



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

***ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΤΡΙΚΥΚΛΙΚΩΝ
ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ***



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΚΑΡΜΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Γ.ΦΩΣΚΟΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

2. Ν. ΠΟΥΛΗ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ (ΕΠΒΛΕΠΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ)

3. Π. ΜΑΡΑΚΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1-18
1.1 <u>Γενικά</u>	1-5
1.2 <u>Τα νουκλεοτίδια ως συστατικά των νουκλεϊνικών οξέων</u>	5-7
1.3 <u>Νουκλεοζιτικά παράγωγα που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα</u>	7-15
1.3.1 Νουκλεοζιτικά παράγωγα ως αντικαρκινικά φάρμακα	9-12
α) Θειοπουρίνες: 6-mercaptopurine, 6-thioguanine	
β) 2-Αλογονωμένα παράγωγα 2'-δεοξυαδενοσίνης: cladribine, fludarabine, clofarabine	
γ) Παράγωγα γουανοσίνης: araG και nelarabine	
1.3.2 Νουκλεοζιτικά ανάλογα ως αντιϊικά φάρμακα	13-15
α) Αναστολείς των πολυμερασών των νουκλεϊνικών οξέων	
1.4 <u>Κυτοκινίνες</u>	16-18
2. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	19-34
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	35-43
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44-48

*...Στους γονείς μου και
την αδερφή μου, Μαρία*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είχε σκοπό το σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων τρικυκλικών νουκλεοζιτών με πιθανή κυτταροστατική δράση. Τα νουκλεοτίδια είναι οι δομικές μονάδες των νουκλεϊνικών οξέων και διαδραματίζουν ενεργό ρόλο σε πολλές μεταβολικές διεργασίες. Η μελέτη των συνθετικών παραγώγων τους αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας για τις βιολογικές επιστήμες, και πολλά από αυτά βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη θεραπευτική, κυρίως ως αντι-ιικά και αντικαρκινικά φάρμακα.

Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την τάση να διαφοροποιούνται αδιάκοπα και άτακτα και γι' αυτό το λόγο, τα φάρμακα στοχεύουν στην ενεργοποίηση της απόπτωσής τους. Οι κυτοκινίνες αποτελούν φυτορμόνες που επάγουν την κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση. Η λειτουργία τους αυτή προκάλεσε το επιστημονικό ενδιαφέρον, με σκοπό την ανάπτυξη ενώσεων, που πιθανώς να επιδιορθώνουν τις δυσλειτουργίες της κυτταρικής διαίρεσης και διαφοροποίησης στα ζωικά κύτταρα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του καρκίνου. Είναι γνωστό ότι τα ριβονουκλεοτιδικά παράγωγά τους, φυσικά και συνθετικά, αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, μέσω της εκλεκτικής ενεργοποίησης της απόπτωσης και της ταυτόχρονης αναστολής της μετάβασης G1/S του κυτταρικού κύκλου.

Με βάση τα παραπάνω, παρασκευάστηκαν ορισμένα μη κλασσικά παράγωγα αδενοσίνης, με σκοπό να μελετηθεί η πιθανή κυτταροστατική δράση τους. Τα νέα μόρια φέρουν τρικυκλικό σκελετό με δομική συνάφεια προς το σύστημα της πουρίνης και υποκατεστημένη αμινομάδα σε αντιστοιχία με δραστικές κυτοκινίνες. Τα παράγωγα αυτά συντέθηκαν χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 2,6-διαμινοπυριδίνη από την οποία με διαδοχική ακετυλίωση, νίτρωση, εκλεκτική απακετυλίωση, αναγωγή της νιτρομάδας, προέκυψε ενδιάμεση ο-διαμίνη. Από την τελευταία σχηματίστηκε αρχικά η αντίστοιχη ιμιδαζολοπυριδίνη, η οποία με νίτρωση, αναγωγή και επίδραση γλυοξάλης έδωσε την ιμιδαζο[4',5':5,6]πυριδο[2,3-*b*]πυραζίνη. Το μόριο αυτό γλυκοζυλιώθηκε προς τα δύο δυνατά ισομερή θέσης. Ακολούθησε χλωρίωση στη θέση 9 και πυρηνόφιλη προσβολή του χλωρίου από κατάλληλες αμίνες, για να παραληφθούν τα τελικά προϊόντα.

ABSTRACT

THE DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL NUCLEOSIDES AS POTENTIAL ANTIPROLIFERATIVE AGENT

This thesis deals with the design and synthesis of new tricyclic nucleosides as potential antiproliferative agents. The nucleotides are the structural units of nucleic acids and play a crucial role in many metabolic processes. The study of their structural analogues is an important area of research within biological sciences, and numerous derivatives possess therapeutic interest, mainly as antiviral and anticancer drugs.

Cancer cells have the tendency to differentiate continuously and randomly and for this reason, drugs are targeting the activation of apoptosis. The cytokinins are plant hormones that promote cell division and differentiation. Their physiological role has prompted the development of compounds that might repair dysfunctions of cell division and differentiation in animal cells, as in the case of cancer cells. It is known that their ribonucleotide derivatives, natural and synthetic, inhibit proliferation of cancer cells through selective activation of apoptosis and simultaneous blockade of the transition of G1 / S cell cycle.

Based on the above mentioned considerations, a number of non-classical adenosine derivatives have been prepared in order to study their potential antiproliferative activity. The new molecules bear a tricyclic structure mimicking the purine system and possess alkylamino substituents which are present into active cytokinins. The derivatives were synthesized using as starting material 2,6-diaminopyridine which upon acetylation, nitration, selective deacetylation and reduction of the nitro group revealed an intermediate o-diamine. This compound was converted to the corresponding imidazolpyridine which was then subjected to nitration, reduction of the nitro group and reaction with glyoxal to provide imidazo[4',5':5.6]pyrido[2,3-*b*]pyrazine. Glycosylation of this molecule gave the two possible regio-isomers. The major isomer was converted to the 9-chloro derivative which was used for the preparation of the 9-aminosubstituted analogues.

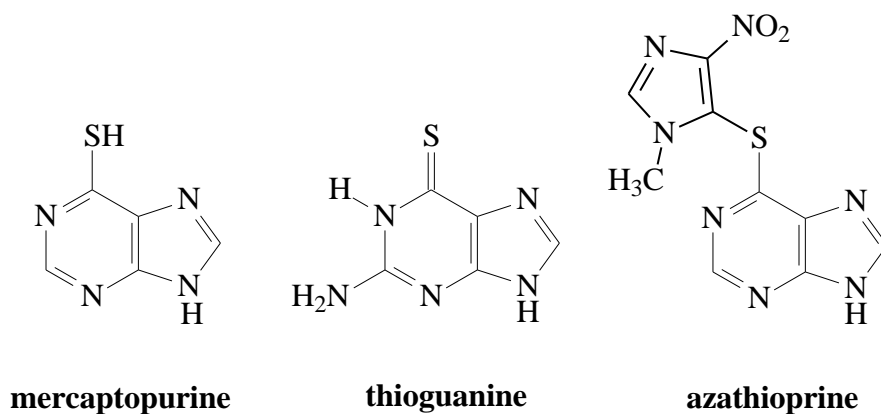
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Ο Emil Fischer, που έλαβε το βραβείο Nobel Χημείας το 1902, έδωσε το εμπειρικό όνομα «πουρίνη» στην ιμιδαζο[4,5-*d*]πυριμιδίνη, που ταυτοποίησε το 1884 και παρασκεύασε συνθετικά το 1898. Ο ίδιος ερευνητής απέδειξε ότι τα φυσικά προϊόντα αδενίνη, γουανίνη, ξανθίνη, καφεΐνη και ουρικό οξύ είναι στην πραγματικότητα υδροξυ- και αμινοϋποκατεστημένα παράγωγα πουρίνης.¹ Αργότερα, η ανακάλυψη του θεμελιώδους για τη ζωή ρόλου των νουκλεϊνικών οξέων, DNA (δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ) και RNA (ριβονουκλεϊνικό οξύ), είχε ως συνέπεια να τεθούν στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος οι δομικές μονάδες από τις οποίες βιοσυνθέτονται, δηλαδή τα νουκλεοτίδια πουρίνης και πυριμιδίνης.

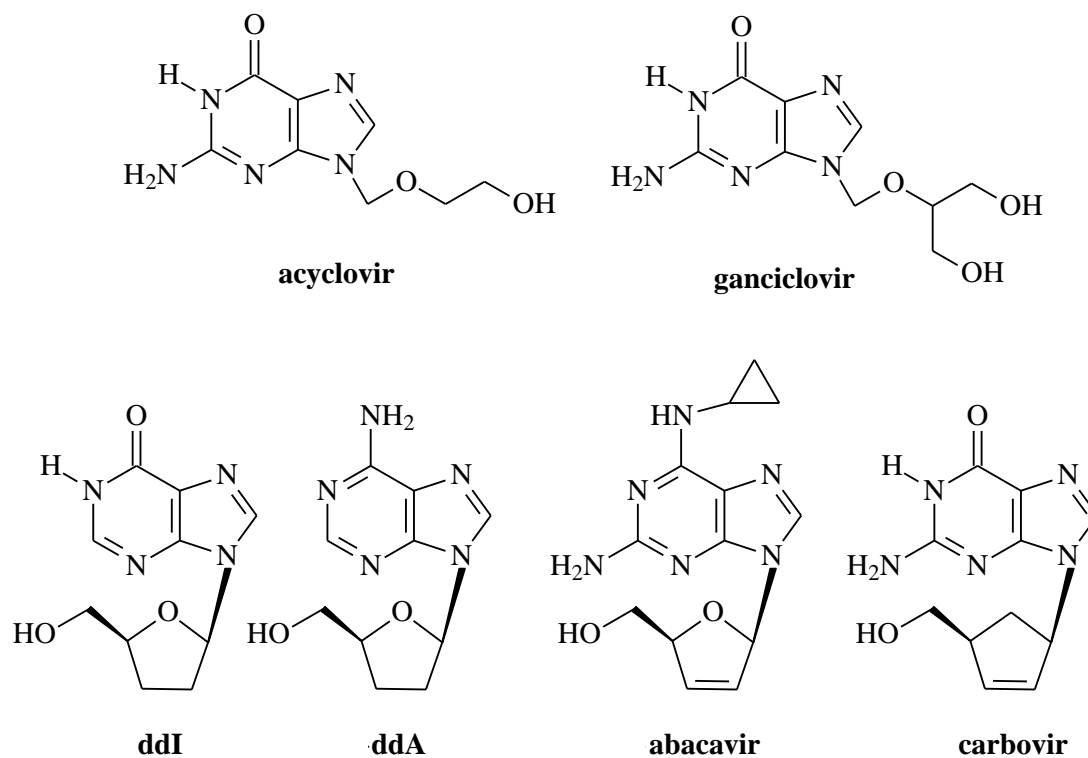
Ο φυσιολογικός ρόλος αυτών των νουκλεοτιδίων δεν σχετίζεται όμως μόνο με τα νουκλεϊνικά οξέα, αλλά επεκτείνεται στην κατάλυση πλήθους βιοχημικών αντιδράσεων, στη μεταφορά ενέργειας και στη μετάδοση ορμονικών σημάτων. Βιοχημικές μελέτες απέδειξαν ότι **τα νουκλεοτίδια μόνα τους, ή σε συνδυασμό με άλλα μόρια λαμβάνουν μέρος σε όλες τις σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες.**² Η μελέτη των συνθετικών παραγώγων πουρίνης αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας της Χημικής Βιολογίας και της Φαρμακευτικής Χημείας, για την εύρεση αντίστοιχα κατάλληλων βιοχημικών/φαρμακολογικών εργαλείων, καθώς και ενώσεων που θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα στη θεραπευτική.

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας πενητηκονταετίας παρασκευάστηκε ένας πολύ μεγάλος αριθμός νουκλεοζιτικών παραγώγων και ορισμένα εξ' αυτών αναπτύχθηκαν ως φάρμακα, κυρίως για την αντιμετώπιση μεταβολικών νοσημάτων και ως συστατικά χημειοθεραπευτικών σχημάτων έναντι ιογενών λοιμώξεων και διαφόρων μορφών καρκίνου. Η 6-mercaptopurine (**Σχήμα 1.1**) πήρε άδεια κυκλοφορίας μόλις το 1953 για την αντιμετώπιση της παιδικής λευχαιμίας, αλλά εξακολουθεί να χορηγείται μέχρι σήμερα, αφού σε πολλές περιπτώσεις φαίνεται να εξαλείφει τη νόσο.³ Ανάλογη θεραπευτική εφαρμογή βρίσκει και η άλλη θειοπουρίνη, η θειογουανίνη, ενώ η αζαθειοπρίνη (**Σχήμα 1.1**) χρησιμοποιείται ως ανοσοκατασταλτικό σε μεταμοσχεύσεις οργάνων.⁴



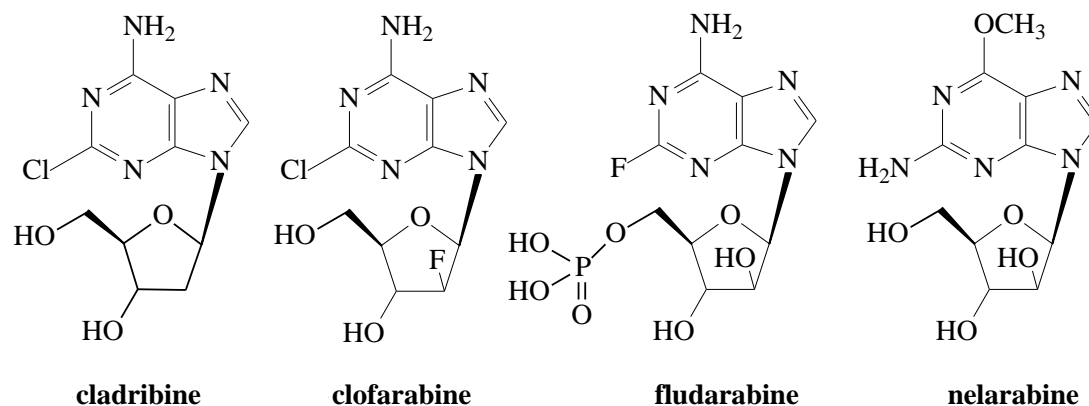
Σχήμα 1.1

Η ανακάλυψη του acyclovir έδωσε το έναυσμα για την εύρεση και άλλων σημαντικών αντι-ϊικών φαρμάκων, που είναι νουκλεοζιτικά παράγωγα αδενίνης και γουανοσίνης, όπως το ganciclovir, η διδεοξυϊνοσίνη (Didanosine, ddI), η διδεοξαδενοσίνη (ddA), το abacavir και το carbovir (**Σχήμα 1.2**), που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση ορισμένων ερπητοϊών και του HIV.⁵



Σχήμα 1.2

Παράλληλα, αναπτύχθηκαν και ορισμένα 2'-δεοξυ ή αραβινονουκλεοζιτικά παράγωγα πουρίνης, τα cladribine,⁶ clofarabine,⁷ fludarabine⁸ και nelarabine⁹ (Σχήμα 1.3), που έχουν λάβει έγκριση κυκλοφορίας ως αντικαρκινικά φάρμακα.



Σχήμα 1.3

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση πολυάριθμων «παραγώγων πουρίνης» που αποτέλεσε τη βάση για την ανάπτυξη των ανωτέρω φαρμάκων απέδειξε ότι αρκετά παράγωγα άλλων, σχετικών ετεροκυκλικών συστημάτων, κυρίως όσων μπορούν να θεωρηθούν ως αζα- ή δεαζαπουρίνες, συμπεριφέρονται πολλές φορές εντελώς ανάλογα στο βιολογικό περιβάλλον. Αυτό ανακαλύφθηκε σε μια προσπάθεια μεταβολής των ηλεκτρονικών κυρίως παραμέτρων, όταν επιχειρήθηκαν ισοστερείς αλλαγές του ετεροκυκλικού συστήματος και προέκυψαν παράγωγα με σημαντικές διαφορές στις φυσικοχημικές ιδιότητες σε σχέση με τα μητρικά παράγωγα πουρίνης. Με τέτοιου είδους αλλαγές δε μεταβάλλεται σημαντικά το σχήμα του μορίου και ελαχιστοποιείται η μεταβολή της στερεοχημείας, ενώ αλλάζουν η διαλυτότητά του, η κατανομή του ηλεκτρονικού φορτίου του, η οξύτητα ή η βασικότητα των διαφόρων ομάδων του και η ικανότητά του να συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου. Μικρές αλλαγές στο αρωματικό σύστημα των νουκλεοζιτών μπορούν να διαφοροποιήσουν τις πιθανές διαμορφώσεις του σακχάρου, όπως συμβαίνει πχ με τη περιστροφή του γλυκοζιτικού δεσμού κατά 180° , που προκαλεί αλλαγή του *anti*- προς το *syn*-διαμορφωμέρες και αντίστροφα.¹⁰ Παρά την δομική ανομοιομορφία τους, όλα τα νουκλεοζιτικά παράγωγα «πουρίνης» και «πυριμιδίνης» παρουσιάζουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά, όπως είναι η μεταφορά με μεμβρανικούς φορείς, η ενεργοποίηση προς νουκλεοτίδια με ενδοκυττάριους μεταβολικούς μηχανισμούς

και η συγκράτηση των ενεργών φωσφορυλιωμένων παραγώγων τους μέσα στο κύτταρο.

Η χαρακτηριστική ευκολία, με την οποία τα «πουρινικά παράγωγα» διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες, αποτελεί κοινό πλεονέκτημα τους και οφείλεται **στην παρουσία των παθητικών ή ενεργών συστημάτων μεταφοράς**, που έχουν εντοπιστεί στα περισσότερα ανθρώπινα κύτταρα.¹¹ Σε ό,τι αφορά τη μεταβολική ενεργοποίηση που υφίστανται μέσα στο κύτταρο οι νουκλεοζίτες, είναι προφανές ότι τα συνθετικά ανάλογα πρέπει να αναγνωρισθούν από τα αντίστοιχα ανθρώπινα ή ιϊκά (στην περίπτωση των αντι-ιϊκών φαρμάκων) ένζυμα, που λαμβάνουν μέρος στα μεταβολικά μονοπάτια της βιοσύνθεσης των νουκλεοτιδίων. Τα σχηματιζόμενα αναβολικά παράγωγα τους, τα νουκλεοτίδια, δεν διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και μέχρι να καταβολισθούν, παραμένουν ενεργά μέσα στο κύτταρο. Εκεί λειτουργούν συνήθως ως αναστολείς ενός ή περισσότερων ενζύμων, που παίζουν κομβικό ρόλο στη βιοσύνθεση των νουκλεϊνικών οξέων, με αποτέλεσμα να προκαλείται σοβαρή βλάβη στο DNA και να ενεργοποιούνται οι κυτταρικοί μηχανισμοί απόπτωσης.¹²

Υπάρχει, λοιπόν, ένας **σημαντικός περιορισμός σε σχέση με τις «επιτρεπόμενες» δομικές αλλαγές των φαρμακολογικώς δραστικών συνθετικών αναλόγων**. Το γεγονός αυτό αντισταθμίζεται από την **τεράστια ποσοτική, αλλά και ποιοτική διαφορά που παρουσιάζεται πολύ συχνά στη δράση δύο πολύ συγγενών μορίων** αυτής της κατηγορίας. Οποσδήποτε, αντανακλάται μέχρις ενός σημείου η εξειδίκευση των εμπλεκόμενων κάθε φορά αναβολικών και καταβολικών ενζύμων, τα οποία είναι συχνά περισσότερα του ενός, όμως οι διαφορές παραμένουν μεγάλες και παρατηρούνται ακόμα και για φάρμακα, που μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά, κοινά μεταβολικά μονοπάτια, παρόμοιο μηχανισμό δράσης σε μοριακό επίπεδο και παρ' όλα αυτά καταλήγουν σε διαφορετική κλινική εικόνα και χρησιμότητα.¹³ Ως παράδειγμα, αναφέρονται το φάρμακο clofarabine, που διαφέρει μόνο κατά την εισαγωγή ενός φθοροϋποκαταστάτη από το cladribine (**Σχήμα 1.3**) και ασκεί εξαιρετική αντικαρκινική δράση σε επανεμφανιζόμενη λεμφοβλαστική παιδική λευχαιμία, όπου το cladribine είναι τελείως ανενεργό.⁷

Σήμερα, μετά την ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος αποδείχθηκε ότι **το 4-7% των κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών εξαρτώνται από διάφορα νουκλεοτίδια** πουρινών (ATP, GTP, c-AMP, c-GMP, NAD, FAD, PAPS) για να ασκήσουν τη φυσιολογική λειτουργία τους, είτε επειδή πρόκειται για υποδοχείς συζευγμένους με

G-πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, GPCRs), είτε επειδή αναγνωρίζουν ως υποστρώματα ή ως συμπαράγοντες ορισμένα νουκλεοτίδια πουρινών. Αν και το ποσοστό 7% δεν φαίνεται εκ πρώτης όψεως εντυπωσιακό, είναι εντούτοις πολύ σημαντικό, αν λάβουμε υπόψη ότι μικρό μόνο μέρος του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι χρήσιμο για την ανακάλυψη φαρμάκων (drugable genome).¹⁴

Οι νεώτερες θεραπευτικές εφαρμογές αναλόγων πουρίνης αφορούν σε ένα ποσοστό στο σχεδιασμό και τη σύνθεση νέων νουκλεοζιτικών παραγώγων, αλλά **σχετίζονται επίσης και με την χρήση μη νουκλεοζιτών**, που μελετώνται σε πληθώρα νέων εφαρμογών, κυρίως ως προσδέματα των διαφόρων υποδοχέων αδενοσίνης,^{15,16} ως αναστολείς φωσφοδιεστερασών,^{17,18,19} ως τροποποιητές της έκκρισης κορτικοτροπίνης,²⁰ ως επαγωγείς της έκκρισης ιντερφερόνης,²¹ ως αναστολείς της A4 υδρολάσης του λευκοτριενίου,²² ως αναστολείς της κυστεϊνικής πρωτεάσης Cathepsin K,²³ ως αναστολείς της σουλφοτρανσφεράσης,²⁴ ως αναστολείς μεταγραφικών παραγόντων²⁵ και ως αναστολείς πρωτεϊνικών κινασών.^{26, 27} Μεγάλος αριθμός νέων ενώσεων βρίσκεται σε κλινικές δοκιμές, ενώ το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται όχι μόνο στην αύξηση της δραστηριότητας, αλλά και της εκλεκτικότητας, που συνδέεται με εξειδικευμένη δράση.²⁸

1.2 Τα νουκλεοτίδια ως συστατικά των νουκλεϊνικών οξέων

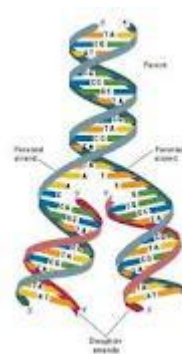
Τα νουκλεοτίδια αποτελούνται από έναν αζωτούχο, ασθενώς βασικό ετεροκυκλικό πυρήνα πουρίνης ή πυριμιδίνης, που χάριν συντομίας αναφέρεται συνήθως ως βάση, από ένα σακχαρικό τμήμα, D-ριβοφουρανόζης για τα ριβονουκλεοτίδια (RNA) και 2-δεοξυ-D-ριβοφουρανόζης για τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (DNA) και μια έως τρεις φωσφορικές ρίζες. Η επικρατούσα στις φυσιολογικές συνθήκες ταυτομερής δομή κάθε βάσης είναι σημαντική, γιατί η ταυτομέρεια σχετίζεται άμεσα με το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, που καθορίζουν την αλληλεπίδραση με ένζυμα και υποδοχείς, καθώς και την τριτοταγή δομή των νουκλεϊνικών οξέων. Στις διάφορες ταυτομερείς δομές αλλάζει ο χαρακτήρας των χαρακτηριστικών ομάδων (NH-, O-) που λειτουργούν ως δότες ή ως δέκτες ηλεκτρονίων. Έχει διαπιστωθεί ότι η σταθερότερη ταυτομερής μορφή βάσης που φέρει αμινομάδα (Αδενίνη, Γουανίνη, Κυτοσίνη), είναι αυτή στην οποία εμφανίζεται ως αμίνη, παρά ως ιμίνη. Αντίστοιχα, όταν υπάρχει ως υποκαταστάτης οξυγόνο (Γουανίνη, Θυμίνη) η λακταμική μορφή είναι σταθερότερη

της ενολικής (αρωματικό υδροξύλιο). Εκτός από τις ανωτέρω αναφερόμενες βάσεις, υπάρχουν και άλλες πουρίνες και πυριμιδίνες, που σχηματίζουν νουκλεοζίτες ή νουκλεοτίδια τα οποία απαντώνται σπανιότερα στη φύση. Ως παράδειγμα αναφέρεται η 5-μεθυλοκυτοσίνη και η N^6 -μεθυλαδενίνη, που αποτελούν δομικές μονάδες του μεταφορικού RNA (tRNA).

Οι ετεροκυκλικές βάσεις πουρίνης ή πυριμιδίνης είναι δυσδιάλυτες στο νερό σε συνθήκες φυσιολογικού pH, σε αντίθεση με τους νουκλεοζίτες και τα νουκλεοτίδια, που διαλύονται πολύ εύκολα. Η ετεροκυκλική βάση συνδέεται στην ανωμερική θέση του σακχάρου συνήθως με *N*-γλυκοζιτικό δεσμό και πολύ σπανιότερα με *C*-γλυκοζιτικό δεσμό. Το 5'-υδροξύλιο του σακχάρου εστεροποιείται με φωσφορικό οξύ, από το οποίο με πυροφωσφορικούς δεσμούς μπορεί να σχηματιστεί αλυσίδα έως και τριών φωσφορικών ομάδων. Αυτές οι ομάδες, ιονίζονται σε μεγάλο βαθμό στο φυσιολογικό pH, π.χ. τα μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια συμπεριφέρονται ως διβασικά οξέα, με pKa της τάξης του 1 και του 6 αντίστοιχα. Η περιστροφή γύρω από τον γλυκοζιτικό δεσμό των νουκλεοζιτών και των νουκλεοτιδίων περιορίζεται σε ορισμένες περιπτώσεις, λόγω της ύπαρξης στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Γενικά όμως, στους πουρινικούς νουκλεοζίτες υπάρχει ταχεία αλληλομετατροπή των *syn* και *anti* διαμορφώσεων, ενώ στους πυριμιδινικούς νουκλεοζίτες υπερέχει η *anti* διαμόρφωση. Επίσης, *anti* διαμόρφωση λαμβάνουν συνήθως τα νουκλεοτίδια που σχηματίζουν τις έλικες των νουκλεϊνικών οξέων.

Η αντιγραφή του ανθρώπινου DNA στον πυρήνα του κυττάρου καταλύεται από τις α , β , δ και ϵ DNA εξαρτώμενες DNA πολυμεράσες, ενώ το μιτοχondριακό DNA αντιγράφεται από την γ -DNA πολυμεράση. Τα ένζυμα αυτά είναι υπεύθυνα όχι μόνο για την αντιγραφή, αλλά και για την επιδιόρθωση του DNA, λειτουργώντας συγκυριακά και ως εξωνουκλεάσες. Η αντιγραφή είναι **ημισυντηρητική**, δηλαδή η μία από τις δύο έλικες του DNA χρησιμοποιείται ως μήτρα και με δομικές μονάδες τα μονοφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια σχηματίζεται σταδιακά η συμπληρωματική αλυσίδα. Το πυρηνόφιλο πρωτοταγές 3'-υδροξύλιο του τελευταίου νουκλεοτιδίου της αλυσίδας του νουκλεϊνικού οξέος προσβάλλει το α -άτομο φωσφόρου ενός τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου και έτσι σχηματίζεται 3'→5' φωσφοδιεστερικός δεσμός, ενώ αποσπάται πυροφωσφορικό οξύ. Με ανάλογη αντίδραση συνδέονται ομοιοπολικά και τα νουκλεοτίδια του RNA. Κατά την αντιγραφή ισχύει ο κανόνας της συμπληρωματικότητας, όπως έχει διατυπωθεί από τους James D. Watson και Francis H. C. Crick, δηλαδή οι βάσεις των νουκλεοτιδίων, που προστίθενται, είναι

συμπληρωματικές ως προς τις βάσεις της μητρικής αλυσίδας στην αντίστοιχη θέση.²⁹ Τα ζεύγη που επιτρέπονται, είναι Αδενίνη – Θυμίνη (δύο δεσμοί υδρογόνου) και Γουανίνη – Κυτοσίνη (τρεις δεσμοί υδρογόνου) και έτσι διασφαλίζεται η ορθότητα της αντιγραφής και η γενετική σταθερότητα. Περισσότερο πολύπλοκη είναι η διαδικασία της μεταγραφής, που καταλύεται από DNA εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες και εξασφαλίζει τη σωστή ροή της γενετικής πληροφορίας.



Στα ανθρώπινα κύτταρα τα “λάθη” στην αντιγραφή είναι σπάνια και συνήθως επιδιορθώνονται από τις DNA πολυμεράσες. Ορισμένα λάθη που παραμένουν είναι υπεύθυνα για μεταλλάξεις, στις οποίες αποδίδεται αφ’ ενός μεν η εξέλιξη και η ποικιλομορφία των οργανισμών και αφετέρου η γήρανση και η εμφάνιση εκφυλιστικών ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την αξιοπιστία της αντιγραφής του DNA είναι η επάρκεια των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Η αναστολή της σύνθεσης των δεοξυριβονουκλεοτιδίων θεωρείται ότι έχει μεταλλαξιογόνες ιδιότητες και είναι δυνατόν να προκαλέσει αναστολή της ανάπτυξης του κυττάρου ή και κυτταρικό θάνατο.

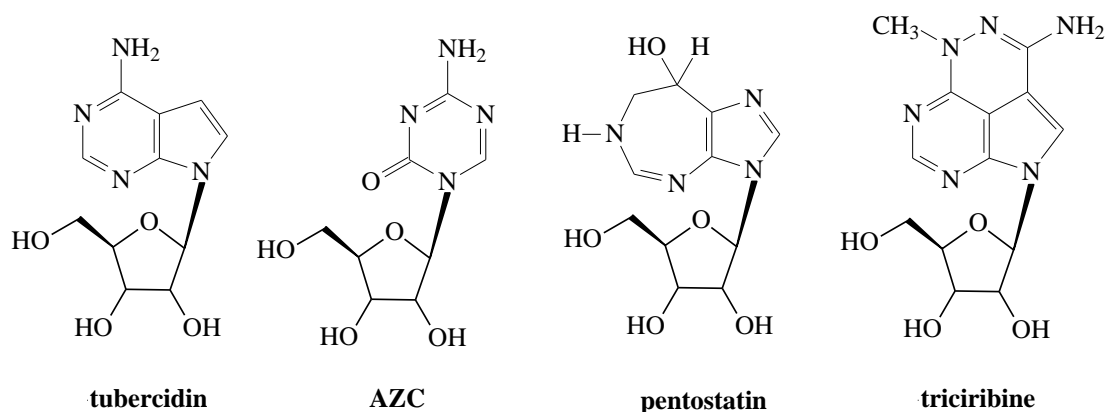
1.3 Νουκλεοζιτικά παράγωγα που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα

Τα δομικά ανάλογα των φυσικών νουκλεοζιτών/νουκλεοτιδίων **μπορούν εν δυνάμει να ασκήσουν κυτταροτοξική δράση ως αντιμεταβολίτες** κατά τη βιοσύνθεση των νουκλεϊνικών οξέων, είτε επειδή ενσωματώνονται και τροποποιούν τη δομή των μακρομορίων DNA και RNA, είτε επειδή αναστέλλουν διάφορα εμπλεκόμενα ένζυμα μεταβάλλοντας το μεταβολισμό των φυσιολογικών νουκλεοζιτών.³⁰ Υπάρχουν επίσης και ορισμένα ένζυμα που εμπλέκονται στην αναπαραγωγή ιών και βακτηρίων, που είτε δεν απαντώνται καθόλου στους ανώτερους οργανισμούς, είτε διαφέρουν αισθητά από τα αντίστοιχα ένζυμα του ξενιστή, ώστε να είναι εφικτή η εκλεκτική αναστολή τους. Αντίθετα, επειδή η χημειοθεραπεία του καρκίνου με νουκλεοζιτικά παράγωγα βασίζεται κυρίως στη μεγάλη ταχύτητα αναπαραγωγής των καρκινικών κυττάρων, είναι επόμενο να παρουσιάζει (τις γνωστές) παρενέργειες από τους φυσιολογικά ταχέως αναπαραγόμενους ιστούς.

Η χρήση του όρου «νουκλεοζίτης» είναι γενική και περιλαμβάνει όλα τα μόρια που μπορούν να θεωρηθούν δομικά ανάλογα των φυσικών νουκλεοζιτών, δηλαδή των δομικών μονάδων των νουκλεϊνικών οξέων ή άλλων νουκλεοζιτών που απομονώνονται και μελετώνται ως φυσικά προϊόντα (πχ συστατικά/προϊόντα μυκήτων). Έτσι, η δομική μετατροπή μπορεί να προκληθεί:

- στην ετεροκυκλική βάση,
- στο σακχαρικό τμήμα,
- στην ετεροκυκλική βάση και στο σακχαρικό τμήμα συγχρόνως.

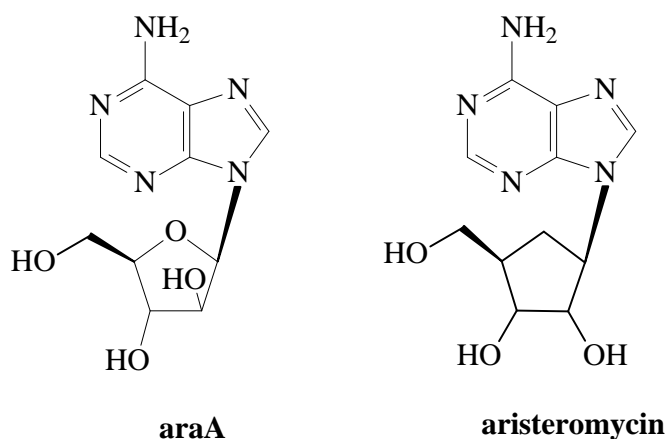
Η πρώτη περίπτωση αναφέρεται κυρίως σε παράγωγα πουρίνης, στα οποία διαφοροποιούνται τα άτομα αζώτου στον ετεροκυκλικό πυρήνα. Όταν αντικατασταθεί ένα άζωτο από άνθρακα, το νέο μόριο αναφέρεται ως δεαζα-ανάλογο, π.χ. το tubercidin (**Σχήμα 1.4**) είναι η 7-δεαζα-αδενοσίνη. Αντίθετα, όταν αντικατασταθεί άνθρακας από άζωτο, το νέο μόριο αναφέρεται ως αζα-ανάλογο, π.χ. το AZC (**Σχήμα 1.4**) είναι η 5-αζα-κυτιδίνη. Άλλοτε εισάγονται χαρακτηριστικές ομάδες στις ετεροκυκλικές βάσεις των νουκλεοζιτών, όπως π.χ. το cladribine (**Σχήμα 1.3**) είναι η 2-χλωρο-2'-δεοξυαδενοσίνη, ενώ σπανιότερα τροποποιείται ο ίδιος ο ετεροκυκλικός σκελετός, αλλάζοντας μέγεθος, όπως στην περίπτωση του pentostatin, ή σχηματίζοντας τρικυκλικό αρωματικό σύστημα, όπως στην περίπτωση του tricitribine (**Σχήμα 1.4**).



Σχήμα 1.4

Στη δεύτερη κατηγορία εντάσσονται αρχικά όλα τα αραβινο-παράγωγα νουκλεοζιτών, όπως το Ara-A (1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοαδενοσίνη, **Σχήμα 1.5**), στα οποία έχει αλλάξει η στερεοχημεία του 2'-υδροξυλίου του σακχάρου. Επίσης,

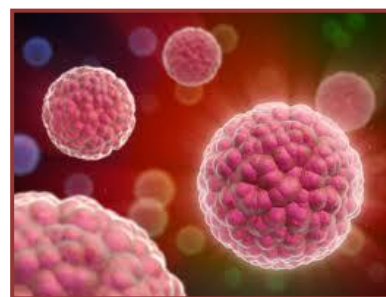
εντάσσονται τα 2',3'-διδεοξυ-παράγωγα νουκλεοζιτών, όπως το ddI (didanosine, διδεοξυινοσίνη, **Σχήμα 1.2**), στα οποία τα υδροξύλια 2' και 3' έχουν αντικατασταθεί από υδρογόνα. Έχει, επίσης, συμβεί αντικατάσταση υδροξυλίου του σακχαρικού δακτυλίου από άλλη ομάδα, αντικατάσταση της ριβοφουρανόζης από οξαθειολανικό δακτύλιο ή από κυκλοβουτανικό ή κυκλοπεντανικό υποκατεστημένο δακτύλιο, οπότε αναφερόμαστε σε “καρβοκυκλικούς νουκλεοζίτες”, όπως το aristeromycin, (**Σχήμα 1.5**). Μια ειδική κατηγορία νουκλεοζιτικών παραγώγων είναι αυτή, στην οποία ο σακχαρικός δακτύλιος έχει αντικατασταθεί από αλειφατική αλυσίδα υποκατεστημένη με υδροξύλιο(α), η οποία μπορεί να μιμηθεί εν μέρει τη λειτουργία του. Έτσι, προκύπτουν οι “άκυκλοι νουκλεοζίτες”, όπως τα σημαντικά αντι-ϊικά φάρμακα acyclovir και ganciclovir (**Σχήμα 1.2**).



Σχήμα 1.5

1.3.1 Νουκλεοζιτικά παράγωγα ως αντικαρκινικά φάρμακα

μελέτη της φυσιολογίας των καρκινικών κυττάρων αποκάλυψε τη διαφοροποίηση της έκφρασης αρκετών γονιδίων, με αποτέλεσμα τη σοβαρή διαταραχή ή την κατάργηση των πολλαπλών ρυθμιστικών μηχανισμών, που σχετίζονται με τον έλεγχο της ομοιόστασης του οργανισμού και με την κυτταρική επιβίωση. Παρά τις επί μέρους διαφοροποιήσεις, που είναι πολλές, το τελικό αποτέλεσμα έχει να κάνει με την ανάγκη πολλαπλασιασμού του καρκινικού κυττάρου,



επομένως και με την ανάγκη βιοσύνθεσης DNA, που συνεπάγεται τη διαρκή προμήθεια πρώτων υλών, νουκλεοτιδίων πουρινών και πυριμιδινών.

Τα νουκλεοζιτικά παράγωγα εισήχθησαν στην θεραπεία του καρκίνου κατά τη δεκαετία του 1960 και παραμένουν έκτοτε τα πλέον χρησιμοποιούμενα και δραστικά φάρμακα. Συνήθως λειτουργούν σε δύο επίπεδα: αφ' ενός μεν αναστέλλοντας την αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων και αφ' ετέρου αντικαθιστώντας τα φυσικά νουκλεοτίδια στην αλυσίδα DNA. Προκαλείται τερματισμός της σύνθεσης του νουκλεϊνικού οξέος, διαταραχή των διαδικασιών επιδιόρθωσης και τελικά κυτταρική απόπτωση. Μέσα σε αυτό το γενικό πλαίσιο, προκύπτουν αρκετές επί μέρους διαφοροποιήσεις, λόγω της εμπλοκής πολλαπλών παραγόντων και συνεπώς **η εξαγωγή σχέσεων δομής-δράσης γι' αυτά τα μόρια δεν είναι απλή.**

α) Θειοπουρίνες: 6-mercaptopurine, 6-thioguanine

Τα 6-mercaptopurine και 6-thioguanine (**Σχήμα 1.1**) είναι δομικά ανάλογα της υποξανθίνης και της γουανίνης αντίστοιχα. Εισερχόμενα στον οργανισμό, ριβοζυλιώνονται και φωσφορυλιώνονται από την φωσφοροριβοζυλική τρανσφεράση, το ένζυμο μεταβολισμού των πουρινών κατά την διαδικασία επαναχρησιμοποίησης υλικών (purine salvage pathway). Μετατρέπονται αρχικά σε μονοφωσφορική θειοϊνόςίνη και μονοφωσφορική θειογουανόςίνη και στη συνέχεια στα αντίστοιχα νουκλεοτίδια, που ενσωματώνονται σε αλυσίδα DNA, κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης του νουκλεϊνικού οξέος, στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Προκύπτει αναστολή πλήθους ενζύμων πχ DNA πολυμερασών, λιγασών και ενδονουκλεασών. Επιπλέον, το μονοφωσφορικό νουκλεοτίδιο του 6-mercaptopurine αναστέλλει ένζυμα που λαμβάνουν μέρος στη *de novo* σύνθεση των πουρινών, μεταξύ των οποίων η PRPP αμιδοτρανσφεράση, η αφυδρογονάση της 1-μονοφωσφορικής ινόςίνης (IMP dehydrogenase) και η αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων. Οι θειοπουρίνες χρησιμοποιούνται κυρίως σε οξείες λευχαιμίες, το 6-mercaptopurine χορηγείται ευρέως σε παιδικές λευχαιμίες και είναι επίσης το συνηθέστερα χορηγούμενο φάρμακο στη χρόνια λεμφοβλαστική λευχαιμία.

β) 2-Αλογονωμένα ανάλογα της 2'-δεοξυαδενοσίνης: cladribine, fludarabine, clofarabine

Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση όλων των δομικών αναλόγων της 2'-δεοξυαδενοσίνης ρυθμίζεται από τη δράση ειδικών καταβολικών ενζύμων, τα

σημαντικότερα εκ των οποίων είναι η δεαμινάση της αδενοσίνης (ADA), που μετατρέπει τα παράγωγα αδενοσίνης στα αντίστοιχα, λιγότερο δραστικά παράγωγα ινοσίνης και η φωσφορυλάση των νουκλεοζιτών πουρίνης (PNP), που διασπά τον γλυκοζιτικό δεσμό. Με σκοπό την αύξηση της μεταβολικής σταθερότητας των αναλόγων αδενοσίνης επιχειρήθηκε η αντικατάσταση του 2-υδρογόνου της πουρίνης από αλογόνο.³¹

Τόσο το cladribine (2-χλωρο-2'-δεοξυαδενοσίνη, **Σχήμα 1.3**), όσο και το fludarabine (5'-μονοφωσφορικός εστέρας της 9-β-D-αραβινοφουρανοζύλο-2-φθοροαδενίνης, **Σχήμα 1.3**) είναι πολύ ανθεκτικά στη δράση της ADA.³² Το fludarabine εισέρχεται στο κύτταρο μετά από την υδρόλυση του 5'-φωσφορικού εστέρα, που γίνεται ταχύτατα κατά τη διάρκεια της ενδοφλέβιας έγχυσης από μη εξειδικευμένες φωσφατάσες του ορού. Στα λεμφοκύτταρα, όπου υπάρχουν υψηλά επίπεδα κινάσης της δεοξυκυτιδίνης και χαμηλά



επίπεδα 5'-νουκλεοτιδάσης συσσωρεύεται ο τριφωσφορικός εστέρας του, που ανταγωνίζεται αποτελεσματικά το φυσικό υπόστρωμα, για την ενσωμάτωσή του σε αλυσίδα DNA. Η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των μεταβολιτών των ανωτέρω φαρμάκων καταστέλλει την έκφραση γονιδίων, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για την επιβίωση του κυττάρου, και επηρεάζει τη μιτοχονδριακή λειτουργία, ενεργοποιώντας αποπτωτικές οδούς, όπως αυτή που ελέγχεται από τις κασπάσες -3 και -9.³³ Το fludarabine ενσωματώνεται και στο RNA και προκαλεί πρόωρη διακοπή της μεταγραφικής διαδικασίας, αναστολή της RNA-πολυμεράσης II και τελικά αναστολή της σύνθεσης RNA. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η δράση των cladribine και fludarabine ως αναστολέων της μεθυλίωσης του DNA, μέσω αναστολής της υδρολάσης της S-αδενοζυλομεθειονίνης, της ένωσης που λειτουργεί ως δότης μεθυλίου.³⁴ Η μεθυλίωση του DNA είναι σημαντική επιγενετική διαδικασία, που σχετίζεται με την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, με την κυτταρική διαφοροποίηση και βέβαια με την καρκινογένεση. Το cladribine,



χρησιμοποιείται στην θεραπεία διαφόρων μορφών λευχαιμίας και (μη-Hodgkin) λεμφωμάτων, καθώς επίσης και για τον έλεγχο της σκλήρυνσης κατά πλάκας και ορισμένων αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως ο συστηματικός λύκος και η ψωρίαση.³⁵ Σε αντίθεση με το cladribine, που καταπολεμά την οξεία μυελογενή λευχαιμία σε παιδιά, το fludarabine είναι δραστικό στην οξεία μυελογενή λευχαιμία ενηλίκων, αλλά μόνο

όταν χορηγείται σε υψηλές δόσεις, που συνήθως είναι νευροτοξικές. Μια άλλη σοβαρή παρενέργεια αυτών των φαρμάκων είναι η πρόκληση ανοσοκαταστολής μεγάλης διάρκειας, που δίνει πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξη μολύνσεων και ίσως δευτερογενών καρκίνων.

Στα πλαίσια προσπαθειών βελτίωσης της κλινικής αποτελεσματικότητας τους, ανακαλύφθηκε το clofarabine, (*Σχήμα 1.3*), που είναι πολύ ανθεκτικό στη δράση των ADA και PNP και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση οξείας λευχαιμίας σε παιδιά.

γ) Παράγωγα γουανοσίνης: araG και nelarabine

Το 1983 δημοσιεύτηκε μελέτη σχετικά με την κυτταροτοξική δράση της 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλογουανίνης (araG) στα T-λεμφοκύτταρα.³⁶ Το ανωτέρω παράγωγο είναι ανθεκτικό στην δράση της PNP, αλλά πρακτικά αδιάλυτο στο νερό, γεγονός που δεν επιτρέπει την περαιτέρω ανάπτυξη του ως φάρμακο. Αντ' αυτού αξιολογήθηκε κλινικά το προφάρμακο nelarabine [2-αμινο-(9-β-D-αραβινοφουρανοζυλο)-6-μεθοξυ-9H-πουρίνη, *Σχήμα 1.3*], που διαλύεται δέκα φορές καλύτερα από το araG στο νερό και μετατρέπεται πλήρως και εύκολα σε araG με την επίδραση της δεαμινάσης της αδενοσίνης. Το nelarabine απεδείχθη αποτελεσματικό, κυρίως για θεραπεία ασθενών με οξεία T-λεμφοκυτταρική λευχαιμία.^{9,37}

Ο μηχανισμός δράσης του araG δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, όμως φαίνεται ότι η κυτταροτοξικότητα του συσχετίζεται με την επιτυχή ενσωμάτωση του αντίστοιχου μονοφωσφορικού του εστέρα στο DNA, στη θέση της μονοφωσφορικής γουανοσίνης, οπότε ενεργοποιείται η κυτταρική απόπτωση. Το araG ενσωματώνεται επίσης στο μιτοχονδριακό DNA, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η λειτουργία των μιτοχονδρίων και να προκύπτει μιτοχονδριακή τοξικότητα μετά από μακρά έκθεση στο φάρμακο.³⁸

1.3.2 Νουκλεοζιτικά ανάλογα ως αντι-ϊικά φάρμακα

Ο ορθολογικός σχεδιασμός παραγώγων ικανών να αναστέλλουν με εκλεκτικό τρόπο ορισμένες ζωτικές λειτουργίες παθογόνων ιών κατέστη δυνατός κυρίως μετά από τη μελέτη της αναστολής διαφόρων ιϊκών ενζύμων, όπως είναι για παράδειγμα οι DNA- ή RNA-πολυμεράσες, που λαμβάνουν μέρος στη βιοσύνθεση του γενετικού υλικού των ιών, οι πρωτεάσες, που “ενεργοποιούν” τις ιϊκές πολυπρωτεΐνες διασπώντας τις προς δομικές και λειτουργικές ιϊκές πρωτεΐνες, κ. α. Η εύρεση ισχυρού και εκλεκτικού αναστολέα του ιϊκού ενζύμου αποτελεί το πρώτο βήμα μιας πιο απαιτητικής διαδικασίας, αφού για να είναι κλινικά εφαρμόσιμο ένα αντι-ϊικό παράγωγο πρέπει να χαρακτηρίζεται και από άλλες ιδιότητες, όπως είναι η ικανοποιητική σταθερότητα και βιοδιαθεσιμότητα για λήψη από το στόμα, η κατάλληλη φαρμακοκινητική και μεταβολική συμπεριφορά, η ελάχιστη κυτταροτοξικότητα, οι μη απαγορευτικές αλληλεπιδράσεις με άλλα φάρμακα κλπ.

Ο αριθμός των νουκλεοζιτικών παραγώγων που χρησιμοποιούνται σήμερα στη θεραπεία ιώσεων είναι μεγάλος.³⁹ Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι 15 από τις 30 δραστικές ενώσεις, που χρησιμοποιούνται στις Ηνωμένες Πολιτείες για την παρασκευή αντι-ϊικών φαρμάκων, είναι παράγωγα νουκλεοζιτών και στοχεύουν κυρίως στην αντιμετώπιση του συνδρόμου του AIDS (HIV) και μολύνσεων από έρπητοϊούς (HSV, HMCV) και ιούς ηπατίτιδας (HBV, HCV). Ειδικά για την αντιμετώπιση του HIV χρησιμοποιούνται συνδυαστικά χημειοθεραπευτικά σχήματα, στα οποία συμμετέχουν και άλλες κατηγορίες αντι-ϊικών φαρμάκων π.χ. μη νουκλεοζιτικοί (αλλοστερικοί) αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης και πεπτιδομιμητικοί αναστολείς της ιϊκής πρωτεάσης.

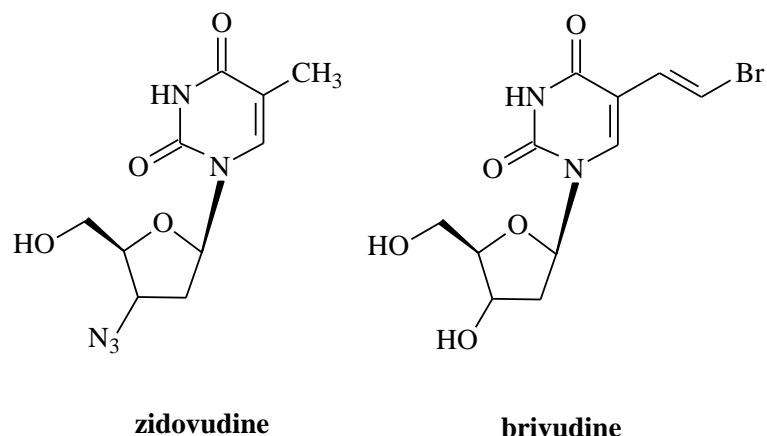
α) Αναστολείς των πολυμερασών των νουκλεϊνικών οξέων

Από τις τρεις φωσφορυλιώσεις της μεταβολικής ενεργοποίησης αυτών των μορίων, μόνο η πρώτη είναι εκλεκτική, ανεξάρτητα αν οφείλεται σε κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες. Οι δύο επόμενες αντιδράσεις είναι λιγότερο εκλεκτικές και συνήθως καταλύονται από διάφορες κυτταρικές κινάσες. Το acyclovir [9-[(2-υδροξυαιθοξυ)μεθυλο]γουανίνη, *Σχήμα 1.2*] οφείλει την εξαιρετική του εκλεκτικότητα κυρίως στο γεγονός ότι η πρώτη αντίδραση φωσφορυλίωσης, καταλύεται αποτελεσματικά μόνο από την ιϊκή κινάση της θυμιδίνης του ιού του έρπητα (HSV-1 και HSV-2) και του έρπητα-ζωστήρα (VZV). Ενεργοποιείται, λοιπόν,

μεταβολικά μόνο στα μολυσμένα κύτταρα και ο τριφωσφορικός εστέρας του αναγνωρίζεται πολύ καλύτερα ως υπόστρωμα από τις ιϊκές, παρά από τις ανθρώπινες DNA πολυμεράσες.⁴⁰ Αποτελεί υπόδειγμα ασφαλούς και αποτελεσματικής αντι-ιϊκής θεραπείας και ήταν επόμενο να χρησιμεύσει ως ένωση-οδηγός για τον σχεδιασμό ανάλογων μορίων. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνεται ένα άλλο φάρμακο, το ganciclovir (**Σχήμα 1.2**), στο οποίο προστέθηκε στην “άκυκλη” αλυσίδα μια υδροξυμεθυλενομάδα ως υποκαταστάτης. Το ganciclovir, σε αντίθεση με το acyclovir, είναι πολύ δραστικό έναντι του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (HCMV), δεν τερματίζει τη σύνθεση της αλυσίδας, στην οποία ενσωματώνεται ως μονοφωσφορικός νουκλεοζίτης και, εξ’ αιτίας της λιγότερο εκλεκτικής μεταβολικής ενεργοποίησης και της λιγότερο εκλεκτικής αναστολής της ιϊκής DNA πολυμεράσης, εμφανίζει κυτταροτοξικότητα και σοβαρές παρενέργειες.⁴¹

Σε ανάλογη με το acyclovir, πολύ εκλεκτική μεταβολική ενεργοποίηση οφείλει την εκλεκτικότητα της δράσης του και το brivudine [(E)-5-(2-βρωμοβινυλο)-2'-δεοξουριδίνη, **Σχήμα 1.6**] και μάλιστα καθοριστικό ρόλο παίζει η *trans*- γεωμετρική ισομέρεια του υποκαταστάτη. Το brivudine φωσφορυλιώνεται από την κινάση της θυμιδίνης των ιών HSV-1 και VZV, αλλά δεν αναγνωρίζεται επαρκώς από την κινάση της θυμιδίνης του HSV-2, με αποτέλεσμα να μη μετατρέπεται στον 5'-τριφωσφορικό νουκλεοζίτη σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί με έρπητα των γεννητικών οργάνων.⁴²

Αντίθετα, το zidovudine (AZT, **Σχήμα 1.6**) και τα άλλα 2',3'-διδεοξυνουκλεοζιτικά παράγωγα, που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του AIDS και του ιού της ηπατίτιδας Β δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Nucleosides Reverse Transcriptase Inhibitors, **NRTIs**), φωσφορυλιώνονται από κυτταρικές κινάσες εις βάρος των φυσικών νουκλεοζιτών.⁴³ Ο 5'-τριφωσφορικός εστέρας των 2',3'-διδεοξυνουκλεοζιτικών αναλόγων αποτελεί εναλλακτικό υπόστρωμα/ανταγωνιστικό αναστολέα του ιϊκού ενζύμου, που λειτουργεί διαδοχικά ως ειδική RNA εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, ως RNAάση-H και ως DNA εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, για να συνθέσει το δίκλωνο προ-ιϊκό DNA. Αυτά τα 2',3'-διδεοξυνουκλεοζιτικά φάρμακα δε στερούνται τοξικών παρενεργειών. Αν και θεωρούνται εκλεκτικά, ως προς την αναστολή της ιϊκής DNA πολυμεράσης, υπάρχει πάντοτε κίνδυνος αναστολής και των κυτταρικών DNA πολυμερασών, με ό,τι αυτό συνεπάγεται για την εκδήλωση κυτταροτοξικότητας.



Σχήμα 1.6

Η εξαγωγή σχέσεων δομής-δράσης για τους αντι-ϊικούς νουκλεοζίτες είναι πολύπλοκη και επίπονη, λόγω της δυσκολίας αξιολόγησης των *in vitro* αποτελεσμάτων και αδυναμίας πρόβλεψης της κλινικής αποτελεσματικότητας κάθε νέου μορίου. Απαιτείται η συλλογή πολλών στοιχείων, ακόμα και σχετικών με τη φυσιολογία των χρησιμοποιούμενων πειραματόζων, επειδή η μεταβολική ενεργοποίηση του φαρμάκου, με τη συμμετοχή κινασών του ξενιστή, αποτελεί τις περισσότερες φορές το καθοριστικό στάδιο για την εκδήλωση της δράσης, ενώ η έκβαση των ανταγωνιστικών αντιδράσεων εξαρτάται κάθε φορά από τη συγκέντρωση των φυσικών νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων, που είναι πολύ διαφορετική στις διάφορες κυτταρικές καλλιέργειες, ή στους διαφορετικούς μολυνθέντες ιστούς του ασθενή. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι τα IC_{50} 's των AZT και ddI *in vitro* διαφέρουν κατά 1000 και δεν «προβλέπουν» καθόλου σωστά την *in vivo* δραστηριότητα και το σχεδόν ισοδύναμο θεραπευτικό αποτέλεσμα αυτών των δύο φαρμάκων.

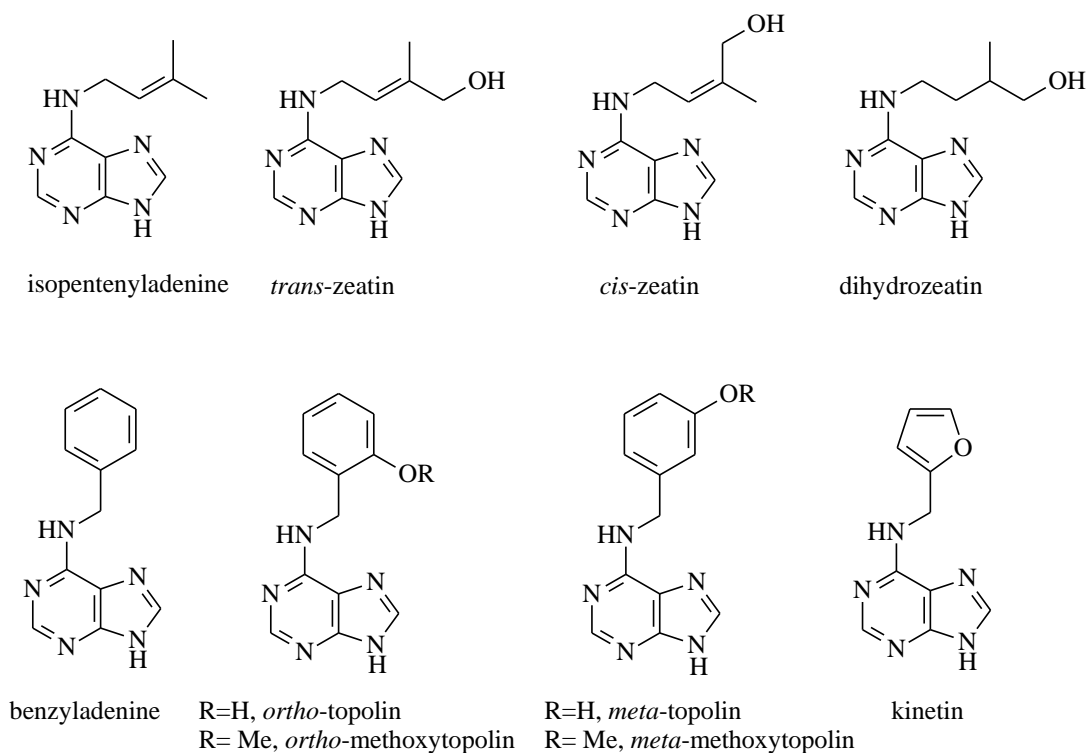
1.4 Κυτοκινίνες

Οι κυτοκινίνες αποτελούν παράγωγα της αδενίνης υποκατεστημένα στην 6-θέση με αλειφατική, ισοπρενική αλυσίδα ή με αρωματικό δακτύλιο (**Σχήμα 1.7**). Αποτελούν σημαντικές φυτορμόνες που βρέθηκε ότι λειτουργούν, τουλάχιστον *in vitro*, ως επαγωγείς της κυτταρικής διαίρεσης.⁴⁴ Η κυτοκινίνη, που είναι περισσότερο διαδεδομένη στο φυτικό βασίλειο είναι η *trans*-zeatin και ακολουθούν άλλα παράγωγα αδενίνης που φέρουν N^6 -αλειφατικό υποκαταστάτη, των οποίων οι συγκεντρώσεις διαφέρουν, ανάλογα με το είδος. Λιγότερο διαδεδομένες είναι οι αρωματικές κυτοκινίνες, δηλαδή η N^6 -βενζυλαδενίνη και τα υδροξυλιωμένα παραγωγά της, οι τοπολίνες (topolins), που έχουν απομονωθεί μόνο από φυτά του γένους *taxa*.⁴⁵

Ιδιαίτερη είναι η περίπτωση της N^6 -φουρφυουλαδενίνης ή κινετίνης (kinetin), που απομονώθηκε ως προϊόν πυρόλυσης του DNA,⁴⁶ παρασκευάστηκε συνθετικά και μελετήθηκε εκτενώς πριν αποδειχθεί ότι πρόκειται στην ουσία για φυσικό προϊόν.⁴⁷ Η κινετίνη ασκεί ισχυρή αντι-οξειδωτική δράση *in vitro* και *in vivo*⁴⁸ και αποδεδειγμένα προστατεύει το DNA από ενδεχόμενη οξειδωτική βλάβη.⁴⁷ Θεωρείται ισχυρός αντιγηραντικός παράγοντας και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία καλλυντικών.⁴⁹

Φαίνεται ότι όλες οι φυσικές κυτοκινίνες συνθέτονται στα πλαίσια της άμυνας του κυττάρου, όταν βρίσκεται υπό την επίδραση οξειδωτικού stress.⁵⁰ Εμφανίζονται σε ποικιλία μορφών, ως ελεύθερες βάσεις, ως ριβονουκλεοζιτικά παράγωγα, ως 5'-μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια, ως *O*-γλυκοζίτες, ή συζευγμένες με διάφορα αμινοξέα. Εξ' αυτών, η ισοπεντυλαδενίνη είναι η μόνη που απαντάται και στο ζωικό βασίλειο, προερχόμενη από το μεβαλονικό οξύ και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, ή ως συστατικό του tRNA, λαμβάνοντας μέρος στον έλεγχο της πρωτεϊνσύνθεσης.

Ο ρόλος των κυτοκινινών στον έλεγχο της αύξησης και της διαφοροποίησης των φυτικών κυττάρων προκάλεσε το επιστημονικό ενδιαφέρον, σχετικά με την πιθανότητα άσκησης μιας ανάλογης δράσης στα ζωικά κύτταρα και την ανάπτυξη ενώσεων, που σχετίζονται με δυσλειτουργίες στην κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση, όπως ο καρκίνος.



Σχήμα 1.7

Αρχικά, επιβεβαιώθηκε η ικανότητα της κινετίνης και άλλων φυσικών κυτοκινινών να επάγουν τη διαφοροποίηση ανθρώπινων κυττάρων, αλλά σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις (25–100 IM).⁵¹ Περισσότερο ενδιαφέρουσα αποδείχθηκε η δράση των ριβονουκλεοζιτικών τους παραγώγων, που ενδοκυτταρικά μετατρέπονται στα αντίστοιχα μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια και αναστέλλουν ισχυρά τον πολλαπλασιασμό λευχαιμικών κυττάρων.^{52,53} Ενώ η ορμονική δράση των κυτοκινινών οφείλεται στην αλληλεπίδραση του ετεροκυκλικού τμήματός τους με υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, η κυτταροτοξική δράση τους προϋποθέτει τη μεταβολική τους ενεργοποίηση προς το αντίστοιχο νουκλεοτίδιο.

Η υψηλή δραστηριότητα της *N*⁶-ισοπεντενυλαδενοσίνης, της *N*⁶-βενζυλαδενοσίνης και του ριβοζίτη της κινετίνης έναντι διαφόρων καρκινικών σειρών επιβεβαιώθηκε με σειρά πειραμάτων.⁵⁴⁻⁵⁷ Επιπλέον, οι ανωτέρω ενώσεις, βρέθηκε ότι, ασκούν αντικαρκινική δράση και *in vivo*⁵⁸ και μάλιστα ο ριβοζίτης της κινετίνης προτάθηκε ως «ένωση - οδηγός» για την ανάπτυξη θεραπείας έναντι του πολλαπλού μυελώματος.⁵⁹

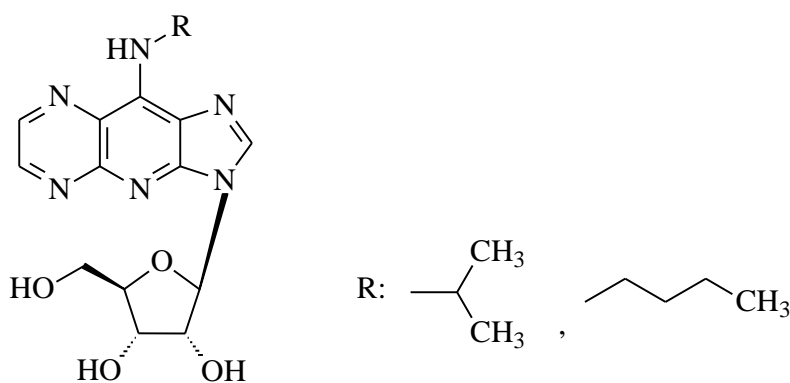
Ο μηχανισμός κυτταροτοξικής δράσης των νουκλεοζιτικών παραγώγων των κυτοκινινών, καθώς και ορισμένων συνθετικών αναλόγων τους^{60,61} περιλαμβάνει τη

μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του ATP και τη διαταραχή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια και την ενεργοποίηση της κασπάσης-3.^{52,62,63} Η ενεργοποίηση απόπτωσης είναι εκλεκτική για τα καρκινικά κύτταρα⁶⁴ και συνδέεται επίσης με την αναστολή της έκφρασης του αντι-αποπτωτικού γονιδίου bcl-x1, και την ενεργοποίηση του προ-αποπτωτικού γονιδίου bax.

Οι κασπάσες ανήκουν στην οικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης και έχουν κυρίαρχο ρόλο στην απόπτωση, αφού αποδομούν διάφορες λειτουργικές πρωτεΐνες του κυττάρου, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και ένζυμα που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και στην επιδιόρθωση του DNA. Συντίθενται στο κύτταρο ως πρόδρομες πρωτεάσες (προ-κασπάσες 30-50 kDa), που για να ασκήσουν την δραστηριότητά τους απαιτούν πρωτεόλυση, είτε μέσω άλλης ενεργοποιημένης πρωτεάσης, είτε μέσω αυτοπρωτεόλυσης.

Επιπλέον, η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού οφείλεται στην αναστολή της μετάβασης G1/S του κυτταρικού κύκλου, που συνδέεται με την αναστολή της βιοσύνθεσης των κυκλινών A, E και D1, ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης των φυσικών αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p21waf και p27kip1 και τελικά αναστολή του ενεργού συμπλόκου cyclin/Cdk2.^{65,66}

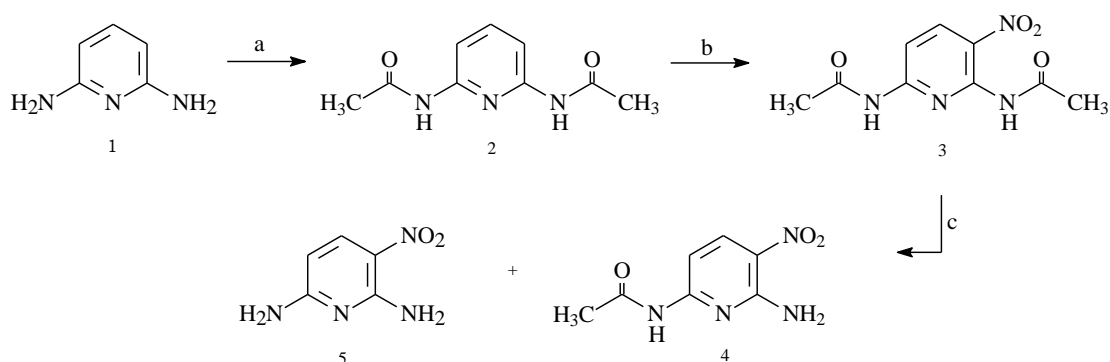
Σε συνέχεια των προηγούμενων παρατηρήσεων και σε συνάφεια με την ερευνητική μας ενασχόληση για τη σύνθεση και βιολογική αποτίμηση νέων τροποποιημένων νουκλεοζιτικών παραγώγων, αποφασίσαμε να παρασκευάσουμε ορισμένα μη κλασσικά παράγωγα αδενοσίνης, με σκοπό να μελετήσουμε την πιθανή κυτταροστατική δράση τους. Τα νέα μόρια φέρουν τρικυκλικό σκελετό με δομική αντιστοιχία με τις δραστικές κυτοκινίνες (**Σχήμα 1.8**).



Σχήμα 1.8

2.ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Για την παραλαβή των επιθυμητών παραγώγων, χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη η 2,6-διαμινοπυριδίνη **1**, η οποία αρχικά ακετυλιώθηκε με επίδραση διμοριακής ποσότητας οξικού ανυδρίτη και παραλήφθηκε το διακεταμίδιο **2** σε απόδοση 87%. Στη συνέχεια, με νίτρωση του παραγώγου **2** παρασκευάστηκε το 3-νιτροπαραίγωγο **3** σε καλή απόδοση (88%). Από την αντίδραση δεν παραλήφθηκε το 3,5-δινιτροπαραίγωγο, ούτε απομονώθηκαν προϊόντα υδρόλυσης του αμιδικού δεσμού, καθώς οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ήπιες. Σε επόμενο στάδιο έγινε εκλεκτική απακετυλίωση της αμινομάδας, που βρίσκεται σε *ο*-θέση ως προς την νιτρομάδα, με την επίδραση πυκνού υδροχλωρικού οξέος. Η αντίδραση αυτή έδωσε ως κύριο προϊόν το παράγωγο **4** σε απόδοση 50%, ενώ απομονώθηκε επίσης μια ελάχιστη ποσότητα του αντίστοιχου 2,6-διαμινονιτροπαραγώγου **5**, γεγονός που δικαιολογείται από το ισχυρό επαγωγικό φαινόμενο της νιτρομάδας (Σχήμα 2.1).

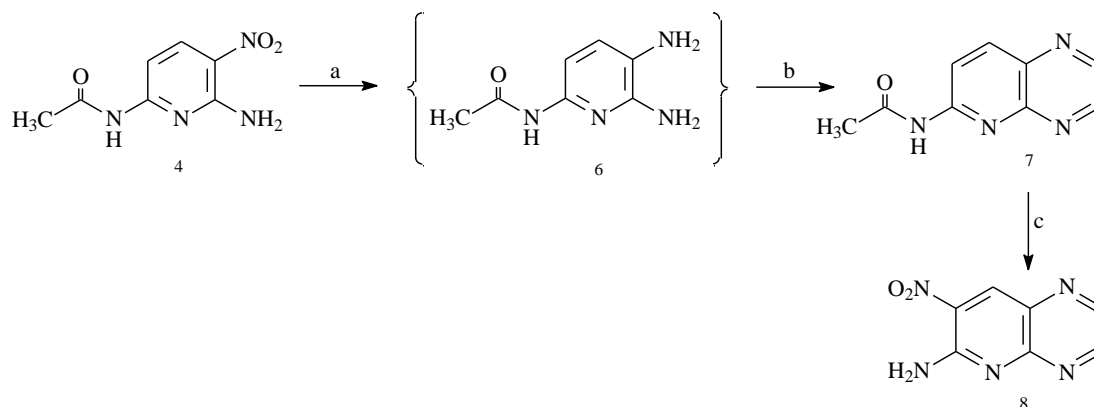


a) $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, CH_2Cl_2 , b) π. HNO_3 + π. H_2SO_4 (οξύ νίτρωσης), π. H_2SO_4 , c) π. HCl , CH_3OH

Σχήμα 2.1

Ακολούθησε καταλυτική υδρογόνωση του ακεταμιδίου **4**, με τη χρήση παλλαδίου επί άνθρακα ως καταλύτη. Η ασταθής διαμίνη **6** που προέκυψε, δεν απομονώθηκε, αλλά υποβλήθηκε σε κυκλοποίηση με την επίδραση γλυοξάλης. Από την αντίδραση προέκυψε η πυριδο[2,3-*b*]πυραζίνη **7** με απόδοση 56%, στην οποία έγινε προσπάθεια νίτρωσης με διάφορες μεθόδους για να παραληφθεί το παράγωγο **8**. Η μόνη μέθοδος που έδωσε το επιθυμητό νιτροπαραίγωγο **8** ήταν αυτή, στην οποία χρησιμοποιήθηκε

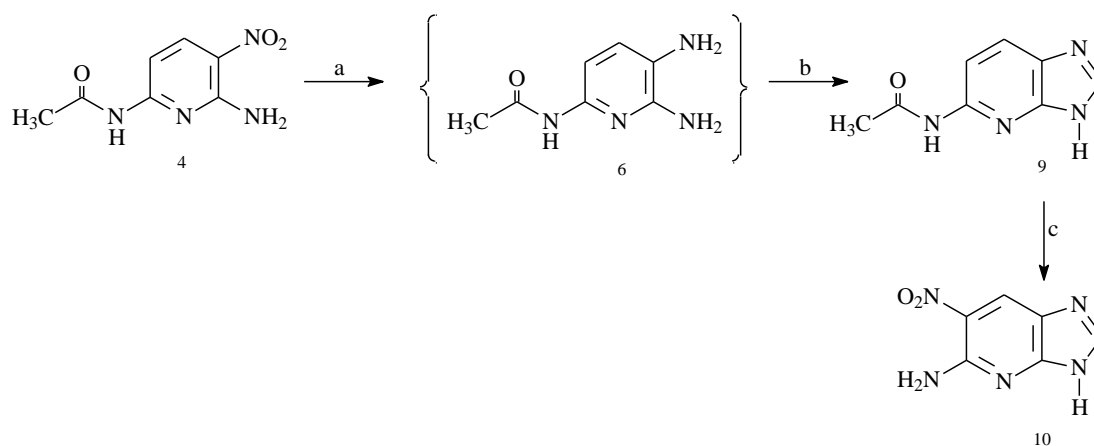
ως οξύ νίτρωσης μίγμα οξικού ανυδρίτη και αμιζοντος νιτρικού οξέος. Λόγω της πολύ μικρής απόδοσής του σταδίου αυτού (7%) η πορεία αυτή εγκαταλείφθηκε (*Σχήμα 2.2*).



a) Pd/C, CH₃CH₂OH, b) γλυοξάλη, CH₃CH₂OH, c) (CH₃CO)₂O + ατμ. HNO₃ (οξύ νίτρωσης), (CH₃CO)₂O

Σχήμα 2.2

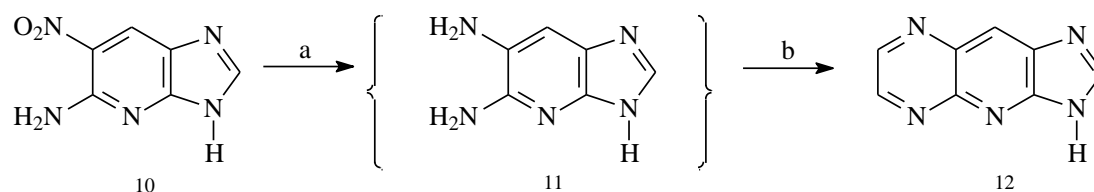
Ως εναλλακτική συνθετική πορεία σχεδιάστηκε ο σχηματισμός ιμιδαζολοπυριδίνης, επί της οποίας θα συμπυκνωθεί πυραζινικός δακτύλιος. Επομένως, μετά την καταλυτική υδρογόνωση του ακεταμιδίου **4** προς την ασταθή διαμίνη **6**, πραγματοποιήθηκε κύκλωση με τη χρήση ορθομυρμηκικού τριαιθυλεστέρα. Από την αντίδραση αυτή προέκυψε η ιμιδαζολοπυριδίνη **9** (*Σχήμα 2.3*), η οποία στη συνέχεια νιτρώθηκε, με την επίδραση μίγματος θειϊκού και νιτρικού οξέος και έτσι παραλήφθηκε το νιτροπαράγωγο **10**.



a) Pd/C, CH₃CH₂OH, b) ορθομυρμηκικός τριαιθυλεστέρας, π. HCl, c) π. H₂SO₄ + π. HNO₃ (οξύ νίτρωσης), π. H₂SO₄

Σχήμα 2.3

Για τη παρασκευή του τρικυκλικού μορίου **12** (Σχήμα 2.4), πραγματοποιήθηκε αρχικά αναγωγή της νιτρομάδας του παραγώγου **10** με καταλυτική υδρογόνωση, χρησιμοποιώντας ως καταλύτη παλλάδιο επί άνθρακα. Η ασταθής διαμίνη **11** υποβλήθηκε απευθείας σε αντίδραση κυκλοποίησης, με την επίδραση γλυοξάλης για τη δημιουργία του πυραζινικού δακτυλίου και παραλήφθηκε το επιθυμητό μόριο **12**, που αποτελεί ένα νέο συμπυκνωμένο ετεροκυκλικό σύστημα, σε απόδοση 86%.

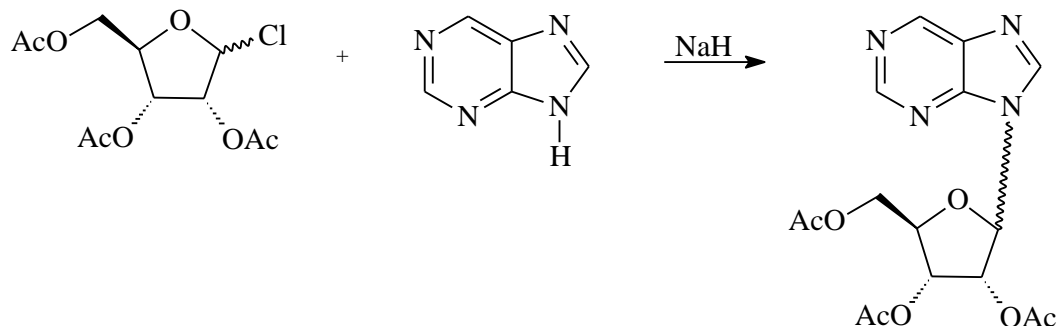


a) Pd/C, CH₃CH₂OH, b) γλυοξάλη, CH₃CH₂OH

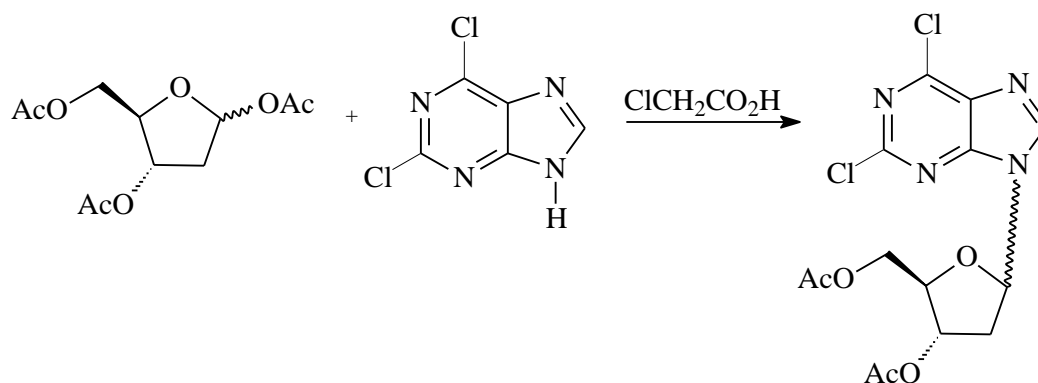
Σχήμα 2.4

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της γλυκοζυλίωσης. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται αρκετές μέθοδοι σύνθεσης νουκλεοζιτικών παραγώγων,⁶⁷ οι σημαντικότερες από αυτές, όπου χρησιμοποιείται προσχηματισμένη βάση και κατάλληλο σακχαρικό παράγωγο. παρουσιάζονται σε συντομία παρακάτω:

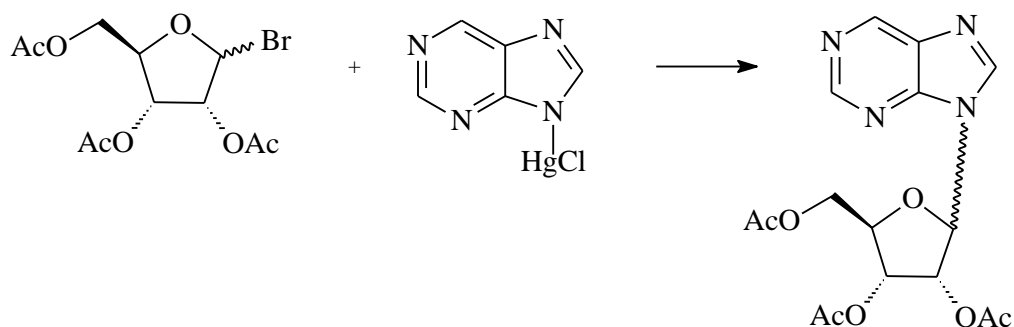
- Η αντίδραση ενός 1'-αλογονωμένου σακχάρου με το ανιόν ενός κατάλληλου ετεροκυκλικού δακτυλίου. Με κατάλληλη επιλογή του σακχάρου επιτυγχάνεται στερεοεκλεκτικότητα στην προσθήκη.^{68,69}



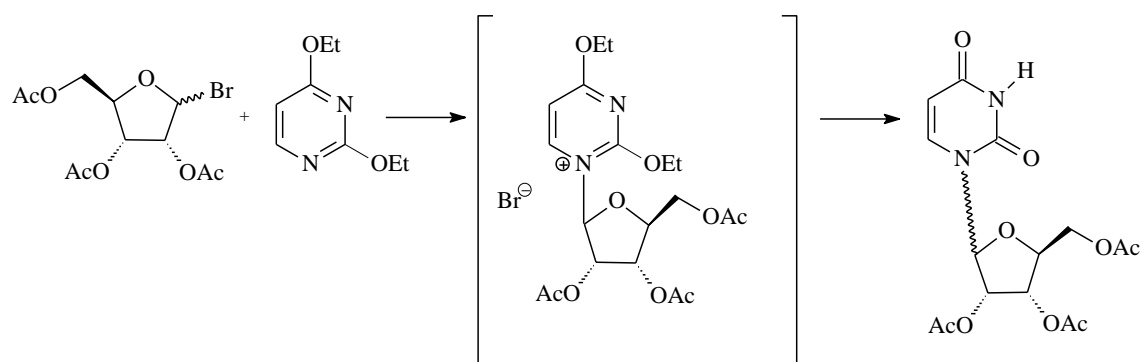
- Η μέθοδος Sato⁷⁰ που αφορά στη σύντηξη O-ακυλοσακχάρων με ετεροκυκλικές βάσεις, με όξινη κατάλυση. Είναι μια μέθοδος χρήσιμη, καθώς μπορεί να εφαρμοστεί και για τη λήψη 2-δεοξυ-νουκλεοζιτών.



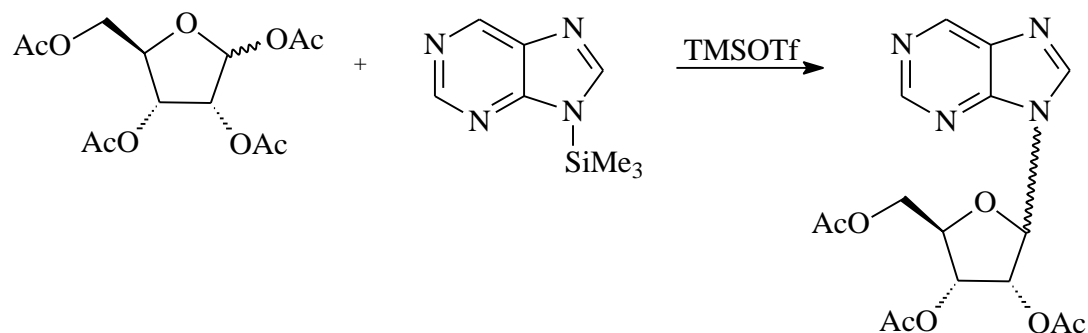
- Η μέθοδος Fischer-Helfferich/Koenigs-Knorr, στην οποία ενώσεις νουκλεοτιδίων με βαρέα μέταλλα, κυρίως Ag⁺ και Hg²⁺, αντιδρούν με προστατευμένη 1'-Cl ή 1'-Br ριβοφουρανόζη.⁷¹



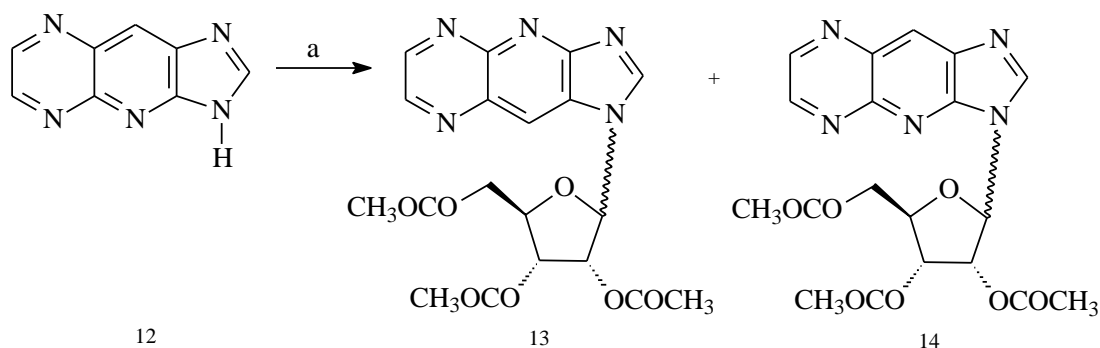
- Η γλυκοζυλίωση Hilbert-Johnson που αφορά στην αντίδραση αλκοξυπυριμιδινών (αλλά και μη αρωματικών άγλυκων τμημάτων) με προστατευμένα 1'-αλογονωμένα σάκχαρα και οδεύει μέσω ενδιάμεσου άλατος πυριδινίου.⁷²⁻⁷⁴



- Η γλυκοζυλίωση Vorbrüggen, που χρησιμοποιεί στοιχεία της προηγούμενης μεθόδου (Hilbert-Johnson), κατά την οποία μια σιλυλιωμένη ετεροκυκλική βάση αντιδρά με ένα πλήρως ακετυλιωμένο (ή βενζοϋλιωμένο) σάκχαρο, αλλά για την προαγωγή της γλυκοζυλίωσης εισάγει την χρήση καταλυτών - οξέων κατά Lewis, όπως το SnCl_4 ή το TMSOTf .⁷⁵

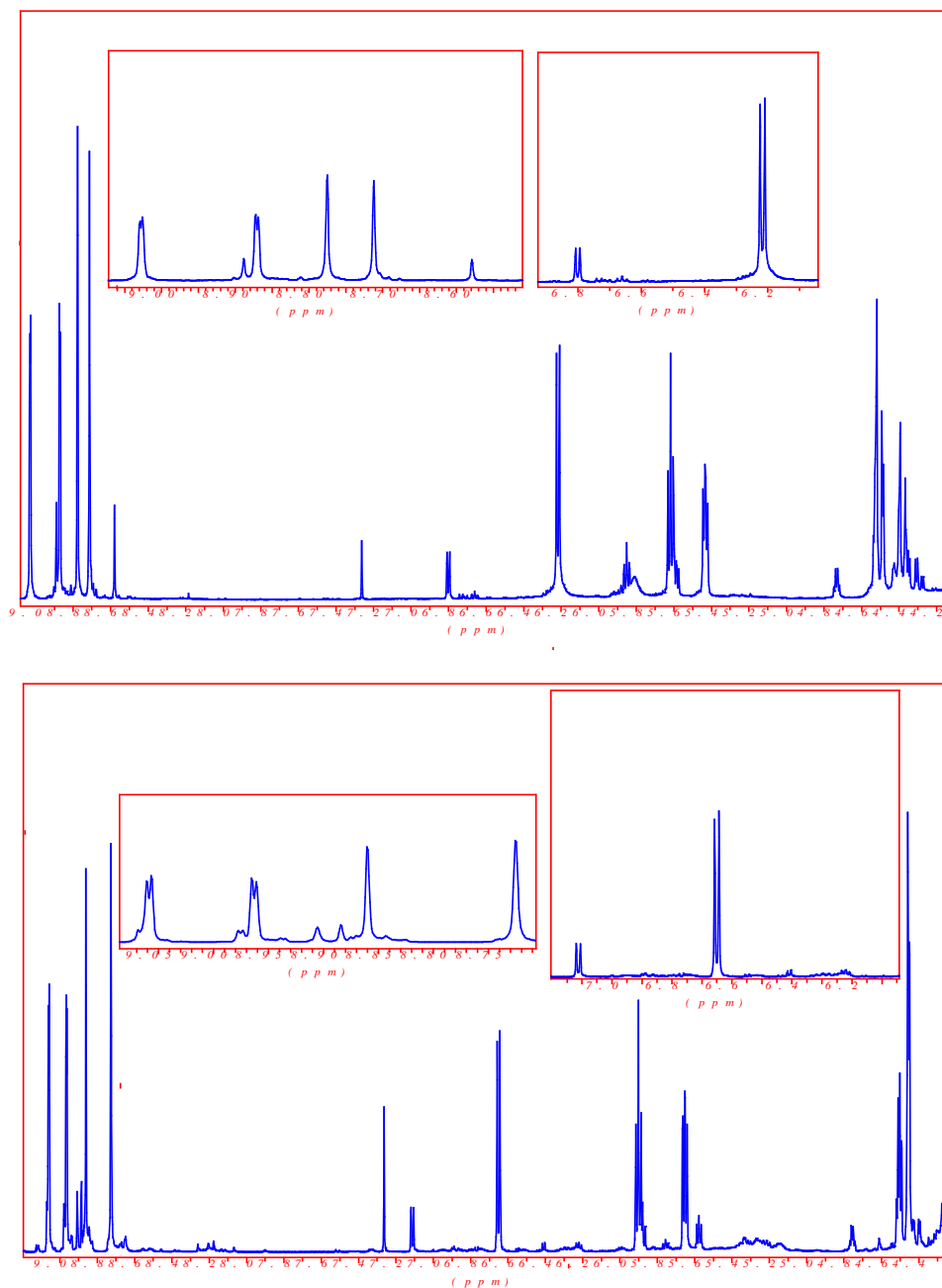


Στην παρούσα εργασία, στο τρικυκλικό παράγωγο **12**, εφαρμόστηκε η τελευταία μέθοδος. Επειδή οι σιλυλιωμένες ετεροκυκλικές βάσεις υδρολύονται με σχετική ευκολία, γεγονός που δυσκολεύει τη χρησιμοποίησή τους, συνηθίζεται η *in situ* δημιουργία τους στις σχετικές αντιδράσεις.⁷⁶ Λαμβάνοντας υπόψη αυτή την παρατήρηση, πραγματοποιήθηκε η γλυκοζυλίωση του παραγώγου **12** με την επίδραση 1,2,3,5-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανόζης παρουσία N-τριμεθυλοσιλυλακεταμιδίου και τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα, οπότε παρελήφθησαν τα ακετυλιωμένα ισομερή θέσης **13** και **14**. Με τη βοήθεια χρωματογραφίας στήλης διαχωρίστηκαν μεταξύ τους τα ισομερή θέσης ως μίγματα των αντίστοιχων α- και β- ανωμερών. Στην **Εικόνα 2.1** δίνονται τα φάσματα των μιγμάτων των ανωμερών, στα οποία διακρίνονται τα δυο ανωμερικά πρωτόνια, καθώς επίσης και τα αντίστοιχα αρωματικά πρωτόνια σε αναλογία περίπου 6:1. Επιχειρήθηκε, στη συνέχεια, διαχωρισμός των ανωμερών και για τα δυο ισομερή, όμως κατέστη δυνατή η απομόνωση και ταυτοποίηση μόνο των β-ανωμερών, καθώς το ποσοστό των α-ανωμερών στο μίγμα ήταν εξαιρετικά χαμηλό και ελήφθησαν μόνο μίγματά τους (**Σχήμα 2.5**).



a) N-τριμεθυλοσιλυλακεταμιδίο (BSA), 1,2,3,5-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανόζη, τριφθορομεθανοσουλφονικός τριμεθυλοσιλυλεστέρας (TMSOTf), CH₃CN

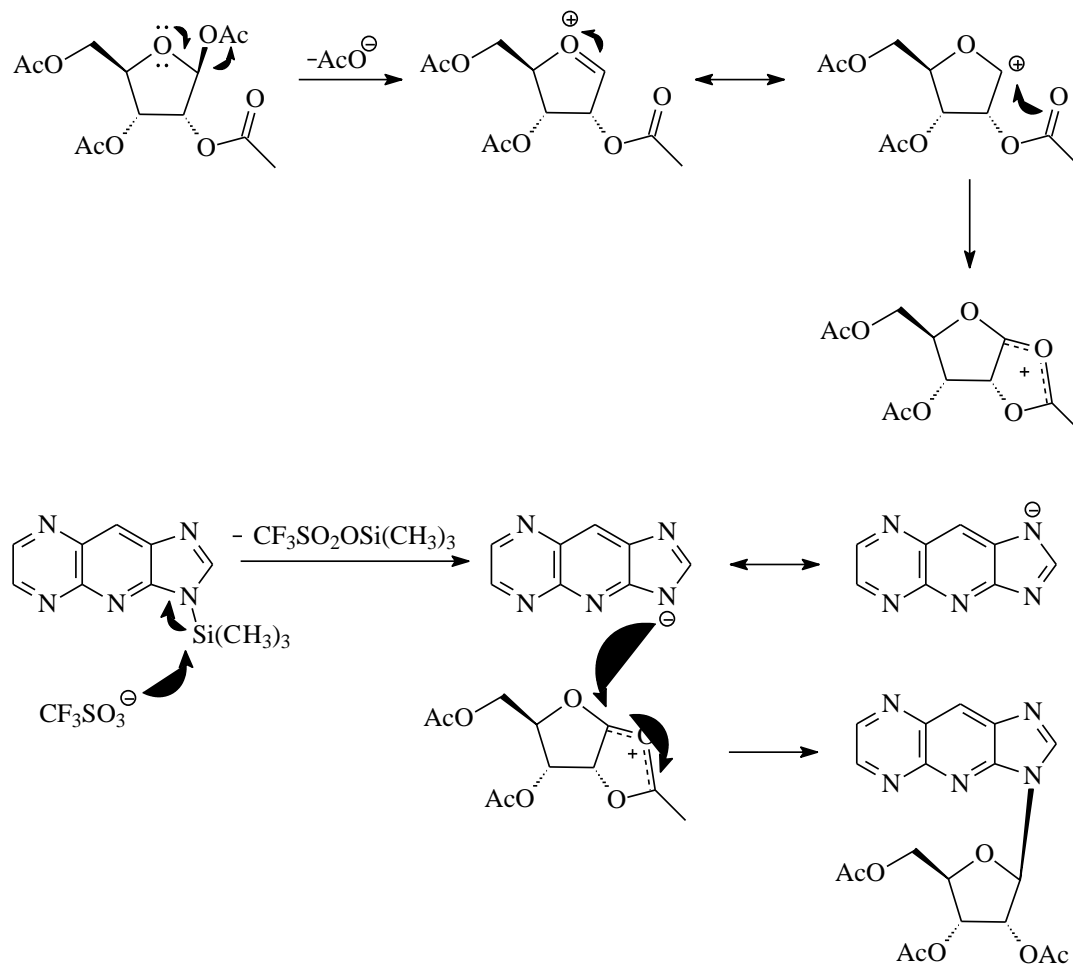
Σχήμα 2.5



Εικόνα 2.1: Φάσματα μίγματος ανωμερών των παραγώγων **13** και **14** αντίστοιχα σε CDCl_3 .

Ένας πιθανός μηχανισμός της γλυκοζυλίωσης Vorbrüggen παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2.6**, όπου όπως φαίνεται δημιουργείται αρχικά με την επίδραση του οξέος Lewis καρβοκατιόν, στο οποίο μπορεί να γίνει α- ή β-προσβολή. Όμως, λόγω της συμμετοχής της 2-ακετοξυομάδας, σχηματίζεται κατιόν ακετυλοξωνίου, το οποίο είναι επιλεκτικό μόνο σε β-προσβολή. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί τη

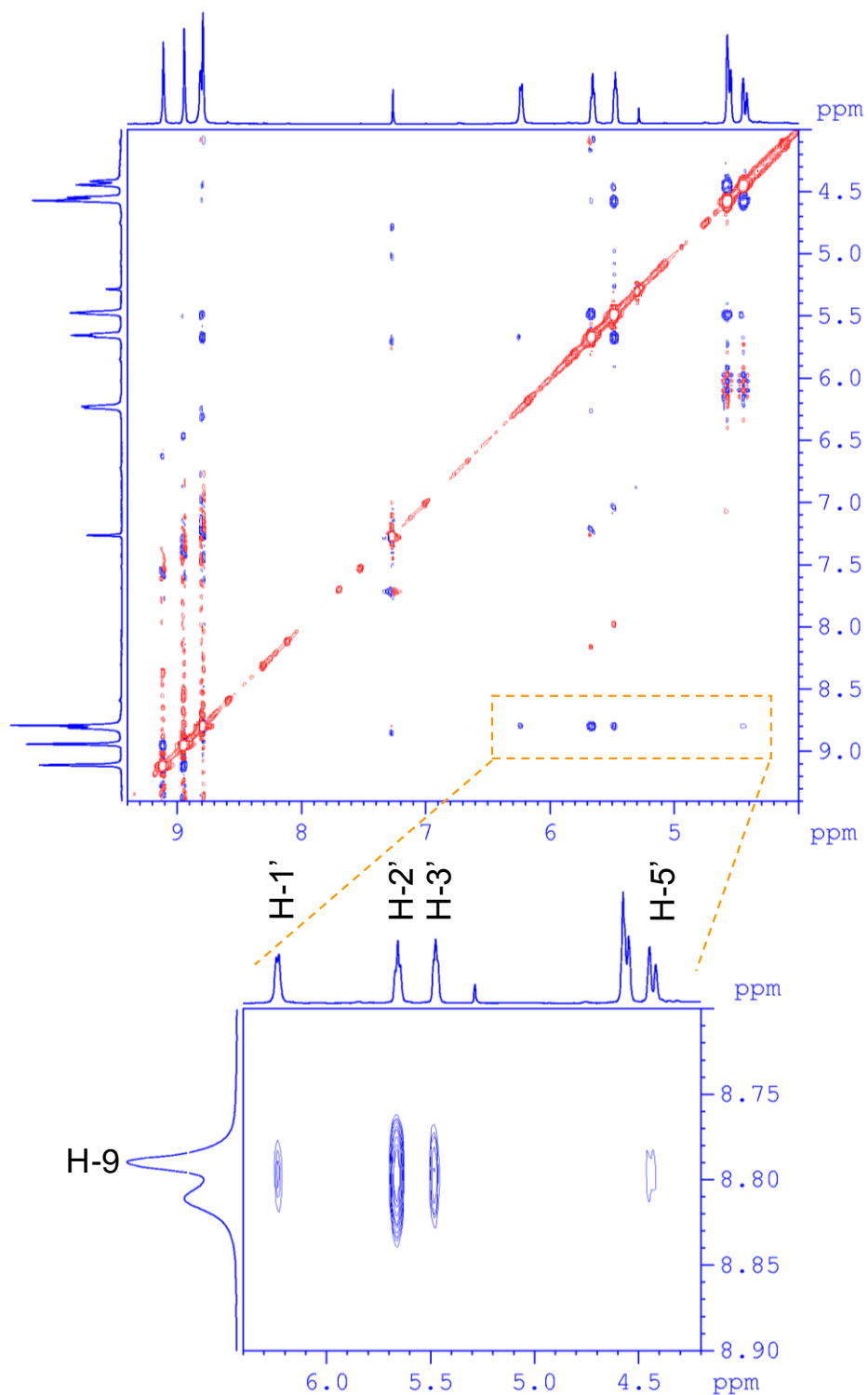
στερεοεκλεκτικότητα (όχι στερεοειδικότητα) της μεθόδου. Αυτή η άποψη ενισχύεται από την **Εικόνα 2.1**, η οποία επιβεβαιώνει και πειραματικά την παραλαβή μίγματος των δυο ανωμερών, όπου το ένα σαφώς υπερिशύχει του άλλου ⁷⁷.



Σχήμα 2.6

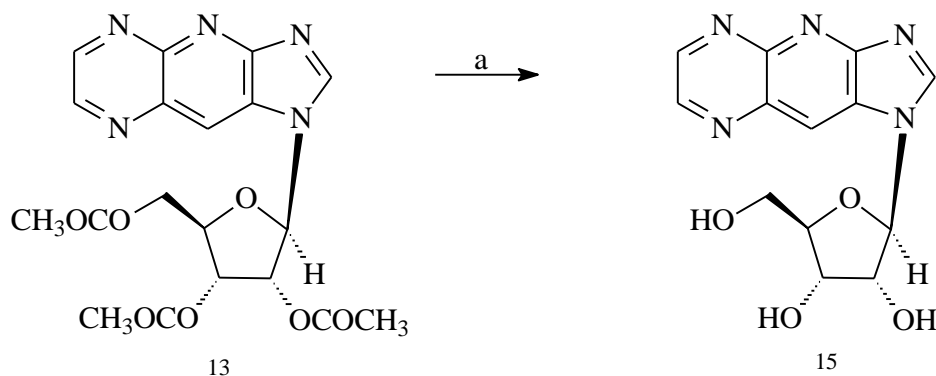
Με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και ειδικότερα με φάσματα δυο διαστάσεων, ετεροπυρηνικό (HSBC) και ομοπυρηνικό (NOESY) πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των ισομερών και ταυτομερών ενώσεων αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, με τη βοήθεια του ομοπυρηνικού φάσματος (NOESY) και ειδικότερα με την εμφάνιση σύζευξης μεταξύ πρωτονίων του σακχάρου και του αρωματικού πρωτονίου του πυριδινικού δακτυλίου (H-9) ταυτοποιήθηκε το μόριο **13**. (**Εικόνα 2.2**). Με ανάλογη μελέτη των δύο ισομερών προϊόντων **13** και **14** διαπιστώθηκε ότι υπάρχει σύζευξη μεταξύ του ανωμερικού

πρωτονίου και του πρωτονίου του άνθρακα 4' του σακχάρου και έτσι επιβεβαιώθηκε ότι έχουν απομονωθεί τα αντίστοιχα β ανωμερή.



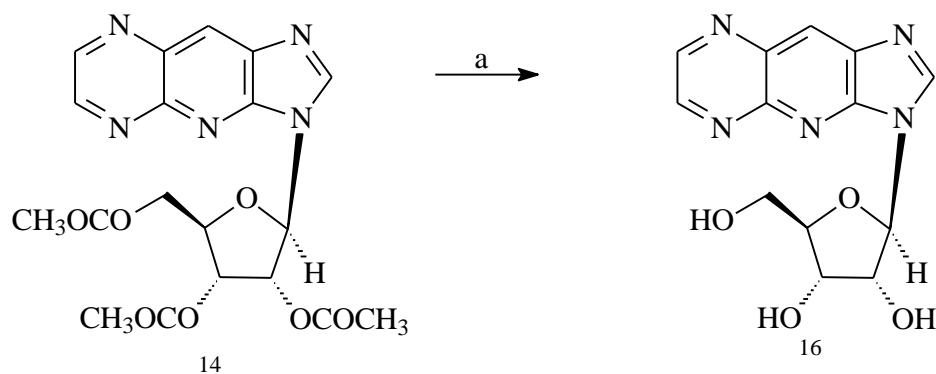
Εικόνα 2.2: Φάσμα NOESY του προϊόντος 13.

Τέλος, για την παραλαβή των τελικών μορίων **15** και **16** πραγματοποιήθηκε σχεδόν ποσοτική αντίδραση απακευλίωσης των προϊόντων **13β** και **14β** αντίστοιχα, με επίδραση μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας (*Σχήμα 2.7*, *Σχήμα 2.8*). Από τα φάσματα πρωτονίων τους (*Εικόνα 2.3*, *Εικόνα 2.4*) διαπιστώνουμε ότι το ανωμερικό πρωτόνιο εμφανίζεται ως διπλή κορυφή, ενώ όσον αφορά στην αρωματική περιοχή, το πρωτόνιο 2 εμφανίζεται και στα δυο ως το πλέον αποπροστατευμένο και επίσης το πυραζινικό πρωτόνιο 6 είναι πιο αποπροστατευμένο, σε σχέση με το πρωτόνιο της θέσης 7.



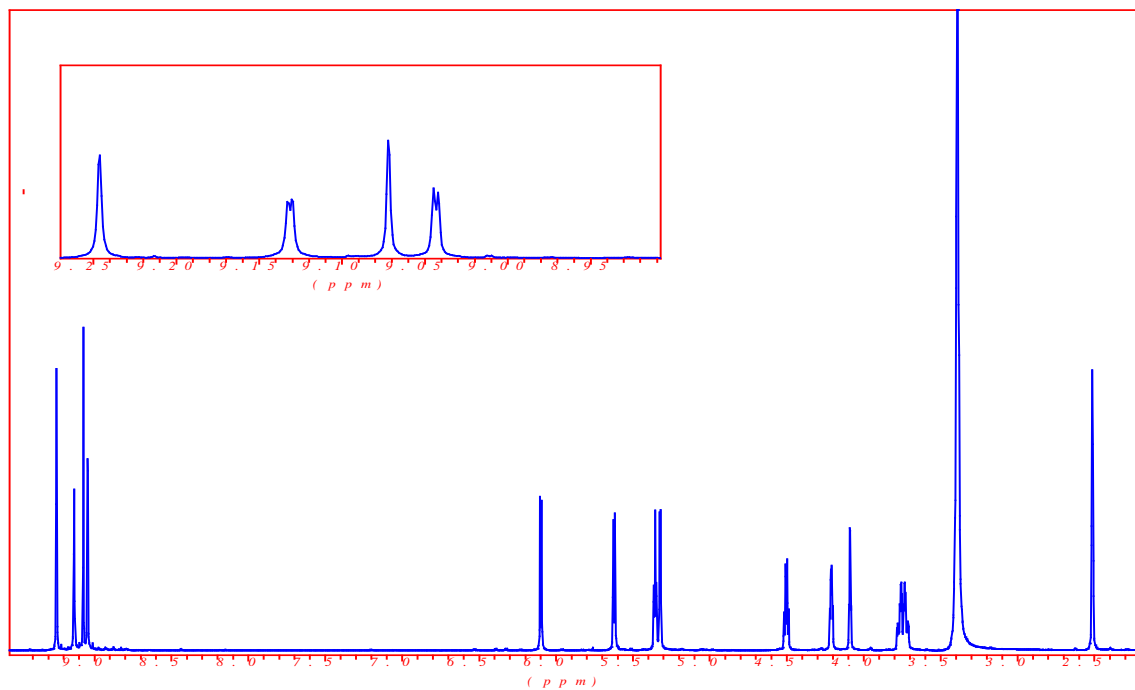
a) NH_3 , CH_3OH

Σχήμα 2.7

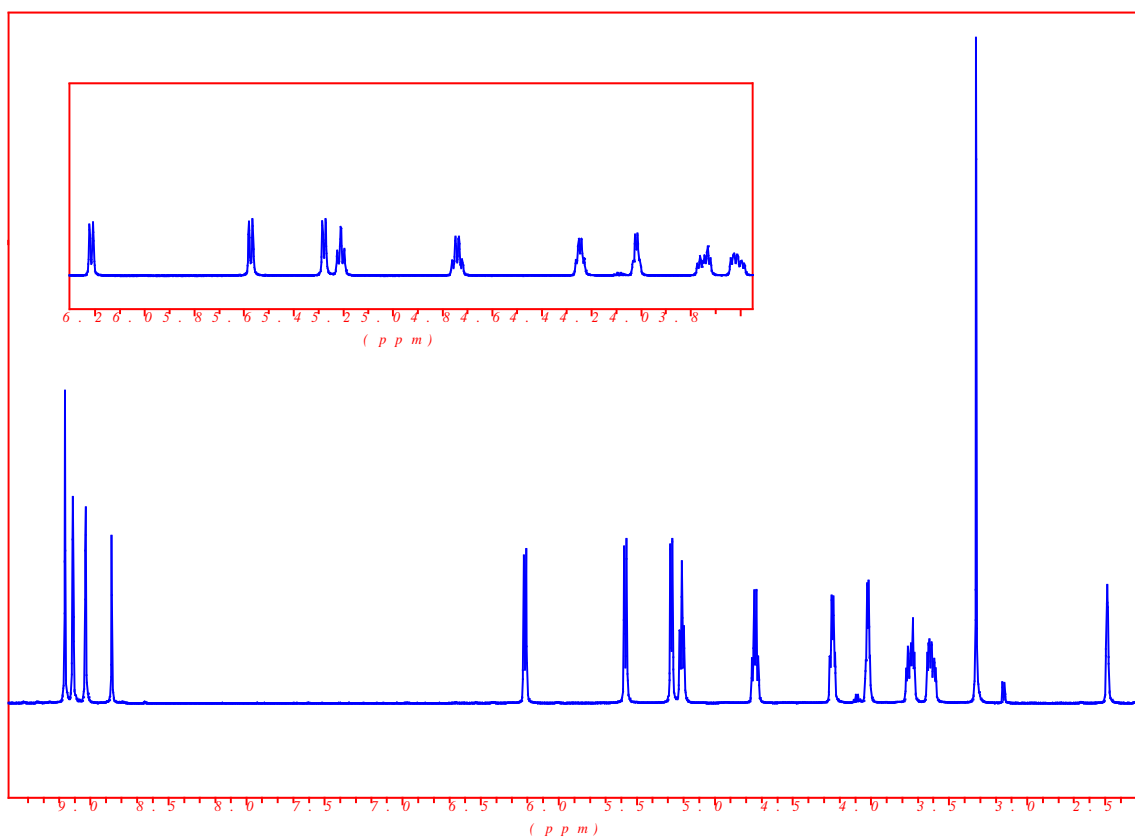


a) NH_3 , CH_3OH

Σχήμα 2.8

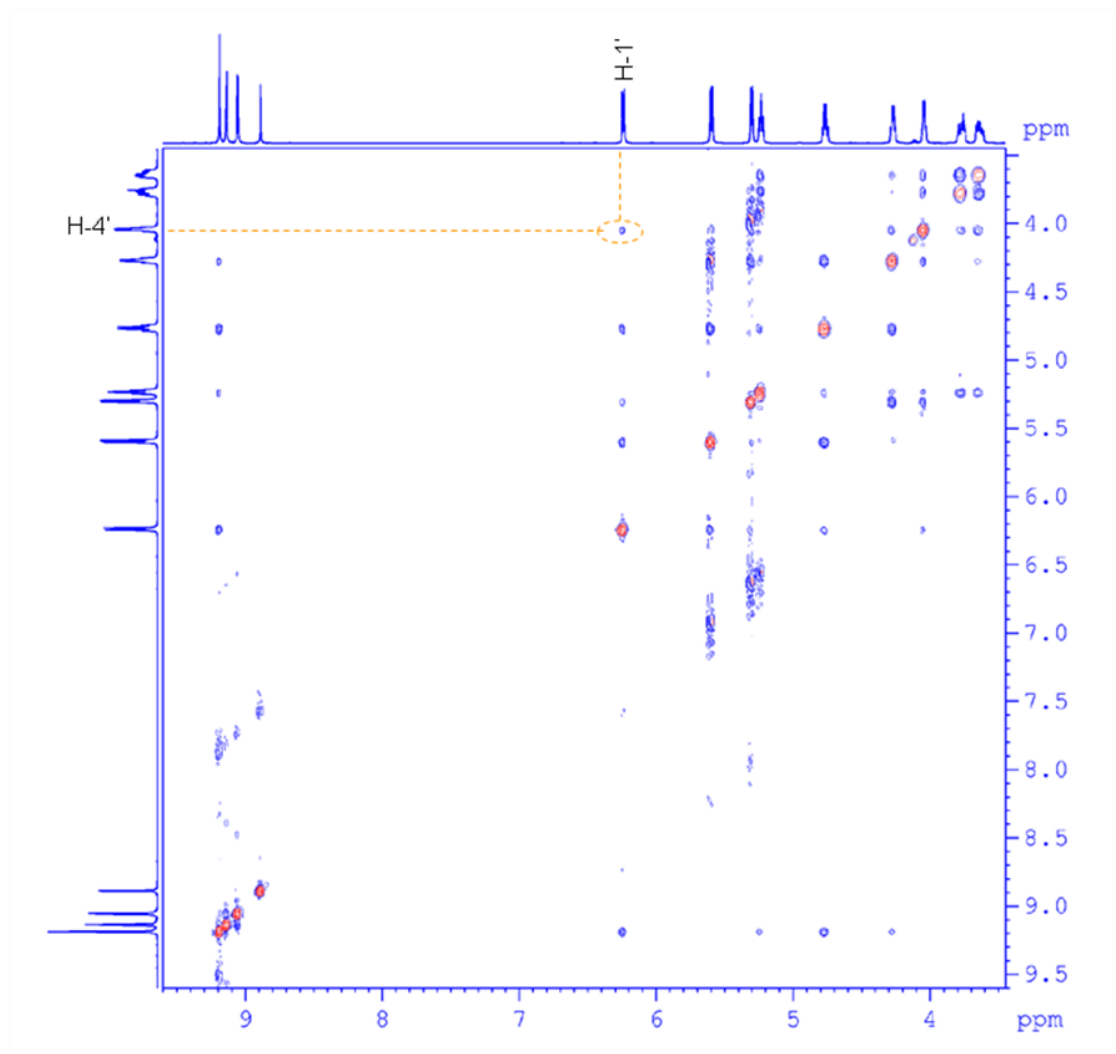


Εικόνα 2.3: Φάσμα του παραγώγου **15** σε $\text{DMSO-}d_6$.



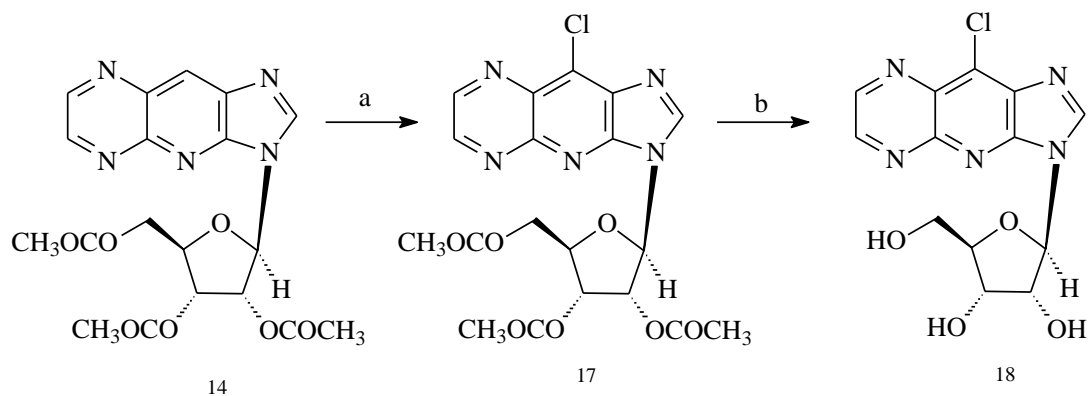
Εικόνα 2.4: Φάσμα του παραγώγου **16** σε $\text{DMSO-}d_6$.

Παρακάτω δίνεται ενδεικτικά το φάσμα NOESY (*Εικόνα 2.5*) του παραγώγου **16**, το οποίο απεικονίζει τη σύζευξη μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου και του πρωτονίου του άνθρακα 4' του σακχάρου και έτσι επιβεβαιώνεται ότι έχουν απομονωθεί τα αντίστοιχα β ανωμερή, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.



Εικόνα 2.5: Φάσμα NOESY για την ταυτοποίηση του β ισομερούς του παραγώγου **16**.

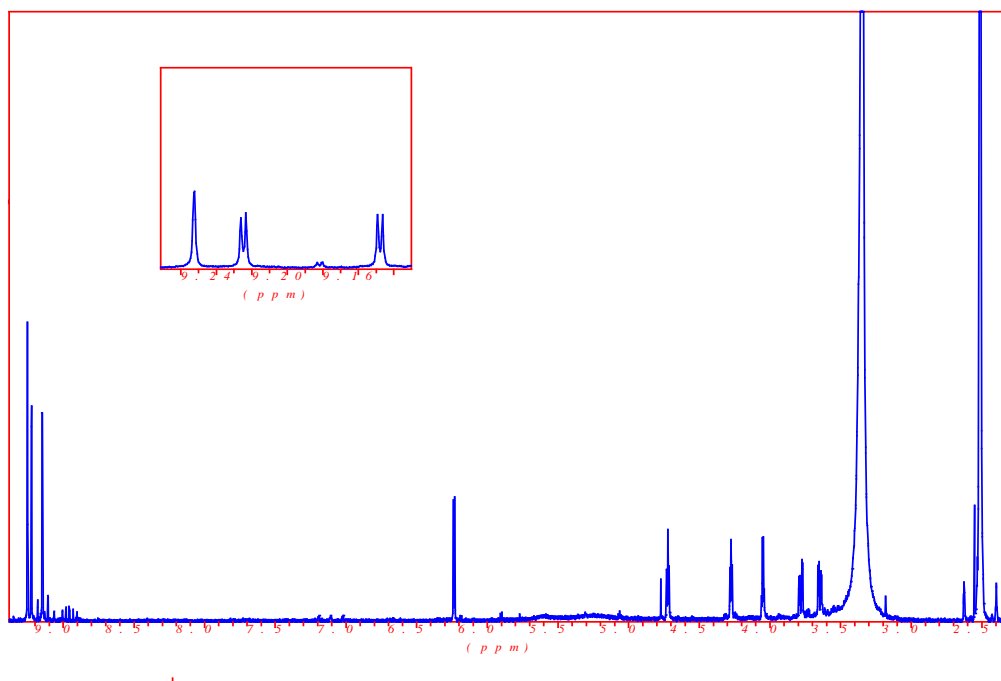
Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε αντίδραση ηλεκτρονιόφιλης υποκατάστασης στο ακετυλιωμένο παράγωγο **14** με τη χρήση *N*-χλωροηλεκτριμιδίου. Όπως αποδείχθηκε και από πειράματα δύο διαστάσεων πυρηνικού συντονισμού, η υποκατάσταση πραγματοποιήθηκε στη θέση 9 του τρικυκλικού σκελετού. Το προϊόν **17** προέκυψε σε απόδοση 46% και στη συνέχεια απακετυλιώθηκε με επίδραση μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας για να παραληφθεί τελικά ο νουκλεοζίτης **18** (*Σχήμα 2.9*).



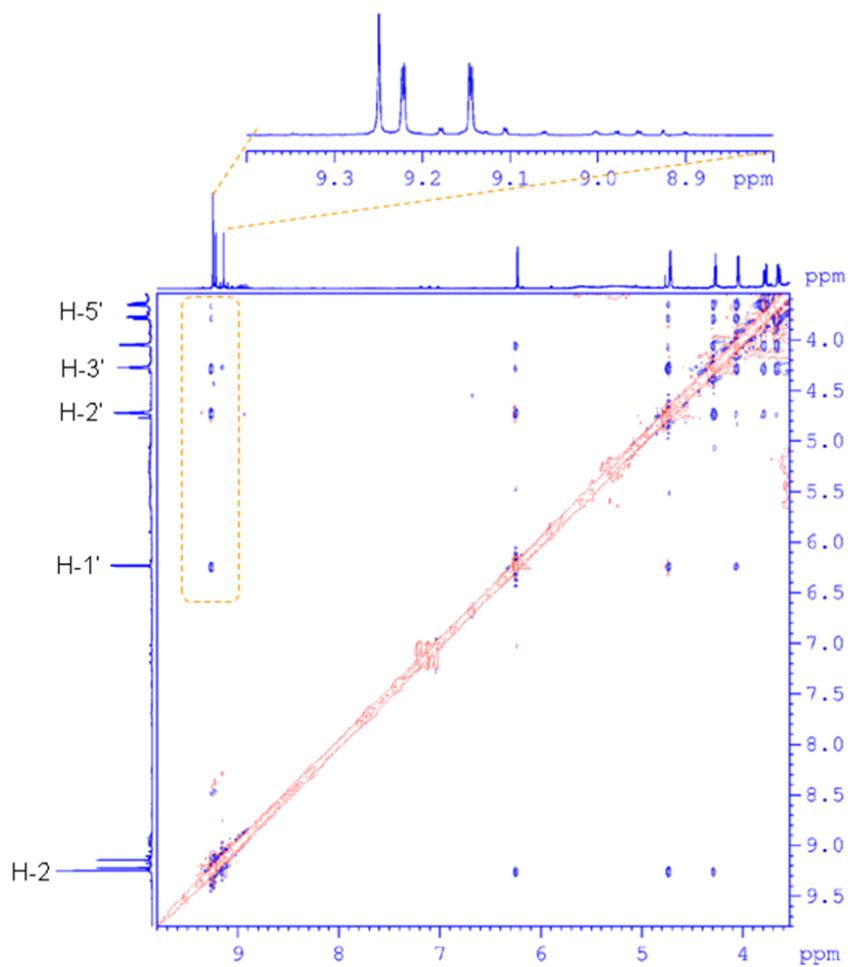
a) *N*-χλωροηλεκτριμίδιο (NCS), THF, b) NH₃, CH₃OH

Σχήμα 2.9

Στην *Εικόνα 2.6* παρουσιάζεται το φάσμα ¹H-NMR του παραγώγου **18** και στην *Εικόνα 2.7* το φάσμα (NOESY), όπου είναι εμφανής η σύζευξη του μιδαζολικού πρωτονίου (H-2) με τα πρωτόνια του σακχάρου. Βάσει αυτών επιβεβαιώθηκε ότι η χλωρίωση πραγματοποιήθηκε στη θέση 9 του αρωματικού δακτυλίου.

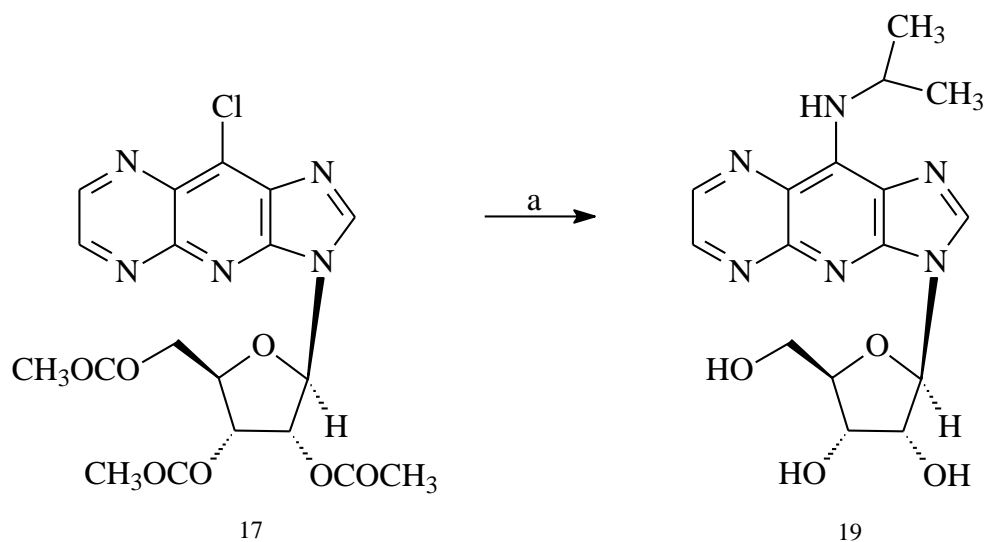


Εικόνα 2.6: Φάσμα ¹H-NMR της ένωσης **18** σε DMSO-*d*₆.



Εικόνα 2.7: Φάσμα NOESY της ένωσης **18** σε DMSO-*d*₆.

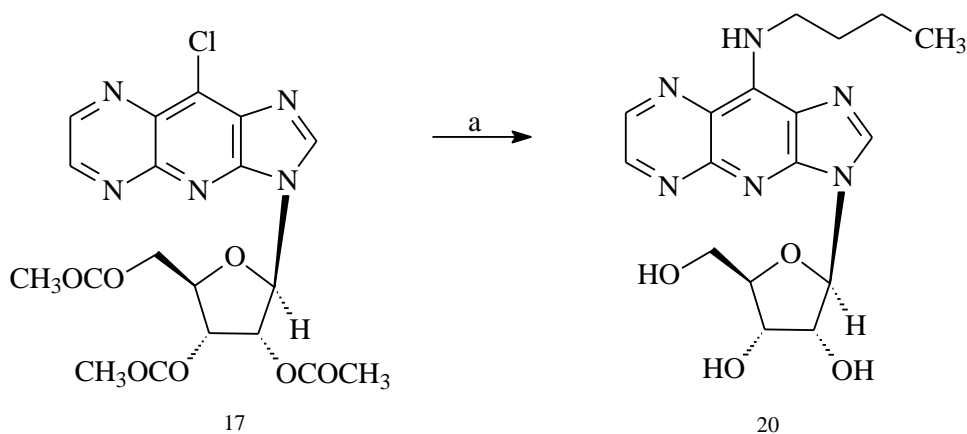
Στη συνέχεια έγινε αρωματική πυρηνόφιλη υποκατάσταση του χλωρίου από ισοπροπυλαμίνη στο παράγωγο **17**. Απομονώθηκε απ' ευθείας το απακετυλιωμένο παράγωγο **19**, καθώς η ισοπροπυλαμίνη προκάλεσε αμινόλυση των ακετοξυομάδων (Σχήμα 2.10).



a) $\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CH}_3$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

Σχήμα 2.10

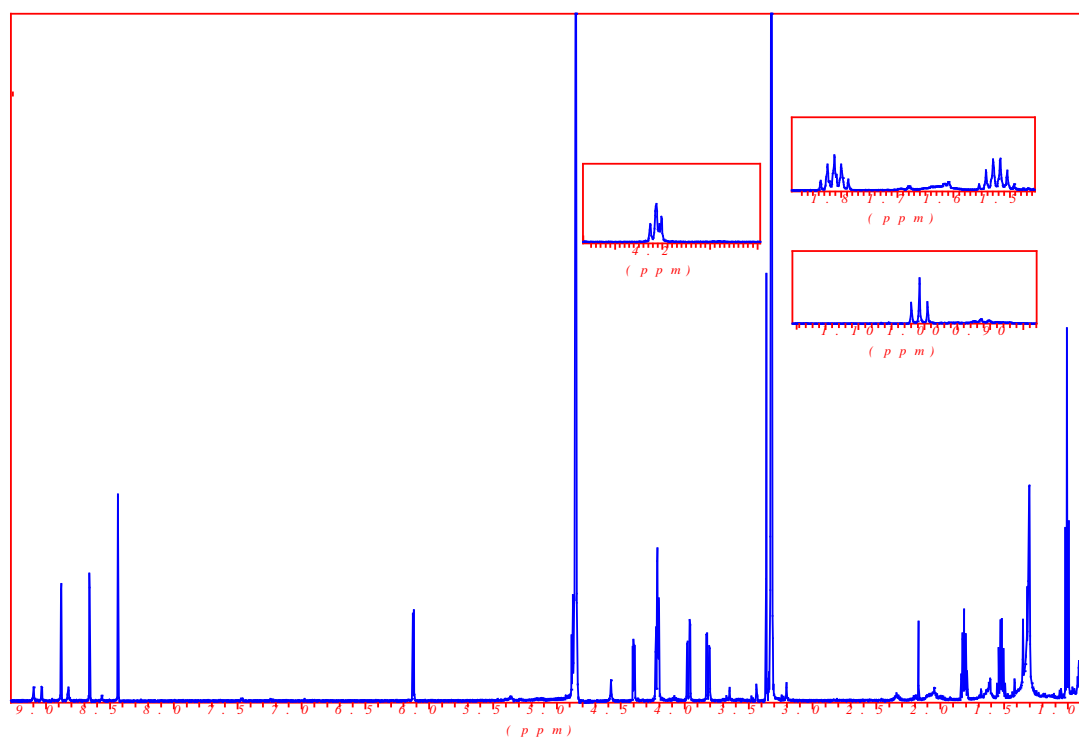
Τέλος, με αντίστοιχη αντίδραση παραλήφθηκε και το βουτυλαμινοπαράγωγο **20** (Σχήμα 2.11).



a) $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

Σχήμα 2.11

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ παραγώγου **20** (Εικόνα 2.8) είναι εμφανείς οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της βουτυλομάδας. Τα πλέον αποπροστατευμένα πρωτόνια (4 ppm) αντιστοιχούν στο μεθυλένιο που γειτνιάζει με την αμινομάδα ενώ τα υπόλοιπα εμφανίζονται στην περιοχή 1.00 με 1.50 ppm.



Εικόνα 2.8: Φάσμα του παραγώγου **20** σε CD_3OD .

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα. Οι χρωματογραφίες στήλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση silica gel 60ACC (SDS 35-70 μm). Η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε πλάκες silica gel 60F₂₅₄. Τα φάσματα ¹H-NMR λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker Avance 400 στα 400 MHz, ενώ τα φάσματα ¹³C-NMR λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker AC 200 στα 50 MHz. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃), διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO-d₆) και μεθανόλη (CD₃OD).

1) *N*-[6-ακεταμιδοπυριδιν-2-υλ]ακεταμίδιο (2)

Σε διάλυμα της 2,6-διαμινοπυριδίνης (1, 7.5 gr, 68.8 mmol) εντός διχλωρομεθανίου (90 ml), προστέθηκε στάγδην, υπό ψύξη και έντονη ανάδευση οξικός ανυδρίτης (13.65 ml). Η αντίδραση συνεχίστηκε για τριάντα λεπτά υπό ψύξη και ακολούθησε ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για δώδεκα ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, εκδιώχθηκε ο διαλύτης και το υπόλειμμα εξουδετερώθηκε με όξινο ανθρακικό νάτριο και νερό υπό συνεχή ανάδευση μέχρι pH=7. Κατόπιν το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για μισή περίπου ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία υπό ψύξη μέχρι να σχηματιστεί ίζημα. Ακολούθησε διήθηση του στερεού, έκπλυση με νερό και τέλος ξήρανση υπεράνω χλωριούχου ασβεστίου. Ελήφθησαν 11.51 gr του προϊόντος **2**. **Απόδοση:** 86.7%, **Στ:** 212⁰C.

2) *N*-[6-ακεταμιδο-3-νιτροπυριδιν-2-υλ]ακεταμίδιο (3)

Σε διάλυμα της 2,6-διακεταμιδοπυριδίνης (2, 5 gr, 25.90 mmol) εντός θειϊκού οξέος 98% (37.6 ml), προστέθηκε στάγδην, υπό ψύξη και έντονη ανάδευση το οξύ νίτρωσης, που παρασκευάστηκε από την προσθήκη πυκνού θειϊκού οξέος (2.5 ml) σε νιτρικό οξύ (2.5 ml) υπό ψύξη. Το μίγμα που προέκυψε, αρχικά αναδεύτηκε για είκοσι λεπτά υπό ψύξη και για τα επόμενα εικοσιπέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ στη συνέχεια το περιεχόμενο της φιάλης αποχύθηκε σε πάγο και εξουδετερώθηκε με διάλυμα αμμωνίας (25%) υπό ψύξη και ανάδευση μέχρι pH=7. Προέκυψε κρυσταλλικό στερεό, το οποίο διηθήθηκε υπό κενό. Ελήφθησαν τελικά 5.5 gr στερεού **3**. **Απόδοση:** 89.40%, **Στ:** 195⁰C, **¹H-NMR** (DMSO-d₆) δ (ppm): 2.11 (s,

3 H, CH₃), 2.15 (s, 3 H, CH₃), 7.99 (d, 1 H, J= 9 Hz, H-4), 8.38 (d, 1 H, J= 9 Hz, H-5), 10.68 (s, 1 H, NH, D₂O exch.), 10.86 (s, 1 H, NH, D₂O exch.). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24.60 (CH₃), 24.69 (CH₃), 109.82 (C-4), 134.72 (C-3), 137.28 (C-5), 143.17 (C-2), 153.94 (C-6), 169.52 (C=O), 170.61 (C=O).

3) *N*-[6-ακεταμιδο-5-νιτροπυριδιν-2-υλ]ακεταμίδιο (4) και 3-νιτροπυριδινό-2,6-διαμίνη (5)

Σε διάλυμα του προϊόντος **3** (2.7 gr, 11.34 mmol) εντός μεθανόλης (40 ml), προστέθηκε στάγδην, υπό ψύξη και ανάδευση υδροχλωρικό οξύ 36% (5.4 ml). Η ανάδευση συνεχίστηκε για σαράντα λεπτά υπό ψύξη, ενώ ακολούθησε ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για μια ώρα. Μετά το τέλος της αντίδρασης το περιεχόμενο της φιάλης αποχύθηκε σε πάγο και εξουδετερώθηκε με διάλυμα αμμωνίας (25%) μέχρι pH=7, συμπυκνώθηκε και το στερεό υπόλειμμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική στοιβάδα ξηράνθηκε με θειϊκό νάτριο, διηθήθηκε, συμπυκνώθηκε υπό κενό και το υπόλειμμα προσροφήθηκε σε μικρή ποσότητα silica gel και καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης αρχικά διχλωρομεθάνιο και κατόπιν μίγμα διχλωρομεθανίου/οξικού αιθυλεστέρα (95:5). Μετά από συμπύκνωση υπό κενό ελήφθησαν 1.11 gr κίτρινου στερεού **4**, ενώ απομονώθηκαν και 2 mg από το παραπροϊόν **5**.

(4): Απόδοση: 50%, **Στ:** 209.3⁰C, ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.13 (s, 1 H, CH₃), 7.44 (d, 1 H, J= 9 Hz, H-4), 7.75 (br s, 2 H, NH₂, D₂O exch.), 8.36 (d, 1 H, J= 9 Hz, H-5), 10.64 (s, 1 H, NH, D₂O exch.). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24.73 (CH₃), 103.48 (C-4), 123.23 (C-3), 137.96 (C-5), 153.93 (C-2), 156.56 (C-6), 170.77 (C=O).

(5): Απόδοση: 3%, **Στ:** 240⁰C, ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.92 (d, 1 H, J= 9 Hz, H-4), 7.27 (br s, 1 H, NH), 7.59 (br s, 1 H, NH), 7.97 (d, 1 H, J= 9 Hz, H-5), 8.04 (br s, 2 H, NH₂). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 101.86 (C-4), 117.77 (C-3), 135.79 (C-5), 156.21 (C-2), 162.80 (C-6).

4) *N*-(πυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-6-υλ)ακεταμίδιο (7)

Η 6-ακεταμιδο-2-αμινο-3-νιτροπυριδίνη (**4**, 500 mg, 2.55 mmol) διαλύθηκε σε απόλυτη αιθανόλη (30 ml) και κατόπιν προστέθηκε παλλάδιο σε ενεργό άνθρακα (60 mg). Ακολούθησε υδρογόνωση για τέσσερις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό πίεση 50 psi. Μετά το πέρας της αντίδρασης το στερεό διηθήθηκε υπό κελίτη, εκπλύθηκε με διχλωρομεθάνιο/αιθανόλη και συμπυκνώθηκε υπό κενό σε χαμηλή

θερμοκρασία για να δώσει το *N*-(2,3-διαμινοπυριδιν-6-υλ)ακεταμίδιο (**6**), που χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω κατεργασία για την επόμενη αντίδραση. Στο διάλυμα του συμπυκνώματος **6** σε αιθανόλη (30 ml) προστέθηκε γλυοξάλη (0.5 ml) και ακολούθησε βρασμός για μιάμιση ώρα. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το μίγμα αφέθηκε σε ηρεμία για αρκετές ώρες μέχρι την εμφάνιση ιζήματος, το οποίο στη συνέχεια διηθήθηκε. Ακολούθησε χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης οξικό αιθυλεστέρα. Τελικά ζυγίστηκαν 543 mg καθαρού προϊόντος **7**. **Απόδοση:** 96%, **Στ:** 249°C, **¹H-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2,19 (s, 3 H, CH₃), 8,49 (d, 1 H, J= 9 Hz, H-8), 8,62 (d, 1 H, J= 9 Hz, H-7), 8,90 (d, 1 H, J= 2 Hz, H-2), 9,03 (d, 1 H, J= 2 Hz, H-3), 11,28 (s, 1 H, NH, D₂O exch.). **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24.37 (CH₃), 119.09 (C-7), 135.97 (C-8a), 140.04 (C-8), 144.41 (C-2), 148.16 (C-3), 150.98 (C-4a), 154.73 (C-6), 170.67 (C=O).

5) 7-νιτροπυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-6-αμίνη (**8**)

Το παράγωγο **7** (250 mg, 1.33 mmol) διαλύθηκε σε οξικό ανυδρίτη (7 ml) στους -20°C και υπό ανάδευση προστέθηκε το οξύ νίτρωσης, που παρασκευάστηκε από την προσθήκη ατμίζοντος νιτρικού οξέος (0.4 ml) σε οξικό ανυδρίτη (1.6 ml) υπό ψύξη. Το μίγμα παρέμεινε στους -20°C υπό ανάδευση για μιάμιση ώρα. Κατά την κατεργασία πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και νερό, συμπύκνωση της οργανικής στοιβάδας και τέλος χρωματογραφία στήλης με σύστημα έκλουσης κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα (40:60). Απομονώθηκαν 20 mg πορτοκαλοκίτρινου στερεού **8**. **Απόδοση:** 6.5%, **Στ:** >300°C, **¹H-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.84 (br s, 1 H, NH₂, D₂O exch.), 8.14 (br s, 1 H, NH₂, D₂O exch.), 8.73 (d, 1 H, J= 9 Hz, H-2), 8.95 (d, 1 H, J= 9 Hz, H-3), 8.99 (s, 1 H, H-8). **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 131.28 (C-8a), 134.10 (C-7), 137.23 (C-8), 142.47 (C-2), 150.04 (C-6), 151.92 (C-3), 153.79 (C-4a).

6) *N*-(3*H*-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-5-υλ)ακεταμίδιο (**9**)

Στο συμπύκνωμα **6** προστέθηκε ορθομυρμηκικός τριαιθυλεστέρας (2.5 ml) και πέντε σταγόνες πυκνού υδροχλωρικού οξέος και το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Αφού ολοκληρώθηκε η αντίδραση προστέθηκε στο διάλυμα *n*-πεντάνιο, ώστε να πέσει στερεό. Ακολούθησε διήθηση υπό κενό, διάλυση σε διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη, εξουδετέρωση με όξινο ανθρακικό νάτριο και τέλος καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης

διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη (150:1). Ελήφθησαν τελικά 1.05 gr κίτρινου στερεού **9**. **Απόδοση:** 94%, **Στ:** 212-213⁰C, **¹H-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 2.10 (s, 1 H, CH₃), 7.99 (d, 1 H, J= 8.5Hz, H-7), 8.02 (d, 1 H, J= 8.3Hz, H-6), 8.33 (s, 1 H, H-2), 10.46 (s, 1 H, NH, D₂O exch.), 12.80 (s, 1 H, NH-3). **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 24.43 (CH₃), 109.94 (C-6), 125.78 (C-7), 127.74 (C-7a), 143.65 (C-2), 148.17 (C-5), 149.49 (C-3a), 169.28 (C=O).

7) 6-νιτρο-3H-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-5-αμίνη (**10**)

Το N-3H-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-5-υλακεταμίδιο (**9**, 100 mg, 0.56 mmol) διαλύθηκε στους 0 °C σε πυκνό υδροχλωρικό οξύ (1.2 ml). Στη συνέχεια, υπό τους 0 °C στάγδην και με έντονη ανάδευση προστέθηκε το οξύ νίτρωσης, που παρασκευάστηκε από την προσθήκη πυκνού θειϊκού οξέος (0.04 ml) σε νιτρικό οξύ (0.04 ml) υπό ψύξη. Το μίγμα που προέκυψε αναδεύτηκε για δεκαπέντε λεπτά υπό ψύξη και για τα επόμενα σαράντα λεπτά θερμάνθηκε στους 50 °C. Το περιεχόμενο της φιάλης αποχύθηκε σε πάγο και εξουδετερώθηκε με αμμωνία (25%) μέχρι pH=6 οπότε δημιουργήθηκε ίζημα, το οποίο διηθήθηκε. Το στερεό που συλλέχθηκε, προσροφήθηκε σε μικρή ποσότητα silica gel και καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα διχλωρομεθανίου/μεθανόλης (92:8). Ελήφθησαν 69 mg πορτοκαλί στερεού **10**. **Απόδοση:** 68%, **Στ:** >300⁰C, **¹H-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.75 (s, 2 H, NH₂, D₂O exch.), 8.36 (s, 1 H, H-2), 8.6 (s, 1 H, H-7). **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 125.15 (C-7), 126.92 (C-6), 127.31 (C-7a), 147.11 (C-2), 152.71 (C-5), 154.09 (C-3a).

8) 3H-ιμιδαζο[4',5':5,6]πυριδο-[2,3-*b*]πυραζίνη (**12**)

Το παράγωγο **10** (900 mg, 5.02 mmol) διαλύθηκε στην αιθανόλη (30 ml) και στο διάλυμα προστέθηκε ως καταλύτης παλλάδιο σε ενεργό άνθρακα (145 mg). Το μίγμα υδρογονώθηκε υπό πίεση 55 psi για δύο μέρες. Ακολούθησε διήθηση υπό κελίτη, συμπύκνωση του διηθήματος υπό κενό, προσρόφησή του σε ανάλογη ποσότητα silica gel και καθαρισμός αυτού με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα οξικού αιθυλεστέρα/μεθανόλης (90:10). Αποκρυστάλλωση με αιθέρα. Παρελήφθησαν 558 mg της 3H-ιμιδαζο [4,5-*b*]πυριδιν-5,6-διαμίνης (**11**). Στο συμπύκνωμα **11** (137 mg, 0.92 mmol) προστέθηκε ως διαλύτης, αιθανόλη (20 ml) και γλυοξάλη (0.830 gr) και ακολούθησε βρασμός για πέντε ώρες. Στη συνέχεια το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου μια μέρα και έπειτα

συμπυκνώθηκε. Το στερεό υπόλειμμα που προέκυψε, ανακρυσταλλώθηκε με μεθανόλη. Ελήφθησαν 500 mg καφέ στερεού.

(11): Απόδοση: 74%, **Στ:** 189-192⁰C, **¹H-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.32 (s, 2 H, NH₂, D₂O exch.), 4.50 (br s, 2 H, NH₂, D₂O exch.), 6.95 (s, 1 H, H-2), 7.74 (s, 1 H, H-7), 12.09 (br s, 1 H, NH-3). **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 107.81 (C-2), 123.36 (C-6), 127.11 (C-7a), 137.14 (C-7), 142.11 (C-5), 146.80 (C-3a).

(12): Απόδοση: 73%, **Στ:** >300⁰C, **¹H-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8,74 (s, 1 H, H-2), 8.94 (s, 1 H, H-9), 9.00 (~s, 1 H, H-7), 9.08 (~s, 1 H, H-6). **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 127.31 (C-9a), 132.93 (C-8a), 135.16 (C-9), 144.46 (C-7), 146.57 (C-6), 147.47 (C-2), 151.68 (C-4a), 153.11 (C-3a).

9) 1-(2,3,5-τρι-Ο-ακετυλο-1-β-D-ριβοφουρανοζυλ)-3H-ιμιδαζο[4',5':5,6]πυριδο[2,3-*b*]πυραζίνη (13) και 3-(2,3,5-τρι-Ο-ακετυλο-1-β-D-ριβοφουρανοζυλ)-3H-ιμιδαζο[4',5':5,6]πυριδο[2,3-*b*]πυραζίνη (14)

Στο εναιώρημα του παραγώγου **12** (1 gr) σε άνυδρο ακετονιτρίλιο (15.5 ml) υπό άνυδρες συνθήκες αργού προστέθηκε το *N*-(τριμεθυλσυλλ)ακεταμίδιο (BSA, 1.67 ml) και το μίγμα θερμάνθηκε στους 80⁰C για τριανταπέντε λεπτά. Ακολούθως σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκε η 1,2,3,5-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανόζη, (1.98 gr) και τέλος στους 0 °C ο τριφθορομεθανοσουλφονικός τριμεθυλοσυλλεστέρας (TMSOTf, 1.03 ml). Το τελικό μίγμα θερμάνθηκε στους 80-90 °C για δυο ώρες και τριάντα λεπτά. Με το πέρας της αντίδρασης το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό προς απομάκρυνση του ακετονιτρίλιου. Το υπόλειμμα αποχύθηκε σε ποτήρι με κορεσμένο σε νερό διάλυμα οξίνου ανθρακικού νατρίου όπου και εξουδετερώθηκε, ενώ στη συνέχεια εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα και νερό. Η οργανική στοιβάδα συμπυκνώθηκε και ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης αρχικά κυκλοεξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα (30:70), έπειτα οξικό αιθυλεστέρα και τέλος μίγμα οξικού αιθυλεστέρα/μεθανόλης (2%, 4%). Από το διαχωρισμό παρελήφθησαν 350 mg μίγματος α και β ανωμερών με το σάκχαρο να εμφανίζει σύζευξη με το 4H της πυριδίνης (**13**) και 1.03 gr μίγματος α και β ανωμερών με το σάκχαρο να βρίσκεται κοντά στο άζωτο της πυριδίνης (**14**). Τα μίγματα χωρίζονται εκ νέου με χρωματογραφία στήλης. Όσον αφορά στο προϊόν **13** το σύστημα έκλουσης που χρησιμοποιείται είναι το μίγμα διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη (99:1), ενώ για το προϊόν **14** το σύστημα διαχωρισμού, που χρησιμοποιείται για τα ανωμερή, είναι το μίγμα

διγλωρομεθάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (60:40). Λαμβάνονται 170 mg υποκίτρινου στερεού **13** και 773 mg ελαιώδους υφής προϊόντος **14**.

(13): Απόδοση: 6.8%, **Στ:** 92.4⁰C, $[\alpha]_{589}^{20}$ -71.67° (c=0.0012, CH₃OH), **¹H-NMR** (CDCl₃) δ (ppm): 2.09 (s, 1 H, CH₃), 2.18 (s, 1 H, CH₃), 2.32 (s, 1 H, CH₃), 4.50 (m, 2 H, H-5'), 4.57 (s, 1 H, H-4'), 5.47 (~t, 1 H, H-3'), 5.65 (~t, 1 H, H-2'), 6.24 (d, 1 H, J= 5 Hz, H-1'), 8.78 (s, 1 H, H-4), 8.81 (s, 1 H, H-2), 8.94 (s, 1 H, H-7), 9.10 (s, 1 H, H-6). **¹³C-NMR** (CDCl₃) δ (ppm): 20.33 (CH₃), 20.52 (CH₃), 20.90 (CH₃), 62.83 (C-5'), 70.04 (C-3'), 72.68 (C-2'), 80.86 (C-4'), 88.13 (C-1'), 119.37 (C-4), 127.22 (C-3a), 135.62 (C-4a), 144.90 (C-7), 146.82 (C-6), 148.50 (C-8a), 150.85 (C-2), 159.76 (C-9a), 169.31 (C=O), 169.56 (C=O), 170.33 (C=O).

(14): Απόδοση: 31%, $[\alpha]_{589}^{20}$ +15° (c=0.0046, CH₃OH), **¹H-NMR** (CDCl₃) δ (ppm): 2.03 (s, 3 H, CH₃-2'), 2.15 (s, 3 H, CH₃-3'), 2.16 (s, 3 H, CH₃-5'), 4.45 (m, 2 H, H-5'), 4.50 (m, 1 H, H-4'), 5.65 (t, 1 H, J= 9.59 Hz, H-3'), 5.90 (t, 1 H, J= 11.22 Hz, H-2'), 6.65 (s, 1 H, J= 5.77 Hz, H-1'), 7.72 (s, 1 H, H-2), 8.85 (s, 1 H, H-9), 8.96 (s, 1 H, J= 1.63 Hz, H-7), 9.05 (s, 1 H, J= 1.65 Hz, H-6). **¹³C-NMR** (CDCl₃) δ (ppm): 20.40 (CH₃), 20.57 (CH₃), 20.85 (CH₃), 63.19 (C-5'), 70.77 (C-3'), 73.30 (C-2'), 80.35 (C-4'), 85.50 (C-1), 128.96 (C-9), 136.53 (C-8a), 138.19 (C-9a), 144.21 (C-7), 146.77 (C-6), 148.17 (C-2), 148.36 (C-4a), 149.98 (C-3a), 169.50 (C=O), 169.67 (C=O), 170.29 (C=O).

10) 1-(β-D-ριβοφουρανοζυλ)-3H-ιμιδαζο[4',5':5,6]πυριδο[2,3-b]πυραζίνη (15)

Για την παραλαβή του τελικού μορίου **15** πραγματοποιήθηκε αντίδραση απακετυλίωσης με τη διαβίβαση αέριας αμμωνίας, σε διάλυμα του ακετυλιωμένου προϊόντος **13** (170 mg, 0.40 mmol) σε μεθανόλη. Το μίγμα αφήθηκε σε ηρεμία για δυο περίπου ώρες, ακολούθησε συμπύκνωση μέχρι ξηρού και τέλος καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης οξικό αιθυλεστέρα/μεθανόλη (98:2). Ανακρυστάλλωση με μεθανόλη. Παρελήφθησαν 80 mg τελικού λευκού στερεού. **Απόδοση:** 67%, **Στ:** 218-219⁰C (dec.), $[\alpha]_{589}^{20}$ -59.17° (c=0.0024, DMSO), **¹H-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.74 (m, 2 H, H-5'), 4.10 (m, 1 H, H-4'), 4.20 (m, 1 H, H-3'), 4.50 (m, 1 H, H-2'), 5.32 (d, 1 H, J= 4.37 Hz, OH-5', D₂O exch.), 5.36 (t, 1 H, J= 9.81 Hz, OH-3', D₂O exch.), 5.62 (d, 1 H, J= 6.19 Hz, OH-2', D₂O exch.), 6.10 (d, 1 H, J= 6.24 Hz, H-1'), 9.04 (d, 1 H, J= 1.55 Hz, H-7), 9.07 (s, 1 H, H-9), 9.13 (d, 1 H, J= 1.50 Hz, H-6), 9.24 (s, 1 H, H-2). **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 61.50 (C-5'),

70.67 (C-4'), 73.95 (C-2'), 90.35 (C-1'), 119.06 (C-9), 127.97 (C-9a), 135.26 (C-8a), 145.20 (C-7), 147.02 (C-6), 147.85 (C-4a), 153.32 (C-2), 160.04 (C-3a).

11) 3-(β-D-ριβοφουρανοζυλ)-3H-ιμιδαζο[4',5':5,6]πυριδο[2,3-b]πυραζίνη (16)

Για την παραλαβή του τελικού μορίου **16** πραγματοποιήθηκε αντίδραση απακετυλίωσης με τη διαβίβαση αέριας αμμωνίας, σε διάλυμα του ακετυλιωμένου προϊόντος **14** (200 mg, 0.47 mmol) σε μεθανόλη. Το μίγμα αφέθηκε σε ηρεμία για δυο περίπου ώρες, ακολούθησε συμπίκνωση μέχρι ξηρού και τέλος καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη (96:4). Ανακρυστάλλωση με μεθανόλη. Παρελήφθησαν 62 mg τελικού λευκού στερεού. **Απόδοση:** 44%, **Στ:** 227-228⁰C, **[α]₅₈₉²⁰** -31.33° (c=0.0030, DMSO), **¹H-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 3.61 (m, 1 H, H-5'), 3.74 (m, 1 H, H-5'), 4.01 (m, 1 H, H-4'), 4.24 (m, 1 H, H-3'), 4.74 (q, 1 H, H-2'), 5.21 (t, 1 H, J= 11.14 Hz, OH-5', D₂O exch.), 5.28 (d, 1 H, J= 4.93 Hz, OH-3', D₂O exch.), 5.57 (d, 1 H, J= 5.92 Hz, OH-2', D₂O exch.), 6.21 (d, 1 H, J= 5.70 Hz, H-1'), 8.86 (s, 1 H, H-9), 9.03 (~d, 1 H, H-7), 9.11 (~d, 1 H, H-6), 9.16 (s, 1 H, H-2). **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 61.81 (C-5'), 70.85 (C-3'), 73.90 (C-2'), 86.16 (C-4'), 88.14 (C-1'), 127.95 (C-9), 135.93 (C-8a), 138.78 (C-9a), 144.81 (C-7), 147.47 (C-6), 147.83 (C-4a), 150.59 (C-3a), 151.36 (C-2).

**12) 3-(2,3,5-τρι-Ο-ακετυλο-1-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-9-χλωρο-3H-ιμιδαζο-
[4',5':5,6]-πυριδο[2,3-b]πυραζίνη (17)**

Το ακετυλιωμένο παράγωγο **14β** (230 mg, 0.54 mmol) διαλύθηκε σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (10 ml) και υπό άνυδρες συνθήκες προστέθηκε το Ν-χλωροσουλκκινιμίδιο (165.6 mg) και το μίγμα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για ένα εικοσιτετράωρο. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το διάλυμα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού και εκχυλίστηκε με σύστημα οξικού αιθυλεστέρα/νερού. Έπειτα, προσροφήθηκε σε silica gel και καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης συστήματος κυκλοεξανίου/οξικού αιθυλεστέρα (60:40). Ελήφθησαν τελικά 150 mg κίτρινου λαδιού. **Απόδοση:** 60%, **[α]₅₈₉²⁰** +7.36° (c=0.0053, CH₃OH), **¹H-NMR** (CDCl₃) δ (ppm): 2.03 (s, 3 H, CH₃-2'), 2.16 (s, 6 H, CH₃-3'_5'), 4.45 (m, 2 H, H-5'), 4.51 (s, 1 H, H-4'), 5.63 (m, 1 H, H-3'), 5.89 (t, 1 H, J= 11.20 Hz, H-2'), 6.60 (d, 1 H, J= 5.76 Hz, H-1'), 8.67 (s, 1 H, H-2), 9.04 (d, 1 H, J= 1.61 Hz, H-7), 9.10 (d, 1 H, J=

1.62 Hz, H-6). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 20.31 (CH_3), 20.49 (CH_3), 20.75 (CH_3), 63.31 (C-5'), 70.75 (C-3'), 73.28 (C-2'), 80.43 (C-4'), 85.61 (C-1'), 133.60 (C-9), 134.30 (C-8a), 136.16 (C-9a), 143.99 (C-7), 147.22 (C-6), 148.26 (C-2), 148.64 (C-4a), 149.45 (C-3a), 169.40 (C=O), 169.58 (C=O), 170.20 (C=O).

13) 3-(β -D-ριβοφουρανοζυλο)-9-γλωρο-3H-ιμιδαζο[4',5':5,6]πυριδο[2,3-b]πυραζίνη (18)

Η απακετυλίωση του μορίου **17** (50 mg, 0.11 mmol) έλαβε χώρα με διαβίβαση αέριας αμμωνίας στο μεθανολικό διάλυμά του. Το μίγμα παρέμεινε σε ηρεμία για δυο ώρες και έπειτα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού. Αφού προσροφήθηκε σε silica gel καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη (90:10). Ελήφθησαν 8.81 mg λευκού στερεού.

Απόδοση: 24.20%, **Στ:** 288.1-280.5 $^{\circ}\text{C}$ (dec.), $[\alpha]_{589}^{20}$ -28 $^{\circ}$ (c=0.0025, DMSO), $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 3.64 (dd, J= 4 και 12 Hz, 1 H, H-5'), 3.77 (dd, J= 4 και 12 Hz, 1 H, H-5'), 4.04 (m, 1 H, H-4'), 4.27 (t, 1 H, J=8.53 Hz, H-3'), 4.71 (t, 1 H, J= 10.18 Hz, H-2'), 6.23 (d, 1 H, J= 5.29 Hz, H-1'), 7.02 (m, 1 H, OH, D_2O exch.), 7.10 (m, 1 H, OH, D_2O exch.), 7.18 (m, 1 H, OH, D_2O exch.), 9.14 (s, 1 H, H-7), 9.22 (s, 1 H, H-6), 9.25 (s, 1 H, H-2). $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 61.09 (C-5'), 70.18 (C-3'), 73.55 (C-2'), 85.63 (C-4'), 87.92 (C-1'), 131.77 (C-4a), 132.45 (C-8a), 133.96 (C-9), 135.85 (C-9a), 144.47 (C-7), 147.70 (C-6), 149.56 (C-3a), 151.09 (C-2).

14) N-ισοπροπυλο-3-(β -D-ριβοφουρανοζυλ)-3H-ιμιδαζο[4',5':5,6]πυριδο[2,3-b]πυραζίν-9-αμίνη (19)

Το ακετυλιωμένο παράγωγο **17** (90 mg, 0.19 mmol) διαλύθηκε σε αιθανόλη (2 ml) και έπειτα προστέθηκε ισοπροπυλαμίνη (1 ml) υπό άνυδρες συνθήκες. Το μίγμα θερμάνθηκε στους 30-40 $^{\circ}\text{C}$ για 6 ώρες και έπειτα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για μια μέρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης εκδιώχθηκε ο διαλύτης και το στερεό υπόλειμμα που προέκυψε, προσροφήθηκε σε silica gel και καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη (97:3). Τελικά ζυγίστηκαν 17 mg της επιθυμητής αμίνης **19**, κίτρινου χρώματος και ελαιώδους υφής. **Απόδοση:** 24.4%, $[\alpha]_{589}^{20}$ -1.06 $^{\circ}$ (c=0.0010, CH_3OH), $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 1.36 (d, 6 H, J= 6.28 Hz, 2 CH_3), 3.59 (m, 1 H, H-5'), 3.70 (m, 1 H, H-5'), 4.00 (m, 1 H, H-4'), 4.20 (m, 1 H, H-3'), 4.73 (m, 1 H, H-2'), 5.19 (d, 1 H,

$J = 3.98$ Hz, OH-3', D₂O exch.), 5.32 (m, 1 H, CH), 5.45 (d, 1 H, $J = 6.05$ Hz, OH-2', D₂O exch.), 5.54 (m, 1 H, OH-5', D₂O exch.), 6.05 (d, 1 H, $J = 6.07$ Hz, H-1'), 7.66 (d, 1 H, $J = 9.15$ Hz, NH, D₂O exch.), 8.56 (s, 1 H, H-2), 8.67 (s, 1 H, H-7), 8.95 (s, 1 H, H-6). ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ (ppm): 23.01 (CH₃), 48.53 (CH), 61.82 (C-5'), 70.77 (C-3'), 73.05 (C-2'), 85.16 (C-4'), 87.78 (C-1'), 119.34 (C-9a), 125.70 (C-8a), 138.48 (C-7), 142.74 (C-2), 146.98 (C-6), 147.81 (C-9), 148.48 (C-4a), 150.85 (C-3a).

15) *N*-βουτυλο-3-(β-D-ριβοφουρανοζυλ)-3*H*-ιμιδαζο[4',5':5,6]πυριδο[2,3-*b*]πυραζιν-9-αμίνη (20)

Το ακετυλιωμένο παράγωγο **17** (30 mg, 0.06 mmol) διαλύθηκε σε αιθανόλη (1 ml) και έπειτα προστέθηκε ισοπροπυλαμίνη (1 ml) υπό άνυδρες συνθήκες. Το μίγμα θερμάνθηκε στους 30-40°C για 6 ώρες και έπειτα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για μια μέρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης εκδιώχθηκε ο διαλύτης και το στερεό υπόλειμμα που προέκυψε, προσροφήθηκε σε silica gel και καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και σύστημα έκλουσης χλωροφόρμιο/μεθανόλη (95:5). Τελικά ζυγίστηκαν 6 mg της επιθυμητής αμίνης **20**, κίτρινου χρώματος και ελαιώδους υφής. **Απόδοση:** 25%, $[\alpha]_{589}^{20} -10.77^\circ$ ($c=0.0013$, CH₃OH), ¹H-NMR (CD₃OD) δ (ppm): 1.00 (t, 3 H, CH₃), 1.50 (m, 2 H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 1.80 (m, 2 H, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 3.95 (dd, $J = 3$ και 12 Hz, 1 H, H-5'), 3.80 (dd, $J = 3$ και 12 Hz, 1 H, H-5'), 4.20 (m, 1 H, H-4'), 4.22 (d, 2 H, $J = 7.71$ Hz, NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 4.38 (m, 1 H, H-3'), 4.87 (m, 1 H, H-2'), 6.10 (d, 1 H, $J = 5.79$ Hz, H-1'), 8.42 (s, 1 H, H-2), 8.64 (d, 1 H, $J = 1.84$ Hz, H-7), 8.86 (d, 1 H, $J = 1.80$ Hz, H-6). ¹³C-NMR (CD₃OD) δ (ppm): 12.48 (CH₃), 19.52 (NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 32.42 (NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 43.89 (NHCH₂CH₂CH₂CH₃), 61.26 (C-5'), 70.64 (C-3'), 72.52 (C-2'), 85.65 (C-4'), 88.46 (C-1'), 120.08 (C-9a), 126.41 (C-8a), 138.36 (C-7), 142.34 (C-2), 146.33 (C-6), 148.20 (C-4a), 150.78 (C-3a).

4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/1902/fischer-bio.html>, in 'Emil Fischer—Biography', ed. C. From Nobel Lectures, Amsterdam, **1966**.
2. Rompay, A. R. V.; Johansson, M.; Karlsson, A. *Pharmacology & Therapeutics*, **2003**, 100, 119-139
3. Hoffmann, M.; Chrzanowska, M.; Hermann, T.; Rychlewski, J. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4482
4. Drognitz, O.; Benz, S.; Pfeffer, F.; Fischer, C.; Makowiec, F.; Schareck, W.; Hopt, U. *T. Transplantation* **2004**, 78, 1802
5. Clercq, De.; *Clin. E. Microb. Rev.* **1997**, 10, 674
6. Lamanna, N.; Weiss, M. *Adv. Pharmacol.* 2004, 51, 107
7. Bonate, P. L.; Arthaud, L., Jr; Stephenson, K.; Secrist, J. A., III; Weitman, S. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, 5, 855
8. Gandhi, V.; Plunkett, W. *Drug Dispos.* **2002**, 41, 93
9. Buie, L. W.; Epstein, S. S.; Lindley, C. M. *Clin. Ther.* **2007**, 29, 1887
10. Giufo, G.M.; Santillan, M.B.; Estrada, M.R.; Yamin, L.J.; Jauregui, E.A. *J. Mol. Struct.* **1998**, 428, 155-165
11. deKoning, H.; Diallinas, G. *Mol. Membr. Biol.* **2000**, 17,122
12. Sampath, D.; Rao, V. A.; Plunkett, W. *Oncogene* **2003**, 22, 9063
13. Plunkett, W.; Gandhi, V. *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.* **2001**, 19, 21
14. Chapman, T. *Nature*. **2004**, 430, 109
15. Zablocki, J.; Kalla, R.; Perry, T.; Palle, V.; Varkhedkar, V.; Xiao, D.; Piscopio, A.; Maa, T.; Gimbel, A.; Hao, J.; Chu, N.; Leung, K.; Zeng, D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 609
16. Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A.; Gessi, S.; Borea, P. A. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 238-263
17. Ahn, H.-S.; Bercovici, A.; Boykow, G.; Bronnenkant, A.; Chackalamannil, S.; Chow, J.; Cleven, R.; Cook, J.; Czarniecki, M.; Domalski, C.; Fawzi, A.; Green, M.; Gundes, A.; Ho, G.; Laudicina, M.; Lindo, N.; Ma, K.; Manna, M.; McKittrick, B.; Mirzai, B.; Nechuta, T.; Neustadt, B.; Puchalski, C.; Pula, K.; Silverman, L.; Smith, E.; Stamford, A.; Tedesco, R. P.; Tsai, H.; Tulshian, D.;

- Vaccaro, H.; Watkins, R. W.; Weng, X.; Witkowski, J. T.; Xia, Y.; Zhang, H., *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 2196-2210
18. Whitehead, J. W. F.; Lee, G. P.; Gharagozloo, P.; Hofer, P.; Gehrig, A.; Wintergerst, P.; Smyth, D.; McCoull, W.; Hachicha, M.; Patel, A.; Kyle, D. J. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1237
19. Raboisson, P.; Lugnier, C.; Muller, C. E.; Reimund, J.-M.; Schultz, D.; Pinna, G.; Le Bec, A.; Basaran, H.; Desaubry, L.; Gaudiot, F.; Selouma, M.; Bourguignon, J.-J. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 199
20. Gilligan, P. J.; Robertson, D. W.; Zaczek, R. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1641
21. Kurimoto, A.; Ogino, T.; Ichii, S.; Isobe, Y.; Tobe, M.; Ogita, H.; Takaku, H.; Sajiki, H.; Hirota, K.; Kawakami, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 1091
22. Penning, T. D.; Chandrakumar, N. S.; Desai, B. N.; Djuric, S. W.; Gasiecki, A. F.; Malecha, J. W.; Miyashiro, J. M.; Russell, M. A.; Askonas, L. J.; Gierse, J. K.; Harding, E. I.; Highkin, M. K.; Kachur, J. F.; Kim, S. H.; Villani-Price, D.; Pyla, E. Y.; Ghoreishi-Haack, N. S.; Smith, W. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 1137
23. Altmann, E.; Cowan-Jacob, S. W.; Missbach, M. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5833
24. Chapman, E.; Best, M. D.; Hanson, S. R.; Wong, C.-H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 3526
25. Shahani, V. M.; Yue, P.; Haftchenary, S.; Zhao, W.; Lukkarila, J. L.; Zhang X.; Ball, D.; Nona, Ch.; Gunning, P. T.; Turkson J. *Med. Chem. Lett.* **2010**, 2, 79-84
26. Yan, A.; Wang, L.; Xu, S.; Xu, J. *Drug Disc. Today* **2010**, 5-6, 260-269
27. Bettayeb, K.; Sallam, H.; Ferandin, Y.; Popowycz, F.; Fournet, G.; Hassan, M.; Echaliier, A.; Bernard, P.; Endicott, J.; Joseph, B.; Meijer, L. *Mol. Cancer. Ther.* **2008**, 7, 2713-2724
28. Legraverend, M.; Grierson, D. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 3987
29. Watson, J. D.; Crick, F.H.C. *Nature.* **1953**, 171, 737-738 and 964-967
30. Cole, P. D.; Zebala, J. A.; Kamen, B. A. *Drug Discov. Today.* **2005**, 2, 337-342
31. Montgomery, J. A.; Shortnacy-Fowler, A. T.; Clayton, S. D.; Riordan, J. M.; Secrist III, J. A. *J. Med. Chem* **1992**, 35, 397-401
32. Nabhan, C.; Gartenhaus, R. B.; Tallman, M. S. *Leukemia Research.* **2004**, 28, 429-442
33. Carson, D. A.; Kaye, J.; Seegmiller, J. E. *J. Immunol.* **1978**, 121, 1726-1731

34. Wyczechowska, D.; Fabianowska-Majewska, K. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 65, 219-225
35. Goodman, G. R. *Best Practice and Research Clin. Hematol.* **2003**, 16, 101-116
36. Cohen, A.; Lee, J. W.; Gelfand, E. W. *Blood.* **1983**, 61, 660-666
37. Zhu, C.; Johansson, M.; Permert, J.; Karlsson, A. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 56, 1035-1040
38. Curbo, S.; Zhu, C.; Johansson, M.; Balzarini, J.; Karlsson, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 285, 40-45
39. Clercq, E. De. *Antiviral Res.*, **2005**, 67, 56-75
40. Ellion, G. B.; Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; deMiranda, P.; Beauchamp, L.; Schaeffer, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74, 5716-5720
41. Darby, G. *Drugs of Today.* **1995**, 31, 273-83
42. Clercq, E. De. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, 68, 2301-2315
43. Lewis, W.; Dalakas, M. C. *Nat. Med.* **1995**, 1, 417-422
44. Skoog, F.; Strong, F.M.; Miller, C.O. *Science.* 1965,148, 532-533
45. Strnad, M. *Physiol. Plant.* **1997**, 101, 674-688
46. Miller, F.; Skoog, M.H.; von Saltza, F.M.; Strong, J. *Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1392
47. Barciszewski, J.; Massino, F.; Clark, B.F. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, 40, 182-192
48. Verbeke, P.; Siboska, G.E.; Clark, B.F.; Rattan, S.I.S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 276, 1265
49. Sharma, S.P.; Kaur, J.; Rattan, S.I.S. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1997**, 41, 869
50. Barciszewski, J.; Siboska, G.E.; Rattan, S.I.S.; Clark, B.F.C. *Plant Growth Reg.* **2000**, 32, 257
51. Berge, U.; Kristensen, P.; Rattan, S.I. *Ann. NY Acad. Sci.* **2006**, 1067, 332-336
52. Mlejnek, P. *J. Cell Biochem.* **2001**, 83, 678-689
53. Mlejnek, P.; Dolezel, P. *Toxicol. In Vitro.* **2005**, 19, 985-990
54. Cabello, C.M.; Bair, W.B.; Ley, S.; Lamore, S.D.; Azimian, S.; Wondrak, G.T. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, 77, 1125-1138
55. Choi, B.H.; Kim, W.; Wang, Q.C.; Kim, D.C.; Tan, S.N.; Yong, J.W.; Kim, K.T.; Yoon, H.S. *Cancer Lett.* **2008**, 261, 37-45

56. Laezza, C.; Notarnicola, M.; Caruso, M.G.; Messa, C.; Macchia, M.; Bertini, S.; Minutolo, F.; Portella, G.; Fiorentino, L.; Stingo, S.; Bifulco, M. *FASEB J.* **2006**, *20*, 412–418
57. Spinola, M.; Colombo, F.; Falvella, F.S.; Dragani, T.A. *Int. J. Cancer.* **2007**, *120*, 2744–2748
58. Mittelman, A.; Evans, J.T.; Chheda, G.B. *Ann. NY Acad. Sci.* **1975**, *255*, 225–234
59. Tiedemann, R.E.; Mao, X.; Shi, C.X.; Zhu, Y.X.; Palmer, S.E.; Sebag, M.; Marler, R.; Chesi, M.; Fonseca, R.; Bergsagel, P.L.; Schimmer, A.D.; Stewart, A.K. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 1750–1764
60. Ottria, R.; Casati, S.; Baldoli, E.; Maier, J. A. M.; Ciuffreda, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8396–8402
61. Ottria, R.; Casati, S.; Manzocchi, A.; Baldoli, E.; Mariotti, M.; Maier, J. A. M.; Ciuffreda, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4249–4254
62. Liu, X.; Kim, C. N.; Yang, J.; Jemmerson, R.; Wang, X. *Cell.* **1996**, *86*, 147–157
63. Laezza, C.; Caruso, M. G.; Gentile, T.; Notarnicola, M.; Malfitano, A. M.; Matola, T. Di.; Messa, C.; Gazzo, P.; Bifulco, M. *Int. J. Cancer:* **2009**, *124*, 1322–1329
64. Dudzik, P.; Dulinska-Litewka, J.; Wyszko, E.; Jedrychowska, P.; Opalka, M.; Barciszewski, J.; Laidler, P. *Journal of Cellular Biochemistry* **2011**, *112*, 2115–2124
65. Vermeulen K.; Strnad, M.; Havlicek, L.; Van Onckelen, H.; Lenjou, M.; Nijs, G.; Van Bockstaele, DR.; Berneman, ZN. *Exp. Hematol.* **2002**; *30*, 1107–1114
66. Ishi, Y.; Hori, Y.; Sakai, S.; Honma, Y. *Cell Growth Differ.* **2002**, *13*, 19–26
67. Vorbruggen, H.; Ruh-Pohlenz, C. *Org. React.* **2000**, *55*, 1–630
68. Kazimierzuk, Z.; Cottam, H. B.; Revankar, G. R.; Robins, Roland K. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6379–6382
69. Kandasamy, R.; Imamura, N.; Robins, R. K.; Revankar, G. R. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5107–5110
70. Ishido, Y.; Sato, T.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1961**, *34*, 1347
71. Fischer, E.; Helferich, B. *Chem. Ber.* **1914**, *47*, 210
72. Hilbert, G. E.; Johnson, T. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1930**, *52*, 4489–4494
73. Davoll, J.; Lowy, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 1650–1655
74. Ueda, T.; Nishino, H. *JACS* **1968**, *90*, 1678–1679
75. Vorbruggen, H.; Krolikiewicz, K.; Bennua, B. *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 1234–1255

76. Vorbrüggen, H.; Bennua, B. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 1339
77. Choi, W-B.; Wilson, L. J.; Yeola, S.; Liotta, D. C.; Schinazi, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9377
78. Wilson, L. J.; Liotta, D. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 1815-1818