



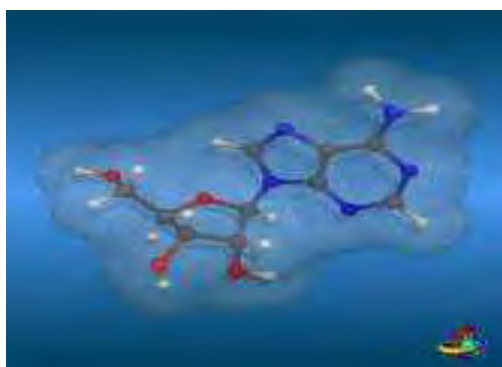
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΜΑΓΓΑΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

Διπλωματική Εργασία

**“ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΔΕΟΞΥ ΚΥΑΝΟ ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΗ ΤΗΣ
ΟΥΡΑΚΙΛΗΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΣ ΑΝΤΙΪΚΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΣ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ”**



Λάρισα 2011

Διπλωματική Εργασία

**“Σύνθεση του δεοξυ κυανο πυρανονουκλεοζίτη της ουρακίλης
ως πιθανός αντιικός και αντικαρκινικός παράγοντας”**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

Αιμιλία Ζίφα — Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας 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.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Κομιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου αυτή την εργασία ,καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον κομμάτι της Οργανικής χημείας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω 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, θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κυρίτση Χρήστο που με βοήθησε να ξεπεράσω τις δυσκολίες που συνάντησα στην εκπόνηση του πειραματικού μέρους αλλά και κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσης εργασίας. Επίσης ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου οργανικής χημείας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και τη φιλική τους διάθεση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Υδατάνθρακες	8
1.2 Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές :Σχηματισμός ημιακετάλης	9
1.3 Νουκλεοζίτες	12
1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιδίων	13
1.5 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα	17
1.6 Αντιικά νουκλεοζιτικά ανάλογα	19
1.7 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη	22
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
2.1 Στόχος – σκοπός μελέτης	27
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
3.1 Υλικά	29
3.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων	29
3.2 ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	30
3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)	30
3.2.2 Χρωματογραφία στήλης	30
3.2.3 Ξήρανση διαλυτών	31
3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων	31
3.3 Μέθοδοι	32
3.3.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού	32
3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης	33
3.3.3 Σύνθεση της 1-(3'-Δεοξυ-3-C-κυανο-2',4',6'-τρι-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)ουρακίλης	35
3.3.3.1. Σύνθεση της 3-C-Κυανο-1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (2)	35
3.3.3.2. Σύνθεση της 3-C-Κυανο-3-O-φαινοξυθειοκαρβονυλο -1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (3)	36
3.3.3.3 Σύνθεση της 3-Δεόξυ 3-C-Κυανο-1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (4)	37
3.3.3.4 Σύνθεση της 3-Δεόξυ -3-C-Κυανοαλλόζης (5)	38
3.3.3.5 Σύνθεση της 3- Δεόξυ -3-C-κυανο-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλοαλλοπυρανόζης (6)	39
3.3.3.6 Σύνθεση της 1-(3'-Δεόξυ-3'-C-Κυανο-2',4',6'-τρι-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)ουρακίλης (7)	40
4.ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR	42
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια έχει στραφεί στους νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους, κυρίως λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντικαρκινική, αντιβακτηριδιακή και αντιική δράση περιέχουν νουκλεοζίτες αποτελούμενους από μονοσακχαρίτες με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση. Αυτό το γεγονός ώθησε στην σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών με εξαμελή δακτύλιο, οι οποίοι αναμένεται να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην αντιική και αντικαρκινική θεραπεία.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση ενός καινούργιου νουκλεοζιτικού αναλόγου, του κυανο πυρανονουκλεοζίτη της ουρακίλης. Αναλύεται η συνθετική οδός που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του καθώς και η μέθοδος ταυτοποίησής του.

ABSTRACT

In recent years, the research interest has turned to nucleosides and nucleoside analogues, mainly because of their therapeutic properties. It is recognized that many natural antibiotics with anticancer, antibacterial and antiviral action containing nucleosides consisting of monosaccharides with five or six-member ring connected to a ring-position hetero basis. This fact led to the synthesis of modified nucleosides of six-member ring, which is expected to play an important role in antiviral and anticancer therapy.

This thesis describes the synthesis of a novel nucleoside analogue, that of the cyano pyranonucleoside of uracil. Within, the synthetic route and identification of the novel compound are detailed.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων που απαντώνται ευρέως στην φύση (αποτελούν πάνω από το 50% του ξηρού βάρους της βιομάζας της γης, χωρίς να υπολογίζεται το νερό) και είναι συνεπώς, τα πιο διαδεδομένα συστατικά στα φυτά και τα ζώα. Η βιολογική τους σημασία ως μόρια είναι μεγάλη, διότι μπορούν να αποτελέσουν δομικά στοιχεία των κυττάρων, πηγή ενέργειας, όπως επίσης και μέρος άλλων μακρομορίων, όπως γλυκοπρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα.

Ο όρος «υδατάνθρακας» προήλθε από το χημικό τύπο αυτών, $C_n(H_2O)_n$, και για τους οποίους βρέθηκε ότι αποτελούνται από άνθρακα και νερό. Οι υδατάνθρακες είναι μια ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών, που ονομάζονται κοινώς σάκχαρα. Τα μικρότερα από άποψη μοριακού βάρους είναι οι μονοσακχαρίτες, ακολουθούν οι δισακχαρίτες, οι ολιγοσακχαρίτες και τέλος οι πολυσακχαρίτες με πολύ υψηλά μοριακά βάρη. Πιο αναλυτικά, οι παραπάνω κατηγορίες υδατανθράκων είναι οι εξής:

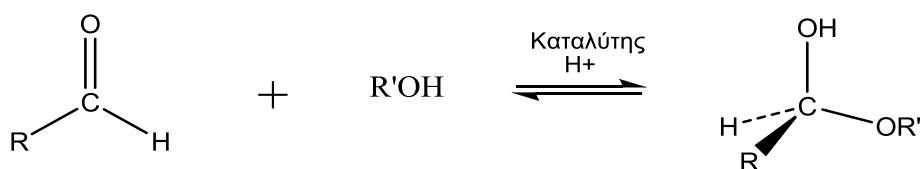
- Μονοσακχαρίτες: χαρακτηριστικές ενώσεις της κατηγορίας αυτής είναι η γλυκόζη, η μαλτόζη και η φρουκτόζη. Αποτελούν μονομερή για τη σύνθεση πολυπλοκότερων δομών που προκύπτουν από πολυμερισμό τους.
- Δισακχαρίτες: χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι η λακτόζη, η σουκρόζη και η μαλτόζη που αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες.
- Ολιγοσακχαρίτες όπως οι φρουκτολιγοσακχαρίτες. Αυτές οι ενώσεις αποτελούνται από 20-30 μονομερή μονοσακχαριτών.
- Πολυσακχαρίτες: χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη. Δημιουργούνται με

πολυμερισμό μονοσακχαριτών και το κάθε μόριο πολυσακχαρίτη δύναται να αποτελείται από εκατοντάδες χιλιάδες μονομερή.

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.

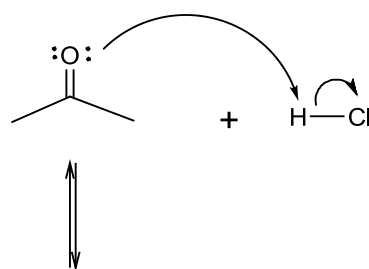
1.2 Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές: Σχηματισμός ημιακετάλης

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

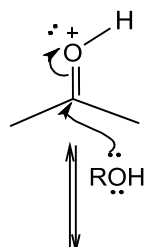


Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 1 (Mc Murry, 2000, p. 905):

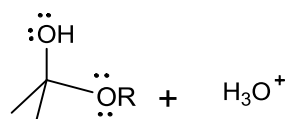
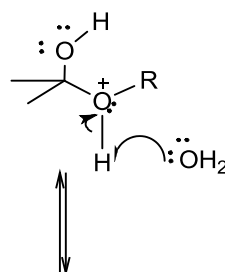
Η πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου πολώνει έντονα το καρβονύλιο και...



...ενεργοποιεί την καρβονυλική ομάδα για πυρηνόφιλη προσβολή από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου της αλκοόλης.



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

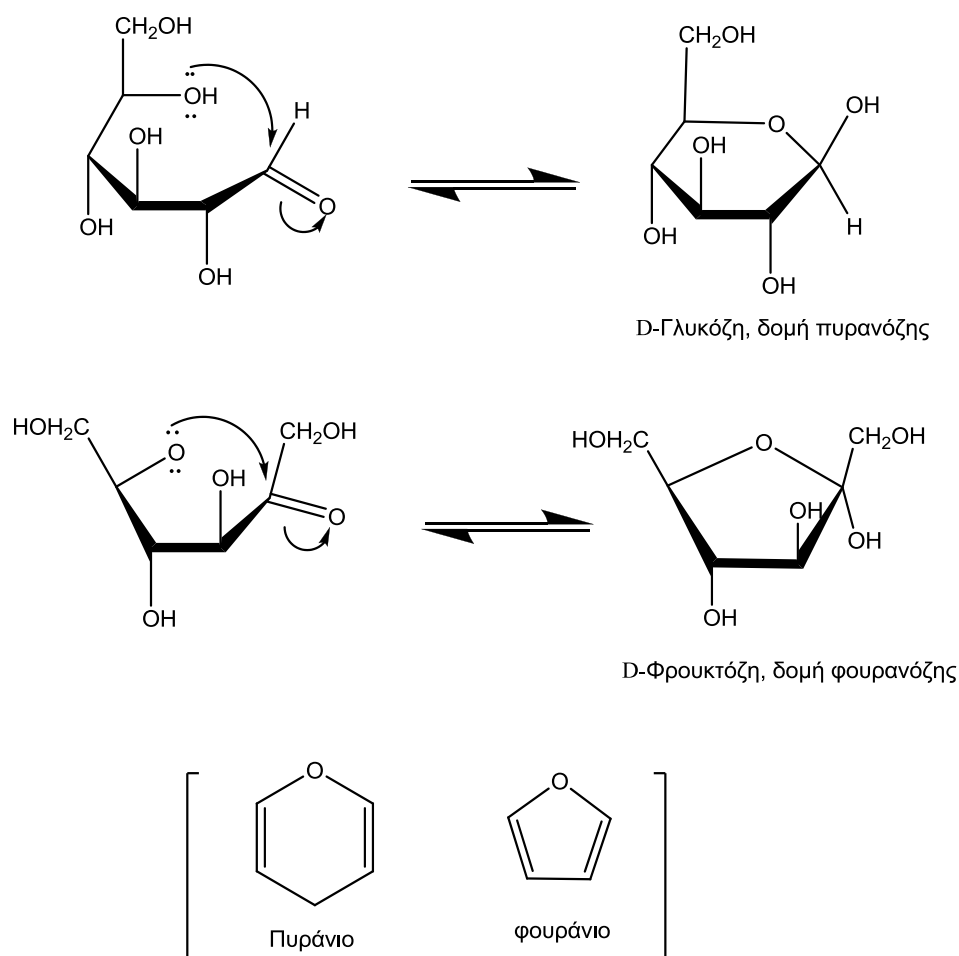


Σχήμα 1. Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης

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.

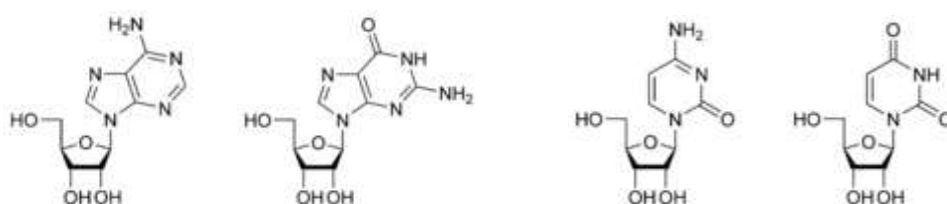
Οι ονομασίες πυρανόζη για τον εξαμελή δακτύλιο και φουρανόζη για τον πενταμελή δακτύλιο προέρχονται από τις ονομασίες των απλών κυκλικών αιθέρων πυράνιο και φουράνιο. Οι κυκλικές δομές της πυρανόζης και της φουρανόζης καθώς και του πυρανίου και του φουρανίου παρατίθενται στο σχήμα 2.



Σχήμα 2. Κυκλικές δομές πυρανόζης και φουρανόζης

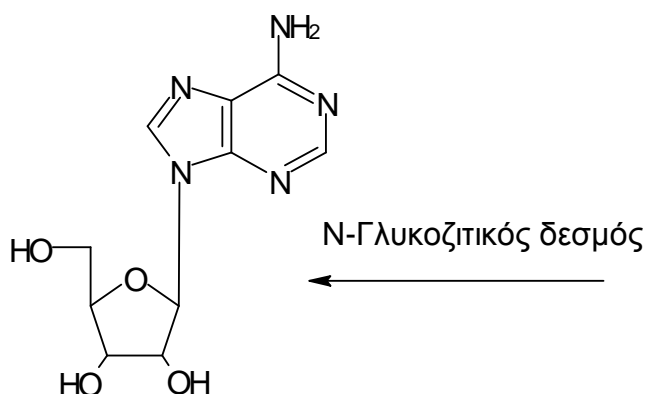
1.3 Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες που προέρχονται από την ένωση μιας νουκλεοβάσης (αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, θυμίνη, ουρακίλη) και της ριβόζης (ριβονουκλεοζίτες) ή της δεοξυριβόζης (δεοξυριβονουκλεοζίτες). Παραδείγματα ριβονουκλεοζιτών αποτελούν η αδενοσίνη, η γουανοσίνη, η κυτιδίνη και η ουριδίνη. (σχήμα 3).



Σχήμα 3. Νουκλεοζίτες (αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη, ουριδίνη).

Ο νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης ενωμένη στη θέση 1 μιας πεντόζης με β -N-γλυκοζιτικό δεσμό (Berg J.M. *et al*, 2001). Ο ανωμερής άνθρακας ενός σακχάρου είναι σε θέση να ενωθεί με το άζωτο μιας αμίνης με ένα N-γλυκοζιτικό δεσμό. Ο συγκεκριμένος τρόπος γλυκοζιτικής σύνθεσης είναι συνήθης σε πολλά βασικά μακρομόρια, όπως νουκλεοτίδια, RNA και DNA. Οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β , δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Berg J.M. *et al*, 2001) (σχήμα 4).



Σχήμα 4. Αδενοσίνη

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. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες (Zhou W. *et al*, 2004; Perigaund C. 1992; Robins R.K. *et al*, 1990; MacCoss M. *et al*, 1990). Ως εκ τούτου έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους.

1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα έχουν ενδοκυτταρικούς μοριακούς στόχους. Στοχεύουν κυρίως τα νουκλεϊκά οξέα και την σύνθεσή τους, όπως επίσης και ένζυμα σχετιζόμενα με αυτά (Vender M. D. *et al*, 2001). Στην φύση οι νουκλεοζίτες συντίθενται ενδοκυτταρικά αλλά είναι δυνατή και η είσοδός τους στο κύτταρο διαμέσω παθητικής διάχυσης 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. *et al*, 2010; Somsák L. *et al*, 2008).

Τα θεραπευτικά ανάλογα 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 τριφωσφορυλιωμένες μορφές τους (Arner E. S. J. *et al*, 1995). Οι φωσφορυλιωμένες μορφές των νουκλεοζιτών δεν μπορούν να διαπεράσουν

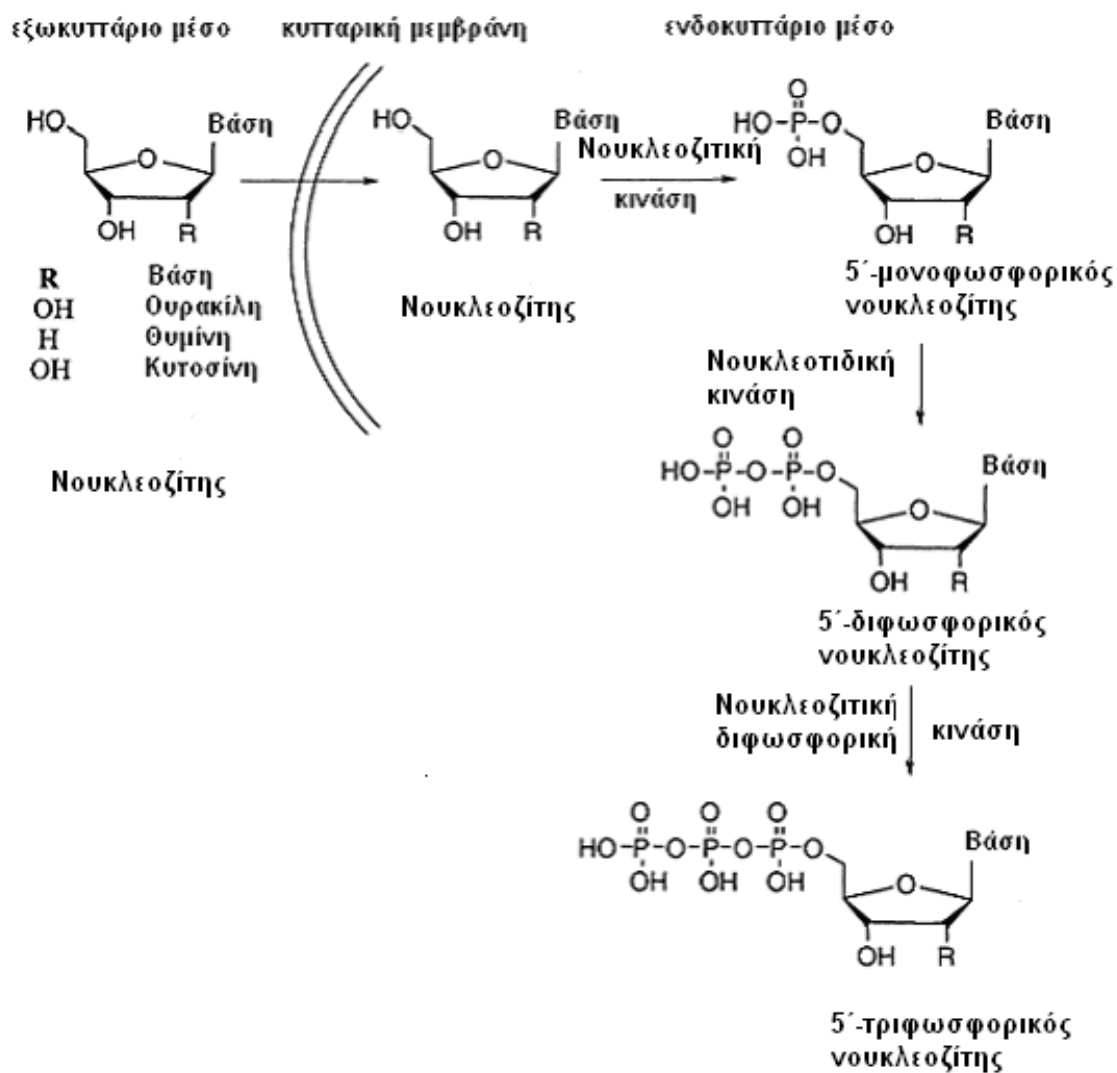
με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη λόγω φορτίου, όπως επίσης και άπαξ και δημιουργηθούν μέσα στο κύτταρο η μετακίνησή τους προς γειτονικά κύτταρα είναι δύσκολη λόγω του διαφορετικού pH που υπάρχει στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα.

Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, εντοπίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Μιμούμενα τους φυσικούς νουκλεοζίτες, τα αντιϊικά ανάλογά τους μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τις πολυμεράσες και να ενσωματωθούν στο ιικό γονιδίωμα. 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 ιοσωματιδίων. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος είναι συντηρημένος σε πολλά είδη ιών, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να παρουσιάσουν δράση έναντι μεγάλου φάσματος ιών (Chong Y. *et al*, 2003). Αξίζει να σημειωθεί πως μέρος της επιλεκτικότητας 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 επιλεκτικότητα τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

Ο μηχανισμός φωσφορυλίωσης των νουκλεοζιτών αποτελεί επίσης μέρος της εκλεκτικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών. Η φωσφορυλίωση αρχίζει με την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στην 5' θέση του σακχάρου, η οποία καταλύεται ειδικές ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες, προς δημιουργία ενός μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (Wagner C. R. *et al*, 2000; Balzarini J. *et al*, 1993). Οι μετέπειτα φωσφορυλιώσεις προς τις διφωσφορικές και τριφωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών καταλύεται από νουκλεοδιτικές κινάσες και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες αντιστοίχως (σχήμα 5). Η φωσφορυλίωση από ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες όπως επίσης και η χαμηλή διαπερατική ικανότητα των φωσφορυλιωμένων νουκλεοζιτών οδηγούν στην συσσώρευση των φαρμακολογικά ενεργών μορφών τους στα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό.

Ένας κοινός μηχανισμός αντιϊκής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωση των νουκλεοζιτών στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της

επιμήκυνσής της. 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 (John M. Clark Jr. and Robert L. Switzer, 1992; Benjamin Lewin, 2003; Christopher J. Burns, 2005). Εκτός του παραπάνω μηχανισμού, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να ασκήσουν αντικαρκινική δράση και μέσω άλλων μηχανισμών. Μπορούν να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της καταστολής αντιαποπτωτικών γονιδίων. Δυο νουκλεοζιτικά ανάλογα, στα οποία ο τρόπος δράσης τους έχει εντοπιστεί στον παραπάνω μηχανισμό είναι το νουκλεοζιτικό ανάλογο 1-(3'-ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd) και το νουκλεοζιτικό ανάλογο 4-amino-6-hydrazino-7-β-D-ribofuranosyl-7H-pyrrolo(2,3-d)-pyrimidine-5-carboxamide (ARC) (Lui V. *et al*, 2010; Bhat U. G. *et al*, 2010).

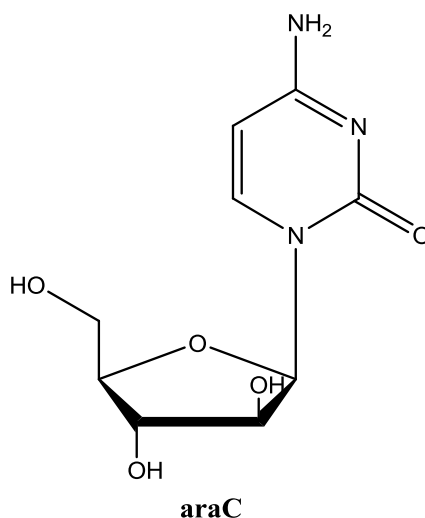


Σχήμα 5. Τροποποίηση των νουκλεοζιτικών αναλόγων προς την ενεργή τους μορφή μέσω ενδοκυτταρικής φωσφορυλίωσης.

1.5 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα

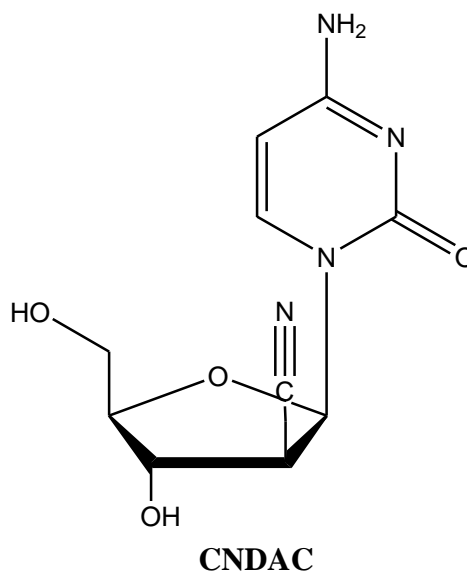
Οι αντιμεταβολίτες που ορισμένοι από αυτούς ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεοζιτών, χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην ιατρική ως πρώτης γραμμής φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύει στην παρεμπόδιση της σύνθεσης του DNA και του RNA των καρκινικών κυττάρων. Πυριμιδινικά αλλά και πουρινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται σαν αντιμεταβολίτες έναντι του καρκίνου. 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. *et al*, 2010; Bhat U. G. *et al*, 2010).

Ένα από τα πρώτα πυριμιδινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιήθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας ήταν το cytarabine (araC ή 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη) (σχήμα 6) (Ellison *et al*. 1967).



Σχήμα 6. Χημική δομή του araC

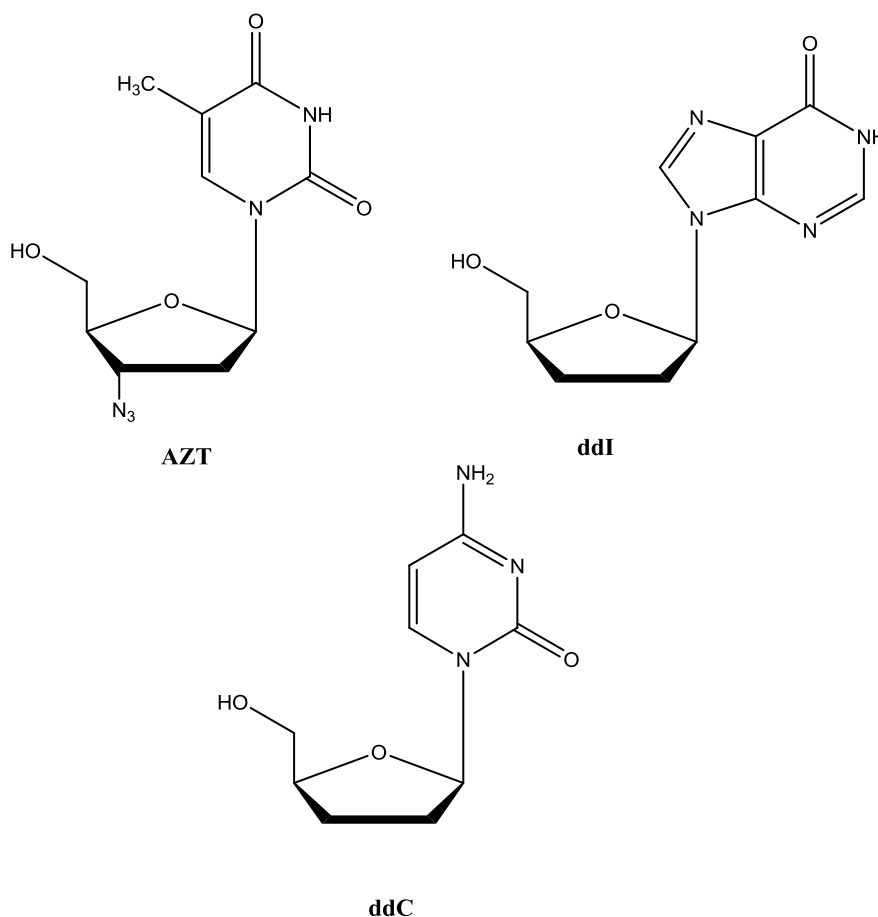
Ένα ακόμη πυριμιδινικό νουκλεοζιτικό ανάλογο είναι το CNDAC (2-C-κυανο-2-δεοξυ-1-β-D-αραβινοφουρανοσυλπισίνη) (σχήμα 7) (Motohiro Tanaka et al. 1992), το οποίο συγκρινόμενο με το araC έδειξε ότι είναι πιο αποτελεσματικό σε 10 είδη καρκινικών όγκων (2 των πνευμόνων, 4 του στομάχου και 4 οστεοσαρκώματα) αλλά και ισοδύναμο σε 2 ακόμα είδη (πνευμόνων και ινοσαρκώματος) .



Σχήμα 7. Χημική δομή του CNDAC

1.6 Αντιικά νουκλεοζιτικά ανάλογα

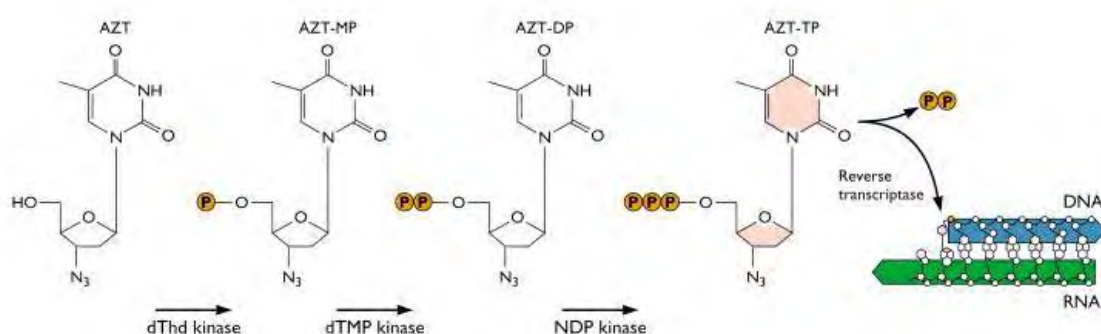
Μερικά χαρακτηριστικά νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι το zidovudine (**AZT**), το didanosine (**DDI**) και το zalcitabine (**DDC**), τα οποία χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα εναντίον του HIV. Οι χημικές τους δομές φαίνονται στο παρακάτω σχήμα 8:



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 τη σύνθεση του νέου DNA με μήτρα το ιικό RNA. Το ένζυμο αυτό συνθέτει μια αλυσίδα DNA συμπληρωματική με το RNA. Τα παραπάνω ανάλογα νουκλεοζιτών αναστέλλουν τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή του ιικού DNA.

Το AZT (3'-αζιδο-2'-δεοξυθυμιδίνη) αποτελεί ένα στοματικό και ενέσιμο φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των μολύνσεων με τον ιό της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1). (www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrn/). 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.

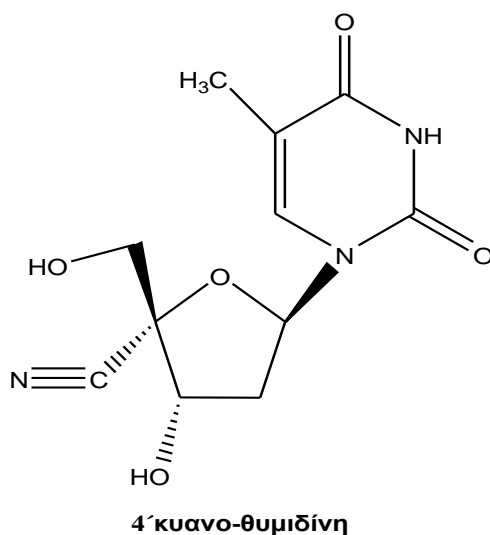


Σχήμα 9. Τερματισμός της αλυσίδας του ιικού DNA από το φωσφορυλιωμένο AZT

Το DDI (σχήμα 8) αποτελεί ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο με αντική δράση, αναστέλλοντας την αντιγραφή των ρετροϊών όπως του HIV, παρεμποδίζοντας τη δράση του ενζύμου της αντίστροφης τρανσκριπτάσης.

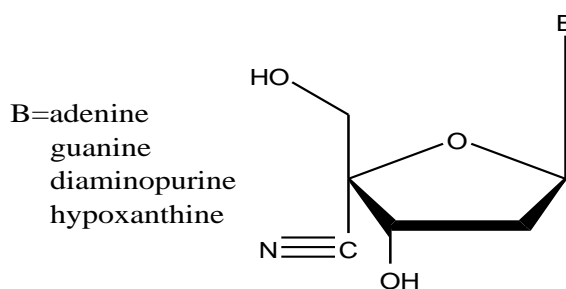
Το DDC ή διδεοξυκυτιδίνη (σχήμα 8) έχει παρόμοια δράση με το AZT και αποτελεί νουκλεοσιδικό ανάλογο που δρα ενάντια στον HIV.

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον προέκυψε και από την ανακάλυψη της ισχυρής αντι- HIV δράσης των 4'-κυανο αναλόγων της θυμιδίνης (Σχήμα 10) (O-Yang et al. 1992 και Kodama et al. 2001).



Σχήμα 10. Δομή 4' - υποκατεστημένου νουκλεοζίτη της θυμίνης

Επιπρόσθετα, πουρίνο 2'-δεοξυ νουκλεοζίτες που διαθέτουν μια κυανο ομάδα στον 4' άνθρακα του σακχάρου, εμφανίζουν 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 11.



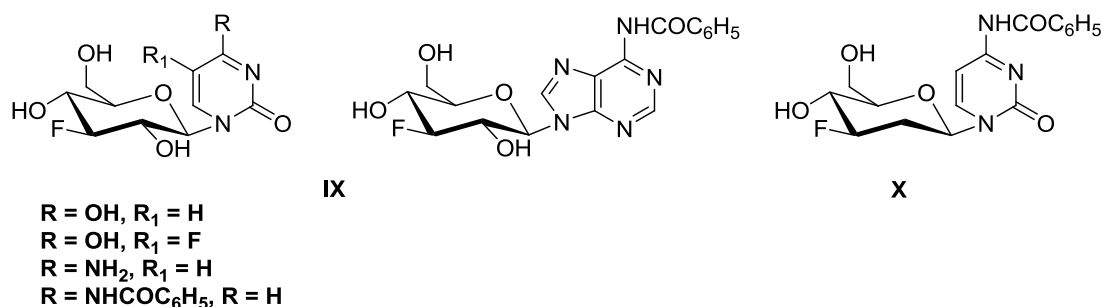
Σχήμα 11. Δομές των κυανο πουρίνο 2'-δεοξυ νουκλεοζιτών

1.7 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη

Παρ' όλες τις επιτυχίες στην έρευνα για καινούργια αντιικά και αντικαρκινικά φάρμακα, υπάρχει διαρκής ανάγκη για τη σύνθεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με μειωμένη τοξικότητα αλλά και αυξημένη αποτελεσματικότητα σε νέα ανθεκτικά ιικά στελέχη. Τα τελευταία χρόνια, νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντιικές (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 αντιικών, 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 αντιικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών αναλόγων με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο βρίσκεται αρκετά πίσω σε σχέση με αυτή των νουκλεοζιτών με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίου.

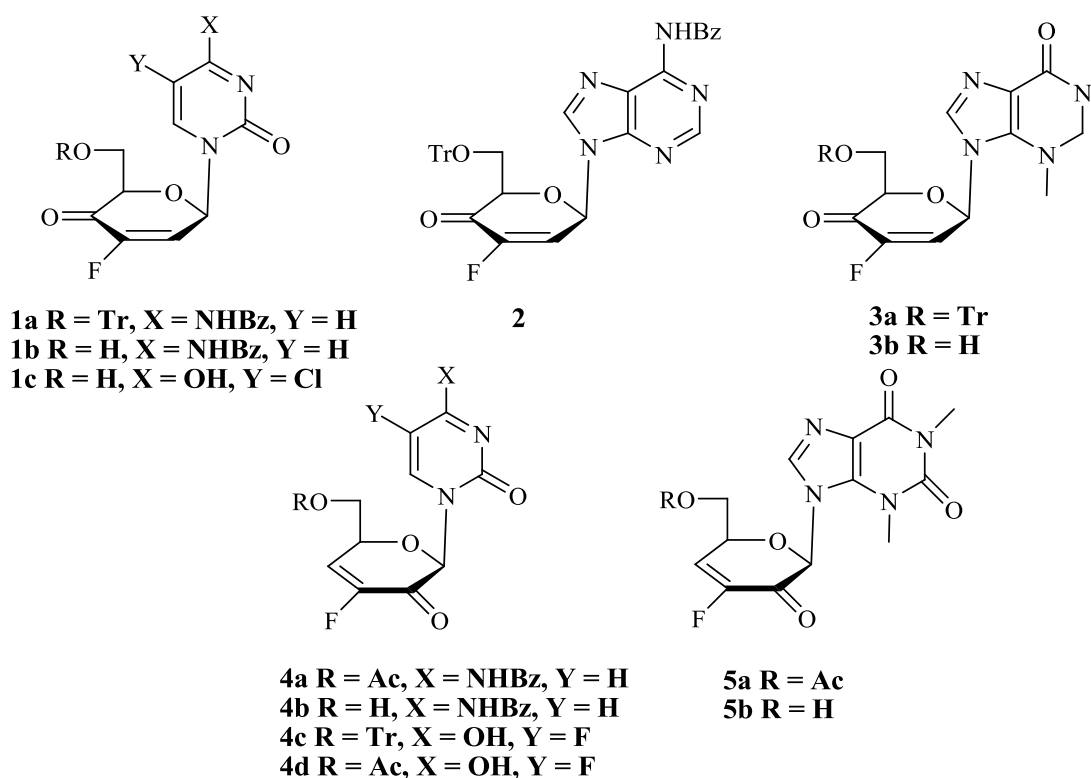
Οι φθοριωμένοι νουκλεοζίτες της N^4 -βενζοϋλοκυτοσίνης και N^6 -βενζοϋλοαδενίνης (ενώσεις **IX**, Σχήμα 12), μείωσαν αποτελεσματικά τη δραστηριότητα της PARN, δείχνοντας έτσι ότι αυτή μπορεί να ελεγχθεί από φυσικά νουκλεοτίδια *in vitro*, πιθανόν μέσω ενός απλού μηχανισμού ρύθμισης της αποικοδόμησης της πολυ(A) ουράς. Επιπλέον, τα ανάλογα νουκλεοζιτών που εξετάστηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπες ενώσεις για την ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν την PARN (Balatsos et al. 2009).



Σχήμα 12

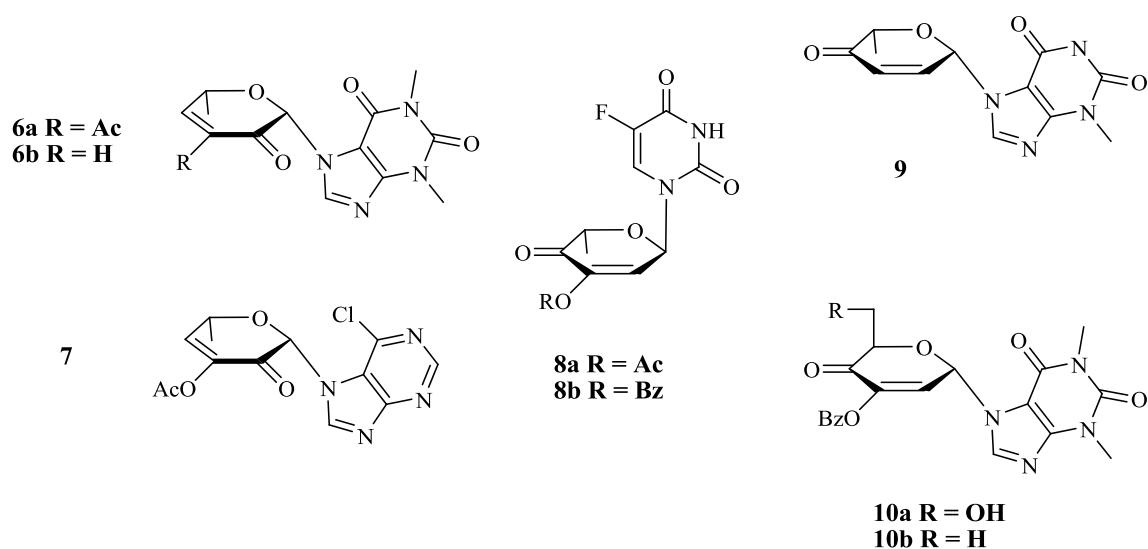
Ακόμη, φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες έχουν αξιολογηθεί και ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP), ένζυμο με κεντρικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου και υπεύθυνο για την παραγωγή γλυκόζης στο αίμα (γλυκογενόλυση). Η λεπτομερής ανάλυση των παραγόντων που καθορίζουν τη σύνδεση μικρομοριακών 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 (ενώσεις **IX**, Σχήμα 12) καθώς και ένα φθοριωμένο δεοξυ-πυρανονουκλεοζιτικό ανάλογο της *N*⁴-βενζοϋλοκυτοσίνης (ένωση **X**, Σχήμα 12) αποδείχθηκαν ανταγωνιστικοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του μυϊκού γλυκογόνου (GPb) (Tsirkone *et al.* 2010).

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 αντιικές και τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες (ενώσεις **1-5**, σχήμα 13). Αξιοσημείωτη είναι η αντιική δράση εναντί του εντεροϊού (rotavirus), που επέδειξαν οι ενώσεις **1a,b**, **2** και **4a,b**.



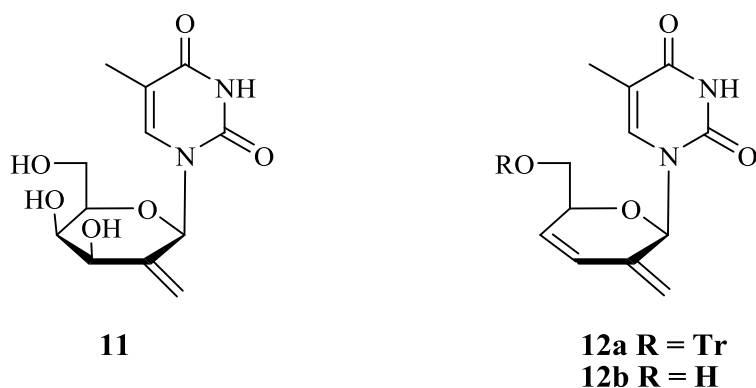
Σχήμα 13.

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 14.



Σχήμα 14

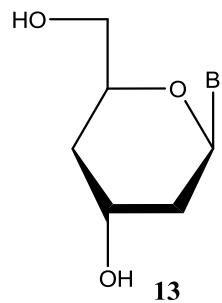
Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας συντέθηκε μια νέα ενδιαφέρουσα σειρά εξομεθυλενικών και ακόρεστων εξομεθυλενικών πυρανονουκλεοζιτών (Agelis et al. 2007), οι οποίοι επίσης παρουσίασαν σημαντική αντιική δράση έναντι του εντεροϊού (ενώσεις **11** και **12a**, σχήμα 15).



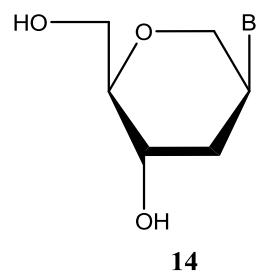
Σχήμα 15

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 πουργινικοί καθώς και πυριμιδινικοί 2'-δεοξυπυρανονουκλεοζίτες εμφάνισαν σημαντική αντιική, 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 16) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων (Augustyns et al. 1992, Augustyns et al. 1993). Επιπρόσθετα, σημαντική είναι η αντιική δράση των 1,5-ανυδροεξιτολο-νουκλεοζιτών έναντι του ιού του απλού έρπητα τύπου 1 και τύπου 2, του κυτταρομεγαλοϊού καθώς και του ιού

έρπητα ζωστήρα (ενώσεις **14**, Σχήμα 16 (Verheggen et al. 1993, Verheggen et al. 1995).



a=κυτοσίνη
b=αδερίνη
c=γουανίνη



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

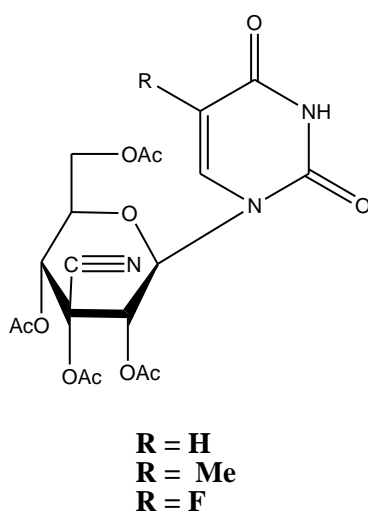
Σχήμα 16. Δεοξυ- πυρανονουκλεοζίτες

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Στόχος – σκοπός μελέτης

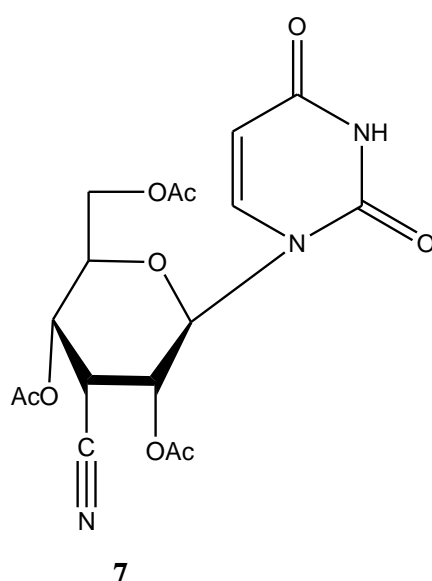
Οι νουκλεοζίτες μαζί με τα ανάλογά τους αποτελούν το θεμελιώδη λίθο για την ανάπτυξη αποτελεσματικών, εκλεκτικών και μη τοξικών αντιικών και αντικαρκινικών παραγόντων. Εκτεταμένη έρευνα έχει διεξαχθεί για την εύρεση νέων τάξεων νουκλεοζιτών με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και αποτελεσματικότητα έναντι ανθεκτικών στελεχών των ιών.

Πρόσφατες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, απέδειξαν ότι νέες τάξεις ασυνήθιστων φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών αποτελούν εν δυνάμει αντι-εντεροϊικούς παράγοντες, θεραπευτικά μέσα για τον καρκίνο του παχέως εντέρου, καθώς και αποτελεσματικούς αναστολείς της ανάπτυξης καρκινικών όγκων. Βασιζόμενοι στις ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες των ανωτέρω ενώσεων, αποφασίσαμε να διευρύνουμε τις μελέτες μας προς τη σύνθεση νέων μορίων, στα οποία μία ηλεκτραρνητική κυανο ομάδα θα αντικαταστήσει το άτομο του φθορίου. Πρόσφατα αποτελέσματα που αφορούν στη σύνθεση και στη βιολογική αποτίμηση των 3'-κυανο πυρανονουκλεοζιτών (σχήμα 17) απέδειξαν ότι τα συγκεκριμένα μόρια διαθέτουν αξιοσημείωτες κυτταροτοξικές και αντιικές ιδιότητες.



Σχήμα 17. 3'-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης, της θυμίνης και της 5-φθοροουρακίλης.

Με βάση τις σημαντικές αντιϊκές και αντικαρκινικές ιδιότητες που παρουσιάζουν οι δεοξυ πυρανονουκλεοζίτες και σε συνδυασμό με το ότι η εισαγωγή μιας ηλεκτραρνητικής κυανο ομάδας στο τμήμα του σακχάρου θα μπορούσε να προσδώσει σημαντική βιολογική δράση στο μόριο, κρίθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης δεοξυ κυανο πυρανονουκλεοζιτών. Οι νέοι νουκλεοζίτες φέρουν κυανο αλλά και δεοξυ στη 3'-θέση του σακχάρου και ως ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη, ένωση **7**. Η δομή του μορίου που στόχευσε η συνθετική μας πορεία φαίνεται στο σχήμα 18.



Σχήμα 18. 3'-κυανο-β-D-πυρανονουκλεοζίτης της ουρακίλης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιδικών αναλόγων

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

- Οξικός ανυδρίτης (Ac_2O) (Aldrich, Γερμανία)
- Πυριδίνη (Panreac, Ισπανία)
- Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH) (Merck, Γερμανία)
- Hexamethyldisilazane (HMDS) (Aldrich, Γερμανία)
- Trimethylsilyltrifluoromethane ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Υδρίδιο του ασβεστίου (CaH) (Fluca, Γερμανία)
- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN) (Merck, Γερμανία)
- Πεντοξείδιο του φωσφόρου (P_2O_5) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bicarbonate (NaHCO_3) (Merck, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bisulfate (NaHSO_4) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) (Merck, Γερμανία)

3.2 ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : thin layer chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε μέσω της χρωματογραφικής μεθόδου TLC, όπου χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₅₄) πάχους 0.2 mm . Τα χρωματογραφήματα εμφανίζονται με ψεκασμό με διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 30%, ενώ άλλοτε οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων (TLC) είναι ορατές υπό λυχνία υπεριώδους (UV).

Η χρωματογραφία διεκπεραιώθηκε χρησιμοποιώντας τα παρακάτω συστήματα διαλυτών :

- 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

3.2.2 Χρωματογραφία στήλης

Για τον καθαρισμό των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography), η οποία στήλη πληρώθηκε με silica gel (230-400 mesh) της εταιρίας E. Merck. Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής :

- 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

3.2.3 Ξήρανση διαλυτών

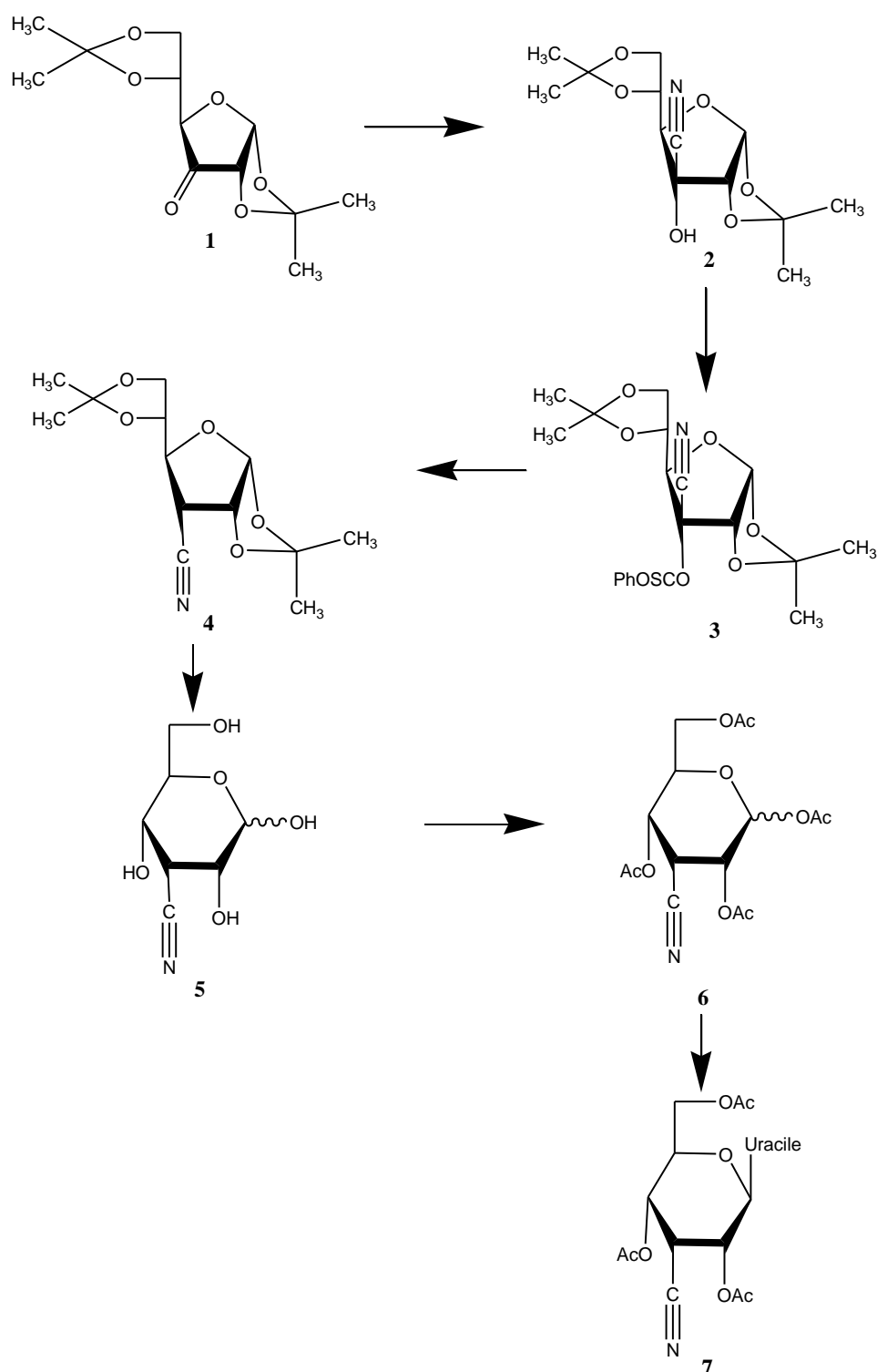
Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων , απαιτείται η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο και τολουόλιο . Η ξήρανση του ακετονιτρίλιου και του τολουολίου γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves).

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 ^1H NMR μετρήθηκαν με το φωτόμετρο Bruker 300 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^1H . Η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (doublet), dd (doublet doublet), dtr (doublet triplet), m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

3.3 Μέθοδοι

3.3.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού



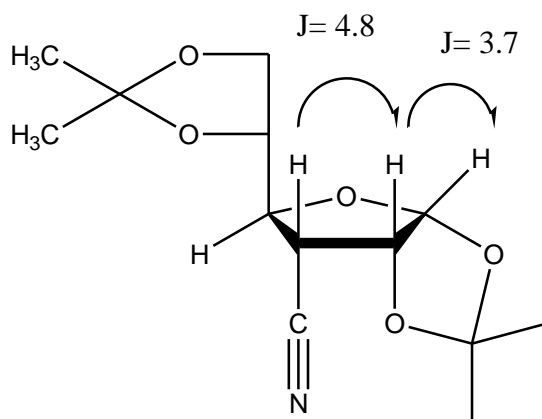
Σχήμα 19: Επισκόπηση της σύνθεσης του δεοξυ κυανο νουκλεοζιτικού ανάλογου με βάση την ουρακίλη.

3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης

Η πρώτη αντίδραση αυτής της πορείας περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσθήκη της κυανο ομάδας στην κετονομάδα του προϊόντος **1**, χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια NaCN, NaHCO₃ σε διάλυμα δύο φάσεων H₂O και Et₂O. Αυτή η προσθήκη γίνεται από τη στερικά 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 **2**, με απόδοση 41%.

Η επόμενη αντίδραση της συνθετικής πορείας είναι η φαινοξυθειοκαρβονυλίωση του παραγώγου **2**, η οποία πραγματοποιείται με επίδραση φαινοξυθειοκαρβονυλοχλωριδίου (PhOC(S)Cl), παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et₃N) και 4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (DMAP) σε CH₃CN. Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνεται το 3'-O-φαινοξυθειοκαρβονυλο παράγωγο **3**.

Στη συνέχεια, το προϊόν **3** χωρίς περαιτέρω απομόνωση ανάγεται παρουσία του υδριδίου του τριβουτυλοκασσιτέρου (Bu₃SnH), καθώς και του αζωδισ-ισοβουτυρονιτριλίου (AIBN) σε διαλύτη τολουόλιο στους 100 °C. Η 3-Δεοξυ-3-C-κυανο-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη **4** λαμβάνεται σε 65% απόδοση, ύστερα από τη σχάση του δεσμού C³-O³ σε μία αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών. Η αναγωγή επιτεύχθηκε στερεοεκλεκτικά και η απόσπαση του υδρογόνου από το Bu₃SnH έγινε από την πάνω β όψη του δακτυλίου. Η α-στεreoχημεία της κυανο ομάδας διαπιστώθηκε από την παρατηρούμενη cis σύζευξη J_{2,3} = 4.8 μεταξύ των H₂ και H₃ (Σχήμα 20).



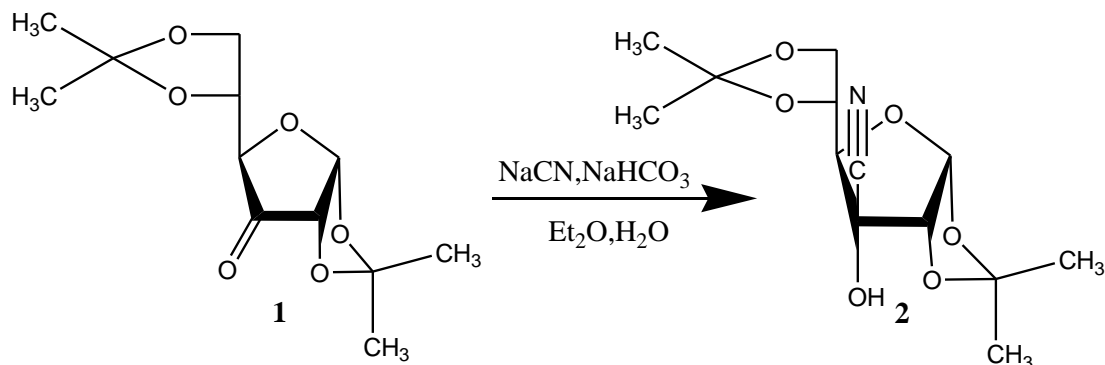
Σχήμα 20. Δεδομένα σύζευξης από το φάσμα ¹H NMR της ένωσης **4**.

Η συνθετική πορεία συνεχίζεται με την υδρόλυση του προϊόντος **4** με ένα θερμό υδατικό διάλυμα της ρητίνης Amberlite IR-120 (H^+), η οποία οδηγεί στην ένωση **5**, σε απόδοση 88%. Στη συνέχεια, με ακετυλίωση του προϊόντος **5** παρουσία Ac_2O σε πυριδίνη, λαμβάνεται το επιθυμητό σάκχαρο, 3-Δεοξυ-3-C-κυανο-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζη **6** αρκετά καλή απόδοση (78%).

Ακολουθεί η σύζευξη του σακχάρου **6** με τη βάση ουρακίλη. Σιλυλιώνεται πρώτα η βάση παρουσία του διαλύτη ακετονιτριλίου (CH_3CN), εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης. Αφού σιλυλιωθεί η βάση, προστίθεται το σάκχαρο **6** και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα ($Me_3SiOSO_2CF_3$) και θέρμανση της αντίδρασης, λαμβάνοντας την επιθυμητή ένωση 1-(3'-Δεοξυ-3'-C-κυανο-2',4',6'-τρिस-O-ακετυλο-β-D-πυρανοζυλο) ουρακίλη **7**, με ικανοποιητική απόδοση (51%).

3.3.3 Σύνθεση της 1-(3'-Δεοξυ-3-C-κυανο-2',4',6'-τρεις-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)ουρακίλης

3.3.3.1 Σύνθεση της 3-C-Κυανο-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (2)

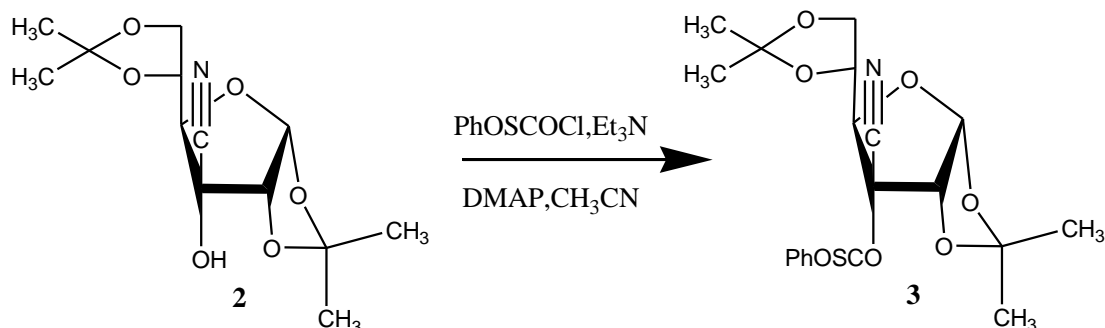


Η 1,2:5,6-Δισ-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη (**1**) (692 mg ή 2.68 mmol) διαλύθηκε σε αιθυλεθέρα (10.7 ml) και στη συνέχεια προστέθηκε νερό (5.4 ml), ώστε να σχηματιστούν δύο φάσεις. Κατόπιν προστέθηκε NaHCO₃ (2.95 mmol, 245 mg) και NaCN (1.47 mmol, 72 mg). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε με έντονη ανάδευση για 48 ώρες. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 1). Η οργανική φάση διαχωρίστηκε και η υδατική φάση πλύθηκε δυο φορές με οξικό αιθυλεστέρα (20 ml). Οι οργανικές φάσεις ενώθηκαν, ξηράθηκαν με άνυδρο Na₂SO₄ 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 (**2**) (284 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λαδιού.

TLC (Διάλυμα Ε)	R _f = 0.56
Απόδοση	41%

Πίνακας 1. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-Κυανο-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (**2**)

3.3.3.2 Σύνθεση της 3-C-Κυανο-3-O-φαινοξυθειοκαρβονυλο-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (3)

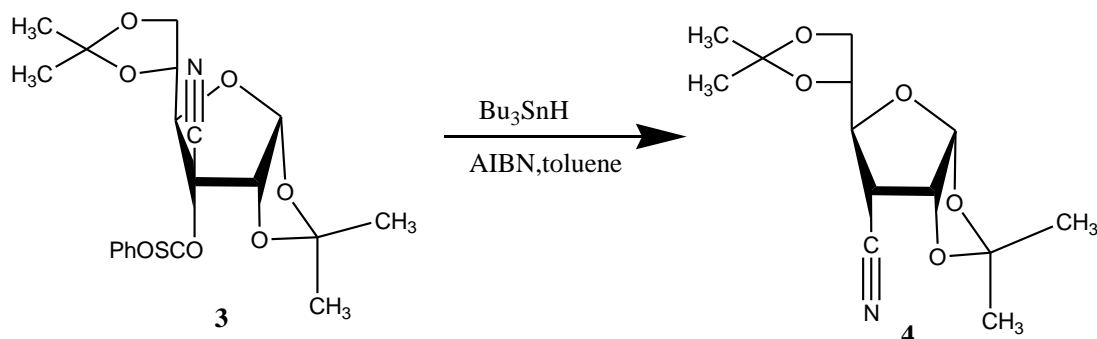


Η 3-C-Κυανο-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (2) (250 mg, 0.88 mmol) διαλύθηκε σε άνυδρο CH₃CN (2 mL). Στο διάλυμα προστέθηκε Et₃N (185 μl, 1.34 mmol) και DMAP (46mg, 0.37 mmol) και τέλος PhOC(S)Cl (175 μl, 1.29 mmol) σε παγόλουτρο για μία ώρα. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 2) και αφού έχει ολοκληρωθεί, απομακρύνθηκε ο διαλύτης υπό κενό. Το υπόλειμμα αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (70 mL) και εκχυλίστηκε μία φορά με νερό (1 x 20 mL). Κατόπιν η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα συμπυκνώνεται δυο φορές με άνυδρο τολουόλιο και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω απομόνωση.

TLC (Διάλυμα Δ)	R _f = 0.6
-----------------	----------------------

Πίνακας 2. Σύνθεσης της 3-C-Κυανο-3-O-φαινοξυθειοκαρβονυλο-1,2:5,6-Δισ-O-ισοπροπυλιδενο- α-D-αλλοφουρανόζης (3)

3.3.3.3 Σύνθεση της 3-Δεοξυ-3-C-κυανο-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (4)



Η 3-C-Κυανο-3-O-φαινοξυθειοκαρβονυλο-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (**3**) (210 mg, 0.15 mmol) διαλύθηκε σε τολουόλιο και το μίγμα απαερώθηκε με άζωτο για 30 λεπτά. Στο διάλυμα προστέθηκε Bu_3SnH (3.95 mL, 14.7 mmol) καθώς και AIBN (0.24 g, 1.47 mmol). Το προκύπτον μίγμα θερμάνθηκε στους 100°C για 2 ώρες. Στη συνέχεια αφέθηκε να κρυώσει, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Γ. Το επιθυμητό προϊόν (**4**) (155 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων (διχλωρομεθάνιο/εξάνιο). Σημείο Τήξεως 103°C .

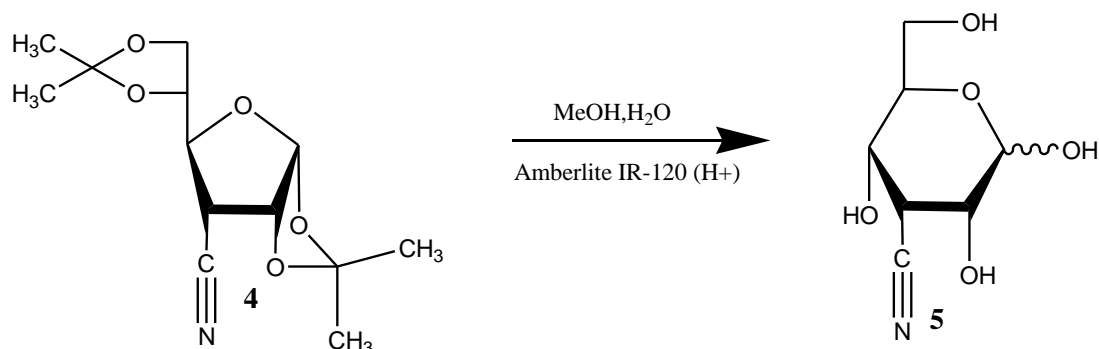
TLC (Διάλυμα Γ)	$R_f = 0.4$
Απόδοση	65%

Πίνακας 3. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-Δεοξυ-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδενο-3-C-Κυανο -α-D -αλλοφουρανόζης (**4**)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3)

5.81 (d, 1H, $J_{1,2} = 3.7$, H1), 4.76 (dd, 1H, $J_{2,1} = 3.7$, $J_{2,3} = 4.8$, H2), 4.21- 3.94 (m, 4H, H4, H5, H6a, H6b), 2.88 (dd, 1H, $J_{3,2} = 4.8$, H3), 1.51 (s, 3H, CH_3), 1.42 (s, 3H, CH_3), 1.33 (s, 6H, 2 CH_3).

3.3.3.4 Σύνθεση της 3-Δεοξυ-3-C-κυανοαλλόζης (5)

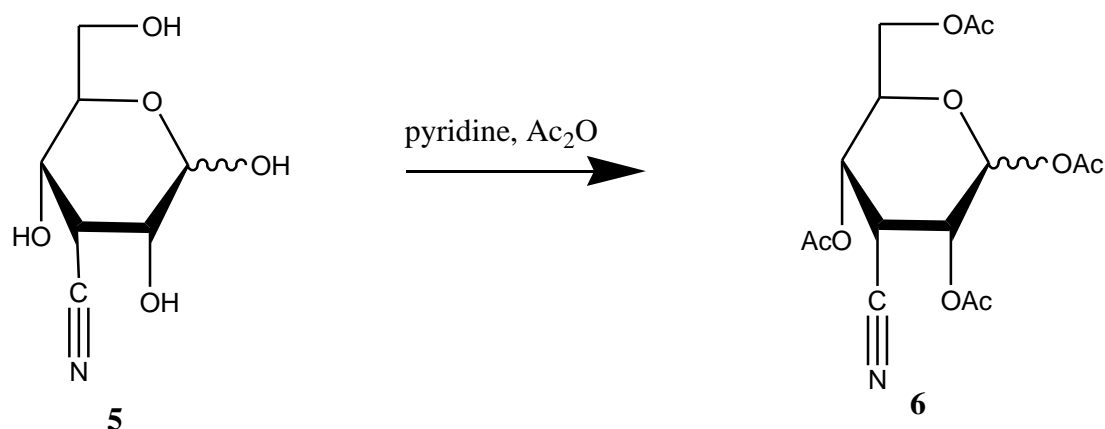


Η 3-Δεοξυ-1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-Κυανο-α-D-αλλοφουρανόζη (**4**) (155 mg, 0.57 mmol) διαλύθηκε σε MeOH (0.9 ml) και νερό (5.16 ml) αναδεύτηκε στους 60-70 °C με ρητίνη Amberlite IR-120 (H⁺) (603 mg). Μετά από 10 ώρες η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 4), το μίγμα διηθήθηκε και απομακρύνθηκαν οι διαλύτες από το διήθημα υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν (**5**) (95 mg) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

TLC (Διάλυμα A)	R _f = 0.3
Απόδοση	88%

Πίνακας 4. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-Δεοξυ- 3-C-κυανοαλλόζης (**5**)

3.3.3.5 Σύνθεση της 3-Δεοξυ-3-C-κυανο-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλοαλλοπυρανόζης (6)

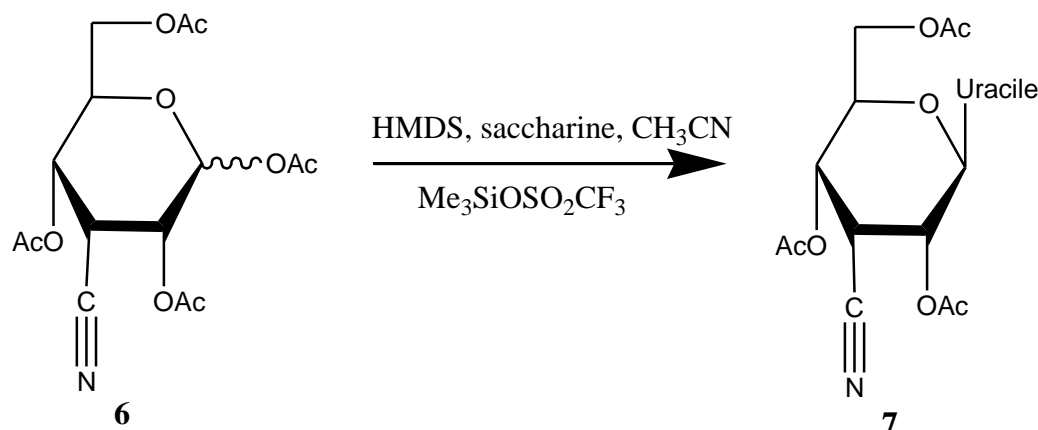


Σε ένα διάλυμα της 3-Δεοξυ-3-C-κυανοαλλόζης (**5**) (98 mg, 0.52 mmol) σε πυριδίνη (2 ml) προστέθηκε Ac_2O (1 ml). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC πίνακας 5) το διάλυμα κρύωσε στους 0 °C και προστέθηκε μεθανόλη (0.7 ml) για να καταστείλει την αντίδραση. 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 (**6**) (145mg) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου.

TLC (Διάλυμα Β)	$R_f = 0.59$
Απόδοση	78%

Πίνακας 5. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-Δεοξυ-3-C-κυανο-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλοαλλοπυρανόζης (**6**)

3.3.3.6 Σύνθεση της 1-(3'-Δεοξυ-3'-C-Κυανο-2',4',6'-τρι-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)ουρακίλης (**7**)



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-Δεοξυ-3-C-κυανο-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζη (**6**) (28mg, 0.078mmol) καθώς και Me₃SiOSO₂CF₃ (20μl, 0.11mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες (TLC πίνακας 6) 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 (**7**) (16mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Σημείο Τήξεως 126 °C.

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

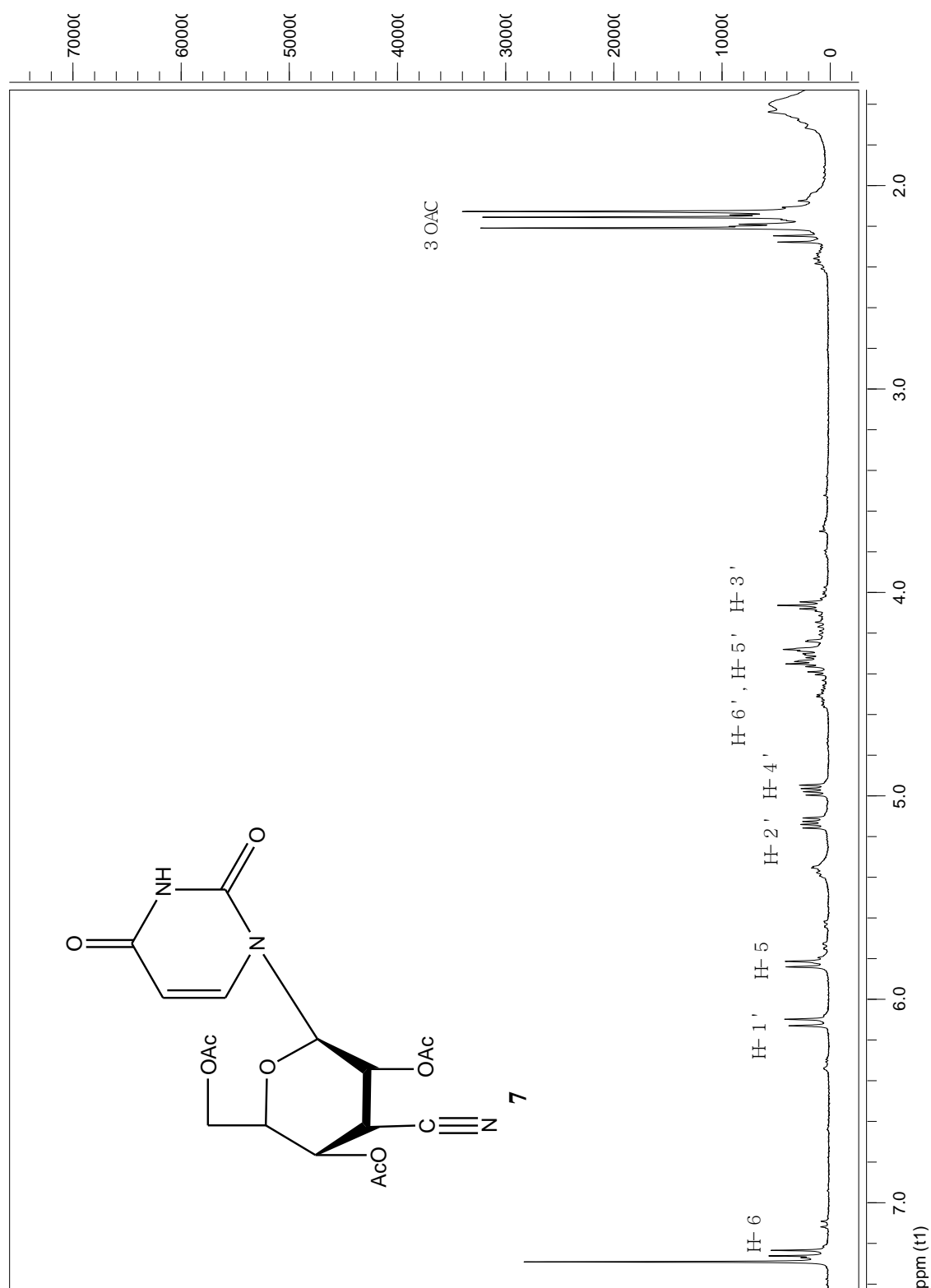
Πίνακας 6. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3'-Δεοξυ-3'-C-κυανο-2',4',6'-τρι-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)ουρακίλης (**7**)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)

7.25 (d, 1H, J_{6,5}=8.2, H6), 6.11 (d, 1H, J_{1',2'}=9.6, H1'), 5.8 (d, 1H, J_{5,6}=8.2, H5), 5.12 (dd, 1H, J_{2',3'}=5.2, J_{2',1'}=9.6, H2'), 4.96 (dd, 1H, J_{4',3'}=5.0, J_{4',5'}=9.6, H4'), 4.38-4.23

(m, 3H, H-6a',b' , H5'), 4.06 (t, 1H, $J_{3',2'}=5.2$, $J_{3',4'}=5.0$, H3') 2.20 και 2.15 και 2.12 (s, 9H, 3OAc).

4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR



Σχήμα 21. Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος **7**

5.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία επιτεύχθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης νουκλεοζιτών με πιθανή αντιική και αντικαρκινική δράση. Στηριζόμενοι στο μεγάλο ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι φούρανο νουκλεοζίτες με διακλαδωμένη αλυσίδα την κυανο ομάδα και λαμβάνοντας υπόψη τις σημαντικές βιολογικές ιδιότητες των δεοξυ νουκλεοζιτών, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών που φέρουν τη χαρακτηριστική κυανο ομάδα και δεοξυ στη θέση 3' του σακχάρου και ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη.

Το πρώτο στάδιο της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσθήκη της κυανο ομάδας στην κετονομάδα της 1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζης (**1**) για το σχηματισμό του κυανο φουρανικού παραγώγου **2**. Η ένωση **1**, στην οποία πραγματοποιείται η πυρηνόφιλη προσθήκη, μας παρέχει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει τον στερεοχημικό έλεγχο της εισαγωγής της κυανο ομάδας στην πάνω του υδατανθρακικού δακτυλίου λόγω της παρεμπόδισης του ογκώδους 1,2-Ο-ισοπροπυλιδενο υποκαταστάτη, λαμβάνοντας μ' αυτό τον τρόπο ένα μόνο ανωμερές.

Το επόμενο σημαντικό στάδιο στην συνθετική μας πορεία είναι η αναγωγή του υδροξυ κυανο φουρανικού παραγώγου **2** που πραγματοποιείται με δύο διαδοχικές αντιδράσεις. Αρχικά εισάγεται η φαινοξυθειοκαρβονυλο ομάδα στο τριτοταγές υδροξύλιο της ένωσης **2** και έπειτα το προϊόν ανάγεται σε μια αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η αντίδραση αναγωγής γίνεται υπό αυστηρά άνυδρες συνθήκες, λόγω της σχετικά εύκολης υδρόλυσης του ενδιάμεσου φαινοξυθειοκαρβονυλο εστέρα **3**. Η αντίδραση αναγωγής πραγματοποιείται με στερεοεκλεκτικό τρόπο, με αποτέλεσμα η κυανο ομάδα στο κυανο φουρανοσάκχαρο **4** να βρίσκεται στην κάτω όψη του υδατανθρακικού δακτυλίου, όπως φάνηκε από τις τιμές των σταθερών σύζευξης $J_{1',2'}$ και $J_{2',3'}$.

Ο τελικός νουκλεοζίτης ελήφθη με μια βολική συνθετική πορεία, η οποία περιλάμβανε σύντομα βήματα και καλές αποδόσεις. Η σύνθεση της 3-C-Κυανο-1,2:5,6-δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (**2**) είχε απόδοση 41%, η σύνθεση της 3-Δεοξυ--3-C-κυανο-1,2:5,6-δις-Ο-ισοπροπυλιδενο -α-D

–αλλοφουρανόζης (**4**) είχε απόδοση 65%, η σύνθεση της 3-Δεοξυ-3-C-κυανοαλλόζης (**5**) είχε απόδοση 88% , η σύνθεση της 3-Δεοξυ-3-C-κυανο-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλοαλλοπυρανόζης (**6**) είχε απόδοση 78% και η σύνθεση της 1-(3'-Δεοξυ-3'-C-κυανο-2',4',6'-τρεις-O-ακετυλο-β-D-αλλοπυρανοζυλο)ουρακίλης (**10**) είχε απόδοση 51%.

Στο φάσμα ^1H NMR του επιθυμητού νουκλεοζίτη **7** (Σχήμα 23), διακρίνεται μία διπλή κορυφή στα 6.11 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{1',2'} = 9.67$ Hz, η οποία αντιστοιχεί στο σήμα του πρωτονίου H-1' του σακχάρου. Ακολουθεί το σήμα του πρωτονίου H-2' ως μια διπλή διπλών κορυφή στα 5.79 ppm με σταθερές σύζευξης $J_{1',2'} = 9.5$ Hz και $J_{2',3'} = 5.2$ Hz. Εδώ θα πρέπει επίσης να τονιστεί ότι η χαμηλή σταθερά σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων H-2' και H-3' ($J_{2',3'} = 5.2$ Hz) μας παρέχει μια επιπλέον επιβεβαίωση της στερεοχημείας της κυανο ομάδας στη 3' θέση του σακχάρου. Ακολουθεί το σήμα του πρωτονίου H-4' ως μια διπλή διπλών κορυφή στα 4.96 ppm με $J_{4',5'} = 9.6$ Hz και $J_{4',3'} = 5.0$ Hz. Στο ίδιο φάσμα διακρίνονται τα σήματα των πρωτονίων H-5' και H-6' ως πολλαπλές κορυφές, ενώ το σήμα του πρωτονίου H-3' εμφανίζεται ως μια τριπλή στα 4.06 Hz. Τέλος, διακρίνονται τα σήματα των εννιά πρωτονίων των τριών ακετυλο ομάδων, που εμφανίζονται ως απλές κορυφές στα 2.20 και 2.15 και 2.12 ppm, αντίστοιχα.

Με δεδομένες τις ενδιαφέρουσες αντιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες που παρουσιάζουν πολλοί τροποποιημένοι νουκλεοζίτες, θα διεξαχθούν βιολογικές μελέτες στον νεοσυντιθέμενο νουκλεοζίτη **7**, οι οποίες και θα αναφερθούν σε επόμενες εργασίες.

6. 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.
- 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.
- Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* **1995**, *67*, 155.
- Balzarini, J. *Pharmacy World Sci.* **1993**, *16*, 113.
- Benjamin Lewin. **(2003)** *Genes VIII*,: 6- 8.
- Berg, J. M.; Tymoczko J. L., Stryer L. **(2001)**. Βιοχημεία (Τόμος I) Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (p) 329-351.
- Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* **2010**.
- Brossette T., Emmanuel Klein, Christophe Creminon, Jacques Grassi, Charles Mioskowski and Lyk Lebeau; *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 8129-8143.
- Chong, Y.; Gumina, G.; Mathew, J. S.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2003** *45*, 3245.
- Christopher, J. Burns, Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Hepatitis C Virus (HCV), *Current Medicinal Chemistry- Anti-Infective Agents*, Vol. 4, No. 2, **2005**.
- Egron, M.J.; Dorange, I.B.; Antonakis, K.; Herscovici, J.; Ollapally, A.P. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2002**, *21*, 327.
- Ellison RR, Carey RW and Holland JF. *Clin. Pharmacol. Ther.* , **1967** *8*, 800–809.
- Halliwell, B., **(2001)**. Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopaedia of life sciences*
- Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. J. *Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4963.

- Hiroyuki Hayakawa, Satoru Kohgo, Kenji Kitano, Noriyuki Ashida, Eiichi Kodama, Hiroaki Mitsuya and Hiroshi Ohrai Antiviral chemistry & chemotherapy **2004**;15(4):169-87.
- John M. Clark, Jr and Robert L. Switzer, Πειραματική βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1992.
- Khan, A.R.; Mulligan, K.X.; Ollapally, P. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2001**, 20, 759.
- Kodama, E.; Kohgo, S.; Kitano, K.; Machida, H.; Gatanda, H.; Shigeta, S.; Matsuoka, M.; Ohrai, H.; Mitsuya, H. 4'-Ethyryl 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.; Eggen, M.J.; Antonakis, K. *Carbohydr. Res.*, **1992**, 228, 95.
- Lui, V. W. Y. W.; Lau, C. P. Y. P.; Cheung, C. S. F. S.; Ho, K.; Ng, M. H. L. H.; Cheng, S. H. H.; Hong, B.; Tsao, S.-W. W.; Tsang, C. M. M.; Lei, K. I. K. I.; Yamasaki, Y.; Mita, A.; Chan, A. T. *Biochemical pharmacology* **2010**, 79, 1772–1780.
- MacCoss, M.; Robins, M. J. "Anticancer Pyrimidines, Pyrimidine Nucleosides and Prodrugs". In the chemistry of Antitumor Agents; Wilman, D. E. V. Ed.; Chapman and Hall: New York, **1990**, p. 261.
- McMurry John, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, **2000**, σελ.905.
- McMurry John, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, **2000**, σελ. 1245-1247.
- 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.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* **2004**, 95, 105.

- 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.
- Motohiro Tanaka et al, 1992 Antitumor activity of CNDAC.
- Lui V. *et al*, 2010; Bhat U. G. *et al*, 2010
- 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.
- Nair V.; Buenger, G.S. *J. Org. Chem.* 55 (**1990**) 3695-3697.
- 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.
- 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
- Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* **1992**, 11, 903.
- 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.
- Robins, R. K.; Kini, G. D. "Purines and Purine Nucleoside Analogues as Antitumor Agents". In *The Chemistry of Antitumor Agents*; Wilman, D. E. V. Ed. Chapman and Hall: New York, **1990**, p.299.
- Satoru Kohgo, Kohei Yamada, Kenji Kitano, Shinji Sakata, Hiroyuki Hayakawa, Daisuke Nameki, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Hiroaki Mitsuya, and Hiroshi Ohrai, *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS*, Vol. 22, Nos. 5–8, pp. 887–889, **2003**.
- Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Ramsey, C. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2005**, 45, 287.

- Somsák, L.; Czifrák, K.; Tóth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K.-M. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. *Current medicinal chemistry* **2008**, *15*, 2933–2983.
- Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *International Journal of Molecular Sciences* **2007**, *8*, 695.
- Suhadolnik, R. J. *Nucleoside Antibiotics*, Wiley-Interscience, New York, **1970**.
- Suhadolnik, R. J. *Nucleosides as biological Probes*, Wiley and Sons, New York, **1979**.
- Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J. M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis D.; Leonidas, D. D. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, *18*, 3413–3425.
- Undurti N. Das, *Med Sci Monit*, **2002**, *8*, 79.
- 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.
- Vender, M. D.; Sherman, P. D.; Luciano, P. D.; Tsakoulos, D. M.; Φυσιολογία του ανθρώπου: μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού. Εκδόσεις Πασχαλίδης (8^η έκδοση) **2001**.
- Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2033.
- Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Van Meervelt, L.; Rozenski, J.; Wiebe, L.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Claes, P.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 826.
- Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417.
- www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrsv/
- Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3399.