα επίσης σαν αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης στην θεραπεία κατά του AIDS (Brossetteetal. 2001). Η χημική δομή του d4T απεικονίζεται στο σχήμα 14.



Σχήμα 14: Χημική δομή της D4T

Στην κατηγορία των αντιϊκών ενώσεων συναντάμε και μη κλασικές κατηγορίες νουκλεοζιτών. Μια χαρακτηριστική ομάδα είναι οι απιο- διδεοξυνουκλεοζίτες 1, όπου η 4'-υδροξυμεθυλο ομάδα έχει μετατοπιστεί στον C-3' (Moonetal. 2002). Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν αντιϊκή δράση, ενώ αντικαθιστώντας την

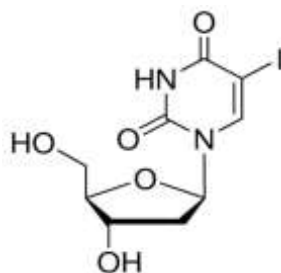
θέση του οξυγόνου με ένα άτομο θείου, έχουμε τους αντίστοιχους θειο-απιο-διδεοξυνουκλεοζίτες (σχήμα 15).



Σχήμα 15: Θειο-, απιο- διδεοξυνουκλεοζίτες

1.6 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στο σάκχαρο και τη βάση

Ο πρώτος κλινικά αποτελεσματικός νουκλεοζίτης που εγκρίθηκε ήταν η 5-ιώδο-2'-δεοξουριδίνη (Σχήμα 16) στις αρχές του 1960, του οποίου η σύνθεση ήταν μέρος ενός αντικαρκινικού προγράμματος (W. H. Prusoff, 1959).

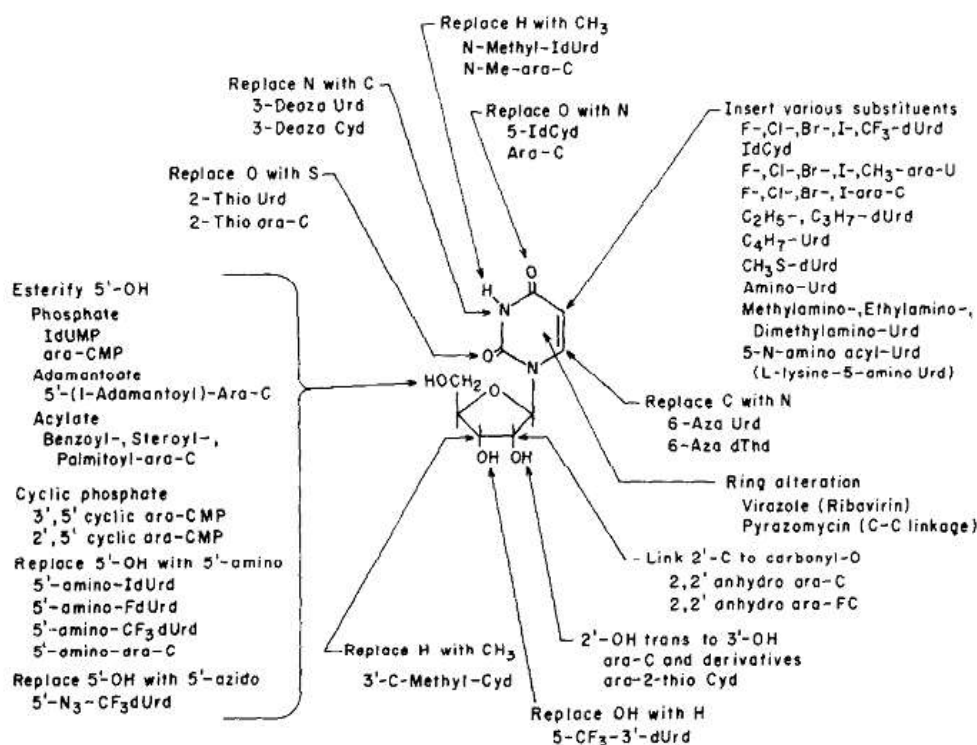


Σχήμα 16: Χημική δομή της 5-ιώδο-2'-δεοξουριδίνης

Οι Johnsons και John (T. B. Johnson and C. O. Johns, 1905-06) είχαν αναφέρει τη σύνθεση 5'-ιώδοπυριμιδινών το 1905. Το 1945, οι Hitchings *et al.* (G. H. Hitchings *et al.*, 1945) ξεκίνησαν συστηματική μελέτη της βιολογικής δράσης διαφόρων παραγόντων της πουρίνης και της πυριμιδίνης. Σύντομα, μία ομάδα (R. L. Thompson *et al.*, 1949) τεκμηρίωσε την μέτρια αναστολή από την 5-βρωμοουρακίλη, την 5-υδρόξουρακίλη και τη 2,4-διθιοθυμίνη της αντιγραφής του ιού της δαμαλίτιδας σε κυτταρική καλλιέργεια. Οι Visser *et al.* (Visser *et al.*, 1952) ανέφεραν ότι διάφορα 5-υποκατεστημένα παράγωγα της ουριδίνης (5-χλώρο, 5-διάζο, 5-φορμαμιδο, 5-υδρόξυ

και 5-άμινω) ανέστηλαν τον πολλαπλασιασμό του ιού της εγκεφαλίτιδας του ποντικού Theiler σε καλλιέργεια εγκεφάλου ποντικού.

Ένα παράδειγμα που αναπαριστά όλους τους τύπους τροποποίησης που αποδίδει νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση φαίνεται στο Σχήμα 17.



Σχήμα 17: Τύποι τροποποίησης που αποδίδουν νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση.

5-Ίωδο-2'-δεοξουριδίνη (IdUrd, IUdR, IDU, Ιδοξουριδίνη)

Οι χημικές, βιοχημικές και κλινικές δοκιμές της IdUrd έχουν ήδη αναφερθεί στο παρελθόν (W. H. Prusoff and B. Goz., 1975, W. H. Prusoff and B. Goz., 1973). Η σημαντικότητα του IdUrd έγκειται στο ότι μπορεί να αναπτυχθεί ένα νουκλεοτιδικό φάρμακο το οποίο θα είναι κλινικά αποτελεσματικό όταν γίνεται μία μόλυνση από έναν ιό. Η IDU είχε περιγραφεί ως ένας αντι-HSV παράγοντας για τη θεραπεία της ερπητικής κερατίτιδας από τους Kaufman *et al.* [6-9]. Η αποτελεσματικότητα της Ιδοξουριδίνης στη θεραπεία του απλού έρπη του επιθηλίου του κερατοειδούς στον άνθρωπο, μία ασθένεια που αποτελεί την κύρια αιτία τύφλωσης λόγω της μόλυνσης του κερατοειδούς στις ΗΠΑ, έχει αποδειχθεί και εγκριθεί από τον FDA. Ο Juel-Jensen (B. E. Juel-Jensen, 1974, B. E. Juel-Jensen, 1973), έχει ήδη αναλύσει την

κλινική χρησιμότητα της Ιδοξουριδίνης και πολλών άλλων αντιϊκών παραγόντων στον άνθρωπο.

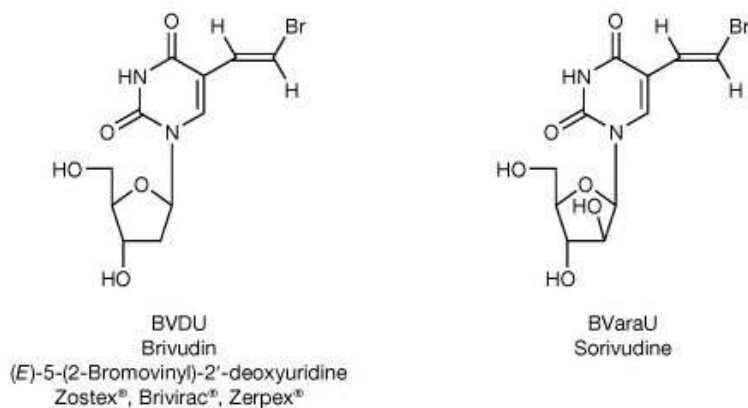
Ο μηχανισμός της αντιϊκής δράσης της IdUrd σχετίζεται με τις δυσμενείς βιολογικές επιπτώσεις της ενσωμάτωσης του αναλόγου της θυμιδίνης σε ιϊκό DNA (W. H. Prusoff and B. Goz., 1975, W. H. Prusoff and B. Goz., 1973). Η ενσωμάτωση της IdUrd στο DNA φυσιολογικών μη μολυσμένων κυττάρων, ενδεχομένως είναι υπεύθυνη για την τοξικότητα που έχει βρεθεί κατά τη διάρκεια είτε της τοπικής είτε της συστηματικής θεραπείας. Η συστηματική τοξικότητα είναι δόσοεξαρτώμενη και όταν εισάγεται καθημερινά στον άνθρωπο σε συγκέντρωση περίπου 100mg/kg για 5 ή 6 ημέρες, μπορεί να παρατηρηθεί στοματίτιδα, λευκοπενία και αλωπεκία (P. Calabresi *et al.*, 1961).

Μαζί με αυτά τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα, υπάρχουν και άλλες ανησυχίες των οποίων η σημασία για τον άνθρωπο είναι δύσκολο να αξιολογηθεί, και περιλαμβάνουν την ικανότητα της IdUrd να: 1] επάγει τον σχηματισμό ιών σε καλλιέργεια κυττάρων, 2] να αυξήσει το ρυθμό μετάλλαξης των βακτηρίων, 3] να δημιουργήσει χρωμοσωμικές βλάβες και, 4] να επηρεάσει την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση (W. H. Prusoff and B. Goz, 1975).

Έτσι, η IdUrd φαίνεται να είναι η πρώτη ένωση που παρουσιάζει ξεκάθαρα μια επιτυχημένη θεραπεία μιας καθιερωμένης λοίμωξης από ιό στον άνθρωπο.

Μετά τη σύνθεση της 5-ιωδο-2'-δεοξουριδίνης (IDU) από τον Prusoff (Prusoff, 1959), το ενδιαφέρον για τους 5-υποκατεστημένους νουκλεοζίτες ως πιθανά αντιϊκά παράγωγα έχει αυξηθεί (Prusoff & Fischer, 1979). Τα ακόρεστα 5-υποκατεστημένα παράγωγα έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μεταξύ αυτών, η BVDU [E-5- (2-βρωμοβινυλ) -2'-δεοξουριδίνη] έχει αναδειχθεί ένας από τους πιο ισχυρούς και εκλεκτικούς αναστολείς της αντιγραφής του ιού του έρπη, ιδιαίτερα του ιού απλού έρπη τύπου-1 (HSV-1) (De Clercq *et al.*, 1979). Μεγάλο μέρος του BVDU και σχετικών ενώσεων φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητα της HSV-1 κινάσης της θυμιδίνης (TK) να δεχτεί τέτοια ανάλογα ως υποστρώματα, σε αντίθεση με την ανικανότητα του αντίστοιχου ενζύμου ξενιστή (Cheng *et al.*, 1981). Επιπλέον, η τριφωσφορική BVDU αναστέλλει την HSV-1 DNA πολυμεράση πιο αποτελεσματικά από ό,τι αναστέλλει τις κυτταρικές DNA πολυμεράσες (Allaudeen *et al.*, 1981).

Η IDU μπορεί να θεωρηθεί ως το σημείο εκκίνησης για την σύνθεση διαφόρων νέων παραγώγων 5-υποκατεστημένων-2'-δεοξουριδίνης. Το πιο σημαντικό παράγωγο αυτής της σειράς είναι η (*E*)-5-(2-βρωμοβίνυλο)-2'-δεοξουριδίνη (Brivudin/BDU), το οποίο αποδείχτηκε πολύ καλός ειδικός αναστολέας του HSV-1, καθώς επίσης και του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα (VZV) [11,12]. Αργότερα, το ομόλογο του BVDU, η 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-*E*-5-(2-βρωμοβίνυλο)ουρακίλη (BVaraU), βρέθηκε ότι είναι εξίσου ισχυρή, αν όχι και περισσότερο από το BVDU, κατά του ιού VZV [10].



Σχήμα 18: Οι ενώσεις (*E*)-5-(2-βρωμοβίνυλο)-2'-δεοξουριδίνη και BVaraU, με ισχυρή δράση έναντι του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα [13].

Η BV-araU εμφανίζει αντιϊκή δράση και έναντι εργαστηριακών στελεχών και απομονωμένων κλινικών προϊόντων όταν δοκιμάζεται σε διάφορους ανθρώπινους ινοβλάστες και σε κυτταρική σειρά ινοβλαστών πιθήκου (Haruhiko M. *et al.* 1991).

1.7 Συμπεράσματα

Το συμπέρασμα είναι ότι υπάρχει ανάγκη για αντιϊκά παράγωγα με σημαντικά μικρότερη τοξικότητα. Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά τέτοιων αντιϊκών φαρμάκων πρέπει να είναι: 1) ευκολία παρασκευής (χαμηλό κόστος), 2) καλή διαλυτότητα στην τιμή του φυσιολογικού pH ή κοντά σε αυτή, 3) χημική σταθερότητα σε διάλυμα και σε θέρμανση, 4) μεταβολική σταθερότητα στο κυκλοφορικό σύστημα, 5) επαρκή μη πολικότητα ώστε να αποφευχθούν προβλήματα στην μεταφορά των κυττάρων, 7) όχι ανοσοκαταστολή, 8) μη ενεργοποίηση του ιού, 9) μη τερατογόνος δράση και, 10) μη μεταλλαξιγένεση ή καρκινογένεση.

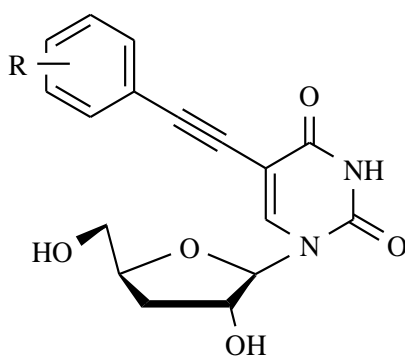
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός

Η ανάγκη για την εύρεση νέων θεραπευτικών ουσιών, με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες παρενέργειες καθώς και η ραγδαία και συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά, πληθώρας φαρμάκων που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο. Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση νέων τροποποιημένων νουκλεοζιτών ως εν δυνάμει αντιϊικοί παράγοντες.

Εκτεταμένες μετατροπές έχουν γίνει τόσο στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης όσο και στο τμήμα του σακχάρου για την εύρεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με καλύτερη βιολογική δράση. Όπως ήδη αναφέραμε από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία έτη, νέες τάξεις φούρανο-νουκλεοζιτών με τροποποιημένη βάση, όπως οι C5-υποκατεστημένοι νουκλεοζίτες πυριμιδίνης έχουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιϊκές και αντικαρκινικές.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω στοιχεία, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης φουρανονουκλεοζιτών με διαφορετικούς υποκαταστάτες όπου και με ετεροκυκλική βάση την ιωδοουρακίλη (σχήμα 19). Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν ως αντιϊικοί παράγοντες.



Σχήμα 19: Τροποποιημένος στη βάση και στο σάκχαρο φουρανονουκλεοζίτης με υποκαταστάτες: R=2-F (a), 2-Cl (b), 2,5-CH₃ (c)

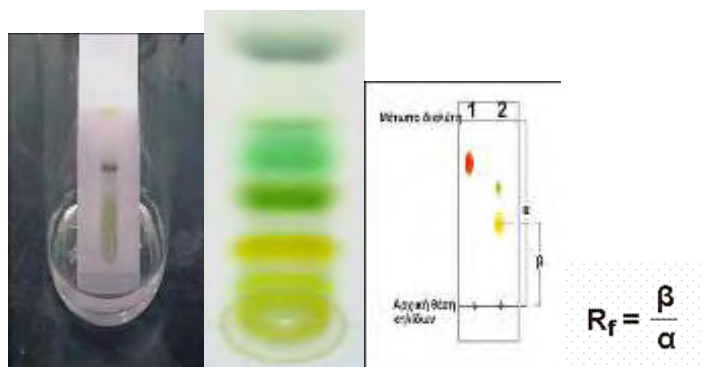
3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieseilel 60F₂₄) πάχους 0,2mm.

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

Μια χρωματογραφία λεπτής στιβάδας απεικονίζεται στο Σχήμα 20.



Σχήμα 20: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

Η χρωματογραφία για το πείραμά μας διεκπεραιώθηκε χρησιμοποιώντας τα παρακάτω συστήματα διαλυτών:

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας / εξάνιο 30/70
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας / εξάνιο 20/80
- Διάλυμα Γ : οξικός αιθυλεστέρας / εξάνιο 40/60
- Διάλυμα Δ: μεθανόλη / διγλωρομεθάνιο 10/90

3.2 Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η πλειοψηφία των καθαρισμών οργανικών ουσιών πραγματοποιούνται μέσω της χρωματογραφίας μιας τεχνικής κατά την οποία το επιθυμητό προϊόν διαλύεται σε έναν οργανικό διαλύτη ή σύστημα διαλυτών σε συγκεκριμένη κάθε φορά αναλογία και στη συνέχεια αφήνεται να διαρρέυσει μέσω ενός κατακόρυφου γυάλινου σωλήνα ο οποίος είναι γεμάτος με προσροφητικό υλικό. Το προς διαχωρισμό μείγμα ονομάζεται κινητή φάση ενώ το προσροφητικό υλικό εντός του σωλήνα στατική. Επειδή οι διαφορετικές ενώσεις προσροφώνται στη στατική φάση σε διαφορετική έκταση, μετακινούνται διαμέσου αυτής με διαφορετικές ταχύτητες και για το λόγο αυτό, εξέρχονται από τη στήλη – εκλούνται- από το άκρο της. Ο χρόνος έκλουσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα από την πολικότητά της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες προσροφώνται κατά κανόνα, εντονότερα και άρα μετακινούνται βραδύτερα μέσω της στατικής φάσης σε σχέση με τα περισσότερα άπολα.

Η χρωματογραφία στήλης πραγματοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merckgrade).

3.3 Ξήρανση διαλυτών

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

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

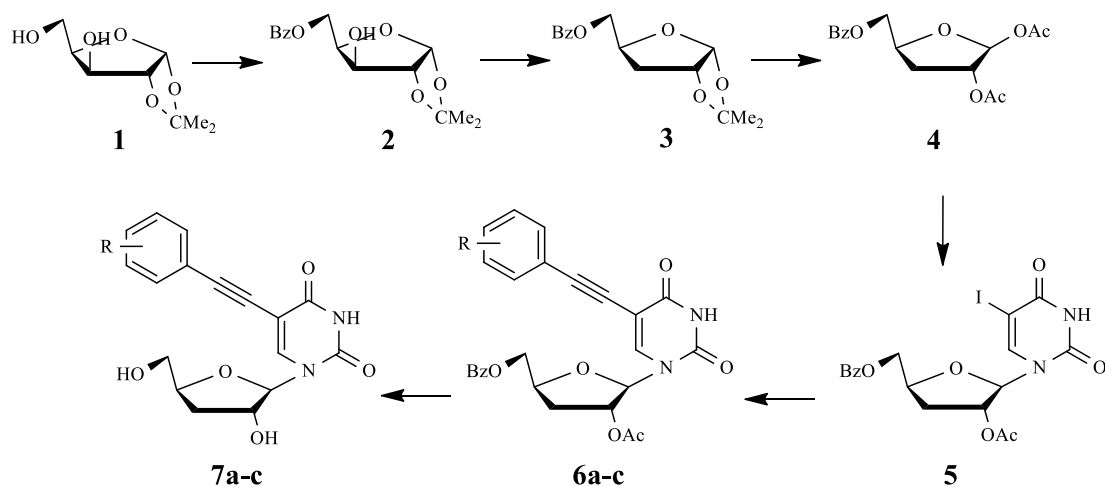
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί την πρώτη και χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική προσδιορισμού της δομής των μορίων καθώς παρέχει ένα χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο.

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 300MHz στο φωτόμετρο Bruker AVAMCEIII 300, χρησιμοποιώντας chloroform-d (CDCl_3), methanol-d4 (CD_3OD). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^1H .

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1.1 Επισκόπηση της σύνθεσης της (7)



4.1.2 Μεθοδολογία Σύνθεσης

Η πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 5-*O*-υδρόξυ-1,2-*O*-ισοπροπυλιδενιο- α -*D*-ξυλοφουρανοζη (**1**), η οποία σε διαλύτη CH₂Cl₂, μετά από εκλεκτική βενζυλίωση της 5-υδρόξυ ομάδας, δίνει τη δευτεροταγή αλκοόλη 5-*O*-βενζόυλο-1,2-*O*-ισοπροπυλιδενιο- α -*D*-ξυλοφουρανοζη (**2**). Η αντίδραση προχωράει με καλή απόδοση 80%.

Η επόμενη αντίδραση είναι μία αντίδραση αναγωγής της **2**, η οποία γίνεται σε δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο δημιουργείται ο μέθυλο-οξαλοξικός εστέρας παρουσία μεθυλ-οξαλικού χλωρίου σε άνυδρο CH₂Cl₂ και στη συνέχεια, με αντίδραση αναγωγής παρουσία υδριδίου του τριβουτυλοκασιτέρου (tri-*n*-butyltin hydrate) σε άνυδρο τολουόλιο λαμβάνουμε την 1,2-*O*-ισοπροπυλιδένιο-5-*O*-βενζόυλο-3-δεόξυ- β -*D*-ριβοφουρανόζη (**3**). Η αντίδραση προχωράει με απόδοση 77%.

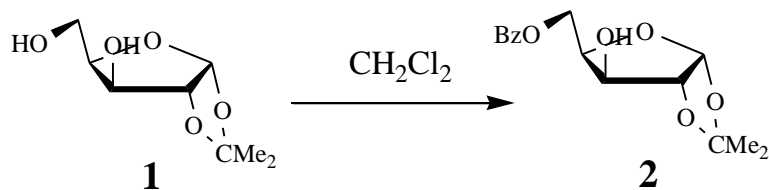
Η σύνθεση συνεχίζεται με την υδρόλυση του προϊόντος **3** με TFA 90%. Στη συνέχεια, παρουσία οξικού ανυδρίτη (Ac₂O) σε πυριδίνη, γίνεται ακετυλίωση της ένωσης και λαμβάνουμε το επιθυμητό προϊόν 1,2-δι-*O*-ακέτυλ-5-*O*-βενζόυλο-3-*C*-δεόξυ-β-*D*-ριβοφουρανόζη **4** με απόδοση 85%.

Ακολουθεί σύζευξη με αντίδραση Vorbrüggen [14-17]. Γίνεται η σύζευξη του σακχάρου **4** με τη βάση 5-ιωδοουρακίλη. Αρχικά, σιλυλιώνεται η βάση σε άνυδρο ακετονιτρίλιο (MeCN), παρουσία εξαμεθυλοδισιλαζανίου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης στους 100°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, προστίθεται το σάκχαρο **4** και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορο-μεθανοσουλφονικού-τριμεθυλο-σιλυλεστέρα (Me₃SiOSO₂CF₃) στους 0°C λαμβάνοντας την επιθυμητή 1-(2'-*O*-ακέτυλ-5'-*O*-βενζόυλο-3'-*C*-δεόξυ-β-*D*-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλη (**5**), σε απόδοση 85%.

Στη συνέχεια, με αντίδραση Sonogashira [18,19] παίρνουμε τα προστατευμένα προϊόντα **6a-c**. Ένα τυπικό πείραμα Sonogashira είναι το ακόλουθο. Ο φούρανο-νουκλεοζίτης της 5-ιωδοουρακίλης (**5**) διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και με την προσθήκη του κατάλληλου αλκινίου, της τριαιθυλαμίνης (Et₃N), του ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκαταλύτης) και του τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄] (καταλύτης), πραγματοποιήθηκε η σύζευξη τους υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων ισχύος 200W για 5 λεπτά στους 60°C, σε αποδόσεις 69-74%

Τέλος, η σύνθεση ολοκληρώνεται με την αποπροστασία των προϊόντων **6** σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας τους προστατευμένους νουκλεοζίτες **7a-c**, σε αποδόσεις 91-92%.

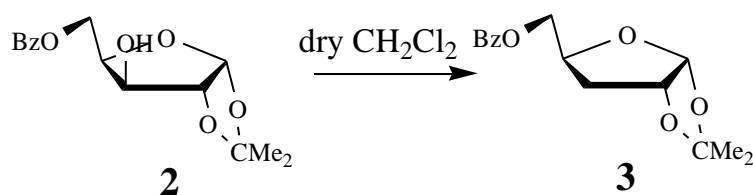
4.2.1 Σύνθεση της 5-*O*-βενζόυλο-1,2-*O*-ισοπροπυλιδένιο- α -*D*-ξυλοφουρανόζης (**2**)



Η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 5-*O*-υδρόξυ-1,2-*O*-ισοπροπυλιδενιο- α -*D*-ξυλοφουρανοζη (**1**) (2 gr, 10,5 mmol) διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο (20 ml) παρουσία χλωριούχου βενζολίου (1 eq), στους 0°C για 30 λεπτά. Στο προκύπτον μείγμα προστέθηκε H_2O και ακολούθησε εκχύλιση με CH_2Cl_2 . Κατόπιν, αφού συλλέχθηκε η οργανική φάση, έγινε ξήρανση με άνυδρο Na_2SO_4 , διήθηση και συμπύκνωση, το προκύπτον διάλυμα μεταφέρθηκε για καθαρισμό σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 30% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Έπειτα, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **2** (2,47 g) ελήφθη υπό τη μορφή ελαίου.

TLC (Διάλυμα A)	$R_f = 0,2$
Απόδοση	80%

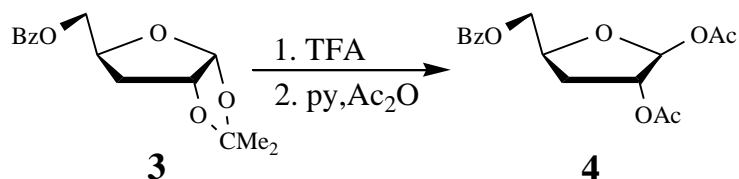
4.2.2 Σύνθεση της 1,2-*O*-ισοπροπυλιδένιο-5-*O*-βενζόυλο-3-δεόξυ- α -*D*-ριβοφουρανόζης (**3**)



Για την σύνθεση της 1,2-*O*-ισοπροπυλιδένιο-5-*O*-βενζόυλο-3-δεόξυ- α -*D*-ριβοφουρανόζης, προστέθηκε η (**2**) (2 eq, 750 mg, 2,55mmol) σε άνυδρο CH_2Cl_2 (10 ml, $d=1.325 \text{ g/mL}$). Στη συνέχεια, έγινε εκχύλιση του διαλύματος με CH_2Cl_2 και κορεσμένο διάλυμα NaCl και αφού συλλέχθηκε η οργανική φάση, έγινε ξήρανση με άνυδρο Na_2SO_4 , διήθηση και τέλος συμπύκνωση. Κατόπιν, στο μίγμα προστέθηκε υδρίδο του τριβουτυλοκασιτέρου (tri-*n*-butyltin hydrate) (2 eq, 783 mg, 2,55 mmol) και άνυδρο τολουόλιο (10 ml) για 1 ώρα. Το προϊόν μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) για καθαρισμό χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 20% οξικό αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **3** (545,5 mg) ελήφθη υπό τη μορφή ελαίου.

TLC (Διάλυμα B)	$R_f = 0,6$
Απόδοση	77%

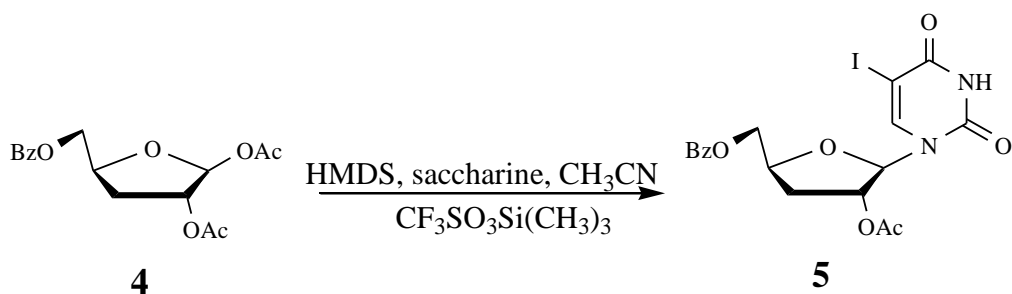
4.2.3. Σύνθεση της 1,2-δι-*O*-ακετυλ-5-*O*-βενζόυλο-3-*C*-δεόξυ-β-*D*-ριβοφουρανόζης (4).



Η ένωση (3) (270 mg, 0,97 mmol) αναδεύτηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με υδατικό διάλυμα τριφθοροοξικού οξέος (TFA) 90% για να γίνει διάνοιξη του ισοπροπυλενιδίου. Στη συνέχεια, το διάλυμα συμπυκνώθηκε. Αφού απομακρύνθηκαν οι διαλύτες υπό κενό, προστέθηκε πυριδίνη (1,6 ml) και οξικός ανυδρίτης (0,7 ml) με σκοπό να γίνει ακετυλίωση της ένωσης και να ληφθεί η (4). Ακολούθησε συμπύκνωση, του προϊόντος και καθαρισμός σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης 20% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν 4 (264,3mg) ελήφθη υπό τη μορφή άχρωμου ελαίου.

TLC (Διάλυμα B)	R _f = 0,4
Απόδοση	85%

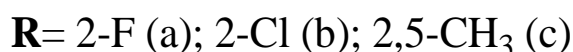
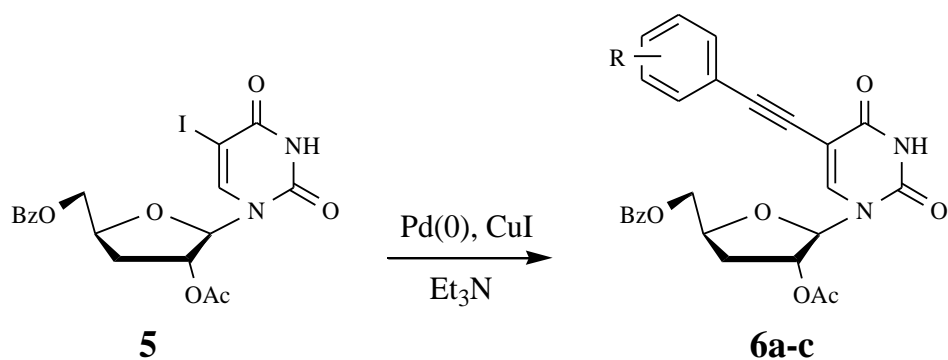
4.2.4 Σύνθεση της 1-(2'-*O*-ακέτυλ-5-*O*-βενζόυλο-3-*C*-δεόξυ-β-*D*-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλης (**5**).



Ακολουθεί σύζευξη με αντίδραση Vorbrüggen. Ένα διάλυμα της 5-ιωδοουρακίλης (1,2 eq, 0,94mmol, 222,75 mg), του HMDS (1,4 eq, 253μL, 1,1 mmol) και της σακχαρίνης (0,046 eq, 7,3mg, 0,04mmol) σε άνυδρο ακετονιτρίλιο (0,24 mmol, 1,6 ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για μία ώρα στους 100 °C. Η ολοκλήρωση της συλλίωσης της βάσης γίνεται αντιληπτή όταν το μίγμα γίνει διαυγές. Αφότου το μείγμα έγινε διαυγές, προστέθηκε η 1,2-δι-*O*-ακέτυλ-5-*O*-βενζόυλο-3-*C*-δεόξυ-β-*D*-ριβοφουρανόζη (**4**) (250 mg, 0,78mmol) καθώς και ο καταλύτης $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (0,20 ml, 1,1 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 30 λεπτά με ψύξη στους 0 °C. Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 . Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **5** (331,7mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρού.

TLC (Διάλυμα Γ)	$R_f = 0,25$
Απόδοση	85%
$[\alpha]_D^{22}$	-2
λ_{max}	284 nm

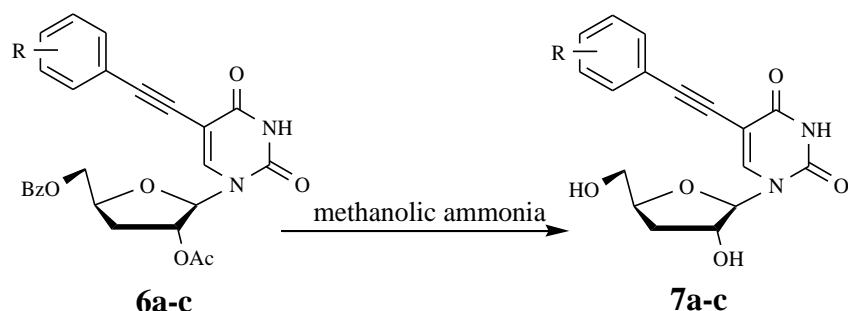
4.2.5 Σύνθεση της (6).



Η σύνθεση του 6 επιτεύχθηκε με τη μέθοδο Sonogashira με χρήση μικροκυμάτων: Το *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και η 1-(2'-*O*-ακέτυλ-5'-*O*-βενζόυλο-3'-*C*-δεόξυ-β-*D*-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλη (5) διαλύονται σε 5 ml άνυδρου διαλύτη (0,41mmol, 206mg), 2 eq του κατάλληλου τελικού αλκινίου, τριφαινυλοφωσφορικό παλλάδιο [Pd(PPh₃)₄] (0,1 eq, 323,6 mg, 0,28mmol), ιωδιούχο χαλκό (0,1 eq, 53,7 mg, 0,28 mmol), τριαιθυλαμίνη (3 eq, 1,2ml), και εν συνεχεία γίνεται χρήση μικροκυμάτων σε συνθήκες 200 Watt, για 5 λεπτά στους 60°C. Η επεξεργασία που ακολουθείται για την παραλαβή του προϊόντος περιλαμβάνει εκχύλιση του μίγματος της αντίδρασης με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, παραλαβή της οργανικής φάσης, ξήρανση με άνυδρο Na₂SO₄ και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Τα επιθυμητά προϊόντα **6a** (138 mg), **6b** (148 mg), **6c** (151 mg) ελήφθησαν υπό τη μορφή κίτρινου αφρού με απόδοση 69%, 71% και 74%αντίστοιχα.

	Προϊόν 6a	Προϊόν 6b	Προϊόν 6c
TLC (Διάλυμα Γ)	R _f = 0,22	R _f = 0,18	R _f = 0,4
Απόδοση	69%	71%	74%
[α] _D ²²	-22	+16	+4
λ _{max}	292 nm	294 nm	293 nm

4.2.6 Σύνθεση της (7).

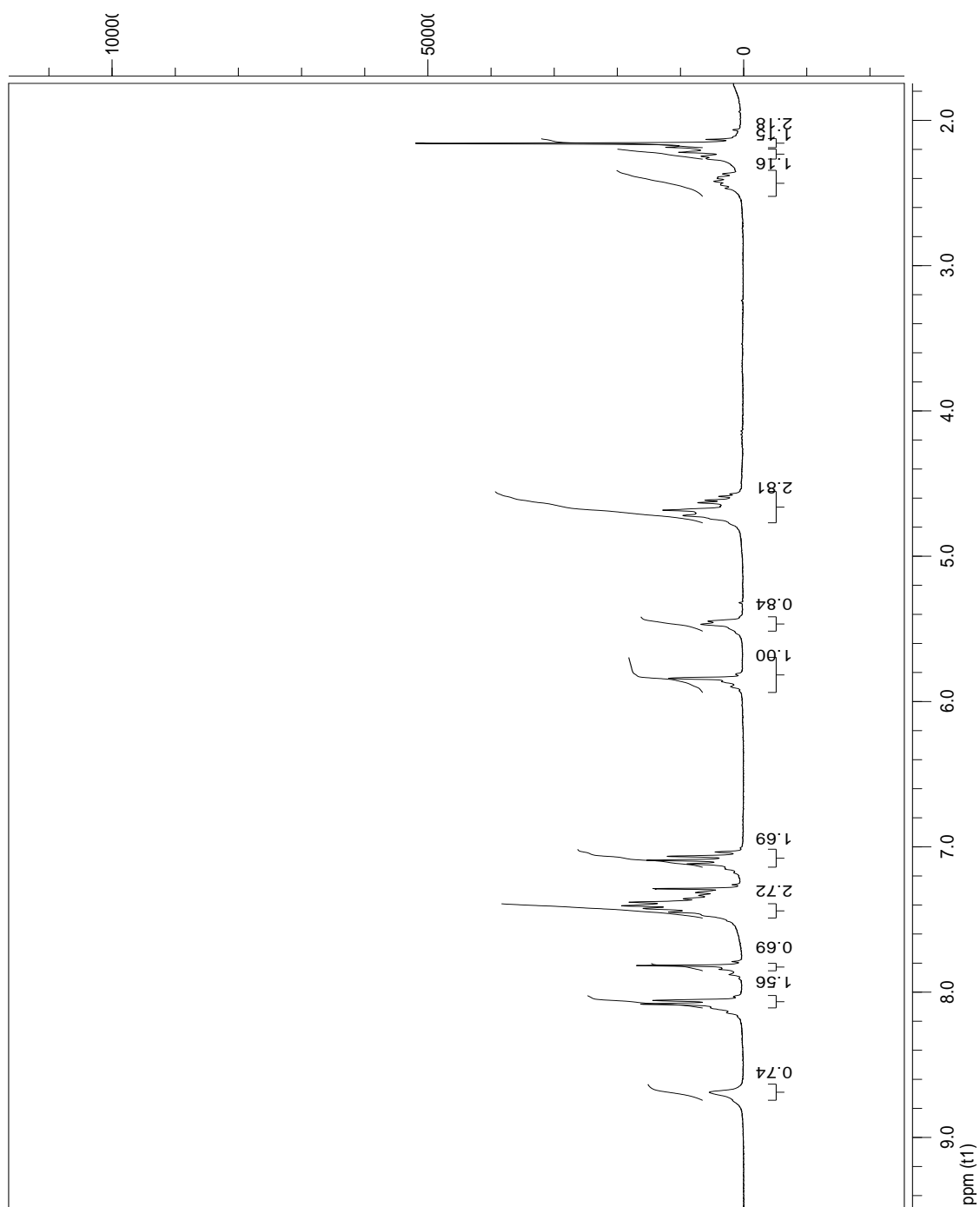


R= 2-F (a); 2-Cl (b); 2,5-CH₃ (c)

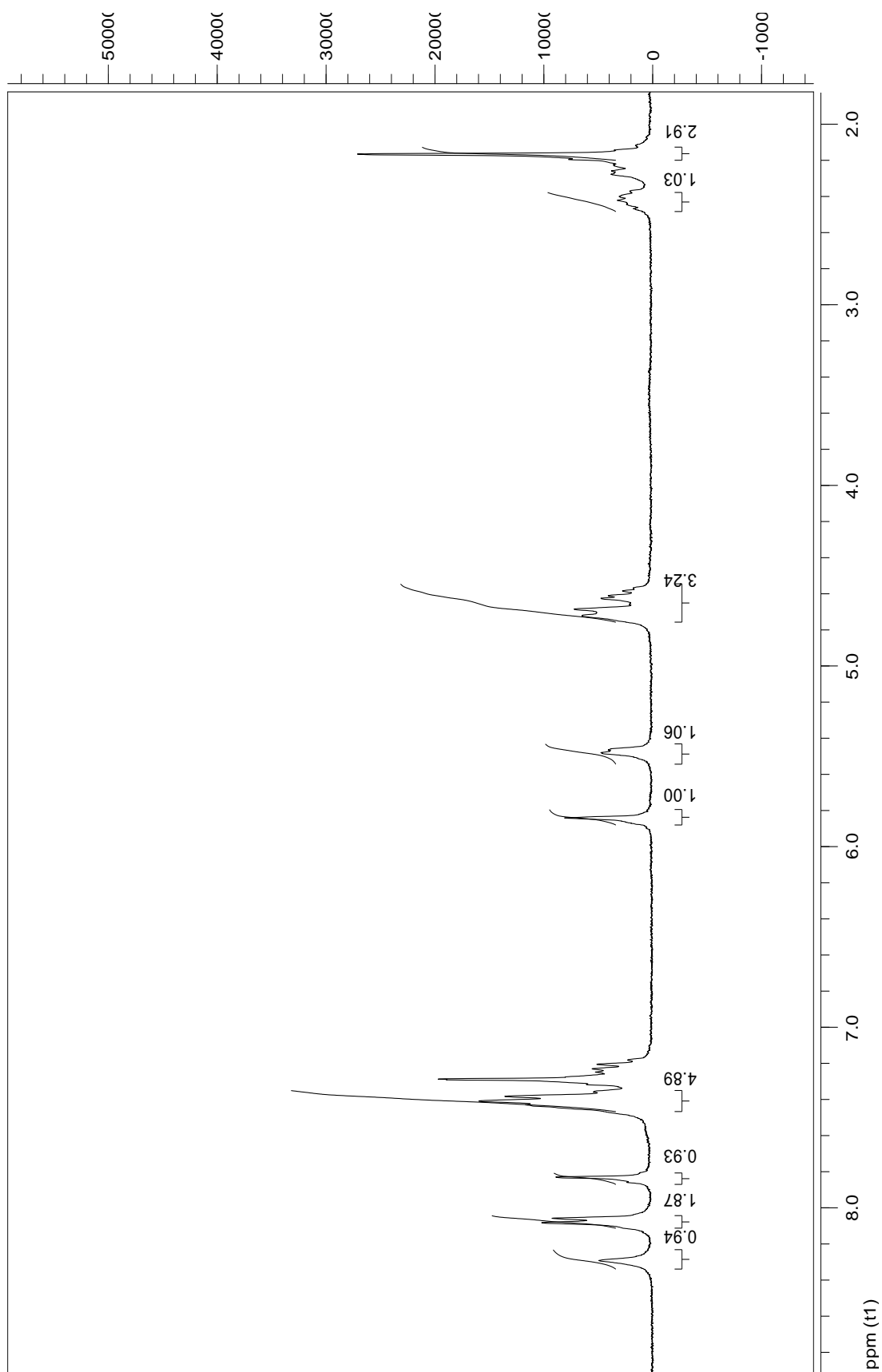
Διάλυμα των προστατευμένων νουκλεοζιτών **6a** (100 mg, 0,2mmol), **6b** (100 mg, 0,2mmol) και **6c** (100 mg, 0,2mmol) σε κορεσμένη μεθανολική αμμωνία (262,5 ml) αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες καθαρίζονται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 10% μεθανόλης σε CH₂Cl₂, οπότε παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα **7a** (63,7mg), **7b** (66mg) και **7c** (65,6mg), αντίστοιχα, με μορφή κίτρινου ελαίου.

	Προϊόν 7a	Προϊόν 7b	Προϊόν 7c
TLC (Διάλυμα Δ)	R _f = 0,4	R _f =0,37	R _f = 0,38
Απόδοση	92%	91%	92%
[α] _D ²²	-4	+2	+1
λ _{max}	292 nm	294nm	293 nm

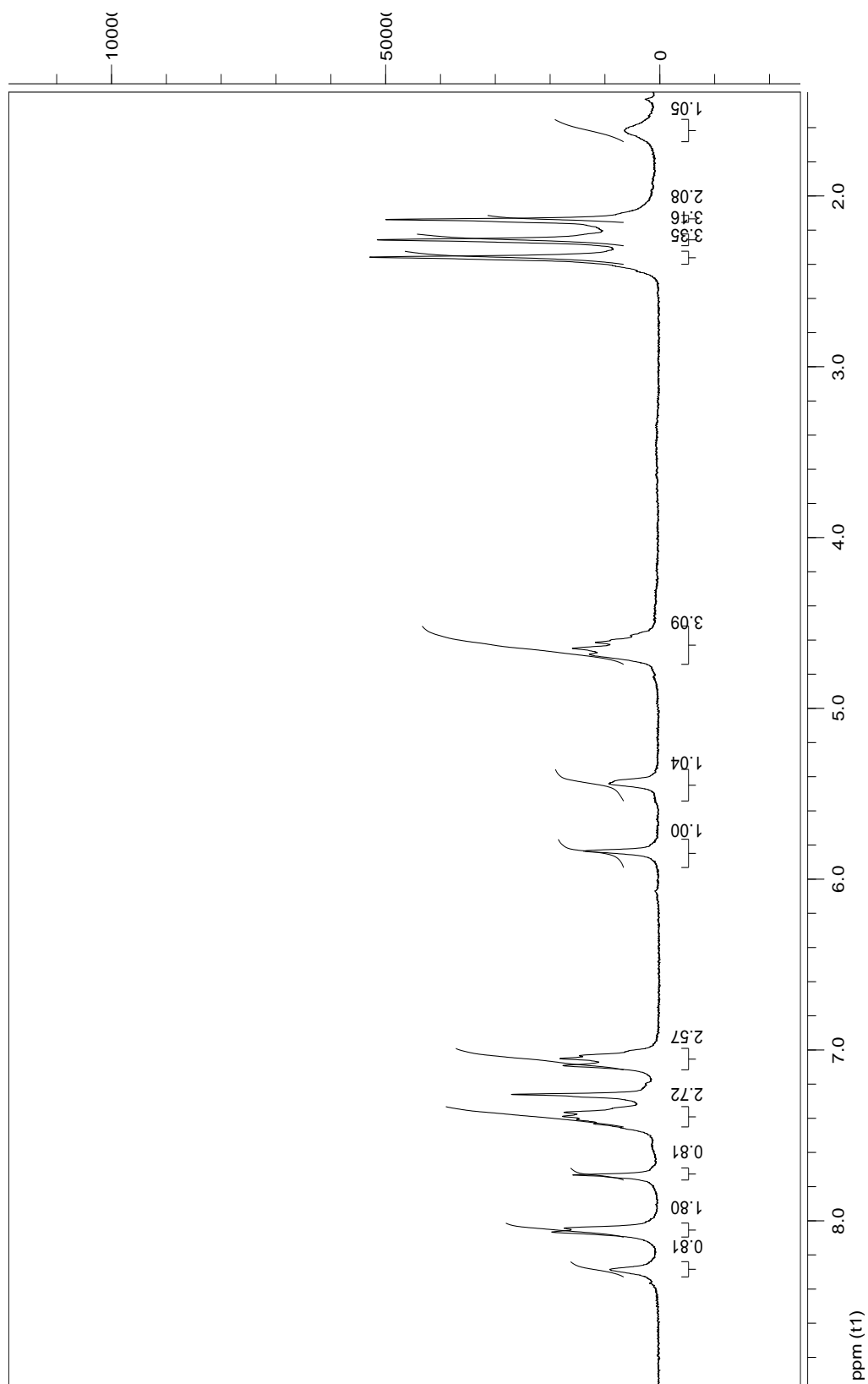
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR



Φάσμα ^1H NMR του προϊόντος 6a



Φάσμα ^1H NMR του προϊόντος 6b



Φάσμα ¹H NMR του προϊόντος 6c

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

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

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης φορανονονουκλεοζιτών με αντιϊκή δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, εύκολη, με μικρό αριθμό βημάτων. Οι τελικές αποδόσεις που πήραμε από τη σύνθεση των τελικών φορανονονουκλεοζιτών είναι ικανοποιητικές. Πιο συγκεκριμένα, σύνθεση 5-*O*-βενζουλο-1,2-*O*-ισοπροπυλιδενιο- α -*D*-ξυλοφουρανόζη (2) με απόδοση 80%, 1,2-*O*-ισοπροπυλιδένιο-5-*O*-βενζόυλο-3-*C*-δεόξυ- α -*D*-ριβοφουρανόζη (3) με απόδοση 77%, 1,2-*di-O*-ακέτυλ-5-*O*-βενζόυλο-3-*C*-δεόξυ- β -*D*-ριβοφουρανόζη (4) με απόδοση 85%, 1-(2'-*O*-ακέτυλ-5'-*O*-βενζόυλο-3'-*C*-δεόξυ- β -*D*-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλη (5) με απόδοση 85%, οι ενώσεις 6a-c με ανάλογα της (6) όπου R=2-F(a); 2-Cl (b); 2,5-CH₃ (c) με αποδόσεις 69%, 71% και 74% αντίστοιχα και τέλος, οι ενώσεις 7a-c με ανάλογα της (7) όπου R=2-F(a); 2-Cl (b); 2,5-CH₃ (c) με αποδόσεις 92%, 91% και 94% αντίστοιχα. Όλες οι νέες ενώσεις προσδιορίστηκαν από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹H NMR.

Τα νέα μόρια 6a-c και 7a-c μελετήθηκαν ως προς την κυτταροτοξική και αντιϊκή τους δράση έναντι του εντεροϊού Κοξάκι B4 (Coxsackie virus B4) και του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (Respiratory syncytial virus) της σειράς HeLa. Η ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού των ιϊκών κυτταρικών σειρών από τους νεοσυντιθέμενους φορανονονουκλεοζίτες, απεικονίζεται στον Πίνακα 1. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τις νέες ενώσεις συγκρίνονται με αυτά του αντιϊκου φαρμάκου Ριμπαβιρίνη.

Πίνακας 1: Κυτταροτοξική και αντιϊκή δράση: HeLa κυταροκαλλιέργειες

Ένωση	Concentration unit	Minimum cytotoxic concentration ^a	EC ₅₀ ^b	
			Coxsackie virus B4	Respiratory syncytial virus
6a	μM	100	>100	>100
6b	μM	100	8.9	20
6c	μM	20	>100	>100
7a	μM	>100	>100	>100
7b	μM	>100	>100	>100
7c	μM	>100	>100	>100
Ribavirin	μM	>250	250	4.5

a: Η συγκέντρωση που απαιτείται για να προκαλέσει μικροσκοπικά ανιχνεύσιμη αλλαγή στη μορφολογία φυσιολογικών κυττάρων.

b: Η συγκέντρωση που απαιτείται για τη μείωση κυτταροπαθογένειας, που προκαλείται από ιούς, κατά 50%.

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 1, ο νεοσυντιθέμενος φουρανονουκλεοζίτης με υποκαταστάτη ένα χλώριο, παρουσίασε ανασταλτική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των ιϊκών κυττάρων Coxsackie B4 και των κυττάρων του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού. Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά έναντι της δράσης της Ριμπαβιρίνης.

Παρατηρούμε ότι ο προστατευμένος νουκλεοζίτης **6b** έχει καλύτερη δράση έναντι του αποπροστατευμένου, λόγω αυξημένης λιποφιλικότητας. Αυτό οφείλεται στο ότι, εν γένει τα λιπόφιλα μόρια διαχέονται πιο εύκολα και γρήγορα δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης, επειδή είναι λιπώδης. Αντίθετα, ο αποπροστατευμένος νουκλεοζίτης **7b** είναι λιγότερο δραστικός σε σχέση με τον **6b**, καθώς έχει ελεύθερες υδροξυλομάδες στο μόριό του και άρα, μειωμένη λιποφιλικότητα.

Μόρια με υποκαταστάτη/ες χλώριο, είναι γνωστά για την αντιϊκή τους δράση. Το χλώριο έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν έναντι του ιού Coxsackie B4 και βρέθηκε ότι μειώνει τη δραστηριότητά του [14].

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως απολυμαντικό, αλλά και ως συστατικό διαφόρων φαρμάκων. Το χλώριο ως υποκαταστάτης αυξάνει τη λιποφιλικότητα του μορίου² και επίσης, είναι πολύ αποτελεσματικό έναντι παθογόνων μικροοργανισμών διότι σπάει τους χημικούς δεσμούς των μορίων τους³.

Στα δεδομένα του πίνακα των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι η δράση του μορίου **6b**, με ελάχιστη κυτταροτοξική συγκέντρωση στα 100 μM, είναι εξαιρετική, αφού απαιτούνται μόλις 8,9 μM της ένωσης για την μείωση κατά 50% καλλιέργειας ιικών κυττάρων Coxsackie B4 και 20 μM σε καλλιέργεια κυττάρων του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού.

Αντίθετα, παρατηρούμε ότι το αντιϊκό φάρμακο Ριμπαβιρίνη, αν και έχει ελάχιστη κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις πάνω από 250 μM, απαιτείται συγκέντρωση 250 μM για μείωση της καλλιέργειας των ιικών κυττάρων Coxsackie B4 κατά 50%. Ωστόσο, απαιτείται πολύ μικρότερη συγκέντρωση (4,5 μM) για την μείωση κατά 50% καλλιέργειας κυττάρων του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού.

² <http://www.curvedarrowpress.com/wpblog/?p=70>

³ <http://www.lenntech.com/processes/disinfection/chemical/disinfectants-chlorine.htm>

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. McMurry J. Οργανική Χημεία, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 1245, 905.
2. Morisson & Boyd Οργανική Χημεία, τόμος ΙΙΙ Γραφείο Εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων 1331, p. 758.
3. Berg, J. M., Tymoczko J. L., Stryer L, Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, **2001** (p) 329-351.
4. Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1997: 4, 26
5. William H. Prusoff and David C. Ward., Commentary, Nucleoside analogs with antiviral activity, *Biochemical Pharmacology*, 1976:25, 1233-1239
6. Kaufman HE. Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 109: 251-252. Medline doi:10.3181/00379727-109-27169
7. Kaufman HE, Nesburn AB, Maloney ED. IDU therapy of herpes simplex. *Arch Ophthalmol* 1962; 67: 583-591. Medline doi:10.1001/archopht.1962.00960020583012
8. Kaufman HE, Martola E-L, Dohlman C. Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in treatment of herpes simplex keratitis. *Arch Ophthalmol* 1962; 68: 235-239. Medline doi:10.1001/archopht.1962.00960030239015
9. Kaufman HE, Heidelberger C. Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine in herpes simplex keratitis. *Science* 1964; 145: 585-586. Medline doi:10.1126/science.145.3632.585
10. Shigeta S, Yokota T, Iwabuchi T, et al. Comparative efficacy of antiherpes drugs against various strains of varicella-zoster virus. *J Infect Dis* 1983; 147: 576-584. Medline doi:10.1093/infdis/147.3.576
11. De Clercq E, Descamps J, De Somer P, Barr PJ, Jones AS, Walker RT. (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 2947-2951. Medline doi:10.1073/pnas.76.6.2947

12. De Clercq E, Degreeef H, Wildiers J, et al. Oral (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in severe herpes zoster. *BMJ* 1980; 281: 1178 Medline doi:10.1136/bmj.281.6249.1178
13. Erik De Clercq, Review: Selective anti-herpesvirus agents, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 2013; 23:93-101
14. Pierre Payment, Michel Tremblay and Michel Trudel, Relative Resistance to Chlorine of Poliovirus and Coxsackievirus Isolates from Environmental Sources and Drinking Water, *Applied and Environmental Microbiology*, **1985**, 49(4), 981-983,
15. Vorbrüggen H., Ruh-Pohlenz C., *Handbook of Nucleoside Synthesis*, **2001**
16. Vorbruggen, H.; Hofle, G. Nucleoside Syntheses, XXIII On the Mechanism of Nucleoside Synthesis. *Chem. Ber.*, **1981**, 114, 1256- 1268
17. Kiritsis C., Manta S., Papatotiriou I., Coutouli-Argyropoulou E., Trakossas S., Balzarini J. and Komiotis D., Synthesis and Biological Evaluation of 3'-C-Ethynyl and 3'-C-(1,4-disubstituted-1,2,3-triazolo) Double-Headed Pyranonucleosides, *Medicinal Chemistry*, **2012**, 8, 000-000
18. G Michael Blackburn, Michael J Gait, David Loakes, David M Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology: Edition 3*, RSC Publishing, **2006**, p.82
19. Majid M. Heravi, Sodeh Sadjadi, Recent advances in the application of the Sonogashira method in the synthesis of heterocyclic compounds, *Tetrahedron*, **2009**, 65 (37), 7761–7775
20. Jason Tierney, Pelle Lidström, *Microwave Assisted Organic Synthesis*, Blackwell Publishing CRC Press, **2005**, 31-32
21. Haruhiko MACHIDA, Makiko NISHITANI, Tatsuo SUZUTANI, and Kozaburo HAYASHI, Different Antiviral Potencies of BV-araU and Related Nucleoside Analogues against Herpes Simplex Virus Type 1 in Human Cell Lines and Vero Cells, *Microbiol. Immunol*, Vol. 35 (11), 963-973, 1991
22. P.E Came and L.A. Caliguiri, *Chemotherapy and Viral Infections*, Springer Science & Business Media, 2012, 98-100

23. C McGuigan, A Brancaleo, H Barucki, S Srinivasan, G Jones, R Pathirana, A Carangio, S Blewett, G Luoni, O Bidet, A Jukes, C Jarvis, G Andrei, R Snoeck, E De Clercq and J Balzarini, *Review Furano pyrimidines as novel potent and selective anti-VZV agents, Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, **2001**, 12, 77–89
24. Bertina B. Wentworth and EE. Russel Alexander, Isolation of Chlamydia trachomatis by Use of 5-Iodo-2-Deoxyuridine-Treated Cells, *Applied Microbiology*, **1974**, 27(8), 912-916
25. Komiotis D., Manta S., Tsoukala E. and Tzioumaki N., Antiviral Unsaturated Nucleosides, *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, **2008**, 7, 219-244
26. Morris J. Robins and Philip J. Barr, Nucleic Acid Related Compounds. 39. Efficient Conversion of 5-Iodo to 5-Alkynyl and Derived 5-Substituted Uracil Bases and Nucleosides 5-Alkynyl and Derived 5-Substituted Uracil Bases and Nucleosides, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 1854-1862
27. Wen Zhou, Giuseppe Gumina, Youhoon Chong, Jianing Wang, Raymond F, Schinazi, and Chung K. Chu, Synthesis, Structure- Activity Relationships, and Drug Resistance of 3-D-3-Fluoro-2,3-Unsaturated Nucleosides as Anti-HIV Agents, *Med. Chem.*, 2004, 47 (13), 3399-3408
28. Vander, M. D. Sherman, Ph. D. Luciano, Ph. D. M. Tsakoulos, Φυσιολογία του ανθρώπου, μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού.
29. Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* **1995**, 67, 155.
30. Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* **2000**, 20, 417.
31. Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* 2000, 39, 12757-12765.
32. Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 3154-3163
33. Lewin, B. *Genes* **2003**, VIII, 6.
34. Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, **2005**, 4, 4.

35. Lui, V. W. Y. W.; Lau, C. P. Y. P.; Cheung, C. S. F. S.; Ho, K.; Ng, M. H. L. H.; Cheng, S. H. H.; Hong, B.; Tsao, S.-W. W.; Tsang, C. M. M.; Lei, K. I. K. I.; Yamasaki, Y.; Mita, A.; Chan, A. T. *Biochemical pharmacology* **2010**, *79*, 1772.
36. Balatsos, N.A.A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis, D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6044-6051.
37. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 420-428.
38. Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevsek, A.; Pamulapati, R.T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2696.
39. Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J.M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis D.; Leonidas, D. D. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, *18*, 3413–3425.
40. Fokin, V. V. *ACS Chem. Biol.*, **2007**, *2*, 775–778.
41. Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 1249–1262.
42. Johnson, J. A.; Koberstein, J. T.; Finn M. G.; Turro, N. *J. Macromol. Rapid Commun.*, **2008**, *29*, 1052–1072.
43. Huisgen, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565–598.
44. A. C. Tomé, in *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations*, ed. Storr, R. C.; Gilchrist, T. L. Thieme, Stuttgart, **2004**, vol. 13: Five-Membered Heteroarenes with three or More Heteroatoms, pp. 415–601;
45. Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 15998–15999.
46. Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin V. V.; Van der Eycken, E. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 4223–4225.
47. Seela, F.; Sirivolu, V. R. *Chem. Biodiversity*, **2006**, *3*, 509–514.
48. F. Seela, F.; Sirivolu, V. R. *Helv. Chim. Acta*, **2007**, *90*, 535–552.
49. Seela, F.; Sirivolu, V. R. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **2007**, *26*, 597–601.

50. Seela, F.; Sirivolu, V. R.; Chittepu, P. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 211–224.
51. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless K. B.; V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 210–216.
52. Urien, M.; Erothu, H.; Cloutet, E.; Hiorns, R. C.; Vignau, L. ; Cramail, H. *Macromolecules*, **2008**, *41*, 7033–7040.
53. Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 365.
54. Pontikis, R.; Wolf, J.; Monneret, C.; Florent, J. –C. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3523.
55. Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2319.
56. 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.
57. Fett, J. W., J. L. Bethune, *et al.* (1987). "Induction of angiogenesis by mixtures of two angiogenic proteins, angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorioallantoic membrane." *Biochem Biophys Res Commun* *146*(3): 1122-1131.
58. Leonidas, D. D., G. B. Chavali, *et al.*. High-resolution crystal structures of ribonuclease A complexed with adenylic and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors. *Protein Sci.* **2003**, *12*(11): 2559-2574.
59. Stimac, A; Kobe, J. An improved preparation of 2,3,5-tri-O-acyl- β -D-ribofuranosylazides by the Lewis acid-catalyzed reaction of β -D-ribofuranosyl acetates and trimethyl silyl azide- An example of concomitant formation of the α anomer by trimethyl silyl triflate catalysis. *Carbohydrate Research*, *232*: 359-365.
60. Menzies, I.S. and Seakins, J.W.T. (1976) Paper and Thin Layer Chromatography. Chromatography and electrophoretic Techniques, Vol.1 (Smith, I. And Seakins, J.W.T. eds.), *William Heinemann Medical books Ltd.*, 183.

61. AN R. Van Rompay, Ameli Norda, Karin Lind En, Magnus Johansson, and Anna Karlsson. Phosphorylation of Uridine and Cytidine Nucleoside Analogs by Two Human Uridine-Cytidine Kinases. *Mol Pharmacol*. 2001, 59:1181–1186
62. Jason M. Walsh, Penny J. Beuning. Synthetic Nucleotides as Probes of DNA Polymerase Specificity. *Journal of Nucleic Acids*. vol. 2012, Article ID 530963, 17 pages, **2012**. doi:10.1155/2012/530963
63. Jason E. Hein and Valery V. Fokin. Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. *Chem. Soc. Rev.*, 2010,39: 1302-1315
64. <http://chemistry.tutorvista.com>. Chromatography Sept **2012**
65. C.L.F. Meyers, D.J. Meyers. Thin-Layer Chromatography. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. **2008**, DOI: 10.1002/0471142700.nca03ds34
66. Hayflick L., Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry*. 1997, 62: 1180-1190
67. Hanahan D. and Folkman J., Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996, 86: 353-364
68. <http://www.curvedarrowpress.com/wpblog/?p=70>
69. <http://www.lenntech.com/processes/disinfection/chemical/disinfectants-chlorine.htm>