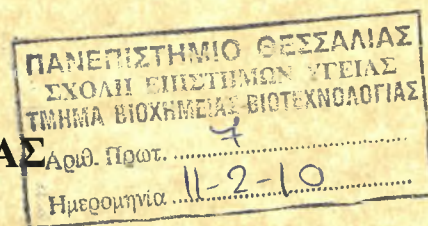


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



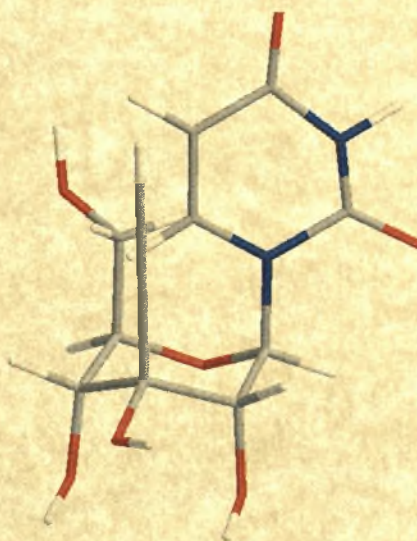
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ- ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΚΥΡΙΤΣΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΑΙΘΥΝΥΛΟ ΚΑΙ ΚΥΑΝΟ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ
ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΙ ΑΝΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ”



ΛΑΡΙΣΑ 2010



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 8101/1

Ημερ. Εισ.: 08-03-2010

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

572.854 5

ΚΥΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087135

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“Σύνθεση νέων αιθυνυλο και κυανο νουκλεοζιτών ως πιθανοί
αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες”**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- **Κομιώτης Δημήτρης** – Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Μαρκουλάτος Παναγιώτης**– Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Λεωνίδας Δημήτριος** – Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Αισθάνομαι υποχρεωμένος να ευχαριστήσω τον κ. Κομιώτη Δημήτρη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου αυτή την εργασία, για την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκειά της και κυρίως για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον επιστημονικό αντικείμενο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τη διδάσκουσα Π.Δ. 407/80 κ. Μαντά Στυλιανή για τις γνώσεις που μου παρείχε αλλά και για το αμείωτο ενδιαφέρον και τη συμπαράστασή της τόσο κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη διόρθωση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου οργανικής χημείας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας, την φιλική τους διάθεση και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι υδατάνθρακες απαντούν σε κάθε ζωντανό οργανισμό και αναφέρονται σε μια ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων 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, αντιακτική 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.

Ενδιαφέρουσες μελέτες έχουν αποδείξει ότι ορισμένοι φουρανονουκλεοζίτες με διακλαδωμένη αλυσίδα (αιθυνυλο ή κυανο) στο υδατανθρακικό τους τμήμα παρουσίασαν αντικαρκινική και αντιακτική δράση. Αντικείμενο της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων με αιθυνυλο αλλά και κυανο αλυσίδα στον εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο και ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| 1. Εισαγωγή | 7 |
| 1.1. Υδατάνθρακες..... | 7 |
| 1.2. Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης | 8 |
| 1.3. Ανωμερή σακχάρων και διαμορφώσεις τους..... | 10 |
| 1.4. Νουκλεοζίτες και ανάλογά τους..... | 12 |
| 1.5. Θεραπευτικός τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών | 13 |
| 1.6. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια πεντόζη | 15 |
| 1.6.1. Αντικά νουκλεοζιτικά ανάλογα | 15 |
| 1.6.2. Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα | 17 |
| 1.7. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με διακλάδωση την αιθύνυλο ή την κυανο ομάδα | 19 |
| 1.8. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη | 23 |
| 2. Ειδικό μέρος..... | 27 |
| 2.1.1. Στόχος-σκοπός μελέτης | 27 |
| 2.1.2. Μεθοδολογία σύνθεσης | 29 |
| 2.2. Γενικές μέθοδοι | 35 |
| 2.2.1. Χρωματογραφία χάρτου | 35 |
| 2.2.2. Χρωματογραφία στήλης | 35 |
| 2.2.3. Ξήρανση διαλυτών..... | 36 |
| 2.2.4. Ταυτοποίηση ενώσεων..... | 36 |
| 3. Πειραματική διαδικασία | 37 |
| 4. Ταυτοποίηση με H^1 NMR..... | 46 |
| 5. Αποτελέσματα-Συζήτηση | 48 |
| 6. Βιβλιογραφία | 50 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατάνθρακες

Οι Υδατάνθρακες ή αλλιώς σάκχαρα, είναι αλδεϋδικές ή κετονικές ενώσεις με πολλαπλές υδροξυλικές ομάδες που αποτελούν μια ομάδα οργανικών ουσιών με γενικό τύπο $(\text{CH}_2\text{O})_n$ και μοριακά βάρη που κυμαίνονται από μικρότερα του 100 μέχρι εκατοντάδες χιλιάδες. Σε αυτούς ανήκουν απλά σάκχαρα όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη αλλά μπορεί να φτάσουν μέχρι σύνθετα μόρια που λέγονται πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο και η κυτταρίνη.

Είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους σε τέσσερις κύριες κατηγορίες :

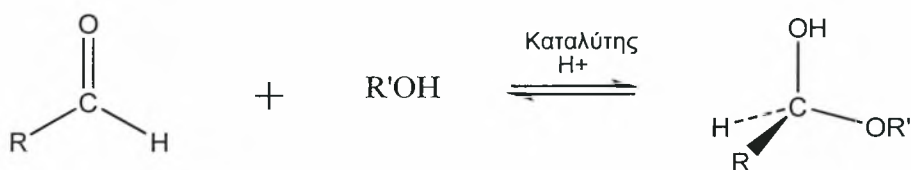
- Μονοσακχαρίτες -όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη- οι οποίοι αποτελούν τις μονομερείς μονάδες για την σύνθεση πολυπλοκότερων δομών.
- Δισακχαρίτες που αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες. Οι πιο γνωστοί δισακχαρίτες είναι το καλαμοσάκχαρο (σακχαρόζη), η λακτόζη και η μαλτόζη.
- Ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από 20-30 μονοσακχαρίτες.
- Πολυσακχαρίτες, όπως είναι η κυτταρίνη, το άμυλο, και το γλυκογόνο, που αποτελούνται από εκατοντάδες ή και χιλιάδες μόρια μονοσακχαριτών.

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.

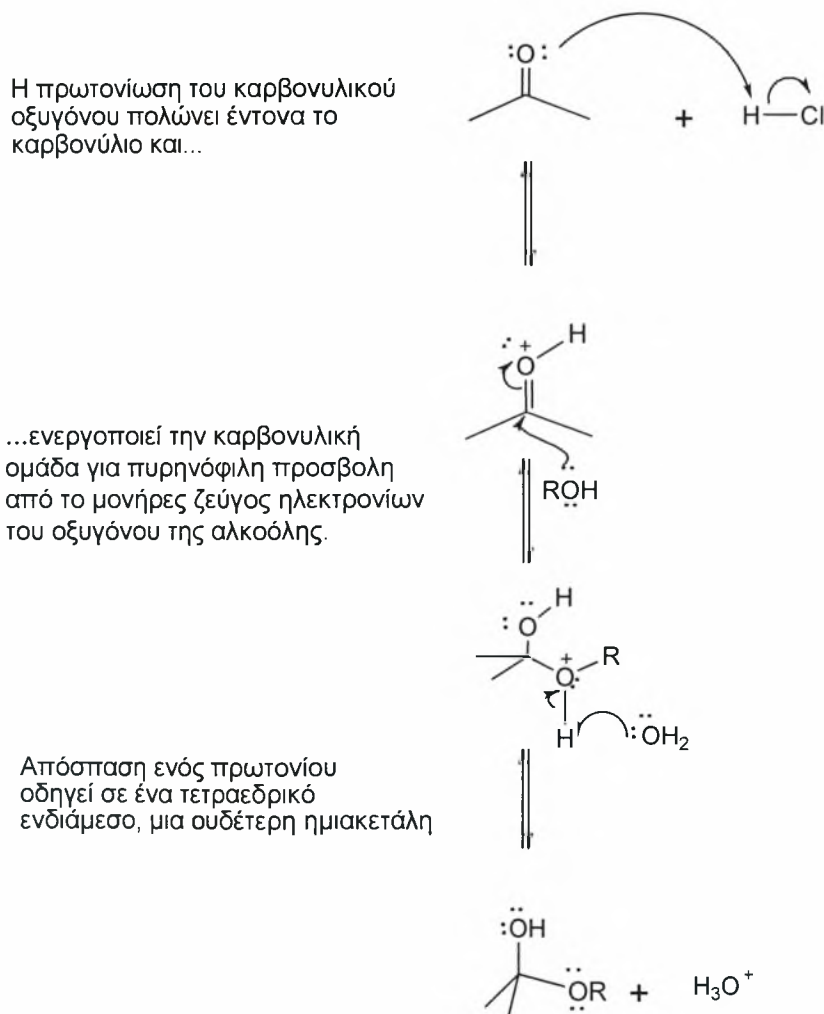
Ο γενικός τύπος $(\text{CH}_2\text{O})_n$ ανταποκρίνεται πλήρως στο μοριακό τύπο των μονοσακχαριτών οι οποίοι έχουν ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα και οξυγόνου, ενώ περιέχουν διπλάσιο αριθμό ατόμων υδρογόνου στο μόριό τους. Οι μικρότεροι μονοσακχαρίτες με $n=3$ είναι η διυδροξυακετόνη και η D- ή L-γλυκεραλδεϋδη και αναφέρονται ως τριόζες. Απλοί μονοσακχαρίτες με τέσσερα, πέντε, έξι και επτά άτομα άνθρακα καλούνται τετρόζες, πεντόζες, εξόζες και επτόζες, αντίστοιχα.

1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών : σχηματισμός ημιακετάλης

Οι αλκοόλες πραγματοποιούν μια γρήγορη και αντιστρεπτή πυρηνόφιλη προσθήκη με κετόνες ή αλδεΐδες προς σχηματισμό ημιακεταλών (Mc Murry, 2000, p. 1245).



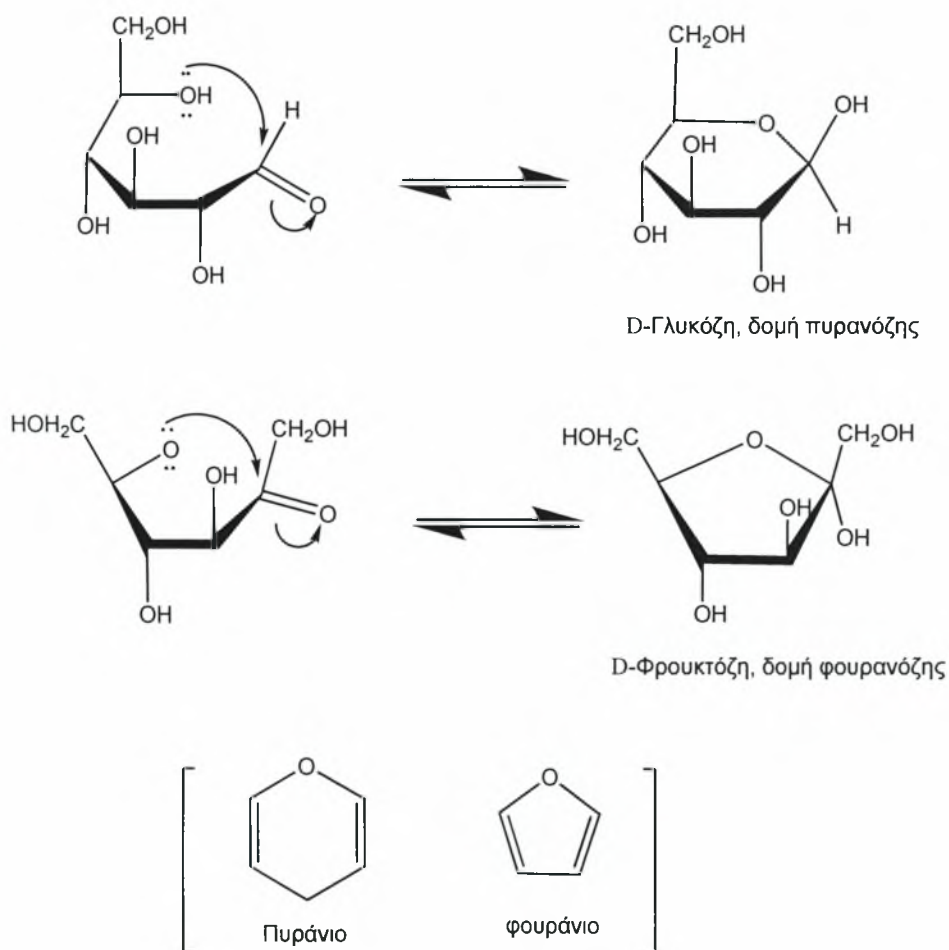
Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 1 (Mc Murry, 2000, p. 905):



Σχήμα 1. Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης

Εάν 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 $-OH$ του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα (C1). 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.

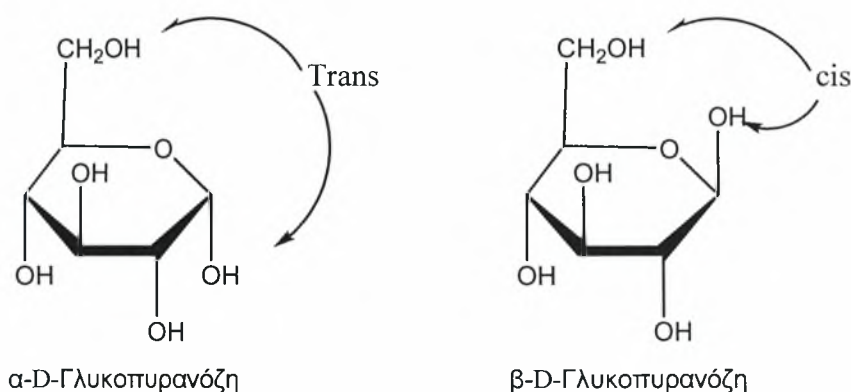
Οι ονομασίες πυρανόζη για τον εξαμελή δακτύλιο και φουρανόζη για τον πενταμελή δακτύλιο προέρχονται από τις ονομασίες των απλών κυκλικών αιθέρων πυράνιο και φουράνιο. Οι κυκλικές δομές της πυρανόζης και της φουρανόζης καθώς και του πυρανίου και του φουρανίου παρατίθενται στο σχήμα 2.



Σχήμα 2. Κυκλικές δομές πυρανόζης και φουρανόζης

1.3 Ανωμερή μονοσακχαριτών και διαμορφώσεις τους

Όταν η ανοικτή αλυσίδα ενός μονοσακχαρίτη υποστεί κυκλοποίηση, αποκτώντας τη δομή της φουρανόζης ή της πυρανόζης, σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Τα δύο νέα διαστερομερή ονομάζονται **ανωμερή** και ο ημιακεταλικός άνθρακας **ανωμερικό κέντρο** (Mc Murry, 2000, p. 1249). 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 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 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 $-\text{CH}_2\text{OH}$ του C-5 (δηλαδή βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου) (σχήμα 3).

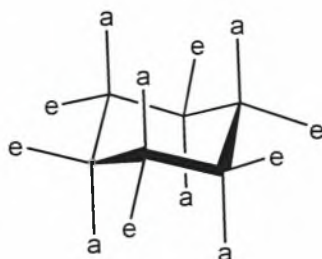


Σχήμα 3. Προβολές των ανωμερών της D-γλυκόζης

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.

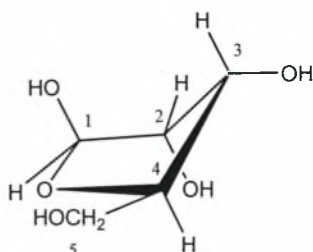
Οι προηγούμενες δομές (Haworth) αν και εύχρηστες δεν μας παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης. Ο συγκεκριμένος δακτύλιος δεν είναι δυνατόν να είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα. Αντίθετα, οι δακτύλιοι της πυρανόζης μπορούν να υιοθετήσουν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

εφόσον όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνιές C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνιάς (Mc Murry, 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' ό τι στην αξονική θέση.



Σχήμα 4. Μορφή ανάκλιτρου 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 5). 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, 1997).

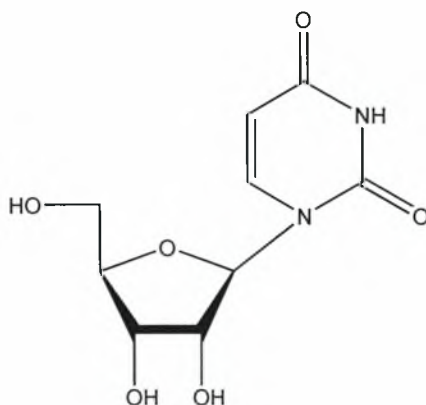


Σχήμα 5. Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης

1.4 Νουκλεοζίτες και ανάλογά τους

Οι νουκλεοζίτες αποτελούν θεμελιώδη συστατικά των διαφόρων βιολογικών συστημάτων. Ο νουκλεοζίτης αποτελείται από μια πουρινική (αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδινική (θυμίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη) βάση, και μια πεντόζη. Αναλόγως αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης. Η ένωση νουκλεοζίτη με φωσφορικό οξύ ονομάζεται νουκλεοτίδιο (ή εστέρας του νουκλεοζίτη) που πάλι αναλόγως τη φύση της πεντόζης είναι ριβονουκλεοτίδιο ή δεοξυριβονουκλεοτίδιο. Πολλά νουκλεοτίδια που ενώνονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς αποτελούν τις δομικές μονάδες των νουκλεϊνικών οξέων. Η φωσφορική ομάδα στην 5' θέση του δεύτερου νουκλεοτιδίου εστεροποιείται με την ελεύθερη υδροξυλομάδα στην 3' θέση ενός άλλου νουκλεοτιδίου, κ.ο.κ. Μ' αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται δινουκλεοτίδια, τρινουκλεοτίδια, τετρανουκλεοτίδια, ολιγονουκλεοτίδια και τέλος πολυνουκλεοτίδια. Δημιουργείται δηλ. στα νουκλεϊνικά οξέα ένα μόρφωμα που έχει σα ραχοκοκαλιά μια αλληλουχία από φωσφορικά και ριβόζες που επάνω τους είναι αγκιστρωμένες οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης. Ανάλογα αν το νουκλεϊκό οξύ περιέχει D-ριβόζη ως υδατάνθρακα, ονομάζεται ριβονουκλεϊνικό οξύ, ενώ αν περιέχει D-2-δεοξυριβόζη ονομάζεται δεοξυριβονουκλεονικό οξύ, τα γνωστά RNA και DNA. (Γεωργάτσου, 1993).

Στους νουκλεοζίτες η ετεροκυκλική βάση ενώνεται στη θέση 1' της πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό, κατά τον οποίο η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου (Page, 1997). Οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β (σχήμα 6).



Σχήμα 6. Ουριδίνη (U)

Η χημεία των νουκλεοζιτών αποτελεί ένα από τα κλασικά αλλά και πιο σημαντικά αντικείμενα στην οργανική σύνθεση. Μεγάλος αριθμός ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη, σύνθεση και βιολογική ταυτοποίηση νουκλεοζιτών και νουκλεοζιτικών αναλόγων. Έχει διαπιστωθεί ότι οι νουκλεοζίτες επιδεικνύουν σημαντική αντικαρκινική, αντιβακτηριακή και αντιαυτική δράση (Hartman et al. 2001). Έχει βρεθεί επίσης ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιαυτική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. Συνεπώς έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών δραστηριοτήτων τους.

1.5 Θεραπευτικός τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών

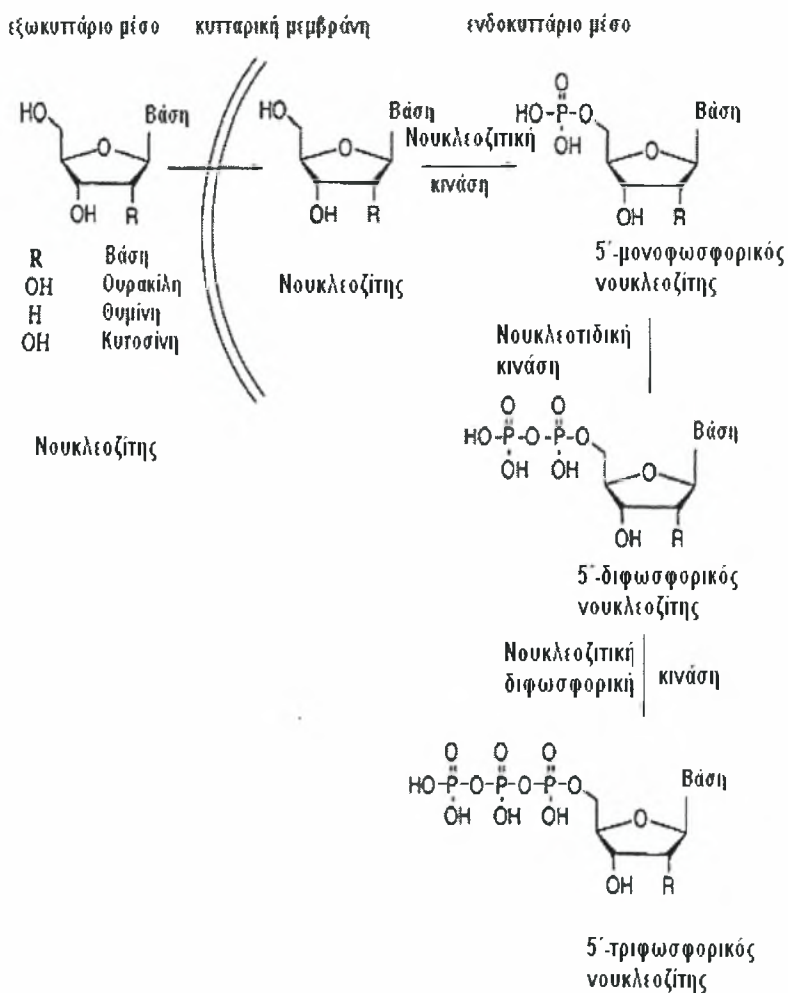
Τα αντιαυτικά φάρμακα σχεδιάζονται με βάση τις διαδικασίες κύκλου ζωής ενός ιού (Clercq et al. 2002). Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν την προσρόφιση του ιού στο κύτταρο, την συγχώνευσή του σε αυτό, την σύνθεσή του ιϊκού DNA και RNA και τέλος τις λειτουργίες των ενζύμων του ιού. Σκοπός των αντιαυτικών φαρμάκων είναι η ανασταλτική τους δράση σε μία ή και περισσότερες από τις παραπάνω διαδικασίες του κύκλου ζωής του ιού, συνήθως στη σύνθεση του ιϊκού DNA και RNA.

Ο κύριος λόγος που τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση του καρκίνου και του AIDS, είναι η δυνατότητα τους να τροποποιούνται δομικά, ώστε να προκύπτουν φαρμακολογικώς ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Παρεμβαίνουν κατόπιν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και προωθούν είτε αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα (Pastor-Anglada et al. 1998)

Τα αντικαρκινικά και τα αντιαυτικά νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση (Arner and Eriksson, 1995). Τα μη φωσφορυλιωμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες-μεταφορείς νουκλεοζιτών, διαπερνώντας την κυτταρική μεμβράνη. Φωσφορυλιώνονται στη συνέχεια προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και

όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA.

Για να επιτευχθεί η πρώτη φωσφορυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (MP) συνήθως καταλύεται από μία νουκλεοζιτική κινάση. Η συγκεκριμένη κινάση κωδικοποιείται από το κύτταρο-ξενιστή ή τον ιό που μολύνει το κύτταρο-ξενιστή (Balzarini 1993, Wagner et al. 2000). Οι μονοφωσφορικοί νουκλεοζίτες (MP) μετατρέπονται προς τις αντίστοιχες 5'-διφωσφορικές και τριφωσφορικές δομές τους καταλυόμενοι από νουκλεοτιδικές κινάσες, καθώς και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντίστοιχα (Σχήμα 7). Συνεπώς, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι ικές κινάσες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών.



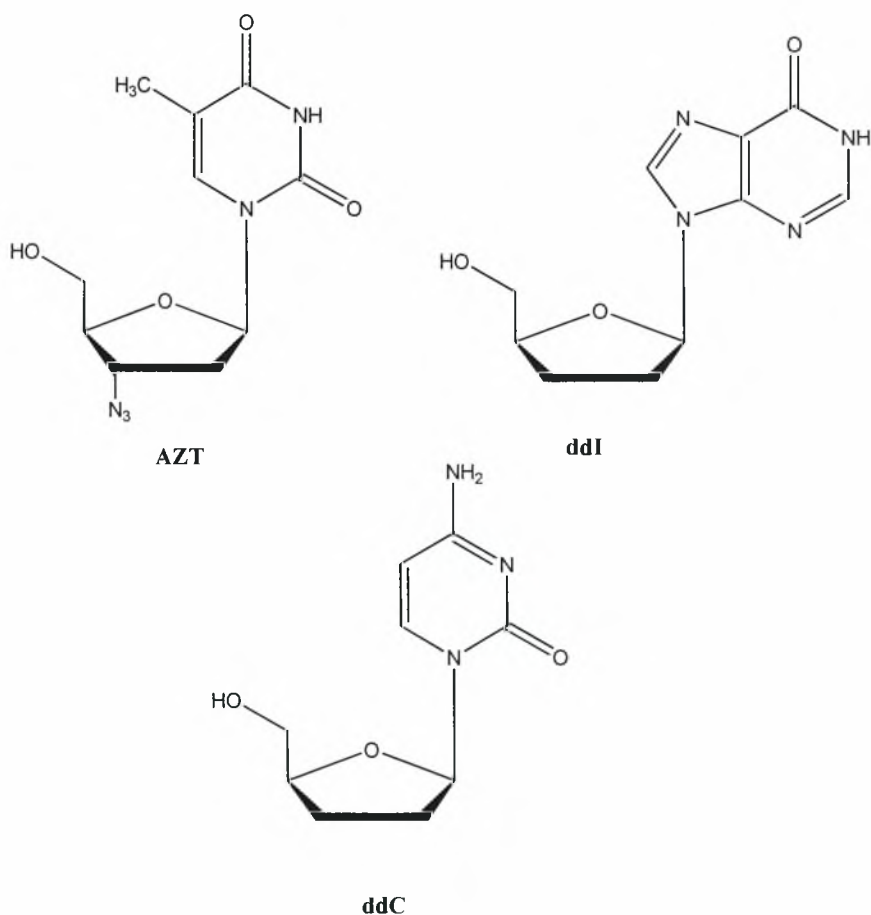
Σχήμα 7. Τροποποίηση των νουκλεοζιτικών αναλόγων προς την ενεργή τους μορφή μέσω ενδοκυτταρικής φωσφορυλίωσης.

1.6 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια πεντόζη

Ο σπουδαίος ρόλος των πεντοζών αναγνωρίστηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως κύριες δομικές μονάδες των νουκλεϊκών οξέων. Η πλειοψηφία των μέχρι τώρα ερευνητικών προσπαθειών για τη δημιουργία φαρμάκων με αντική και αντικαρκινική δράση, αφορούν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη.

1.6.1 Αντικα νουκλεοζιτικά ανάλογα

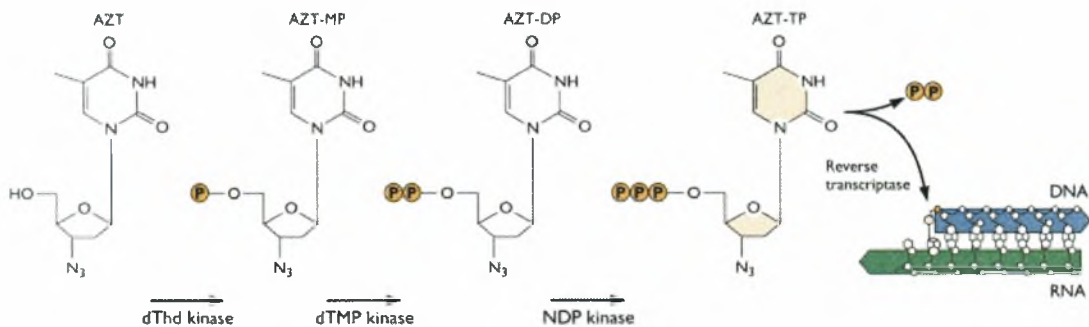
Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα από τα νουκλεοζιτικά αυτά ανάλογα είναι το zidovudine (AZT), το didanosine (ddI) και το zalcitabine (ddC), τα οποία χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα εναντίον του HIV. Οι χημικές τους δομές φαίνονται στο παρακάτω σχήμα 8:



Σχήμα 8. Χημικές δομές των AZT, ddI, ddC

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 νουκλεοζιτών αναστέλλουν τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή του ιικού DNA.

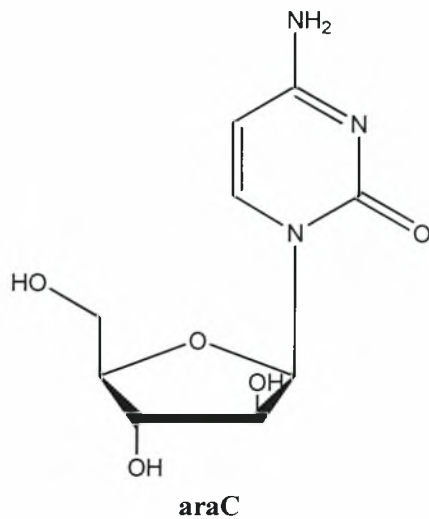
Το AZT (3'-αζιδο-2'-δεοξυθυμιδίνη) ήταν το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία του AIDS (www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrv/). Φωσφορυλιώνεται από τα κυτταρικά ένζυμα στην ενεργή του μορφή και δρα ως αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης τερματίζοντας την αλυσίδα μόλις συνδεθεί στο DNA (σχήμα 9). Επειδή έχει την αζιδο ομάδα αντί για την υδροξυλομάδα, η επόμενη βάση δεν μπορεί να ενωθεί και η σύνθεση της αλυσίδας σταματά.



Σχήμα 9. Τερματισμός της αλυσίδας του ιικού DNA από το φωσφορυλιωμένο AZT

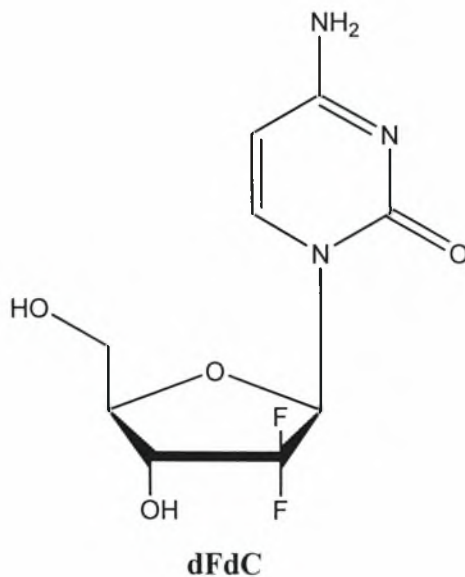
Το συνθετικό ενδιαφέρον στράφηκε επίσης στους 2',3'-ακόρεστους νουκλεοζίτες, όπου η 3'-δεοξυ-2',3'-διδεϋδροθυμιδίνη (d4T) δρα επίσης σαν αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης στην θεραπεία κατά του AIDS (Brossette et al. 2001). Η χημική δομή του d4T απεικονίζεται στο σχήμα 10 της επόμενης σελίδας:

Ένα από τα πρώτα πυριμιδικά νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιήθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας ήταν το cytarabine (araC ή 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη) (σχήμα 12) (Ellison et al. 1967).



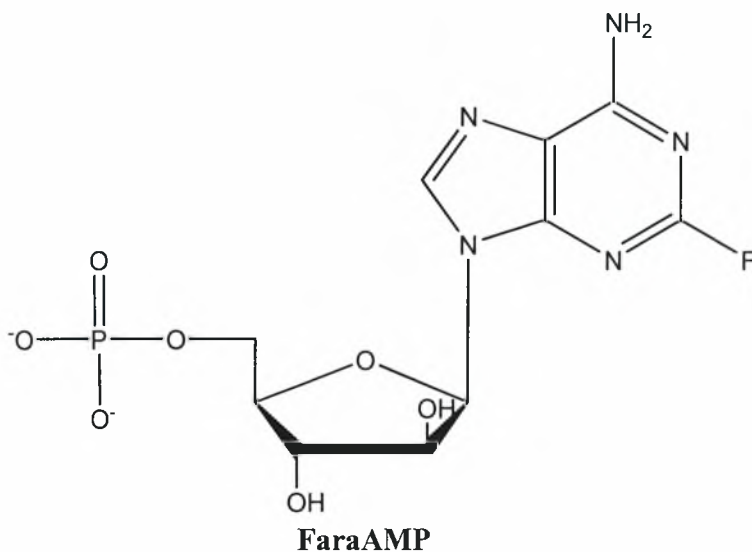
Σχήμα 12. Χημική δομή του araC

Η γεμισιταμπίνη (gemcitabine ή dFdC) είναι ένα ακόμη πυριμιδικό ανάλογο που παρουσιάζει αντικαρκινική δράση (Plunkett et al. 1995). Είναι ανάλογο του cytarabine, το οποίο έχει τροποποιηθεί στην 2' θέση του δακτυλίου της ριβόζης με υποκατάσταση από 2 άτομα φθορίου (Σχήμα 13).



Σχήμα 13. Χημική δομή του gemcitabine (dFdC)

Ένα από τα πρώτα πουρινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα η 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλαδενίνη (araA) απορρίφθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας λόγω της χαμηλής διαλυτότητας και της γρήγορης απαμίνωσής της από την απαμινάση της αδενοσίνης. Η προσθήκη ενός ατόμου φθορίου στο τμήμα της αδενίνης αύξησε την αντίσταση στην απαμινάση της αδενοσίνης και η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας βελτίωσε τη διαλυτότητα του αναλόγου, συνθέτοντας την 5'-μονοφωσφορική 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-2-φθοροαδενίνη (fludarabine), (FaraAMP) (Matsuda et al. 2004). Το fludarabine είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας κατά της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων (σχήμα 14).

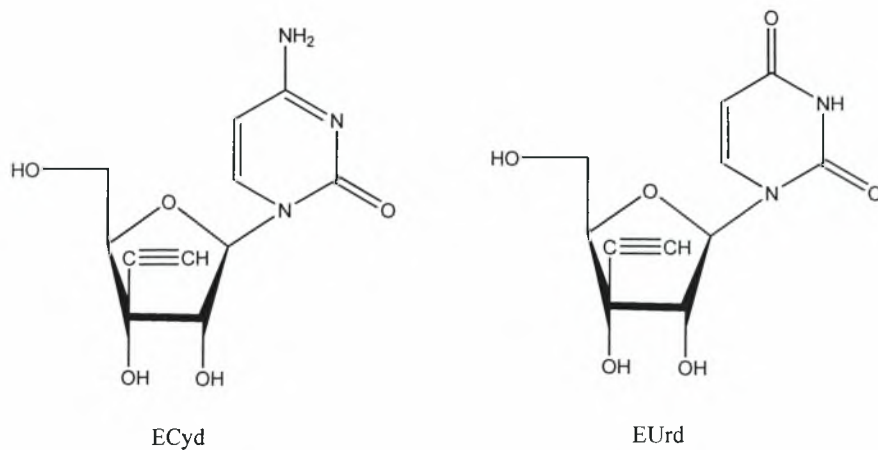


Σχήμα 14. Χημική δομή του fludarabine

1.7 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με διακλάδωση την αιθυλο ή την κυανο ομάδα

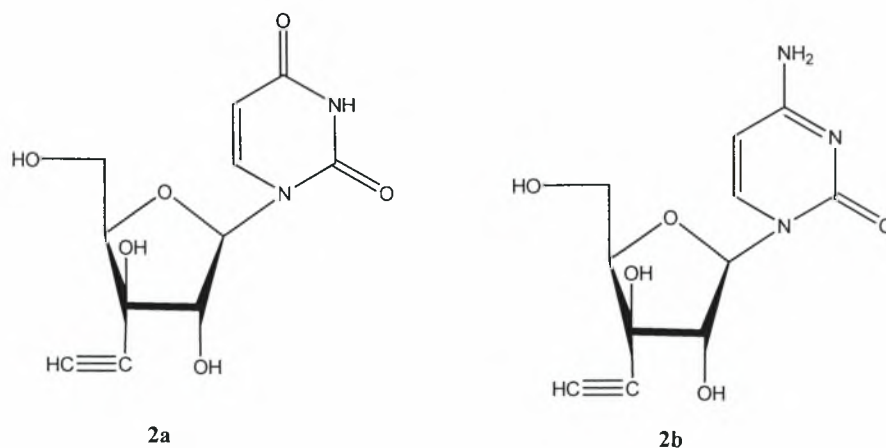
Σε μια μελέτη το 1996 του Hideshi Hattori διαπιστώθηκε ότι οι νουκλεοζίτες της ουρακίλης και της κυτοσίνης (σχήμα 15) που φέρουν αιθυλο ομάδα ως διακλαδισμένη αλυσίδα στο τμήμα του σακχάρου εμφανίζουν εξαιρετικές αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι ECyd και EUrd δοκιμάστηκαν *in vitro* σε 36 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η ECyd ήταν αποτελεσματική σε 22 κυτταρικές σειρές, ενώ αντίστοιχα η EUrd σε 12. Και οι δύο νουκλεοζίτες είχαν παρόμοιο φάσμα παρεμποδιστικής λειτουργίας και συνεπώς παρόμοιο μηχανισμό αντικαρκινικής δράσης. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ECyd και EUrd έχουν πιο ισχυρή αντικαρκινική

λειτουργία ενάντια σε καρκινικούς όγκους απ' ότι κάποιες άλλες ουσίες που συχνά χρησιμοποιούνται κλινικά (Matsuda et al. 1996). Μάλιστα η EUrd παρουσίασε επίσης σημαντική αντικαρκινική λειτουργία ενάντια σε ανθρώπινους όγκους, που εισήχθησαν σε ποντίκια σαν ξενομοσχεύματα.



Σχήμα 15. Χημικές δομές της ECyd και EUrd

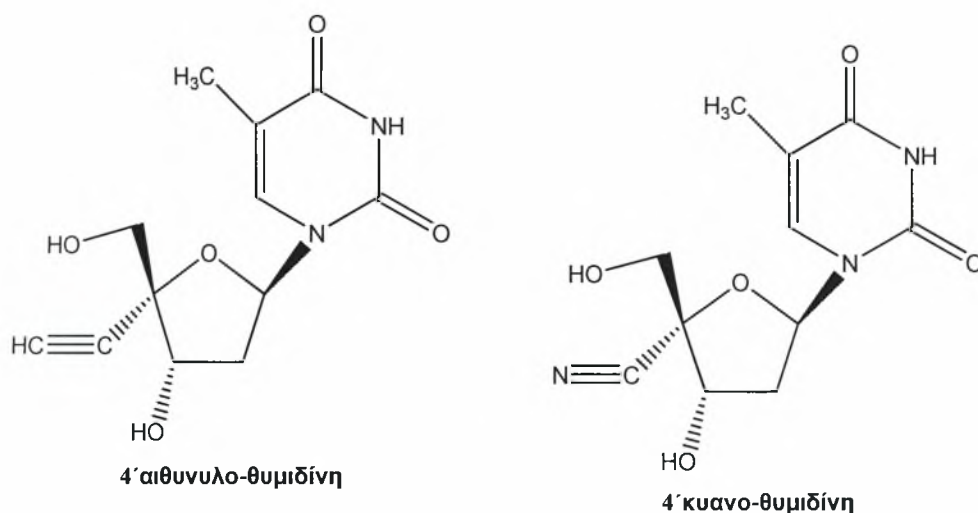
Μελετήθηκε επιπλέον η σχέση μεταξύ δομής και λειτουργίας των ECyd και EUrd (Hideshi et al. 1998). Συντέθηκαν οι 1-(3'-C-αιθυνολο-β-D-ξυλοπεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη και ουρακίλη, οι οποίες είναι 3' επιμερή των ECyd και EUrd (Σχήμα 16). Η βιολογική δράση αυτών των ξυλο παραγώγων ήταν σημαντικά μικρότερη, παρόλο που είχαν τόσο την αιθυνολο ομάδα όσο και το υδροξύλιο στην 3'-θέση του σακχάρου. Αποδεικνύεται δηλαδή ότι η παρουσία μιας 2',3'- cis διόλης στην ECyd και EUrd με μια ριβο-διαμόρφωση ήταν απαραίτητη για την κυτταροτοξικότητά τους.



Σχήμα 16. 3' επιμερή των ECyd και EUrd

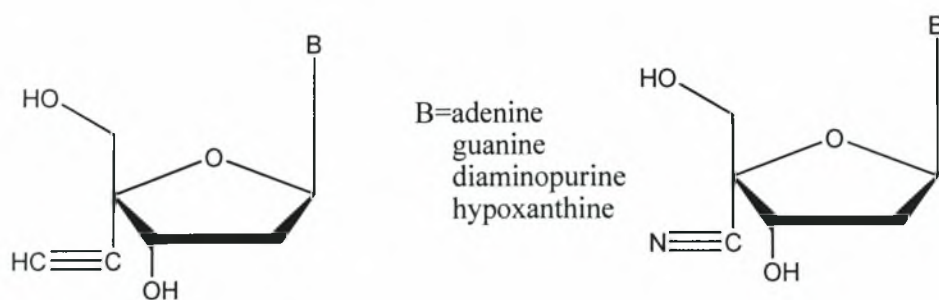
Όσον αφορά το μεταβολισμό της, η ECyd φωσφορυλιώνεται στα κύτταρα προς το μονοφωσφορικό, διφωσφορικό και τελικά τριφωσφορικό της παράγωγο (Makoto et al. 2003). Το πρώτο βήμα από την ECyd στην ECMP καταλύεται από την ουριδινική/κυτιδινική κινάση. Το τριφωσφορικό παράγωγο της κυτιδίνης (ECTP) είναι ένας ενεργός μεταβολίτης της ECyd και παρεμποδίζει την RNA πολυμεράση I, II και III χωρίς εκλεκτικότητα προκαλώντας παρεμπόδιση της σύνθεσης του RNA. Η ECyd κατανέμεται σε μεγάλο ποσοστό σε καρκινικούς ιστούς (in vivo), στους οποίους η ενεργοποίηση της ουριδινικής/κυτιδινικής κινάσης είναι υψηλότερη από τους κανονικούς ιστούς. Αυτά τα δεδομένα θα μπορούσαν να εξηγήσουν την υψηλή ενεργοποίηση και τη χαμηλή τοξικότητα της ECyd ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνου.

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον προέκυψε και από την ανακάλυψη της ισχυρής αντι- HIV δράσης των 4'-κυανο και 4'-αιθυνυλο αναλόγων της θυμιδίνης (Σχήμα 17) (O-Yang et al. 1992 και Kodama et al. 2001).



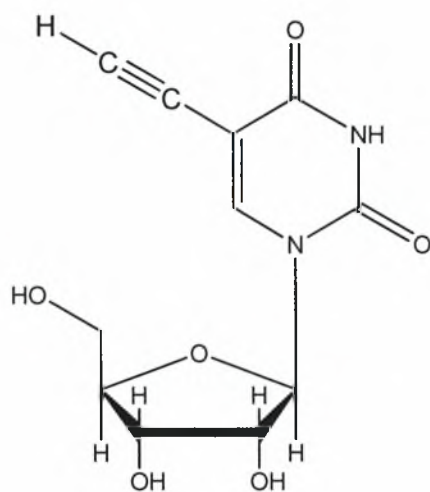
Σχήμα 17. Δομή 4'- υποκατεστημένων νουκλεοζιτών της θυμίνης

Οι πουρινο 2'-δεοξυ νουκλεοζίτες που διαθέτουν μια αιθυνυλο ή κυανο ομάδα στον 4' άνθρακα του σακχάρου, εμφανίζουν επίσης πολύ ισχυρή αντι- HIV δράση, παραμένοντας ενεργοί απέναντι σε ανθεκτικά στελέχη του HIV (Satoru et al. 2003). Μάλιστα, επειδή τα 4-C-κυανο σάκχαρα έχουν χαμηλή δραστηριότητα στις αντιδράσεις τους με τις βάσεις, προτιμάται να παρασκευάζονται τροποποιώντας ήδη τους αντίστοιχους νουκλεοζίτες στην 4' θέση. Η δομή των νουκλεοζιτών απεικονίζεται στο σχήμα 18.



Σχήμα 18. Δομές των αιθυνυλο και κυανο πουρινο 2'-δεοξυ νουκλεοζιτών

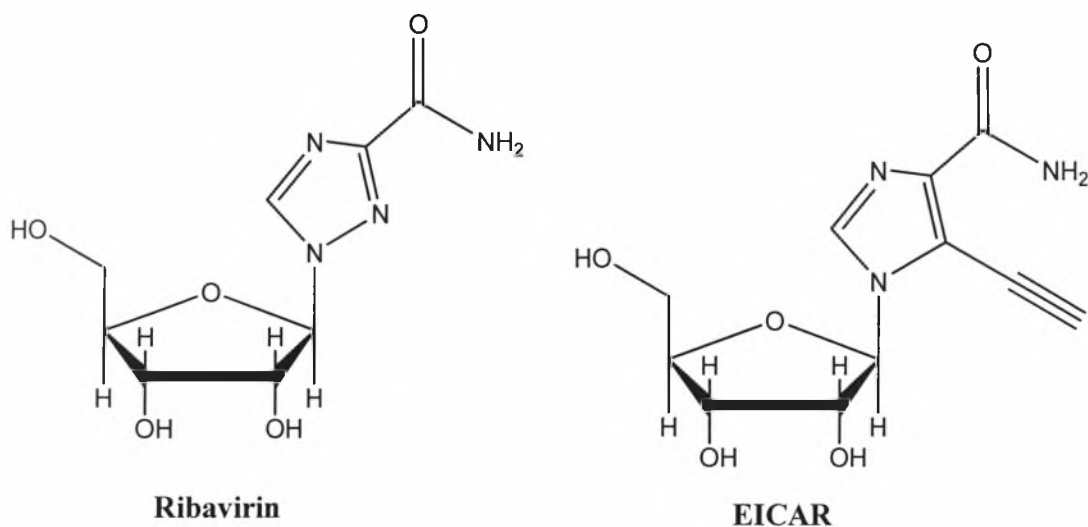
Η παρουσία της αιθυνυλο ομάδας στην ετεροκυκλική βάση οδήγησε επίσης σε νουκλεοζίτες με έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Η 5-αιθυνυλο-2'-δεοξυ ουριδίνη (σχήμα 19), παρουσίασε αυξημένη δράση έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών του ανθρώπινου μαστού MCF-7 και MDA-MB-231, ξεπερνώντας την αντίστοιχη της 5-φθορο ουρακίλης (Srinivasarao et al. 2007).



Σχήμα 19. Χημική δομή της 5-αιθυνυλο-2'-δεοξυ ουριδίνη

Επιπλέον το 5-αιθυνυλο-1-β-D-ριβοφουρανοζυλο-1H-ιμιδαζολο-4 καρβοξαμίδιο (EICAR) που επίσης φέρει την αιθυνυλο ομάδα στην ετεροκυκλική βάση παρουσιάζει εξαιρετικές αντιυικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα η αντιική του λειτουργία από 10 έως 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του ribavirin (Minakawa et al. 1999), του μόνου διαθέσιμου φαρμάκου που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C σε συνδυασμό με το withinterferon-a (De Clercq et al. 2002). Επιπλέον της αντιικής του δράσης, το EICAR επιδεικνύει αντικαρκινική λειτουργία και

εμποδίζει την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών κυττάρων *in vitro* (Minakawa et al. 1991). Στο παρακάτω σχήμα 20 απεικονίζονται οι δομές των Ribavirin και EICAR.



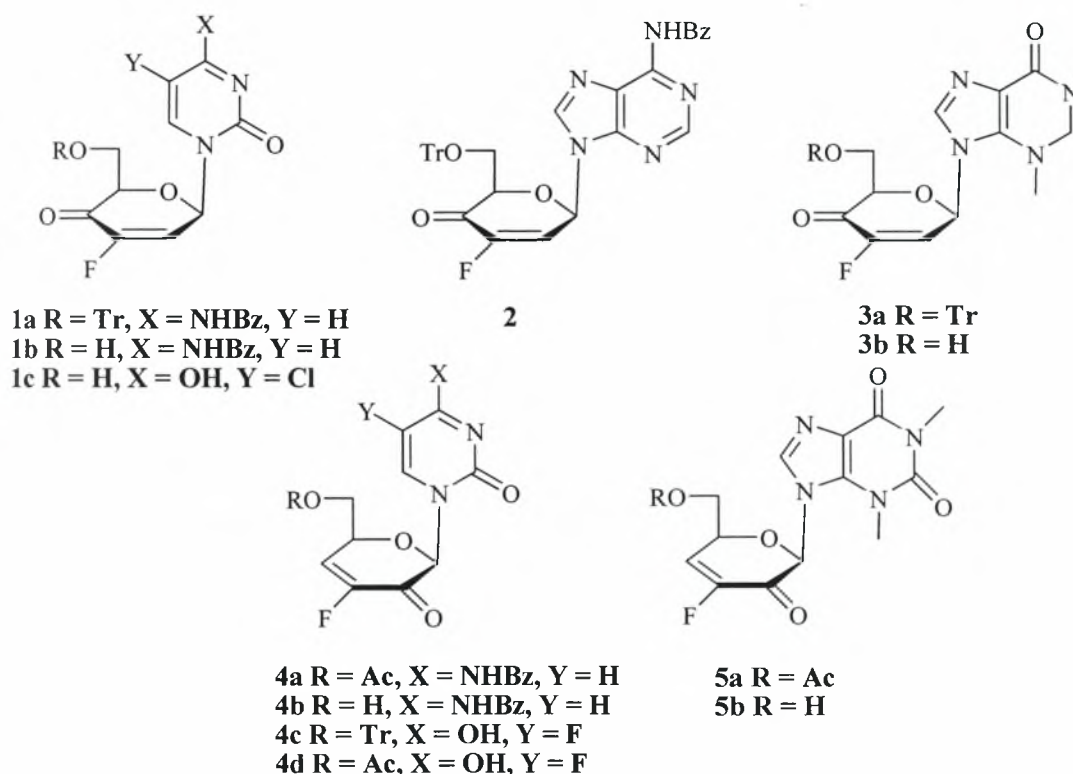
Σχήμα 20. Χημικές δομές του Ribavirin και EICAR

1.8 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη

Παρ' όλες τις επιτυχίες στην έρευνα για καινούργια αντικαρκινικά και αντικαρκινικά φάρμακα, υπάρχει διαρκής ανάγκη για τη σύνθεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με μειωμένη τοξικότητα αλλά και αυξημένη αποτελεσματικότητα σε νέα ανθεκτικά κικά στελέχη. Τα τελευταία χρόνια, νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντικές (Verheggen et al. 1993, Verheggen et al. 1995, Maurinsh et al. 1997, Ostrowski et al. 1998), αντικαρκινικές (Antonakis et al. 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). Μάλιστα νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη έδειξαν αντίσταση στην υδρόλυση, καθώς το σπάσιμο του γλυκοζιτικού δεσμού είναι ένα συνηθισμένο μονοπάτι αποικοδόμησης των νουκλεοζιτικών αντικών, ιδιαίτερα των 2',3'-διδεοξυνουκλεοζιτών (Nair et al. 1990). Τα πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα διαθέτουν λοιπόν αυξημένη σταθερότητα, μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής, άρα και εν δυνάμει περισσότερο χρόνο δράσης.

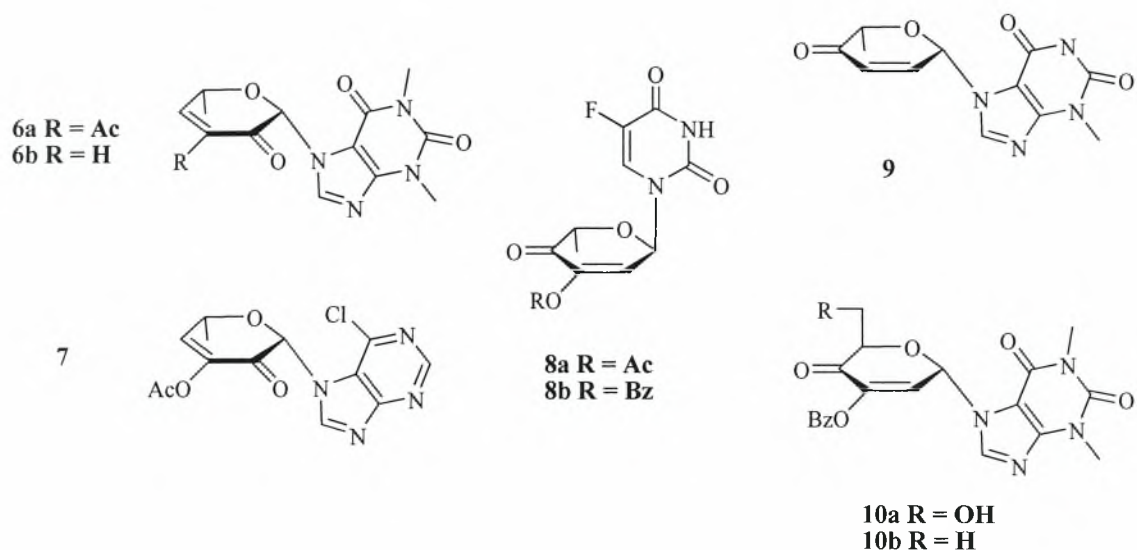
Θα πρέπει να τονιστεί ότι η έρευνα για την ανακάλυψη αντικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών αναλόγων με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο

βρίσκεται αρκετά πίσω σε σχέση με αυτή των νουκλεοζιτών με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίους. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφτεί νέες σειρές βιολογικά ενεργών ακόρεστων νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο. Οι ακόρεστοι φθορο κετοπυρανονουκλεοζίτες, οι οποίοι συντέθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Manta et al. 2007) καθώς και άλλοι ανάλογοι πυρανονουκλεοζίτες (Leclercq et al. 1992, Khan et al. 2001, Ollapally et al. 1999, Egron et al. 2002) έχουν αξιολογηθεί για τις αντικές και τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες (ενώσεις 1-5, σχήμα 21). Αξιοσημείωτη είναι η αντική δράση εναντι του εντεροϊού (rotavirus), που επέδειξαν οι ενώσεις **1a,b**, **2** και **4a,b**.



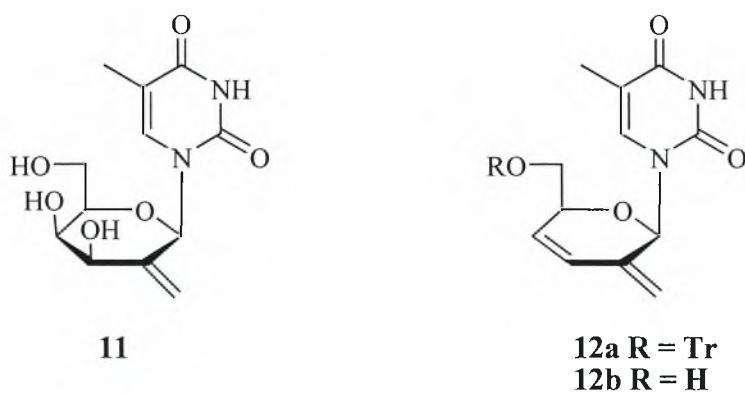
Σχήμα 21.

Επιπρόσθετα, ακόρεστα κετοπυρανονουκλεοζιτικά 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). Η χημική δομή των συγκεκριμένων ενώσεων **6-10** φαίνεται στο σχήμα 22.



Σχήμα 22

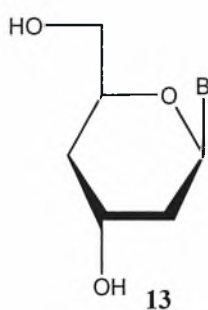
Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας συντέθηκε μια νέα ενδιαφέρουσα σειρά εξομεθυλενικών και ακόρεστων εξομεθυλενικών πυρανονουκλεοζιτών (Agelis et al. 2007), οι οποίοι επίσης παρουσίασαν σημαντική αντική δράση έναντι του εντεροϊού (ενώσεις **11** και **12a**, σχήμα 23).



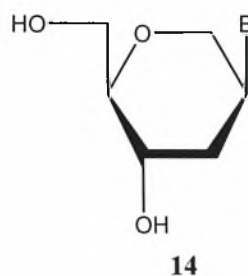
Σχήμα 23

Μεγάλο συνθετικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες. Πρόκειται για νουκλεοζίτες στους οποίους τη θέση ενός υδροξυλίου έχει πάρει ένα άτομο υδρογόνου. Η συγκεκριμένη τάξη νουκλεοζιτών καθιερώθηκε ως ιδιαίτερα σημαντική μετά την απομόνωση αντιβιοτικών από

διάφορες φυσικές πηγές, τα οποία περιέχουν 6'-δεοξυπυρανόζες και επιπλέον λόγω της αντικαρκινικής δράσης που παρουσιάζουν οι 6'-δεοξυ-κετονουκλεοζίτες (Suhadolnik 1970, Antonakis and Chouroulinkon 1974, Suhadolnik 1979). Ορισμένοι μάλιστα πουρινικοί καθώς και πυριμιδινικοί 2'-δεοξυπυρανονουκλεοζίτες εμφάνισαν σημαντική αντική, καθώς και αντιλευχαιμική δράση (Langen and Etzold 1966, Nord et al. 1987). Έρευνες έδειξαν επίσης ότι οι διδεοξυ-β-D-ερυθρο-εξοπυρανονουκλεοζίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (Augustyns et al. 1994) και ότι, οι 2',4'-διδεοξυ-β-D-ερυθρο-εξοπυρανονουκλεοζίτες (ενώσεις **13**, Σχήμα 24) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων (Augustyns et al. 1992, Augustyns et al. 1993). Επιπρόσθετα, σημαντική είναι η αντική δράση των 1,5-ανυδροξειτολονουκλεοζιτών έναντι του ιού του απλού έρπητα τύπου 1 και τύπου 2, του κυτταρομεγαλοϊού καθώς και του ιού έρπητα ζωστήρα (ενώσεις **14**, Σχήμα 24 (Verheggen et al. 1993, Verheggen et al. 1995).



a=κυτοσίνη
b=αδενίνη
c=γουανίνη



a=αδενίνη
b=5-ιοδοουρακίλη
c=κυτοσίνη
d=θυμίνη
e=γουανίνη

Σχήμα 24. Δεοξυ- πυρανονουκλεοζίτες

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

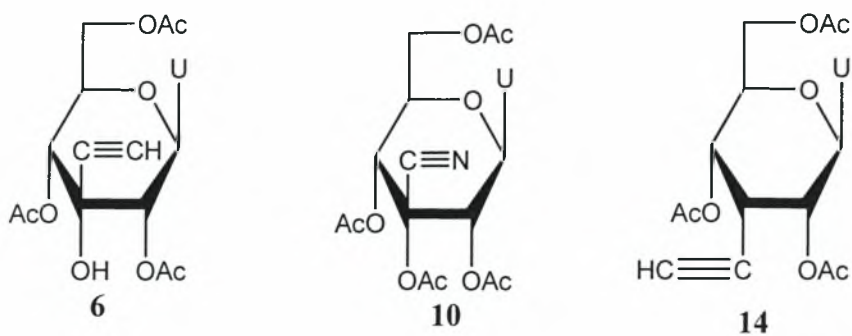
2.1 Στόχος- σκοπός μελέτης

Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών με σκοπό την εύρεση νέων αντικαρκινικών και αντικών παραγόντων. Οι νέοι νουκλεοζίτες στοχεύουν στο να καλύψουν την όλο και αυξανόμενη ανάγκη για φάρμακα με i) αυξημένη αποτελεσματικότητα, ii) αυξημένη σταθερότητα, iii) αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα και iv) μειωμένες παρενέργειες.

Όπως ήδη αναφέραμε -με βάση τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία- έχει διαπιστωθεί ότι φουρανονουκλεοζίτες που φέρουν διακλαδωμένη αιθυνυλο ή κυανο αλυσίδα στο υδατανθρακικό τους τμήμα εμφανίζουν εξαιρετικό φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Κάποιες φορές μάλιστα η δράση τους είναι καλύτερη από τα ήδη χρησιμοποιούμενα φάρμακα.

Έχει επίσης διαπιστωθεί ότι φουρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης και της κυτοσίνης με αιθυνυλο ομάδα στη 3'-θέση του σακχάρου παρουσίασαν εξαιρετικές αντικαρκινικές ιδιότητες, όταν χρησιμοποιήθηκαν έναντι ανθρώπινων καρκινικών όγκων. Στην παρούσα φάση, το αιθυνυλο ανάλογο της κυτοσίνης βρίσκεται στο στάδιο των κλινικών δοκιμών.

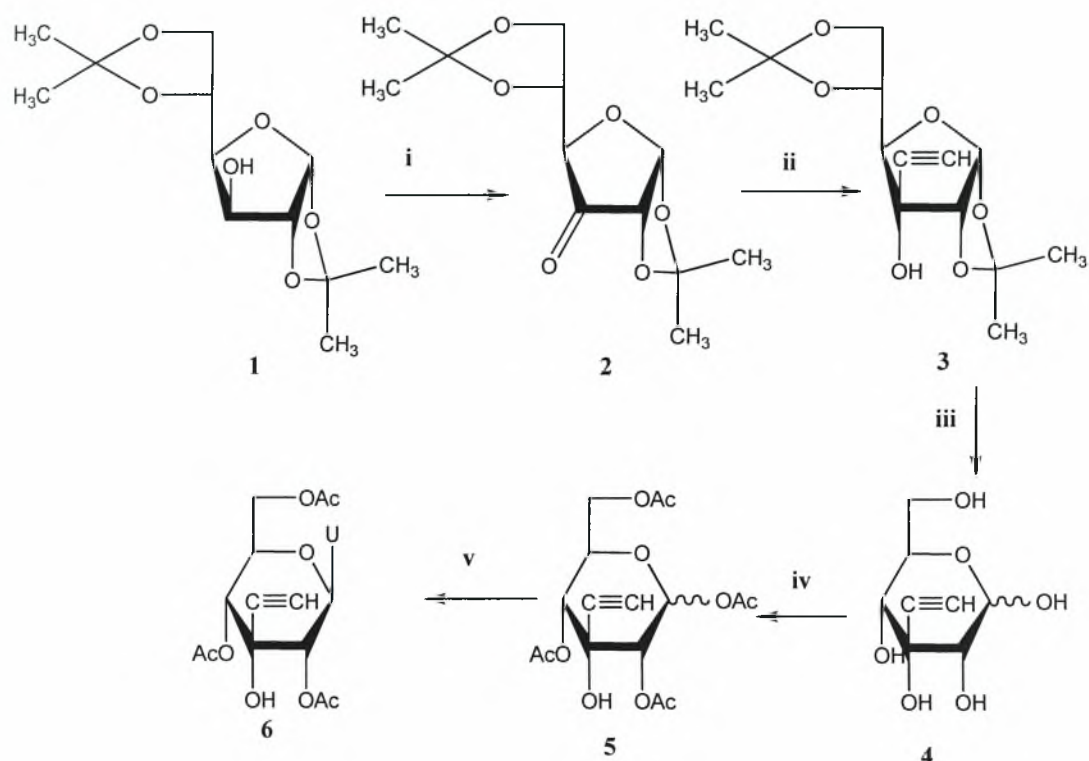
Με βάση τα ανωτέρω, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα, τα οποία να φέρουν τη χαρακτηριστική αιθυνυλο ομάδα στο τμήμα του σακχάρου. Συνεπώς, κρίθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών που φέρουν αιθυνυλο στην 3'-θέση του σακχάρου και ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη, ένωση (6). Επίσης, παρασκευάστηκε ο αντίστοιχος πυρανονουκλεοζίτης με την κυανο ομάδα στη 3'-θέση του σακχάρου, ένωση (10). Τέλος, με βάση τις σημαντικές αντιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες των δεοξυ πυρανονουκλεοζιτών επιχειρήθηκε η παρασκευή του αντίστοιχου πυρανονουκλεοζιτικού αναλόγου της ουρακίλης με αιθυνυλο αλλά και δεοξυ στη 3'-θέση του σακχάρου, ένωση (14). Η δομή των μορίων που στόχευσαν οι συνθετικές μας πορείες φαίνονται στο σχήμα 25 της επόμενης σελίδας.



Σχήμα 25. 1-(3'-C-Αιθινυλο-3'-υδροξύ-2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-ουρακίλη (**6**), 1-(3'-C-Κυανο-2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-ουρακίλη (**10**), 1-(3'-C-Αιθινυλο-3'-δεοξύ-2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-ουρακίλη (**14**).

2.2 Μεθοδολογία σύνθεσης

2.2.1 Σύνθεση της 1-(3'-C-Αιθινυλο-3'-υδροξύ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-ουρακίλης (6)



Σχήμα 26. Μεθοδολογία σύνθεσης της ένωσης 1-(3'-C-Αιθινυλο-3'-υδροξύ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλης (6): (i) CH_2Cl_2 , PDC, Ac_2O (ii) $\text{CH}\equiv\text{CMgBr}$, THF (iii) MeOH, H_2O , Amberlite IR-120 (H+) (iv) pyridine, Ac_2O (v) HMDS, saccharine, CH_3CN , $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$

Η πρώτη ύλη της συνθετικής μας πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδενο- α -D-γλυκοφουρανόζη (DAG) (1), η οποία οξειδώνεται προς 1,2:5,6-Δισ-O-ισοπροπυλιδενο- α -D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη (2) χρησιμοποιώντας PDC παρουσία Ac_2O σε διαλύτη CH_2Cl_2 . Η αντίδραση προχωράει ποσοτικά με απόδοση 95%.

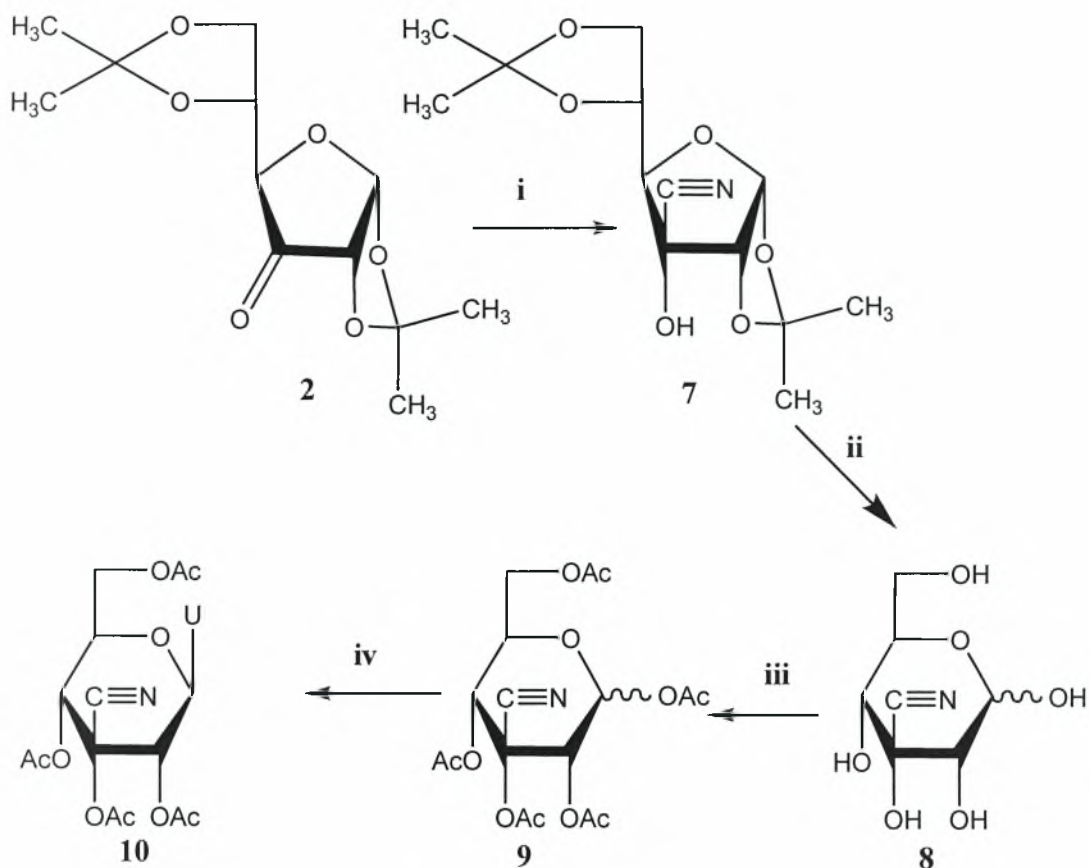
Στο επόμενο στάδιο, έχουμε μια πυρηνόφιλη προσθήκη της αιθυνυλο ομάδας στην κετονομάδα του αντιδραστήριου **2**. Αυτή η προσθήκη γίνεται από τη στερικά λιγότερο παρεμποδισμένη β όψη (πάνω), λόγω της παρεμπόδισης του ογκώδους 1,2-Ο-ισοπροπυλιδενο υποκαταστάτη (Katsumi et al. 1992). Λαμβάνουμε με αυτό τον τρόπο με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα την 3-*C*-Αιθυνυλο-1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο- α -D-αλλοφουρανόζη (**3**) με αντιδραστήριο HC≡CMgBr σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF).

Η συνθετική πορεία συνεχίζεται με την υδρόλυση του προϊόντος **3** με ένα θερμό υδατικό διάλυμα της ρητίνης Amberlite IR-120 (H⁺), η οποία οδηγεί στην ένωση **4** σε άριστη απόδοση (97%). Στη συνέχεια, με ακετυλίωση του προϊόντος **4** παρουσία Ac₂O σε πυριδίνη, λαμβάνεται το επιθυμητό σάκχαρο, 3-*C*-αιθυνυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρακισ-Ο-ακετυλογλυκοπυρανόζη (**5**), σε κρυσταλλική μορφή και σε αρκετά καλή απόδοση (78%).

Ακολουθεί η σύζευξη του σακχάρου **5** με τη βάση ουρακίλη. Αρχικά, σιλυλιώνεται η βάση παρουσία του διαλύτη ακετονιτριλίου (MeCN), εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (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*-Αιθυνυλο-3'-υδροξυ-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο- β -D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλη (**6**), σε απόδοση 66%.

Από τη μελέτη φάσματος NMR του τελικού προϊόντος **6** παρατηρούμε ότι εμφανίζονται 9 υδρογόνα γύρω στα 2.1-2.4 ppm, τα οποία και αντιστοιχούν σε 3 ακετυλομάδες. Συμπεραίνουμε δηλαδή ότι κατά την ακετυλίωση του προϊόντος **4** ακετυλιώνονται όλα τα πρωτοταγή και δευτεροταγή υδροξύλια, αλλά το τριτοταγές υδροξύλιο στη θέση 3 του σακχάρου παραμένει ελεύθερο. Η ακετυλίωση του τριτοταγούς υδροξυλίου επιχειρήθηκε στο τελικό προϊόν **6** με πιο έντονες συνθήκες όπως θέρμανση στους 100 °C, αλλά και πάλι χωρίς επιτυχία. Η αδυναμία ακετυλίωσης του τριτοταγούς υδροξυλίου πιθανόν να οφείλεται σε στερεοχημικές παρεμποδίσεις στον εξαμελή δακτύλιο από τους διπλανούς υποκαταστάτες. Επίσης το τριτοταγές υδροξύλιο μπορεί να σχηματίζει και δεσμούς υδρογόνου με τους AcO-υποκαταστάτες στις διπλανές θέσεις, γεγονός που δυσκολεύει την ακετυλίωση ακόμη περισσότερο.

2.2.2 Σύνθεση της 1-(3'-C-Κυανο-2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλης (10)



Σχήμα 27. Μεθοδολογία σύνθεσης της ένωσης 1-(3'-C-κυανο-2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλης (10): (i) NaCN, NaHCO₃, Et₂O, H₂O (ii) MeOH, H₂O, Amberlite IR-120 (H+) (iii) pyridine, Ac₂O (iv) HMDs, saccharine, CH₃CN, Me₃SiOSO₂CF₃

Η πρώτη αντίδραση αυτής της πορείας περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσθήκη της κυανο ομάδας στην κετονομάδα του αντιδραστήριου 2, χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια NaCN, NaHCO₃ σε διάλυμα δύο φάσεων H₂O και Et₂O. Αυτή η προσθήκη γίνεται (όπως και στην προσθήκη της αιθυνοξυλο ομάδας) από τη στερικώς λιγότερο παρεμποδισμένη β όψη, λόγω της παρεμπόδισης του ογκώδους 1,2-O-ισοπροπυλιδενο υποκαταστάτη. Λαμβάνουμε με αυτό τον τρόπο με υψηλή

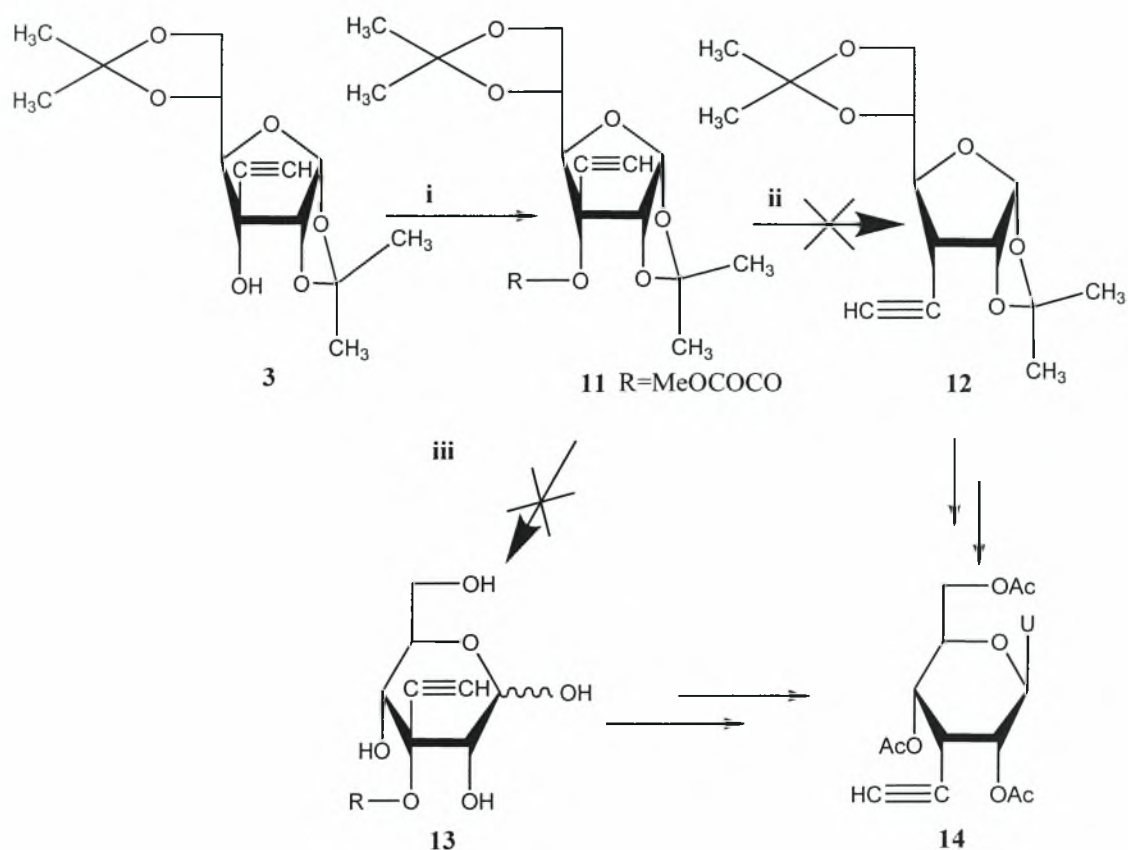
στερεοεκλεκτικότητα την 3-C-Κυανο-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (7), με απόδοση 41%.

Η συνθετική πορεία συνεχίζεται με την υδρόλυση του προϊόντος 7 με ένα θερμό υδατικό διάλυμα της ρητίνης Amberlite IR-120 (H⁺), η οποία οδηγεί στην ένωση 8, σε άριστη απόδοση 95%. Στη συνέχεια, με ακετυλίωση του προϊόντος 8 παρουσία Ac₂O σε πυριδίνη, λαμβάνεται το επιθυμητό σάκχαρο, 3-C-Κυανο-1,2,3,4,6-πεντα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζη (9) σε κρυσταλλική μορφή και σε αρκετά καλή απόδοση (70%).

Ακολουθεί η σύζευξη του σακχάρου 9 με τη βάση ουρακίλη. Σιλυλιώνεται πρώτα η βάση παρουσία του διαλύτη ακετονιτριλίου (CH₃CN), εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης. Αφού σιλυλιωθεί η βάση, προστίθεται στο σάκχαρο 9 και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα (Me₃SiOSO₂CF₃) και θέρμανση της αντίδρασης, λαμβάνοντας την επιθυμητή ένωση 1-(3'-Κυανο-2',3',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλη (10), με ικανοποιητική απόδοση (51%).

Από τη μελέτη φάσματος NMR του τελικού προϊόντος 10 παρατηρούμε ότι εμφανίζονται 12 υδρογόνα γύρω στα 2.06-2.19 ppm, τα οποία και αντιστοιχούν σε 4 ακετυλομάδες. Συμπεραίνουμε δηλαδή ότι κατά την ακετυλίωση του προϊόντος 8 ακετυλιώνονται όχι μόνο τα πρωτοταγή και δευτεροταγή υδροξύλια, αλλά και το τριτοταγές υδροξύλιο στη θέση 3 του σακχάρου. Η ακετυλίωση του τριτοταγούς υδροξυλίου λαμβάνει χώρα παρ' όλες τις στερεοχημικές παρεμποδίσεις που λαμβάνουν χώρα στον εξαμελή δακτύλιο από τους διπλανούς υποκαταστάτες. Μια πιθανή εξήγηση που δόθηκε είναι ότι η ύπαρξη της κυανο ομάδας στη θέση 3 του σακχάρου αλλάζει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του τριτοταγούς υδροξυλίου, διευκολύνοντας στη συνέχεια την ακετυλίωση του.

2.2.3 Σύνθεση της 1-(3'-Αιθυνολο-3'-Δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλης (14)



Σχήμα 28. Μεθοδολογία σύνθεσης της ένωσης 1-(3'-C-Αιθυνολο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλης (14): (i) MeOCOCOCl, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂ (ii) AIBN, Bu₃SnH, toluene (iii) MeOH, H₂O, Amberlite IR-120 (H⁺)

Με αρχική ένωση την 3-C-Αιθυνολο-1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (3) που έχει ήδη παρασκευαστεί έγινε προσπάθεια σύνθεσης της 1-(3'-C-Αιθυνολο-3'-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανόζυλο)ουρακίλης (14). Ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές συνθετικές πορείες –όπως φαίνεται και στο σχήμα 28- χωρίς όμως να ληφθεί το τελικό μας προϊόν.

Αρχικά σχηματίζεται ο μεθοξαλλυλ εστέρας (11) χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο MeOCOCOCl σε διαλύτη CH₂Cl₂, προσθέτοντας Et₃N και καταλυτική ποσότητα DMAP (Tomoharu et al. 1994). Η χαρακτηριστική κορυφή των τριών υδρογόνων της μεθοξαλλυλ ομάδας στα 3.9 ppm στο φάσμα ¹H NMR, μας βεβαιώνει

ότι λήφθηκε το προϊόν **11**. Στη συνέχεια, η αναγωγή του προϊόντος **11** λαμβάνει χώρα παρουσία του υδριδίου του τριβουτυλοκασσιτέρου (Bu_3SnH), καθώς και του αζωδισ-ισοβουτυρονιτριλίου (AIBN) σε διαλύτη τολουόλιο στους $110\text{ }^\circ\text{C}$. Δυστυχώς το συγκεκριμένο στάδιο της συνθετικής μας πορείας απέτυχε, όπως φάνηκε στο φάσμα ^1H NMR, όπου η χαρακτηριστική κορυφή του υδρογόνου του $-\text{C}\equiv\text{CH}$ στα 2.4 ppm δεν υπάρχει πια. Η αντίδραση επαναλήφθηκε σε πιο ήπιες συνθήκες ($60\text{ }^\circ\text{C}$) αλλά και πάλι δεν κατέστη δυνατό να απομονώσουμε το επιθυμητό προϊόν. Μια πιθανή εξήγηση που δόθηκε είναι η ύπαρξη στερεοχημικών παρεμποδίσεων κατά το σχηματισμό του προϊόντος **12** με την αντίδραση των ελευθέρων ριζών.

Εφόσον η αντίδραση ελευθέρων ριζών δεν ήταν επιτυχής στον πενταμελή υδατανθρακικό δακτύλιο, θεωρήθηκε σκόπιμο να δοκιμαστεί και στον εξαμελή. Ακολούθησε νέα συνθετική προσέγγιση με αρχική υδρόλυση του μεθοξαλυλ φούρανο παράγωγου **11** με σκοπό το σχηματισμό του προϊόντος **13** (Σχήμα 28).

Από τη μελέτη φάσματος ^1H NMR του προϊόντος της υδρόλυσης παρατηρείται ότι απουσιάζει η χαρακτηριστική κορυφή των τριών υδρογόνων της μεθοξαλυλ ομάδας στα 3.9 ppm. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη ομάδα απομακρύνθηκε κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης και το τριτοταγές υδροξύλιο παρέμεινε ελεύθερο.

3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Χρωματογραφία Χάρτου (TLC: Thin Layer Chromatography)

Οι αντιδράσεις ελέγχονται με χρωματογραφία χάρτου, με πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με silica gel F₂₅₄ (0.2 mm) της εταιρίας E.Merck. Γενικά, τα χρωματογραφήματα εμφανίζονται με ψεκασμό με διάλυμα θειικού οξέος 30%, ενώ άλλοτε οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων (TLC) είναι ορατές υπό λυχνία υπεριώδους (UV).

Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 70/30
- Διάλυμα Γ : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 60/40
- Διάλυμα Δ : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Ε : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 40/60

3.2 Χρωματογραφία στήλης

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

- Διάλυμα Α: οξικός αιθυλεστέρας
- Διάλυμα Β: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Γ: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 40/60
- Διάλυμα Δ: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 30/70

3.3 Ξήρανση διαλυτών

Χρησιμοποιούνται άνυδροι διαλύτες ακετονιτρίλιο (CH_3CN), και τετραϋδροφουράνιο (THF). Η ξήρανση του CH_3CN έγινε παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια έγινε απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA (molecular sieves). Το THF απεστάχθη από sodium/benzophenone αμέσως πριν από τη χρήση..

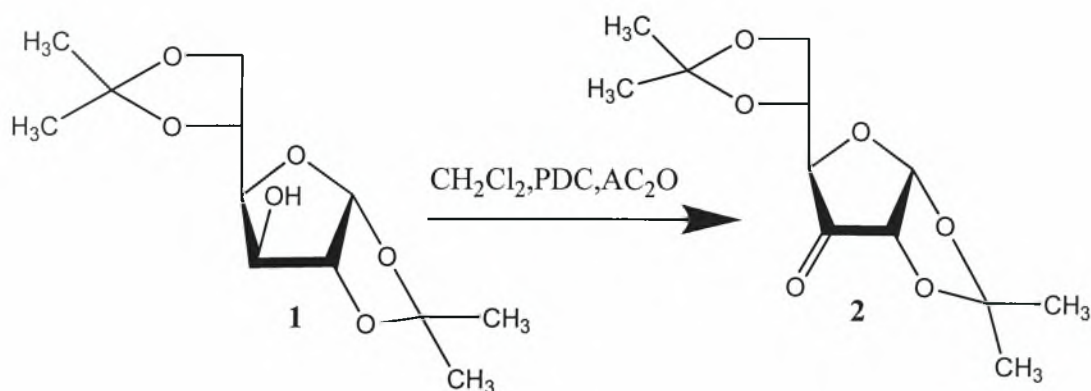
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με Bruker 500 MHz. Το tetramethylsilan (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (double), m (multiple). Οι συχνότητες J μετρήθηκαν σε Hz.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

4.1 Σύνθεση της 1-(3'-C-Αιθυνολο-3'-υδροξύ-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-ουρακίλης (6)

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

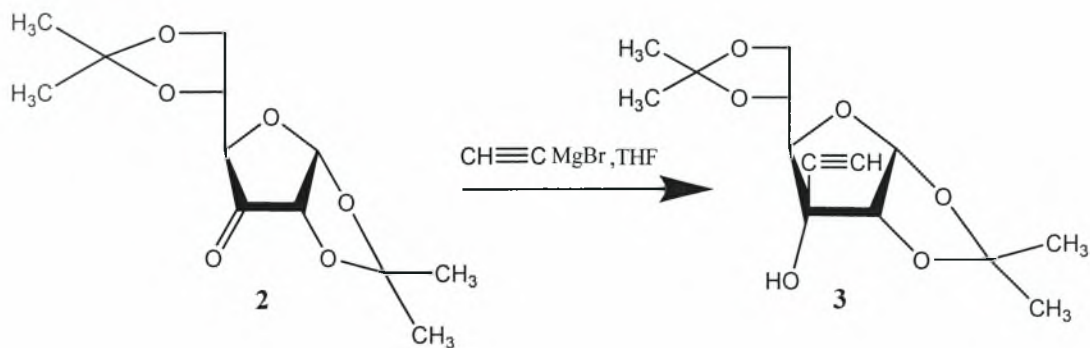


Η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2:5,6-δις-Ο-ισοπροπυλιδενο- α -D-γλυκοφουρανόζη (DAG) (1) (10.00 g, 38.42 mmol) διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο (137.6 ml) και στη συνέχεια προστέθηκε Ac_2O (10.9 ml, 115.26 mmol). Στο προκύπτον μίγμα προστέθηκε PDC (17.3 g, 46.1 mmol) και ακολούθησε θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα για 2 ώρες στους 50°C . Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 1). Μετά το πέρας της αντίδρασης στο μίγμα προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας (150 ml) και το προκύπτον παχύρρευστο διάλυμα μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel). Πραγματοποιήθηκε έκλουση με το διάλυμα A και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα, που περιείχε Ac_2O αραιώθηκε με τολουόλιο και στη συνέχεια με απόσταξη εξατμίστηκε μέχρις ξηρού. Το επιθυμητό προϊόν 2 (17.05 g) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρρευστου πρασινωπού ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

| | |
|-----------------|-------------|
| TLC (Διάλυμα E) | $R_f = 0.3$ |
| Απόδοση | 95% |

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

4.1.2 Σύνθεση της 3-C-Αιθύνυλο-1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (3) (Hideshi et al. 1998)

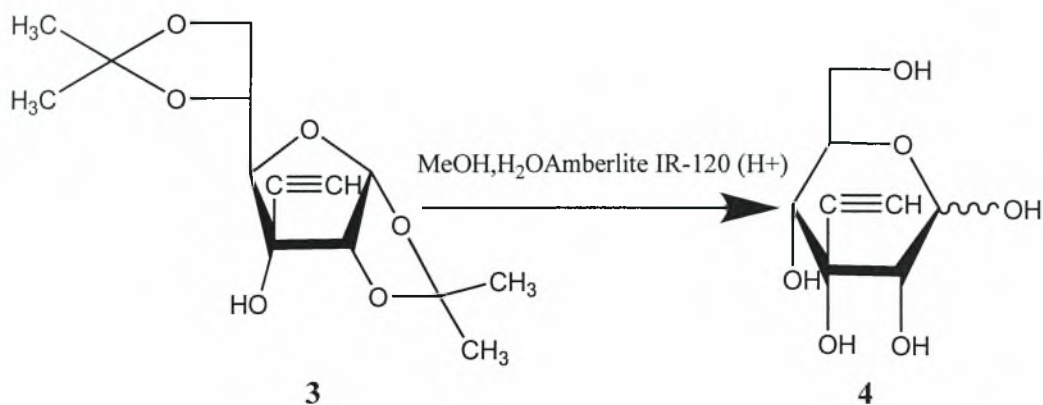


Η 3-C-Αιθύνυλο-1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (2) (1gr ή 3.9 mmoles) διαλύθηκε σε αποσταγμένη THF (39ml) και στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα του $\text{HC}\equiv\text{CMgBr}$ σε THF (0.5M , 46.8ml , 23.4mmoles) σε θερμοκρασία δωματίου. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε για περίπου μία ώρα. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 2). Στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε NH_4Cl (10ml). Το μίγμα στη συνέχεια διαλύθηκε σε οξικό αιθυλεστέρα (50 ml) και πλύθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaCl (5 ml) . Η οργανική φάση διαχωρίστηκε και προστέθηκε άνυδρο NaSO_4 . Έπειτα, διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Δ και το επιθυμητό προϊόν 3 (876mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

| | |
|-----------------|--------------|
| TLC (Διάλυμα E) | $R_f = 0.45$ |
| Απόδοση | 79% |

Πίνακας 2. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-Αιθύνυλο-1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (3)

4.1.3 Σύνθεση της 3-C-Αιθυνυλο-3-υδροξυγλυκόζης (4) (Foster et al. 1967, Tewson and Welsh, 1978)

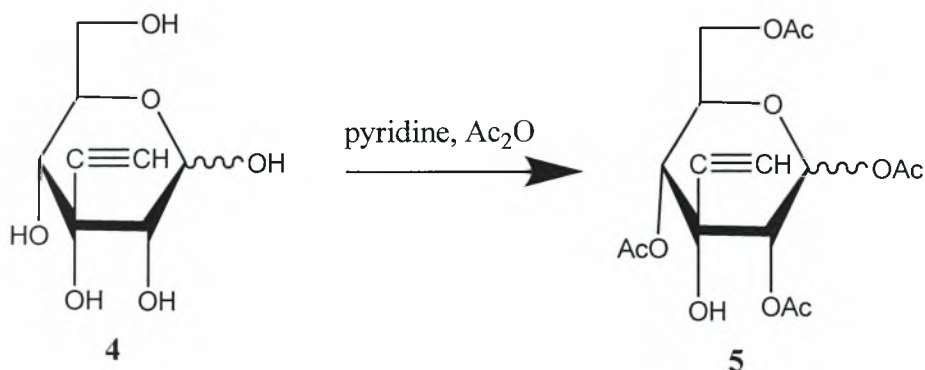


Ένα διάλυμα της ένωσης 3 (400 mg, 1.407 mmol) σε MeOH (2.19 ml) και νερό (12.51 ml) αναδεύτηκε στους 60-70 °C με ρητίνη Amberlite IR-120 (H⁺) (731.64 mg). Μετά από 10 ώρες η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 3), το μίγμα διηθήθηκε και απομακρύνθηκαν οι διαλύτες από το διήθημα υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν 4 (279 mg) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

| | |
|-----------------|-----------------------|
| TLC (Διάλυμα A) | R _f = 0.14 |
| Απόδοση | 97% |

Πίνακας 3. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-Αιθυνυλο-3-υδροξυγλυκόζης (4)

4.1.4 Σύνθεση της 3-C-Αιθυνυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζης (5) (Foster et al. 1967, Tewson et al. 1978)

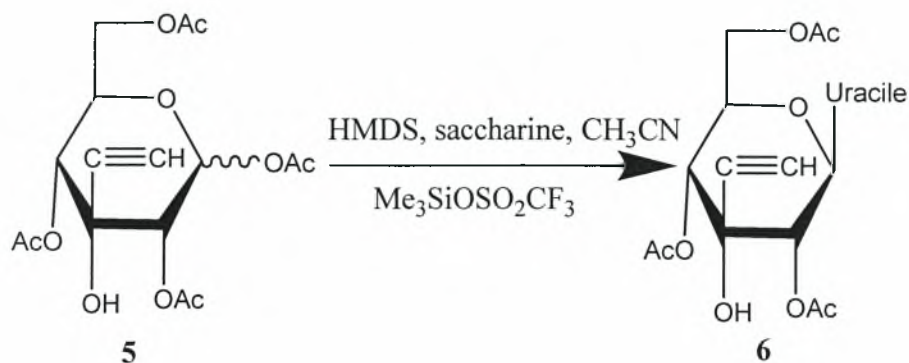


Σε ένα διάλυμα της ένωσης **6** (151 mg, 0.74 mmol) σε πυριδίνη (2.6 ml) προστέθηκε Ac₂O (1.4 ml). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC πίνακας 4) το διάλυμα κρύωσε στους 0 °C και προστέθηκε μεθανόλη (0.7 ml) για να καταστείλει την αντίδραση. Η αντίδραση συμπυκνώνεται υπό κενό πολλές φορές με MeOH για να απομακρυνθεί η πυριδίνη. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Γ και το επιθυμητό προϊόν **5** (215mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

| | |
|-----------------|-----------------------|
| TLC (Διάλυμα Β) | R _f = 0.59 |
| Απόδοση | 78% |

Πίνακας 4. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-Αιθυνυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζης (**5**).

4.1.5 Σύνθεση της 1-(3'-C-Αιθυνυλο-3'-υδροξυ-2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-ουρακίλης (6)



Ένα διάλυμα της ουρακίλης (38 mg, 0.34 mmol), του HMDS (88 μ l, 0.0154 mmol) και της σακχαρίνης (3 mg, 0.0154 mmol) σε άνυδρο CH_3CN (69 ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 30 λεπτά 120°C και αφότου το μίγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 3-αιθυνυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοκυρανόζη (5) (100 mg, 0.27 mmol) καθώς και ο $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (1.65 ml, 9.13 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες (TLC πίνακας 5) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 105°C . Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 , αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (90 ml) και εκχυλίστηκε μία φορά με νερό (1 x 5 ml). 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 το διάλυμα Δ. Το επιθυμητό προϊόν 6 (76 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

| | |
|-----------------|--------------|
| TLC (Διάλυμα Γ) | $R_f = 0.48$ |
| Απόδοση | 65% |

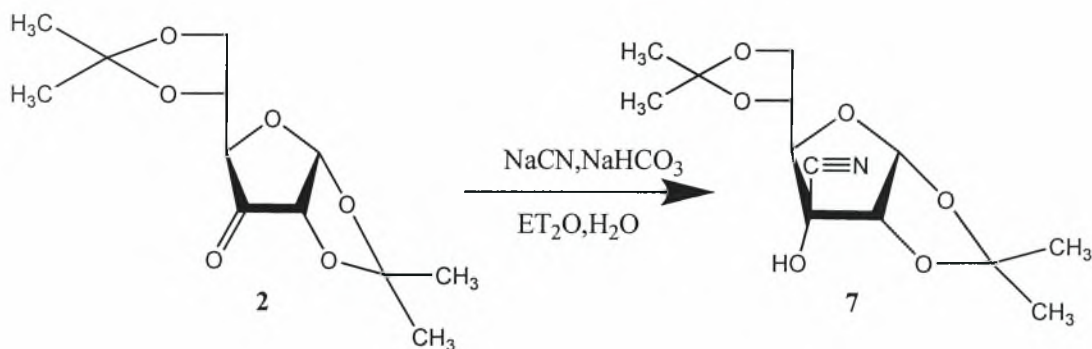
Πίνακας 5. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3'-C-Αιθυνυλο-3'-υδροξυ-2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-ουρακίλης (6)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3)

7.35(d, 1H, $J_{5,6} = 8.22$, H6), 6.06 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.37$, H-1'), 5.78 (d, 1H, H-5), 5.21-5.13 (m, 2H, H-2' και H-4'), 4.27-4.18 (m, 2H, H-6a', 6b'), 4.06-4.02 (m, 1H, H-5'), 2.53 (s, 1H, $-\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.14 και 2.09 και 2.08 (s, 9H, 3OAc).

4.2 Σύνθεση της της 1-(3'-C-Κυανο- 2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-ουρακίλης (10)

4.2.1 Σύνθεση της 3-C-Κυανο-1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (7)(Sonsoles et al. 1992)

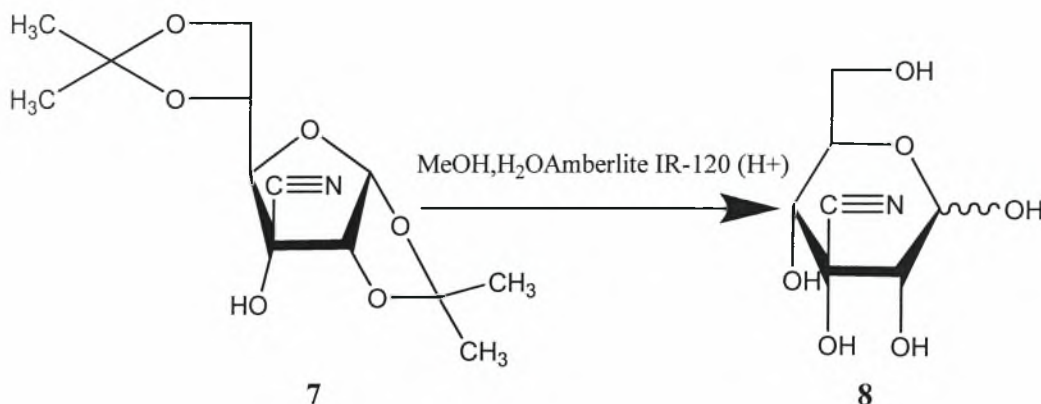


Η 3-C-Κυανο-1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (**2**) (346 mg ή 1.34 mmol) διαλύθηκε σε αιθυλετέρα (10.7ml) και στη συνέχεια προστέθηκε νερό (5.4ml), ώστε να σχηματιστούν δύο φάσεις. Κατόπιν προστέθηκε NaHCO_3 (2.95mmol, 245mg) και NaCN (1.47mmol, 72mg). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε με έντονη ανάδευση για 48 ώρες. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 6). Η οργανική φάση διαχωρίστηκε και η υδατική φάση πλύθηκε δυο φορές με οξικό αιθυλεστέρα (20 ml). Οι οργανικές φάσεις ενώθηκαν, ξηράθηκαν με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Γ. Το επιθυμητό προϊόν **7** (156 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λαδιού.

| | |
|-----------------|-----------------------|
| TLC (Διάλυμα E) | R _f = 0.56 |
| Απόδοση | 41% |

Πίνακας 6 .Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-Κυανο-1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδανο-α-D-αλλοφουρανόζης (7)

4.2.2 Σύνθεση της 3-C-Κυανο-3-υδροξυγλυκόζης (8) (Foster et al. 1967, Tewson et al. 1978)



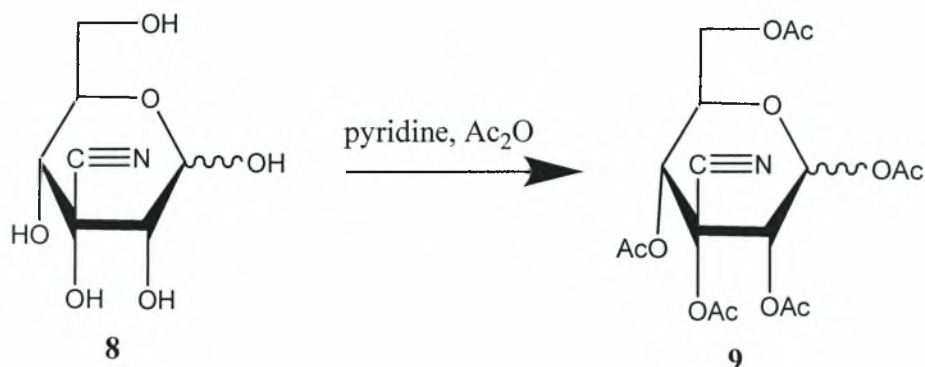
Το πυρανο παράγωγο του κυανίου 8 συντέθηκε από το 7 με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για τη σύνθεση του 4. Το επιθυμητό προϊόν 8 (242 mg) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

| | |
|-----------------|-----------------------|
| TLC (Διάλυμα A) | R _f = 0.32 |
| Απόδοση | 88 % |

Πίνακας 7 .Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-Κυανο-3-υδροξυγλυκόζης (8)

4.2.3 Σύνθεση της 3-C-κυανο-1,2,3,4,6-πεντα-O-ακετυλογλυκοκυρανόζης (9)

(Foster et al. 1967, Tewson et al. 1978)

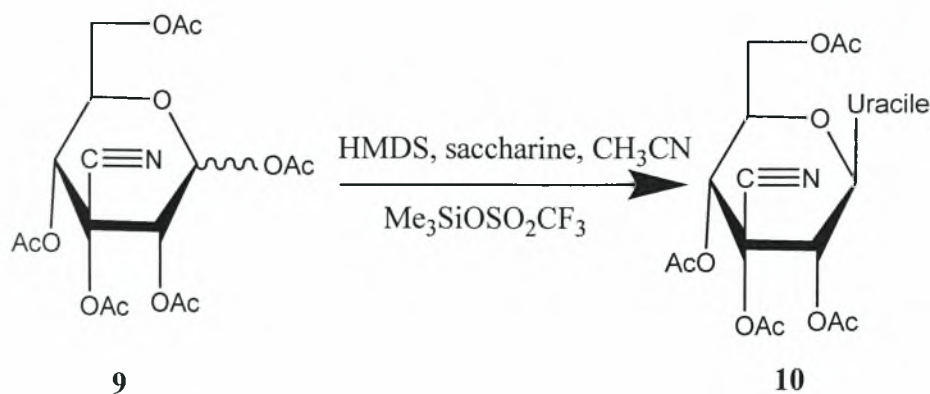


Το πύρανο παράγωγο του κυανίου 9 συντέθηκε από το 8 με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφηκε για τη σύνθεση του 5. Ο καθαρισμός του υπολείμματος, πραγματοποιήθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Δ και το επιθυμητό προϊόν 9 (286mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού.

| | |
|-----------------|----------------------|
| TLC (Διάλυμα Δ) | R _f = 0.6 |
| Απόδοση | 65 % |

Πίνακας 8. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-κυανο-1,2,3,4,6-πεντα-O-ακετυλογλυκοκυρανόζης (9)

4.2.4 Σύνθεση της 1-(3'-C-Κυανο-2',4',3',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)ουρακίλης (10)



Ένα διάλυμα της ουρακίλης (13mg, 0.11mmol), του HMDS (22μl, 0.136mmol) και της σακχαρίνης (0.93mg, 0.005mmol) σε άνυδρο CH₃CN (0.43ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 30 λεπτά 120 °C και αφότου το μίγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 3-C-κυανο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζη (**9**) (29mg, 0.078mmol) καθώς και ο Me₃SiOSO₂CF₃ (20μl, 0.11mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες (TLC πίνακας 9) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 105 °C. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (40ml) και εκχυλίστηκε μία φορά με νερό (1 x 5ml). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Β. Το επιθυμητό προϊόν **10** (17mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού.

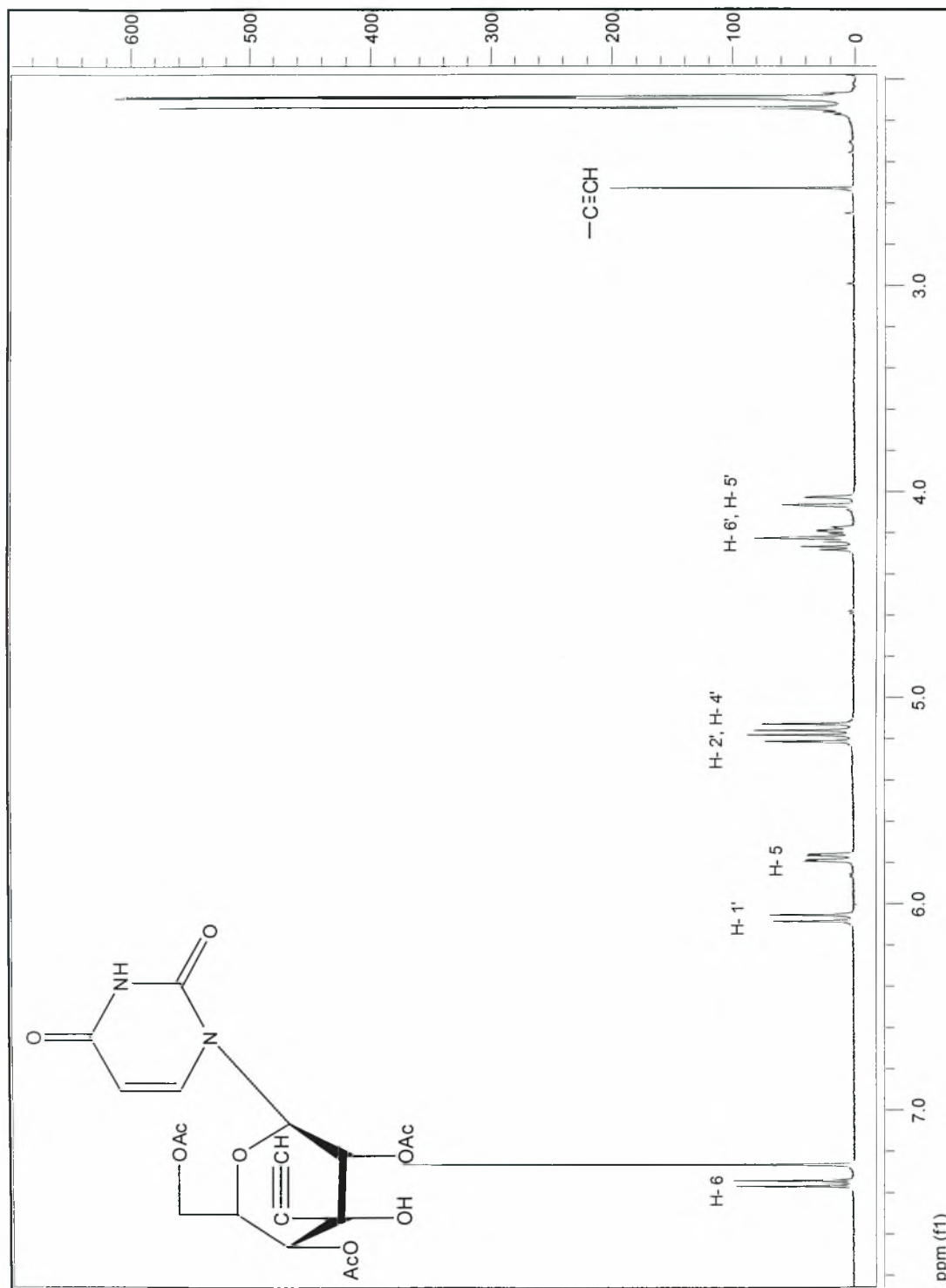
| | |
|-----------------|-----------------------|
| TLC (Διάλυμα Γ) | R _f = 0.43 |
| Απόδοση | 51 % |

Πίνακας 9. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3'-C-Κυανο-2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλης (**10**).

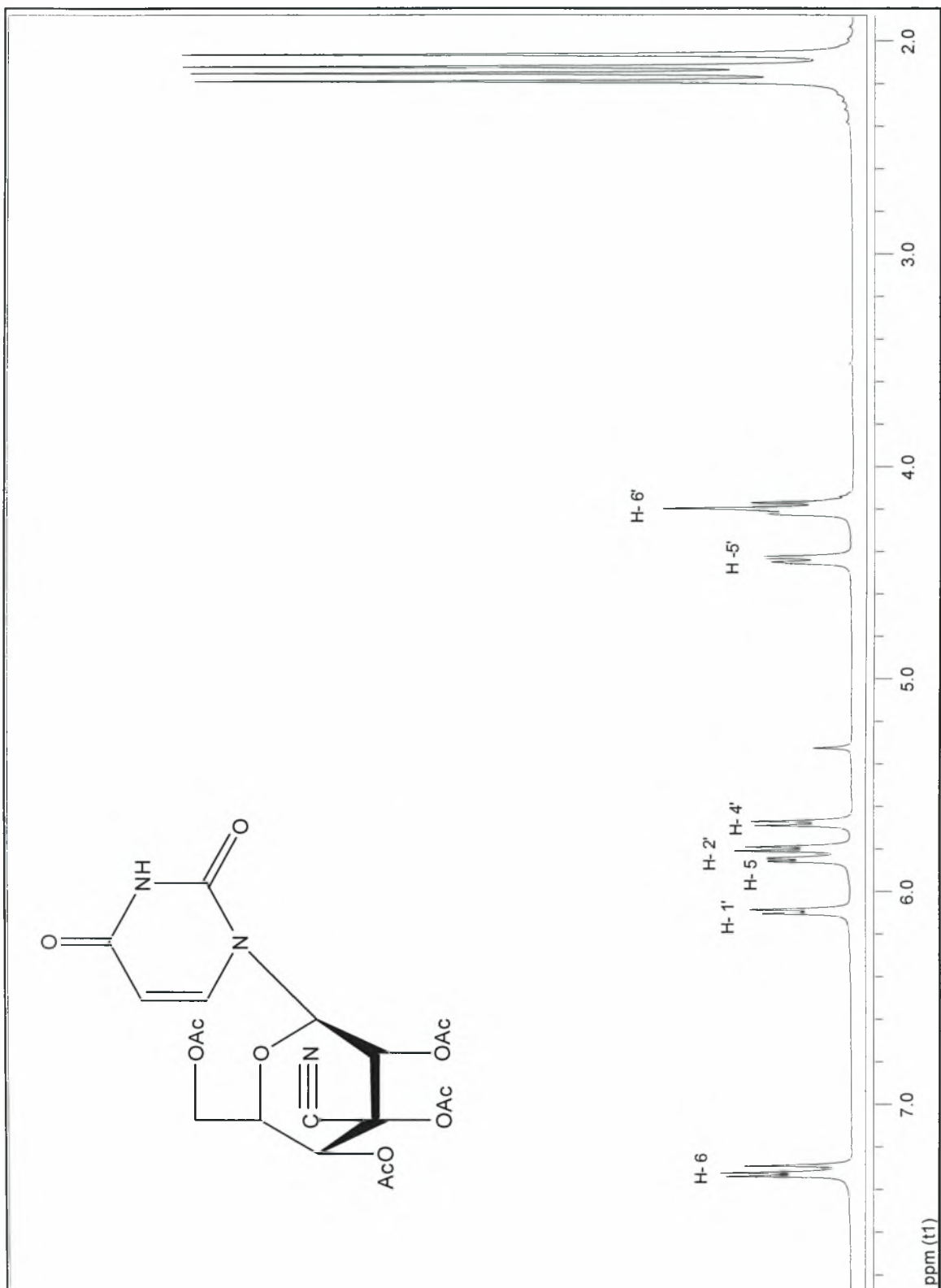
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

7.33 (d, 1H, *J*_{5,6}= 8.13, H6), 6.09 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 9.5, H-1'), 5.85 (d, 1H, H-5), 5.79 (d, 1H, *J*_{1',2'} = 9.5, H-2'), 5.68 (d, 1H, *J*_{4',5'}=9.95, H-4'), 4.46-4.24 (m, 1H, H-5'), 4.22-4.17 (m, 2H, H-6a',6b'), 2.53 (s, 1H, -C≡CH), 2.14 και 2.09 και 2.08 (s, 9H, 3OAc).

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR



Σχήμα 29. Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος 6



Σχήμα 30. Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος 10

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης νουκελοζιτών με πιθανή αντικαρκινική δράση. Με δεδομένο το μεγάλο ενδιαφέρον που έχει δοθεί στους φουρανονουκλεοζίτες με διακλαδωμένη αλυσίδα στο τμήμα του σακχάρου και ειδικότερα την αιθυνυλο αλλά και κυανο ομάδα, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση πυρανονουκλεοζιτών που φέρουν τις συγκεκριμένες χαρακτηριστικές ομάδες στο υδατανθρακικό τους τμήμα και ουρακίλη ως ετεροκυκλική βάση.

Η σύνθεση και των δύο νουκλεοζιτικών παραγώγων προέκυψε από τη σχετικά φτηνή πρώτη ύλη 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). Ακολούθησε πυρηνόφιλη προσθήκη της αιθυνυλο και κυανο ομάδας στην κετονομάδα της ένωσης 2 για το σχηματισμό των αιθυνυλο και κυανο φουρανικών παραγώγων 3 και 7 αντίστοιχα. Η ένωση 2 στην οποία πραγματοποιείται η πυρηνόφιλη προσθήκη μας παρέχει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει τον στερεοχημικό έλεγχο της εισαγωγής των αιθυνυλο και κυανο ομάδων στη β όψη (πάνω) του υδατανθρακικού δακτυλίου λόγω της παρεμπόδισης του ογκώδους 1,2-Ο-ισοπροπυλιδενο υποκαταστάτη.

Τα τελικά προϊόντα ελήφθησαν με μια βολική συνθετική πορεία, η οποία περιλάμβανε μικρά αλλά και σύντομα βήματα. Συγκεκριμένα στην πρώτη συνθετική πορεία του αιθυνυλο νουκλεοζίτη, η σύνθεση της 3-C-Αιθυνυλο-1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (3) είχε απόδοση 79%, η σύνθεση της 3-Αιθυνυλο-3-υδροξυγλυκόζης (4) είχε απόδοση 97%, η σύνθεση της 3-Αιθυνυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλογλυκοπυρανόζης (5) είχε απόδοση 78% και τέλος η σύνθεση του τελικού νουκλεοζίτη 1-(3'-Αιθυνυλο-3'-υδροξυ-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλης (6) είχε απόδοση 65%.

Κατά τη δεύτερη συνθετική πορεία του κυανου νουκλεοζίτη, η σύνθεση της 3-C-Κυανο-1,2:5,6-δι-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (7) είχε απόδοση 41%, η σύνθεση της 3-C-Κυανο-3-υδροξυγλυκόζης (8) είχε απόδοση 88%, η σύνθεση της 3-C-κυανο-1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλογλυκοπυρανόζης (9) είχε απόδοση 65%, και η σύνθεση της 1-(3'-C-Κυανο-2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)ουρακίλης (10) είχε απόδοση 51%.

Η ταυτοποίηση των τελικών ενώσεων **6** και **10** έγινε μέσω αναλύσεων του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H NMR. Από τη μελέτη του φάσματος NMR του επιθυμητού νουκλεοζίτη **6** (Σχήμα 29), διακρίνεται μία διπλή κορυφή στα 6.06 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{1,2'} = 9.37$ Hz, η οποία αντιστοιχεί στο σήμα του πρωτονίου H-1' του σακχάρου. Στο ίδιο φάσμα διακρίνονται τα σήματα των πρωτονίων H-2', H-4', H-5' και H-6' ως πολλαπλές κορυφές. Χαρακτηριστικό είναι το σήμα του πρωτονίου της αιθυνολο ομάδας που εμφανίζεται ως απλή κορυφή στα 2.53 ppm. Τέλος, διακρίνονται τα σήματα των εννιά πρωτονίων των τριών ακετυλο ομάδων, που εμφανίζονται ως απλές κορυφές στα 2.08, 2.09 και 2.14 ppm, αντίστοιχα.

Στο φάσμα ^1H NMR του επιθυμητού νουκλεοζίτη **10** (Σχήμα 30), διακρίνεται μία διπλή κορυφή στα 6.09 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{1,2'} = 9.47$ Hz, η οποία αντιστοιχεί στο σήμα του πρωτονίου H-1' του σακχάρου. Ακολουθεί το σήμα του πρωτονίου H-2' σαν μια διπλή κορυφή στα 5.79 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{1,2'} = 9.5$ Hz και το σήμα του πρωτονίου H-4' σαν μια διπλή κορυφή στα 5.68 ppm με $J_{1,2'} = 9.95$ Hz. Στο ίδιο φάσμα διακρίνονται τα σήματα των πρωτονίων H-5' και H-6' ως πολλαπλές κορυφές. Τέλος, διακρίνονται τα σήματα των δώδεκα πρωτονίων των τεσσάρων ακετυλο ομάδων, που εμφανίζονται ως απλές κορυφές στα 2.07, 2.12, 2.15 και 2.19 ppm, αντίστοιχα.

Με δεδομένο τον σημαντικό ρόλο των τροποποιημένων νουκλεοζιτών στην αντική και αντικαρκινική χημειοθεραπεία, θεωρείται επιβεβλημένη η αποτίμηση της βιολογικής δράσης των νεοσυντιθέμενων νουκλεοζιτών **6** και **10**, η οποία και θα αναφερθεί σε επόμενες εργασίες.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5548.
- Antonakis, K.; Chouroulinkov, I. *Biochem. Pharmacol.* **1974**, *23*, 2095
- Antonakis, K. “Hexopyranose nucleosides”. In *Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C)*; Elsevier, Amsterdam, **1989**, *4*, p. 241.
- Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* **1995**, *67*, 155.
- Augustyns, K.; Vandendriessche, F.; Van Aerschot, A.; Busson, R.; Urbanke, C.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4711.
- Augustyns, K.; Rozenski, J.; Van Aerschot, A.; Janssen, G.; Herdewijn, P. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 2977.
- Augustyns, K.; Rozenski, J.; Van Aerschot, A.; Busson, R.; Claes, P.; Herdewijn, P. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1189.
- Balzarini, J. *Pharmacy World Sci.* **1993**, *16*, 113.
- Brossette T., Emmanuel Klein, Christophe Creminon, Jacques Grassi, Charles Mioskowski and Lyk Lebeau; *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 8129-8143.
- Clercq E.; *Nature Reviews, Drug Discovery*, **2002**, *1*, 13-25.
- Γεωργάτσου, Βιοχημεία, Εκδόσεις Γιαχούδη Γιαπούλη, **1993**.
- De Clercq, E. *Strategies in the design of antiviral drugs. Nat. Rev., Drug Discov.* **2002**, *1*, 13 – 25.
- Egron, M.J.; Dorange, I.B.; Antonakis, K.; Herscovici, J.; Ollapally, A.P. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2002**, *21*, 327.
- Elhalabi, J.; Rice, K. G. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2004**, *23*, 195.
- Ellison RR, Carey RW and Holland JF. *Clin. Pharmacol. Ther.* , **1967** *8*, 800–809.
- Foster, A. B.; Hems, R.; Webber, J. M. *Carbohydr. Res.* **1967**, *5*, 292.
- Hartman, M. C. T. , Coward J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *124*, 10036.
- Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4963.

- Hideshi Hattori, Motohiro Tanaka, Masakazu Fukushima, Takuma Sasaki, and Akira Matsuda. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 5005-5011.
- Hideshi Hattori, Eisuke Nozawa, Tomoharu Iino, Yuichi Yoshimura, Satoshi Shuto, Yuji Shimamoto, Makoto Nomura, Masakazu Fukushima, Motohiro Tanaka, Takuma Sasaki, and Akira Matsuda. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 2892.
- Hiroyuki Hayakawa, Satoru Kohgo, Kenji Kitano, Noriyuki Ashida, Eiichi Kodama, Hiroaki Mitsuya and Hiroshi Ohru. *Antiviral chemistry & chemotherapy* **2004**;15(4):169-87.
- Katsumi Kakinuta, Yoshihisa Iihama, Izumi Takagi, Kouichi Ozawa, Noriaki Yamauchi, Nobutaka Imamura, Yasuaki Esumi and Masakazu Uramoto, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 3763.
- Khan, A.R.; Mulligan, K.X.; Ollapally, P. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2001**, 20, 759.
- Khan, A. R.; Mulligan, K. X.; Redda, K. K.; Ollapally, A. P. *Synth. Commun.* **2002**, 32, 1023.
- Kodama, E.; Kohgo, S.; Kitano, K.; Machida, H.; Gatanda, H.; Shigeta, S.; Matsuoka, M.; Ohru, H.; Mitsuya, H. 4'-Ethynyl nucleoside analogues: potent inhibitors of multidrug-resistant human immunodeficiency virus variant in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 1539.
- Komiotis, D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides Nucleotides* **1991**, 10, 431.
- Komiotis, D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents* **2008**, 7, 219.
- Langen, P.; Etzold, G. *Mol. Pharmacol.* **1966**, 2, 89.
- Leclercq, F.; Egron, M.J.; Antonakis, K. *Carbohydr. Res.*, **1992**, 228, 95.
- Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 980.
- Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.*, **2007**, doi:10.1016/j.ejmech.2007.04.001.
- Matsuda A, Hattori H, Tanaka M, Sasaki T. *Biomed Chem Lett*, **1996**, 6: 1887.
- Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* **2004**, 95, 105.
- Makoto Nomura, Satoshi Shutoa and Akira Matsudaa, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11 (**2003**) 2453–2461

- Maurinsh, Y.; Schraml, J.; De Winter, H.; Blaton, N.; Peeters, O.; Lescrinier, E.; Rozenski, J.; Van Aerschot, A.; De Clercq, E.; Busson, R.; Herdewijn, P. J. *Org. Chem.* **1997**, 62, 2861.
- Minakawa, N.; Takeda, T.; Sasaki, T.; Matsuda, A.; Ueda, T. Nucleosides and nucleotides 96: synthesis and antitumor activity of 5-Ethynyl-1-β-D ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives. *J. Med. Chem.* **1991**, 34(2), 778 – 786.
- Nair V.; Buenger, G.S. *J. Org. Chem.* **55 (1990)** 3695-3697.
- McMurry John, *Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, **2000**, σελ.905.
- McMurry John, *Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, **2000**, σελ. 1245-1247.
- McMurry John, *Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, **2000**, σελ. 1249.
- McMurry John, *Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, **2000**, 151- 152.
- Moon H. R., Kim H. O., Lee S. K., Choi W. J., Chun M. W., Jeong L. S.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2002**, 10, 1499-1507.
- Nord, D. L.; Dalley, N. K.; Mc Kernan, P. A.; Robins, R. K. *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 1044.
- Ollapally, A. P.; Dorange, I. B.; Whitaker, T. L. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, 18, 703.
- Ostrowski, T.; Wroblowski, B.; Busson, R.; Rozenski, J.; De Clercq, E.; Bennet, M. S.; Champness, J. N.; Summers, W. C.; Sanderson, M. R.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4343.
- O-Yang, C.; Wu, H.Y.; Fraser-Smith, E.B.; Walker, K.A.M. Synthesis of 4'-C-cyanothymidine and analogs as potent inhibitors of HIV. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 37.
- Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, *Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης*, **1997** : 4, 26.
- Pastor-Anglada, M.; Felipe, A.; Casado, J. *TiPS* **1998**, 19, 424.
- Patterson, J.; Uriel, C.; Egron, M.J.; Herscovici, J.; Antonakis, K.; Alaoui-Jamali, M.A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1998**, 42, 779 and references cited therein

- Plunkett, W.; Huang, P.; Xu, Y. Z.; Heinemann, V.; Grunewald, R.; Gandhi, V. *Semin. Oncol.* **1995**, *22*, 3-10 (suppl 11) and references cited therein.
- Satoru Kohgo, Kohei Yamada, Kenji Kitano, Shinji Sakata, Hiroyuki Hayakawa, Daisuke Nameki, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Hiroaki Mitsuya, and Hiroshi Ohru, *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS*, Vol. 22, Nos. 5–8, pp. 887–889, **2003**.
- Srinivasarao Meneni, Ingo Ott, Craig D. Sergeant, Adam Sniady, Ronald Gustb, and Roman Dembinski. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15** (2007) 3082–3088.
- Sonsoles Velázquez and Maria- José Camarasa, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1683.
- Stryer Lubert, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, **1997**: 347-354.
- Suhadolnik, R. J. *Nucleoside Antibiotics*, Wiley-Interscience, New York, **1970**.
- Suhadolnik, R. J. *Nucleosides as biological Probes*, Wiley and Sons, New York, **1979**.
- Tomoharu Iino, Yuichi Yoshimura, and Akira Matsuda, *Tetrahedron* Vol. 50, No. 35, pp. 10397-10406, **1994**
- Tewson, T. J.; Welsh, M. J. *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 1090.
- Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12757.
- Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3154.
- Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2033.
- Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Van Meervelt, L.; Rozenski, J.; Wiebe, L.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Claes, P.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 826.
- Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. *J. Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417.
- www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrv/