



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

«Τροποποιημένοι στη βάση της ουρακίλης άκυκλοι
νουκλεοζίτες. Σύνθεση και αποτίμηση της
βιολογικής τους δράσης.»

“Uracil Base-modified acyclic nucleosides. Synthesis
and evaluation of their biological activity”

ΧΡΗΣΤΟΣ ΓΙΑΝΝΑΚΑΣ
ΛΑΡΙΣΑ 2021

Τριμελής επιτροπή

- **ΚΟΜΙΩΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

Καθηγητής Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΟΛΛΑΤΟΣ**

Ακαδημαϊκός Υπότροφος του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών, , το χρονικό διάστημα Οκτωβρίου 2017- Ιουνίου 2018, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Βιοοργανικής Χημείας, κυρίου Κομιώτη, τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά που με καθοδήγησε, με συμβούλεψε και με εμπιστεύθηκε να εργαστώ στο εργαστήριο. Το ήθος του, οι γνώσεις του, ο τρόπος διδασκαλίας του και ο ενθουσιασμός του για το αντικείμενο αποτέλεσαν πόλο έλξης για να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό του, και τον ευχαριστώ που με δέχθηκε. Αξέχαστη για μένα θα μείνει η αμεσότητά του και η θέλησή του να στηρίξει και να βοηθήσει ερευνητικά τους φοιτητές του, και τον ευχαριστώ θερμά γι' αυτό.

Θα ήθελα να επεκτείνω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες και στον σπουδαίο Ακαδημαϊκό Υπότροφο, Νικόλαο Κολλάτο, μέρος της διδακτορικής διατριβής του οποίου μου εμπιστεύθηκε να εργαστώ. Τον ευχαριστώ για τις γνώσεις του, την καθοδήγησή του, τις συμβουλές του και τη βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας· από την παραμονή μου στο εργαστήριο, έως και το τέλος της συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας. Τον ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία του και την υπομονή που υπέδειξε, αλλά και τα εφόδια που μου έδωσε. Η συμβολή του στη διπλωματική μου εργασία υπήρξε καίρια και χωρίς αυτήν, δε θα ήταν δυνατή η περάτωσή της.

Κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο, είχα επίσης τη χαρά να συνεργαστώ με τους συμφοιτητές μου, Καρέτσου Βαρβάρα και Λιόλιο Βασίλειο. Η συνεργασία μαζί τους ήταν άψογη και απολύτως χρήσιμη, αφού με βοήθησαν να εγκλιματιστώ στο χώρο και κατέστησαν την παραμονή μας στο εργαστήριο μια πολύ ευχάριστη εμπειρία.

Κλείνοντας αυτό το ευχαριστήριο μήνυμα, θέλω να αποδώσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου. Ήταν η στήριξή τους σε όλα τα πεδία, η εμπιστοσύνη που έδειξαν στις δυνάμεις μου και αμέριστη αγάπη τους, που με πλαισίωσαν, με ενίσχυσαν και με βοήθησαν να ολοκληρώσω τις προπτυχιακές μου σπουδές. Σας ευχαριστώ πολύ, από καρδιάς!

Χρήστος Χρ. Γιαννακάς

Περίληψη Διπλωματικής Εργασίας

Η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών λειτουργίας του γενετικού υλικού και η βελτίωση των διαθέσιμων μοριακών τεχνικών, έχουν επιτρέψει την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για χρόνιες ασθένειες, όπως οι κακοήθεις νεοπλασίες. Μια κατηγορία αυτών των φαρμάκων, είναι τα νουκλεοζιτικά ανάλογα. Η χρήση τέτοιων φαρμάκων σαν αντιμεταβολίτες φυσικών νουκλεοζιτών, έχει δώσει σπουδαία αποτελέσματα στην καταπολέμηση ασθενειών και εμπνέει την διαρκή ανάπτυξη νέων. Η στενή ομοιότητα των νουκλεοζιτικών αναλόγων με τους φυσικούς νουκλεοζίτες, τους δίνει την ικανότητα να παρεμβαίνουν σε ποικίλες ενδοκυτταρικές διεργασίες, προκαλώντας την αναστολή τους και κατά συνέπεια την καταστροφή του κυττάρου.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το DNA χρησιμοποιεί δεοξυριβονουκλεοτίδια ως δομικά συστατικά για την αντιγραφή και σύνθεση της αλυσίδας του. Οποιοδήποτε σφάλμα στη διαδικασία αυτή, προκαλεί προσωρινή παύση της και ενεργοποιεί τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του κυττάρου. Εάν τα κυτταρικά ένζυμα δεν είναι σε θέση να επιδιορθώσουν το σφάλμα ή αν ο αριθμός των σφαλμάτων είναι υπερβολικά μεγάλος, το κύτταρο μπαίνει σε διαδικασία απόπτωσης. Αυτός ο μηχανισμός είναι και ο στόχος των φαρμάκων νουκλεοζιτικών αναλόγων. Παράλληλα με την αντιγραφή/σύνθεση του DNA, οι νουκλεοζίτες συμμετέχουν και άλλες κυτταρικές διεργασίες, όπως είναι η μεταγωγή σήματος, και οι οποίες μπορούν επίσης να επηρεαστούν από την παρουσία νουκλεοζιτικών αναλόγων.

Πολλοί επιστήμονες στον κλάδο της συνθετικής χημείας και φαρμακολογίας προσπαθούν να αξιοποιήσουν τις γνώσεις που έχουμε προς το παρόν με σκοπό την σύνθεση και παραγωγή πολυάριθμων μορφών νουκλεοζιτικών αναλόγων, με αυξημένη κυτταροτοξικότητα και εξειδικευμένη στόχευση. Τα διαθέσιμα φάρμακα παρουσιάζουν υψηλή ισχύ, αλλά έχουν σοβαρές παρενεργείες λόγω μη εξειδικευμένης δράσης.

Στην παρούσα μελέτη, έχοντας ως βάση αυτά, μελετάται η αντικαρκινική και αντι-ιική δραστηριότητα νουκλεοζιτών τροποποιημένων στη βάση αλλά και στο σάκχαρο. Η επιλογή των συγκεκριμένων νουκλεοζιτών έγινε μετά απο μελέτη ήδη γνωστών δραστικών νουκλεοζιτών που χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική βιομηχανία.

Abstract

Better understanding of function mechanisms of the genetic material, as well as innovations and improvements in available molecular techniques, has allowed the development of novel therapeutic approaches regarding chronic diseases, such as malignant neoplasms or viral infections. One particular category of such novel drugs, includes Nucleoside Analogs. The use of such drugs as nucleoside antimetabolites, has yielded great results in fighting the aforementioned diseases and has inspired the constant development of new ones. Their close resemblance to natural analogues, gives them the power to interfere with a variety of intracellular processes, resulting in their suspension and subsequently in the death of the cell itself.

Under normal circumstances, DNA uses deoxyribonucleosides as building blocks for copying or elongating its chain. Should an error occur, the process reaches to a halt and the repair mechanisms of the cell are activated. If the responsible enzymes are unable to repair the damage, or if a big number of errors has accumulated, then the cell initiates the process of apoptosis. This particular mechanism is the one that these novel nucleoside drugs aim for. In addition to DNA copy/synthesis, natural nucleosides are part of other cellular processes, like signal transduction. These processes can also be targeted by nucleoside analogues.

Many scientists in the field of synthetic chemistry and pharmacology are striving to make good use of current knowledge, in order to synthesize and produce a big array of nucleoside analog drugs, with increased cyto-toxicity and specialized targeting. Current available drugs have increased potency, however they also come with serious side-effects, due to their non-specialized targeting function.

In this study, based on these, the antitumor and antiviral activity of nucleosides modified on both base and on sugar is studied. Selection of these nucleosides was made after studying already known active nucleosides used in the pharmaceutical industry.

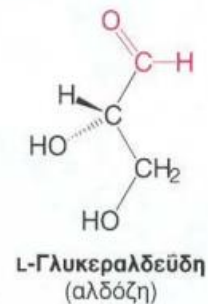
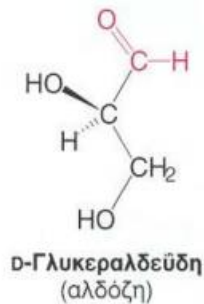
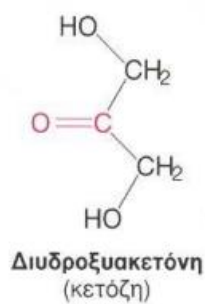
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	4
Abstract	5
Περιεχόμενα.....	6
1. Εισαγωγή	
1.1. Σάκχαρα	7
1.2. Νουκλεοζίτες.....	9
1.3. Εισαγωγή Νουκλεοζιτών στην Ιατρική	10
1.4. Σύνθεση, Ενδοκυτταρική πρόσληψη, Φωσφορυλίωση και Μεταβολισμός νουκλεοζιτών	11
1.5. Παράγωγα Νουκλεοζιτικών Αναλόγων	16
1.6. Μηχανισμός Δράσης αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών παραγώγων.....	16
1.7. Τοξικότητα αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών αναλόγων.....	20
1.8. Αντι-ιικά νουκλεοζιτικά παράγωγα	21
1.9. Τοξικότητα αντι-ιικών νουκλεοζιτικών αναλόγων	24
1.10. Πρώτοι άκυκλοι νουκλεοζίτες ως αντι-ιικά φάρμακα – ANPs	25
2. Σκοπός Μελέτης.....	28
3. Μέθοδοι – Τεχνικές	30
4. Πειραματική Διαδικασία.....	33
5. Αποτελέσματα – Συζήτηση	40
6. Βιβλιογραφία.....	44

1. Εισαγωγή

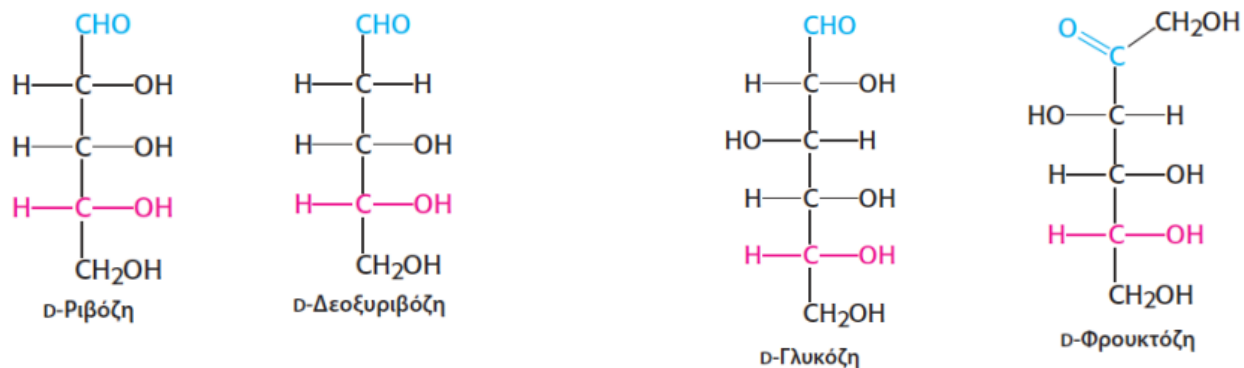
1.1. Σάκχαρα

Τα σάκχαρα ή αλλιώς υδατάνθρακες, είναι οργανικά βιομόρια αποτελούμενα κυρίως από άτομα Άνθρακα (C), Υδρογόνου (H) και Οξυγόνου (O). Ο χημικός τους τύπος μπορεί να συνοψισθεί ως $(C-H_2O)_n$, όπου n ο αριθμός των ατόμων C, κάτι που τεχνικά τους καθιστά ως ένυδρους άνθρακες. Η απλούστερη μορφή υδατανθράκων είναι οι μονοσακχαρίτες, οι οποίοι είναι αλδεΐδες ή κετόνες. Οι μονοσακχαρίτες αποτελούν σημαντικά καύσιμα μόρια στο μεταβολισμό, καθώς επίσης και δομικές μονάδες στο σχηματισμό των νουκλεϊκών οξέων. Η μικρότεροι μονοσακχαρίτες, με τρία άτομα άνθρακα ($n=3$), είναι διυδροξυακετόνη και η D- και L-γλυκεραλδεΐδη και αναφέρονται κι ως τριόζες. Η διυδροξυακετόνη είναι μία κετόζη, διότι φέρει μία κετονική ομάδα ($>C=O$), ενώ η γλυκεραλδεΐδη είναι μια αλδόζη, καθότι φέρει μία αλδεΐδική ομάδα ($-CH=O$).

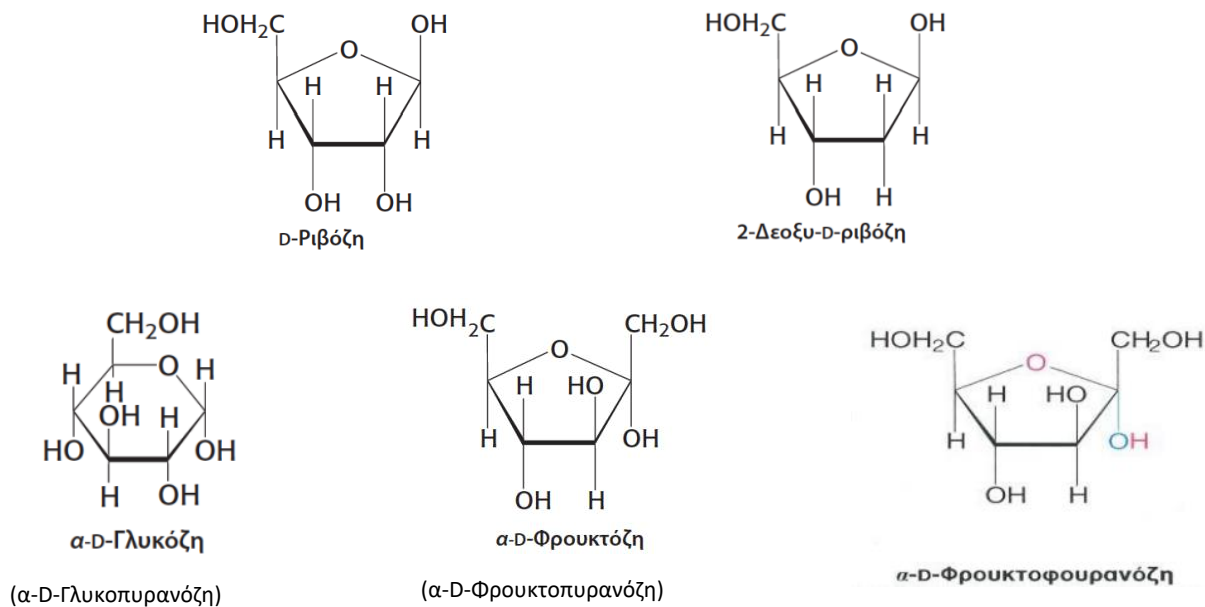


Στο συμβατικό σχήμα αρίθμησης για μονοσακχαρίτες, τα άτομα άνθρακα αριθμούνται από C1' (στην ομάδα αλδεΐδης) έως C5'. Το παράγωγο δεοξυριβόζης που βρίσκεται στο DNA, διαφέρει από την ριβόζη του RNA, έχοντας ένα άτομο υδρογόνου στη θέση της υδροξυλομάδας στο C2'.

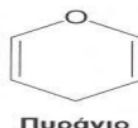
Κατ' αντιστοιχία με τις τριόζες, μονοσακχαρίτες με περισσότερα άτομα άνθρακα (4,5,6 κ.ο.κ.), καλούνται τετρόζες, πεντόζες και εξόζες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ένωσης παντοχών, αποτελεί η Ριβόζη/Δεοξυριβόζη (αλδόζη), ενώ παραδείγματα εξοζών είναι η Γλυκόζη (αλδόζη) και η Φρουκτόζη (κετόζη).



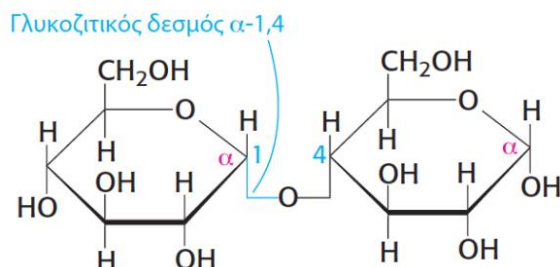
Οι παραπάνω τύποι ενώσεων δεν συναντώνται συχνά σε ανοιχτή αλυσίδα. Η επικρατέστερη μορφή αυτών των ενώσεων είναι η κυκλοποίηση της ανοιχτής αλυσίδας σε δακτύλιο.



Οι ονομασίες πυρανόζη και φουρανόζη στις ενώσεις, οφείλονται στην ομοιότητα που σχηματίζουν οι δακτύλιοι με τις ενώσεις του πυρανίου και του φουρανίου αντίστοιχα.

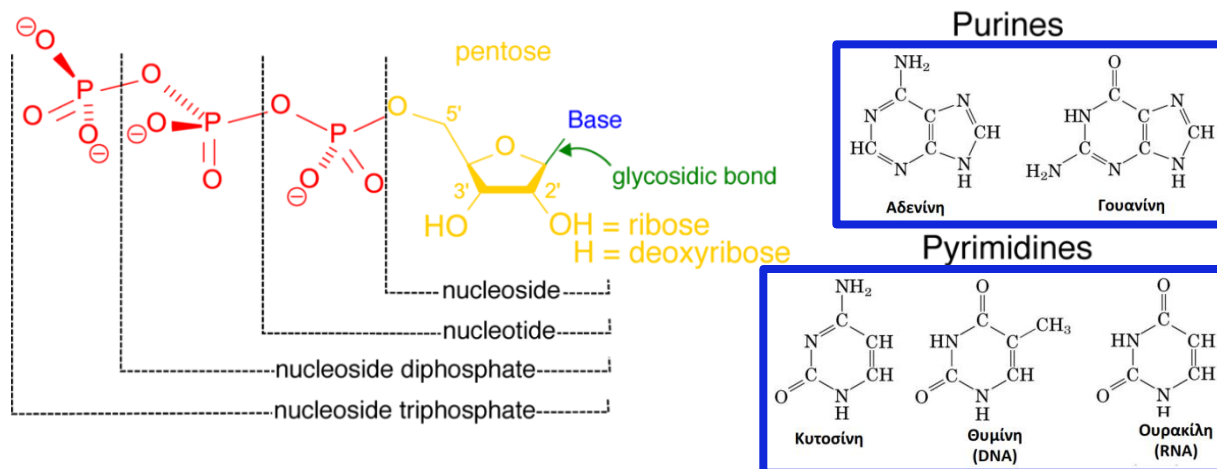


Οι ομάδες υδροξυλίου στους μονοσακχαρίτες, τους επιτρέπουν να ενώνονται μεταξύ τους, προς σχηματισμό δισακχαριτών, ολιγοσακχαριτών και πολυσακχαριτών. Ο δεσμός που επιτρέπει αυτή τη σύνδεση, σχηματίζεται μεταξύ του άνθρακα C-1 του ενός μονοσακχαρίτη και του άνθρακα C-4 του επόμενου μονοσακχαρίτη, απ'όπου προκύπτει και το όνομά του: α-1,4 γλυκοζιτικός δεσμός.

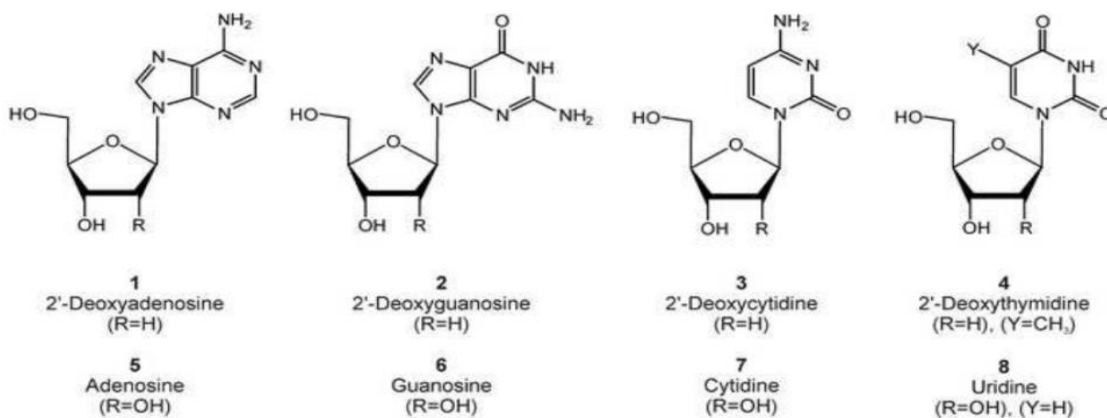


1.2. Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες και μπορούν να θεωρηθούν σαν νουκλεοτίδια χωρίς τη φωσφορική ομάδα. Είναι ενδογενείς στον οργανισμό και παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως είναι η σύνθεση του DNA/RNA, στην κυτταρική σηματοδότηση, την ενζυματική ρύθμιση και το μεταβολισμό. Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται από μία αζωτούχο βάση (Αδενίνη, Θυμίνη, Ουρακίλη, Γουανίνη, Κυτοσίνη), έναν ετεροκυκλικό πενταμελή δακτύλιο σακχάρου (πεντόζη: ριβόζη ή δεοξυριβόζη) και μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες. Η αζωτούχος βάση συνδέεται με το σάκχαρο (πεντόζη) μέσω γλυκοσιδικού δεσμού, μεταξύ του άνθρακα C-5 του σακχάρου και του αζώτου N-1 μιας πυριμιδίνης ή του N-9 μιας πουρίνης. Το σάκχαρο συνδέεται με τις φωσφορικές ομάδες μέσω φωσφοεστερικού δεσμού. Ένας νουκλεοζίτης με μία μόνο φωσφορική ομάδα, συνιστά ένα νουκλεοτίδιο, δομικό συστατικό του DNA/RNA, το οποίο αποκαλείται και εστέρας του νουκλεοζίτη.



Σχήμα 1: Σχεδιαγραμματική Απεικόνιση ενός νουκλεοζίτη στις διάφορες μορφές του.



Σχήμα 2: Χημική δομή φυσικών δεοξυ- και ριβονουκλεοσιδίων

Λειτουργία	Επιλεγμένα παραδείγματα
1. Ενεργειακός μεταβολισμός	ATP (μυϊκή συστολή, ενεργός μεταφορά, διαβαθμίσεις ιόντων, δότης φωσφορικού)
2. Μονομερείς μονάδες νουκλεϊνικών οξέων	NTP και dNTP (υποστρώματα για RNA και DNA)
3. Φυσιολογικοί διαμεσολαβητές	Αδενοσίνη (στεφανιαία ροή αίματος), ADP (συσσωμάτωση αιμοπεταλίων), cAMP και cGMP (δεύτεροι αγγελιοφόροι), μεταγωγή σήματος μέσω GTP-δεσμευόμενων πρωτεϊνών
4. Λειτουργία προδρόμου	GTP (mRNA καλύπτρα), τετραϋδροβιοπτερίνη (υδροξυλίωση αρωματικών αμινοξέων)
5. Συστατικά συνενζύμων	NAD, FAD, FMN και συνένζυμο A
6. Ενεργοποιημένα ενδιάμεσα	UDP-γλυκόζη (γλυκογόνο), CDP-χολίνη (φωσφολιπίδια), SAM (μεθυλίωση), PAPS (θειίκωση)
7. Αλλοστερικοί τελεστές	ATP (αρνητικός τελεστής PFK-1), AMP (θετικός τελεστής φωσφορυλάσης b), dATP (αρνητικός τελεστής ριβονουκλεοσιδικής αναγωγής)

Πίνακας 1: Παραδείγματα κυτταρικών διεργασιών όπου συμμετέχουν οι φυσικοί νουκλεοζίτες

1.3. Εισαγωγή Νουκλεοζιτών στην Ιατρική

Η μελέτη και οι επακόλουθες ανακαλύψεις που έγιναν στον κλάδο των νουκλεοζιτών πουρίνης και πυριμιδίνης, καθώς και των βιοσυνθετικών μονοπατιών των νουκλεοτιδίων, έχουν συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση των βιολογικών διεργασιών σε μοριακό επίπεδο. Η de novo σύνθεση πουρινο- και πυριμιδινο-νουκλεοτιδίων είναι κρίσιμη για τη φυσιολογική αναπαραγωγή, συντήρηση και λειτουργία των κυττάρων. Διαπιστώθηκε πως λόγω του μεγάλου βαθμού εμπλοκής τους στις κυτταρικές διεργασίες (σύνθεση γενετικού υλικού, κυτταρική σηματοδότηση κ.α.), οι νουκλεοζίτες θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντικούς στόχους φαρμάκων. Η ανάπτυξη φαρμάκων με δράσεις στο διάμεσο μεταβολισμό των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, υπήρξε σημαντική τόσο από κλινικής απόψεως, όσο από πλευράς σχεδιασμού. Πράγματι, αυτό επετεύχθη με τη δημιουργία Νουκλεοζιτικών Αναλόγων (NA).

Τα Νουκλεοζιτικά Ανάλογα είναι συνθετικές ουσίες, τροποποιημένες χημικά, ώστε να μιμούνται το ρόλο και τις λειτουργίες ενός φυσιολογικού νουκλεοζίτη.

Ο μεγάλος βαθμός ομοιότητας στις χημικές ιδιότητες των NA, τους επιτρέπει να επεμβαίνουν στις φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες, λαμβάνοντας το ρόλο των φυσικών νουκλεοζιτών. Μπορούν, για παράδειγμα, να ενσωματώνονται στην αλυσίδα του DNA ή του RNA και να προκαλούν κυτταρική απόπτωση ή να συνδέονται σε ένζυμα και να μπλοκάρουν τη δράση τους. Καθότι πρόκειται για εξωγενείς ουσίες, η δράση τους στον οργανισμό είναι τοξική.

Μέχρι στιγμής έχουν αναπτυχθεί δραστικές μορφές NA και χρησιμοποιούνται ως αντιμεταβολίτες σε κυτταροτοξικά φάρμακα για την καταπολέμηση διαφόρων ιογενών λοιμώξεων και καρκινικών όγκων.

1.4. Σύνθεση, Ενδοκυτταρική πρόσληψη, Φωσφορυλίωση και Μεταβολισμός νουκλεοζιτών

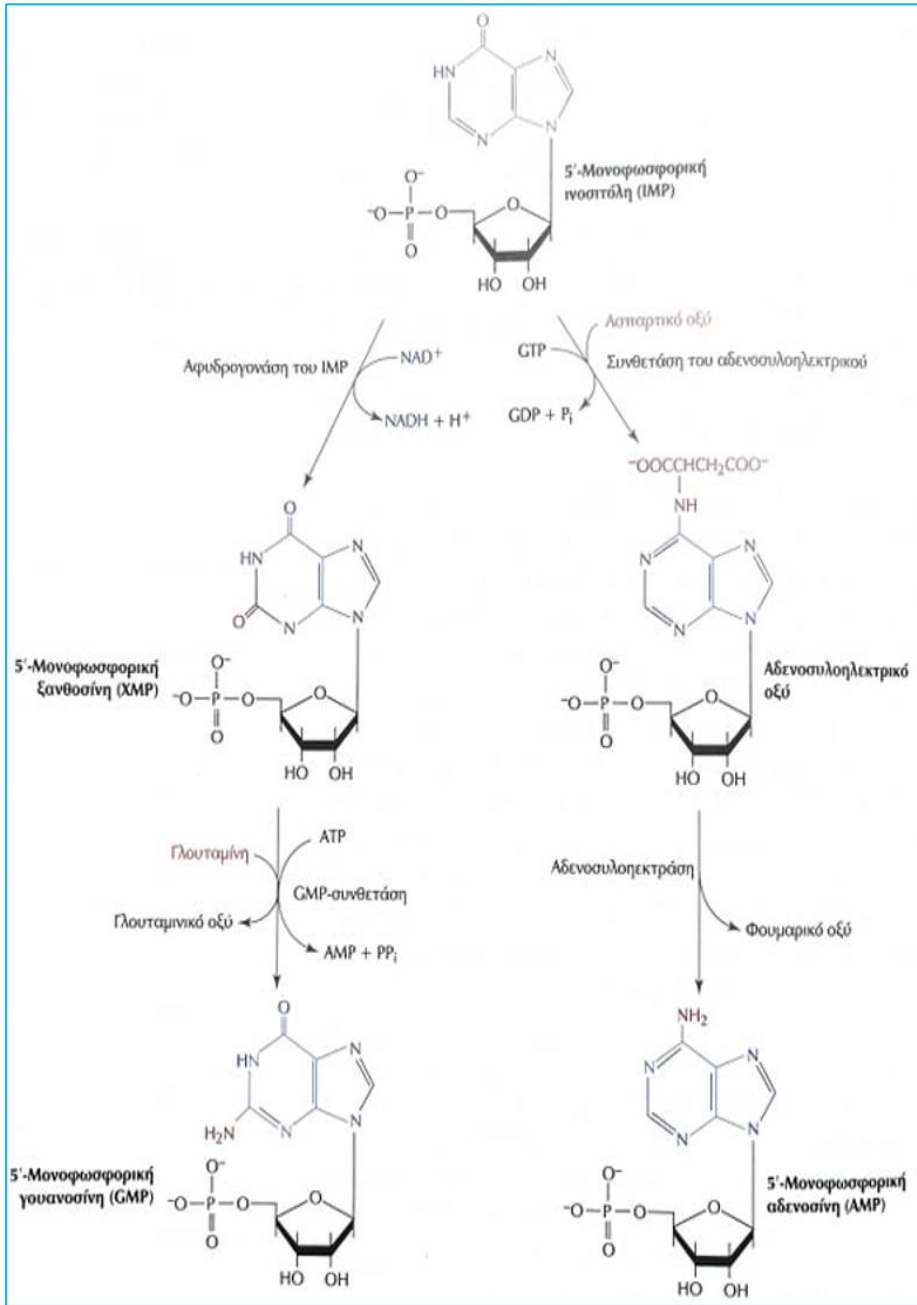
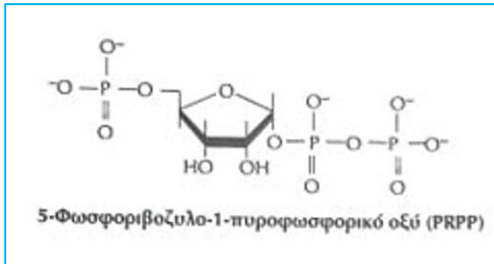
Δεδομένης της σημασίας τους στις κυτταρικές διεργασίες, ο μεταβολισμός των νουκλεοζιτών βρίσκεται υπό αυστηρό έλεγχο στον οργανισμό. Οι τριφωσφορικοί νουκλεοζίτες δεν μπορούν να απορροφηθούν καλά, επομένως κατά μεγάλο ποσοστό σχηματίζονται *de novo* στα κύτταρα. Η σύνθεση τριφωσφορικής (3P-) γουνοσίνης (GTP) και αδενοσίνης (ATP), διαφέρει από τη σύνθεση της 3P-κυτιδίνης (CTP), της 3P-θυμιδίνης (TTP) και της 3P-ουριδίνης (UTP). Και τα δύο μονοπάτια όμως έχουν κοινό πρόδρομο μόριο το 5-Φωσφοριβοζυλο-1-πυροφωσφορικό οξύ (PRPP).

- **Σύνθεση Πουρινο-νουκλεοζιτών**

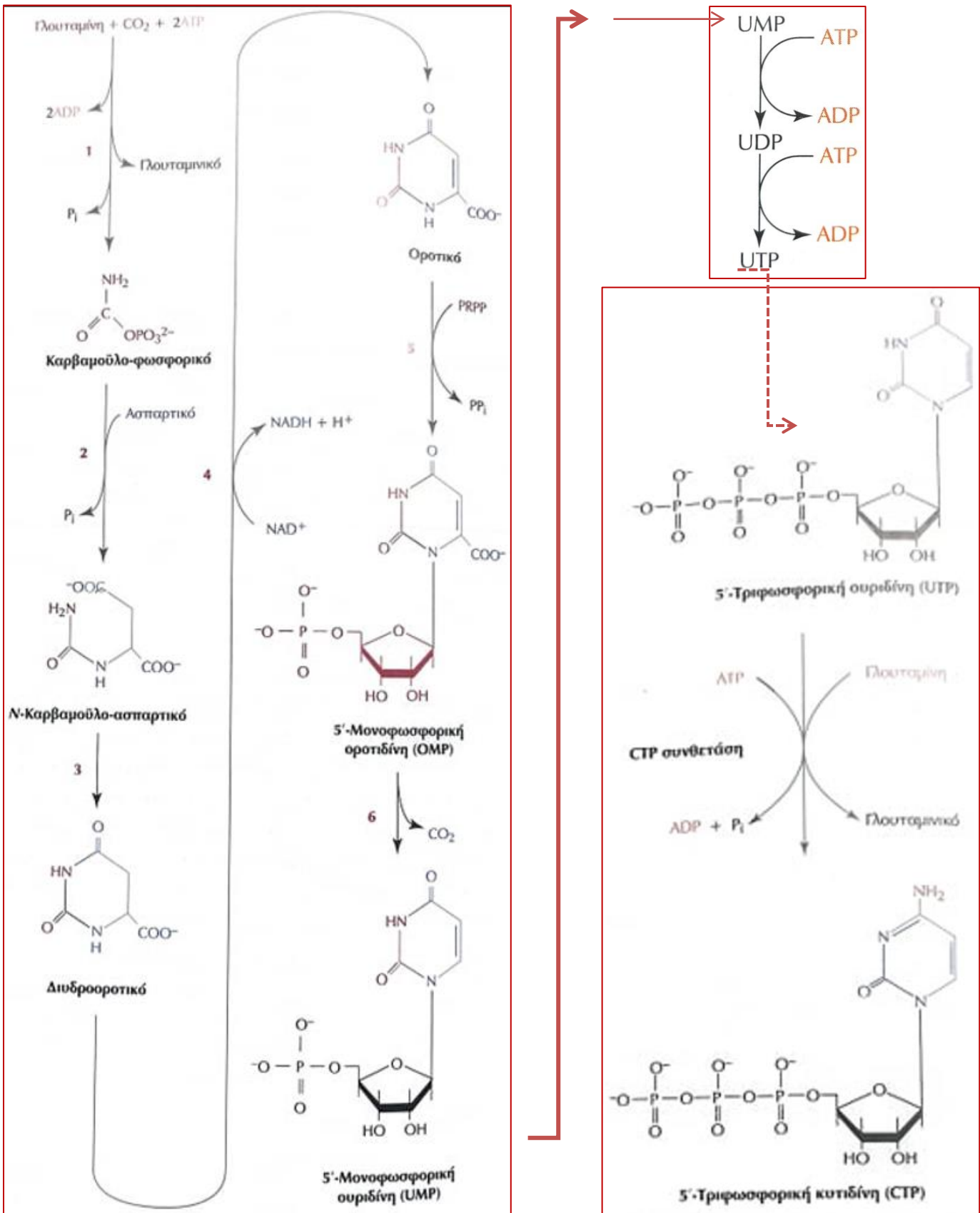
Η αζωτούχος βάση Υποξανθίνη στρατολογείται στο κύτταρο για το σχηματισμό του PRPP. Μέσα από ένα μεταβολικό μονοπάτι δέκα σταδίων, το PRPP δίνει το την 5-Μονοφωσφορική Ινσοσιτόλη (IMP), το οποίο στη συνέχεια δίνει GMP και AMP. Τα GMP και AMP ύστερα φωσφορυλιώνονται περαιτέρω προς GTP και ATP.

- **Σύνθεση Πυριμιδινο-νουκλεοζιτών**

Η αζωτούχος βάση Οροτικό, συντίθεται ανεξάρτητα από το PRPP. Η αντίδραση των δύο όμως, δίνει το σχηματισμό του Μονοφωσφορικού Οροτικού (OMP). Το OMP μετατρέπεται σε Μονοφωσφορική Ουριδίνη (UMP), η οποία ύστερα μπορεί να φωσφορυλιωθεί περαιτέρω προς UDP και UTP. Τέλος η Τριφωσφορική Ουριδίνη (UTP), μπορεί να δώσει την Τριφωσφορική Κυτιδίνη (CTP).



Σχήμα 3: Βιοσυνθετική πορεία πουρινο-νουκλεοζιτών



Σχήμα 4: Βιοσυνθετικό μονοπάτι πυριμιдино-νουκλεοζιτών.

- **Ενδοκυτταρική Πρόσληψη**

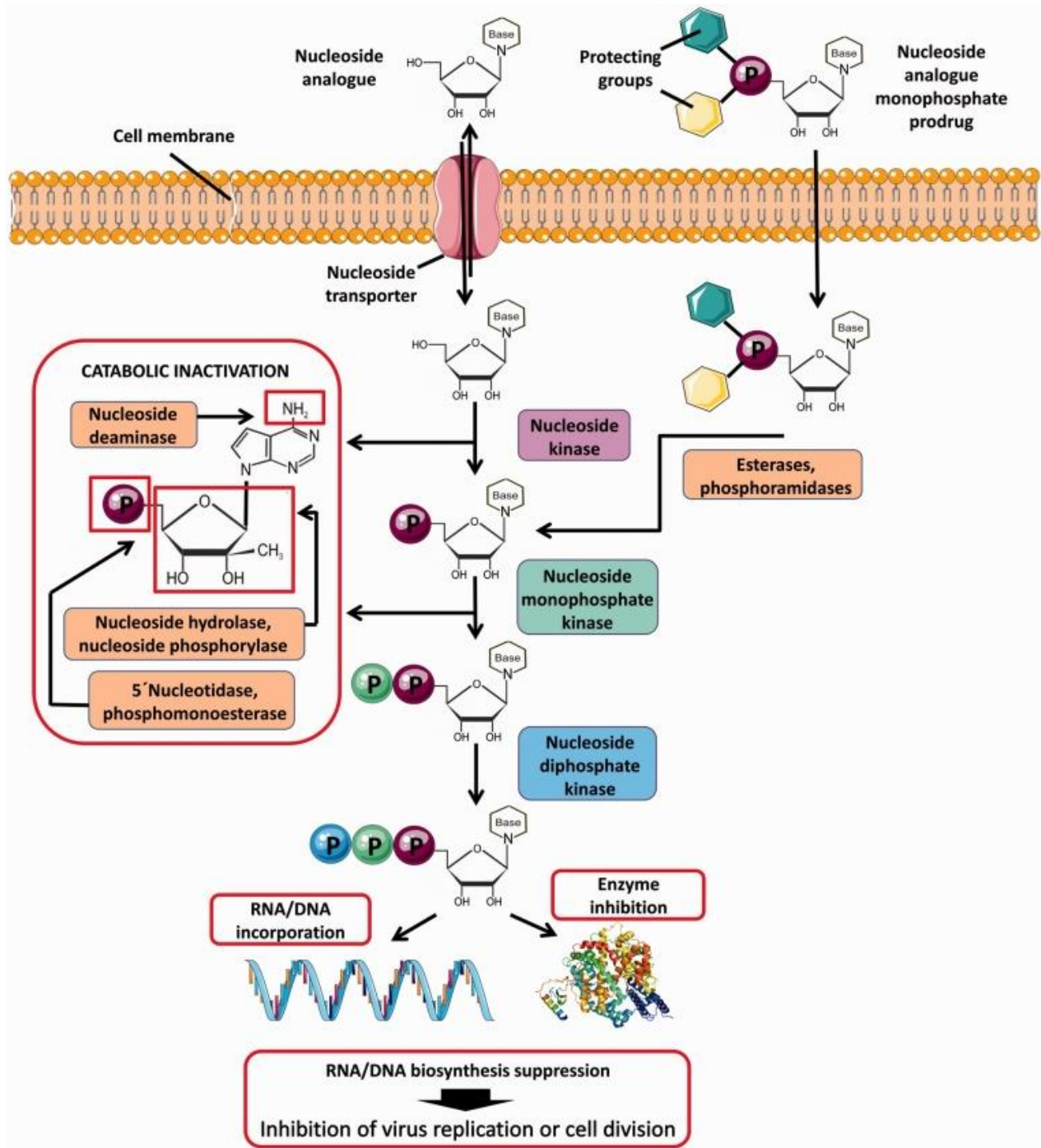
Οι νουκλεοζίτες σαν τριφωσφορικές ενώσεις δεν είναι εύκολο να απορροφηθούν εύκολα από τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω παθητικής διάχυσης, λόγω του αρνητικού φορτίου τους από τις φωσφορικές ομάδες. Οι πορείες de novo βιοσύνθεσης των πουρινο- και πυριμιδινονουκλεοζιτών, δίνουν 5-μονοφωσφορικά νουκλεοσίδια, τα οποία μπορούν να απορροφηθούν εντός των κυττάρων μέσω ειδικών διαμεμβρανικών μεταφορέων. Αυτό είναι πολύ σημαντικό για κύτταρα, όπως τα ερυθροκύτταρα, τα οποία δε μπορούν να συνθέσουν de novo τα νουκλεοσίδια που χρειάζονται. Προσλαμβάνουν τους μονοφωσφορικούς νουκλεοζίτες και τους φωσφορυλιώνουν περαιτέρω, με τη βοήθεια νουκλεοτιδικών κινασών, προκειμένου να παράγουν τριφωσφορικούς νουκλεοζίτες.

- **Φωσφορυλίωση και Μεταβολισμός Νουκλεοζιτικών Αναλόγων**

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα φαίνεται να φωσφορυλιώνονται με τα ίδια ένζυμα με τα φυσικά νουκλεοτίδια. Παράδειγμα αποτελούν οι κινάση θυμιδίνης, η θυμιδυλική κινάση. Όταν τα ΝΑ εισάγονται στο κύτταρο ως νουκλεοζίτες, οι παραπάνω κινάσες καταλύουν το πρώτο και δεύτερο βήμα στη φωσφορυλίωσή τους, προς την ενεργή μορφή του τριφωσφορικού παραγώγου. Έχει επίσης διαπιστωθεί ο ρόλος της Διφωσφορικής Νουκλεοζιτικής Κινάσης (NDPK), να φωσφορυλιώνει τόσο φυσικά νουκλεοσίδια, όσο και συνθετικούς νουκλεοζίτες.

Τα μονοφωσφορικά προφάρμακα εισάγονται στα κύτταρα ανεξάρτητα από τους μεταφορείς μεμβράνης και οι προστατευτικές ομάδες απομακρύνονται με ενδοκυτταρικές εστεράσες ή φωσφοραμιδάσες μετά από την εισαγωγή στα κύτταρα. Τα τριφωσφορικά άλατα των νουκλεοζιτικών ειδών αντιπροσωπεύουν τις δραστικές μορφές των νουκλεοζιτικών αναλόγων που δρουν αναστέλλοντας τη δράση κυτταρικών ή ιικών ενζύμων, όπως DNA/RNA πολυμεράσες. Κατά την αντιγραφή DNA/RNA, τα ΝΑ ενσωματώνονται σε λανθάνοντες DNA ή RNA αλυσίδες με αποτέλεσμα τον πρόωρο τερματισμό της σύνθεσης νουκλεϊκού οξέος ή τη συσσώρευση μεγάλου αριθμού μεταλλάξεων σε ιικά γονιδιώματα για την καταστολή της ιικής αντιγραφής, λόγω καταστροφής μέσω σφαλμάτων.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι συγκεντρώσεις των ενδοκυτταρικών νουκλεοζιτών διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα λόγω των καταβολικών οδών νουκλεοζιτών/νουκλεοτιδίων, όπως η απαμίνωση (οξειδωση) της ετεροκυκλικής βάσης, η υδρόλυση ή η φωσφορόλυση της ετεροκυκλικής βάσης και η υδρόλυση των δεσμών φωσφομονοεστέρα. Αυτές οι καταβολικές αντιδράσεις επίσης αφορούν τα περισσότερα ανάλογα νουκλεοζιτών που περιέχουν τον φυσικό N-γλυκοσιδικό δεσμό και / ή τις αποικοδομήσιμες λειτουργικές ομάδες της ετεροκυκλικής βάσης.



Σχήμα 5: Ενδοκυτταρική πρόσληψη και μεταβολισμός των νουκλεοζιτικών αναλόγων και των προφαρμάκων τους.

1.5. Παράγωγα Νουκλεοσιδικών Αναλόγων

Οι νουκλεοζίτες είναι πολυδύναμες ενώσεις με παρουσία πολλαπλών υδροξυλικών ομάδων και αμινομάδων, οι οποίες τους καθιστούν ιδιαίτερα λιπόφιλα και πολικά μόρια. Συνέπεια αυτού είναι η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα στη δια στόματος χορήγηση τέτοιων φαρμάκων, όπως επίσης και ο χαμηλός ρυθμός απέκκρισης του φαρμάκου από τον οργανισμό. Επιπρόσθετα, ο χρόνος ημιζωής τους στο πλάσμα του αίματος είναι μειωμένος, αφού υπόκεινται στη δράση ενζύμων όπως η νουκλεοσιδική φωσφορυλάση, η οποία κόβει το γλυκοσιδικό δεσμό, ή η νουκλεοζιτική απαμινάση. Προκειμένου ένα φάρμακο βασισμένο σε νουκλεοσιδικό ανάλογο να μπορεί να δράσει, θα πρέπει η συγκέντρωσή του στο αίμα να παραμένει σε σχετικά σταθερές συγκεντρώσεις. Τα παραπάνω στοιχεία αποτελούν πυλώνες, στους οποίους στηρίζεται η έρευνα ανάπτυξης ΝΑ ως δραστικών φαρμάκων.

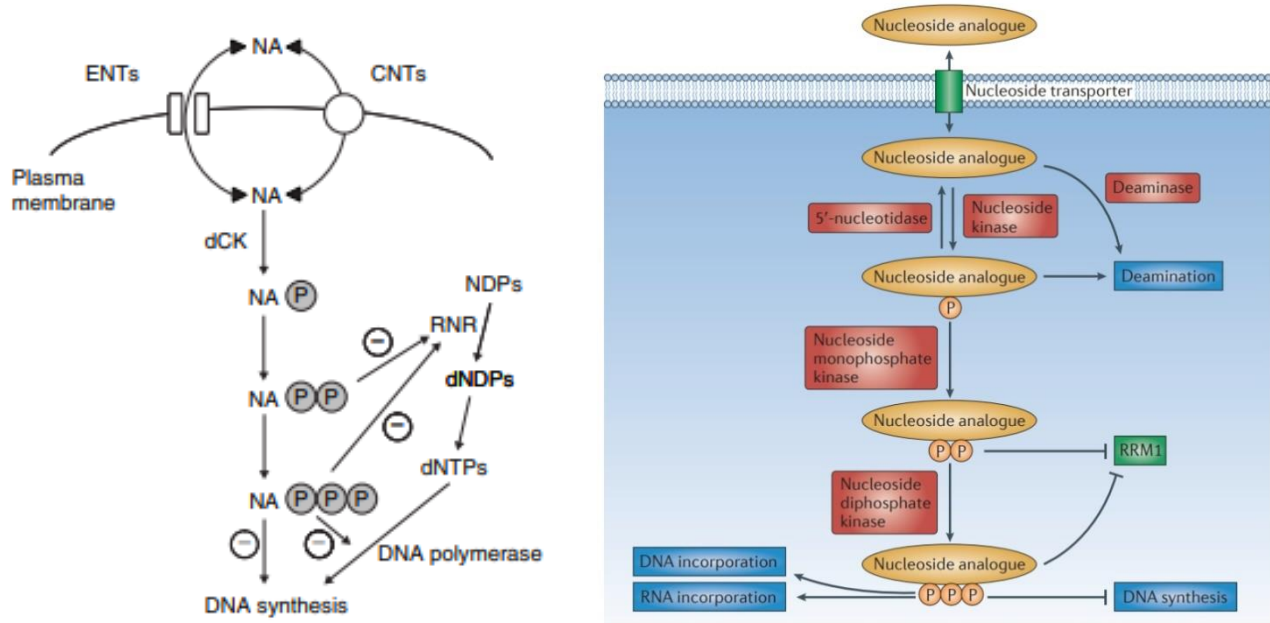
Η χημική τροποποίηση των αρχικών μορίων, είναι η πιο συνήθης στρατηγική ανάπτυξης νέων ΝΑ. Παράδειγμα αποτελεί η Ακετυλίωση νουκλεοζιτών, η οποία στοχεύει στην προστασία του μορίου από τη δράση ενζύμων. Η πρόκληση όμως σε αυτή τη στρατηγική, είναι η στοχευμένη ακετυλίωση του μορίου. Τα πιο γνωστά παραδείγματα δοκιμασμένων προφαρμάκων, είναι το valganciclovir και το valacyclovir, τα οποία χορηγήθηκαν σαν αντι-ϊικοί παράγοντες, αντί των acyclovir και ganciclovir.

Επιπλέον, διαπιστώθηκε κατόπιν ερευνών πως η γλυκοσυλίωση των παραγώγων των ΝΑ, βοηθά στο να εμφανίζουν χαμηλότερη τοξικότητα στον οργανισμό και μπορεί ως ένα βαθμό να βελτιώσει τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες.

1.6. Μηχανισμός δράσης Αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών παραγώγων

Τα κυτταροτοξικά νουκλεοσιδικά παράγωγα ήταν ανάμεσα στους πρώτους θεραπευτικούς παράγοντες που αναπτύχθηκαν για την καταπολέμηση του καρκίνου. Η χρήση των ΝΑ ως αντιμεταβολίτες με στόχο τον διάμεσο μεταβολισμό των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, αποτέλεσε σημείο καμπής στην ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων. Παρότι οι βιοχημικές ιδιότητες των διαφόρων καρκινικών κυττάρων δεν είναι πλήρως γνωστές, η αυξημένη μεταβολική δραστηριότητά τους, σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα καθιστά ευπαθή σε έναν μεγάλο αριθμό αντιμεταβολιτών. Οι βιοχημικές οδοί, οι οποίες έχουν μέχρι τώρα αποδειχθεί περισσότερο ευπαθείς σε εξωγενείς αντιμεταβολίτες, είναι εκείνες που σχετίζονται με τη σύνθεση των νουκλεοτιδίων και των νουκλεϊκών οξέων. Για παράδειγμα, αν ένα ένζυμο είναι γνωστό πως παίζει σημαντικό στην κυτταρική αύξηση, και πως η ενεργότητά του παρατηρείται αυξημένη σε ένα καρκινικό κύτταρο, τότε, το ένζυμο αυτό αποτελεί δελεαστικό στόχο φαρμάκων που θα αναστείλουν τη δράση του.

+Τα NA μοιράζονται κάποια κοινά χαρακτηριστικά: α) η μεταφορά τους εντός του κυττάρου μεσολαβείται από μεμβρανικούς μεταφορείς, β) ενεργοποιούνται από ενδοκυτταρικά μεταβολικά μονοπάτια και γ) σχηματισμός ενεργών φωσφορικών παραγώγων. Τα NA είναι κατά βάση υδρόφιλα μόρια και απαιτούν την παρουσία εξειδικευμένων νουκλεοτιδικών μεταφορέων στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης.



Σχήμα 6: Μηχανισμός δράσης και ενεργοποίησης νουκλεοζιτικών αναλόγων.

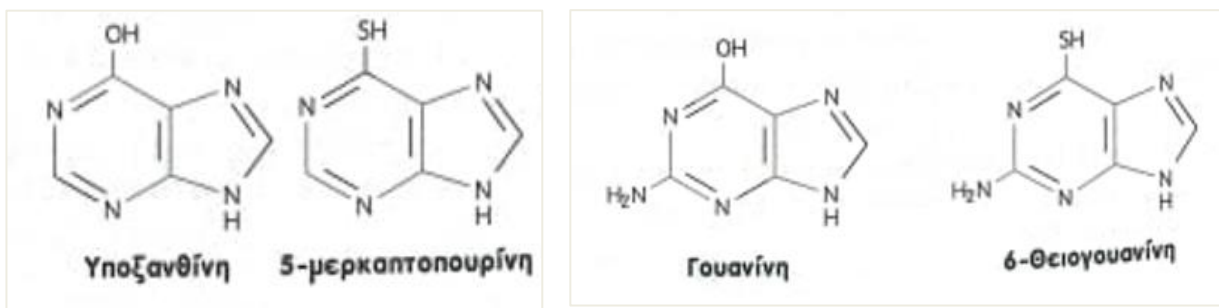
Ο μηχανισμός με τον οποίο λειτουργούν τα NA είναι απλός σε θεωρητικό επίπεδο και ιδιαίτερα αποτελεσματικός. Καθότι τα NA μοιάζουν σε δομή και σε χημικές ιδιότητες με τους φυσιολογικούς νουκλεοζίτες του οργανισμού, μπορούν να δρουν ως αντιμεταβολίτες, επηρεάζοντας τη φυσική διαδικασία της σύνθεσης νουκλεοτιδίων και της επιμήκυνσης της αλυσίδας του DNA/RNA. Μπορούν να ενσωματώνονται στις (δεοξυ-)ριβονουκλεοτιδικές αλυσίδες και να εμποδίζουν τη δράση των ενδογενών ενζύμων, όπως η DNA/RNA πολυμεράση. Επίσης προκαλούν πρόωρες παύσεις στις διαδικασίες αντιγραφής και μεταγραφής, οδηγώντας σε κατακερματισμό του γενετικού υλικού από νουκλεάσες, και κατά συνέπεια στο θάνατο του κυττάρου.

Τα αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα μεταφέρονται διαμέσου της μεμβράνης του πλάσματος με μεταφορείς νουκλεοσιδίων ENTs και / ή CNTs. Τα NA φωσφορυλιώνονται με νουκλεοσιδικές κινάσες, όπως dCK, κινάση μονοφωσφορικού νουκλεοσιδίου και κινάση διφωσφορικού νουκλεοζίτη σε δραστικά 5'-τριφωσφορικά παράγωγα. Τα δραστικά 5'-τριφωσφορικά παράγωγα των NA ενσωματώνονται στο DNA, οδηγώντας σε τερματισμό της σύνθεσης αλυσίδας DNA και κυτταρικό θάνατο. Επιπροσθέτως, τα φωσφορικά παράγωγα ορισμένων αναλόγων νουκλεοζιτών μπορούν να αποκλείσουν την αντιγραφή του DNA αναστέλλοντας την DNA πολυμεράση ή αναστέλλοντας το RNR (ριβονουκλεοτιδική ρεδοκτάση) που με τη σειρά του μειώνει τη μετατροπή των NDPs σε dNDPs και dNTPs. Η μείωση της συγκέντρωσης dNTP μειώνει τη σύνθεση του DNA και ευνοεί την ενσωμάτωση δραστικών 5'-τριφωσφορικών

παραγώγων των ΝΑ στο DNA. Οι αντιμεταβολίτες νουκλεοζιτών στοχεύουν ένα ή περισσότερα συγκεκριμένα ένζυμα. Ο τρόπος ανασταλτικής δράσης στο ένζυμο στόχο δεν είναι πάντα όμοιος ακόμη και μεταξύ των αντιμεταβολιτών νουκλεοζιτών που έχουν την ίδια νουκλεοσιδική βάση, όπως τα ara-C και γεμισαβίνη. Παρόλο που και οι δύο νουκλεοζίτες φωσφορυλιώνονται με κινάση δεοξυκυτιδίνης και είναι επίσης καλά υποστρώματα της κυταδίνης δεαμινάσης, μόνο η γεμισαβίνη δείχνει αντικαρκινική δραστηριότητα έναντι συμπαγών όγκων. Αυτό υποδηλώνει ότι οι διαφορές στη φαρμακολογική δραστηριότητα αυτών των αντιμεταβολιτών νουκλεοζιτών μπορεί να αντικατοπτρίζουν διαφορετικούς τρόπους δράσης επί των μορίων στόχων.

❖ Πουρινικά νουκλεοσιδικά ανάλογα και νουκλεοβάσεις

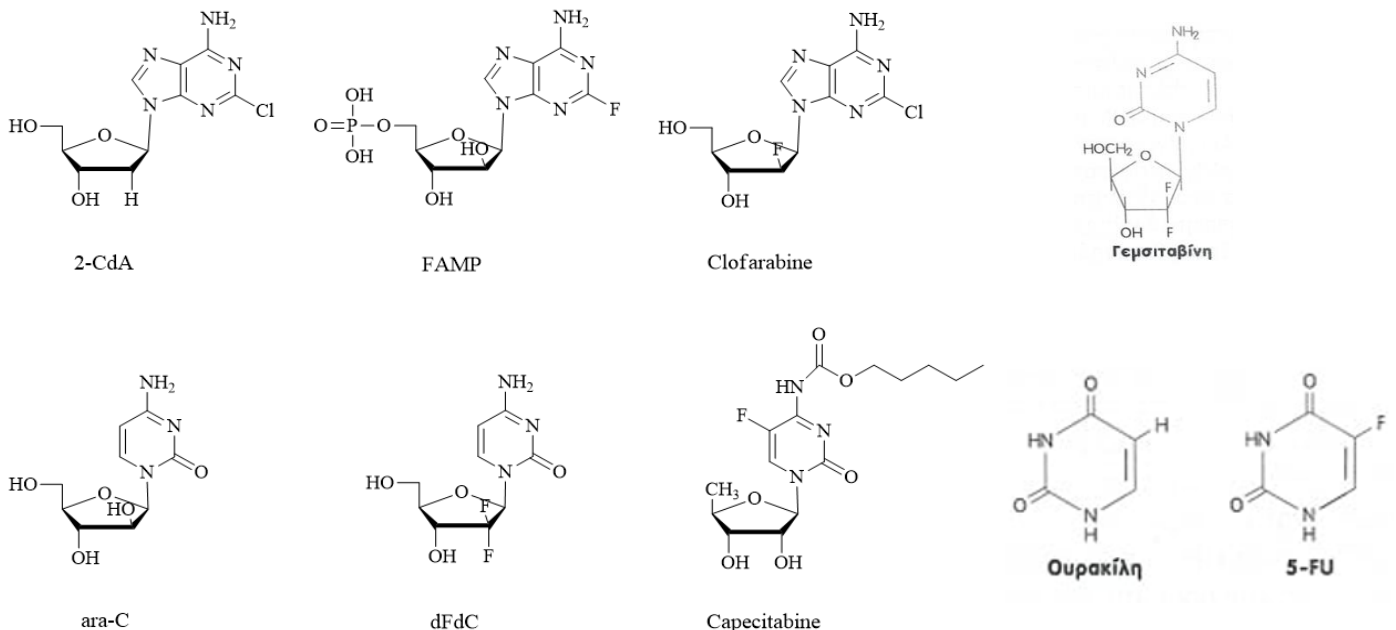
- Θειοπουρίνες: Η **Mercaptopurine** (6-MP) και η **Thioguanine** (6-TG) είναι ανάλογα της υποξανθίνης και της γουανίνης αντίστοιχα, και χρησιμοποιούνται περισσότερο ως ανάλογα νουκλεοβάσεων. Τα μόρια αυτά, για να είναι ενεργά, χρειάζεται να φωσφορυλιωθούν προς μονοφωσφορική θειο-ινοσίνη και μονοφωσφορική θειογουανίνη. Συνεχίζεται η φωσφορυλίωσή τους μέχρι το στάδιο των τριφωσφορικών, οπότε και μπορούν να ενσωματωθούν στο σχηματισμό των νουκλεοτιδίων. Χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση οξείας λευχαιμίας.
- Παράγωγα Δεοξαδενοσίνης: Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει φάρμακα όπως το **Fludabarine** (2-φθόριο-αραβινο-φουρανοσυλ μονοφωσφορική αδεδίνη) και το **Cladribine** (2-χλωροδεοξαδενοσίνη). Χορηγούνται ως μονοφωσφορικοί νουκλεοζίτες, κι στον οργανισμό φωσφορυλιώνονται περαιτέρω και ενσωματώνονται στο DNA, προκαλώντας ρήξη. Επιπλέον εμποδίζουν την αντιγραφή του DNA, εμποδίζοντας τη δράση της αναγωγάσης των ριβονουκλεοτιδίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνεται η διαθεσιμότητα του κυττάρου σε τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), και άρα να μην μπορούν να συντεθούν νέες αλυσίδες DNA. Τέλος, έχει παρατηρηθεί πως η δράση τους επηρεάζει και γονιδιακή μεταγραφή του κυττάρου, με αποτέλεσμα την εξάντληση πρωτεϊνών, απαραίτητων για τον κύκλο ζωής του κυττάρου. Χρησιμοποιούνται στη θεραπεία κακοηθειών στο αίμα, όπως χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, λέμφωμα μη-Hodgkin, οξεία μυελοειδή λευχαιμία και οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία.



Σχήμα 7: Πουρινικά νουκλεοσιδικά ανάλογα. Η 5-μερκαπτοπουρίνη και η 6-θειογουανίνη είναι νουκλεοσιδικά ανάλογα της υποξανθίνης και της γουανίνης αντίστοιχα.

❖ **Πυριμιδινικά νουκλεοσιδικά ανάλογα και νουκλεοβάσεις**

- **Παράγωγα Δεοξυκυτιδίνης:** Η **Cytarabine** (κυτοσινο αραβινοσίδη, ara-C) είναι ένας ειδικός της φάσης S του κυτταρικού κύκλου αντιμεταβολίτης, ο οποίος φωσφορυλιώνεται από την δεοξυκυτιδινική κινάση προς το 5-μονονουκλεοτίδιο (AraCMP). Το AraCMP φωσφορυλιώνεται μέχρι το τριφωσφορικό AraCTP, και δρα συναγωνιστικά αναστέλλοντας την DNA πολυμεράση. Επιπλέον, ενσωματώνεται στις αλυσίδες DNA/RNA και οδηγεί σε λύση της αλυσίδας πρόωρα.
- **Γεμισταβίνη:** Η **Γεμισταβίνη** φωσφορυλιώνεται κι αυτή από την δεοξυκυτιδινική κινάση και αποκτά την τριφωσφορική της μορφή. Στοχεύει την νουκλεοτιδική αναγωγή και την αναστέλλει, μειώνοντας έτσι τις διαθέσιμες ποσότητες των dNTPS στο κύτταρο. Επίσης ενσωματώνεται στην αλυσίδα του DNA κατά την αντιγραφή, και προκαλεί πρόωρη λήξη της αντιγραφής. Η Γεμισταβίνη χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση του μικρο-κυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, του καρκίνου του παγκρέατος και του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως.
- **Φθοριουρακίλη:** Η **Φθοριουρακίλη** (5-FU) είναι ένα προφάρμακο που υπόκειται σε μια σειρά σύνθετων αντιδράσεων βιομετασχηματισμού προς ριβοσυλ και δεοξυριβοσυλ νουκλεοτιδικούς μεταβολίτες. Ένας από αυτούς τους μεταβολίτες, το 5-φθόριο-2'-δεοξουριδινό-5'-φωσφορικό (FdUMP), μπορεί να ενσωματώνεται στο DNA και να προκαλεί παύση της σύνθεσής τους μέσω του «θυμιδινοελλειματικού θανάτου». Η 5-FU μετατρέπεται επίσης σε 5-τριφωσφορική-5-φθοριουριδίνη (FUTP), ενσωματώνεται στο RNA και επηρεάζει τη μετάφρασή του. Τέλος η 5-FU μετατρέπεται και σε 5-τριφωσφορική-5-φθοριοδεοξουριδίνη (FdUTP), η οποία ενσωματώνεται στο κυτταρικό DNA, αναστέλλοντας την ικανότητα σύνθεσης και αντιγραφής του. Η Φθοριουρακίλη χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση επιφανειακών καρκίνων του δέρματος, του καρκίνου του παχέως εντέρου, των μαστών, του στόματος, του ήπατος, του παγκρέατος, του τραχήλου, του οισοφάγου και του πρωκτού.



Σχήμα 8: Διάφορα νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση του καρκίνου.

1.7. Τοξικότητα αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών παραγόντων

Τα αντικαρκινικά ανάλογα νουκλεοζιτών παρουσιάζουν τοξικότητα τόσο σε επίπεδο κυτάρων, όσο και σε επίπεδο οργανισμού. Η τοξικότητά τους είναι πολυπαραγοντική και προκύπτει από την ίδια τους τη φύση και μηχανισμό δράσης. Σαν ανάλογα ενδογενών μορίων, πηγαίνουν και καταλαμβάνουν τις θέσεις τους στις κυτταρικές διεργασίες. Συνδέονται στις αλυσίδες του DNA και του RNA, διακόπτουν την ομαλή τους σύνθεση και προκαλούν πρόωρες ρήξεις στις αλυσίδες. Τελικώς αυτό έχει σα συνέπεια το κύτταρο να οδηγείται σε κυτταρικό θάνατο. Αυτό είναι το ωφέλιμο για εμάς αποτέλεσμα, όταν πρόκειται για καρκινικό κύτταρο. Το πρόβλημα είναι πως η δράση τους δεν είναι ιστοειδική ή κυτταροειδική, με αποτέλεσμα, εκτός από τα καρκινικά, να επηρεάζουν και τα υγιή κύτταρα. Δυνητικά, όλα τα κύτταρα του οργανισμού μπορούν να επηρεαστούν από τα νουκλεοζιτικά ανάλογα, ωστόσο μεγαλύτερο κίνδυνο και απόκριση στην κυτταροτοξικότητα παρουσιάζουν σειρές ταχέως πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, δηλαδή πολυδύναμα κύτταρα βλαστικών στοιβάδων. Παράδειγμα αποτελούν τα αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα και τα πολυδύναμα κύτταρα που προέρχονται από αυτά. Η προκύπτουσα τοξικότητα οδηγεί σε μείωση των γραμμών των κυττάρων του αίματος από την καταστολή του μυελού των οστών, ένα αποτέλεσμα που ευτυχώς είναι αναστρέψιμο μετά από διακοπή της αντικαρκινικής θεραπείας. Πέρα από τις επιθυμητές φαρμακοκινητικές ιδιότητες, τη δυσκολία σύνθεσης de novo συνθετικών νουκλεοζιτικών αναλόγων, μεγάλο στοίχημα στην ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων είναι η βελτίωση της στοχευμένης δράσης τους. Στον ακόλουθο πίνακα, παρουσιάζονται οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, για τους οποίους έγινε λόγος παραπάνω στην ενότητα 1.6, καθώς και τα αποτελέσματα της τοξικότητάς τους στον οργανισμό.

Χημειοθεραπευτικός Παράγοντας	Δοσολογία Μεμονωμένου Παράγοντα	Επιβραδυνόμενη Τοξικότητα ¹
Καπεσιταβίνη	1250 mg/m ² /ημερησίως από του στόματος επί 14 ημέρες, ακολουθούμενες από 7 ημέρες αποχής. Επανάληψη ανά 3 εβδομάδες	Μυелоκαταστολή, σύνδρομο χειρών και ποδιών ² , ναυτία και έμετος, διάρροια
Κλαδριβίνη	0.09 mg/kg/ημερησίως επί 7 ημέρες, με συνεχή ενδοφλέβια έγχυση σε αποστειωμένο φυσιολογικό ορό	Σοβαρή μυелоκαταστολή, ναυτία, έμετος και ανοσοκαταστολή
Κυταραβίνη	100 mg/m ² /ημερησίως επί 5-10 ημέρες, είτε με συνεχή Ε.Φ. έγχυση ή υποδορίως ανά 8 ώρες	Ναυτία και έμετος, καταστολή μυελού των οστών, στοματίτιδα και παρεγκεφαλική αταξία
Φλουδαραβίνη	25 mg/m ² /ημερησίως επί 5 ημέρες ανά 28 ημέρες (χορηγούμενο Ε.Φ. επί 30 λεπτά)	Μυелоκαταστολή, ανοσοκαταστολή, πυρετός, μυαλγίες και αρθραλγίες
Φθοριουρακίλη	15 mg/kg/ημερησίως Ε.Φ. επί 5 ημέρες μέσω 24ωρης έγχυσης· 15 mg/kg Ε.Φ. εβδομαδιαία	Ναυτία, βλεννογονίτιδα, διάρροια, καταστολή μυελού οστών, σύνδρομο χειρών και ποδιών και νευροτοξικότητα
Γεμισαβίνη	1000 mg/m ² Ε.Φ. εβδομαδιαίως έως και 7 εβδομάδες, ακολουθούμενες από παύση 1 εβδομάδας	Ναυτία, έμετος, διάρροια, μυелоκαταστολή
Μερκαπτοπουρίνη	2.5 mg/kg/ημερησίως από του στόματος	Μυелоκαταστολή, ανοσοκαταστολή και ηπατοτοξικότητα
Μεθοτρεξάτη	2.5-5 mg/ημερησίως από του στόματος· 10 mg ενδοραχιαία εφ' άπαξ ή δύο φορές εβδομαδιαίως	Βλεννογονίτιδα, διάρροια, καταστολή μυελού των οστών με λευκοπενία και θρομβοκυτοπενία
Θειογουανίνη	2 mg/kg/ημερησίως από του στόματος	Μυелоκαταστολή, ανοσοκαταστολή και ηπατοτοξικότητα

¹ Τα φάρμακα αυτά δεν προκαλούν οξεία τοξικότητα.
² Το σύνδρομο χειρών και ποδιών είναι μία μορφή ερυθρομεγαλαλγίας που εκδηλώνεται με αίσθημα νυγμών, αιμωδίες, άλγος, ερύθημα, οίδημα και μελάγχρωση του δέρματος.

Πίνακας 2: Τα διάφορα αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά φάρμακα κι η τοξικότητα που εμφανίζουν.

1.8. Μηχανισμός δράσης Αντι-ιικών νουκλεοζιτικών παραγώγων

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα, πέρα από αντικαρκινική δράση, μπορούν να συντεθούν με σκοπό την καταπολέμηση ιογενών λοιμώξεων. Κατ' αντιστοιχία με το μηχανισμό δράσης στα καρκινικά κύτταρα, τα αντι-ιικά ΝΑ μοιάζουν με τους φυσικούς νουκλεοσίδια, λαμβάνουν τις θέσεις τους στις βιολογικές διεργασίες, δρώντας σαν αντιμεταβολίτες και προκαλούν πρόωρες θραύσεις στις αλυσίδες του DNA και του RNA, οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση. Υπάρχουν ΝΑ για την καταπολέμηση της μόλυνσης από HIV, από ιούς της ηπατίτιδας Β και Γ (HBV, HCV), μόλυνση από κυτταρομεγαλοϊό (CMV), από ερπητοϊούς (HSV1 και HSV2), και από έρπητα ζωστήρα (VZV).

❖ Θεραπεία από Ιούς Έρπητα

- Acyclovir: Όντα το πρώτο που ανακαλύφθηκε, το 1974, ένα από τα πιο κοινά ΝΑ που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα για την αντιμετώπιση μολύνσεων HSV και VZV, είναι η **Ακυκλοβίρη** (ακυκλογουανοσίνη). Όπως φαίνεται κι από το όνομά της, είναι ένα ανάλογο πουρίνης (γουανίνη). Μετατρέπεται σε σε μονοφωσφορικό, ύστερα από φωσφορυλίωση από την κινάση της θυμιδίνης. Από τα κυτταρικά ένζυμα φωσφορυλιώνεται σε δι- και τριφωσφορική μορφή, οπότε και μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα για την HSV DNA πολυμεράση. Όταν ενσωματωθεί στην αλυσίδα, προκαλεί τον τερματισμό της επιμήκυνσής της. Έχει υψηλή ειδικότητα και υψηλό θεραπευτικό δείκτη, επομένως επηρεάζει μόνο κύτταρα προσβελημένα από τον ιό. Αυτό συνηστιά χαμηλή τοξικότητα σαν φάρμακο.

Άλλα ΝΑ που χρησιμοποιούνται ως αντι-ιικά έναντι των ερπητοϊών: Βαλασυκλοβίρη, Φαμισκλοβίρη, Πενσικλοβίρη, Τριφθοριοριδίνη.

❖ Θεραπεία από τον HIV

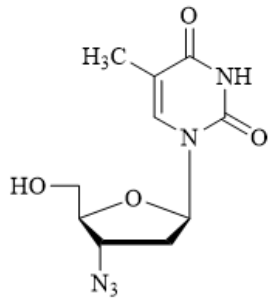
- AZT: Η 3'-αζιδο-3'-δεοξυθυμιδίνη (**Ζιδοβουδίνη**, AZT), ανήκει στην κατηγορία φαρμάκων με την ονομασία «Νουκλεοσιδικοί Αναστολείς της Αντίστροφης Μεταγραφάσης» (NRTIs). Οι NRTIs δρουν μέσω συναγωνιστικής αναστολής της αντίστροφης μεταγραφάσης του HIV-1. Είναι ανάλογο της δεοξυθυμιδίνης και στοχεύει την αλυσίδα του DNA. Η AZT φωσφορυλιώνεται σε τριφωσφορική AZT, από κινάσες του κυττάρου ξενιστή και παρεμποδίζει την αντιγραφή του DNA αναστέλλοντας τη δράση της HIV-DNA πολυμεράσης. Λόγω του ότι η HIV-DNA πολυμεράση έχει ειδικότητα 100 φορές μεγαλύτερη για την 3P-AZT, εμφανίζει έναν ικανοποιητικό βαθμό ειδικότητας ως προς τον στόχο της, αποφεύγοντας να προξενήσει βλάβες στα κύτταρα του ξενιστή.

Άλλα ΝΑ που χρησιμοποιούνται ως αντι-ιικά έναντι του ιου HIV: Διδανοσίνη, Λαμβουδίνη, Ζαλσιταβίνη, Σταβουδίνη, Αβακαβίρη

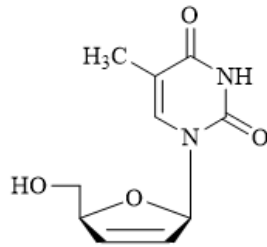
❖ **Θεραπεία από τον Κυτταρομεγαλοϊό (CMV)**

- **Ganciclovir:** Η Γανσικλοβίρη, είναι ένα ακυκλικό ΝΑ της γουανοσίνης, που απαιτεί φωσφορυλίωση για να ενεργοποιηθεί, πριν από τη σύνδεση με την πολυμέραση του CMV. Στην ενεργή μορφή της, αναστέλλει την DNA πολυμεράση και τερματίζει την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA του ιού.

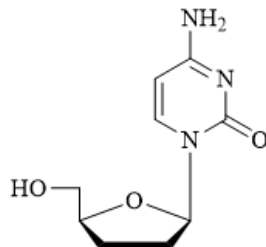
Άλλα ΝΑ που χρησιμοποιούνται ως αντι-ϊικά έναντι του ιού CMV:
Βαλγανσικλοβίρη, Σιδοφοβίρη, Φοσκαρνέτη, Φομιβιρσένη



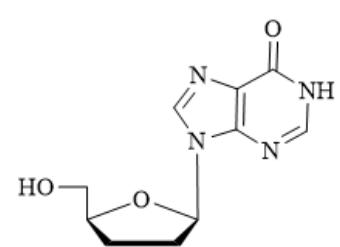
Zidovudine
Anti-HIV



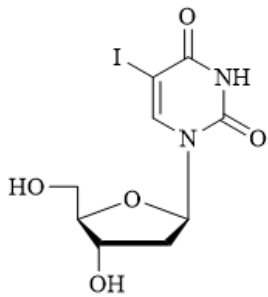
Stavudine
Anti-HIV



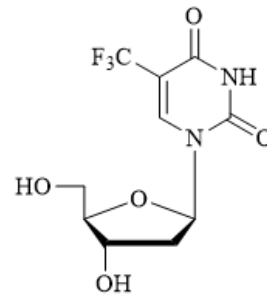
Zalcitabine
Anti-HIV



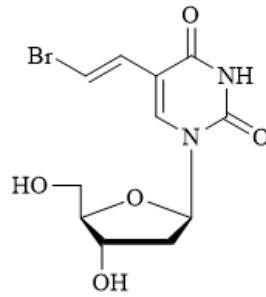
Didanosine
Anti-HIV



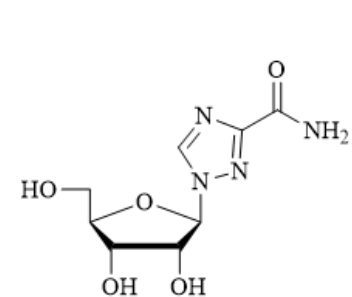
Idoxuridine
Anti-HSV



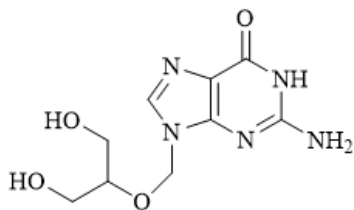
Trifluridine
Anti-HSV



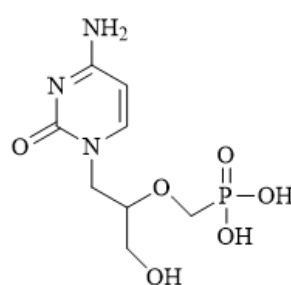
Brivudin
Anti-HSV & Anti-VZV



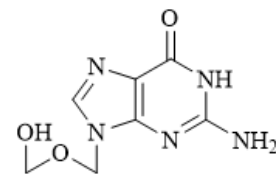
Ribavirin
Anti-HCV



Ganciclovir
Anti-HCMV



Cidofovir
Anti-HCMV



Acyclovir
Anti-HSV & Anti-VZV

Σχήμα 9: Διάφορα νουκλεοζιτικά ανάλογα που εμφανίζουν αντι-ϊική δράση

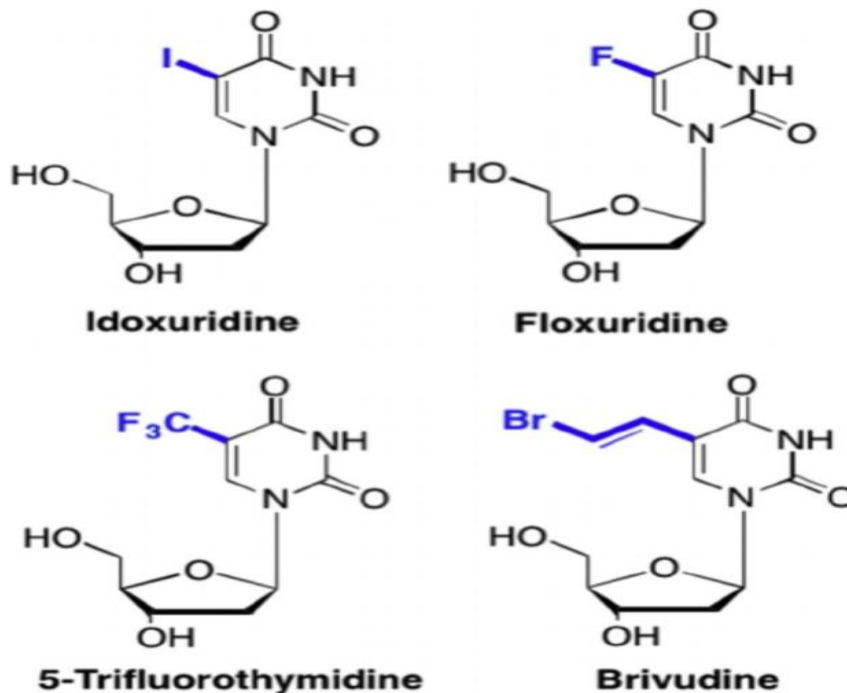
Όταν εξετάζονται ενδεχόμενες τροποποιήσεις στο σκελετό του νουκλεοζίτη, μπορεί να εξεταστούν διάφορες διαφορετικές θέσεις: το τμήμα σακχάρου, η αρωματική ετεροκυκλική βάση, ο γλυκοσιδικός δεσμός που συνδέει το σάκχαρο με την ετεροκυκλική βάση ή/και την φωσφορική ομάδα του νουκλεοτιδίου. Τροποποιήσεις μπορούν να γίνουν με απλή προσθήκη ενός υποκαταστάτη ή ομάδας στην ετεροκυκλική βάση ή σάκχαρο, αντικαθιστώντας ένα άτομο σε οποιαδήποτε ομάδα, μετακινώντας ένα άτομο σε διαφορετική θέση ή συνδυασμός αυτών των προσεγγίσεων. Παρόμοιες τροποποιήσεις μπορούν επίσης να γίνουν στις φωσφορικές ομάδες σε ανάλογα νουκλεοτιδίων. Ακόμη και η θέση του γλυκοσιδικού δεσμού μπορεί να μετατοπιστεί, για παράδειγμα, σε άλλο άνθρακα, ωστόσο, η τελευταία είναι παραδοσιακά λιγότερο συνηθισμένη τροποποίηση. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν επίσης να γίνουν σε συνδυασμό, επιτρέποντας έτσι μια μεγάλη ποικιλία στη δομή και λειτουργία των νουκλεοζιτών.

1. Τροποποιήσεις στο σάκχαρο

Ορισμένα από τα πρώτα παραδείγματα αναλόγων νουκλεοζιτών παρουσίαζαν τροποποιήσεις στο σάκχαρο. Αυτά τα ανάλογα αύξησαν σημαντικά τις γνώσεις μας για τις φυσιολογικές αλληλεπιδράσεις νουκλεοζιτών, αλλά και τον τρόπο με τον οποίο αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούσαν να αξιοποιηθούν για ιατρικούς σκοπούς. Αυτές οι τροποποιήσεις περιλαμβάνουν την προσθήκη ή την αφαίρεση υποκαταστατών στο δακτύλιο φουρανόζης, την αλλαγή του μεγέθους του δακτυλίου ή ακόμη και την αφαίρεση του οξυγόνου της φουρανόζης για να δημιουργηθεί μια εντελώς νέα κατηγορία νουκλεοζιτών.

2. Τροποποιήσεις στον δακτύλιο πυριμιδίνης

Αν και μπορούν να γίνουν διάφορες τροποποιήσεις στον δακτύλιο πυριμιδίνης, μία από τις συνηθέστερες πρώιμες τροποποιήσεις στον σχεδιασμό νουκλεοζιτικών φαρμάκων περιλαμβάνει την προσθήκη υποκαταστατών στη θέση C5 του δακτυλίου πυριμιδίνης. Αυτή η τροποποίηση μπορεί δυνητικά να μεταβάλλει το ηλεκτρονιακό περιβάλλον και ακόμη και τις αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου μεταξύ της θέσης σύνδεσης ενζύμου και του νουκλεοζιτικού αναλόγου. Ένας πρώιμος νουκλεοζίτης που χρησιμοποιήθηκε αυτή την τροποποίηση ήταν η Ιδοξουριδίνη, ένα ανάλογο 2'-δεοξουριδίνης με ένα ιώδιο στη θέση C5 στον δακτύλιο ουριδίνης. Η Ιδοξουριδίνη ήταν ένα από τα πρώτα παραδείγματα ενός αναλόγου πυριμιδίνης και αρχικά αναπτύχθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας, ωστόσο, μετέπειτα μελέτες αργότερα κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η θεραπεία με Ιδοξουριδίνη συσχετίστηκε επίσης με βαθιά αντι-ιική δραστηριότητα, κυρίως έναντι ιών DNA όπως ο HSV. Άλλα αξιοσημείωτα τροποποιημένα ανάλογα C5 που αναπτύχθηκαν νωρίς περιελάμβαναν 5-τριφθοροθυμιδίνη (Trifluridine), η οποία χρησιμοποιήθηκε κυρίως για μολύνσεις από έρπητα του οφθαλμού και 5-βρωμοβινυλ δεοξουριδίνη (Brivudine), η οποία χρησιμοποιήθηκε για την αγωγή τ.ου έρπητα ζωστήρα.



Σχήμα 10: Νουκλεοζιτικά ανάλογα με τροποποίηση στο δακτύλιο πυριμιδίνης.

1.9. Τοξικότητα Αντι-ϊικών νουκλεοζιτικών παραγώγων

Τα αντι-ϊικά ΝΑ είναι συχνά ουσίες με αρκετά στοχευμένη δράση, λόγω κυρίως της αυξημένης ειδικότητας με το στόχο τους. Για το λόγο αυτό, συχνά δεν παρατηρούνται έντονες αντιδράσεις, και η χρήση τους είναι σχετικά ανεκτή. Ωστόσο αυτό δε σημαίνει ότι δεν έχουν παρατηρηθεί αντενδείξεις στη χρήση τους, αφού δυνητικά μπορούν να δημιουργήσουν μεγάλα προβλήματα στον οργανισμό. Η όποια προκύπτουσα τοξικότητα, είναι συχνά δοσο-εξαρτώμενη και αναστρέψιμη μετά τη διακοπή της θεραπείας.

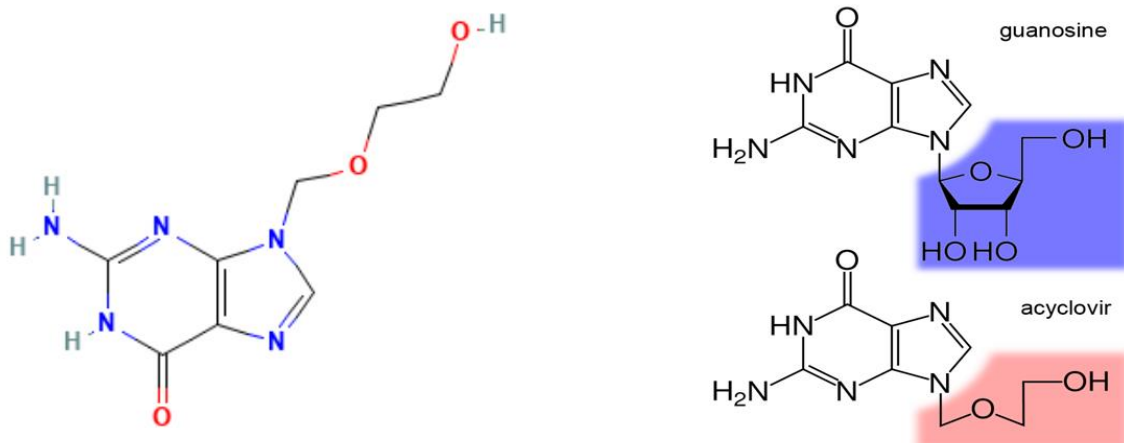
- ***Acyclovir***: Ανάμεσα στα συμπτώματα που έχουν καταγραφεί, αναφέρονται ενδεικτικά: Ναυτία, Κεφαλαλγία, Διάρροια, Αναστρέψιμη νεφρική ανεπάρκεια και νευρολογική τοξικότητα που εκφράζεται με σπασμούς και τρόμο.
- ***Ganciclovir***: Η συνηθέστερη παρενέργεια από τη συστηματική χορήγηση γανσικλοβίρης, είναι η μυελοκαταστολή και η ουδετεροπενία. Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν πυρετό, εξανθήματα, ανώμαλη ηπατική λειτουργία, και αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς σε ασθενείς με CMV αμφιβληστροειδοπάθεια.
- ***NRTIs***: Η χρήση φαρμάκων κατά του HIV μπορεί να προκαλέσει ηπατομεγαλία και γαλακτική οξέωση, ειδικά σε παχύσαρκους ασθενείς. Ένα κοινό πρόβλημα αυτής της κατηγορίας φαρμάκων είναι πως με τη χρόνια χρήση, αναπτύσσεται ανοχή στα ιικά στελέχη κύτταρα και μειώνεται η κλινική αποτελεσματικότητα. Άλλα

συμπτώματα των NRTIs περιλαμβάνουν την κεφαλαλγία, την κόπωση, την γαστρεντερική δυσανεξία, εμετό, διάρροια και νευροπάθειες.

Αξίζει να σημειωθεί πως τα αντι-ϊικά NA, εμφανίζουν μεταξύ τους μια κοινή κυτταροτοξική δράση. Η δράση αυτή σχετίζεται με τη λειτουργία του μιτοχονδριακού DNA. Τα NA μπορούν να εισέλθουν στο μιτοχόνδριο και να μπλοκάρουν την σύνθεση του μιτοχονδριακού DNA, αναστέλλοντας τη δράση τη γ-μιτοχονδριακής πολυμεράσης. Αυτό οδηγεί στην εξάντληση των μιτοχονδρίων στο κύτταρο ή στην ελάττωση της λειτουργικότητάς τους. Το φαινόμενο αυτό που ονομάζεται και Μιτοχονδριακός τραυματισμός, μπορεί να έχει αντίκτυπο σε πολλαπλά σημεία στον οργανισμό. Αρχικά μπορεί να προκύψει μυοπάθεια, αφού τα μυϊκά κύτταρα δεν διαθέτουν τον απαραίτητο αριθμό μιτοχονδρίων για να παράγξουν τα τεράστια ποσά ενέργειας που απαιτούνται για την εκτέλεση μηχανικών κινήσεων. Επίσης, στο ήπαρ δημιουργείται γαλακτική οξέωση και στεάτωση, οδηγώντας τελικά σε ηπατική ανεπάρκεια.

1.10. ANPs – Άκυκλοι Φωσφονικοί νουκλεοζίτες

Το πρώτο Νουκλεοτιδικό Ανάλογο που ανακαλύφθηκε, με σκοπό τη χρήση του ως αντι-ϊικό παράγοντα, ήταν η Ακυκλοβίρη το 1974. Δρα αποτελεσματικά κατά των των ερπητοϊών 1 και 2 (HSV1, HSV2) , λιγότερο ισχυρά έναντι του έρπητα ζωστήρα (VZV), και πολύ λίγη δραστηριότητα έχει έναντι του κυτταρομεγαλοϊού και του ιού Epstein-Barr. Όπως περιγράφηκε παραπάνω, στο μηχανισμό λειτουργίας του φαρμάκου, η ακυκλοβίρη πρέπει να φωσφορυλιωθεί για να είναι στην ενεργή μορφή της, οπότε και θα συνδεθεί στην αλυσίδα του DNA, διακόπτοντας την σύνθεσή του. Όπως όλα τα NA, η ικανότητα δράσης της ένωσης οφείλεται στο μεγάλο βαθμό ομοιότητας με το ενδογενές μόριο, τη γουανοσίνη. Χάρη σε αυτή την ομοιότητα μπορεί να δρα σαν αντιμεταβολίτης. Ιδιαίτερα χαρακτηριστικό στην ένωση της ακυκλοβίρης, είναι το γεγονός πως ολόκληρο το σάκχαρο του νουκλεοζίτη, έχει υποκατασταθεί από μια ομάδα (2-υδροξυεθοξυ)μεθυλ.



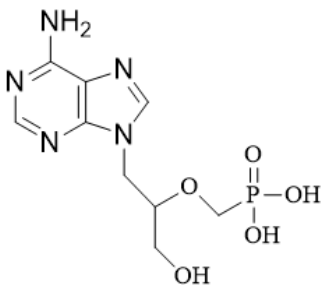
Σχήμα 11: Η ακυκλοβίρη ως αντι-ϊικό φάρμακο και η ομοιότητα που παρουσιάζει το τροποποιημένο σάκχαρο στην ακυκλοβίρη με το φυσικό της ανάλογο, τη γουανίνη.

Η αδυναμία της ακυκλοβίρης να αντιμετωπίσει επαρκώς τους ιούς CMV και VZV, ώθησε τους ερευνητές στην ανάπτυξη νέων αναλόγων που θα μπορούσαν να καλύψουν αυτό το αντι-ϊικό ρόλο. Έτσι προέκυψαν τα μόρια Γανσικλοβίρη (για τον CMV) και Πενσικλοβίρη (για VZV), επίσης άκυκλα, όπως η Ακυκλοβίρη. Αυτό έδωσε την ιδέα για την ανάπτυξη περισσότερων και πιο σταθερών Νουκλεοζιτικών αναλόγων, τα οποία μπορούν να είναι άκυκλες ενώσεις και πιο ανθεκτικές στο μεταβολισμό του οργανισμού.

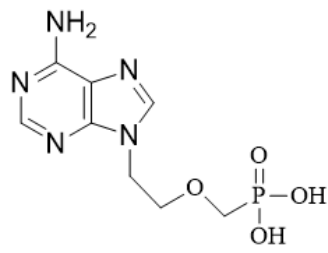
ANPs

Άκυκλοι φωσφονικοί νουκλεοζίτες (ANPs) είναι μία τάξη νουκλεοζιτών στους οποίους ο φουρανικός δακτύλιος έχει διανοιχτεί ή αντικατασταθεί από διάφορα άκυκλα τμήματα. Οι άκυκλοι φωσφονικοί νουκλεοζίτες διαθέτουν μια φωσφονική ομάδα προσαρτημένη στο ακυκλικό νουκλεοζιτικό τμήμα μέσω ενός σταθερού αιθερικού δεσμού P-C. Σε αντίθεση με την φωσφορική ομάδα (η οποία συνδέεται μέσω ενός δεσμού P-O-C), μια φωσφονική ομάδα δεν μπορεί να αποκοπεί με κυτταρικές υδρολάσες (εστεράσες). Δεδομένου ότι οι άκυκλοι φωσφονικοί νουκλεοζίτες ήδη περιέχουν μια φωσφορικο-μιμητική ομάδα, σταθερά προσαρτημένη μέσω ενός δεσμού P-C, χρειάζονται μόνο δύο, αντί για τρία, στάδια φωσφορυλίωσης για να φτάσουν στο στάδιο του ενεργού μεταβολίτη. Έτσι, οι άκυκλοι φωσφονικοί νουκλεοζίτες δεν εξαρτώνται από την ιική κινάση για να ασκήσουν την αντι-ϊική τους δράση και, "παρακάμπτοντας" το στάδιο της νουκλεοσιδικής κινάσης, οι άκυκλοι φωσφονικοί νουκλεοζίτες αναμένεται να δράσουν εναντίον ευρέως φάσματος ιών DNA (ιός ηπατίτιδας B [HBV]) και ρετροϊοί (ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας [HIV]), δηλαδή όλοι οι ιοί που χρησιμοποιούν για την αντιγραφή τους DNA πολυμεράση μέσω της οποίας οι δραστηριοί μεταβολίτες των ακυκλικών φωσφονικών νουκλεοζιτών μπορούν να εισέλθουν σε ανταγωνισμό με τα κανονικά υποστρώματα (dNTPs).

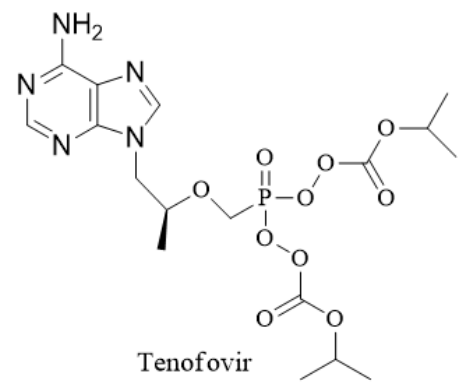
Υπάρχουν 3 μεγάλες ομάδες ANPs που διακρίνονται σε εκείνα που δρουν έναντι DNA ιών, σε εκείνα που δρουν έναντι DNA και RNA ιών και σε εκείνα που δρουν έναντι RNA ιών. Στην πρώτη κατηγορία ανήκει η (S)-HPMPA η οποία έχει αποδειχθεί η δράση της έναντι του απλού έρπητα 1 και 2, του ιού Epstein-Barr και του ανθρώπινου αδενοϊού. Το ανάλογο της (S)-HPMPA είναι η Cidofovir που έχει δράση έναντι του κυτταρομεγαλοϊού (CMV). Στη δεύτερη ομάδα ανήκει η Adefovir που είναι δραστηρική έναντι των ιών του έρπητα (HSV-1, HSV-2 και VV) και του ιού της ηπατίτιδας B (HBV) καθώς και RNA ιών όπως ο ιός της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας HIV τύπου 1 και 2 (HIV-1, HIV-2). Στην τρίτη ομάδα ανήκει η Tenofovir η οποία έχει έντονη δραστηριότητα έναντι του HIV.



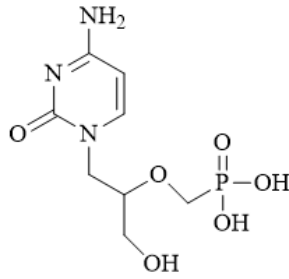
S-HPMPA



PMEAs



Tenofovir



Cidofovir

Σχήμα 12: Παραδείγματα άκυκλων νουκλεοζιτών που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα.

2. Σκοπός Μελέτης

Σημαντικές προσπάθειες καταβάλλονται από τους επιστήμονες προκειμένου να τροποποιήσουν με κάθε δυνατό τρόπο τη δομή των ενδογενών νουκλεοζιτών, αλλάζοντας τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους, προς παραγωγή νουκλεοζιτικών παραγώγων με αντικαρκινική και αντι-ιική δράση, ελαχιστοποιώντας παράλληλα τις ανεπιθύμητες παρενέργειες.

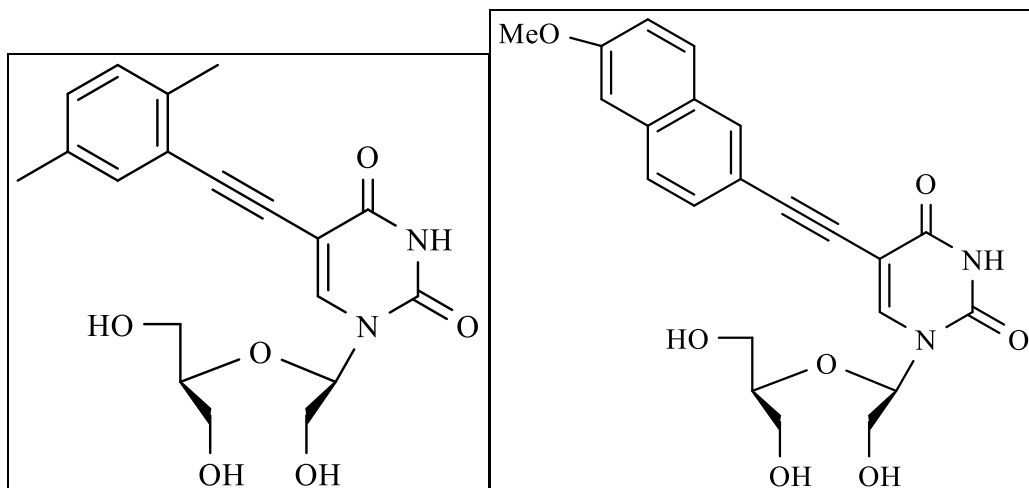
Τα κυτταροτοξικά νουκλεοζιτικά ανάλογα και οι βάσεις τους, ήταν ανάμεσα στους πρώτους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες που αναπτύχθηκαν στην προσπάθεια θεραπείας του καρκίνου. Τα παράγωγα πουρινικών και πυριμιδινικών νουκλεοσιδικών αναλόγων αποτελούν πλέον μεγάλη οικογένεια συνθετικών ενώσεων. Σε συνδυασμό με τις γνώσεις που έχουν αποκτηθεί για τη λειτουργία των βιολογικών μονοπατιών και των μοριακών μηχανισμών, είμαστε σε θέση να σχεδιάζουμε πιο αποδοτικές στρατηγικές για την στόχευση και καταστροφή καρκινικών κυττάρων.

Στο πεδίο των αντι-ιικών αναλόγων, έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος από την ανακάλυψη της ακυκλοβίρης, ωστόσο υπάρχει περιθώριο βελτίωσης. Υπάρχει πάντα η ανάγκη για πιο στοχευμένη δράση και ελάττωση των παρενεργειών. Παράλληλα, χρειαζόμαστε νέα νουκλεοζιτικά ανάλογα, για την καταπολέμηση νεοεμφανιζόμενων θανατηφόρων ιογενών λοιμώξεων ή λοιμώξεων που δεν έχουν ακόμα εξαλειφθεί.

Λαμβάνοντας υπόψη μελέτες που υποδεικνύουν ότι νουκλεοζιτικά ανάλογα, όπως οι C'5 τροποποιημένοι 3'-δέοξυ και 3'-δέοξυ-3'-C-μέθυλ της ουρακίλης νουκλεοζίτες καθώς και οι νουκλεοζίτες που φέρουν υποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο, εμφάνισαν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση έναντι μίας πληθώρας ιών, στόχος της παρούσης εργασίας αποτελεί η σύνθεση νέων ισχυρότερων αναστολέων-φαρμάκων, με προσθήκη αλκυνο-ομάδων στη βάση πυρανονουκλεοζιτών, ως εν δυνάμει αντι-ιικά και αντικαρκινικά φάρμακα.

Ειδικότερα, η τροποποίηση γίνεται στην βάση που συνδέεται με τον δακτύλιο και συγκεκριμένα στη 5 θέση της ουρακίλης, όπου εισάγεται το *διμεθυλο αλκύνυλο*- και το *αλκυνολο μεθογυναφθαλενιο*, όπως επίσης και στο σάκχαρο του νουκλεοζίτη καθώς σπάει ο δεσμός ανάμεσα στον τρίτο και τέταρτο άνθρακα. Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων των νέων νουκλεοζιτικών παραγώγων καταδεικνύει -όπως αναφέρεται και στα συμπεράσματα της παρούσης εργασίας- τη δυνατότητα αξιοποίησής τους ως θεραπευτικά μέσα έναντι ενός αριθμού ιών και καρκίνων.

Η δομή των μορίων που στόχευσαν οι συνθετικές μας πορείες φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα:



Σχήμα 13: Οι τελικές μορφές των μορίων που στόχευσαν οι συνθετικές μας πορείες:

(αριστερά): C5 διμεθυλο αλκύνυλο 1-(1-((1,3-διύδροξυπροπαν-2-υλ)οξυ)-2-υδροξυαίθυλ)-ουρακίλη

(δεξιά): C5 αλκύνυλο μεθοξυναφθαλενιο 1-(1-((1,3-διύδροξυπροπαν-2-υλ)οξυ)-2-υδροξυαίθυλ)-ουρακίλη

3. Μέθοδοι - Τεχνικές

i. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silicagel (MerckKieseilel60F24) πάχους 0,2mm.

Το υπό εξέταση δείγμα τοποθετείται ως κηλίδα στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2cm από τη βάση. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται αεροστεγώς σε ένα θάλαμο στον οποίο έχει ήδη εισχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Ακολούθως ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη και να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Ύστερα η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητά τους και φαίνονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε μορίου στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης R_f , που ορίζεται από τον λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από τον διαλύτη (α). Η τιμή R_f ενός συγκεκριμένου μορίου χρησιμεύει για την ταυτοποίηση μια άγνωστης ουσίας. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254nm ή 356nm) ή μετά από ψεκασμό με διάλυμα H_2SO_4 (θειικού οξέος) 30%.

ii. Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από παραπροϊόντα και διαλύτες. Ο καθαρισμός οργανικών ενώσεων πραγματοποιείται κατά κόρον μέσω χρωματογραφίας μιας τεχνικής κατά την οποία το επιθυμητό προϊόν διαλύεται σε έναν οργανικό διαλύτη ή σύστημα διαλυτών με συγκεκριμένη αναλογία κάθε φορά και στη συνέχεια αφήνεται να διαρρεύσει μέσω ενός γυάλινου κατακόρυφου σωλήνα ο οποίος είναι γεμάτος με προσροφητικό υλικό. Το προς διαχωρισμό μείγμα ονομάζεται κινητή φάση ενώ το προσροφητικό υλικό εντός του σωλήνα στατική φάση. Επειδή οι διάφορες ενώσεις προσροφώνται στην στατική φάση με διαφορετική έκταση, μετακινούνται διαμέσου αυτής με διαφορετικές ταχύτητες και τια το λόγο αυτό, εξέρχονται από τη στήλη- εκκλύονται από το άκρο της με διαφορετική ταχύτητα. Ο χρόνος έκλουσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα 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.

Η χρωματογραφία στήλης πραγματοποιείται για τον καθορισμό προϊόντων και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flashchromatography) σε silicagel (240-400, Merckgrade).

iii. Ξήρανση διαλυτών

Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων, απαιτείται η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο, τολουόλιο και μεθανόλης.

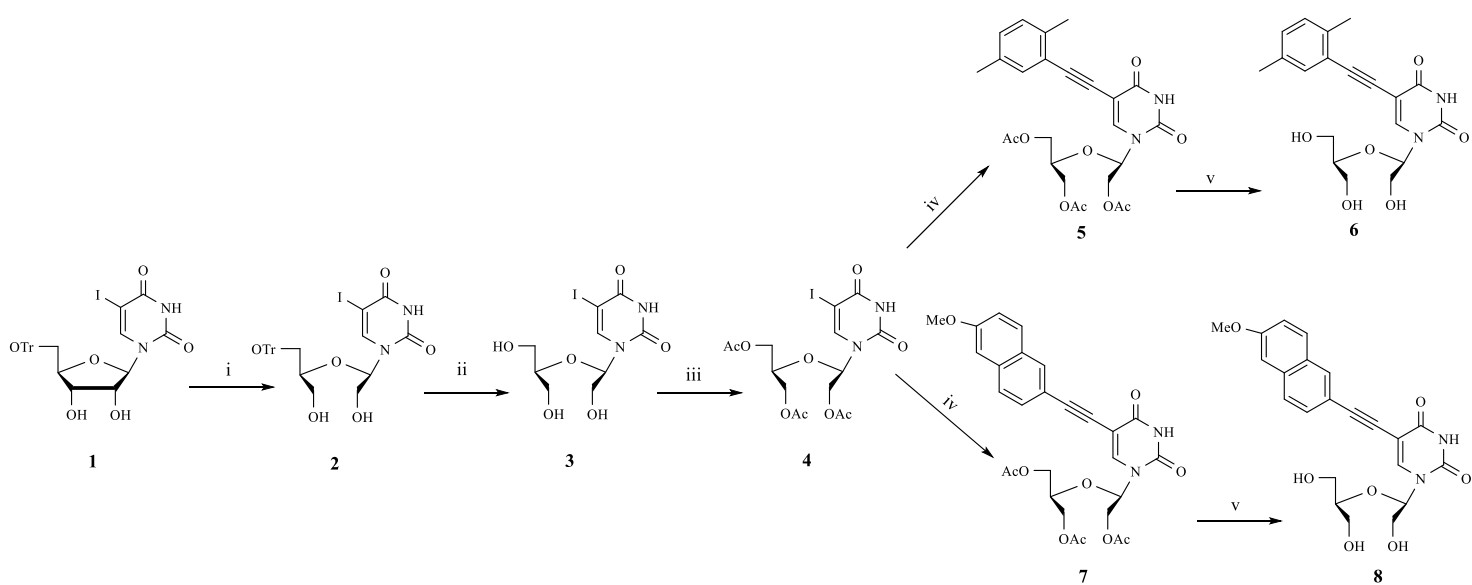
Η ξήρανση του ακετονιτριλίου και του τολουολίου γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecularsieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε. Η ξήρανση της μεθανόλης γίνεται σε φιάλη με μοριακό κόσκινα 3Å (molecularsieves) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου για μια ώρα.

iv. Ταυτοποίηση ενώσεων

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι η χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική μέθοδος που έχουν στη διάθεσή τους οι οργανικοί χημικοί. Αυτό συμβαίνει γιατί παρέχει τον χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα του σε ένα οργανικό μόριο.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που παρασκευάστηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (NuclearMagneticResonance). Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο BrukerAVAMCEIII 300, χρησιμοποιώντας chloroform-d (CDCl_3), methanol-d4 (CD_3OD). Το τριμέθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^1H .

Επισκόπηση Πειραματικής πορείας



Σχήμα 14: Μονοπάτι σύνθεσης των τελικών μορίων.

(i) α) NaIO_4 , MeOH , H_2O , 1h, β) NaBH_4 , 1h,

(ii) HCOOH , Et_2O ,

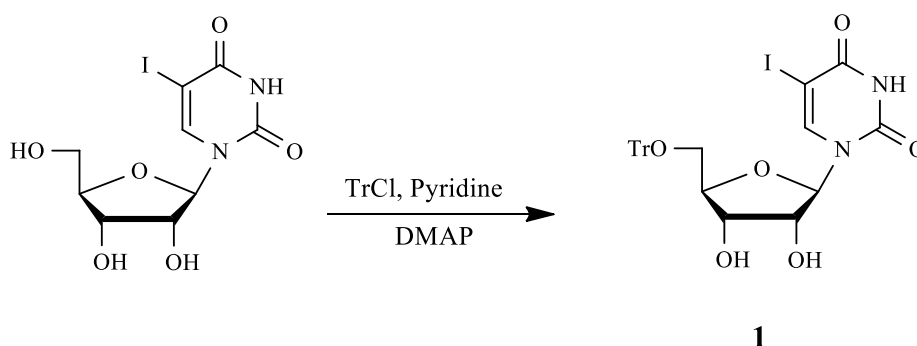
(iii) Ac_2O , πυριδίνη, 1h.

(iv) DMF , CuI , Et_3N , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, και το κατάλληλο αλκίνιο,

(v) MeOH/NH_3 .

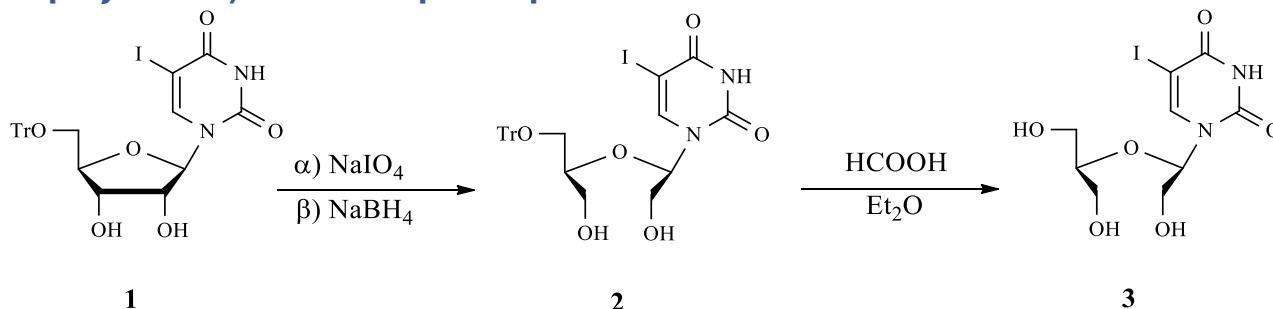
4. Πειραματικό Μέρος

1. Σύνθεση της 1 – (5' - O – τριτυλ – β- D – ριβοφουρανόζυλο) – 5 – ίωδοουρακίλης



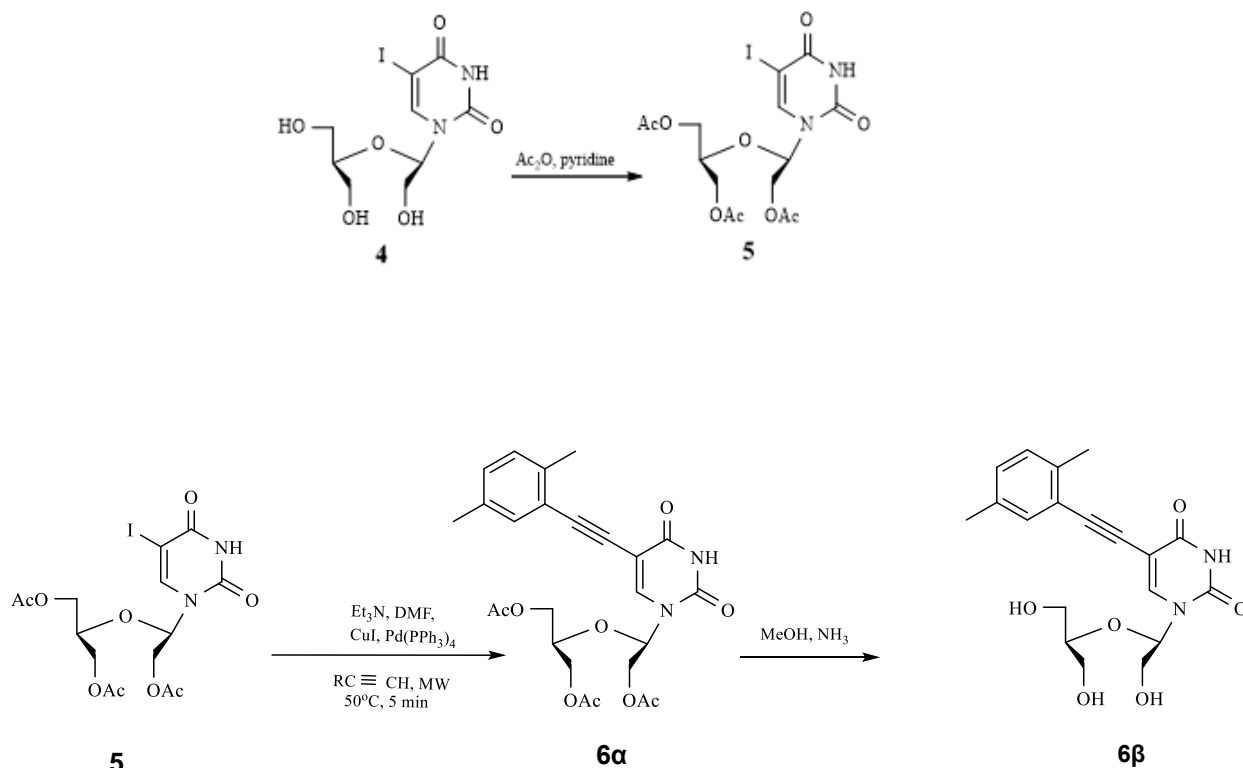
Ο ριβοφούρανονουκλεοζίτης της 5-ίωδοουρακίλης, συντέθηκε με συμπύκνωση της ακετυλιωμένης ριβόζης με την νουκλεοβάση της 5-ίωδοουρακίλης και εν συνεχεία απακετυλίωση του προστατευμένου νουκλεοζίτη με μεθανολική αμμωνία. Το επόμενο βήμα της σύνθεσης περιλαμβάνει την εκλεκτική τριτυλίωση του πρωτοταγούς υδροξυλίου του νουκλεοζίτη, η οποία λαμβάνει χώρα μέσω κατεργασίας με τριφαινυλομεθυλοχλωρίδιο (TrCl) σε πυριδίνη, παρουσία καταλυτικής ποσότητας 4,4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (DMAP), οπότε το μερικώς προστατευμένο νουκλεοζιτικό ανάλογο 1 λαμβάνεται σε πολύ καλή απόδοση (82%).

2. Σύνθεση της 1-(1-((1,3-διύδροξυπροπαν-2-υλ)οξυ)-2-υδροξυαίθυλ)-5-ιώδοουρακίλη



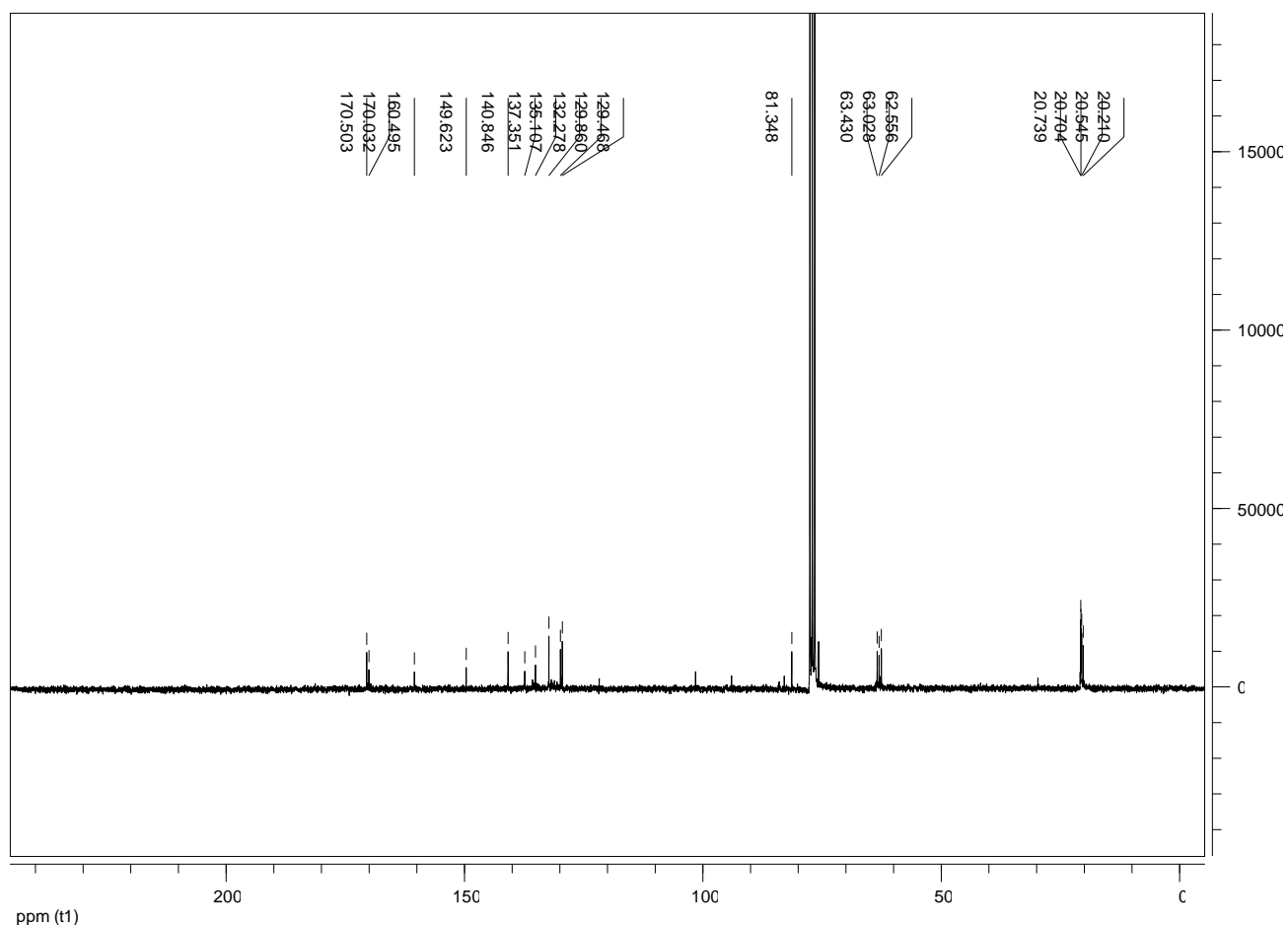
Η επόμενη αντίδραση είναι μία οξειδωτική διάσπαση της *cis* – διόλης στην 2',3'-θέση του νουκλεοζίτη 1 χρησιμοποιώντας υπερϊοδικό νάτριο (NaIO_4) σε μίγμα νερού και αιθανόλης και στη συνέχεια αναγωγή με βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH_4) της διαλδεΰδης που προέκυψε, οδήγησε στον άκυκλο νουκλεοζίτη 2. Η αποτριτυλίωση του νουκλεοζίτη 2 πραγματοποιήθηκε μέσω κατεργασίας του με μίγμα μυρμιγκικού οξέος (HCOOH) και διαιθυλαιθέρα (Et_2O), με αποτέλεσμα τη λήψη του άκυκλου νουκλεοζίτη της 5-ιώδοουρακίλης (3).

3. Σύνθεση του C5 διμεθυλο αλκύνυλο 1-(1-((1,3-διϋδροξυπροπαν-2-υλ)οξυ)-2-υδροξυαιθύλ)-ουρακίλη

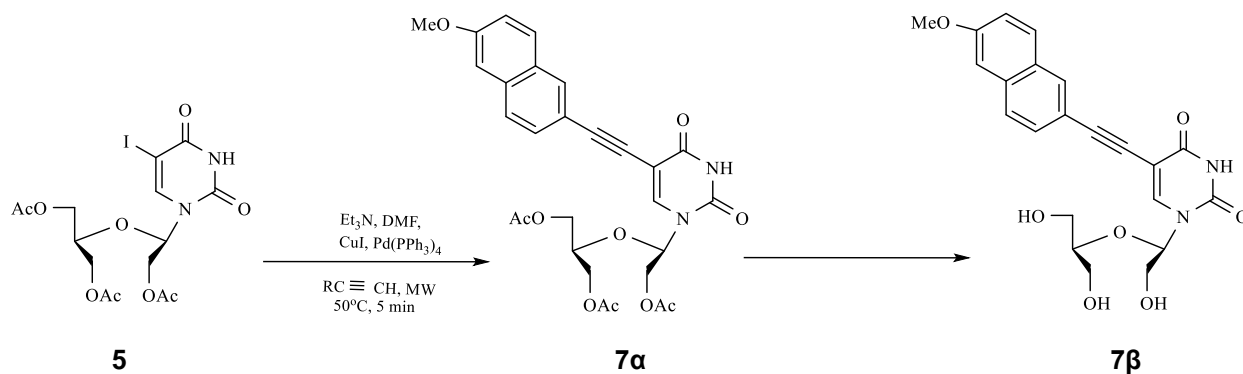


Το επόμενο στάδιο, της σύνθεσης, περιλαμβάνει την ακετυλίωση των υδροξυλομάδων του νουκλεοζίτη 4 με την χρήση οξεϊκού ανυδρίτη παρουσία πυριδίνης καταλλήγοντας στον ακετυλιωμένο παράγωγο 5. Η εισαγωγή των αλκινίων στον C5 της ίωδοουρακίλης πραγματοποιήθηκε με την αντίδραση Sonogashira, όπου ο άκυκλος νουκλεοζίτης της ίωδοουρακίλης 5 διαλύθηκε σε DMF και προστέθηκε Et_3N , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ως καταλύτης CuI ως συγκαταλύτης, το κατάλληλο αλκίνιο και το μίγμα θερμάνθηκε στους 50°C για δεκαπέντε λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης έγινε έκπλυση του μίγματος με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl) και οξεϊκού αιθυλεστέρα, ενώ το επιθυμητό προϊόν ελήφθηκε καθαρό μετά από στήλη χρωματογραφίας. Τέλος τα μόρια αποακετυλιώθηκαν χρησιμοποιώντας κορεσμένο διάλυμα μεθανόλης με αμμωνία (MeOH/NH_3) με αποτέλεσμα να συντεθούν τα παράγωγα **6α**, **6β**.

$[\alpha]_{\text{D}22} = +12$ (c 0.22, χλωροφόρμιο)



4. Σύνθεση του C5 αλκυνολο μεθοξυναφθαλενιο 1-(1-((1,3-διυδροξυπροπαν-2-υλ)οξυ)-2-υδροξυαίθυλ)-ουρακίλη



Το επόμενο στάδιο, της σύνθεσης, περιλαμβάνει την ακετυλίωση των υδροξυλομάδων του νουκλεοζίτη 4 με την χρήση οξικού ανυδρίτη παρουσία πυριδίνης

καταλλήγοντας στον ακετυλιωμένο παράγωγο 5. Η εισαγωγή των αλκινίων στον C5 της ιωδοουρακίλης πραγματοποιήθηκε με την αντίδραση Sonogashira, όπου ο άκυκλος νουκλεοζίτης της ιωδοουρακίλης 5 διαλύθηκε σε DMF και προστέθηκε Et₃N, Pd(PPh₃)₄ ως καταλύτης CuI ως συγκαταλύτης, το κατάλληλο αλκίνιο και το μίγμα θερμάνθηκε στους 50°C για δεκαπέντε λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης έγινε έκπλυση του μίγματος με κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl) και οξεικού αιθυλεστέρα, ενώ το επιθυμητό προϊόν λήφθηκε καθαρό μετά από στήλη χρωματογραφίας. Τέλος τα μόρια αποακετυλιώθηκαν, χρησιμοποιώντας κορεσμένο διάλυμα μεθανόλης με αμμωνία (MeOH/NH₃) με αποτέλεσμα να συντεθούν τα παράγωγα **7α,7β**.

[α]_{D22} = +15 (c 0.17, μεθανόλη)

λ_{max}286nm (ε 19654)

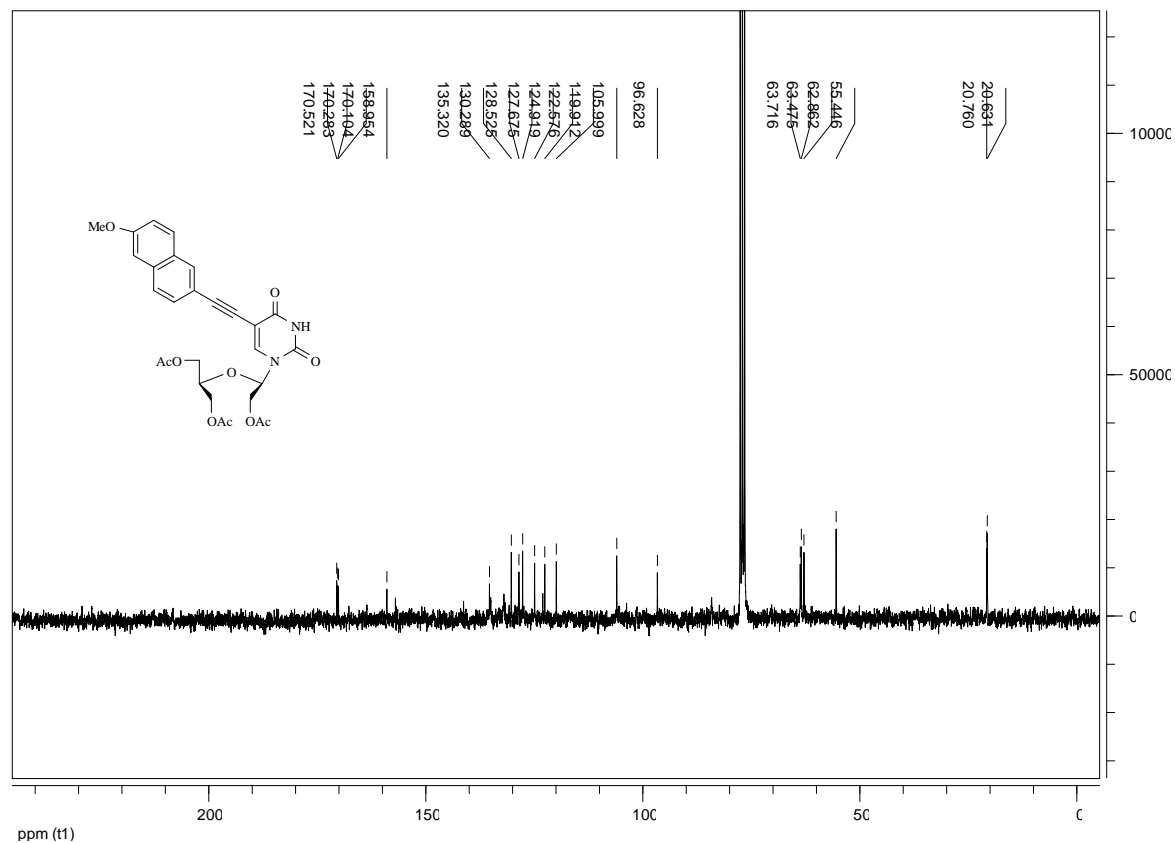
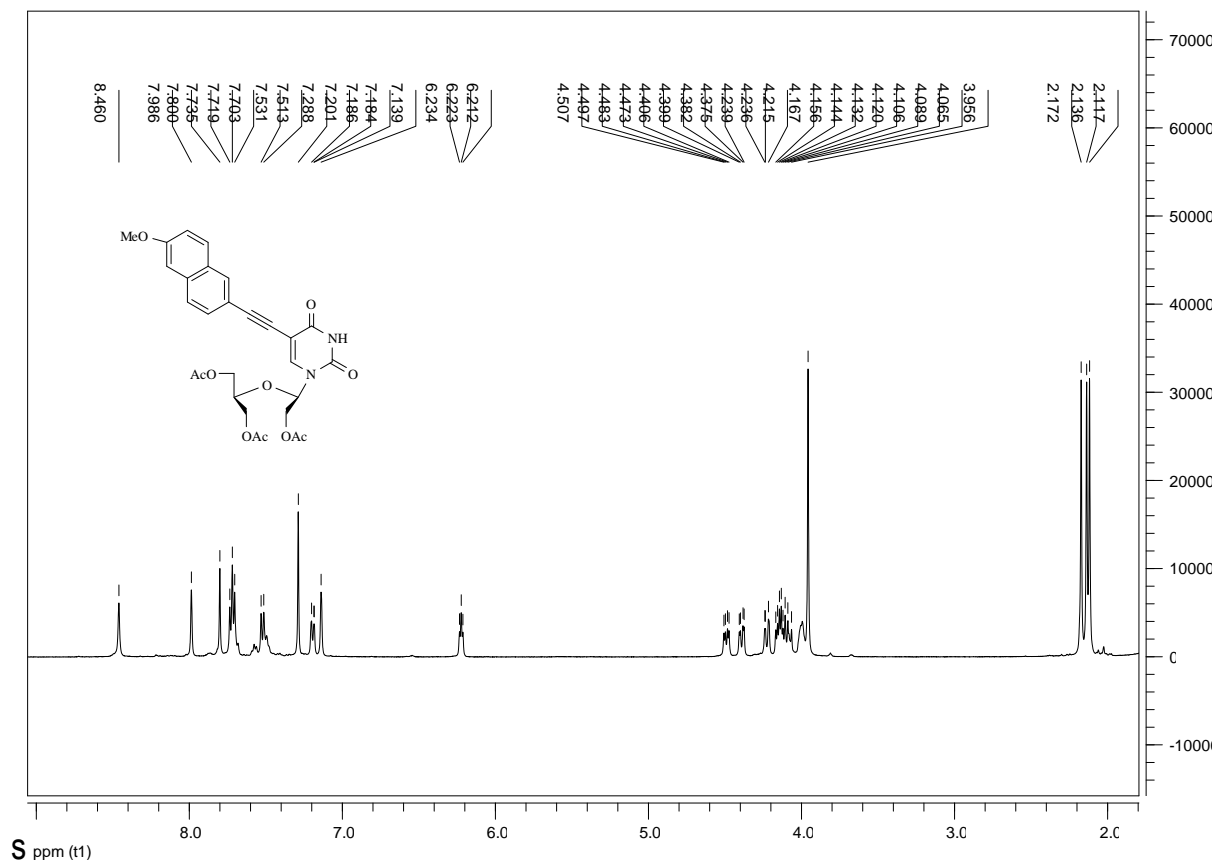
ESI-MS (m/z): 427.14 (M+H⁺)

Στοιχειακή Ανάλυση: (C₂₂H₂₂N₂O₇) C, H, N

Υπολ. (%) C : 61.97 H : 5.20 N : 6.57

Ευρ. (%) C : 62.27 H : 5.60 N : 6.97

➤ Ταυτοποίηση του μορίου με την τεχνική NMR

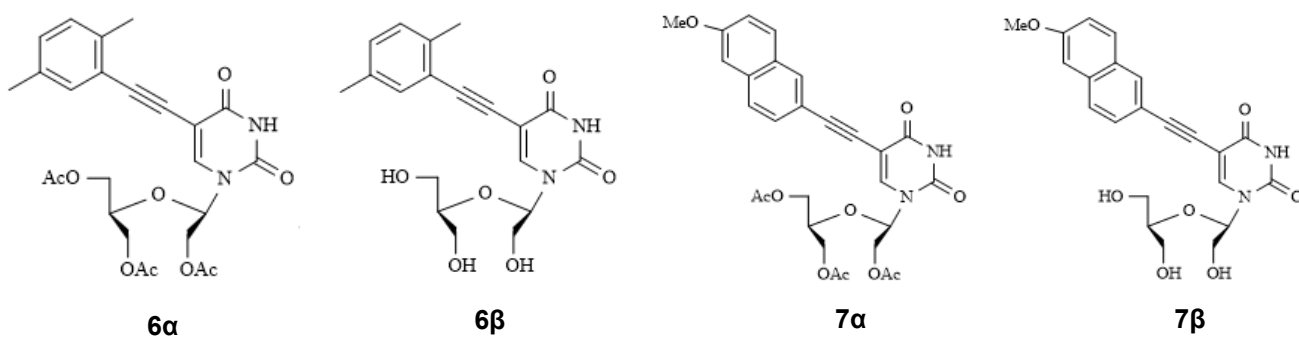


5. Αποτελέσματα - Συζήτηση

Οι ανακαλύψεις στο μηχανισμό λειτουργίας του γενετικού υλικού των οργανισμών, σε συνδυασμό με τη βελτίωση των τεχνικών της μοριακής βιολογίας, επέτρεψε στους ερευνητές να εξερευνήσουν νέες προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση χρόνιων ασθενειών, όπως οι κακοήθεις νεοπλασίες ή εκτεταμένες ιικές μολύνσεις. Η ιδέα της παρέμβασης στη φυσιολογική λειτουργία του DNA και του RNA, με συνέπεια την παύση της, και άρα τη διακοπή της λειτουργίας του κυττάρου, έδωσε γέννηση στο πεδίο της ανάπτυξης φαρμάκων, βασισμένων στη χημική δομή των φυσικών νουκλεοζιτών. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων, τα οποία να παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και εκλεκτικότητα όσον αφορά στην δράση τους. Η παρούσα εργασία είχε ως πρωταρχικό στόχο τη σύνθεση νέων Νουκλεοζιτικών Αναλόγων που θα παρουσιάζουν κάποιο αντι-ιικό ή αντικαρκινικό όφελος, που όμως θα βασίζεται σε μια απλή συνθετική πορεία. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών με πιθανή αντιική και αντικαρκινική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, εύκολη, έχοντας πραγματοποιήσει σύντομα βήματα.

▪ Αντιική και αντικαρκινική δράση των C5 τροποποιημένων άκυκλων νουκλεοζιτών της ουρακίλης

Οι νεοσυντιθέμενοι C5 τροποποιημένοι άκυκλοι νουκλεοζίτες της ουρακίλης 6α,6β,7,8, εξετάστηκαν για τη πιθανή αντιική και αντικαρκινική τους δράση σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιολογίας και Χημειοθεραπείας του Ινστιτούτου Ιατρικής Έρευνας Rega στο Βέλγιο.

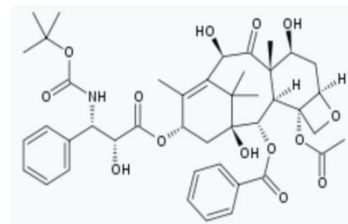


Οι ενώσεις 6α, 6β, 7α και 7β, δηλαδή τα τελικά μόρια, τόσο στην ακετυλιωμένη όσο και στην υδροξυλιωμένη μορφή του σακχάρου, αξιολογήθηκαν για την κυτταροτοξική τους δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων:

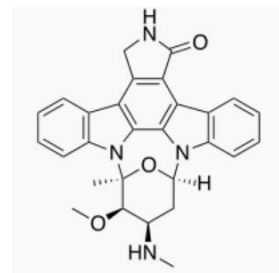
- παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (Capan-1),
- χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (Har-1),
- καρκινώματος του ορθού (HCT-116),
- καρκίνου του πνεύμονα (NCI-H460),
- οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (DND-41),
- οξεία μυελογενούς λευχαιμίας (HL-60),
- χρόνια μυελογενούς λευχαιμία (K-562) και
- μη-Hodgkin λέμφωμα (Z-138).

Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC50, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η απαιτούμενη συγκέντρωση ενός μορίου, για να εμφανίσει την ανασταλτική του δράση, τόσο το καλύτερο. Ως δείγματα ελέγχου (control), χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα μόρια με επιβεβαιωμένη δράση έναντι των παραπάνω τύπων καρκίνου:

- **Δοσεταξέλη (Docetaxel)**: Είναι χημειοθεραπευτικός παράγοντας που χρησιμοποιείται σε ευρύ φάσμα για την αντιμετώπιση πολλών ειδών καρκίνου. Ο μηχανισμός δράσης του περιλαμβάνει την παρεμπόδιση της κυτταρικής μίτωσης και τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της ογκοπρωτεΐνης Bcl-2, οδηγώντας τα καρκινικά κύτταρα σε απόπτωση.



- **Σταυροσπορίνη (Staurosporine)**: Είναι φυσικό προϊόν που απομονώθηκε αρχικά από το βακτήριο *Streptomyces staurosporeus*. Η κύρια βιολογική του δράση είναι η παρεμπόδιση της λειτουργίας των πρωτεϊνικών κινασών. Λόγω της δομής της, δρα ανταγωνιστικά με το ATP για την περιοχή πρόσδεσης του ATP πάνω στις κινάσες. Χωρίς να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης, φαίνεται να επάγει την κυτταρική απόπτωση ενεργοποιώντας το μονοπάτι της κασπάσης-3.



Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικής δράσης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

Προϊόν	IC ₅₀ (μM)	Πανκρεατικό αδενοκαρκίνωμα Capan-1	Χρόνια μυελογενής λευχαιμία Har-1	Καρκίνος ορθού HCT-116	Καρκίνος πνεύμονα NCI-H460	Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία DND- 41	Οξεία μυελογενής λευχαιμία HL-60	Χρόνια μυελογενής λευχαιμία K-562	non- Hodgkin λέμφωμα Z- 138
Μέσος Όρος									
 6β	μM	>100	>100	56,2	46,1	>100	>100	>100	>100
 7β	μM	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
 6α	μM	64,7	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
 7α	μM	>100	88,9	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Docetaxel	μM	21,9	3,0	19,3	4,9	1,7	5,4	2,1	1,1
Staurosporine	μM	49,5	46,1	66,5	60,0	28,1	52,9	39,1	9,9

Πίνακας 3: Οι ενώσεις που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία, αξιολογήθηκαν ως προς την πιθανή αντικαρκινική τους δράση. Από τις δοκιμών, οι ενώσεις **6β** και **6α** ξεχώρισαν για την δράση τους έναντι των καρκίνων του ορθού (HCT-116), του πνεύμονα (NCI-H460) και του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (Capan-I). Πιο συγκεκριμένα, στους καρκίνους του ορθού και του πνεύμονα, η ένωση **6β** εμφάνισε καλύτερη κυτταροτοξική δράση από τη Staurosporine, σε συγκεντρώσεις 56,2μM και 46,1μM έναντι των τιμών 66,5μM και 60μM της Staurosporine. Δεν ξεπέρασε όμως την αποτελεσματικότητα του Docetaxel. Στην περίπτωση του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος, η ένωση **6α** παρουσίασε σχετικά εφάμιλλη δράση με τη Staurosporine, με συγκέντρωση 64,7μM έναντι 49,5μM. Το **7α** παρουσίασε κάποια δραστηριότητα έναντι της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, αλλά η δράση του δεν ήταν επαρκής.

Συμπερασματικά θα λέγαμε πως η πρόοδος που σημειώθηκε, είναι ενθαρρυντική. Στόχος της εργασίας ήταν αφενός η σύνθεση μορίων με πιθανή αντικαρκινική δράση και αφετέρου η επίτευξη αυτού το στόχου, αξιοποιώντας μια σχετικά απλή συνθετική πορεία. Δεδομένων των αποτελεσμάτων που λάβαμε, η εργασία φαίνεται να αποτέλεσε ένα βήμα προς τη σωστή κατεύθυνση.

6. Βιβλιογραφία

Βιβλία:

- ✚ *Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer*, (2013), “Βιοχημεία”
- ✚ *Darrel D. Ebbing, Steven D. Gammon*, (2011), “Γενική Χημεία”
- ✚ *LG Wade, Jr.*, (2013), “Οργανική Χημεία”
- ✚ *Bertram G. Katzung*, (2009), “Βασική και Κλινική Φαρμακολογία”
- ✚ *Thomas M. Devlin*, (2007), “Βιοχημεία- Κλινικοί Συσχετισμοί II”
- ✚ *Στυλιανός Λιοδάκης*, (2001), “Αναλυτική Χημεία”

Δημοσιευμένα Άρθρα:

1. A.Altomare, G. Cascarano, C. Giacobozzo, A. Guagliardi, M. Burla, G. Polidori, M. Camalli, SIRPOW.92: a program for automatic solution of crystal structures by direct methods optimized for powder data, *J. Appl. Cryst.* 27 (1994) 435–443.
2. A.Markham, D. Faulds, Ganciclovir: an update of its therapeutic use in cytomegalovirus infections, *Drugs* 48 (1994) 455–484.
3. A.C. Moffat (Ed.), *Clarke’s Isolation and Identification of Drugs*, second ed., The Pharmaceutical Press, London, 1989.
4. A.K. Field, M.E. Davies, C. DeWitt, H.C. Perry, R. Liou, J. Germershausen,
5. B.Alhede, F.P. Clausen, J. Juhl-Christensen, K.K. McCluskey, H.F. Preikschat, A simple and efficient synthesis of 9-substituted guanines. Cyclodesulfurization of 1-substituted 5-[(thiocarbamoyl)amino] imidazole-4-carboxamide under aqueous basic conditions, *J. Org. Chem.* 56 (1991) 2139–2143.
6. Balzarini J., Herdewijn P., De Clercq E. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 6127–6133
7. Blakley R. L., Harwood F. C., Huff K. D. (1990) *Mol. Pharmacol.* 37, 328–332
8. C.S. Crumpacker, Ganciclovir: a review, *N. Engl. J. Med.* 335 (1996) 721–729.
9. Cherfils J., Moréra S., Lascu I., Veron M., Janin J. (1994) *Biochemistry* 33, 9062–9069
10. Chiadmi M., Moréra S., Lascu I., Dumas C., LeBras G., Veron M., Janin J. (1993) *Structure* 1, 283–293
11. Copeland W. C., Chen M. S., Wang T. S. (1992) *J. Biol. Chem* 267, 21459–21464
12. CrystalStructure, version 3.5.1, Crystal Structure Analysis Package, Rigaku and Rigaku/MSK, 2000–2003.
13. D. Faulds, R.C. Heel, Ganciclovir: a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections, *Drugs* 39 (1990) 597–638.
14. D.K. Kim, H.K. Kim, Y.-B. Choe, Design and synthesis of 6-fluoropurine acyclonucleosides: potential prodrugs of acyclovir and ganciclovir, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4 (1994) 1309–1312.

15. de Miranda, P, Blum, MR. Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous and oral administration. *J Antimicrob Chemother.* 1983;12:29–37
16. de Miranda, P, Krasny, HC, Page, DA, Elion, GB. The disposition of acyclovir in different species. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981;219:309–315
17. de Miranda, P, Krasny, HC, Page, DA, Elion, GD. Species differences in the disposition of acyclovir. *Am J Med.* 1982;73:31–35
18. Dumas C., Lascu I., Moréra S., Glaser P., Fourme R., Wallet V., Lacombe M.-L., Veron M., Janin J. (1992) *EMBO J.* 11, 3203–3208
19. Elion, GB, Furman, TA, Fyfe, JA, de Miranda, P, Beauchamp, L, Schaeffer, HJ. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74:5716–57120
20. Elion, GB. Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am J Med.* 1982;73:7–13
21. Elion, GB. The biochemistry and mechanism of action of acyclovir. *J Antimicrob Chemother.* 1983;12:9–17
22. Furman P. A., Fyfe J. A., St. Clair M. H., Weinhold K., Rideout J. L., Freeman G. A., Lehrman S. N., Bolognesi D. P., Broder S., Mitsuya H., Barry D. W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 8333–8337
23. G.H. Hakimelahi, A. Khalafi-Nezhad, Catalytic effect of tetrabutyl ammonium fluoride in the preparation of seco-ribo nucleosides, *Helv. Chim. Acta* 72 (1989) 1495–1500.
24. Gilles A. M., Presecan E., Vonica A., Lascu I. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 8784–8789
25. Hoard D. E., Ott G. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* 87, 1785–1788
26. 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
27. J. Boryski, B. Golankiewicz, A facile synthesis of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine (ganciclovir) from guanosine, *Synthesis* 4 (1999) 625–628.
28. J.C. Martin, C.A. Dvorak, D.F. Smee, T.R. Matthews, J.P.H. Verheyden, 9-[(1,3-Dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine: a new potent and selective antiherpes agent, *J. Med. Chem.* 26 (1983) 759–761.
29. J.D. Karkas, W.T. Ashton, D.B. Johnston, R.L. Tolman, 9-[(2-Hydroxy)-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl guanine: as selective inhibitor of herpes group virus replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80 (1983) 4139–4143.
30. J.K. McGavin, K.I. Gao, Ganciclovir: an update of its use in the prevention of cytomegalovirus infections and disease in transplant recipients, *Drugs* 61 (2001) 1153–1183.
31. K.K. Ogilvie, N. Nguyen-Ba, M.F. Gillen, B.K. Radatus, U.O. Cheriyan, H.R. Hanna, Synthesis of a purine acyclonucleoside series having pronounced antiviral activity. The glyceropurines, *Can. J. Chem.* 62 (1984) 241–252.
32. K.K. Ogilvie, U.O. Cheriyan, B.K. Radatus, Biologically active acyclonucleoside analogues, II. The synthesis of 9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl]guanine (BIOLF-62), *Can. J. Chem.* 60 (1982) 3005–3010.
33. L.J. Farrugia, ORTEP III, *J. Appl. Cryst.* 22 (1997) 389.
34. Lacombe M.-L., Wallet V., Troll H., Veron M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 10012–10018

35. M.J. O'Neil (Ed.), *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, 14th ed., Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, 2006, p. 380. Monograph 2282.
36. 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 Infect. Agents* 12, 2–57. doi: 10.2174/22113525113119990106
37. McGuirt, PV, Furman, PA, Acyclovir inhibition of viral DNA chain elongation in herpes simplex virus-infected cells. *Am J Med.* 1982;73:67–71
38. Moréra S., Chiadmi M., Lascu I., Janin J. (1995) *Biochemistry* 34, 11062–11070
39. Moréra S., Dumas C., Lascu I., Lacombe M.-L., Veron M., Janin J. (1994) *J. Mol. Biol.* 243, 873–890
40. Moréra S., Lacombe M.-L., Yingwu X., LeBras G., Janin J. (1995) *Structure* 3, 1307–1314
41. Moréra S., Lascu I., Dumas C., LeBras G., Briozzo P., Veron M., Janin J. (1994) *Biochemistry* 33, 459–467
42. Munoz-Dorado J., Inouye M., Inouye S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 2702–2706
43. Parks R. E. J., Agarwal R. P. (1973) *Enzymes (Basel)* 8, 307–334
44. Postel E. H., Berberich S. J., Flint S. J., Ferrone C. A. (1993) *Science* 261, 478–480
45. Pronovost, AD, Lucia, HL, Dann, PR, Hsiung, GD. Effect of acyclovir on genital herpes in guinea pigs. *J Infect Dis.* 1982;145:904–908
46. R. Sariri, G. Khalili, A novel approach to the synthesis of the purine anti-viral agent ganciclovir, *Indian J. Chem.* 42 (2003) 651–654.
47. R.M. Sarbajna, A. Preetam, A.S. Devi, M.V. Suryanarayana, M. Sethi, D. Dutta, Studies on crystal modifications of ganciclovir, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 537 (2011) 141–154.
48. Rosengard A. M., Krutzsch H. C., Shearn A., Biggs J. R., Barker E., Margulies I. M. K., King C. R., Liotta L. A., Steeg P. S. (1989) *Nature* 342, 177–180
49. S. Noble, D. Faulds, Ganciclovir. An update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients, *Drugs* 56 (1998) 115–146.
50. S.C. Sweetman (Ed.), *Martindale: The Complete Drug Reference*, 37th ed., Pharmaceutical Press, London, 2009. Electronic version.
51. Schaeffer, HJ, Beauchamp, L, de Miranda, P, Elion, GB, Bauer, DJ, Collins, P. 9-(2-Hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature.* 1978;272:583–585
52. Schaeffer, HJ. Acyclovir chemistry and spectrum of activity. *Am J Med.* 1982;73:4–6
53. Stahl J. A., Leone A., Rosengard A. M., Porter L., King C. R., Steeg P. S. (1991) *Cancer Res.* 51, 445–449
54. Stanberry, LR, Kern, ER, Richards, JT, Abbott, TM, Overall, JC Jr. Genital herpes in guinea pigs: pathogenesis of the primary infection and description of recurrent disease. *J Infect Dis.* 1982;146:397–404
55. T. Kawamura, N. Hirayama, X-ray Structure Analysis Online, Crystal structure of ganciclovir. *vol. 25*, 2009, pp. 51–52.

56. T.W. Chan, H.T. Nguyen, Anhydrous crystalline 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine, U.S. patent application number 4,642,346, Assignee Syntex (USA) Inc., 1987.
57. Tener G. M. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* 83, 159–168
58. Tepper A., Dammann H., Bominaar A. A., Veron M. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 32175–32180
59. Tornevik Y., Ullman B., Balzarini J., Wahren B., Eriksson S. (1995) *Biochem. Pharmacol.* 49, 829–37
60. Tucker, WE, Johnson, RE, Macklin, AW et al, Preclinical toxicology studies with acyclovir: ophthalmic and cutaneous tests. *Fundam Appl Toxicol.* 1983;3:569–572
61. Tucker, WE, Krasny, HC, de Miranda, P et al, Preclinical toxicology studies with acyclovir: carcinogenicity bioassays and chronic toxicity tests. *Fundam Appl Toxicol.* 1983;3:579–586
62. Tucker, WE, Macklin, AW, Szot, RJ et al, Preclinical toxicology studies with acyclovir: acute and subchronic tests. *Fundam Appl Toxicol.* 1983;3:573–578
63. U. Thewalt, C.E. Bugg, R.E. Marsh, The crystal structure of guanosine dihydrate and inosine dehydrate, *Acta Crystallogr. B* 26 (1970) 1089–1101.
64. V.V.N.K.V.P. Raju, V. Ravindra, S.S. Kamath, V.T. Mathad, P.K. Dubey, P.P. Reddy, A facile synthesis of potent antiherpes drug substance, ganciclovir, 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine, using a new masked glycerol derivative, *Arkivoc* 12 (2009) 296–301.
65. W.C. Ashton, J.D. Karleas, A.K. Field, R.L. Tolman, Activation of thymidine kinase and potent activity of 20-nor-20-deoxyguanosine (20-NDG), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108 (1982) 1716–1721.
66. Wallet V., Mutzel R., Troll H., Barzu O., Wurster B., Veron M., Lacombe M.-L. (1990) *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1199–1202
67. Webb P. A., Perisic O., Mendola C. E., Backer J. M., Williams R. L. (1995) *J. Mol. Biol.* 251, 574–587

68. Williams R. L., Oren D. A., Munoz-Dorado J., Inouye S., Inouye M., Arnold E. (1993) *J. Mol. Biol.* 234, 1230–1247
69. Galmarini, C. M., Mackey, J. R., & Dumontet, C. (2002). Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *The Lancet Oncology*,
70. Mar´ia J.Lapponi, Cintia W.Rivero, Mar´ia A.Zinni, Claudia N.Britos, Jorge A.Trelles, New developments in nucleoside analogues biosynthesis: A review, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*