



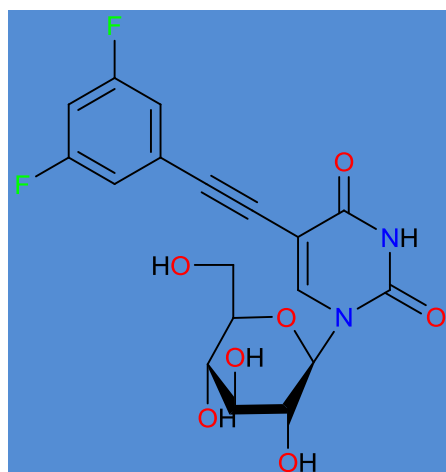
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΖΗΣΟΠΟΥΛΟΥ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ  
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Αλογονο φαινυλο νουκλεοζίτες ως νέοι κυτταροτοξικοί  
παράγοντες.**



**ΛΑΡΙΣΑ 2014**

# **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Αλογονο φαινυλο νουκλεοζίτες ως νέοι κυτταροτοξικοί  
παράγοντες.**

**Halogen phenylethynyl pyranonucleosides as novel cytotoxic  
agents**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

**Μπαλατσός Νικόλαος** — Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα καθηγητή τον κο Κομιώτη Δημήτριο τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το ιδιαίτερα αυτό ενδιαφέρον θέμα καθώς και για τις πολύτιμες και επικοινωνιακές υποδείξεις του.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα κα. Δημοπούλου Αθηνά για όλα τα εφόδια που μου μεταβίβασε και χρειάστηκαν ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή καθώς και στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια κα. Μαντά Στυλιανή για την πολύτιμη βοήθεια της.

Τέλος, δε θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την υποδοχή και το κλίμα συνεργασίας που φρόντισαν να επικρατεί καθ' όλη τη διάρκεια.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	6
ABSTRACT	7
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
1.1 Υδατάνθρακες	8-9
1.1.1 Σχηματισμός ημιακετάλης	9-10
1.2 Νουκλεοζίτες	11
1.2.1 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών	12-15
1.3 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες	15-17
1.4 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες	18-19
1.5 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρα μια εξόζη	20-22
<b>2.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
2.1 Στόχος – Σκοπός μελέτης	23-26
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
3.1 Υλικά	27
3.1.1 Υλικά σύνθεσης νουκλεοζιτικών αναλόγων	27
3.2 Γενική μεθοδολογία	28
3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	28-29
3.2.2 Χρωματογραφία στήλης	29-30
3.2.3 Ξήρανση διαλυτών	30
3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων	31
3.3 Μέθοδοι	32
3.3.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού	32
3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης	33

3.3.3	Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη 2	34-35
3.3.4	Σύνθεση των 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5 - [(-2 ή -3-φθοροφαινυλο) αιθυνυλο] νουκλεοζίτες της ουρακίλης (3), (4) και 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-[-(3,5-διφθοροφαινυλο)αιθυνυλο] ουρακίλη (5).	35-36
3.3.5	Σύνθεση των 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-[-2-ή -3- ή -5-φθοροφαινυλο]αιθύνυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης 6,7,8.	37-38
<b>4.</b>	<b>ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ <sup>1</sup>H NMR</b>	38-39
<b>5.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	39-40
<b>6.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	41-49

## Περίληψη

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι μόρια τα οποία προκύπτουν από δομικές τροποποιήσεις των φυσικών νουκλεοζιτών που ανήκουν στην γενικότερη κατηγορία των  $\beta$ -*N*-γλυκοζιτών και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου και των ιογενών λοιμώξεων.

Μεγάλος αριθμός νουκλεοζιτικών αναλόγων δρουν ως αντιμεταβολίτες, ανταγωνίζονται τους φυσικούς νουκλεοζίτες και αλληλεπιδρούν με ενδοκυττάριους στόχους με σκοπό την πρόκληση της κυτταροτοξικότητας. Άλλοι πάλι ενσωματώνονται κατά την αντιγραφή ή την επιδιόρθωση του DNA, οδηγώντας έτσι στον τερματισμό της διαδικασίας σύνθεσής του ενώ άλλοι λειτουργούν ως αναστολείς της πολυμεράσης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η συνθετική πορεία νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων, με τροποποίηση στη βάση, ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί και αντιικοί παράγοντες.

Τα νέα μόρια που συντέθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας είναι τα πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα που φέρουν στην 5-θέση της ουρακίλης: 1-αιθυνο-2-φθοροβενζόλιο, 1-αιθυνο-3-φθοροβενζόλιο και 1-αιθυνο-3,5-διφθοροβενζόλιο.

## ABSTRACT

Nucleoside analogs are molecules that result from structural modifications of natural nucleosides belonging to the general class of beta-*N*-glycosides and play a key role in the treatment of cancer and viral infections. Many nucleoside analogs act as antimetabolites, natural nucleosides compete and interact with intracellular targets to cause cytotoxicity. Others incorporated during replication or repair of DNA, leading to the termination of the composition process while others function as polymerase inhibitors. This dissertation describes the new synthetic route nucleosidic analogues, bearing modifications at the base moiety, as potential anticancer and antiviral agents.

The new molecules which were synthesized in the laboratory of Organic Chemistry, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly are: 1-ethynyl-2-fluorobenzene ,1-ethynyl-3-fluorobenzene and 1-ethynyl-3,5-difluorobenzene.

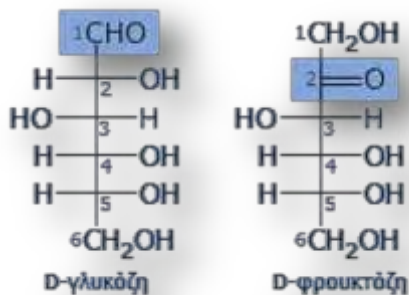


# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Υδατάνθρακες

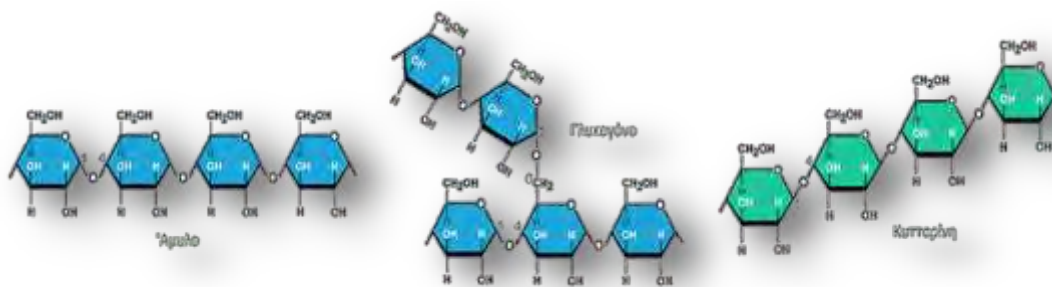
Οι υδατάνθρακες, αποτελούν μια ομάδα οργανικών ουσιών, που ως προς το χημικό τύπο τους, είναι ενυδατωμένος άνθρακας, με γενικό τύπο  $C_n(H_2O)_n$ [1]. Η ονομασία υδατάνθρακες (carbohydrate) προέρχεται ιστορικά από το γεγονός ότι η γλυκόζη (άλλες κοινές ονομασίες: σταφυλοσάκχαρο, δεξτρόζη), ο πρώτος απλός υδατάνθρακας που απομονώθηκε σε καθαρή μορφή, έχει μοριακό τύπο  $C_6H_{12}O_6$  και αρχικά θεωρήθηκε ως ένα είδος υδρίτη του άνθρακα (εφυδατωμένος άνθρακας), δηλαδή  $C_6(H_2O)_6$ . Αν και η άποψη αυτή σύντομα εγκαταλείφθηκε, η ονομασία παρέμεινε. Ο όρος υδατάνθρακες σήμερα περιλαμβάνει μια ευρύτατη ομάδα πολύ-υδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών που κοινώς τα ονομάζουμε σάκχαρα. Οι βιολογικής σημασίας υδατάνθρακες ονομάζονται και γλυκίδια αρχίζουν από τους μονοσακχαρίτες (π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη), και φθάνουν μέχρι σύνθετα μόρια, που λέγονται πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο και η κυτταρίνη. Έτσι μερικοί είναι σχετικά μικροί, με μοριακά βάρη μικρότερα του  $100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , ενώ άλλοι είναι πραγματικά μακρομόρια, με μοριακό βάρος πολλές εκατοντάδες ή χιλιάδες  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες υδατανθράκων βιολογικού ενδιαφέροντος:

- Οι μονοσακχαρίτες, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, είναι τα μονομερή για τη σύνθεση πολυπλοκότερων δομών. Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να ταξινομηθούν επιπλέον σε αλδοζες και κετόζες. Η κατάληξη -οζη χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει υδατάνθρακα, ενώ τα προθέματα αλδο- και κετο-, προσδιορίζουν τη φύση της καρβονυλικής ομάδας στην άκυκλη μορφή τους (αλδεϋδη ή κετόνη). Ο αριθμός των ατόμων άνθρακα σε



μονοσακχαρίτη δηλώνεται με τα προθήματα τρι-, τετρ-, πεντ-, εξ-, κ.λπ. Η γλυκόζη είναι μία αλδοεξόζη και η φρουκτόζη είναι κετοεξόζη.

- Οι δισακχαρίτες αποτελούνται από δυο μονοσακχαρίτες
- Οι ολιγοσακχαρίτες αποτελούνται 2-10 μονοσακχαρίτες.
- Οι πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη, που αποτελούνται από εκατοντάδες χιλιάδες υπομονάδες γλυκόζης. (Εικόνα 1)



**Εικόνα 1.** Τμήματα των μορίων των τριών κυριότερων πολυμερών μορφών της γλυκόζης: άμυλο, γλυκογόνο, κυτταρίνη.

**Άμυλο:** Πολυμερής μορφή αποτελούμενη από σειρά μορίων α-γλυκόζης. Αποτελεί την κυριότερη μορφή υπό την οποία προσλαμβάνεται η γλυκόζη από τον άνθρωπο.

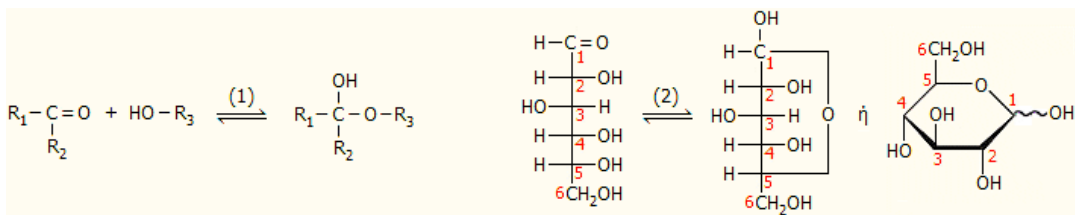
**Γλυκογόνο:** Πολυμερής μορφή αποτελούμενη από σειρά μορίων α-γλυκόζης με διασταυρώσεις. Η κυριότερη μορφή υπό την οποία αποθηκεύεται η γλυκόζη στον ανθρώπινο οργανισμό (αποτελεί την κυριότερη πηγή ενέργειας που απαιτείται από τον οργανισμό).

**Κυτταρίνη:** Πολυμερής μορφή αποτελούμενη από σειρά μορίων β-γλυκόζης. Αποτελεί την κυριότερη μορφή υπό την οποία βρίσκεται η γλυκόζη στη φύση. Δεν αποτελεί τροφή για τον άνθρωπο, αλλά αφομοιώνεται από πολλούς άλλους οργανισμούς, όπως τα μηρυκαστικά ζώα, που διαθέτουν τα κατάλληλα ένζυμα για τη διάσπασή της. Το άμυλο στους φυτικούς οργανισμούς, η κυτταρίνη (κελλουλόζη) στα διάφορα είδη ξύλου, το χαρτί, το βαμβάκι και διάφορα άλλα προϊόντα φυτικής προέλευσης, είναι καθαροί υδατάνθρακες, ενώ τροποποιημένα μόρια υδατανθράκων βρίσκονται στα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA) και σε άλλες βιοοργανικές ενώσεις. Μαζί με τις πρωτεΐνες και τα λίπη, οι υδατάνθρακες αποτελούν βασικά συστατικά στους ζωντανούς οργανισμούς με μεγάλη βιολογική και ενεργειακή σημασία. Συνεπώς όλοι οι σύνθετοι υδατάνθρακες είναι δημιουργήματα από απλές μονάδες που λέγονται μονοσακχαρίτες οι οποίες και δεν μπορούν να υδρολυθούν σε απλούστερη δομή. Κυριότεροι υδατάνθρακες είναι: οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη και φρουκτόζη, οι δισακχαρίτες λακτόζη, μαλτόζη και σακχαρόζη, οι πολυσακχαρίτες άμυλο, γλυκογόνο και κυτταρίνη και τέλος οι ανάγοντες μονοσακχαρίτες ριβόζη και δεοξυριβόζη. ([http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem\\_glucose.htm](http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_glucose.htm))

### 1.1.1 Σχηματισμός ημιακετάλης

Η γενική αντίδραση σχηματισμού ημιακετάλης (hemiacetal) μεταξύ μιας καρβονυλικής ένωσης (αλδεΐδης ή κετόνης) και μιας αλκοόλης αποδίδεται από την αντίδραση ισορροπίας:

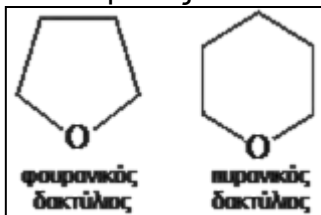
Να σημειωθεί εδώ ότι οι ημιακετάλες έχουν τη χαρακτηριστική ομάδα  $R-CR'(OH)-O-R''$  ένωσης με αλκοόλη), ενώ οι (πλήρεις) ακετάλες έχουν τη χαρακτηριστική ομάδα  $R-CR'(O-R''')-O-R''''$ . Εάν η υδροξυλομάδα και το καρβονύλιο βρίσκονται στο ίδιο μόριο του μονοσακχαρίτη, μπορεί να πραγματοποιηθεί ενδομοριακή



**Εικόνα 2.**

πυρηνόφιλη προσθήκη, που θα οδηγήσει στον σχηματισμό κυκλικής ημιακετάλης. (Εικόνα 2)

Οι πενταμελείς και οι εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερές

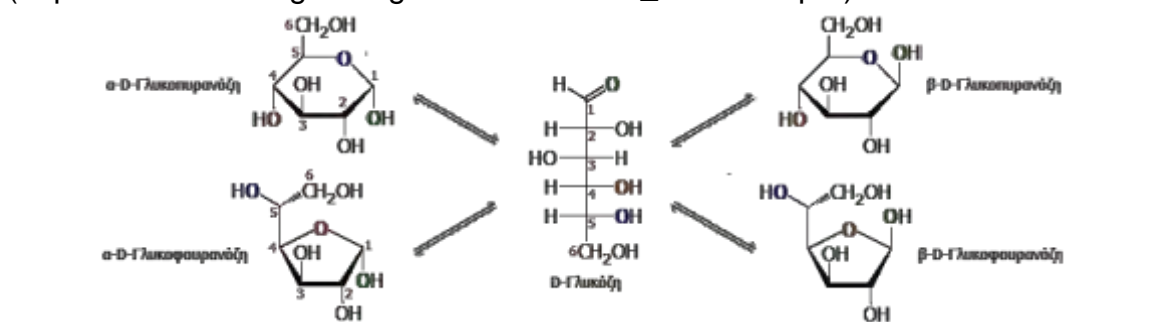


ενώσεις. Για τον λόγο αυτό οι υδατάνθρακες σε διαλύματα βρίσκονται σε μορφές τόσο ανοικτής, όσο και κλειστής αλυσίδας σε μια κατάσταση ισορροπίας, όπου κατά κανόνα κυριαρχεί η κλειστή (κυκλική) μορφή μέσω του ημιακεταλικού δεσμού. Στην περίπτωση των εξοζών, το οξυγόνο του υδροξυλίου του άνθρακα C5 καθίσταται το αιθερικό οξυγόνο εξαμελούς (πυρανικού) δακτυλίου ή το το οξυγόνο του υδροξυλίου του άνθρακα C4 καθίσταται το αιθερικό οξυγόνο πενταμελούς (φουρανικού) δακτυλίου.

Η γλυκόζη σε υδατικό διάλυμα απαντά κυρίως με τη μορφή εξαμελούς δακτυλίου της πυρανόξης, που οφείλεται σε ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη του -OH του άνθρακα 5 (C5) στον καρβονυλικό άνθρακα 1 (C1). Οι κυκλικές δομές παριστάνονται κυρίως με τις προβολές κατά Haworth. Στις προβολές αυτές ο ημιακεταλικός δακτύλιος σχεδιάζεται σαν να είχε επίπεδη μορφή, όπου το άτομο του ημιακεταλικού οξυγόνου τοποθετείται συνήθως πίσω και δεξιά. Οι "παχιές" γραμμές του δακτυλίου παριστάνουν την πλευρά του δακτυλίου προς τον αναγνώστη.

Στην πραγματικότητα ο δακτύλιος της πυρανόξης δεν είναι επίπεδος και έχει τη δομή, αλλά οι προβολές κατά Haworth χρησιμοποιούνται ευρύτατα, επειδή σχεδιάζονται ευκολότερα και παρέχουν τη δυνατότητα άμεσης διάκρισης των cis- και trans- συσχετισμών των υδροξυλίων του δακτυλίου. Στις προβολές κατά Haworth συνήθως δεν εμφανίζονται (αλλά εννοούνται) στον δακτύλιο τα άτομα άνθρακα και οι δεσμοί C-H. (Εικόνα 3)

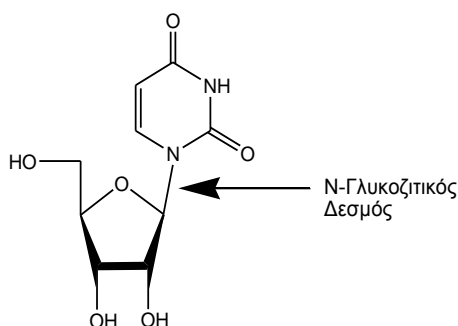
([http://www.chemeng.ntua.gr/files/simeioseis\\_xamilakis.pdf](http://www.chemeng.ntua.gr/files/simeioseis_xamilakis.pdf))



**Εικόνα 3.** Κυκλοποίηση μονοσαχαρίτη μέσω αντίδρασης ημιακετάλης.

## 1.2 Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες είναι βιομόρια που αποτελούν τους δομικούς λίθους των νουκλεϊκών οξέων DNA και RNA. Πρόκειται για γλυκοσυλαμίνες που προκύπτουν από την ένωση μιας βάσης, πουρίνης (αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδίνης (θυμίνη, κυτοσίνη, ουρακίλη), με τον άνθρακα C-1 μιας πεντόζης (σάκχαρο με 5 άτομα άνθρακα στην αλυσίδα του) η οποία είναι είτε η 2 δεοξυ-*D*-ριβόζη για το DNA είτε η *D*-ριβόζη για το RNA μέσω  $\beta$ -*N*-γλυκοζιτικού δεσμού (Stryer L, 2001). Οι *N*-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη  $\beta$ , δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Berg J. M. *et al*, 2001) (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Η  $\beta$ -στερεοδιάταξη του *N*-γλυκοζιτικού δεσμού της ουριδίνης.

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των ιδιοτήτων τους που τα καθιστούν αντικαρκινικούς, αντιβακτηριδιακούς, αντιικούς παράγοντες, καθώς και ως αντιοξειδωτικά. Το εξαιρετικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση και μελέτη ενός μεγάλου αριθμού παραγώγων με ιδιαίτερη ποικιλομορφία.

Μια ποικιλομορφία νουκλεοζιτών που σε σχέση με τους γνωστούς στα βιολογικά συστήματα διαφοροποιούνται είτε στη βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης είτε στο φουραζονικό υπόστρωμα ή και στα δυο.

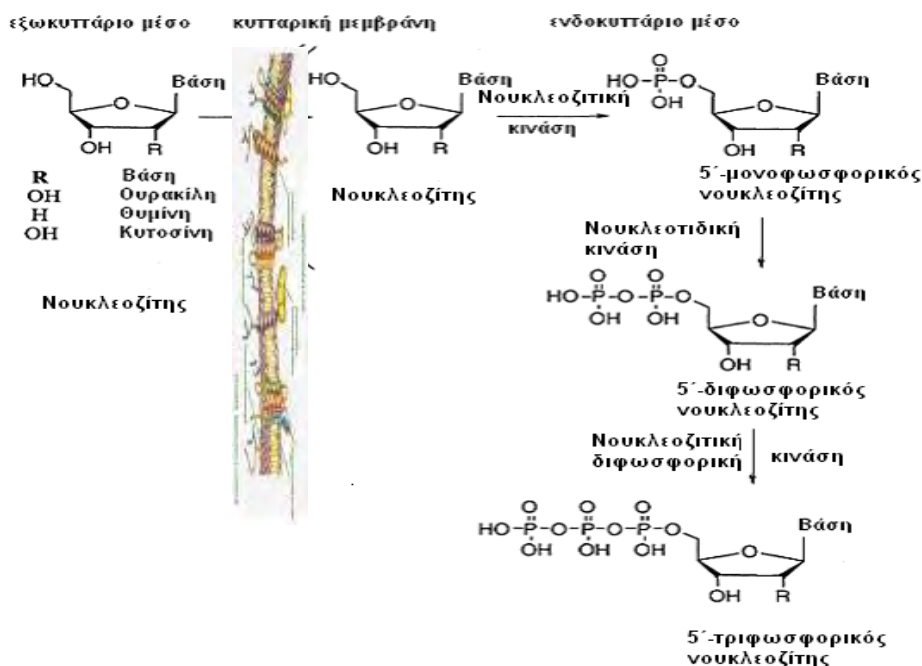
### 1.2.1 Τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών.

Η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά αλλά έχουν και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση, όπως επίσης και μέσω πρωτεϊνών μεταφορέων νουκλεοζιτών, ιδιότητες τις οποίες εκμεταλλευόμαστε στην χρήση νουκλεοζιτικών αναλόγων ως αντικαρκινικά και αντιικά φάρμακα (Zhou W. *et al*, 2004). Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα διατηρούν χαρακτηριστικά των φυσικών μορίων αλλά είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε, όταν εισέλθουν στο κύτταρο και μεταβολιστούν, να μπορούν να παρέμβουν στην σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και έτσι να ασκήσουν κυτταροστατική και αντιική δράση (Tsirkone V. *et al*, 2010; Lui V. W. *et al*, 2010; Somsák L. *et al*, 2008).

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών, συνήθως δρουν ως προφάρμακα, δηλαδή είναι ανενεργά στην μορφή που χορηγούνται και πρέπει, για να ασκήσουν την θεραπευτική τους δράση, να μεταβολιστούν προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους (Arner E. S. J. and Eriksson S., 1995). Οι φωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών δεν μπορούν να διαπεράσουν με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη λόγω φορτίου, όπως επίσης και όταν δημιουργηθούν μέσα στο κύτταρο η μετακίνησή τους προς γειτονικά κύτταρα είναι δύσκολη λόγω του διαφορετικού pH που υπάρχει στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα.

Η φωσφορυλίωση αρχίζει με την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στην 5'-θέση του σακχάρου, η οποία καταλύεται από ειδικές ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες, προς τη δημιουργία ενός μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (Wagner C. R. *et al*, 2000, Balzarini J., 1993) (Εικόνα 5). Οι μετέπειτα φωσφορυλιώσεις προς τις διφωσφορικές και τριφωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών καταλύονται από νουκλεοτιδικές κινάσες και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντιστοίχως. Η φωσφορυλίωση από ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες όπως επίσης και η χαμηλή ικανότητα διαπερατότητας των φωσφορυλιωμένων νουκλεοζιτών οδηγούν στην συσσώρευση των φαρμακολογικά ενεργών μορφών τους, στα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό. Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, εντοπίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες.

Μιμούμενα τους φυσικούς νουκλεοζίτες, τα αντιικά ανάλογά τους μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τις πολυμεράσες και να ενσωματωθούν στο ιικό γονιδίωμα.

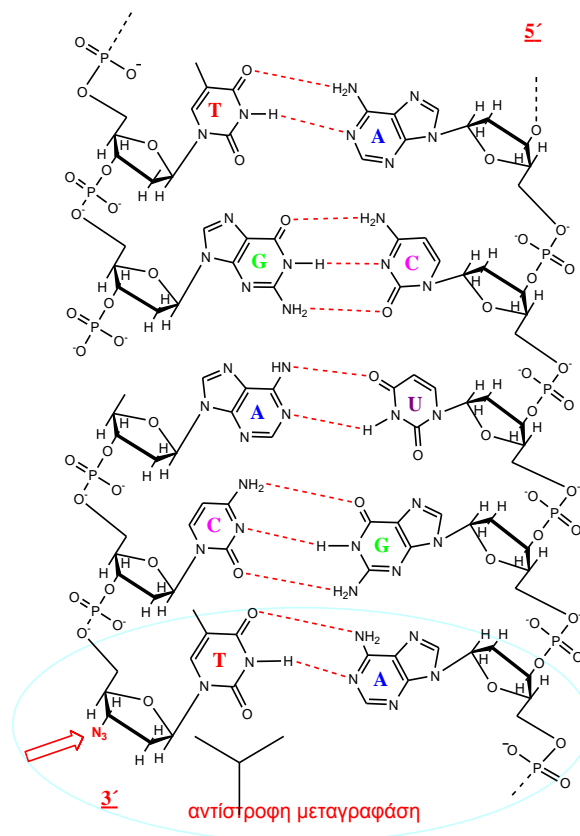


**Εικόνα 5.** Τροποποίηση των νουκλεοζιτικών αναλόγων προς την ενεργή τους μορφή μέσω ενδοκυτταρικής φωσφορυλίωσης.

Η ενσωμάτωσή τους στο ιικό γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει διακοπή της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, να το καταστήσει μη λειτουργικό και κατά συνέπεια να καταστείλει την αντιγραφή του ιού και την περαιτέρω παραγωγή ιικών σωματιδίων. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του γονιδιώματος του ιού είναι συντηρημένος σε πολλά είδη ιών, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να παρουσιάσουν δράση έναντι μεγάλου φάσματος ιών (Chong Y. *et al*, 2002). Αξίζει να σημειωθεί πως μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιική πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητα τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

Ένας κοινός μηχανισμός αντιικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωση των νουκλεοζιτών στην

επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της (Εικόνα 6). Η ένωση των νουκλεοτιδίων καταλύεται από κυτταρικές πολυμεράσες οι οποίες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των σακχάρων (Lewin B., 2003, Burns C. J. *et al*, 2005).



**Εικόνα 6.**

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 V. W. *et al*, 2010, Bhat U. G. *et al*, 2010).

Το σάκχαρο, είναι το τμήμα του νουκλεοζίτη που χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τις κινάσες και τις πολυμεράσες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την επιμήκυνση των αλυσίδων. Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας. 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 M. *et al*, 1969) και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης (Ahn Y. J. *et al*, 2000).

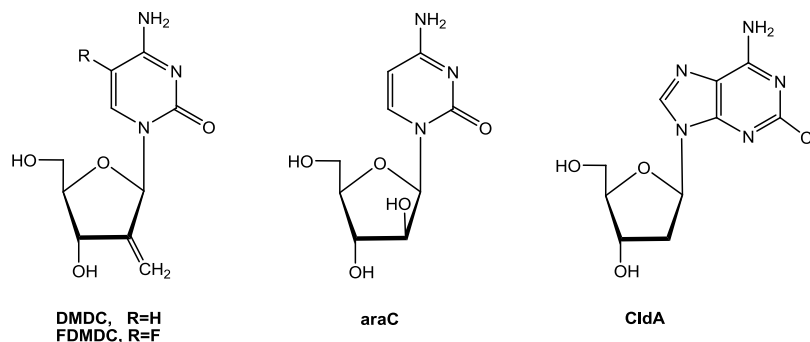
### **1.3 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.**

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σ' έναν υγιή οργανισμό υπόκειται πάντα σε αυστηρές ρυθμίσεις, που επιτρέπουν στα κύτταρα να αυξηθούν, να διαφοροποιηθούν και να λειτουργήσουν αρμονικά. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις ρυθμίσεις αυτές, περιλαμβάνουν ένα σύστημα χημικών μηνυμάτων με τη διαμεσολάβηση, για παράδειγμα, ορμονών και συγκεκριμένων μεμβρανικών υποδοχέων. Τα κύτταρα σε καλλιέργεια, σταματούν την διαίρεσή τους όταν έρθουν σ' επαφή το ένα με το άλλο. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται και η μιτωτική διαίρεση ορισμένων κυττάρων συνεχίζεται ανεξέλεγκτα χωρίς να υπακούει σε περιοριστικούς κανόνες. Τα κύτταρα χάνουν τη διαφοροποιημένη μορφή τους και περνούν σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία όγκων ή καρκινωμάτων.

Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία διαθέτουν αυξημένη δραστικότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το



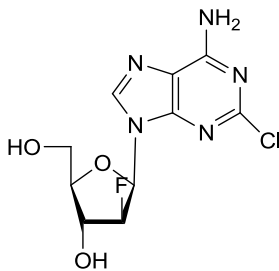
σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Νέες αντικαρκινικές ουσίες, οι οποίες έχουν μελετηθεί εντατικά, είναι οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους. Οι νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύουν στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC), 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πεντοφουρανοζυλο)5-φθοροκυτοσίνη (FDMDC), 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC) και 2-χλωρο-2'-δεσοξαδενοσίνη (CldA) (Εικόνα 7) έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών, όπως διάφοροι τύποι λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Cory A. H. *et al*, 1994, Pontikis R. *et al*, 1997, Yamagami K. *et al*, 1991, Lin T. S. *et al*, 1991, Baker C. H. *et al*, 1991, Matsuda A. and Sasaki T. 2004). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui V. W. *et al*, 2010, Bhat U. G. *et al*, 2010).



**Εικόνα 7.**

Ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο που έχει εγκριθεί για την θεραπεία της αιματολογικής κακοήθειας, της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και πιθανόν άλλων μορφών καρκίνου, όπως η οξεία μυελογενής λευχαιμία είναι το Clofarabine [2-χλωρο -(2'-δεοξυ-φθορο-β-D-αραβινοφουρανοζυλο)αδενίνη]

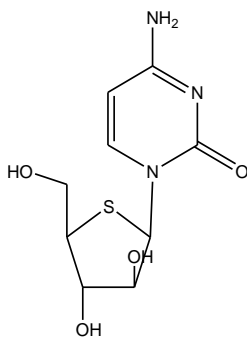
(Faderl S. J. *et al*, 2002, Parker W. B. *et al*, 2004, Faderl S. J. *et al*, 2005, Pui C. H. *et al*, 2005, Secrist J. A., 2005),(Εικόνα 8).



**Clofarabine**

### Εικόνα 8.

Η ένωση 1-(4'-θειο-β-D-αραβινοφουρανοζυλο)κυτοσίνη (Thiarabine, 4'thio-araC) (Tiwari K. N. *et al*, 2000, Waud W. R. *et al*, 2003, Someya H. *et al*, 2003, Secrist J. A., 2005) (Εικόνα 9), μετά το πρώτο στάδιο μελετών, βρέθηκε ότι είναι δραστική έναντι, κακοήθων όγκων, συμπεριλαμβανομένων του παχέος εντέρου, των πνευμόνων, του παγκρέατος, του νεφρού, του προστάτη καθώς και του μαστού.



**Thiarabine 4'thio-araC**

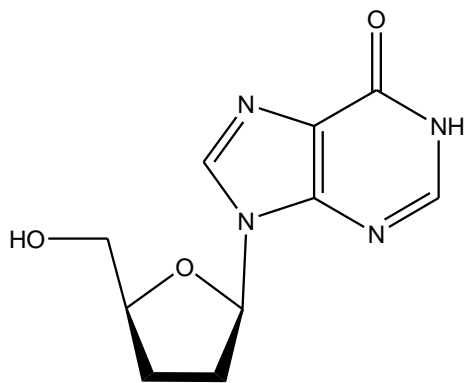
### Εικόνα 9.

Μικρές μεταβολές στη δομή των νουκλεοζιτών μπορούν να έχουν βαθιά επίδραση στις αντικαρκινικές ιδιότητες των ενώσεων αυτών, και έχει υπάρξει εκτενής έρευνα σε ανάλογα νουκλεοζιτών όπως για παράδειγμα η έρευνα χημικών ενώσεων κατά του AIDS, ώστε να παραχθούν ενώσεις με βελτιωμένη δραστικότητα.

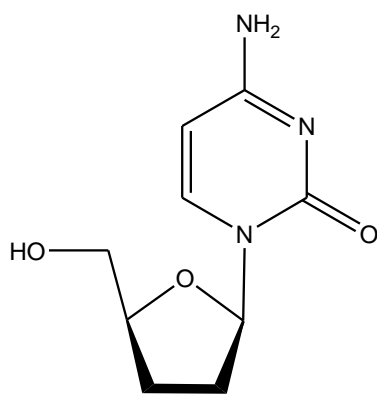
## 1.4 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες

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 αντιικών 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 ιικές πολυμεράσες. Οι αντιικοί νουκλεοζίτες αποτελούν θεμελιώδη λίθο στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τον ιό του απλού έρπητα (HSV), τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλιό (HCMV), τον ιό του έρπη ζωστήρα (VZV), τον ιό της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV) και τον ιό της ηπατίτιδας B (HBV) και C (HCV).

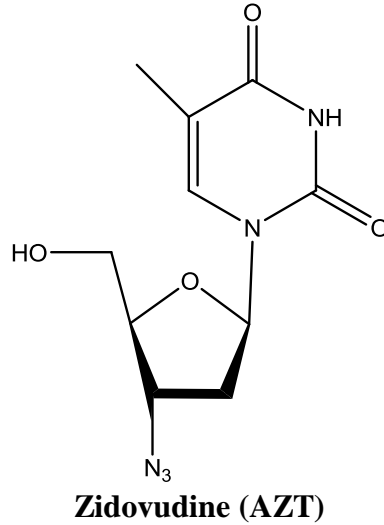
Μερικά χαρακτηριστικά νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα κατά του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) είναι το Zidovudine (AZT) 3'-αζιδο-3'-δεσοξυθυμιδίνη, το Didanosine (DDI) 2'-3' διδεοξυινοσίνη, το Zalcitabine (DDC) 2'-3' διδεοξυκυτιδίνη και το 2'-3' διδεοξυ-3'-θειακυτιδίνη 3TC, που δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού (Εικόνα 10).



**Didanosine (DDI)**

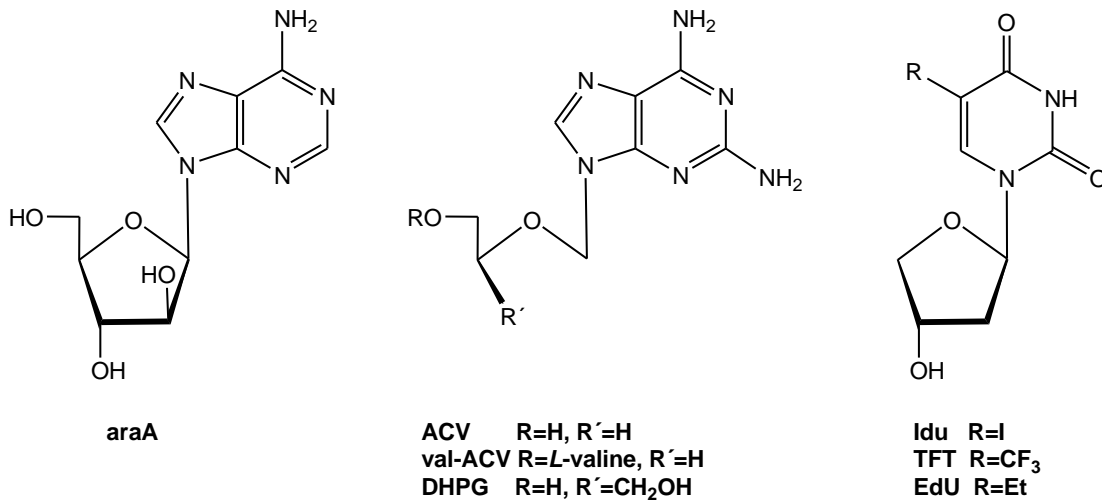


**Zalcitabine (DDC)**



**Εικόνα 10.**

Για τη θεραπεία του κυτταρομεγαλοϊού CMV, του ιού του απλού έρπητα HSV 1 και 2 και του ιού του έρπητα ζωστήρα VZV χρησιμοποιείται πλήθος νουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως Vidarabine (araA), Acyclovir (ACV), Idoxuridine (Idu), Trifluridine (TFT), Acedurid (EdU), Ganciclovir (DHPG) και Valaciclovir (val-ACV) (Gumina G. *et al*, 2001) (Εικόνα 11), τα οποία δρουν ως αναστολείς της DNA πολυμεράσης.

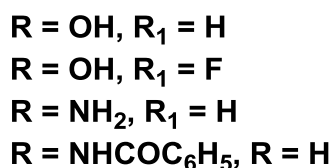
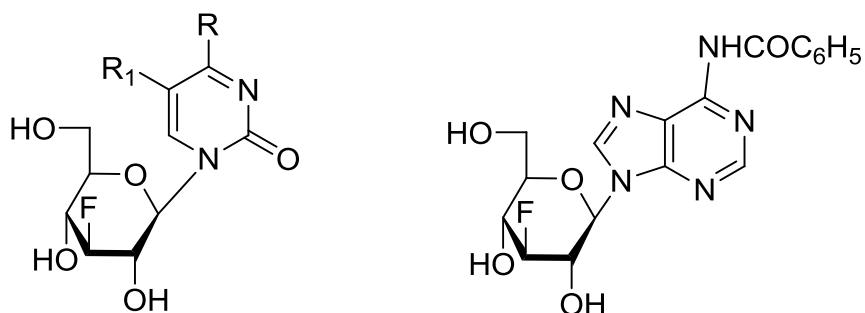


**Εικόνα 11.**

## 1.5 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν κυρίως στη χρήση νουκλεοζιτικών αναλόγων που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη και φέρουν τη β-απεικόνιση. Η σπουδαιότητα των πεντοζών αναγνωρίστηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως συστατικά των νουκλεϊκών οξέων. Όμως, ορισμένα προβλήματα που προέκυψαν από τη χρήση των φουρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως ο ανεπαρκής μεταβολισμός προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, η χημική ή ενζυματική απενεργοποίησή τους, η τοξικότητα, η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και όγκων και τέλος ο μικρός χρόνος ημιζωής και κατά συνέπεια χρόνος δράσης τους, έστρεψαν το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντιικής δράσης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων και ειδικότερα αυτών που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η έρευνα για την ανακάλυψη αντιικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είχε μείνει αρκετά βήματα πίσω σε σχέση με αυτή των βιολογικώς ενεργών νουκλεοζιτών με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίους.

Στο εργαστήριο της Οργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έχουν συντεθεί φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Manta S. *et al*, 2007), οι οποίοι έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν αποτελεσματικά τη δραστικότητα της PARN (poly(A) specific ribonuclease), ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(A) ουράς) (Εικόνα 12). Τα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπες ενώσεις για την ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν την PARN (poly(A) specific ribonuclease (Balatsos N. A. *et al*, 2009).

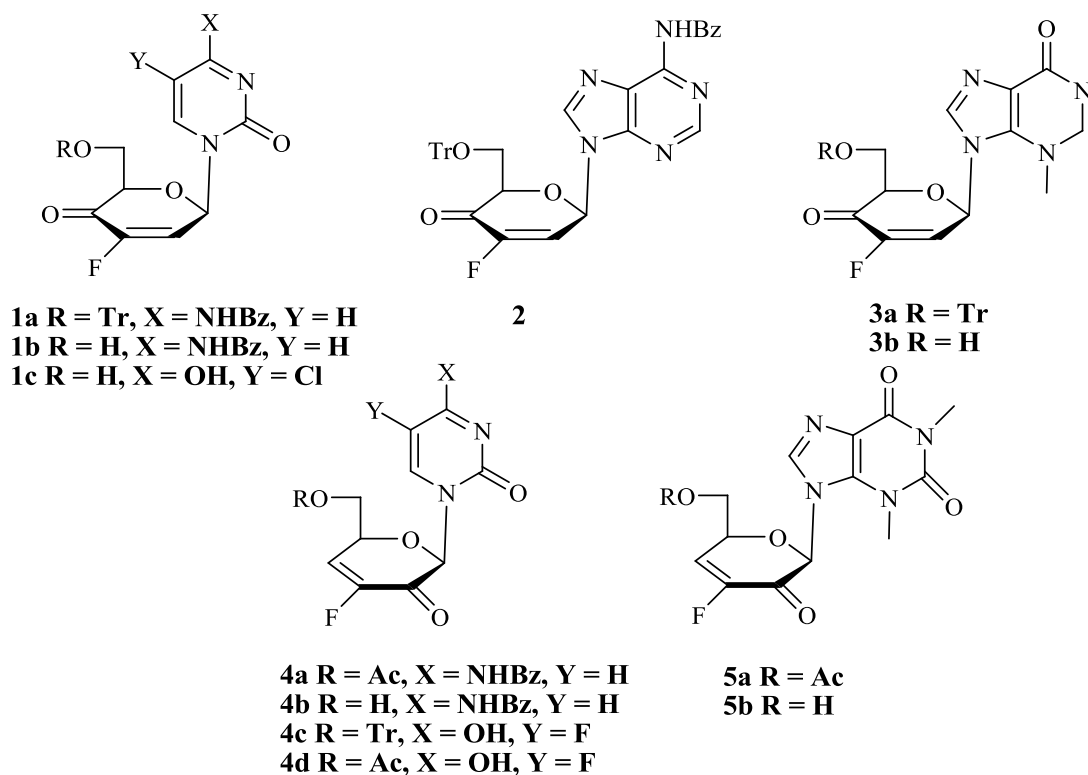


**Εικόνα 12.**

Ακόμη, οι φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες έχουν αξιολογηθεί και ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP), ένζυμο με κεντρικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου και υπεύθυνο για την παραγωγή γλυκόζης στο αίμα (γλυκογενόλυση). Η GP είναι πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται στους μύες και το ήπαρ, ρυθμίζεται αλλοστερικά από φωσφορυλίωση και είναι παρούσα σε δυο μορφές, την GPb (ανενεργός, T-διαμόρφωση) και την GPa (ενεργός, R-διαμόρφωση). Η λεπτομερής ανάλυση των παραγόντων που καθορίζουν τη σύνδεση μικρομοριακών ενώσεων (αναστολέων) στη GP σε μοριακό επίπεδο, παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της ενζυμικής τους δράσης ή και της ανεπιθύμητης αποικοδόμησης γλυκογόνου, στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, όπου η υπεργλυκαιμία αποτελεί σοβαρό ιατρικό πρόβλημα. Συγκεκριμένα, φθοριωμένοι πυριμιδινικοί γλυκοπυρανονουκλεοζίτες καθώς και ένα φθοριωμένο δεοξυ-πυρανονουκλεοζιτικό ανάλογο της *N*<sup>4</sup>-βενζουλόκυτοσίνης αποδείχθηκαν ανταγωνιστικοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του μυϊκού γλυκογόνου (GPb) (Tsirkone V. *et al*, 2010).

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί 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 S. *et al*, 2007) καθώς και άλλοι ανάλογοι πυρανονουκλεοζίτες (Leclercq E. *et al*, 1992, Khan A. R. *et al*, 2001, Ollapally A. P. *et al*, 1999, Egron M. J. *et al*, 2002) έχουν αξιολογηθεί για τις αντιικές και τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες (ενώσεις 1-5, Εικόνα 13). Αξιοσημείωτη είναι η αντιική δράση έναντι του εντεροϊού (rotavirus), που επέδειξαν οι ενώσεις **1a,b**, **2** και **4a,b** (Εικόνα 13).



Εικόνα 13.

## 2.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

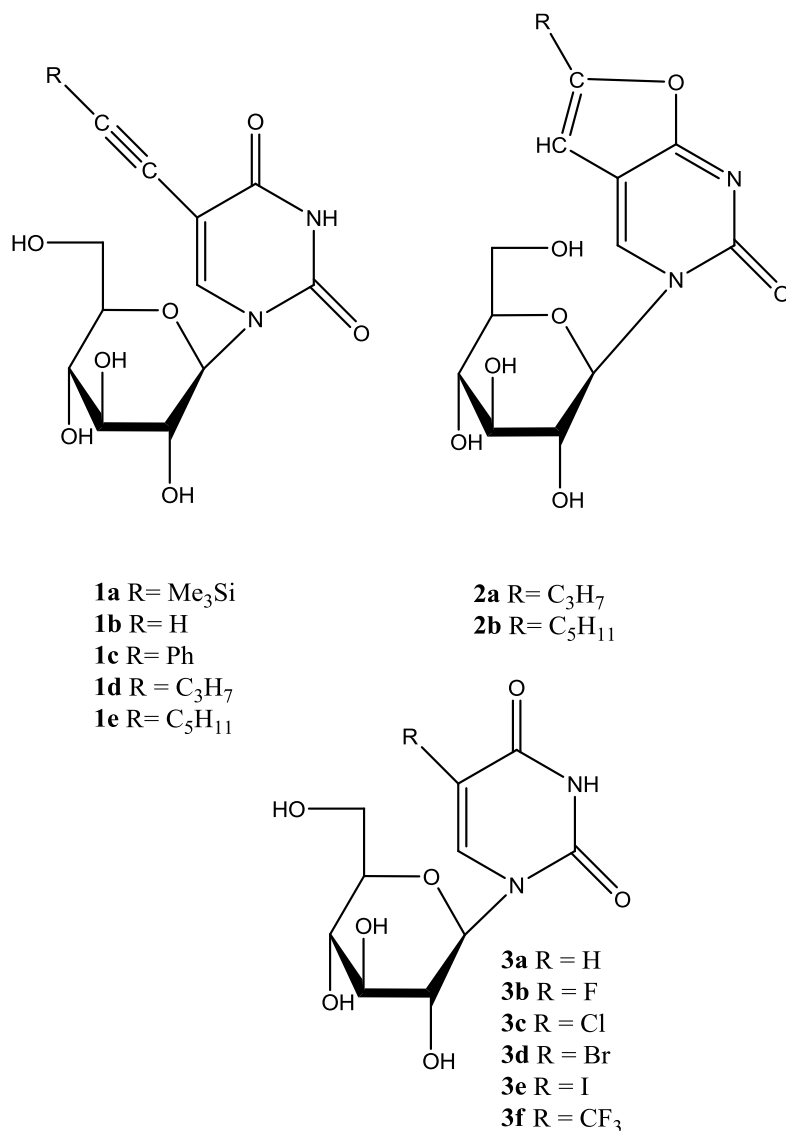
### 2.1 Στόχος-Σκοπός μελέτης

Η ανάγκη για την εύρεση νέων χημειοθεραπευτικών ουσιών, με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές 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.

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 αντιικές και αντικαρκινικές.

Βασιζόμενοι στα ανωτέρω, στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματός μας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των C5-αλογόνο- και C5-αλκύνυλο-γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης, (Εικόνα 14) οι οποίοι αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Επιπλέον οι C5-αλκύνυλο-γλυκοπυρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης, έχουν επιδείξει αξιόλογη ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών και συγκεκριμένα ο νουκλεοζίτης που φέρει φαινολικό δακτύλιο στην 5-θέση της ουρακίλης αποδείχτηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικός έναντι της ανάπτυξης καρκινικών κυτταρικών σειρών L1210, CEM, HeLa σε τιμές IC<sub>50</sub> που κυμαίνονται στα 5-6 μΜ.

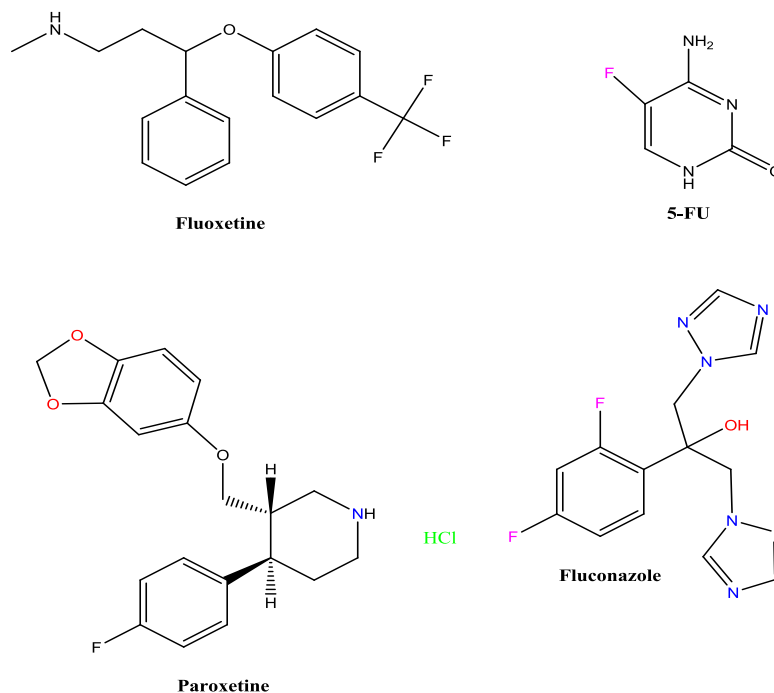




**Εικόνα 14.**

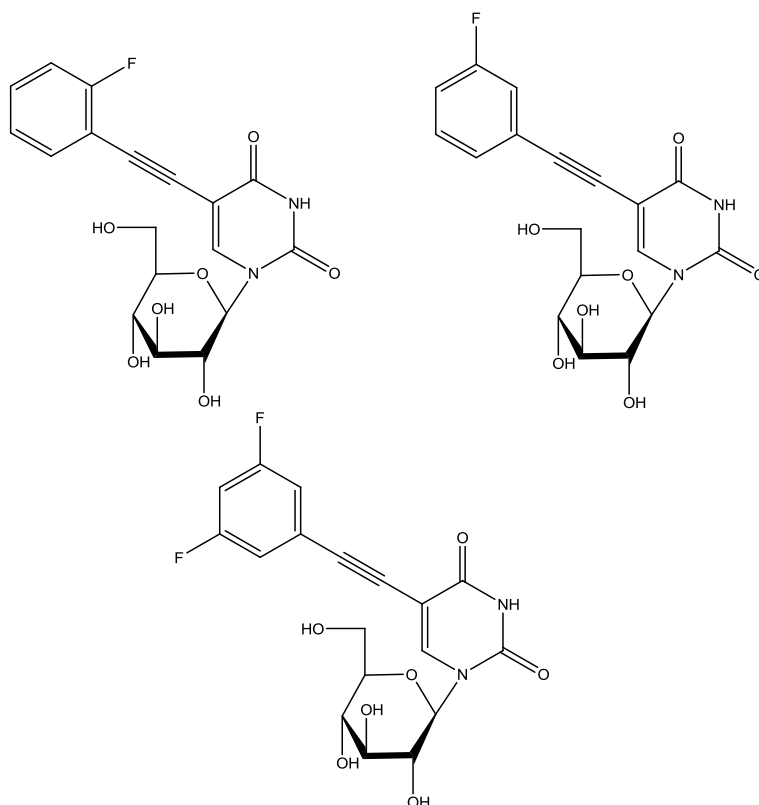
Το φθόριο αποτελεί ένα από τα 92 χημικά στοιχεία που υπάρχουν στη γη και ανήκει στην οικογένεια των αλογόνων, μαζί με το χλώριο, το βρώμιο και το ιώδιο. Το φθόριο είναι εξαιρετικά δραστικό και ενώνεται σχεδόν άμεσα με οποιοδήποτε άλλο χημικό στοιχείο υπάρχει κοντά του. Η προσθήκη φθορίου ή φθοριομένων λειτουργικών ομάδων σε ένα οργανικό μόριο, συνήθως το κάνει λιπόφιλο κι αυτόματα μπορεί να του χαρίσει απο ενδιαφέρουσες μέχρι πολύτιμες ιδιότητες. Όπως είναι η καλύτερη απορρόφηση και κατανομή στους ιστούς ενός οργανισμού όπως επίσης και η άμεση διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού

φραγμού που προστατεύει τον εγκέφαλό μας από πολλά, αλλά αφήνει τα λιπόφιλα μόρια να διέρχονται. Ο δεσμός άνθρακα φθορίου (C-F) είναι πιο δυνατός από το δεσμό άνθρακα υδρογόνου (C-H). Με τον τρόπο αυτό μπορεί να αδρανοποιήσει τα ηπατικά ένζυμα μεταβολισμού, που στη συνέχεια θα δεχτούν την φαρμακευτική ουσία αυξάνοντας μ' αυτόν τον τρόπο την βιοδιαθεσιμότητα της, δηλαδή το ποσοστό του αρχικού μορίου που φτάνει στην κυκλοφορία του αίματος και κατά συνέπεια στα στοχοποιημένα άρρωστα όργανα ώστε να τα θεραπεύσει. Ένας μεγάλος αριθμός φαρμακευτικών προϊόντων περιέχουν αλογόνα, και περισσότερο το φθόριο. Εκτιμάται ότι το 20% των φαρμακευτικών προϊόντων περιέχει φθόριο, περιλαμβάνοντας αρκετά από τα ευρύτερα καταναλωνόμενα φάρμακα. Μερικά παραδείγματα περιλαμβάνουν την [5-φθορουρακίλη](#), τη [φθορεξιτίνη](#) (Prozac), την [παροξετίνη](#) (Paxil), την [κιπροφλαξακίνη](#) (Cipro). (Εικόνα 15) ([http://anamorfosi.uoi.gr/latrikh/edumaterial/11/Synoptikh\\_farmakologia\\_tomos\\_I.pdf](http://anamorfosi.uoi.gr/latrikh/edumaterial/11/Synoptikh_farmakologia_tomos_I.pdf))



**Εικόνα 15.**

Με βάση τις αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες των ανωτέρω ενώσεων, θεωρήσαμε ενδιαφέρουσα την εισαγωγή του φθορίου στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης και συγκεκριμένα στο φαινολικό δακτύλιο, με στόχο την εύρεση νέων αποτελεσματικότερων θεραπευτικών αναλόγων. Συνεπώς, στην παρούσα εργασία περιγράφεται η σύνθεση και η βιολογική αποτίμηση των φθοριωμένων στην ετεροκυκλική βάση γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης. Οι δομές των μορίων που στόχευσε η συνθετική μας πορεία παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 16.**

## 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 Υλικά

#### 3.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων

Για την σύνθεση των νουκλεοζιτικών αναλόγων χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια των παρακάτω εταιριών, των οποίων η καθαρότητα ήταν αναλυτικού βαθμού:

- Οξικός ανυδρίτης ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) (Aldrich, Γερμανία)
- Πυριδίνη (Panreac, Ισπανία)
- Διάλυμα Μεθανόλης ( $\text{MeOH}$ ) (Merck, Γερμανία)
- Hexamethyldisilizane (HMDS) (Aldrich, Γερμανία)
- Trimethylsilyltrifluoromethane ( $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ ) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Υδρίδιο του ασβεστίου ( $\text{CaH}$ ) (Fluca, Γερμανία)
- Ακετονιτρίλιο ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (Merck, Γερμανία)
- Πεντοξείδιο του φωσφόρου ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Merck, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bisulfate ( $\text{NaHSO}_4$ ) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδρο θειικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (Merck, Γερμανία)

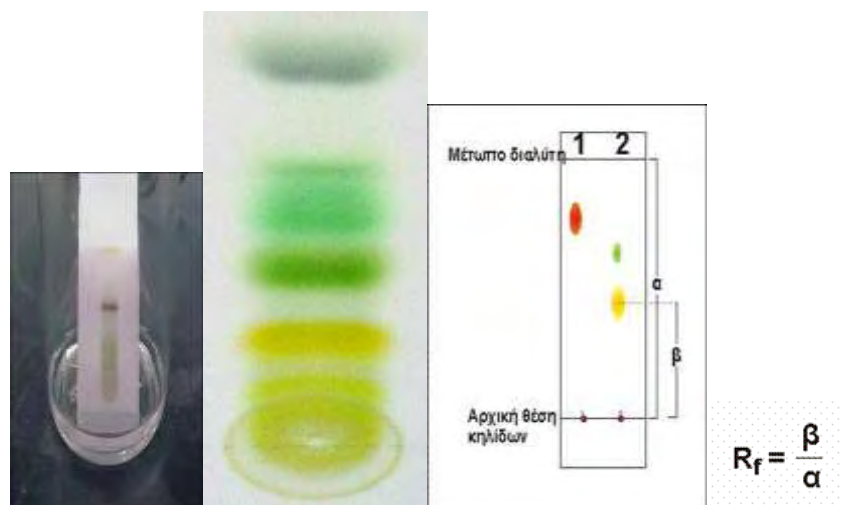
## 3.2 Γενική Μεθοδολογία

### 3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου λεπτής στιβάδας TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F<sub>24</sub>) 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. Ακολουθώς 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<sub>f</sub>, που ορίζεται από το λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη (α). Η τιμή R<sub>f</sub> 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (θειϊκού οξέος) 30%.

Μια χρωματογραφία λεπτής στιβάδας απεικονίζεται στην εικόνα 17.



**Εικόνα 17.**

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

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας / εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας / εξάνιο 60/40
- Διάλυμα Γ : διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 90/10

### 3.2.2 Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί αυτό είναι η χρωματογραφία στήλης και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merck grade).

Η χρωματογραφία στήλης είναι μια τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην προσρόφηση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μια ακίνητη φάση, συνήθως silica gel και την έκλουσή τους με μια ακίνητη φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών. Οι πολικές ουσίες προσροφούνται και κολλούν στην αφετηρία, κορυφή, της στήλης και χρειάζονται πιο πολικό διαλύτη για να

προχωρήσουν. Οι άπολες ουσίες συνήθως προχωρούν ή κατεβαίνουν πιο εύκολα ακόμη και με διαλύτες χαμηλής πολικότητας. Για την έκλουση των ουσιών από το silica gel χρειάζεται να γίνει έκλουση της στήλης με διάφορους διαλύτες αρχίζοντας από τους λιγότερο πολικούς και καταλήγοντας στους περισσότερο πολικούς.

Στη χρωματογραφία στήλης η στατική φάση τοποθετείται σε μια στήλη κατασκευασμένη από αδρανές υλικό ( ύαλος, πηκτική πυριτίας, ανοξειδωτος χάλυβας). Το δείγμα τοποθετείται στην αρχή (κορυφή) της στήλης και η κινητή φάση διέρχεται εξαναγκασμένα μέσω της στατικής φάσης με την εφαρμογή πίεσης σε αυτήν ή λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από την συγγένεια των συστατικών ως προς την στατική φάση (εικόνα 10). Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής :

- Διάλυμα Α: οξικός αιθυλεστέρας/ εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Β: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 60/40
- Διάλυμα Γ: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 70/30
- Διάλυμα Δ: διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 80/20

### 3.2.3 Ξήρανση διαλυτών

Ορισμένες από τις αντιδράσεις που περιγράφονται, επιβάλλουν την χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο  $\text{CH}_3\text{CN}$  και *N,N*-διμέθυλοφορμαμίδιο DMF. Η ξήρανση του  $\text{CH}_3\text{CN}$  γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το DMF φυλάσσεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å.

### 3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

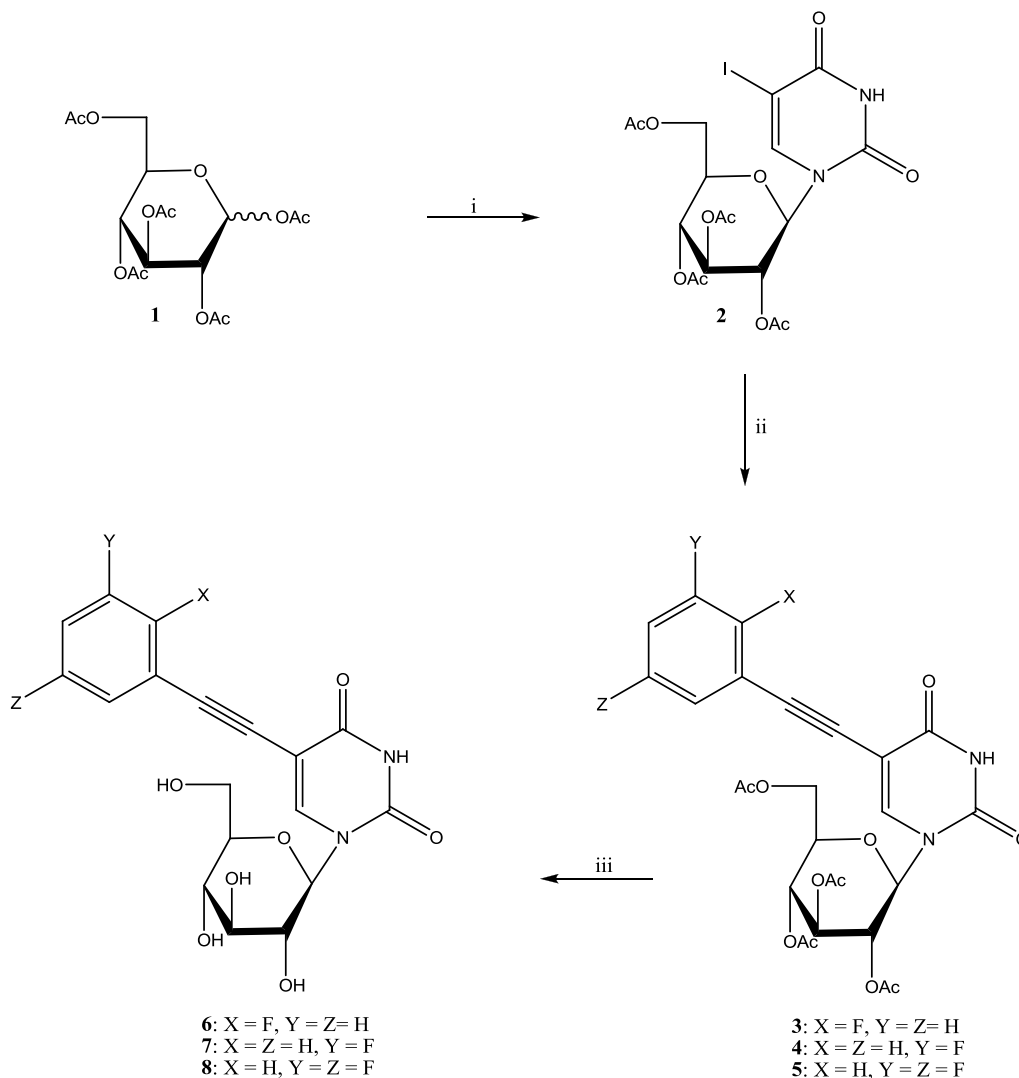
Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR μετρήθηκαν με το φωτόμετρο Bruker 300 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ) και διμεθυλοσουλφοξείδιο ( $\text{DMSO}-d_6$ ). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς. Η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (doublet), dd (doublet doublet), dtr (doublet triplet), m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός NMR, είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο NMR, άλλοι, οι λιγότεροι όχι. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανακλώνται στην ιδιότητα του σπίν. Στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη, για την μελέτη των χημικών, φυσικών και βιολογικών ιδιοτήτων της.



### 3.3 Μέθοδοι

#### 3.3.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού.



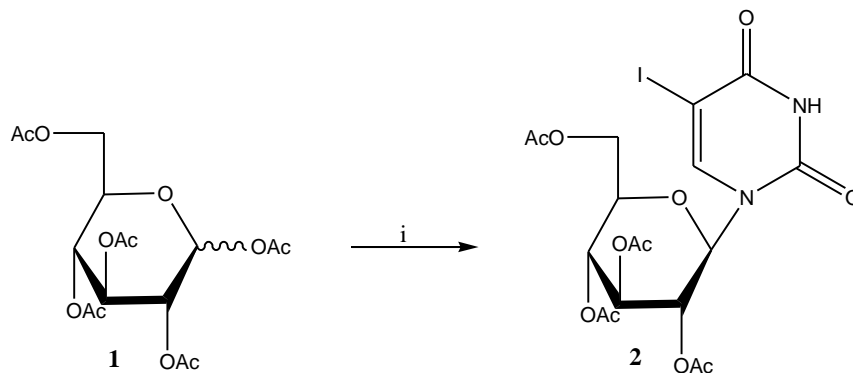
**Εικόνα 18.** Επισκόπηση της σύνθεσης των αλογονο φαινυλο γλυκοπυρανονουκλεοζίτων της ουρακίλης.

**Αντιδραστήρια και συνθήκες:** i) silylated base,  $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , HMDS, Saccharine, MW (200 Watt), 8 min; ii) 1-ethynyl-2 or 3-fluorobenzene or 1-ethynyl-3,5-difluorobenzene,  $\text{CuI}$ ,  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMF, MW, (200 Watt), 7 min; iii) ammonia/MeOH.

### 3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης.

Η πορεία της σύνθεσης ξεκίνησε με την σύζευξη της εμπορικά διαθέσιμης 1,2,3,4,6-πεντακίς-*O*-ακετυλο-*D*-γλυκοπυρανόζης (**1**), με την ετεροκυκλική βάση 5-ιωδοουρακίλη, παρουσία του άνυδρου διαλύτη ακετονιτριλίου (CH<sub>3</sub>CN), εξαμεθυλοδισιλαζάνιου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης και με την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα (Me<sub>3</sub>SiOSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων σε συνθήκες 200 Watt για 8 λεπτά στους 80 °C. Έτσι λήφθηκε ο προστατευμένος νουκλεοζίτης 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (**2**) με ικανοποιητική απόδοση 83%. Στη συνέχεια ο προστατευμένος νουκλεοζίτης 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (**2**) διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF), και με την προσθήκη καταλύτη τετρακίς τρις φαινυλοφωσφορικό παλλαδίο Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, συγκαταλύτη ιωδοχαλκό (CuI), της βάσης τριαιθυλαμίνης (Et<sub>3</sub>N) και του 1-αιθύνυλο-2 ή 3-φθοροβενζολίου και 1-αιθύνυλο-3,5-διφθοροβενζολίου πραγματοποιήθηκε η σύζευξη τους υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων σε συνθήκες 200 Watt για 7 λεπτά στους 40 °C λαμβάνοντας τους προστατευμένους νουκλεοζίτες 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(2 ή -3-φθοροβενζολίου) της ουρακίλης **3**, **4** και 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(3,5-διφθοροβενζολίου) της ουρακίλης **5** με απόδοση 65%, 62% και 60% αντίστοιχα. Το τελευταίο βήμα της πορείας αυτής είναι η αποπροστασία των ενώσεων **3**, **4** και **5** με κορεσμένο διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας, η οποία οδήγησε στην λήψη των αποπροστατευμένων 1-(β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-φθοροβενζολίου νουκλεοζιτών της ουρακίλης **6**, **7** και **8** με απόδοση 65%–68%.

### 3.3.3 Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοκυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (**2**).

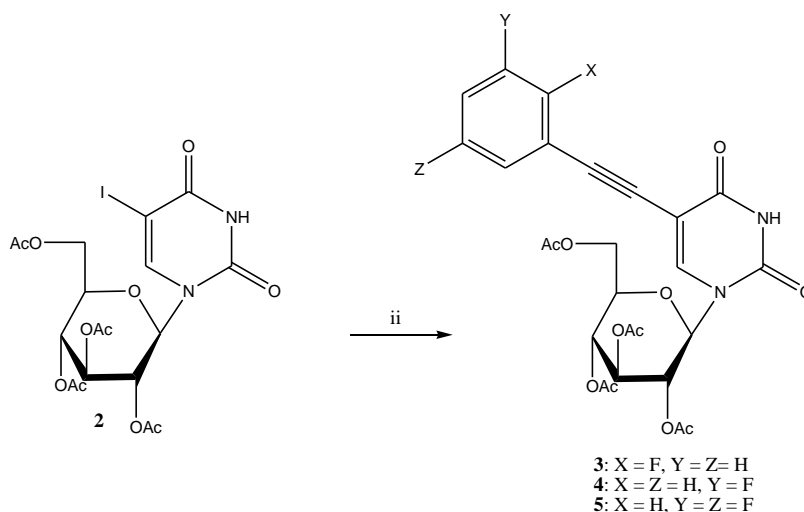


Η σύνθεση του **2** επιτεύχθηκε με τη μέθοδο των μικροκυμάτων ως εξής. Σε γυάλινο φιαλίδιο των 10 ml διαλύονται σε 7 ml άνυδρου διαλύτη ακετονιτρίλιο ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), η 1,2,3,4,6-πεντακίς-*O*-ακετυλο-*D*-γλυκοκυρανόζη (**1**, 500 mg, 1.28 mmol), η 5-ιωδοουρακίλη (1.66 mmol), το εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS 2.06 mmol), η σακχαρίνη (0.08 mmol) και μετά την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα ( $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ , 1.80 mmol) ακτινοβολούνται σε συνθήκες 200 Watt για 7 λεπτά στους 80 °C. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 1). Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου  $\text{NaHCO}_3$  και αραιώθηκε με διχλωρομεθάνιο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (250ml). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα B (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 6:4). Το επιθυμητό προϊόν (**2**) ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος με ικανοποιητική απόδοση 83%.

TLC(Διάλυμα Β)	R <sub>f</sub> = 0.18
Απόδοση	83%
[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup>	-3.0 c = 0.11
λ <sub>max</sub>	270 nm

**Πίνακας 1.** Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (2).

**3.3.4 Σύνθεση των 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5 -[(-2 ή -3-φθοροφαινυλο) αιθυνυλο] νουκλεοζίτες της ουρακίλης (3), (4) και 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-[(-3,5-διφθοροφαινυλο)αιθυνυλο] ουρακίλη (5).**



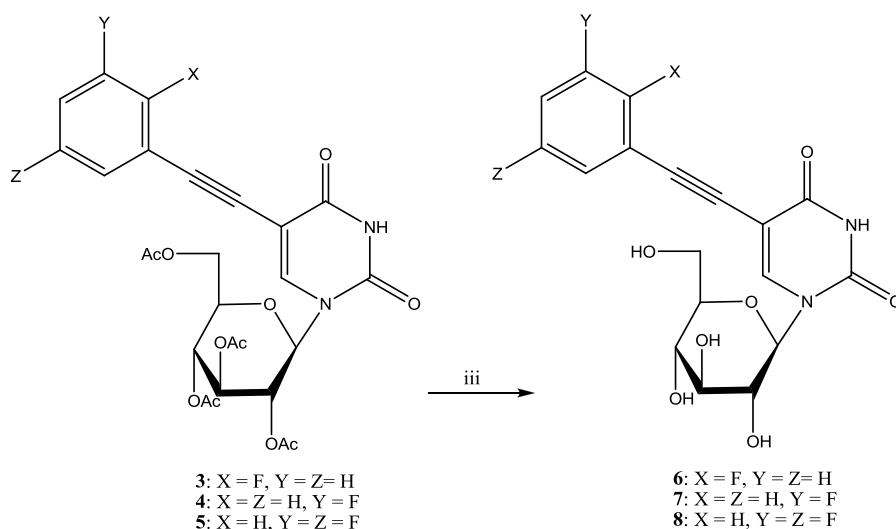
Η σύνθεση του **3**, **4** και **5** επιτεύχθηκε με τη μέθοδο των μικροκυμάτων ως εξής. Σε γυάλινο φιαλίδιο των 10 ml διαλύονται σε 2 ml άνυδρου διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF), 0.35 mmol (200 mg) της 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλης (**2**), 1.05 mmol του

κατάλληλου τελικού αλκινίου, 0.035 mmol Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 0.035 mmol CuI, 0.70 mmol Et<sub>3</sub>N και εν συνεχεία ακτινοβολούνται σε συνθήκες 200 Watt, για 7 λεπτά στους 50 °C. Η επεξεργασία που ακολουθείται για την παραλαβή του προϊόντος περιλαμβάνει καθαρισμό του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης τα διαλύματα: Α (οξικός αιθυλεστέρας/Εξάνιο 5:5) και Γ (οξικός αιθυλεστέρας/Εξάνιο 7:3). Τα επιθυμητά προϊόντα (**3**, **4** και **5**) ελήφθησαν υπό τη μορφή αφρώδους στερεού κίτρινου χρώματος με απόδοση 78%, 94% και 65% αντίστοιχα.

	Προϊόν <b>3</b>	Προϊόν <b>4</b>	Προϊόν <b>5</b>
TLC	R <sub>f</sub> = 0.19 (Διάλυμα Β)	R <sub>f</sub> = 0.45 (Διάλυμα Γ)	R <sub>f</sub> = 0.42 (Διάλυμα Α)
Απόδοση	78%	94%	65%
[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup>	-2.0 c = 0.13	-4.0 c = 0.16	-6.0 c = 0.25
λ <sub>max</sub>	306 nm	306 nm	306 nm

**Πίνακας 2.** Αποτελέσματα σύνθεσης των 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-5-[-(2 ή -3-φθοροφαίνυλο ή -3,5- διφθοροφαίνυλο)αιθυνο] νουκλεοζίτες της ουρακίλης **3**, **4** και **5**.

### 3.3.5 Σύνθεση των 1-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-5-[2-ή -3- ή -5-φθοροφαινυλο]αιθύνυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης 6,7,8.

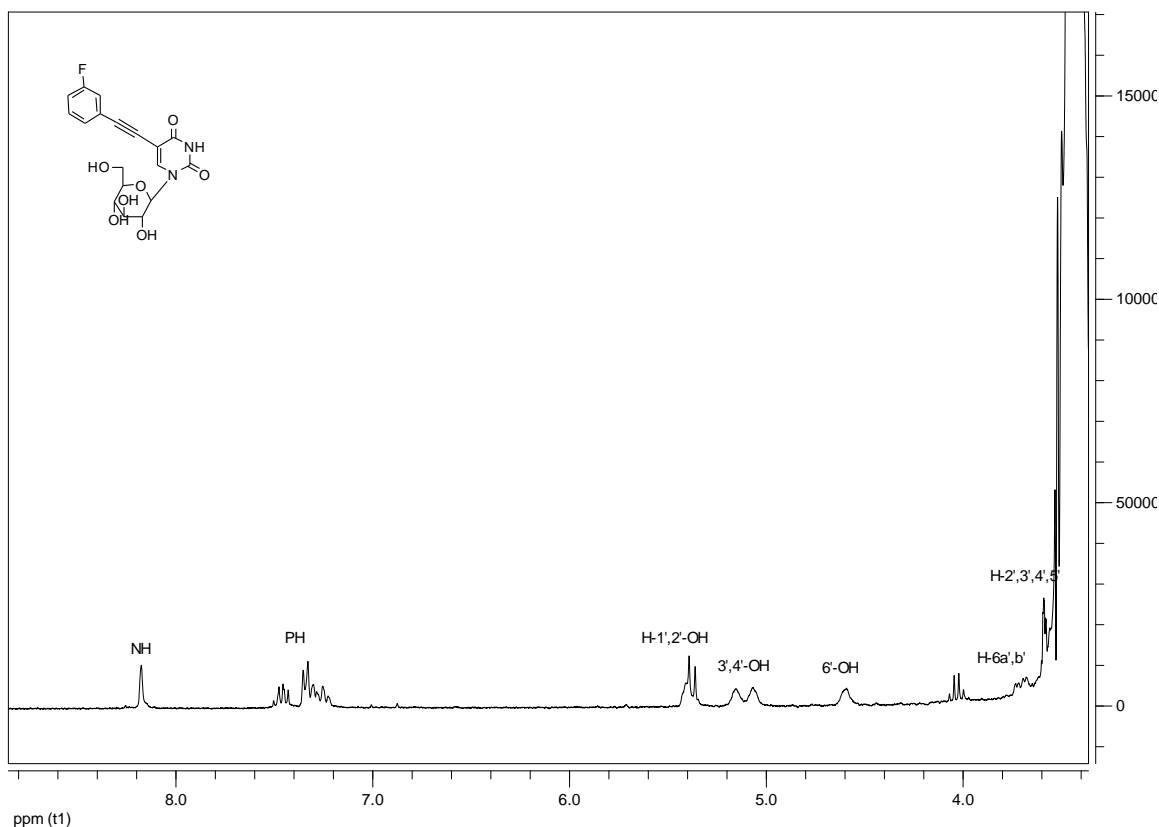


Διάλυμα των προστατευμένων νουκλεοζιτών **3**, **4** και **5** (0.15 mmol) σε μεθανολική αμμωνία αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 12h ώρες. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες καθαρίζονται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Γ (διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη 9:1), οπότε παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα **6**, **7** και **8** με απόδοση 60%, 70% και 78% αντίστοιχα, με μορφή ελαίου κίτρινου χρώματος.

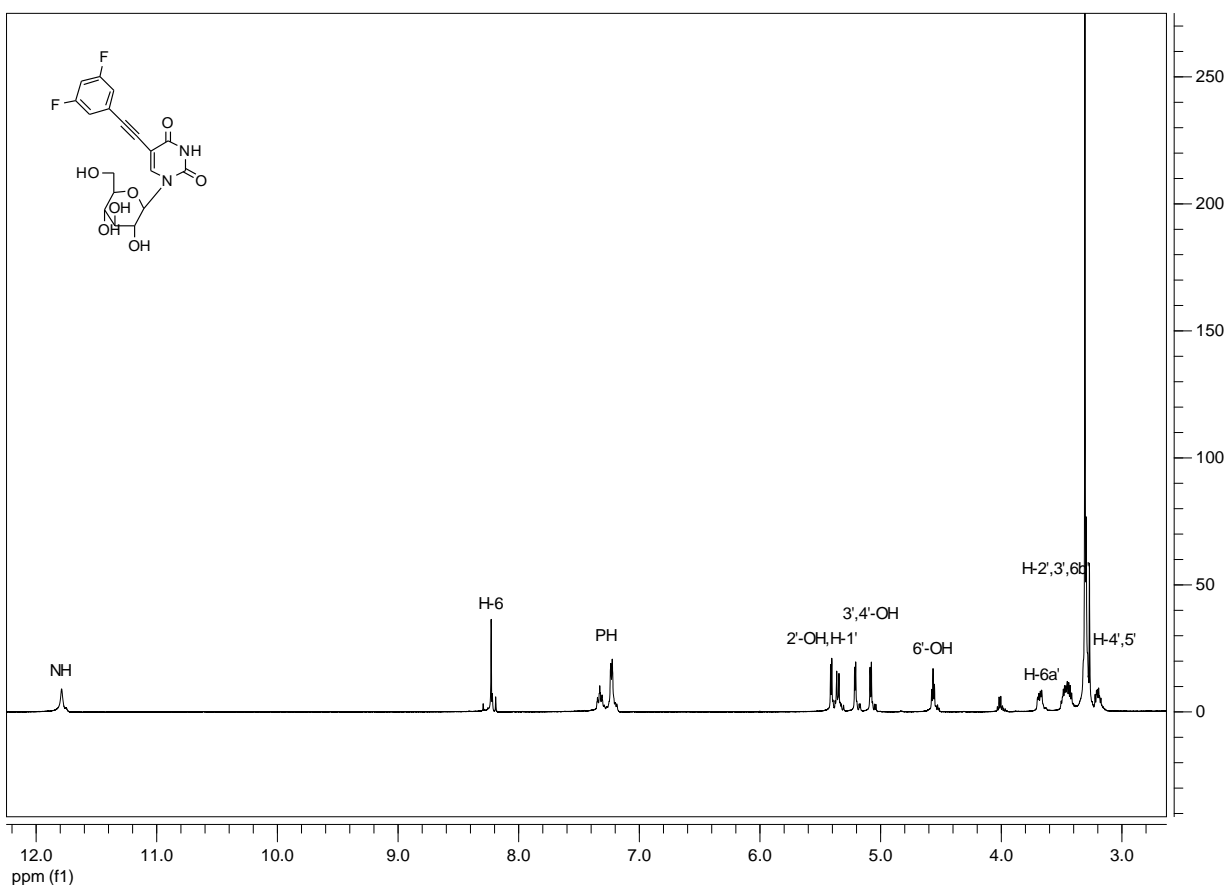
	Προϊόν 6	Προϊόν 7	Προϊόν 8
TLC	R <sub>f</sub> = 0.50 (Διάλυμα Δ)	R <sub>f</sub> = 0.34 (Διάλυμα Δ)	R <sub>f</sub> = 0.38 (Διάλυμα Δ)
Απόδοση	60%	70%	78%
[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup>	-3.0 c = 0.13	-5.0 c = 0.26	-7.0 c = 0.17
λ <sub>max</sub>	306 nm	306 nm	307 nm

**Πίνακας 3.** Αποτελέσματα σύνθεσης των των 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-[-2-ή -3- ή -5-φθοροφαινυλο]αιθύνυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης **6,7,8**.

## 4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ <sup>1</sup>H NMR



**Εικόνα 19.** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR του τελικού προϊόντος **7**.



**Εικόνα 20.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του τελικού προϊόντος **8**.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προέκυψε από τις προσπάθειες των ερευνητών για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως κακοήθεις νεοπλασίες και ιικές μολύνσεις. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων, που 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 γλυκοπυρανονουκλεοζιτών με τροποποίηση στο τμήμα της βάσης με



πιθανή αντικαρκινική και αντιική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, ταχεία, έχοντας πραγματοποιήσει σύντομα βήματα. Η αντίδραση Sonogashira επιτεύχθηκε με την χρήση μικροκυμάτων, η οποία αποτελεί “πράσινη” τεχνική και υπερέχει σε σχέση με τη συμβατική θέρμανση στα εξής βασικά σημεία:

1. Προσφέρει ομοιόμορφη θέρμανση σε όλο το μίγμα της αντίδρασης.
2. Αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα της αντίδρασης.
3. Ελαττώνει τον σχηματισμό παραπροϊόντων.
4. Παρέχει αυξημένες αποδόσεις.

Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος  $IC_{50}$ , η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%.

ΠΡΟΪΟΝ	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )		
	L1210	CEM	HeLa
<b>6</b>	160 $\pm$ 0.4	128 $\pm$ 0.0	89 $\pm$ 0.0
<b>7</b>	>250	>250	>250
<b>8</b>	>250	>250	>250

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα η 1-( $\beta$ -D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-[-2-φθοροφαινυλο]αιθύνυλο ουρακίλη **6** παρουσίασε ανασταλτική δράση έναντι όλων των καρκινικών σειρών με καλύτερη αυτή έναντι των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) της τάξεως  $\sim 89 \mu M$ . Αντίθετα η 1-( $\beta$ -D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-[-3-φθοροφαινυλο]αιθύνυλο ουρακίλη **7** και η 1-( $\beta$ -D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-[-5-φθοροφαινυλο]αιθύνυλο ουρακίλη **8** δεν εμφάνισαν αξιοσημείωτη δράση.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Berg, J. M.; Tymoczko J. L., Stryer L. **Βιοχημεία** (Τόμος Ι) **2001**. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (p) 329-351.
2. Zhou W., Gumina G., Chong Y., Wang J., Schinazi R. F., Chu C. K. **Synthesis, structure-activity relationships, and drug resistance of beta-d-3'-fluoro-2',3'-unsaturated nucleosides as anti-HIV Agents.** [J Med Chem.](#) **2004**, 47, 3399-408
3. 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. **[1-\(3-Deoxy-3-fluoro-beta-d-glucopyranosyl\) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies.](#)** *Bioorg Med Chem.* **2010**, 38, 3413-25.
4. [Lui V. W.](#), [Lau C. P.](#), [Cheung C. S.](#), [Ho K.](#), [Ng M. H.](#), [Cheng S. H.](#), [Hong B.](#), [Tsao S. W.](#), [Tsang C. M.](#), [Lei K. I.](#), [Yamasaki Y.](#), [Mita A.](#), [Chan A. T.](#) **An RNA-directed nucleoside anti-metabolite, 1-(3-C-ethynyl-beta-d-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd), elicits antitumor effect via TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) downregulation.** *Biochem Pharmacol.* **2010**, 79, 1772-80.
5. [Somsák L.](#), [Czifrák K.](#), [Tóth M.](#), [Bokor E.](#), [Chrysina E. D.](#), [Alexacou K. M.](#), [Hayes J. M.](#), [Tiraidis C.](#), [Lazoura E.](#), [Leonidas D. D.](#), [Zographos S. E.](#), [Oikonomakos N. G.](#) **New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents.** [Curr Med Chem.](#) **2008**, 15, 2933-83.
6. Arnér E. S. J., Eriksson S. **Mammalian deoxyribonucleoside kinases.** *Pharmacol Ther.* **1995**; 67, 155-86.

7. [Wagner C. R.](#), [Iyer V. V.](#), [McIntee E. J.](#) **Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides.** [Med Res Rev.](#) **2000**, 20, 417-51.
  
8. Balzarini J., Thormar H., Holy A., Jindrich J., Rosenberg I., Debyser Z., Desmyter J., De Clercq E. **Inhibition of visna virus replication by 2',3'-dideoxynucleosides and acyclic nucleoside phosphonate analogs.** [Antimicrob Agents Chemother.](#) **1993**, 37, 2540-4.
  
9. [Chong Y.](#), [Choo H.](#), [Choi Y.](#), [Mathew J.](#), [Schinazi R. F.](#), [Chu C. K.](#) **Stereoselective synthesis and antiviral activity of D-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-2'-fluoro-4'-thionucleosides.** [J Med Chem.](#) **2002**, 45, 4888-98.
  
10. Lewin B. *Genes* **2003**, VIII, 6.
  
11. [Burns C. J.](#), [Milne H. M.](#), [Squires P. E.](#), [Evans N. D.](#), [Pickup J.](#), [Jones P. M.](#), [Persaud S. J.](#) **Uncoupling of nutrient metabolism from insulin secretion by overexpression of cytosolic phospholipase A(2).** [Diabetes.](#) **2005**, 54, 116-24.
  
12. Lui V. W., Lau C. P., Cheung C. S., Ho K., NG M. H., Cheng S. H., Hong B., Tsao S. W., Tsang C. M., Lei K. I., Yamasaki Y., Mita A., Chan A. T. **An RNA-directed nucleoside anti-metabolite, 1-(3-C-ethynyl-beta-d-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd), elicits antitumor effect via TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) downregulation.** [Biochem Pharmacol.](#) **2010**, 79, 1772-80.

13. Bhat U. G., Pandit B., Gartel A. L. **ARC synergizes with ABT-737 to induce apoptosis in human cancer cells.** [Mol Cancer Ther.](#) 2010, 9, 1688-96.
14. Siev M., Weinberg R., Penman S. **The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in HeLa cells by cordycepin.** [J Cell Biol.](#) 1969, 41, 510-20
15. Ahn Y. J., Park S. J., Lee S. G., Shin S. C., Choi D. H. **Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of Cordyceps militaris against Clostridium spp.** [J Agric Food Chem.](#) 2000, 48, 2744-8.
16. Cory A. H., Cory J. G. **Use of nucleoside kinase-deficient mouse leukemia L1210 cell lines to determine metabolic routes of activation of antitumor nucleoside analogs.** [Adv Enzyme Regul.](#) 1994, 34:1-12
17. [Pontikis R.](#), [Benhida R.](#), [Aubertin A. M.](#), [Grierson D. S.](#), [Monneret C.](#) **Synthesis and anti-HIV activity of novel N-1 side chain-modified analogs of 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT).** [J Med Chem.](#) 1997, 40, 1845-54.
18. [Yamagami K.](#), [Fujii A.](#), [Arita M.](#), [Okumoto T.](#), [Sakata S.](#), [Matsuda A.](#), [Ueda T.](#), [Sasaki T.](#) **Antitumor activity of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine, a new 2'-deoxycytidine derivative.** [Cancer Res.](#) 1991, 51, 2319-23.
19. Lin T. S , [Luo M. Z.](#), [Liu M. C.](#), [Clarke-Katzenburg R. H.](#), [Cheng Y. C.](#), [Prusoff W. H.](#), [Mancini W. R.](#), [Birnbaum G. I.](#), [Gabe E. J.](#), [Giziewicz J.](#) **Synthesis and anticancer and antiviral activities of various 2'- and 3'-methylidene-substituted nucleoside analogues and crystal structure of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine hydrochloride.** [J Med Chem.](#) 1991, 34, 2607-15.

20. [Baker C. H.](#), [Banzon J.](#), [Bollinger J. M.](#), [Stubbe J.](#), [Samano V.](#), [Robins M. J.](#), [Lippert B.](#), [Jarvi E.](#), [Resvick R.](#) **2'-Deoxy-2'-methylenecytidine and 2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine 5'-diphosphates: potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase.** [J Med Chem.](#) **1991**, 34, 1879-84.
21. [Matsuda A.](#), [Sasaki T.](#) **Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides.** [Cancer Sci.](#) **2004**, 95, 105-11
22. [Faderl S.](#), [Gandhi V.](#), [Kantarjian H.](#), [Plunkett W.](#) **New nucleoside analogues in clinical development.** [Cancer Chemother Biol Response Modif.](#) **2002**, 20, 37-58.
23. [Parker W. B.](#), [Secrist J. A.](#), [Waud W. R.](#) **Purine nucleoside antimetabolites in development for the treatment of cancer.** [Curr Opin Investig Drugs.](#) **2004**, 5, 592-6.
24. Pui [C. H.](#), [Jeha S.](#) **Clofarabine.** [Nat Rev Drug Discov.](#) **2005**, 12-3.
25. Secrist J. A. **Nucleosides as anticancer agents: from concept to the clinic.** [Nucleic Acids Symp.](#) **2005**, 49, 15-6
26. [Tiwari K. N.](#), [Shortnacy-Fowler A. T.](#), [Cappellacci L.](#), [Waud W. R.](#), [Parker W. B.](#), [Montgomery J. A.](#), [Secrist J. A.](#) **Synthesis and structure activity relationships of 5-substituted-4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosines.** [Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.](#) **2000**, 19, 2005-17.
27. [Waud W. R.](#), [Gilbert K. S.](#), [Shepherd R. V.](#), [Montgomery J. A.](#), [Secrist J. A.](#) **Preclinical antitumor activity of 4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosine (4'-thio-ara-C).** [Cancer Chemother Pharmacol.](#) **2003**, 51, 422-6

28. [Someya H.](#), [Shaddix S. C.](#), [Tiwari K. N.](#), [Secrist J. A.](#), [Parker W. B.](#) **Phosphorylation of 4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosine and its analogs by human deoxycytidine kinase.** [J Pharmacol Exp Ther.](#) **2003**, 304, 1314-22.
29. [Komiotis D.](#), [Tsoukala E.](#), [Manta S.](#), [Tzioumaki N.](#), [Agelis G.](#) **Concise synthesis of 3-fluoro-5-thio-xylo- and glucopyranoses, useful precursors towards their corresponding pyranonucleoside derivatives.** [Carbohydr Res.](#) **2008**, 343, 1099-103.
30. [Gumina G.](#), [Song G. Y.](#), [Chu C. K.](#) **L-Nucleosides as chemotherapeutic agents.** [FEMS Microbiol Lett.](#) **2001**, 202, 9-15.
31. [Manta S.](#), [Agelis G.](#), [Botić T.](#), [Cencic A.](#), [Komiotis D.](#) **Fluoro-ketopyranosyl nucleosides: synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-2-keto-beta-D-glucopyranosyl derivatives of N4-benzoyl cytosine.** [Bioorg Med Chem.](#) **2007**, 15, 980-7
32. Balatsos N. A., Vlachakis D., Maragozidis P., Manta S., Anastasakis D., Kyritsis A., Vlassi M., Komiotis D., Stathopoulos C. **Competitive inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides.** [Biochemistry.](#) **2009**, 48, 6044-51.
33. [Leclercq F.](#), [Egron M. J.](#), [Antonakis K.](#), [Bennani-Baiti M. I.](#), [Frayssinet C.](#) **Synthesis and biological activity of a fluorketonulceoside: 7-(3-deoxy-3-fluoro-beta-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose) theophylline.** [Carbohydr Res.](#) **1992**, 228, 95-102.
34. Khan A. R., [Mulligan K. X.](#), [Ollapally A. P.](#) **Synthesis of 5-chloro-1-(2,3-dideoxy-3-fluoro-beta-D-glycero-hex-2-enopyranose-4-ulosyl)uracil as**

**potential anticancer/antiviral agent.** [Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.](#) **2001**, 20, 759-62.

35. Ollapally A. P., Bennouna-Dorange I., Whitaker T. L. **5-Fluoro-1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-6-O-trityl-beta-D-glycero-hex-3-eno- pyranos-2-ulosyl (uracil): anticancer agent.** [Nucleosides Nucleotides.](#) **1999**, 18, 703-5.

36. Egron M. J., Dorange B. I., Antonakis K., Herscovici J., Ollapally A. P. **Unsaturated fluoroketonucleosides as anticancer agents: the synthesis and biological activity of 5-fluoro-1-(3,4-di-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-beta-d-glycero-hex-3-eno-pyranos-2- ulosyl) uracil.** [Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.](#) **2002**, 21, 327-34

37. Agelis G., Tzioumaki N., Botić T., Cencic A., Komiotis D. **Exomethylene pyranonucleosides: efficient synthesis and biological evaluation of 1-(2,3,4-trideoxy-2-methylene-beta-d-glycero-hex-3-enopyranosyl)thymine.** [Bioorg Med Chem.](#) **2007**, 15, 5448-56.

38. Komiotis D., [Delatre S.](#), [Holt L.](#), [Ollapally A. P.](#), [Balzarini J.](#) **Biologically Important Nucleosides: A General Method for the Synthesis of Unsaturated Ketonucleosides of Uracil and its Analogs.** *Nucleosides and Nucleotides.* **1991**, 10, 431-455.

39. Paterson J., Uriel C., Egron M. J., Herscovici J., Antonakis K., Alaoui-Jamali M. A. **Antiproliferative and apoptotic activities of ketonucleosides and keto-C-glycosides against non-small-cell lung cancer cells with intrinsic drug resistance.** [Antimicrob Agents Chemother.](#) **1998**, 42, 779-84.

40. [Kodama E.I.](#), [Kohgo S.](#), [Kitano K.](#), [Machida H.](#), [Gatanaga H.](#), [Shigeta S.](#), [Matsuoka M.](#), [Ohruji H.](#), [Mitsuya H.](#) **4'-Ethylnyl nucleoside analogs: potent**

**inhibitors of multidrug-resistant human immunodeficiency virus variants in vitro.** *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**, 45, 1539-46.

41. Minakawa N., [Matsuda A.](#) **Mechanism-based design of inosine 5-monophosphate dehydrogenase inhibitors: synthesis and biological activities of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives.** *Curr Med Chem.* **1999**, 6, 615-28.

42. De Clercq E. **New developments in anti-HIV chemotherapy.** *Biochim Biophys Acta.* **2002**, 1587, 258-75.

43. [Minakawa N.](#), [Takeda T.](#), [Sasaki T.](#), [Matsuda A.](#), [Ueda T.](#) **Synthesis and antitumor activity of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives.** *J Med Chem.* **1991**, 34, 778-86

44. Matsuda A. **Design of a new antitumor nucleoside CNDAC, against solid tumors.** *Gan To Kagaku Ryoho.* **1996**, 23, 202-10

45. [Hattori H.](#), [Nozawa E.](#), [Iino T.](#), [Yoshimura Y.](#), [Shuto S.](#), [Shimamoto Y.](#), [Nomura M.](#), [Fukushima M.](#), [Tanaka M.](#), [Sasaki T.](#), [Matsuda A.](#) **Nucleosides and nucleotides. 175. Structural requirements of the sugar moiety for the antitumor activities of new nucleoside antimetabolites, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine and -uracil1.** *J Med Chem.* **1998**, 41, 2892-902.

46. [Kohgo S.](#), [Yamada K.](#), [Kitano K.](#), [Sakata S.](#), [Hayakawa H.](#), [Nameki D.](#), [Kodama E.](#), [Matsuoka M.](#), [Mitsuya H.](#), [Ohruji H.](#) **Synthesis of 4'-C-ethynyl and**



**4'-C-cyano purine nucleosides from natural nucleosides and their anti-HIV activity.** [Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids](#). 2003, 22, 887-9.

47. Hattori H., Tanaka M., Fukushima M., Sasaki T., Matsuda A. **Nucleosides and nucleotides. 158. 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)-cytosine, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)uracil, and their nucleobase analogues as new potential multifunctional antitumor nucleosides with a broad spectrum of activity.** [J Med Chem](#). 1996, 39, 5005-11.

48. [Agelis G.](#), [Tzioumaki N.](#), [Tselios T.](#), [Botić T.](#), [Cencic A.](#), [Komiotis D.](#) **Synthesis and molecular modelling of unsaturated exomethylene pyranonucleoside analogues with antitumor and antiviral activities.** [Eur J Med Chem](#). 2008, 43, 1366-75.

49. [Nomura M.](#), [Shuto S.](#), [Matsuda A.](#) **Synthesis of the cyclic and acyclic acetal derivatives of 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine, a potent antitumor nucleoside. Design of prodrugs to be selectively activated in tumor tissues via the bio-reduction-hydrolysis mechanism.** [Bioorg Med Chem](#). 2003, 11, 2453-61.

50. O-Yang H. Y., Wu E. B., Fraser-Smith, KAM Walker. **[Nucleosides and nucleotides. 183. Synthesis of 4'  \$\alpha\$ -branched thymidines as a new type of antiviral agent.](#)** *Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 37–40.

51. Meneni S., [Ott I.](#), [Sergeant C. D.](#), [Sniady A.](#), [Gust R.](#), [Dembinski R.](#) **Alkynyl-2'-deoxyuridines: chromatography-free synthesis and cytotoxicity evaluation against human breast cancer cells.** [Bioorg Med Chem](#). 2007, 15, 3082-8.

52. Kantsadi A. L., Hayes J. M., Manta S., Skamnaki V. T., Kiritsis C., Psarra A. M., Koutsogiannis Z., Dimopoulou A., Theofanous S., Nikoleousakos N., Zoumpoulakis P., Kontou M., Papadopoulos G., Zographos S. E., Komiotis D., Leonidas D. D. **The  $\sigma$ -hole phenomenon of halogen atoms forms the structural basis of the strong inhibitory potency of C5 halogen substituted glucopyranosyl nucleosides towards glycogen phosphorylase b.**

[ChemMedChem](#). 2012, 7, 722-32.

53. Perigaud C., Gosselin G., Imbach J. L. **Nucleoside Analogues as Chemotherapeutic Agents.** Nucleosides & Nucleotides. 1992, 11, 903–945.

54. [http://www.chemeng.ntua.gr/files/simeioseis\\_xamilakis.pdf](http://www.chemeng.ntua.gr/files/simeioseis_xamilakis.pdf)

55. [http://anamorfosi.uoi.gr/latrikh/edumaterial/11/Synoptikh\\_farmakologia\\_tomos\\_I.pdf](http://anamorfosi.uoi.gr/latrikh/edumaterial/11/Synoptikh_farmakologia_tomos_I.pdf)

56. [http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem\\_glucose.htm](http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_glucose.htm)