

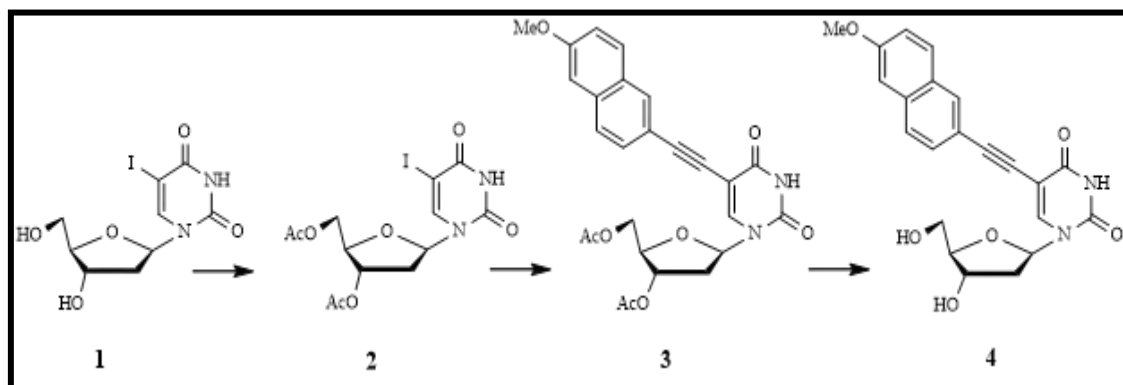


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΠΑΜΑΡΓΑΡΙΤΗ ΜΑΡΙΑ

Διπλωματική Εργασία

**C5 - αρυλαλκινυλ -2' - δεόξυ-φουρανουκλεοζίτες της ουρακίλης ως
πιθανοί αντιϊικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.**



ΛΑΡΙΣΑ 2018

Διπλωματική Εργασία

C5 - αρυλαλκινυλ -2' - δεόξυ-φουρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης ως πιθανοί αντιϊικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.

C5-arylalckinylyl-2'-deoxy-furanonucleosides of uracil as potential antiviral and anticancer agents.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Κομιώτη Δημήτριο, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου αυτό το θέμα όσο και για τις εποικοδομητικές υποδείξεις που μου προσέφερε κάνοντας με να λάβω όσο το δυνατόν περισσότερες γνώσεις γίνεται.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κολλάτο Νικόλαο για την άριστη συνεργασία και τις πολύτιμες υποδείξεις του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων μου στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας και τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής μου, το κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη και τον κ. Αμούτζια Γρηγόριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου τόσο προπτυχιακούς όσο και μεταπτυχιακούς φοιτητές για την υποδοχή και το άριστο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε καθόλη τη διάρκεια διεξαγωγής της παρούσας διπλωματικής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Υδατάνθρακες.....	7
1.2 Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές: Σχηματισμός ημιακετάλης.....	7
1.3 Νουκλεοζίτες και ανάλογα τους	11
1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών	12
1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιϊικοί παράγοντες	14
1.6 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στο σάκχαρο και τη βάση.....	15
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	18
2.1 Σκοπός.....	18
3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	20
3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)	20
3.2 Χρωματογραφία στήλης	22
3.3 Ξήρανση διαλυτών.....	23
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων.....	23
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
4.1.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού της (7)	24
4.1.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης.....	24
4.2 Σύνθεση της 1-(3',5'-δι-Ο-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη)-5-ιοδοουρακίλης (2)	25
4.3 Σύνθεση της (3).....	25
4.4 Σύνθεση της (4).....	27
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR	28
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	29
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	31

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια σε ερευνητικό επίπεδο έχει παρατηρηθεί ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο για τους νουκλεοζίτες όσο και για τα ανάλογά τους, καθώς φαίνεται να έχουν θεραπευτικές ιδιότητες.

Οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες με εξαμελή δακτύλιο εμφανίζουν σημαντική αντικαρκινική, αντιϊκή και αντιβιοτική δράση. Αξίζει να τονιστεί μία ιδιαίτερη κατηγορία, η οποία περιλαμβάνει νουκλεοζίτες, οι οποίοι εμφανίζουν αλλαγές στη δομή του σακχάρου.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση καινούριων νουκλεοζιτικών αναλόγων, των C5 - αρυλαλκινυλ- 2'- δεόξυ-φουρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης ως πιθανοί αντιϊκοί και αντικαρκινικοί παράγοντες. Αναλύονται οι συνθετικές οδοί που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή τους, η μέθοδος ταυτοποίησής τους και η εκτίμηση της βιολογικής τους δράσης ως αντιϊκοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.

ABSTRACT

In recent years, a particular interest has been observed at the research level for both nucleosides and their analogues, as they appear to have healing properties.

Modified nucleosides with six-membered ring exhibit significant anticancer, antiviral and antibiotic activity. It is worth highlighting a particular category, which includes nucleosides, that show changes in the structure of the sugar.

This diploma thesis presents the synthesis of new nucleoside analogues, of C5-arylalckinyl-2'-deoxy-furanonucleosides of uracil as potential antivirals and anticancer agents. We have the analysis of the synthetic pathways followed for their preparation, the method of their identification and the assessment of their biological activity as antiviral and anticancer agents.

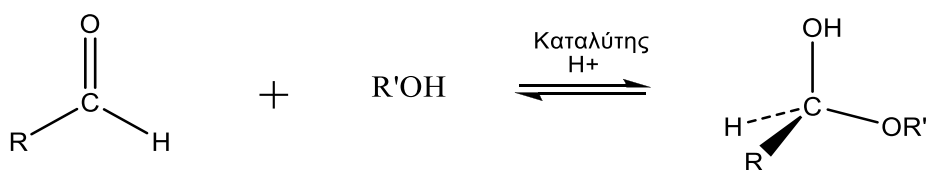
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες ή κοινώς σάκχαρα απαντούν σε κάθε ζωντανό οργανισμό καθώς παρέχουν τόσο την απαραίτητη ενέργεια που απαιτείται για την επιβίωση του. Έχουν γενικό τύπο $(\text{CH}_2\text{O})_n$ και απαντούν σε τέσσερις κύριες κατηγορίες υδατανθράκων (μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες). Ειδικότερα, ένας υδατάνθρακας, ο οποίος δεν μπορεί να υδρολυθεί προς απλούστερες ενώσεις ονομάζεται μονοσακχαρίτης, όπως π.χ. η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Ένας υδατάνθρακας, ο οποίος είναι δυνατόν να υδρολυθεί προς δύο μόρια μονοσακχαρίτη ονομάζεται δισακχαρίτης, όπως είναι η σακχαρόζη, η λακτόζη και η μαλτόζη. Τέλος, ένας υδατάνθρακας, ο οποίος μπορεί να υδρολυθεί προς πολλά μόρια μονοσακχαρίτη ονομάζεται πολυσακχαρίτης, όπως π.χ. η κυτταρίνη, το άμυλο, και το γλυκογόνο.

1.2. Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης

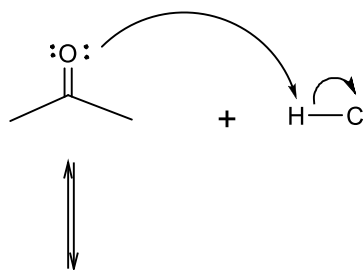
Μια ημιακετάλη μπορεί να σχηματιστεί με την προσθήκη του πυρηνόφιλου μορίου της αλκοόλης στην καρβονυλική ομάδα. Οι ημιακετάλες είναι ασταθείς ενώσεις (Morisson&Boyd, 1991, p. 758).



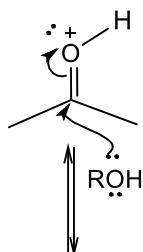
Σχήμα 1 : Σχηματισμός ημιακετάλης

Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 2 (McMurry, 2000, p. 905):

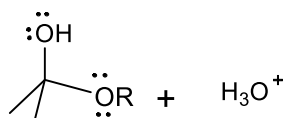
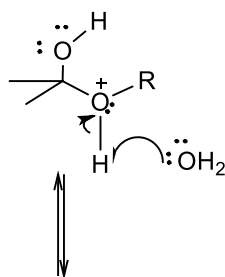
Η πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου πολώνει έντονα το καρβονύλιο και...



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



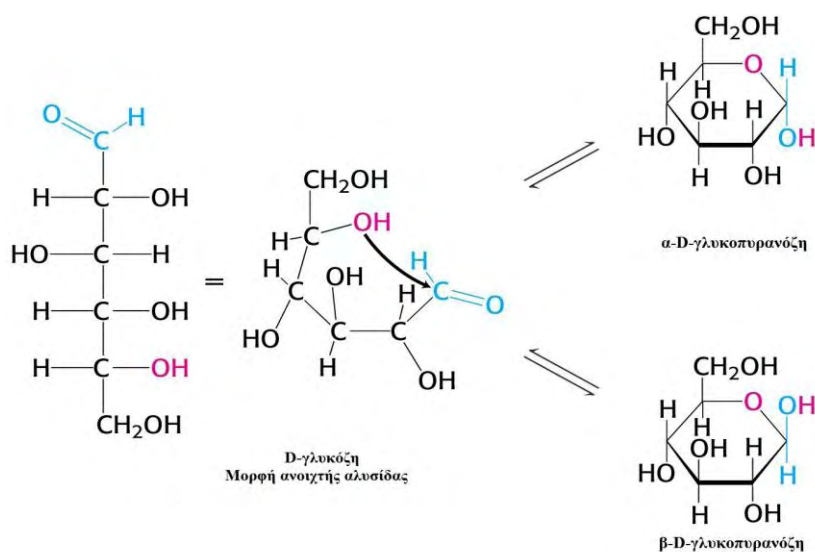
Απόσπαση ενός πρωτονίου οδηγεί σε ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, μια ουδέτερη ημιακετάλη



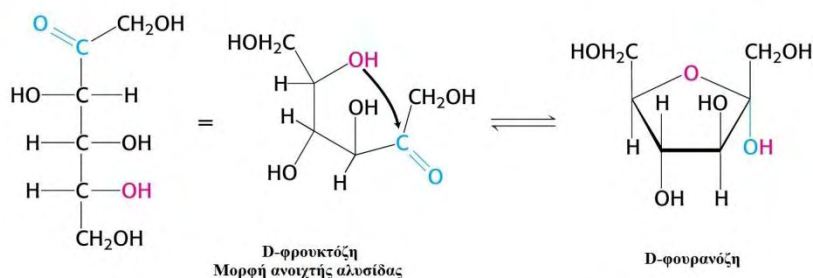
Σχήμα 2: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού ημιακετάλης

Όταν η υδροξυλομάδα (-OH) και το καρβονύλιο εντοπίζονται στο ίδιο μόριο, μπορεί να λάβει χώρα μία ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό μιας κυκλικής ημιακετάλης. Οι πενταμελείς και οι εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι γενικά σταθερά μόρια, με αποτέλεσμα πολλοί υδατάνθρακες να βρίσκονται σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές της κλειστής και ανοικτής αλυσίδας. Παραδείγματος χάριν, η γλυκόζη σε υδατικό διάλυμα απαντά με τη δομή του εξαμελούς δακτυλίου της πυρανόζης, που οφείλεται στην ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη του -OH του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C1 (σχήμα 2). Αντιθέτως, η φρουκτόζη, απαντά σε ποσοστό 80% στην πυρανοζική δομή και κατά 20% στη δομή του πενταμελούς

δακτυλίου της φουρανόζης, που σχηματίζεται από την προσθήκη του -OH του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C2 (σχήμα 3).



Σχήμα 3 : Σχηματισμός γλυκοπυρανόζης

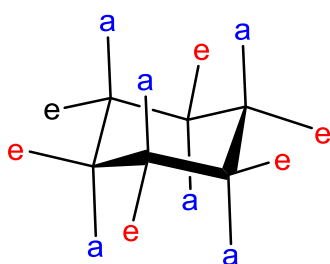


Σχήμα 4: Σχηματισμός φουρανόζης

Ένας μονοσακχαρίτης με την κυκλοποίηση της ανοικτής αλυσίδας, μπορεί να αποκτήσει τη δομή της φουρανόζης ή της πυρανόζης, όπου σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Τα δύο αυτά νέα διαστερομερή ονομάζονται ανωμερή και ο ημιακεταλικός άνθρακας είναι το ανωμερικό κέντρο (McMurry, 2000, p. 1249).

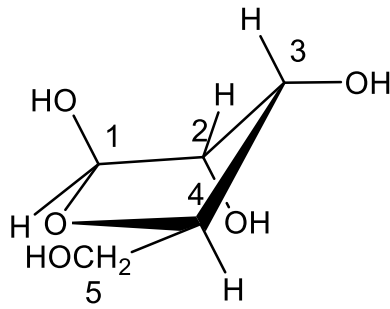
Οι δακτύλιοι της πυρανόζης έχουν τη δυνατότητα να υιοθετήσουν στερεοδιατάξεις ανάκλιντρο, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι

τάσεις, εφόσον όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνιάς (McMurry, 2000, p. 151). Οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου είναι δύο ειδών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί (σχήμα 4). Οι αξονικοί δεσμοί είναι σχεδόν κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί δεσμοί είναι σχεδόν παράλληλοι προς το επίπεδο αυτό. Οι αξονικοί υποκαταστάτες προβάλλουν πάνω και κάτω από το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί υποκαταστάτες διατάσσονται στην περιφέρεια. Οι αξονικοί υποκαταστάτες, με εξαίρεση το υδρογόνο, παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλο, αν εμφανιστούν από την ίδια πλευρά του δακτυλίου. Αντιθέτως, υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για τους ισημερινούς υποκαταστάτες. Έτσι λοιπόν, ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ότι στην αξονική θέση.



Σχήμα 5: Μορφή ανάκλιντρου μιας πυρανόζης (e = ισημερινός υποκαταστάτης, a = αξονικός υποκαταστάτης)

Κατά αναλογία ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να είναι πτυχωμένος, έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού (σχήμα 5). Αυτή η διαμόρφωση καλείται μορφή φακέλου. Οι δακτύλιοι της φουρανόζης είναι σε θέση να αλληλομετατρέπονται ταχύτατα σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις. Είναι πιο ευέλικτοι από τους δακτυλίους της πυρανόζης, γεγονός που εξηγεί την επιλογή τους ως συστατικά του RNA και DNA (Stryer, 1995).



Σχήμα 6:Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης

1.3.Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες βρίσκονται σε όλους τους οργανισμούς της φύσης, καθώς παρεμβάλλονται στη σύνθεση του DNA και του RNA. Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης δεσμευμένης σε ένα σάκχαρο. Το DNA αποτελείται από τέσσερις νουκλεοζιτικές μονάδες οι οποίες ονομάζονται δεοξαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυθυμιδίνη και δεοξυκυτιδίνη. Σε περίπτωση που η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, τότε αναφερόμαστε σε ριβονουκλεοζίτη ή δεοξυριβονουκλεοζίτη αντίστοιχα. Σε ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο το άτομο C-1 της δεοξυριβόζης δεσμεύεται στο N-1 μιας πυριμιδίνης ή στο N-9 μιας πουρίνης. Η διαμόρφωση αυτού του νουκλεοζιτικού δεσμού είναι μορφής β, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Stryer, 1995).

Τα τελευταία χρόνια τα ανάλογα των φυσικών νουκλεοζιτών αποτελούν ιδιαίτερα επιστημονικό και ερευνητικό ενδιαφέρον, λόγω κυρίως των αντικαρκινικών, αντιϊκών, αντιβακτηριδιακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους (Zhou *et al.* 2004, Perigaud *et al.* 1992, Robins *et al.* 1990, MacCoss *et al.* 1990). Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί πολλές τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα της βάσης όσο και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με κύριο στόχο τη μελέτη των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων.

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντιϊκή και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη με β-απεικόνιση.

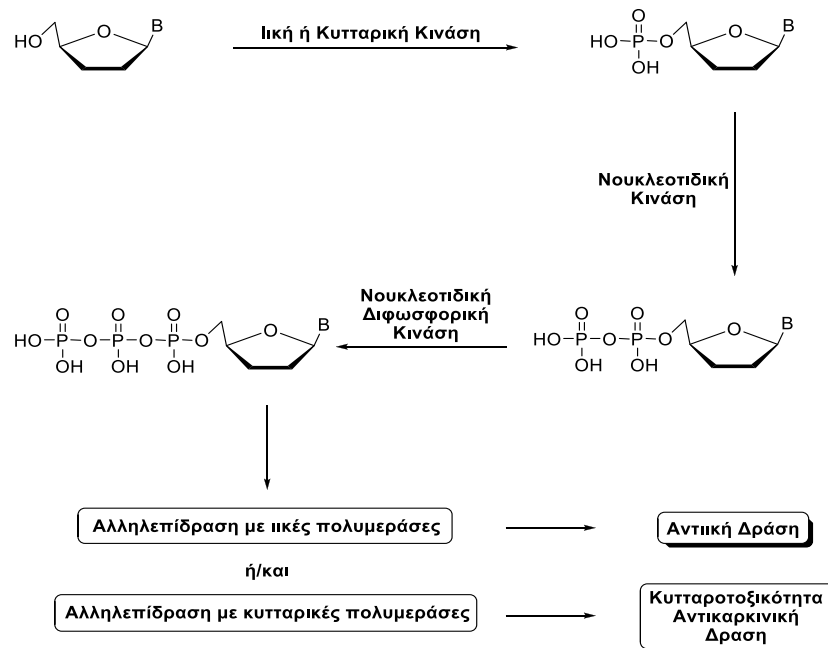
1.4. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Ο τρόπος δράσης των φαρμάκων στηρίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό στόχο, ο οποίος μπορεί να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη, (π.χ. υποδοχέας, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφορέας) είτε τα νουκλεϊκά οξέα. Αντίστοιχα, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που διαθέτουν αντιϊκή ή αντικαρκινική δράση λόγω της ικανότητας μεταφοράς που διαθέτουν εντός των κυττάρων με παθητική διάχυση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία πολλών ασθενειών (Zhou *et al.* 2004).

Στην ουσία, τα ανάλογα των νουκλεοζιτών είναι ανενεργά προφάρμακα, τα οποία πρέπει να τροποποιηθούν ενδοκυτταρικά, έτσι ώστε να είναι ικανά για δράση. Η διαδικασία αυτή απαντάται στη φωσφορυλίωσή τους από τις κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες (Arner and Eriksson 1995). Αφού φωσφορυλιωθούν προς τις τριφωσφορικές τους δομές από κυτταρικά ή ιϊκά ένζυμα, αποτρέπουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιϊκό διπλασιασμό, ή μπορούν να παρεμποδίσουν τον αναδιπλασιασμό του DNA (σχήμα 7).

Η ενσωμάτωσή των νουκλεοζιτικών αναλόγων στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA αποτελεί ένα κοινό μηχανισμό αντιϊκής και αντικαρκινικής δράσης με αποτέλεσμα τη διακοπή της επιμήκυνσης της αλυσίδας. Οι κυτταρικές πολυμεράσες συνδέουν το 5' άκρο ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με ταυτόχρονη απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και της δημιουργίας ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων (Lewin 2003, Burns *et al.* 2005). Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν είναι ικανό να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας. Ένα μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων σε σχέση με τα κύτταρα που είναι μολυσμένα

με τον H^+ , οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιϊκή πολυμεράση. Επομένως, όσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη είναι και η εκλεκτικότητά τους σαν θεραπευτικοί παράγοντες.



Σχήμα 7: Φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες

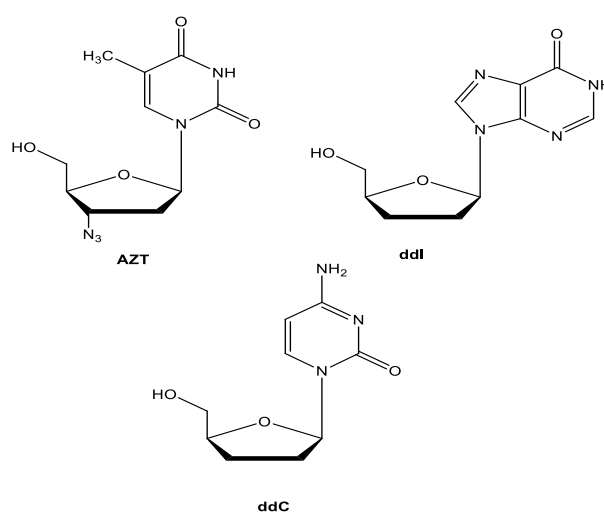
Εκτός του παραπάνω μηχανισμού, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να δράσουν και μέσω άλλων διαφορετικών μηχανισμών. Έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τη διαδικασία της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο μέσω της καταστολής αντιαποπτωτικών γονιδίων (Lui *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).

Η δράση των νουκλεοζιτών που δρουν ως αντιβιοτικά στηρίζεται είτε στο ότι καταστρέφουν συγκεκριμένα τμήματα των βακτηρίων, όπως π.χ. τη μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα τους, είτε στο ότι επιδρούν στην σύνθεση των πρωτεϊνών (Siev *et al.* 1969) καθώς και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης (Ahn *et al.* 2000).

1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιϊικοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους συμμετέχουν στη σύνθεση του DNA και του RNA και μπορούν να επηρεάσουν και τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Με αυτό λοιπόν τον τρόπο αποτελούν ένα ενδιαφέρον σημείο για την ανάπτυξη αντιϊκών φαρμάκων (Komiotis D. *Et al*, 2008, Zhou W. *et al*, 2004, Perigaund C. *et al*, 1993). Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών βασίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με τις ιϊκές πολυμεράσες. Οι αντιϊκοί νουκλεοζίτες συμμετέχουν στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τον ιό του απλού έρπητα (HSV), τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV), τον ιό του έρπη ζωστήρα (VZV), τον ιό της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV) και τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και C (HCV).

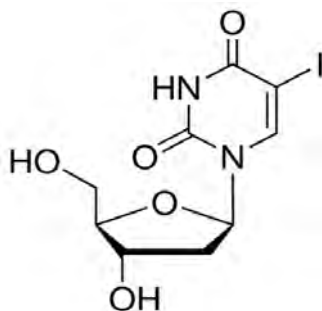
Ιδιαίτερα χαρακτηριστικά παραδείγματα από αυτά τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αποτελούν το zidovudine (AZT), το didanosine (DDI) και το zalcitabine (DDC), τα οποία σήμερα μπορούν να χρησιμοποιηθούν κλινικά ως φάρμακα εναντίον του HIV (σχήμα 8). Αξιοσημείωτο είναι ότι αυτά τα νουκλεοτιδικά ανάλογα περιλαμβάνουν για σάκχαρο μία πεντόζη.



Σχήμα 8: Χημικές δομές των AZT, ddi, ddC

1.6 Νουκλεοτιδικά ανάλογα με τροποποίηση στο σάκχαρο και τη βάση

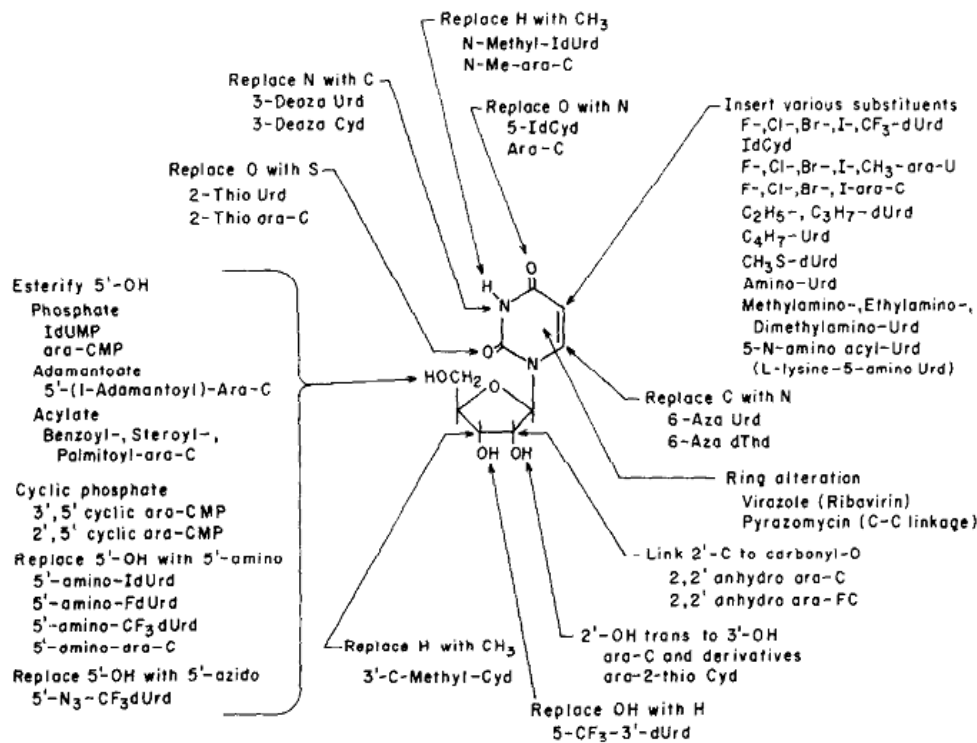
Στις αρχές του 1960 ο πρώτος νουκλεοζίτης που θεωρήθηκε κλινικά αποτελεσματικός ήταν η 5-ιώδο-2'-δεοξουριδίνη (Σχήμα 9), όπου η σύνθεσή του ήταν μέρος ενός αντικαρκινικού προγράμματος (W. H. Prusoff, 1959).



Σχήμα 9: Χημική δομή της 5-ιώδο-2'-δεοξουριδίνης

Οι Johnsons και John (T. B. Johnson and C. O. Johns, 1905-06) είχαν αναφερθεί στη σύνθεση 5'-ιωδοπυριμιδινών το 1905. Οι Hitchings *et al.* (G. H. Hitchings *et al.*, 1945) το 1945, ξεκίνησαν μία συστηματική μελέτη της βιολογικής δράσης διαφόρων παραγόντων της πουρίνης και της πυριμιδίνης. Σε σύντομο χρονικό διάστημα, μία ομάδα ερευνητών (R. L. Thompson *et al.*, 1949) αναφέρθηκε στη μέτρια αναστολή από την 5-βρωμοουρακίλη, την 5-υδρόξουρακίλη και τη 2,4-διθυοθυμίνη της αντιγραφής του ιού της δαμαλίτιδας σε κυτταρική καλλιέργεια. Οι Visser *et al.* (Visser *et al.*, 1952) τόνισαν ότι διάφορα 5-υποκατεστημένα παράγωγα της ουριδίνης (5-χλώρο, 5-διάζο, 5-φορμαμιδο, 5-υδρόξυ και 5-άμινο) παρεμπόδισαν τον πολλαπλασιασμό του ιού της εγκεφαλίτιδας του ποντικού Theiler σε καλλιέργεια εγκεφάλου ποντικού.

Στο σχήμα 10 παρατηρούνται οι τύποι τροποποίησης που αποδίδουν νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση φαίνεται.



Σχήμα 10: Τύποι τροποποίησης που αποδίδουν νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση.

5-Ίωδο-2΄-δεοξουριδίνη

Στο παρελθόν έχουν γίνει αναφορές για τις κλινικές δοκιμές της IdUrd (W. H. Prusoff and B. Goz., 1975, W. H. Prusoff and B. Goz., 1973). Η IdUrd είναι ιδιαίτερα σημαντική λόγω του ότι μπορεί να αναπτυχθεί σαν ένα νουκλεοτιδικό φάρμακο, το οποίο θα είναι αποτελεσματικό σε περίπτωση μόλυνσης από έναν ιό.

Ο μηχανισμός της αντιϊκής δράσης της IdUrd σχετίζεται με τις βιολογικές επιπτώσεις της ενσωμάτωσης του αναλόγου της θυμιδίνης σε ένα ιϊκό DNA (W. H. Prusoff and B. Goz., 1975, W. H. Prusoff and B. Goz., 1973). Η ενσωμάτωση της IdUrd στο DNA φυσιολογικών μη μολυσμένων κυττάρων ίσως να είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση τοξικότητας που έχει εντοπιστεί κατά τη διάρκεια είτε της τοπικής είτε της συστηματικής θεραπείας. Ειδικότερα, η τοξικότητα είναι δοσοεξαρτώμενη και όταν εισάγεται καθημερινά στον άνθρωπο σε συγκέντρωση, η οποία αναλογεί περίπου στα

100mg/kg για 5 ή 6 ημέρες, μπορεί να παρατηρηθεί εμφάνιση στοματίτιδας, λευκοπενίας και αλωπεκίας (P. Calabresi *et al.*, 1961).

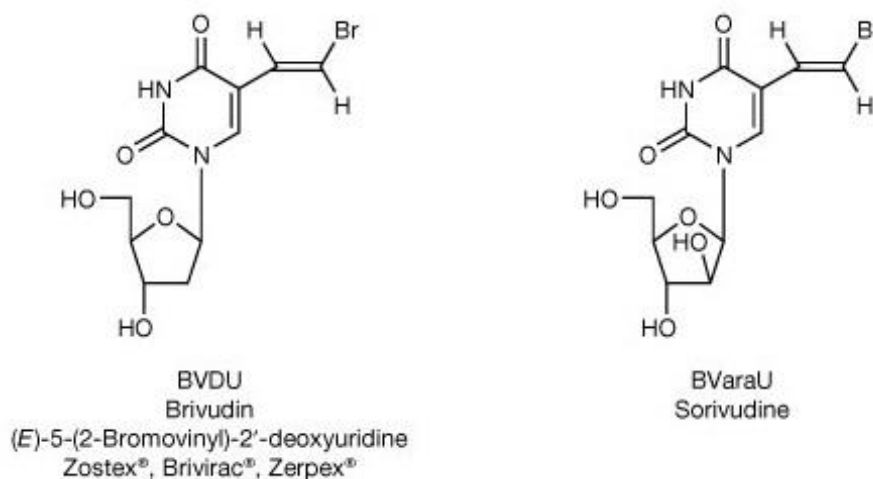
Εκτός από αυτά τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα υπάρχουν και κάποιες επιπλέον ανησυχίες οι οποίες είναι δύσκολο να αξιολογηθούν από τον άνθρωπο και περιλαμβάνουν την ικανότητα της IdUrd: α) να οδηγήσει στον σχηματισμό ιών σε καλλιέργεια κυττάρων, β) να αυξήσει το ρυθμό μετάλλαξης των βακτηρίων, γ) να οδηγήσει στη δημιουργία χρωμοσωμικών βλαβών και τέλος δ) να επηρεάσει την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση (W. H. Prusoff and B. Goz, 1975).

Γι' αυτό λοιπόν το λόγο η IdUrd φαίνεται να είναι η πρώτη ένωση, η οποία αποτελεί μια επιτυχημένη θεραπεία μιας καθιερωμένης λοίμωξης από ιό στον άνθρωπο.

Μετά τη σύνθεση της 5-ιωδο-2'-δεοξουριδίνης (IDU) από τον Prusoff (Prusoff, 1959), αυξήθηκε το ενδιαφέρον για τους 5-υποκατεστημένους νουκλεοζίτες σαν πιθανά αντιϊκά παράγωγα (Prusoff & Fischer, 1979). Τα ακόρεστα 5-υποκατεστημένα παράγωγα φαίνεται να παρουσιάζουν ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μεταξύ αυτών, η BVDU [E-5- (2-βρωμοβινυλ) -2'-δεοξουριδίνη] αποτελεί έναν από τους πιο ισχυρούς και εκλεκτικούς αναστολείς της αντιγραφής του ιού του έρπη, ιδιαίτερα του ιού απλού έρπη τύπου-1 (HSV-1) (De Clercq *et al.*, 1979). Μεγάλο μέρος του BVDU και σχετικών ενώσεων φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητα της HSV-1 κινάσης της θυμιδίνης (TK) να δεχτεί τέτοιου είδους ανάλογα σαν υποστρώματα, σε αντίθεση με την ανικανότητα του αντίστοιχου ενζύμου ξενιστή (Cheng *et al.*, 1981). Επιπροσθέτως, η τριφωσφορική BVDU μπορεί να αναστείλει αποτελεσματικότερα την HSV-1 DNA πολυμεράση από ότι αναστέλλει τις κυτταρικές DNA πολυμεράσες (Allaudeen *et al.*, 1981).

Η IDU αποτελεί σημείο εκκίνησης για την σύνθεση διαφόρων νέων παραγώγων 5-υποκατεστημένων-2'-δεοξουριδίνης. Το πιο αξιοσημείωτο παράγωγο αυτής της σειράς είναι η (E)-5-(2-βρωμοβίνυλο)-2'-δεοξουριδίνη

(Brivudin/BDU), το οποίο φαίνεται να είναι ένας αποτελεσματικός ειδικός αναστολέας του HSV-1, καθώς και του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα (VZV) [11,12]. Το ομόλογο του BVDU, η 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-*E*-5-(2-βρωμοβινυλο) ουρακίλη (BVaraU), βρέθηκε να είναι επίσης ισχυρή, όχι όμως περισσότερο από το BVDU, κατά του ιού VZV [10].



Σχήμα 11: Οι ενώσεις (*E*)-5-(2-βρωμοβίνυλο)-2'-δεοξουριδίνη και BVaraU, με ισχυρή δράση έναντι του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα [13].

Η BV-araU φαίνεται να παρουσιάζει αντιϊκή δράση έναντι εργαστηριακών στελεχών και απομονωμένων κλινικών προϊόντων όταν χρησιμοποιείται σε διάφορους ανθρώπινους ινοβλάστες και σε κυτταρική σειρά ινοβλαστών πιθήκου (Haruhiko M. *Et al.* 1991).

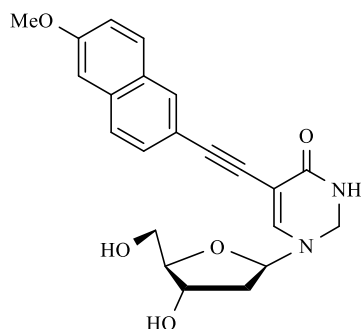
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός

Η επιτακτική ανάγκη για ανακάλυψη καινούριων θεραπευτικών ουσιών, οι οποίες θα εμφανίζουν αυξημένη βιολογική δράση, μειωμένη τοξικότητα και λιγότερες παρενέργειες και η ραγδαία ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας οδήγησε στη μελέτη, τη σύνθεση αλλά και την προώθηση στην αγορά μια μεγάλης ποικιλίας φαρμάκων που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο.

Έχουν πραγματοποιηθεί ποικίλες μετατροπές τόσο στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης όσο και στο τμήμα του σακχάρου για την εύρεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων τα οποία θα εμφανίζουν καλύτερη βιολογική δράση.

Σύμφωνα με τα παραπάνω στοιχεία, κρίθηκε αναγκαία η σύνθεση μιας νέας τάξης φουρανονουκλεοζιτών με διαφορετικούς υποκαταστάτες στην ετεροκυκλική βάση την ιωδοουρακίλη (σχήμα 12).



Σχήμα 12: Τροποποιημένος φουρανονουκλεοζίτης στη βάση και στο σάκχαρο

3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Οι αντιδράσεις ελέγχθηκαν με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Ειδικότερα, πρόκειται για μία μέθοδο, η οποία περιλαμβάνει πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₄) πάχους 0,2mm.

Για την εκτέλεση μιας χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, επιτελείται η παρακάτω διεργασία:

- Αρχικά, μια μικρή σταγόνα του διαλύματος που περιέχει το δείγμα εφαρμόζεται σε μια πλάκα, περίπου 1,5 εκατοστό από την κάτω άκρη. Ο διαλύτης αφήνεται να ολοκληρώσει πλήρη εξάτμιση, αλλιώς δεν επιτυγχάνεται κανένας διαχωρισμός ή ελάχιστος διαχωρισμός. Αν χρησιμοποιήθηκε ένας μη πτητικός διαλύτης για το δείγμα, η πλάκα χρειάζεται να ξηραθεί σε έναν θάλαμο κενού (vacuum chamber).
- Μια μικρή ποσότητα ενός κατάλληλου διαλύτη (μέσου έκλουσης) χύνεται σε ένα ποτήρι ζέσης ή σε οποιονδήποτε άλλον κατάλληλο διαφανή περιέκτη (θάλαμο διαχωρισμού) σε ένα βάθος λιγότερο από 1 εκατοστό. Μια λουρίδα από διηθητικό χαρτί (γνωστή και ως "φυτίλι") τοποθετείται στον θάλαμο, έτσι ώστε ο πυθμένας του να εφάπτεται του διαλύτη και το χαρτί να κείται στο τοίχωμα του θαλάμου και να φτάνει σχεδόν την κορυφή του περιέκτη. Ο περιέκτης κλείνεται με ένα κάλυμμα από γυαλί ή άλλο καπάκι και αφήνεται για λίγα λεπτά για να επιτρέψει στους ατμούς του διαλύτη να ανέβουν στο διηθητικό χαρτί και να κορέσει τον αέρα στον θάλαμο. (Αποτυχία κορεσμού του θαλάμου θα καταλήξει σε φτωχό διαχωρισμό και μη αναπαραγώγιμα αποτελέσματα).
- Η πλάκα TLC τοποθετείται έπειτα στον θάλαμο έτσι ώστε η ποσότητα του δείγματος να μην εφάπτεται της επιφάνειας του μέσου έκλουσης

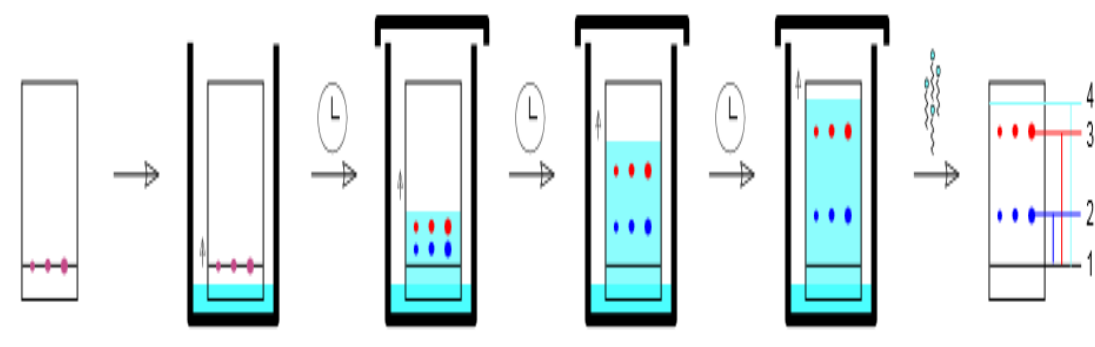
στον θάλαμο και το κάλυμμα κλείνεται. Ο διαλύτης ανεβαίνει στον δίσκο με τριχοειδή δράση (capillary action), συναντά το μείγμα του δείγματος και το μεταφέρει στην πλάκα (εκκλύει το δείγμα). Η πλάκα πρέπει να αφαιρεθεί από τον θάλαμο πριν το μέτωπο του διαλύτη φτάσει την κορυφή της στατικής φάσης (η συνέχιση της έκλουσης θα δώσει ένα παραπλανητικό αποτέλεσμα) και ξεραθεί.

- Η παρατήρηση των κηλίδων πραγματοποιείται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254nm ή 356nm) ή ύστερα από ψεκασμό με διάλυμα H_2SO_4 (θειϊκού οξέος) 30%.

Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 70/30
- Διάλυμα Γ : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 60/40
- Διάλυμα Δ : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Ε : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 40/60

Μια χρωματογραφία λεπτής στιβάδας απεικονίζεται στο σχήμα 13.



Σχήμα 13 : Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

3.2 Χρωματογραφία στήλης

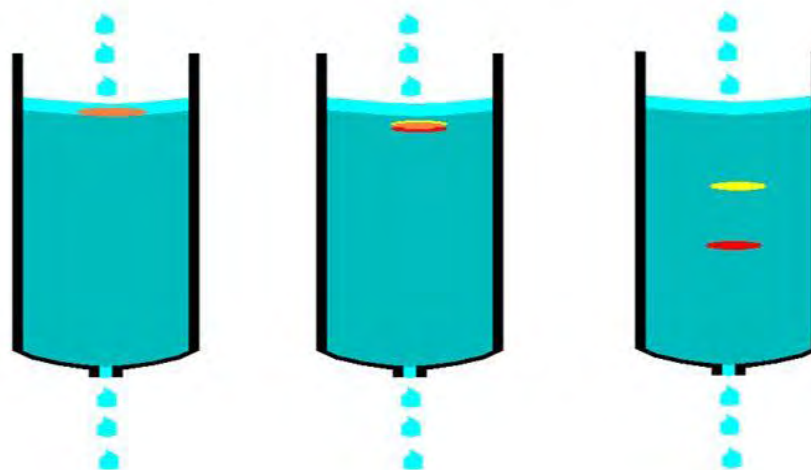
Η χρωματογραφία στήλης πραγματοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merckgrade).

Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι εξής:

- Διάλυμα Α: οξικός αιθυλεστέρας
- Διάλυμα Β: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Γ: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 40/60
- Διάλυμα Δ: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 30/70

Είδη χρωματογραφίας

Χρωματογραφία στήλης. Στην πρώτη στήλη το δείγμα μόλις έχει τοποθετηθεί. Στην δεύτερη μόλις έχει αρχίσει η έκλουση (και ο διαχωρισμός). Στην τρίτη ο διαχωρισμός είναι τέλειος.



5

Σχήμα 14 : Χρωματογραφία στήλης.

3.3 Ξήρανση διαλυτών

Για να μπορέσουν να πραγματοποιηθούν ορισμένες αντιδράσεις είναι απαραίτητη η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο, τολουόλιο και μεθανόλης.

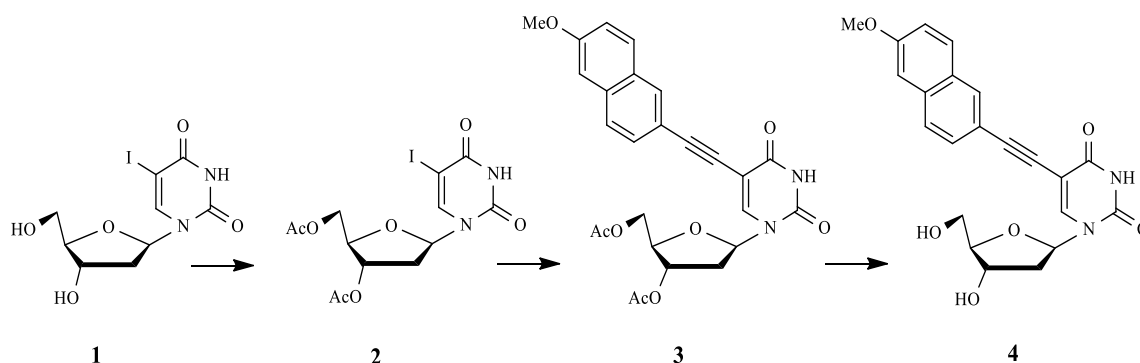
Η ξήρανση του ακετονιτρίλιου και του τολουολίου πραγματοποιείται με την παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε ένα κάθετο ψυκτήρα κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Έπειτα, ακολούθησε απόσταξη υπό άζωτο και τελικά το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε υπό την παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4Å. Η ξήρανση της μεθανόλης πραγματοποιείται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου για μία ώρα.

3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H -NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο Bruker, χρησιμοποιώντας chloroform-d (CDCl_3), methanol-d4 (CD_3OD). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^1H .

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού της (7)



Σχήμα 15

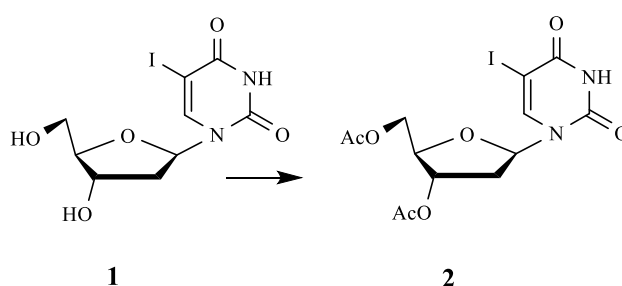
4.1.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης

Η πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 2'-δέοξυ- 5 ιοδοουριδίνη (1), η οποία υπόκειται σε προστασία των υδροξυλίων παρουσία οξικού ανυδρίτη (Ac₂O) σε πυριδίνη, γίνεται ακετυλίωση της ένωσης και λαμβάνουμε την 3',5'-δι-Ο-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη της 5-ιοδοουρακίλης 2 με απόδοση 85%. Εν συνεχεία, με αντίδραση Sonogashira [18,19] παίρνουμε το προστατευμένο προϊόν 3. Ένα τυπικό πείραμα Sonogashira είναι το παρακάτω :

Ο φούρανο-νουκλεοζίτης της 5-ιοδοουρακίλης (2) διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και με την προσθήκη του κατάλληλου αλκινίου, της τριαιθυλαμίνης (Et₃N), του ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκαταλύτης) και του τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄] (καταλύτης), πραγματοποιήθηκε η σύζευξη τους υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων ισχύος 200W για 5 λεπτά στους 60°C, σε

αποδόσεις 69-74%. Τέλος, η ολοκλήρωση της σύνθεσης γίνεται με την αποπροστασία του προϊόντος **3** σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας τον νουκλεοζίτη **4**, σε απόδοση 92%.

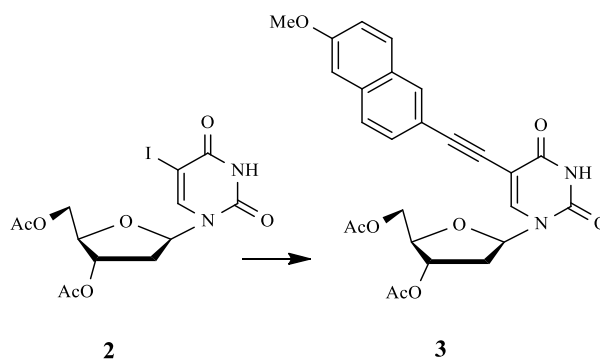
4.2 Σύνθεση της 1-(3',5'-δι-O-ακετυλ-2'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη)-5-ιοδοουρακίλης (**2**)



Σχήμα 16

Η ένωση **1** διαλύθηκε σε πυριδίνη (1,6 ml) και προστέθηκε οξικός ανυδρίτης (0,7 ml) με σκοπό να ακετυλιωθεί η ένωση και να ληφθεί η **4**. Εν συνεχεία το προϊόν συμπυκνώθηκε και καθαρίστηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης 20% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **2** (264,3mg) ελήφθη υπό τη μορφή άχρωμου ελαίου.

4.3 Σύνθεση της (**3**).



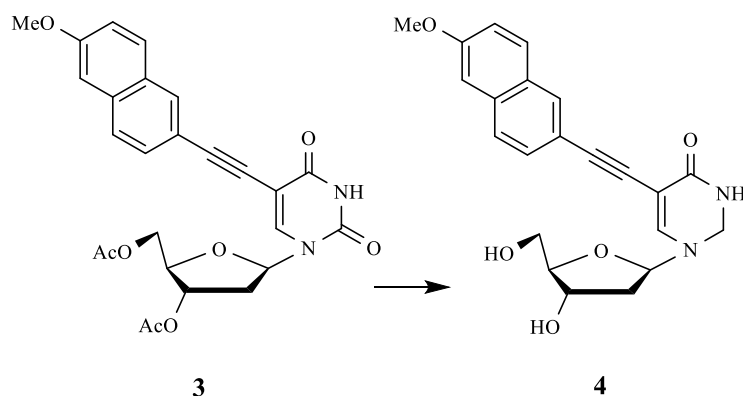
Σχήμα 17

Για τη σύνθεση του 3 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Sonogashira με μικροκύματα. Η 1-(3',5'-δι-O-ακέτυλ-2'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη) -5-ιοδοουρακίλης (2) (0,41mmol, 206mg) διαλύονται σε 5 ml άνυδρου διαλύτη N,N-διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF), 2 eq του κατάλληλου τελικού αλκινίου, τριφαινυλοφωσφορικό παλλάδιο [Pd(PPh₃)₄] (0,1 eq, 323,6 mg, 0,28mmol), ιωδιούχο χαλκό (0,1 eq, 53,7 mg, 0,28 mmol), τριαιθυλαμίνη (3 eq, 1,2ml), και έπειτα χρησιμοποιούνται τα μικροκύματα σε συνθήκες 200 Watt, για 5 λεπτά στους 60°C. Για την παραλαβή του προϊόντος γίνεται εκχύλιση του μίγματος της αντίδρασης με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, παραλαβή της οργανικής φάσης, ξήρανση με άνυδρο Na₂SO₄ και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Στη συνέχεια έγινε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν 3a (138 mg), λήφθηκε υπό τη μορφή κίτρινου αφρού με απόδοση 69%.

	Προϊόν 3
TLC (Διάλυμα Γ)	R _f = 0,22
Απόδοση	69%
[α] _D ²²	-22
λ _{max}	292 nm

Πίνακας 1

4.4 Σύνθεση των (4)



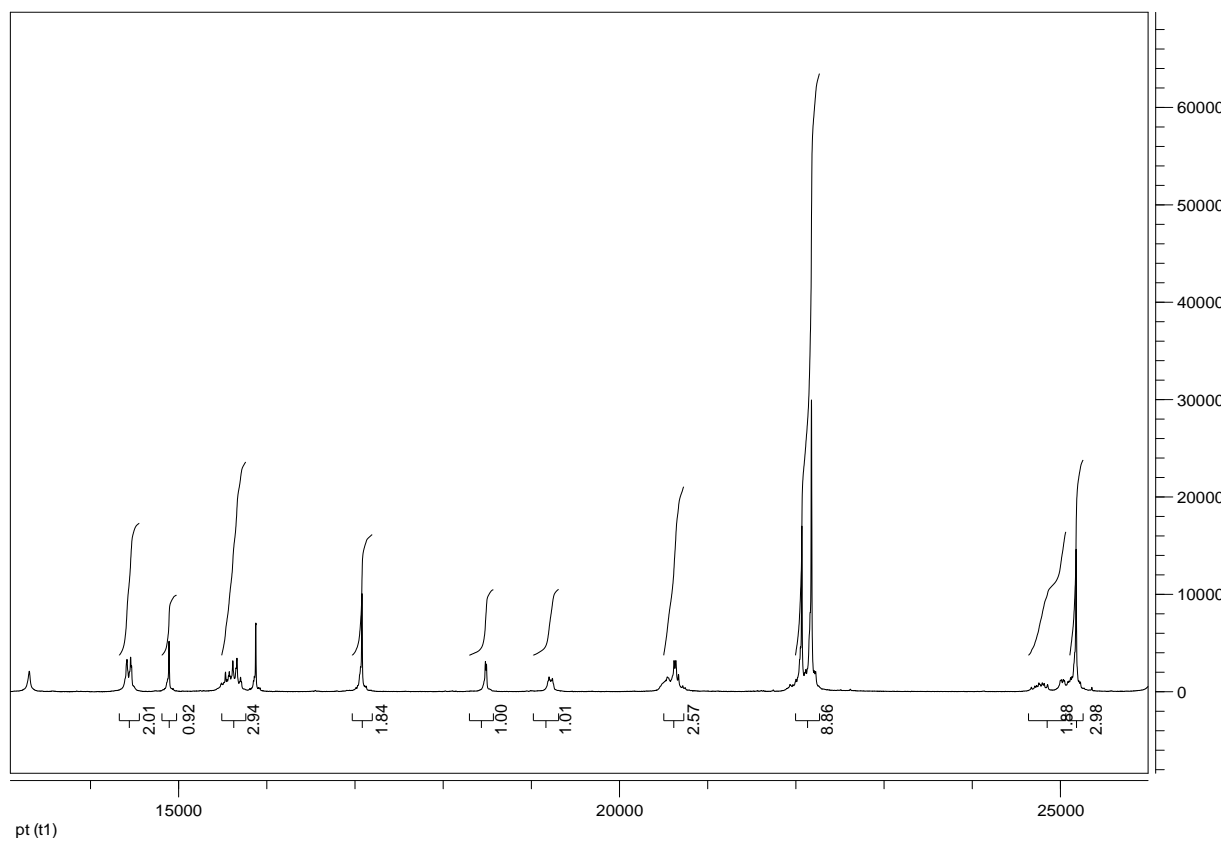
Σχήμα 18

Γίνεται ανάδευση του διαλύματος του προστατευμένου νουκλεοζίτη 3 (100 mg, 0,2mmol), σε κορεσμένη μεθανολική αμμωνία (262,5 ml) σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Έπειτα ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και ο αποπροστατευμένος νουκλεοζίτης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 10% μεθανόλης σε CH₂Cl₂, έτσι παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν 4 με μορφή κίτρινου ελαίου.

	Προϊόν 4
TLC (Διάλυμα Δ)	R _f = 0,4
Απόδοση	92%
[α] _D ²²	-4
λ _{max}	292 nm

Πίνακας 2

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR - Φάσμα ^1H NMR του προϊόντος 3



6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όλες οι ερευνητικές μελέτες και προσπάθειες στοχεύουν στην ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα. Αυτή η ανάγκη γεννήθηκε για την καταπολέμηση ιϊκών μολύνσεων. Τα συγκεκριμένα ανάλογα πρέπει να παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και εκλεκτικότητα όσον αφορά στην δράση τους.

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας ομάδας φουρανονουκλεοζιτών με αντιϊκή δράση. Η διαδικασία του πειράματος ήταν σχετικά απλή, εύκολη, και ο αριθμός των βημάτων μικρός. Οι αποδόσεις τόσο των τελικών όσο και των ενδιάμεσων προϊόντων της συνθετικής μας πορείας χαρακτηρίζονται ως πολύ καλές έως ποσοτικές. Πιο συγκεκριμένα, σύνθεση 1-(3',5'-δι-Ο-ακέτυλ-2'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη)-5-ιοδοουρακίλης (2) με απόδοση 85%, σύνθεση της (3) με απόδοση 69% και τέλος σύνθεση της (4) με απόδοση 92%. Όλες οι νέες ενώσεις προσδιορίστηκαν από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H NMR}$.

Στα νέα μόρια **3** και **4** πραγματοποιήθηκε μελέτη ως προς την αντιϊκή τους δράση έναντι του εντεροϊού Κοξάκι Β4 (Coxsackie virus Β4) και του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (Respiratory syncytial virus) της σειράς HeLa. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζεται η ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού των ιικών κυτταρικών σειρών των νεοσυντιθέμενων φουρανονουκλεοζιτών. Τα αποτελέσματα των καινούριων ενώσεων συγκρίνονται με αυτά του αντιϊκου φαρμάκου Ριμπαβιρίνη.

Ένωση	Concentration unit	Minimum cytotoxic concentration ^a	EC ₅₀ ^b	
			Coxsackie virus B4	Respiratory syncytial virus
3	μM	100	>100	>100
4	μM	>100	>100	>100
Ribavirin	μM	>250	250	4.5

Πίνακας 3

a: Η συγκέντρωση που απαιτείται για να προκαλέσει μικροσκοπικά ανιχνεύσιμη αλλαγή στη μορφολογία φυσιολογικών κυττάρων.

b: Η συγκέντρωση που απαιτείται για τη μείωση κυτταροπαθογένειας, που προκαλείται από ιούς, κατά 50%.

Από τον πίνακα διαπιστώνουμε ότι τα μόρια 3 και 4 δεν εμφανίζουν αντική και αντικαρκινική δράση. Πιο συγκεκριμένα, δεν έχουν ανασταλτική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των ιϊκών κυττάρων Coxsackie B4 και των κυττάρων του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού.

Βιβλιογραφία

1. McMurry J. Οργανική Χημεία, τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 151, 905, 1045, 1949.
2. Morisson & Boyd Οργανική Χημεία, τόμος III Γραφείο Εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων 1331, p. 758.
3. Haruhiko MACHIDA, Makiko NISHITANI, Tatsuo SUZUTANI, and Kozaburo HAYASHI, Different Antiviral Potencies of BV-araU and Related Nucleoside Analogues against Herpes Simplex Virus Type 1 in Human Cell Lines and Vero Cells, *Microbiol. Immunol*, Vol. 35 (11), 963-973, 1991
4. Komiotis D., Manta S., Tsoukala E. and Tzioumaki N., Antiviral Unsaturated Nucleosides, *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 2008, 7, 219-244
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. Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* 1995, 67, 155.
7. Lewin, B. *Genes* 2003, VIII, 6.
8. Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, 2005, 4, 4.
9. Lui, V. W. Y. W.; Lau, C. P. Y. P.; Cheung, C. S. F. S.; Ho, K.; Ng, M. H. L. H.; Cheng, S. H. H.; Hong, B.; Tsao, S.-W. W.; Tsang, C. M. M.; Lei, K. I. K. I.; Yamasaki, Y.; Mita, A.; Chan, A. T. *Biochemical pharmacology* 2010, 79, 1772.
10. Shigeta S, Yokota T, Iwabuchi T, et al. Comparative efficacy of antiherpes drugs against various strains of varicella-zoster virus. *J Infect Dis* 1983; 147: 576-584. Medline doi:10.1093/infdis/147.3.576

11. De Clercq E, Descamps J, De Somer P, Barr PJ, Jones AS, Walker RT. (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. Proc Natl Acad Sci U S A 1979; 76: 2947-2951. Medline doi:10.1073/pnas.76.6.2947
12. De Clercq E, Degreef H, Wildiers J, et al. Oral (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in severe herpes zoster. BMJ 1980; 281: 1178 Medline doi:10.1136/bmj.281.6249.1178
13. Erik De Clercq, Review: Selective anti-herpesvirus agents, Antiviral Chemistry & Chemotherapy 2013; 23:93-101
14. Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. Nucleosides Nucleotides 1992, 11, 903.
15. Robins, R. K.; Kini, G. D. "Wilman, D. E. V. Ed.; Chapman and Hall: New York, 1990, p.299
16. MacCoss, M.; Robins, M. J. Wilman, D. E. V. Ed.; Chapman and Hall: New York, 1990, p. 261
17. Siev, M.; Weinberg, R.; Penman, S. J. Cell Biol. 1969, 41, 510.
18. Ahn, Y. J.; Park, S. J.; Lee, S. G.; Shin, S. C.; Choi D. H. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 2744.
19. Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. Molecular cancer therapeutics 2010.
20. Stryer, Βιοχημεία, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 1995
21. Perigaud C., Gosselin G., Imbach J. L. Nucleoside Analogues as Chemotherapeutic Agents. Nucleosides & Nucleotides. 1993
22. <https://goo.gl/5q2u3o>
23. W. H. Prusoff, Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. Biochim Biophys Acta. 1959 Mar;32(1):295-6.

24. W. H. Prusoff and B. Goz., "Antineoplastic and Immunosuppressive Agents" (Eds. A. C. Sartorelli and D. G. Johns), 2, 272 (1975)
Springer, W. H. Prusoff and B. Goz., 1973
25. Prusoff & Fischer, 1979 Prusoff WH, Fischer PH (1979) Basis for the selective antiviral and antitumor activity of pyrimidine nucleoside analogs.
26. P. Calabresi et al., Calabresi, P., Cardoso, S. S., Finch, S. C., Kligerman, M. M., von Essen, C. F., Chu, M. Y., and Welch, A. D., *Can. Res.*, 21, 550 (1961)
27. Cheng A., D. D. Jackson, and P.M. Davis, Apparent instrument offset, refraction, and tectonic dilatation near Palmdale, California (abstract), *Eos Trans. AGU*, 62, 1051, 1981.
28. Allaudeen et al., ALLAUDEEN, H. S., KOZARICH, J. W., BERTINO, J. R. & DE CLERCQ, E. (1981). On the mechanism of selective inhibition of herpesvirus replication by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 78, 2698-2702.
29. Johnson, J. A.; Koberstein, J. T.; Finn M. G.; Turro, N. J. *Macromol. Rapid Commun.*, 2008, 29, 1052–1072. G. H.
30. R.L. Thompson, M.L. Wilkie, G.H. Hitchings, C.B. Elion, E.A. Falco, P.B. Russell The effects of antagonists on the multiplication of vaccinia virus in vitro *Science*, 110 (1949), p. 454
31. Visser, 1987. J.N.J. Visser The influence of topography on the Permo-Carboniferous glaciation in the Karoo Basin and adjoining areas, southern Africa.