



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

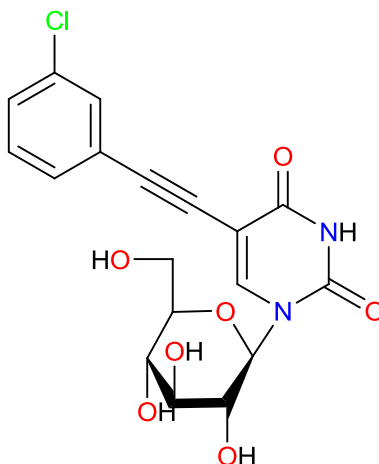
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

ΞΕΝΙΔΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**C5 – ΑΛΟΓΟΝΟΦΑΙΝΥΛΟ ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ:
ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ**



ΛΑΡΙΣΑ 2015

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

C5 – ΑΛΟΓΟΝΟΦΑΙΝΥΛΟ ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κοριώτης Δημήτριος — Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μπαλατσός Νικόλαος — Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

Η παρούσα
μεταπτυχιακή εργασία
αφιερώνεται στον πατέρα μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα καθηγητή τον κο Κομιώτη Δημήτριο, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το ιδιαίτερα αυτό ενδιαφέρον θέμα καθώς και για τις πολύτιμες και εποικοδομητικές υποδείξεις του.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα κα. Δημοπούλου Αθηνά για όλα τα εφόδια που μου μεταβίβασε και χρειάστηκαν ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή καθώς και στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια κα. Μαντά Στυλιανή για την πολύτιμη βοήθεια της.

Τέλος, δε θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την υποδοχή και το κλίμα συνεργασίας που φρόντισαν να επικρατεί καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσης μεταπτυχιακής εργασίας.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1	Υδατάνθρακες	7
1.1.1	Σχηματισμός ημιακετάλης	9
1.2	Νουκλεοζίτες	11
1.2.1	Τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών	14
1.3	Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες	17
1.4	Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες	25
1.5	Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη	28
2	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
2.1	Στόχος-Σκοπός μελέτης	31
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
3.1	Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων	37
3.2	Γενική Μεθοδολογία	38
3.2.1	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography) 38	
3.2.2	Χρωματογραφία στήλης	39
3.2.3	Ξήρανση διαλυτών	40
3.2.4	Ταυτοποίηση ενώσεων	40
3.3	Μέθοδοι	42
3.3.1	Επισκόπηση της συνθετικής οδού	42
3.3.2	Μεθοδολογία της σύνθεσης	43
3.3.3	Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D- γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (2)	44
3.3.4	Σύνθεση των 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D- γλυκοπυρανοζυλο)-5-(-2 ή -3-χλωροβενζολιο) της ουρακίλης (3), (4), 1- (2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(-3,4- διφθοροβενζολιο) της ουρακίλης (5) και 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β- D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(4-βρωμοβενζολιο) της ουρακίλης (6)	45
3.3.5	Σύνθεση των 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- αλογονοφαινυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης 7, 8, 9 και 10	47
4	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹ H NMR..... Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	48
5	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νουκλεοζιδικά ανάλογα είναι μόρια τα οποία προκύπτουν από δομικές τροποποιήσεις των φυσικών νουκλεοζιδίων που ανήκουν στην γενικότερη κατηγορία των β -*N*-γλυκοζιδίων και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου και των ιογενών λοιμώξεων.

Μεγάλος αριθμός νουκλεοζιδικών αναλόγων δρουν ως αντιμεταβολίτες, ανταγωνίζονται τους φυσικούς νουκλεοζίτες και αλληλεπιδρούν με ενδοκυττάριους στόχους με σκοπό την πρόκληση της κυτταροτοξικότητας. Άλλοι πάλι ενσωματώνονται κατά την αντιγραφή ή την επιδιόρθωση του DNA, οδηγώντας έτσι στον τερματισμό της διαδικασίας σύνθεσής του ενώ άλλοι λειτουργούν ως αναστολείς της πολυμεράσης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η συνθετική πορεία νέων νουκλεοζιδικών αναλόγων, με τροποποίηση στη βάση, ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί και αντιικοί παράγοντες.

Τα νέα μόρια που συντέθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας είναι τα πυρανονουκλεοζιδικά ανάλογα που φέρουν στην 5-θέση της ουρακίλης: 1-χλωρο-2-αιθυνυλοβενζολιο, 3-χλωρο-1-αιθυνυλοβενζολιο, 3,4-διφθοροβενζολιο ακετυλενιο, 1-βρωμο-4-αιθυνυλοβενζολιο.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατάνθρακες

Η κατηγορία των ενώσεων που είναι γνωστή ως υδατάνθρακες πήρε αυτή τη γενική ονομασία από κάποιες αρχικές παρατηρήσεις που έδειχναν ότι συχνά έχουν το γενικό τύπο $C_x(H_2O)_y$. Θεωρήθηκαν δηλαδή «ενυδατωμένοι άνθρακες».

Οι απλοί υδατάνθρακες είναι επίσης γνωστοί και ως *σάκχαρα* ή *σακχαρίτες* (από το Λατινικό *saccharum* = ζάχαρη), μια και έχουν γλυκιά γεύση. Στην ίδια αιτία οφείλεται και η κατάληξη *-όζη* στο όνομα των περισσοτέρων από αυτούς. Έτσι υπάρχουν ονόματα όπως *σακχαρόζη* για την συνηθισμένη ζάχαρη, *γλυκόζη* για το κύριο ζάχαρο του αίματος και *μαλτόζη* για το ζάχαρο της βύνης.

Μία άλλη ταξινόμηση, πιο ορθολογική αυτή την φορά, μια και αποδίδει την ή τις χαρακτηριστικές ομάδες, είναι εκείνη η οποία στηρίζεται στον ορισμό: υδατάνθρακες είναι πολυυδροξυαλδεΐδες ή πολυυδοξυκετόνες ή καλύτερα ενώσεις που υδρολύμενες δίνουν πολυυδροξυαλδεΐδες ή πολυυδοξυκετόνες. Παρόλο που η διάκριση αυτή στηρίζεται στις χαρακτηριστικές ομάδες, δεν είναι πλήρως ικανοποιητική. Και αυτό διότι οι περιεχόμενες ομάδες $C=O$ (καρβονύλιο) και $-OH$ είναι κατά κύριο λόγο με μορφή *ημιακεταλών* ή *ακεταλών* (ή *ημικεταλών* και *κεταλών* αντίστοιχα για πολυυδοξυκετόνες).

Μία επιπλέον ταξινόμηση στηρίζεται στα προϊόντα της υδρόλυσης των υδατανθράκων. Έτσι οι υδατάνθρακες οι οποίοι δεν υδρολύονται σε μικρότερους, απλούστερους υδατάνθρακες λέγονται μονοσακχαρίτες. Υδατάνθρακες όταν υδρολύονται δίνουν ανά μόριό τους δύο μόρια μονοσακχαριτών ονομάζονται δισακχαρίτες. Εκείνοι που δίνουν τρία μόρια τρισακχαρίτες κ.ο.κ. Υδατάνθρακες οι οποίοι υδρολύμενοι δίνουν 2 έως 10 μόρια μονοσακχαριτών καλούνται επίσης ολιγοσακχαρίτες. Αν δίνουν μεγάλο (>10) αριθμό μονοσακχαριτών, χαρακτηρίζονται πολυσακχαρίτες.

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται μερικοί συνηθισμένοι υδατάνθρακες με την ονομασία, τη δομή και την προέλευσή τους.

Όνομα	Κατηγορία	Δομή	Απαντάται
Γλυκόζη	Μονοσακχαρίτης Αλζοεξόζη	$C_6H_{12}O_6$	Σε φυτά και ζώα
Φρουκτόζη	Μονοσακχαρίτης Κετοεξόζη	$C_6H_{12}O_6$	Φρούτα και μέλι
Σακχαρόζη	Δισακχαρίτης	Γλυκόζη -- Φρουκτόζη	Σακχαροκάλαμο, παντζάρια
Μαλτόζη	Δισακχαρίτης	Γλυκόζη -- Γλυκόζη	Βύνη
Λακτόζη	Δισακχαρίτης	Γλυκόζη -- Γαλακτόζη	Γάλα
Άμυλο	Πολυσακχαρίτης	Αλυσίδα μονάδων γλυκόζης	Πατάτα, σιτάρι, αλεύρι
Κυτταρίνη	Πολυσακχαρίτης	Αλυσίδα μονάδων γλυκόζης	Ξύλο, βαμβάκι

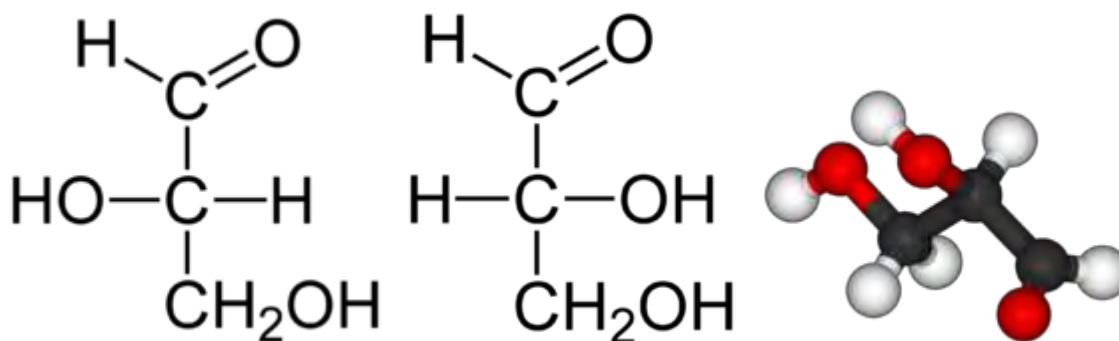
Οι υδατάνθρακες είναι το πλέον άφθονο διαδεδομένο οργανικό υλικό των φυτών. Είναι η κύρια πηγή ενέργειας των ζώντων οργανισμών (σάκχαρα και άμυλο). Πέρα από αυτό όμως, στα φυτά και σε ορισμένα ζώα χρησιμοποιούνται ως το βασικό συστατικό του σκελετικού ιστού (κυτταρίνη). Αυτή είναι η βασική αποστολή της κυτταρίνης, που βρίσκεται στο ξύλο, στο βαμβάκι, στο λινάρι. Συναντάμε τους υδατάνθρακες σε όλες τις δραστηριότητες της καθημερινής μας ζωής. Το χαρτί αυτού του βιβλίου είναι φτιαγμένο κατά κύριο λόγο από κυτταρίνη. Το ίδιο και το βαμβάκι των ρούχων μας και το ξύλο κάθε οικοδομής. Το αλεύρι από το οποίο φτιάχνεται το ψωμί είναι κυρίως άμυλο, το οποίο επίσης είναι συστατικό πολλών τροφών, όπως η πατάτα, το ρύζι, τα φασόλια και τα μπιζέλια.

Κατάταξη των μονοσακχαριτών.

Οι μονοσακχαρίτες κατατάσσονται με βάση δύο κριτήρια :

1. Τον **αριθμό των ατόμων C** που υπάρχουν στο μόριό τους και
2. Την **χαρακτηριστική ομάδα**, αν αυτή είναι αλδεύδο- ή κέτο- ομάδα. Έτσι ένας μονοσακχαρίτης που περιέχει 3 άτομα C είναι μία *τριόζη*, 4 άτομα C μία *τετρόζη* κ.ο.κ. Σημαντικές εδώ είναι οι *εξόζες* με 6 άτομα C.

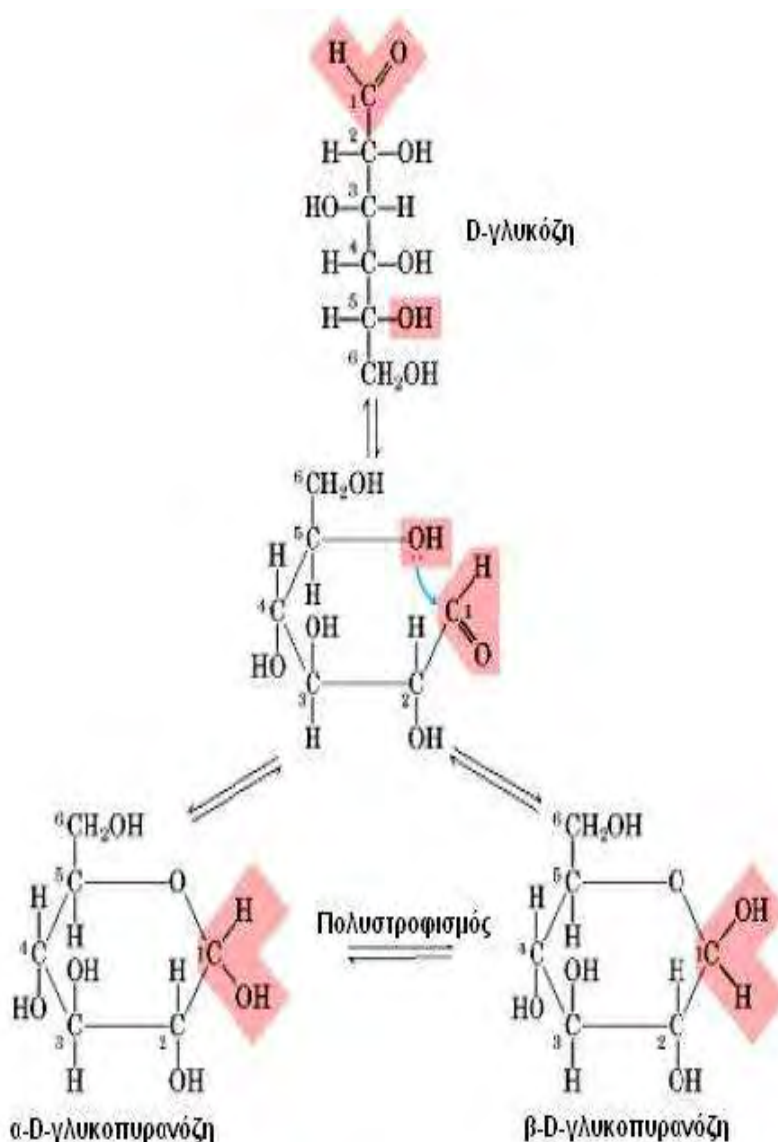
Αλδόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης ο οποίος, πέρα των υδρο-ξυομάδων, περιέχει και μία αλδεϋδομάδα. Αντίστοιχα, αν περιέχει μία κετονομάδα, είναι μία κετόζη. Αυτές οι δύο ταξινομήσεις συχνά συνδυάζονται. Έτσι π.χ. μία αλδόζη με 4 C είναι μία *αλδοτετρόζη*. Μία κετοπεντόζη θα είναι ένας υδατάνθρακας με μία κετονομάδα και με 5 C. Με ανεπτυγμένους δομικούς ή συντακτικούς τύπους θα είναι :



1.1.1 Σχηματισμός ημιακετάλης

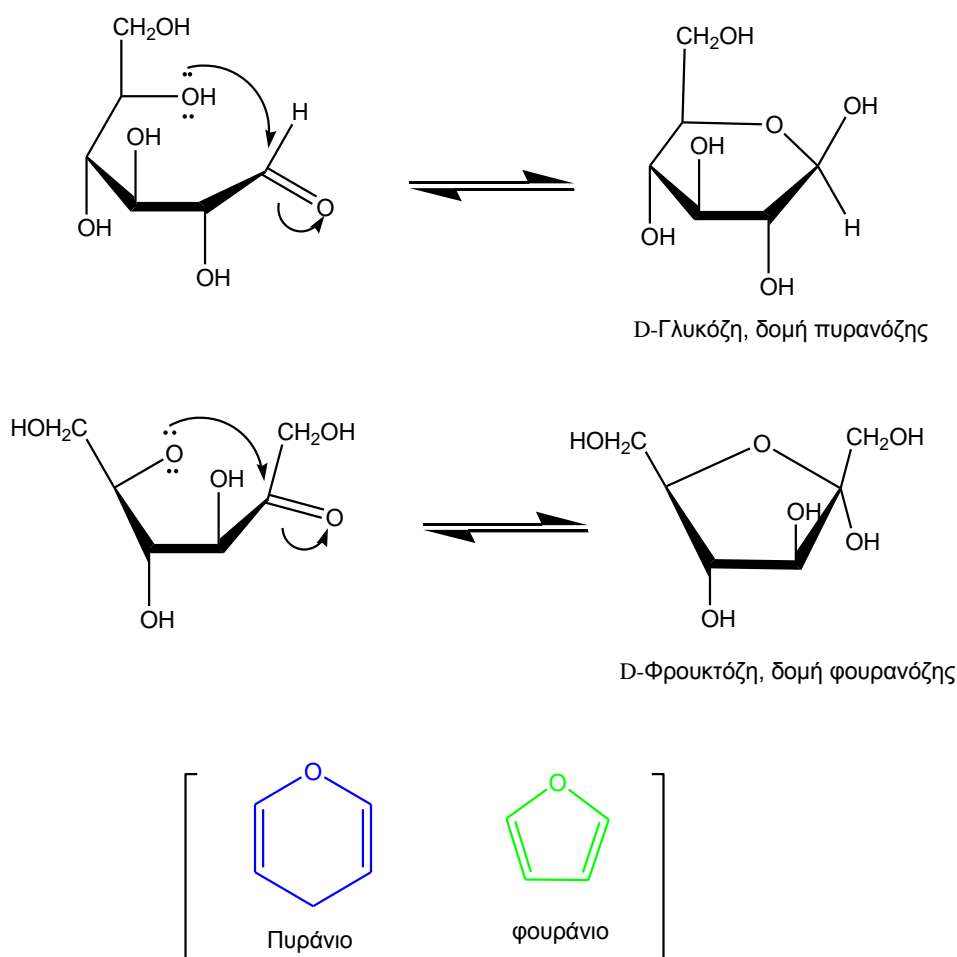
Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρχουν σε δυο μορφές. Στη μορφή της ανοικτής αλυσίδας και την κυκλοποιημένη τους μορφή. Η ανοικτή αλυσίδα μπορεί να κυκλοποιηθεί όταν μια καρβονυλική ομάδα του μορίου τους αντιδρά με μια ομάδα υδροξυλίου, προς δημιουργία ημιακετάλης. Αυτή η ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη οδηγεί στην δημιουργία φουρανοζών (πενταμελείς δακτύλιοι) ή πυρανοζών (εξαμελείς δακτύλιοι). Οι πενταμελείς και εξαμελείς ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα σε δομές ανοικτής και κλειστής αλυσίδας. Η κυκλοποίηση των σακχάρων μέσω ημιακετάλης είναι μεγάλης σημασίας διότι με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα πρόσθετο στερεογονικό κέντρο στο μόριο και παρουσιάζεται το φαινόμενο της ανωμέρειας (άτομο άνθρακα με τέσσερις διαφορετικούς υποκαταστάτες). Στην περίπτωση της γλυκόζης ο άνθρακας C-1 είναι ανωμερής με αποτέλεσμα να μπορούν να

σχηματίζονται δύο στερεοχημικές δομές : της α -D-γλυκοπυρανόζης και της β -D-γλυκοπυρανόζης (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Κυκλοποίηση μονοσακχαρίτη μέσω αντίδρασης ημιακετάλης

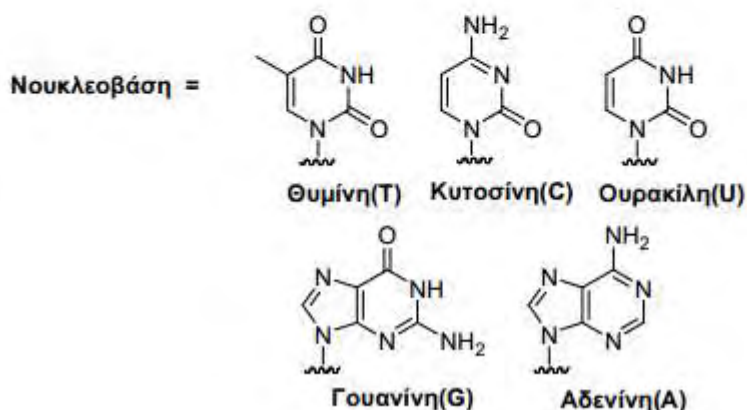
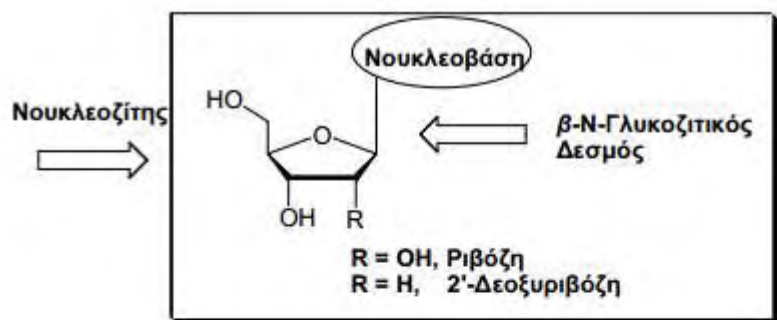
Οι κυκλικές δομές της πυρανόζης και της φουρανόζης καθώς και του πυρανίου και του φουρανίου παρατίθενται στο σχήμα 1.



Σχήμα 1. Κυκλικές δομές πυρανόζης και φουρανόζης.

1.2 Νουκλεοζίτες

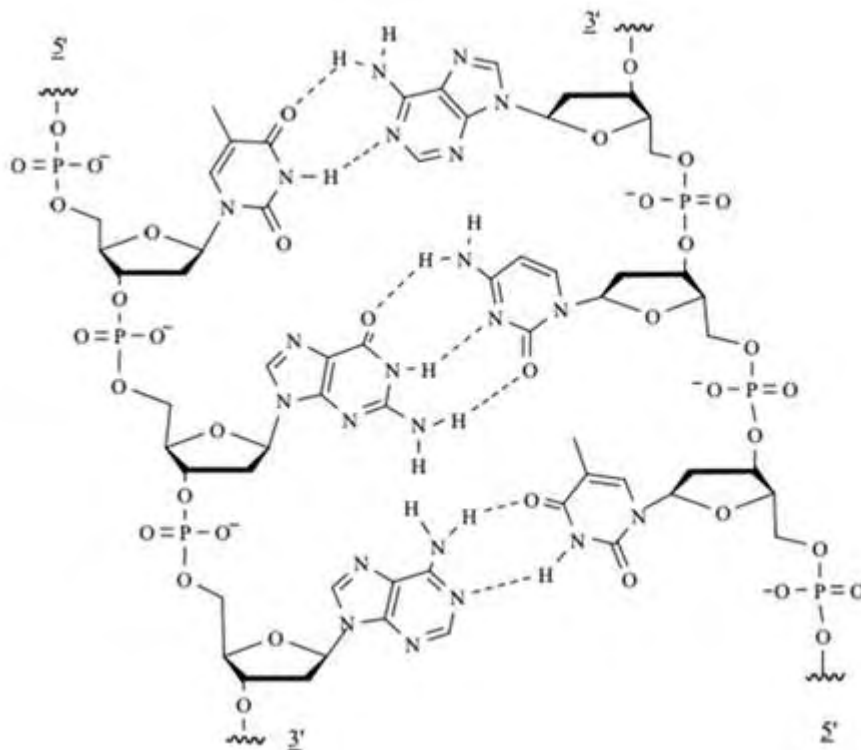
Οι νουκλεοζίτες αποτελούν θεμελιώδη συστατικά των βιολογικών συστημάτων. Η βασική δομή ενός φυσικού νουκλεοζίτη αποτελείται από δύο μέρη: Μια πεντόζη, η οποία είναι είτε 2'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη είτε β-D-ριβοφουρανόζη, οπότε ο νουκλεοζίτης καλείται δεοξυριβονουκλεοζίτης ή ριβονουκλεοζίτης, αντίστοιχα (Σχήμα 2). Μια πουρινική (αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδινική (θυμίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη) βάση, η οποία ενώνεται με το σάκχαρο με ένα β-N-γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ του πρώτου αλδεϋδικού άνθρακα της πεντόζης και του N-1 ατόμου της πυριμιδίνης ή του N-9 της πουρίνης.



Σχήμα 2 : Μια πεντόζη, η οποία είναι είτε 2'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη είτε β-D-ριβοφουρανόζη, οπότε ο νουκλεοζίτης καλείται δεοξυριβονουκλεοζίτης ή ριβονουκλεοζίτης

Οι νουκλεοζίτες μεταβολίζονται προς τις αντίστοιχες τριφωσφορικές τους δομές από τις κυτταρικές κινάσες και τα προκύπτοντα νουκλεοτίδια ενώνονται μεταξύ τους με 3'-5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, οδηγώντας στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων με τη βοήθεια πολυμερασών (Chu και Baker, 1993, Townsend, 1988). Αν το νουκλεϊκό οξύ περιέχει ριβόζη ως υδατάνθρακα, ονομάζεται ριβονουκλεϊνικό οξύ (Ribonucleic acid, RNA), ενώ αν περιέχει 2'-δεοξυ-ριβόζη ονομάζεται δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (Deoxyribonucleic acid, DNA). Τα DNA και RNA έχουν όλες τις αζωτούχες βάσεις κοινές, εκτός της θυμίνης (T) που βρίσκεται μόνο στο DNA και της ουρακίλης (U) που υπάρχει στο RNA. Στο σχήμα 3 απεικονίζεται η δομή ενός τμήματος του DNA, όπου παρατηρείται η συμπληρωματικότητα που χαρακτηρίζει τις δύο αλυσίδες (κλώνους του DNA) ως προς την ακολουθία των βάσεων (A-T, G-C), ενώ

παράλληλα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των νουκλεοβάσεων και συνδέουν τους δύο κλώνους.



Σχήμα 3. Η δομή ενός τμήματος του DNA, όπου παρατηρείται η συμπληρωματικότητα που χαρακτηρίζει τις δύο αλυσίδες.

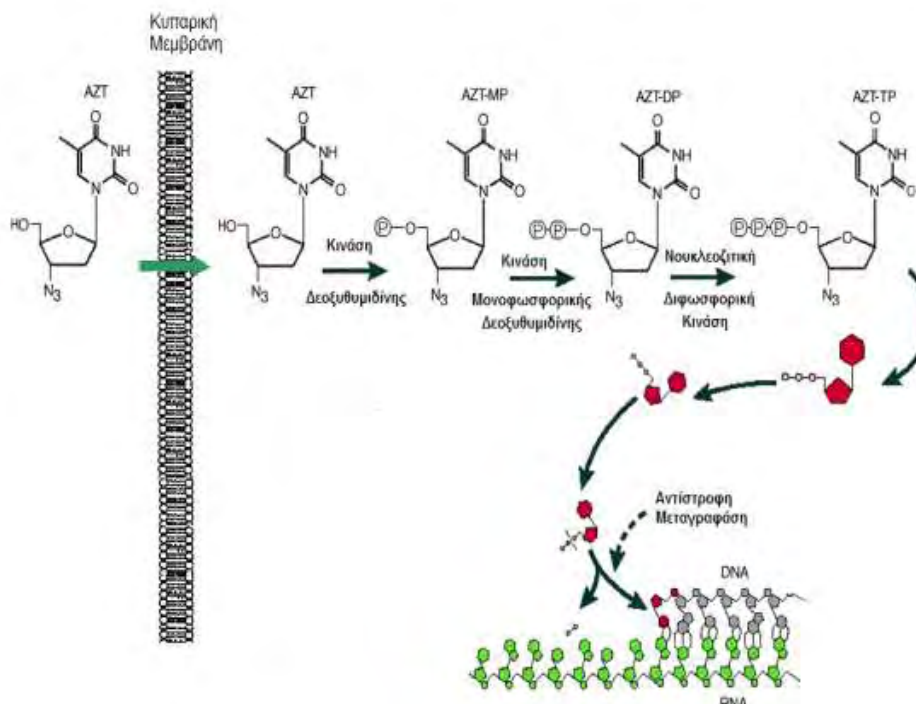
Οι νουκλεοζίτες αναγνωρίστηκαν ως τα βασικά δομικά συστατικά του DNA και του RNA από τις πρωτοποριακές έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στα τέλη του 19ου αιώνα και στις αρχές του 20ου . Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τους νουκλεοζίτες πολλαπλασιάστηκε κατά τη δεκαετία του 1940 και αυξήθηκε κατακόρυφα τα επόμενα χρόνια, όπου συστηματικές μελέτες πάνω στη χημική σύνθεση και τις βιολογικές ιδιότητες της συγκεκριμένης κατηγορίας ενώσεων οδήγησαν σε μερικές σημαντικές δομές νουκλεοζιτικών αναλόγων με εξαιρετική βιολογική και φαρμακευτική εφαρμογή (Mikhailorulo και Miroshnikov, 2010). Από τότε ένα πλήθος αναλόγων φυσικών νουκλεοζιτών έχουν συντεθεί, λαμβάνοντας χώρα διάφορες τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα του σακχάρου, όσο στον ετεροκυκλικό δακτύλιο της βάσης. Σύγχρονες έρευνες έχουν καταδείξει ότι τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να δράσουν ως αντιμεταβολίτες, ανταγωνιζόμενοι τους φυσικούς νουκλεοζίτες και να αλληλεπιδράσουν με ενδοκυττάριους στόχους με αποτέλεσμα να προκαλέσουν σημαντική αντιική ή αντικαρκινική δράση. Χημικά τροποποιημένοι νουκλεοζίτες χρησιμοποιούνται κλινικά εδώ και σχεδόν μισό αιώνα και αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο για τη θεραπευτική αντιμετώπιση πολλών ιικών μολύνσεων ή διαφόρων μορφών καρκίνου. Η συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων παρουσιάζει ακόμα ισχυρή δυναμική και ανάπτυξη, καθώς τα τελευταία χρόνια έχουν εγκριθεί από τη Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) αρκετά φάρμακα που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο (Jordheim et al. 2013). Επιπλέον, μελέτες έχουν φωτίσει τους πιθανούς μηχανισμούς αντιικής και αντικαρκινικής τους δράσης αποδίδοντας σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τους μεταβολικούς μετασχηματισμούς τους, συμπεριλαμβανομένου της μεταβολικής ενεργοποίησης και απενεργοποίησής τους.

1.2.1 Τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών.

Οι φαρμακευτικές ενώσεις ασκούν την δράση τους αλληλεπιδρώντας με κάποιο μοριακό στόχο, όπως μόρια-μεταφορείς, πρωτεΐνες, ένζυμα αλλά και νουκλεϊκά

οξέα, επηρεάζοντας δραστικά τη φυσιολογία της λειτουργίας των κυττάρων και του οργανισμού. Στην περίπτωση που ο μοριακός στόχος του φαρμάκου είναι ενδοκυτταρικός, είναι απαραίτητη η εισαγωγή του στο εσωτερικό του κυττάρου, ώστε να μπορέσει εν συνεχεία να δράσει. Η εκλεκτική επίδραση ενός φαρμάκου με το μοριακό του στόχο αποτελεί ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό, καθώς έτσι αποφεύγεται η παρεμβολή του σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου και τα επακόλουθα προβλήματα τοξικότητας που πιθανόν να προκύψουν. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η πλειονότητα των νουκλεοζιτικών αναλόγων που παρουσιάζουν αντιικές και/ή αντικαρκινικές ιδιότητες δεν είναι από μόνα τους ενεργά, αλλά αποκτούν τη δραστικότητα τους αφού μεταφερθούν στο κύτταρο και μεταβολιστούν από ενδοκυτταρικά ένζυμα. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι υδρόφιλα μόρια και η παθητική τους διάχυση είναι περιορισμένη, οπότε σε πολλές περιπτώσεις απαιτούνται εξειδικευμένες πρωτεΐνες-μεταφορείς για να διαπεράσουν τις πλασματικές μεμβράνες και να εισαχθούν στα κύτταρα. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες επιδεικνύουν ένα μοτίβο έκφρασης που εξαρτάται από τον ιστό και επηρεάζει τη φαρμακολογική δράση των τροποποιημένων νουκλεοζιτών (Pastor-Anglada et al. 1998). Εφόσον τα ανάλογα νουκλεοζιτών εισαχθούν στο κύτταρο, φωσφορυλιώνονται προς τα τριφωσφορικά τους παράγωγα από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα. Η πρώτη φωσφορυλίωση οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού (MP) νουκλεοζίτη και πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας νουκλεοζιτικής κινάσης. Ακολουθεί η μετατροπή του MP-νουκλεοζίτη προς την αντίστοιχη 5'-διφωσφορική και τριφωσφορική του δομή, η οποία καταλύεται από τη νουκλεοτιδική και νουκλεοζιτική διφωσφορική κινάση, αντίστοιχα (Wagner et al. 2000). Στη συνέχεια, οι ενεργές τριφωσφορικές δομές των αναλόγων είτε ενσωματώνονται και τροποποιούν τα μακρομόρια του DNA και του RNA, είτε παρεμβάλλονται σε διάφορα ένζυμα που σχετίζονται με τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, όπως οι DNA πολυμεράσες, επάγοντας μ' αυτόν τον τρόπο την κυτταροτοξική ή την αντιική τους δράση (Galmarini et al. 2002, Berdis 2008). Ένας κοινός μηχανισμός αντιικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωση τους στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας τη διακοπή της επιμήκυνσής της. Η

συγκεκριμένη δράση παρουσιάζεται στο χαρακτηριστικό παράδειγμα του φαρμάκου AZT, όπου ο αζιδο-νουκλεοζίτης προσλαμβάνεται αρχικά από το κύτταρο, ενεργοποιείται μεταβολικά στην τριφωσφορική του δομή και στη συνέχεια δρα ως αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης τερματίζοντας την αλυσίδα του ιικού DNA μετά τη σύνδεση του σε αυτή, καθώς απουσιάζει η 3'-υδροξυλο ομάδα και δεν μπορεί να ενωθεί με την 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου (De Clercq, 2004) (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Ο αζιδο-νουκλεοζίτης προσλαμβάνεται αρχικά από το κύτταρο, ενεργοποιείται μεταβολικά στην τριφωσφορική του δομή και στη συνέχεια δρα ως αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης τερματίζοντας την αλυσίδα του ιικού DNA μετά τη σύνδεση του σε αυτή.

Η εκλεκτικότητα ανάμεσα στην αντιική και την κυτταροτοξική δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων εξαρτάται από την εξειδίκευση του υποστρώματος των τριφωσφορικών τους δομών ως προς τις ιικές και κυτταρικές πολυμεράσες (Challand και Young 1997). Εκτός των πολυμερασών, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα δρουν ως αποτελεσματικοί αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες, μέσω

αναστολής και άλλων ενζύμων, όπως είναι η αφυδρογονάση της μονοφωσφορικής ινοσίνης και η συνθάση της τριφωσφορικής κυτιδίνης (De Clercq et al. 1991, Petrelli et al. 2013). Τα συγκεκριμένα ευρήματα προσφέρουν νέες ευκαιρίες θεραπευτικής δράσης, με την ανάπτυξη ενώσεων που θα στοχεύουν σε διαφορετικά ένζυμα και οι οποίες θα διαθέτουν συνεργιστική δράση με τους κλασικούς αναστολείς των πολυμερασών. Η εντυπωσιακή πρόοδος στην κατανόηση του τρόπου δράσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων, οδήγησε στη στοχευμένη σύνθεση παραγώγων με αποτελεσματικότερη φαρμακολογική δράση. Είναι γνωστό ότι τα νουκλεοζιτικά ανάλογα απενεργοποιούνται μέσω καταβολικών διαδικασιών, οι οποίες περιλαμβάνουν την απαμίνωση των νουκλεοζιδίων της κυτοσίνης και της αδερίνης από τις αντίστοιχες απαμινάσες, αλλά και την υδρόλυση του γλυκοζιτικού τους δεσμού από τις νουκλεοζιτικές φωσφορυλάσες (Langen 1975, Mikhailopulo 2007, Montgomery 1984, De Clercq 2002). Νέες γενιές νουκλεοζιτικών αναλόγων όπως Κλαδριβίνη, Χλωραφαβίνη, Φλουδαράβίνη διαθέτουν τα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά, ώστε να αυξηθεί η αντίσταση στην απαμίνωση της αδενοσίνης, βελτιώνοντας σημαντικά τη δραστηριότητά τους ως αντικαρκινικά φάρμακα (Mikhailopulo και Miroshnikov, 2010).

1.3 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.

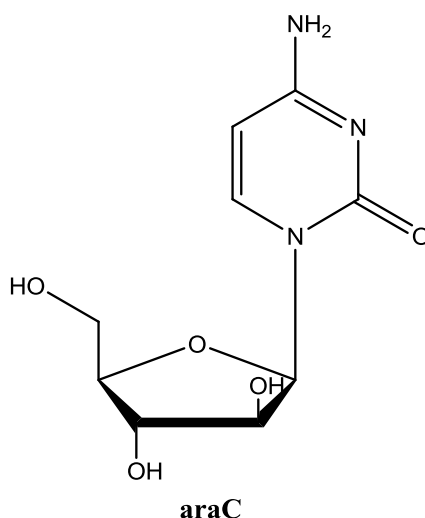
Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σ' έναν υγιή οργανισμό υπόκειται πάντα σε αυστηρές ρυθμίσεις, που επιτρέπουν στα κύτταρα να αυξηθούν, να διαφοροποιηθούν και να λειτουργήσουν αρμονικά. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις ρυθμίσεις αυτές, περιλαμβάνουν ένα σύστημα χημικών μηνυμάτων με τη διαμεσολάβηση, για παράδειγμα, ορμονών και συγκεκριμένων μεμβρανικών υποδοχέων. Τα κύτταρα σε καλλιέργεια, σταματούν την διαίρεσή τους όταν έρθουν σ' επαφή το ένα με το άλλο. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται και η μιτωτική διαίρεση ορισμένων κυττάρων συνεχίζεται ανεξέλεγκτα χωρίς να υπακούει σε περιοριστικούς κανόνες. Τα κύτταρα χάνουν τη διαφοροποιημένη μορφή τους και περνούν σε μια

αδιαφοροποίητη κατάσταση. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία όγκων ή καρκινωμάτων.

Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία διαθέτουν αυξημένη δραστικότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης.

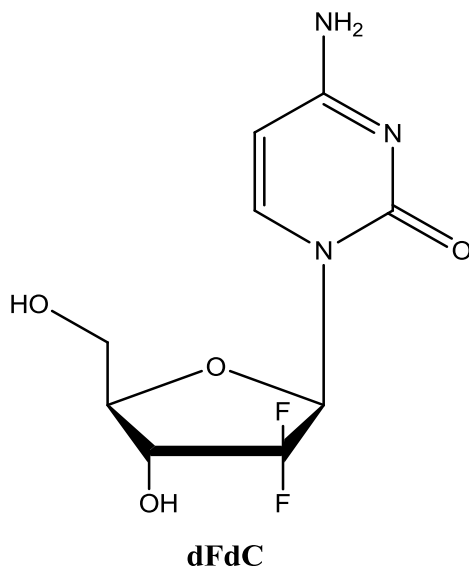
Πυριμιδινικά αλλά και πουρινικά νουκλεοζιδικά ανάλογα χρησιμοποιούνται ήδη σαν αντιμεταβολίτες έναντι του καρκίνου. Οι αντιμεταβολίτες είναι μια οικογένεια φαρμάκων που επηρεάζουν την ανάπτυξη του DNA και του RNA των καρκινικών κυττάρων.

Ένα από τα πρώτα πυριμιδινικά νουκλεοζιδικά ανάλογα που χρησιμοποιήθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας ήταν το cytarabine (araC ή 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη) (σχήμα 5) (Ellison et al. 1967).



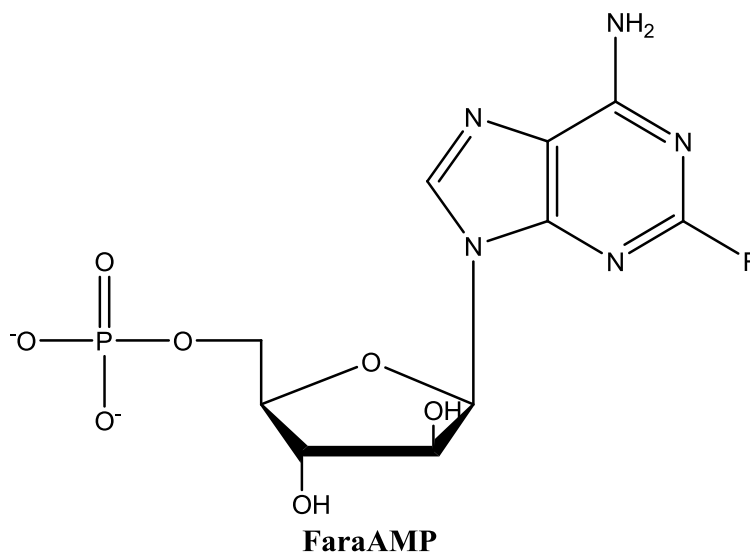
Σχήμα 5. Χημική δομή του **araC**

Η γεμισταμπίνη (gemcitabine ή dFdC) είναι ένα ακόμη πυριμιδινικό ανάλογο που παρουσιάζει αντικαρκινική δράση (Plunkett et al. 1995). Είναι ανάλογο του cytarabine, το οποίο έχει τροποποιηθεί στην 2' θέση του δακτυλίου της ριβόζης με υποκατάσταση από 2 άτομα φθορίου (Σχήμα 6).



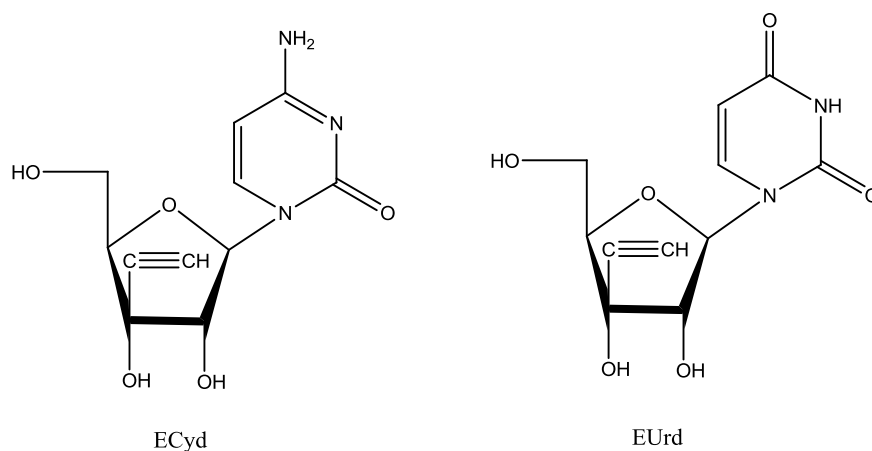
Σχήμα 6. Χημική δομή του **gemcitabine (dFdC)**

Ένα από τα πρώτα πουρινικά νουκλεοζιδικά ανάλογα η 9-β-*D*-αραβινοφουρανοζυλαδερίνη (araA) απορρίφθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας λόγω της χαμηλής διαλυτότητας και της γρήγορης απαμίνωσής της από την απαμινάση της αδενοσίνης. Η προσθήκη ενός ατόμου φθορίου στο τμήμα της αδερίνης αύξησε την αντίσταση στην απαμινάση της αδενοσίνης και η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας βελτίωσε τη διαλυτότητα του αναλόγου, συνθέτοντας την 5'-μονοφωσφορική 9-β-*D*-αραβινοφουρανοζυλο-2-φθοροαδερίνη (fludarabine), (FaraAMP) (Matsuda et al. 2004). Το fludarabine είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας κατά της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων (σχήμα 7).



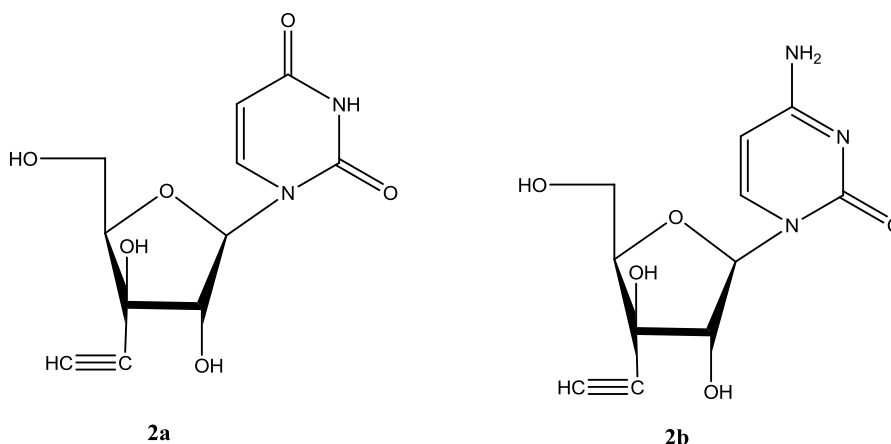
Σχήμα 7. Χημική δομή του **fludarabine**

Σε μια μελέτη το 1996 του Hideshi Hattori διαπιστώθηκε ότι οι νουκλεοζίτες της ουρακίλης και της κυτοσίνης (σχήμα 8) που φέρουν αιθυνολο ομάδα ως διακλαδισμένη αλυσίδα στο τμήμα του σακχάρου εμφανίζουν εξαιρετικές αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι ECyd και EUrd δοκιμάστηκαν *in vitro* σε 36 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η ECyd ήταν αποτελεσματική σε 22 κυτταρικές σειρές, ενώ αντίστοιχα η EUrd σε 12. Και οι δύο νουκλεοζίτες είχαν παρόμοιο φάσμα παρεμποδιστικής λειτουργίας και συνεπώς παρόμοιο μηχανισμό αντικαρκινικής δράσης. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ECyd και EUrd έχουν πιο ισχυρή αντικαρκινική λειτουργία ενάντια σε καρκινικούς όγκους απ' ό,τι κάποιες άλλες ουσίες που συχνά χρησιμοποιούνται κλινικά (Matsuda et al. 1996). Μάλιστα η EUrd παρουσίασε επίσης σημαντική αντικαρκινική λειτουργία ενάντια σε ανθρώπινους όγκους, που εισήχθησαν σε ποντίκια σαν ξενομοσχεύματα.



Σχήμα 8. Χημικές δομές της **ECyd** και **EUrd**

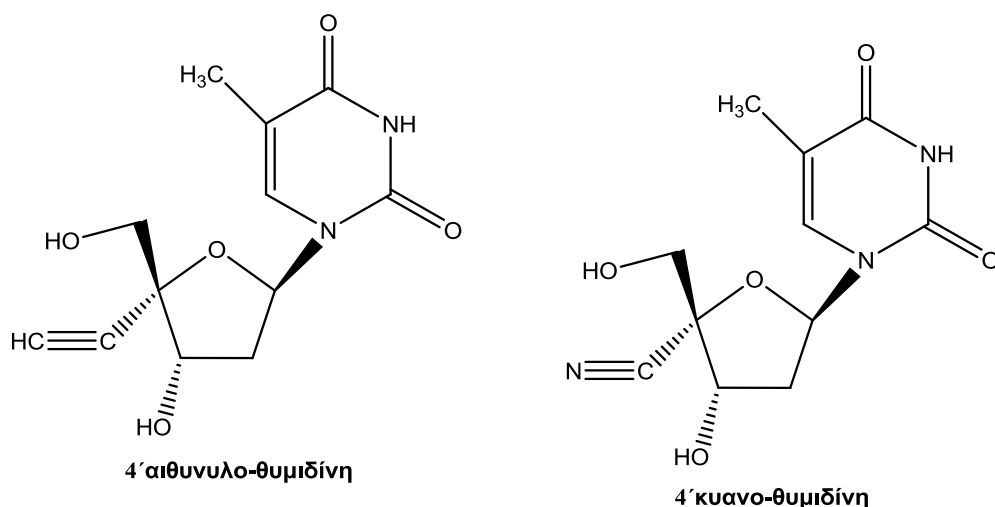
Μελετήθηκε επιπλέον η σχέση μεταξύ δομής και λειτουργίας των ECyd και EUrd (Hideshi et al. 1998). Συντέθηκαν οι 1-(3'-C-αιθυνυλο-β-*D*-ξυλο-πεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη και ουρακίλη, οι οποίες είναι 3'επιμερή των ECyd και EUrd (Σχήμα 9). Η βιολογική δράση αυτών των ξυλο παραγώγων ήταν σημαντικά μικρότερη, παρόλο που είχαν τόσο την αιθυνυλο ομάδα όσο και το υδροξύλιο στην 3'-θέση του σακχάρου. Αποδεικνύεται δηλαδή ότι η παρουσία μιας 2',3'- cis διόλης στην ECyd και EUrd με μια ριβο-διαμόρφωση ήταν απαραίτητη για την κυτταροτοξικότητά τους.



Σχήμα 9. 3'επιμερή των **ECyd** και **EUrd**

Όσον αφορά το μεταβολισμό της, η ECyd φωσφορυλιώνεται στα κύτταρα προς το μονοφωσφορικό, διφωσφορικό και τελικά τριφωσφορικό της παράγωγο (Makoto et al. 2003). Το πρώτο βήμα από την ECyd στην ECMP καταλύεται από την ουριδινική/κυτιδινική κινάση. Το τριφωσφορικό παράγωγο της κυτιδίνης (ECTP) είναι ένας ενεργός μεταβολίτης της ECyd και παρεμποδίζει την RNA πολυμεράση I, II και III χωρίς εκλεκτικότητα προκαλώντας παρεμπόδιση της σύνθεσης του RNA. Η ECyd κατανέμεται σε μεγάλο ποσοστό σε καρκινικούς ιστούς (in vivo), στους οποίους η ενεργοποίηση της ουριδινικής/κυτιδινικής κινάσης είναι υψηλότερη από τους κανονικούς ιστούς. Αυτά τα δεδομένα θα μπορούσαν να εξηγήσουν την υψηλή ενεργοποίηση και τη χαμηλή τοξικότητα της ECyd ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνου.

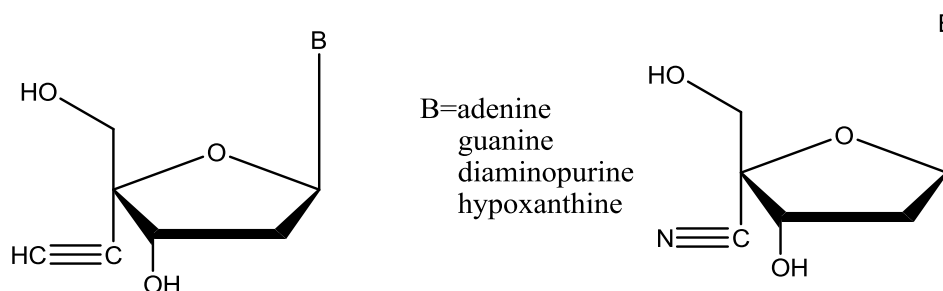
Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον προέκυψε και από την ανακάλυψη της ισχυρής αντι- HIV δράσης των 4'-κυανο και 4'-αιθυνολο αναλόγων της θυμιδίνης (Σχήμα 10) (O-Yang et al. 1992 και Kodama et al. 2001).



Σχήμα 10. Δομή 4'- υποκατεστημένων νουκλεοζιτών της θυμίνης

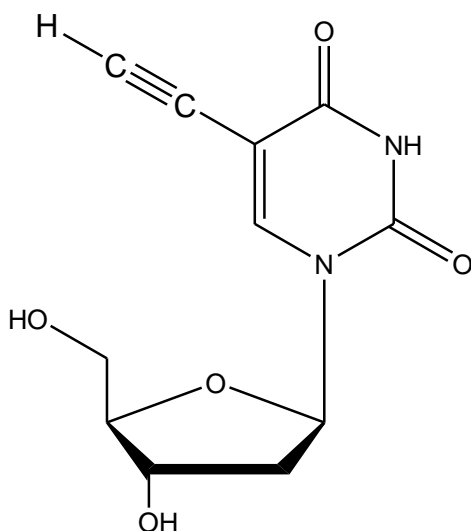
Οι πουρανο 2'-δεοξυ νουκλεοζίτες που διαθέτουν μια αιθυνολο ή κυανο ομάδα στον 4' άνθρακα του σακχάρου, εμφανίζουν επίσης πολύ ισχυρή αντι- HIV

δράση, παραμένοντας ενεργοί απέναντι σε ανθεκτικά στελέχη του HIV (Satoru et al. 2003). Μάλιστα, επειδή τα 4-*C*-κυανο σάκχαρα έχουν χαμηλή δραστικότητα στις αντιδράσεις τους με τις βάσεις, προτιμάται να παρασκευάζονται τροποποιώντας ήδη τους αντίστοιχους νουκλεοζίτες στην 4' θέση. Η δομή των νουκλεοζιτών απεικονίζεται στο σχήμα 11.



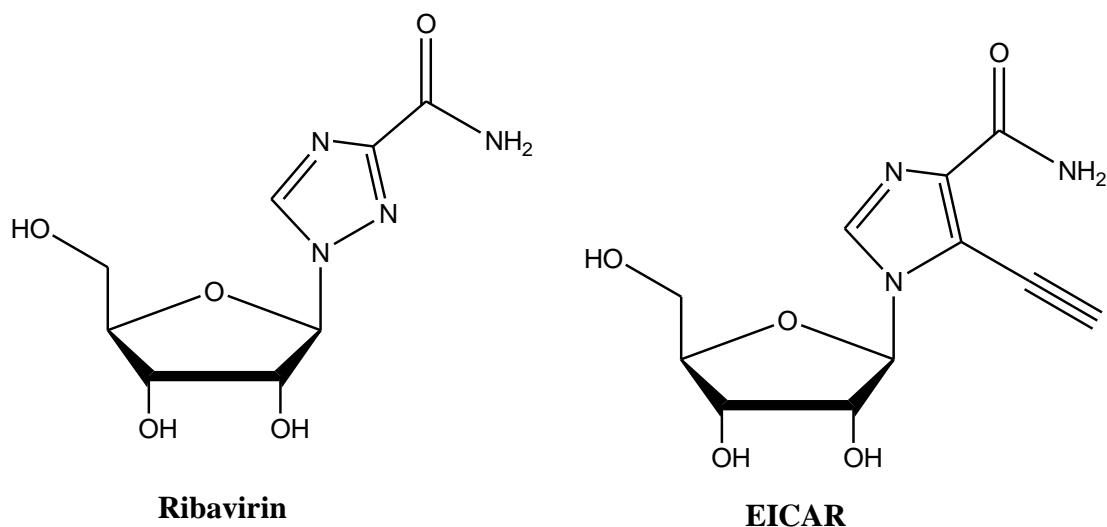
Σχήμα 11. Δομές των αιθυνυλο και κυανο πουρανο 2'-δεοξυ νουκλεοζιτών

Η παρουσία της αιθυνυλο ομάδας στην ετεροκυκλική βάση οδήγησε επίσης σε νουκλεοζίτες με έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Η 5-αιθυνυλο-2'-δεοξυ ουριδίνη (σχήμα 12), παρουσίασε αυξημένη δράση έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών του ανθρώπινου μαστού MCF-7 και MDA-MB-231, ξεπερνώντας την αντίστοιχη της 5-φθορο ουρακίλης (Srinivasarao et al. 2007).



Σχήμα 12. Χημική δομή της 5-αιθυνυλο-2'-δεοξυ ουριδίνη

Επιπλέον, το 5 - αιθυνυλο - 1 - β - *D* - ριβοφουρανοζυλο - 1^H - ιμιδαζολο - 4 καρβοξαμίδιο (EICAR) που επίσης φέρει την αιθυνυλο ομάδα στην ετεροκυκλική βάση παρουσιάζει εξαιρετικές αντιϊκές ιδιότητες. Συγκεκριμένα η αντιϊκή του λειτουργία είναι από 10 έως 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του ribavirin (Minakawa et al. 1999), του μόνου διαθέσιμου φαρμάκου που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C σε συνδυασμό με το interferon- α (De Clercq et al. 2002). Επιπλέον της αντιϊκής του δράσης, το EICAR επιδεικνύει αντικαρκινική λειτουργία και εμποδίζει την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών κυττάρων *in vitro* (Minakawa et al. 1991). Στο παρακάτω σχήμα 13 απεικονίζονται οι δομές των Ribavirin και EICAR.



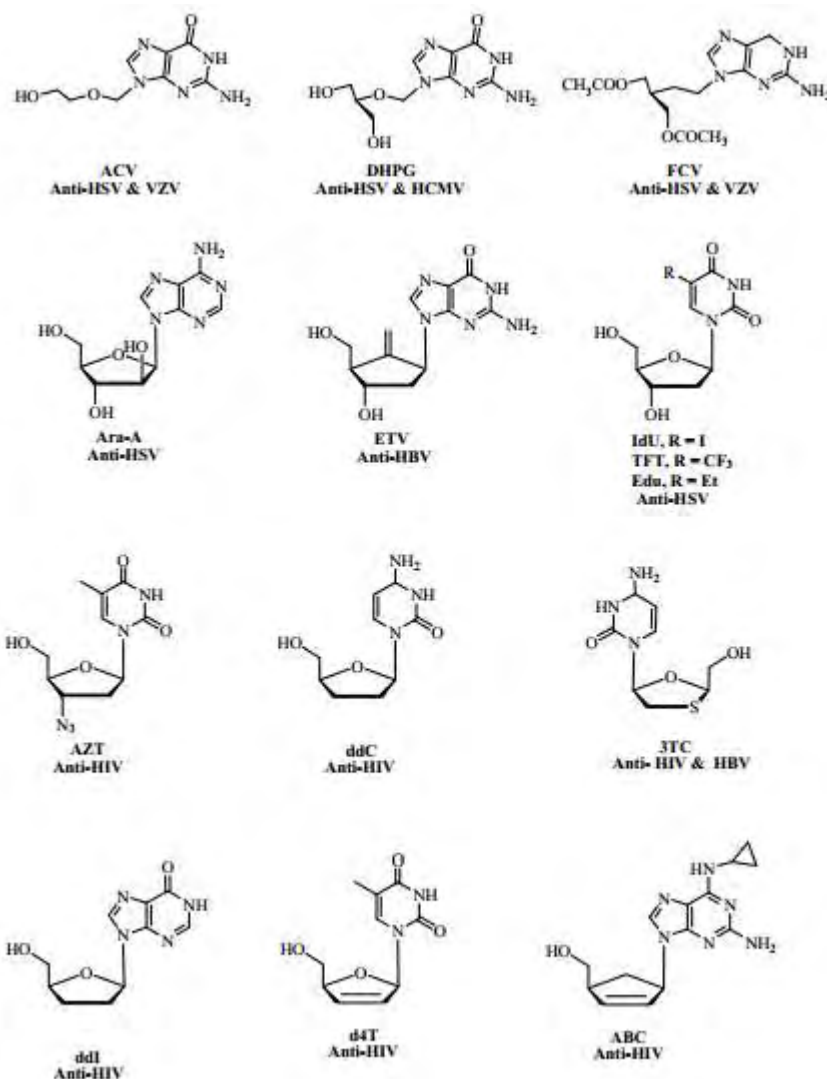
Σχήμα 13. Χημικές δομές του **Ribavirin** και **EICAR**

1.4 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες

Οι ιικές μολύνσεις παρέμεναν για μεγάλο χρονικό διάστημα ένα παγκόσμιο ιατρικό πρόβλημα λόγω της έλλειψης αποτελεσματικής θεραπείας καθώς και της απουσίας κατάλληλης στρατηγικής πρόληψης ή εμβολιασμού. Εντούτοις, οι συστηματικές μελέτες αρκετών δεκαετιών στον τομέα των νουκλεοζιτών επέφεραν σημαντικές αλλαγές στη θεραπεία των περισσότερων ιικών μολύνσεων, με τα νουκλεοζιτικά ανάλογα να αποτελούν μερικές από τις πλέον επιτυχημένες αντιικές ενώσεις που κυκλοφορούν μέχρι σήμερα. Τα αντιικά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση του ιού του απλού έρπητα (Herpes Simplex Virus, HSV) που περιλαμβάνει τα υποείδη HSV1 και HSV2, του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (Human Cytomegalovirus, HCMV), του ιού της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV) και του ιού της ηπατίτιδας (Hepatitis Virus) (De Clercq, 2005, Mathé και Gosselin, 2006, Komiotis et al. 2008, Manta et al. 2013). Η βιολογική τους δράση συχνά καθορίζεται από διάφορες τροποποιήσεις της (2-δεοξυ)-D-ριβοφουρανόζης που περιλαμβάνει αντιστροφή των διαμορφώσεων της υδροξυλομάδας, υποκαταστάσεις με διάφορες συνθετικές ομάδες, καθώς και

αποσπάσεις και διασπάσεις του δακτυλίου οι οποίες οδηγούν σε διδαιοξυ και σε άκυκλους νουκλεοζίτες, αντίστοιχα. Άλλες ενδιαφέρουσες δομικές τροποποιήσεις περιλαμβάνουν την αντικατάσταση του ενδοκυκλικού οξυγόνου του σακχάρου από μια μεθυλενο- ομάδα αλλά και την επιπλέον προσθήκη ενός ετεροατόμου στο δακτύλιο του σακχάρου (Mansour και Storer, 1997). Από το 1963, όταν ο William Prusoff εισήγαγε την 5-ιωδο-2'- δεοξουριδίνη για τη θεραπεία του απλού ιού του έρπητα του κερατοειδούς έως σήμερα, νουκλεοζιτικά ανάλογα όπως Ιδοξουριδίνη (Idoxuridine, IdU), Τριφλουριδίνη (Trifluridine, TFT), Ασεδουρίδη (Acedurid, Edu), Βιδαραβίνη (Vidarabine, Ara-A), Γκανσικλοβίρη (Ganciclovir, DHPG) και Φαμισκλοβίρη (Famciclovir, FCV) έχουν επιτυχημένα χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ιών όπως ο HSV, ο HCMV και ο ιός του ερπητίζωστήρα (varicella-zoster virus, VZV) (Σχήμα 14). Ανάμεσα στα διάφορα αντιικά που αναπτύχθηκαν για τη θεραπεία των ερπητοϊών, η Ακυκλοβίρη (Aciclovir, ACV) θεωρείται ως ένα από τα πλέον αποτελεσματικά λόγω της αυξημένης εκλεκτικότητας που διαθέτει αλλά και της μικρής της τοξικότητας (De Clercq και Field, 2006) (Σχήμα 14). Καθοριστική επίσης αποδείχτηκε η συμβολή των νουκλεοζιτικών αναλόγων στην καταπολέμηση της ασθένειας του AIDS (Acquired Immuno Deficiency syndrome), καθώς μετά την έγκριση της 2',3'- διδαιοξυ-3'- αζιδοθυμιδίνης (AZT) μια σειρά νουκλεοζιτών όπως Ζαλσιταβίνη (Zalcitabine, ddC), Διδανοσίνη (Didanosine, ddl), Σταβουδίνη (Stavudine, d4T), Λαμβουδίνη (Lamivudine, 3TC) και Αμπκαβίρη (Abacavir, ABC) χρησιμοποιήθηκαν στη θεραπεία του HIV (Cihlara και Rayb, 2010) (Σχήμα 14). Τα συγκεκριμένα μόρια χαρακτηρίζονται ως νουκλεοζιτικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors, NRTIs), έχοντας σαν μοριακό-στόχο το συγκεκριμένο ένζυμο-κλειδί της ιικής αναπαραγωγής και θα πρέπει να μετατραπούν στην τριφωσφορική τους δομή για να ασκήσουν τη βιολογική τους δράση. Μεταξύ των NRTIs, η Λαμβουδίνη και η Εντεκαβίρη (Entecavir, ETV) είναι εγκεκριμένα φάρμακα από τον FDA, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας Β (HBV). Οι συγκεκριμένες ενώσεις, παρόλο που δεν μπορούν να εξαλείψουν την μόλυνση, εμποδίζουν αποτελεσματικά την αναπαραγωγή του ιού,

ελαχιστοποιώντας μ' αυτό τον τρόπο τις ηπατικές βλάβες. Παρά τα σημαντικά αυτά επιτεύγματα, συνεχής είναι η ανάγκη ανακάλυψης νέων αντιικών νουκλεοζιδικών αναλόγων, προκειμένου να αντιμετωπιστούν διάφορα προβλήματα, όπως η μη μεταβολική τους σταθερότητα, οι τοξικές παρενέργειες, καθώς και η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιικών στελεχών και κατ' επέκταση νεοεμφανιζόμενων ιικών ασθενειών.

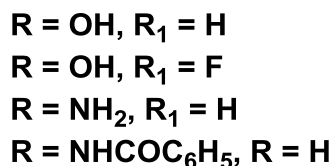


Σχήμα 14.

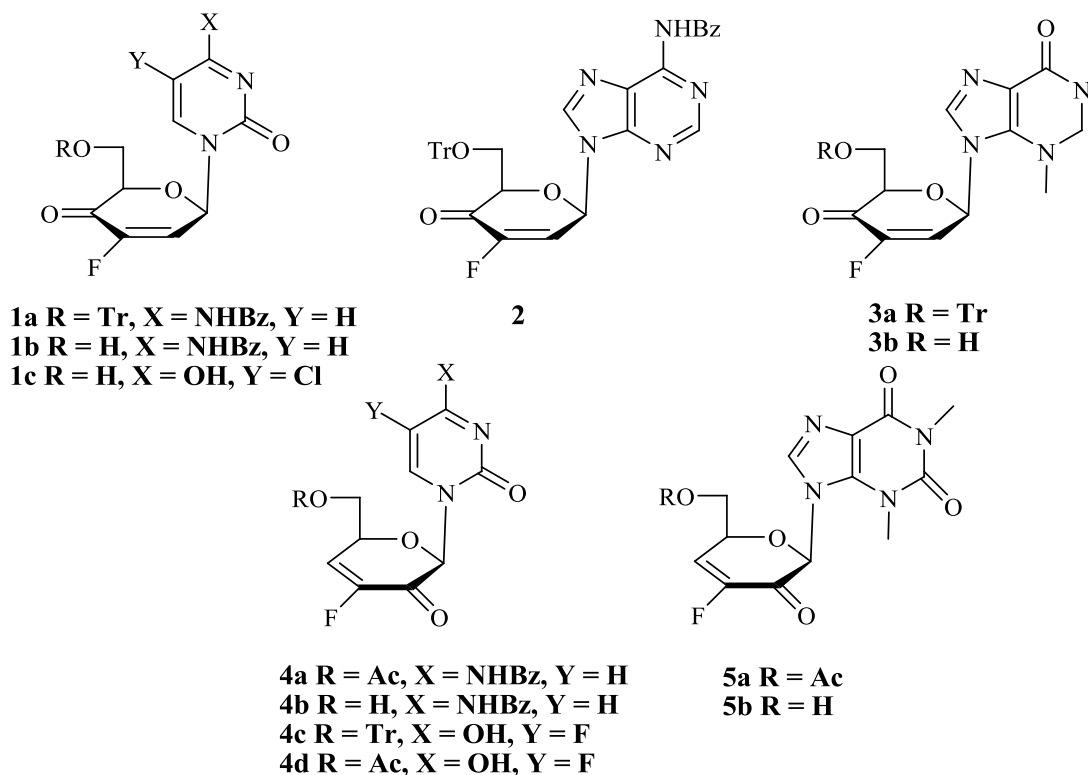
1.5 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν κυρίως στη χρήση νουκλεοζιτικών αναλόγων που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη και φέρουν τη β-απεικόνιση. Η σπουδαιότητα των πεντοζών αναγνωρίστηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως συστατικά των νουκλεϊκών οξέων. Όμως, ορισμένα προβλήματα που προέκυψαν από τη χρήση των φουρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως ο ανεπαρκής μεταβολισμός προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, η χημική ή ενζυματική απενεργοποίησή τους, η τοξικότητα, η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και όγκων και τέλος ο μικρός χρόνος ημιζωής και κατά συνέπεια χρόνος δράσης τους, έστρεψαν το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντιικής δράσης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων και ειδικότερα αυτών που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η έρευνα για την ανακάλυψη αντιικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είχε μείνει αρκετά βήματα πίσω σε σχέση με αυτή των βιολογικώς ενεργών νουκλεοζιτών με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίους.

Στο εργαστήριο της Οργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έχουν συντεθεί φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Manta S. *et al*, 2007), οι οποίοι έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν αποτελεσματικά τη δραστικότητα της PARN (poly(A) specific ribonuclease), ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(A) ουράς) (Σχήμα 15). Τα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπες ενώσεις για την ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν την PARN (poly(A) specific ribonuclease (Balatsos N. A. *et al*, 2009).



Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Manta S. *et al*, 2007) καθώς και άλλοι ανάλογοι πυρανονουκλεοζίτες (Leclercq E. *et al*, 1992, Khan A. R. *et al*, 2001, Ollapally A. P. *et al*, 1999, Egron M. J. *et al*, 2002) έχουν αξιολογηθεί για τις αντιικές και τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες (ενώσεις **1-5**, Σχήμα 16). Αξιοσημείωτη είναι η αντιική δράση έναντι του εντεροϊού (rotavirus), που επέδειξαν οι ενώσεις **1a,b**, **2** και **4a,b** (Σχήμα 16).



Σχήμα 16.

2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

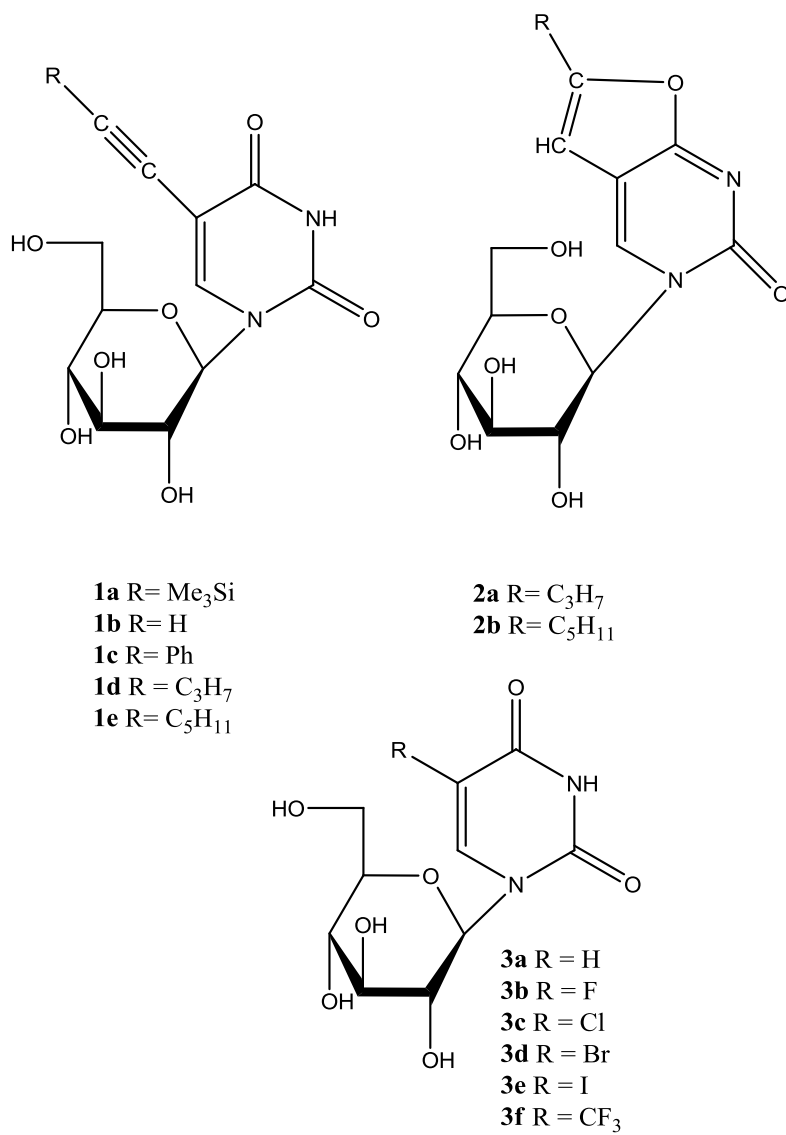
2.1 Στόχος-Σκοπός μελέτης

Η ανάγκη για την εύρεση νέων χημειοθεραπευτικών ουσιών, με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες καθώς και η ραγδαία και συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά, πληθώρας φαρμάκων που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο.

Εκτεταμένες μετατροπές έχουν γίνει τόσο στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης όσο και στο τμήμα του σακχάρου για την εύρεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με καλύτερη βιολογική δράση.

Όπως ήδη αναφέραμε από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία έτη, νέες τάξεις φούρανο-νουκλεοζιτών με τροποποιημένη βάση, όπως οι C5-υποκατεστημένοι νουκλεοζίτες πυριμιδίνης έχουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιϊκές και αντικαρκινικές.

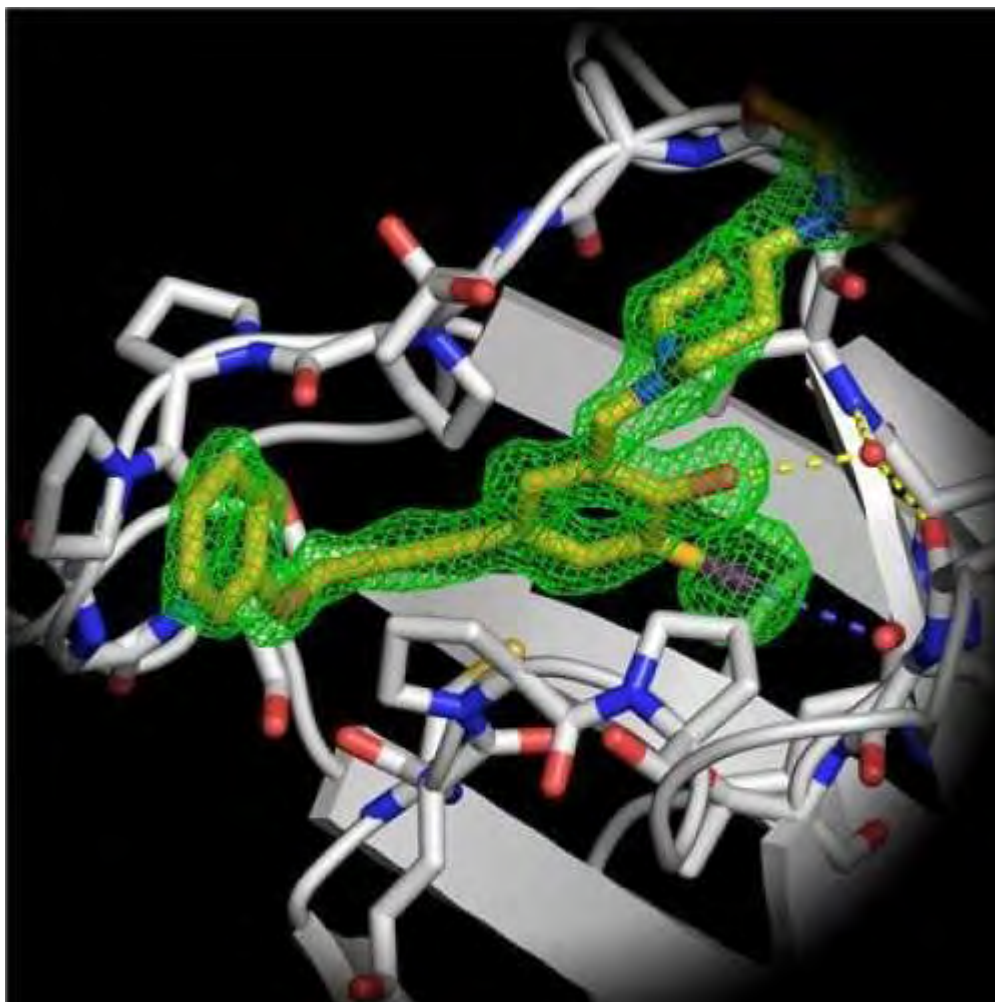
Βασιζόμενοι στα ανωτέρω, στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματός μας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των C5-αλογόνο- και C5-αλκύνυλο-γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης, (Σχήμα 17) οι οποίοι αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Επιπλέον οι C5-αλκύνυλο-γλυκοπυρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης, έχουν επιδείξει αξιόλογη ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης διάφορων καρκινικών κυτταρικών σειρών και συγκεκριμένα ο νουκλεοζίτης που φέρει φαινολικό δακτύλιο στην 5-θέση της ουρακίλης αποδείχτηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικός έναντι της ανάπτυξης καρκινικών κυτταρικών σειρών L1210, CEM, HeLa σε τιμές IC₅₀ που κυμαίνονται στα 5-6 μM.



Σχήμα 17.

Τα αλογόνα - ιδίως χλώριο, βρώμιο και ιώδιο - έχουν μια μοναδική ιδιότητα, η οποία τους επιτρέπει να επηρεάσουν θετικά την αλληλεπίδραση μεταξύ μόριων. Αυτός ο «δεσμός αλογόνου» έχει χρησιμοποιηθεί στον τομέα της έρευνας των υλικών, της μηχανικής των κρυστάλλων και στην νανοτεχνολογία για κάποιο χρονικό διάστημα, αλλά μόλις τώρα να βρήκε εφαρμογή στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Αυτοί οι δεσμοί αλογόνου καθιστούν δυνατή την αναγνώριση μορίων, το οποίο μπορεί να είναι χρήσιμο στη θεραπεία της νόσου, επηρεάζοντας τη

βιολογική δομή του στόχου. (Rainer Wilcken, *Journal of the American Chemical Society*, 2012)



Σχήμα 18. Μέρος της κρυσταλλικής δομής του μεταλλαγμένου καταστολέα του όγκου p53 που συνδέεται με ένα μικρό μόριο που αλληλεπιδρά με τη σύνδεση rocket μέσω ενός δεσμού αλογόνου (μωβ διακεκομμένη γραμμή). Οι ενώσεις της νέας κατηγορίας ουσιών επανενεργοποιεί τον p53 στα προσβεβλημένα καρκινικά κύτταρα.

Το 85% των φαρμακευτικών παραγόντων και βιταμινών περιλαμβάνουν χλώριο. Πολλά φάρμακα απαιτούν χλώριο, φθόριο ή βρώμιο για να είναι αποτελεσματικά. Το ceclor και το Ionabid χρησιμοποιούνται για να θεραπεύσουν μολύνσεις ωτών. Το vancomycin είναι ένα φυσικό αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται για την

αντιμετώπιση μολύνσεων ανθεκτικών στην πενικιλίνη. Το χλωριοβενζόλιο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση φαρμάκων όπως τα phenobarbital, benzedrine, and Demerol.

Εκτιμάται ότι το 20% των φαρμακευτικών προϊόντων περιέχει φθόριο, περιλαμβάνοντας αρκετά από τα ευρύτερα καταναλωόμενα φάρμακα. Μερικά παραδείγματα περιλαμβάνουν την 5-φθορουρακίλη, τη φθορεξιδίνη (Prozac), την παροξετίνη (Paxil), την κιπροφλαξακίνη (Cipro), τη μεφλοκουΐνη και τη φλουκοναζόλη. Τα συγκριτικά οφέλη των σκευασμάτων αυτών προκύπτουν επειδή ο δεσμός C-F, που περιέχουν, είναι σχετικά αδρανής.

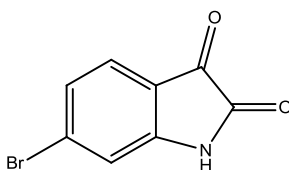
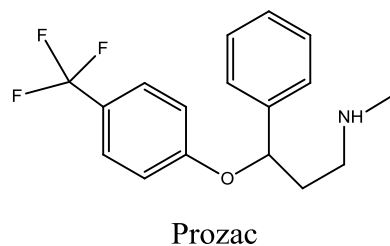
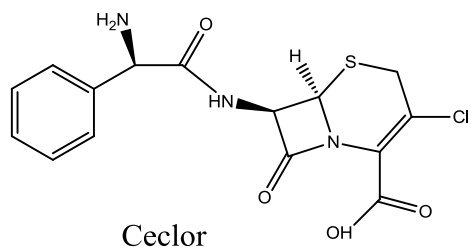
Το CECLOX είναι αντιβιοτικό το οποίο ανήκει στην ομάδα των ημισυνθετικών κεφαλοσπορινών 2ης γενεάς και προορίζεται για από του στόματος χορήγηση. Οι in vitro δοκιμασίες έχουν δείξει ότι η βακτηριοκτόνος δράση της κεφακλόρης οφείλεται στην αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. (www.galinos.gr).

Το PROZAC (φλουοξετίνη) είναι ένα αντικαταθλιπτικό που ανήκει κατηγορία φαρμάκων των εκλεκτικών αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRI) . Χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία της μείζονος κατάθλιψης, ιδεο-ψυχαναγκαστικής διαταραχής και διαταραχή πανικού.

Δρα αναστέλλοντας την απορρόφηση του νευροδιαβιβαστή της σεροτονίνης στον εγκέφαλο. Ρύθμιση της ποσότητας της σεροτονίνης βοηθά τα κύτταρα του εγκεφάλου να μεταδίδουν μηνύματα το ένα στο άλλο, με αποτέλεσμα μία καλύτερη και πιο σταθερή διάθεση. (<http://www.medicalnewstoday.com>)

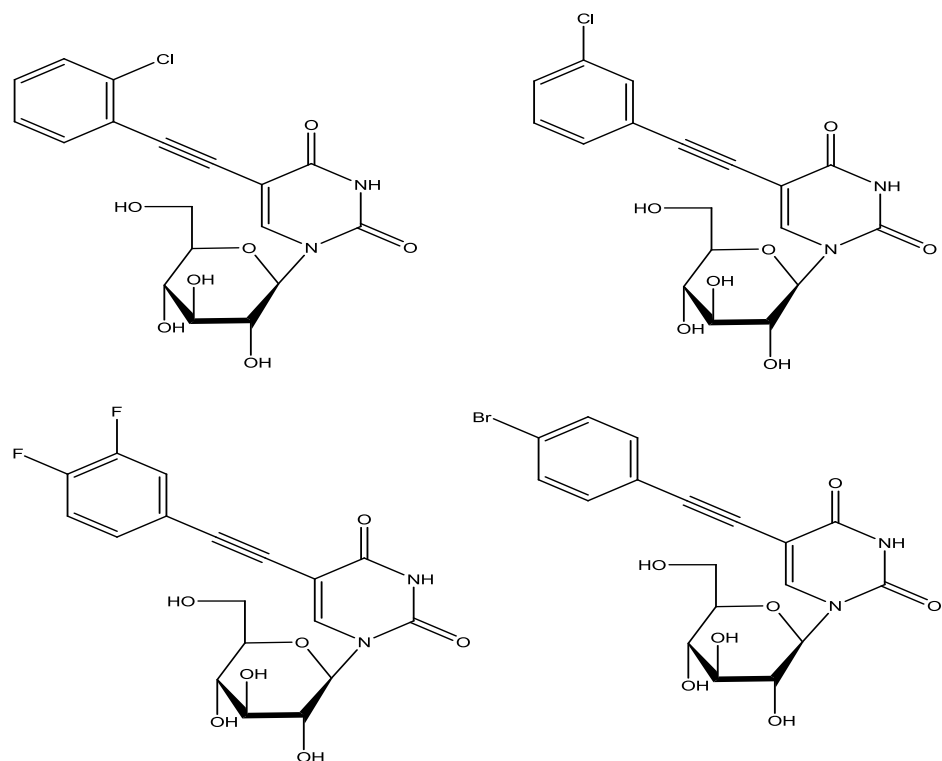
Η Ισατίνη είναι ένα ενδογενές φυσικό προϊόν το οποίο ταυτοποιήθηκε σε πολλούς οργανισμούς και διαθέτει ποικίλες βιολογικές ιδιότητες. Έχει αναφερθεί ότι 6-βρωμο ισατίνη παρουσίασε αντικαρκινική δραστηριότητα έναντι του ανθρώπινης κυτταρικής σειράς λεμφώματος.(Yao Zhou¹, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2013).

Μερικά παραδείγματα απεικονίζονται στο Σχήμα 19.



Σχήμα 19.

Με βάση τις αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες των ανωτέρω ενώσεων, θεωρήσαμε ενδιαφέρουσα την εισαγωγή των αλογόνων στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης και συγκεκριμένα στο φαινολικό δακτύλιο, με στόχο την εύρεση νέων αποτελεσματικότερων θεραπευτικών αναλόγων. Συνεπώς, στην παρούσα εργασία περιγράφεται η σύνθεση και η βιολογική αποτίμηση των C5 αλογονοφαίνυλο γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης. Οι δομές των μορίων που στόχευσε η συνθετική μας πορεία παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα :



Σχήμα 20.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιδικών αναλόγων

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

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

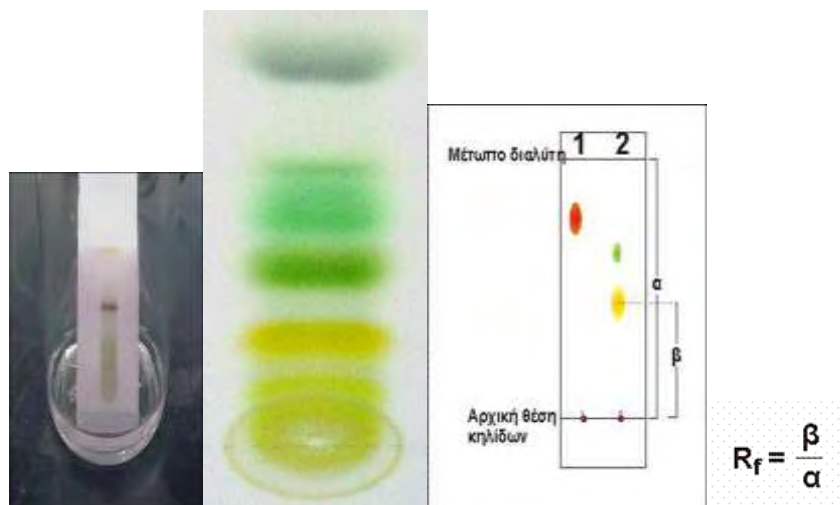
3.2 Γενική Μεθοδολογία

3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου λεπτής στιβάδας TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F24) πάχους 0.2mm.

Το διάλυμα του υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς θαλάμου στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Ακολουθώντας ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Έπειτα, 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 πολικότητα τους και εμφανίζονται 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 το λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη (α). Η τιμή R_f ενός συγκεκριμένου μορίου χρησιμεύει για την ταυτοποίηση μιας 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%.

Μια χρωματογραφία λεπτής στιβάδας απεικονίζεται στην σχήμα 21.



Σχήμα 21.

Η χρωματογραφία για το πείραμά μας διεκπεραιώθηκε χρησιμοποιώντας τα παρακάτω συστήματα διαλυτών :

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας / εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας / εξάνιο 60/40
- Διάλυμα Γ : διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 90/10

3.2.2 Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί αυτό είναι η χρωματογραφία στήλης και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merck grade).

Η χρωματογραφία στήλης είναι μια τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην προσρόφηση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μια ακίνητη φάση, συνήθως silica gel και την έκλουσή τους με μια ακίνητη φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών. Οι πολικές ουσίες προσροφούνται και κολλούν στην αφετηρία, κορυφή, της στήλης και χρειάζονται πιο πολικό διαλύτη για να προχωρήσουν. Οι άπολες ουσίες συνήθως προχωρούν ή κατεβαίνουν πιο

εύκολα ακόμη και με διαλύτες χαμηλής πολικότητας. Για την έκλουση των ουσιών από το silica gel χρειάζεται να γίνει έκλουση της στήλης με διάφορους διαλύτες αρχίζοντας από τους λιγότερο πολικούς και καταλήγοντας στους περισσότερο πολικούς.

Στη χρωματογραφία στήλης η στατική φάση τοποθετείται σε μια στήλη κατασκευασμένη από αδρανές υλικό (ύαλος, πηκτή πυριτίας, ανοξειδωτος χάλυβας). Το δείγμα τοποθετείται στην αρχή (κορυφή) της στήλης και η κινητή φάση διέρχεται εξαναγκασμένα μέσω της στατικής φάσης με την εφαρμογή πίεσης σε αυτήν ή λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από την συγγένεια των συστατικών ως προς την στατική φάση . Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής :

- Διάλυμα Α: οξικός αιθυλεστέρας/ εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Β: διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 90/10

3.2.3 Ξήρανση διαλυτών

Ορισμένες από τις αντιδράσεις που περιγράφονται, επιβάλλουν την χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο CH_3CN και *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο DMF. Η ξήρανση του CH_3CN γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA (molecular sieves). Το DMF φυλάσσεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA .

3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

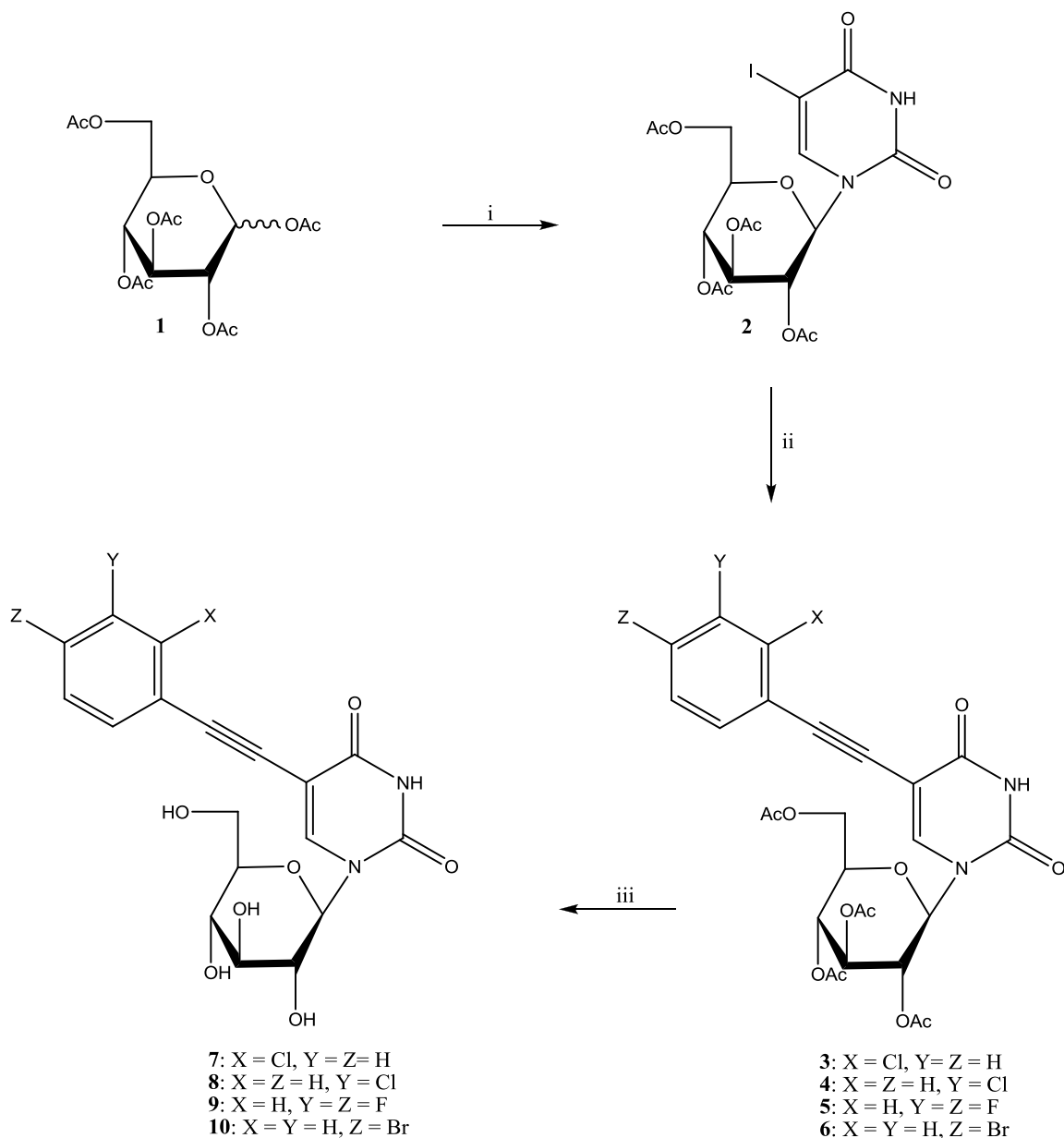
Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με το φωτόμετρο Bruker 300 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και διμεθυλοσουλφοξίδιο ($\text{DMSO}-d_6$). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο

αναφοράς. 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.

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός NMR, είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο NMR, άλλοι, οι λιγότεροι όχι. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανakλώνται στην ιδιότητα του σπίν. Στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη, για την μελέτη των χημικών, φυσικών και βιολογικών ιδιοτήτων της.

3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.3.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού



Σχήμα 22. Επισκόπηση της σύνθεσης των αλογονο φαινυλο γλυκοπυρανονουκλεοζίτων της ουρακίλης.

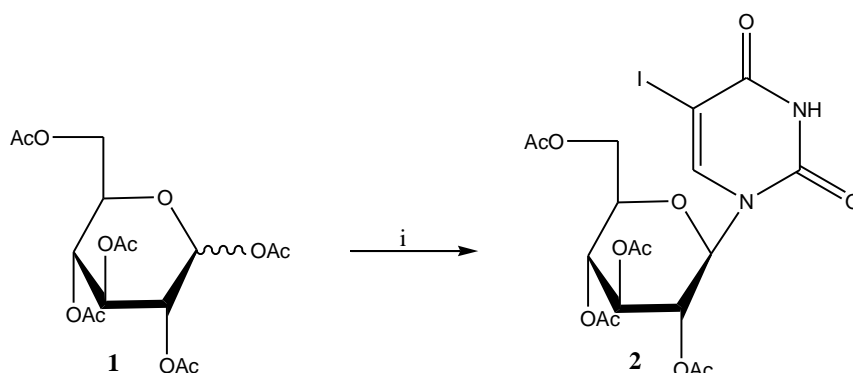
Αντιδραστήρια και συνθήκες: i) silylated base, $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$, CH_3CN , MW (200 Watt), 8 min; ii) 1-ethynyl-2 or 3-fluorobenzene or 1-ethynyl-3,5-

difluorobenzene or 1-bromo-4-ethynylbenzene, CuI, Pd(PPh₃)₄, Et₃N, DMF, MW, (200 Watt), 5 min; iii) ammonia/MeOH.

3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης.

Η πορεία της σύνθεσης ξεκίνησε με την σύζευξη της εμπορικά διαθέσιμης 1,2,3,4,6-πεντακίς-Ο-ακετυλο-D-γλυκοπυρανόζης (**1**), με την ετεροκυκλική βάση 5-ιωδοουρακίλη, παρουσία του άνυδρου διαλύτη ακετονιτριλίου (CH₃CN), εξαμεθυλοδισιλαζάνιου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης και με την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα (Me₃SiOSO₂CF₃) υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων σε συνθήκες 200 Watt για 8 λεπτά στους 80 °C. Έτσι λήφθηκε ο προστατευμένος νουκλεοζίτης 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (**2**) με ικανοποιητική απόδοση 83%. Στη συνέχεια ο προστατευμένος νουκλεοζίτης 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (**2**) διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF), και με την προσθήκη καταλύτη τετρακίς τρις φαινυλοφωσφορικό παλλαδίο Pd(PPh₃)₄, συγκαταλύτη ιωδοχαλκό (CuI), της βάσης τριαιθυλαμίνης (Et₃N) και του 1-χλωρο-2-αιθυνυλοβενζολίου ή 3-χλωρο-1-αιθυνυλοβενζολίου ή 3,4-διφθοροβενζολίου ακετυλενίου ή 1-βρωμο-4-αιθυνυλοβενζολίου πραγματοποιήθηκε η σύζευξη τους υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων σε συνθήκες 200 Watt για 5 λεπτά στους 50 °C λαμβάνοντας τους προστατευμένους νουκλεοζίτες 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(-2 ή -3-χλωροβενζολίου) της ουρακίλης (**3**), (**4**), 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(-3,4-διφθοροβενζολίου) της ουρακίλης (**5**) και 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(4-βρωμοβενζολίου) της ουρακίλης (**6**) με απόδοση 65-78%. Το τελευταίο βήμα της πορείας αυτής είναι η αποπροστασία των ενώσεων **3**, **4**, **5** και **6** με κορεσμένο διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας, η οποία οδήγησε στην λήψη των αποπροστατευμένων ενώσεων 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- αλογονοφαινυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης **7**, **8**, **9** και **10** με απόδοση 62%–73%.

3.3.3 Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (2)



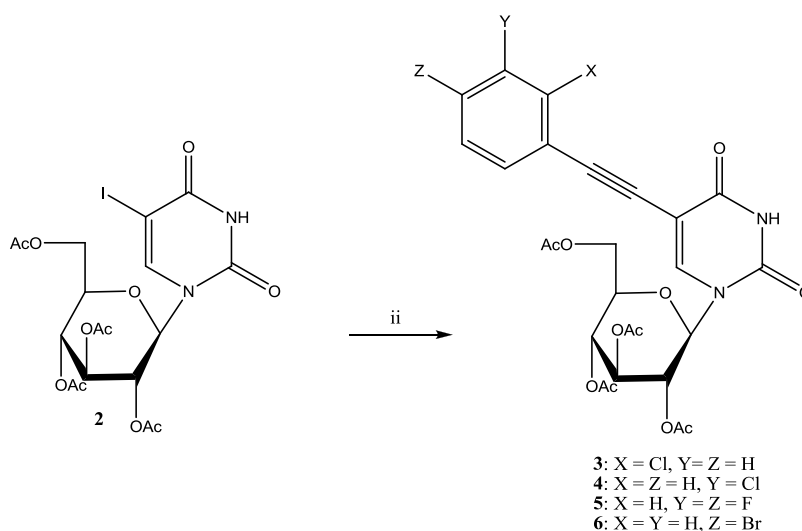
Σχήμα 23.

Η σύνθεση του **2** επιτεύχθηκε με τη μέθοδο των μικροκυμάτων ως εξής. Σε γυάλινο φιαλίδιο των 10 ml διαλύονται σε 7 ml άνυδρου διαλύτη ακετονιτρίλιο (CH_3CN), η 1,2,3,4,6-πεντακίς-O-ακετυλο-D-γλυκοπυρανόζη (**1**, 500 mg, 1.28 mmol), η 5-ιωδοουρακίλη (1.66 mmol), το εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS 2.06 mmol), η σακχαρίνη (0.08 mmol) και μετά την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$, 1.80 mmol) ακτινοβολούνται σε συνθήκες 200 Watt για 7 λεπτά στους 80 °C. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 1). Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου NaHCO_3 και αραιώθηκε με διχλωρομεθάνιο CH_2Cl_2 (250ml). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα B (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 6:4). Το επιθυμητό προϊόν (**2**) ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος με ικανοποιητική απόδοση 83%.

TLC(Διάλυμα Β)	R _f = 0.18
Απόδοση	83%
[α] _D ²²	-3.0 c = 0.11
λ _{max}	270 nm

Πίνακας 1. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (2).

3.3.4 Σύνθεση των 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(-2 ή -3-χλωροβενζολιο) της ουρακίλης (3), (4), 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(-3,4-διφθοροβενζολιο) της ουρακίλης (5) και 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(4-βρωμοβενζολιο) της ουρακίλης (6)



Σχήμα 24.

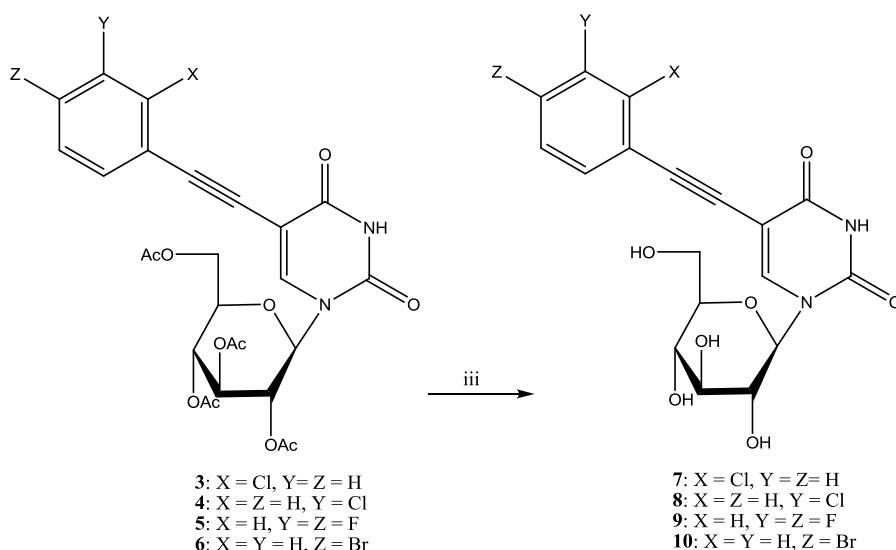
Η σύνθεση του **3**, **4**, **5** και **6** επιτεύχθηκε με τη μέθοδο των μικροκυμάτων ως εξής. Σε γυάλινο φιαλίδιο των 10 ml διαλύονται σε 2 ml άνυδρου διαλύτη *N,N*-

διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF), 0.35 mmol (200 mg) της 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλης (**2**), 1.05 mmol τελικό αλκένιο, 0.035 mmol Pd(PPh₃)₄, 0.035 mmol CuI, 0.70 mmol Et₃N και εν συνεχεία ακτινοβολούνται σε συνθήκες 200 Watt, για 5 λεπτά στους 50 °C. Η επεξεργασία που ακολουθείται για την παραλαβή του προϊόντος περιλαμβάνει καθαρισμό του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης τα διαλύματα: A (οξικός αιθυλεστέρας/Εξάνιο 5:5). Τα επιθυμητά προϊόντα (**3**, **4**, **5** και **6**) ελήφθησαν υπό τη μορφή αφρώδους στερεού κίτρινου χρώματος με απόδοση 65-78%.

	Προϊόν 3	Προϊόν 4	Προϊόν 5	Προϊόν 6
TLC	R _f = 0.35 (Διάλυμα A)	R _f = 0.14 (Διάλυμα A)	R _f = 0.23 (Διάλυμα A)	R _f = 0.19 (Διάλυμα A)
Απόδοση	65%	72%	75%	78%
[α]_D²²	-2.0 c = 0.13	-8.0 c = 0.2	-4.0 c = 0.15	-2.0 c = 0.2
λ_{max}	306 nm	308 nm	306 nm	308nm

Πίνακας 2. Αποτελέσματα σύνθεσης των 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-[(2 ή -3-φθοροφαινυλο ή -3,5-διφθοροφαινυλο ή -4-βρωμοβενζολιο)αιθυνο] νουκλεοζιτών της ουρακίλης **3**, **4**, **5** και **6**.

3.3.5 Σύνθεση των 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- αλογονοφαινυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης 7, 8, 9 και 10



Σχήμα 25.

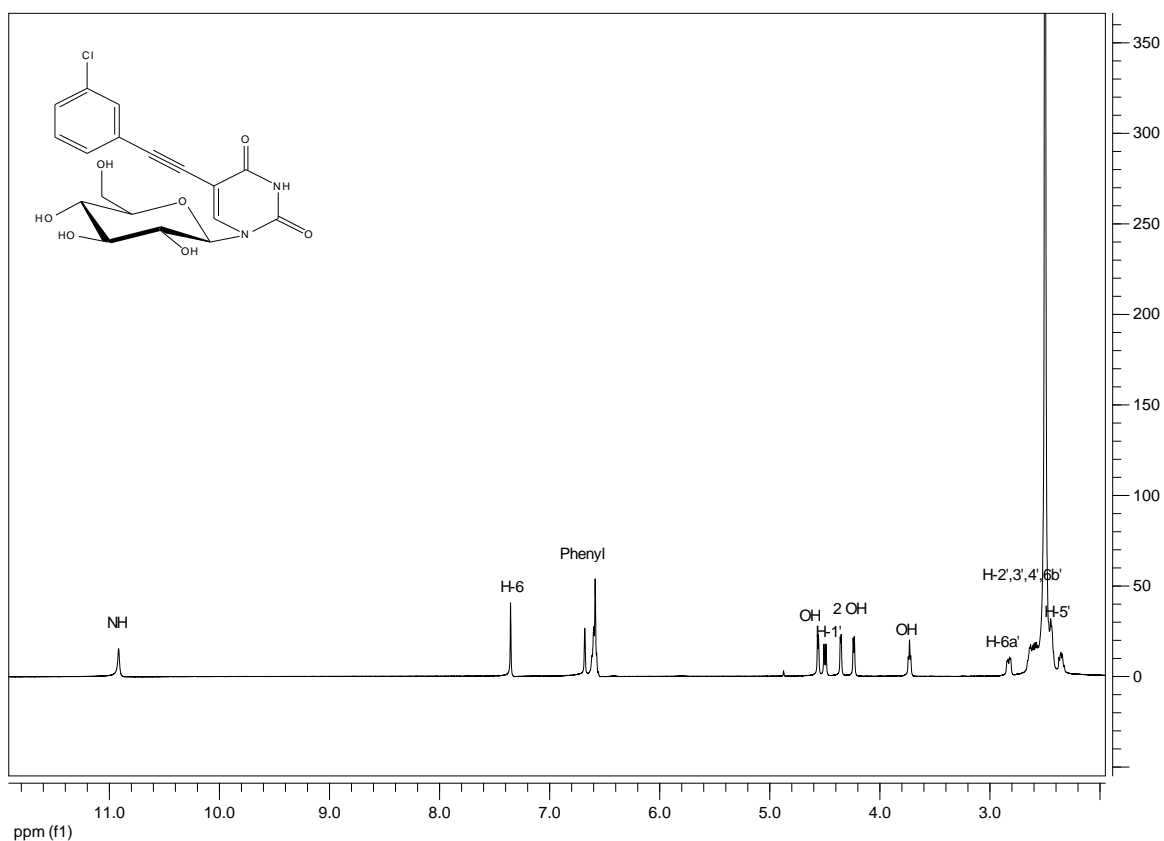
Διαλύματα των προστατευμένων νουκλεοζιτών **3**, **4**, **5** και **6** (0.15 mmol) σε μεθανολική αμμωνία αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 12h ώρες. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες καθαρίζονται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα B (διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη 9:1), οπότε παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα **7**, **8**, **9** και **10** με απόδοση 62%–73%, με μορφή ελαίου κίτρινου χρώματος.

	Προϊόν 7	Προϊόν 8	Προϊόν 9	Προϊόν 10
TLC	R _f = 0.07 (Σύστημα Β)	R _f = 0.19 (Σύστημα Β)	R _f = 0.13 (Σύστημα Β)	R _f = 0.14 (Σύστημα Β)
Απόδοση	62%	68%	70%	73%
[α]_D²²	-3.0 c = 0.13	-8.0 c = 0.2	-4.0 c = 0.16	-2.0 c = 0.2
λ_{max}	306nm	308 nm	306 nm	310 nm

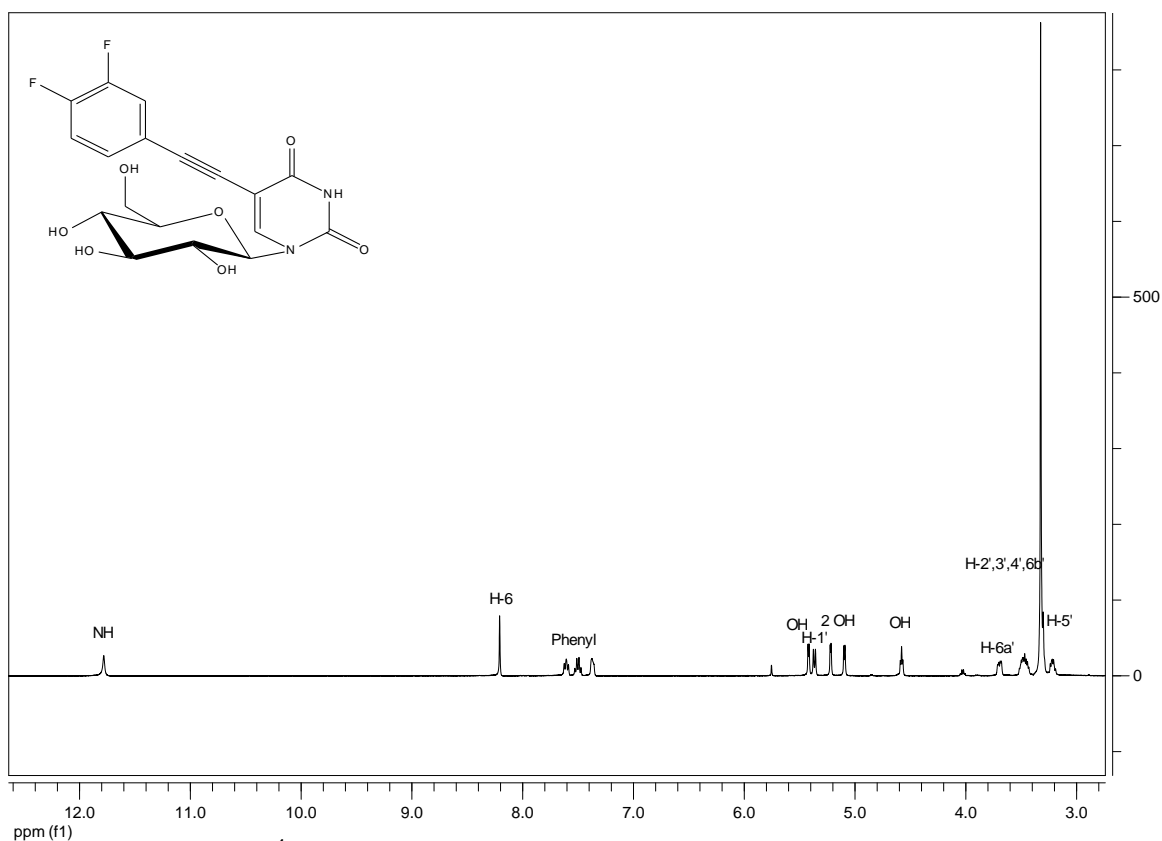
Πίνακας 3. Αποτελέσματα σύνθεσης των 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-αλογονοφαινυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης **7, 8, 9 και 10**.

4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR

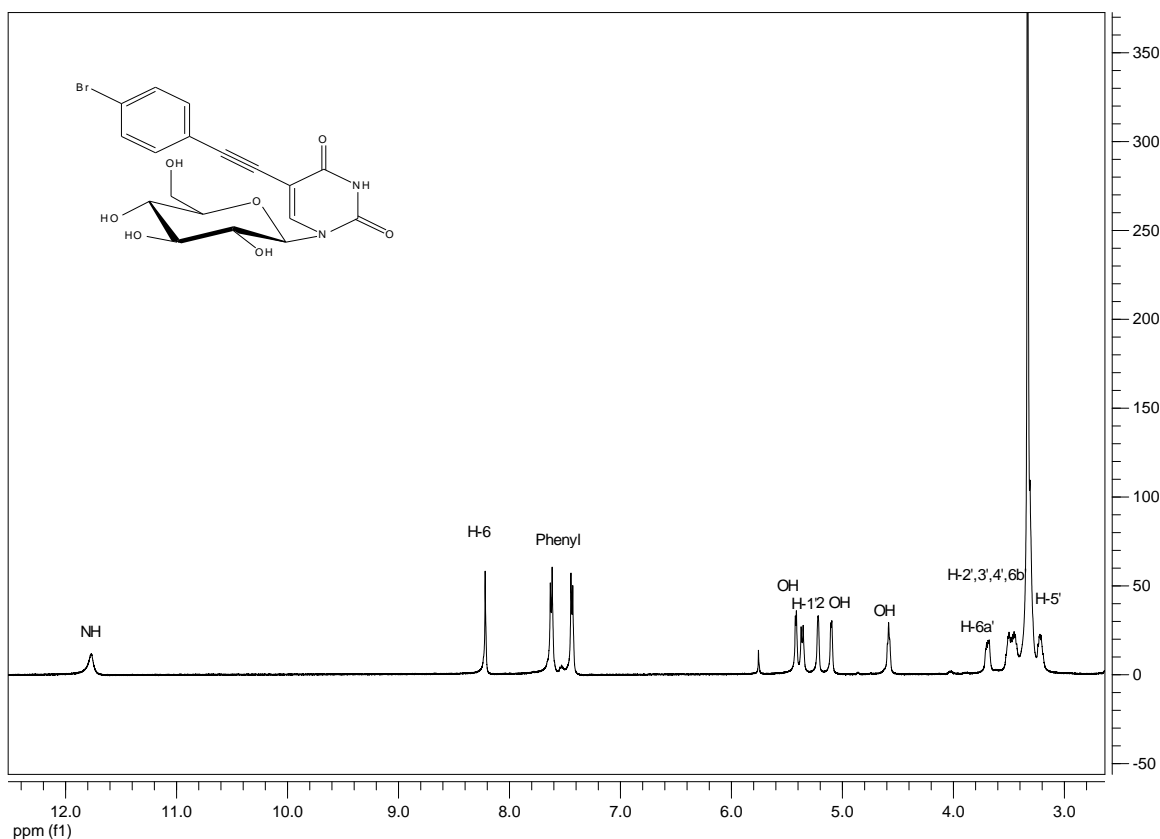
Στο παρόν κεφάλαιο παρατίθενται τα διαγράμματα της φασματοσκοπίας NMR για τα τελικά προϊόντα **8, 9, 10** αντίστοιχα:



Σχήμα 26. Φάσμα ¹H NMR του τελικού προϊόντος **8**.



Σχήμα 27. Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος **9**.



Σχήμα 28. Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος **10**.

5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προέκυψε από τις προσπάθειες των ερευνητών για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως κακοήθεις νεοπλασίες και ιικές μολύνσεις. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων, που παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και εκλεκτικότητα όσον αφορά στην δράση τους. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης γλυκοπυρανονουκλεοζιτών με τροποποίηση στο τμήμα της βάσης με πιθανή αντικαρκινική και αντιική δράση.

Οι νέες ενώσεις έχουν ήδη σταλεί για αποτίμηση της βιολογικής τους δράσης και αναμένουμε τα αποτελέσματα.

Η συνθετική πορεία ήταν σχετικά απλή, ταχεία, έχοντας πραγματοποιήσει σύντομα βήματα. Η αντίδραση Sonogashira επιτεύχθηκε με την χρήση μικροκυμάτων, η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα και με μεγάλη επιτυχία γιατί δίνει υψηλές αποδόσεις υπό ηπιότερες και φιλικότερες προς το περιβάλλον συνθήκες, συχνά χωρίς την χρήση διαλυτών, άλλοτε με ανακύκλωση τους, αλλά και με μικρότερη κατανάλωση ενέργειας.

Οι επιτυγχανόμενες υψηλές αποδόσεις, οι ηπιότερες (περιβαλλοντικές) συνθήκες και οι συντομότεροι χρόνοι της αντίδρασης αποδεικνύονται πολύ χρήσιμα στοιχεία, που επιτρέπουν την ουσιαστική βελτίωση πολλών χημικών διεργασιών. Οι ιδιότητες αυτές της μικροκυματικής θέρμανσης καθιστούν εφικτές ακόμη και αντιδράσεις που ούτε καν θα προχωρούσαν με κλασικές μεθόδους θέρμανσης, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρείται και αλλαγή της εκλεκτικότητας των αντιδράσεων.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η χρήση της μικροκυματικής θέρμανσης και από τη σκοπιά της πράσινης χημείας. Η δυνατότητα εκτέλεσης αντιδράσεων με απ' ευθείας αλληλεπίδραση μικροκυματικής ενέργειας επί του μίγματος της αντίδρασης, σε πολύ μικρούς χρόνους, σε αντιδιαστολή προς την έμμεση μεταφορά ενέργειας με την χρήση ελαιόλουτρου ή παρόμοιας συσκευής, επιτρέπει να θεωρηθεί, η πρώτη, ως «πράσινη» διεργασία, όχι μόνον λόγω της μειωμένης κατανάλωσης ενέργειας αλλά και λόγω της οικονομίας χρόνου, δηλαδή της αυξημένης αποτελεσματικότητας της.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Berg, J. M.; Tymoczko J. L., Stryer L. Βιοχημεία (Τόμος Ι) 2001. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (p) 329-351.
2. Zhou W., Gumina G., Chong Y., Wang J., Schinazi R. F., Chu C. K. Synthesis, structure-activity relationships, and drug resistance of beta-d-3'-fluoro-2',3'-unsaturated nucleosides as anti-HIV Agents. *J Med Chem.* 2004, 47, 3399-408
3. Tsirkone V. G., Tsoukala E., Lamprakis C., Manta S., Hayes J. .M., Skamnaki V. T., Drakou C., Zographos S. E., Komiotis D., Leonidas D. D. 1-(3-Deoxy-3-fluoro-beta-d-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies. *Bioorg Med Chem.* 2010, 38, 3413-25.
4. Lui V. W., Lau C. P., Cheung C. S., Ho K., Ng M. H., Cheng S. H., Hong B., Tsao S. W., Tsang C. M., Lei K. I., Yamasaki Y., Mita A., Chan A. T. An RNA-directed nucleoside anti-metabolite, 1-(3-C-ethynyl-beta-d-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd), elicits antitumor effect via TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) downregulation. *Biochem Pharmacol.* 2010, 79, 1772-80.
5. Somsák L., Czifrák K., Tóth M., Bokor E., Chrysina E. D., Alexacou K. M., Hayes J. M., Tiraidis C., Lazoura E., Leonidas D. D., Zographos S. E., Oikonomakos N. G. New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents. *Curr Med Chem.* 2008, 15, 2933-83.
6. Arnér E. S. J., Eriksson S. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther.* 1995; 67, 155-86.
7. Wagner C. R., Iyer V. V., McIntee E. J. Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Med Res Rev.* 2000, 20, 417-51.
8. Balzarini J., Thormar H., Holy A., Jindrich J., Rosenberg I., Debyser Z., Desmyter J., De Clercq E. Inhibition of visna virus replication by 2',3'-dideoxynucleosides and acyclic nucleoside phosphonate analogs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993, 37, 2540-4.

9. Chong Y., Choo H., Choi Y., Mathew J., Schinazi R. F., Chu C. K. Stereoselective synthesis and antiviral activity of D-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-2'-fluoro-4'-thionucleosides. *J Med Chem.* 2002, 45, 4888-98.
10. Lewin B. *Genes* 2003, VIII, 6.
11. Burns C. J., Milne H. M., Squires P. E., Evans N. D., Pickup J., Jones P. M., Persaud S. J. Uncoupling of nutrient metabolism from insulin secretion by overexpression of cytosolic phospholipase A(2). *Diabetes.* 2005, 54, 116-24.
12. Lui V. W., Lau C. P., Cheung C. S., Ho K., NG M. H., Cheng S. H., Hong B., Tsao S. W., Tsang C. M., Lei K. I., Yamasaki Y., Mita A., Chan A. T. An RNA-directed nucleoside anti-metabolite, 1-(3-C-ethynyl-beta-d-ribo-pentofuranosyl) cytosine (ECyd), elicits antitumor effect via TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) downregulation. *Biochem Pharmacol.* 2010, 79, 1772-80.
13. Bhat U. G., Pandit B., Gartel A. L. ARC synergizes with ABT-737 to induce apoptosis in human cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2010, 9, 1688-96.
14. Siev M., Weinberg R., Penman S. The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in HeLa cells by cordycepin. *J Cell Biol.* 1969, 41, 510-20
15. Ahn Y. J., Park S. J., Lee S. G., Shin S. C., Choi D. H. Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. *J Agric Food Chem.* 2000, 48, 2744-8.
16. Cory A. H., Cory J. G. Use of nucleoside kinase-deficient mouse leukemia L1210 cell lines to determine metabolic routes of activation of antitumor nucleoside analogs. *Adv Enzyme Regul.* 1994, 34:1-12
17. Pontikis R., Benhida R., Aubertin A. M., Grierson D. S., Monneret C. Synthesis and anti-HIV activity of novel N-1 side chain-modified analogs of 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT). *J Med Chem.* 1997, 40, 1845-54.
18. Yamagami K., Fujii A., Arita M., Okumoto T., Sakata S., Matsuda A., Ueda T., Sasaki T. Antitumor activity of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine, a new 2'-deoxycytidine derivative. *Cancer Res.* 1991, 51, 2319-23.

19. Lin T. S , Luo M. Z., Liu M. C., Clarke-Katzenburg R. H., Cheng Y. C., Prusoff W. H., Mancini W. R., Birnbaum G. I., Gabe E. J., Giziwicz J. Synthesis and anticancer and antiviral activities of various 2'- and 3'-methylidene-substituted nucleoside analogues and crystal structure of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine hydrochloride. *J Med Chem.* 1991, 34, 2607-15.
20. Baker C. H., Banzon J., Bollinger J. M., Stubbe J., Samano V., Robins M. J., Lippert B., Jarvi E., Resvick R. 2'-Deoxy-2'-methylenecytidine and 2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine 5'-diphosphates: potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase. *J Med Chem.* 1991, 34, 1879-84.
21. Matsuda A., Sasaki T. Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides. *Cancer Sci.* 2004, 95, 105-11
22. Faderl S., Gandhi V., Kantarjian H., Plunkett W. New nucleoside analogues in clinical development. *Cancer Chemother Biol Response Modif.* 2002, 20, 37-58.
23. Parker W. B., Secrist J. A., Waud W. R. Purine nucleoside antimetabolites in development for the treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs.* 2004, 5, 592-6.
24. Pui C. H., Jeha S. Clofarabine. *Nat Rev Drug Discov.* 2005, 12-3.
25. Secrist J. A. Nucleosides as anticancer agents: from concept to the clinic. *Nucleic Acids Symp.* 2005, 49, 15-6
26. Tiwari K. N., Shortnacy-Fowler A. T., Cappellacci L., Waud W. R., Parker W. B., Montgomery J. A., Secrist J. A. Synthesis and structure activity relationships of 5-substituted-4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosines. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2000, 19, 2005-17.
27. Waud W. R., Gilbert K. S., Shepherd R. V., Montgomery J. A., Secrist J. A. Preclinical antitumor activity of 4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosine (4'-thio-ara-C). *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003, 51, 422-6
28. Someya H., Shaddix S. C., Tiwari K. N., Secrist J. A., Parker W. B. Phosphorylation of 4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosine and its . analogs by human deoxycytidine kinase. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, 304, 1314-22.

29. Komiotis D., Tsoukala E., Manta S., Tzioumaki N., Agelis G. Concise synthesis of 3-fluoro-5-thio-xylo- and glucopyranoses, useful precursors towards their corresponding pyranonucleoside derivatives. *Carbohydr Res.* 2008, 343, 1099-103.
30. Gumina G., Song G. Y., Chu C. K. L-Nucleosides as chemotherapeutic agents. *FEMS Microbiol Lett.* 2001, 202, 9-15.
31. Manta S., Agelis G., Botić T., Cencic A., Komiotis D. Fluoro-ketopyranosyl nucleosides: synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-2-keto-beta-D-glucopyranosyl derivatives of N4-benzoyl cytosine. *Bioorg Med Chem.* 2007, 15, 980-7
32. Balatsos N. A., Vlachakis D., Maragozidis P., Manta S., Anastasakis D., Kyritsis A., Vlassi M., Komiotis D., Stathopoulos C. Competitive inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides. *Biochemistry.* 2009, 48, 6044-51.
33. Leclercq F., Egron M. J., Antonakis K., Bennani-Baiti M. I., Frayssinet C. Synthesis and biological activity of a fluorketonulceoside: 7-(3-deoxy-3-fluoro-beta-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose) theophylline. *Carbohydr Res.* 1992, 228, 95-102.
34. Khan A. R., Mulligan K. X., Ollapally A. P. Synthesis of 5-chloro-1-(2,3-dideoxy-3-fluoro-beta-D-glycero-hex-2-enopyranose-4-ulosyl)uracil as potential anticancer/antiviral agent. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2001, 20, 759-62.
35. Ollapally A. P., Bennouna-Dorange I., Whitaker T. L. 5-Fluoro-1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-6-O-trityl-beta-D-glycero-hex-3-eno-pyranos-2-ulosyl (uracil): anticancer agent. *Nucleosides Nucleotides.* 1999, 18, 703-5.
36. Egron M. J., Dorange B. I., Antonakis K., Herscovici J., Ollapally A. P. Unsaturated fluoroketonucleosides as anticancer agents: the synthesis and biological activity of 5-fluoro-1-(3,4-di-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-beta-d-glycero-hex-3-eno-pyranos-2-ulosyl) uracil. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2002, 21, 327-34

37. Agelis G., Tzioumaki N., Botić T., Cencic A., Komiotis D. Exomethylene pyranonucleosides: efficient synthesis and biological evaluation of 1-(2,3,4-trideoxy-2-methylene-beta-d-glycero-hex-3-enopyranosyl)thymine. *Bioorg Med Chem.* 2007, 15, 5448-56.
38. Komiotis D., Delatre S., Holt L., Ollapally A. P., Balzarini J. Biologically Important Nucleosides: A General Method for the Synthesis of Unsaturated Ketonucleosides of Uracil and its Analogs. *Nucleosides and Nucleotides.* 1991, 10, 431-455.
39. Paterson J., Uriel C., Egron M. J., Herscovici J., Antonakis K., Alaoui-Jamali M. A. Antiproliferative and apoptotic activities of ketonucleosides and keto-C-glycosides against non-small-cell lung cancer cells with intrinsic drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998, 42, 779-84.
40. Kodama E.I., Kohgo S., Kitano K., Machida H., Gatanaga H., Shigeta S., Matsuoka M., Ohrai H., Mitsuya H. 4'-Ethynyl nucleoside analogs: potent inhibitors of multidrug-resistant human immunodeficiency virus variants in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001, 45, 1539-46.
41. Minakawa N., Matsuda A. Mechanism-based design of inosine 5-monophosphate dehydrogenase inhibitors: synthesis and biological activities of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives. *Curr Med Chem.* 1999, 6, 615-28.
42. De Clercq E. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Biochim Biophys Acta.* 2002, 1587, 258-75.
43. Minakawa N., Takeda T., Sasaki T., Matsuda A., Ueda T. Synthesis and antitumor activity of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives. *J Med Chem.* 1991, 34, 778-86
44. Matsuda A. Design of a new antitumor nucleoside CNDAC, against solid tumors. *Gan To Kagaku Ryoho.* 1996, 23, 202-10
45. Hattori H., Nozawa E., Iino T., Yoshimura Y., Shuto S., Shimamoto Y., Nomura M., Fukushima M., Tanaka M., Sasaki T., Matsuda A. Nucleosides and nucleotides. 175. Structural requirements of the sugar moiety for the antitumor

activities of new nucleoside antimetabolites, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine and -uracil¹. *J Med Chem.* 1998, 41, 2892-902.

46. Kohgo S., Yamada K., Kitano K., Sakata S., Hayakawa H., Nameki D., Kodama E., Matsuoka M., Mitsuya H., Ohru H. Synthesis of 4'-C-ethynyl and 4'-C-cyano purine nucleosides from natural nucleosides and their anti-HIV activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2003, 22, 887-9.

47. Hattori H., Tanaka M., Fukushima M., Sasaki T., Matsuda A. Nucleosides and nucleotides. 158. 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)-cytosine, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)uracil, and their nucleobase analogues as new potential multifunctional antitumor nucleosides with a broad spectrum of activity. *J Med Chem.* 1996, 39, 5005-11.

48. Agelis G., Tzioumaki N., Tselios T., Botić T., Cencic A., Komiotis D. Synthesis and molecular modelling of unsaturated exomethylene pyranonucleoside analogues with antitumor and antiviral activities. *Eur J Med Chem.* 2008, 43, 1366-75.

49. Nomura M., Shuto S., Matsuda A. Synthesis of the cyclic and acyclic acetal derivatives of 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine, a potent antitumor nucleoside. Design of prodrugs to be selectively activated in tumor tissues via the bio-reduction-hydrolysis mechanism. *Bioorg Med Chem.* 2003, 11, 2453-61.

50. O-Yang H. Y., Wu E. B., Fraser-Smith, KAM Walker. Nucleosides and nucleotides. 183. Synthesis of 4' α -branched thymidines as a new type of antiviral agent. *Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 37-40.

51. Meneni S., Ott I., Sergeant C. D., Sniady A., Gust R., Dembinski R. Alkynyl-2'-deoxyuridines: chromatography-free synthesis and cytotoxicity evaluation against human breast cancer cells. *Bioorg Med Chem.* 2007, 15, 3082-8.

52. Kantsadi A. L., Hayes J. M., Manta S., Skamnaki V. T., Kiritsis C., Psarra A. M., Koutsogiannis Z., Dimopoulou A., Theofanous S., Nikoleousakos N., Zoumpoulakis P., Kontou M., Papadopoulos G., Zographos S. E., Komiotis D., Leonidas D. D. The σ -hole phenomenon of halogen atoms forms the structural

basis of the strong inhibitory potency of C5 halogen substituted glucopyranosyl nucleosides towards glycogen phosphorylase b. ChemMedChem. 2012, 7, 722-32.

53. Perigaud C., Gosselin G., Imbach J. L. Nucleoside Analogues as Chemotherapeutic Agents. Nucleosides & Nucleotides. 1992, 11, 903–945.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

54. http://www.chemeng.ntua.gr/files/simeioseis_xamilakis.pdf

55. http://anamorfosi.uoi.gr/latrikh/edumaterial/11/Synoptikh_farmakologia_to_mos_l.pdf

56. http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_glucose.htm

57. <http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%BB%CE%BA%CF%85%CE%B%CE%B1%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%BF%CE%BD%CE%AF%CE%B4%CE%B9%CE%B1>

58. <http://www.sciencedaily.com/releases/2012/06/120605121639.htm>

59. <http://www.chemistryexplained.com/Ny-Pi/Organic-Halogen-Compounds.html>

60. http://www.uni-tuebingen.de/uploads/media/12-05-31Pharmazie_HEFLibs_en.pdf

61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24431896>

62. http://www.chem.auth.gr/iyc2011/iyc_2011_microwaves.html

63. http://www.uni-tuebingen.de/uploads/media/12-05-31Pharmazie_HEFLibs_en.pdf

64. <http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-B132/471/3121,12549/>