



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΛΕΝΗ ΜΑΡΡΑ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟ-
ΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

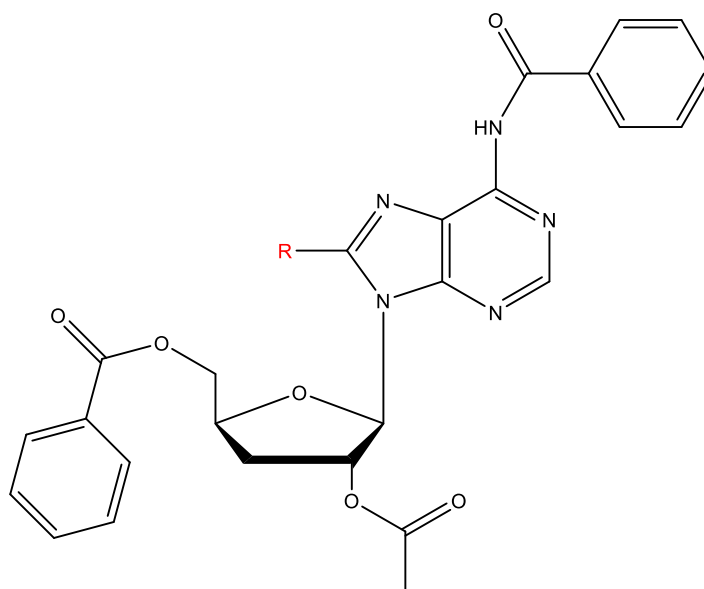
ΛΑΡΙΣΑ 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ: «ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ & ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»



ΕΛΕΝΗ ΜΑΡΡΑ

«ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΣΤΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΚΑΙ ΣΤΗ ΒΑΣΗ 3' ΔΕΟΞΥ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ.
ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ»

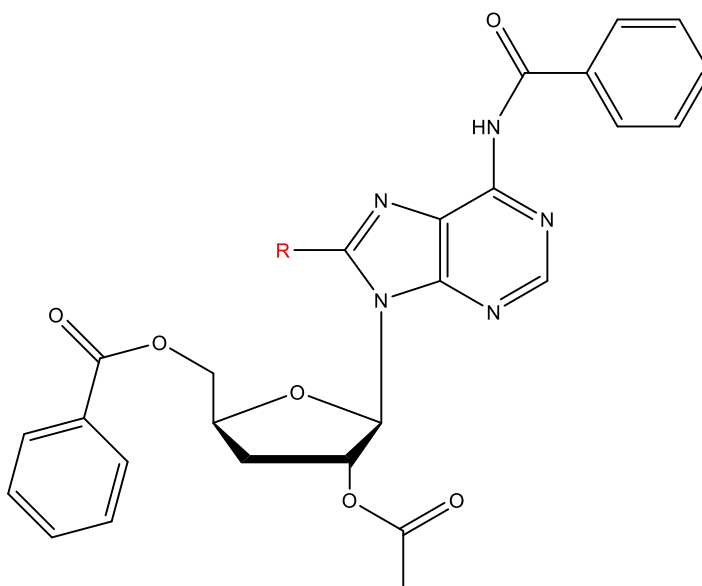
ΛΑΡΙΣΑ 2021



UNIVERSITY OF THESSALY

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

MASTER'S DEGREE ENTITLED: "APPLICATIONS OF MOLECULAR BIOLOGY-
MOLECULAR GENETICS AND DIAGNOSTIC INDICATORS"



ELENI MARRA

"MODIFIED 3' DEOXY NUCLEOSIDES AT THE SUGAR AND THE BASE. SYN-
THESIS, SPECTROSCOPIC ANALYSIS AND BIOLOGICAL EVALUATION"

LARISA 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ

- Δρ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΜΙΩΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Δρ. ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΜΟΣΙΑΛΟΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Δρ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΟΛΛΑΤΟΣ: Ακαδημαϊκός Υπότροφος στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ανάλογα νουκλεοζιτών έχουν συμβάλλει σημαντικά στην αντιμετώπιση ασθενειών όπως του καρκίνου και των μολύνσεων από ιούς. Η ομοιότητά τους με τα φυσικά ανάλογα, τα καθιστά ικανά να στοχεύουν ενδοκυτταρικά, ωστόσο προκαλούν σημαντικές παρενέργειες, ιδιαίτερα εκείνα που χρησιμοποιούνται στην χημειοθεραπεία έναντι κακοηθειών. Έτσι η ανάπτυξη νέων αναλόγων νουκλεοζιτών με μεγαλύτερο θεραπευτικό εύρος, αποτελεί έναν ελκυστικό στόχο για την επιστημονική κοινότητα.

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, εστίαστηκε στον σχεδιασμό και την σύνθεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα του σακχάρου, όσο και στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης της αδερίνης. Ο σχεδιασμός των μορίων, τα οποία συντέθηκαν για την εν λόγω εργασία βασίστηκε στο ότι : (α) στο ότι η απουσία του 3' υδροξυλίου από το τμήμα του σακχάρου, συμβάλλει στον πρόωρο τερματισμό της επιμήκυνσης της αλυσίδας είτε του DNA είτε του RNA καθώς καθίσταται αδύνατο να σχηματιστεί ο 3'-5' φωσφοδιεστερικός δεσμός και (β) στο ότι η προσθήκη ενός ατόμου βρωμίου στην θέση 8 της αδερίνης έχει βρεθεί με σπουδαίες δράσεις καθώς σε περιπτώσεις ιικών μολύνσεων, επάγεται η εκτεταμένη ενεργοποίηση της ριβονουκλεάσης L (RNase L).

Οι τελικοί νουκλεοζίτες απομονώθηκαν με τεχνικές χρωματογραφίας και ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία H^1 -NMR.

Λέξεις – κλειδιά: ανάλογα νουκλεοζιτών, 3' υδροξύλιο, πρόωρος τερματισμός, βρώμιο, αδερίνη.

ABSTRACT

Nucleoside analogues have made a significant contribution to the treatment of diseases such as cancer and viral infections. Their resemblance to natural analogues enables them to target intracellular elements, however they cause significant side effects, especially those who are used in chemotherapy against malignancies. Thus, the development of new nucleoside analogues with a greater therapeutic range is an attractive goal for the scientific community.

The present dissertation focused on the design and synthesis of new nucleoside analogues with modifications in both the sugar portion and the heterocyclic base of adenine portion. The design of the molecules, which were synthesized for this work, was based on the fact that: (a) the absence of 3' hydroxyl group from the sugar moiety contributes to the premature termination of either DNA or RNA extension as it becomes impossible to form the 3'-5' phosphodiesterase bond and (b) the addition of a bromine atom to position 8 of the adenine has been found to have significant effects as in cases of viral infections, extensive ribonuclease L (RNAse L) activation is induced.

The final nucleosides were isolated by chromatography techniques and identified by H¹-NMR spectroscopy.

Keywords: nucleoside analogues, 3'hydroxyl group, premature termination, bromine, adenine

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βίο- Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας, κ. Δημήτριου Κομιώτη στον οποίο και θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου για την υπόδειξη του θέματος όσο και για την αδιάκοπη καθοδήγηση και επιστημονική του συμπαράσταση σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας. Η αμεσότητα του στην προσπάθεια να μεταλαμπαδεύσει τις γνώσεις του, το ήθος του και ο σεβασμός του απέναντι σε όλους τους φοιτητές, αποτέλεσε το κίνητρο για να απευθυνθώ σε εκείνον για αυτό το κομμάτι των σπουδών μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τον ακαδημαϊκό υπότροφο Δρ. Νικόλαο Κολλάτο, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την αμέριστη στήριξή του κατά την διάρκεια της εργασίας μου. Η καθοδήγηση του και οι συμβουλές του μου υπέδειξαν έναν σωστό τρόπο σκέψης και πάνω από όλα μου προσέφεραν σημαντικά εφόδια για την μετέπειτα ζωή μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω εγκάρδια τον Δρ. Χρήστο Μήτσο, τόσο για την στήριξή του όσο και για τις σπουδαίες συμβουλές που μου έδινε όλο αυτό το διάστημα της παραμονής μου στο εργαστήριο, που θα αξιοποιήσω στην πορεία της επαγγελματικής μου ζωής. Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους συμφοιτητές μου που συνεργαστήκαμε κατά την περίοδο εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας, για την συμβολή τους στο να εξοικειωθώ με το χώρο του εργαστηρίου και να έχουμε ένα υπέροχο κλίμα συνεργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά μέσα από την καρδιά μου την οικογένειά μου, που ήταν δίπλα μου καθ' όλη την διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων, που με αγαπάει, με στηρίζει κάθε μου επιλογή και βήμα στην ζωή μου αλλά και που πιστεύει στις δυνατότητές μου.

Ελένη Μάρρα

*Στην οικογένειά μου,
Στον πατέρα μου Θεόδωρο, την μητέρα μου Μαρία και τον αδερφό μου Νίκο,
Σας ευχαριστώ για όλα*

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	10
ΠΙΝΑΚΕΣ.....	12
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1.1 ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ.....	13
1.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ.....	15
1.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ.....	16
1.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ.....	18
1.4.1 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ.....	19
1.4.2 ΑΝΤΙΙΚΟΙ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ.....	21
1.5 ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ.....	22
1.5.1 ΒΡΩΜΙΟ ΣΤΗΝ ΘΕΣΗ 8 ΤΗΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ.....	25
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	27
3.ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	28
3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (<i>Thin Layer Chromatography</i>).....	28
3.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ.....	29
3.3 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ.....	30
3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	30
4.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	31
4.1 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ.....	31
4.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ.....	32
4.2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 5-BENZOYΛO-1,2-O-ΙΣOΠΡOΠΥΛΙΔΕΝO-a-D-RIBOΦOYΡΑΝOΖHΣ.....	32
4.2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 5-BENZOYΛO-3-ΔEOΞY-1,2-O-ΙΣOΠΡOΠΥΛΙΔΕΝO-a-D-RIBOΦOYΡΑΝOΖHΣ.....	33
4.2.3 ΥΔΡOΛYΣH ΤΩΝ ΑΝΘΡΑΚΩΝ 1 ΚΑΙ 2 ΣΤΗΝ 5-BEΖNOYΛO-3-ΔEOΞY-1,2-O-ΙΣOΠΡOΠΥΛΙΔΕΝO-a-D-RIBOΦOYΡΑΝOΖH.....	35
.....	35
4.2.4 ΑΚΕΤYΛΙΩΣH ΤOY ΥΔΡOΞYΛΙΩΜΕΝOY ΣΑΚΧΑΡOY ΣΤΙΣ ΘΕΣΕΙΣ 1 ΚΑΙ 2.....	36
.....	36
4.2.5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ N6-BENZOYΛO ΑΔΕΝΙΝΗΣ.....	37

4.2.6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΗ ΤΗΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ.....	38
2.4.7 ΒΡΩΜΙΩΣΗ ΣΤΗΝ ΘΕΣΗ 8 ΤΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΗ ΤΗΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ	39
5. ΦΑΣΜΑΤΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕ Η¹-NMR	40
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1: ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΚΑΙ ΒΑΣΕΩΝ.(Α) ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΟΝΤΑΙ ΤΑ ΣΑΚΧΑΡΑ: Η ΡΙΒΟΖΗ ΓΙΑ ΤΟ RNA ΚΑΙ Η ΔΕΟΞΥΡΙΒΟΖΗ ΓΙΑ ΤΟ DNA. (Β) ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΦΑΙΝΕΤΑΙ Ο ΓΛΥΚΟΖΙΤΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ ΠΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΖΕΤΑΙ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΑΚΑ 1 ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΥ ΜΕ ΤΗΝ ΒΑΣΗ. (Γ) ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΟΙ ΒΑΣΕΙΣ ΑΔΕΝΙΝΗ ΚΑΙ ΓΟΥΑΝΙΝΗ, ΚΑΙ (Δ) ΟΙ ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΕΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΟΙ ΒΑΣΕΙΣ ΚΥΤΟΣΙΝΗ, ΟΥΡΑΚΙΛΗ ΚΑΙ ΘΥΜΙΝΗ.	14
ΕΙΚΟΝΑ 2 ΒΑΣΙΚΗ ΔΟΜΗ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ. ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΕΤΑΙ Η ΥΔΡΟΞΥ-ΜΕΘΥΛΟ-ΟΜΑΔΑ, Ο ΣΥΝΔΕΤΙΚΟΣ ΒΡΑΧΙΟΝΑΣ ΚΑΙ Η ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΗ ΒΑΣΗ	16
ΕΙΚΟΝΑ 3: ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΤΙΣ ΕΝΕΡΓΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥΣ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΔΙΑΔΟΧΙΚΕΣ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.	17
ΕΙΚΟΝΑ 4: ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗΣ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΑΣ ΛΟΓΩ ΑΠΟΥΣΙΑΣ ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΛΟΜΑΔΑΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΑΚΑ 3 ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗΣ.	18
ΕΙΚΟΝΑ 5: ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	20
ΕΙΚΟΝΑ 6: ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΑΝΤΙΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	22
ΕΙΚΟΝΑ 7 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ ΕΠΑΓΩΜΕΝΑ ΑΠΟ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ(PNA).(Α) ΤΑ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΩΝ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΕΙΣΕΡΧΟΝΤΑΙ ΕΝΤΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΜΕΣΩ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕΤΑΦΟΡΕΩΝ ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΥΡΥΛΙΩΝΟΝΤΑΙ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΗ ΤΟΥ ΜΟΡΦΗ. ΣΤΗΝ ΣΥΝΕΧΕΙΑ ΕΙΣΕΡΧΟΝΤΑΙ ΕΝΤΟΣ ΤΟΥ ΠΥΡΗΝΑ ΩΣΤΕ ΝΑ ΠΡΟΣΔΕΘΟΥΝ ΕΠΑΝΩ ΣΤΟ DNA ΠΡΟΚΑΛΩΝΤΑΣ ΕΙΤΕ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ DNA ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΕΙΤΕ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ, ΟΔΗΓΩΝΤΑΣ ΣΕ ΑΠΟΠΤΩΣΗ.(Β) ΈΝΑΣ ΑΚΟΜΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΙΝΑΙ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ P53 ΜΕ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΝΑ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΟΝ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΒΑΧ. ΜΕΣΩ ΑΥΤΟΥ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΝΕΤΑΙ ΤΟ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ C ΚΑΙ Ο ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (AIF)(Γ).(Δ) ΤΟ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ C ΣΧΗΜΑΤΙΖΕΙ ΜΑΖΙ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΚΑΣΠΑΣΗ-9 ΚΑΙ ΤΟΝ ΑΡΑΡΑ-1 ΤΟ ΑΠΟΠΤΩΣΜΑΤΙΟ ΣΧΗΜΑΤΙΖΟΝΤΑΣ ΤΗΝ ΚΑΣΠΑΣΗ-9 ΟΔΗΓΩΝΤΑΣ ΕΝ ΤΕΛΗ ΣΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΕΛΕΣΤΗ (ΚΑΣΠΑΣΗ-3), ΥΠΕΥΘΥΝΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΜΕΣΩ ΚΑΤΑΚΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΟΥ DNA.(Ε) ΤΕΛΟΣ ΕΝΑΣ ΑΚΟΜΗ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΙΝΑΙ Ο ΘΑΝΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ Fas/ CD95, ΟΠΟΥ ΕΙΣΕΡΧΕΤΑΙ ΤΟ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΟ ΑΝΑΛΟΓΟ ΕΝΤΟΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΕΠΑΓΟΝΤΑΣ ΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΗΣ ΚΑΣΠΑΣΗΣ-3	24
ΕΙΚΟΝΑ 8 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ L (RNase L) ΟΔΗΓΩΝΤΑΣ ΣΤΟΝ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ATP ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ 2'-5' ΑΔΕΝΙΝΗΣ, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΥΤΟΥ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ.....	25
ΕΙΚΟΝΑ 9 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ, ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΥΠΟΣΤΕΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΟΣΟ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΥ ΟΣΟ ΚΑΙ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΒΑΣΗΣ ΜΕ ΙΔΙΑΙΤΕΡΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΕΝΟΣ ΜΟΡΙΟΥ ΒΡΩΜΙΟΥ ΣΤΗΝ ΘΕΣΗ 8 ΤΗΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ.	26
ΕΙΚΟΝΑ 10 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΤΕΛΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΣΥΝΤΕΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΣΚΟΠΟ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.	27
ΕΙΚΟΝΑ 11 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ. (Α) ΤΟΠΟΘΕΤΗΜΕΝΟ ΤΟ TLC ΣΤΟΝ ΑΕΡΟΣΤΕΓΩΣ ΚΛΕΙΣΜΕΝΟ ΘΑΛΑΜΟ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΚΑΙ (Β) ΤΟ TLC ΚΑΙ Ο ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ Rf.	28
ΕΙΚΟΝΑ 12 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ.	29
ΕΙΚΟΝΑ 13 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 5-ΒΕΝΖΟΥΛΟ-1,2-Ο-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΙΔΕΝΟ-Α-D-ΡΙΒΟΦΟΥΡΑΝΟΖΗΣ. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ.	32
ΕΙΚΟΝΑ 14 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΗΣ 5-ΒΕΝΖΟΥΛΟ-3-ΔΕΟΞΥ-1,2-Ο-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΙΔΕΝΟ-Α-D-ΡΙΒΟΦΟΥΡΑΝΟΖΗΣ ΜΕ ΤΟΝ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΟΥ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟΥ ΜΟΡΙΟΥ.	33
ΕΙΚΟΝΑ 15 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΡΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΟΥ 3' ΔΕΟΞΥ ΣΑΚΧΑΡΟΥ ΑΠΟ ΤΟΝ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ ΕΣΤΕΡΑ	34
ΕΙΚΟΝΑ 16 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΘΡΑΚΩΝ 1 ΚΑΙ 2 ΣΤΟ ΣΑΚΧΑΡΟ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ.....	35
ΕΙΚΟΝΑ 17 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΑΚΑ 1 ΚΑΙ 2 ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΥ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ.....	36
ΕΙΚΟΝΑ 18 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ N6-ΒΕΝΖΟΥΛΟ-ΑΔΕΝΙΝΗΣ, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΑΤΩΣΗ ΤΗΣ.	37
ΕΙΚΟΝΑ 19 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΗ ΤΗΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΑΤΩΣΗ ΤΗΣ.	38
ΕΙΚΟΝΑ 20 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΒΡΩΜΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ 8 ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΕΡΑΤΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.	39

ΕΙΚΟΝΑ 21 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ H-NMR ΤΟΥ 3΄ΔΕΟΞΥ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΗ ΤΗΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ.....	40
ΕΙΚΟΝΑ 22 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ H-NMR ΤΟΥ 3΄ΔΕΟΞΥ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΗ ΤΗΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΤΟΥ ΒΡΩΜΙΟΥ ΣΤΗΝ ΘΕΣΗ 8.	41
ΕΙΚΟΝΑ 23 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΚΥΡΙΟΤΕΡΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΠΟΥ ΣΥΝΤΕΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.	42

ΠΙΝΑΚΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 ΑΝΑΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΤΟΣΟ ΓΙΑ TLC ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΟΣΟ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ R _F ΑΛΛΑ ΚΑΙ Η % ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.	32
ΠΙΝΑΚΑΣ 2 ΑΝΑΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΤΟΣΟ ΓΙΑ TLC ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΟΣΟ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ R _F ΑΛΛΑ ΚΑΙ Η % ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.	33
ΠΙΝΑΚΑΣ 3 ΑΝΑΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΤΟΣΟ ΓΙΑ TLC ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΟΣΟ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ R _F ΑΛΛΑ ΚΑΙ Η % ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.	34
ΠΙΝΑΚΑΣ 4 ΑΝΑΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΤΟΣΟ ΓΙΑ TLC ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΟΣΟ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ R _F ΑΛΛΑ ΚΑΙ Η % ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.	35
ΠΙΝΑΚΑΣ 5 ΑΝΑΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΤΟΣΟ ΓΙΑ TLC ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΟΣΟ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ R _F ΑΛΛΑ ΚΑΙ Η % ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.	36
ΠΙΝΑΚΑΣ 6 ΑΝΑΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΤΟΣΟ ΓΙΑ TLC ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΟΣΟ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ R _F ΑΛΛΑ ΚΑΙ Η % ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.	38
ΠΙΝΑΚΑΣ 7 ΑΝΑΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΤΟΣΟ ΓΙΑ TLC ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΟΣΟ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ R _F ΑΛΛΑ ΚΑΙ Η % ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ.	39

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ

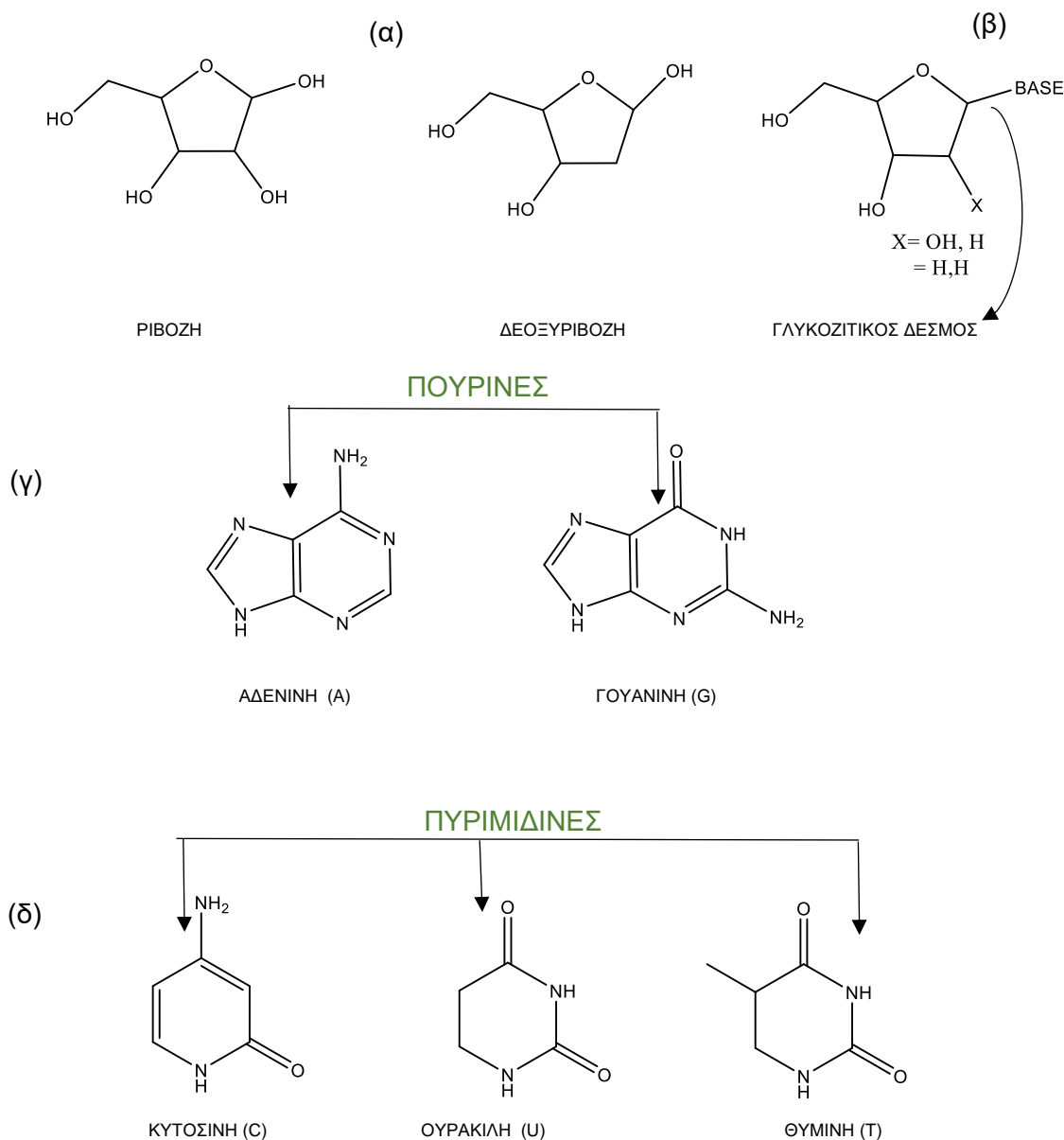
Τα νουκλεϊκά οξέα, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA), είναι τα μόρια-φορείς της γενετικής πληροφορίας ενός κυττάρου. Τα νουκλεϊκά οξέα αποτελούνται από νουκλεοτίδια, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας μακριές αλυσίδες. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από ένα νουκλεοζίτη (ή νουκλεοσίδιο) συνδεδεμένο με μία φωσφορική ομάδα, και κάθε νουκλεοζίτης αποτελείται από μία αλδοπεντόζη συνδεδεμένη, μέσω του ανωμερικού της άνθρακα, με το άτομο αζώτου μίας ετεροκυκλικής βάσης τύπου πουρίνης ή πυριμιδίνης.

Το σάκχαρο (εικ. 1(α)) που είναι δομικό συστατικό του RNA είναι η ριβόζη ενώ του DNA είναι η 2'-δεοξυριβόζη¹, όπου το συνθετικό δέοξυ- προσδιορίζει ότι το 2'-C του σακχάρου δεν έχει το άτομο του οξυγόνου που βρίσκεται συνδεδεμένο στο 2'-άτομο C της ριβόζης. Το DNA περιέχει τέσσερις διαφορετικές αζωτούχες βάσεις: (εικ. 1(γ)) 2 υποκατεστημένες πουρίνες (αδενίνη και γουανίνη) και (εικ. 1(δ)) 2 υποκατεστημένες πυριμιδίνες (κυτοσίνη και θυμίνη). Η αδενίνη, η γουανίνη και η κυτοσίνη αποτελούν επίσης δομικά συστατικά των μορίων RNA, όμως αντί για θυμίνη στα μόρια RNA υπάρχει μία άλλη, δομικά παρόμοια, πυριμιδινική βάση που ονομάζεται ουρακίλη.

Οι πυριμιδίνες είναι ετεροκυκλικές αρωματικές ενώσεις με δομή ενός εξαμελούς δακτυλίου όπου στις θέσεις 1 και 3 έχει ένα άτομο αζώτου. Οι πουρίνες είναι ετεροκυκλικές αρωματικές οργανικές ενώσεις με δομή διπλού δακτυλίου, ενός δακτυλίου πυριμιδίνης συντηγμένο με ένα δακτύλιο ιμιδαζολίου έχοντας στις θέσεις 1,3,7 και 9 από ένα άτομο αζώτου. Είναι οι πιο καταναμημένες ενώσεις αυτού του τύπου στην φύση. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο δακτύλιος της αδενίνης κατά κύριο λόγο είναι ένας από τους πιο συχνά εμφανιζόμενους δακτυλίους ετεροκυκλικών ενώσεων στους ζωντανούς οργανισμούς, τόσο στο DNA και στο RNA, αλλά και ως συστατικό διαφόρων συμπαραγόντων όπως τα οξειδοαναγωγικά συνένζυμα, το νικοτιναμίδο-αδένινο-δινουκλεορίδιο (NADH), το φλαβινο-αδένινο-νουκλεοτίδιο (FAD), το ακέτυλο συνένζυμο A (AcCoA), η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) καθώς και η μονοφωσφορική κυκλική αδενοσίνη (cAMP) (Berg, Tymoczko et al. 2015).

Το N-9 μίας πουρίνης ή το N-1 μιας πυριμιδίνης συνδέεται στο C-1' του σακχάρου, (εικ. 1(β)) δημιουργώντας έτσι έναν β-N γλυκοζιτικό δεσμό καθώς η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου. Ένα νουκλεοτίδιο είναι ο φωσφορικός εστέρας του νουκλεοζίτη. Η πιο κοινή θέση εστεροποίησης σε ένα φυσικό νουκλεοτίδιο είναι η υδροξυλική ομάδα που συνδέεται στην θέση C-5' του σακχάρου. Κυτταρικές κινάσες συνδέουν μία φωσφορική ομάδα στο C-5' του σακχάρου ενός νουκλεοζίτη σχηματίζοντας 5'-νουκλεοτίδια (McMurry 2016).

¹ Στην ονοματολογία και στην αρίθμηση των νουκλεοτιδίων, οι αριθμοί που φέρουν τονισμό αναφέρονται σε θέσεις του σακχάρου και οι αριθμοί χωρίς τονισμό αναφέρονται σε θέσεις του ετεροκυκλικού δακτυλίου της αζωτούχης βάσης.



Εικόνα 1: Απεικόνιση σακχάρων και βάσεων. (α) Απεικονίζονται τα σάκχαρα: η ριβόζη για το RNA και η δεοξυριβόζη για το DNA. (β) Επιπλέον φαίνεται ο γλυκοζιτικός δεσμός που σχηματίζεται στον άνθρακα 1 του σακχάρου με την βάση. (γ) Απεικόνιση των πουρινών και συγκεκριμένα οι βάσεις αδενίνη και γουανίνη, και (δ) οι πυριμιδίνες και συγκεκριμένα οι βάσεις κυτοσίνη, ουρακίλη και θυμίνη.

Το ενδιαφέρον των ερευνητών για τους νουκλεοζίτες αυξήθηκε ραγδαία την δεκαετία του '40, όπου εμπειριστατωμένες μελέτες πάνω στην χημική σύνθεση και τις βιολογικές ιδιότητες της συγκεκριμένης κατηγορίας ενώσεων οδήγησαν σε ορισμένες σημαντικές δομές νουκλεοζιτικών αναλόγων με ακόμη περισσότερες σημαντικές τόσο βιολογικές όσο και φαρμακευτικές εφαρμογές. Έκτοτε, ένα πλήθος αναλόγων έχει συντεθεί, τα οποία έχουν υποστεί τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα του σακχάρου όσο και στον ετεροκυκλικό δακτύλιο της βάσης (Mikhailopulo and Miroshnikov 2010).

Σύγχρονες μελέτες έχουν δείξει ότι τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να δράσουν ως αντιμεταβολίτες. Με τον όρο αυτό, ορίζονται τα φάρμακα που εμφανίζουν δομή όμοια με τις φυσικές ουσίες που είναι απαραίτητες για την ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Η

δομική αυτή ομοιότητα επιτρέπει σε πολλούς από τους αντιμεταβολίτες να λειτουργήσουν ως υποστρώματα σημαντικών κυτταρικών ενζύμων. Με αυτόν τον τρόπο, δηλαδή, ανταγωνίζονται τους φυσικούς νουκλεοζίτες και αλληλεπιδρούν με ενδοκυττάρους στόχους. Χημικά τροποποιημένοι νουκλεοζίτες χρησιμοποιούνται εδώ και σχεδόν μισό αιώνα σε κλινικές μελέτες αποτελώντας σημαντικό λίθο για τη θεραπεία πολλών ιικών μολύνσεων ή διαφόρων μορφών καρκίνου. Είναι πολύ σημαντικό να τονισθεί ότι, τα τελευταία χρόνια έχουν εγκριθεί από τη Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration-FDA) αρκετά φάρμακα στα οποία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο περιέχεται ως δραστική ουσία (Jordheim, Durantel et al. 2013). Επιπλέον, διάφορες μελέτες έχουν κάνει γνωστούς πιθανούς μηχανισμούς αντιικής και αντικαρκινικής δράσης, δίνοντας, έτσι, σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τους μεταβολικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένου της μεταβολικής ενεργοποίησης και απενεργοποίησης.

1.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ

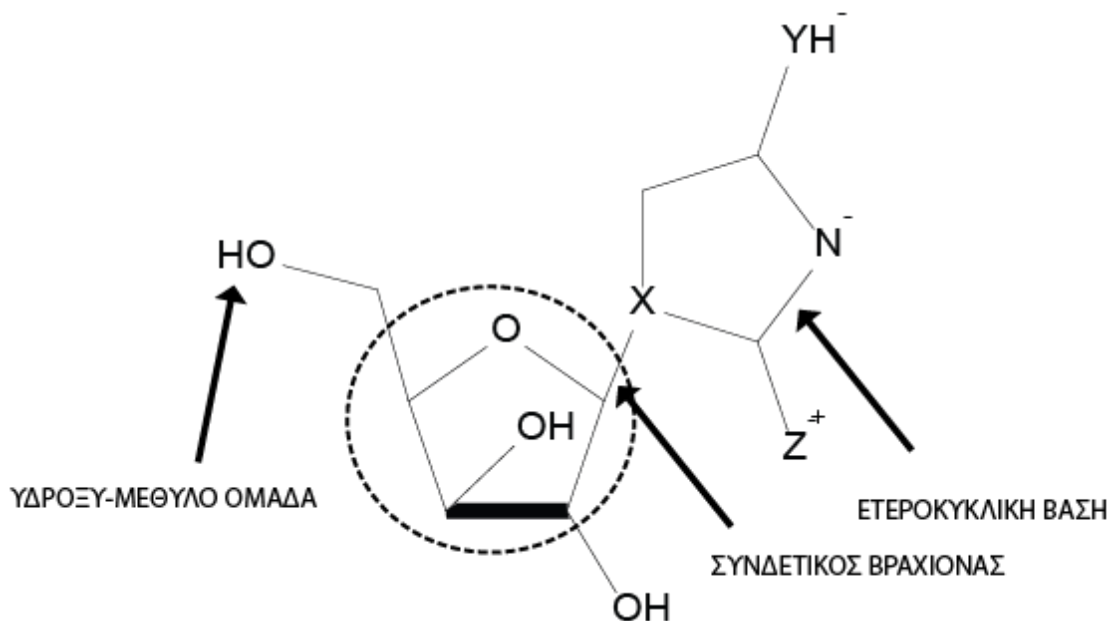
Ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο για την βελτιστοποίηση των αντιικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων αποτελεί η τροποποίηση των νουκλεοζιτών. Η ανάπτυξη νέων αναλόγων είναι μια διαρκής προσπάθεια με τροποποίηση τόσο στο τμήμα του σακχάρου όσο και στο άγλυκο τμήμα προκειμένου να επιτευχθεί η βελτιστοποίηση. Η ετεροκυκλική βάση αναγνωρίζεται από τα ένζυμα και προστίθεται στο συμπληρωματικό κλώνο κατά την σύνθεση του DNA.

Κάθε βιολογικά ενεργός νουκλεοζίτης αποτελείται κατά κανόνα από (εικ.2):

- i. Από μία ετεροκυκλική βάση
- ii. Το τμήμα του σακχάρου και,
- iii. Μία υδροξυ-μέθυλο ομάδα, η οποία απαιτείται για την ενεργοποίηση του αναλόγου από τις κυτταρικές κινάσες .

Το τμήμα του σακχάρου μπορεί να θεωρηθεί σαν ένας συνδετικός βραχίονας (spacer) που συνδέει την ετεροκυκλική βάση με την υδροξυ-μέθυλο ομάδα (Hernandez-Reyes, Angeles-Beltran et al. 2012). Η βιολογική δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων συχνά καθορίζεται από την φύση του συνδετικού βραχίονα, ο οποίος ασκεί μία σημαντική επίδραση στη διαμόρφωση του μορίου και στις αλληλεπιδράσεις των ενώσεων με τις κυτταρικές κινάσες.

Οι τροποποιήσεις στο τμήμα του σακχάρου περιλαμβάνουν, αντιστροφή στη διαμόρφωση των υδροξυλομάδων, υποκαταστάσεις (υδροξυλομάδας) με διάφορες φαρμακοφόρες ομάδες, οδηγώντας σε δέοξυ ή διδέοξυ ανάλογα και σε άνοιγμα του δακτυλίου δίνοντας άκυκλους νουκλεοζίτες, με στόχο την αναγνώριση τους από την DNA πολυμεράση και την ενσωμάτωσή τους στην πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Κατά συνέπεια, απουσία της ομάδας του υδροξυλίου από τον άνθρακα 3 του σακχάρου, οδηγεί στον πρόωρο τερματισμό της επιμήκυνσης της αλυσίδας είτε του DNA είτε του RNA καθώς καθίσταται αδύνατο να δημιουργηθεί ο 3'-5' φωσφοδιεστερικός δεσμός (Berg, Tymoczko et al. 2015, Rahman, Raj et al. 2018, Ramesh, Vijayakumar et al. 2021).



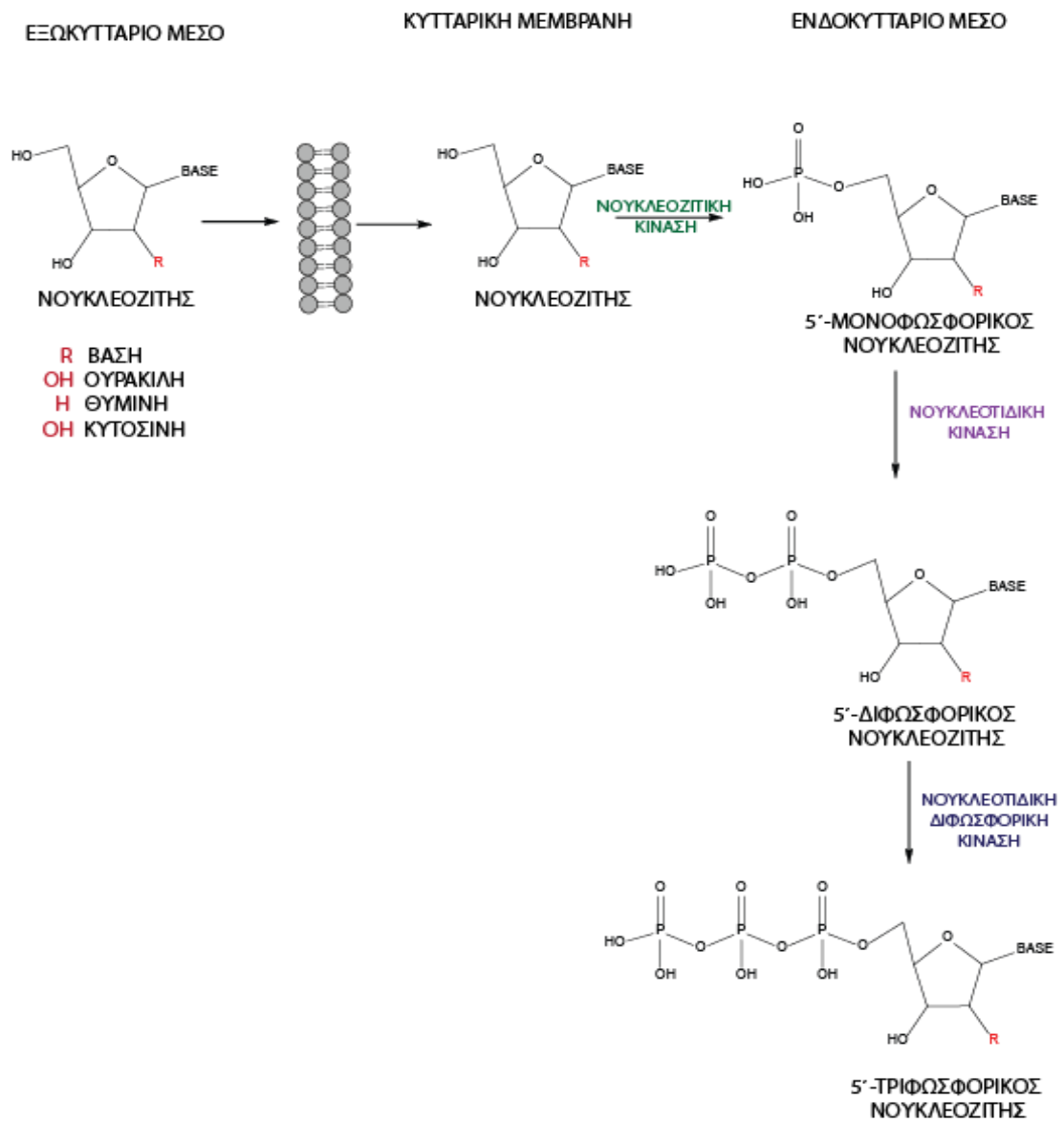
Εικόνα 2 Βασική δομή νουκλεοζιτών. Απεικονίζεται η ύδροξυ-μέθυλο-ομάδα, ο συνδετικός βραχίονας και η ετεροκυκλική βάση

1.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

Οι φαρμακευτικές ενώσεις ασκούν την δράση τους αλληλεπιδρώντας με διάφορους μοριακούς στόχους, όπως μόρια μεταφορείς, πρωτεΐνες, ένζυμα αλλά και νουκλεϊκά οξέα, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη φυσιολογία της λειτουργίας των κυττάρων και του οργανισμού. Στην περίπτωση που ο μοριακός στόχος του φαρμάκου είναι εντός του κυττάρου (ενδοκυτταρικός), είναι απαραίτητη η εισαγωγή του στο εσωτερικό του κυττάρου, ώστε να μπορέσει να δράσει. Η εκλεκτική επίδραση ενός φαρμάκου με το μοριακό του στόχο αποτελεί ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό, καθώς έτσι αποφεύγεται η παρεμβολή του σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου, καθώς και προβλήματα τοξικότητας που ενδεχομένως να προκύψουν.

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι τα περισσότερα νουκλεοζιτικά ανάλογα που παρουσιάζουν αντιικές ή/ και αντικαρκινικές ιδιότητες δεν είναι από μόνα τους ενεργά, αλλά γίνονται αφού μεταφερθούν στο κύτταρο όπου θα μεταβολιστούν από ενδοκυτταρικά ένζυμα. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι υδρόφιλα μόρια και η παθητική τους διάχυση είναι περιορισμένη με αποτέλεσμα να απαιτείται η συμβολή εξειδικευμένων πρωτεϊνών μεταφοράς ώστε να διαπεράσουν τις πλασματικές μεμβράνες και να εισαχθούν εν τέλει στα κύτταρα. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες παρουσιάζουν ένα μοτίβο έκφρασης που εξαρτάται από τον ιστό και επηρεάζει τη φαρμακολογική δράση των τροποποιημένων νουκλεοζιτών (Pastor-Anglada, Felipe et al. 1998). Όταν τα ανάλογα αυτά εισαχθούν στο κύτταρο, φωσφορυλιώνονται προς τα τριφωσφορικά τους παράγωγα από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα (εικ.3). Η πρώτη φωσφορυλίωση οδηγεί στον σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού (MP) νουκλεοζίτη και πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας νουκλεοζιτικής κινάσης. Στη συνέχεια, η μετατροπή του MP-νουκλεοζίτη προς την αντίστοιχη 5'-διφωσφορική και τριφωσφορική του δομή καταλύεται από νουκλεοτιδικές κινάσες

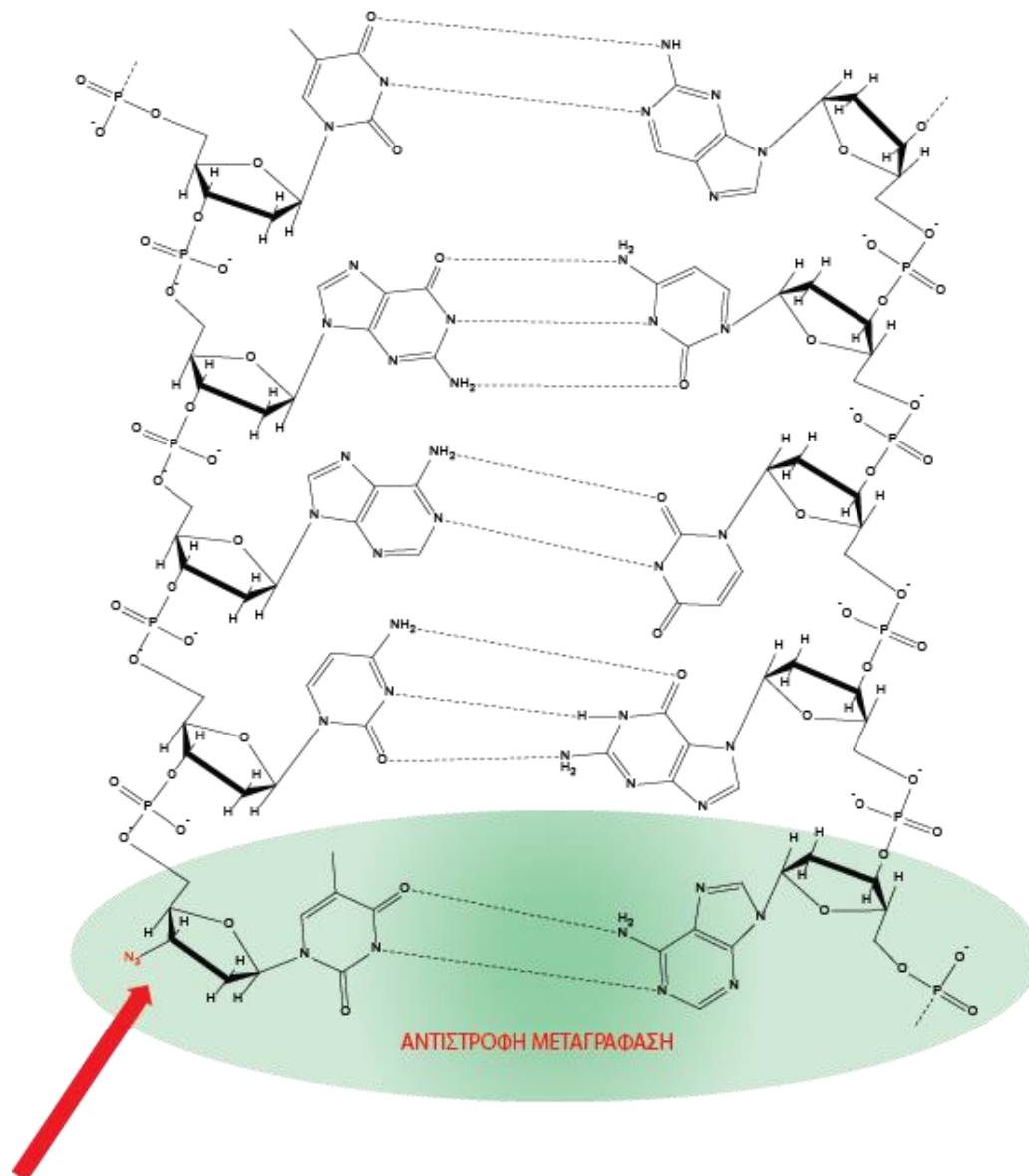
καθώς και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντίστοιχα (Wagner, Iyer et al. 2000). Ακολουθως, οι ενεργές τριφωσφορικές δομές των αναλόγων είτε ενσωματώνονται και τροποποιούν τα μακρομόρια του DNA και του RNA, είτε παρεμβάλλονται σε διάφορα ένζυμα που σχετίζονται με τη σύνθεση των νουκλεϊκων οξέων, όπως οι DNA πολυμεράσες, επάγοντας έτσι την κυτταροτοξική ή την ανιικη τους δράση (Galmarini, Mackey et al. 2002).



Εικόνα 3: Μετατροπή των νουκλεοζιτικών αναλόγων στις ενεργές μορφές τους έπειτα από διαδοχικές φωσφορυλιώσεις στο εσωτερικό των κυτάρων.

1.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

Ένας κοινός μηχανισμός αντιικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωσή τους στην επιμήκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας έτσι τη διακοπή της επιμήκυνσης της. Η εν λόγω δράση παρουσιάζεται στο χαρακτηριστικό παράδειγμα του φαρμάκου AZT (αζινοθυμιδίνη), όπου ο άζιδο-νουκλεοζίτης εισέρχεται στο κύτταρο, ενεργοποιείται από τον μεταβολισμό του κυττάρου, σχηματίζοντας την τριφωσφορική δομή του νουκλεοζίτη, και στη συνέχεια δρα ως αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης, καθώς διακόπτει την επιμήκυνση της αλυσίδας με αποτέλεσμα την απομάκρυνση του ενζύμου από αυτή. (εικ.4) Η δράση αυτή επιτυγχάνεται λόγω απουσίας της 3'-υδροξυλομάδας με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ενωθεί με την 5'- φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου (De Clercq 2004).



Εικόνα 4: Απεικόνιση της αναστολής της επιμήκυνσης της αλυσίδας λόγω απουσίας της υδροξυλομάδας στον άνθρακα 3 και αναστολή της αντίστροφης μεταγραφάσης.

Η εκλεκτικότητα ανάμεσα στην αντιική και την κυτταροτοξική δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων εξαρτάται από την εξειδίκευση του υποστρώματος των τριφωσφορικών τους δομών ως προς τις ιικές και κυτταρικές πολυμεράσες. Μια ακόμη λειτουργία των νουκλεοζιτικών αναλόγων είναι αυτή ως αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες, μέσω αναστολής και άλλων ενζύμων όπως είναι και η αφυδρογονάση της μονοφωσφορικής ινοσίνης και η συνθάση της τριφωσφορικής κυτιδίνης (Camarasa, Perez-Perez et al. 1992). Οι συγκεκριμένες έρευνες οδηγούν στην ανάπτυξη ενώσεων οι οποίες θα στοχεύουν σε διαφορετικά ένζυμα και οι οποίες θα διαθέτουν συνεργατική δράση με τους κλασικούς αναστολείς των πολυμερασών.

Η πρόοδος στην ανίχνευση και στην μελέτη του τρόπου δράσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων οδήγησε στην στοχευμένη σύνθεση παραγώγων με αποτελεσματικότερη φαρμακολογική δράση. Από τα ευρήματα, έγινε γνωστό ότι τα νουκλεοζιτικά ανάλογα, απενεργοποιούνται μέσω καταβολικών διαδικασιών. Τέτοιες διαδικασίες είναι η απαμίνωση των νουκλεοζιτών της κυτοσίνης και της αδενίνης από τις αντίστοιχες απαμινάσες αλλά και την υδρόλυση του γλυκοζιτικού δεσμού από τις νουκλεοζιτικές φωσφορυλάσες (Peter 1975, E. 2002, Jordheim, Durantel et al. 2013).

1.4.1 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ

Με τον γενικό όρο καρκίνο είναι γνωστή μία κατηγορία ασθενειών ή διαταραχών με κύριο χαρακτηριστικό την ανεξέλεγκτη διαίρεση κυττάρων, στα οποία καθίσταται δυνατό να εισέρχονται σε άλλους ιστούς είτε λόγω της άμεσης αύξησης στον παρακείμενο ιστό μέσω εισβολής, είτε από την εμφύτευση σε απόμακρες περιοχές μέσω μετάστασης. Εναντίον του καρκίνου εφαρμόζοντας 3 θεραπευτικές προσεγγίσεις, είτε μεμονωμένα είτε συνδυαστικά :

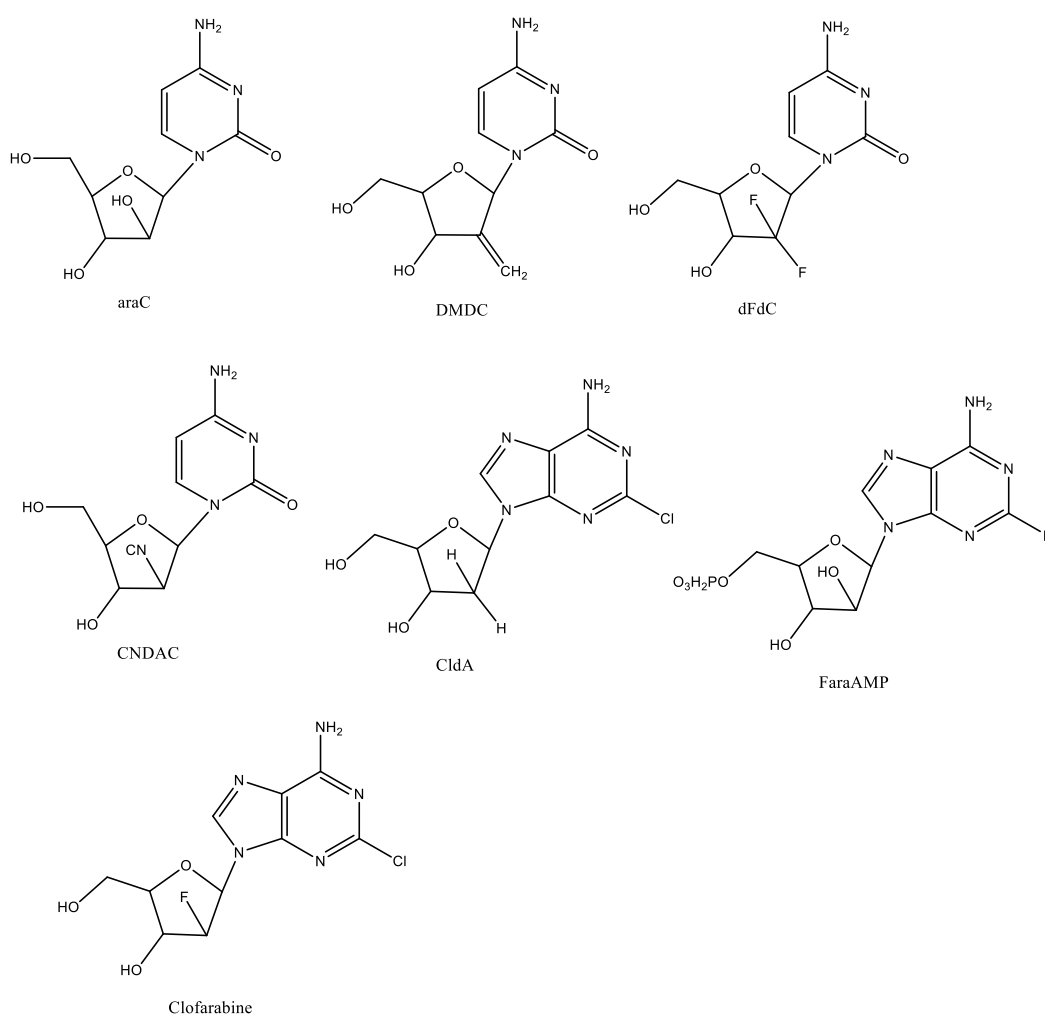
- i. Χειρουργική επέμβαση
- ii. Ακτινοθεραπεία
- iii. Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία θεωρείται ως η πλέον κατάλληλη μέθοδος για την θεραπεία των όγκων σε προχωρημένο στάδιο, στην περίπτωση που τα κακοήθη κύτταρα συρρέουν κατά κόρον στον οργανισμό. Προκειμένου να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας συνίσταται η εύρεση νέων αντικαρκινικών ουσιών, οι οποίες διαθέτουν αυξημένη δραστηριότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης.

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογα τους έχουν μελετηθεί πολύ εντατικά ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (Robins and Kini , Elion 1989). Ένας μεγάλος αριθμός φυσικών νουκλεοζιτών χρησιμοποιείται πολλά χρόνια στην ιατρική για την θεραπεία καρκινικών ασθενειών. Μία εξήγηση για την επιλεκτικότητα τους θα μπορούσε να είναι ότι η πλειονότητα των καρκινικών κυττάρων στον κύκλο είναι πιο ευαίσθητα σε ανάλογα νουκλεοσιδίων αλλά και στους μεταβολίτες των νουκλεοτιδίων τους, σε σύγκριση με τα κύτταρα ανάπαυσης.

Μία εκτενής μελέτη των αντικαρκινικών φαρμάκων που έχουν ήδη εγκριθεί από τον FDA, παρουσίασε ότι οι νουκλεοζίτες αποτελούν μία πολύ σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών μέσων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κάποια από τα μόρια με αντικαρκινική δράση τα οποία έχουν εγκριθεί από τον FDA είναι αντιμεταβολίτες αλλά και νουκλεοζίτες ή συγγενικά μόρια τα οποία επηρεάζουν την σύνθεση του DNA με ποικίλους τρόπους. Για αυτόν τον λόγο, δεν είναι τυχαίο το γεγονός, ότι το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία, το 15% των αντικαρκινικών φαρμάκων σχετίζονται με νουκλεοζιτικά ανάλογα.

Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες, όπως οι 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC) (Matsuda and Sasaki 2004), 1-(2'-δέοξυ-2'-μεθυλένο-β-D-πεντοφουρανόζυλο) κυτοσίνη (DMDC) (Takenuki, Matsuda et al. 1988, Baker, Banzon et al. 1991, Matsuda, Nakajima et al. 1991, Yamagami, Fujii et al. 1991, Cory, Samano et al. 1994), 2'-δέοξυ-2',2'-διφθοροκυτιδίνη (gemcitabine, dFdC) (Plunkett, Huang et al. 1995), 1'-(2'-κύανο-2'-δέοξυ-β-D-αράβινο-πεντοφουρανόζυλο) κυτοσίνη (CNDAC) (Matsuda, Nakajima et al. 1991, Tanaka, Matsuda et al. 1992, Azuma, Nakajima et al. 1993), 2-χλώρο-2'-δέοξυαδενοσίνη (CldA) και 5'-μονοφωσφορική 9-β-D-αράβινοφουρανόζυλο-2 φθοροαδενίνη (φλουδαραβίνη-Fara AMP) (Matsuda and Sasaki 2004) έχουν μελετηθεί ως προς τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες και είναι αποτελεσματικές ενώσεις όχι μόνο κατά της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων, αλλά και κατά κακοήθων όγκων (εικ.5).



Εικόνα 5: Νουκλεοζιτικά ανάλογα με αντικαρκινική δράση.

Στα τέλη του 2004, ο FDA ενέκρινε ακόμη ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο ως αντικαρκινικό μέσο, το clofarabine (χλωφαραβίνη), το οποίο εγκρίθηκε για την θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Faderl, Gandhi et al. 2002, Faderl, Gandhi et al. 2005).

1.4.2 ΑΝΤΙΙΚΟΙ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ

Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1960, το πρόβλημα της διάκρισης των ιογενών λειτουργιών από τις κυτταρικές λειτουργίες ήταν ανυπέβλητο. Η κύρια στρατηγική για τον έλεγχο των ιογενών λοιμώξεων ήταν η ανάπτυξη εμβολίων, τα οποία δεν επιτίθενται σε ιούς άμεσα, αλλά προλαμβάνουν τη μόλυνση προκαλώντας εξ των προτέρων το ανοσοποιητικό σύστημα. Χρήζει ιδιαίτερης σημασίας το γεγονός ότι η τεχνική αυτή βρίσκει εφαρμογή ακόμη και σήμερα.

Συσσωρεύοντας γνώσεις για την αντιγραφή των ιών, κατέστησε δυνατό τον προσδιορισμό συγκεκριμένων στόχων που θα μπορούσαν να επηρεαστούν από αντιικούς παράγοντες.

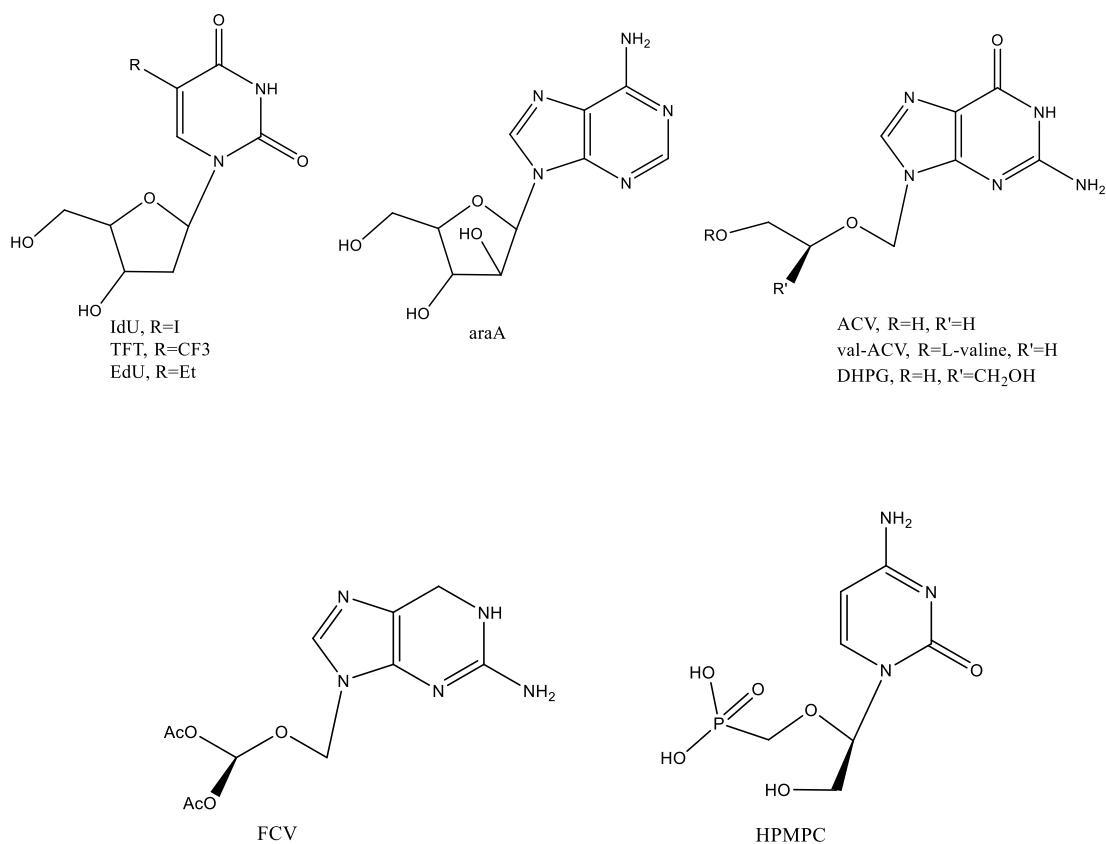
Ο κύκλος αναπαραγωγής του ιού αποτελείται από:

- Προσρόφηση του ισωματίου στην κυτταρική μεμβράνη
- Διείσδυση και επικάλυψη
- Αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος και της πρωτεΐνης
- Συγκρότηση μακρομορίων σε ένα ισωμάτιο και τέλος
- Απελευθέρωση ισωματίου από τα κύτταρα

Κάθε φάρμακο που παρεμβαίνει επιλεκτικά σε ένα από αυτά τα συμβάντα, καθιστώντας το υποψήφιο για κλινική χρήση. Οι κύριοι στόχοι των αντιικών νουκλεοσιδικών αναλόγων είναι τα ενδοκυτταρικά βιοσυνθετικά μονοπάτια και η επιλεκτικότητά τους οφείλεται γενικά στην αναστολή ενζύμων που σχετίζονται ή προκαλούνται από ιούς που εμπλέκονται στον μεταβολισμό νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδίων. Κατά αυτόν τον τρόπο αποτελούν μέχρι και σήμερα τον θεμελιώδη λίθο για την ανάπτυξη αντιικών παραγωγών. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία, το 55% των αντιικών φαρμάκων σχετίζονταν με νουκλεοζιτικό ανάλογο. Ιδιαίτερης σημασίας χρήζει το γεγονός ότι έξι από τα δεκαπέντε φάρμακα, τα οποία διατίθενται για την θεραπεία του AIDS είναι νουκλεοζιτικά ανάλογα (νουκλεοζίτες, αναστολείς της αντίστροφης τρανσκριπτάσης, NRTIs) μαζί με τρία μη NRTIs, καθώς και έξι αναστολείς της πρωτεάσης. Μεταξύ των NRTIs, η 3TC (lamivudine) είναι το φάρμακο, το οποίο χρησιμοποιείται τόσο για την θεραπεία του AIDS όσο και για την θεραπεία έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV). Επιπλέον είναι το μόνο το οποίο έχει εγκριθεί από τον FDA, εκτός από την interferon-α.

Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι εννέα ακόμη νουκλεοζίτες οι idoxuridine (ιδοξουριδίνη, IdU), trifluridine (τριφλουριδίνη, TFT), acedurid (ασεδουριδίνη, EdU), vidarabine (βιδαραβίνη, ara A), acyclovir (ακυκλοβίρη, ACV), valaciclovir (βαλακυκλοβίρη, val-ACV), ganciclovir (γανσικλοβίρη, DHPG), famciclovir (φαμσικλοβίρη, FCV), cidofovir (συντοφοβίρη, HPMPC) χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ασθενειών που προκαλούνται από ερπεροϊούς, όπως από τον ιό του απλού έρπητα τύπου 1 (Herpes Simplex Virus, HSV-1) και τύπου 2 (HSV-2), τον κυτταρομεγαλοϊό (cytomegalovirus, HCMV) και

τον ιό έρπητα ζωστήρα (varicella- zoster virus, VZV) (εικ.6) (Zhou, Gumina et al. 2004, Manta, Agelis et al. 2008).



Εικόνα 6: Νουκλεοζιτικά ανάλογα με αντιική δράση.

1.5 ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα των πουρινών (purines nucleoside analogs- PNA) έχουν χημική δομή όμοια με την αδενοσίνη και την γουανοσίνη και αντιπροσωπεύουν μια ομάδα κυτταροτοξικών παραγόντων με υψηλή ανοσοκατασταλτική και αντινεοπλασματική δράση. Το σημείο κλειδί για την δράση τους είναι η επαγωγή της απόπτωσης μέσα από διάφορα μονοπάτια. Αρκετές κλινικές δοκιμές έχουν δείξει ότι τα PNAs που χρησιμοποιούνται μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλα κυτταροτοξικά φάρμακα ή με μονοκλωνικά αντισώματα έχουν καλή αποτελεσματικότητα και επιθυμητά επίπεδα τοξικότητας στην θεραπεία τόσο έναντι ιών όσο και έναντι κακοηθειών (Robak and Robak 2012).

Προκειμένου να δράσουν, (εικ.7) τα PNAs θα πρέπει να γίνει εισαγωγή τους εντός του κυττάρου με πρωτεΐνες μεταφοράς και στην συνέχεια να φωσφοριλιωθούν και να μετατραπούν στην τριφωσφορική τους δομή όπου είναι και η ενεργή τους μορφή (PNA-TP). Η κυτταροτοξικότητα του τριφωσφορικού PNA στα κύτταρα πολλαπλασιασμού, οφείλεται κυρίως στην αναστολή είτε της DNA πολυμεράσης, είτε της ριβονουκλεοτιδι-

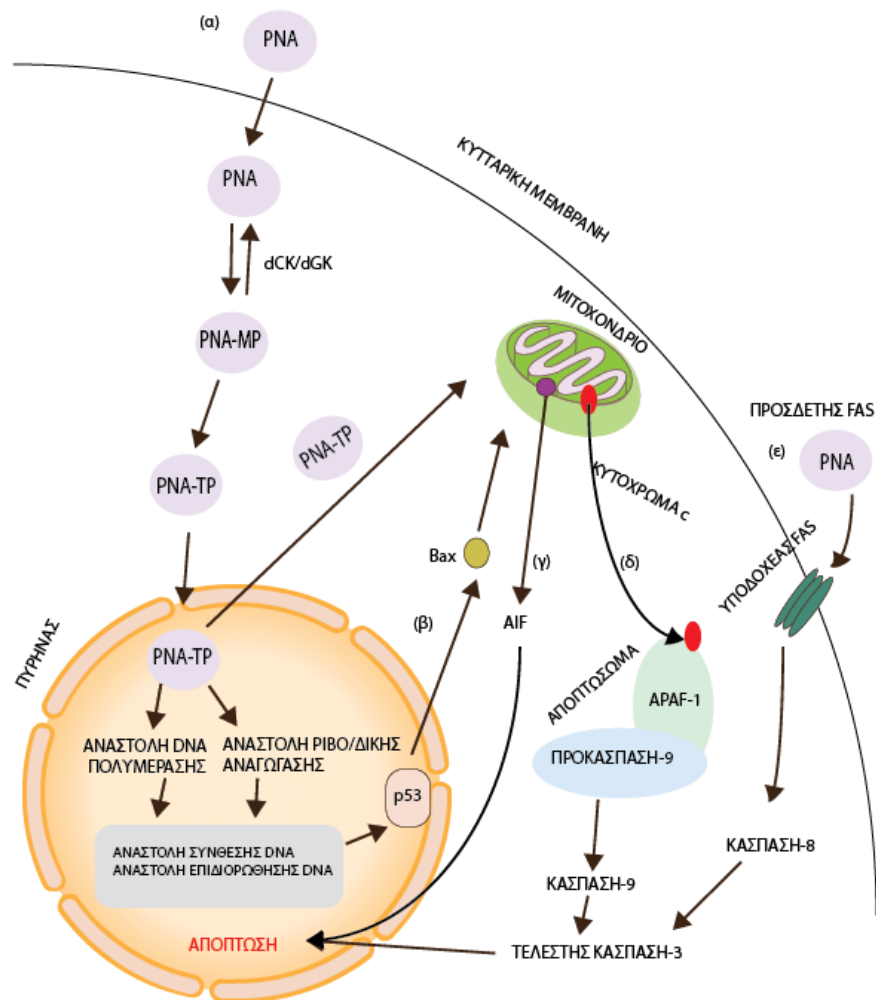
κής αναγωγής, οδηγώντας σε ανισορροπία στην δεξαμενή των τριφωσφορικών δεοξυουκλεοτιδίων και μέσω ενεργοποίησης της ενδονουκλεάσης επάγεται η διάσπαση του DNA κλώνου. Ένα σημαντικό σημείο στον μηχανισμό της δράσης των PNAs είναι η ενσωμάτωση του στο DNA και η αναστολή είτε της σύνθεσης του DNA είτε της επιδιόρθωσης, η οποία οδηγεί σε συσσώρευση DNA θραυσμάτων οδηγώντας στην απόπτωση.

Τα θραύσματα του DNA, ενεργοποιούν την poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1), ένα ένζυμο το οποίο έχει αναδυθεί ως ένα κρίσιμο ρυθμιστικό συστατικό της άμεσης κυτταρικής απόκρισης στη βλάβη του DNA. Όταν το DNA είναι ελαφρώς κατεστραμμένο, το PARP-1 ενεργοποιείται και συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA, οδηγώντας στην επιβίωση των κυττάρων. Ωστόσο, σε περίπτωση εκτεταμένης βλάβης του DNA, το PARP-1 είναι ενεργοποιημένο σε υψηλό βαθμό με αποτέλεσμα την εξάντληση μορίων όπως το NAD και το ATP. Με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα μπορούν να οδηγηθούν στην νέκρωση. Αυτός είναι ο κύριος μηχανισμός δράσης των PNAs για να κατευθύνουν τα κύτταρα στην απόπτωση.

Η βλάβη του DNA λόγω της αναστολής της επιδιόρθωσης του και η συσσώρευση των θραυσμάτων επάγει την έκφραση του p53, το οποίο διαδραματίζει βασικό ρόλο στον έλεγχο της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου. Στην φάση ηρεμίας το τριφωσφορικό PNA παρεμβαίνει στη σωστή επιδιόρθωση του DNA και οδηγεί σε ολική διακοπή του κυτταρικού μεταβολισμού μέσω της συσσώρευσης θραυσμάτων στον κλώνο του DNA, στην έκφραση του p53 και κατά συνέπεια στην επαγωγή της απόπτωσης.

Η απόπτωση επαγόμενη από το τριφωσφορικό PNA μπορεί να μεσολαβηθεί από εγγενή οδό είτε μέσω της βλάβης του DNA και έκφρασης της πρωτεΐνης p53 ή απευθείας μέσω πόρων διαπερατότητας των μιτοχονδρίων (MIT- mitochondrial permeability transition pore), συντελώντας στην απελευθέρωση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως είναι το κυτόχρωμα c και ο αποπτωτικός παράγοντας (AIF-apoptotic inducing factor). Εντούτοις, το PNA μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο μέσω υποδοχέων Fas/CD95 από εξωγενή οδό. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι το p53 επηρεάζει τον αποπτωτικό παράγοντα Bax, ο οποίος αυξάνει το άνοιγμα του μιτοχονδριακού καναλιού ανιόντος που εξαρτάται από την τάση (VDAC), το οποίο οδηγεί στην απώλεια δυναμικού της μεμβράνης και στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την δραστηριότητα άλλων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών που οδηγούν σε αλλαγές των μιτοχονδρίων τυπικές για αποπτωτικά γεγονότα. Αυτά οδηγούν σε έκκριση του κυτοχρώματος c και τη δέσμευση του με τον APAF-1 (αποπτωτικός παράγοντας ενεργοποίησης πρωτεάσης-1) και με την προκασπάση-9. Το κυτόχρωμα c, ο APAF-1 και η προκασπάση-9 σχηματίζουν μία δομή η οποία ονομάζεται αποπτωσωμάτιο. Ο ρόλος αυτού είναι ο κατακερματισμός του DNA έπειτα από ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που σχετίζονται

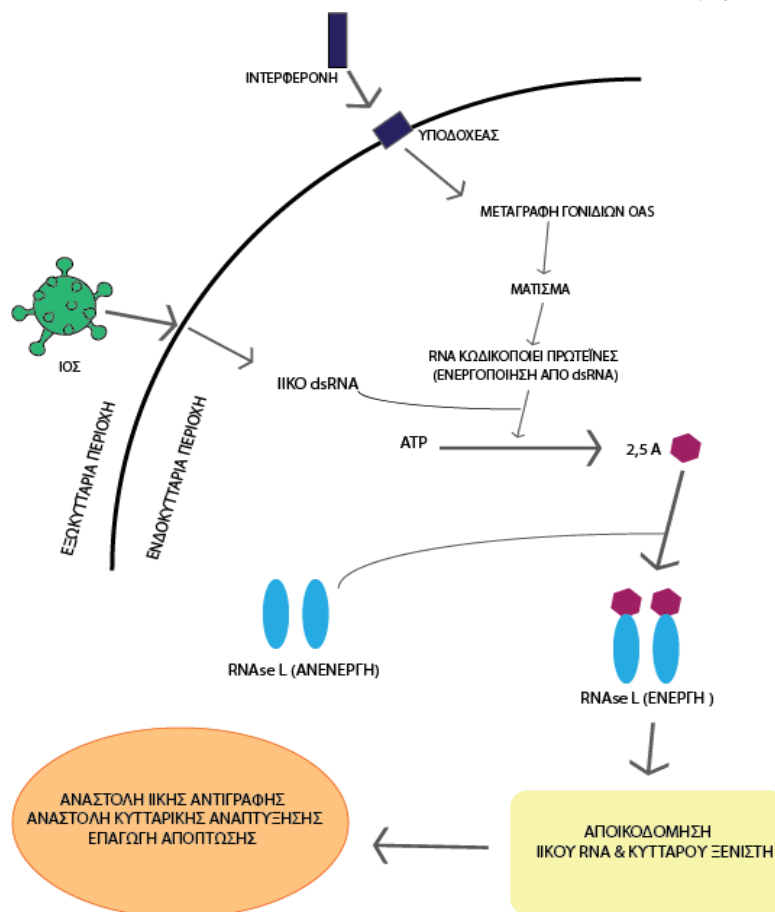
με την με την κασπάση-9 από το ενεργό PNA. Σε αυτή την κατηγορία ενώσεων ανήκουν νουκλεοζιτικά ανάλογα αδενοσίνης Cladribine, Fludarabine και Clofarabine (Robak, Lech-Maranda et al. 2006).



Εικόνα 7 Απεικόνιση σηματοδοτικών μονοπατιών απόπτωσης επαγόμενα από νουκλεοσιδικά ανάλογα πουρινών(PNA). (α) Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα των πουρινών εισέρχονται εντός του κυττάρου μέσω πρωτεϊνών μεταφορέων και φωσφορυλιώνονται προς την ενεργή του μορφή. Στην συνέχεια εισέρχονται εντός του πυρήνα ώστε να προσδεθούν επάνω στο DNA προκαλώντας είτε αναστολή της DNA πολυμεράσης είτε αναστολή της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγής, οδηγώντας σε απόπτωση. (β) Ένας ακόμη μηχανισμός είναι μέσω της ενεργοποίησης του p53 με αποτέλεσμα να επηρεάζει τον αποπτωτικό παράγοντα Bax. Μέσω αυτού του παράγοντα απελευθερώνεται το κυτόχρωμα c και ο αποπτωτικός παράγοντας (AIF)(γ). (δ) Το κυτόχρωμα c σχηματίζει μαζί με την προκασπάση-9 και τον APAF-1 το αποπτωσωμάτιο σχηματίζοντας την κασπάση-9 οδηγώντας εν τέλει στο μόριο τελεστή (κασπάση-3), υπεύθυνο για την απόπτωση του κυττάρου μέσω κατακερματισμού του DNA. (ε) Τέλος ένας ακόμη μηχανισμός είναι ο θάνατος μέσω των υποδοχέων Fas/ CD95, όπου εισέρχεται το νουκλεοσιδικό ανάλογο εντός του κυττάρου μέσω των συγκεκριμένων υποδοχέων επάγοντας τον σχηματισμό της κασπάσης-3

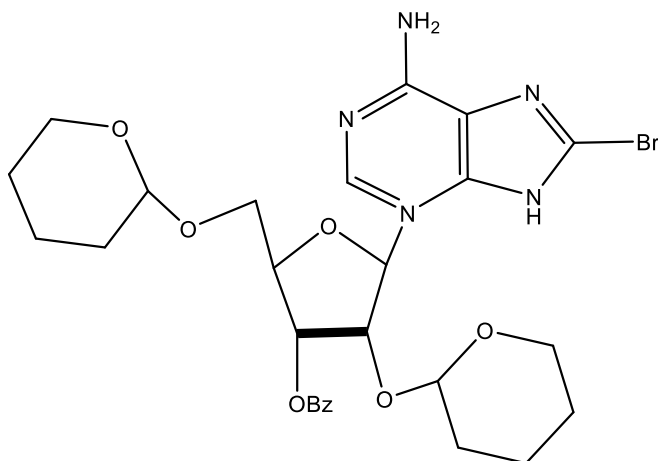
1.5.1 ΒΡΩΜΙΟ ΣΤΗΝ ΘΕΣΗ 8 ΤΗΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ

Μία από τις πιο σημαντικές τροποποιήσεις που έχουν μελετηθεί είναι η προσθήκη βρωμίου στην θέση 8 της αδενίνης, καθώς έρευνες έχουν αποδείξει ότι ανάλογα νουκλεοζιτών με αυτές τις τροποποιήσεις έχουν αντιική δράση, επάγοντας την εκτεταμένη δράση της ριβονουκλεάσης L (RNase L). Η εν λόγω ριβονουκλεάση, αποτελεί μόριο του μονοπατιού της ιντερφερόνης. Συγκεκριμένα, οι ιντερφερόνες είναι αντιικοί παράγοντες, ρυθμίζοντας τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος (de Veer, Holko et al. 2001, Hartmann, Justesen et al. 2003, Bisbal and Silverman 2007, Fensterl and Sen 2009, 2011). Ένα μολυσμένο με ιό κύτταρο απελευθερώνει ιικά σωματίδια, τα οποία μπορούν να μολύνουν τα κοντινά κύτταρα. Ωστόσο ένα μολυσμένο κύτταρο μπορεί να προστατεύσει τα γειτονικά από μία πιθανή μόλυνση απελευθερώνοντας ιντερφερόνες. Σε απόκριση στην ιντερφερόνη τα κύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες ενζύμου γνωστό πρωτεϊνική κινάση R (PRK). (εικ8) Ένα άλλο κυτταρικό ένζυμο είναι η αδενυλική συνθετάση 2'-5', η οποία πολυμερίζει ATP σε 2'-5' ολιγονουκλεοτίδια αδενίνης διαφόρων μηκών. Τα μόρια αυτά ενεργοποιούν την ριβονουκλεάση L (RNase L) καταστέλλοντας την πρωτεϊνική σύνθεση τόσο των γονιδίων ιικής προέλευσης όσο και των γονιδίων του κυττάρου ξενιστή, καθώς αποικοδομεί όλα τα RNA (Goswami, Crea et al. 1982, Ghosh, Kusari et al. 1991, Player and Torrence 1998, Tokumi Maruyama 1998, Hartmann, Justesen et al. 2003, Ramesh, Vijayakumar et al. 2021).

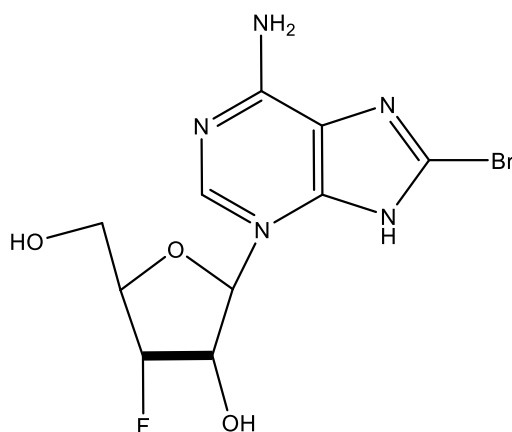


Εικόνα 8 Απεικόνιση ενεργοποίησης του ενζύμου ριβονουκλεάσης L (RNase L) οδηγώντας στον πολυμερισμό του ATP και στην δημιουργία ολιγονουκλεοτιδίων 2'-5' αδενίνης, καθώς και τα αποτελέσματα αυτού του μονοπατιού σηματοδότησης.

Έρευνες έχουν δείξει ότι η προσθήκη βρωμίου στο κατάλοιπο 3 των 2'-5' ολιγονουκλεοτιδίων της αδερίνης, οδηγούν σε αυξημένη ενεργοποίηση του ενζύμου RNase L, αποτελώντας με αυτόν τον τρόπο ένα ισχυρό ανάλογο πουρινών με σημαντική αντιική δράση (van den Hoogen, Hilgersom et al. 1989).



3'-O-BENZOYL-8-BROMO-2'.5'-di-O-(TETRAHYDROPYRON-2-YL)ADENOSINE



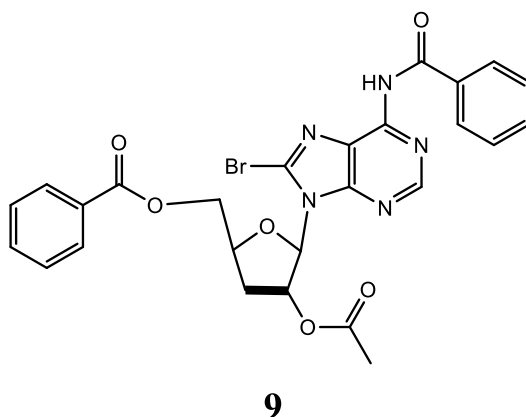
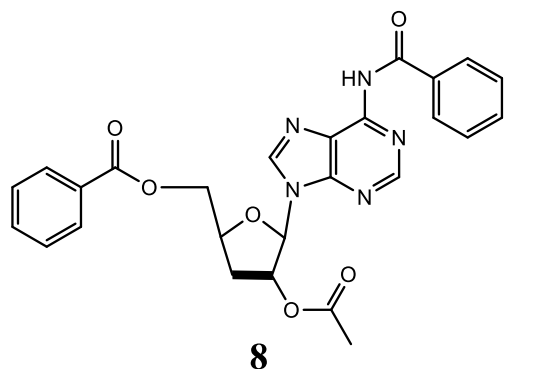
8-BROMO-3'-DEOXY-3'-FLUOROADENOSINE

Εικόνα 9 Απεικόνιση αναλόγων νουκλεοζιτών, που έχουν υποστεί τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα του σακχάρου όσο και στο τμήμα της βάσης με ιδιαίτερη σημασία την προσθήκη ενός μορίου βρωμίου στην θέση 8 της αδερίνης.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν νέα ανάλογα νουκλεοζιτών με τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα του σακχάρου όσο και στο τμήμα της βάσης. Ειδικότερα, για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η ξυλοφουρανόζη ως σάκχαρο και το μόριο της αδεΐνης ως βάση. Η τροποποίηση που πραγματοποιήθηκε στο τμήμα του σακχάρου ήταν η αφαίρεση του υδροξυλίου (OH) από την 3', ενώ στο τμήμα της βάσης ήταν η προσθήκη ενός ατόμου βρωμίου στον άνθρακα 8.

Για την επίτευξη αυτού, σχηματίστηκαν ενδιάμεσα μόρια, τα οποία απομονώθηκαν με τεχνικές χρωματογραφίας και ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές.



Εικόνα 10 Απεικόνιση των τελικών μορίων που συντέθηκαν για τον σκοπό της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

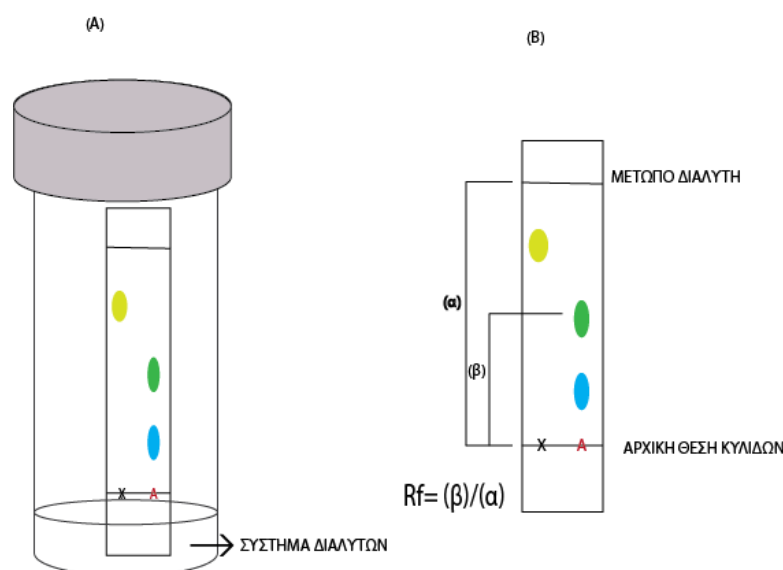
3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (Thin Layer Chromatography)

Οι αντιδράσεις ελέγχθηκαν με την χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Η μέθοδος βασίζεται σε πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₄) πάχους 0,2 mm.

Το υπό εξέταση δείγμα, (εικ.9) αφού πρώτα διαλυτοποιηθεί σε κατάλληλο διαλύτη, τοποθετείται υπό μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Έπειτα, η πλάκα τοποθετείται σε ορθή θέση εντός αεροστεγούς θαλάμου στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί ένα σύστημα διαλυτών σε ύψος ελαφρώς κάτω από αυτό της κηλίδας. Το σύστημα διαλυτών αποτελεί την υδατική φάση, ενώ η πλάκα TLC αποτελεί την στατική φάση. Με την βοήθεια των τριχοειδών φαινομένων, οι διαλύτες ωθούνται να ανέλθουν έως και λίγα εκατοστά πριν από το τέλος της πλάκας, συμπαρασύροντας μαζί και το υπό εξέταση δείγμα. Ακολούθως, η πλάκα αποσύρεται από τον θάλαμο και στεγνώνεται.

Η εν λόγω τεχνική είναι πολύ χρήσιμη καθώς καθίσταται δυνατή η απεικόνιση της πορείας της αντίδρασης και ελέγχοντας παράλληλα την καθαρότητα της ουσίας. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επάνω στην πλάκα με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητά τους, και έτσι, μπορούν να είναι διακριτές κηλίδες, οι οποίες αφού διαχωρίζονται μεταξύ τους μπορούν και να ταυτοποιηθούν. Η ταυτοποίηση προκύπτει από τον υπολογισμό του συντελεστή κατακράτησης (R_f), ο οποίος ορίζεται από τον λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από τον διαλύτη (α). Η απεικόνιση των κηλίδων γίνεται υπό την επίδραση υπεριώδους φωτός (254 nm ή 356 nm) ή κατόπιν ψεκασμού με διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 30%.



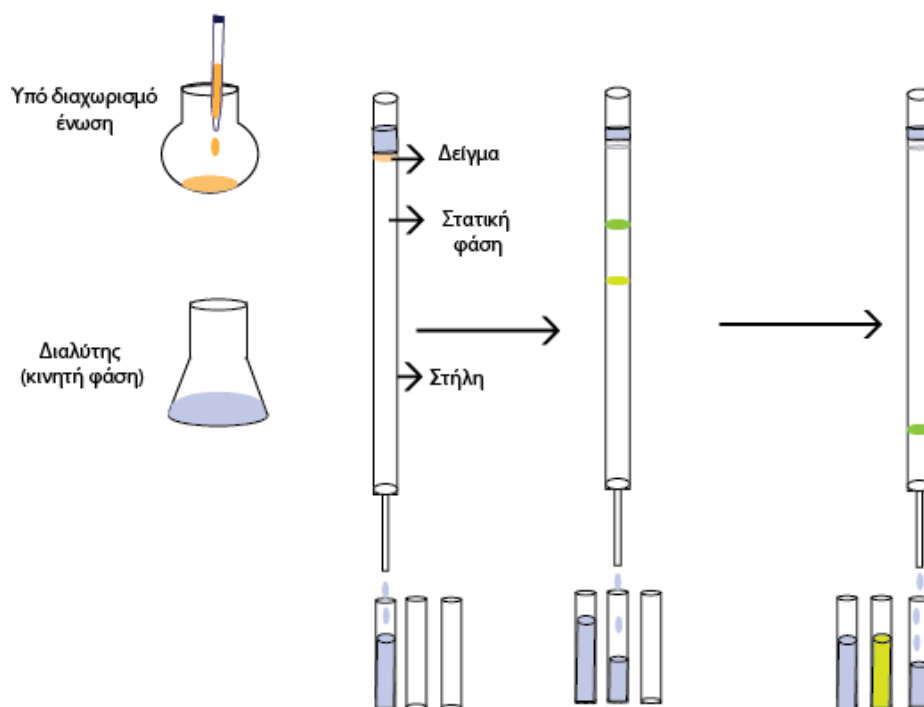
Εικόνα 11 Απεικόνιση μεθόδου Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας. (Α) Τοποθετημένο το TLC στον αεροστεγώς κλεισμένο θάλαμο σε σύστημα διαλυτών και (Β) το TLC και ο υπολογισμός του συντελεστή κατακράτησης R_f .

3.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Με το πέρασμα της εκάστοτε αντίδρασης, η ένωση στόχος πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για αυτόν τον σκοπό είναι η χρωματογραφία στήλης, στην οποία γίνεται εισαγωγή αέρος υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merck grade).

Η χρωματογραφία στήλης είναι μια τεχνική διαχωρισμού, η οποία βασίζεται στην προσρόφηση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μία ακίνητη φάση, συνήθως silica gel και την έκλουσή τους με μία ακίνητη φάση, που είναι είτε ένας διαλύτης είτε ένα μείγμα διαλυτών. Οι πολικές ενώσεις προσροφούνται και προσκολλώνται στην αφητηρία- κορυφή της στήλης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την χρήση πιο πολικών διαλυτών ώστε να συμπαρασυρθούν και να διαχωριστούν στην στήλη. Οι άπολες ουσίες συνήθως εκκλύονται πιο εύκολα από την στήλη με την χρήση διαλυτών χαμηλής πολικότητας. Για την επιτυχή έκλυση των ουσιών από την στήλη, πραγματοποιούνται διαδοχικά περάσματα αυτής με διαλύτες σταδιακά αυξανόμενης πολικότητας κάθε φορά.

Στην συγκεκριμένη χρωματογραφία, η στατική φάση τοποθετείται εντός μιας στήλης κατασκευασμένης από αδρανές υλικό (ύαλος, πηκτή πυριτίας, ανοξειδωτος χάλυβας). Το δείγμα, αφού διαλυτοποιηθεί πολύ καλά σε κατάλληλο διαλύτη, τοποθετείται στην αρχή της στήλης (κορυφή) και η κινητή φάση διέρχεται μέσω της στατικής φάσης είτε υπό πίεση είτε λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες και απομονώνονται.



Εικόνα 12 Χρωματογραφία στήλης.

3.3 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Για την πραγματοποίηση των περισσότερων αντιδράσεων στην συγκεκριμένη μεταπτυχιακή διατριβή, χρειάστηκαν άνυδροι διαλύτες όπως το ακετονιτρίλιο, το διχλωρομεθάνιο και το τολουόλιο.

Η ξήρανση του ακετονιτρίλιου και του τολουολίου γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά την διάρκεια μιας νύχτας. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε.

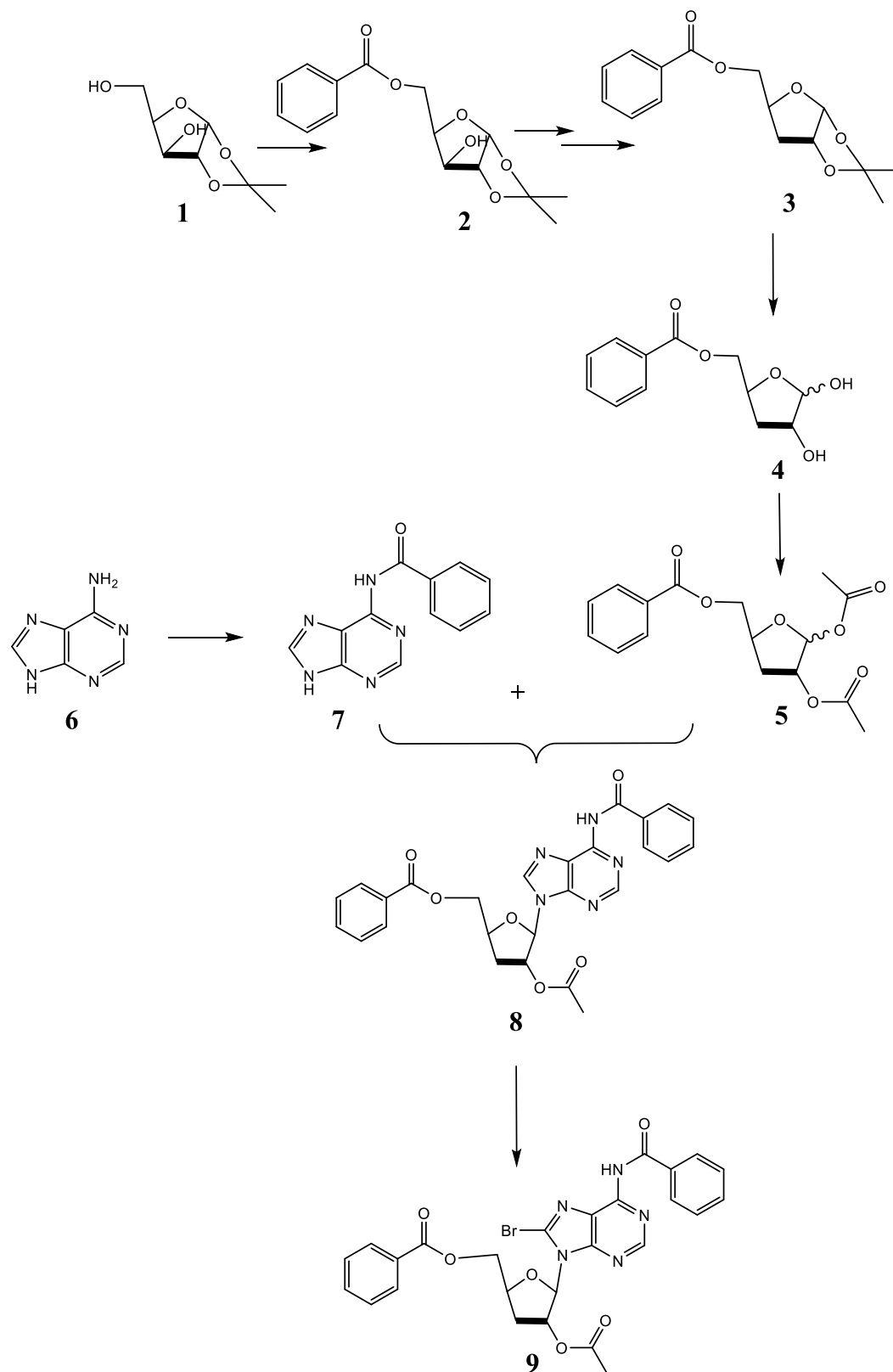
3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί την πρώτη και την 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 την χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ ελήφθησαν με φασματοφωτόμετρο τύπου 500 MHz DRX- Avance της εταιρείας Bruker στο εργαστήριο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Ινστιτούτου Βιολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Τα φάσματα ελήφθησαν σε διαλύματα chloroform-d (CDCl_3) και methanol-d_4 (CD_3OD). Οι χημικές μετατοπίσεις (δ ,ppm) υπολογίστηκαν με την χρήση τετραμεθυλοσιλανίου (TMS), ως εσωτερικού προτύπου.

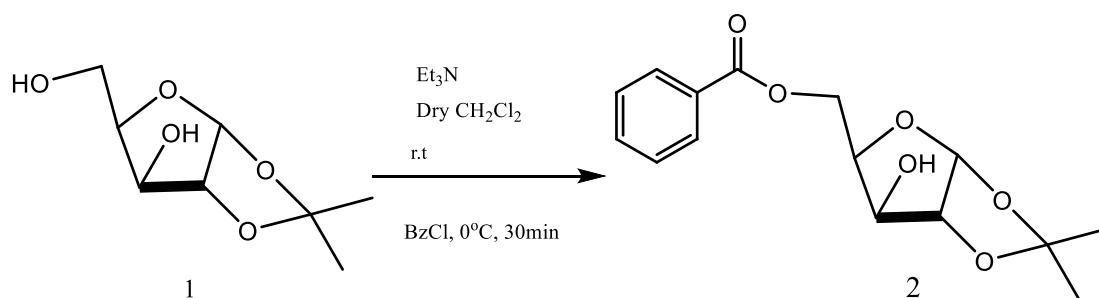
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ



4.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

4.2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 5-BENZΟΥΛΟ-1,2-O-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΙΔΕΝΟ-α-D-ΡΙΒΟΦΟΥΡΑΝΟΖΗΣ



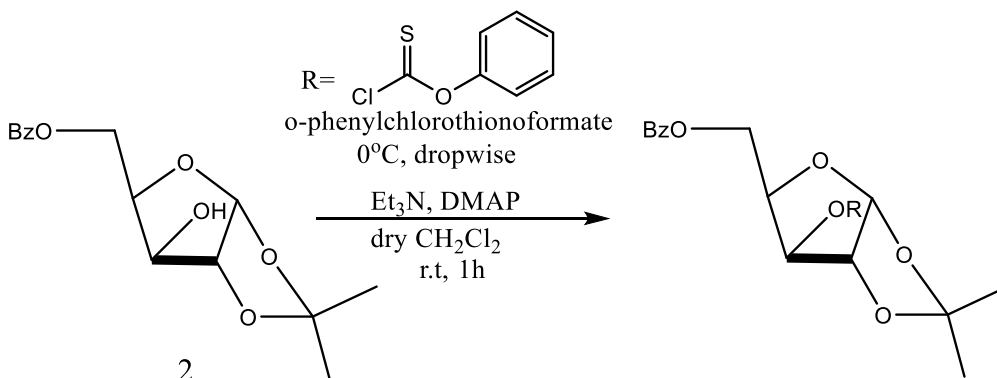
Εικόνα 13 Σύνθεση της 5-Βενζόυλο-1,2-Ο-Ισοπροπυλίδενο- α -D-ριβοφουρανόζης. Απεικόνιση των αντιδραστηρίων καθώς και των συνθηκών.

Σε πρώτο βήμα, έγινε η προστασία του πρωτοταγούς υδροξυλίου της εμπορικά διαθέσιμης 1,2-Ο-ισοπροπυλίδενο- α -D-ξυλοφουρανόζης (1) [Mr 190.4] χρησιμοποιώντας βενζόυλοχλωρίδιο (BzCl) [0.7eq] υπό άνυδρες συνθήκες. Αρχικά η ένωση 1 διαλυτοποιήθηκε σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο [10ml, 3mmol]. Στην συνέχεια, προστέθηκε η βάση, τριαιθυλαμίνη (Et_3N) [3eq,]. Η σφαιρική στην συνέχεια τοποθετείται σε παγόλουτρο, ώστε να εξασφαλιστούν οι 0°C που χρειάζονται για την προσθήκη του BzCl . Η προσθήκη αυτού γίνεται στάγδην. Αντίδραση αφέθηκε για 30 λεπτά. Η πορεία της αντίδρασης, ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών 6 Hexane/ 4 AcOEt. Για την ολοκλήρωση της αντίδρασης, προστέθηκε απιονισμένο νερό σε ίση ποσότητα με αυτή του διαλύτη. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με υδατική φάση το NaHCO_3 και οργανική φάση το CH_2Cl_2 . Η οργανική φάση, συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και οδηγήθηκε προς εξατμίση έως ξηρού, σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Τέλος, το προϊόν καθαρίστηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/ 2 AcOEt.

Πίνακας 1 Αναγράφονται τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για TLC ελέγχου της πορείας της αντίδρασης όσο και για την χρωματογραφία στήλη καθώς και τα αντίστοιχα R_f αλλά και η % απόδοση της αντίδρασης.

Σύστημα διαλυτών TLC (ελέγχου) 6 Hexane/ 4 AcOEt	R_f 0.5
Σύστημα στήλης 8 Hexane/ 2 AcOEt	R_f 0.2
Απόδοση (α)	87%

4.2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 5-BΕΝΖΟΥΛΟ-3-ΔΕΟΞΥ-1,2-Ο-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΙ-ΔΕΝΟ-α-D-ΡΙΒΟΦΟΥΡΑΝΟΖΗΣ

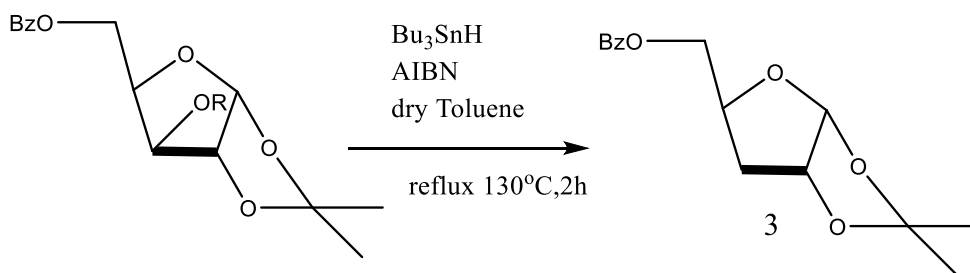


Εικόνα 14 Απεικόνιση της συνθετικής πορείας της 5-Βενζούλο-3-δέοξυ-1,2-Ο-ισοπροπυλίδενο-α-D-ριβοφουρανόζης με τον σχηματισμό του ενδιάμεσου μορίου.

Σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του 3'-δέοξυ σακχάρου με τον σχηματισμό ενδιάμεσου μορίου (εστέρα). Αρχικά, η ένωση **2** διαλυτοποιήθηκε σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο [3ml, 0.17mmol] και προστέθηκε Et₃N [9eq] και διμέθυλ-άμινο-πυριδίνη (DMAP) [3eq]. Έπειτα η σφαιρική εμβάπτιστηκε σε παγόλουτρο ώστε να φτάσει η θερμοκρασία του 0°C, όπου και έγινε στάγδην η προσθήκη του o-phenylchlorothionoformate [1.2eq]. Αμέσως παρατηρήθηκε οπτική αλλαγή στο χρώμα της αντίδρασης από αχνό κίτρινο έγινε σκούρο. Η αντίδραση αφαιρέθηκε από το παγόλουτρο έπειτα από λίγα λεπτά και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών 6 Hexane/ 4 AcOEt. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολούθησε εκχύλιση όπου ως οργανική φάση χρησιμοποιήθηκε το CH₂Cl₂ ενώ ως υδατική το NaHCO₃. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και οδηγήθηκε σε εξάτμιση μέχρι ξηρού. Τέλος ο καθαρισμός και η απομόνωση του ενδιάμεσου επιθυμητού προϊόντος έγινε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 9 Hexane/ 1 AcOEt.

Πίνακας 2 Αναγράφονται τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για TLC ελέγχου της πορείας της αντίδρασης όσο και για την χρωματογραφία στήλη καθώς και τα αντίστοιχα R_f αλλά και η % απόδοση της αντίδρασης.

Σύστημα διαλυτών TLC (ελέγχου) 6 Hexane/ 4 AcOEt	R _f 0.8
Σύστημα στήλης 9 Hexane/ 1 AcOEt	R _f 0.25
Απόδοση (α)	79%



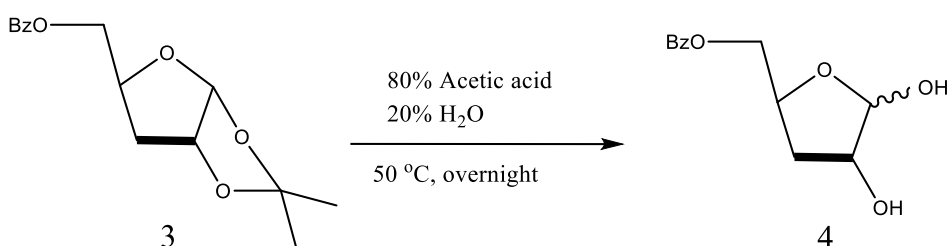
Εικόνα 15 Απεικόνιση της αντίδρασης προς σχηματισμό του 3' δέοξυ σακχάρου από τον ενδιάμεσο εστέρα

Το ενδιάμεσο προϊόν αφού έμεινε όλο το βράδυ στον ξηραντήρα για την απομάκρυνση της υγρασίας που μπορεί να υπήρχε από διαλύτες, αντέδρασε περεταίρω προκειμένου να σχηματιστεί το επιθυμητό μόριο **3**. Για την επίτευξη αυτού, το ενδιάμεσο [Mr 430.47] διαλυτοποιήθηκε σε άνυδρο τολουόλιο [2ml, 0.1 mmol]. Ακολούθησε η προσθήκη του αζωισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN) [1eq] και του υδριδίου του τριβούτυλοκασσιτέρου (H_3SnBu_3) [2eq]. Η εν λόγω αντίδραση είναι αντίδραση ελευθέρων ριζών, χρησιμοποιώντας το H_3SnBu_3 ως πηγή H^\cdot δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο το 3' σάκχαρο. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θέρμανση εντός ελαιόλουτρου με κάθετο ψυκτήρα επαναρροής (reflux). Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα 8 Hexane/ 2 AcOEt. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη και εκχύλιση με οργανική φάση το CH_2Cl_2 και υδατική φάση το NaHCO_3 . Η οργανική φάση συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και οδηγήθηκε σε εξάτμιση μέχρι ξηρού με περιστροφικό εξάτμιστήρα κενού. Τέλος, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός του επιθυμητού προϊόντος **3** με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 9 Hexane/ 1 AcOEt.

Πίνακας 3 Αναγράφονται τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για TLC ελέγχου της πορείας της αντίδρασης όσο και για την χρωματογραφία στήλη καθώς και τα αντίστοιχα R_f αλλά και η % απόδοση της αντίδρασης.

Σύστημα διαλυτών TLC (ελέγχου) 8 Hexane/ 2 AcOEt	R_f 0.5
Σύστημα στήλης 9 Hexane/ 1 AcOEt	R_f 0.25
Απόδοση (α)	79%

4.2.3 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΝΘΡΑΚΩΝ 1 ΚΑΙ 2 ΣΤΗΝ 5-ΒΕΖΝΟΥΛΟ-3-ΔΕΟΞΥ-1,2-Ο-ΙΣΟΠΡΟΠΥΛΙΔΕΝΟ- α -D-ΡΙΒΟΦΟΥΡΑΝΟΖΗ



Εικόνα 16 Απεικόνιση της υδρόλυσης των ανθράκων 1 και 2 στο σάκχαρο και των συνθηκών.

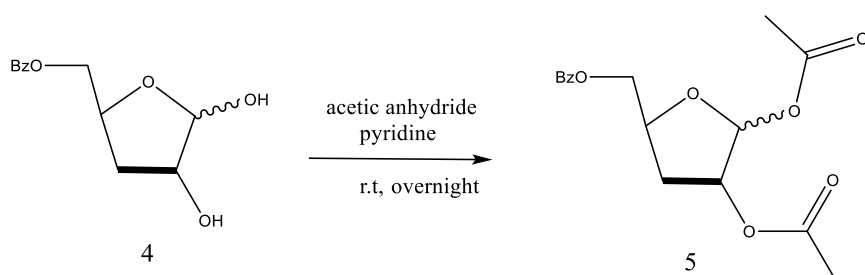
Το τρίτο βήμα της συνθετικής πορείας ήταν το 1,2-ισοπροπυλιδενίου, το προϊόν από την προηγούμενη αντίδραση **3** αφέθηκε υπό ανάδευση σε διάλυμα οξικού οξέος και νερού σε αναλογία 80% οξικού οξέος / 20% απιονισμένο νερό [5mmol, 200ml διαλύματος 80% οξικού οξέος σε νερό]. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα 7 Hexane / 3 AcOEt. Αξίζει να σημειωθεί πως έγινε η χρήση αυτού του συστήματος διότι το προϊόν από αυτή την αντίδραση είναι αρκετά πολικό σε σύγκριση με το αντιδρών. Έτσι σε R_f 0.6 γίνεται διακριτό αν υπάρχει αντιδρών καθώς το προϊόν λόγω της πολικότητας του στο συγκεκριμένο σύστημα διαλυτών παραμένει στην γραμμή των κηλίδων. Για την ταυτοποίηση όμως του προϊόντος **4** με μόριο αναφοράς το σύστημα το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν 7 AcOEt / 3 Hexane.

Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολούθησαν διαδοχικές εξατμίσεις στον περιστροφικό εξατμιστήρα κενού τόσο με τολουόλιο όσο και με μεθανόλη αλλά και οξικό αιθυλεστέρα για την καλύτερη απομάκρυνση του απιονισμένου νερού αλλά και του οξικού οξέος.

Πίνακας 4 Αναγράφονται τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για TLC ελέγχου της πορείας της αντίδρασης όσο και για την ταυτοποίηση του προϊόντος καθώς και τα αντίστοιχα R_f αλλά και η % απόδοση της αντίδρασης.

Σύστημα διαλυτών TLC 7 AcOEt / 3 Hexane	R_f 0.25
Σύστημα ταυτοποίησης 3 Hexane/ 7 AcOEt	R_f 0.2
Απόδοση (α)	100%

4.2.4 ΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΥΔΡΟΞΥΛΙΩΜΕΝΟΥ ΣΑΚΧΑΡΟΥ ΣΤΙΣ ΘΕΣΕΙΣ 1 ΚΑΙ 2



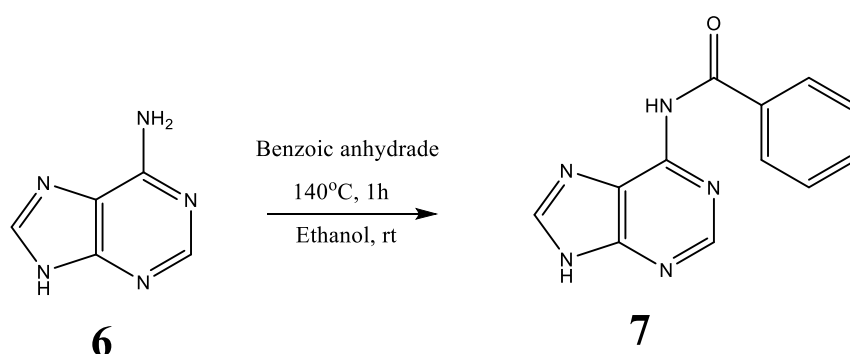
Εικόνα 17 Απεικόνιση της αντίδρασης ακετυλίωσης στον άνθρακα 1 και 2 του σακχάρου καθώς και των συνθηκών.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η ακετυλίωση των ανθράκων 1 και 2 στο προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης 4. Για την επίτευξη αυτού, η ένωση 4 διαλυτοποιήθηκε σε διαλύτη πυριδίνη [0,0869mmol, 0.29ml] και στην συνέχεια προστέθηκε ο οξικός ανυδρίτης [15eq]. Η αντίδραση αφέθηκε όλο το βράδυ υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης έγινε με TLC σε σύστημα διαλυτών 7 Hexane/ 3 AcOEt. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο όπου εκεί προστέθηκε μεθανόλη σε ίση ποσότητα με αυτή του διαλύτη της αντίδρασης. Ακολούθησαν διαδοχικές εξατμίσεις με τολουόλιο και μεθανόλη. Τέλος, το επιθυμητό ακετυλιωμένο σάκχαρο 5 καθαρίστηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/ 2 AcOEt.

Πίνακας 5 Αναγράφονται τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για TLC έλεγχου της πορείας της αντίδρασης όσο και για την χρωματογραφία στήλη καθώς και τα αντίστοιχα Rf αλλά και η % απόδοση της αντίδρασης

Σύστημα διαλυτών TLC (ελέγχου) 7 Hexane/ 3 AcOEt	Rf 0.45
Σύστημα στήλης 8 Hexane/ 2 AcOEt	Rf 0.2
Απόδοση (α)	86%

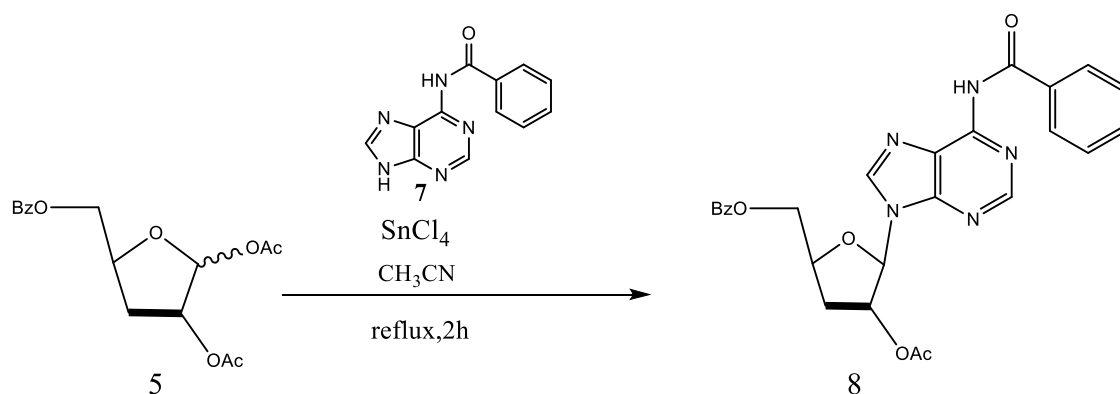
4.2.5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ N6-BENZOΪΛΟ ΑΔΕΝΙΝΗΣ



Εικόνα 18 Απεικόνιση του σχηματισμού της N6-βενζόυλο-αδενίνης, καθώς και των συνθηκών για την περάτωσή της.

Για την σύνθεση της N6-βενζόυλο-αδενίνης, πραγματοποιήθηκε αντίδραση στερεού-στερεού μεταξύ της αδενίνης [Mr 135.13] και του βενζοϊκού ανυδρίτη [0,003eq]. Συγκεκριμένα, τα δύο αυτά στερεά αναμείχθηκαν πολύ καλά σε γουδί ώστε να γίνει ένα μείγμα και στην συνέχεια το μείγμα μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη. Κατόπιν, η σφαιρική φιάλη οδηγήθηκε σε ελαιόλουτρο ώστε να θερμανθεί σε θερμοκρασία 140 °C χωρίς ανάδευση. Μετά από μία ώρα, και τα δύο στερεά είχαν ρευστοποιηθεί και η φιάλη αφαιρέθηκε από το ελαιόλουτρο και έμεινε σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού η θερμοκρασία εντός της φιάλης έφτασε την θερμοκρασία δωματίου στην συνέχεια προστέθηκε ο διαλύτης αιθανόλη. Η ποσότητα που χρειάστηκε από τον διαλύτη ήταν τόση ώστε να μπορέσει να κρυσταλλώσει το προϊόν που παρήχθη. Τέλος η σφαιρική φιάλη οδηγήθηκε σε παγόλουτρο, για την καλύτερη δυνατή κρυστάλλωση. Σε επόμενο βήμα ακολούθησε διήθηση και το στερεό που συγκρατήθηκε στο διηθητικό χαρτί, απομονώθηκε και συλλέχθηκε καθώς ήταν το επιθυμητό προϊόν **7**.

4.2.6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΗ ΤΗΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ



Εικόνα 19 Απεικόνιση της σύνθεσης του νουκλεοζίτη της αδενίνης και των συνθηκών για την περάτωση της.

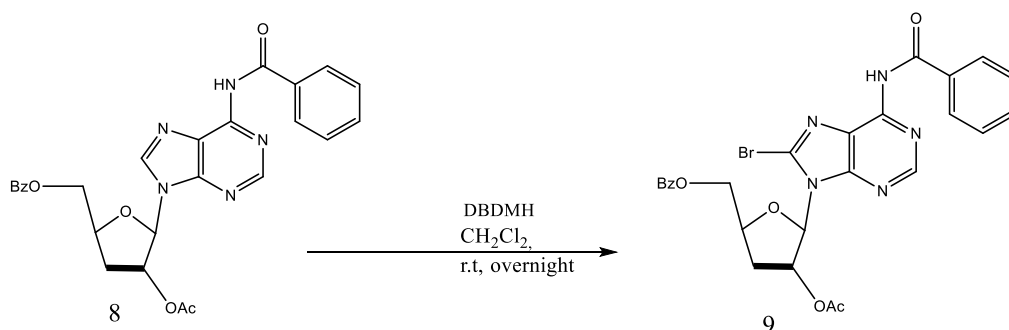
Για την σύνθεση του νουκλεοζίτη της αδενίνης **8**, το παράγωγο **5** διαλυτοποιήθηκε σε άνυδρο διαλύτη ακετονιτρίλιο (CH_3CN) [5.2mmol, 46ml] και σε επόμενο βήμα προστέθηκε το παράγωγο **7** [1, 18eq] αφού πρώτα είχε μείνει ξηραντήρα. Κατόπιν, πολύ προσεκτικά προστέθηκε ο τετραχλωριούχος κασσίτερος (SnCl_4) [2.15eq]. Η αντίδραση αφέθηκε για 2 ώρες υπό θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα επαναρροής. Με την θέρμανση αυτό που επιτεύχθηκε ήταν να σχηματιστεί το θερμοδυναμικό παράγωγο και όχι το κινητικό αλλά και να αποφευχθεί ο σχηματισμός παραπροϊόντων και μειγμάτων. Ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών 9,8 CH_2Cl_2 / 0,2 MeOH. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολούθησε εκχύλιση χρησιμοποιώντας ως οργανικό διαλύτη τον AcOEt, ενώ ως υδατικό διαλύτη το NaHCO_3 . Τέλος, η οργανική φάση συλλέχθηκε και οδηγήθηκε σε εξάτμιση μέχρι ξηρού.

Το επιθυμητό παράγωγο, καθαρίστηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 9,8 CH_2Cl_2 / 0,2 MeOH.

Πίνακας 6 Αναγράφονται τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για TLC ελέγχου της πορείας της αντίδρασης όσο και για την χρωματογραφία στήλη καθώς και τα αντίστοιχα R_f αλλά και η % απόδοση της αντίδρασης

Σύστημα διαλυτών TLC (ελέγχου) 9,8 CH_2Cl_2 / 0,2 MeOH	R_f 0.25
Σύστημα στήλης 9,8 CH_2Cl_2 / 0,2 MeOH	R_f 0.25
Απόδοση (α)	73%

2.4.7 ΒΡΩΜΙΩΣΗ ΣΤΗΝ ΘΕΣΗ 8 ΤΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΗ ΤΗΣ ΑΔΕΝΙΝΗΣ



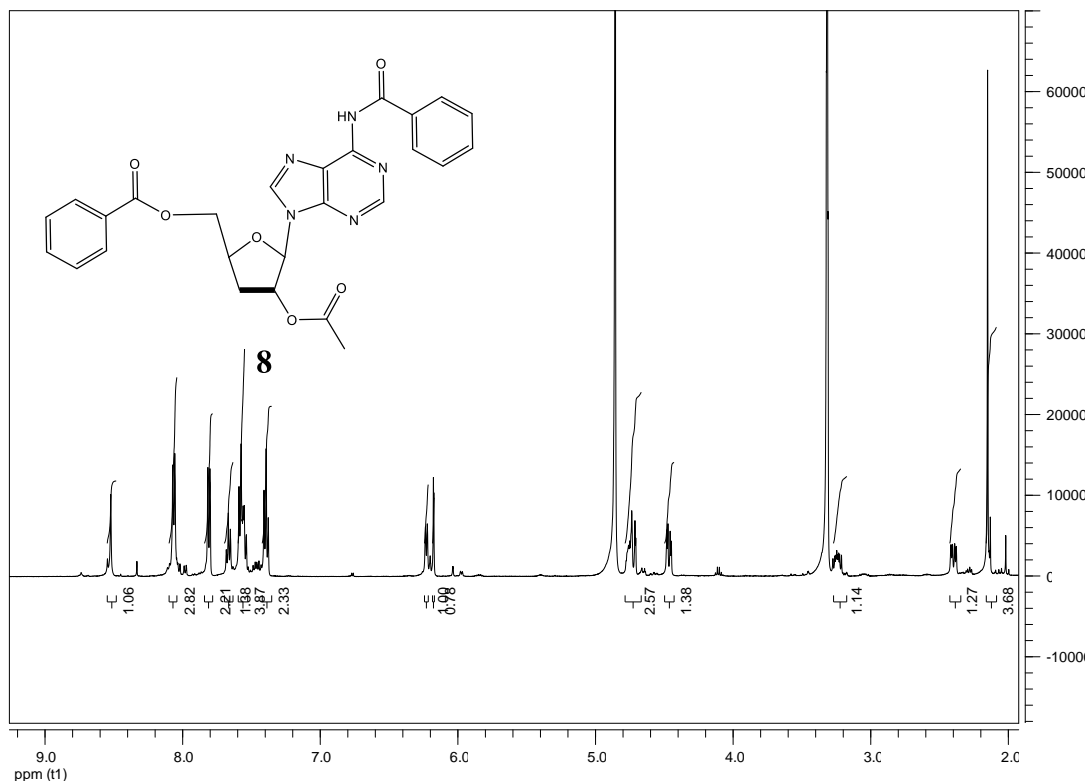
Εικόνα 20 Απεικόνιση της βρωμίωσης του παραγώγου **8** καθώς και των συνθηκών για την περάτωση της αντίδρασης.

Για την προσθήκη του βρωμίου στην θέση 8 του παραγώγου από την προηγούμενη αντίδραση **8**, το προϊόν διαλυτοποιήθηκε σε CH₂Cl₂ [1.13ml, 5ml] και προστέθηκε το αντιδραστήριο διβρωμο-διμέθυλοϋδαντοΐνη [1,7eq]. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ο έλεγχος της πορείας της αντίδρασης έγινε με TLC σε σύστημα διαλυτών 7 AcOEt / 3 Hexane. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν οδηγήθηκε προς καθαρισμό και απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 5 AcOEt / 5 Hexane.

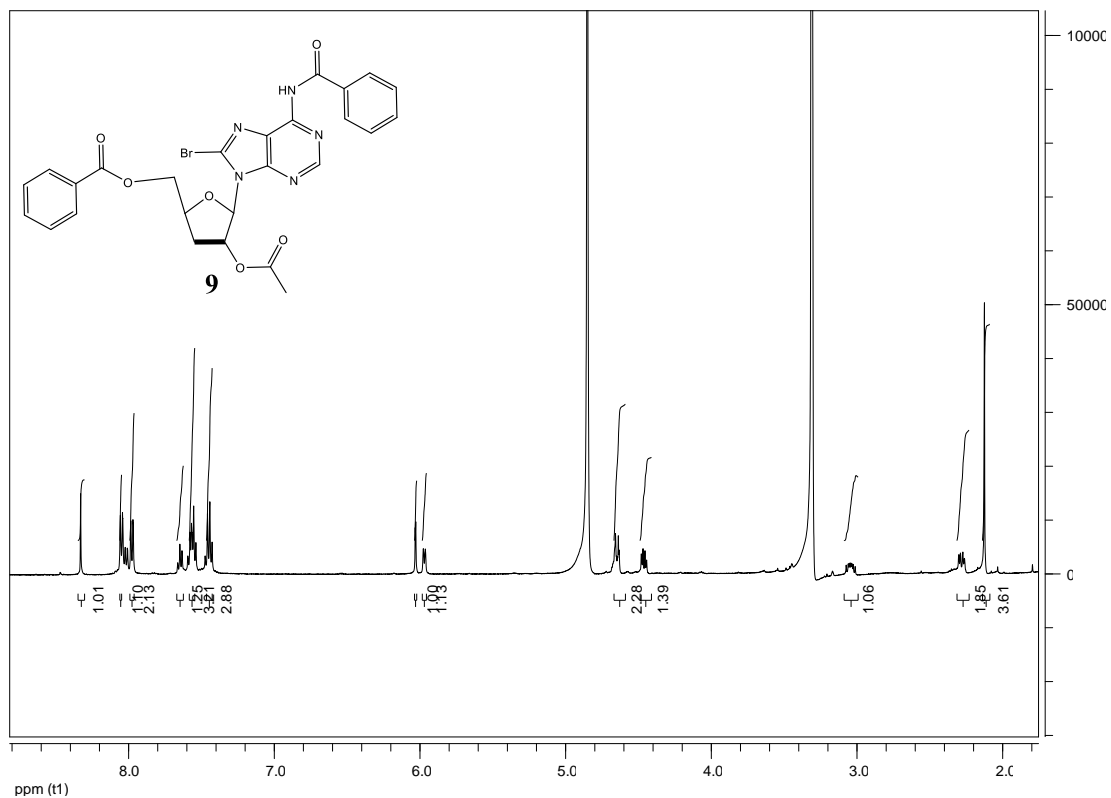
Πίνακας 7 Αναγράφονται τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για TLC ελέγχου της πορείας της αντίδρασης όσο και για την χρωματογραφία στήλη καθώς και τα αντίστοιχα R_f αλλά και η % απόδοση της αντίδρασης

Σύστημα διαλυτών TLC (ελέγχου) 7 AcOEt / 3 Hexane	R _f 0.5
Σύστημα στήλης 5 AcOEt / 5 Hexane	R _f 0.25
Απόδοση (α)	40%

5. ΦΑΣΜΑΤΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕ H¹-NMR



Εικόνα 21 Απεικόνιση του φάσματος H-NMR του 3'δέοξυ νουκλεοζίτη της αδενίνης.

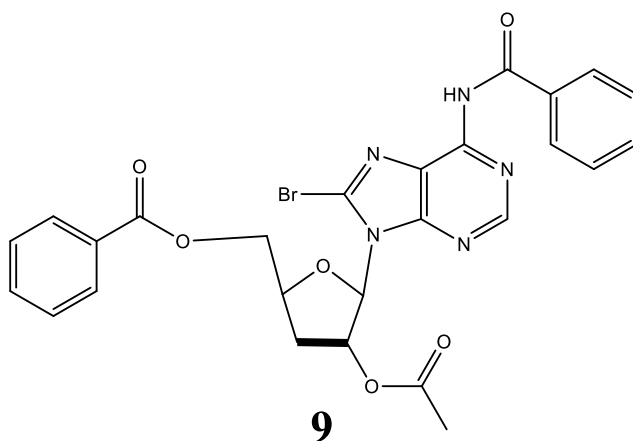
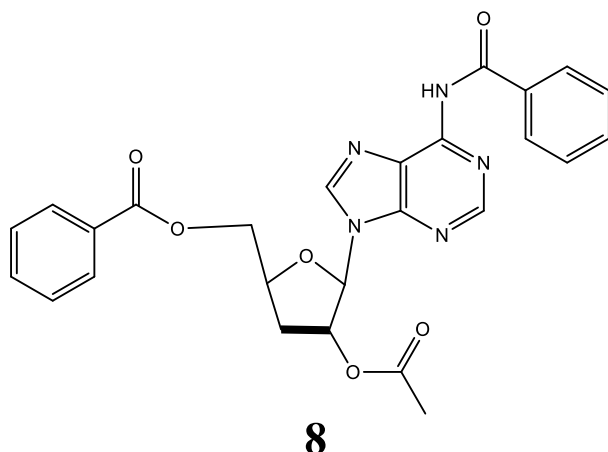


Εικόνα 22 Απεικόνιση του φάσματος ¹H-NMR του 3'δέοξυ νουκλεοζίτη της αδενίνης έπειτα από την προσθήκη του βρωμίου στην θέση 8.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη αναλόγων νουκλεοζιτών και ιδίως πουρινών, ως πιθανά φάρμακα, προέκυψε από τις προσπάθειες της συμμετοχής της επιστημονικής κοινότητας στον πόλεμο ενάντια χρόνιων νόσων όπως κακοήθεις νεοπλασίες και ιικές μολύνσεις. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων που παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά αυξημένη βιολογική δράση και εκλεκτικότητα.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης φουρανονουκλεοζιτών με τροποποίηση τόσο στο τμήμα του σακχάρου όσο και στο τμήμα της βάσης. Συγκεκριμένα οι τροποποιήσεις που έγιναν στο σάκχαρο ήταν η προστασία του άνθρακα 5 με την προσθήκη μίας βενζόυλο ομάδας, η προσθήκη μίας ακέτυλο-ομάδας στον άνθρακα 2 και η δημιουργία δέοξυ στον άνθρακα 3. Όσο αναφορά τις τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης, πραγματοποιήθηκε επίσης μία προστασία στον άνθρακα 6 με μία βενζόυλο ομάδα αλλά και την προσθήκη ενός ατόμου βρωμίου στην θέση 8. Όλες αυτές οι τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν ενδέχεται να αποτελέσουν ισχυρά εργαλεία ως αντικαρκινικές και αντιικές ενώσεις.



Εικόνα 23 Απεικόνιση των κυριότερων παραγώγων που συντέθηκαν κατά την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία.

Οι επιμέρους αντιδράσεις της πειραματικής διαδικασίας βελτιστοποιήθηκαν δίνοντας ιδιαίτερη σημασία στις άνυδρες συνθήκες που χρειάστηκαν για τις περισσότερες από αυτές και πλέον αποτελούν σχετικά εύκολα βήματα με αρκετά υψηλές αποδόσεις, δίνοντας με αυτό τον τρόπο την ευκαιρία για περαιτέρω μελέτες και σύνθεση και άλλων τροποποιημένων αναλόγων.

Όλες οι νέες ενώσεις προσδιορίστηκαν από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού H^1 -NMR.

Σε μελλοντικές μελέτες, οι ενώσεις που συντέθηκαν θα εξεταστούν ως προς τον τρόπο λειτουργίας τους σε επίπεδο κυτταρικών σειρών (in vitro).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (2011). Ribonucleases, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Azuma, A., Y. Nakajima, N. Nishizono, N. Minakawa, M. Suzuki, K. Hanaoka, T. Kobayashi, M. Tanaka, T. Sasaki and A. Matsuda (1993). "Nucleosides and nucleotides. 122. 2'-C-cyano-2'-deoxy-1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and its derivatives. A new class of nucleoside with a broad antitumor spectrum." J Med Chem **36**(26): 4183-4189.
- Baker, C. H., J. Banzon, J. M. Bollinger, J. Stubbe, V. Samano, M. J. Robins, B. Lippert, E. Jarvi and R. Resvick (1991). "2'-Deoxy-2'-methylene cytidine and 2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine 5'-diphosphates: potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase." J Med Chem **34**(6): 1879-1884.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, G. J. Gatto and L. Stryer (2015). Biochemistry. New York, W.H. Freeman & Company, a Macmillan Education Imprint.
- Bisbal, C. and R. H. Silverman (2007). "Diverse functions of RNase L and implications in pathology." Biochimie **89**(6-7): 789-798.
- Camarasa, M. J., M. J. Perez-Perez, A. San-Felix, J. Balzarini and E. De Clercq (1992). "3'-Spiro nucleosides, a new class of specific human immunodeficiency virus type 1 inhibitors: synthesis and antiviral activity of [2'-5'-bis-O-(tert-butyl dimethylsilyl)-beta-D-xylo- and -ribofuranose]-3'-spiro-5"-[4"-amino-1",2"-oxathiole 2",2"-dioxide] (TSAO) pyrimidine nucleosides." J Med Chem **35**(15): 2721-2727.
- Cory, A. H., V. Samano, M. J. Robins and J. G. Cory (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): 365-371.
- De Clercq, E. (2004). "Antiviral drugs in current clinical use." J Clin Virol **30**(2): 115-133.
- de Veer, M. J., M. Holko, M. Frevel, E. Walker, S. Der, J. M. Paranjape, R. H. Silverman and B. R. Williams (2001). "Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays." J Leukoc Biol **69**(6): 912-920.
- E., D. C. (2002). National Review Drug Discovery. **1**: 13-25.
- Elion, G. B. (1989). "The purine path to chemotherapy." Science **244**(4900): 41-47.
- Faderl, S., V. Gandhi, H. Kantarjian and W. Plunkett (2002). "New nucleoside analogues in clinical development." Cancer Chemother Biol Response Modif **20**: 37-58.
- Faderl, S., V. Gandhi, M. J. Keating, S. Jeha, W. Plunkett and H. M. Kantarjian (2005). "The role of clofarabine in hematologic and solid malignancies--development of a next-generation nucleoside analog." Cancer **103**(10): 1985-1995.
- Fensterl, V. and G. C. Sen (2009). "Interferons and viral infections." **35**(1): 14-20.
- Galmarini, C. M., J. R. Mackey and C. Dumontet (2002). "Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment." Lancet Oncol **3**(7): 415-424.
- Ghosh, S. K., J. Kusari, S. K. Bandyopadhyay, H. Samanta, R. Kumar and G. C. Sen (1991). "Cloning, sequencing, and expression of two murine 2'-5'-oligoadenylate synthetases. Structure-function relationships." J Biol Chem **266**(23): 15293-15299.
- Goswami, B. B., R. Crea, J. H. Van Boom and O. K. Sharma (1982). "2'-5'-Linked oligo(adenylic acid) and its analogs. A new class of inhibitors of mRNA methylation." J Biol Chem **257**(12): 6867-6870.
- Hartmann, R., J. Justesen, S. N. Sarkar, G. C. Sen and V. C. Yee (2003). "Crystal structure of the 2'-specific and double-stranded RNA-activated interferon-induced antiviral protein 2'-5'-oligoadenylate synthetase." Mol Cell **12**(5): 1173-1185.
- Hernandez-Reyes, C. X., D. Angeles-Beltran, L. Lomas-Romero, E. Gonzalez-Zamora, R. Gavino, J. Cardenas, J. A. Morales-Serna and G. E. Negron-Silva (2012). "Synthesis of azanucleosides through regioselective ring-opening of epoxides catalyzed by sulphated zirconia under microwave and solvent-free conditions." Molecules **17**(3): 3359-3369.
- Jordheim, L. P., D. Durantel, F. Zoulim and C. Dumontet (2013). "Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases." Nat Rev Drug Discov **12**(6): 447-464.
- Manta, S., G. Agelis, T. Botic, A. Cencic and D. Komiotis (2008). "Unsaturated fluoroketopyranosyl nucleosides: synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-4-keto-beta-D-glucopyranosyl derivatives of N(4)-benzoyl cytosine and N(6)-benzoyl adenine." Eur J Med Chem **43**(2): 420-428.
- Matsuda, A., Y. Nakajima, A. Azuma, M. Tanaka and T. Sasaki (1991). "Nucleosides and nucleotides. 100. 2'-C-cyano-2'-deoxy-1-beta-D-arabinofuranosyl-cytosine (CNDAC): design of

a potential mechanism-based DNA-strand-breaking antineoplastic nucleoside." *J Med Chem* **34**(9): 2917-2919.

Matsuda, A. and T. Sasaki (2004). "Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides." *Cancer Sci* **95**(2): 105-111.

McMurry, J. (2016). *Organic chemistry*. Boston, MA, USA, Cengage Learning.

Mikhailopulo, I. A. and A. I. Miroshnikov (2010). "New trends in nucleoside biotechnology." *Acta Naturae* **2**(2): 36-59.

Pastor-Anglada, M., A. Felipe and F. J. Casado (1998). "Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies." *Trends Pharmacol Sci* **19**(10): 424-430.

Peter, L. (1975). *Antimetabolites of nucleic acid metabolism*, Gordon and Breach.

Player, M. R. and P. F. Torrence (1998). "The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation." *Pharmacol Ther* **78**(2): 55-113.

Plunkett, W., P. Huang, Y. Z. Xu, V. Heinemann, R. Grunewald and V. Gandhi (1995). "Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential." *Semin Oncol* **22**(4 Suppl 11): 3-10.

Rahman, M. F., R. Raj and R. Govindarajan (2018). "Identification of Structural and Molecular Features Involved in the Transport of 3'-Deoxy-Nucleoside Analogs by Human Equilibrative Nucleoside Transporter 3." *46*(5): 600-609.

Ramesh, D., B. G. Vijayakumar and T. Kannan (2021). "Advances in Nucleoside and Nucleotide Analogues in Tackling Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis Virus Infections." *ChemMedChem* **16**(9): 1403-1419.

Robak, T., E. Lech-Maranda, A. Korycka and E. Robak (2006). "Purine nucleoside analogs as immunosuppressive and antineoplastic agents: mechanism of action and clinical activity." *Curr Med Chem* **13**(26): 3165-3189.

Robak, T. and P. Robak (2012). "Purine nucleoside analogs in the treatment of rarer chronic lymphoid leukemias." *Curr Pharm Des* **18**(23): 3373-3388.

Robins, R. K. and G. D. Kini "Purines and purine nucleoside analogues as antitumour agents." Takenuki, K., A. Matsuda, T. Ueda, T. Sasaki, A. Fujii and K. Yamagami (1988). "Design, synthesis, and antineoplastic activity of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine." *J Med Chem* **31**(6): 1063-1064.

Tanaka, M., A. Matsuda, T. Terao and T. Sasaki (1992). "Antitumor activity of a novel nucleoside, 2'-C-cyano-2'-deoxy-1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (CNDAC) against murine and human tumors." *Cancer Lett* **64**(1): 67-74.

Tokumi Maruyama, Y. S. T. S. (1998). "Synthesis of 8-Substituted Analogs of 3'-Deoxy-3'-fluoradenosine ¹." *Nucleosides & Nucleotides* **17**:1-3: 115-122.

van den Hoogen, Y. T., C. M. Hilgersom, D. Brozda, K. Lesiak, P. F. Torrence and C. Altona (1989). "Conformational analysis of brominated pA2'-5'A2'-5'A analogs. An NMR and model-building study." *Eur J Biochem* **182**(3): 629-637.

Wagner, C. R., V. V. Iyer and E. J. McIntee (2000). "Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides." *Med Res Rev* **20**(6): 417-451.

Yamagami, K., A. Fujii, M. Arita, T. Okumoto, S. Sakata, A. Matsuda, T. Ueda and T. Sasaki (1991). "Antitumor activity of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine, a new 2'-deoxycytidine derivative." *Cancer Res* **51**(9): 2319-2323.

Zhou, W., G. Gumina, Y. Chong, J. Wang, R. F. Schinazi and C. K. Chu (2004). "Synthesis, structure-activity relationships, and drug resistance of beta-d-3'-fluoro-2',3'-unsaturated nucleosides as anti-HIV Agents." *J Med Chem* **47**(13): 3399-3408.