

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ
ΤΩΝ 3'-ΦΘΟΡΟ-6'-ΘΕΙΟ-ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΘΥΜΙΝΗΣ,
ΟΥΡΑΚΙΛΗΣ ΚΑΙ 5-ΦΘΟΡΟΟΥΡΑΚΙΛΗΣ**

**ΣΥΜΕΩΝΙΔΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2007**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ 3'-ΦΘΟΡΟ-6'-
ΘΕΙΟ-ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΘΥΜΙΝΗΣ, ΟΥΡΑΚΙΑΗΣ ΚΑΙ
5-ΦΘΟΡΟΟΥΡΑΚΙΑΗΣ**

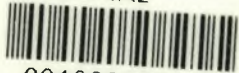
ΣΥΜΕΩΝΙΔΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2007



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 6597/1
Ημερ. Εισ.: 01-06-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΣΥΜ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087228

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ 3'-ΦΘΟΡΟ-6'-
ΘΕΙΟ-ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΘΥΜΙΝΗΣ, ΟΥΡΑΚΙΑΗΣ ΚΑΙ
5-ΦΘΟΡΟΟΥΡΑΚΙΑΗΣ**

ΣΥΜΕΩΝΙΔΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2007

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
Κομιώτης Δημήτριος – Επίκουρος Καθηγητής Οργανικής Χημείας
του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Μαρκουλάτος Παναγιώτης – Αναπληρωτής Καθηγητής
Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κοντού Μαρία – Λέκτορας του Τμήματος Βιοχημείας –
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Κομιώτη Δημητρίου.

Αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στον κ. Κομιώτη, για την εμπιστοσύνη που διέκρινε στο πρόσωπό μου αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα. Στη σωστή διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών, καθώς στη διεύρυνση της σκέψης μου και στην επιλογή της σωστής κατεύθυνσης, συνετέλεσαν η επιστημονική του κατάρτιση, η εύστοχη κριτική του, οι πολύτιμες συμβουλές του, η υπομονή του, η ενθάρρυνσή του και η πετυχημένη καθοδήγησή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την ένερμη υποδοχή τους, τη συμπαράστασή τους και τη βοήθεια τους, ώστε να καταφέρω να προσαρμοστώ στο χώρο του εργαστηρίου. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα Τσουκαλά Ευαγγελία, όχι μόνο για την άσπογη συνεργασία, αλλά για τη φιλική σχέση που αποκόμισα. Οι συμβουλές και η εμπιστοσύνη της να μου αναθέσει τμήμα του διδακτορικού της αποδείχθηκαν ωφέλιμες και με εφοδίασαν με τρόπο σκέψης για την εκπόνηση της εργασίας μου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι υδατάνθρακες αποτελούν μια από τις τέσσερις κύριες κατηγορίες βιομορίων που απαντούν σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Οι υδατάνθρακες είναι αλδεϋδικές ή κετονικές ενώσεις με πολλαπλές υδροξυλομάδες. Αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό της οργανικής ύλης επάνω στη γη, λόγω των πολλαπλών ρόλων τους σε κάθε μορφή ζωής. Κατ' αρχάς χρησιμεύουν ως αποθήκες ενέργειας, ως καύσιμα, και ως μεταβολικά ενδιάμεσα. Τροποποιημένους υδατάνθρακες συναντούμε ως μέρος του δομικού πλαισίου των μορίων DNA και RNA που εκφράζουν γενετικές πληροφορίες, ως δομικά στοιχεία στις μεμβράνες των κυττάρων, ενώ κάποιοι χρησιμοποιούνται ως φάρμακα.

Τα τροποποιημένα νουκλεοσίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιϊκή και αντικαρκινική χημειοθεραπεία. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιϊκή και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοσίδια συνδεδεμένα με ολιγοσακχαρίτες.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον δόθηκε στη μελέτη φθορο-θειονουκλεοσιδίων προκειμένου να βρεθούν νέα αντικαρκινικά, αντιϊκά, ή αντι-HIV φάρμακα με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα έναντι των έως τώρα χρησιμοποιούμενων ενώσεων. Η προσθήκη φθορίου καθώς και θείου στο μόριο του σακχάρου αποδείχτηκε ότι είναι μια καλή μέθοδος ενίσχυσης της βιολογικής δράσης.

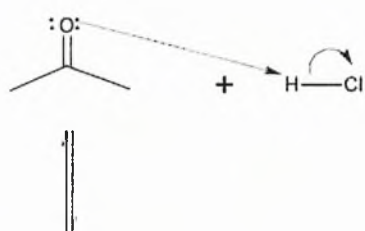
7ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	6
1.1 Υδατάνθρακες	6
1.2 Νουκλεοσίδια	8
1.3 Τρόπος δράσης νουκλεοσιδίων	9
1.4 Νουκλεοσιδικά ανάλογα	12
1.4.1 Zidovudine azidothynidine	12
1.4.2 DDI ή didanosine	13
1.4.3 DDC ή zalcitabine	14
1.4.4 Τριφθοριοθυμιδίνη	14
1.5 Τροποποιημένα νουκλεοσιδικά ανάλογα	15
1.5A Τροποποιημένα νουκλεοσιδικά ανάλογα με πενταμελή δακτύλιο	15
1.5B Τροποποιημένα νουκλεοσιδικά ανάλογα με εξαμελή δακτύλιο	19
2. Ειδικό μέρος	20
2.1 Στόχος- σκοπός μελέτης	20
2.2 Μεθοδολογία σύνθεσης	23
3. Σύνθεση φθοροθειονουκλεοσιδίων	26
3.1 Γενικές μέθοδοι	26
3.1.1 Χρωματογραφία χάρτου	26
3.1.2 Χρωματογραφία στήλης	26
3.1.3 Ξήρανση διαλυτών	26
3.1.4 Ταυτοποίηση ενώσεων	26
4. Πειραματική διαδικασία	27
5. Αποτελέσματα- συζήτηση	37
5.1 Χημικά χαρακτηριστικά ενώσεων	37
5.2 Αντιϊκή δραστηριότητα	38
5.3 Κυτταροτοξικότητα και ανάπτυξη ανασταλτικής δραστηριότητας	39
5.4 Συμπεράσματα	40
6. Βιβλιογραφία	42

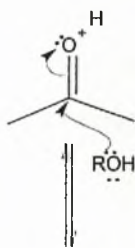
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατάνθρακες

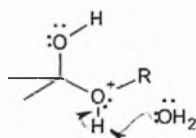
Οι υδατάνθρακες είναι αλδεϋδικές ή κετονικές ενώσεις με πολλαπλές υδροξυλομάδες. Τα σάκχαρα με πέντε άτομα άνθρακα και έξι άτομα άνθρακα καλούνται πεντόζες και εξόζες, αντίστοιχα. Οι ανοιχτές αλυσίδες των ενώσεων αυτών κυκλοποιούνται σε δακτυλίους, αποτελώντας την επικρατέστερη μορφή των σακχάρων αυτών σε διαλύματα. Γενικά, μια καρβονυλική ένωση αντιδρώντας με μια αλκοόλη σχηματίζει μια ημιακετάλη (εικόνα 1).



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



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



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

Εικόνα 1. Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης.⁽¹⁾

Στη φρουκτόζη για παράδειγμα, η κετονομάδα στον C-2 του τύπου της ανοικτής αλυσίδας είναι σε θέση να αντιδράσει με την υδροξυλομάδα του C-5 για να

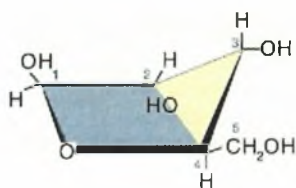
σχηματιστεί μια ενδομοριακή ημιακετάλη. Ο πενταμελής δακτύλιος του σακχάρου καλείται φουρανόζη, λόγω ομοιότητας του με το φουράνιο (εικόνα 2).



Εικόνα 2. Φουράνιο ⁽²⁾

Κατά την κυκλοποίηση της φρουκτόζης δημιουργείται ένα πρόσθετο ασύμμετρο κέντρο. Ο άνθρακας C-2 μετατρέπεται σε ένα ασύμμετρο κέντρο στο δακτύλιο. Μπορεί να προκύψουν δυο δομές: η α -D-φρουκτοφουρανόζη και η β -D-φρουκτοφουρανόζη. Ο χαρακτηρισμός α σημαίνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον άνθρακα C-2 βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου, ενώ β σημαίνει ότι βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του. Ο άνθρακας C-2 καλείται ανωμερής και κατά συνέπεια οι μορφές α και β , ανωμερείς.

Ο πενταμελής δακτύλιος της φουρανόζης δεν είναι επίπεδος. Οι δακτύλιοι φουρανόζης μπορούν να είναι πτυχωμένοι έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα άνθρακα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός επιπέδου αυτού (εικόνα 3).



Εικόνα 3. Μορφή φακέλου της β -D-ριβόζης ⁽²⁾

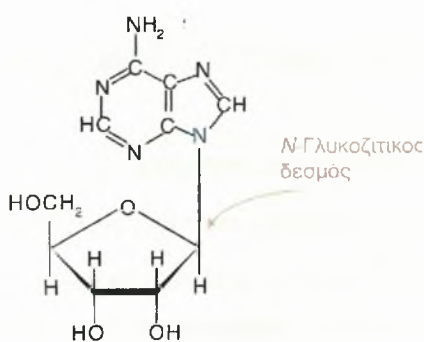
Αυτή η διαμόρφωση καλείται μορφή φακέλου γιατί μοιάζει με ανοιχτό φάκελο έχοντας το πίσω μέρος ανασηκωμένο. Οι δακτύλιοι της φουρανόζης είναι σε θέση να αλληλομετατρέπονται ταχύτατα σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις και είναι αρκετά ευέλικτοι, γεγονός που εξηγεί την επιλογή ως συστατικών του RNA και DNA. ^(1,2)

1.2 Νουκλεοσίδια

Στις μέρες μας, παρατηρείται στροφή των ερευνών, επικεντρώνοντας το ενδιαφέρον στο σχεδιασμό, τη σύνθεση και την αξιολόγηση μικρών μορίων ως πιθανούς αντικαρκινικούς, αντιβακτηριακούς και αντιϊκούς παράγοντες, αποδεικνύοντας ότι τις σημαντικότερες ομάδες αντιϊκών φαρμάκων αποτελούν τα νουκλεοσίδια και τα ανάλογα νουκλεοσιδίων.⁽³⁾

Νουκλεοσίδια συνδεδεμένα με ολιγοσακχαρίτες στελεχώνουν τη δομή πολλών φυσικών, εντοπισμένων αντιβιοτικών με αντιϊκή και αντικαρκινική δράση.

Τα σάκχαρα μπορούν να ενωθούν με τις αμίνες μέσω γλυκοσιδικών δεσμών. Ο ανωμερής άνθρακας του σακχάρου είναι σε θέση να ενωθεί με το άζωτο της αμίνης με ένα N-γλυκοσιδικό δεσμό. Στο νουκλεοσίδιο, μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης ενώνεται στη θέση 1' μιας πεντόζης με τη βοήθεια β-N-γλυκοσιδικού δεσμού.⁽⁴⁾ Αυτό το επικρατές μοτίβο γλυκοσιδικής σύνδεσης ακολουθούν πολλά βασικά μακρομόρια όπως τα νουκλεοτίδια, RNA και DNA. Οι N-γλυκοσιδικοί δεσμοί σε όλα τα κυτταρικής προέλευσης μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β⁽²⁾ (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Ο N-γλυκοσιδικός δεσμός στην Αδενοσίνη⁽²⁾

1.3 Τρόπος δράσης νουκλεοσιδίων

Η κύρια μέθοδος σύνθεσης νουκλεοσιδίων γίνεται ενδοκυτταρικά. Η δυνατότητα όμως μεταφοράς τους εντός των κυττάρων με παθητική διάχυση, παρέχει στα ανάλογα νουκλεοσιδίων με αντιϊκή ή/και αντικαρκινική δράση την ικανότητα χρήσης τους για θεραπεία πολλών ασθενειών. ⁽⁵⁾

Ο τρόπος δράσης των φαρμάκων έγκειται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό 'στόχο', ο οποίος μπορεί να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη, εννοώντας έναν υποδοχέα, ένα διάυλο ιόντων, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφορέα, είτε τα νουκλεϊκά οξέα. ⁽⁶⁾

Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα είναι μικρά μόρια αποτελώντας σύνθετες ενώσεις, χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοσιδίων που στοχεύουν αποτελεσματικά τις ιικές πολυμεράσες. Η ειδική διαμόρφωση των ιικών πολυμερασών βοηθάει στην επιλογής τους, πολλές φορές, ως στόχο ενός αντιϊκού παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντιϊκών φαρμάκων. ⁽⁷⁻⁹⁾

Τα νουκλεοσιδία ενδοκυτταρικά παράγουν τα νουκλεοτιδία, τα οποία χρησιμοποιούνται από τις πολυμεράσες ως βασικές δομικές μονάδες γενετικού υλικού DNA και RNA. Τα αντιϊκά φάρμακα νουκλεοσιδίων, μιμούμενα τα φυσικά νουκλεοσιδία, καταλαμβάνουν τη θέση τους, κατά την αντιγραφή, στο ιικό γονιδίωμα με τη βοήθεια των αντίστοιχων πολυμερασών. Μετά από αυτό το συμβάν επέρχεται καταστολή της αντιγραφής του ιού λόγω εξασθένησης της σύνθεσης ή της λειτουργίας του ιικού γονιδιώματος. ⁽⁸⁾

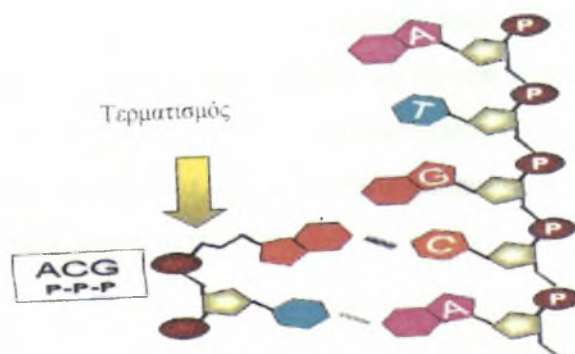
Τα ανάλογα νουκλεοσιδίων στην πραγματικότητα αποτελούν προφάρμακα, που σημαίνει ότι ενδοκυτταρικά πρέπει να τροποποιηθούν ώστε να μπορέσουν να δράσουν. Η επεξεργασία αυτή έγκειται στη φωσφορυλίωση στην 5'- θέση του υδατάνθρακα από τις κυτταρικές κινάσες, αποτελώντας εισαγωγικά το 'κλειδί' για την επιλεκτικότητα τους. ⁽¹⁰⁾

Η φωσφορυλίωση κάνει τα ανάλογα νουκλεοσιδίων ικανά να ανταγωνιστούν τα φυσικά νουκλεοσιδία για τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων. Επειδή η αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων είναι κοινή για όλες τις μορφές των ιών, τα ανάλογα νουκλεοσιδίων ενδεχομένως έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντιϊκή θεραπεία.

Επειδή οι φωσφορυλιωμένες ενώσεις ιοντίζονται λόγω του διαφορετικού pH στα διάφορα διαμερίσματα, δεν διέρχονται εύκολα μέσω των μεμβρανών των κυττάρων. Οι ενεργές μορφές των νουκλεοτιδίων αποτελούν τριφωσφορικά άλατα, με όλες τις αντικαταστάσεις φωσφορικών στην 5'- θέση. Ειδικές ιικές -κινάσες συχνά καταλύουν

την πρώτη 5'- φωσφορυλίωση των αναλόγων νουκλεοσιδίων, ενώ την επόμενη καταλύουν οι κυτταρικές κινάσες. Συνέπεια αυτού η συσσώρευση των ανάλογων φωσφορυλιωμένων νουκλεοτιδίων κυρίως στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό. Τα τμήματα των νουκλεϊκών οξέων διαμορφώνονται από τις κυτταρικές πολυμεράσες, οι οποίες συνδέουν το 5'-P- νουκλεοτίδιο στην 3'-υδροξυλομάδα ενός άλλου νουκλεοτιδίου. Κατά τη διαδικασία αυτή απελευθερώνεται μια πυροφωσφορική ομάδα (PPi), έτσι τα δυο σάκχαρα συνδέονται με φωσφοδιεστερική γέφυρα. ^(1,2,11)

Το σάκχαρο, είναι η μερίδα του νουκλεοσιδίου που χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τις κινάσες και τις πολυμεράσες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την επιμήκυνση των αλυσίδων. Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια 3'-υδροξυλομάδα, δεν μπορεί να ενωθεί με την 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, κι αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας (εικόνα 5).



Εικόνα 5. Τερματισμός αλυσίδας

Τα ανάλογα νουκλεοσιδίων αναμένονται να είναι αποτελεσματικά ενάντια στις περισσότερες εάν όχι σε όλες τις μορφές ιών.⁽¹⁾ Η ειδικότητά τους έγκειται στην ενεργοποίηση της δράσης του φαρμάκου από το ιικό ένζυμο ή/και στο ότι οι ιικές πολυμεράσες μπορεί να είναι πολύ πιο ευαίσθητες στη δράση του φαρμάκου από ότι στα αντίστοιχα ένζυμα του κυττάρου ξενιστή.⁽¹²⁾

Επιπλέον, το ιικό ένζυμο δε διαθέτει ειδικότητα σύνδεσης με το υπάρχον υπόστρωμα, εν αντιθέσει με το ένζυμο του κυττάρου ξενιστή. Οπότε, το ιικό ένζυμο μπορεί να δρα και σε φάρμακα ανάλογων νουκλεοσιδίων (διαφορετικό υπόστρωμα)

και να τα φωσφορυλιώνει, ενώ το ένζυμο του κυττάρου ξενιστή θα τα αφήνει ανεπηρέαστα εφόσον δεν είναι εφικτή η σύνδεση ενζύμου- υποστρώματος. ^(12.13)

Οι ιοί μπορούν να αντιμετωπιστούν εκλεκτικά με φάρμακα νουκλεοσιδίων και ανάλογων νουκλεοσιδίων. Η εκλεκτική αυτή αναστολή τους μπορεί να επιτευχθεί (α) με την αναστολή ειδικών σταδίων της πορείας μόλυνσης του κυττάρου, όπως προσκόλληση του ιού σε κάποιο κυτταρικό υποδοχέα, η διείσδυση του στο κύτταρο, αποβολή του περιβλήματος και η απελευθέρωση του εντός του κυτταροπλάσματος, ή/και (β) με την κατά προτίμηση αναστολή κάποιων σταδίων της πορείας πολλαπλασιασμού του ιού, τα οποία είναι κοινά με το κύτταρο ξενιστή και περιλαμβάνουν τη μεταγραφή και τη μετάφραση. ⁽⁶⁾

Τα νουκλεοσίδια μπορούν να ενεργήσουν με διαφορετικούς μηχανισμούς: μπορούν να αναστείλουν τη δράση βασικών ενζύμων στο μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων ή/ και μπορούν να ενσωματωθούν στα πρόσφατα συντεθειμένα νουκλεϊκά οξέα προκαλώντας τον τερματισμό των αλυσίδων ή την παραγωγή μη λειτουργικών βιομορίων.

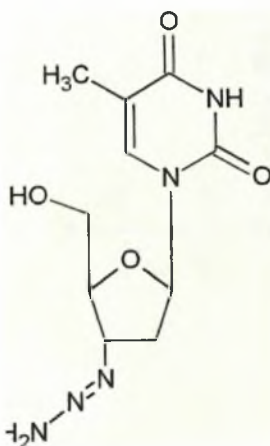
Το πιο κοινό αποτέλεσμα των παραπάνω ενεργειών είναι ο κυτταρικός θάνατος, ο οποίος μπορεί να είναι επιθυμητός όσον αφορά τη θεραπεία του καρκίνου και των αυτοάνοσων νοσημάτων. Επιπλέον, οι ενώσεις που μπορούν να στοχεύσουν επιλεκτικά στα βακτηριακά ή στα προερχόμενα από ιό ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιβακτηριακοί ή αντιϊικοί παράγοντες. ⁽⁶⁾

1.4 Νουκλεοσιδικά ανάλογα

Οι έρευνες που έγιναν μέχρι σήμερα στη δημιουργία φαρμάκων με αντιϊκή και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν τη χρήση αναλόγων νουκλεοσιδίων που είχαν για σάκχαρο μια πεντόζη. Ακολούθως παρατίθενται μερικά από τα αντιϊκά φάρμακα που συντέθηκαν και των οποίων έχει μελετηθεί η δράση.

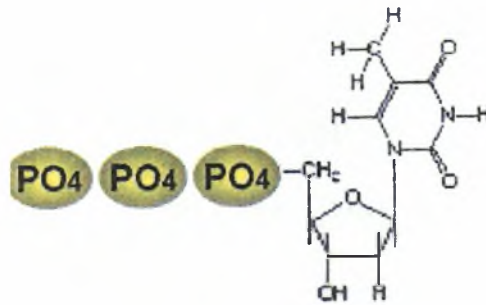
1.4.1 Zidovudine azidothymidine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine)

Το Zidovudine ή AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine (εικόνα 6) αποτελεί ένα φάρμακο, το οποίο χορηγείται είτε από το στόμα είτε σε ενέσιμη μορφή, για τη θεραπεία των μολύνσεων από τον ιό της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1). Πρωτοσυντέθηκε από τον Jerome Horowitz το 1964. Ανήκει στην κατηγορία των αντιστρεπτών ανασταλτικών παραγόντων της τρανσκριπτάσης, που περιλαμβάνει επίσης τα zalcitabine (Hivid), stavudine (Zerit), didanosine (Videx) και lamivudine (Epirivir).⁽¹⁴⁾



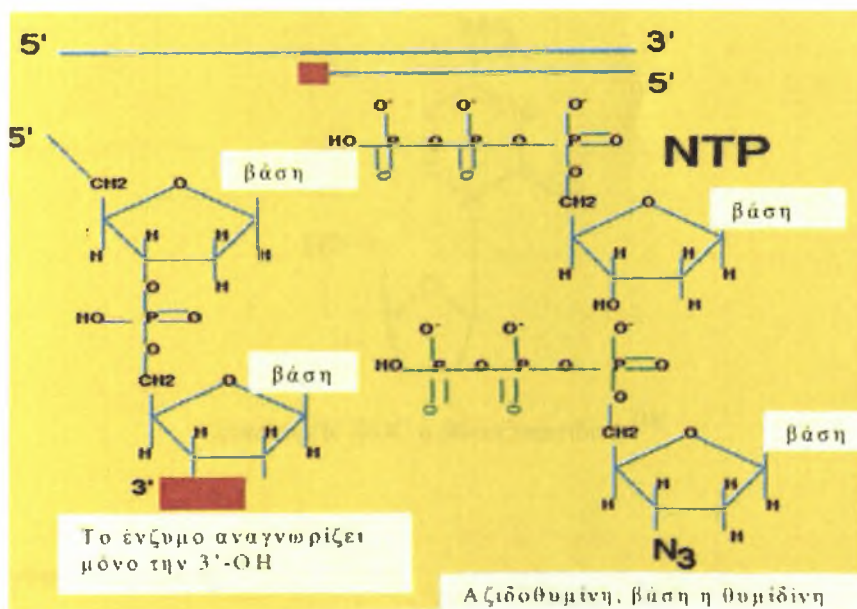
Εικόνα 6. AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine⁽¹⁴⁾

Η αντίστροφη τρανσκριπτάση είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιούν οι ρετροϊοί για να συνθέσουν το νέο DNA. Το Zidovudine εμποδίζει τη δράση της αντίστροφης τρανσκριπτάσης, την παραγωγή του DNA και κατά συνέπεια τον πολλαπλασιασμό των ιών. Τα κυτταρικά ένζυμα μετατρέπουν το Zidovudine σε ενεργή μορφή, 5'-τριφωσφορικού άλατος (εικόνα 7).



Εικόνα 7. Στη θυμιδίνη προστίθενται τρεις φωσφορικές ομάδες. Η πρώτη φωσφορυλίωση γίνεται από το ιϊκό ένζυμο και οι υπόλοιπες από τα κυτταρικά ένζυμα. ⁽¹⁵⁾

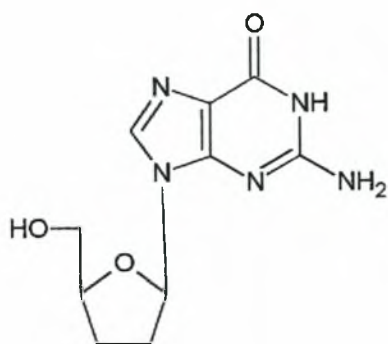
Ο τερματισμός της αλυσίδας του DNA είναι αποτέλεσμα της απουσίας της 3'-υδροξυλομάδας στο Zidovudine, το οποίο καθιστά αδύνατη τη σύνδεση άλλων νουκλεοτιδίων. Μελέτες έδειξαν ότι ο τερματισμός των αλυσίδων αποτελεί τον παράγοντα της ανασταλτικής επίδρασης ^(15,16) (εικόνα 8).



Εικόνα 8. Ανάλογα νουκλεοτιδίων στον τερματισμό αλυσίδων ⁽¹⁶⁾

1.4.2 DDI ή didanosine

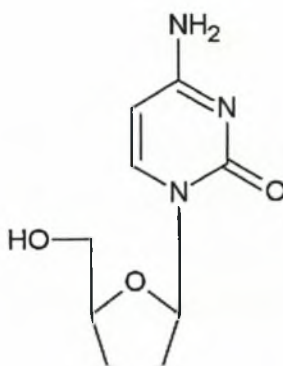
Το DDI (εικόνα 9) αποτελεί ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο με αντιϊκή δράση που αναστέλλει την αντιγραφή των ρετροϊών όπως του HIV, παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του ενζύμου αντίστροφης τρανσκριπτάσης. ⁽¹⁷⁾



Εικόνα 9. DDI ή didanosine ⁽¹⁷⁾

1.4.3 DDC ή zalcitabine

Το DDC ή διδεοξυκυτιδίνη (εικόνα 10) έχει παρόμοια δράση με το AZT και αποτελεί νουκλεοσιδικό ανάλογο που δρα ενάντια του ιού HIV. ⁽¹⁸⁾

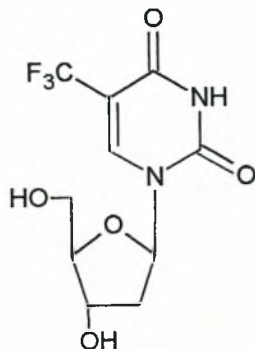


Εικόνα 10. DDC ή διδεοξυκυτιδίνη ⁽¹⁸⁾

1.4.4 Τριφθοριοθυμιδίνη

Η τριφθοριοθυμιδίνη (εικόνα 11) είναι ένα φθοριωμένο ανάλογο θυμιδίνης, το οποίο ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση από κυτταρικά ένζυμα σχηματίζοντας ένα τριφωσφορυλιωμένο παράγωγο, με απώτερο στόχο την αναστολή του πολλαπλασιασμού του ιού απλού έρπητα (HSV: Herpes Simplex Virus). Η ενεργοποιημένη μορφή της τριφθοριοθυμιδίνης, μπλοκάρει τη λειτουργία της θυμιδικής συνθετάσης και της υϊκής (και κυτταρικής) DNA πολυμεράσης, ενσωματώνεται στο DNA του ιού και του κυττάρου- ξενιστή, προκαλώντας διαταραχή

στη δομή του DNA. Προκλινικές μελέτες προβλέπουν πως είναι μεταλλαξιογόνος και τερατογόνος.⁽¹⁸⁾



Εικόνα 11. Τριφθοριοθυμιδίνη⁽¹⁸⁾

1.5 Τροποποιημένα νουκλεοσιδικά ανάλογα

Στην αναζήτηση νέων και αποτελεσματικών φαρμάκων στην κατηγορία των νουκλεοσιδίων, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αποτελέσει η σύνθεση και η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των φθορο- και θειο- νουκλεοσιδίων, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιοχημεία, την ιατρική χημεία και τη φαρμακολογία.

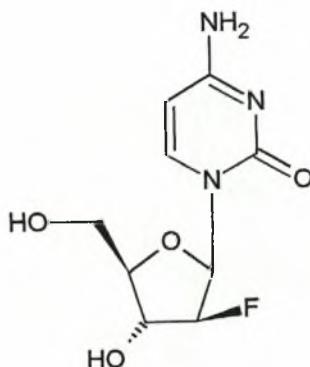
1.5.A Τροποποιημένα νουκλεοσιδικά ανάλογα με πενταμελή δακτύλιο

A1. Φθορονουκλεοσίδια

Τα φθοριωμένα νουκλεοσίδια υιοθετούνται ως πειραματικοί αντιικοί και αντιογκογόνοι παράγοντες.⁽¹⁹⁾ Η δυνατότητα αντικατάστασης του υδρογόνου με το φθόριο αλλάζει ελάχιστα τη λειτουργία του νουκλεοσιδίου, παράλληλα προσδίδει σταθερότητα στο μόριο, αυξάνει την ηλεκτραρνητικότητα του, το λιπόφιλο χαρακτήρα του και κατά συνέπεια την αποτελεσματικότητά του ως φάρμακο.

Πρόσφατα, φθοριωμένα νουκλεοσίδια φάνηκε να είναι αποτελεσματικά όχι μόνο σε περιπτώσεις λευχαιμίας αλλά και καρκινωμάτων, όπως το καρκίνωμα του κόλον καθώς και του ήπατος. Έρευνες έδειξαν ότι το 1-(2'-δεοξυ-2'-φθορο-β-D-

αραβινοφουρανόζυλο) νουκλεοσίδιο της κυτοσίνης (FAC) (εικόνα 12) έχει ανασταλτικά αποτελέσματα σε μια σειρά κυττάρων λευχαιμίας καθώς και σε μια σειρά κυττάρων καρκινώματος του κόλον. ⁽²⁰⁾



Εικόνα 12. 1-(2'-δεοξυ-2'-φθορο-β-D-αραβινοφουρανόζυλ) κυτοσίνη, FAC ⁽²⁰⁾

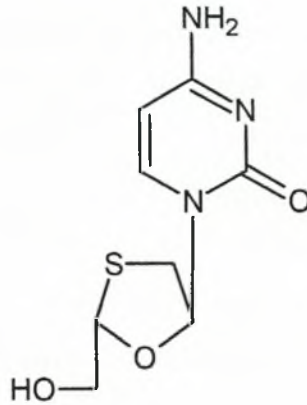
Επιπλέον, τα 2'-φθορο-5'-ιωδο-αραβινοσυλο νουκλεοσίδια της κυτοσίνης και της ουρακίλης έχουν χαρακτηριστεί για την αντιική τους δράση έναντι του κυτταρομεγαλοϊού που προσβάλλει τον άνθρωπο (HCMV: Human cytomegalovirus) και του ιού απλού έρπητα (HSV: Herpes Simplex Virus). ⁽²¹⁾

A2. Θειονουκλεοσίδια

Τα θειο-σάκχαρα, 5'-θειο-πυρανόζες και οι 4'-θειο-φουρανόζες, έχουν ενδιαφέρουσες χημικές και βιολογικές ιδιότητες. Το πρώτο παράδειγμα ενός φυσικού θειοσακχάρου ταυτοποιήθηκε το 1984 ως μέρος του αντιβιοτικού *albomycin*. Το 1987, η 5'-θειο-μαννόζη, απομονώθηκε από τα θαλάσσια σφουγγάρια *Clathria pyramida* και το 1-δεόξυ παράγωγό της είναι ένας ανταγωνιστικός ανασταλτικός παράγοντας της ζύμης α-D-γλυκοσιδάσης. Πρόσφατα το *Salacinol* και *Kotalanol*, τα οποία απομονώθηκαν από το βότανο *Salacia reticulata*, αποδείχθηκε ότι είναι ισχυροί ανασταλτικοί παράγοντες των εντερικών α-γλυκοσιδασών.

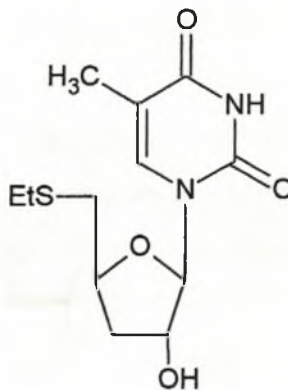
Όπως τα θειο-σάκχαρα έτσι και τα θειονουκλεοσίδια, έχοντας το θείο εντός ή εκτός του δακτυλίου, παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες αντιβιοτικές, αντιϊκές και αντινεοπλασματικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, τα νουκλεοσίδια **D** και **L**-2'-δεοξυ-4'-θειοπυριδίνη παρουσιάζουν αντικαρκινικές ιδιότητες. Σήμερα, ένα 4'-θειονουκλεοσίδιο, η 3TC (*Lamivudine*)⁽²²⁾ (εικόνα 13) είναι ένα αντί-HIV φάρμακο όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το 3'-Azido-2'-deoxythymidine (AZT) και

ανασταλτικός παράγοντας του ενζύμου της αντίστροφης τρανσκριπτάσης, με την ίδια δράση όπως το AZT. Επειδή η 3TC έχει την L-διαμόρφωση της πεντοφουρανόζης, ποικίλα ανάλογα πεντοφουρανόζης έχουν συντεθεί και εξεταστεί για αντιϊκές και άλλες βιολογικές ιδιότητες.



Εικόνα 13. 3TC, 2'-3'-dideoxy-3'-thiacytidine

Προηγούμενες έρευνες έδειξαν ότι ανάμεσα σε ποικίλα 5'-αλκυλοθειονουκλεοσίδια, η 5'-αιθυλο-5'-δεοξυθυμιδίνη (εικόνα 14) είναι ένας μη ανταγωνιστικός αναστολέας της κυτταροπλασματικής κινάσης της θυμιδίνης (C-TK), του απαραίτητου 'προάγγελου' στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ενδιαφέρουσα όμως είναι και η δράση του αναλόγου αυτού σε L1210 κύτταρα λευχαιμίας.⁽²³⁾

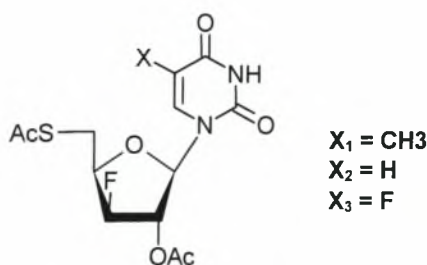


Εικόνα 14. 5'-αιθυλο-5'-δεοξυθυμιδίνη⁽²³⁾

A3. Φθορο-θειο- νουκλεοσίδια

Τα ανάλογα 4'-θειονουκλεοσίδια μπορούν να φωσφορυλιωθούν από ιϊκές ή κυτταρικές κινάσες του ξενιστή, με αποτέλεσμα τα τριφωσφορυλιωμένα παράγωγα να μπορούν να αναστείλουν τα ένζυμα αντιγραφής. Κατά τη διάρκεια αυτού του μεταβολικού μονοπατιού, το σημείο ελέγχου αποτελεί η πρώτη φωσφορυλίωση των ελεύθερων νουκλεοσιδίων, σ' αυτό το βήμα μετατρέπονται στα αντίστοιχα μονοφωσφορυλιωμένα παράγωγα. Τα ανάλογα των 2'-τροποποιημένων νουκλεοσιδίων, όπως τα αραβινο και 2'-φθοροαραβινο νουκλεοσίδια, τα οποία περιλαμβάνουν μια σημαντική κατηγορία αντιϊκών παραγόντων, μπορούν να ξεπεράσουν αυτό το φραγμό. Έτσι, τα 2'-φωσφορυλιωμένα-4'-θειονουκλεοσίδια αποτελούν εν δυνάμει αντιϊκούς και αντιογκογόνους παράγοντες.

Τα 4'-θειοFAC[1-(2'-δεοξυ-2'-φθορο-β-D-αραβινοφουρανόζυλο)]νουκλεοσίδια της κυτοσίνης έχουν υψηλή, αποτελεσματική δράση σε ποικιλία ανθρώπινων όγκων σε σταθερές κυτταρικές σειρές *in vitro*, και σημαντικές αντινεοπλασματικές ιδιότητες *in vivo*. Αποτιμήθηκε ότι τα 2'-δεοξυ-2'-φθορο-4'-θειοαραβινονουκλεοσίδια διαθέτουν αντινεοπλασματικές ιδιότητες σε ανθρώπινα λευκαιμικά T-λεμφοκύτταρα, CCRF-HSB-2 και κύτταρα KB μη μεταστατικού όγκου, καθώς επίσης τα περισσότερα από τα β-ανωμερή της 2'-δεοξυ-2'-φθορο-4'-θειοαραβινοσυλπυριμιδίνης φάνηκε να διαθέτουν εκλεκτική αντι-HSV-1 δραστηριότητα. Τέλος, θα ήταν σημαντική παράλειψη, η μη αναφορά ως σημαντικών αναστολέων των 3'-φθορο-5'-θειο-ξυλοφουρανοσυλο αναλόγων που συντέθηκαν στο εργαστήριό μας (εικόνα 15).



Εικόνα 15. 3'-φθορο-5'-θειο-ξυλοφουρανοσυλο αναλόγων (η υποομάδα X μπορεί να είναι X_1 : CH_3 , X_2 : H ή X_3 : F)

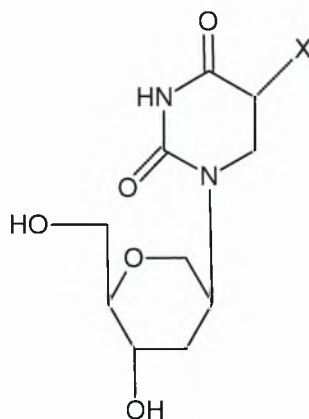
1.5.B Τροποποιημένα νουκλεοσιδικά ανάλογα με εξαμελή δακτύλιο

Η τροποποίηση του τμήματος του σακχάρου στη δομή ενός νουκλεοσιδίου έχει οδηγήσει στην παρασκευή αναλόγων νουκλεοσιδίων με σημαντική αντιϊκή δράση. Η φωσφορυλίωση των συνθετικών αυτών νουκλεοσιδίων από κυτταρικά ή ιϊκά ένζυμα αποτελεί κοινό σημείο στον τρόπο δράσης, ώστε να εκδηλώσουν τη βιολογική δραστηριότητά τους.⁽²⁴⁾ Οι τροποποιήσεις αυτές στοχεύουν στην καλύτερη λειτουργία των αναλόγων νουκλεοσιδίων ως υποστρώματα των DNA πολυμερασών όπως προκύπτει από την μελέτη της δομής τους και της λειτουργίας τους. Για παράδειγμα, ο KooI και οι συνεργάτες του μελέτησαν την ενσωμάτωση μη πολικών ισοστερών της θυμίνης και αδενίνης, του ίδιου σχήματος, μεγέθους και διαμόρφωσης, και λόγω αυτού διέφεραν από τις φυσικές συμπληρωματικές τους βάσεις μόνο στην αδυναμία σχηματισμού δεσμών υδρογόνου.⁽²⁵⁾ Τέτοιες μελέτες, αποτέλεσαν έρεισμα της υπόθεσης ότι η συμπληρωματικότητα σχήματος παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα του ενζύμου να δεχθεί ως υποστρώματα τα συνθετικά νουκλεοσίδια. Μέρος της ευθύνης, για την αναγνώριση τους από τις πολυμεράσες και την ενσωμάτωσή τους στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, φέρει το τμήμα του σακχάρου. Αποτελέσματα συγγενών πειραμάτων οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα τροποποιημένα ανάλογα νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδίων πρέπει να διαθέτουν ένα μερικώς επίπεδο κατάλοιπο σακχάρου με περιορισμένη ευκαμψία.⁽²⁵⁾

Ένας μεγάλος αριθμός πεντοφουρανοσυλο νουκλεοσιδίων και παραγώγων αυτών έχουν συντεθεί λόγω του ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν ως βιολογικά δραστικά μόρια. Ωστόσο, τις τελευταίες δεκαετίες, νουκλεοσίδια με εξαμελή δακτύλιο στη θέση του σακχάρου έχουν χαρακτηριστεί με ενδιαφέρουσες αντιϊκές και αντιβιοτικές ιδιότητες, καθώς και ως δομικά μόρια για τη σύνθεση νουκλεικών οξέων.^(25,26)

Από τα ενδιαφέροντα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν είναι κι αυτό που στηρίχτηκε στη χρήση του hTTP, το anhydrohexitol τριφωσφορικό ανάλογο του dTTP, ως υπόστρωμα του ενζύμου αντιγραφής για προσπάθεια συμπληρωματικότητας με τη δεοξυαδενοσίνη ή το anhydrohexitol ανάλογό της. Τα 1,5-Anhydro-2,3-dideoxy-D-arabino-hexitol νουκλεοσίδια είναι ανάλογα νουκλεοσιδίων με εξαμελή δακτύλιο στη θέση του σακχάρου και με τη βάση υποκατεστημένη στη θέση 2'.⁽²⁷⁾ Τα ανάλογα της 5-ιωδοουρακίλης και 5-αιθυλοουρακίλης (εικόνα 16) εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα για το ένζυμο κινάση της θυμιδίνης και αποτελούν αναστολείς του ιού απλού έρπητα τύπου 1 (HSV-1) και τύπου-2 (HSV-2), ενώ τα ανάλογα κυτοσίνης και γουανίνης είναι

δραστικά ενάντια και άλλων ερπητοϊών [όπως του ιού της ανεμοβλογιάς (VZV) και του κυτταρομεγαλοϊού (CMV)] . Από συγγενείς μελέτες της δομής και της δραστηριότητας τους προέκυψε ότι η παρουσία ακόρεστων υποκαταστατών στη θέση 5' του σακχάρου και μικρών ετεροκυκλικών υποκαταστατών στη θέση 5 της ουρακίλης είναι συμβατές με την αντιϊκή δράση τους.



Εικόνα 16.1,5-Anhydro-2,3-dideoxy-D-arabino-hexitol ανάλογα (η υποομάδα X μπορεί να είναι X₁:H, X₂:F, X₃:I, X₄:CH₂CH₃, X₅:CH=CH-Br)

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στόχος- σκοπός μελέτης

Τα αντιβακτηριακά, αντιϊκά και αντιογκογόνα φάρμακα περιλαμβάνονται μεταξύ των πιο σημαντικών θεραπευτικών ανακαλύψεων του εικοστού αιώνα και έχουν αλλάξει δραστικά τη θεραπευτική αγωγή πολλών ασθενειών, μειώνοντας τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση και η μελέτη τροποποιημένων νουκλεοσιδίων και συγκεκριμένα φθοροθειονουκλεοσιδίων για την εύρεση νέων αντικαρκινικών, αντιϊκών φαρμάκων με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα από τα μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενα.

Έρευνες των τελευταίων ετών έδειξαν ότι:

- × Η εισαγωγή ενός ατόμου φθορίου στο σάκχαρο των νουκλεοσιδίων μεταβάλλει με διάφορους τρόπους τη βιολογική δραστηριότητα των διαφόρων κυττάρων και ενζύμων,

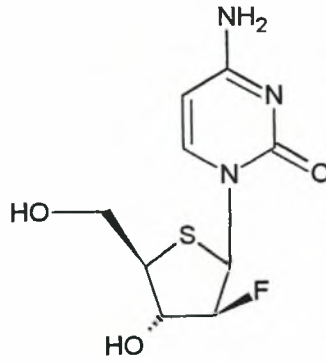
συμπεριλαμβανομένων των κινασών, DNA πολυμερασών, ριβονουκλεασών και αναγωγασών.⁽²⁸⁾ Η αντικατάσταση του υδρογόνου με φθόριο έχει ερευνηθεί εκτενώς στη βιοχημεία φαρμάκων και έχει διαπιστωθεί ότι ενισχύει τη βιολογική δραστηριότητα και αυξάνει τη χημική ή μεταβολική σταθερότητα καθότι:

- Έχει μικρή Van der Waals ακτίνα (1.35 Å) που μοιάζει πολύ με την ακτίνα του υδρογόνου (1.20 Å).
- Η μεγάλη ηλεκτραρνητικότητα του, ενισχύει τις ιδιότητες του μορίου.
- Η αυξημένη σταθερότητα και η μεγαλύτερη ισχύς του δεσμού άνθρακα-φθορίου αναστέλλει τον μεταβολισμό με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημιζωής του μορίου
- Αυξάνει το λιπόφιλο χαρακτήρα του μορίου διευκολύνοντας έτσι τη διαπερατότητά του διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.⁽²³⁾

× Η εισαγωγή ενός ατόμου θείου τόσο στο δακτύλιο του σακχάρου ενός νουκλεοσιδίου όσο και ως υποκαταστάτης κάποιου άνθρακα του δακτυλίου αλλάζει σημαντικά τη συμπεριφορά της διαμόρφωσης του μορίου, τη χημική του δραστηριότητα, το μοριακό εντοπισμό του από πρωτεΐνες καθώς και τη μεταβολική σταθερότητα. Η αντικατάσταση του οξυγόνου με θείο έχει διαπιστωθεί ότι προσδίδει ιδιαίτερες χημικές ιδιότητες στο μόριο και αλλάζει τη βιολογική δραστηριότητα καθότι:

- Είναι μεγαλύτερο ως άτομο από το οξυγόνο.
- Το μήκος δεσμού άνθρακα- θείου είναι μεγαλύτερο [C-S 1.82 Å (0.182 nm) C-O 1.43 Å (0.143nm)], άρα ο δεσμός πιο ασθενής και λιγότερο πολικός από αυτόν του άνθρακα-οξυγόνου.
- Η γωνία C-S-C (95-100 °) είναι πιο έντονη από αυτή C-O-C.⁽²⁹⁾

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το 1-(2'-δεοξυ-2'-φθορο-β-D-αραβινοφουρανοζυλο) νουκλεοσίδιο της κυτοσίνης (FAC) του οποίου η δραστηριότητα έναντι καρκινικών κυττάρων αυξάνεται σημαντικά με την αντικατάσταση του ατόμου του οξυγόνου του δακτυλίου από ένα άτομο θείου, προκύπτοντας έτσι ένα νέο πιο δραστικό ανάλογο, το 1-(2'-δεοξυ-2'-φθορο-4'-θειο-β-D-αραβινοφουρανοζυλο) νουκλεοσίδιο της κυτοσίνης (4'-thio-FAC) (εικόνα 17).⁽²⁰⁾

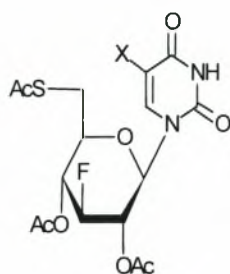


Εικόνα 17. 1-(2'-δεοξυ'-2'-φθορο-4'-θειο-β-D-αραβινοφουρανοζυλο) κυτοσίνη (4'-thio-FAC).⁽²⁰⁾

Επιπλέον, η εισαγωγή του ατόμου του θείου, όπως και του φθορίου, μεταβάλλει τη βιολογική δραστηριότητα ενζύμων των κυττάρων, όπως κινασών και DNA πολυμερασών. Έρευνες έχουν δείξει ότι ανάμεσα σε ποικίλα ανάλογα νουκλεοσιδίων, τα 5'-αλκυλοθειονουκλεοσιδία έχουν δράση μη ανταγωνιστικών αναστολέων της κυτταροπλασματικής θυμιδίνης (C-TK), του απαραίτητου 'προάγγελου' στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές.⁽²³⁾

Βασιζόμενοι στα ανωτέρω στοιχεία, θεωρήθηκε πολύ σημαντική η σύνθεση μιας νέας τάξης φθοροθειονουκλεοσιδίων (εικόνα 18), συνδυάζοντας έτσι τη δράση των δυο ατόμων του φθορίου και του θείου. Η νέα τάξη των νουκλεοσιδίων αυτών θα έχει ως σάκχαρο εξαμελή δακτύλιο, ως ετεροκυκλική βάση θα έχει θυμίνη, ουρακίλη ή 5-φθοροουρακίλη, φθόριο στη θέση 3' και θείο στη θέση 6' του σακχάρου.

Θεωρήθηκε σκόπιμη η μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας των νεοσυντεθέντων ουσιών καθώς και της δράσης τους ως φάρμακα (**Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Μικροβιολογίας, Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου του Μάριμπορ, στη Σλοβενία**). Οι προηγούμενες συνθέσεις φθοροθειονουκλεοσιδίων με εξαμελή δακτύλιο υπόσχονται σημαντικές αντιϊκές και αντιβιοτικές δυνατότητες, καθώς και ανασταλτική δράση στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων. Ένα βασικός λόγος που το ενδιαφέρον στράφηκε στα φθοροθειονουκλεοσιδία με εξαμελή δακτύλιο είναι η αυξημένη ανθεκτικότητα στην υδρόλυση, αφού το σπάσιμο του γλυκοσιδικού δεσμού αποτελεί συχνά φραγμό στη δράση των αντιϊκών νουκλεοσιδίων, οδηγώντας τα σε αποικοδόμηση.



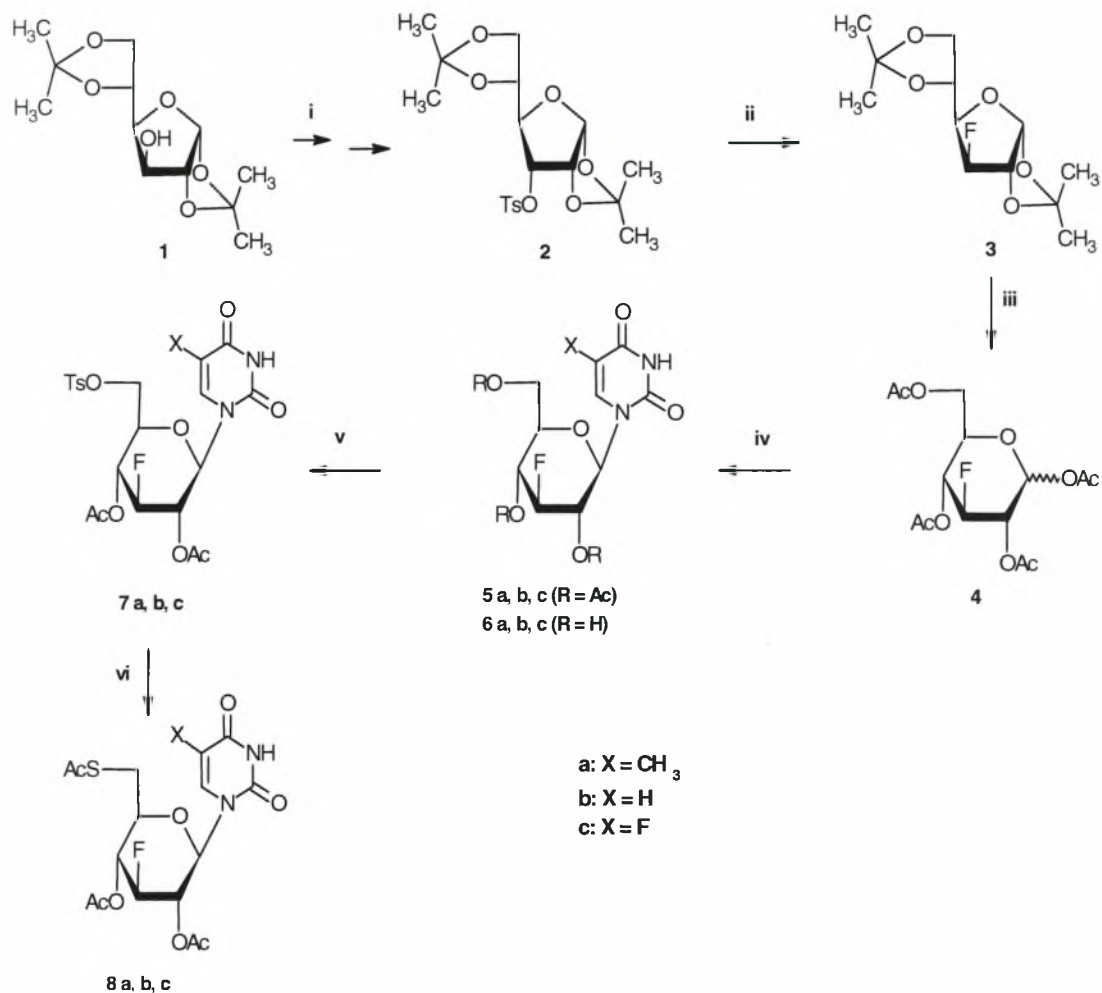
$X_1 = \text{CH}_3$
 $X_2 = \text{H}$
 $X_3 = \text{F}$

Εικόνα 18. 3'-φθορο-6'-θειο-γλυκοπυρανοσυλο νουκλεοσίδια (Η υποομάδα X μπορεί να είναι $X_1: \text{CH}_3$, $X_2: \text{H}$ ή $X_3: \text{F}$)

Μεθοδολογία σύνθεσης

Ξεκινώντας με την ένωση 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose (**1**), η οποία είναι εμπορικά διαθέσιμη, και ακολουθώντας δυο διαδοχικές πορείες πραγματοποιείται η σύνθεση της ένωσης 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene-3-*O*-toluenesulfonyl- α -D-allofuranose (**2**). Στη συνέχεια, η αντικατάσταση της *p*-τολουενυλοσουλφονυλο-ομάδας στον C-3' από ένα άτομο φθορίου, η οποία διενεργήθηκε αντιδρώντας η ένωση **2** με potassium fluoride σε acetamide, οδήγησε στην ένωση 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene-3-deoxy-3-fluoro- α -D-allofuranose (**3**). Η ένωση αυτή εύκολα μετατρέπεται στην αντίστοιχη 1,2,4,6-tetra-*O*-acetyl- α -deoxy-3-fluoro-glucopyranose (**4**)⁽²⁹⁾. Οι ενώσεις 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro- β -D-glucopyranosyl)thymine (**5a**), 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro- β -D-glucopyranosyl)uracil (**5b**) και 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro- β -D-glucopyranosyl)5-fluorouracil (**5c**) λαμβάνονται με σύζευξη της ένωσης (**4**) με συλλιωμένη θυμίνη παρουσίας του tin chloride, με ουρακίλη και με 5-φθοροουρακίλη παρουσίας trimethylsilyl trifluoromethane-sulfonate, σε ακετονιτριλίο υπό αναβρασμό. Από τα δεδομένα του ^1H NMR προκύπτει για την 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro- β -D-glucopyranosyl)thymine (**5a**) ($J_{1,2}=9.6$ Hz, $J_{2,3}=9.1$ Hz, $J_{3,4}=9.0$ Hz), για τις ενώσεις δε 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro- β -D-glucopyranosyl)uracil (**5b**) και 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro- β -D-glucopyranosyl)5-fluorouracil (**5c**) προέκυψε ότι έχουν β -διαμόρφωση. Με επιλεκτική αποπροστασία των **5a**, **5b** και **5c** χρησιμοποιώντας μεθανολική αμμωνία λαμβάνονται τα παράγωγα **6a**, **6b** και **6c** σε εξαιρετική απόδοση. Έπειτα, οι ενώσεις αυτές παρουσίας του *p*-τολουενυλοσουλφονυλο χλωρίδιο σε διαλύτη άνυδρη πυριδίνη⁽³⁰⁾ και με

κατευθυνόμενη ακετυλίωση των ελεύθερων υδροξυλομάδων στις θέσεις C-2' και C-4' με οξικό ανυδρίτη/πυριδίνη προκύπτουν τα επιθυμητά ακετυλιωμένα 6'-O-τοσυλο παράγωγα **7a**, **7b** και **7c** σε πολύ καλή απόδοση. Τα παράγωγα αυτά αντιδρούν με potassium thioacetate σε ζεστό N,N-dimethylformamide (DMF)⁽³¹⁾ δίνοντας τα αντίστοιχα θειοπαράγωγα, 1-(2',4'-di-O-acetyl-6'-S-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio-β-D-glucopyranosyl)thymine (**8a**), 1-(2',4'-di-O-acetyl-6'-S-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio-β-D-glucopyranosyl)uracil (**8b**) και 1-(2',4'-di-O-acetyl-6'-S-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio-β-D-glucopyranosyl)5-fluorouracil (**8c**). Από τα δεδομένα του H¹ NMR προκύπτει για την 1-(2',4'-di-O-acetyl-6'-S-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio-β-D-glucopyranosyl)thymine (**8a**) ($J_{1',2'}=9.5$ Hz, $J_{F,3'}=51.8$ Hz, $J_{3',2'}=9.1$ Hz, $J_{3',4'}=9.0$ Hz), για την ένωση 1-(2',4'-Di-O-acetyl-6'-S-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio-β-D-glucopyranosyl)uracil (**8b**) ($J_{1',2'}=9.5$ Hz, $J_{F,3'}=51.8$ Hz, $J_{3',2'}=9.1$ Hz, $J_{3',4'}=9.1$ Hz) και για την ένωση 1-(2',4'-Di-O-acetyl-6'-S-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio-β-D-glucopyranosyl)5-fluorouracil (**8c**) ($J_{1',2'}=9.3$ Hz, $J_{F,3'}=51.5$ Hz, $J_{3',2'}=9.2$ Hz, $J_{3',4'}=9.0$ Hz)



Σχήμα 1: Μεθοδολογία σύνθεσης: (i) **a)** PDC/ Ac₂O/ CH₂Cl₂ **b)** NaBH₄/ MeOH **c)** TsCl/ πυριδίνη; (ii) **a)** KF/ Acetamide **b)** 70% AcOH; (iii) **a)** MeOH/ H₂O/ Amberlite IR 120(H⁺) **b)** Ac₂O/ πυριδίνη; (iv) Συλιωμένη βάση, CH₃CN, τριμεθυλο-σίλυλο τριφθορομεθάνο-σουλφονυλο χλωρίδιο ή tin chloride; (v) πυριδίνη, παρα-τολουενυλοσουλφονυλο χλωρίδιο; (vi) KSAc/ DMF/ 100°C.

3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΘΟΡΟΘΕΙΟΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ

3.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΟΥ (TLC: Thin Layer Chromatography)

Οι αντιδράσεις ελέγχονται με χρωματογραφία χάρτου, με πλάκες Silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₅₄). Γενικά τα χρωματογραφήματα εμφανίζονται ψεκάζοντας με διάλυμα H₂SO₄ (θεικού οξέος) 30%. Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

Διάλυμα Α: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 80 / 20

Διάλυμα Β: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 70 / 30

Διάλυμα Γ: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 50 / 50

Διάλυμα Δ: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 60 / 40

3.1.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Η χρωματογραφία στήλης επιτεύχθηκε με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση σε Silica gel (240-400 mesh, Merck grade) (flash chromatography) και οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω:

Διάλυμα Α: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 80 / 20

Διάλυμα Β: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 70 / 30

Διάλυμα Γ: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 50 / 50

Διάλυμα Δ: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 60 / 40

3.1.3 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Χρησιμοποιούνται άνυδροι διαλύτες ακετονιτρίλιο (CH₃CN), πυριδίνη και διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Η ξήρανση του CH₃CN γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με reflux overnight. Στη συνέχεια, γίνεται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το DMF φυλάσσεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å, καθώς και η πυριδίνη σε σφαιρίδια ΚΟΗ (pellets).

3.1.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ

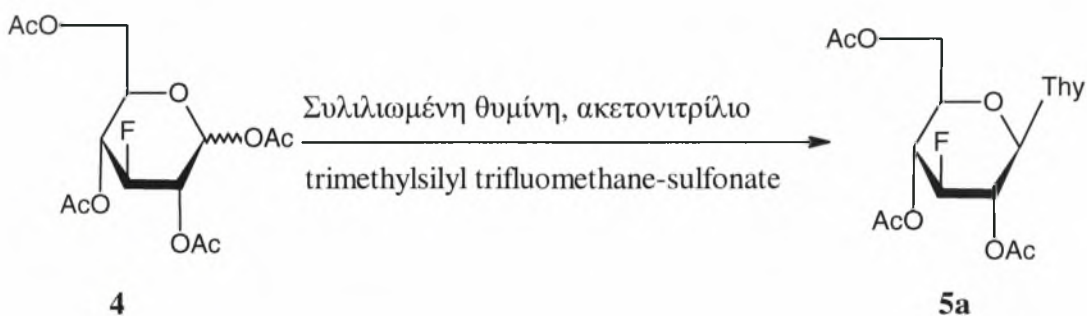
Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance) και μέσω του φάσματος υπερύθρου (IR). Τα φάσματα H¹ NMR μετρήθηκαν με Bruker 400 MHz

spectrometer χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Το tetramethylsilan (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για H^1 και trifluorotoluene (TFT) για F^1 . Η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (doublet), dd (doublet doublet), dtr (doublet triplet), m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η ένωση 1,2:5,6-Di-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose (**1**) είναι εμπορικά διαθέσιμη και χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση της 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene-3-*O*-toluenesulfonyl- α -D-allofuranose (**2**) ακολουθώντας 2 διαδοχικές πορείες. Οι ενώσεις (**3**) και (**4**) παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας από την υποψήφια Διδάκτορα Ευαγγελία Τσουκαλά.

4.1.1 Σύνθεση της 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro- β -D-glucopyranosyl)thymine (**5a**).³⁰



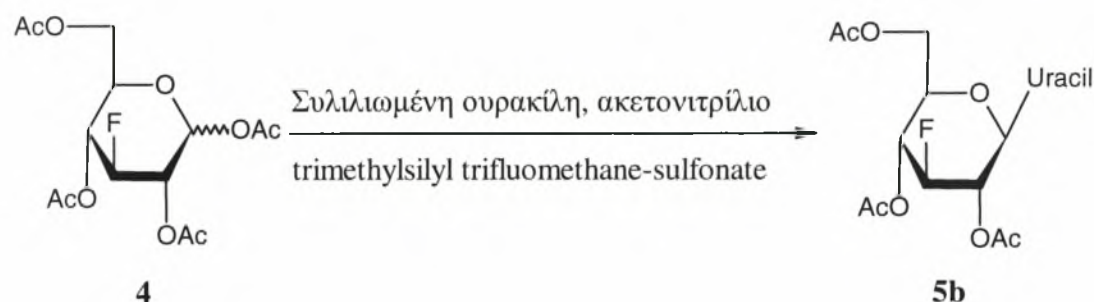
Ένα μίγμα θυμίνης (1.00g, 7.98mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (2.00ml, 9.90mmol) και saccharine (0.07g, 0,37mmol) σε άνυδρο CH_3CN (28ml) τοποθετούνται υπό αναβρασμό για 30 min στους 120°C . Στη συνέχεια, η τετρακετυλιωμένη 3'-deoxy-3'-fluoro-D-glucose (**4**) (2.00g, 5.70mmol) και το tin chloride (0.90g, 7.98mmol) προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης υπό αναβρασμό, μειώνοντας τη θερμοκρασία στους 110°C για 2 h. Το τελικό μίγμα της αντίδρασης ψύχεται και εξουδετερώνεται με υδατικό sodium bicarbonate (NaHCO_3). Πραγματοποιείται εκχύλιση με CH_2Cl_2 (500ml), η οργανική φάση πλένεται με νερό (3 x 10ml) και ξηραίνεται με άνυδρο

sodium sulfate, το διάλυμα διηθείται, συμπυκνώνεται και τελικά καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα A: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 80 / 20. Έπειτα, συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται καθαρή η ένωση **5a** (1.70g) σε στερεά μορφή. Η σύνθεση της ένωσης **5a** είχε απόδοση 72 %.

TLC (Διάλυμα A)	R _f =0.35
Απόδοση	72%

Πίνακας 1. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-β-D-glucopyranosyl)thymine (**5a**)

4.1.2 Σύνθεση της 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-β-D-glucopyranosyl)uracil (**5b**).³⁰

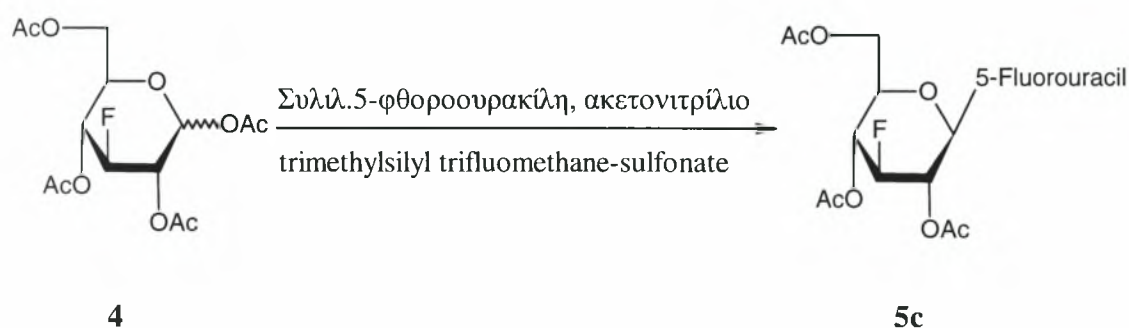


Ένα μίγμα ουρακίλης (0.90g, 7.98mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (2.00ml, 9.90mmol) και saccharine (0.07g, 0.37mmol) σε άνυδρο CH₃CN (28ml) τοποθετούνται υπό αναβρασμό για 30 min στους 120 °C. Στη συνέχεια, η τετρακετυλιωμένη 3'-deoxy-3'-fluoro-D-glucose (**4**) (2.00g, 5.70mmol) και το trimethylsilyl trifluoromethane-sulfonate (1.44ml, 7.98mmol) προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης υπό αναβρασμό, μειώνοντας τη θερμοκρασία στους 105 °C για 3h. Το τελικό μίγμα της αντίδρασης ψύχεται και εξουδετερώνεται με υδατικό NaHCO₃. Πραγματοποιείται εκχύλιση με CH₂Cl₂ (500ml), η οργανική φάση πλένεται με νερό (3 x 10ml) και ξηραίνεται με άνυδρο sodium sulfate, το διάλυμα διηθείται, συμπυκνώνεται και τελικά καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα B: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 70 / 30. Έπειτα, συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται καθαρή η ένωση **5b** (1.70g) σε στερεά μορφή. Η σύνθεση της ένωσης **5b** είχε απόδοση 74 %.

TLC (Διάλυμα Β)	R _f =0.3
Απόδοση	74%

Πίνακας 2. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-β-D-glucopyranosyl) uracil (**5b**)

4.1.3 Σύνθεση της 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-β-D-glucopyranosyl)5-fluorouracil (**5c**).³⁰

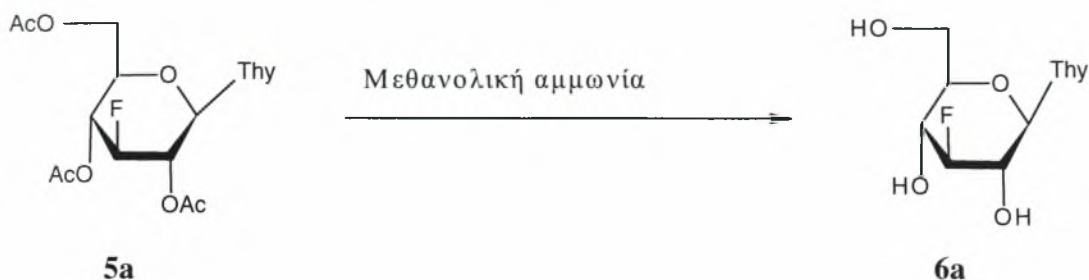


Ένα μίγμα 5-φθοροουρακίλης (1.00g, 7.98mmol), hexamethyldisilazane (HMDS) (2.00ml, 9.90mmol) και saccharine (0.07g, 0.37mmol) σε άνυδρο CH₃CN (28ml) τοποθετούνται υπό αναβρασμό για 30 min στους 120 °C. Στη συνέχεια, η τετρακετυλιωμένη 3'-deoxy-3'-fluoro-D-glucose (**4**) (2.00g, 5.70mmol) και το trimethylsilyl trifluoromethane-sulfonate (1.44ml, 7.98mmol) προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης υπό αναβρασμό, μειώνοντας τη θερμοκρασία στους 80 °C για 3h. Το τελικό μίγμα της αντίδρασης ψύχεται και εξουδετερώνεται με υδατικό NaHCO₃. Πραγματοποιείται εκχύλιση με CH₂Cl₂ (500ml), η οργανική φάση πλένεται με νερό (3 x 10ml) και ξηραίνεται με άνυδρο NaHSO₄, το διάλυμα διηθείται, συμπυκνώνεται και τελικά καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Γ: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 50 / 50. Έπειτα, συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται καθαρή η ένωση **5c** (1.70g) σε στερεά μορφή. Η σύνθεση της ένωσης **5c** είχε απόδοση 70 %.

TLC (Διάλυμα Γ)	R _f =0.37
Απόδοση	70%

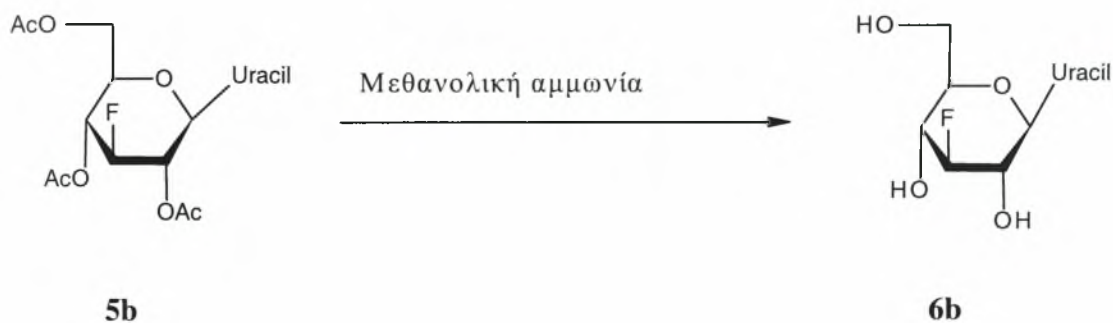
Πίνακας 3. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-β-D-glucopyranosyl)5-fluorouracil (**5c**)

4.1.4 Σύνθεση της 1-(3',4'-dideoxy-3'-fluoro-β-D-glucopyranosyl)thymine (6a).



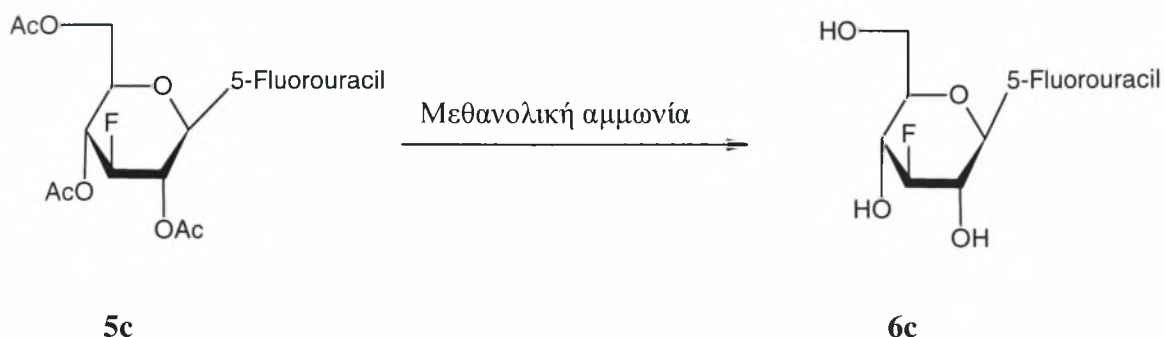
Ένα μίγμα της ένωσης 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-β-D-glucopyranosyl)thymine (**5a**) (1.70g, 4.10mmol) με μεθανολική αμμωνία αναδεύεται για 4 h σε θερμοκρασία δωματίου. Από το τελικό μίγμα λαμβάνεται ακατέργαστη η ένωση **6a** (1.10g) σε μορφή έγχρωμου ελαίου, χωρίς να υφίσταται κανένα περαιτέρω καθαρισμό. Η σύνθεση της ένωσης **6a** είχε απόδοση 90%.

4.1.5 Σύνθεση της 1-(3',4'-dideoxy-3'-fluoro-β-D-glucopyranosyl)uracil (6b).



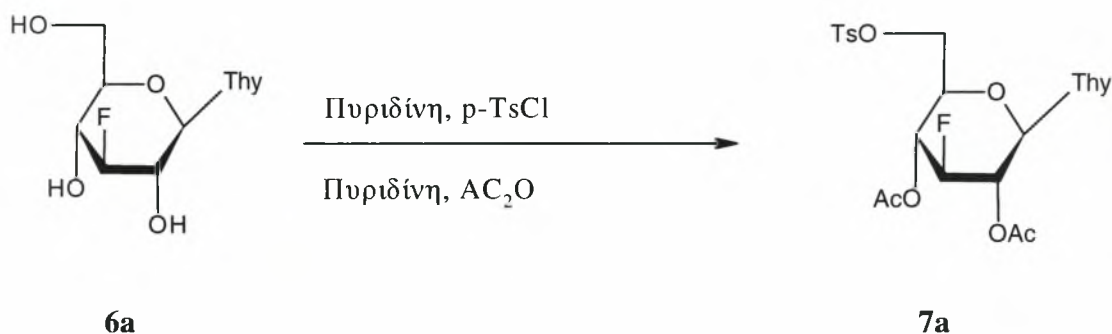
Ένα μίγμα της ένωσης 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-β-D-glucopyranosyl) uracil (**5b**) (1.70g, 4.10mmol) με μεθανολική αμμωνία αναδεύεται για 4 h σε θερμοκρασία δωματίου. Από το τελικό μίγμα λαμβάνεται ακατέργαστη η ένωση **6b** (1.00g) σε μορφή έγχρωμου ελαίου, χωρίς να υφίσταται κανένα περαιτέρω καθαρισμό. Η σύνθεση της ένωσης **6b** είχε απόδοση 88%.

4.1.6 Σύνθεση της 1-(3',4'-dideoxy-3'-fluoro-β-D-glucopyranosyl)5-fluorouracil (6c).



Ένα διάλυμα της ένωσης 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-β-D-glucopyranosyl)5-fluorouracil (**5c**) (1.70g, 4.10mmol) σε μεθανολική αμμωνία αναδεύεται για 4 h σε θερμοκρασία δωματίου. Από το τελικό μίγμα λαμβάνεται ακατέργαστη η ένωση **6c** (1.00g) σε μορφή έγχρωμου ελαίου, χωρίς να υφίσταται κανένα περαιτέρω καθαρισμό. Η σύνθεση της ένωσης **6c** είχε απόδοση 86%.

4.1.7 Σύνθεση της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-*O*-*p*-toluenesulfonyl-β-D-glucopyranosyl)thymine (7a).



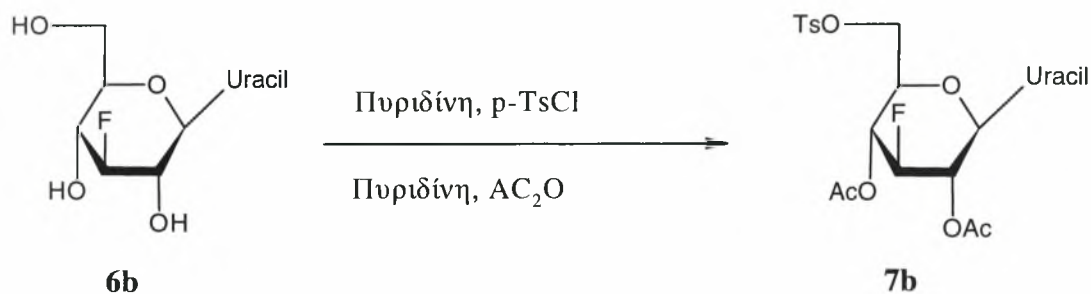
Ένα διάλυμα της ένωσης **6a** (1.10g, 3.70mmol) σε 4.50ml άνυδρη πυριδίνη ψύχεται στους 0 °C και 1.10g (5.58mmol) *p*-τολουενυλοσουλφονυλο χλωρίδιο σε 4.50ml άνυδρης πυριδίνης προστίθενται σταγόνα-σταγόνα υπό συνεχή ανάδευση. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου overnight, έπειτα συμπυκνώνεται. Το κολλώδες σκεύασμα διαλύεται σε πυριδίνη (49ml) και προστίθεται οξικός ανυδρίτης (25ml), το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται μεθανόλη (0.40ml) για τον τερματισμό της αντίδρασης και το

μίγμα συμπυκνώνεται υπό υψηλή πίεση κενού για την απομάκρυνση των διαλυτών. Το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (2 x 200ml) και εξουδετερώνεται με υδατικό NaHCO₃. Η οργανική φάση πλένεται με όξινοθειικό νάτριο NaHSO₄, ξηραίνεται με άνυδρο sodium sulfate, διηθείται, αποστάζεται και τελικά καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας το Διάλυμα Δ: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 60 / 40. Τέλος, συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται καθαρή η ένωση **7a** (1.20g) σε μορφή λευκού στερεού. Η αντίδραση είχε απόδοση 62%.

TLC (Διάλυμα Δ)	R _f =0.35
Απόδοση	62%

Πίνακας 4. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',4'-di-O-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-O-p-toluenesulfonyl-β-D-glucopyranosyl)thymine (**7a**).

4.1.8 Σύνθεση της 1-(2,4-di-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-6-O-p-toluenesulfonyl-β-D-glucopyranosyl)uracil (**7b**).



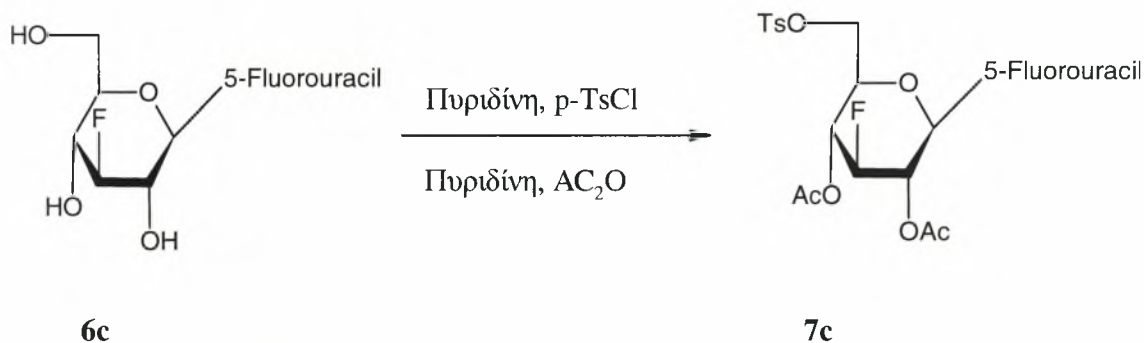
Ένα διάλυμα της ένωσης **6b** (1.10g, 3.70mmol) σε 4.50ml άνυδρη πυριδίνη ψύχεται στους 0 °C και 1.10g (5.58mmol) p-τολουενυλοσουλφονυλο χλωρίδιο σε 4.50ml άνυδρης πυριδίνης προστίθενται σταγόνα-σταγόνα υπό συνεχή ανάδευση. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου overnight, έπειτα συμπυκνώνεται. Το κολλώδες σκεύασμα διαλύεται σε πυριδίνη (49ml) και προστίθεται οξικός ανυδρίτης (25ml), το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται μεθανόλη (0.40ml) για τον τερματισμό της αντίδρασης και το μίγμα συμπυκνώνεται υπό υψηλή πίεση κενού για την απομάκρυνση των διαλυτών. Το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (2 x 200ml) και εξουδετερώνεται με υδατικό NaHCO₃. Η οργανική φάση πλένεται με NaHSO₄, ξηραίνεται με άνυδρο sodium

sulfate, διηθείται, αποστάζεται και τελικά καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας το Διάλυμα Β: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 70 / 30. Τέλος, συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται καθαρή η ένωση **7b** (1.10g) σε μορφή λευκού στερεού. Η αντίδραση είχε απόδοση 58%.

TLC (Διάλυμα Β)	$R_f=0.4$
Απόδοση	58%

Πίνακας 5. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-*O*-*p*-toluenesulfonyl- β -D-glucopyranosyl)uracil (**7b**).

4.1.9 Σύνθεση της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-*O*-*p*-toluenesulfonyl- β -D-glucopyranosyl)5-fluorouracil (**7c**).



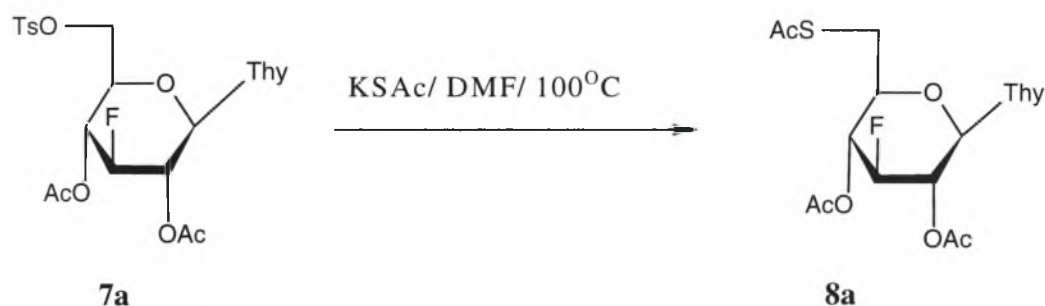
Ένα διάλυμα της ένωσης **6c** (1.10g, 3.70mmol) σε 4.50ml άνυδρη πυριδίνη ψύχεται στους 0 °C και 1.10g (5.58mmol) *p*-τολουενυλοσουλφονυλο χλωρίδιο σε 4.50ml άνυδρης πυριδίνης προστίθενται σταγόνα-σταγόνα υπό συνεχή ανάδευση. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου overnight, έπειτα συμπυκνώνεται. Το κολλώδες σκεύασμα διαλύεται σε πυριδίνη (49ml) και προστίθεται οξικός ανυδρίτης (25ml), το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται μεθανόλη (0.40ml) για το τερματισμό της αντίδρασης και το μίγμα συμπυκνώνεται υπό υψηλή πίεση κενού για την απομάκρυνση των διαλυτών. Το μίγμα εκχλιίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (2 x 200ml) και εξουδετερώνεται με υδατικό NaHCO₃. Η οργανική φάση πλένεται με NaHSO₄, ξηραίνεται με άνυδρο sodium sulfate, διηθείται, αποστάζεται και τελικά καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης

χρησιμοποιώντας το Διάλυμα Δ: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 60 / 40. Τέλος, συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται καθαρή η ένωση **7c** (1.10g) σε μορφή λευκού στερεού. Η αντίδραση είχε απόδοση 60%.

TLC (Διάλυμα Β)	R _f =0.4
Απόδοση	60%

Πίνακας 6. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-*O*-*p*-toluenesulfonyl-β-*D*-glucopyranosyl)5-fluorouracil (**7c**).

4.1.10 Σύνθεση της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-6'-*S*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio-β-*D*-glucopyranosyl)thymine (**8a**).

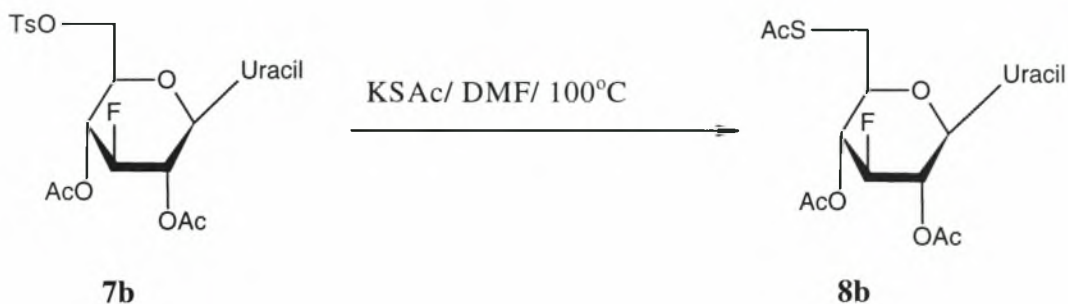


Το τοσυλιωμένο παράγωγο **7a** (1.20 g, 2.30mmol) θερμαίνεται με potassium thioacetate (0.36g, 3.10mmol) σε DMF (8.70ml) στους 100 °C για 2h. Το μίγμα της αντίδρασης εξουδετερώνεται με υδατικό NaHCO₃. Στη συνέχεια, το μίγμα αυτό συμπυκνώνεται υπό υψηλή πίεση κενού για να εξατμιστεί ο διαλύτης DMF. Το σκεύασμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και νερό, η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο sodium sulfate, διηθείται και εξατμίζεται έως στεγνού. Το τελικό σκεύασμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας το Διάλυμα Δ: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 60 / 40, παραλαμβάνοντας έτσι καθαρή την ένωση **8a** (0.75g) υπό μορφή λευκού στερεού. Η αντίδραση είχε απόδοση 78%.

TLC (Διάλυμα Δ)	R _f =0.4
Απόδοση	78%

Πίνακας 7. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-6'-*S*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio-β-D-glucopyranosyl)thymine (8a)

4.1.11 Σύνθεση της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-6'-*S*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio-β-D-glucopyranosyl)uracil (8b).

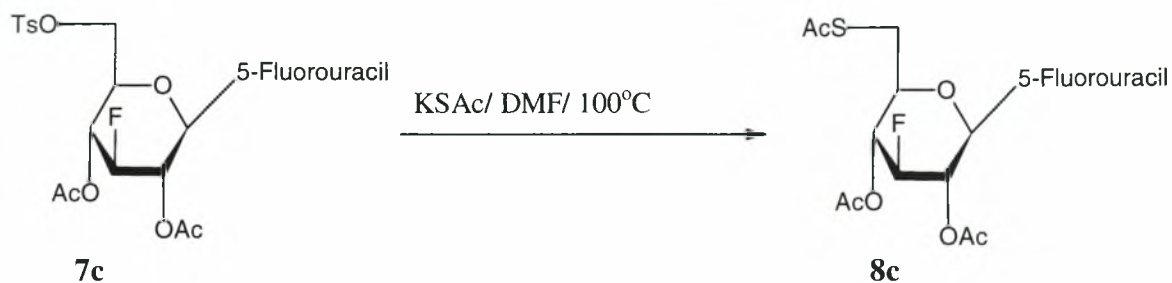


Το τοσυλιωμένο παράγωγο **7b** (1.10g, 2.30mmol) θερμαίνεται με potassium thioacetate (0.36g, 3.10mmol) σε DMF (8.70ml) στους 100°C για 2h. Το μίγμα της αντίδρασης εξουδετερώνεται με υδατικό NaHCO₃. Στη συνέχεια, το μίγμα αυτό συμπυκνώνεται υπό υψηλή πίεση κενού για να εξατμιστεί ο διαλύτης DMF. Το σκεύασμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και νερό, η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο sodium sulfate, διηθείται και εξατμίζεται έως στεγνού. Το τελικό σκεύασμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας το Διάλυμα Β: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 70 / 30, παραλαμβάνοντας έτσι καθαρή την ένωση **8b** (0.64g) υπό μορφή λευκού στερεού. Η αντίδραση είχε απόδοση 76%.

TLC (Διάλυμα Β)	R _f =0.4
Απόδοση	76%

Πίνακας 8. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-6'-*S*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio-β-D-glucopyranosyl) uracil (8b).

4.1.12 Σύνθεση της 1-(2',4'-di-O-acetyl-6'-S-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio-β-D-glucopyranosyl)5-fluorouracil (**8c**).



Το τοσυλιωμένο παράγωγο **7c** (1.10g, 2.30mmol) θερμαίνεται με potassium thioacetate (0.36g, 3.10mmol) σε DMF (8.70ml) στους 100°C για 2h. Το μίγμα της αντίδρασης εξουδετερώνεται με υδατικό NaHCO_3 . Στη συνέχεια, το μίγμα αυτό συμπυκνώνεται υπό υψηλή πίεση κενού για να εξατμιστεί ο διαλύτης DMF. Το σκεύασμα εκχυλίζεται με οξικός αιθυλεστέρας και νερό, η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο sodium sulfate, διηθείται και εξατμίζεται έως στεγνού. Το τελικό σκεύασμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας το Διάλυμα Β: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 70 / 30, παραλαμβάνοντας έτσι καθαρή την ένωση **8c** (0.65g) υπό μορφή λευκού στερεού. Η αντίδραση είχε απόδοση 75%.

TLC (Διάλυμα Β)	$R_f=0.47$
Απόδοση	76%

Πίνακας 9. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',4'-di-O-acetyl-6'-S-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio-β-D-glucopyranosyl)5-fluorouracil (**8c**).

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 ΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΩΣΕΩΝ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης φθοροθειονουκλεοσιδίων, η οποία θα έχει στη θέση του σακχάρου έναν εξαμελή δακτύλιο, θυμίνη, ουρακίλη ή 5-φθοροουρακίλη ως ετεροκυκλική βάση, φθόριο στη θέση 3' και θείο στη θέση 6' του σακχάρου, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Η πιθανή αντιϊκή και αντικαρκινική δράση ήταν το έναυσμα για την εύρεση μιας σχετικά εύκολης πειραματικής διαδικασίας με μικρά και σύντομα βήματα για τη σύνθεση αυτών των φθορονουκλεοσιδίων. Οι τελικές αποδόσεις της σύνθεσης του τελικού φθορο-θειονουκλεοσιδίου θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν αρκετά καλές. Συγκεκριμένα, η σύνθεση της 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro- β -**D**-glucopyranosyl)thymine **5a** είχε απόδοση 72%, της 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro- β -**D**-glucopyranosyl)uracil **5b** είχε απόδοση 74%, της 1-(2',4',6'-tri-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro- β -**D**-glucopyranosyl)5-fluorouracil **5c** είχε απόδοση 70%, της 1-(3',4'-dideoxy-3-fluoro- β -**D**-glucopyranosyl)thymine **6a** είχε απόδοση 90%, της 1-(3',4'-dideoxy-3'-fluoro- β -**D**-glucopyranosyl)uracil **6b** είχε απόδοση 88%, της 1-(3',4'-dideoxy-3'-fluoro- β -**D**-glucopyranosyl)5-fluorouracil **6c** είχε απόδοση 86%, της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-*O*-*p*-toluenesulfonyl- β -**D**-glucopyranosyl)thymine **7a** είχε απόδοση 62%, της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-*O*-*p*-toluenesulfonyl- β -**D**-glucopyranosyl)uracil **7b** είχε απόδοση 58%, της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-*O*-*p*-toluenesulfonyl- β -**D**-glucopyranosyl)5-fluorouracil **7c** είχε απόδοση 60%, της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-6'-*S*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio- β -**D**-glucopyranosyl)thymine **8a** είχε απόδοση 78%, της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-6'-*S*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio- β -**D**-glucopyranosyl)uracil **8b** είχε απόδοση 76%, της 1-(2',4'-di-*O*-acetyl-6'-*S*-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio- β -**D**-glucopyranosyl)5-fluorouracil **8c** είχε απόδοση 76%.

Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού H^1 NMR. Είναι αξιοπρόσεκτο το γεγονός ότι οι επιθυμητές τελικές ενώσεις **8a**, **8b** και **8c** εμφανίζουν ισχυρή απορρόφηση στο φάσμα υπερύθρου (IR) στα 1750 cm^{-1} (OAc) και 1697 cm^{-1} (Sac), ενώ το H^1 NMR φάσμα τους εμφανίζει φανερά σήματα τριών πρωτονίων μεθυλίου που

αποδίδονται στο τμήμα SAc (**8a**: δ 2.37, **8b**: δ 2.37, **8c**: δ 2.36) και κορυφές 6 πρωτονίων μεθυλίου, οι οποίες αντιστοιχούν στην ομάδα OAc (**8a**: δ 2.08, 2.21, **8b**: δ 2.19, 2.07, **8c**: δ 2.19, 2.08)

Βρέθηκε ότι τα τροποποιημένα νουκλεοσίδια παίρνουν μέρος στην αντιμετώπιση και θεραπεία ασθενειών, έχοντας αντιϊκή και αντικαρκινική δράση, εξ αιτίας αυτού κρίθηκε σημαντική και η αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης, της οποίας τα αποτελέσματα καταγράφονται παρακάτω.

5.2 ΑΝΤΙΪΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις αντιϊκής δραστηριότητας των νεοσυνθεθειμένων γλυκοπυρανοσυλο- νουκλεοσιδίων καταγράφονται στον Πίνακα 10 συγκρίνοντάς τα με το AZT. Στην διαδικασία εξουδετέρωσης, η ουσία **8c** εμφανίζει ικανότητα εξουδετέρωσης του ιού πριν να συνδεθεί στα κύτταρα Caco-2 σε συγκέντρωση 0.1μM σε σύγκριση με το AZT, από το οποίο απαιτείται σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση ($IC_{50}=78.84\mu M$) ικανή να εξουδετερώσει τον εντεροϊό *rotavirus*. Όμοια αποτελέσματα παρατηρούνται για την ουσία **8b**, κατά την αναστολή μολυσματικότητας μέσω ιϊκής σύνδεσης (Πίνακας 10), μειώνοντας τα απαιτούμενα επίπεδα συγκέντρωσης στο μισό (0.05 μM) και συγκρίνοντας τη με την ουσία **8c** στην ανάλυση εξουδετέρωσης (Πίνακας 10, πείραμα Α). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, ενώ μαζί οι ουσίες **8b** και **8c** είναι αποτελεσματικές για την εξουδετέρωση του ιού, ωστόσο αυτό το καταφέρνουν με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, το οποίο αποτελεί συνέπεια της διαφορετικής χημικής δομής τους. Η παρουσία του φθορίου στη θέση C-5 της ουρακίλης στην ουσία **8c**, είναι πιθανό να μπλοκάρει την αναστολή της αντιγραφής του *rotavirus* στο κύτταρο. Η ουσία, **8a** 1-(2',4'-Di-O-acetyl-6'-S-acetyl-3'-deoxy-3'-fluoro-6'-thio-β-D-glucopyranosyl)thymine δε φαίνεται να παρουσιάζει κάποια αντιϊκή επίδραση. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν προβλέψιμο, αφού ο *rotavirus* είναι ρετροϊός, έτσι τα παράγωγα ουρακίλης έχουν τη δυνατότητα να εκφράζονται περισσότερο αποτελεσματικά, αναστέλλοντας την ιϊκή αντιγραφή. Ολοκληρώνοντας, οι εξεταζόμενες ουσίες **8b** και **8c** εμφανίζουν εξειδικευμένη ενεργότητα σύμφωνα με την αντιϊκή ανάλυση, έχοντας την ικανότητα να αναστείλουν τη μόλυνση κυττάρων από *rotavirus* σε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις από το AZT.

5.3 ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η κυτταροτοξικότητα των ουσιών **8a-c** μετρήθηκε σε φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα εντέρου H4 και σε άλλες κυτταρικές σειρές όγκων, όπως στα κύτταρα Caco-2 απομονωμένα από ανθρώπινο αδenoκαρκίνωμα του κόλον, σε κύτταρα από δερματικό μελάνωμα, στην κυτταρική σειρά MCF-7 παραγόμενη από καρκίνο του επιθηλίου του μαστού, εκφράζοντας τα αποτελέσματα σε τιμές CC_{50} . Η ανάπτυξη ανασταλτικής δράσης στα κύτταρα Caco-2 επηρεάστηκε από τις καθορισμένες ελάχιστες συγκεντρώσεις ανασταλτικής δράσης (IC_{50}) των νέων ουσιών. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον πίνακα 11 και συγκρίνονται με τις αποτελεσματικές τιμές που παρατηρήθηκαν για την 5-φθορουρακίλη.

Όλα τα εξεταζόμενα 3'-φθορο-6'-θειογλυκοκυρανοσυλο νουκλεοσίδια εκδηλώνουν κυτταροτοξικότητα σε όλα τα κακοήθη κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν και επιδεικνύουν υψηλή εκλεκτικότητα συγκρίνοντας τη δράση τους αυτή στα φυσιολογικά κύτταρα H4. Εν συγκρίσει με την 5FU, η ένωση **8b** είναι δυο φορές περισσότερο εκλεκτική ενάντια των Caco-2 κυττάρων και μια φορά ενάντια των κυττάρων από δερματικό μελάνωμα (πίνακας 11). Η ένωση **8a**, τώρα, είναι λιγότερο εκλεκτική έναντι της κυτταρικής σειράς MCF-7 από τις άλλες εξεταζόμενες ενώσεις. Συγκρίνοντας τα 3'-φθορο-5'-θειοξυλοφουρανοσυλο ανάλογα ⁽³²⁾ (εικόνα της θυμίνης, ουρακίλης, 5-φθορουρακίλης, τα 3'-φθορο-6'-θειογλυκοκυρανοσυλο νουκλεοσίδια εκδηλώνουν υψηλότερη κυτταροτοξικότητα έναντι των κυττάρων Caco-2 και MCF-7, δεν εμφανίζουν όμως την ίδια δράση και έναντι των κυττάρων από δερματικό μελάνωμα (Πίνακας 11, τιμές CC_{50}), ενώ το 3'-φθορο-6'-θειογλυκοκυρανοσυλο νουκλεοσίδιο της θυμίνης **8a** εμφανίζεται περισσότερο αποτελεσματικό έναντι των κυττάρων από δερματικό μελάνωμα και MCF-7.

Στη μελέτη ανάπτυξης ανασταλτικής δράσης όλες οι εξεταζόμενες ενώσεις φαίνονται ικανές να αναστείλουν την ανάπτυξη των κυττάρων κακοηθών όγκων στο ίδιο εύρος με την ουσία αναφοράς την 5-φθορουρακίλη (IC_{50} , πίνακας 11). Παρά το γεγονός μη παρατήρησης σημαντικών διαφορών στην ανάπτυξη ανασταλτικής δράσης στα κύτταρα από καρκίνωμα του κόλον, μεταξύ των εξεταζόμενων ουσιών (συμπεριλαμβανομένου του γλυκοκυρανοσυλο παραγώγου της θυμίνης), όλες αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της ανάπτυξης κυττάρων κακοηθών όγκων και εκλεκτικής ενεργότητας μεταξύ κακοηθών- φυσιολογικών κυττάρων. Συμπερασματικά,

τα 3'-φθορο-6'-θειογλυκοκυρανοσυλο νουκλεοσίδια είναι αποτελεσματικά στην αναστολή ανάπτυξης των κυττάρων Caco-2

5.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Εν κατακλείδι, τα νεοσυντεθειμένα νουκλεοσίδια 3'-φθορο-6'-θειογλυκοκυρανοσυλο νουκλεοσίδια της 5-φθοροουρακίλης (**8c**) και ουρακίλης (**8 b**) εμφανίζουν ικανοποιητική αντιϊκή δραστηριότητα έναντι του rotavirus σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις συγκρινόμενες με τις απαιτούμενες του AZT. Υπάρχει η πιθανότητα ότι η τροποποίηση του συστατικού σακχάρου παίζει σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση αντιϊκής δραστηριότητας. Επιπροσθέτως, το αναποτελεσματικό 3'-φθορο-5'-θειοξυλοκυρανοσυλο ανάλογο της θυμίνης, αποκαλύπτει μεγαλύτερη αντιογκογόνα δραση έναντι κυττάρων από δερματικό μελάνωμα και MCF-7 μετά από τροποποίηση στο αντίστοιχο 3-φθορο-6-θειογλυκοκυρανοσυλο νουκλεοσίδιο (**8a**). Γενικεύοντας, τα νεοσυντεθειμένα νουκλεοσίδια φαίνεται να αποτελούν εκλεκτικούς αντιογκογόνους παράγοντες και αποτελεσματικούς καταστολείς ανάπτυξης καρκινώματος του κόλον.

Πίνακας 10. Αντιϊκή δραστηριότητα των ουσιών **8a**, **8b**, **8c** και AZT ενάντια στο στέλεχος RF του ιού rotavirus σε κύτταρα Caco-2 (IC₅₀, Μμ). Οι αναλογίες CC₅₀/IC₅₀ υπολογίστηκαν από τις τιμές του CC₅₀ που δίνονται στον πίνακα 11.

Όνομα Ουσίας	Πείραμα A ^a			Πείραμα B ^a		
	IC ₅₀		CC ₅₀ /IC ₅₀ ^b	IC ₅₀		CC ₅₀ /IC ₅₀ ^b
	mg/ml	μM		mg/ml	μM	
8a	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e
8b	n.e	n.e	n.e	0.00002	0.05	372
8c	0.00006	0.1	179	n.e	n.e	n.e
AZT	0.02	74.84	0.75 ^c	0.006	22.45	2.5 ^c

^a

Πείραμα A, εξουδετέρωση του ιού στο διάλυμα χωρίς επαφή, Πείραμα B, αναστολή μολυσματικότητας εξ επαφής του ιού

^b Οι αναλογίες CC₅₀/IC₅₀ υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τις τιμές CC₅₀ του πίνακα 11.

^c Οι αναλογίες CC₅₀/IC₅₀ για την ένωση AZT σε κύτταρα Caco-2= 65,1 μM

n.e = κανένα αποτέλεσμα

Πίνακας 11. Κυτταροτοξικό αποτέλεσμα (CC_{50} , μM) των ενώσεων **8a**, **8b**, **8c** και **5-φθοροουρακίλης (5-FU)** σε κύτταρα Caco-2, H4, από δερματικό μελάνωμα και MCF-7 κύτταρα, και αναστολή ανάπτυξης (IC_{50} , μM) σε Caco-2 και H4 κύτταρα.

Όνομα Ουσίας	Κυτταροτοξικό Αποτέλεσμα (CC_{50} , μM)				TSI*			Αναστολή ανάπτυξης (IC_{50} , μM)	
	H4	Caco-2	δερματικό μελάνωμα	MCF-7	Caco-2	δερματικό μελάνωμα	MCF-7	Caco-2	H4
8a	36.1	18.0	36.1	144.5	2.0	1.0	0.25	1.6	36.1
8b	74.6	18.6	37.3	149.4	4.0	2.0	0.5	1.7	37.3
8c	35.8	17.9	35.8	71.5	2.0	1.0	0.5	1.6	35.8
5FU	3843.8	384.4	46.1	768.8	10	83.4	5.0	1.5	1.5

TSI*: Δείκτης ογκογόνου εκλεκτικότητας (CC_{50} σε H4 κύτταρα/ CC_{50} σε καθορισμένα κύτταρα ξενιστές).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. John McMurry, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2000 : 151-152, 905
2. Lubert Stryer, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997:347-354
3. M. C.T. Hartman, J. K. Coward, J. Am. Chem. Soc., 2001, 124, 10036
4. Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1997: 4, 26
5. Wen Zhou, Giuseppe Gumina, Youhoon Chong, Jianing Wang, Raymond F, Schinazi, and Chung K. Chu, Synthesis, Structure- Activity Relationships, and Drug Resistance of 3-D-3-Fluoro-2,3-Unsaturated Nucleosides as Anti-HIV Agents, *Med. Chem.*, **2004**, 47 (13), 3399-3408
6. Vander, M. D. Sherman, Ph. D.Luciano, Ph. D. M. Tsakoulos, Φυσιολογία του ανθρώπου, μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού
7. <http://www.hafreeclinics.org/drugs/index.html>
8. http://www.idenix.com/science/sci_nucleosides.html
9. http://www.mpcfaculty.net/ron_rinehart/30B/NA24/basetabl.html
10. Chong Y., Gumina G., Mathew JS., Schinazi RF, Chu CK, 1-2,3-Didehydro-2,3-dideoxy-3-fluoronucleosides: synthesis, anti- HIV activity, chemical and enzymatic stability, and mechanism of resistance, *Med. Chem.* 2003 Jul 17;46(15):3245-56
11. John M. Clark, Jr and Robert L. Switzer, Πειραματική βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1992
12. Benjamin Lewin, *Genes* VIII:6- 8
13. Christopher J. Burns, Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Hepatitis C Virus (HCV), *Current Medicinal Chemistry- Anti-Infective Agents*, Vol. 4, No. 2, 2005.
14. <http://www.answers.com/topic/zidovudine-1>
15. <http://www.answers.com/topic/zidovudine?hl=zidovudine>
16. <http://www.pathmicro.med.sc.edu/lecture/chemo.html>
17. <http://www.answers.com/topic/ddi>
18. <http://www.answers.com/topic/ddc>
19. Christophe Thibaudeau, Janez Plavec, and Jyoti Chattopadhyaya, A New Generalized Karplus-Type Equation Relating Vicinal Proton- Fluorine Coupling Constants to H-C-C-F Torsion Angles, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 4967-4982

20. Miura, S. ; Yosimura, Y. ; Endo, M. ; Machida, H. ; Matsuda, A. ; Tanaka, M. ; Sasaki, Antitumor activity of a novel orally effective nucleoside, 1-(2-deoxy-2-fluoro-4-thio- β -D-arabino-5-FUranosyl)cytosine, *Cancer Lett.* **1998**, *129*, 103-110
21. Harada, K. ; Matulic-Adamic, J. ; Price, R.W.; Schinazi, R.F.; Watanabe, K.A.; Fox, J.J, Nucleosides. 139. Synthesis and Anticytomegalovirus and Antiherpes Simplex Virus Activity of 5-Modified Analogues of 2-Fluoroarabinosylpyrimidine Nucleosides, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 226-229
22. <http://www.answers.com/topic/lamivudine>
23. Najim A. Al-Masoudi, Synthesis of 3-Deoxy-5-s-ethyl-5-thio- β -D-erythro-pento-5-FUranosylthymine as potential Antitumor Agent, *Tetrahedron Lett.*, 1999, *40*, 4795-4796.
24. Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Van Meervelt, L.; Rozenski, J.; Wiebe, L.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Claes, P.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 826-835.
25. Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12757-12765.
26. Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3154-3163
27. Ostrowski, T.; Wroblowski, B.; Busson, R.; Rozenski, J.; De Clercq, E.; Bennet, M. S.; Champness, J. N.; Summers, W. C.; Sanderson, M. R.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4343-4353
28. Kyeong Lee, Yongseok Choi, Elizabeth Gullen, Susan Schlueter- Wirtz, Raymond F. Schinazi, Yung-Chi Cheng, and Chung K. Chu, Synthesis and Anti-HIV and Anti- HBV Activities of 2-Fluoro-2,3-unsaturated-L-Nucleosides, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*(7), 1320-1328
29. Jose G. Fernandez-Bolanos ; Najim A. Al-Masoudi ; Ines Maya, Sugar Derivatives Having Sul5-FU_r in the Ring, *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, Vol 57
30. Foster, A. B.; Hems, R.; Webber, J. M. *Carbohydrate Res.* **1967**, *5*, 292-301
31. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 980-987
32. Tsoukala, E.; Agelis, G.; Dolinsek, J.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3241-3247

