

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



**ΝΕΑ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ
ΙΜΙΔΑΖΟΠΥΡΙΔΙΝΗΣ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΔΡΑΣΗ ΕΝΑΝΤΙ
ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΓΑΛΟΪΟΥ**

ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

2017-2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΟΥΛΗ ΝΙΚΟΛΑΪΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)

ΜΑΡΑΚΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΤΣΟΤΙΝΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο του τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου κ. Π. Μαράκο και κ. Ν. Πουλή για την καθοδήγηση και τη συμπαράσταση τους σε όλα τα στάδια της παρούσας εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το τρίτο μέλος της εξεταστικής μου επιτροπής, καθηγητή Α. Τσοτίνη, για τη συμβολή του στην προσωπική μου πρόοδο. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το ίδρυμα Ωνάση για τη χορήγηση υποτροφίας στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3-23
1.1 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ HCMV-ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	3-4
1.2 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΟΣΩΜΑΤΙΟΥ ΤΟΥ HCMV	5-6
1.3 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ HCMV	7-14
<i>1.3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο-ξενιστή</i>	7-8
<i>1.3.2 Λυτικός κύκλος ζωής</i>	9-11
<i>1.3.3 Λυσιγονικός κύκλος ζωής</i>	12-14
1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ HCMV	15-17
<i>1.4.1 Ανοσοεπαρκείς φορείς</i>	15
<i>1.4.2 Ανοσοανεπαρκείς φορείς</i>	16-17
1.5 ΦΑΡΜΑΚΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ HCMV	18-20
<i>1.5.1 Εγκεκριμένες αντι-HCMV θεραπείες</i>	18-19
<i>1.5.2 Αντι-HCMV παράγωγα σε κλινικές μελέτες</i>	20
1.6 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	21-23
2. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24-42
3. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ	43-44
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	45-56
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57-65

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λοίμωξη από HCMV αποτελεί σημαντικό παράγοντα νοσηρότητας σε πληθυσμιακές ομάδες που εμφανίζουν υψηλό βαθμό ανοσοανεπάρκειας, όπως οι ασθενείς με AIDS προχωρημένου σταδίου και οι ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση οργάνου ή μυελού των οστών. Η θεραπευτική αντιμετώπιση του HCMV βασίζεται στους αναστολείς της ιικής DNA πολυμεράσης Ganciclovir, Cidofovir και Foscarnet που αναπτύχθηκαν στις αρχές τις δεκαετίας του '90, με το πρώτο να αποτελεί μέχρι σήμερα τον παράγοντα εκλογής. Ωστόσο τα προβλήματα βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων αυτών, που αντιμετωπίστηκαν μερικώς με την ανάπτυξη του per os χορηγούμενου Valganciclovir, η εμφάνιση σοβαρών δόσοεξαρτώμενων ανεπιθύμητων ενεργειών και η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών περιορίζουν την κλινική τους αποτελεσματικότητα. Η πρόσφατη έγκριση του αναστολέα τερμινάσης Letemovir με fast-track διαδικασία καταδεικνύει την ανάγκη ανάπτυξης νέων ασφαλέστερων αντι-HCMV παραγόντων με νέους μηχανισμούς δράσης. Στο πλαίσιο της έρευνας για την ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αντιμεταβολιτών, αναπτύχθηκαν τα βενζιμιδαζολικά παράγωγα 2,5,6-τριχλωρο-1-(β-D-ριβοφουρανοζυλο)βενζιμιδαζόλιο (TCRB) και το 2-βρωμο ανάλογο του (BDCRB). Τα παράγωγα αυτά αποδείχθηκαν ισχυροί αναστολείς της ανάπτυξης του HCMV, ενώ η υποκατάσταση του αλογόνου από μικρούς αλειφατικούς αμινοϋποκαταστάτες και η αντικατάσταση του D-σακχάρου από την L-ριβοφουρανόζη, οδήγησε στην ανάπτυξη του 2-ισοπροπυλαμινο-παραγώγου Maribavir. Το παράγωγο αυτό αναστέλλει τη σύνθεση του HCMV DNA, μέσω αναστολής της ιικής pUL97 κινάσης και βρέθηκε δραστικότερο και μεταβολικά σταθερότερο από τα TCRB και BDCRB, με αποτέλεσμα να εισέλθει σε κλινικές δοκιμές, ως υποψήφιο φάρμακο έναντι του HCMV. Σε μία προσπάθεια επέκτασης των σχέσεων δομής-δράσης των βενζιμιδαζολικών παραγώγων στη σειρά της ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης, σχεδιάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας νέα νουκλεοζιτικά παράγωγα, που μπορούν να θεωρηθούν ως 4-αζα-D-ισοστερή του Maribavir. Με την τροποποίηση αυτή της φαρμακοφόρου δομής στοχεύουμε στη διερεύνηση των ηλεκτρονικών και στερικών απαιτήσεων για την αποτελεσματική αλληλεπίδραση με τους ενζυμικούς στόχους των βενζιμιδαζολικών παραγώγων. Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται η σύνθεση και η φαρμακολογική αξιολόγηση των ισομερών 1- και 3-β-D-ριβονουκλεοζιτών της 5,6-διχλωροϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης, οι οποίοι φέρουν 2-αμινοϋποκαταστάτες στην κενή θέση του ιμιδαζολικού πυρήνα.

Λέξεις-Κλειδιά: βενζιμιδαζολικοί νουκλεοζίτες, maribavir, pUL97 κινάση, 5,6-διχλωροϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνη

NEW IMIDAZOPYRIDINE NUCLEOSIDE DERIVATIVES WITH POTENTIAL ANTI-HCMV ACTIVITY

ABSTRACT

Human cytomegalovirus (HCMV) is the most common sight- and life-threatening opportunistic pathogen in immunocompromised individuals. Therapeutic approaches for treatment or prophylaxis of HCMV infectious manifestations rely on a handful of approved drugs. Ganciclovir and its orally bioavailable prodrug, Valganciclovir, are still the gold standards for the treatment of HCMV diseases, while Cidofovir and Foscarnet serve as second-line therapies. However, the clinical effectiveness of these compounds, all of which are targeted at the viral DNA polymerase, is limited due to severe side effects, poor pharmacokinetic properties and the development of resistant strains. The recent approval of the terminase inhibitor Letemovir with fast-track procedures highlights the urgent need to overcome these handicaps by developing anti-HCMV agents with novel modes of action and improved clinical safety. In this scope, research efforts led to the development of a number of polyhalogenated benzimidazole nucleosides, exemplified by 2,5,6-trichloro-1-(β -D-ribofuranosyl)benzimidazole (TCRB) and its 2-bromo analogue (BDCRB), that were found to strongly inhibit viral replication. In terms of improving the metabolic stability of these compounds, the 2-halo substituent was replaced by small aliphatic amines in both the β -D- as well as the β -L-ribose derivatives. The 2-isopropylamine substituted derivative of the β -L-series Maribavir proved to be more potent than BDCRB, reducing HCMV DNA synthesis via the inhibition of the viral pUL97 kinase and has entered clinical trials. In order to expand the structure-activity relationships of the benzimidazole series to the less-studied and more “purine-like” imidazo[4,5-*b*]pyridine scaffold, we have designed a number of novel imidazopyridine nucleoside derivatives, which can be considered as 4-aza-D-isosters of Maribavir. We aim to explore the spatial limitations of the target enzymes and gain insight on the network of the developed interactions. Within this context, we disclose herein the preparation and pharmacological evaluation of the 1- and 3-regioisomeric β -D-ribosides of 5,6-dichloroimidazo[4,5-*b*]pyridine, introducing various aminosubstituents at the vacant position of the imidazole ring.

Keywords: benzimidazole nucleosides, maribavir, pUL97 kinase, 5,6-dichloroimidazo[4,5-*b*]pyridine

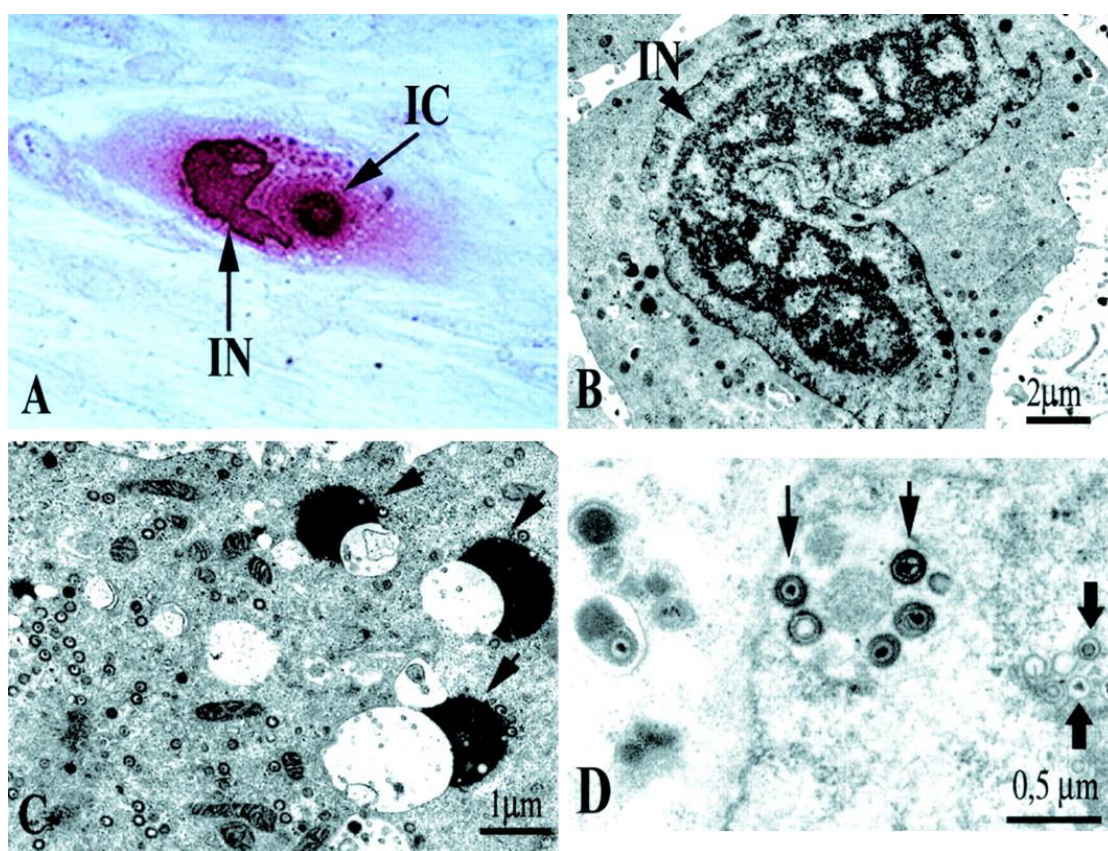
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ HCMV-ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο Ανθρώπινος Κυτταρομεγαλοϊός (**H**uman **C**ytomegalovirus, HCMV) αποτελεί ένα από τα είδη του γένους των Κυτταρομεγαλοϊών (*Cytomegalovirus* genus), το οποίο κατατάσσεται στην οικογένεια των ερπητοϊών (*Herpesviridae* family). Επίσης γνωστός ως ανθρώπινος ερπητοϊός-5 (**H**uman **H**erpesvirus-5, HHV-5), αποτελεί το πρωτότυπο μέλος της υποοικογένειας των β-ερπητοϊών (*Betaherpesvirinae* subfamily), η οποία περιλαμβάνει επίσης τους κυτταρομεγαλοϊούς των υπόλοιπων θηλαστικών-ξενιστών, καθώς και τους ανθρώπινους ερπητοϊούς 6 και 7 (HHV-6, HHV-7)¹. Η ονομασία του ιού προέκυψε από τα κυτταρολογικά ευρήματα που εντοπίζονται κατά τη μικροσκοπική εξέταση σε περιπτώσεις λοίμωξης από HCMV, με προεξέχοντα την χαρακτηριστική διόγκωση των μολυσμένων κυττάρων (κυτταρομεγαλία) που συνοδεύεται από την ανίχνευση ενδοκυτταρικών ή/και ενδοκυτταροπλασματικών εγκλείστων². Όταν τα εγκλείστα αυτά παρατηρούνται σε ζεύγη είναι γνωστά ως “μάτια της κουκουβάγιας” (“owl’s eye inclusions”) και αποτελούν ειδικό ιστοπαθολογικό εύρημα για τη διάγνωση της λοίμωξης από HCMV, αν και η απουσία τους δεν αποκλείει το ενδεχόμενο παρουσίας του ιού³.

Η αναγνώριση και ταυτοποίηση του HCMV κατέστη δυνατή στις αρχές τις δεκαετίας του '50, όταν η καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων αποτέλεσε εργαστηριακή ρουτίνα και ήταν αποτέλεσμα της ανεξάρτητης ερευνητικής προσπάθειας τριών διαφορετικών ερευνητών⁴. Η χαρακτηριστική ιστοπαθολογική εικόνα της “νόσου των μεγαλοκυτταρικών εγκλείστων” (cytomegalic inclusion disease, CID) αποτελούσε κοινό εύρημα επί αυτοψίας σε πολλές περιπτώσεις θανάτων νεογνών και βρεφών, αλλά πρώτος ο Wyatt το 1950 επισήμανε τη σημασία της ως θανατηφόρου ασθένειας, αγνώστου ιογενούς αιτιολογίας, της εμβρυϊκής και νεογνικής ηλικίας⁵. Η απομόνωση ενός άγνωστου ιού σε δύο διαφορετικές περιπτώσεις από τους σιελογόνους αδένες (1955) και από νεφρικό ιστό (1956) νεκρών ασθενών με CID από την Margaret Smith συνοδεύθηκε από την παρατήρηση ότι ο ιός μπορεί να καλλιεργηθεί μόνο σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, αλλά όχι σε κύτταρα άλλων ζώων⁶. Η υποψία της απομόνωσης από τον Rowe ιικών στελεχών έρπητα ζωστήρα από κύτταρα αδενοϊδούς ιστού⁷, τα οποία εμφάνιζαν ενδοκυτταρικά εγκλείστα όμοια προς αυτά που είχε περιγράψει ο Thomas Weller σε καλλιέργειες ιστών επιμολυσμένες με τον ιό⁸, τον οδήγησε για επιβεβαίωση στο εργαστήριο του δεύτερου. Διαπιστώθηκε τότε ότι τα εν λόγω στελέχη παρουσίαζαν μεγάλη ομοιότητα με αυτά που είχαν απομονωθεί από βιοψίες ήπατος βρεφών εν ζωή που εμφάνιζαν μικροκεφαλία, ίκτερο και ηπατοσπληνομεγαλία, συμπτώματα τα οποία

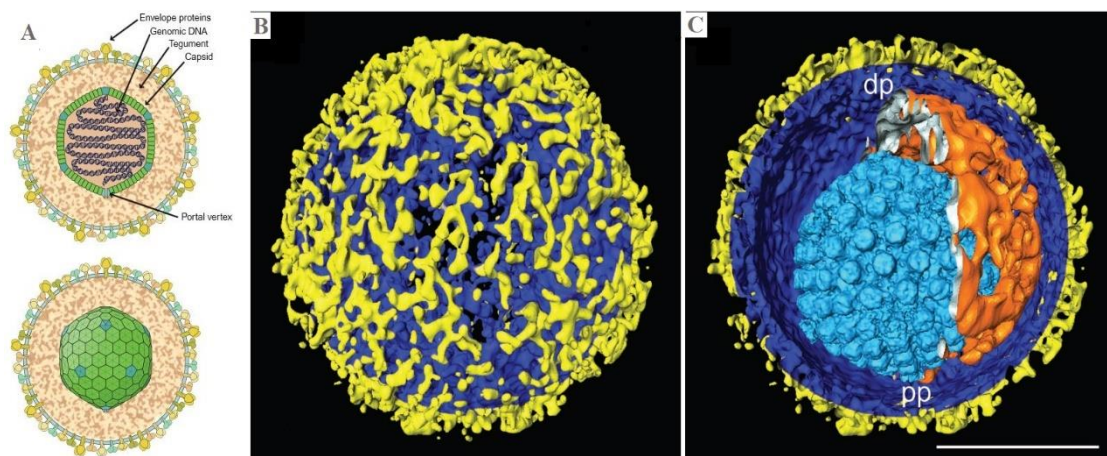
είχαν αρχικά παρερμηνευθεί, ως ενδείξεις συγγενούς τοξοπλάσμωσης⁹. Μέσω της σύγκρισης των αποτελεσμάτων των τριών ερευνητικών ομάδων αναγνωρίστηκε από τον Weller ως αίτιο της νόσου CID η ομάδα των ανθρώπινων κυτταρομεγαλοϊών, για την οποία στοιχειοθέτησε την ύπαρξη περισσότερων του ενός οροτύπων (π.χ. στελέχη Davis, AD-169)¹⁰. Για την απομόνωση των στελεχών του HCMV ως αποτέλεσμα της ανεξάρτητης εργασίας των ερευνητικών ομάδων του St. Louis υπό την Margaret Smith, του Bethesda υπό τον Wallace Rowe και του εργαστηρίου του ίδιου στο Harvard αναφέρεται εκτενώς ο Weller, σε δημοσίευση του σχετικά με το ιστορικό της ανακάλυψης, αναγνωρίζοντας με αυτό τον τρόπο τη συνεισφορά των συναδέλφων του¹¹.



Εικόνα 1: Πολλαπλασιασμός του HCMV σε ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες πνεύμονα. (A) Μολυσμένος από HCMV ινοβλάστης 120 ώρες μετά από την προσβολή, με ενδοπυρηνικά (IN-intranuclear) και ενδοκυττασολικά (IC-intracytoplasmic) έγκλειστα. (B-D) Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μολυσμένων από HCMV ινοβλαστών. (B) Ενδοπυρηνικά (IN) έγκλειστα σε μορφή πετάλου (horseshoe-shaped). (C) Πυκνοί σχηματισμοί (Dense bodies). (D) Ισσωμάτια που ωριμάζουν στο επίπεδο της πυρηνικής μεμβράνης¹²

1.2 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΟΣΩΜΑΤΙΟΥ ΤΟΥ HCMV

Ο HCMV αποτελεί από άποψη δομικής και γενετικής σύστασης το πολυπλοκότερο μέλος της ομάδας των ανθρώπινων ερπητοϊών. Το γενετικό υλικό του συνίσταται σε ένα γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA) μήκους 236 kbp, το οποίο κωδικοποιεί περισσότερα από 220 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORFs) και αποτελείται από τουλάχιστον 145 μοναδικά για το είδος γονίδια¹³. Είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακό το γεγονός ότι το γονιδίωμα του είναι διπλάσιο από αυτό του VZV (Varicella Zoster Virus) και υπερδιπλάσιο από το γονιδίωμα του HSV-1 (Herpes Simplex Virus-1), δύο κοινών ανθρώπινων α-ερπητοϊών¹⁴. Το διαμέτρου 230nm ιοσωμάτιο του HCMV εμφανίζει τα τυπικά χαρακτηριστικά της ομάδας των ερπητοϊών. Το σύστημα των λιποπρωτεϊνικών μεμβρανών που συνιστούν το φάκελο¹⁵ περικλείει μία κοκκιώδη πρωτεϊνική ζώνη (tegument layer), η οποία περιβάλλει το ιικό νουκλεοκαψίδιο.



Εικόνα 2: A) Δομή ώριμου βιρίου του HCMV όπου επιδεικνύονται τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά του. B,C) Αντιπροσωπευτικές ιοσωματίου ερπητοϊού τομές επιφανείας από τομογραφία (cryo-electron tomography) ενός βιρίου του HSV-1 μετά από εξάλειψη θορύβου. B) Εξωτερική επιφάνεια φακέλου, όπου φαίνεται η κατανομή των γλυκοπρωτεϊνικών συμπλεγμάτων (κίτρινο χρώμα) τα οποία προεξέχουν από τη μεμβράνη. C) Διατομή του εσωτερικού του βιρίου, όπου φαίνονται το νουκλεοκαψίδιο (γαλάζιο χρώμα) και η περιβάλλουσα του κοκκιώδους ζώνης (tegument layer, πορτοκαλί χρώμα) στο εσωτερικό του φακέλου¹⁶.

Το ιικό νουκλεοκαψίδιο αποτελεί την καλύτερα χαρακτηρισμένη δομή του ιοσωματίου του HCMV, με τις τρισδιάστατες απεικονίσεις να καταδεικνύουν γνωρίσματα όμοια με αυτά του απλού ερπητοϊού τύπου-1 (HSV-1)¹⁷. Ο HCMV διαθέτει το χαρακτηριστικό εικοσαεδρικό καψίδιο της οικογένειας, διαμέτρου περίπου 100 nm, το οποίο αποτελείται από 162 καγομερίδια. Αυτά εντοπίζονται ως δύο διακριτές μορφολογικά δομές, 12 πενταμερείς

(pentons) και 150 εξαμερείς (hexons), με τις γειτονικές δομές να συνδέονται κατά τρόπο που εξασφαλίζει μία τρισδιάστατη συμμετρία¹⁸. Σε μία από τις ακμές του πλέγματος διαμορφώνεται ένα συμμετρικό κυλινδρικό σύμπλεγμα, αποτελούμενο από 12 αντίγραφα της πρωτεΐνης pUL104 (portal protein, 79 kDa), μέσω του οποίου το ιικό DNA εισέρχεται και απομακρύνεται από το καψίδιο¹⁹.

Η κοκκιώδης ζώνη (tegument layer) περιλαμβάνει τις περισσότερες φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες του ιοσωματίου οι οποίες, μέσω της ενζυμικής τους δραστηριότητας, ρυθμίζουν τόσο την κυτταρική όσο και την ιική γονιδιακή έκφραση. Έχει πάχος περίπου 50 nm και βασικά συστατικά της είναι η pUL32 (basic phosphoprotein, pp150, 149 kDa), η pUL82 (upper matrix protein, pp71, 74 kDa) και η pUL83 (lower matrix protein, pp65, 69 kDa), οι οποίες μαζί με τις pUL97 και pUL28 φωσφορυλιώνονται και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά το λυτικό κύκλο ζωής του ιού²⁰.

Ο φάκελος του ώριμου ιοσωματίου του HCMV έχει πάχος περίπου 10 nm και περιλαμβάνει σε αφθονία τουλάχιστον 10 πρωτεϊνικά είδη, μεταξύ των οποίων υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνες (G-protein coupled receptors, GPCRs), ανοσογονικά γλυκοπρωτεϊνικά συμπλέγματα, καθώς και πρωτεΐνες προερχόμενες από το κύτταρο του ξενιστή²¹. Ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών της κοκκιώδους ζώνης και του φακέλου δεν έχουν αποσαφηνιστεί, ωστόσο η pUL83 έχει προταθεί ως πιθανός σύνδεσμος μεταξύ των δύο δομών, με βάση τη διαπίστωση ότι οι πυκνές δομές (dense bodies) που παρατηρούνται σε κύτταρα μολυσμένα από HCMV είναι στην πραγματικότητα σφαιρικά συσσωματώματα της εν λόγω πρωτεΐνης, που περικλείονται από τον ιικό φάκελο²².

1.3 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ HCMV

1.3.1 Είσοδος του ιού στο κύτταρο-ξενιστή

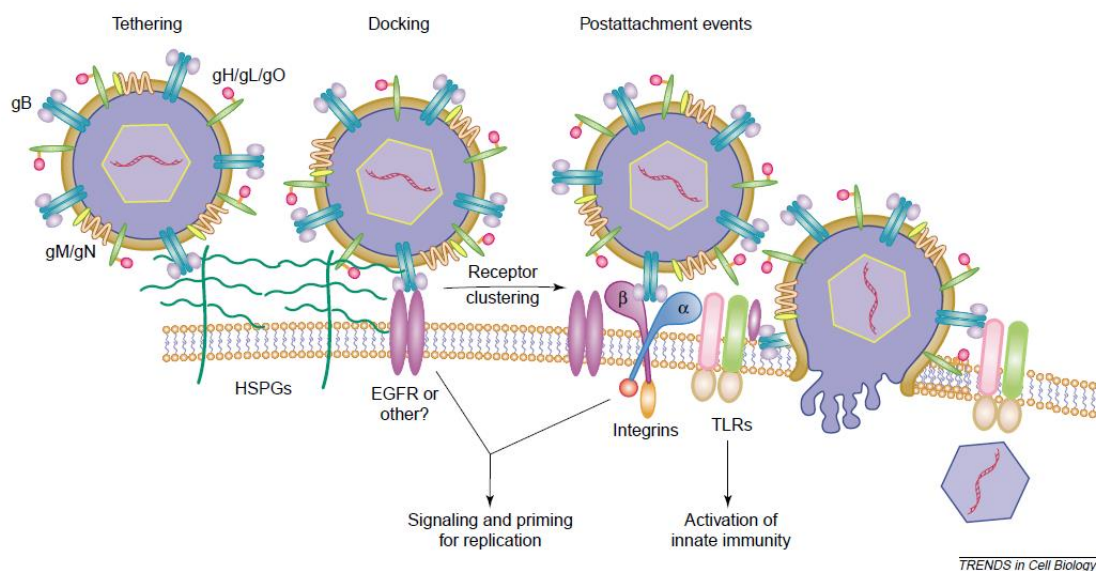
Ο HCMV εμφανίζει ευρύ κυτταρικό τροπισμό *in vivo*. Κατά την πρωτογενή λοίμωξη τα πρώτα κύτταρα που εκτίθενται στον ιό είναι αυτά του επιθηλίου της ρινοφαρυγγικής οδού ή της γεννητικής κοιλότητας, ανάλογα με το αν η μετάδοση έχει πραγματοποιηθεί από του στόματος ή μέσω σεξουαλικής επαφής. Στην περίπτωση που η μετάδοση οφείλεται σε μεταγγίσεις αίματος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού συστήματος εκτίθενται πρώτα, ενώ η αιματογενής διασπορά του ιού στα επιμέρους όργανα διαμεσολαβείται μέσω των μολυσμένων λευκοκυττάρων, που σπεύδουν στα σημεία της πρωτολοίμωξης. Τα όργανα στα οποία εντοπίζονται το υψηλότερα ποσά ιικού φορτίου είναι οι σιελογόνοι και οι μαστικοί αδένες, τα νεφρά και το ήπαρ²³.

Η είσοδος του HCMV στο κύτταρο-ξενιστή πραγματοποιείται είτε μέσω απευθείας σύντηξης του φακέλου με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και επακόλουθη απελευθέρωση των νουκλεοκαψιδίων στο κυτταρόπλασμα (όπως συμβαίνει στα κύτταρα των ινοβλαστών)²⁴ είτε μέσω ενδοκυττάρωσης ολόκληρου του ισοωματίου (όπως συμβαίνει στα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα). Στη δεύτερη περίπτωση, το χαμηλό pH στο περιβάλλον του ενδοσώματος οδηγεί στη λύση του φακέλου και στην απελευθέρωση των ιικών πρωτεϊνών και του νουκλεοκαψιδίου στο κυτοσόλιο²⁵.

Η γλυκοπρωτεΐνη B (gB - UL55) του φακέλου, καθώς και το σύμπλεγμα των γλυκοπρωτεϊνών M και N (gM/gN - UL100/UL73) συμμετέχουν στο καθοριστικό στάδιο της πρόσδεσης και σύντηξης του ιικού φακέλου με τη μεμβράνη του κυττάρου-στόχου²⁶. Είναι γνωστό ότι η είσοδος του HCMV στο κύτταρο πραγματοποιείται μέσω ενός αρχικού βήματος πρόσδεσης του ισοωματίου σε μόρια θεϊκής ηπαράνης (πρωτεογλυκάνες επιφανείας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, HSPGs), μέσω της αλληλεπίδρασης τους με της γλυκοπρωτεΐνες gB και gM²⁷. Η πρόσδεση στις HSPGs θεωρείται ότι συμβάλει στη σταθεροποίηση του ισοωματίου στην επιφάνεια της μεμβράνης, στάδιο απαραίτητο για την ενεργοποίηση των συγκεκριμένων υποδοχέων που εμπλέκονται στη συνέχεια²⁸.

Η αρχική αλληλεπίδραση των gB ή/και gM/gN με τις HSPGs ακολουθείται σε πολλά διηθήσιμα από τον HCMV κύτταρα, από την αλληλεπίδραση της gB με τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) ή με άλλους υποδοχείς της επιφανείας των αιμοποιητικών κυττάρων²⁹, όπως των μονοκυττάρων/μακροφάγων, των δενδριτικών κυττάρων και των ουδετερόφιλων, στα οποία ο υποδοχέας δεν εκφράζεται³⁰.

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γλυκοπρωτεϊνών του φακέλου και κυτταρικών ιντεγκρινών οδηγούν στη συσσώρευση άλλων υποδοχέων και μέσω αυτής της αλληλουχίας γεγονότων επέρχεται τελικά η σύντηξη με τη μεμβράνη και η απελευθέρωση των περιεχομένων του φακέλου στο κυτταρόπλασμα³¹.

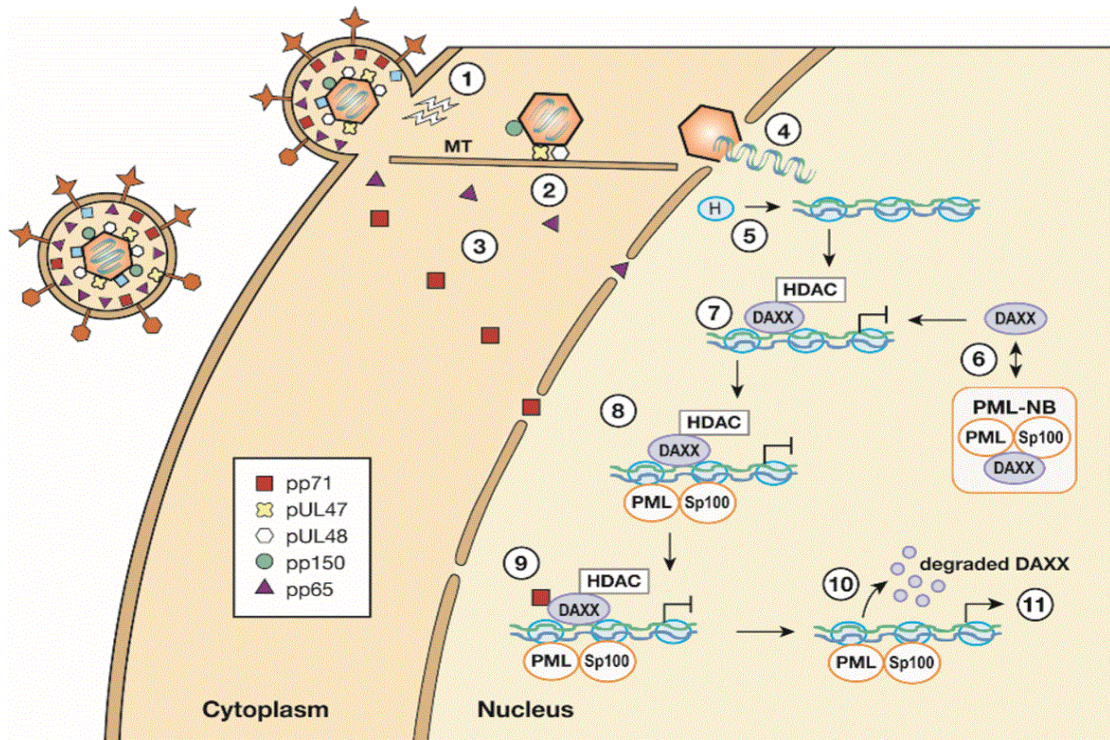


Εικόνα 3: Αλληλεπιδράσεις των γλυκοπρωτεϊνών του φακέλου του HCMV με πρωτεογλυκάνες (HSPGs) και υποδοχείς (EGFR) που οδηγούν στην είσοδο του ιού στο κύτταρο. Η είσοδος του ιού στο κύτταρο πυροδοτεί αποκλίνοντα σηματοδοτικά μηνύματα, καθώς άλλα εννοούν την αναπαραγωγή του (EGFR, integrins) ενώ άλλα (TLRs) καταλήγουν στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος²⁹

Η σηματοδότηση που εκκινείται μέσω του EGFR ή/και των ιντεγκρινών πιστεύεται ότι συμβάλλει στην εξέλιξη των επόμενων σταδίων του λυτικού κύκλου ζωής του ιού, ενώ η αναγνώριση από τους υποδοχείς TLR (Toll-like receptors) ενός παθογονικού μοτίβου (Pathogen associated molecular pattern, PAMP) κατά την είσοδο του ιού πυροδοτεί διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, που ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα²⁹. Η κυτταρική απόκριση που θα υπερिσχύσει τελικά κατά την έκθεση στον HCMV θα καθορίσει εάν ο ιός θα ακολουθήσει το λυτικό κύκλο αναπαραγωγής και την εδραίωση παραγωγικής λοίμωξης ή αν θα περιέλθει σε λανθάνουσα κατάσταση εντός των κυττάρων του ξενιστή.

1.3.2 Αντικός κύκλος ζωής

Τα γεγονότα που διαδέχονται την απελευθέρωση των νουκλεοκαπιδίων του HCMV και των πρωτεϊνών της κοκκιάδους ζώνης στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή συνοψίζονται στην εικόνα 4.

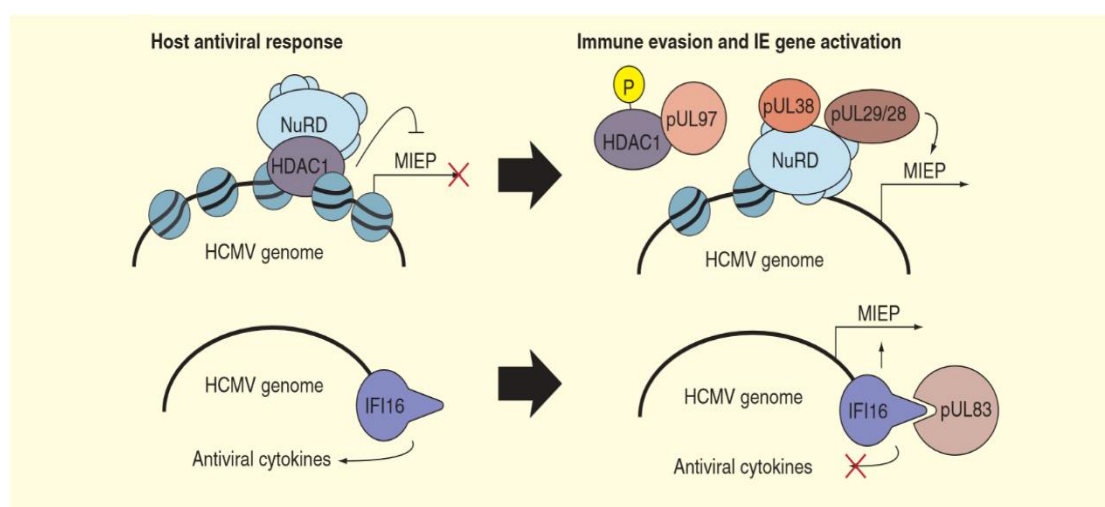


Εικόνα 4: Στάδια που μεσολαβούν από την απελευθέρωση των νουκλεοκαπιδίων του HCMV στο κυτταρόπλασμα μέχρι την επαγωγή της μεταγραφής των ιικών πρώιμων γονιδίων κατά το λυτικό κύκλο³²

Η μεταφορά των νουκλεοκαπιδίων του HCMV στους πυρηνικούς πόρους διαμεσολαβείται από την αλληλεπίδραση του συμπλέγματος των πρωτεϊνών pUL47/pUL48 με το σύστημα των μικροσωληνίσκων του κυττάρου-ξενιστή^{32,33} και ακολουθεί η απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί πακετάρεται παρουσία κυτταρικών ιστονών³⁴ και στη μορφή αυτή αναγνωρίζεται από πυρηνικά σώματα της πρωτεΐνης PML (PML nuclear bodies, PML-NBs)³⁵, τα οποία σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση της PML (Promyelocytic leukemia protein) με τις Sp100 και Daxx και δρουν ως καταστολείς της μεταγραφής των ιικών γονιδίων³⁶. Παράλληλα, με τη δράση της απακετυλάσης των ιστονών (HDAC1) επί του πακεταρισμένου γονιδιώματος του HCMV, καταστέλλεται η μεταγραφή των ιικών άμεσα πρώιμων γονιδίων (Immediate early genes, IE) από τον κύριο υποκινητή MIEP (Major immediate-early promoter)³⁷.

Στην περίπτωση ανοσοεπαρκών ξενιστών, η επίδραση αυτών των επιγενετικών κατασταλατικών μηχανισμών και η κινητοποίηση των μηχανισμών της φυσικής και ειδικής ανοσίας καθιστά αδύνατη την είσοδο του ιού στο λυτικό κύκλο ζωής. Έτσι, δεν παρατηρείται παραγωγή νέων ιοσωματίων και ο HCMV εισέρχεται σε λανθάνουσα φάση, εντός των κυττάρων-ξενιστών. Ωστόσο, στην περίπτωση ανοσοανεπαρκών ή ανοσοκατεσταλμένων ξενιστών, ο ιός δύναται να επανενεργοποιηθεί από τη λανθάνουσα κατάσταση ή να εκδηλώσει άμεσα τη λοιμογόνο δράση του επί πρωτολοίμωξης, υπερνικώντας την καταστολή της έκφρασης των πρώιμων γονιδίων του.

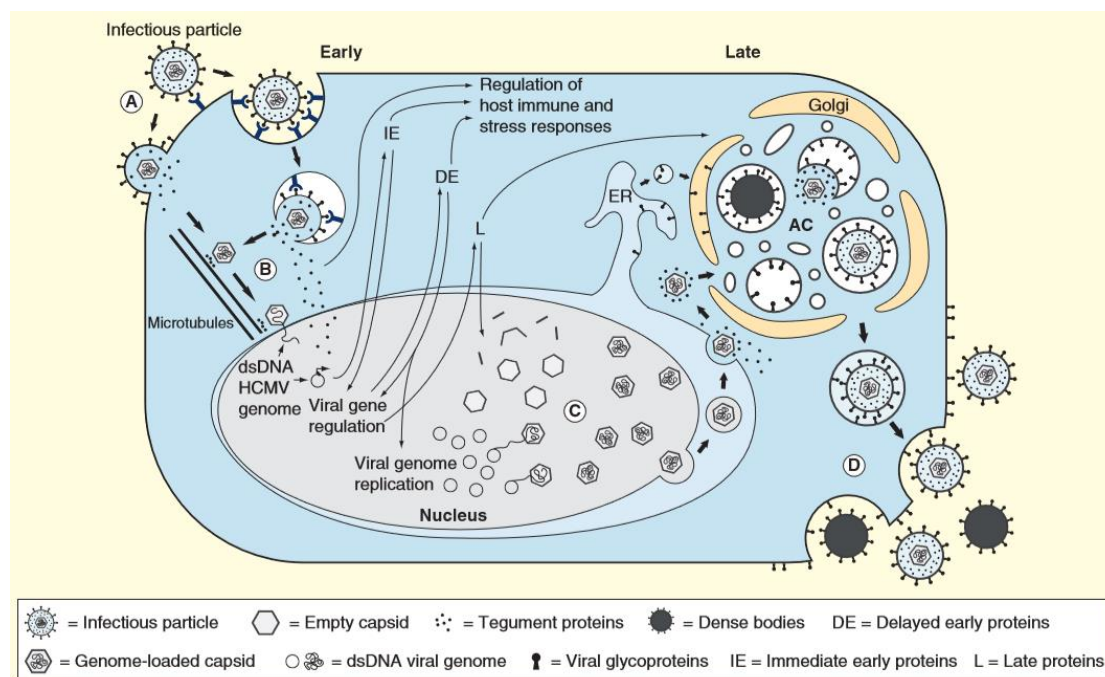
Η άρση της αναστολής αυτών των κυτταρικών μηχανισμών και η επαγωγή της μεταγραφής διαμεσολαβείται αρχικά από την pUL82 (pp71), η οποία προσδένεται στην Daxx³⁸, με τελικό αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της δεύτερης από το πρωτεάσωμα³⁹. Παράλληλα, η φωσφορυλίωση της HDAC1 από την pUL97 επιφέρει αναστολή της ενζυμικής της δραστηριότητας και την αποσταθεροποίηση της από το σύμπλεγμα αναδιαμόρφωσης του νουκλεοσώματος (Nucleosome remodelling and deacetylase complex, NuRD)⁴⁰. Η επακόλουθη αλληλεπίδραση του NuRD με τις pUL38 και pUL29/28 καταλήγει στην επαγωγή του κύριου υποκινητή MIEP^{40,41}. Η αλληλεπίδραση της pUL83 (pp65) με το μεταγραφικό παράγοντα IFI16 (Interferon inducible protein 16) αναστέλλει την έκφραση αντιικών κυτταροκινών⁴² και καταλύει επίσης την ενεργοποίηση του MIEP⁴³, ο οποίος ελέγχει, μεταξύ άλλων, την έκφραση δύο άμεσα πρώιμων γονιδίων, των IE1 και IE2. Μέσω της λειτουργίας αυτών των μηχανισμών, ο HCMV εισέρχεται σε λυτικό αναπαραγωγικό κύκλο και με αποτέλεσμα το σχηματισμό νέων ιοσωματίων και την εγκατάσταση παραγωγικής λοίμωξης.



Εικόνα 5: Επαγωγή του MIEP και της μεταγραφής από αυτόν των ιικών άμεσα πρώιμων γονιδίων (IE)⁴⁴

Παρόλο που η IE2-p86 θεωρείται ως ο σημαντικότερος ενεργοποιητής (transactivator) της ιικής γονιδιακής έκφρασης κατά το λυτικό κύκλο ζωής του HCMV, ο συνδυασμός των IE1-p72 και IE2-p86 είναι αυτός που αναστέλλει την επιγενετική καταστολή επί του ιικού γονιδιώματος, ενεργοποιεί την έκφραση των πρώιμων (early genes, E or delayed early genes, DE) και των όψιμων (late genes, L) ιικών γονιδίων κατά την παραγωγική λοίμωξη, αυτορρυθμίζει την έκφραση των IE γονιδίων και καθορίζει τις πυρηνικές περιοχές, όπου θα λάβει χώρα η αντιγραφή του ιικού DNA⁴⁵.

Κατά το επόμενο στάδιο πραγματοποιείται η έκφραση των ιικών DE γονιδίων, οπότε σχηματίζεται μεταξύ άλλων η DNA πολυμεράση του HCMV (pUL54) και ακολουθεί η αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος⁴⁶. Με την ολοκλήρωση της αντιγραφής ξεκινάει η έκφραση των ιικών όψιμων (L) γονιδίων, που κωδικοποιούν κυρίως δομικές πρωτεΐνες του βιρίου⁴⁷. Με αυτό τον τρόπο εκκινείται η συναρμολόγηση νέων νουκλεοκαψιδίων, τα οποία εξέρχονται από τον πυρήνα μέσω ενός συμπλέγματος (Nuclear egress complex, NEC) το οποίο διαταράσσει τη συνέχεια της πυρηνικής μεμβράνης⁴⁸. Με τη συμμετοχή του κυτταρικού εκκριτικού μηχανισμού (ενδοπλασματικό δίκτυο, σύμπλεγμα Golgi, ενδοσώματα) σχηματίζεται ένα κυτταροπλασματικό σύμπλεγμα (viral assembly complex, AC), που καταλύει την προσάρτηση των πρωτεϊνών της κοκκιώδους ζώνης και το σχηματισμό του φακέλου⁴⁹, με τελικό αποτέλεσμα την εξωκυττάρωση ώριμων ισωματίων.



Εικόνα 6: Συνοπτική παρουσίαση των σταδίων που μεσολαβούν από την είσοδο του HCMV στο κύτταρο μέχρι την εξωκυττάρωση των νέων ώριμων ισωματίων του ιού κατά το λυτικό κύκλο ζωής του⁴⁴.

1.3.3 Λυσιγονικός κύκλος ζωής

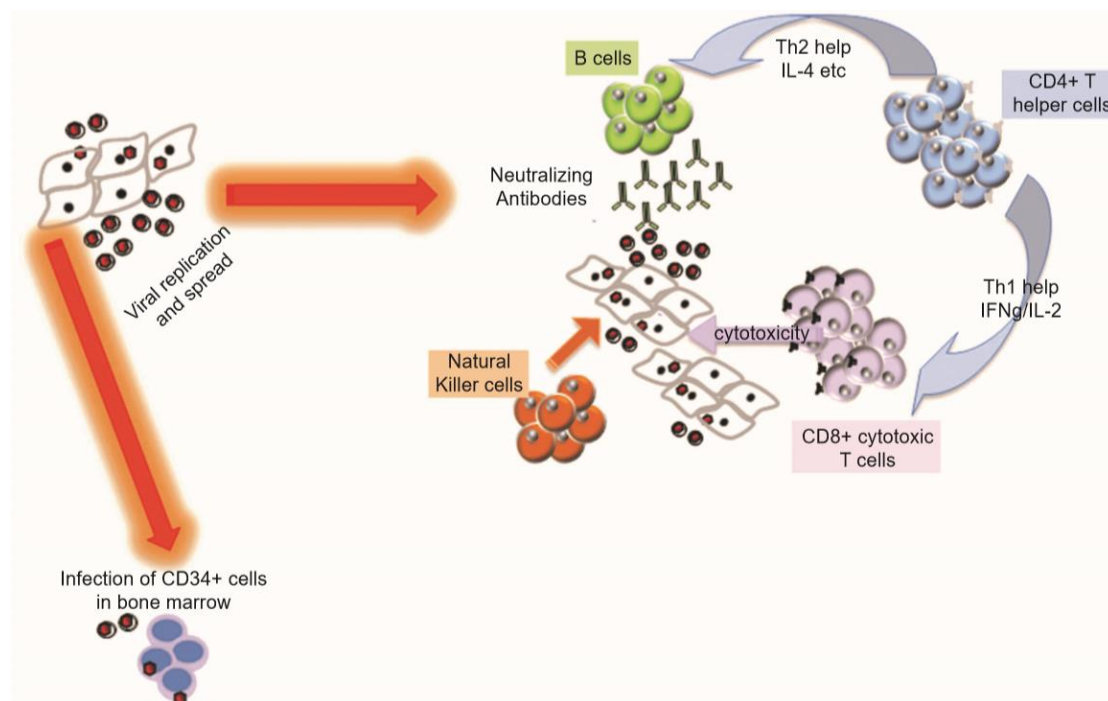
Κατά την πρωτογενή προσβολή ανοσοανεπαρκούς ασθενούς από τον HCMV, ο ιός θα ακολουθήσει το λυτικό κύκλο ζωής και η εκτεταμένη αναπαραγωγή του σε διάφορους τύπους κυττάρων θα οδηγήσει στην εκδήλωση γενικευμένης λοίμωξης. Εάν η λοίμωξη δεν τεθεί εγκαίρως υπό έλεγχο, μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές βλάβες οργάνων (end-organ disease), με αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα νοσηρότητας και σε ορισμένες περιπτώσεις θνησιμότητα⁵⁰. Αντιθέτως, στην περίπτωση ανοσοεπαρκών ατόμων, η έκθεση στον ιό επάγει μία ισχυρή και άμεση απόκριση από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, με την κλινική εικόνα να είναι ασυμπτωματική στην πλειονότητα των περιπτώσεων⁵¹.

Τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στα πρώτα στάδια της λοίμωξης από HCMV επιφέρουν εκτεταμένες αλλαγές στο επίπεδο της κυτταρικής γονιδιακής έκφρασης⁵². Η πυροδότηση της ισχυρής ανοσολογικής απόκρισης από τον ξενιστή έχει συσχετιστεί με την πρόσδεση των γλυκοπρωτεϊνών του ιικού φακέλου σε υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και εξελίσσεται πριν και ανεξάρτητα από την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος και τη σύνθεση των ιικών πρωτεϊνών⁵³. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εκκινούνται με το έναυσμα της αλληλεπίδρασης του ιού με μεμβρανικούς υποδοχείς οδηγούν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, σημαντικότεροι από τους οποίους είναι οι NFκ-B, Sp1 και ο ρυθμιστικός παράγοντας των ιντερφερονών 3 (IRF 3)^{54,55}.

Η ενεργοποίηση του NFκ-B αποτελεί έναν άμεσο αμυντικό μηχανισμό του ξενιστή και διαμεσολαβείται από τη διέγερση των υποδοχέων TLR2, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης τους με τις γλυκοπρωτεΐνες gB και gH του φακέλου⁵⁶. Σε ινοβλάστες και μονοκύτταρα προσβεβλημένα από HCMV, ο NFκ-B εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου εμφανίζοντας υψηλά ποσοστά πρόσδεσης με το DNA, στοιχεία που υποδηλώνουν την ενεργοποίηση του⁵⁷. Αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του NFκ-B είναι η μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν αρκετές προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοκίνες⁵⁸.

Παράλληλα, σηματοδοτικά μονοπάτια που δεν είναι ακόμη πλήρως χαρακτηρισμένα οδηγούν στην επαγόμενη από τον ιό φωσφορυλίωση της IRF3⁵⁹, η οποία ομοδιμερίζεται, μετατοπίζεται στον πυρήνα και υπό τη μορφή συμπλέγματος με άλλες πρωτεΐνες καταλύει την έκφραση της ιντερφερόνης β και ενός άλλου υποσυνόλου γονιδίων ISGs (Interferon Stimulating Genes)⁶⁰. Συγκεκριμένα, η ιντερφερόνη β, μέσω της αυτοκρινούς και της παρακρινούς δράσης της, αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της, ενεργοποιώντας τον καταρράκτη μετάδοσης σήματος που διαμεσολαβείται από τις JAK/STAT κινάσες και έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση ενός μεγάλου εύρους ISGs⁶¹.

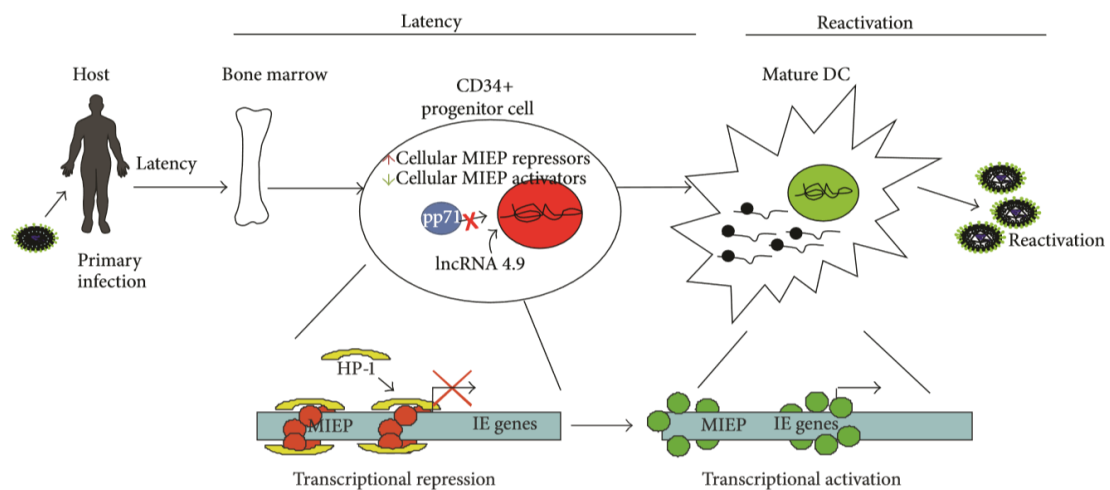
Η απελευθέρωση ανοσοδιεγερτικών παραγόντων σε συνδυασμό με την ωρίμανση και ισχυρή απόκριση των δενδριτικών κυττάρων⁶² περιορίζουν την αναπαραγωγή του HCMV (την οποία έκταση της) στην εστία της λοίμωξης, διευκολύνουν τη διήθηση της περιοχής από άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και επάγουν την ειδική ανοσολογική απόκριση που διαμεσολαβείται από τα T και B λεμφοκύτταρα³¹. Έτσι παρατηρείται ο σχηματισμός αντισωμάτων⁶³ και η διαφοροποίηση, τόσο βοηθητικών CD4⁺, όσο και κυτταροξικών CD8⁺ T λεμφοκυττάρων, που αναγνωρίζουν ένα μεγάλο εύρος ιικών πρωτεϊνών. Παρόλο που η απόκριση αυτή καταστέλλει αποτελεσματικά τον λυτικό αναπαραγωγικό κύκλο του HCMV και αποτρέπει την εκδήλωση σοβαρής λοίμωξης, δεν είναι τελικά ικανή να επιφέρει την πλήρη εκρίζωση του ιού, με αποτέλεσμα αυτός να παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση στα κύτταρα του ξενιστή για το υπόλοιπο της ζωής του⁶⁴.



Εικόνα 7: Κατά την πρωτογενή λοίμωξη από HCMV, ο ανοσοεπαρκής ξενιστής εκδηλώνει μία αποτελεσματική ανοσολογική απόκριση που περιλαμβάνει τη συμμετοχή των NK κυττάρων, αντισωμάτων καθώς και T-λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα την καταστολή της ιικής αναπαραγωγής⁶⁵

Κατά το λυσιγονικό κύκλο ζωής του HCMV μία από τις θέσεις όπου εντοπίζεται *in vivo* ο ιός είναι τα κύτταρα της μυελοειδούς σειράς, με κυριότερα τα CD14⁺ μονοκύτταρα και τα CD34⁺ προγονικά τους κύτταρα⁶⁶. Στα κύτταρα αυτά η απουσία ιικών ενεργοποιών στοιχείων,⁶⁷ σε συνδυασμό με την ισχυρή καταστολή του MIEP από κυτταρικά στοιχεία, αποτρέπουν την είσοδο του ιού στο λυτικό κύκλο αναπαραγωγής και διαμορφώνουν ένα

περιβάλλον ευνοϊκό για τη διατήρηση της λανθάνουσας κατάστασης. Χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτής της φάσης είναι ότι δεν παρατηρείται σχηματισμός μολυσματικών ισοματιών. Κατά την διαφοροποίηση ωστόσο των προγονικών αυτών κυττάρων σε μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα, επέρχονται αλλαγές στο περιβάλλον του πυρήνα και αναδιαμόρφωση της χρωματίνης γύρω από τον ΜΙΕΡ, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο τη μεταγραφή των ΙΕ1-p72 και ΙΕ2-p86, που αποτελούν τους κύριους επαγωγείς του λυτικού κύκλου αναπαραγωγής⁶⁸. Σε περίπτωση ανεπαρκούς ανοσολογικής απόκρισης (σε ανοσοκατεσταλμένους ή γενικότερα ανοσοανεπαρκείς ασθενείς) η επανενεργοποίηση του HCMV οδηγεί στη διασπορά του ιού σε διάφορα όργανα-στόχους και στην εκδήλωση κλινικής νόσου.



Εικόνα 8: Λανθάνουσα κατάσταση και επανενεργοποίηση του HCMV⁶⁹

1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ HCMV

Αντισώματα IgG που υποδηλώνουν προηγούμενη έκθεση στον ιό ανιχνεύονται περίπου στο 60% των ενηλίκων σε αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ το ποσοστό αγγίζει το 100% στις αναπτυσσόμενες. Η προσβολή από τον HCMV μπορεί να λάβει χώρα στην εμβρυϊκή, βρεφική, παιδική ή ενήλικη ζωή του ατόμου⁷⁰. Η μεν μόλυνση μπορεί να αφορά στην πλειονότητα του πληθυσμού, η εκδήλωση όμως ασθένειας λαμβάνει χώρα υπό προϋποθέσεις, με αποτέλεσμα την πρόκληση διαφόρων συνδρόμων σε παιδιά και ενήλικες. Ο καθοριστικός παράγοντας για την εκδήλωση του παθογόνου δυναμικού του ιού αναζητείται σε χαρακτηριστικά του ξενιστή εν γένει και όχι σε διαφορές νοσογονικότητας ή συγγένειας με συγκεκριμένους ιστούς, μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ιού⁷¹. Πρωταρχικής σημασίας για την κλινική εξέλιξη της μόλυνσης από HCMV είναι η κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, οπότε διαφοροποιείται η έκβαση της πρωτολοίμωξης από τον ιό, ή της επανενεργοποίησης του από τη λανθάνουσα κατάσταση, στις περιπτώσεις ανοσοεπαρκών και ανοσοανεπαρκών φορέων⁷².

1.4.1 Ανοσοεπαρκείς φορείς

Σε υγιή άτομα η μόλυνση από τον HCMV σπανίως προκαλεί ασθένεια, γεγονός που οφείλεται όπως έχει ήδη περιγραφεί (ενότητα 1.3.3) στην ολοκληρωμένη απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Η πρωτογενής λοίμωξη είναι συνήθως καλοήθης, με ελάχιστες ή και καθόλου κλινικές εκδηλώσεις, με την εξαίρεση ίσως ορισμένων περιστατικών που εξελίσσονται σε σύνδρομο ανάλογο με αυτό της λοιμώδους μονοπυρήνωσης⁷³. Σε κάθε περίπτωση ο ιός παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση στον οργανισμό του ξενιστή και σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη επανενεργοποιείται περιοδικά, με τις εκδηλώσεις αυτές να είναι επίσης υποκλινικές⁶⁹. Ωστόσο, συσσωρεύονται όλο και περισσότερα δεδομένα που συσχετίζουν αυτή την υποκλινική παρουσία του HCMV με σοβαρές χρόνιες παθήσεις του κυκλοφορικού συστήματος όπως η αθηροσκλήρωση⁷⁴ και η υπέρταση⁷⁵ καθώς και με την εμφάνιση νεοπλασιών⁷⁶.

1.4.2 Ανοσοανεπαρκείς φορείς

Το δυναμικό παθογένεσης του HCMV έχει συσχετιστεί με την εκδήλωση κλινικής νόσου σε τρεις ουσιαστικά κατηγορίες ξενιστών, που χαρακτηρίζονται από διαφορετικού βαθμού και αιτιολογίας ανοσοανεπάρκεια⁷²:

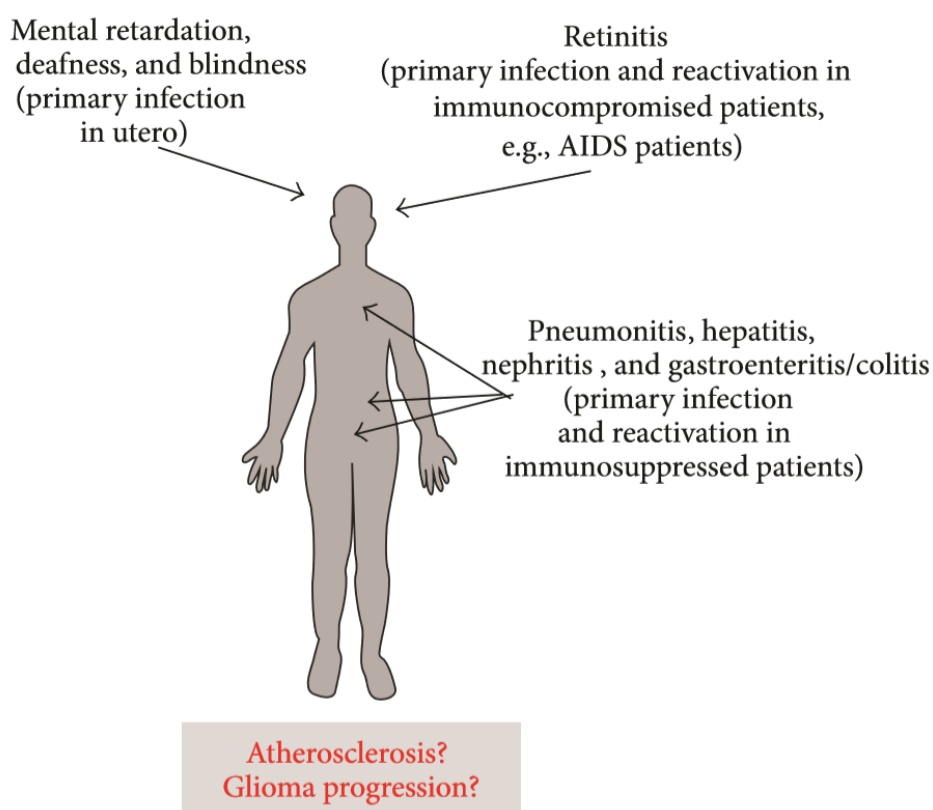
- Νεογνά, ως αποτέλεσμα της ελλιπούς ανάπτυξης του ανοσοποιητικού συστήματος και τα οποία μολύνονται λόγω της κάθετης μετάδοσης από τη μητέρα κατά την κύηση
- Δέκτες μοσχευμάτων, ως αποτέλεσμα της χορήγησης ανοσοκατασταλτικών παραγόντων και, σε ορισμένες περιπτώσεις, της αντίδρασης μοσχεύματος κατά ξενιστή
- Φορείς του HIV, ως αποτέλεσμα της απώλειας των CD4⁺ λεμφοκυττάρων και της συνακόλουθης ανεπάρκειας των συστημάτων της ειδικής ανοσίας

Πολύ μεγάλης σημασίας θεωρείται η συγγενής μόλυνση από HCMV, η οποία κατά ένα μεγάλο ποσοστό αναγνωρίζεται μετά τη γέννηση⁷⁷ και μπορεί να αποτελέσει αιτία σημαντικής νοσηρότητας στο νεογνό. Η συγγενής λοίμωξη της βρεφικής ηλικίας συσχετίζεται με ένα εύρος κλινικών εκδηλώσεων όπως χαμηλό βάρος κατά τη γέννηση, μικροκεφαλία, επιληπτικές κρίσεις, πετεχειώδες εξάνθημα που μοιάζει με αυτό της συγγενούς ερυθράς και μέτρια ηπατοσπληνομεγαλία με ίκτερο⁷⁸. Η καταπολέμηση της λοίμωξης από HCMV στη νεογνική ηλικία έχει μεγάλη σημασία, τόσο λόγω της βαρύτητας των συμπτωμάτων, που μπορεί να εξελιχτούν σε απειλητικά για τη ζωή του βρέφους, όσο και για την αποτροπή της εμφάνισης μη αναστρέψιμων επιπλοκών κατά την ανάπτυξη, όπως απώλεια ακοής και όρασης, διαταραχή συγκέντρωσης ή ακόμη και νοητική υστέρηση⁷⁹.

Κατά τη μεταμόσχευση οργάνων, η μετάδοση του HCMV πραγματοποιείται συνήθως από δότες-φορείς σε μη οροθετικούς ασθενείς⁸⁰ ενώ στους μισούς περίπου ασθενείς που έχουν δεχτεί μόσχευμα και λαμβάνουν ανοσοκατασταλτική θεραπεία, ενεργοποιείται ο ιός από τη λανθάνουσα κατάσταση⁸¹. Μεταξύ των φορέων του HIV, ο HCMV αποτελούσε συνηθισμένο ευκαιριακό παθογόνο, με το 85% των ασθενών με AIDS να καταλήγουν από HCMV αμφιβληστροειδίτιδα. Η ασθένεια αυτή αποτελεί αιτία θανάτου σε λιγότερο από 1% των μεταμοσχευμένων ασθενών που καταλήγουν από λοίμωξη από HCMV. Παρόλο που η αμφιβληστροειδίτιδα έχει ουσιαστικά εξαλειφθεί μεταξύ των HIV-οροθετικών ασθενών που λαμβάνουν αποτελεσματική αντιρετροϊκή θεραπεία, η HCMV ιαμία φαίνεται να αποτελεί γι' αυτούς σημαντικό παράγοντα νοσηρότητας⁸²

Συνολικά, η πρωτολοίμωξη από HCMV ή η επανενεργοποίηση του ιού στις ομάδες υψηλού κινδύνου αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την εκδήλωση σοβαρών ασθενειών, όπως:

- HCMV ηπατίτιδα, η οποία μπορεί να προκαλέσει κεραυνοβόλο ηπατική ανεπάρκεια
- HCMV αμφιβληστροειδίτιδα
- HCMV κολίτιδα
- HCMV πνευμονίτιδα
- HCMV οισοφαγίτιδα
- Πολυριζοπάθεια, εγκάρσια μυελίτιδα και υποξεία εγκεφαλίτιδα

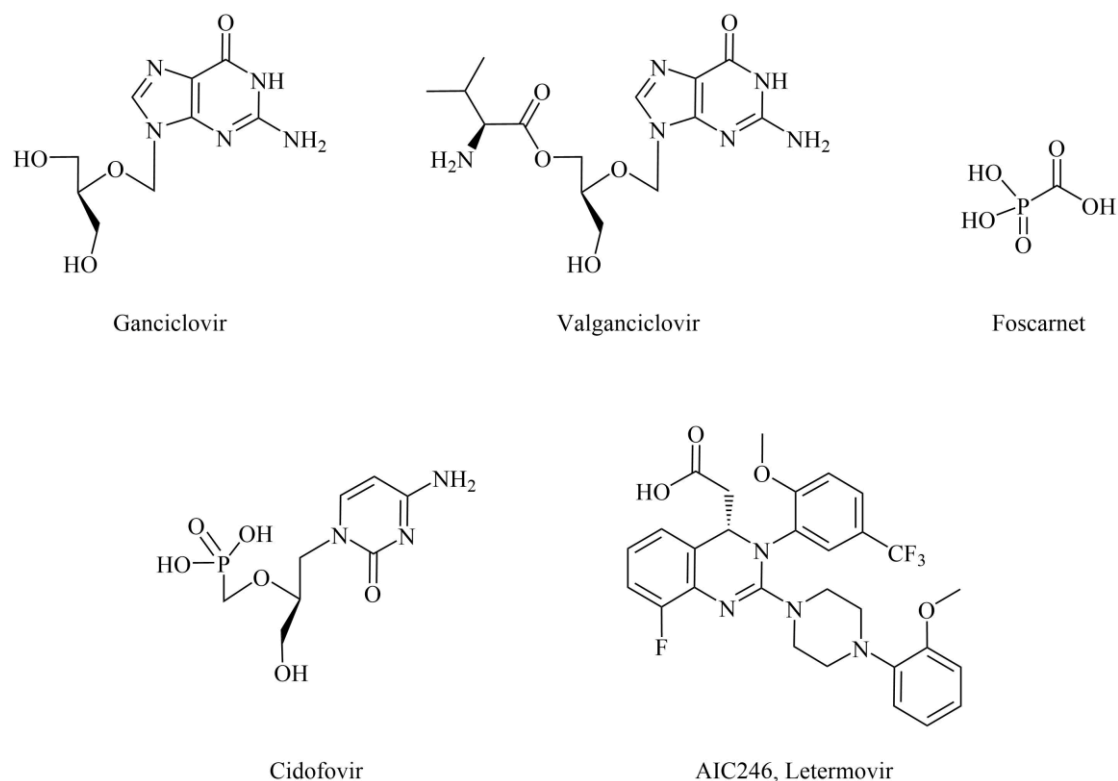


Εικόνα 9: Παθολογικές καταστάσεις και εκδηλώσεις σχετιζόμενες με τον HCMV⁶⁹

1.5 ΦΑΡΜΑΚΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ HCMV

1.5.1 Εγκριμένες αντι-HCMV θεραπείες

Αντι-HCMV φάρμακα έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται σε σχήματα προετοιμασίας ασθενών που πρόκειται να υποβληθούν σε μεταμόσχευση και ως χημειοπροφύλαξη από τον ιό μετά από μεταμόσχευση, καθώς και ως άμεση θεραπεία για την αντιμετώπιση οξείας λοίμωξης από HCMV⁷³. Πέντε ενώσεις που έχουν λάβει μέχρι σήμερα έγκριση χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη: το Ganciclovir και το από του στόματος προφάρμακό του Valganciclovir, το Foscarnet, το Cidofovir και το Letemovir.



Εικόνα 10: Εγκριμένα φάρμακα έναντι του HCMV

Το Ganciclovir (GCV-Cytovene IV®) έχει αποτελέσει τα τελευταία σχεδόν 30 χρόνια τη θεραπεία πρώτης γραμμής για πρόληψη και θεραπεία των λοιμώξεων από HCMV⁸³. Ο L-βαλινικός εστέρας του, Valganciclovir (Valacyte®), αποτελεί per os χορηγούμενο προφάρμακο του GCV. Βιομετατρέπεται στην ενεργό μορφή κατά τη διέλευση του από το εντερικό επιθήλιο στη συστηματική κυκλοφορία, εμφανίζοντας βιοδιαθεσιμότητα της τάξης του 60%⁸⁴. Το GCV υφίσταται μία αρχική φωσφορυλίωση από την UL97 κινάση του HCMV

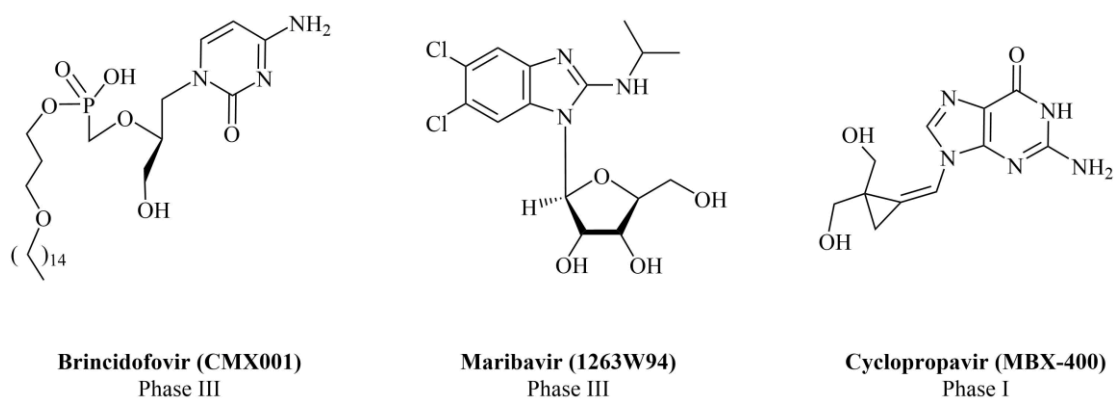
και στη συνέχεια με τη δράση κυτταρικών κινασών σχηματίζεται το δραστικό τριφωσφορικό παράγωγο (GCV-TP), το οποίο δρα ως συναγωνιστικός αναστολέας της ιικής UL54 DNA-πολυμεράσης (συναγωνίζεται το φυσιολογικό υπόστρωμα dGTP)⁸⁵. Με αυτό τον τρόπο επέρχεται ο τερματισμός της επιμήκυνσης του νεοσυντιθέμενου ιικού DNA. Μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν την pUL97 και την pUL54 οδηγούν στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών⁸⁶. Οι σημαντικότερες ανεπιθύμητες ενέργειες σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς που λαμβάνουν GCV είναι η δοσοεξαρτώμενη μυελοκαταστολή, που εκδηλώνεται συχνότερα ως ουδετεροπενία και η νεφροτοξικότητα που μπορεί να εκδηλωθεί κατά τη συγχορήγηση με άλλους νεφροτοξικούς παράγοντες, όπως η αζαθιοπρίνη, η κυκλοσπορίνη Α και η αμφοτερικίνη⁸⁷.

Τα Cidofovir (CDV-Vistide®) και Foscarnet (FOS-Foscavir®) αποτελούν θεραπείες δεύτερης γραμμής για την αντιμετώπιση του HCMV. Λόγω της χαμηλής per os βιοδιαθεσιμότητας τους, είναι διαθέσιμα μόνο για ενδοφλέβια χορήγηση. Το CDV είναι μονοφωσφορικό παράγωγο και δεν εξαρτάται για την ενεργοποίηση του από κάποιο ιικό ένζυμο, αλλά μετατρέπεται από κινάσες του κυττάρου-ξενιστή στη δραστική τριφωσφορική μορφή του, που αναστέλλει συναγωνιστικά τη DNA-πολυμεράση του HCMV⁸⁸. Το πυροφωσφορικό ανάλογο FOS συνδέεται στην ομόλογη θέση πρόσδεσης της pUL54 και εμποδίζει την υδρόλυση της πυροφωσφορικής ομάδας του τελικού τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου επί της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας του DNA⁸⁹. Λόγω του κοινού μοριακού στόχου εμφανίζεται συχνά διασταυρούμενη ανοχή μεταξύ των GCV και CDV, ενώ το φαινόμενο δεν είναι τόσο σύνηθες μεταξύ GCV και FOS⁹⁰. Τόσο το CDV όσο και το FOS εμφανίζουν σοβαρή και δοσοεξαρτώμενη νεφροτοξικότητα, με αποτέλεσμα η χρήση τους να περιορίζεται σε ασθενείς που έχουν αναπτύξει ανοχή στο GCV και σε εκείνους που η χορήγηση GCV αντενδείκνυται λόγω του μυελοκατασταλτικού του δυναμικού⁹¹.

Το παράγωγο Letermovir αποτελεί τον πιο πρόσφατα εγκεκριμένο (2017) παράγοντα για χημειοπροφύλαξη και αντιμετώπιση της λοίμωξης από HCMV σε ενήλικες οροθετικούς δέκτες αλλογενούς μοσχεύματος αιμοποιητικών κυττάρων (Human stem cell transplantation, HSCT)⁹² και είναι διαθέσιμο τόσο σε ενδοφλέβια όσο και σε per os χορηγούμενη μορφή. Αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα του συμπλέγματος της CMV τερμινάσης (pUL51, pUL56 και pUL89), το οποίο καταλύει την κατάτμηση των ιικών DNA συγκαταμερών (concatamers) στα μονομερή που αποτελούν το δίκλωνο DNA του HCMV, τα οποία ενσωματώνονται στη συνέχεια στα νεοσχηματιζόμενα νουκλεοκαψίδια⁹³. Καθότι ο μοριακός του στόχος είναι διαφορετικός από αυτόν των αναστολέων της pUL54, εμφανίζεται δραστικό σε στελέχη του HCMV που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στο GCV.

1.5.2 Αντι-HCMV παράγωγα σε κλινικές μελέτες

Οι προσπάθειες για την ανάπτυξη ασφαλέστερων παραγόντων έναντι του HCMV με νέους μηχανισμούς δράσης έχει σαν αποτέλεσμα την ανάδειξη τριών νέων υποψήφιων φαρμάκων, που βρίσκονται επί του παρόντος σε διάφορα στάδια κλινικών μελετών.



Εικόνα 11: Παράγωγα υπό κλινική αξιολόγηση έναντι του HCMV

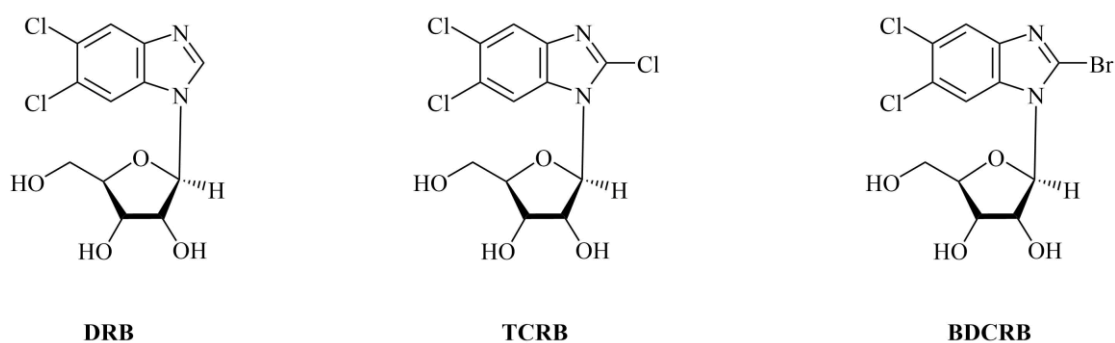
Το Brincidofovir είναι ο εξαδεκυλοξυπροπυλεστέρας του Cidofovir, ο οποίος αναπτύχθηκε ως προφάρμακο με σκοπό τη βελτίωση της *per os* βιοδιαθεσιμότητας και τη μείωση της νεφρικής κατανομής του μητρικού φαρμάκου, που συνδέεται με την εκδήλωση δόσοεξαρτώμενης τοξικότητας.

Το Maribavir αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του '90 και αποτελεί τον πρώτο αναστολέα της pUL97 κινάσης του HCMV που εισήλθε σε κλινικές δοκιμές. Ωστόσο σε κλινικές μελέτες φάσης III σε μεταμοσχευμένους ασθενείς, το Maribavir δεν επέδειξε ουσιαστικό όφελος σε σχέση με το placebo. Πιστεύεται ότι η συμμετοχή στη μελέτη ασθενών που είχαν λάβει ως θεραπεία προετοιμασίας Ganciclovir πριν τη μεταμόσχευση επηρέασε σημαντικά το αποτέλεσμα, ενώ και η δόση που χορηγήθηκε κρίθηκε τελικά μικρή⁹⁴. Στην παρούσα φάση το Maribavir βρίσκεται εκ νέου σε κλινικές μελέτες φάσης III για την αξιολόγηση της δραστηριότητας του ως θεραπεία προετοιμασίας σε ασθενείς που πρόκειται να υποβληθούν σε μεταμόσχευση⁷⁰.

Το ανάλογο γουανοσίνης Cyclopropavir φωσφορυλιώνεται από την pUL97 κινάση και με τον αναβολισμό του προς τριφωσφορικό παράγωγο αναστέλλει τελικά την ιική DNA πολυμεράση⁹⁵. Παράλληλα, η ισχυρή αλληλεπίδραση του μορίου με την ιική κινάση έχει σαν αποτέλεσμα να δρα και σαν συναγωνιστικός αναστολέας της, κατά τρόπο παρόμοιο με το Maribavir, με αποτέλεσμα έναν πιο περίπλοκο μηχανισμό δράσης⁹⁶.

1.6 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Κατά τη διερεύνηση της φαρμακολογικής δράσης νουκλεοζιτικών παραγώγων βενζιμιδαζολίου, αναπτύχθηκαν από την ομάδα των Leroy Townsend και John Drach το 2,5,6-τριχλωρο-1-(β-D-ριβοφουρανοζυλο)βενζιμιδαζόλιο (TCRB) και το 2-βρωμο ισομερές του (BDCRB) ως δομικά ανάλογα του μη υποκατεστημένου στη 2-θέση ισομερούς βενζιμιδαζολικού παραγώγου (DRB, εικόνα 12). Παρά τη δομική τους συγγένεια με τον ευρέως φάσματος αναστολέα RNA πολυμεράσης DRB⁹⁷, τα TCRB και BDCRB δεν επέδειξαν δράση ως αντικαρκινικοί παράγοντες, αλλά αποδείχθηκαν ισχυροί αναστολείς του HCMV σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις⁹⁸.

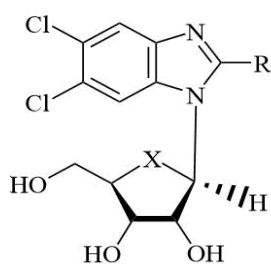
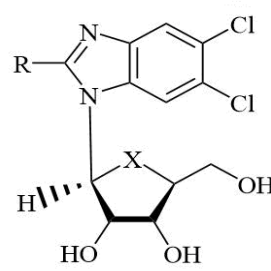






Εικόνα 12: Νουκλεοζιτικά παράγωγα αλογονομένων βενζιμιδαζολίων

Μελέτες του μηχανισμού δράσης των παραγώγων κατέδειξαν ότι δεν αναβολίζονται προς τριφωσφορικά παράγωγα⁹⁹ αλλά υπό τη μορφή του μη φωσφορυλιωμένου νουκλεοζιτη αναστέλλουν το σύμπλεγμα της DNA τερμινάσης. Αυτό υποστηρίζεται τόσο από την ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια UL56 και UL89 σε στελέχη ανθεκτικά στα εν λόγω παράγωγα,^{100,101} όσο και από την αποδεδειγμένη αναστολή της νουκλεάσης pUL89 από το BDCRB¹⁰². Με αυτό τον τρόπο αναστέλλουν την ωρίμανση του συγκαταμερούς (concatemeric) ιικού DNA σε μονομερή, σταδίου απαραίτητου για την ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του HCMV στα νεοσχηματιζόμενα νουκλεοκαψίδια. Παρά τα πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα των *in vitro* μελετών, φαρμακοκινητικές μελέτες σε αρουραίους και πιθήκους απέδειξαν ότι ο *N*-γλυκοζιτικός δεσμός του BDCRB διασπάται ταχέως *in vivo* κατά την πρώτη δίοδο από το ήπαρ, απελευθερώνοντας έτσι το αδρανές έναντι του ιού αλλά σημαντικά κυτταροτοξικό άγλυκο τμήμα¹⁰³.

Ακολούθησε η σύνθεση μεγάλης πληθώρας αναλόγων βενζιμιδαζολίου με διάφορες υποκαταστάσεις στις θέσεις 2,4,5 ή/και 6 του ετεροκυκλικού τμήματος, τα οποία φέρουν

στην N-1 θέση σάκχαρα της D- και L-σειράς, καρβοκυκλικά ισοστερή τους ή μη κυκλικούς υποκαταστάτες¹⁰⁴⁻¹¹¹. Μετά από εκτεταμένες μελέτες σχέσεων δομής δράσης, αναγνωρίστηκε ως αποτελεσματικότερο το μοτίβο της 2,5,6-τριυποκατάστασης, με ευνοϊκότερη την 5,6-διχλωροϋποκατάσταση, καθώς και το γεγονός ότι τα παράγωγα D- και L-ριβοφουρανόζης εμφανίζουν τη μικρότερη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τα παράγωγα που φέρουν άλλες N-υποκαταστάσεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει η επίδραση της φύσης του 2-υποκαταστάτη επί του βενζιμιδαζολίου μεταξύ των N-υποκατεστημένων παραγώγων της D- και L-σειράς στη δραστηριότητα έναντι του HCMV. Συγκεκριμένα, η παρουσία μικρών αλειφατικών 2-αμινοϋποκαταστατών (π.χ 2-ισοπροπυλαμινο- ή 2-κυκλοπροπυλαμινο-) στην L-σειρά οδηγεί σε δραστηκότερα παράγωγα από τη 2-βρωμοϋποκατάσταση, αντιστρέφοντας την εικόνα που παρατηρείται στην D-σειρά (πίνακας 1). Παρότι η χρησιμοποίηση των L-σακχάρων είχε ως αρχικό στόχο τη βελτίωση της μεταβολικής σταθερότητας των αρχικών παραγώγων, τελικά οδήγησε σε μια κατηγορία ενώσεων που εμφανίζει διαφορετικό μηχανισμό δράσης, γεγονός που πιθανώς ερμηνεύει και την παραπάνω παρατήρηση¹¹².

Enantiomeric Pairs							
 β-D-ribose				 β-L-ribose			
Compound	X	R	hCMV IC ₅₀ μM	Compound	X	R	hCMV IC ₅₀ μM
1421W92	CH ₂	Br	6.6	3142W92	CH ₂	Br	0.57
BDCRB	O	Br	0.56	3858U92	O	Br	0.93
2915W93	CH ₂	NH 	12.5	2916W93	CH ₂	NH 	1.0
3322W93	O	NH 	2.3	1263W94 maribavir	O	NH 	0.12
DNA maturation inhibition			MOA	DNA synthesis inhibition Capsid egress inhibition			

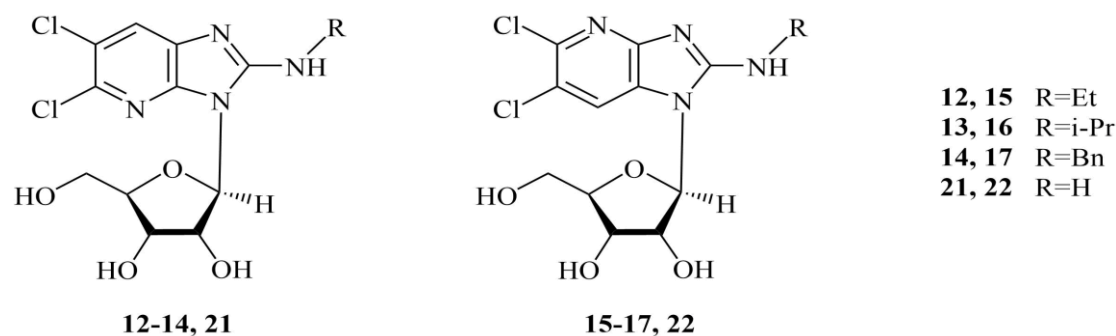
Πίνακας 1: Σύγκριση της δραστηριότητας και του μηχανισμού δράσης D- και L-ριβονουκλεοζιτικών παραγώγων και καρβοκυκλικών ισοστερών τους.

Η καλή *in vitro* δραστηριότητα και εκλεκτικότητα του παραγώγου 1263W94, που ονομάστηκε αργότερα Maribavir (πίνακας 1), σε συνδυασμό με το ευνοϊκό *in vivo* φαρμακοκινητικό, φαρμακολογικό και τοξικολογικό προφίλ του, οδήγησαν στην κλινική αξιολόγηση του ως υποψήφιου φαρμάκου έναντι του HCMV. Κατά τα πρώτα στάδια των

κλινικών μελετών επιβεβαιώθηκε ότι ασκεί αντι-HCMV δράση δίχως να αναβολίζεται σε τριφωσφορικό παράγωγο, μέσω της αναστολής της pUL97 κινάσης του ιού. Με αυτό τον τρόπο αναστέλλει τόσο τη σύνθεση του ιικού DNA, όσο και την μετάβαση των νεοσύστατων νουκλεοκασιδίων από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα¹¹³.

Αντικατάσταση του φαρμακοφόρου ετεροκυκλικού πυρήνα των 2-αμινοϋποκατεστημένων βενζιμιδαζολικών β-D-ριβονουκλεοζιτών, οδήγησε κατά το παρελθόν στην μελέτη νουκλεοζιτικών παραγώγων ιμιδαζο[4,5-*b*]κινολίνης και ιμιδαζο[4,5-*b*]κινοξαλίνης. Τα παράγωγα αυτά, στα οποία διατηρήθηκε το μοτίβο της διχλωροϋποκατάστασης και η εισαγωγή στη 2-θέση ισοπροπυλαμίνης ή κυκλοπροπυλαμίνης, εμφάνισαν μικρή ή καθόλου δράση έναντι του ιού, αλλά διατήρησαν το μη κυτταροτοξικό προφίλ των βενζιμιδαζολικών αναλόγων τους.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νουκλεοζιτικών παραγώγων της 1-δεαζαπυρίνης, με σκοπό την αξιολόγηση της ισοστερούς τροποποίησης του βενζιμιδαζολικού φαρμακοφόρου στη δράση έναντι του HCMV. Βασικό ζητούμενο ήταν η ανάπτυξη μιας συνθετικής μεθοδολογίας που θα παρέχει πρόσβαση στους 1- και 3-ισομερείς β-D-ριβονουκλεοζίτες της 5,6-διχλωρο-2-αμινοϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης, οι οποίοι θα φέρουν διάφορους 2-αμινοϋποκαταστάτες. Σε αυτό το πλαίσιο πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των παραγώγων **12-17**, **21** και **22** (εικόνα 13):

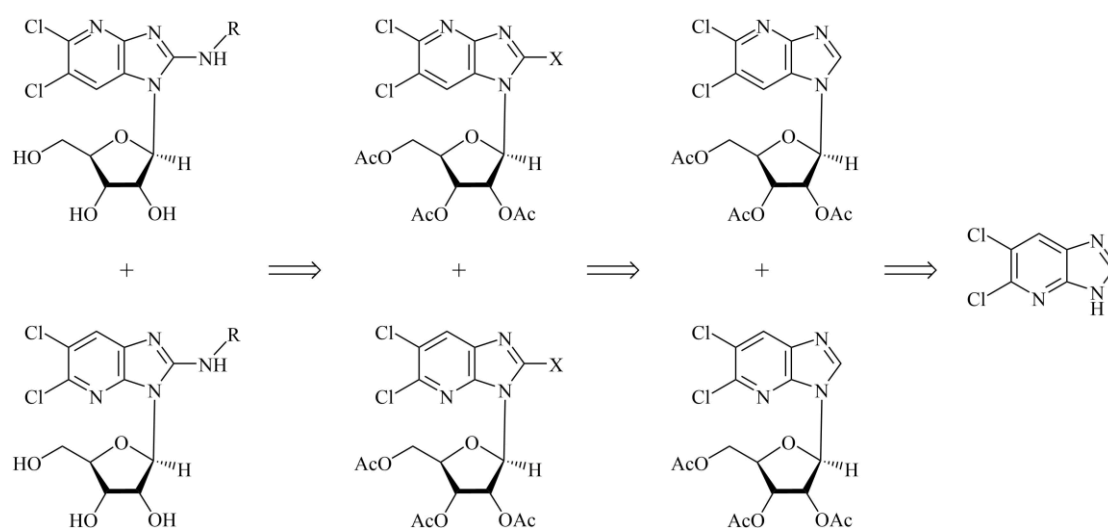


Εικόνα 13: Μόρια-στόχοι της παρούσας εργασίας

Έχοντας διατηρήσει σταθερό το μοτίβο της 5,6-διχλωροϋποκατάστασης των βενζιμιδαζολικών αναλόγων, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η παρουσία πρωτοταγούς αμινομάδας στην 2-θέση, καθώς και η επίδραση της παρουσίας μικρών αλειφατικών υποκαταστατών αιθυλαμίνης και ισοπροπυλαμίνης, αλλά και της ογκωδέστερης βενζυλαμινομάδας. Η επιλογή αυτής της ετερογένειας μεταξύ των αμινοϋποκαταστατών επιλέχθηκε, ώστε να καταστεί δυνατή η εξαγωγή σχέσεων δομής-δράσης, όπου θα συνυπολογίζεται η επίδραση της ισομέρειας θέσης, σε συνδυασμό με τη φύση της 2-υποκατάστασης επί του ετεροκυκλικού συστήματος.

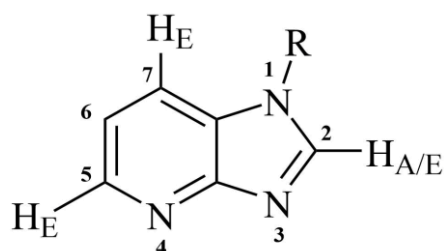
2. ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κατά το σχεδιασμό της συνθετικής πορείας διερευνήθηκε αρχικά η δυνατότητα σχηματισμού των μη υποκατεστημένων στη 2-θέση ισομερών N-1 και N-3 β-D-ριβονουκλεοζιτών της 5,6-διχλωροϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης, στους οποίους θα γινόταν στη συνέχεια η εισαγωγή του 2-αμινοϋποκαταστάτη. Προέκυψε έτσι η ρετροσυνθετική οδός που παρουσιάζεται στο σχήμα 1:



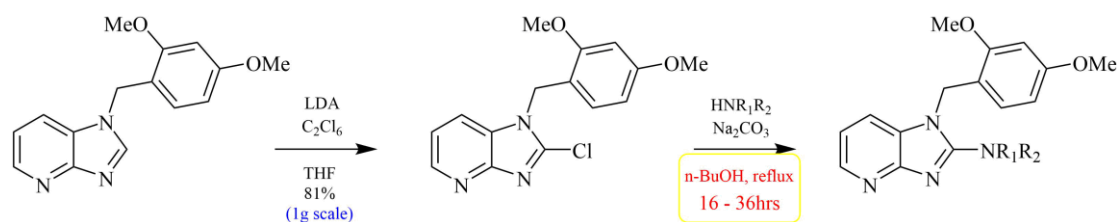
Σχήμα 1: Προτεινόμενη ρετροσυνθετική οδός μέσω της 5,6-διχλωροϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης

Ο πυρήνας της υποκατεστημένης ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης διαθέτει τρεις ηλεκτρονιόφιλες θέσεις (2,5,7) οι οποίες είναι δύσκολο να διαφοροποιηθούν μεταξύ τους (εικόνα 14). Η εκλεκτική αλογόνωση επί του C-2 μπορεί να πραγματοποιηθεί αν ληφθεί υπόψη η οξύτητα του αντίστοιχου μεθινικού πρωτονίου, παρουσία ισχυρών βάσεων (π.χ. LDA):



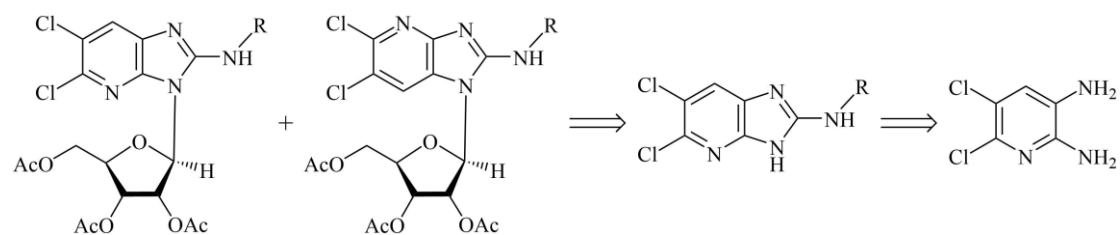
Εικόνα 14: Αρίθμηση ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης. Θέσεις επιδεικτικές σε ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση (H_E) και θέσεις που φέρουν όξινα H (H_A)

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, τα 2-χλωροπαράγωγα της 1-(2,4-διμεθοξυβενζυλο)ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης είναι πιο δραστικά από τα 2-ιωδοϊσομερή τους σε συνθήκες πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης από αμινικά παράγωγα¹¹⁴. Οι συνθήκες που αναφέρονται για τη 2-χλωρίωση και την επακόλουθη S_NAr υποκατάσταση από πρωτοταγείς και δευτεροταγείς (αλεικυκλικές και μη) αμίνες συνοψίζονται στο σχήμα 2¹¹⁵:



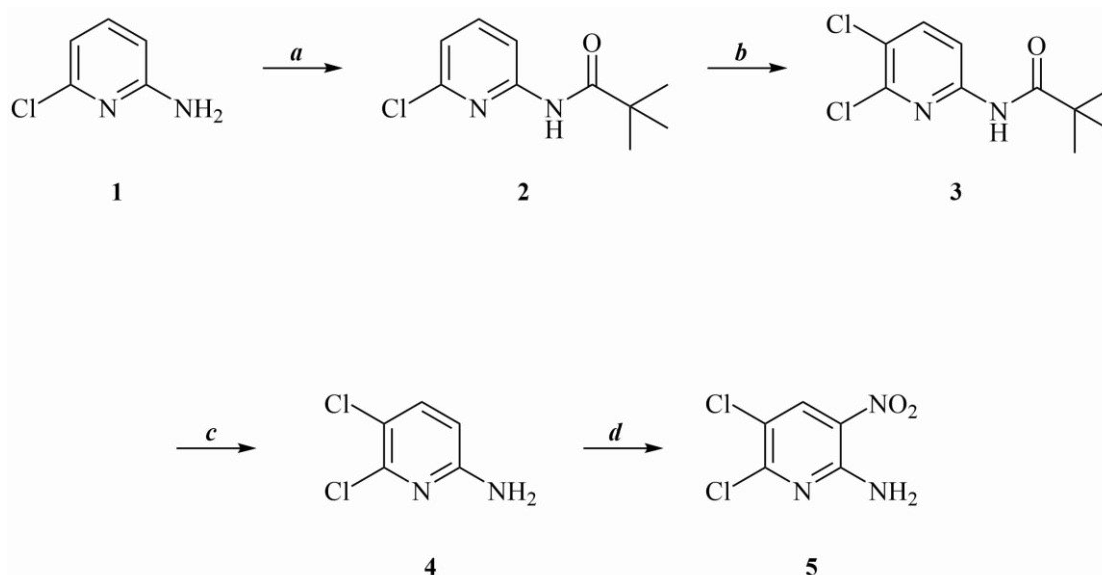
Σχήμα 2: Συνθήκες για τη διαδοχική χλωρίωση και S_NAr υποκατάσταση στη 2-θέση 1-υποκατεστημένων ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδινών

Στην περίπτωση ωστόσο των μορίων στόχων της παρούσας εργασίας, οι έντονες συνθήκες που φαίνεται ότι απαιτούνται για την πυρηνόφιλη αρωματική υποκατάσταση στη 2-θέση της ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης κρίθηκαν επίφοβες ως προς την πιθανή ευπάθεια του 5-χλωρίου. Επιλέχθηκε ως πιο ορθολογική προσέγγιση ο σχηματισμός των επιθυμητών νουκλεοζιτικών παραγώγων μέσω της γλυκοζυλίωσης των αντίστοιχων 2-αμινοϋποκατεστημένων 5,6-διχλωροϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδινών. Ως βασικό πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση τους αναγνωρίστηκε η 5,6-διχλωροπυριδιν-2,3-διαμίνη, όπως φαίνεται στο αντίστοιχο ρετροσυνθετικό σχήμα (σχήμα 3):



Σχήμα 3: Προτεινόμενη ρετροσυνθετική οδός μέσω της 5,6-διχλωροπυριδιν-2,3-διαμίνης

Για τη σύνθεση του χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη η 2-αμινο-6-χλωροπυριδίνη (**1**, σχήμα 4), από την οποία με επίδραση πιβαλοϋλοχλωριδίου, παρουσία τριαθυλαμίνης, παραλαμβάνεται το αντίστοιχο αμίδιο **2**. Από αυτό, υπό συνθήκες ηλεκτρονιόφιλης χλωρίωσης με τη χρήση N-χλωροσουκινιμιδίου σε άνυδρο DMF, παραλαμβάνεται regio-εκλεκτικά το επιθυμητό προϊόν αλογόνωσης στην 5-θέση του πυριδινικού δακτυλίου **3**, ως αποτέλεσμα στερεοχημικής παρεμπόδισης κατά την υποκαταστάση στην 3-θέση από το ογκώδες πιβαλικό αμίδιο. Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιείται υδρόλυση του αμιδίου, με την επίδραση πυκνού υδροχλωρίου σε διάλυμα του **3** σε μίγμα αιθανόλης:νερού (1:1), οπότε παραλαμβάνεται η 5,6-διχλωροπυριδιν-2-αμίνη (**4**), η οποία στη συνέχεια νιτρώνεται με επίδραση πυκνού νιτρικού οξέος σε διάλυμα της σε πυκνό θειικό οξύ προς το νιτροπαράγωγο **5** (σχήμα 4).

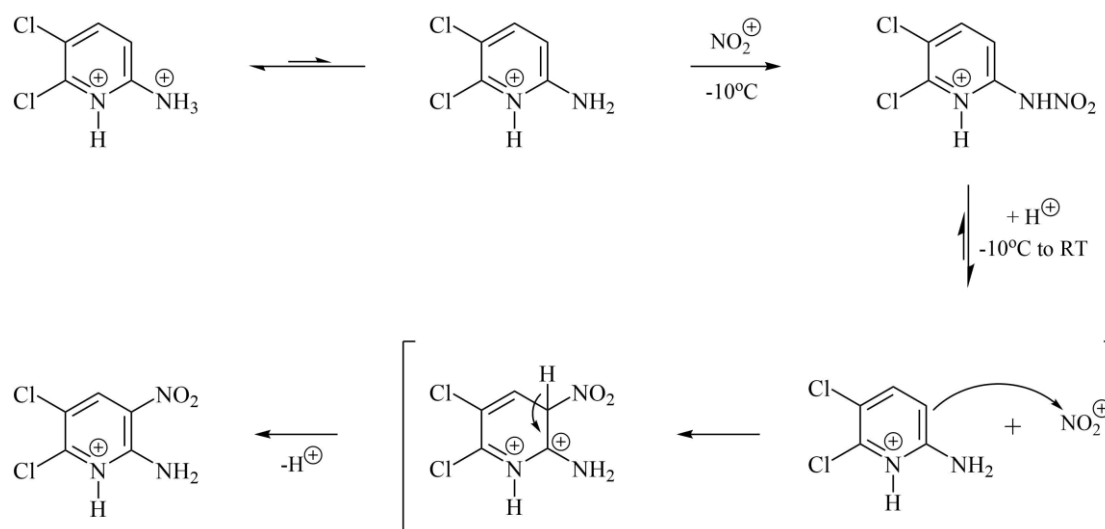


Σχήμα 4: a) *pivaloyl chloride*, Et_3N , DCM, RT, 22 hrs, b) *NCS*, DMF, 100°C, 18 hrs, c) *conc. HCl*, H_2O , EtOH, reflux, 2 hrs d) *conc. HNO_3*, *conc. H_2SO_4*, RT, 45 min

Η εν λόγω αντίδραση νίτρωσης δεν αποτελεί κλασσική περίπτωση ηλεκτρονιόφιλης αρωματικής υποκατάστασης¹¹⁶. Είναι γνωστό ότι σε παράγωγα ανιλίνης και αμινοπυριδινών, επί επίδρασης νιτρικού οξέος σε διάλυμα της αμίνης σε θειικό οξύ, σχηματίζονται σε πρώτο στάδιο ενδιάμεσα παράγωγα νιτραμίνης¹¹⁷. Στην αρωματική σειρά, τα παράγωγα νιτραμίνης δεν είναι σταθερά σε όξινες συνθήκες (ακόμη και σε αραιά διαλύματα ανόργανων οξέων) και παραγματοποιείται μετάθεση της νιτροομάδας, οδηγώντας τελικά στα αντίστοιχα *ortho*- ή/και *para*-νιτροανιλινικά παράγωγα¹¹⁸. Για την μετάθεση αυτή υπάρχουν ικανοποιητικά ευρήματα, που συνηγορούν υπέρ της ομολυτικής σχάσης του δεσμού N-N στην πρωτονιωμένη μορφή της νιτραμίνης, ως του καθοριστικού της ταχύτητας σταδίου της αντίδρασης. Το ζεύγος ριζών που προκύπτει μπορεί να αντιδράσει με τρόπο ώστε να προκύψουν ισομερή νιτροπαράγωγα,

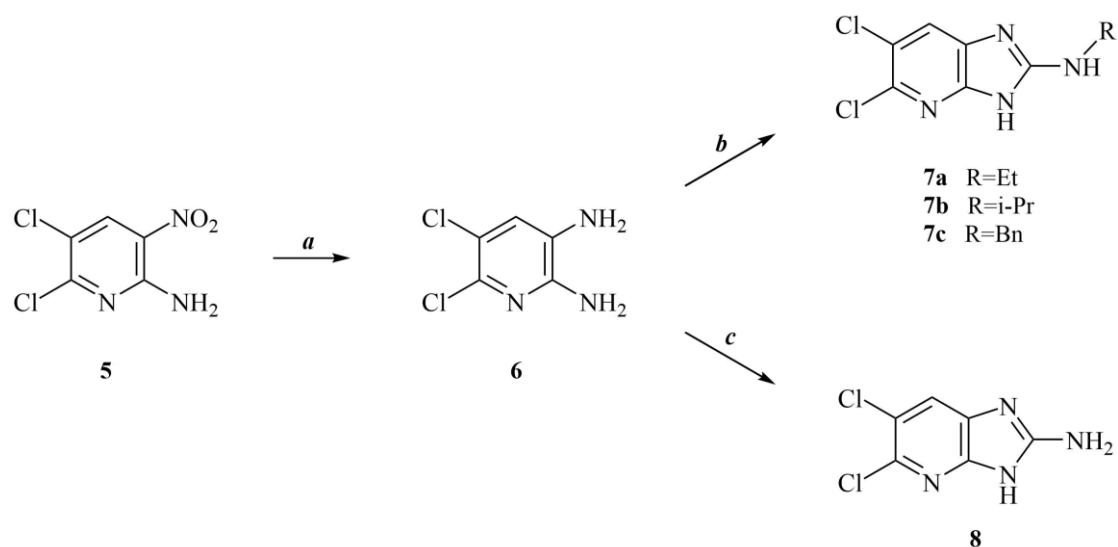
μέσω του σχηματισμού των θερμοδυναμικά σταθερότερων σ-συμπλόκων¹¹⁹. Στη περίπτωση των αμινοπυριδινών, τα παράγωγα νιτραμίνης είναι σταθερότερα στις κλασσικές συνθήκες νίτρωσης από τα ανιλινικά τους ομόλογα και σε αρκετές περιπτώσεις μάλιστα είναι απομονώσιμα¹²⁰. Και στην περίπτωση αυτή έχει μελετηθεί ο μηχανισμός αυτού του τύπου μεταθέσεων, ο οποίος εμφανίζει διαφορές σε σχέση με τον προηγούμενο. Έχει αναγνωριστεί ότι απαραίτητη προϋπόθεση για τη μετάθεση είναι ένα ισχυρά όξινο μέσο (σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα πυκνό θειικό οξύ), στο οποίο επέρχεται σχάση του δεσμού NH-NO₂¹²¹. Αυτή λαμβάνει χώρα πιθανότατα ετερολυτικά και απαιτεί σε αρκετές περιπτώσεις άνοδο της θερμοκρασίας ώστε να ολοκληρωθεί το στάδιο της υποκατάστασης (σχήμα 5)¹²²:

Κατόπιν τούτων, ο σχηματισμός της νιτραμίνης της 5,6-διχλωροπυριδιν-2-αμίνης (**4**), πραγματοποιείται σχεδόν ποσοτικά, με την προσθήκη πυκνού νιτρικού οξέος στους -10°C. Για να ολοκληρωθεί όμως η μετάθεση είναι απαραίτητη η άνοδος της θερμοκρασίας, οπότε καθώς η θερμοκρασία του μίγματος ανέρχεται στους 20°C, η μετάθεση προς το επιθυμητό νιτροπαράγωγο **5** ολοκληρώνεται εντός 45 λεπτών.



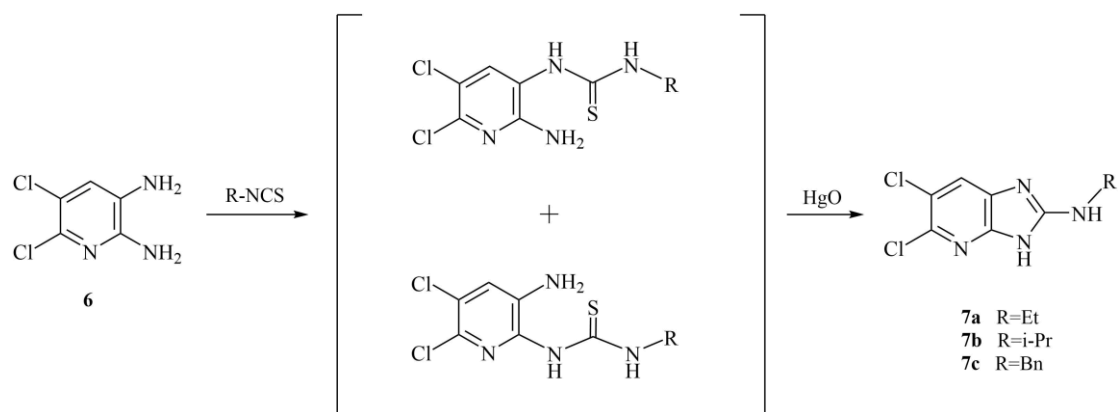
Σχήμα 5: Σχηματισμός νιτραμίνης και μετάθεση προς νιτροπαράγωγο

Το νιτροπαράγωγο **5** ανάγεται στη συνέχεια προς τη διαμινοπυριδίνη **6** με την επίδραση χλωριούχου κασσιτέρου εντός πυκνού υδροχλωρίου. Το παράγωγο **6** αποτελεί σημαντικό ενδιάμεσο για τη σύνθεση των παραγώγων **7a-7c** και **8**, όπως φαίνεται στο σχήμα 6:



Σχήμα 6: a) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, conc. HCl , 60°C , 40 min, b) i) *N*-alkylisothiocyanate, dry THF, reflux, 36 hrs, ii) HgO , dry THF, reflux, 40 min, c) BrCN , MeOH , H_2O , 24 hrs

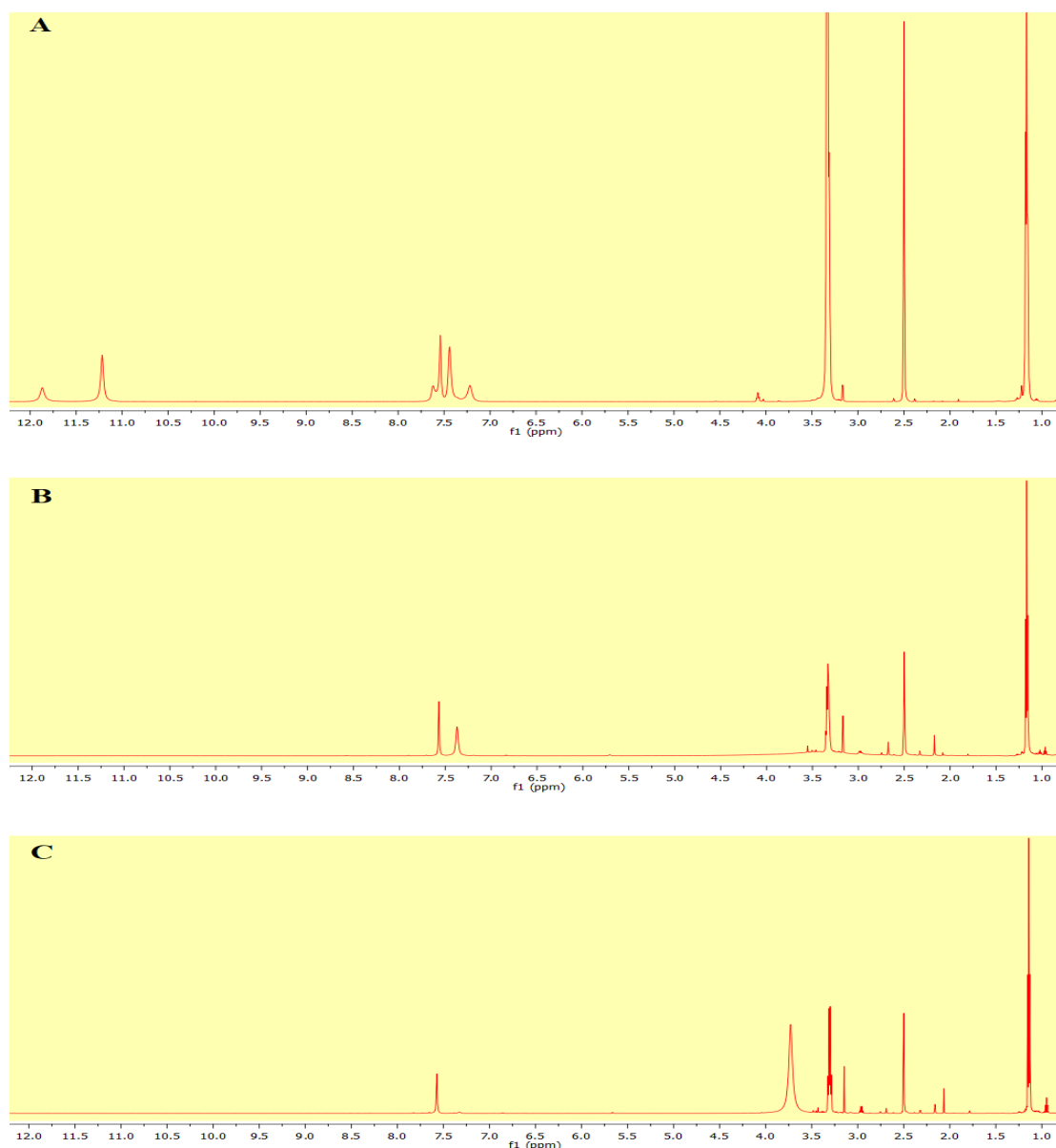
Η προσέγγιση που εφαρμόστηκε για το σχηματισμό των 2-αμινοϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδινών **7a-7c** περιλαμβάνει σε πρώτο στάδιο το σχηματισμό των κατάλληλα υποκατεστημένων *N*'-αλκυλο,*N*-[2(3)-αμινο-5,6-διχλωροπυριδιν-3(2)-υλ]θειουριών, με επίδραση των αντίστοιχων ισοθειοκυανικών εστέρων επί της διαμινοπυριδίνης **6** (σχήμα 7). Είναι γνωστό ότι παράγωγα θειουρίας που προκύπτουν με ανάλογο τρόπο στη σειρά των *ortho*-φαινυλενοδιαμιμών μπορούν υπό κατάλληλες συνθήκες, μέσω κύκλωσης και αποθείωσης, να μετατραπούν στα αντίστοιχα υποκατεστημένα 2-αμινοβενζιμιδαζόλια¹²³. Συνθήκες που καταλύουν τη συγκεκριμένη μετατροπή είναι η επίδραση CH_3I σε ζέουσα αιθανόλη,¹²⁴ καθώς και η επίδραση ανόργανων παραγόντων όπως το HgO ,¹²⁵ ή ο CuCl ¹²⁶, που μπορούν να δράσουν μέσω σύμπλεξης του θείου, ευνοώντας την πυρηνόφιλη προσβολή του θειοκαρβονυλίου από την *ortho*-αμινομάδα του αρωματικού συστήματος. Για την αποφυγή πολύπλοκου μίγματος προϊόντων, που θα μπορούσαν να προκύψουν από την επίδραση CH_3I στα παράγωγα θειουρίας, (π.χ. τεταρτοποίηση πυριδινικού αζώτου, υποκατάσταση πρωτοταγούς αμινομάδας) προτιμήθηκε η χρησιμοποίηση του συμπλεκτικού παράγοντα. Ελλείπει ασυμβασίας μεταξύ του σταδίου σχηματισμού των ενδιάμεσων θειουριών και της κύκλωσης και αποθείωσης τους, οι επιθυμητοί ετερόκυκλοι **7a-7c** λαμβάνονται τελικώς με μία one-pot διαδικασία δύο σταδίων, όπως φαίνεται στο σχήμα 7:



Σχήμα 7: Σχηματισμός των παραγώγων 2-αλκυλαμινοϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης μέσω κύκλωσης και αποθείωσης ενδιάμεσων παραγώγων θειουρίας

Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται ο σχηματισμός των ενδιάμεσων ισομερών θειουριών και η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται εύκολα με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Όταν επιβεβαιώνεται η εξάντληση της πρώτης ύλης, η ποσότητα του ερυθρού HgO απαιρείται στο μίγμα της αντίδρασης και με κατάλληλη κατεργασία λαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα **7a-7c** σε καλές αποδόσεις (~50-55%).

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε αραιό δείγμα της N-αιθυλο-5,6-διχλωροϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνης (**7a**) σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο είναι χαρακτηριστική η παρουσία δύο ταυτομερών μορφών (εικόνα 15, A). Στην αρωματική περιοχή του φάσματος υπάρχουν δύο σειρές κορυφών για το αρωματικό 7-H και τη δευτεροταγή αμινομάδα των δύο ταυτομερών στα 7.10-7.70 ppm. Ενδεικτικές είναι επίσης οι χημικές μετατοπίσεις των ιμιδαζολικών NH, με το πρωτόνιο του επικρατούς ταυτομερούς να εμφανίζεται σε υψηλότερες τιμές πεδίου (11.21 ppm έναντι 11.87 ppm του άλλου ταυτομερούς). Σε δείγμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης (εικόνα 15, B) δεν παρατηρείται ανάλογη εικόνα, προφανώς λόγω της ταχείας αλληλομετατροπής των δύο ταυτομερών. Ενδεικτικό της ταχύτητας με την οποία πραγματοποιείται η μετατροπή αυτή, είναι η απουσία από το φάσμα της κορυφής του ιμιδαζολικού πρωτονίου. Με την προσθήκη δευτεριωμένου νερού στο παραπάνω δείγμα (εικόνα 15, C) φαίνεται ευκρινώς η τετραπλή κορυφή των μεθυλενικών πρωτονίων στα 3.30 ppm.

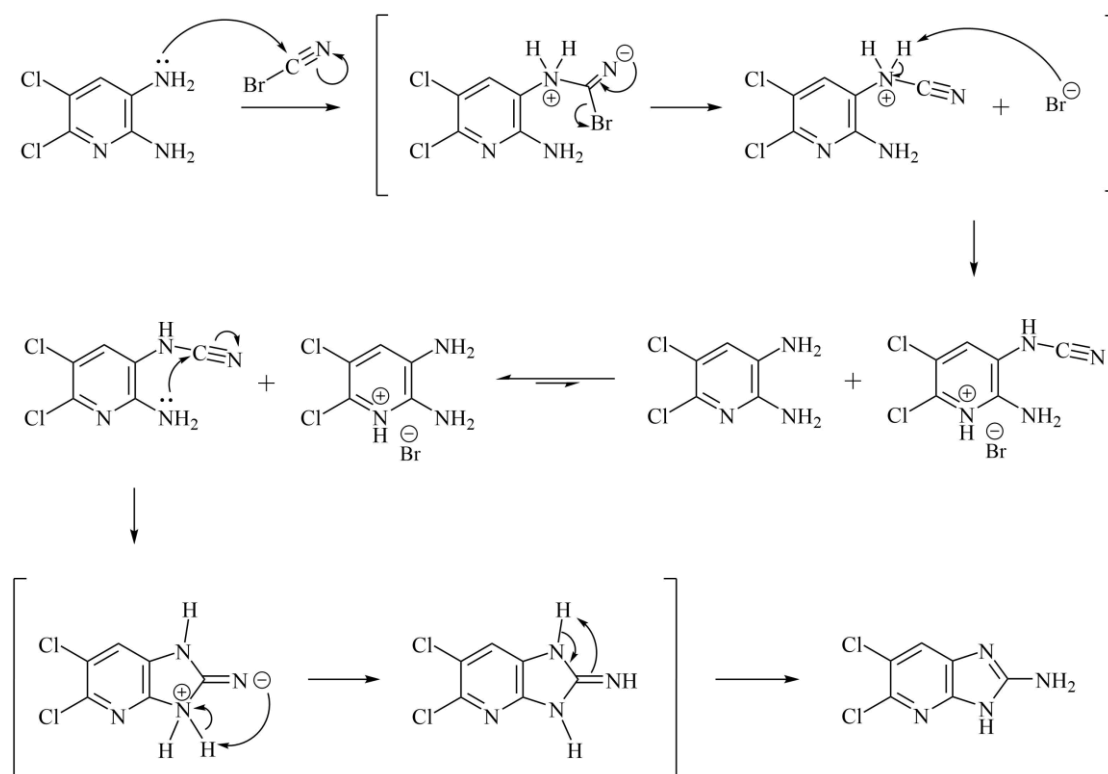


Εικόνα 15: Φάσματα ¹H-NMR του παραγώγου **7a** σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d₆). **A:** αραιό δείγμα όπου φαίνονται οι δύο ταυτομερείς μορφές. **B:** πυκνό δείγμα του **7a** όπου δεν παρατηρείται πλέον η ταυτομέρεια. **C:** φάσμα μετά από προσθήκη δευτεριωμένου νερού (D₂O) στο δείγμα **B**

Η αντίδραση κύκλωσης παραγώγων *ortho*-φαινυλενοδιαμινών με βρωμιούχο κυανογόνο αποτελεί γνωστή μέθοδο¹²³ για τη σύνθεση 2-αμινοβενζιμιδαζολίων¹²⁷⁻¹²⁹. Για την περίπτωση των 2-αμινοϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδινών, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία για το σχηματισμό N-1 και N-3 υποκατεστημένων παραγώγων^{130,131} με πρώτη ύλη την αντίστοιχη N-υποκατεστημένη πυριδο-2,3-διαμίνη, καθώς και μη υποκατεστημένων αναλόγων μορίων¹³². Ωστόσο, τα επιθυμητά παράγωγα παραλαμβάνονται σε χαμηλές έως μέτριες αποδόσεις (10-55%), γεγονός που πιθανώς αποδίδεται στα συστήματα διαλυτών που

χρησιμοποιούνται στην αντίδραση (νερό, μεθανόλη, αιθανόλη, ακετονιτρίλιο:νερό). Από τη μελέτη των συνθηκών παρατηρήθηκε ότι η βέλτιστη απόδοση επιτεύχθηκε με τη χρήση μίγματος ακετονιτρίλιου:νερού σε αναλογία 4:1¹³³. Αποφασίσαμε λοιπόν να χρησιμοποιήσουμε μίγμα μεθανόλης:νερού, ώστε να αξιολογήσουμε την επίδραση ενός πολικού πρωτικού διαλύτη στο αποτέλεσμα. Έτσι, με την επίδραση βρωμιούχου κυανογόνου σε εναιώρημα της διαμίνης **6** σε μίγμα μεθανόλης-νερού 1:1 παραλάβαμε την 5,6-διχλωροϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνη (**8**) σε καλή απόδοση (~80%). Κατά τον έλεγχο της προόδου της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας παρατηρήθηκε, 2 ώρες περίπου μετά από την προσθήκη του βρωμιούχου κυανογόνου, ο σχηματισμός ενδιάμεσου προϊόντος πολικότερου από την πρώτη ύλη, αλλά λιγότερο πολικού από το προϊόν. Το ενδιάμεσο αυτό δεν ανιχνεύεται στο μίγμα της αντίδρασης μετά από 24 ώρες, ενώ παρατηρείται πλήρης μετατροπή της πρώτης ύλης στην επιθυμητή ιμιδαζοπυριδίνη.

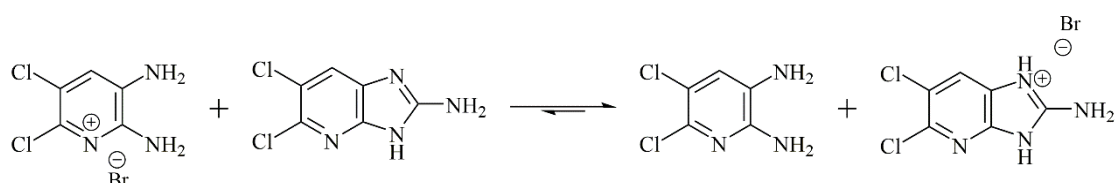
Ένας προτεινόμενος μηχανισμός για την αντίδραση φαίνεται στο σχήμα 8:



Σχήμα 8: Προτεινόμενος μηχανισμός για το σχηματισμό της 2-αμινοϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης (**1**)

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιείται πυρηνόφιλη προσβολή από την 3-αμινομάδα της πυριδίνης στον ισχυρά ηλεκτροθετικό άνθρακα του βρωμιούχου κυανογόνου, που οδηγεί στο

σχηματισμό του ενδιάμεσου κυαναμιδίου, με ταυτόχρονη απελευθέρωση ισοδύναμης ποσότητας υδροβρωμίου. Ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσβολή στο στάδιο αυτό από τη 2-αμινομάδα στον άνθρακα του κυαναμιδίου οδηγεί στο μη αρωματικό ιμινικό ενδιάμεσο ιμιδαζολίνης, το οποίο εύκολα αρωματοποιείται προς τον ετερόκυκλο **8**. Το σχηματιζόμενο αμινοϊμιδαζολικό παράγωγο είναι σαφώς ισχυρότερη βάση από τις αμινοπυριδίνες που μετέχουν στην αντίδραση και κατ' επέκταση δεσμεύει τη συνολική ποσότητα του παραγόμενου υδροβρωμίου, απελευθερώνοντας τις αντίστοιχες ελεύθερες βάσεις τους (αυτό αφορά κατά κύριο λόγο τη διαμινοπυριδίνη **6**). Με αυτό τον τρόπο η παραπάνω ισορροπία μετατοπίζεται πρακτικά εξ' ολοκλήρου προς το επιθυμητό προϊόν (σχήμα 9).



Σχήμα 9: Προτεινόμενος μηχανισμός για το σχηματισμό της 2-αμινοϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης (2)

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αρχικά για τη σύνθεση νουκλεοζιτών είναι η σύζευξη αλάτων βαρέων μετάλλων (Ag^+ , Pb^+ , Hg^+) των ετεροκυκλικών βάσεων με παράγωγα 1-αλογονοσακχάρων¹³⁴, η οποία αναπτύχθηκε από τους E. Fischer και B. Helferich (1914) για νουκλεοζίτες πουρίνης. Η σύζευξη των μεθ' υδραργύρου αλάτων διαφόρων πουρινικών παραγώγων, μεταξύ άλλων της αδενοσίνης και της γουανοσίνης, με αλογονοσάκχαρα παρουσία διαλύτη,¹³⁵ αποδείχθηκε αποτελεσματικότερη από τη χρησιμοποίηση των αλάτων αργύρου ή μολύβδου υπό της ίδιες συνθήκες, ή υπό συνθήκες σύντηξης^{136,137}. Παρότι η μέθοδος αυτή συχνά οδηγεί σε νουκλεοζιτικά προϊόντα υψηλότερης ανωμερικής καθαρότητας από ότι η μέθοδος Hilbert-Johnson¹³⁸, βασικοί περιορισμοί της είναι ο μη ποσοτικός σχηματισμός και η μικρή διαλυτότητα του άλατος της πρώτης ύλης και οι λαμβανόμενες μέτριες αποδόσεις¹³⁹. Επιπρόσθετα, η αντίχρεση ιόντων Hg^{2+} στα τελικά νουκλεοζιτικά προϊόντα αποτελεί σοβαρό παράγοντα σφάλματος κατά τη φαρμακολογική αξιολόγηση των παραγώγων¹⁴⁰, με αποτέλεσμα η μέθοδος να μην εφαρμόζεται πλέον.

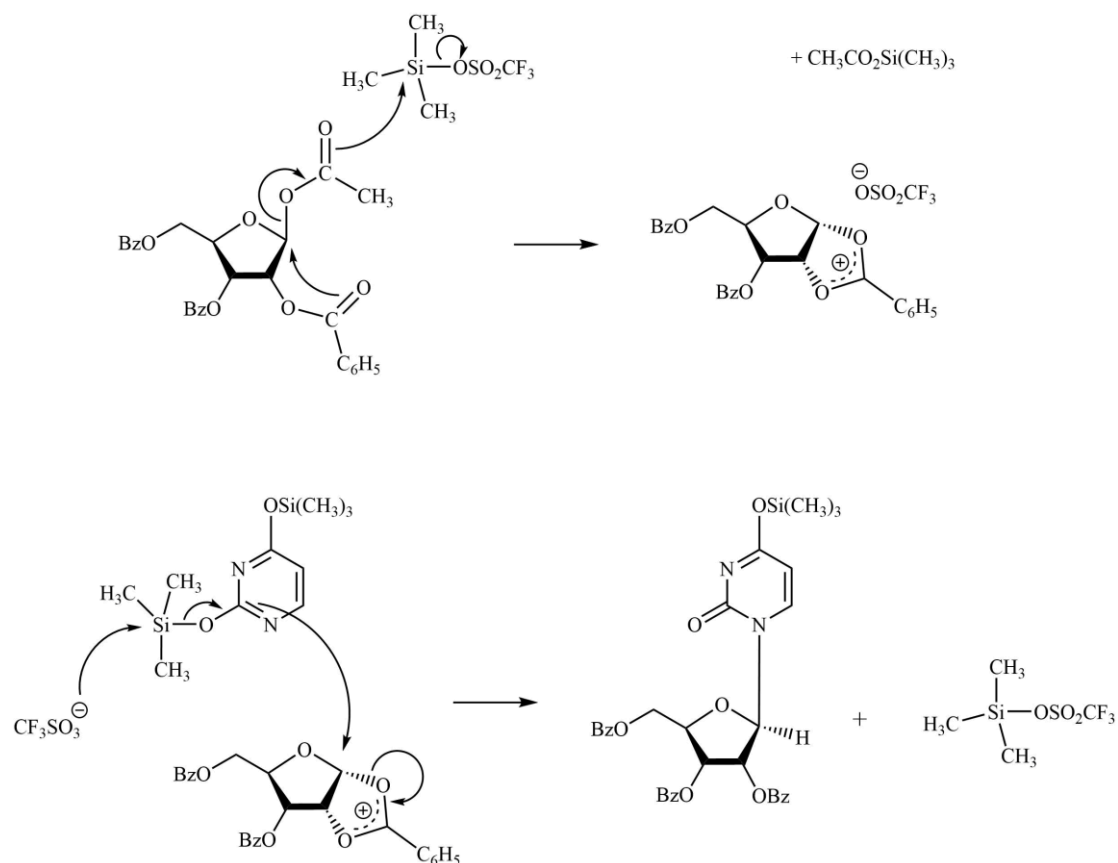
Άλλη μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση N-νουκλεοζιτών από ετεροκυκλικά ανάλογα πουρινών, όπως π.χ. παράγωγα πυρρολο[2,3-*d*]πυριμιδίνης, είναι γλυκοζυλίωση μέσω του σχηματισμού ανιόντος επί του πυρρολικού αζώτου με νατριοϋδρίδιο¹⁴¹. Το μετά νατρίου ανιόν προσβάλλει τον ανωμερικό άνθρακα μίας κατάλληλα προστατευμένης 1-αλογονο-*a*-D-ριβοφουρανόζης, οδηγώντας μέσω αναστροφής κατά

Walden στους επιθυμητούς β -D-ριβονουκλεοζίτες. Η παρουσία, ωστόσο του ιμιδαζολικού πρωτονίου και ευκίνητων υδρογόνων επί των 2-αμινοϋποκαταστατών των ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδινών **7a-7c**, καθιστά ακατάλληλη την εφαρμογή αυτής της μεθόδου.

Για το σχηματισμό των επιθυμητών ισομερών β -D-ριβονουκλεοζιτικών παραγώγων από τις αμινοϊμιδαζοπυριδίνες **7a-7c** εφαρμόστηκε μία τροποποιημένη μέθοδος της γλυκοζυλίωσης κατά Vorbrüggen. Η μέθοδος Vorbrüggen αποτελεί μία παραλλαγή της κλασσικής αντίδρασης Hilbert-Johnson, η οποία είναι αντίδραση σύντηξης μίας 2,4-διαλκοξυπυριμιδίνης με παράγωγα 1-αλογονοσακχάρων¹⁴². Μεταγενέστερες εφαρμογές της αντίδρασης αυτής περιλαμβάνουν ενδεικτικά τη χρήση διαλύτη για τη διεξαγωγή της αντίδρασης¹⁴³ ή την αντικατάσταση της αλκοξυ-υποκατάστασης επί του πυριμιδινικού πυρήνα από την τριμεθυλοσιλυλομάδα (silyl Hilbert-Johnson)¹⁴⁴.

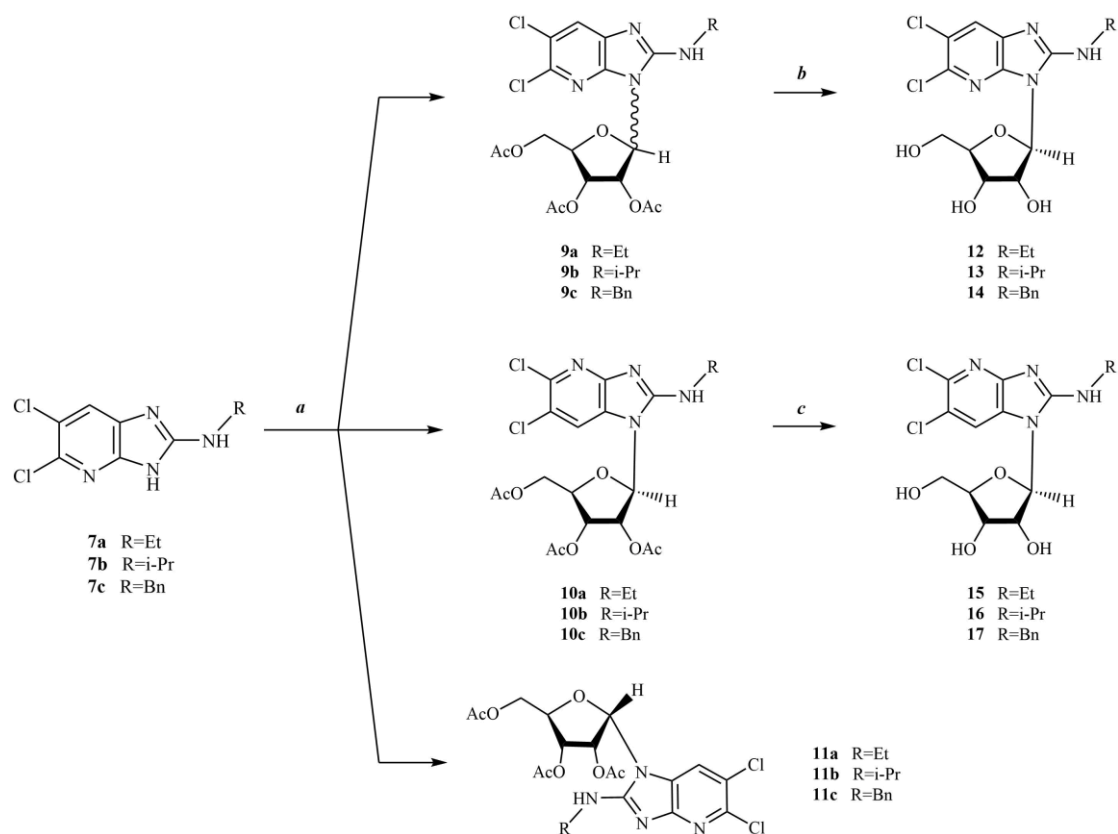
Η γλυκοζυλίωση Vorbrüggen είναι αντίδραση σύζευξης μεταξύ μίας υπερσυλιωμένης ετεροκυκλικής βάσης (ανάλογο πουρίνης ή πυριμιδίνης) και της 1-O-ακετυλο-2,3,5-τρι-O-βενζοϋλο- β -D-ριβοφουρανόζης (ή του υπερακετυλιωμένου ομολόγου) παρουσία ενός οξέος κατά Lewis, όπως ο SnCl_4 και το TMSOTf ^{145,146}. Εκτεταμένες μελέτες στη σειρά των παραγώγων πυριμιδίνης έδειξαν ότι η παραπάνω αντίδραση οδηγεί στις περισσότερες περιπτώσεις στον εκλεκτικό σχηματισμό των β -D-νουκλεοζιτικών παραγώγων. Τα αποτελέσματα αυτά ερμηνεύονται από το γεγονός ότι παρουσία των οξέων κατά Lewis πραγματοποιείται ο σχηματισμός κατιόντων 1,2-ακυλοξωνίου, μέσω της συμμετοχής της 2-α-βενζοϋλοξυ-ομάδας. Απαραίτητη δηλαδή προϋπόθεση για την εξέλιξη της αντίδρασης εκλεκτικά προς τα β -ανωμερή, είναι η *trans* διευθέτηση των 1,2-υποκαταστατών της ριβοφουρανόζης, προς σχηματισμό των ενδιάμεσων κατιόντων, τα οποία μπορούν πλέον να προσβληθούν από τη σιλυλιωμένη βάση από τη β -επιφάνεια του σακχάρου. Ένα σημαντικό σημείο του μηχανισμού είναι η επιλογή του οξέος κατά Lewis. Έχει διαπιστωθεί ότι η χρησιμοποίηση των λιγότερο ισχυρών οξέων κατά Lewis π.χ. σουλφονικών εστέρων σε σχέση με τα ανόργανα οξέα, όπως ο SnCl_4 μετατοπίζει την ισορροπία σ -συμπλόκου και ελεύθερης βάσης προς όφελος της δεύτερης, που είναι και η δραστική μορφή στο μίγμα της αντίδρασης.

Απεικονίζεται ενδεικτικά στο σχήμα 10 ο προτεινόμενος μηχανισμός, για την αντίδραση της 2,4-δισ-O-(τριμεθυλοσιλυλοξυ)ουριδίνης με την 1-O-ακετυλο-2,3,5-τρι-O-βενζοϋλο- β -D-ριβοφουρανόζη, παρουσία οξέος κατά Lewis:



Σχήμα 10: Μηχανισμός γλυκοζυλίωσης κατά Vorbügggen

Η τροποποίηση της μεθόδου που εφαρμόστηκε στην περίπτωση αυτή βασίζεται στο σχηματισμό του σιλυλιωμένου ετεροκυκλικού παραγώγου σε πρώτο στάδιο, με την επίδραση BSA. Τα σιλυλοπαραγώγα αυτού του τύπου είναι γνωστό ότι είναι ιδιαίτερα ευπαθή, οπότε προτιμάται ο *in situ* σχηματισμός τους, πριν από την προσθήκη στο μίγμα της αντίδρασης της 1,2,3,5-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανόζης και του οξέος κατά Lewis (TMSOTf). Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν από τις ιμιδαζοπυριδίνες **7a-7c** οι αντίστοιχοι νουκλεοζίτες **9a-9c**, **10a-10c** και **11a-11c**, όπως φαίνεται στο σχήμα 11:



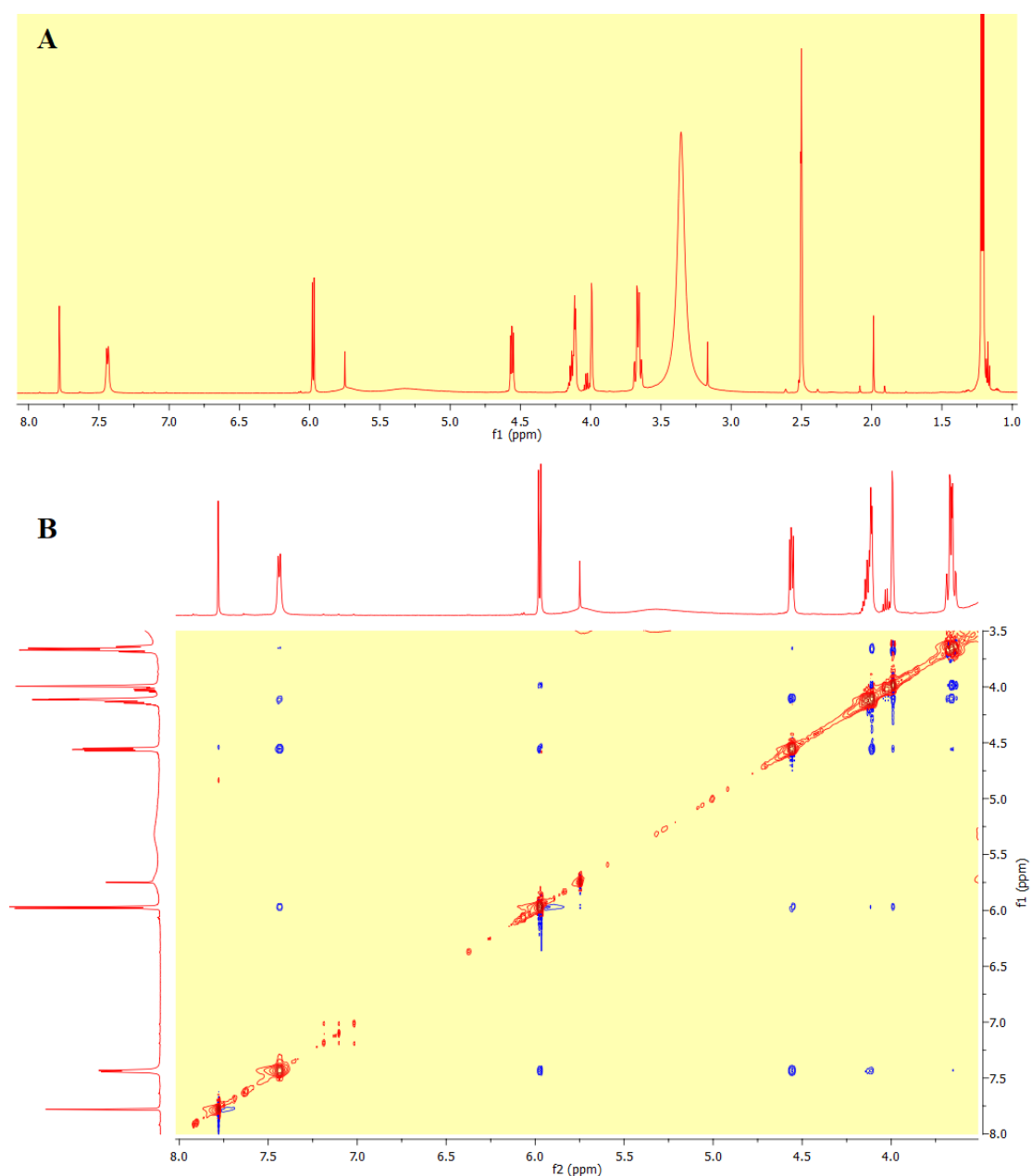
Σχημα 11: a) i) BSA, ACN, reflux 2hrs, then ii) TAR, TMSOTf, reflux, 3hrs, b) NH₃, MeOH, rt, 24 hrs. β-anomers 12-14 were the only isolated products upon recrystallization, c) NH₃, MeOH, rt, 24 hrs

Στην περίπτωση των 2-αλκυλαμινοϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδινών απομονώνονται από το μίγμα της αντίδρασης τόσο οι N-3 όσο και οι N-1 ισομερείς νουκλεοζίτες. Τα N-3 ισομερή παράγωγα απομονώνονται ως ανωμερικά μίγματα β:α (9a-9c), με το α-ανωμερές σε μικρή αναλογία. Με βάση τη συγκριτική ολοκλήρωση των ανωμερικών πρωτονίων στα φάσματα ¹H-NMR η αναλογία β:α είναι ~12:1 για τα 9a και 9c και ~24:1 για το 9b, επομένως τα επιθυμητά β-ανωμερή αποτελούν τα κύρια προϊόντα των αντιδράσεων. Όμως, ο διαχωρισμός των ανωμερικών μιγμάτων με χρωματογραφία στήλης δεν ήταν εφικτός, καθώς τα δύο ανωμερή εμφανίζουν ανάλογη πολικότητα σε όλα τα συστήματα διαλυτών που δοκιμάστηκαν. Επιπλέον, δεν ήταν επιτυχής η απόπειρα διαχωρισμού των επιθυμητών 3-β-D-παραγώγων με ανακρυστάλλωση.

Έτσι, τα μίγματα 9a-9c υποβλήθηκαν σε αντίδραση απακετυλίωσης με μεθανολικό διάλυμα αμμωνίας. Τα απακετυλιωμένα ανωμερικά παράγωγα της 3-θέσης εξακολουθούν να εμφανίζουν ανάλογη χρωματογραφική συμπεριφορά, όμως τα προϊόντα 12 και 13 παρελήφθησαν τελικά καθαρά με ανακρυστάλλωση, χωρίς α-ανωμερικές προσμίξεις. Στην περίπτωση του 2-βενζυλαμινο-νουκλεοζίτη 14, ο διαχωρισμός αυτός δεν ήταν εφικτός. Μετά από διαδοχικούς χρωματογραφικούς καθαρισμούς και κρυστάλλωση από τολουόλιο, παρελήφθη ποσότητα προϊόντος εμπλουτισμένη σε β-ανωμερές (αναλογία β:α, 17:1), ενώ η

λήψη του καθαρού προϊόντος **14** για αναλυτικούς σκοπούς έγινε με τη χρήση ημιπαρασκευαστικής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (semi-prep HPLC), με τη χρησιμοποίηση στήλης αντιστρόφου φάσεως C-18.

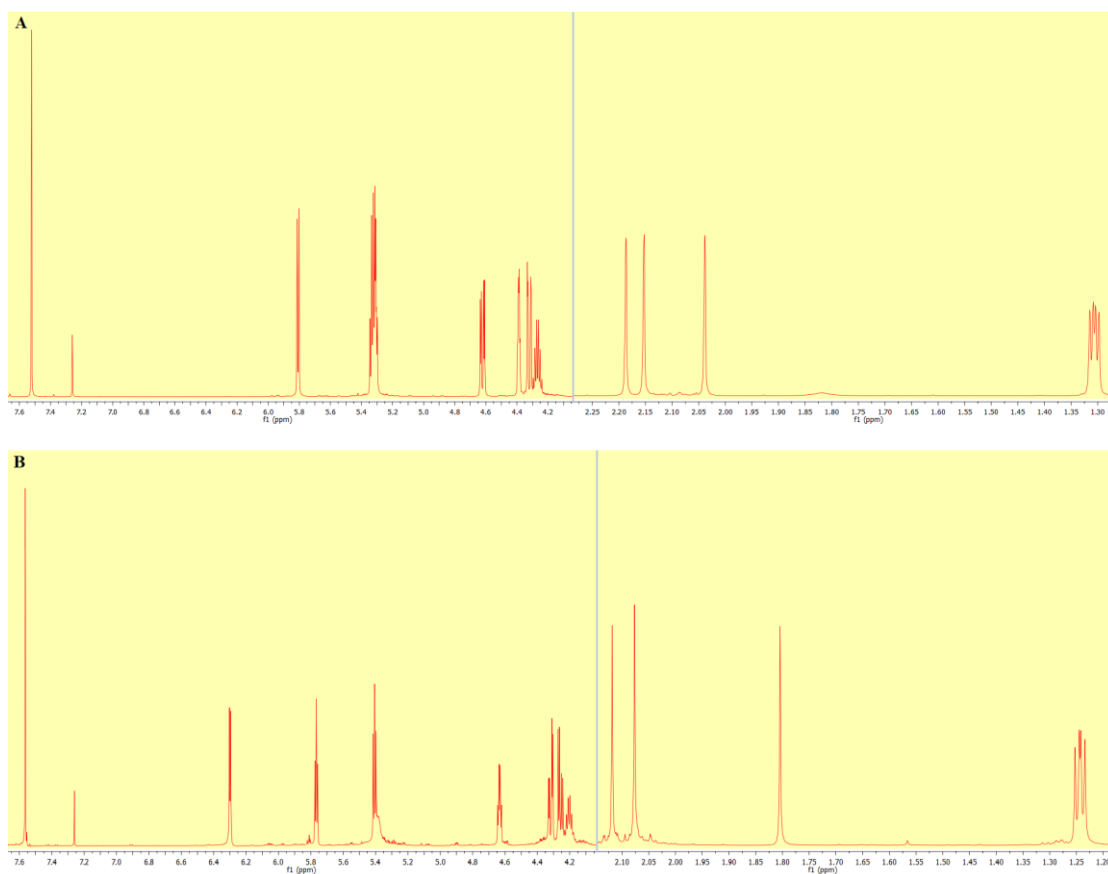
Η απόδοση της ανωμερικής διαμόρφωσης των παραγώγων πραγματοποιήθηκε με λήψη φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ και ομοπυρηνικών φασμάτων δύο διαστάσεων $^1\text{H-NOESY}$. Η απόδοση της ισομέρειας θέσης έγινε σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των φασματικών δεδομένων των υπόλοιπων προϊόντων της αντίδρασης γλυκοζυλίωσης, όπως περιγράφεται στη συνέχεια. Στην εικόνα 16 παρατίθενται ενδεικτικά τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και $^1\text{H-NOESY}$ του 2-ισοπροπυλαμινο-νουκλεοζίτη **13**:



Εικόνα 16: Φάσματα A) $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) και B) $^1\text{H-NOESY}$ (600 MHz) του **13** σε $\text{DMSO-}d_6$

Το πρωτόνιο της αμινομάδας συντονίζεται στα 7.46 ppm και εμφανίζεται ως διπλή κορυφή ($J = 7.5$ Hz), ως αποτέλεσμα της J_3 σύζευξης με το μεθινικό πρωτόνιο του ισοπροπυλίου. Στο φάσμα NOESY του νουκλεοζίτη είναι χαρακτηριστική η παρουσία κορυφής συσχέτισης μεταξύ των 1'-H (5.97 ppm) και 4'-H (3.99 ppm) του δακτυλίου της ριβοφουρανόζης, γεγονός που υποδηλώνει τη β -ανωμερική διαμόρφωση του προϊόντος. Χαρακτηριστική είναι επίσης η απουσία κορυφών συσχέτισης μεταξύ του αρωματικού πρωτονίου (7.78 ppm) και των πρωτονίων του σακχάρου.

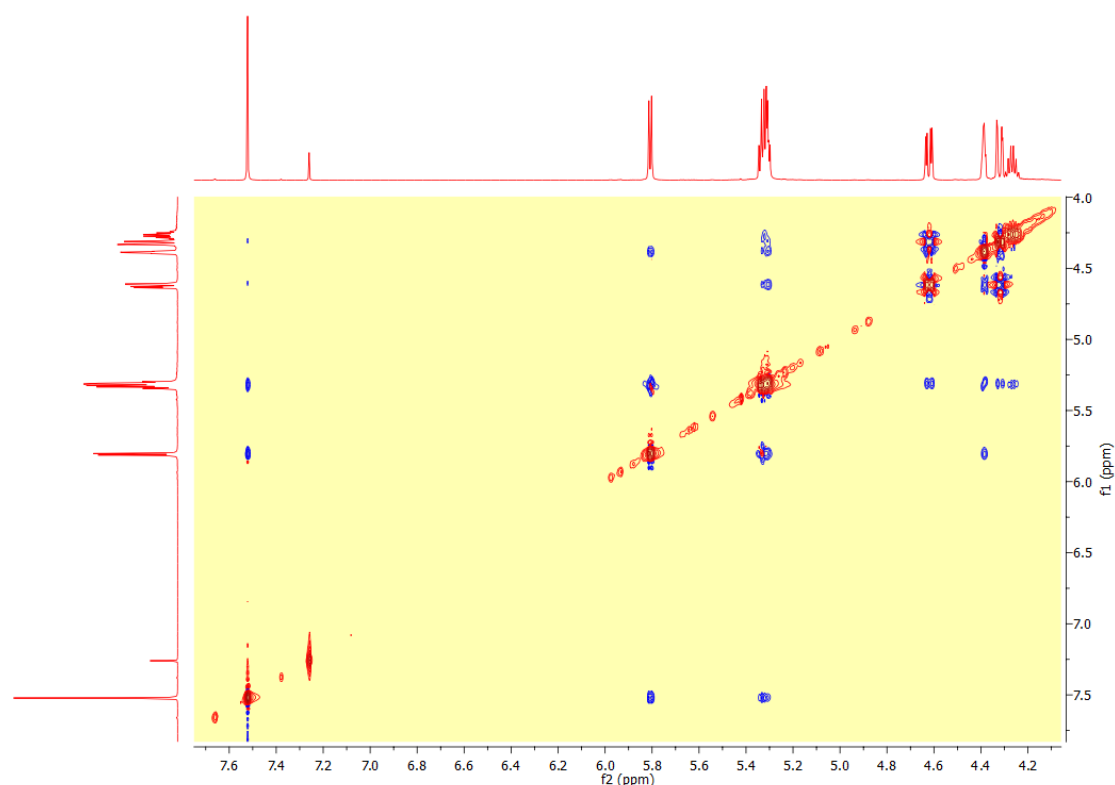
Ο διαχωρισμός των ανωμερικών προϊόντων της 1-θέσης πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης, στο στάδιο των υπερακετυλιωμένων παραγώγων. Η ισομέρεια θέσης και η ανωμερική διαμόρφωση των παραγώγων **10a-10c** και **11a-11c** πραγματοποιήθηκε με τη λήψη φασμάτων NMR. Παρατίθενται τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των ισοπροπυλο-παραγώγων **10b** (εικόνα 17, A) και **11b** (εικόνα 17, B):



Εικόνα 17: Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) των **10b** (A) και **11b** (B) σε CDCl_3 . Οι εντάσεις των σημάτων στα 2 φασματικά εύρη που απεικονίζονται για κάθε μόριο δεν αντιπροσωπεύουν την πραγματική τους αναλογία στο φάσμα.

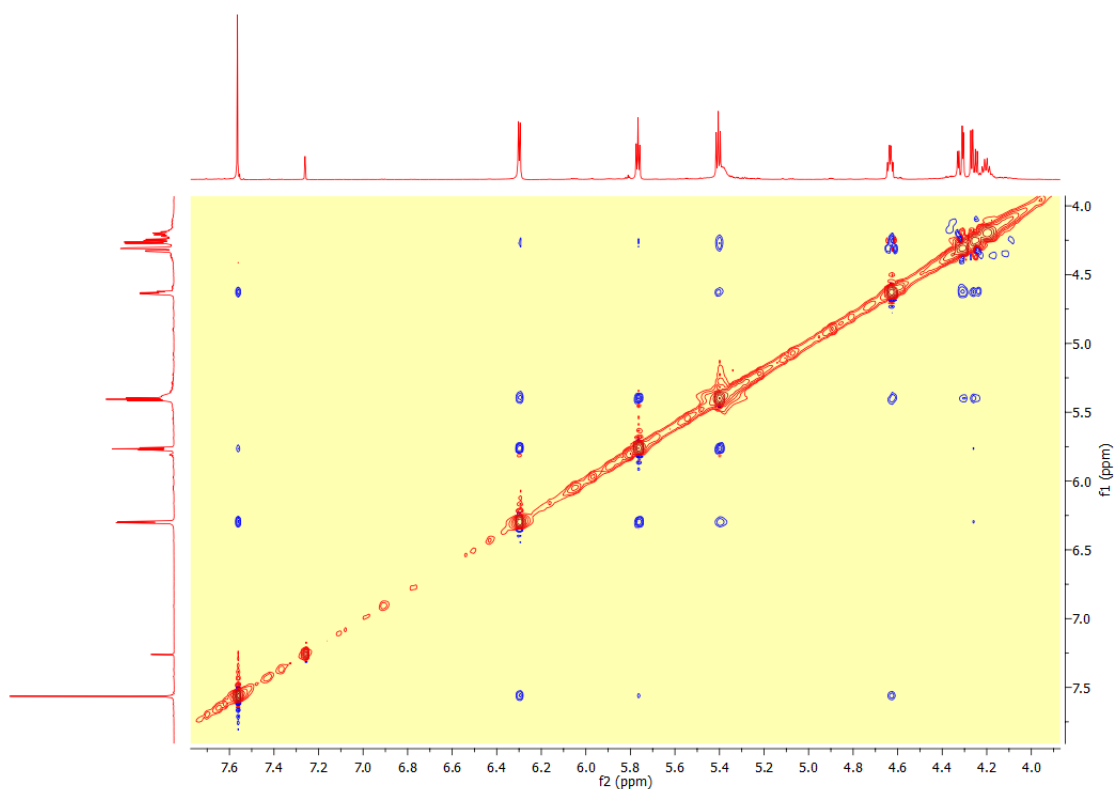
Η πιο χαρακτηριστική διαφορά μεταξύ των δύο μορίων αφορά στη χημική μετατόπιση του ανωμερικού πρωτονίου της ριβοφουρανόζης (1'-H), το οποίο εμφανίζεται αρκετά πιο αποθωρακισμένο στο φάσμα του προϊόντος **11b** (6.30 ppm) σε σχέση με αυτό του **10b** (5.81 ppm). Το δεδομένο αυτό, σε συνδυασμό και με τη μικρότερη τιμή της σταθεράς σύζευξης $J_{1',2'}$ για το παράγωγο **11b** (4.6 Hz αντί 6.8 Hz για το **10b**), υποδηλώνουν ότι πρόκειται πιθανότατα για νουκλεοζιτικό παράγωγο α -ανωμερικής διαμόρφωσης, ενώ το **10b** φαίνεται να είναι το β -ισομερές, λόγω της σχεδόν ταυτόσημης χημικής μετατόπισης που εμφανίζουν τα αρωματικά τους πρωτόνια (**10b**: 7.52 ppm, **11b**: 7.56 ppm). Αξίζει να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι τα πρωτόνια των μεθυλίων της ισοπροπυλικής ομάδας δεν είναι μαγνητικά ισοδύναμα, όπως υποδηλώνει η σχηματομορφή στα 1.31 ppm (ενδεικτικά για το παράγωγο **10b**), η οποία αναλύεται σε δύο διπλές κορυφές με $J = 6.50$ Hz.

Η διαπίστωση της ανωμερικής διαμόρφωσης των προϊόντων **10a-10c** και **11a-11c** καθώς και της ισομέρειας θέσης προήλθε από τη λήψη ομοπυρηνικών φασμάτων δύο διαστάσεων ^1H -NOESY. Στο φάσμα NOESY του παραγώγου **10b** που φαίνεται στην εικόνα 18, είναι χαρακτηριστική η ύπαρξη ισχυρών κορυφών συσχέτισης μεταξύ του αρωματικού πρωτονίου (7-H, 7.52 ppm) και των πρωτονίων της ριβοφουρανόζης στα 5.81 ppm (1'-H) και στα 5.32 ppm (2'-H και 3'-H), ενώ παρατηρείται και μία ασθενής συσχέτιση με τα δύο 5'-H (4.32 ppm και 4.62 ppm). Επίσης παρατηρείται κορυφή συσχέτισης μεταξύ των 1'-H και 4'-H (4.38 ppm) του δακτυλίου της ριβοφουρανόζης.



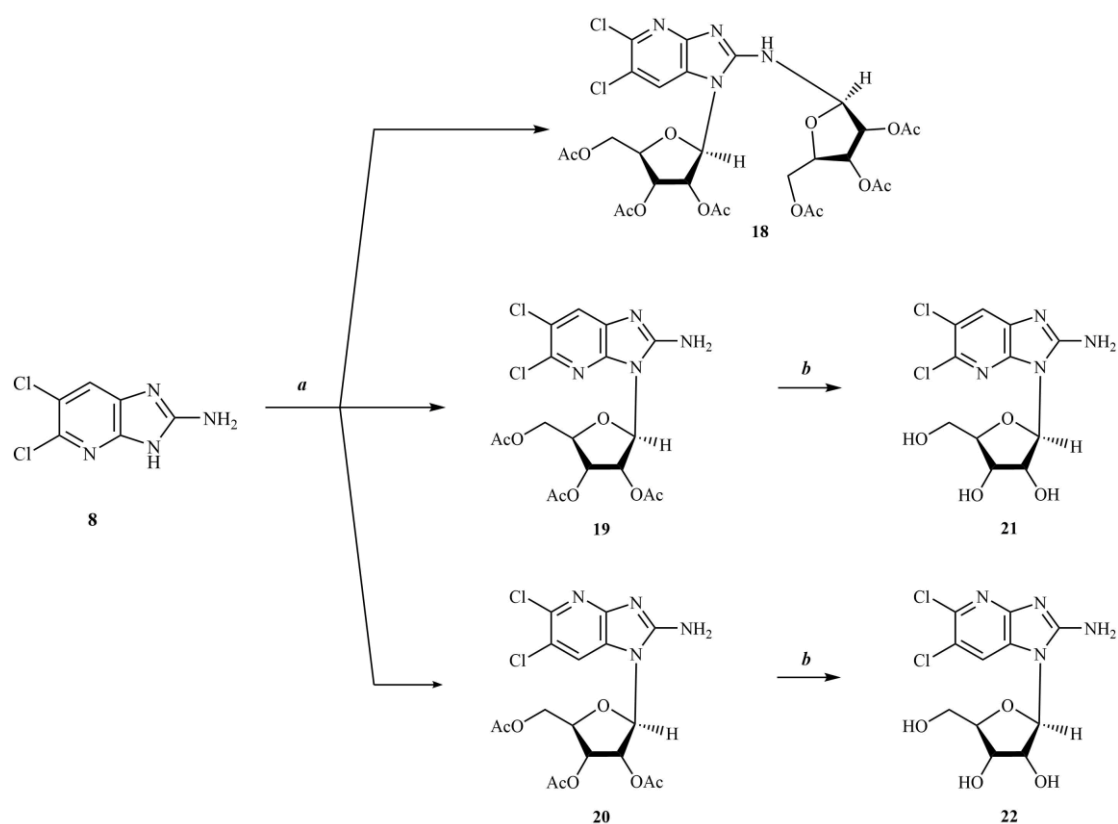
Εικόνα 18: Φάσμα ^1H -NOESY (600 MHz) του **10b** σε CDCl_3

Στο φάσμα NOESY του παραγώγου **11b** (εικόνα 19) παρατηρούνται επίσης κορυφές συσχέτισης του αρωματικού πρωτονίου (7-H, 7.56 ppm) και πρωτονίων του δακτυλίου της ριβοφουρανόζης. Ωστόσο στην περίπτωση αυτή, οι ισχυρές κορυφές συσχέτισης του αρωματικού πρωτονίου είναι με τα 1'-H (6.30 ppm) και 4'-H (4.63 ppm) του δακτυλίου της ριβοφουρανόζης, ενώ παρατηρείται και μια πιο ασθενής κορυφή συσχέτισης με το 2'-H (5.77 ppm) του σακχάρου. Επίσης χαρακτηριστική είναι η απουσία κορυφής συσχέτισης μεταξύ των 1'-H και 4'-H της ριβόζης. Επομένως, τα προϊόντα **10a-10c** αποτελούν τα 1-β-D-ριβονουκλεοζιτικά παράγωγα της ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης, ενώ τα **11a-11c** είναι τα αντίστοιχα α-D-ανωμερή τους. Ακολουθεί αντίδραση αποπροστασίας των **10a-10c** με την επίδραση μεθανολικού διαλύματος αμμωνίας προς λήψη των επιθυμητών τελικών νουκλεοζιτών **15-17**.



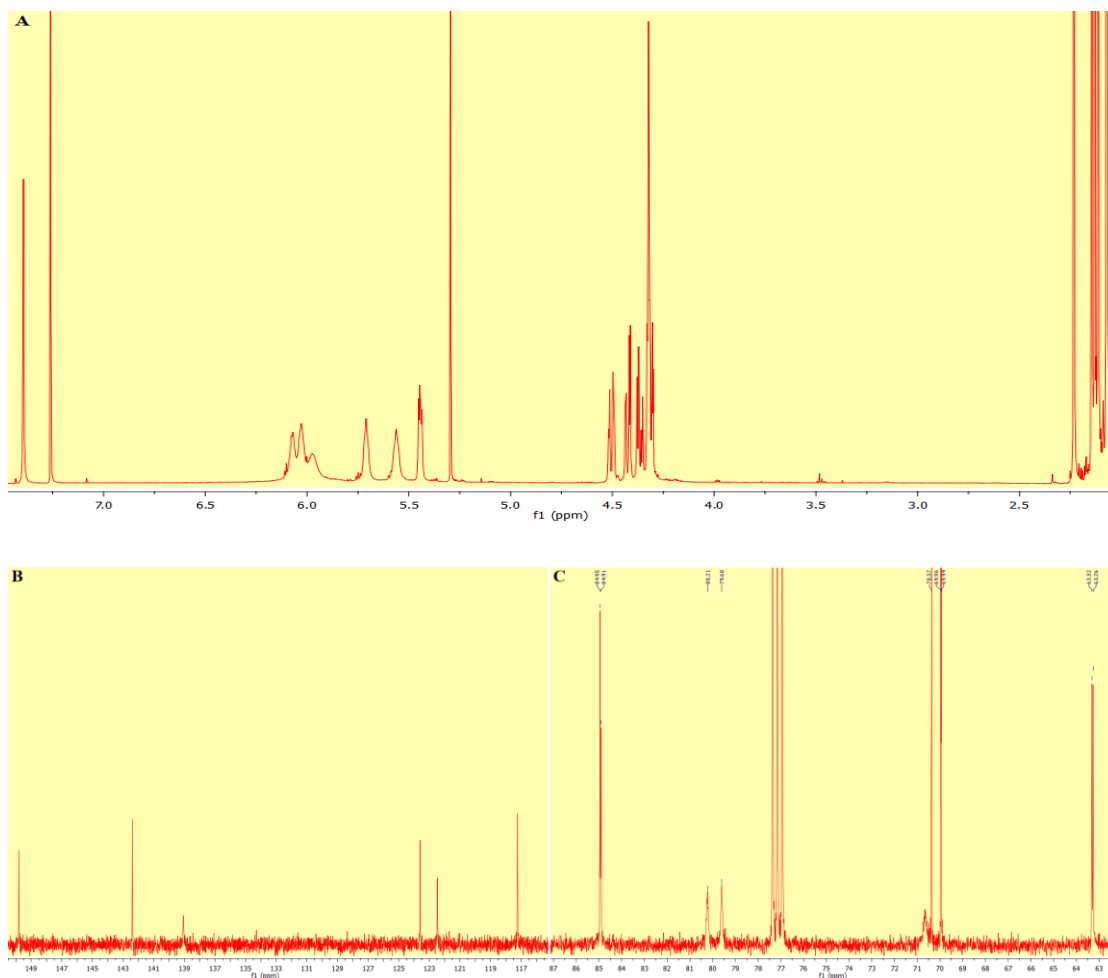
Εικόνα 19: Φάσμα ^1H -NOESY (600 MHz) του **11b** σε CDCl_3

Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις προέκυψαν από την αντίδραση γλυκοζυλίωσης του 2-αμινοϋποκατεστημένου παραγώγου **8**. Όταν εφαρμόστηκαν συνθήκες ανάλογες της αντίδρασης γλυκοζυλίωσης των αντίστοιχων *N*-αλκυλοποκατεστημένων παραγώγων, απομονώθηκαν από το μίγμα της αντίδρασης καθαροί οι *N*-3 (**19**) και *N*-1 (**20**) ισομερείς β-D-ριβοζίτες, δίχως ανιχνεύσιμες ποσότητες των αντίστοιχων α -ανωμερών. Αντίστοιχα με προηγούμενως, το 3-ισομερές σχηματίστηκε σε μεγαλύτερη αναλογία από τον *N*1-ριβοζίτη. Οι ενδιάμεσοι νουκλεοζίτες **19** και **20** αποπροστατεύονται με την επίδραση μεθανολικής αμμωνίας προς τους τελικούς νουκλεοζίτες **21** και **22** αντίστοιχα (σχήμα 12).



Σχήμα 12: a) i) BSA, ACN, reflux 2hrs, then ii) TAR, TMSOTf, reflux, 3hrs, b) NH₃, MeOH, rt, 24 hrs

Εκτός από τα **19** και **20**, απομονώθηκε από την αντίδραση γλυκοζυλίωσης της ιμιδαζοπυριδίνης **8** και το παράγωγο **18**, το οποίο ταυτοποιήθηκε με τη λήψη φασμάτων ¹H-NMR, ¹³C-NMR και μάζας ως ένα δις-ριβοζυλιωμένο παράγωγο (σχήμα 12), το οποίο μάλιστα ήταν το κύριο προϊόν της αντίδρασης. Στην εικόνα 20 φαίνονται τα φάσματα ¹H-NMR και ¹³C-NMR για το προϊόν **18**:

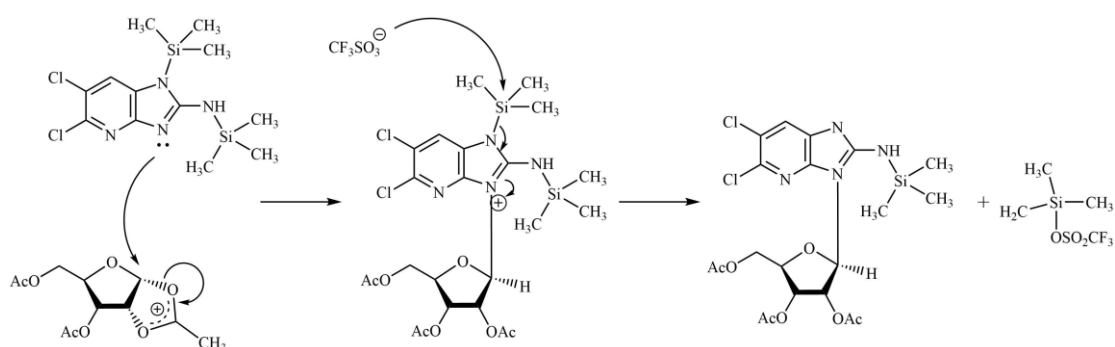


Εικόνα 20: (A) Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz) του **18** σε CDCl_3 , (B,C) Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz) του **18** σε CDCl_3 . (B) Αρωματικοί άνθρακες, (C) Άνθρακες ριβοφουρανόζης

Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ φαίνεται χαρακτηριστικά η παρουσία 6 κορυφών πρωτονίων ακετυλομάδων ενώ η κορυφή στα 7.40 ppm αντιστοιχεί στο μοναδικό αρωματικό πρωτόνιο του μορίου. Στο εύρος συχνοτήτων 4.29 ppm - 4.53 ppm συντονίζονται τα δύο 4'-H και τα τέσσερα 5'-H των σακχάρων, στα 5.44 ppm ένα από τα 3'-H του μορίου, ενώ η εικόνα των 1'-H, 2'-H και το δεύτερο 3'-H δεν είναι ευκρινής στο φάσμα πρωτονίου. Ωστόσο, στο φάσμα άνθρακα καταδεικνύεται χαρακτηριστικά η ύπαρξη δύο σειρών απορροφήσεων στο εύρος συχνοτήτων όπου συντονίζονται οι άνθρακες της ριβοφουρανόζης και την παρουσία μίας μόνο σειράς κορυφών που αντιστοιχούν σε αρωματικούς άνθρακες. Η απόδοση της ισομέρειας θέσης και της ανωμερικής διαμόρφωσης του παραγώγου **18** πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία NOE.

Όσον αφορά τα μονοϋποκατεστημένα νουκλεοζιτικά προϊόντα της αντίδρασης, είναι πιθανό ότι η απουσία ανιχνεύσιμων ποσοτήτων α -ανωμερών σχετίζεται με την παρουσία πρωτοταγούς αμινομάδας στη 2-θέση της ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης. Η απουσία N-

αλκυλοϋποκαταστάτη επιτρέπει τη σιλυλίωση της πλευρικής αμινομάδας παρουσία του BSA, η οποία ενδεχομένως δεν πραγματοποιείται σε μεγάλη έκταση στα παράγωγα **7a-7c**. Η εισαγωγή της ογκώδους τριμεθυλοσιλυλομάδας στην εξωκυκλική 2-θέση ως προς τις θέσεις γλυκοζυλίωσης, προσομοιάζει πλέον στερεοχημικά την περίπτωση των πυριμιδινικών παραγώγων. Καθώς απομονώνονται από το μίγμα της αντίδρασης οι μονοϋποκατεστημένοι νουκλεοζίτες, είναι λογικό να θεωρήσουμε ότι η γλυκοζυλίωση στις θέσεις N1 και N3 προηγείται του σχηματισμού του εξωκυκλικού γλυκοζιτικού δεσμού. Μία αρκετά απλουστευμένη μηχανιστική προσέγγιση για το σχηματισμό του N3-ριβοζίτη από το N1,N2-δισ-σιλυλοπαράγωγο θα μπορούσε να είναι αυτή που απεικονίζεται στο σχήμα 13:

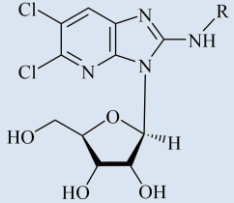
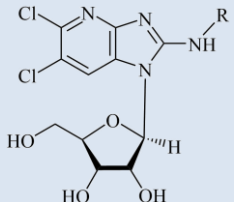


Σχήμα 13: Προτεινόμενος μηχανισμός εκλεκτικής β-προσβολής στην αντίδραση γλυκοζυλίωσης του παραγώγου **8**

Η πρόταση αυτή εμφανίζεται συνεπής με την αναλογία σχηματισμού των ανωμερικών προϊόντων της N3-γλυκοζυλίωσης στην περίπτωση των παραγώγων **7a-7c**. Συγκεκριμένα, στα παράγωγα με τύπου n-αλειφατικούς υποκαταστάτες (**7a**:αιθυλο- και **7c**:βενζυλο-) προκύπτει ανωμερικό μίγμα β:α ~ 12:1, ενώ στην περίπτωση του sec-υποκαταστάτη (**7b**:ισοπροπυλο-) η αναλογία αυτή είναι ~24:1. Ωστόσο, τα παραπάνω χρίζουν περαιτέρω διερεύνησης, δεδομένης της πολύ μικρότερης εναντιομερικής προτίμησης που παρατηρείται στη θέση 1.

3. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ

Τα παράγωγα **12-17**, **21** και **22** αξιολογήθηκαν για τη δράση τους έναντι των HSV-1, HSV-2, και HCMV σε καλλιέργειες ανθρώπινων εμβρυϊκών κυττάρων πνεύμονα χρησιμοποιώντας ως μόρια-αναφοράς τα Ganciclovir και Cidofovir. Τα μόρια δεν επέδειξαν αξιόλογη δράση έναντι του απλού έρπητα, εύρημα που συνάδει και με την εκλεκτικότητα των ισοστερών βενζιμιδαζολικών αναλόγων έναντι του HCMV. Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση στα στελέχη AD-169 και Davis του HCMV συνοψίζονται στον πίνακα 2:

Αποτελέσματα αξιολόγησης της δράσης των παραγώγων έναντι του HCMV σε ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα πνεύμονα (human embryonic lung cells, HEL)					
Compound Data			Anti-HCMV EC ₅₀ (μM) ^a		Cytotoxicity (μM)
Chemical Formula	Compound No	R-	AD-169 strain	Davis strain	Cell morphology (MCC) ^b
	12	Et-	>100	>100	>100
	13	i-Pr-	>100	>100	>100
	14	Bn-	>20	>4	>100
	21	H-	>20	>100	>100
	15	Et-	>100	>100	>100
	16	i-Pr-	>100	>100	>100
	17	Bn-	>20	>20	>100
	22	H-	>100	>100	>100
Reference Compounds					
Ganciclovir			9.22	2.29	>350
Cidofovir			1.93	1.05	>300
^a Effective concentration required to reduce virus plaque formation by 50%. Virus input was 100 plaque forming units					
^b Minimum cytotoxic concentration that causes a microscopically detectable alteration of cell morphology					

Πίνακας 2: Δραστικότητα των **12-17**, **21** και **22** έναντι των στελεχών AD-169 και Davis του HCMV

Είναι ενδιαφέρον ότι η αντικατάσταση του βενζιμιδαζολικού φαρμακοφόρου από τον πυρήνα της 1-δεαζαπυριδίνης έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της δραστηριότητας στην περίπτωση των παραγώγων με τους μικρούς αλειφατικούς 2-αμινοϋποκαταστάτες. Αναφέρεται συγκεκριμένα η περίπτωση των 2-ισοπροπυλαμινο-παραγώγων, όπου το βενζιμιδαζολικό ισοστερές εμφανίζει EC_{50} 2.3 μ M. Τα παράγωγα τα οποία εμφανίζουν αντίθετα κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα έναντι του ιού είναι οι N1 και N3 ισομερείς βενζυλαμινο-νουκλεοζίτες, ενώ τα αποτελέσματα για το 3-ισομερές της 2-αμινοϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης εμφανίζονται αντιφατικά μεταξύ των δύο στελεχών του ιού.

Το γεγονός ότι η δράση των παραγώγων αυτών δεν εντοπίζεται σε αυτά που φέρουν μικρούς αλειφατικούς αμινοϋποκαταστάτες αλλά στα βενζυλαμινο-ομόλογα τους, σκιαγραφεί ένα διαφορετικό δυναμικό αλληλεπιδράσεων σε μοριακό επίπεδο. Αυτό παραπέμπει σε διαφορετικό μηχανισμό δράσης και διαφορετικούς ενζυμικούς στόχους από τα ανάλογα παράγωγα βενζιμιδαζολίου (τερμινάση, pUL97). Σε κάθε περίπτωση ωστόσο η εξαγωγή συμπερασμάτων χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα σημεία τήξεως λήφθηκαν σε συσκευή Büchi και δεν είναι διορθωμένα. Οι μετρήσεις στροφικής ικανότητας λήφθηκαν σε πολωσιμότερο Perkin-Elmer 341. Οι χρωματογραφίες στήλης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση Silica gel 60 AC.C (SDS 35-70 μm). Η παρακολούθηση των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) σε πλάκες Silica gel 60_{F254}. Για τη λήψη φασμάτων ¹H-NMR, ¹³C-NMR και φασμάτων δύο διαστάσεων χρησιμοποιήθηκαν φασματοφωτόμετρα Bruker Avance 400 ή 600. Ως διαλύτες για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl₃) και δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-*d*₆). Η παρασκευαστική HPLC πραγματοποιήθηκε σε σύστημα που φέρει δύο αντλίες Prep LabAlliance, μία Fortis C-18 (5 μm; Fortis) στήλη (250 x 10 mm) και ανιχνευτή FLASH 06S DAD 600 (Ecom, Praha-Czech Republic).

N-(6-χλωροπυριδιν-2-υλο)-2,2-διμεθυλοπροπιοναμίδιο (2). Η 2-αμινο-6-χλωροπυριδίνη (5.0 g, 38.9 mmol) διαλύεται σε 35 mL άνυδρο CH₂Cl₂ με την προσθήκη Et₃N (7.3 mL, 52.3 mmol) και ακολούθως προστίθεται στάγδην και υπό ψύξη (0-5°C) διάλυμα του πιβαλοϋλοχλωριδίου (5.8 mL, 47.1 mmol) σε 10 mL άνυδρο CH₂Cl₂. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και μετά από 22 ώρες έχει ολοκληρωθεί, οπότε προστίθενται στο μίγμα 150 mL κορεσμένου διαλύματος NaHCO₃ και ακολουθεί εκχύλιση με CH₂Cl₂ (3x150 mL). Τα συνενωμένα οργανικά εκχυλίσματα ξηραίνονται (άνυδρο Na₂SO₄) και μετά από απομάκρυνση των διαλυτών και ανακρυστάλλωση με εξάνιο, λαμβάνονται 6.7 g κρυσταλλικού στερεού. Στο διήθημα της ανακρυστάλλωσης διενεργείται χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα DCM:MeOH (99.5:0.5 έως 99:1), οπότε λαμβάνονται επιπλέον 1.5 g προϊόντος (99.1 %). Λευκό στερεό, στ: 90-91°C (n-Hexane, βιβλιογραφία: 85-87°C). ¹H-NMR, ¹³C-NMR και MS γνωστά από βιβλιογραφία¹⁴⁷.

N-(5,6-διχλωροπυριδιν-2-υλο)-2,2-διμεθυλοπροπιοναμίδιο (3). Σε διάλυμα του αμιδίου **2** (8.2 g, 38.6 mmol) σε 18 mL άνυδρου DMF προστίθεται σε δόσεις το NCS (5.9 g, 44.2 mmol) και το μίγμα θερμαίνεται στους 100°C για 18 ώρες, οπότε η αντίδραση ολοκληρώνεται. Το μίγμα αποχύνεται σε πάγο και αραιώνεται με νερό (800 mL), το στερεό που αποχωρίζεται συλλέγεται με διήθηση υπό κενό, ξηραίνεται και υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα cHex:EtOAc

(99:1 έως 90:10). Λαμβάνονται τελικώς 7.5 g προϊόντος (απόδοση 78.7%). Λευκό στερεό, στ: 87-88°C (Et₂O). ¹H-NMR και MS γνωστά από βιβλιογραφία¹⁴⁸. ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 27.34 (C(CH₃)₃), 39.90 (C(CH₃)₃), 113.13 (C-3), 124.06 (C-5), 140.94 (C-4), 145.86 (C-6), 149.45 (C-2), 177.04 (CO).

5,6-διχλωροπυριδιν-2-αμίνη (4). Το παράγωγο **3** (7.5 g, 30.4 mmol) απαιωρείται σε 25 mL αιθανόλης και ακολούθως προστίθενται υπό ψύξη (0-5°C) 14 mL H₂O και 14 mL πυκνού υδροχλωρικού οξέος. Το μίγμα της αντίδρασης φέρεται σε βρασμό (θερμοκρασία ελαίου 100°C) και μετά από 2 ώρες η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί. Ακολουθεί αλκαλοποίηση υπό ψύξη (0-5°C) με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ (250 mL) έως pH 8 και μετά από προσθήκη επιπλέον ποσότητας H₂O (αραίωση στα 550 mL) αποχωρίζεται το προϊόν ως λευκό στερεό. Συλλέγονται μετά από διήθηση υπό κενό και ξήρανση 4.9 g προϊόντος (99.2%). Λευκό στερεό, στ: 142-143°C (Et₂O). ¹H-NMR και MS γνωστά από βιβλιογραφία¹⁴⁸. ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 109.10 (C-3), 113.99 (C-5), 140.52 (C-4), 145.16 (C-6), 158.99 (C-2).

3-νιτρο-5,6-διχλωροπυριδιν-2-αμίνη (5). Η αμινοπυριδίνη **4** (1.2 g, 7.4 mmol) διαλύεται υπό ψύξη (0-5°C) σε 11 mL π. H₂SO₄ και ακολουθεί στάγδην προσθήκη 1.2 mL π. HNO₃ στους -10°C. Κατόπιν η ψύξη απομακρύνεται και μετά από 45 λεπτά η αντίδραση ολοκληρώνεται. Το μίγμα της αντίδρασης αποχύνεται σε πάγο και πραγματοποιείται αλκαλοποίηση υπό ψύξη (0-5°C) με διάλυμα αμμωνίας 12.5% μέχρι pH 8-9. Το στερεό που αποχωρίζεται διηθείται υπό κενό, ξηραίνεται και υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα DCM:MeOH (99.5:0.5), οπότε συλλέγονται 950 mg προϊόντος (62.1 %). Κίτρινο στερεό, στ: 186-187°C (EtOAc). ¹H-NMR και MS γνωστά από βιβλιογραφία¹⁴⁹. ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 104.78 (C-5), 131.06 (C-3), 136.65 (C-4), 150.48 (C-6), 160.09 (C-2).

5,6-διχλωροπυριδιν-2,3-διαμίνη (6). Το νιτροπαράγωγο **5** (1.0 g, 4.8 mmol) διαλύεται υπό ψύξη (0-5°C) σε 12.5 mL π. HCl και ακολουθεί η προσθήκη του SnCl₂•2H₂O (4.6 g, 20.4 mmol). Κατόπιν η ψύξη απομακρύνεται, το μίγμα της αντίδρασης φέρεται στους 60°C και μετά από 40 λεπτά η αντίδραση ολοκληρώνεται. Το μίγμα αποχύνεται σε πάγο, αλκαλοποιείται υπό ψύξη (0-5°C) με διάλυμα αμμωνίας 12.5% μέχρι pH 12, αραιώνεται με H₂O (στα 500 mL) και εκχυλίζεται με EtOAc (2x500 mL). Μετά από ξήρανση (άνυδρο Na₂SO₄) και απομάκρυνση των διαλυτών λαμβάνονται 850 mg του επιθυμητού προϊόντος (απόδοση 99.3%). Κρυσταλλικό στερεό, στ: 171-172°C (EtOAc, βιβλιογραφία: 165-

166°C)¹⁴⁹. ¹H-NMR και MS γνωστά από βιβλιογραφία¹⁵⁰. ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 113.92 (C-5), 119.07 (C-4), 129.94 (C-3), 130.86 (C-6), 147.05 (C-2).

Γενική μέθοδος για τη σύνθεση των παραγώγων 7a-7c: Σε διάλυμα της διαμινοπυριδίνης **6** (1 equiv) σε 10 mL άνυδρο THF υπό ατμόσφαιρα Ar προστίθεται ο κατάλληλα υποκατεστημένος ισοθειοκυανικός εστέρας (4 equiv). Το μίγμα της αντίδρασης φέρεται σε βρασμό και μετά από 26-32 ώρες η πρώτη ύλη έχει εξαντληθεί (TLC, cyclohexane:EtOAc, 5:5). Αφού το μίγμα επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται ερυθρό HgO (2 equiv) και μετά από βρασμό για 40 λεπτά η αντίδραση ολοκληρώνεται. Το μίγμα διηθείται εν θερμό από κελλίτη και ο ηθμός εκπλένεται με θερμή MeOH. Το κατέργασμα που λαμβάνεται μετά την απομάκρυνση των διαλυτών υποβάλλεται σε χρωματογραφία στήλης οπότε λαμβάνονται τα παράγωγα ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης **7a-7c**.

N-αιθυλο-5,6-διγλωροϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνη (7a). Παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, με επίδραση αιθυλοϊσοθειοκυανικού εστέρα επί της διαμίνης **6** (500 mg). Μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα CHCl₃:MeOH (95:5 έως 85:15) λαμβάνονται 340 mg προϊόντος (52.3%, 2 στάδια). Μπεζ στερεό, στ> 300°C, dec (MeOH). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400MHz) δ 1.16 (t, 1H, CH₃, *J* = 6.8 Hz), 3.33 (m, 2H, CH₂), 7.37 (br. 1H, D₂O exchangeable, NH), 7.56 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.87 (CH₃), 36.82 (CH₂), 116.40 (C-6), 116.58 (C-7, major tautomeric form), 121.73 (C-7, minor tautomeric form), 126.92 (C-7a), 137.46 (C-5), 156.20 (C-3a), 158.92 (C-2). HR-MS (ESI) *m/z*: Calcd for C₈H₉Cl₂N₄: [M+H]⁺ = 231.0199, found 231.0202

N-ισοπροπυλο-5,6-διγλωροϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνη (7b). Παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, με επίδραση ισοπροπυλοϊσοθειοκυανικού εστέρα επί της διαμίνης **6** (500 mg). Μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα DCM:EtOAc (70:30 έως 20:80) και κατόπιν EtOAc:MeOH (99:1 έως 97:3), συλλέγονται 380 mg προϊόντος (55.2%, 2 στάδια). Λευκό στερεό, στ: 235-236°C (Acetone). ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.20 (d, 6H, CH₃, *J* = 6.1 Hz), 3.92 (m, 1H, CH), 7.34 (br, 1H, D₂O exchangeable, NH), 7.56 (s, 1H, H-7), 11.06 (br, 1H, D₂O exchangeable, imidazole NH of the major tautomeric form), 11.66 (br, 1H, D₂O exchangeable, imidazole NH of the minor tautomeric form). ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 22.58 (CH₃), 43.97 (CH), 116.37 (C-6), 116.61 (C-7 of the major tautomeric form), 121.62 (C-7 of the minor tautomeric form), 126.86 (C-7a), 137.41 (C-5), 156.22 (C-3a), 158.24 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for C₉H₁₁Cl₂N₄: [M1+H]⁺ = 245.0355, found 245.0352

N-βενζυλο-5,6-διγλωροϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνη (7c). Παρασκευάστηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, με επίδραση βενζυλοϊσοθειοκυανικού εστέρα επί της διαμίνης **6** (500 mg). Μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μm) η οποία εκλύεται με σύστημα DCM:EtOAc (90:10 έως 50:50) και κατόπιν EtOAc:MeOH (99:1 έως 90:10), συλλέγονται 420 mg προϊόντος (51.0%, 2 στάδια). Λευκό στερεό, στ: 277-278°C (MeOH). ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.55 (d, 2H, CH₂, J = 6.0 Hz), 7.24 (t, 1H, H-4', J = 7.2 Hz), 7.32 (t, 2H, H-3' and 5', J = 7.6 Hz), 7.36 (d, 2H, H-2' and 6', J = 7.3 Hz), 7.60 (s, 1H, H-7), 7.94 (br, 1H, D₂O exchangeable, NH), 11.38 (br, 1H, D₂O exchangeable, imidazole NH). ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 45.36 (CH₂), 116.89 (C-6), 117.05 (C-7), 126.97 (C-4'), 127.13 (C-7a), 127.25 (C-3',5'), 128.33 (C-2',6'), 137.50 (C-5), 139.34 (C-1'), 155.88 (C-3a), 158.81 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for C₁₃H₁₁Cl₂N₄: [M1+H]⁺ = 293.0355, found 293.0358

5,6-διγλωροϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνη (8). Σε εναιώρημα της διαμινοπυριδίνης **6** (570 mg, 3.20 mmol) σε 24 mL MeOH:H₂O (1:1) προστίθεται η ποσότητα του BrCN (1.60 mL από διάλυμα 5.0M σε ακετονιτρίλιο, 8.00 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 24 ώρες η αντίδραση ολοκληρώνεται, το μίγμα συμπυκνώνεται στο 1/3 του αρχικού όγκου, αλκαλοποιείται σε pH 8 με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ (150 mL) και εκχυλίζεται με EtOAc (5x200 mL). Στο κατέργασμα που παραλαμβάνεται μετά από ξήρανση (άνυδρο Na₂SO₄) και απομάκρυνση των διαλυτών πραγματοποιείται κατεργασία με Et₂O, οπότε συλλέγονται τελικώς 510 mg προϊόντος ως άμορφο στερεό (απόδοση 78.5%). ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 600MHz) δ 7.05 (br, 2H, D₂O exchangeable, -NH₂), 7.58 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 117.5 (C-6), 118.2 (C-7), 129.6 (C-7a), 136.7 (C-5), 153.6 (C-3a), 158.8 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for C₆H₅Cl₂N₄: [M1+H]⁺ = 202.9886, found 202.9887

Γενική μέθοδος για τη σύνθεση των ριβοζυλιωμένων παραγώγων: Σε εναιώρημα της αντίστοιχης 2-αμινοϊμιδαζο[4,5-*b*]πυριδίνης (**7a-7c**, **8**), (1 equiv) σε άνυδρο CH₃CN προστίθεται η ποσότητα του N,O-δισ-(τριμεθυλοσιλυλο)ακεταμιδίου (BSA, 1.3 equiv) και το μίγμα φέρεται σε βρασμό για δύο ώρες. Τότε, προστίθεται σε θερμοκρασία δωματίου η 1,2,3,5-τετρα-O-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανόζη (1.2 equiv) και στη συνέχεια η ποσότητα του

τριμεθυλοσιλυλο-τριφθορομεθανοσουλφονικού εστέρα (TMSOTf, 1.4 equiv) υπό ψύξη (0-5°C). Κατόπιν το μίγμα φέρεται σε βρασμό για άλλες 3 ώρες, οπότε η αντίδραση ολοκληρώνεται. Το CH₃CN απομακρύνεται υπό κενό και το κατέργασμα παραλαμβάνεται με EtOAc (100 mL) και εκχυλίζεται με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ (100 mL). Η υδατική στιβάδα εκχυλίζεται άλλη μία φορά με EtOAc (100 mL) και οι συνενωμένες οργανικές στιβάδες εκχυλίζονται με κορεσμένο διάλυμα NaCl (brine, 200 mL), ξηραίνονται (άνυδρο Na₂SO₄) και συμπυκνώνονται υπό κενό. Στο ελαιώδες κατέργασμα που προκύπτει πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης προς λήψη των νουκλεοζιτικών παραγώγων **9a-9c**, **10a-10c**, **11a-11c** και **18-20**.

N-αιθυλο-5,6-διχλωρο-3-(2',3',5'-τρι-O-ακετυλο-D-ριβοφουρανοζυλο)-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδιν-2-αμίνη (9a), **N-αιθυλο-5,6-διχλωρο-1-(2',3',5'-τρι-O-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδιν-2-αμίνη (10a)** και **N-αιθυλο-5,6-διχλωρο-1-(2',3',5'-τρι-O-ακετυλο-α-D-ριβοφουρανοζυλο)-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδιν-2-αμίνη (11a)**. Παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο από το παράγωγο **7a** (250 mg), οπότε μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα CHCl₃:MeOH (99:1 έως 97:3) παραλαμβάνονται τα παράγωγα **9a** (280 mg, μίγμα 3-β/α αναλογίας 12:1, με βάση ¹H-NMR), **10a** (115 mg, μίγμα 1-β με άλλη νουκλεοζιτική πρόσμιξη σε αναλογία 5:1) και **11a** (27.3 mg, oil). Δεδομένα για το **11a**: [α]_D +61.23 (c=0.684, CHCl₃). ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 1.28 (t, 3H, CH₃, J = 7.2 Hz), 1.82 (s, 3H, CH₃CO), 2.11 (s, 3H, CH₃CO), 2.15 (s, 3H, CH₃CO), 3.57 (m, 2H, CH₂), 4.29 (dd, 1H, H-5', J_{5',4'} = 4.9 Hz, J_{5',5'} = 12.3 Hz), 4.33 (dd, 1H, H-5', J_{5',4'} = 3.5 Hz, J_{5',5'} = 12.3 Hz), 4.66 (m, 1H, H-4'), 5.27 (t, 1H, D₂O exchangeable, NH, J = 5.3 Hz), 5.45 (t, 1H, H-3', J = 5.3 Hz), 5.73 (t, 1H, H-2', J = 5.1 Hz), 6.19 (d, 1H, H-1', J = 4.9 Hz), 7.55 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 14.96 (CH₃), 20.28 (CH₃CO), 20.55 (CH₃CO), 20.94 (CH₃CO), 38.71 (CH₂), 63.31 (C-5'), 71.08 (C-3'), 71.55 (C-2'), 78.96 (C-4'), 85.40 (C-1'), 119.37 (C-7), 119.69 (C-6), 125.67 (C-7a), 141.09 (C-5), 154.24 (C-3a), 157.01 (C-2), 169.26 (CH₃CO), 169.55 (CH₃CO), 170.51 (CH₃CO). HR-MS (ESI) m/z: Calcd for C₁₉H₂₂Cl₂N₄O₇Na: [M1+Na]⁺ = 511.0758, found 511.0764

N-ισοπροπυλο-5,6-διχλωρο-3-(2',3',5'-τρι-O-ακετυλο-D-ριβοφουρανοζυλο)-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδιν-2-αμίνη (9b), **N-ισοπροπυλο-5,6-διχλωρο-1-(2',3',5'-τρι-O-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδιν-2-αμίνη (10b)** και **N-ισοπροπυλο-5,6-διχλωρο-1-(2',3',5'-τρι-O-ακετυλο-α-D-ριβοφουρανοζυλο)-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδιν-2-αμίνη (11b)**. Παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο από

το παράγωγο **7b** (280 mg), οπότε μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (99.5:0.5 έως 98:2) παραλαμβάνονται τα παράγωγα **9b** (350 mg, μίγμα 3- β/α αναλογίας 24:1, με βάση $^1\text{H-NMR}$), **10b** (140 mg) και **11b** (50 mg, oil). Δεδομένα για το **10b**: Μπεζ στερεό, στ: 165-166°C (EtOAc/n-pentane). $[\alpha]_{\text{D}}$ +37.77 ($c=0.495$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 1.30 (d, 3H, CH_3 , $J = 6.5$ Hz), 1.31 (d, 3H, CH_3 , $J = 6.5$ Hz), 2.04 (s, 3H, CH_3CO), 2.15 (s, 3H, CH_3CO), 2.19 (s, 3H, CH_3CO), 4.27 (m, 1H, CH), 4.32 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 2.2$ Hz, $J_{5',5''} = 12.7$ Hz), 4.39 (m, 1H, H-4'), 4.62 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 4.0$ Hz, $J_{5',5''} = 12.7$ Hz), 5.30 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'} = 3.6$ Hz, $J_{3',2'} = 6.1$ Hz), 5.33 (m, 1H, H-2'), 5.47 (br, 1H, D_2O exchangeable, NH), 5.86 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 6.7$ Hz), 7.53 (s, 1H, H-7). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 20.41 (CH_3CO), 20.67 (CH_3CO), 21.04 (CH_3CO), 22.76 (isopropyl CH_3), 23.03 (isopropyl CH_3), 46.04 (isopropyl CH), 62.80 (C-5'), 69.59 (C-3'), 71.87 (C-2'), 81.06 (C-4'), 86.26 (C-1'), 117.74 (C-7), 119.70 (C-6), 125.49 (C-7 α), 141.38 (C-5), 154.37 (C-3 α), 156.10 (C-2), 169.44 (CO), 169.72 (CO), 170.29 (CO). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 525.0914$, found 525.0917. Δεδομένα για το **11b**: $[\alpha]_{\text{D}}$ +57.75 ($c=0.561$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.25 (d, 3H, CH_3 , $J = 6.50$ Hz), 1.26 (d, 3H, CH_3 , $J = 6.50$ Hz), 1.81 (s, 3H, CH_3CO), 2.09 (s, 3H, CH_3CO), 2.13 (s, 3H, CH_3CO), 4.21 (m, 1H, CH), 4.26 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 5.2$ Hz, $J_{5',5''} = 12.5$ Hz), 4.32 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 3.3$ Hz, $J_{5',5''} = 12.3$ Hz), 4.65 (m, 1H, H-4'), 5.16 (d, 1H, D_2O exchangeable, NH, $J = 7.0$ Hz), 5.42 (t, 1H, H-3', $J = 5.4$ Hz), 5.74 (t, 1H, H-2', $J = 5.0$ Hz), 6.23 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 4.7$ Hz), 7.56 (s, 1H, H-7). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 20.26 (CH_3CO), 20.53 (CH_3CO), 20.88 (CH_3CO), 22.67 (CH_3), 23.00 (CH_3), 45.87 (CH), 63.29 (C-5'), 70.98 (C-3'), 71.48 (C-2'), 78.84 (C-4'), 85.35 (C-1'), 119.32 (C-7), 119.43 (C-6), 125.58 (C-7 α), 140.92 (C-5), 154.52 (C-3 α), 156.45 (C-2), 169.20 (CO), 169.55 (CO), 170.49 (CO). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 525.0914$, found 525.0917.

N-βενζυλο-5,6-διγλωρο-3-(2',3',5'-τρι-Ο-ακετυλο-D-ριβοφουρανοζυλο)-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδιν-2-αμίνη (9c), **N-βενζυλο-5,6-διγλωρο-1-(2',3',5'-τρι-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδιν-2-αμίνη (10c)** και **N-βενζυλο-5,6-διγλωρο-1-(2',3',5'-τρι-Ο-ακετυλο-α-D-ριβοφουρανοζυλο)-1H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδιν-2-αμίνη (11c)**. Παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο από το παράγωγο **7c** (350 mg), οπότε μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα $\text{cHex}:\text{EtOAc}$ (70:30 έως 20:80) παραλαμβάνονται τα παράγωγα **9c** (350 mg, μίγμα 3- β/α αναλογίας 12:1, με βάση $^1\text{H-NMR}$), **10c** (100 mg, μη καθαρό) και **11c** (40 mg, oil). Το **10c** υποβάλλεται εκ νέου σε χρωματογραφία στήλης η οποία εκλούεται με σύστημα $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (99.5:0.5) οπότε λαμβάνονται τελικώς 80 mg του προϊόντος (oil). Δεδομένα

για το **10c**: $[\alpha]_D +46.29$ ($c=0.337$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 1.91 (s, 3H, CH_3CO), 1.99 (s, 3H, CH_3CO), 2.15 (s, 3H, CH_3CO), 4.21 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 2.0$ Hz, $J_{5',5'} = 12.6$ Hz), 4.37 (m, 1H, H-4'), 4.57 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 3.4$ Hz, $J_{5',5'} = 12.6$ Hz), 4.72 (dd, 1H, CH_2 , $J_{\text{CH}_2,\text{NH}} = 5.2$ Hz, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 14.8$ Hz), 4.82 (dd, 1H, CH_2 , $J_{\text{CH}_2,\text{NH}} = 5.9$ Hz, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 14.8$ Hz), 5.30 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'} = 3.1$ Hz, $J_{3',2'} = 6.1$ Hz), 5.37 (m, 1H, H-2'), 5.87 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 7.6$ Hz), 5.88 (br, 1H, D_2O exchangeable, NH), 7.27 (m, 1H, phenyl, H-4), 7.32 (t, 2H, phenyl, H-3,5, $J = 7.5$ Hz), 7.37 (d, 2H, phenyl H-2,6, $J = 7.4$ Hz), 7.52 (s, 1H, H-7). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 20.34 (CH_3CO), 20.52 (CH_3CO), 20.70 (CH_3CO), 47.62 (CH_2), 62.91 (C-5'), 69.83 (C-3'), 71.64 (C-2'), 81.41 (C-4'), 86.04 (C-1'), 117.40 (C-7), 120.01 (C-6), 126.03 (C-7a), 127.89 (phenyl, C-2,6), 128.01 (phenyl, C-4), 128.96 (phenyl, C-3,5), 137.97 (phenyl, C-1), 141.60 (C-5), 154.26 (C-3a), 156.81 (C-2), 169.27 (CH_3CO), 169.71 (CH_3CO), 170.16 (CH_3CO). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$: $[\text{M}1+\text{Na}]^+ = 573.0914$, found 573.0919. Δεδομένα για το **11c**: $[\alpha]_D +53.17$ ($c=0.600$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 1.72 (s, 3H, CH_3CO), 2.00 (s, 3H, CH_3CO), 2.12 (s, 3H, CH_3CO), 4.27 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 4.8$ Hz, $J_{5',5'} = 12.4$ Hz), 4.30 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 3.5$ Hz, $J_{5',5'} = 12.3$ Hz), 4.62 (m, 1H, H-4'), 4.69 (dd, 1H, CH_2 , $J_{\text{CH}_2,\text{NH}} = 5.0$ Hz, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 14.5$ Hz), 4.76 (dd, 1H, CH_2 , $J_{\text{CH}_2,\text{NH}} = 5.5$ Hz, $J_{\text{CH}_2,\text{CH}_2} = 14.8$ Hz), 5.44 (t, 1H, H-3', $J = 5.2$ Hz), 5.60 (br, 1H, D_2O exchangeable, NH), 5.71 (t, 1H, H-2', $J = 5.2$ Hz), 6.19 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 5.0$ Hz), 7.28 (m, 1H, H-4, phenyl), 7.32 (m, 2H, phenyl, H-3,5), 7.40 (m, 2H, phenyl, H-2,6), 7.53 (s, 1H, H-7). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 20.08 (CH_3CO), 20.40 (CH_3CO), 20.94 (CH_3CO), 47.73 (CH_2), 63.24 (C-5'), 71.03 (C-3'), 71.39 (C-2'), 79.20 (C-4'), 85.46 (C-1'), 118.91 (C-7), 119.87 (C-6), 125.89 (C-7a), 128.02 (phenyl, C-4), 128.23 (phenyl, C-2,6), 128.90 (phenyl, C-3,5), 138.03 (phenyl, C-1), 141.44 (C-5), 154.31 (C-3a), 157.13 (C-2), 169.33 (CH_3CO), 169.53 (CH_3CO), 170.39 (CH_3CO). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$: $[\text{M}1+\text{Na}]^+ = 573.0914$, found 573.0920.

N,1-δισ-(2',3',5'-τρι-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-5,6-διχλωρο-1H-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνη (18), **5,6-διχλωρο-3-(2',3',5'-τρι-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-3H-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνη (19)** και **5,6-διχλωρο-1-(2',3',5'-τρι-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1H-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνη (20)**. Παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη γενική μέθοδο, οπότε μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (99.5:0.5 έως 95.5:4.5) παραλαμβάνονται τα παράγωγα **18** (300 mg, oil), **19** (150 mg, oil) και **20** (40 mg, oil). Δεδομένα για το **18**: $[\alpha]_D -25.60$ ($c=0.703$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 2.07 (s, 3H, CH_3CO), 2.07 (s, 3H, CH_3CO), 2.11 (s, 3H, CH_3CO), 2.13 (s, 3H, CH_3CO), 2.14 (s, 3H, CH_3CO), 2.23 (s, 3H, CH_3CO), 4.27-4.32 (m, 3H, 2xH-4', 1xH-5'), 4.36 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 5.1$ Hz, $J_{5',5'} = 12.1$ Hz), 4.43 (dd,

1H, H-5', $J_{5',4'} = 3.4$ Hz, $J_{5',5'} = 12.1$ Hz), 4.50 (m, 1H, H-5'), 5.44 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'} = 3.6$ Hz, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz), 5.57 (br, 1H, H-2'), 5.71 (br, 1H, H-3'), 5.97 (br, 1H, H-1'), 6.02 (br, 1H, H-2'), 6.09 (br, 1H, H-1'), 7.37 (s, 1H, H-7). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 20.44 (CH_3CO), 20.54 (CH_3CO), 20.62 (CH_3CO), 20.64 (CH_3CO), 20.84 (CH_3CO), 21.01 (CH_3CO), 63.27 (C-5'), 63.32 (C-5'), 69.95, 69.96, 70.38, 70.63 (2xC-2', 2xC-3'), 79.61 (C-4'), 80.22 (C-4'), 84.92 (C-1'), 84.96 (C-1'), 117.25 (C-7), 122.48, 123.61, 139.07, 142.39 (C-3a, C-5, C-6 and C-7a), 149.82 (C-2), 169.62 (CH_3CO), 169.64 (CH_3CO), 169.73 (CH_3CO), 170.33 (CH_3CO), 170.61 (CH_3CO), 171.21 (CH_3CO). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_{14}\text{Na}$: $[\text{M}1+\text{Na}]^+ = 741.1184$, found 741.1185. Δεδομένα για το **19**: $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 2.03 (s, 3H, CH_3CO), 2.11 (s, 3H, CH_3CO), 2.16 (s, 3H, CH_3CO), 4.35 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 2.7$ Hz, $J_{5',5'} = 12.2$ Hz), 4.38 (m, 1H, H-4'), 4.59 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 4.0$ Hz, $J_{5',5'} = 12.2$ Hz), 5.50 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'} = 4.3$ Hz, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz), 5.75 (m, 1H, H-2'), 5.87 (br, 2H, D_2O exchangeable, NH_2), 6.23 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 6.3$ Hz), 7.63 (s, 1H, H-7). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 20.48 (CH_3CO), 20.70 (CH_3CO), 20.83 (CH_3CO), 63.24 (C-5'), 70.27 (C-3'), 71.19 (C-2'), 80.73 (C-4'), 85.04 (C-1'), 123.94 (C-6), 125.17 (C-7), 135.02, 138.38 (C-5 and C-7a), 144.67 (C-3a), 155.30 (C-2), 169.85 (CH_3CO), 169.86 (CH_3CO), 170.24 (CH_3CO). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$: $[\text{M}1+\text{Na}]^+ = 483.0445$, found 483.0449. Δεδομένα για το **20**: $[\alpha]_{\text{D}} +22.70$ ($c=0.185$, CHCl_3) $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 2.02 (s, 3H, CH_3CO), 2.16 (s, 3H, CH_3CO), 2.35 (s, 3H, CH_3CO), 4.31 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 2.1$ Hz, $J_{5',5'} = 12.6$ Hz), 4.43 (m, 1H, H-4'), 4.65 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 2.1$ Hz, $J_{5',5'} = 12.5$ Hz), 5.39 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'} = 3.2$ Hz, $J_{3',2'} = 6.2$ Hz), 5.47 (m, 1H, H-2'), 5.89 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 7.5$ Hz), 7.47 (br, 2H, D_2O exchangeable, NH_2), 7.52 (s, 1H, H-7). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 20.36 (CH_3CO), 20.65 (CH_3CO), 21.23 (CH_3CO), 63.01 (C-5'), 70.07 (C-3'), 71.20 (C-2'), 81.20 (C-4'), 86.11 (C-1'), 117.54 (C-7), 119.80 (C-6), 125.35 (C-7a), 141.36 (C-5), 153.77 (C-3a), 157.58 (C-2), 169.30 (CH_3CO), 169.71 (CH_3CO), 170.43 (CH_3CO). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$: $[\text{M}1+\text{Na}]^+ = 483.0445$, found 483.0440.

Γενική μέθοδος αποπροστασίας των ριβοζυλιωμένων παραγώγων: Σε διάλυμα των υπερακετυλιωμένων νουκλεοζιτών **9a-9c**, **10a-10c**, **19** και **20** σε MeOH διαβιβάζεται υπό ψύξη (0-5°C) αέρια NH_3 μέχρι κορεσμού. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες, οπότε συμπυκνώνεται υπό κενό μέχρι ξηρού υπολλείματος. Στο κατέργασμα πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης (silica gel 60-200 μm) και παραλαμβάνονται τελικά τα νουκλεοζιτικά παράγωγα **12-17**, **21** και **22** με ανακρυστάλλωση.

N-αιθυλο-5,6-διχλωρο-3-(β-D-ριβοφουρανοζυλο)-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδιν-2-αμίνη (12).

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο από το **9a** (80 mg), οπότε μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα EtOAc:MeOH (99:1) και ανακρυστάλλωση από MeOH λαμβάνονται 20 mg του **12** ως λευκό στερεό, στ: 191-192°C. $[\alpha]_D +31.88$ ($c=0.367$, MeOH) $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-*d*6) δ 1.19 (t, 3H, CH₃, $J = 7.2$ Hz), 3.41 (m, 2H, CH₂), 3.66 (m, 2H, H-5'), 3.99 (m, 1H, H-4'), 4.12 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'} = 1.5$ Hz, $J_{3',2'} = 5.2$ Hz), 4.59 (dd, 1H, H-2', $J_{2',3'} = 5.5$ Hz, $J_{2',1'} = 7.3$ Hz), 5.05-5.55 (br, 2H, D₂O exchangeable, 2 OH), 5.75 (br, 1H, D₂O exchangeable, OH), 5.96 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 7.5$ Hz), 7.64 (br, 1H, D₂O exchangeable, NH), 7.78 (s, 1H, H-7). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO-*d*6) δ 14.50 (CH₃), 37.08 (CH₂), 61.42 (C-5'), 70.29 (C-2'), 71.04 (C-3'), 85.74 (C-4'), 86.37 (C-1'), 121.03 (C-6), 122.82 (C-7), 134.65, 136.07 (C-5 and C-7a), 145.96 (C-3a), 155.48 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for C₁₃H₁₇Cl₂N₄O₄: [M1+H]⁺ = 363.0621, found 363.0615.

N-ισοπροπυλο-5,6-διχλωρο-3-(β-D-ριβοφουρανοζυλο)-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδιν-2-αμίνη

(13). Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο από το **9b** (90 mg), οπότε μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα DCM:MeOH (98:2 έως 95:5) και ανακρυστάλλωση από EtOAc/*n*-pentane λαμβάνονται 30 mg του **13** ως λευκό στερεό, στ: 127-128°C. $[\alpha]_D +30.77$ ($c=0.494$, MeOH) $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO-*d*6) δ 1.21 (d, 3H, CH₃, $J = 6.4$ Hz), 1.22 (d, 3H, CH₃, $J = 6.4$ Hz), 3.65 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 2.8$ Hz, $J_{5',5'} = 11.8$ Hz), 3.68 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 2.0$ Hz, $J_{5',5'} = 11.8$ Hz), 3.99 (m, 1H, H-4'), 4.09-4.18 (m, 2H, H-3', CH), 4.56 (dd, 1H, H-2', $J_{2',3'} = 5.4$ Hz, $J_{2',1'} = 7.6$ Hz), 5.02-5.52 (br, 2H, D₂O exchangeable, 2 OH), 5.72 (br, 1H, D₂O exchangeable, OH), 5.97 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 7.6$ Hz), 7.44 (d, 1H, D₂O exchangeable, NH), 7.78 (s, 1H, H-7). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO-*d*6) δ 22.23 (CH₃), 22.37 (CH₃), 44.36 (CH), 61.42 (C-5'), 70.25 (C-2'), 71.03 (C-3'), 85.71 (C-4'), 86.26 (C-1'), 121.00 (C-6), 122.72 (C-7), 134.60, 135.99 (C-5 and C-7a), 145.91 (C-3a), 154.84 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for C₁₄H₁₉Cl₂N₄O₄: [M1+H]⁺ = 377.0778, found 377.0786.

N-βενζυλο-5,6-διχλωρο-3-(β-D-ριβοφουρανοζυλο)-3H-ιμιδαζο[4,5-b]πυριδιν-2-αμίνη

(14). Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο από το **9c** (100 mg), οπότε μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα DCM:MeOH (98:2 έως 90:10) λαμβάνονται 80 mg με αναλογία β:α περίπου 12:1. Πραγματοποιείται δεύτερη χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα DCM:MeOH (97.5:2.5 έως 90:10), από την οποία συλλέγεται ποσότητα (~30 mg) με

αναλογία β:α περίπου 17:1. Από το μίγμα αυτό παραλαμβάνεται τελικά καθαρό το **14** (12 mg) μετά από ημιπαρασκευαστική HPLC με σύστημα έκλυσης H₂O(0,2% AA):ACN από 70:30 έως 60:40 (40 min) σε R_t=23.96 min. [α]_D +6.44 (c=0.652, MeOH). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.67 (br, 2H, H-5'), 4.02 (m, 1H, H-4'), 4.14 (br, 1H, H-3'), 4.58 (dd, 1H, CH₂, J_{CH₂-NH} = 5.8 Hz, J_{CH₂-CH₂} = 15.6 Hz), 4.63 (dd, 1H, CH₂, J_{CH₂-NH} = 6.4 Hz, J_{CH₂-CH₂} = 15.6 Hz), 4.67 (m, 1H, H-2'), 5.22 (d, 1H, D₂O exchangeable, OH, J = 4.1 Hz), 5.40 (d, 1H, D₂O exchangeable, OH, J = 6.3 Hz), 5.72 (t, 1H, D₂O exchangeable, OH-5', J = 4.3 Hz), 6.01 (d, 1H, H-1', J_{1',2'} = 7.5 Hz), 7.23 (t, 1H, phenyl, H-4, J = 7.1 Hz), 7.32 (t, 2H, phenyl, H-3,5, J = 7.6 Hz), 7.35 (d, 2H, phenyl, H-2,6, J = 7.2 Hz), 7.78 (s, 1H, H-7), 8.25 (t, 1H, D₂O exchangeable, NH, J = 6.1 Hz). ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 45.14 (CH₂), 61.45 (C-5'), 70.53 (C-2'), 71.05 (C-3'), 85.80 (C-4'), 86.46 (C-1'), 121.08 (C-6), 123.09 (C-7) 126.79 (phenyl, C-4), 126.99 (phenyl, C-2,6), 128.26 (phenyl, C-3,5), 134.73, 136.10 (C-5 and C-7a), 139.25 (phenyl, C-1), 146.01 (C-3a), 155.69 (C-2). HR-MS (ESI) *m/z*: Calcd for C₁₈H₁₇Cl₂N₄O₄: [M1-H]⁻ = 423.0621, found 423.0658.

N-αιθυλο-5,6-διχλωρο-1-(β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1H-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνη (15).

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο από το **10a** (80 mg), οπότε μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) η οποία εκλύεται με σύστημα DCM:MeOH (98:2 έως 85:15) και ανακρυστάλλωση από MeOH λαμβάνονται 25 mg του **15** ως λευκό στερεό, στ: 226-227°C. [α]_D +47.23 (c=0.271, MeOH) ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.18 (t, 3H, CH₃, J = 7.2 Hz), 3.41 (m, 2H, CH₂), 3.65 (dd, 1H, H-5', J_{5',4'} = 2.0 Hz, J_{5',5'} = 11.8 Hz), 3.68 (dd, 1H, H-5', J_{5',4'} = 1.8 Hz, J_{5',5'} = 11.8 Hz), 4.00 (m, 1H, H-4'), 4.07 (dd, 1H, H-3', J_{3',4'} = 1.6 Hz, J_{3',2'} = 5.5 Hz), 4.59 (dd, 1H, H-2', J_{2',3'} = 5.7 Hz, J_{2',1'} = 7.3 Hz), 5.22-5.37 (br, 2H, D₂O exchangeable, 2 OH), 5.72 (br, 1H, D₂O exchangeable, OH), 5.76 (d, 1H, H-1', J_{1',2'} = 7.7 Hz), 7.61 (t, 1H, D₂O exchangeable, NH, J = 5.3 Hz), 8.03 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 14.55 (CH₃), 37.52 (CH₂), 61.09 (C-5'), 70.26 (C-3'), 71.49 (C-2'), 86.00 (C-4'), 87.55 (C-1'), 117.00 (C-6), 118.13 (C-7), 126.68 (C-7a), 138.26 (C-5), 154.74 (C-3a), 157.22 (C-2). HR-MS (ESI) *m/z*: Calcd for C₁₃H₁₇Cl₂N₄O₄: [M1+H]⁺ = 363.0621, found 363.0630.

N-ισοπροπυλο-5,6-διχλωρο-1-(β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1H-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνη (16).

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο από το **10b** (90 mg), οπότε μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) η οποία εκλύεται με σύστημα DCM:MeOH (97:3 έως 88:12) και ανακρυστάλλωση από EtOAc/n-pentane λαμβάνονται 38 mg του **16** ως λευκό στερεό, στ: 191-192°C. [α]_D +45.80 (c=0.559, MeOH). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-

d6) δ ^1H NMR (600 MHz, DMSO-*d6*) δ 1.22 (d, 6H, 2 CH₃, $J = 6.6$ Hz), 3.65 (ddd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 2.5$ Hz, $J_{5',\text{OH}} = 4.4$ Hz, $J_{5',5''} = 11.9$ Hz), 3.71 (ddd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 1.7$ Hz, $J_{5',\text{OH}} = 4.4$ Hz, $J_{5',5''} = 11.9$ Hz), 4.00 (m, 1H, H-4'), 4.08 (m, 1H, H-3'), 4.11 (m, 1H, CH), 4.27 (m, 1H, H-2'), 5.27 (d, 1H, D₂O exchangeable, OH-3', $J = 3.9$ Hz), 5.30 (d, 1H, D₂O exchangeable, OH-2', $J = 7.6$ Hz), 5.70 (t, 1H, D₂O exchangeable, OH-5', $J = 4.4$ Hz), 5.78 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 7.8$ Hz), 7.37 (d, 1H, D₂O exchangeable, NH, $J = 7.7$ Hz), 8.02 (s, 1H, H-7). ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO-*d6*) δ 22.23 (CH₃), 22.33 (CH₃), 44.87 (CH), 61.11 (C-5'), 70.26 (C-3'), 71.49 (C-2'), 86.02 (C-4'), 87.53 (C-1'), 116.90 (C-6), 117.96 (C-7), 126.73 (C-7a), 138.22 (C-5), 154.76 (C-3a), 156.63 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for C₁₄H₁₉Cl₂N₄O₄: [M1+H]⁺ = 377.0778, found 377.0785.

N-βενζυλο-5,6-διγλωρο-1-(β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1H-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνη

(17). Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο από το **10c** (60 mg), οπότε μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα DCM:MeOH (97.5:2.5 έως 85:5) και ανακρυστάλλωση από τολουόλιο λαμβάνονται 25 mg του **17** ως λευκό στερεό, στ: 136-137°C. $[\alpha]_D +17.37$ ($c=0.570$, MeOH). ^1H NMR (600 MHz, DMSO-*d6*) δ 3.66 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 2.5$ Hz, $J_{5',5''} = 11.9$ Hz), 3.72 (dd, 1H, H-5', $J_{5',4'} = 1.8$ Hz, $J_{5',5''} = 11.9$ Hz), 4.03 (m, 1H, H-4'), 4.09 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'} = 1.6$ Hz, $J_{3',2'} = 5.4$ Hz), 4.32 (dd, 1H, H-2', $J_{2',3'} = 5.5$ Hz, $J_{2',1'} = 7.7$ Hz), 4.59 (d, 2H, CH₂, $J = 6.0$ Hz), 5.07-5.57 (br, 2H, D₂O exchangeable, 2 OH), 5.77 (br, 1H, D₂O exchangeable, OH), 5.83 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 7.8$ Hz), 7.24 (t, 1H, phenyl, H-4, $J = 7.2$ Hz), 7.32 (t, 2H, phenyl, H-3,5, $J = 7.5$ Hz), 7.36 (d, 2H, phenyl, H-2,6, $J = 7.4$ Hz), 8.09 (s, 1H, H-7), 8.26 (t, 1H, D₂O exchangeable, NH, $J = 6.1$ Hz). ^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO-*d6*) δ 45.71 (CH₂), 61.11 (C-5'), 70.26 (C-3'), 71.67 (C-2'), 86.10 (C-4'), 87.55 (C-1'), 117.22 (C-6), 118.50 (C-7), 126.64 (C-7a), 126.87 (phenyl, C-4), 127.21 (phenyl, C-2,6), 128.26 (phenyl, C-3,5), 138.40 (C-5), 139.24 (phenyl, C-1), 154.43 (C-3a), 157.31 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for C₁₈H₁₉Cl₂N₄O₄: [M1+H]⁺ = 425.0778, found 425.0784.

5,6-διγλωρο-3-(β-D-ριβοφουρανοζυλο)-3H-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνη (21).

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο από το **19** (120 mg), οπότε μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα DCM:MeOH (97:3 έως 90:10) και ανακρυστάλλωση από τολουόλιο λαμβάνονται 32 mg του **21** ως μπλε στερεό, στ: 142-143°C. $[\alpha]_D +16.50$ ($c=0.594$, MeOH) ^1H NMR (600 MHz, DMSO-*d6*) δ ^1H NMR (600 MHz, DMSO-*d6*) δ 3.64 (s, 2H, H-5'), 3.98 (m, 1H, H-4'), 4.12 (d, 1H, H-3', $J = 4.8$ Hz), 4.62 (t, 1H, H-2', $J = 6.1$ Hz), 5.20 (br, 1H, D₂O exchangeable, OH), 5.35 (br, 1H,

D₂O exchangeable, OH), 5.58 (br, 1H, D₂O exchangeable, OH), 5.94 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 6.1$ Hz), 7.39 (br, 2H, D₂O exchangeable, NH₂), 7.71 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 61.44 (C-5'), 70.31 (C-2'), 70.95 (C-3'), 85.73 (C-4'), 86.37 (C-1'), 121.12 (C-6), 122.58 (C-7), 134.39, 136.37 (C-5 and C-7a), 145.71 (C-3a), 156.45 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for C₁₁H₁₃Cl₂N₄O₄: [M₁+H]⁺ = 335.0308, found 335.0317.

5,6-διγλωρο-1-(β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1H-ιμιδαζο[4,5-*b*]πυριδιν-2-αμίνη (22).

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο από το **20** (40 mg), οπότε μετά από χρωματογραφία στήλης (silica gel 40-60 μm) η οποία εκλούεται με σύστημα DCM:MeOH (97:3 έως 88:12) ανακρυστάλλωση από τολουόλιο λαμβάνονται 17 mg του **22** ως μπεζ στερεό, στ: 194-195 °C. $[\alpha]_D +19.44$ ($c=0.360$, MeOH) ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.67 (m, 2H, H-5'), 3.99 (m, 1H, H-4'), 4.08 (dd, 1H, H-3', $J_{3',4'} = 1.5$ Hz, $J_{3',2'} = 5.5$ Hz), 4.29 (m, 1H, H-2'), 5.25 (br, 1H, D₂O exchangeable, OH), 5.30 (br, 1H, D₂O exchangeable, OH), 5.60 (br, 1H, D₂O exchangeable, OH), 5.76 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'} = 7.7$ Hz), 7.45 (br, 2H, D₂O exchangeable, NH₂), 8.08 (s, 1H, H-7). ¹³C-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 61.01 (C-5'), 70.07 (C-3'), 71.56 (C-2'), 85.96 (C-4'), 87.60 (C-1'), 116.70 (C-6), 118.29 (C-7), 126.13 (C-7a), 138.41 (C-5), 154.85 (C-3a), 158.06 (C-2). HR-MS (ESI) m/z : Calcd for C₁₁H₁₃Cl₂N₄O₄: [M₁+H]⁺ = 335.0308, found 335.0318.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Ryan, K. J.; Ray, C. G.; Sherris, J. C. *Sherris Medical Microbiology : An Introduction to Infectious Diseases*; The McGraw-Hill Companies. Inc, 2004.
- (2) Gerard J. Tortora; Berdell R. Funke; Christine L. Case. *Microbiology: An Introduction, 9th Edition*; Benjamin Cummings, 2007.
- (3) Mattes, F.; McLaughlin, J.; Emery, V.; Clark, D.; Griffiths, P. Histopathological Detection of Owl's Eye Inclusions Is Still Specific for Cytomegalovirus in the Era of Human Herpesviruses 6 and 7. *J. Clin. Pathol.* **2000**, *53* (8), 612–614.
- (4) Ho, M. The History of Cytomegalovirus and Its Diseases. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* **2008**, *197* (2), 65–73.
- (5) Wyatt, J. P.; Saxton, J.; Lee, R. S.; Pinkerton, H. Generalized Cytomegalic Inclusion Disease. *J. Pediatr.* **1950**, *36* (3), 271–294.
- (6) Smith, M. G. Propagation in Tissue Cultures of a Cytopathogenic Virus from Human Salivary Gland Virus (SGV) Disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1956**, *92* (2), 424–430.
- (7) Wallace, P. R.; Janet, W. H.; Samuel, W.; Horace, C. T.; Robert, J. H. Cytopathogenic Agent Resembling Human Salivary Gland Virus Recovered from Tissue Cultures of Human Adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1956**, *92* (2), 418–424.
- (8) Weller, T. H. Serial Propagation in Vitro of Agents Producing Inclusion Bodies Derived from Varicella and Herpes Zoster. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1953**, *83* (2), 340–346.
- (9) Weller, T. H.; MacAuley, J. C.; Craig, J. M.; Wirth, P. Isolation of Intranuclear Inclusion Producing Agents from Infants with Illnesses Resembling Cytomegalic Inclusion Disease.*†: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1957**, *94* (1), 4–12.
- (10) Weller, T. H.; Hanshaw, J. B.; Scott, D. E. Serologic Differentiation of Viruses Responsible for Cytomegalic Inclusion Disease. *Virology* **1960**, *12* (1), 130–132.
- (11) Weller, T. H. Cytomegaloviruses: The Difficult Years. *J. Infect. Dis.* **1970**, *122* (6), 532–539.
- (12) Revello, M. G.; Gerna, G. Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn Infant. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15* (4), 680–715.
- (13) Cunningham, C.; Gatherer, D.; Hilfrich, B.; Baluchova, K.; Dargan, D. J.; Thomson, M.; Griffiths, P. D.; Wilkinson, G. W. G.; Schulz, T. F.; Davison, A. J. Sequences of Complete Human Cytomegalovirus Genomes from Infected Cell Cultures and Clinical Specimens. *J. Gen. Virol.* **2010**, *91* (3), 605–615.
- (14) Davison, A. J.; Dolan, A.; Akter, P.; Addison, C.; Dargan, D. J.; Alcendor, D. J.; McGeoch, D. J.; Hayward, G. S. The Human Cytomegalovirus Genome Revisited: Comparison with the Chimpanzee Cytomegalovirus GenomeFN1. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84* (1), 17–28.
- (15) Gibson, W. Structure and Formation of the Cytomegalovirus Virion. In *Human Cytomegalovirus; Current Topics in Microbiology and Immunology*; Springer, Berlin, Heidelberg, 2008; pp 187–204.
- (16) Grünewald, K.; Desai, P.; Winkler, D. C.; Heymann, J. B.; Belnap, D. M.; Baumeister, W.; Steven, A. C. Three-Dimensional Structure of Herpes Simplex Virus from Cryo-Electron Tomography. *Science* **2003**, *302* (5649), 1396–1398.
- (17) Chen, D. H.; Jiang, H.; Lee, M.; Liu, F.; Zhou, Z. H. Three-Dimensional Visualization of Tegument/Capsid Interactions in the Intact Human Cytomegalovirus. *Virology* **1999**, *260* (1), 10–16.

- (18) Butcher, S. J.; Aitken, J.; Mitchell, J.; Gowen, B.; Dargan, D. J. Structure of the Human Cytomegalovirus B Capsid by Electron Cryomicroscopy and Image Reconstruction. *J. Struct. Biol.* **1998**, *124* (1), 70–76.
- (19) Newcomb, W. W.; Cockrell, S. K.; Homa, F. L.; Brown, J. C. Polarized DNA Ejection from the Herpesvirus Capsid. *J. Mol. Biol.* **2009**, *392* (4), 885–894.
- (20) Tang, J. Cytomegaloviruses: From Molecular Pathogenesis to Intervention. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19* (11), 1906.
- (21) O'Connor, C. M.; Shenk, T. Human Cytomegalovirus PUS27 G Protein-Coupled Receptor Homologue Is Required for Efficient Spread by the Extracellular Route but Not for Direct Cell-to-Cell Spread. *J. Virol.* **2011**, *85* (8), 3700–3707.
- (22) Irmieri, A.; Gibson, W. Isolation and Characterization of a Noninfectious Virion-like Particle Released from Cells Infected with Human Strains of Cytomegalovirus. *Virology* **1983**, *130* (1), 118–133.
- (23) Revello, M. G.; Gerna, G. Human Cytomegalovirus Tropism for Endothelial/Epithelial Cells: Scientific Background and Clinical Implications. *Rev. Med. Virol.* **20** (3), 136–155.
- (24) Compton, T.; Nepomuceno, R. R.; Nowlin, D. M. Human Cytomegalovirus Penetrates Host Cells by PH-Independent Fusion at the Cell Surface. *Virology* **1992**, *191* (1), 387–395.
- (25) Bodaghi, B.; Slobbe–vanDrunen, M. E. P.; Topilko, A.; Perret, E.; Vossen, R. C. R. M.; Dam–Mieras, M. C. E. van; Zipeto, D.; Virelizier, J.-L.; LeHoang, P.; Bruggeman, C. A.; et al. Entry of Human Cytomegalovirus into Retinal Pigment Epithelial and Endothelial Cells by Endocytosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1999**, *40* (11), 2598–2607.
- (26) Varnum, S. M.; Streblow, D. N.; Monroe, M. E.; Smith, P.; Auberry, K. J.; Paša-Tolić, L.; Wang, D.; Camp, D. G.; Rodland, K.; Wiley, S.; et al. Identification of Proteins in Human Cytomegalovirus (HCMV) Particles: The HCMV Proteome. *J. Virol.* **2004**, *78* (20), 10960–10966.
- (27) Kari, B.; Gehrz, R. A Human Cytomegalovirus Glycoprotein Complex Designated GC-II Is a Major Heparin-Binding Component of the Envelope. *J. Virol.* **1992**, *66* (3), 1761–1764.
- (28) Compton, T.; Nowlin, D. M.; Cooper, N. R. Initiation of Human Cytomegalovirus Infection Requires Initial Interaction with Cell Surface Heparan Sulfate. *Virology* **1993**, *193* (2), 834–841.
- (29) Compton, T. Receptors and Immune Sensors: The Complex Entry Path of Human Cytomegalovirus. *Trends Cell Biol.* **2004**, *14* (1), 5–8.
- (30) Ewald, J. A.; Wilkinson, J. C.; Guyer, C. A.; Staros, J. V. Ligand- and Kinase Activity-Independent Cell Survival Mediated by the Epidermal Growth Factor Receptor Expressed in 32D Cells. *Exp. Cell Res.* **2003**, *282* (2), 121–131.
- (31) Isaacson, M. K.; Juckem, L. K.; Compton, T. Virus Entry and Innate Immune Activation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2008**, *325*, 85–100.
- (32) Kalejta, R. F. Functions of Human Cytomegalovirus Tegument Proteins Prior to Immediate Early Gene Expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2008**, *325*, 101–115.
- (33) Kalejta, R. F. Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72* (2), 249–265.
- (34) Nitzsche, A.; Paulus, C.; Nevels, M. Temporal Dynamics of Cytomegalovirus Chromatin Assembly in Productively Infected Human Cells. *J. Virol.* **2008**, *82* (22), 11167–11180.
- (35) Ishov, A. M.; Stenberg, R. M.; Maul, G. G. Human Cytomegalovirus Immediate Early Interaction with Host Nuclear Structures: Definition of an Immediate Transcript Environment. *J. Cell Biol.* **1997**, *138* (1), 5–16.
- (36) Everett, R. D.; Chelbi-Alix, M. K. PML and PML Nuclear Bodies: Implications in Antiviral Defence. *Biochimie* **2007**, *89* (6), 819–830.

- (37) Reeves, M.; Murphy, J.; Greaves, R.; Fairley, J.; Brehm, A.; Sinclair, J. Autorepression of the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Promoter/Enhancer at Late Times of Infection Is Mediated by the Recruitment of Chromatin Remodeling Enzymes by IE86. *J. Virol.* **2006**, *80* (20), 9998–10009.
- (38) Hofmann, H.; Sindre, H.; Stamminger, T. Functional Interaction between the Pp71 Protein of Human Cytomegalovirus and the PML-Interacting Protein Human Daxx. *J. Virol.* **2002**, *76* (11), 5769–5783.
- (39) Saffert, R. T.; Kalejta, R. F. Inactivating a Cellular Intrinsic Immune Defense Mediated by Daxx Is the Mechanism through Which the Human Cytomegalovirus Pp71 Protein Stimulates Viral Immediate-Early Gene Expression. *J. Virol.* **2006**, *80* (8), 3863–3871.
- (40) Bigley, T. M.; Reitsma, J. M.; Mirza, S. P.; Terhune, S. S. Human Cytomegalovirus PUL97 Regulates the Viral Major Immediate Early Promoter by Phosphorylation-Mediated Disruption of Histone Deacetylase 1 Binding. *J. Virol.* **2013**, *87* (13), 7393–7408.
- (41) Terhune, S. S.; Moorman, N. J.; Cristea, I. M.; Savaryn, J. P.; Cuevas-Bennett, C.; Rout, M. P.; Chait, B. T.; Shenk, T. Human Cytomegalovirus UL29/28 Protein Interacts with Components of the NuRD Complex Which Promote Accumulation of Immediate-Early RNA. *PLOS Pathog.* **2010**, *6* (6), e1000965.
- (42) Li, T.; Chen, J.; Cristea, I. M. Human Cytomegalovirus Tegument Protein PUL83 Inhibits IFI16-Mediated DNA Sensing for Immune Evasion. *Cell Host Microbe* **2013**, *14* (5), 591–599.
- (43) Cristea, I. M.; Moorman, N. J.; Terhune, S. S.; Cuevas, C. D.; O’Keefe, E. S.; Rout, M. P.; Chait, B. T.; Shenk, T. Human Cytomegalovirus PUL83 Stimulates Activity of the Viral Immediate-Early Promoter through Its Interaction with the Cellular IFI16 Protein. *J. Virol.* **2010**, *84* (15), 7803–7814.
- (44) Beltran, P. M. J.; Cristea, I. M. The Life Cycle and Pathogenesis of Human Cytomegalovirus Infection: Lessons from Proteomics. *Expert Rev. Proteomics* **2014**, *11* (6), 697–711.
- (45) Edward S. Mocarski, Jr; Thomas Shenk; Paul D. Griffiths; Robert F. Pass. Cytomegaloviruses. In *Fields Virology*; Lippincott Williams & Wilkins, 2013; Vol. 2, pp 1960–2014.
- (46) Zarrouk, K.; Piret, J.; Boivin, G. Herpesvirus DNA Polymerases: Structures, Functions and Inhibitors. *Virus Res.* **2017**, *234*, 177–192.
- (47) Tomtishen III, J. P. Human Cytomegalovirus Tegument Proteins (Pp65, Pp71, Pp150, Pp28). *Virol. J.* **2012**, *9*, 22.
- (48) Milbradt, J.; Kraut, A.; Hutterer, C.; Sonntag, E.; Schmeiser, C.; Ferro, M.; Wagner, S.; Lenac, T.; Claus, C.; Pinkert, S.; et al. Proteomic Analysis of the Multimeric Nuclear Egress Complex of Human Cytomegalovirus. *Mol. Cell. Proteomics* **2014**, *13* (8), 2132–2146.
- (49) Alwine, J. C. The Human Cytomegalovirus Assembly Compartment: A Masterpiece of Viral Manipulation of Cellular Processes That Facilitates Assembly and Egress. *PLoS Pathog.* **2012**, *8* (9).
- (50) Ariza-Heredia, E. J.; Neshner, L.; Chemaly, R. F. Cytomegalovirus Diseases after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Mini-Review. *Cancer Lett.* **2014**, *342* (1), 1–8.
- (51) Rook, A. H. Interactions of Cytomegalovirus with the Human Immune System. *Rev. Infect. Dis.* **1988**, *10*, S460–S467.
- (52) Simmen, K. A.; Singh, J.; Luukkonen, B. G. M.; Lopper, M.; Bittner, A.; Miller, N. E.; Jackson, M. R.; Compton, T.; Früh, K. Global Modulation of Cellular Transcription by Human Cytomegalovirus Is Initiated by Viral Glycoprotein B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (13), 7140–7145.
- (53) Browne, E. P.; Wing, B.; Coleman, D.; Shenk, T. Altered Cellular mRNA Levels in Human Cytomegalovirus-Infected Fibroblasts: Viral Block to the Accumulation of Antiviral MRNAs. *J. Virol.* **2001**, *75* (24), 12319–12330.

- (54) Yurochko, A. D.; Hwang, E. S.; Rasmussen, L.; Keay, S.; Pereira, L.; Huang, E. S. The Human Cytomegalovirus UL55 (GB) and UL75 (GH) Glycoprotein Ligands Initiate the Rapid Activation of Sp1 and NF-KappaB during Infection. *J. Virol.* **1997**, *71* (7), 5051–5059.
- (55) Boehme, K. W.; Singh, J.; Perry, S. T.; Compton, T. Human Cytomegalovirus Elicits a Coordinated Cellular Antiviral Response via Envelope Glycoprotein B. *J. Virol.* **2004**, *78* (3), 1202–1211.
- (56) Compton, T.; Kurt-Jones, E. A.; Boehme, K. W.; Belko, J.; Latz, E.; Golenbock, D. T.; Finberg, R. W. Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-Like Receptor 2. *J. Virol.* **2003**, *77* (8), 4588–4596.
- (57) Yurochko, A. D.; Huang, E.-S. Human Cytomegalovirus Binding to Human Monocytes Induces Immunoregulatory Gene Expression. *J. Immunol.* **1999**, *162* (8), 4806–4816.
- (58) Hayden, M. S.; West, A. P.; Ghosh, S. NF-KappaB and the Immune Response. *Oncogene* **2006**, *25* (51), 6758–6780.
- (59) Sharma, S.; tenOever, B. R.; Grandvaux, N.; Zhou, G.-P.; Lin, R.; Hiscott, J. Triggering the Interferon Antiviral Response through an IKK-Related Pathway. *Science* **2003**, *300* (5622), 1148–1151.
- (60) Taniguchi, T.; Takaoka, A. The Interferon-Alpha/Beta System in Antiviral Responses: A Multimodal Machinery of Gene Regulation by the IRF Family of Transcription Factors. *Curr. Opin. Immunol.* **2002**, *14* (1), 111–116.
- (61) Stark, G. R.; Kerr, I. M.; Williams, B. R.; Silverman, R. H.; Schreiber, R. D. How Cells Respond to Interferons. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 227–264.
- (62) Wilkinson, G. W. G.; Tomasec, P.; Stanton, R. J.; Armstrong, M.; Prod'homme, V.; Aichel, R.; McSharry, B. P.; Rickards, C. R.; Cochrane, D.; Llewellyn-Lacey, S.; et al. Modulation of Natural Killer Cells by Human Cytomegalovirus. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **2008**, *41* (3), 206–212.
- (63) Macagno, A.; Bernasconi, N. L.; Vanzetta, F.; Dander, E.; Sarasini, A.; Revello, M. G.; Gerna, G.; Sallusto, F.; Lanzavecchia, A. Isolation of Human Monoclonal Antibodies That Potently Neutralize Human Cytomegalovirus Infection by Targeting Different Epitopes on the GH/GL/UL128-131A Complex. *J. Virol.* **2010**, *84* (2), 1005–1013.
- (64) Jackson, S. E.; Mason, G. M.; Wills, M. R. Human Cytomegalovirus Immunity and Immune Evasion. *Virus Res.* **2011**, *157* (2), 151–160.
- (65) Wills, M. R.; Poole, E.; Lau, B.; Krishna, B.; Sinclair, J. H. The Immunology of Human Cytomegalovirus Latency: Could Latent Infection Be Cleared by Novel Immunotherapeutic Strategies? *Cell. Mol. Immunol.* **2015**, *12* (2), 128–138.
- (66) Rossetto, C. C.; Tarrant-Elorza, M.; Pari, G. S. Cis and Trans Acting Factors Involved in Human Cytomegalovirus Experimental and Natural Latent Infection of CD14 (+) Monocytes and CD34 (+) Cells. *PLOS Pathog.* **2013**, *9* (5), e1003366.
- (67) Saffert, R. T.; Penkert, R. R.; Kalejta, R. F. Cellular and Viral Control over the Initial Events of Human Cytomegalovirus Experimental Latency in CD34+ Cells. *J. Virol.* **2010**, *84* (11), 5594–5604.
- (68) Gatherer, D.; Seirafian, S.; Cunningham, C.; Holton, M.; Dargan, D. J.; Baluchova, K.; Hector, R. D.; Galbraith, J.; Herzyk, P.; Wilkinson, G. W. G.; et al. High-Resolution Human Cytomegalovirus Transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (49), 19755–19760.
- (69) Poole, E.; Wills, M.; Sinclair, J.; Poole, E.; Wills, M.; Sinclair, J. Human Cytomegalovirus Latency: Targeting Differences in the Latently Infected Cell with a View to Clearing Latent Infection, Human Cytomegalovirus Latency: Targeting Differences in the Latently Infected Cell with a View to Clearing Latent Infection. *New J. Sci. New J. Sci.* **2014**, *2014*, 2014, e313761.
- (70) Griffiths, P.; Baraniak, I.; Reeves, M. The Pathogenesis of Human Cytomegalovirus. *J. Pathol.* **2015**, *235* (2), 288–297.

- (71) Ho, M. Epidemiology of Cytomegalovirus Infections. *Rev. Infect. Dis.* **1990**, *12*, S701–S710.
- (72) Britt, W. Manifestations of Human Cytomegalovirus Infection: Proposed Mechanisms of Acute and Chronic Disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2008**, *325*, 417–470.
- (73) Mercorelli, B.; Sinigalia, E.; Loregian, A.; Palù, G. Human Cytomegalovirus DNA Replication: Antiviral Targets and Drugs. *Rev. Med. Virol.* **2008**, *18* (3), 177–210.
- (74) Xenaki, E.; Hassoulas, J.; Apostolakis, S.; Sourvinos, G.; Spandidos, D. A. Detection of Cytomegalovirus in Atherosclerotic Plaques and Nonatherosclerotic Arteries. *Angiology* **2009**, *60* (4), 504–508.
- (75) Li, S.; Zhu, J.; Zhang, W.; Chen, Y.; Zhang, K.; Popescu, L. M.; Ma, X.; Lau, W. B.; Rong, R.; Yu, X.; et al. Signature MicroRNA Expression Profile of Essential Hypertension and Its Novel Link to Human Cytomegalovirus Infection Clinical Perspective. *Circulation* **2011**, *124* (2), 175–184.
- (76) Michaelis, M.; Doerr, H. W.; Cinatl, J. The Story of Human Cytomegalovirus and Cancer: Increasing Evidence and Open Questions. *Neoplasia N. Y. N* **2009**, *11* (1), 1–9.
- (77) Revello, M. G.; Fabbri, E.; Furione, M.; Zavattoni, M.; Lilleri, D.; Tassis, B.; Quarenghi, A.; Cena, C.; Arossa, A.; Montanari, L.; et al. Role of Prenatal Diagnosis and Counseling in the Management of 735 Pregnancies Complicated by Primary Human Cytomegalovirus Infection: A 20-Year Experience. *J. Clin. Virol.* **2011**, *50* (4), 303–307.
- (78) Kenneson, A.; Cannon, M. J. Review and Meta-Analysis of the Epidemiology of Congenital Cytomegalovirus (CMV) Infection. *Rev. Med. Virol.* **2007**, *17* (4), 253–276.
- (79) Cannon, M. J.; Davis, K. F. Washing Our Hands of the Congenital Cytomegalovirus Disease Epidemic. *BMC Public Health* **2005**, *5*, 70.
- (80) Atabani, S. F.; Smith, C.; Atkinson, C.; Aldridge, R. W.; Rodriguez-Perálvarez, M.; Rolando, N.; Harber, M.; Jones, G.; O’Riordan, A.; Burroughs, A. K.; et al. Cytomegalovirus Replication Kinetics in Solid Organ Transplant Recipients Managed by Preemptive Therapy. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **2012**, *12* (9), 2457–2464.
- (81) Grundy, J. E.; Lui, S. F.; Super, M.; Berry, N. J.; Sweny, P.; Fernando, O. N.; Moorhead, J.; Griffiths, P. D. Symptomatic Cytomegalovirus Infection in Seropositive Kidney Recipients: Reinfection with Donor Virus Rather than Reactivation of Recipient Virus. *Lancet Lond. Engl.* **1988**, *2* (8603), 132–135.
- (82) Deayton, J. R.; Prof Sabin, C. A.; Johnson, M. A.; Emery, V. C.; Wilson, P.; Griffiths, P. D. Importance of Cytomegalovirus Viraemia in Risk of Disease Progression and Death in HIV-Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *Lancet Lond. Engl.* **2004**, *363* (9427), 2116–2121.
- (83) Crumpacker, C. S. Ganciclovir. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *335* (10), 721–729.
- (84) Cvetković, R. S.; Wellington, K. Valganciclovir: A Review of Its Use in the Management of CMV Infection and Disease in Immunocompromised Patients. *Drugs* **2005**, *65* (6), 859–878.
- (85) Sullivan, V.; Talarico, C. L.; Stanat, S. C.; Davis, M.; Coen, D. M.; Biron, K. K. A Protein Kinase Homologue Controls Phosphorylation of Ganciclovir in Human Cytomegalovirus-Infected Cells. *Nature* **1992**, *358* (6382), 162–164.
- (86) Göhring, K.; Hamprecht, K.; Jahn, G. Antiviral Drug- and Multidrug Resistance in Cytomegalovirus Infected SCT Patients. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2015**, *13*, 153–158.
- (87) Schreiber, A.; Härter, G.; Schubert, A.; Bunjes, D.; Mertens, T.; Michel, D. Antiviral Treatment of Cytomegalovirus Infection and Resistant Strains. *Expert Opin. Pharmacother.* **2009**, *10* (2), 191–209.

- (88) Snoeck, R.; De Clercq, E. Role of Cidofovir in the Treatment of DNA Virus Infections, Other than CMV Infections, in Immunocompromised Patients. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* **2002**, *3* (11), 1561–1566.
- (89) Chrisp, P.; Clissold, S. P. Foscarnet. A Review of Its Antiviral Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in Immunocompromised Patients with Cytomegalovirus Retinitis. *Drugs* **1991**, *41* (1), 104–129.
- (90) Gilbert, C.; Boivin, G. Human Cytomegalovirus Resistance to Antiviral Drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49* (3), 873–883.
- (91) Razonable, R. R.; Emery, V. C.; 11th Annual Meeting of the IHMF (International Herpes Management Forum). Management of CMV Infection and Disease in Transplant Patients. 27-29 February 2004. *Herpes J. IHMF* **2004**, *11* (3), 77–86.
- (92) Kim, E. S. Letermovir: First Global Approval. *Drugs* **2018**, *78* (1), 147–152.
- (93) Goldner, T.; Hewlett, G.; Ettischer, N.; Ruebsamen-Schaeff, H.; Zimmermann, H.; Lischka, P. The Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246 (Letermovir) Inhibits Human Cytomegalovirus Replication through a Specific Antiviral Mechanism That Involves the Viral Terminase. *J. Virol.* **2011**, *85* (20), 10884–10893.
- (94) Marty, F. M.; Boeckh, M. Maribavir and Human Cytomegalovirus-What Happened in the Clinical Trials and Why Might the Drug Have Failed? *Curr. Opin. Virol.* **2011**, *1* (6), 555–562.
- (95) Price, N. B.; Prichard, M. N. Progress in the Development of New Therapies for Herpesvirus Infections. *Curr. Opin. Virol.* **2011**, *1* (6), 548–554.
- (96) James, S. H.; Hartline, C. B.; Harden, E. A.; Driebe, E. M.; Schupp, J. M.; Engelthaler, D. M.; Keim, P. S.; Bowlin, T. L.; Kern, E. R.; Prichard, M. N. Cyclopropavir Inhibits the Normal Function of the Human Cytomegalovirus UL97 Kinase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (10), 4682–4691.
- (97) Tamm, I.; Sehgal, P. B. Halobenzimidazole Ribosides and RNA Synthesis of Cells and Viruses. In *Advances in Virus Research*; Lauffer, M. A., Bang, F. B., Maramorosch, K., Smith, K. M., Eds.; Academic Press, 1978; Vol. 22, pp 187–258.
- (98) Townsend, L. B.; Devivar, R. V.; Turk, S. R.; Nassiri, M. R.; Drach, J. C. Design, Synthesis, and Antiviral Activity of Certain 2,5,6-Trihalo-1-(β-D-Ribofuranosyl)Benzimidazoles. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (20), 4098–4105.
- (99) Krosky, P. M.; Borysko, K. Z.; Nassiri, M. R.; Devivar, R. V.; Ptak, R. G.; Davis, M. G.; Biron, K. K.; Townsend, L. B.; Drach, J. C. Phosphorylation of β-D-Ribosylbenzimidazoles Is Not Required for Activity against Human Cytomegalovirus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (2), 478–486.
- (100) Underwood, M. R.; Harvey, R. J.; Stanat, S. C.; Hemphill, M. L.; Miller, T.; Drach, J. C.; Townsend, L. B.; Biron, K. K. Inhibition of Human Cytomegalovirus DNA Maturation by a Benzimidazole Ribonucleoside Is Mediated through the UL89 Gene Product. *J. Virol.* **1998**, *72* (1), 717–725.
- (101) Krosky, P. M.; Underwood, M. R.; Turk, S. R.; Feng, K. W.-H.; Jain, R. K.; Ptak, R. G.; Westerman, A. C.; Biron, K. K.; Townsend, L. B.; Drach, J. C. Resistance of Human Cytomegalovirus to Benzimidazole Ribonucleosides Maps to Two Open Reading Frames: UL89 and UL56. *J. Virol.* **1998**, *72* (6), 4721–4728.
- (102) Scheffczik, H.; Savva, C. G. W.; Holzenburg, A.; Kolesnikova, L.; Bogner, E. The Terminase Subunits PUL56 and PUL89 of Human Cytomegalovirus Are DNA-Metabolizing Proteins with Toroidal Structure. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (7), 1695–1703.
- (103) Chulay, J.; Biron, K.; Wang, L.; Underwood, M.; Chamberlain, S.; Frick, L.; Good, S.; Davis, M.; Harvey, R.; Townsend, L.; et al. Development of Novel Benzimidazole Riboside Compounds for Treatment of Cytomegalovirus Disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, *458*, 129–134.
- (104) Saluja, S.; Zou, R.; Drach, J. C.; Townsend, L. B. Structure–Activity Relationships among 2-Substituted 5,6-Dichloro-, 4,6-Dichloro-, and 4,5-Dichloro-1-[(2-Hydroxyethoxy)Methyl]- and -1-[(1,3-Dihydroxy-2-Propoxy)Methyl]Benzimidazoles. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (4), 881–891.

- (105) Gudmundsson, K. S.; Drach, J. C.; Wotring, L. L.; Townsend, L. B. Synthesis and Antiviral Activity of Certain 5'-Modified Analogs of 2,5,6-Trichloro-1-(β -d-Ribofuranosyl)Benzimidazole. *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (5), 785–793.
- (106) Zou, R.; Drach, J. C.; Townsend, L. B. Design, Synthesis, and Antiviral Evaluation of 2-Substituted 4,5-Dichloro- and 4,6-Dichloro-1- β -d-Ribofuranosylbenzimidazoles as Potential Agents for Human Cytomegalovirus Infections. *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (5), 802–810.
- (107) Zou, R.; Drach, J. C.; Townsend, L. B. Design, Synthesis, and Antiviral Evaluation of 2-Chloro-5,6-Dihalo-1- β -d-Ribofuranosylbenzimidazoles as Potential Agents for Human Cytomegalovirus Infections. *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (5), 811–818.
- (108) Chen, J. J.; Wei, Y.; Drach, J. C.; Townsend, L. B. Synthesis and Antiviral Evaluation of Trisubstituted Indole N-Nucleosides as Analogues of 2,5,6-Trichloro-1-(β -d-Ribofuranosyl)Benzimidazole (TCRB). *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (12), 2449–2456.
- (109) Gudmundsson, K. S.; Tidwell, J.; Lipka, N.; Koszalka, G. W.; van Draanen, N.; Ptak, R. G.; Drach, J. C.; Townsend, L. B. Synthesis and Antiviral Evaluation of Halogenated β -d- and -l-Erythrofuransylbenzimidazoles. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (12), 2464–2472.
- (110) Gudmundsson, K. S.; Freeman, G. A.; Drach, J. C.; Townsend, L. B. Synthesis of Fluorosugar Analogues of 2,5,6-Trichloro-1-(β -d-Ribofuranosyl)Benzimidazole as Antivirals with Potentially Increased Glycosidic Bond Stability. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (12), 2473–2478.
- (111) Chien, T.-C.; Saluja, S. S.; Drach, J. C.; Townsend, L. B. Synthesis and Antiviral Evaluation of Polyhalogenated Imidazole Nucleosides: Dimensional Analogues of 2,5,6-Trichloro-1-(β -d-Ribofuranosyl)Benzimidazole. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (23), 5743–5752.
- (112) Biron, K. K.; Harvey, R. J.; Chamberlain, S. C.; Good, S. S.; Smith, A. A.; Davis, M. G.; Talarico, C. L.; Miller, W. H.; Ferris, R.; Dornsife, R. E.; et al. Potent and Selective Inhibition of Human Cytomegalovirus Replication by 1263W94, a Benzimidazole L-Riboside with a Unique Mode of Action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (8), 2365–2372.
- (113) Prichard, M. N. Function of Human Cytomegalovirus UL97 Kinase in Viral Infection and Its Inhibition by Maribavir. *Rev. Med. Virol.* **2009**, *19* (4), 215–229.
- (114) Rosenberg, A. J.; Clark, D. A. Total Synthesis of Pentosidine. *Org. Lett.* **2012**, *14* (17), 4678–4681.
- (115) Rosenberg, A. J.; Williams, T. M.; Jordan, A. J.; Clark, D. A. Synthesis of 2-Amino-Imidazo[4,5-b]Pyridines. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (18), 3064–3072.
- (116) Deady, L. W.; Grimmett, M. R.; Potts, C. H. Studies on the Mechanism of the Nitraminopyridine Rearrangement. *Tetrahedron* **1979**, *35* (24), 2895–2900.
- (117) Chemical Papers.
- (118) White, W. N.; Lazdins, D.; White, H. S. The Acid-Catalyzed Nitramine Rearrangement. I. The Products of Rearrangement of N-Nitro-N-Methylaniline. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (8), 1517–1520.
- (119) White, W. N.; Klink, J. R. Acid-Catalyzed Nitramine Rearrangement. IV. Influence of Aromatic Ring Substituents on Rearrangement Rate. *J. Org. Chem.* **1970**, *35* (4), 965–969.
- (120) Deady, L. W.; Korytsky, O. L.; Rowe, J. E. Substituent Effects on the Isomer Ratios in the Rearrangement of Some 2- and 4-Nitraminopyridines. *Aust. J. Chem.* **1982**, *35* (10), 2025–2034.
- (121) Deady, L. W.; Korytsky, O. L. The Effect of Acid Concentration on the Pyridine Nitramine Rearrangement: An N.M.R. Study. *Aust. J. Chem.* **1983**, *36* (6), 1159–1166.
- (122) Deady, L. W.; Korytsky, O. L. Kinetic Studies on the Mechanism of the Nitraminopyridine Rearrangement. *Aust. J. Chem.* **1982**, *35* (10), 2035–2040.

- (123) Rastogi, R.; Sharma, S. 2-Aminobenzimidazoles in Organic Syntheses. *Synthesis* **1983**, 1983 (11), 861–882.
- (124) OMAR, A.-M. M. E. The Cyclodesulfurization of Thio Compounds; VII. A New Facile Synthesis of $N\alpha$ -Substituted Benzimidazoles. *Synthesis* **1974**, 1974 (1), 41–42.
- (125) Perkins, J. J.; Zartman, A. E.; Meissner, R. S. Synthesis of 2-(Alkylamino)Benzimidazoles. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40 (6), 1103–1106.
- (126) Wang, X.; Zhang, L.; Xu, Y.; Krishnamurthy, D.; Senanayake, C. H. A Practical Synthesis of 2-(N -Substituted)-Aminobenzimidazoles Utilizing CuCl-Promoted Intramolecular Cyclization of N -(2-Aminoaryl)Thioureas. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45 (38), 7167–7170.
- (127) Leonard, N. J.; Curtin, D. Y.; Beck, K. M. Sulfonate Salts of Substituted Benzimidazoles. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69 (10), 2459–2461.
- (128) Wright, J. B. Errata and Addenda - The Chemistry of the Benzimidazoles. *Chem. Rev.* **1951**, 49 (2).
- (129) Horner, J. K.; Henry, D. W. Analogs of 3-Amino-7-Chloro-1,2,4-Benzotriazine 1-Oxide as Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.* **1968**, 11 (5), 946–949.
- (130) Tanga, M. J.; Bupp, J. E.; Tochimoto, T. K. Syntheses of 1,5,6-Trimethyl-2-Aminoimidazo[4,5- b]Pyridine and 3,5,6-Trimethyl-2-Aminoimidazo[4,5- b]Pyridine. *J. Heterocycl. Chem.* **31** (6), 1641–1645.
- (131) Chrisman, W.; Tanga, M. J.; Knize, M. G. Synthesis and Mutagenic Potency of Structural Isomers of 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5- b]Pyridine. *J. Heterocycl. Chem.* **45** (6), 1641–1649.
- (132) Fader, L.; Brault, M.; Desjardins, J.; Dansereau, N.; Lamorte, L.; Tremblay, S.; Bilodeau, F.; Bordeleau, J.; Duplessis, M.; Gorys, V.; et al. Discovery of Potent, Orally Bioavailable Inhibitors of Human Cytomegalovirus. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, 7 (5), 525–530.
- (133) Rao, D. N.; Rasheed, S.; Vishwakarma, R. A.; Das, P. Copper-Catalyzed Sequential N -Arylation of C -Amino-NH-Azoles. *Chem. Commun.* **2014**, 50 (85), 12911–12914.
- (134) Fischer, E.; Helferich, B. Synthetische Glucoside Der Purine. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **47** (1), 210–235.
- (135) Davoll, J.; Lowy, B. A. A New Synthesis of Purine Nucleosides. The Synthesis of Adenosine, Guanosine and 2,6-Diamino-9- β -D-Ribofuranosylpurine. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73 (4), 1650–1655.
- (136) Davoll, J.; Lythgoe, B.; Todd, A. R. 185. Experiments on the Synthesis of Purine Nucleosides. Part XIX. A Synthesis of Adenosine. *J. Chem. Soc. Resumed* **1948**, 0 (0), 967–969.
- (137) Davoll, J.; Lythgoe, B.; Todd, A. R. 344. Experiments on the Synthesis of Purine Nucleosides. Part XX. A Synthesis of Guanosine. *J. Chem. Soc. Resumed* **1948**, 0 (0), 1685–1687.
- (138) Pliml, J.; Prystaš, M. The Hilbert-Johnson Reaction of 2,4-Dialkoxypyrimidines with Halogenoses. In *Advances in Heterocyclic Chemistry*; Katritzky, A. R., Boulton, A. J., Eds.; Advances in Heterocyclic Chemistry; Academic Press, 1967; Vol. 8, pp 115–142.
- (139) Vorbrüggen, H.; Ruh-Pohlenz, C. Synthesis Of Nucleosides. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons, Inc., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1999; pp 1–630.
- (140) Novák, J. J. K.; Šorm, F. Nucleic Acid Components and Their Analogues. XVIII. Synthesis of Anomeric 9-(2-Deoxy-1-D-Glucosyl)Adenines and of Their Anhydroderivatives. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1962**, 27 (4), 902–905.
- (141) Revankar, G. R.; Robins, R. K. Use of the Sodium Salt Glycosylation Method in Nucleoside Synthesis. *Nucleosides Nucleotides* **1989**, 8 (5–6), 709–724.
- (142) Hilbert, G. E.; Johnson, T. B. Researches on Pyrimidines. CXVII. A Method for the Synthesis of Nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1930**, 52 (11), 4489–4494.
- (143) Stevens, C. L.; Nagarajan, K. Synthesis of Aminosugar Nucleosides. *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, 5 (6), 1124–1148.

- (144) Nishimura, T.; Iwai, I. Studies on Synthetic Nucleosides, II. Novel Synthesis of Pyrimidine Glucosides. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1964**, *12* (3), 357–361.
- (145) Niedballa, U.; Vorbrueggen, H. Synthesis of Nucleosides 17. A General Synthesis of N-Glycosides. 6. On the Mechanism of the Stannic Chloride Catalyzed Silyl Hilbert-Johnson Reaction. *J. Org. Chem.* **1976**, *41* (12), 2084–2086.
- (146) Vorbrüggen, H.; Bennua, B. New Simplified Nucleoside Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19* (15), 1339–1342.
- (147) Magano, J.; Acciacca, A.; Akin, A.; Collman, B. M.; Conway, B.; Waldo, M.; Chen, M. H.; Mennen, K. E. The Synthesis of a Dopamine D2 Partial Agonist for the Treatment of Schizophrenia. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13* (3), 555–566.
- (148) Kettle, J. G.; Brown, S.; Crafter, C.; Davies, B. R.; Dudley, P.; Fairley, G.; Faulder, P.; Fillery, S.; Greenwood, H.; Hawkins, J.; et al. Diverse Heterocyclic Scaffolds as Allosteric Inhibitors of AKT. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (3), 1261–1273.
- (149) Micheli, F.; Cugola, A.; Donati, D.; Missio, A.; Pecunioso, A.; Reggiani, A.; Tarzia, G. 2,3-Dihydro-6,7-Dichloro-Pyrido[2,3-b]Pyrazine-8-Oxide as Selective Glycine Antagonist with in Vivo Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5* (12), 2129–2132.
- (150) Ko, K.; Kim, H.-J.; Ho, P.-S.; Lee, S. O.; Lee, J.-E.; Min, C.-R.; Kim, Y. C.; Yoon, J.-H.; Park, E.-J.; Kwon, Y.-J.; et al. Discovery of a Novel Highly Selective Histamine H4 Receptor Antagonist for the Treatment of Atopic Dermatitis. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (7), 2949–2961.