

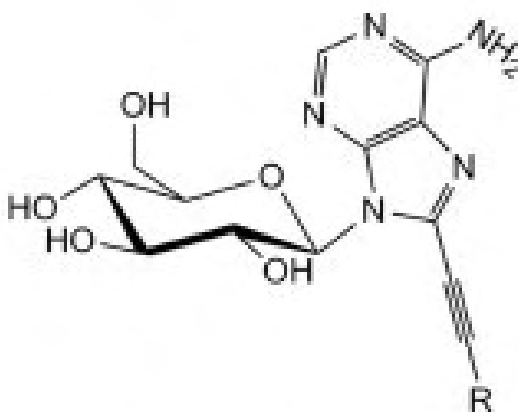


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ –
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ C-8 ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ
ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΤΗΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ ΩΣ ΝΕΟΙ
ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ ΜΑΡΙΝΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2015

Διπλωματική Μεταπτυχιακή Εργασία
«Σύνθεση νέων C-8 υποκατεστημένων πυρανονουκλεοζιτών της αδενίνης ως νέοι
κυτταροτοξικοί παράγοντες»

Διπλωματική μεταπτυχιακή εργασία

**Σύνθεση νέων C-8 υποκατεστημένων πυρανονουκλεοζιτών της
αδενίνης ως νέοι κυτταροτοξικοί παράγοντες.**

**Synthesis of novel C8-alkynyl adenine pyranonucleosides as cytotoxic
agents.**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- **Κομιώτης Δημήτριος** — Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- **Μαρκουλάτος Παναγιώτης** – Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- **Αμούτζιας Γρηγόριος** — Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιβλέπων καθηγητής ήταν ο καθηγητής Οργανικής Χημείας κ. Κομιώτης Δημήτριος, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για τις πολύτιμες και εποικοδομητικές υποδείξεις του στο ιδιαίτερα ενδιαφέρον θέμα που μου ανέθεσε καθώς και για την υποστήριξη που μου υπέδειξε τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε επαγγελματικό επίπεδο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα κα. Μαντά Στυλιανή και την υποψήφια διδάκτορα κα. Δημοπούλου Αθηνά για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή καθώς κι επειδή ήταν πάντα εκεί όταν τις χρειαζόμουν.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το κλίμα συνεργασίας που φρόντισαν να επικρατεί καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ	9
1.2 ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΗΜΙΑΚΕΤΑΛΗΣ	9
1.3 ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ	13
1.4 ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ	14
1.5 ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ ΜΕ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	17
1.6 ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ ΜΕ ΑΝΤΙΪΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	19
1.7 ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ	21
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	30
2.1 ΣΚΟΠΟΣ	30
3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, TLC)	31
3.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ	32
3.3. ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	33
3.4.ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΜΙΚΡΟΚΥΜΜΑΤΩΝ	33
3.5 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ	33
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34

4.1 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ C8-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ	34
4.1.1. 9-(2',3',4',6'-ΤΕΤΡΑ-Ο-ΑΚΕΤΥΛ-Β-D ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΣΥΛ)-N6-BENZOΪΛ ΑΔΕΝΙΝΗ (2)	34
4.1.2. 9-(2',3',4',6'-ΤΕΤΡΑ-Ο-ΑΚΕΤΥΛ-Β-D-ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΣΥΛ)-8-ΒΡΩΜΟ-N6- BENZOΪΛ ΑΔΕΝΙΝΗ (3)	35
4.1.3. ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΜΕΝΩΝ C8-ΑΛΚΥΝΥΛ ΑΔΕΝΙΝΟ ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ (4Α-Ε)	35
4.1.4. 9-(2',3',4',6'-ΤΕΤΡΑ-Ο-ΑΚΕΤΥΛ-Β-D-ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΣΥΛ)-8-ΕΠΤΙΝΥΛ-N6- BENZOΪΛ ΑΔΕΝΙΝΗ (4Α)	36
4.1.5. 9-(2',3',4',6'-ΤΕΤΡΑ-Ο-ΑΚΕΤΥΛ-Β-D-ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΣΥΛ)-8-ΦΑΙΝΥΛΑΙΘΥΝΥΛ-N6- BENZOΪΛ ΑΔΕΝΙΝΗ (4Β)	36
4.1.6. 9-(2',3',4',6'-ΤΕΤΡΑ-Ο-ΑΚΕΤΥΛ-Β-D-ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΣΥΛ)-8-P-ΤΟΛΟΥΑΙΘΥΝΥΛ-N6- BENZOΪΛ ΑΔΕΝΙΝΗ (4C)	36
4.1.7. 9-(2',3',4',6'-ΤΕΤΡΑ-Ο-ΑΚΕΤΥΛ-Β-D-ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΣΥΛ)-8-(ΠΥΡΙΔΙΝ-3-ΥΛ-ΑΙΘΥΝΥΛ)-N6- BENZOΪΛ ΑΔΕΝΙΝΗ (4D)	37
4.1.8. 9-(2',3',4',6'-ΤΕΤΡΑ-Ο-ΑΚΕΤΥΛ-Β-D-ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΣΥΛ)-8-(ΠΥΡΙΔΙΝ-2-ΥΛ-ΑΙΘΥΝΥΛ)-N6- BENZOΪΛ ΑΔΕΝΙΝΗ (4Ε)	37
4.2 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΜΗ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΜΕΝΩΝ C8-ΑΛΚΥΝΥΛ ΑΔΕΝΙΝΟ ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ (5Α-D)	38
4.2.1 9-(Β-D-ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΣΥΛ)-8-ΕΠΤΙΝΥΛ-ΑΔΕΝΙΝΗ (5Α)	38
4.2.2 9-(Β-D-ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΣΥΛ)-8-ΦΑΙΝΥΛΕΠΤΙΝΥΛ-ΑΔΕΝΙΝΗ (5Β)	38
4.2.3 9-(Β-D-ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΣΥΛ)-8-P-ΤΟΛΟΥΑΙΘΥΝΥΛ-ΑΔΕΝΙΝΗ (5C)	39
4.2.4 9-(Β-D-ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΣΥΛ)-8-(ΠΥΡΙΔΙΝ-3-ΥΛ-ΑΙΘΥΝΥΛ)-ΑΔΕΝΙΝΗ (5D)	39
4.3 ΠΡΟΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΣΗΣ 8-ΦΑΙΝΥΛΑΙΘΥΝΥΛ-ΑΔΕΝΙΝΗΣ (II)	39
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR	41

6. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	41
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι νουκλεοζίτες συγκαταλέγονται ανάμεσα στα πιο σημαντικά στοιχεία για τα κύτταρα γιατί αποτελούν συστατικά των *νουκλεικών οξέων*. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια αποτελούν στόχο για παραγωγή προϊόντων τόσο με κυτταροτοξική-αντικαρκινική δράση όσο και αντιβακτηριδιακή και αντική δράση.

Οι νουκλεοζίτες αποτελούνται από μονοσακχαρίτες με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση. Οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες, οι οποίοι αποτελούν ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο, φέρουν δομικές τροποποιήσεις και στο τμήμα του σακχάρου αλλά και στο τμήμα της βάσης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση των C-8 υποκατεστημένων πυρανονουκλεοζιτών και η δράση τους ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες. Αναλύονται οι συνθετικές οδοί που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή τους, η μέθοδος ταυτοποίησης τους καθώς και η βιολογική τους αποτίμηση.

ABSTRACT

Nucleosides belong among the most important elements of cells because they are components of nucleic acids. For that reason, in recent years they became targets for the production of products either with cytostatic-anticancer or antibacterial and antiviral action.

Nucleosides consist of monosaccharides with five or six member ring connected to a ring-position hetero basis. Modified nucleosides, which constitute an important research area, bear structural modifications both in the sugar and the base moiety.

This thesis describes the synthesis of C8-alkynyl adenine pyranonucleosides as potential anticancer agents. The synthetic route, the method of structure identification as well as biological evaluation of the novel compounds are analyzed within.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες ή σάκχαρα αποτελούν μια από τις τέσσερις κύριες κατηγορίες βιομορίων που συναντώνται σε κάθε ζωντανό οργανισμό και πρόκειται για μια ομάδα οργανικών ουσιών με γενικό χημικό τύπο $C_n(H_2O)_n$. Οι υδατάνθρακες είναι πολυϋδροξυ-αλδεΐδες, πολυϋδροξυ-κετόνες ή ενώσεις που μπορούν να υδρολυθούν προς πολυϋδροξυκαρβονυλικές ενώσεις.

Υπάρχουν τέσσερις κύριες κατηγορίες υδατανθράκων βιολογικού ενδιαφέροντος:

- Μονοσακχαρίτες, με κύριους αντιπροσώπους τη γλυκόζη και φρουκτόζη. Τα μόρια αυτά είναι τα μονομερή για τη σύνθεση πολυπλοκότερων δομών.
- Δισακχαρίτες, με κύριους αντιπροσώπους τη σουκρόζη, λακτόζη και μαλτόζη. Αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες.
- Ολιγοσακχαρίτες, με κύριους αντιπροσώπους τις μαλτοδεξτρίνες και τους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες. Αποτελούνται από 20-30 μονοσακχαρίτες.
- Πολυσακχαρίτες, με κύριους αντιπροσώπους το άμυλο, το γλυκογόνο και την κυτταρίνη. Τα μόρια αυτά αποτελούνται από εκατοντάδες χιλιάδες υπομονάδες γλυκόζης.

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

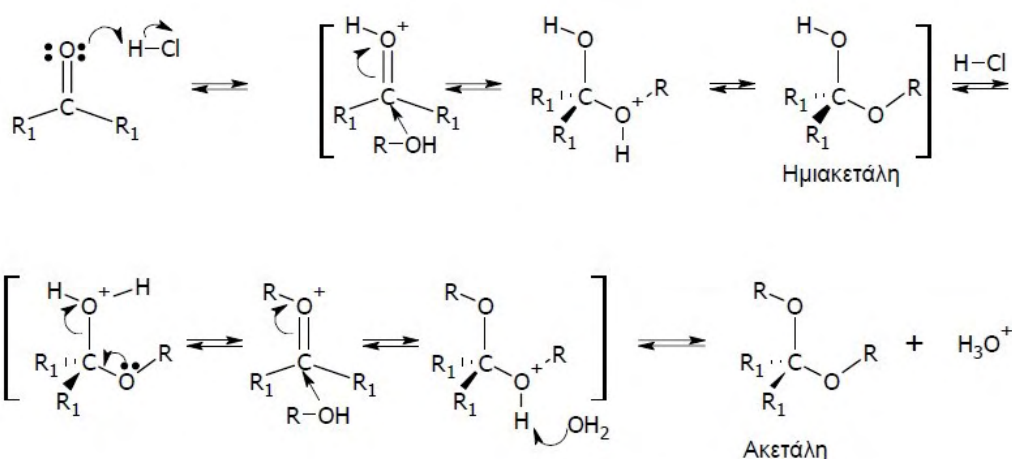
1.2 Υδατάνθρακες και σχηματισμός ημιακετάλης

Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν σε δύο μορφές. Την μορφή ανοιχτής αλυσίδας και την κυκλοποιημένη τους μορφή. Τα σάκχαρα απαντώνται σε κυκλική μορφή όταν μια καρβονυλική ομάδα του μορίου τους αντιδρά με μια ομάδα υδροξυλίου, προς δημιουργία ημιακετάλης.

Συγκεκριμένα, όταν μια αλδεΐδη αντιδρά με ένα μόριο αλκοόλης, δίνει μία ημιακετάλη, ενώ όταν αντιδρά με ένα δεύτερο μόριο αλκοόλης, δίνει μια ακετάλη. Αυτή η αντίδραση είναι μια ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη που οδηγεί στην δημιουργία πυρανοζών ή φουρανοζών.

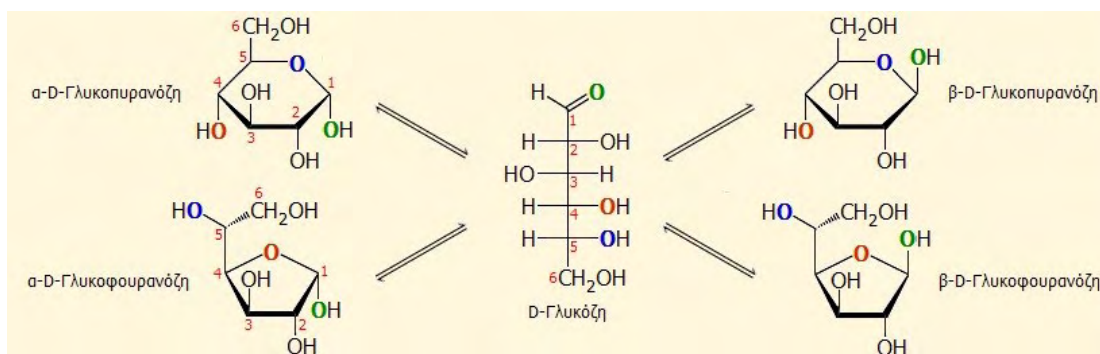
Ο μηχανισμός της αντίδρασης σχηματισμού ακεταλών μπορεί να διαιρεθεί σε δύο στάδια (Σχήμα 1). Το πρώτο στάδιο είναι μια τυπική, καταλυόμενη από

οξύ προσθήκη στην καρβονυλομάδα. Ο όξινος καταλύτης πρωτονιώνει την καρβονυλομάδα και η αλκοόλη (ασθενές πυρηνόφιλο) προσβάλλει το πρωτονιωμένο, ενεργοποιημένο καρβονύλιο. Με απώλεια ενός πρωτονίου από το θετικά φορτισμένο ενδιάμεσο παίρνουμε μια ημιακετάλη. Με την προσθήκη ενός μορίου αλκοόλης, η ημιακετάλη βρίσκεται στα μισά της πορείας μετατροπής της σε «πλήρη» ακετάλη. Το δεύτερο μισό του μηχανισμού, είναι μια S_N1 υποκατάσταση της πρωτονιωμένης ημιακετάλης (L.G. Wade, J.R. 2012).



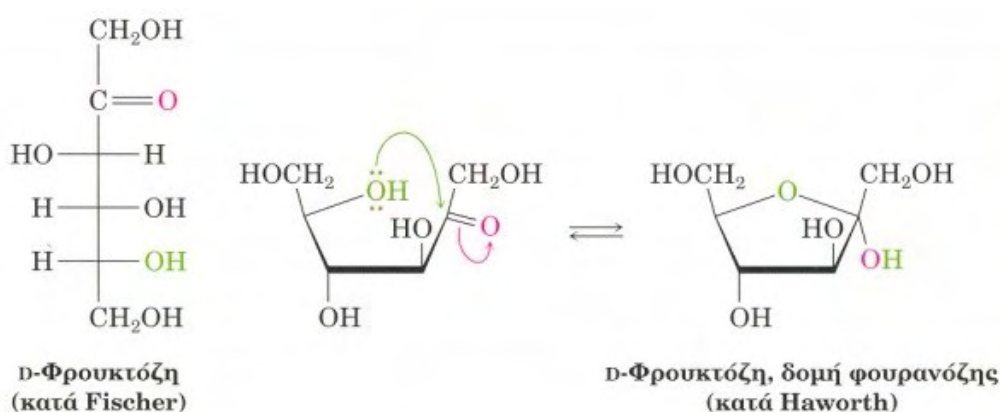
Σχήμα 1. Ο βασικός μηχανισμός σχηματισμού ακεταλών.

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



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

Όλα τα σάκχαρα, δεν απαντούν ως εξαμελείς δακτύλιοι, στην ημιακεταλική μορφή τους. Ο πενταμελής, ημιακεταλικός δακτύλιος της φρουκτόζης, φαίνεται στο σχήμα 3. Πολλές αλδοπεντόζες και κετοεξόζες σχηματίζουν πενταμελείς δακτυλίους. Οι πενταμελείς δακτύλιοι, δεν είναι τόσο πτυχωμένοι όσο οι εξαμελείς και έτσι απεικονίζονται συνήθως ως επίπεδες προβολές Haworth.



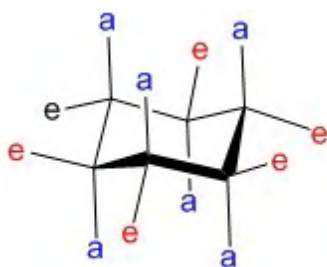
Σχήμα 3. Σχηματισμός φουρανόζης
(http://www.biology.uoc.gr/courses/BIO6_Organiki_Ximia/Lectures/Lecture%2020.pdf).

Οι κυκλικές δομές των μονοσακχαριτών, ονομάζονται σύμφωνα με τους πεντα- ή εξαμελείς δακτυλίους τους. Οι εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες ονομάζονται πυρανόζες, από τον εξαμελή, κυκλικό αιθέρα πυράνιο. Οι πενταμελείς κυκλικές ημιακετάλες ονομάζονται φουρανόζες, από τον πενταμελή κυκλικό αιθέρα φουράνιο. Όταν ο δακτύλιος μιας πυρανόζης ή φουρανόζης, κλείνει, το ημιακεταλικό άτομο άνθρακα, μετατρέπεται από μία επίπεδη καρβονυλομάδα σε έναν ασύμμετρο άνθρακα. Ανάλογα με το ποιά πλευρά της (πρωτονιωμένης) καρβονυλομάδας προσβάλλεται, η ημιακεταλική ομάδα -OH, μπορεί να κατευθύνεται πάνω ή κάτω. Οι δύο αυτοί προσανατολισμοί της ημιακεταλικής ομάδας -OH, δίνουν διαστεreoμερή προϊόντα που ονομάζονται

ανωμερή. Το ημιακεταλικό άτομο άνθρακα ονομάζεται ανωμερικός άνθρακας και αναγνωρίζεται εύκολα ως το μόνο άτομο άνθρακα που συνδέεται με δύο οξυγόνα (L.G. Wade, J.R. 2012). Για παράδειγμα, στη γλυκόζη με την αντιστρεπτή της κυκλοποίηση προκύπτουν δύο δομές, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη. Στην περίπτωση της α-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «α» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση trans ως προς τον υποκαταστάτη $-CH_2OH$ του C-5 (δηλαδή βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). Στην περίπτωση της β-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «β» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση cis ως προς τον υποκαταστάτη $-CH_2OH$ του C-5 (δηλαδή βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου).

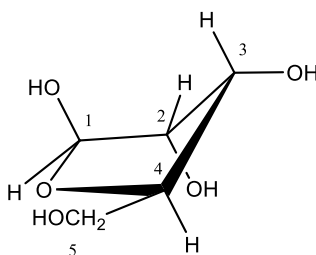
Οι προηγούμενες δομές (Haworth) αν και εύχρηστες δεν μας παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης. Ο συγκεκριμένος δακτύλιος δεν είναι δυνατόν να είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα. Αντίθετα, οι δακτύλιοι της πυρανόζης μπορούν να υιοθετήσουν στερεοδιατάξεις ανάκλιντρου, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι τάσεις, εφόσον όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνιάς (McMurry, 2000, p. 151).

Οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου είναι δύο ειδών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί (Σχήμα 4). Οι αξονικοί δεσμοί είναι σχεδόν κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί δεσμοί είναι σχεδόν παράλληλοι προς το επίπεδο αυτό. Οι αξονικοί υποκαταστάτες προβάλλουν πάνω και κάτω από το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί υποκαταστάτες διατάσσονται στην περιφέρεια. Οι αξονικοί υποκαταστάτες, εκτός του υδρογόνου, παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλο, αν ξεπροβάλουν από την ίδια πλευρά του δακτυλίου. Αντίθετα, υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για τους ισημερινούς υποκαταστάτες. Έτσι, ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ό,τι στην αξονική θέση.



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

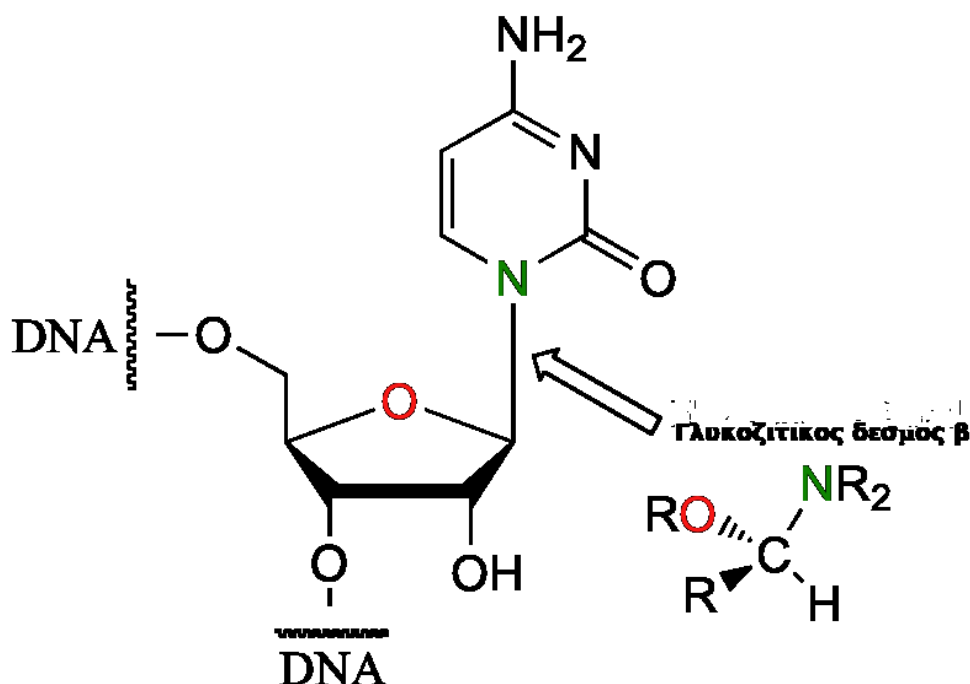
Κατά αναλογία ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να είναι πτυχωμένος, έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού (Σχήμα 5). Αυτή η διαμόρφωση καλείται μορφή φακέλου. Οι δακτύλιοι της φουρανόζης είναι σε θέση να αλληλομετατρέπονται ταχύτατα σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις. Είναι πολύ πιο ευέλικτοι από τους δακτυλίους της πυρανόζης, γεγονός που εξηγεί την επιλογή τους ως συστατικών του RNA και DNA (Stryer, 2001).



Σχήμα 5. Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης

1.3 Νουκλεοζίτες

Μια μονάδα που αποτελείται από μια βάση δεσμευμένη σε ένα σάκχαρο ονομάζεται νουκλεοζίτης. Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς της φύσης καθώς αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Οι τέσσερις μονάδες νουκλεοζιτών στο RNA ονομάζονται αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη και ουριδίνη, ενώ στο DNA ονομάζονται δεοξυαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυκυτιδίνη και θυμιδίνη. Σε κάθε περίπτωση, το N-9 μιας πουρίνης ή το N-1 μιας πυριμιδίνης συνδέεται στο C-1' του σακχάρου. Η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου όταν η δομή γράφεται με τον κλασικό τρόπο, δηλαδή η διαμόρφωση του γλυκοζιτικού δεσμού N είναι β (Σχήμα 6).



Σχήμα 6. Ο N- γλυκοζιτικός δεσμός β σε ένα νουκλεοζίτη

(http://chemwiki.ucdavis.edu/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_With_a_Biological_Emphasis/Chapter_11%3A_Nucleophilic_carbonyl_addition_reactions/Section_11.5%3A_N-glycosidic_bonds).

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

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

1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Όπως είναι γνωστό, η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά, αλλά έχουν και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα

κύτταρα με παθητική διάχυση. Επιπλέον, αφού εισέλθουν, πραγματοποιείται ενδοκυτταρική τροποποίησή τους με σκοπό την παραγωγή των αντίστοιχων νουκλεοτιδίων τους, τα οποία χρησιμοποιούν οι πολυμεράσες ως βασικές δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA. Βασιζόμενοι στην παθητική διάχυση, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα, μόρια που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, χρησιμοποιήθηκαν ως αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες για τη θεραπεία πληθώρας ασθενειών (Zhou *et al.* 2004).

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

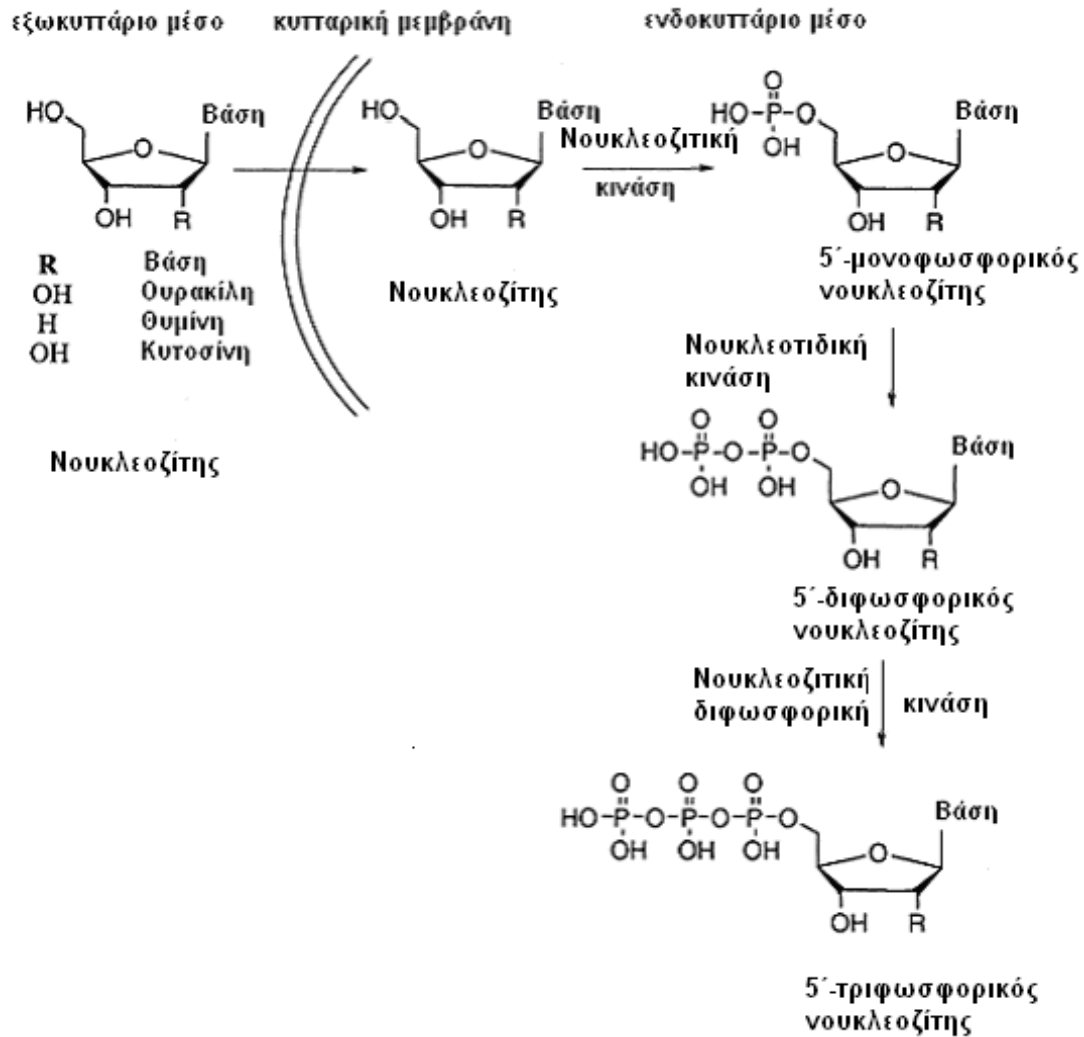
Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών αποτελούν στην πραγματικότητα ανενεργά προφάρμακα, τα οποία ενδοκυτταρικά πρέπει να τροποποιηθούν ώστε να μπορέσουν να δράσουν. Η διαδικασία αυτή συνίσταται στη φωσφορυλίωσή τους από τις κυτταρικές ή ιικές κινάσες (Arner and Eriksson, 1995). Αφού φωσφορυλιωθούν προς τις τριφωσφορικές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

Ένας κοινός μηχανισμός αντιϊκής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωσή τους στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της. Οι κυτταρικές πολυμεράσες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με ταυτόχρονη απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων (Lewin 2003, Burns *et al.*, 2005). Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας.

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

Για τους αντιϊκούς νουκλεοζίτες, 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 *et al.* 2000, Balzarini 1993). Οι μετέπειτα φωσφορυλιώσεις προς τις διφωσφορικές και τριφωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών καταλύονται

από νουκλεοδιτικές κινάσες και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντιστοίχως (Σχήμα 7). Η φωσφορυλίωση από ικές 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 ικές πολυμεράσες. Μιμούμενα τους φυσικούς νουκλεοζίτες, τα αντικά ανάλογά τους μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τις πολυμεράσες και να ενσωματωθούν στο ικό γονιδίωμα. Η ενσωμάτωσή τους στο ικό γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει διακοπή της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, να το καταστήσει μη λειτουργικό και κατά συνέπεια να καταστείλει την αντιγραφή του ιού και την περαιτέρω παραγωγή ιοσωματιδίων. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος είναι συντηρημένος σε πολλά είδη ιών, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να παρουσιάσουν δράση έναντι μεγάλου φάσματος ιών (Chong *et al.* 2002). Αξίζει να σημειωθεί πως μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ική πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητα τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.



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

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

1.5 Νουκλεοζίτες με αντικαρκινική δράση

Ο καρκίνος ευθύνεται για ένα μεγάλο ποσοστό των θανάτων στις βιομηχανικές χώρες. Εμφανίζεται αφού φυσιολογικά κύτταρα μετασχηματιστούν σε νεοπλασματικά, μέσω μεταβολής του γενετικού τους υλικού και ανώμαλης

έκφρασης ορισμένων γονιδίων. Η θεραπεία ασθενών που πάσχουν από καρκίνο επιδιώκει να:

- προσφέρει ανακούφιση, για παράδειγμα άμεση ανακούφιση από δυσάρεστα συμπτώματα,
- επάγει την ύφεση ώστε να εξαφανιστούν όλα τα μακροσκοπικά και μικροσκοπικά χαρακτηριστικά του καρκίνου, ακόμη και αν είναι γνωστό πως η νόσος εξακολουθεί να υφίσταται και τέλος,
- θεραπεύσει, για το οποίο όλα τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να καταστραφούν.

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

Η αναγνώριση των αντικαρκινικών και κυτταροστατικών ιδιοτήτων των νουκλεοζιτών και των αναλόγων τους, αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Matsuda A. *et al.* 2004, Cory A. H. *et al.* 1994, Manta S. *et al.* 2010). Κάποια από τα πιο γνωστά αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα ανήκουν στην κατηγορία των αντιμεταβολιτών, μια κατάταξη των αντικαρκινικών φαρμάκων σύμφωνα με το βιοχημικό μηχανισμό της αντικαρκινικής δράσης τους. Ένα παράδειγμα τέτοιου μηχανισμού είναι η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων από πυριμιδινικούς [5'- fluorouracil, cytarabine (AraC), Σχήμα 8] και πουρινικούς ανταγωνιστές (Σχήμα 9) που έχουν υποσχόμενη δράση σε διάφορους ανθρώπινους στερεούς όγκους όπως του παγκρέατος, των ωοθηκών και ο καρκίνος του πνεύμονα (Hardman J.G. *et al.* 2001).



Σχήμα 8. Οι δομές των πυριμιδινικών ανταγωνιστών 5-φθορο-ουρακίλη, φαίνεται ο ενεργός μεταβολίτης της 5'- FdUMP (αριστερά) και AraC (δεξιά).

Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος

καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).

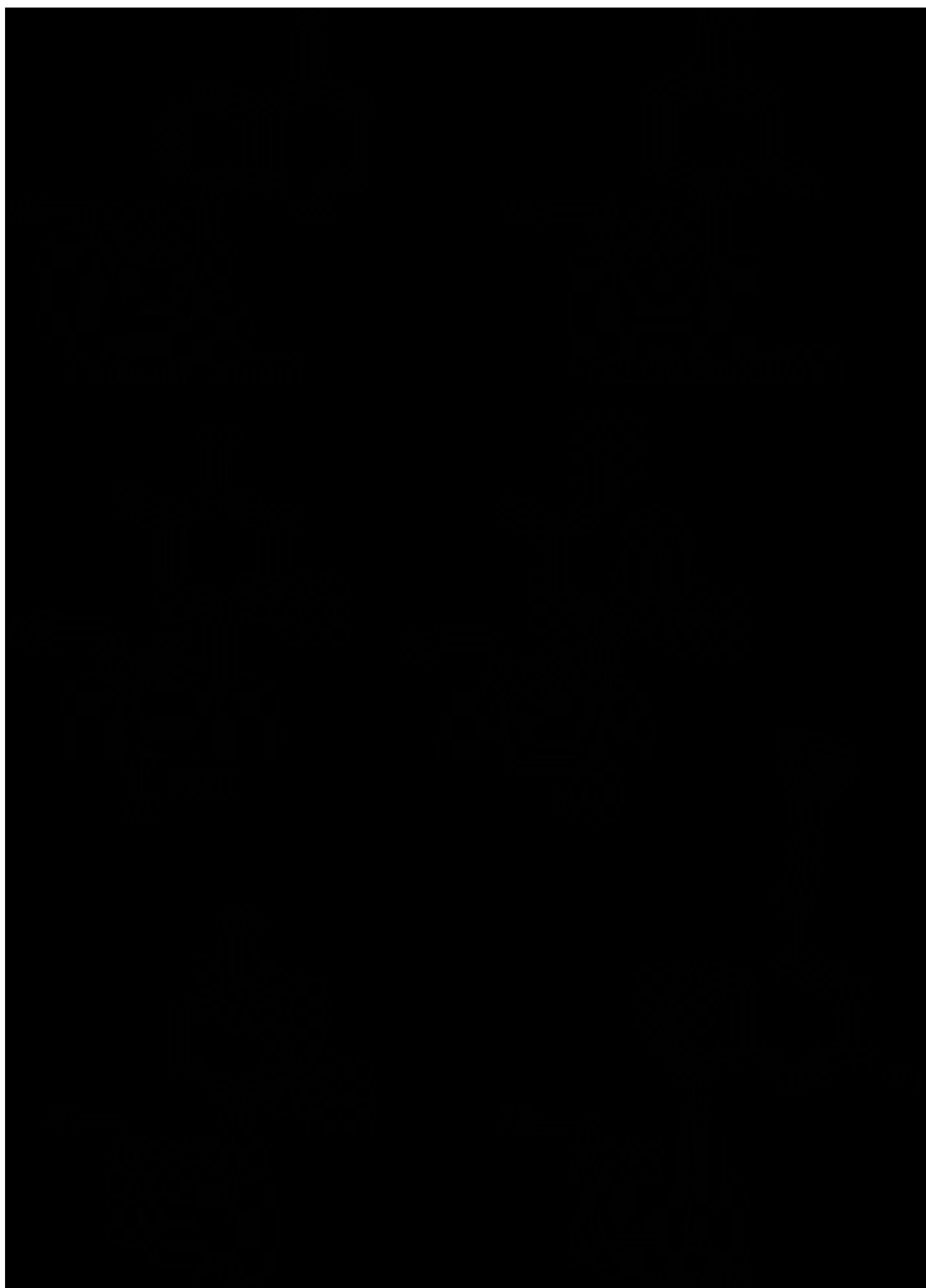


Σχήμα 9. Η δομή του Clofarabine, παράδειγμα ενός πουρινικού ανταγωνιστή (John A. Secrist, 2005).

1.6 Νουκλεοζίτες με αντιική δράση

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

Ήδη πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στην ιατρική έναντι ιών όπως το ιού που προκαλεί το AIDS (HIV), του ιού της ηπατίτιδας B (HBV), των ερπητοϊών (HSV 1-2), του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) και του ιού του έρπητα ζωστήρα (VZV). Στην περίπτωση του HIV ανάμεσα στα νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά είναι τα ddC, AZT, ddI, d4T, abacavir και 3TC που δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού (Σχήμα 10). Για τον ιό HBV έχει ήδη εγκριθεί στην Αμερική και χρησιμοποιείται το 3TC σε συνδυασμό με ιντερφερόνη-α. Για τον CMV, τον HSV 1 και 2 και τον VZV χρησιμοποιείται πλήθος νουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως βιδαραβίνη, ακυκλοβίρη, ιδοξουριδίνη, τριφλουριδίνη, ασεδουρίδη, γανσικλοβίρη, βαλακυκλοβίρη και άλλα (Gumina G. *et al.* 2001).



Σχήμα 10. Οι δομές των νουκλεοζιτικών αναλόγων αναστολέων της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού του AIDS.

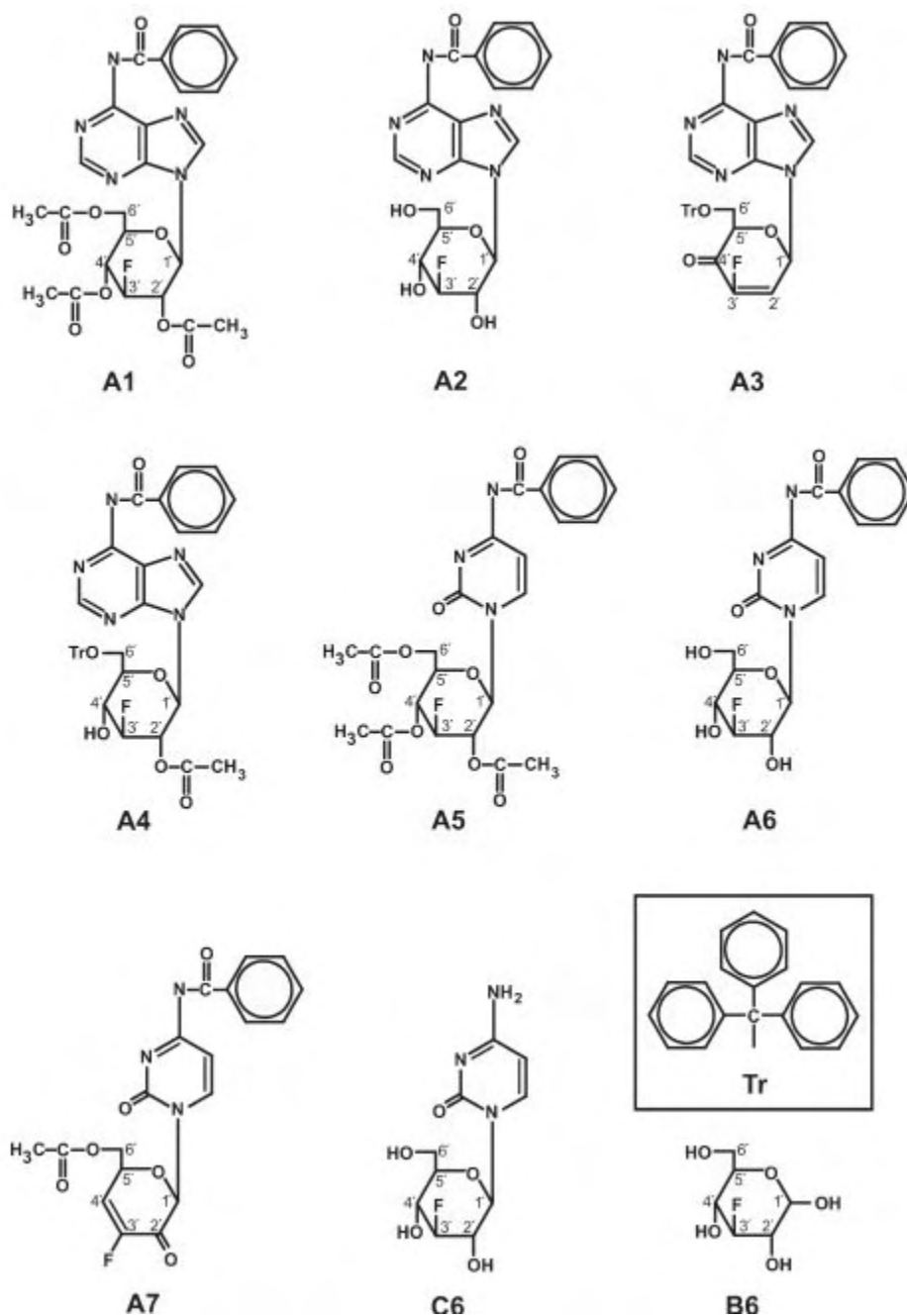
1.7 Πυρανονουκλεοζίτες

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

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η έρευνα για την ανακάλυψη αντικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είχε μείνει αρκετά βήματα πίσω σε σχέση με αυτή των βιολογικώς ενεργών νουκλεοζιτών με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίους. Παρόλα αυτά, νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντικές (Verheggen *et al.* 1993, Verheggen *et al.* 1995, Maurinsh *et al.* 1997, Ostrowski *et al.* 1998), αντικαρκινικές (Antonakis 1989) και αντιβιοτικές τους ιδιότητες (Haouz *et al.* 2003), καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων (Vastmans *et al.* 2000, Vastmans *et al.* 2001).

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

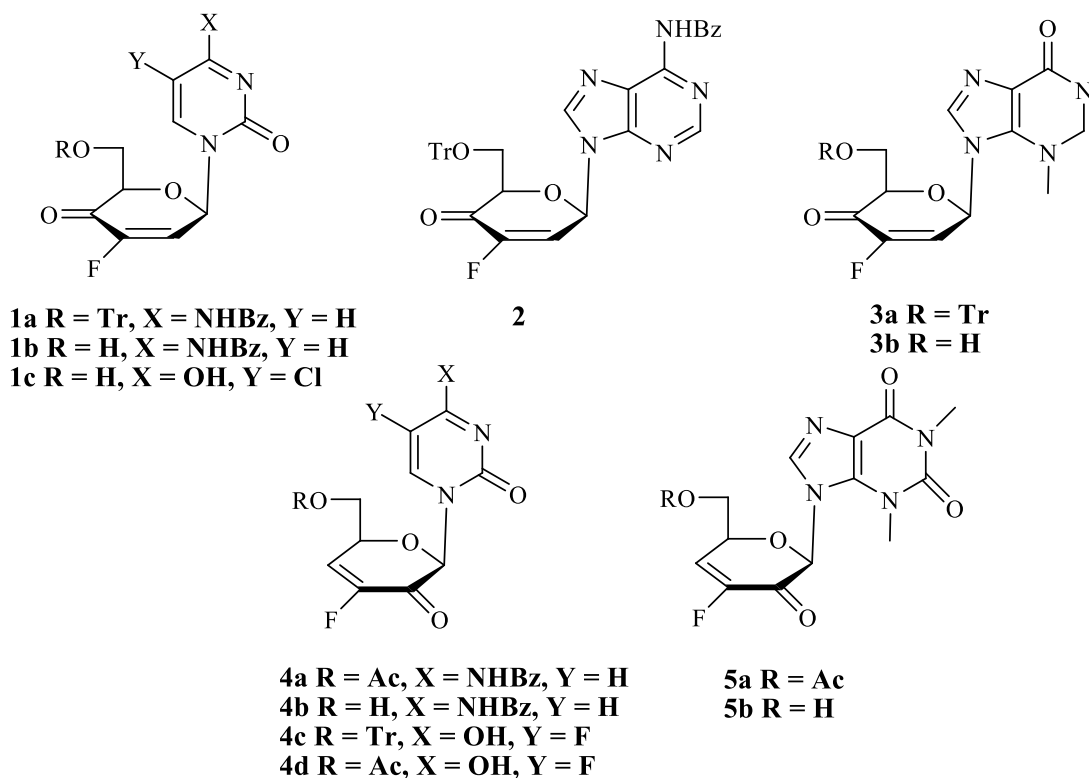
Στο εργαστήριο Βιο- Οργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έχουν συντεθεί φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Manta *et al.* 2007), οι οποίοι μειώνουν αποτελεσματικά τη δραστηριότητα της PARN, ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(Α) ουράς) (Σχήμα 11). Τα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπες ενώσεις για την ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν την PARN (Balatsos *et al.* 2009).



Σχήμα 11. Οι δομές φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών.

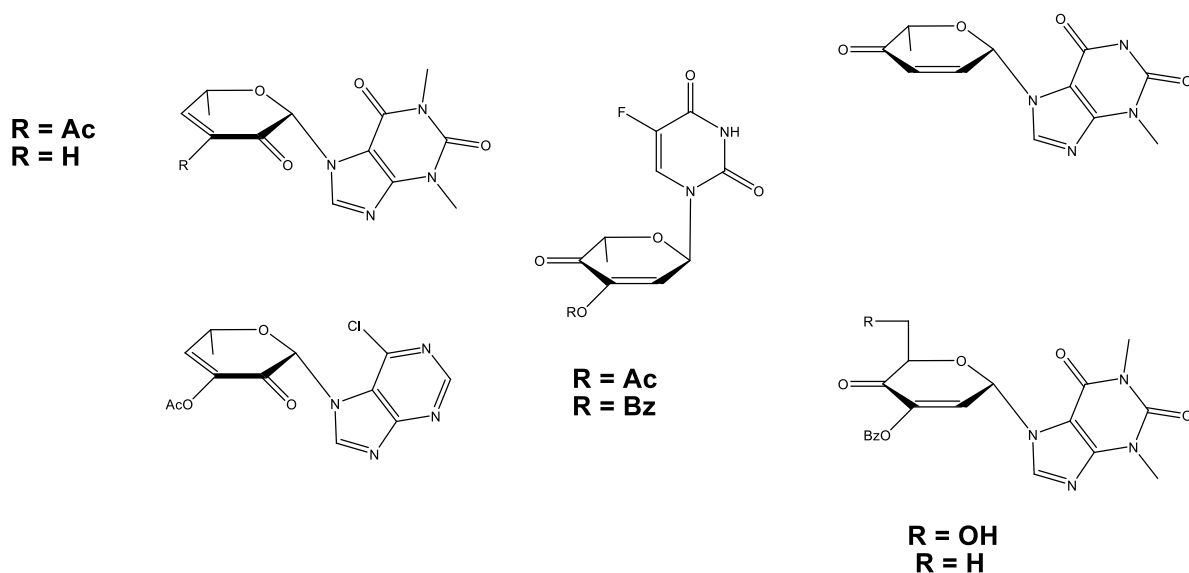
Ακόμη, φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες έχουν αξιολογηθεί και ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP), ένζυμο με κεντρικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου και υπεύθυνο για την παραγωγή γλυκόζης στο αίμα (γλυκογενόλυση). Η λεπτομερής ανάλυση των παραγόντων που καθορίζουν τη σύνδεση μικρομοριακών 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 καθώς και ένα φθοριωμένο δεοξυ-πυρανονουκλεοζιτικό ανάλογο της N^4 -βενζοϋλοκυτοσίνης 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 αντικές και τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες (ενώσεις **1-5**, Σχήμα **12**). Αξιοσημείωτη είναι η αντική δράση εναντι του εντεροϊού (rotavirus), που επέδειξαν οι ενώσεις **1a,b**, **2** και **4a,b**.



Σχήμα 12. Οι δομές ακόρεστων φθορο κετοπυρανονουκλεοζιτών.

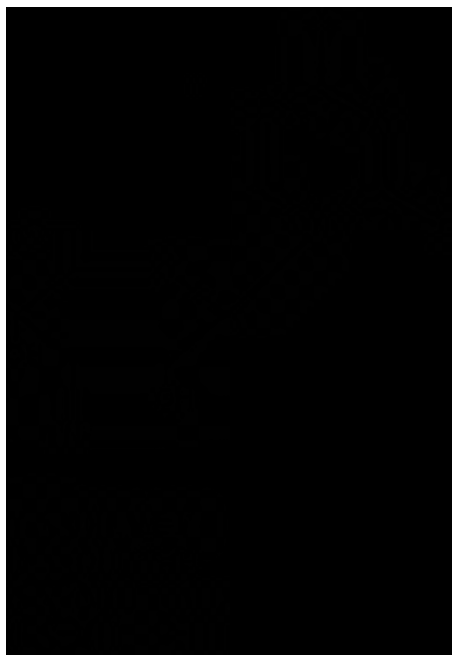
Επιπρόσθετα, ακόρεστα κετο- πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα παρουσίασαν, σε προηγούμενες μελέτες, σημαντική ανασταλτική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων *in vitro* αλλά και *in vivo* (Komiotis *et al.* 1991, Patterson *et al.* 1998, Komiotis *et al.* 2008) (Σχήμα 13).



Σχήμα 13. Ακόρεστα κετο-πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα.

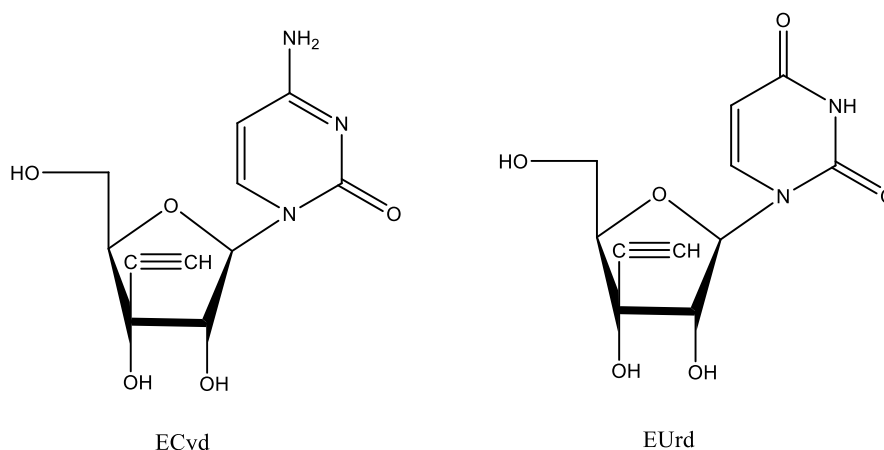
Πρόσφατα μια νέα τάξη πυρανονουκλεοζιτών που έχει μελετηθεί είναι αυτή των 3'-κυανιδρινών και 3'-δεοξυ-κυανο πυρανονουκλεοζιτών (Kiritsis *et al.* 2011). Οι

συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες αξιολογήθηκαν για την αντιική τους δράση έναντι μιας πληθώρας DNA και RNA ιών, ενώ παρουσίασαν σημαντική κυτταροστατική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων Τ-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και κατά του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa) (Σχήμα 14).



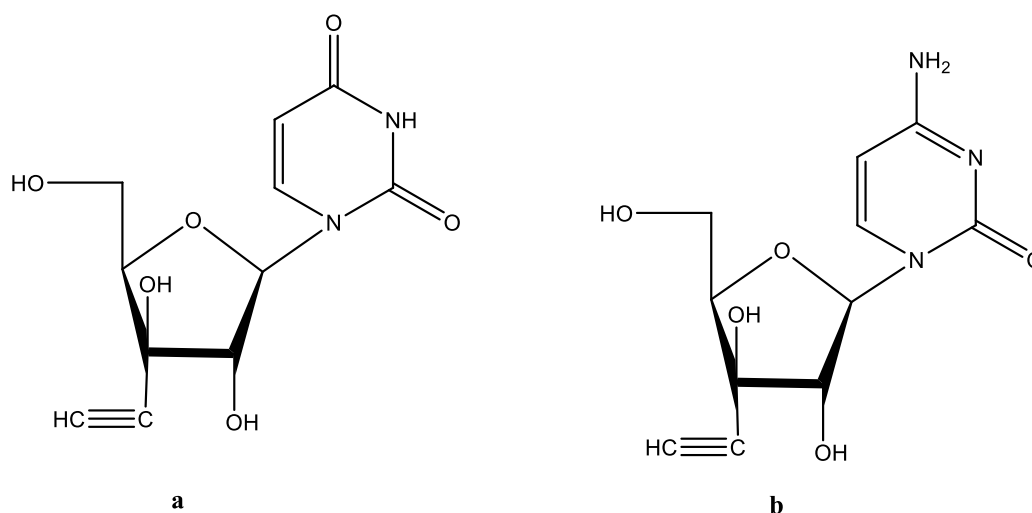
Σχήμα 14. Η δομή των κυανο πυρανονουκλεοζιτών.

Μια σημαντική κατηγορία νουκλεοζιτικών αναλόγων των οποίων η μελέτη έχει ξεκινήσει και συνεχίζει να προσελκύει το ενδιαφέρον των επιστημόνων λόγω των σημαντικών ιδιοτήτων τους, αποτελούν οι νουκλεοζίτες με διακλάδωση την αιθύνυλο ομάδα. Στη μελέτη του Hattori Hideshi το 1996 είχε διαπιστωθεί ότι οι νουκλεοζίτες της ουρακίλης και της κυτοσίνης (Σχήμα 15) που φέρουν αιθύνυλο ομάδα ως διακλαδισμένη αλυσίδα στο τμήμα του σακχάρου εμφανίζουν εξαιρετικές αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι 1-(3-C-αιθυνυλ-β-D-ριβο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη ECyd και 1-(3-C-αιθυνυλ-β-D-ριβο-πενταφουρανοζυλο)ουρακίλη EUrd δοκιμάστηκαν *in vitro* σε 36 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η ECyd ήταν αποτελεσματική σε 22 κυτταρικές σειρές, ενώ αντίστοιχα η EUrd σε 12. Και οι δύο νουκλεοζίτες είχαν παρόμοιο φάσμα παρεμποδιστικής λειτουργίας και συνεπώς παρόμοιο μηχανισμό αντικαρκινικής δράσης. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ECyd και EUrd έχουν πιο ισχυρή αντικαρκινική λειτουργία ενάντια σε καρκινικούς όγκους απ' ότι κάποιες άλλες ουσίες που συχνά χρησιμοποιούνται κλινικά (Matsuda A. *et al*, 1996).



Σχήμα 15. Χημικές δομές της ECyd και EUrd

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

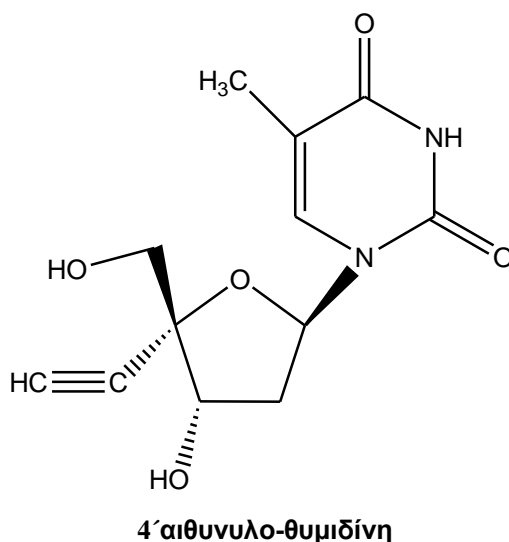


Σχήμα 16. 3' επιμερή των ECyd και EUrd

Όσον αφορά το μεταβολισμό της, η ECyd φωσφορυλιώνεται στα κύτταρα προς το μονοφωσφορικό, διφωσφορικό και τελικά τριφωσφορικό της παράγωγο (Nomura M. *et al*, 2003). Το πρώτο βήμα από την ECyd στην 1-(3-C-αιθυνυλ-β-D-ριβο-πεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη μονοφωσφορική (ECMP) καταλύεται από την ουριδινική/κυτιδινική κινάση. Το τριφωσφορικό παράγωγο της κυτιδίνης (ECTP) είναι ένας ενεργός μεταβολίτης της ECyd και παρεμποδίζει την RNA πολυμεράση I, II και III χωρίς εκλεκτικότητα, προκαλώντας παρεμπόδιση της σύνθεσης του RNA. Η ECyd κατανέμεται σε μεγάλο ποσοστό σε καρκινικούς ιστούς (*in vivo*), στους οποίους η ενεργοποίηση της ουριδινικής/κυτιδινικής κινάσης είναι υψηλότερη από

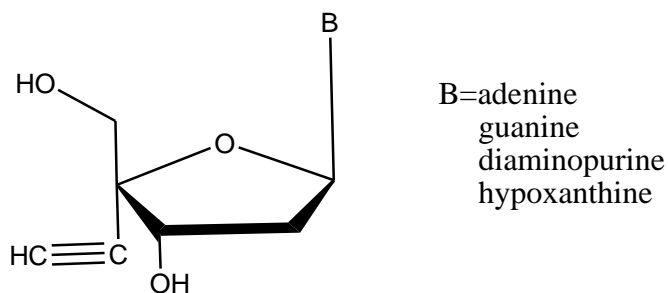
τους κανονικούς ιστούς. Αυτά τα δεδομένα θα μπορούσαν να εξηγήσουν την υψηλή ενεργοποίηση και τη χαμηλή τοξικότητα της ECyd ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνου.

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον προέκυψε και από την ανακάλυψη της ισχυρής αντί-HIV δράσης των 4'-αιθύνυλο αναλόγων της θυμιδίνης (Σχήμα 17) (O-Yang C. *et al*, 1992 και Kodama E. N. *et al*, 2001).



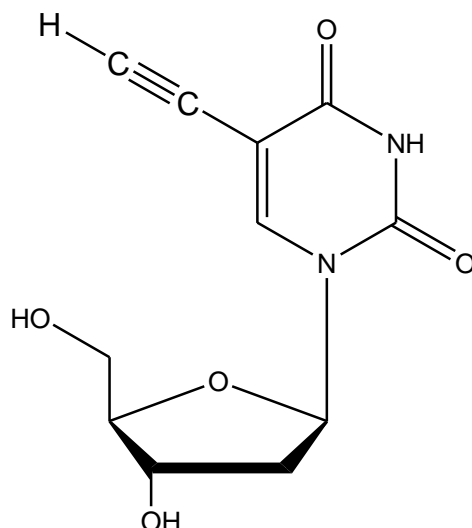
Σχήμα 17. Δομή 4' - υποκατεστημένων νουκλεοζιτών της θυμίνης

Οι πουρίνο 2'-δεοξυ νουκλεοζίτες που διαθέτουν μια αιθύνυλο ομάδα στον 4' άνθρακα του σακχάρου, εμφανίζουν επίσης πολύ ισχυρή αντί-HIV δράση, παραμένοντας ενεργοί απέναντι σε ανθεκτικά στελέχη του HIV (Kongo S. *et al*, 2003). Η δομή του νουκλεοζίτη απεικονίζεται στο (Σχήμα 18).



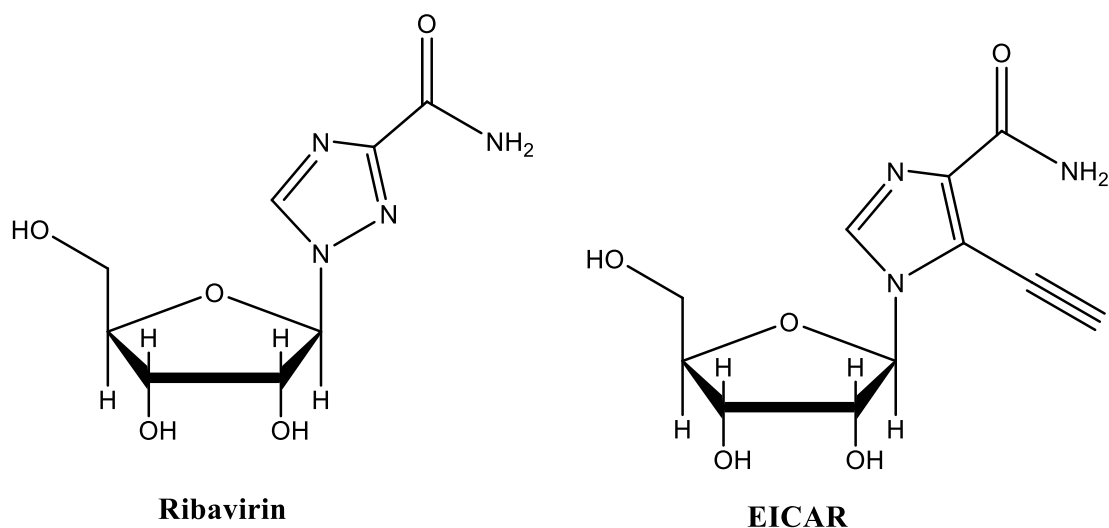
Σχήμα 18. Δομή του αιθύνυλο πούρινο 2'-δεοξυ νουκλεοζίτη.

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



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

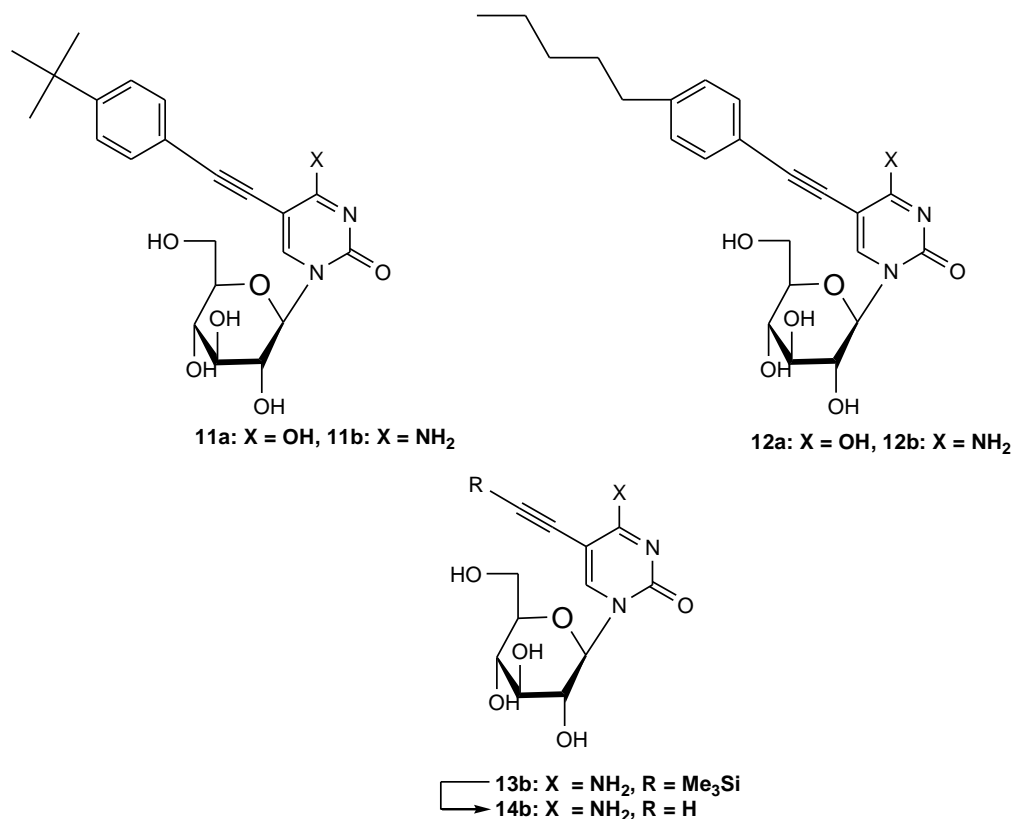
Επιπλέον το 5-αιθυνυλ-1-β-D-ριβοφουρανοζυλο-1H-ιμιδαζολο-4 καρβοξαμίδιο (EICAR) που επίσης φέρει την αιθύνυλο ομάδα στην ετεροκυκλική βάση παρουσιάζει εξαιρετικές αντικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα η αντική του λειτουργία είναι από 10 έως 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του Ribavirin (Minakawa N. *et al*, 1999), του μόνου διαθέσιμου φαρμάκου που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C σε συνδυασμό με interferon-α (De Clercq E. *et al*, 2002). Επιπλέον της αντικής του δράσης, το EICAR επιδεικνύει αντικαρκινική λειτουργία και εμποδίζει την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών κυττάρων *in vitro* (Minakawa N. *et al*, 1991). Παρακάτω (Σχήμα 20) απεικονίζονται οι δομές των Ribavirin και EICAR.



Σχήμα 20. Χημικές δομές του Ribavirin και EICAR.

Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματός μας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των C5-αλκύνυλ-γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης και της

κυτοσίνης, (Σχήμα 21) οι οποίοι έχουν επιδείξει αξιόλογη ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών.



Σχήμα 21. Χημική δομή των C5-αλκύνυλ-γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης και της κυτοσίνης.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

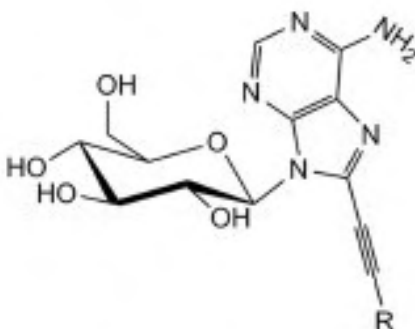
2.1 Σκοπός

Τα συνθετικά ανάλογα νουκλεοζιτών με τροποποιημένα τμήματα της βάσης έχουν μεγάλη σημασία για την αναζήτηση υποσχόμενων υποψήφιων φαρμάκων με αντιική, αντικαρκινική και αντιβακτηριδιακή δράση (Manta et al., 2014, Herdewijn, 2008). Ανάμεσα τους, μεγάλος αριθμός νουκλεοζικών παραγώγων υποκατεστημένων στην πουρίνη ή την πυριμιδίνη εμφάνισαν δράση τόσο σε συμπαγείς όσο και σε αιματολογικούς όγκους, συμπεριφερόμενοι ως αντιμεταβολίτες και ανταγωνιζόμενοι τα φυσιολογικά νουκλεοτίδια και κατά συνέπεια αλληλεπιδρώντας με ένα μεγάλο αριθμό ενδοκυτταρικών στόχων επάγοντας την κυτταροτοξικότητα (Hatse et al., 1999).

Οι αλκυνυλ-τροποποιημένοι νουκλεοζίτες και ειδικά τα ανάλογα πυριμιδίνης υποκατεστημένα στον C-5 και τα ανάλογα πουρίνης υποκατεστημένα στον C-8 έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες (Vivet-Boudou et al., 2011; Lee et al., 2009; Meneni et al., 2007; Lin et al., 1985). Μερικά αντιπροσωπευτικά παραδείγματα περιλαμβάνουν την 5-αιθυνύλ-2-δεοξουριδίνη με δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων μαστού που υπερβαίνει αυτή της σισπλατίνης και της 5-φθοροουρακίλης, ενώ η 5-βρομοαιθυνύλουριδίνη κατέδειξε σημαντικές ιδιότητες έναντι του HCV (Meneni et al., 2007; Escuret et al., 2005). Παρά το γεγονός ότι μικρή προσπάθεια έχει γίνει προς την κατεύθυνση σύνθεσης C-8 υποκατεστημένων νουκλεοζιτών, σε μερικές περιπτώσεις έχουν αναφερθεί ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες, όπως στην περίπτωση κάποιων 8-αλκυνυλ αδενοσινών, που αποδείχθηκαν πολύ εκλεκτικοί συνδέτες για τον υπότυπο A3 του υποδοχέα της αδενοσίνης, συμπεριφερόμενοι ως ανταγωνιστές της αδενοσίνης (Volpini et al., 2001) καθώς και για διάφορες C-8 τροποποιημένες 2-δέοξυ αδενοσίνες, οι οποίες επάγουν καθυστερημένο τερματισμό αλυσίδας *in vitro* κι έδειξαν ποικίλη αντι-HIV δραστηριότητα σε κυτταρικές καλλιέργειες (Vivet-Boudou et al., 2011).

Λαμβάνοντας υπόψη την πρόοδο που έχει γίνει προς αυτήν την κατεύθυνση, πρόσφατα ξεκίνησε η σύνθεση των C5-αλκυνύλ υποκατεστημένων γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης και της κυτοσίνης, οι οποίοι φέρουν υποκαταστάτες όπως γραμμικές αλκύλο αλυσίδες και αρωματικούς δακτυλίους υποκατεστημένους με γραμμικές και διακλαδισμένες αλκυλομάδες (Dimoroulou et al., 2013). Οι συγκεκριμένοι πυρανονουκλεοζίτες έδειξαν αποτελεσματική αναστολή του πολλαπλασιασμού μιας ποικιλίας καρκινικών κυτταρικών σειρών καθώς και αποδείχθηκαν ως μερικοί από τους πιο ισχυρούς αναστολείς του ενεργού κέντρου της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (Kantsadi et al., 2012). Μεταξύ αυτών των παραγόντων ο C5-φαινυλαιθυνύλ πυρανονουκλεοζίτης της ουρακίλης έδειξε αξιόλογη κυτταροτοξική ενεργότητα (IC₅₀ of 5.2-6.2 μM), συγκρινόμενη με αυτή της 5-φθοροουρακίλης (Dimoroulou et al., 2013). Σκοπός λοιπόν της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση C-8 τροποποιημένων πυρανονουκλεοζιτών (Σχήμα 22), που φέρουν τροποποιήσεις στο τμήμα του σακχάρου ή της βάσης, ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί ή/και αντιικοί παράγοντες.

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



Σχήμα 22. Δομή των νεοσυντιθέμενων C8 τροποποιημένων γλυκοπυρανονουκλεοζιτών.

3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

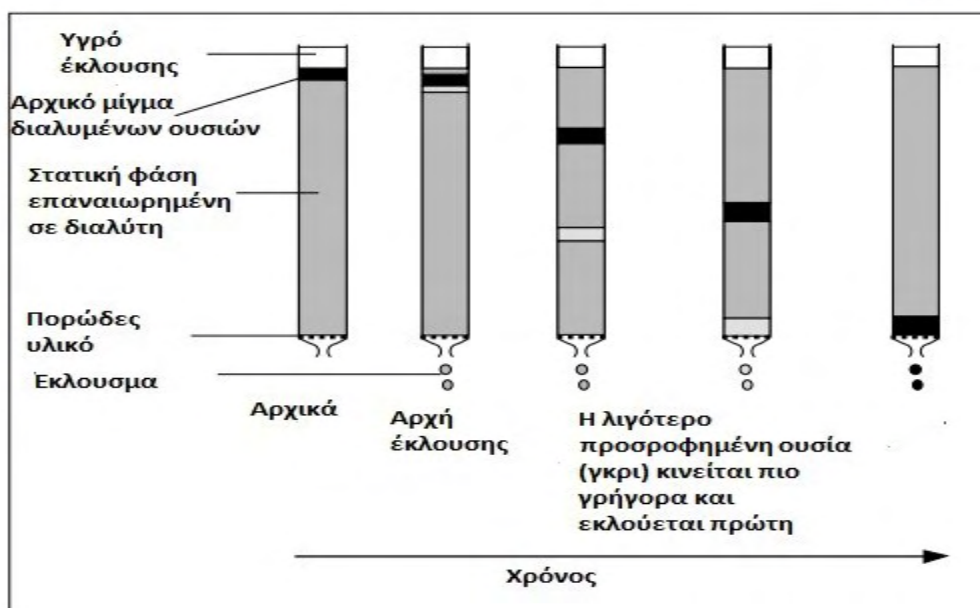
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)

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

3.2 Χρωματογραφία στήλης

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

Η χρωματογραφία στήλης ή υγρή χρωματογραφία, χρησιμοποιεί υγρό ως κινητή φάση. Η στατική φάση είναι συνήθως ένα αδρανές στερεό όπως η silica gel. Όλες οι χρωματογραφικές τεχνικές βασίζονται σε ένα από τα ακόλουθα φαινόμενα: προσρόφηση, διαχωρισμός, ανταλλαγή ιόντων ή μοριακός αποκλεισμός. Η χρωματογραφία προσρόφησης είναι αυτή που αναπτύχθηκε πρώτη. Κάθε διαλυμένη ουσία έχει τη δική της ισορροπία μεταξύ προσρόφησης επάνω στην επιφάνεια του στερεού και διαλυτότητας στο διαλύτη, η λιγότερο διαλυτή ή καλύτερα προσροφημένη κινείται πιο αργά. Το αποτέλεσμα είναι ένας διαχωρισμός σε ζώνες που περιέχουν διαφορετικές διαλυμένες ουσίες. Η υγρή χρωματογραφία που χρησιμοποιεί μία στήλη που περιέχει silica gel είναι ένα παράδειγμα χρωματογραφίας προσρόφησης (Σχήμα 23). Ο διαλύτης ο οποίος έχει τεθεί σε μια στήλη ονομάζεται το υγρό έκλουσης, και το υγρό που ρέει έξω από το άκρο της στήλης ονομάζεται έκλουσμα. Ο χρόνος έκλουσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα και από την πολικότητά της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες προσροφώνται κατά κανόνα, εντονότερα και άρα μετακινούνται βραδύτερα μέσω της στατικής φάσης σε σχέση με τα περισσότερα άπολα (Ben Faust 1997).



Σχήμα 23. Χρωματογραφία στήλης.

3.3. Ξήρανση διαλυτών

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

Η ξήρανση του ακετονιτρίλιου γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA (molecular sieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4\AA , όπου και αποθηκεύτηκε. Η δε πυριδίνη αποστάχθηκε παρουσία υδροξειδίου του καλίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4\AA , όπου και αποθηκεύτηκε.

3.4. Αντιδράσεις υπό την επίδραση ακτινοβολίας μικροκυμάτων

Όλα τα πειράματα με ακτινοβολία μικροκυμάτων πραγματοποιήθηκαν σε μια CEM-Explorer και CEM Discover συσκευή παραγωγής μικροκυμάτων, που λειτουργούσε σε συχνότητα 2.45 GHz με συνεχή ακτινοβολία από 0 έως 300 W χρησιμοποιώντας τυπικό επίπεδο μέγιστης απορρόφησης των 300 W. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν μέσα σε γυάλινους σωλήνες χωρητικότητας 10mL, σφραγισμένους με διάφραγμα από Teflon και τοποθετημένους μέσα στην συσκευή μικροκυμάτων. Αρχικά απαιτούνταν ακτινοβολία με μικροκύματα και η θερμοκρασία αυξανόταν γραμμικά από θερμοκρασία δωματίου έως την επιθυμητή θερμοκρασία. Εφόσον η επιθυμητή θερμοκρασία επετεύχθη, το μίγμα της αντίδρασης έμεινε σε αυτήν την θερμοκρασία για τον απαιτούμενο χρόνο. Το μίγμα αναδευόταν συνεχώς κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Η θερμοκρασία μετρήθηκε με IR στην εξωτερική επιφάνεια του φιαλιδίου. Μετά την ακτινοβολία, η αντίδραση ψύχθηκε ταχέως με αέριο μέχρι θερμοκρασία δωματίου.

3.5 Ταυτοποίηση ενώσεων

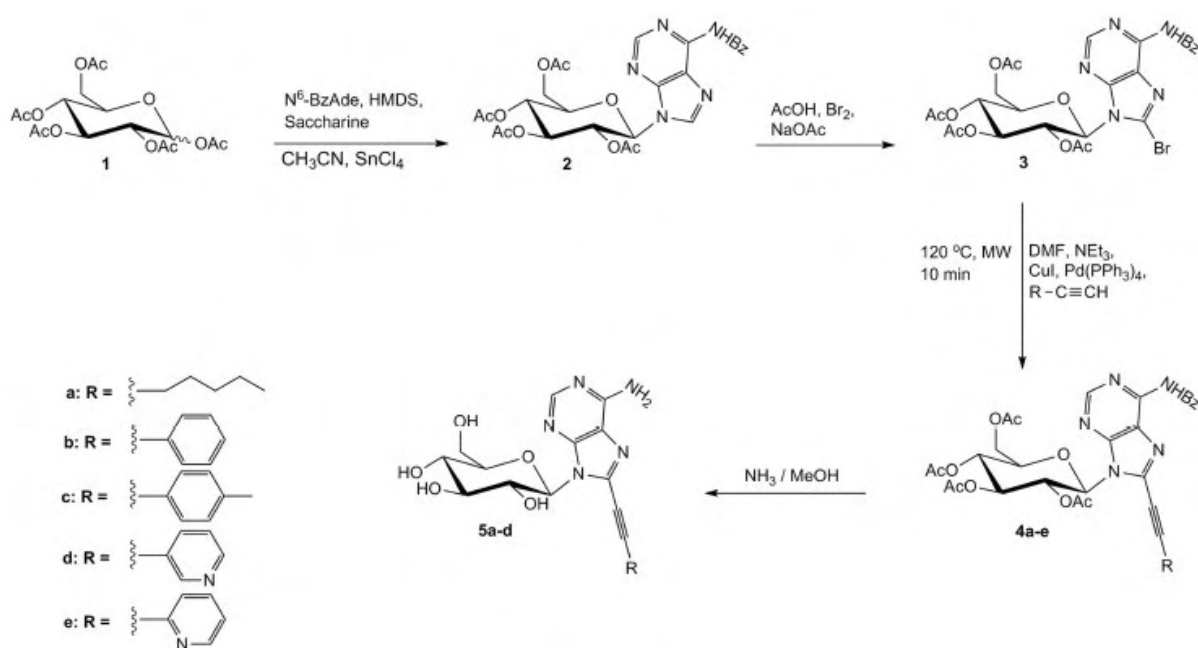
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί την πρώτη και χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική προσδιορισμού της δομής των

μορίων καθώς παρέχει ένα χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H -NMR καταγράφηκαν στα 300 MHz στο φωτόμετρο BrukerAVANCEIII 300 και τα φάσματα ^{13}C -NMR καταγράφηκαν στα 75.5 MHz στο ίδιο φωτόμετρο, χρησιμοποιώντας chloroform-d (CDCl_3), $\text{dimethylsulfoxide-d}_6$ (DMSO-d_6). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^1H .

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Επισκόπηση της σύνθεσης C8-υποκατεστημένων γλυκοπυρανονουκλεοζιτών



Σχήμα 24. Πορείες σύνθεσης C8 τροποποιημένων γλυκοπυρανονουκλεοζιτών.

4.1.1. 9-(2',3',4',6'-τέτρα-O-ακετύλ-β-D γλυκοπυρανοσύλ)-N6-βενζοϋλ αδενίνη (2)

Μίγμα N6-βενζοϋλ αδενίνης (3.33 mmol, 1.3 equiv), εξαμεθυλ διισιλαζανίου (HMDS) (4.13 mmol, 1.24 equiv) και σακχαρίνης (0.15 mmol, 0.046 equiv) σε άνυδρο

CH₃CN (14 mL) επώαστηκαν για 1 h κάτω από άζωτο. 1,2,3,4,6-πεντα-O-ακετυλ-D-γλυκοπυρανόζη (1) (2.56 mmol) και χλωριούχος κασσίτερος (IV) (SnCl₄) (3.58 mmol, 1.4 equiv) προστέθηκαν και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύθηκε για άλλες 2h, ψύχθηκε, εξουδετερώθηκε με ένυδρο διττανθρακικό νάτριο, και εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (1000 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε μέσω άνυδρου θειικού νατρίου, διηθήθηκε, και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα καθарίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (EtOAc/ hexanes 7:3) για να δώσει την ένωση 2, ως λευκό στερεό (56%); mp 169-171 °C; [α]_D²² = -6 (c 0.2, CHCl₃); R_f = 0.47 (EtOAc); λ_{max} 280 nm (ε 20557); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.83 (s, 1H, H-2), 8.22 (s, 1H, H-8), 8.04-7.51 (m, 5H, Bz), 5.98 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.4 Hz, H-1'), 5.65 (t, 1H, J = 9.3 Hz, H-3'), 5.50 (t, 1H, J = 9.4 Hz, H-2'), 5.32 (t, 1H, J = 9.7 Hz, H-4'), 4.34 (dd, 1H, J_{5',6a'} = 4.1 Hz, J_{6a',6b'} = 12.8 Hz, H-6a'), 4.19 (m, 1H, H-6b'), 4.05 (m, 1H, H-5'), 2.08, 2.07, 2.04, 1.79 (4s, 12H, 4OAc); Mass (M+H)⁺: 570.16; Anal. Calcd. for C₂₆H₂₇N₅O₁₀: C, 54.83; H, 4.78; N, 12.30%. Found: C, 55.16; H, 4.66; N, 12.53%.

4.1.2. 9-(2',3',4',6'-τέτρα-O-ακετύλ-β-D-γλυκοπυρανοσύν)-8-βρώμο-N6- βενζοϋλ αδερίνη (3)

Σε διάλυμα της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλ-β-D-γλυκοπυρανοσύν)-N6-βενζοϋλ αδερίνης (2) (250 mg, 0.44 mmol), και οξικού νατρίου (172 mg, 2.1 mmol) μέσα σε 1.6 mL παγόμορφου οξικού οξέος προστέθηκαν 75μL (1.45 mmol) βρωμίου. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ολοκλήρωσή της (14 h). Το μίγμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο Na₂S₂O₃. Η οργανική φάση πλύθηκε με νερό και διάλυμα χλωριούχου νατρίου, ξηράνθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο, διηθήθηκε, και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα καθарίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση (EtOAc/ hexanes 7:3) για να δώσει την ένωση 3, (60%); [α]_D²² = -3 (c 0.2, CHCl₃); R_f = 0.45 (EtOAc/ hexanes 7:3); λ_{max} 282 nm (ε 21223); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.82 (s, 1H, H-2), 8.04-7.49 (m, 5H, Bz), 6.21 (t, 1H, J = 9.6 Hz, H-2'), 5.96 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.6 Hz, H-1'), 5.47 (t, 1H, J = 9.4 Hz, H-3'), 5.35 (t, 1H, J = 9.9 Hz, H-4'), 4.26-4.25 (m, 2H, H-6a',b'), 4.01 (m, 1H, H-5'), 2.09, 2.07, 2.04, 1.79 (4s, 12H, 4OAc); Mass (M+H)⁺: 648.08; Anal. Calcd. for C₂₆H₂₆BrN₅O₁₀: C, 48.16; H, 4.04; Br, 12.32; N, 10.80%. Found: C, 48.44; H, 4.15; Br, 12.11; N, 10.99%.

4.1.3. Γενική πειραματική πορεία για την προετοιμασία προστατευμένων C8-αλκυνύλ αδερίνη πυρανονουκλεοζιτών (4a-e)

Τα κατάλληλα αλκίνια (3 equiv), Pd(PPh₃)₄ (0.1 equiv), CuI (0.1 equiv), τριαιθυλαμίνη (2 equiv) και 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλ-β-D-γλυκοπυρανοσύν)-8-βρώμο-N6-βενζοϋλ αδερίνη (3) (0.37 mmol), ακτινοβολήθηκαν με μικροκύματα (200

W) μέσα σε 1 mL άνυδρου DMF για 10 λεπτά στους 120 °C. Το μίγμα της αντίδρασης συμπυκνώθηκε υπό κενό και το ακατέργαστο υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση σε διοξείδιο του πυριτίου. Το καθαρό προϊόν ξηράνθηκε *in vacuo* για να δώσει τα αντίστοιχα παράγωγα 4a-e, ως άχρωμους αφρούς.

4.1.4. 9-(2',3',4',6'-τέτρα-O-ακετυλ-β-D-γλυκοπυρανοσύλ)-8-επτινύλ-N6- βενζοϋλ αδενίνη (4a)

56%; $[\alpha]_D^{22} = -4$ (c 0.4, CHCl₃); $R_f = 0.10$ (EtOAc/ hexanes 6:4); λ_{max} 303 nm (ϵ 22594); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.99 (br s, 1H, NH), 8.85 (s, 1H, H-2), 8.04-7.41 (m, 5H, Bz), 6.28 (m, 1H, H-2'), 5.95 (m, 1H, H-1'), 5.50-5.25 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.30-4.16 (m, 2H, H-6a',b'), 3.97 (m, 1H, H-5'), 2.62 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, α -CH₂), 2.09, 2.08, 2.05, 1.78 (4s, 12H, 4OAc), 1.68-1.35 (m, 6H, 3 x CH₂), 0.96 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 170.8, 170.5, 170.0, 169.8, 165.0, 153.5, 152.2, 151.3, 148.8, 134.9, 133.0, 129.2, 127.9, 119.9, 97.7, 94.5, 82.9, 70.8, 70.1, 67.5, 67.2, 63.7, 31.5, 31.2, 29.6, 22.3, 21.5, 21.3, 21.0, 20.9, 15.2; Mass (M+H)⁺: 664.26; Anal. Calcd. for C₃₃H₃₇N₅O₁₀: C, 59.72; H, 5.62; N, 10.55%. Found: C, 59.96; H, 5.94; N, 10.65%.

4.1.5. 9-(2',3',4',6'-τέτρα-O-ακετύλ-β-D-γλυκοπυρανοσύλ)-8-φαινυλαιθινύλ-N6- βενζοϋλ αδενίνη (4b)

66%; $[\alpha]_D^{22} = -6$ (c 0.4, CHCl₃); $R_f = 0.33$ (CH₂Cl₂/ MeOH 9.8:0.2); λ_{max} 300 nm (ϵ 29706); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.95 (br s, 1H, NH), 8.87 (s, 1H, H-2), 8.01-7.45 (m, 10H, Bz and Ph), 6.31 (t, 1H, $J = 9.3$ Hz, H-2'), 6.10 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.4$ Hz, H-1'), 5.49 (t, 1H, $J = 9.2$ Hz, H-3'), 5.40 (t, 1H, $J = 9.9$ Hz, H-4'), 4.31-4.22 (m, 2H, H-6a',b'), 4.03 (m, 1H, H-5'), 2.09, 2.05, 1.90, 1.77 (4s, 12H, 4OAc); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 170.6, 170.3, 169.9, 169.7, 165.3, 153.1, 152.4, 150.5, 148.5, 134.5, 133.8, 133.5, 129.9, 129.5, 129.0, 128.3, 123.6, 119.3, 102.6, 98.7, 87.3, 83.6, 70.5, 67.9, 67.5, 63.5, 21.5, 21.3, 20.9, 20.5; Mass (M+H)⁺: 670.18; Anal. Calcd. for C₃₄H₃₁N₅O₁₀: C, 60.98; H, 4.67; N, 10.46%. Found: C, 61.23; H, 4.28; N, 10.80%.

4.1.6. 9-(2',3',4',6'-τέτρα-O-ακετύλ-β-D-γλυκοπυρανοσύλ)-8-p-τολουαιθινύλ-N6- βενζοϋλ αδενίνη (4c)

61%; $[\alpha]_D^{22} = -10$ (c 0.3, CHCl₃); $R_f = 0.37$ (EtOAc/ hexanes 8:2); λ_{max} 325 nm (ϵ 27336); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.98 (br s, 1H, NH), 8.86 (s, 1H, H-2), 8.00-7.29

(m, 9H, Bz and ArH), 6.34 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz, H-3'), 6.08 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 5.51 (t, 1H, $J = 9.3$ Hz, H-2'), 5.37 (t, 1H, $J = 9.7$ Hz, H-4'), 4.29-4.22 (m, 2H, H-6a',b'), 4.03 (m, 1H, H-5'), 2.43 (s, 3H, CH₃), 2.09, 2.05, 1.91, 1.77 (4s, 12H, 4OAc); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 170.3, 170.1, 169.7, 169.3, 165.1, 153.2, 152.3, 150.7, 148.7, 139.5, 135.8, 133.7, 133.4, 129.6, 129.2, 128.8, 120.3, 120.1, 102.4, 98.3, 87.6, 83.5, 70.7, 67.5, 67.1, 63.7, 22.5, 21.7, 21.5, 21.0, 20.2; Mass (M+H)⁺: 684.22; Anal. Calcd. for C₃₅H₃₃N₅O₁₀: C, 61.49; H, 4.87; N, 10.24%. Found: C, 61.84; H, 4.52; N, 10.02%.

4.1.7. 9-(2',3',4',6'-τέτρα-O-ακετύλ-β-D-γλυκοπυρανοσύλ)-8-(πυριδίν-3-υλ-αιθινύλ)-N6- βενζοΐλ αδερίνη (4d)

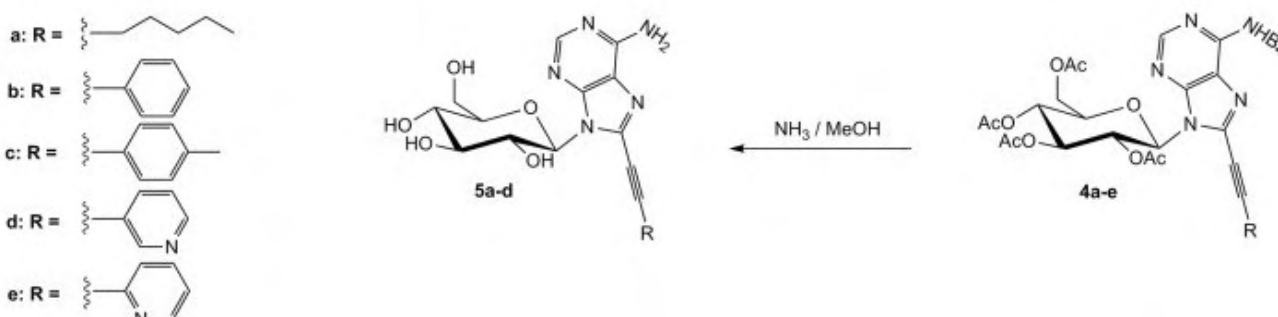
58%; $[\alpha]_D^{22} = -12$ (c 0.2, CHCl₃); R_f = 0.23 (EtOAc/ hexanes 6:4); λ_{max} 320 nm (ϵ 16156); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.99 (br s, 1H, NH), 8.87 (s, 1H, H-2), 8.72-7.38 (m, 9H, Bz and pyridine), 6.30 (t, 1H, $J = 9.8$ Hz, H-3'), 6.11 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 5.48 (t, 1H, $J = 9.3$ Hz, H-2'), 5.35 (t, 1H, $J = 9.7$ Hz, H-4'), 4.32 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 4.6$ Hz, $J_{6a',6b'} = 12.5$ Hz, H-6a'), 4.20 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 2.0$ Hz, H-6b'), 4.04 (m, 1H, H-5'), 2.09, 2.05, 1.94, 1.78 (4s, 12H, 4OAc); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 170.4, 170.0, 169.6, 169.2, 165.4, 153.0, 152.7, 151.6, 150.7, 150.5, 148.8, 140.5, 135.4, 133.6, 129.5, 128.2, 124.6, 120.5, 117.1, 98.7, 95.6, 83.3, 75.7, 70.5, 67.5, 67.2, 63.5, 21.3, 21.0, 20.9, 20.7; Mass (M+H)⁺: 671.21; Anal. Calcd. for C₃₃H₃₀N₆O₁₀: C, 59.10; H, 4.51; N, 12.53%. Found: C, 59.42; H, 4.76; N, 12.22%.

4.1.8. 9-(2',3',4',6'-τέτρα-O-ακετύλ-β-D-γλυκοπυρανοσύλ)-8-(πυριδιν-2-υλ-αιθινύλ)-N6- βενζοΐλ αδερίνη (4e)

50%; $[\alpha]_D^{22} = -2$ (c 0.1, CHCl₃); R_f = 0.21 (EtOAc/ hexanes 7:3); λ_{max} 315 nm (ϵ 22103); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 8.80 (br s, 2H, NH, H-2), 8.03-7.49 (m, 9H, Bz and pyridine), 6.31 (t, 1H, $J = 9.4$ Hz, H-2'), 6.12 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 5.71 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-3'), 5.48 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-4'), 4.29-4.25 (m, 2H, H-6a',b'), 4.07 (m, 1H, H-5'), 2.09, 2.03, 1.92, 1.75 (4s, 12H, 4OAc); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 170.6, 170.3, 169.7, 169.5, 164.3, 153.2, 152.8, 151.5, 149.9, 148.3, 145.2, 139.5, 134.6, 132.7, 128.6, 127.8, 127.6, 123.7, 119.7, 95.7, 92.5, 84.8, 82.7, 72.8, 69.5, 68.3, 65.7, 21.0, 20.7, 20.6, 20.5; Mass (M+H)⁺: 671.20; Anal. Calcd. for C₃₃H₃₀N₆O₁₀: C, 59.10; H, 4.51; N, 12.53%. Found: C, 59.40; H, 4.73; N, 12.34%.

4.2 Επισκόπηση της σύνθεσης για την προετοιμασία των μη προστατευμένων C8-αλκυνύλ αδερίνη πυρανονουκλεοζιτών (5a-d)

Οι προστατευμένοι νουκλεοζίτες 4a-e (0.5 mmol), επεξεργάστηκαν με διάλυμα αμμωνίας σε μεθανόλη (κορεσμένο στους 0 °C, 27.9 mL). Το διάλυμα αναδεύτηκε για μία νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια εξατμίστηκε υπό πίεση. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση για να δώσει τα μη προστατευμένα παράγωγα 5a-d, σε 60-72% αποδόσεις, ως κιτρινωπούς και λευκούς αφρούς.



Σχήμα 25. Πορείες σύνθεσης αποπροστατευμένων C8 τροποποιημένων γλυκοπυρανονουκλεοζιτών.

4.2.1 9-(β-D-γλυκοπυρανοσύν)-8-επτινύλ-αδερίνη (5a)

60%; $[\alpha]_D^{22} = -2$ (c 0.2, MeOH); $R_f = 0.17$ (EtOAc/ MeOH 8:2) λ_{max} 292 nm (ϵ 19971); 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 8.15 (s, 1H, H-2), 7.24 (s, 2H, NH₂), 5.43 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.5$ Hz, H-1'), 5.17, 5.09, 5.01 (3br s, 3H, 3OH), 4.60-4.45 (m, 2H, H-5', H-6a'), 3.74 (m, 1H, H-6b'), 3.52-3.33 (m, 4H, H-2', H-3', H-4', OH), 1.78-1.76 (m, 2H, β -CH₂), 1.62 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, α -CH₂), 1.51-1.30 (m, 4H, 2 x CH₂), 0.93 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH₃). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.5 MHz): δ 156.8, 152.7, 150.1, 148.3, 119.9, 96.2, 93.9, 83.2, 78.8, 73.6, 70.5, 66.7, 65.4, 30.9, 29.2, 22.3, 19.0, 14.5; Mass (M+H)⁺: 392.20; Anal. Calcd. for C₁₈H₂₅N₅O₅: C, 55.23; H, 6.44; N, 17.89%. Found: C, 54.90; H, 6.73; N, 17.72%.

4.2.2 9-(β-D-γλυκοπυρανοσύν)-8-φαινυλεπτινύλ-αδερίνη (5b)

72%; $[\alpha]_D^{22} = -6$ (c 0.1, MeOH); $R_f = 0.30$ (EtOAc/ MeOH 9:1); λ_{max} 313 nm (ϵ 14209); 1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 8.19 (s, 1H, H-2), 7.66 (br s, 2H, NH₂), 7.61-7.47 (m, 5H, Ph), 5.55 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.2$ Hz, H-1'), 5.40 (d, 1H, $J = 5.3$ Hz, OH), 5.34 (d,

1H, $J = 4.1$ Hz, OH), 5.21 (d, 1H, $J = 5.1$ Hz, OH), 4.69 (t, 1H, $J = 5.0$ Hz, OH), 4.47 (m, 1H, H-2'), 3.76 (m, 1H, H-3'), 3.53-3.41 (m, 3H, H-4', H-6a', b'), 3.27 (m, 1H, H-5'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.5 MHz): δ 156.3, 152.6, 150.0, 148.1, 132.7, 128.9, 128.7, 123.0, 119.7, 101.9, 96.3, 86.8, 83.3, 78.1, 73.4, 70.8, 65.8; Mass (M+H)⁺: 398.15; Anal. Calcd. for C₁₉H₁₉N₅O₅: C, 57.43; H, 4.82; N, 17.62%. Found: C, 57.81; H, 4.51; N, 17.90%.

4.2.3 9-(β-D-γλυκοπυρανοσύλ)-8-p-τολουαιθυνύλ-αδενίνη (5c)

67%; $[\alpha]_D^{22} = -4$ (c 0.1, MeOH); $R_f = 0.21$ (EtOAc/ MeOH 8:2); λ_{\max} 316 nm (ϵ 12871); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 8.18 (s, 1H, H-2), 7.55 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, ArH), 7.37 (br s, 2H, NH₂), 7.32 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, ArH), 5.54 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 5.24 (d, 1H, $J = 4.1$ Hz, OH), 5.14, 5.04 (2br s, 2H, 2OH), 4.57-4.44 (m, 2H, H-6a', OH), 3.75 (m, 1H, H-6b'), 3.52-3.44 (m, 4H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 2.38 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.5 MHz): δ 156.4, 152.1, 150.4, 148.5, 138.5, 132.5, 129.0, 122.3, 120.2, 101.8, 96.0, 86.9, 83.0, 78.9, 73.5, 70.7, 65.6, 24.6; Mass (M+H)⁺: 412.17; Anal. Calcd. for C₂₀H₂₁N₅O₅: C, 58.39; H, 5.14; N, 17.02%. Found: C, 58.72; H, 5.45; N, 17.27%.

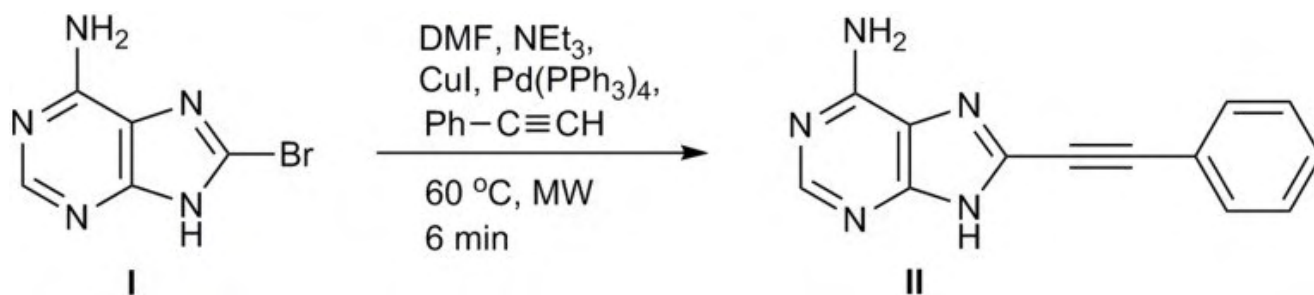
4.2.4 9-(β-D-γλυκοπυρανοσύλ)-8-(πυριδιν-3-υλ-αιθυνύλ)-αδενίνη (5d)

70%; $[\alpha]_D^{22} = +2$ (c 0.2, MeOH); $R_f = 0.16$ (CH₂Cl₂/ MeOH 7:3); λ_{\max} 306 nm (ϵ 7353); ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ 8.89-8.68 (m, 2H, pyridine), 8.20 (s, 1H, H-2), 8.10-7.52 (m, 2H, pyridine), 7.44 (br s, 2H, NH₂), 5.58 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.3$ Hz, H-1'), 5.28, 5.06, 4.55 (3 br s, 3H, 3OH), 4.46 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz, OH), 3.77-3.40 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6a', b'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.5 MHz): δ 156.9, 152.5, 152.3, 150.5, 149.8, 148.5, 139.9, 123.8, 119.8, 116.8, 96.0, 95.7, 83.1, 78.7, 74.1, 73.9, 70.2, 65.2; Mass (M+H)⁺: 399.15; Anal. Calcd. for C₁₈H₁₈N₆O₅: C, 54.27; H, 4.55; N, 21.10%. Found: C, 54.62; H, 4.74; N, 21.38%.

4.3 Προεπισκόπηση σύνθεσης 8-φαινυλαιθυνύλ-αδενίνης (II)

8-βρωμοαδενίνη (I) (0.2 mmol) αναμείχθηκε με άνυδρο DMF (1 mL), φιανυλακετυλένιο (3 equiv), τριαιθυλαμίνη (2 equiv), Pd(PPh₃)₄ (0.1 equiv), CuI (0.3 equiv) και ακτινοβολήθηκε με μικροκύματα (200 W) για 6 min στους 60 °C. Αφού αφαιρέθηκαν τα πτητικά υπό κενό, το στερεό υπόλειμμα καθαρίστηκε με στήλη

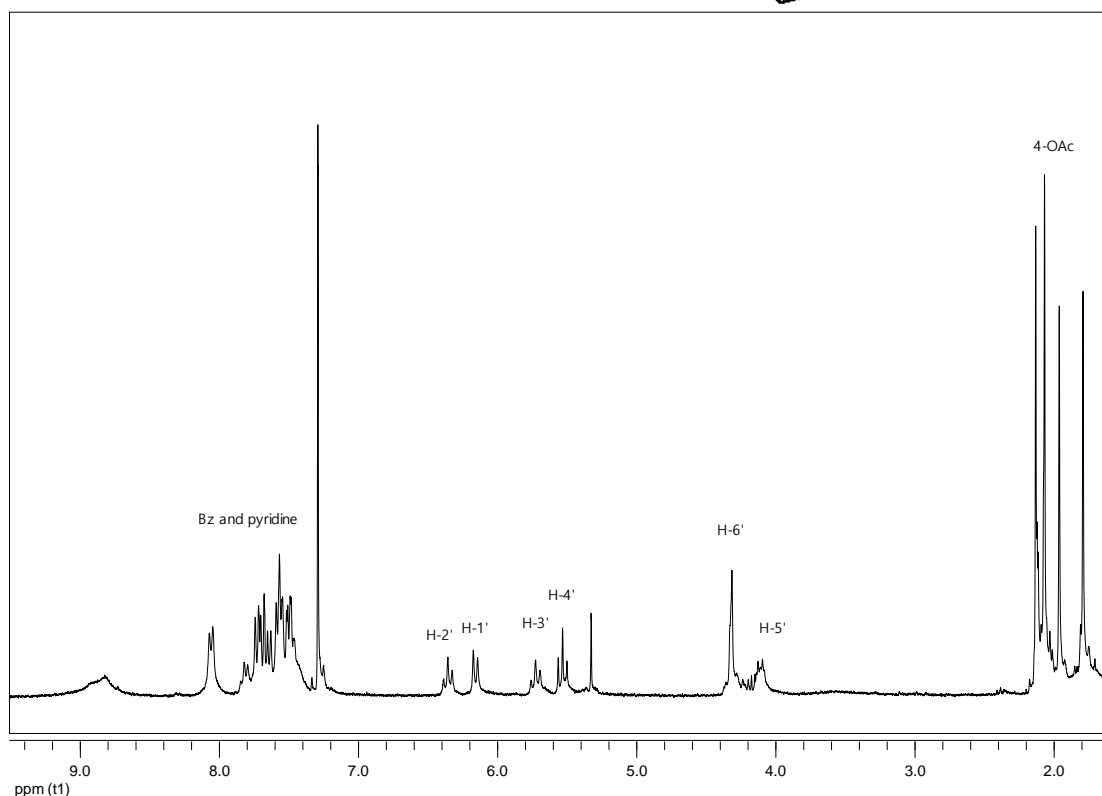
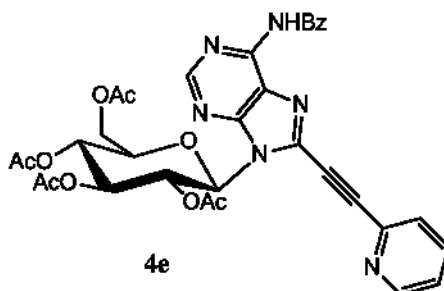
χρωματογραφίας υπό κενό ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9.5:0.5) για να δώσει την ένωση II, ως κιτρινωπό αφρό. 40%; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -2$ (c 0.2, MeOH); $R_f = 0.13$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8.5:1.5); λ_{max} 308 nm (ϵ 9701); ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 13.38 (br s, 1H, NH), 8.15 (s, 1H, H-2), 7.65-7.49 (m, 5H, Ph), 7.27 (br s, 2H, NH_2). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 75.5 MHz): δ 156.8, 154.2, 152.6, 148.1, 132.7, 129.1, 129.0, 123.0, 119.8, 101.8, 67.1; Mass ($\text{M}+\text{H}^+$): 236.08; Anal. Calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_5$: C, 66.37; H, 3.86; N, 29.77%. Found: C, 66.59; H, 4.01; N, 29.40%.



Σχήμα 26. Πορεία σύνθεσης 8-φαινυλαιθυνύλ-αδερίνης (II).

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR

Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H NMR. Ενδεικτικά αναφέρεται το φάσμα της ένωσης **4e**. Στο παρακάτω διάγραμμα διαφαίνονται τα πρωτόνια τόσο του σακχάρου όσο και της βάσης που συνδέεται στο τμήμα του σακχάρου.



Σχήμα 27. Φάσμα ^1H NMR του προϊόντος **4e**.

6. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Η κυτταροτοξική δράση των νεοσυντιθέμενων C8- τροποποιημένων πυρανονουκλεοζιτών της αδερίνης **4e**, **5a-d** καθώς και της 8-φαινύλαιθινυλο αδερίνης καθορίστηκε έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών L1210, CEM, και HeLa. Όλες οι μέθοδοι πραγματοποιήθηκαν σε πιάτα 96 πηγαδιών. Σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκαν $(5-7.5) \times 10^4$ καρκινικά κύτταρα και καθορισμένη ποσότητα της ουσίας υπό έλεγχο. Τα κύτταρα αφέθηκαν να αναπτυχθούν για 48 ώρες (L1210)

ή 72 ώρες (CEM, HeLa) στους 37 °C σε σταθερές συνθήκες υγρασίας και διοξειδίου του άνθρακα. Στο τέλος της περιόδου επώασης τα κύτταρα μετρήθηκαν σε έναν Coulter αναλυτή. Η τιμή IC₅₀ καθορίστηκε ως η συγκέντρωση της ένωσης, η οποία προκαλεί αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές και τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 1.

Ο προστατευμένος πυρανονουκλεοζίτης της αδενίνης 4e, καθώς και το ανάλογο II έδειξαν σημαντική κυτταροτοξικότητα (IC₅₀ 1,2-10 μM) συγκρινόμενοι με την 5-φθόρουρακίλη (IC₅₀ 0,33-18μM).

Compound	IC ₅₀ ^a (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
4e	2.9 ± 0.0	1.2 ± 0.2	3.0 ± 0.7
5a	>250	>250	>250
5b	>250	>250	>250
5c	>250	>250	>250
5d	>250	>250	>250
II	5.9 ± 5.5	4.2 ± 0.8	10 ± 3.0
5-Fluorouracil	0.33 ± 0.17	18 ± 5	0.54 ± 0.12

Πίνακας 1. Κυτταροστατική δράση των ενώσεων έναντι πολλαπλασιασμού καρκινικών κυτταρικών σειρών (L1210, CEM, HeLa).

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση C-8 αλκυνυλ αδενίνο πυρανονουκλεοζιτών και η αποτίμηση της βιολογικής τους δράσης. Το αρχικό υλικό της σύνθεσης αποτέλεσε η περ-O-ακέτυλο D-γλυκόζη, η οποία μετά από σύζευξη μέσω της μεθόδου Vorbrüggen (Vorbrüggen and Höfle, 1981) με την N⁶-βενζόυλο αδενίνη, έδωσε επιλεκτικά το N⁹ ισομερές αδένινο νουκλεοζίτη κάτω από θερμοδυναμικά ελεγχόμενες συνθήκες (SnCl₄/CH₃CN, reflux). Ο trans κανόνας ακολουθήθηκε (Baker, 1957) και ο β-διαμορφωμένος νουκλεοζίτης απομονώθηκε μόνο σύμφωνα με τα αποτελέσματα από το ¹H NMR. Από τη στιγμή που οι αλογονομένοι C-8 πούρινο νουκλεοζίτες αποδείχθηκαν χρήσιμα ενδιάμεσα για την επαρκή προετοιμασία των αντίστοιχων C-8 αλκυνυλ παραγώγων τους (Agrofoglio et al., 2003), ο αδένινο νουκλεοζίτης βρωμώθηκε μετά από επώαση με Br₂/AcOH/AcONa (Holmes and Robins, 1964) αποδίδοντας 8-βρώμο ανάλογο, με απόδοση περίπου 60% μετά από υδατική επεξεργασία και χρωματογραφία στήλης με αέρα υπό πίεση. Οι 8-αλκυνυλ αδένινο νουκλεοζίτες αξιολογήθηκαν μέσω της αντίδρασης σύζευξης Sonogashira των ενδιάμεσων με αρκετά τελικά ακετυλένια, κάτω από ακτινοβολία μικροκυμάτων (200 W). Σε ένα τυπικό πείραμα ένας αποτελεσματικός λόγος καταλύτη(Pd(PPh₃)₄ /συν-καταλύτη

(CuI) αποδείχθηκε να είναι ο 1:1 (Meneni et al., 2007) δίνοντας τα 4a-e σε ικανοποιητικές αποδόσεις (50-66%). Για να παρέχουμε μία λεπτομερή έρευνα της σχέσης δομής-ενεργότητας, ποικίλοι αλκίνιο R υποκαταστάτες επιλέχθηκαν, οι οποίοι περιέχουν γραμμικές αλκύλο αλυσίδες (4a, R=n-πέντυλο), αρωματικούς δακτυλίους (4b, R=φαινύλιο, 4c, R=p-τολουόλιο) και τμήματα πυριμιδινών (4d, R=3-πυριδύλιο, 4e, R=2-πυριδύλιο). Τέλος, η αποπροστασία των 4a-e με τη δράση της μεθανολικής αμμωνίας απέδωσε μόνο τα παράγωγα στόχους 5a-d, ενώ προσπάθειες απομάκρυνσης όλων των προστατευτικών ομάδων από το 4e είτε με μεθοξείδιο του νατρίου (Bozó et al., 1998) ή με ανθρακικό κάλιο-μεθανόλη (Plattner et al., 1972) οδήγησε σε ένα μίγμα μη ανιχνεύσιμων και μη διαχωρίσιμων υλικών.

Βασισμένοι στο υποσχόμενο κυτταροτοξικό προφίλ προηγούμενα συντιθέμενων C5-φαινυλεθινύλ πυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης (Dimoroulou et al., 2013) και προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του γλυκοσιδικού τμήματος στη βιολογική δράση της αδενίνης, επιδιώξαμε να εισαγάγουμε φαινυλακετυλένιο ως υποκαταστάτη στη 8 θέση της ίδιας της αδενίνης. Για το λόγο αυτό, ερευνήσαμε την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού πρωτοκόλλου αλκυλίωσης κατά Sonogashira για τη σύζευξη της εμπορικά διαθέσιμης 8-βρωμοαδενίνης με φαινυλακετυλένιο κάτω από ακτινοβολία μικροκυμάτων (200 W). Η 8-βρωμοαδενίνη αναμίχθηκε με άνυδρο DMF, φαινυλακετυλένιο, τριαιθυλαμίνη, Pd(PPh₃)₄, CuI, ακτινοβολήθηκε με μικροκύματα για 6 λεπτά στους 60°C και μετά από αφαίρεση πτητικών υπό κενό, το στερεό υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης με αέρα υπό πίεση για να αποδώσει την ένωση II σε αποδεκτή απόδοση (40%). Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹H NMR.

Περίληπτικά, επιτεύχθηκε η παραγωγή αρκετών νέων C8-αλκύνυλ αδένινο νουκλεοζιτών καθώς και της 8-φαινυλαιθινύλο αδενίνης, μέσω της αντίδρασης σύζευξης Sonogashira μετά από ακτινοβολία σε μικροκύματα. Για την εκτίμηση της ικανότητας αναστολής του πολλαπλασιασμού διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (L1210, HeLa, CEM) από τους νεοσυντιθέμενους νουκλεοζίτες χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC₅₀, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%. Η δράση των νεοσυντιθέμενων ενώσεων συγκρίθηκε με αυτή του ήδη χρησιμοποιούμενου φαρμάκου 5- φθοροουρακίλη.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. L. G. Wade, JR. (2012) 'Οργανική Χημεία' Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις ΤΖΙΟΛΑ
2. Θ. Βαλαβανίδης, Κ. Ευσταθίου. (2012) 'Η χημική ένωση του μήνα',
http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_glucose.htm.
3. 'Οργανική Χημεία Κεφάλαιο 26: Βιομόρια: Υδατάνθρακες',
http://www.biology.uoc.gr/courses/BIO6_Organiki_Ximia/Lectures/Lecture%2020.pdf.
4. McMurry J. (2000) 'Οργανική Χημεία. Τόμος Ι' Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης: Ηράκλειο.
5. J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. (2006) 'Βιοχημεία. Τόμος Ι' Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης: Ηράκλειο.
6. Zhou W., Gumina G., Chong Y., Wang J., Schinazi R.F., Chu C.K. (2004) 'Synthesis, structure-activity relationships, and drug resistance of beta-d-3'-fluoro-2',3'-unsaturated nucleosides as anti-HIV Agents' J Med Chem. 17;47(13):3399-408.
7. Perigaud C., Gosselin G., Imbach J. L. (1992) 'Nucleosides analogues as chemotherapeutic agents: a review' Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 11, 903-945.
8. Robins, R.K.; Kini, G.D. (1990) 'Purines and Purine Nucleoside Analogues as Antitumor Agents. In The Chemistry of Antitumor Agents' Wilman, D.E.V. Ed.; Chapman and Hall: New York pp 299-321.
9. MacCoss, M.; Robins, M.J. (1990) 'Anticancer Pyrimidines, Pyrimidine Nucleosides and Prodrugs. In the chemistry of Antitumor Agents' Wilman, D.E.V. Ed.; Chapman and Hall: New York, pp 261-298.
10. Claire Simons (2000) 'Nucleoside Mimetics: Their Chemistry and Biological Properties' CRC Press.
11. Arner E. S. J., Eriksson S. (1995) 'Mammalian deoxyribonucleoside kinases' Pharmacol Ther. 67:155–186.
12. Lewin B. (2003) 'Genes' VIII, 6.
13. Lui V.W.Y., Lau C.P.Y., Cheung C.S.F., Ho K., Ng M.H.L., Cheng S.H., Hong B., Tsao S.W., Tsang C.M., Lei K.I.K., Yamasaki Y., Mita A., Chan A.T.C. (2010) 'An

- RNA-directed nucleoside anti-metabolite, 1-(3-C-ethynyl-beta-d-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd), elicits antitumor effect via TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) downregulation' *Biochemical Pharmacology*. Volume 79, issue 12, p. 1772-1780.
14. Wagner C.R., Iyer V.V., McIntee E.J. (2000) 'Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides' *Med Res Rev.* 20(6):417-51.
15. Balzarini J. (1994) 'Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives' *Pharm. World Sci.* 16:113-126.
16. Siev M., Weinberg R., Penman S. (1969) 'The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in HeLa cells by cordycepin' *J Cell Biol.* 41(2):510–520.
17. Ahn Y.J., Park S.J., Lee S.G., Shin S.C., Choi D.H. (2000) 'Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp' *J Agri Food* 48: 2744- 2748.
18. Matsuda A., Sasaki T. (2004) 'Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides' *Cancer Sci.* 95:105-111.
19. Cory A.H., Samano V., Robins M.J., Cory J.G. (1994) '2'-Deoxy-2'-methylene derivatives of adenosine, guanosine, tubercidin, cytidine and uridine as inhibitors of L1210 cell growth in culture' *Biochem Pharmacol.* 47(2):365-71.
20. Manta S., Tsoukala E., Tzioumaki N., Kiritsis C., Balzarini J., Komiotis D. (2010) 'Synthesis of 4,6-dideoxy-3-fluoro-2-keto-beta-D-glucopyranosyl analogues of 5-fluorouracil, N6-benzoyl adenine, uracil, thymine, N4-benzoyl cytosine and evaluation of their antitumor activities' *Bioorg Chem.* 38(2):48-55.
21. Hardman J.G., Limbird L.E. (eds, Gilman A.G. (cons. ed) (2001) 'The Pharmacological Basis of Therapeutics' 10th ed., McGraw-Hill.
22. Komiotis D., Manta S., Tsoukala E., Tzioumaki N. (2008) *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents.* 7, 219.
23. Gumina G., Song G.Y. and Chu C. K. (2001) 'L-Nucleosides as chemotherapeutic agents' *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 9–15.
24. Saenger W. (1984) 'Principles of Nucleic Acid Chemistry'. Springer-Verlag: New York.

25. Blackburn G. M. and Gait M. J. (1996) 'Nucleic Acids in Chemistry and Biology'. Oxford University Press: New York.
26. Bloomfield V. A., Crothers D. M., Tinoco I. (2000) 'Nucleic acids. Structures, properties, and functions' University Science Books. Sausalito: California.
27. www.cf.ac.uk/phrmy/ChemEd/presentations.html
28. Verheggen I., VanAerschot A., Toppet S., Snoeck R., Janssen G., Balzarini J., DeClercq E., Herdewijn P. (1993) 'Synthesis and Antiherpes Virus Activity of 1,5-Anhydrohexitol Nucleosides' Journal of Medicinal Chemistry. 36. pp. 2033-2040.
29. Verheggen I., Van Aerschot A., Van Meervelt L., Rozenski J., Wiebe L., Snoeck R., Andrei G., Balzarini J., Claes P., De Clercq E., Herdewijn P. (1995) 'Synthesis, Biological Evaluation, and Structure Analysis of a Series of New 1,5-Anhydrohexitol Nucleosides' J. Med. Chem. 38. 826.
30. Maurinsh Y., Schraml J., DeWinter H., Blaton N., Peeters O., Lescrinier E., Rozenski J., Van Aerschot A., DeClercq E., Busson R., Herdewijn P. (1997) 'Synthesis and Conformational Study of 3-Hydroxy-4-(Hydroxymethyl)-1-Cyclohexanyl Purines and Pyrimidines' J. Org. Chem. 62. 2861-2871.
31. Ostrowski T., Wroblowski B., Busson R., Rozenski J., DeClercq E., Bennett M.S., Champness J.N., Summers W.C., Sanderson M.R., Herdewijn P. (1998) '5-Substituted Pyrimidines with a 1,5-Anhydro-2,3-dideoxy-d-arabino-hexitol Moiety at N-1: Synthesis, Antiviral Activity, Conformational Analysis, and Interaction with Viral Thymidine Kinase' J. Med. Chem. 41. 4343-4353.
32. Antonakis, K. (1989) 'Hexopyranose nucleosides. In Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C)' Elsevier: Amsterdam. 4. p. 241.
33. Haouz A., Vanheusden V., Munier-Lechman H., Froeyen M., Herdewijn P., Van Galenbergh S., Delarue M. (2003) 'Enzymatic and Structural Analysis of Inhibitors Designed Against Mycobacterium Tuberculosis Thymidylate Kinase. New Insights into the Phosphoryl Transfer Mechanism' J. Biol. Chem. 278:4963–4971.

34. Vastmans K., Pochet S., Peys A., Kerremans L., VanAerschot A., Hendrix C., Marliere P., Herdewijn P. (2000) 'Enzymatic Incorporation in DNA of 1,5-Anhydrohexitol Nucleotides' *Biochemistry*. vol. 39. No. 42. pp. 12757-12765.
35. Vastmans K., Froeyen M., Kerremans L., Pochet S., Herdewijn P. (2001) 'Reverse Transcriptase Incorporation of 1,5-Anhydrohexitol Nucleotides' *Nucleic Acids Res.* 29:3154–3163.
36. Kinoshita M. and Mariyama S. (1975) 'Synthesis of (2R, 3S, 4S) -4- Amino-3-hydroxy-2- methyl-5- (3-pyridyl)- pentanoic Acid Present in Antibiotic Pyridomycin' *Bulletin of The Chemical Society of Japan*. Vol. 48 (7). 2081-2083.
37. Boujouklian R. and Ganem B. (1979) 'Alkyl and cyclopropyl sugars: approaches to branched- chain D- glucofuranose derivatives' *Carbohydrate Research*. 76. 245-251.
38. Olivier R. Martin, Robert C. Nabinger, Yousif Ali, Dolatrai M. Vyas, Walter A. Szarik. (1983) 'Carbon- 13 nuclear magnetic resonance- spectral study of branched- chain and 3-gem-di-C-substituted aldohexofuranoid derivatives.' *Carbohydrate Research*. 121. 302-307.
39. Sarah Couturier, Mohamed Aljarah, Gilles Gosselin, Christophe Mathé and Christian Périgaud. (2007) 'Synthesis of 3'-deoxy-3' -C-methyl-b- D - ribonucleoside analogs.' *Tetrahedron* 63 . 11260–11266.
40. Mohamed Aljarah, Sarah Couturier, Christophe Mathé, Christian Périgaud. (2008) 'Synthesis of 3'-deoxy-3'-C-methyl nucleoside derivatives.' *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16. 7436–7442.
41. Akira Matsuda, J. Kenji Takenuki, Takuma Sasaki and Tohru Ueda. (1991) 'Nucleosides and Nucleotides. 94. Radical Deoxygenation of tert -Alcohols in 1-(2-C-Alkylpentofuranosyl)pyrimidines: Synthesis of (2'5)-2'-Deoxy-2'-C-methylcytidine, an Antileukemic Nucleoside' *Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 34, No. 1 234-239.
42. Manta S., Agelis G., Botić T., Cencic A., Komiotis D. (2007) 'Fluoro-Ketopyranosyl Nucleosides: Synthesis and Biological Evaluation of 3-Fluoro-2-

- Keto- β -d-Glucopyranosyl Derivatives of N4-Benzoyl Cytosine.' Bioorg. Med. Chem. 15:980–987.
43. Nikolaos A. A. Balatsos, Dimitrios Vlachakis, Panagiotis Maragozidis, Stella Manta, Dimitrios Anastasakis, Athanasios Kyritsis, Metaxia Vlassi, Dimitri Komiotis, and Constantinos Stathopoulos. (2009) 'Competitive Inhibition of Human Poly(A)-Specific Ribonuclease (PARN) by Synthetic Fluoro-Pyranosyl Nucleosides' Biochemistry. 48. 6044–6051 DOI: 10.1021/bi900236k.
44. 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.
45. Leclercq, F.; Egron, M.J.; Antonakis, K. Carbohydr. Res., 1992, 228, 95.
46. Khan, A.R.; Mulligan, K.X.; Ollapally, P. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2001, 20, 759.
47. Ollapally, A. P.; Dorange, I. B.; Whitaker, T. L. Nucleosides & Nucleotides 1999, 18, 703.
48. Egron, M.J.; Dorange, I.B.; Antonakis, K.; Herscovici, J.; Ollapally, A.P. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2002, 21, 327.
49. Komiotis D., Delatre S., Holt L., Ollapally A., Balzarini J., De Clercq E., Ligo M. (1991) Nucleosides Nucleotides. 10, 431.
50. Paterson J., Uriel C., Egron M.J., Herscovici J., Antonakis K., Alaoui M. (1998) 'Antiproliferative and Apoptotic Activities of Ketonucleosides and Keto-C-Glycosides against Non-Small-Cell Lung Cancer Cells with Intrinsic Drug Resistance.' Antimicrob. Agents Chemother. 42:779–784.
51. Christos Kiritsis, Stella Manta, Vanessa Parmenopoulou, Jan Balzarini, Dimitri Komiotis. (2011) 'Branched-chain C-cyano pyranonucleosides: Synthesis of 3'-C-cyano & 3'-C-cyano-3'-deoxy pyrimidine pyranonucleosides as novel cytotoxic agents' European Journal of Medicinal Chemistry. 46 5668-5674.
52. Matsuda A, Hattori H, Tanaka M, Sasaki T. Biomed Chem Lett, 1996, 6: 1887
53. 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 -uracil. *J Med Chem.* 1998, 41, 2892-902.
54. 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.
55. O-Yang H. Y., Wu E. B., Fraser-Smith, KAM Walker. Nucleosides and nucleotides. 183. Synthesis of 4' α -branched thymidines as a new type of antiviral agent. *Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 37-40.
56. Kodama E.I., Kohgo S., Kitano K., Machida H., Gatanaga H., Shigeta S., Matsuoka M., Ohnui H., Mitsuya H. *4'-Ethynyl nucleoside analogs: potent inhibitors of multidrug-resistant human immunodeficiency virus variants in vitro.* *Antimicrob Agents Chemother.* 2001, 45, 1539-46.
57. De Clercq E. *New developments in anti-HIV chemotherapy.* *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1587, 258-75.
58. 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
59. Manta, S., Kiritsis, C., Dimopoulou, A., Parmenopoulou, V., Kollatos, N., Tsotinis, A., et al. (2014). Unsaturation: An important structural feature to nucleosides' antiviral activity. *Anti-Infective Agents*, 12, 2-57. doi: 10.2174/22113525113119990106.
60. Herdewijn, P. (2008). *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
61. Hatse, S., De Clercq, E., and Balzarini, J. (1999). Role of antimetabolites of purine and pyrimidine nucleotide metabolism in tumor cell differentiation. *Biochem. Pharmacol.* 58, 539-555. doi:10.1016/S0006-2952(99)00035-0.
62. Vivet-Boudou, V., Isel, C., Sleiman, M., Smyth, R., Ben Gaid, N., Barhoum, P., et al. (2011). 8-Modified-2'-deoxyadenosine analogues induce delayed

- polymerization arrest during HIV-1 reverse transcription. PLoS ONE 6:11. e27456. doi: 10.1371/journal.pone.0027456.
63. Lee, Y.S., Park, S.M., Kim, H.M., Park, S.K., Lee, K., Lee, C.W., et al. (2009). C5-Modified nucleosides exhibiting anticancer activity. Bioorg. Med. Chem. Lett. 19, 4688-4691. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.06.072.
64. Meneni, S., Ott, I., Sergeant, C.D., Sniady, A., Gust, R., and Dembinski, R. (2007). 5-Alkynyl-2'-deoxyuridines: chromatography-free synthesis and cytotoxicity evaluation against human breast cancer cells. Bioorg. Med. Chem. 15, 3082-3088. doi: 10.1016/j.bmc.2007.01.048.
65. Lin, T.S., Cheng, J.C., Ishiguro, K., and Sartorelli, A.C. (1985). Purine and 8-substituted purine arabinofuranosyl and ribofuranosyl nucleoside derivatives as potential inducers of the differentiation of the Friend erythroleukemia. J. Med. Chem. 28, 1481-1485. doi: 10.1021/jm00148a018.
66. Escuret, V., Aucagne, V., Joubert, N., Durantel, D., Rapp, L.K., Schinazi, F.R., et al. (2005). Synthesis of 5-haloethynyl- and 5-(1,2-dihalo)vinyluracil nucleosides: antiviral activity and cellular toxicity. Bioorg. Med. Chem. 13, 6015-6024. doi: 10.1016/j.bmc.2005.06.021.
67. Volpini, R., Costanzi, S., Lambertucci, C., Vittori, S., Klotz, K., Lorenzen, A., et al. (2001). Introduction of alkynyl chains on C-8 of adenosine led to very selective antagonists of the A(3) adenosine receptor. Bioorg. Med. Chem. Lett. 11, 1931-1934. doi: 10.1016/S0960-894X(01)00347-X.
68. M. W. Beyerinck. (1889) Z. Phys. Chem. 3. 110.
69. Ben Faust. (1997) 'Modern Chemical Techniques' The Royal Society of Chemistry, Unilever.
70. Vorbrüggen, H., and Höfle, G. (1981). Nucleosides syntheses XXII: On the mechanism of the nucleoside synthesis. Chem. Ber. 114, 1256-1268. doi: 10.1002/cber.19811140405.
71. Baker, B.R. (1957). Stereochemistry of nucleoside synthesis. In ciba foundation symposium on the chemistry and biology of purines, ed, G.E.W.Wohlstenholme, C.M. O'Connor, Churchill, London, 120-129.

72. Agrofoglio, L.A., Gillaizeau, I., and Saito, Y. (2003). Palladium-assisted routes to nucleosides. *Chem. Rev.* 103, 1875-1916. doi: 10.1021/cr010374q.
73. Holmes, E.R., and Robins, K.R. (1964). Purine nucleosides. VII. Direct bromination of adenosine, deoxyadenosine, guanosine, and related purine nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1242-1245. doi: 10.1021/ja01060a057
74. Bozó, E., Boros, S., Kuszmann, J., Gács-Baitz, E., and Párkányi, L. (1998). An economic synthesis of 1,2,3,4-tetra-O-acetyl-5-thio-D-xylopyranose and its transformation into 4-substituted-phenyl 1,5-dithio-D-xylopyranosides possessing antithrombotic activity. *Carbohydr. Res.* 308, 297-310. doi: 10.1016/S0008-6215(98)00088-3.
75. Plattner, J.J., Gless, R.D., and Rapoport, H. (1972). Synthesis of some DE and CDE ring analogs of camptothecin. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 8613-8615. doi: 10.1021/ja00779a072.
76. Dimopoulou, A., Manta, S., Kiritsis, C., Gkaragkouni, D.N., Papasotiriou, I., Balzarini, J., et al. (2013). Rapid microwave-enhanced synthesis of C5-alkynyl pyranonucleosides as novel cytotoxic antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 1330-1333. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.12.092.