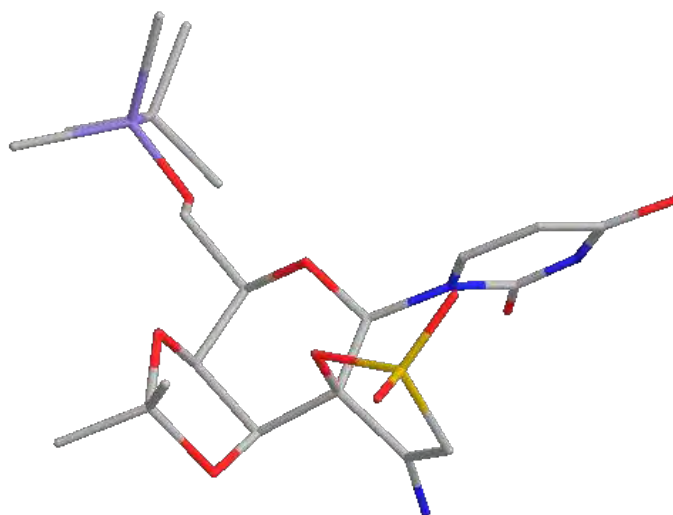




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ- ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

**«2'-ΚΥΑΝΟ ΚΑΙ 2'-ΣΠΕΙΡΟ ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ ΤΗΣ
ΟΥΡΑΚΙΑΗΣ ΩΣ ΝΕΟΙ ΠΙΘΑΝΟΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ»**



ΠΕΤΡΑΚΗΣ ΤΣΑΜΠΚΟΣ
ΛΑΡΙΣΑ 2013

Διπλωματική Εργασία

**«2'-κύανο και 2'-σπείρο πυρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης ως νέοι
πιθανοί αντικαρκινικοί και αντικοί παράγοντες»**

**«2'-cyano and 2'-spiro pyranonucleosides of uracile as potential
anticancer and antiviral agents»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

Αιμιλία Ζίφα — Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Δημητρίου Κομιώτη.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κομιώτη, για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την εκπόνησή της.

Τις θερμές ευχαριστίες μου οφείλω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κα. Στυλιανή Μαντά για τη συνεχή παρακολούθηση και υποστήριξή της. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω στον υποψήφιο διδάκτορα Χρήστο Κυρίτση, την εκτίμησή μου καθώς και ιδιαίτερες ευχαριστίες για την άψογη συνεργασία μας καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Η εμπειρία του με βοήθησε ουσιαστικά στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους.

Τέλος, δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την θερμή υποδοχή τους και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
Υδατάνθρακες.....	9
Υδατάνθρακες και σχηματισμός ημιακετάλης.....	10
Νουκλεοζίτες.....	14
Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια πεντόζη.....	15
Κύανο- φούρανο-νουκλεοζίτες	17
Σπείρο- φούρανο-νουκλεοζίτες	18
Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη.....	19
Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών.....	23
2. ΣΤΟΧΟΣ-ΣΚΟΠΟΣ	28
3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων.....	30
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	31
Χρωματογραφία στήλης.....	31
Ξήρανση διαλυτών.....	32
Ταυτοποίηση ενώσεων.....	33
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34
Επισκόπηση συνθετικής οδού.....	34
Μεθοδολογία σύνθεσης.....	35
Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-πεντα-Ο-ακετυλο-α-D- γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλης	37
Σύνθεση της 1-(α-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλης.....	38
Σύνθεση της 1-{6'-Ο-τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-(α-D- γαλακτοπυρανοζυλο)}ουρακίλης.....	39

<u>Σύνθεση της 1-(3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-6'-Ο- τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο - α-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλης.....</u>	<u>40</u>
<u>Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-6'-Ο- τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο - α-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-2'-ουλοζο)ουρακίλης.....</u>	<u>41</u>
<u>Σύνθεση των 1-(3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-6'-Ο- τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-α-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλης και 1-(3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-6'-Ο-τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο -α-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλης.....</u>	<u>42</u>
<u>Σύνθεση της 1-(2'-C-κυανο-α-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλης.....</u>	<u>43</u>
<u>Σύνθεση της 1-(2'-C-κυανο-α-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλης.....</u>	<u>44</u>
<u>Σύνθεση των 1-(3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-2'-Ο-μεζυλο-6'-Ο- τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο -α-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλης και 1-(3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-2'-Ο-μεζυλο-6'-Ο- τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο -α-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλης.....</u>	<u>45</u>
<u>Σύνθεση της [1-(3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-6'-Ο- τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-α-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλης]- 2'-σπείρο-5''-(4''-αμινο-1'',2''-οξαθειολο-2'',2''-διοξείδιο).....</u>	<u>46</u>
<u>Σύνθεση της [1-(3',4'-Ο-ισοπροπυλιδενο-6'-Ο- τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-α-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλης]- 2'-σπείρο-5''-(4''-αμινο-1'',2''-οξαθειολο-2'',2''-διοξείδιο)</u>	<u>47</u>
<u>5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H-NMR.....</u>	<u>48</u>
<u>6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</u>	<u>50</u>
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</u>	<u>51</u>

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια εξαιτίας των θεραπευτικών ιδιοτήτων που διαφαίνεται να έχουν οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί ολοένα και περισσότερο στη μελέτη και σύνθεσή τους. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά, με αντικαρκινική και αντική δράση, περιέχουν νουκλεοζίτες αποτελούμενους από μονοσακχαρίτες με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση. Αυτό το γεγονός ώθησε στην σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών με εξαμελή δακτύλιο, οι οποίοι αναμένεται να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην αντική και αντικαρκινική θεραπεία.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η συνθετική πορεία των 2'-κύανο και 2'-σπείρο πυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης με εν δυνάμει νέες αντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες.

ABSTRACT

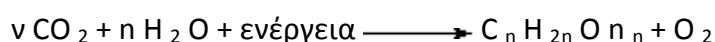
In recent years, the research interest has turned to the study and synthesis of nucleosides and nucleoside analogues, mainly because of their therapeutic potential. It is well known that many natural antibiotics with anticancer and antiviral action contain nucleosides consisting of monosaccharides with a five or six-member ring with a heterocyclic basis connected to a ring-position. This fact led to the synthesis of modified nucleosides of six-member ring, which is expected to play an important role in antiviral and anticancer therapy.

This thesis describes the synthesis of 2'-cyano and 2'- spiro pyranonucleoside of uracil with potential novel antiviral and anticancer properties.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι η πιο άφθονη κατηγορία οργανικών ενώσεων που βρίσκονται σε ζωντανούς οργανισμούς. Προέρχονται ως προϊόντα της φωτοσύνθεσης, ενδοθερμική αναγωγική συμπύκνωση του διοξειδίου του άνθρακα απαιτούν ενέργεια του φωτός και τη χρωστική χλωροφύλλη.



Όπως σημειώνεται εδώ, οι τύποι των πολλών υδατανθράκων μπορούν να γραφτούν σαν υδρίτες άνθρακα, $\text{C}_n (\text{H}_2\text{O})_n$. Οι υδατάνθρακες είναι μια σημαντική πηγή μεταβολικής ενέργειας, τόσο για τα φυτά και για τα ζώα που εξαρτώνται από τα φυτά για τα τρόφιμα. Οι υδατάνθρακες επίσης χρησιμεύουν ως ένα δομικό υλικό (κυτταρίνη), θέσεις αναγνώρισης στις κυτταρικές επιφάνειες, στη μεταφορά ενέργειας και σαν μια από τις τρεις βασικές συστατικές στο DNA και RNA. Υδατάνθρακες ονομάζονται σακχαρίτες, ή, εφόσον είναι σχετικά μικροί, σάκχαρα.

Υπάρχουν τέσσερις κύριες κατηγορίες υδατανθράκων βιολογικού ενδιαφέροντος:

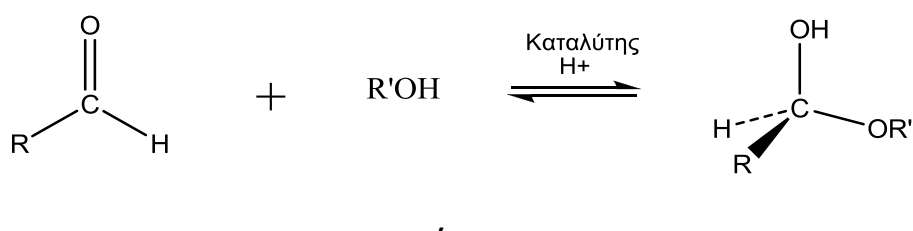
- Οι μονοσακχαρίτες, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, που αποτελούν τα μονομερή για την σύνθεση πολυπλοκότερων δομών.
- Οι δισακχαρίτες που αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες. Τέτοιοι είναι η λακτόζη, η μαλτόζη και η σακχαρόζη.
- Οι ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από 20-30 μονοσακχαρίτες.
- Οι πολυσακχαρίτες, όπως είναι το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη, που αποτελούνται από εκατοντάδες χιλιάδες μονομερή.

Οι μονοσακχαρίτες, οι απλούστεροι υδατάνθρακες, είναι αλδεύδες ή κετόνες με δύο ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Οι μικρότεροι μονοσακχαρίτες με $n=3$ είναι η διυδροξυακετόνη και η D- ή L-γλυκεραλδεύδη και αναφέρονται ως τριόζες.

Απλοί μονοσακχαρίτες με τέσσερα, πέντε, έξι και επτά άτομα άνθρακα καλούνται τετρόζες, πεντόζες, εξόζες και επτόζες αντίστοιχα.

Υδατάνθρακες και Σχηματισμός Ημιακετάλης

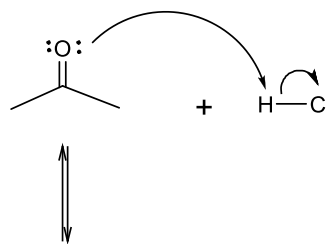
Είναι γνωστό ότι οι αλκοόλες (οποιαδήποτε οργανική ένωση που περιέχει ένα ή περισσότερα υδροξύλια (-OH), συνδεδεμένα με άτομο άνθρακα και εφόσον το υδροξύλιο είναι η κύρια χαρακτηριστική ομάδα της ένωσης) πραγματοποιούν μια γρήγορη και αντιστρεπτή πυρηνόφιλη προσθήκη (Εικόνα 1) με κετόνες ή αλδεΐδες προς σχηματισμό ημιακεταλών με γενικό τύπο $RCH(OH)OR_1$ (Mc Murry, 2000, p. 1245).



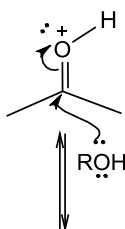
Εικόνα 1: Πυρηνόφιλη Προσθήκη

Ο μηχανισμός της αντίδρασης περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα (Mc Murry, 2000, p. 905).

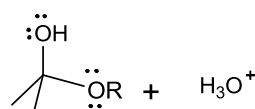
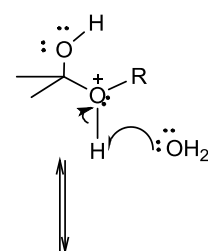
Η πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου πολώνει έντονα το καρβονύλιο και...



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

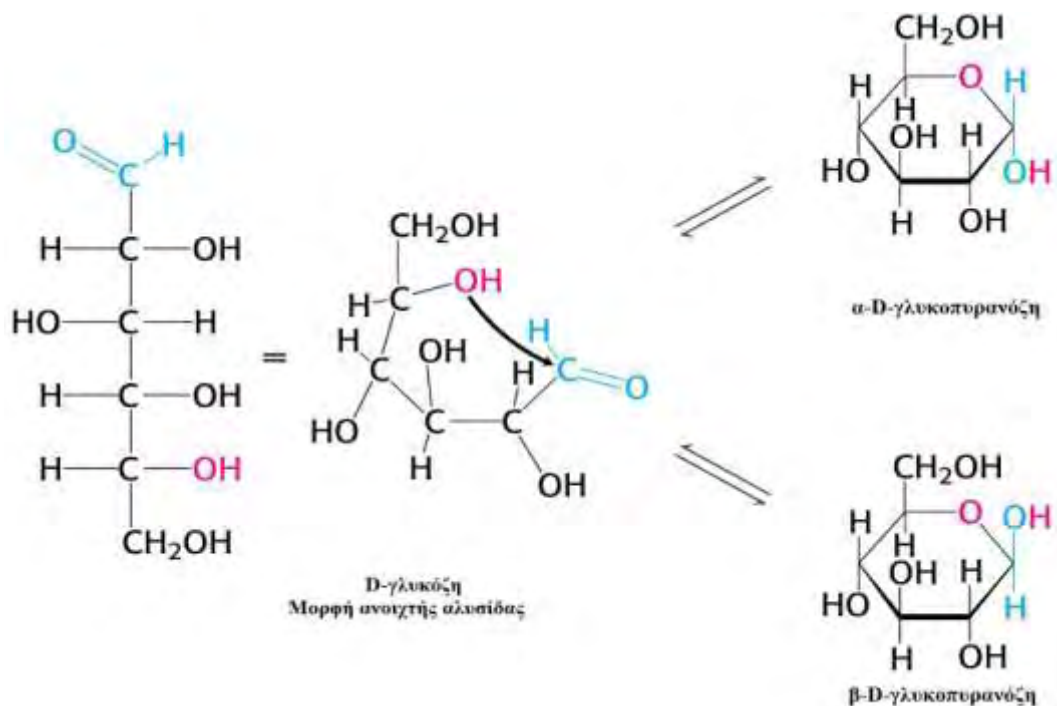


Απόσπαση ενός πρωτονίου οδηγεί σε ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, μια ουδέτερη ημιακετάλη

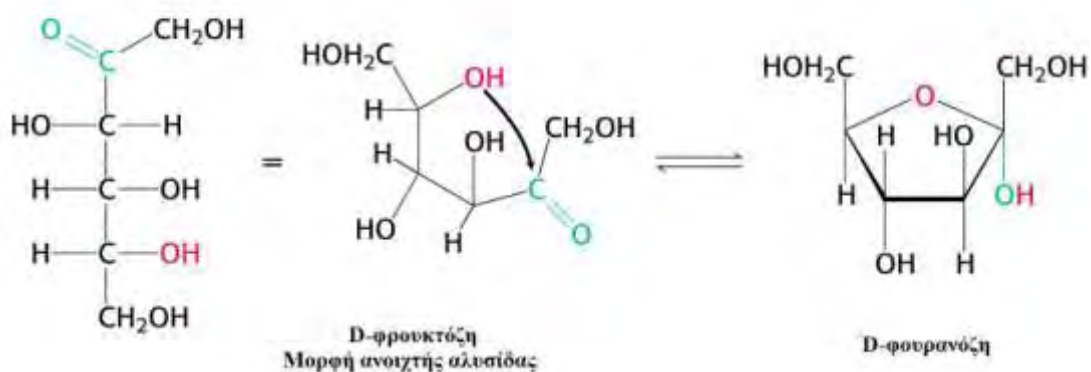


Δεδομένου ότι οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν σε δύο μορφές: τη μορφή ανοιχτής αλυσίδας και την κυκλοποιημένη μορφή εφόσον η υδροξυλομάδα και το καρβονύλιο βρίσκονται στο ίδιο μόριο μπορεί να πραγματοποιηθεί η πυρηνόφιλη προσθήκη προς σχηματισμό κυκλικής ημιακετάλης.

Αυτή η ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη καταλήγει στη δημιουργία φουρανοζών (πενταμελείς δακτύλιοι) ή πυρανοζών (εξαμελείς δακτύλιοι). Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό και αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοιχτής και κλειστής αλυσίδας. Αναλυτικότερα, στην περίπτωση της πυρανόζης η αλδεϋδική ομάδα του άνθρακα C-1 της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο που βρίσκεται στη θέση C-5, σχηματίζοντας αρχικά μια ενδομοριακή ημιακετάλη και στη συνέχεια το επιθυμητό μόριο (Εικόνα 2). Ενώ στην περίπτωση της φουρανόζης, η κετονική ομάδα του άνθρακα C-2 αντιδρά με το υδροξύλιο του άνθρακα C-5 προς σχηματισμό τους πενταμελούς δακτυλίου της φουρανόζης (Εικόνα 3).



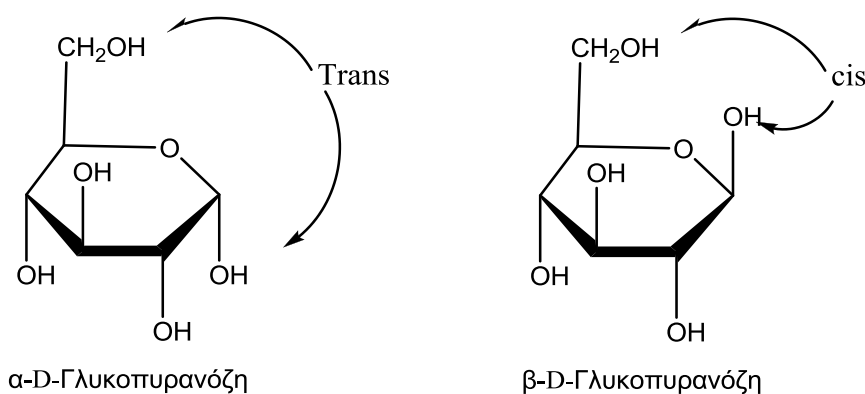
Εικόνα 2: Σχηματισμός γλυκοπυρανόζης



Εικόνα 3: Σχηματισμός φουρανόζης

Με την κυκλοποίηση των σακχάρων σε ημιακετάλη σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο (άνθρακας με τέσσερις διαφορετικούς υποκαταστάτες) στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα και παρουσιάζεται το φαινόμενο της ανωμέρειας(η στερεοχημική ισομέρεια δηλαδή μεταξύ α- και β- ισομερών εφόσον βέβαια η υπόλοιπη στερεοχημική τους δομή είναι ίδια, σελ 178 Νικολαΐδης). Στην περίπτωση της γλυκόζης, ο άνθρακας στη θέση C-1 είναι ανωμερής και

σχηματίζονται έτσι δύο στερεοχημικές δομές: η α-D- γλυκοπυρανόζη και η β-D- γλυκοπυρανόζη (Εικόνα 4). Οι χαρακτηρισμοί α- και β- αναφέρονται στη θέση στον χώρο όπου βρίσκεται η υδροξυλομάδα του ανωμερούς άνθρακα σε σχέση με τον υποκαταστάτη του C-5. Όταν ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου ως προς τον υποκαταστάτη του άνθρακα στη θέση C-5 (θέση trans), τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως ανωμερές α. Όταν ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με τον υποκαταστάτη του άνθρακα C-5, τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως ανωμερές β. Στην περίπτωση της φουρανόζης, ο ανωμερής άνθρακας είναι ο C-2.



Εικόνα 4: Ανωμερή της D-γλυκόζης

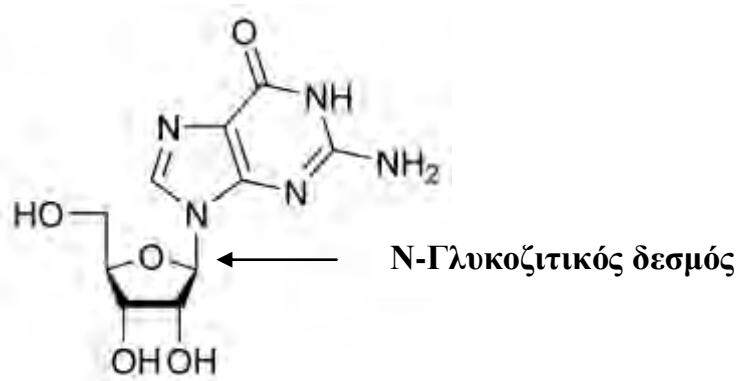
Οι δομές αυτές (Haworth) δεν παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης. Ο συγκεκριμένος δακτύλιος δεν είναι δυνατό να είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα.

Οι δακτύλιοι της πυρανόζης μπορούν να υιοθετήσουν στερεοδιατάξεις ανακλίντρου, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι τάσεις, αφού όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες μεταξύ των γειτονικών ατόμων άνθρακα μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνίας (Mc Murry, 2000, p. 151).

Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς της φύσης, καθώς αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA.

Συγκεκριμένα, οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες, οι οποίες προκύπτουν από την ένωση μιας βάσης, είτε είναι πουρίνη (αδενίνη, γουανίνη) είτε είναι πυριμιδίνη (θυμίνη, κυτοσίνη, ουρακίλη), με τον άνθρακα C-1 μιας πεντόζης μέσω β-N-γλυκοζιτικού δεσμού (Berg J. M. et al, 2001). Αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, τότε γίνεται λόγος για ριβονουκλεοζίτη και δεοξυριβονουκλεοζίτη αντίστοιχα. Τα μόρια αυτά έχουν β στερεοδιάταξη, γιατί η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: β- στερεοδιάταξη του N-γλυκοζιτικού δεσμού της γουανοσίνης

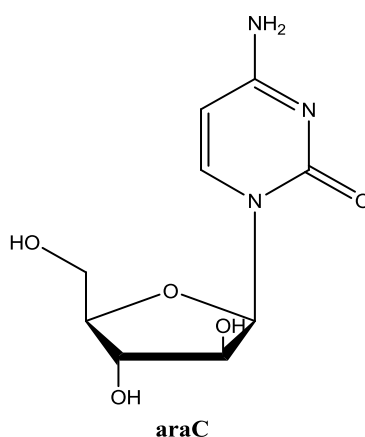
Έχει διαπιστωθεί ότι οι νουκλεοζίτες και τα τροποποιημένα ανάλογά τους επιδεικνύουν σημαντική αντικαρκινική, αντιβακτηριακή και αντική δράση. Επίσης, έχει βρεθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. Γι' αυτούς τους λόγους η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην κατανόηση της σχέσης δομής-δράσης των νουκλεοζιτών καθώς και στην τροποποίησή τους, είτε σε επίπεδο σακχάρου είτε σε επίπεδο βάσης, με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών δραστηριοτήτων τους.

Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια πεντόζη

Ο σπουδαίος ρόλος των πεντοζών επισημάνθηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως κύριες δομικές μονάδες των νουκλεϊκών οξέων. Η πλειοψηφία των μέχρι τώρα ερευνητικών προσπαθειών για τη δημιουργία φαρμάκων με αντικική και αντικαρκινική δράση, επικεντρώθηκε στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη.

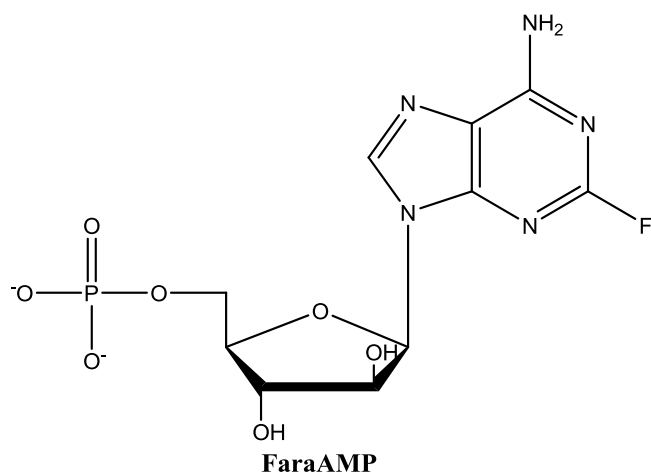
Χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας με σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες αποτελούν οι εξής:

- Το Cytarabine (araC) (Εικόνα 6), το οποίο είναι ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο που χρησιμοποιήθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας



Εικόνα 6: Χημική δομή του araC

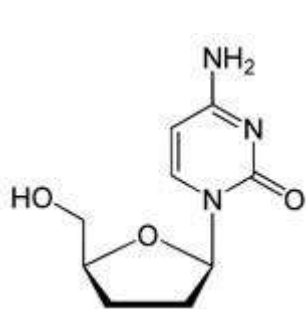
Η 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλαδενίνη (araA) είναι ένα από τα πρώτα πουρινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα, το οποίο απορρίφθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας λόγω της χαμηλής διαλυτότητας και της γρήγορης απαμίνωσής της από την απαμινάση της αδενοσίνης. Η προσθήκη ενός ατόμου φθορίου στο τμήμα της αδενίνης αύξησε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



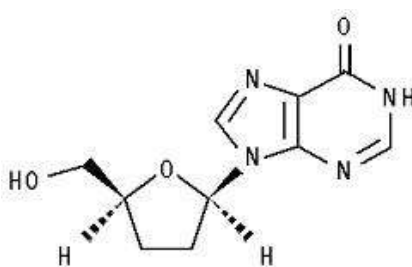
Εικόνα 7: Χημική δομή του FaraAMP

Επίσης, μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα φουρανο νουκλεοζιτών με εξαιρετική αντική δράση είναι οι εξής:

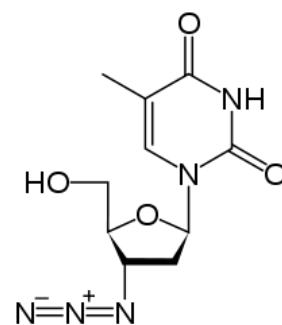
- Τα Zalcitabine (DDC), didanosine (DDI), zidovudine (AZT), τα οποία λειτουργούν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης και χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα έναντι του HIV (Εικόνα 11). Πρόκειται για 2',3'-διδεοξυνουκλεοζίτες που προκύπτουν από την απομάκρυνση των υδροξυλομάδων από τις 2',3'- θέσεις του δακτυλίου της ριβόζης.



DDC



DDI

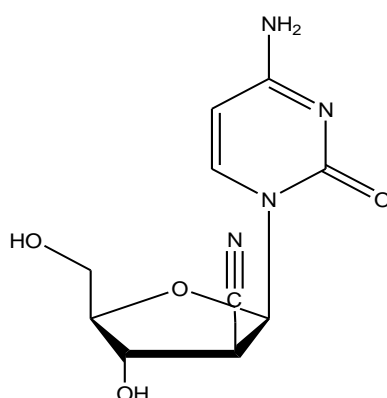


AZT

Εικόνα 8: Χημική δομή των DDC, AZT, DDI

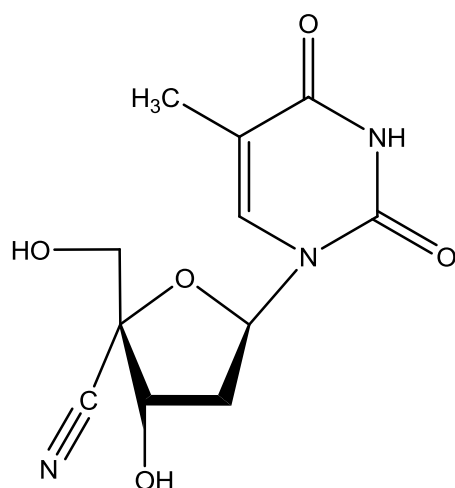
Κυανο-φουρανο-νουκλεοζίτες

Γενικά η κυανο ομάδα εμφανίζει ελάχιστες στεreoχημικές παρεμποδίσεις εξαιτίας του μικρού της μεγέθους καθώς και υψηλή ηλεκτραρνητικότητα, γεγονός που μπορεί να προσδώσει ιδιαίτερες χημικές ιδιότητες στο μόριο και να αλλάξει τη βιολογική του δραστηριότητα. Ως εκ τούτου στο πεδίο έρευνας των φούρανο-νουκλεοζιτών μελετήθηκε η εισαγωγή της κυανο ομάδα σε διάφορες θέσεις του σακχάρου για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων (O-Yang et al. 1992, Satoru et al. 2003). Ορόσημο στη μελέτη των κυανοφουρανονουκλεοζιτών αποτελεί η ανακάλυψη του CNDAC (**Εικόνα 9**) (2'-C-κυανο-2'-δεοξυ-1-β-D-αραβινοφουρανοσυλοκυτοσίνη) (Motohiro Tanaka et al. 1992), το οποίο αποτελεί σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα έναντι μεγάλου φάσματος κακοήθων όγκων, όπως αυτού του πνεύμονα και του στομάχου.



Εικόνα 9: Χημική δομή του CNDA

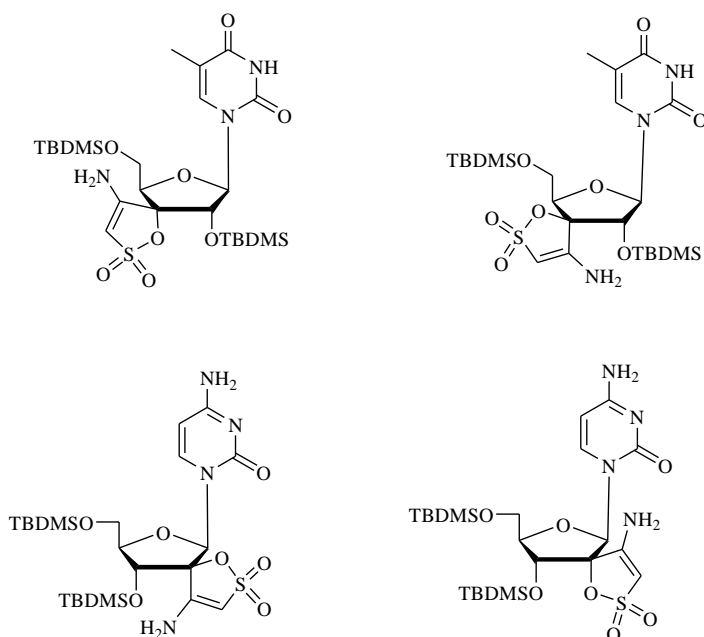
Επιπλέον, διάφοροι κυανοφουρανονουκλεοζίτες έχουν αναφερθεί σαν ενδιαφέροντες αντιικοί παράγοντες, όπως το 4'-κυανο αναλόγο της θυμιδίνης (**Εικόνα 10**) που παρουσιάζει ισχυρή αντι- HIV δράση (O-Yang et al. 1992).



Εικόνα 10: Χημική δομή της 4'-κυανο θυμιδίνης

Σπειρο-φουρανο-νουκλεοζίτες

Πρόσφατα, ενδιαφέρον προέκυψε για μια νέα κατηγορία διακλαδισμένων φουρανο-νουκλεοζιτών των λεγόμενων σπειρο-νουκλεοζιτών, οι οποίοι διαθέτουν έναν επιπλέον δακτύλιο στο τμήμα του σακχάρου. Πλήθος σπειρο-νουκλεοζιτικών αναλόγων συντέθηκαν τα τελευταία χρόνια, ενώ κάποια απ' αυτά εμφάνισαν αξιοσημείωτη δράση έναντι του ιού HIV. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ύπαρξη ισχυρής αντιϊκής δράσης αποτελεί η παρουσία της λιπόφιλης tert-βουτυλοδιμεθυλο-σιλυλο ομάδας στο φουρανοζικό δακτύλιο. Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα της συγκεκριμένης κατηγορίας νουκλεοζιτών φαίνονται παρακάτω στην παρακάτω εικόνα **11**(Camarasa *et al.* , Velázquez *et al.*).



Εικόνα 11 : Χημική δομή σπείρο-φούρανο-νουκλεοζιτών

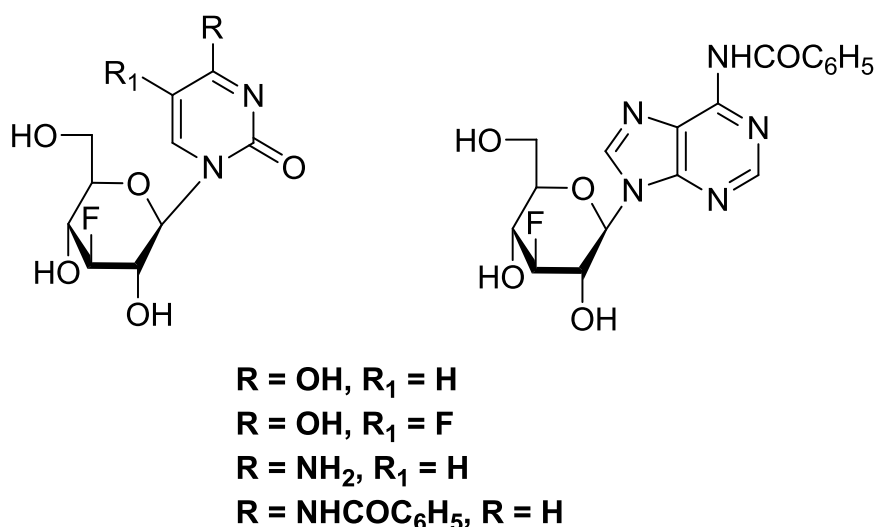
Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη

Όπως προαναφέρθηκε, οι φουρανονουκλεοζίτες γενικά παρουσίασαν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, ωστόσο εμφάνισαν περιορισμένη δράση καθώς υφίστανται, σχετικά εύκολα, χημική ή ενζυμική απενεργοποίηση. Επιπλέον, δεν μεταβολίζονται επαρκώς προς τις ενεργές τριφωσφορικές τους δομές, έχουν μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, παρουσιάζουν αυξημένη τοξικότητα ενώ ακόμη ευθύνονται για την εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιικών στελεχών και κακοηθών όγκων. Ως εκ τούτου, το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε προς μια άλλη κατηγορία νουκλεοζιτών, αυτή των πυρανονουκλεοζιτών η οποία θεωρήθηκε ελπιδοφόρα.

Έτσι λοιπόν, τα τελευταία χρόνια, συντέθηκαν νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους και ελέγχθηκαν για τις πιθανές αντιικές (Ostrowski et al. 1998), αντικαρκινικές (Malsen et al. 2004), αντιοξειδωτικές (Spanou et al. 2007) καθώς και αντιβιοτικές τους ιδιότητες (Haouz et al. 2003). Μάλιστα νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη εμφάνισαν σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως αντίσταση στην υδρόλυση, καθώς το σπάσιμο του γλυκοζιτικού δεσμού είναι ένα συνηθισμένο μονοπάτι αποικοδόμησης των νουκλεοζιτικών, ιδιαίτερα των 2',3'-διδεοξυνουκλεοζιτών. Τα πυρανονουκλεοζιτικά

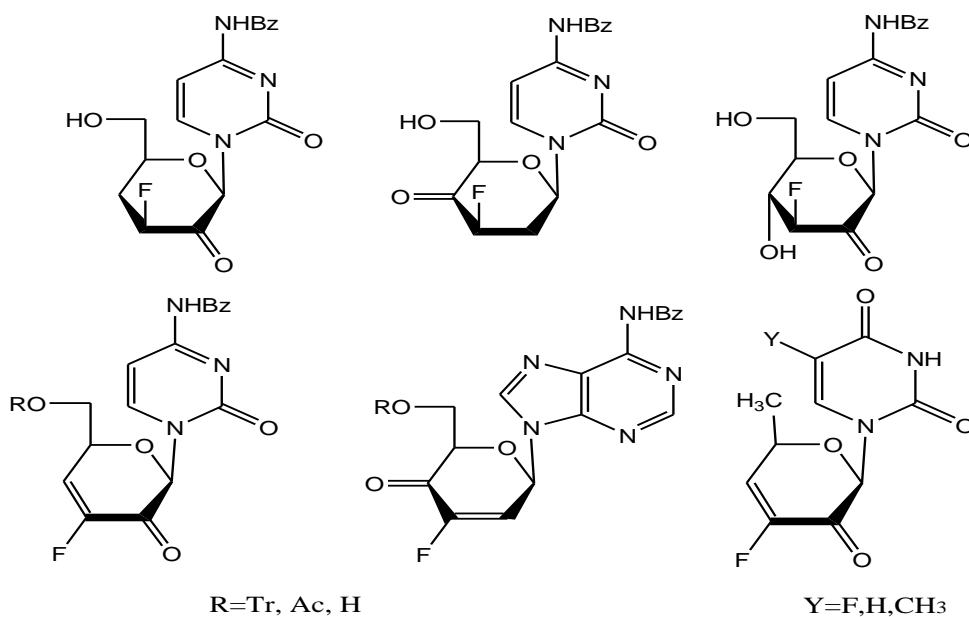
ανάλογα διαθέτουν λοιπόν αυξημένη σταθερότητα, μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής, άρα και εν δυνάμει περισσότερο χρόνο δράσης.

Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έχουν συντεθεί φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Manta et al. 2007), οι οποίοι μειώνουν αποτελεσματικά τη δραστικότητα της PARN, ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(A) ουράς) **(Εικόνα 12)**.



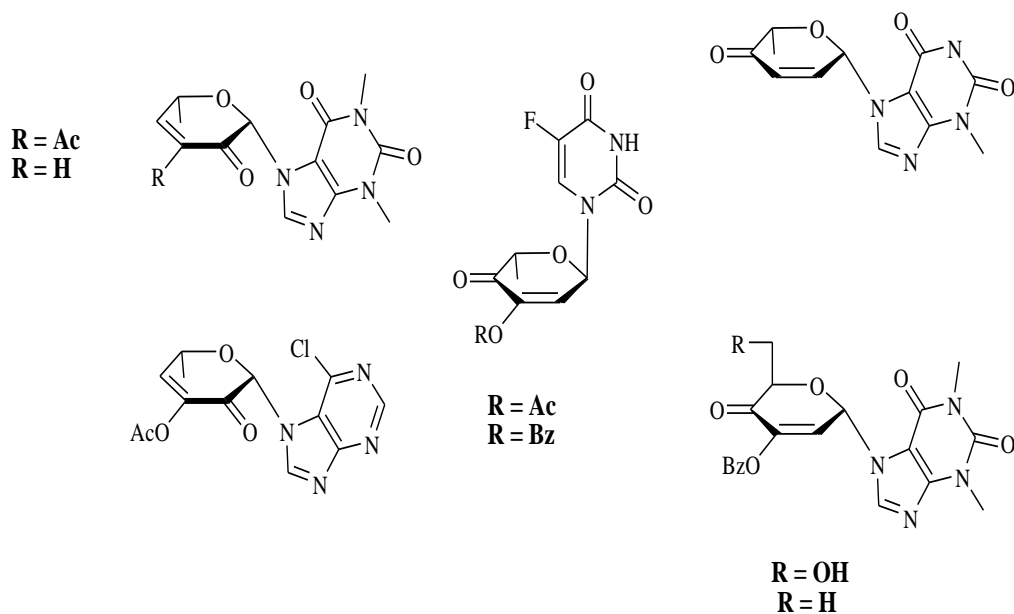
Εικόνα 12: Χημική δομή φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών

Επιπλέον έχουν αξιολογηθεί νέες σειρές νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο και πιο συγκεκριμένα οι φθοροκετο και ακόρεστοι φθοροκετο -πυρανονουκλεοζίτες. Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης εντεροϊού και αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Manta et al. 2007, Manta et al. 2008, Manta et al. 2009) **(Εικόνα 13)**.



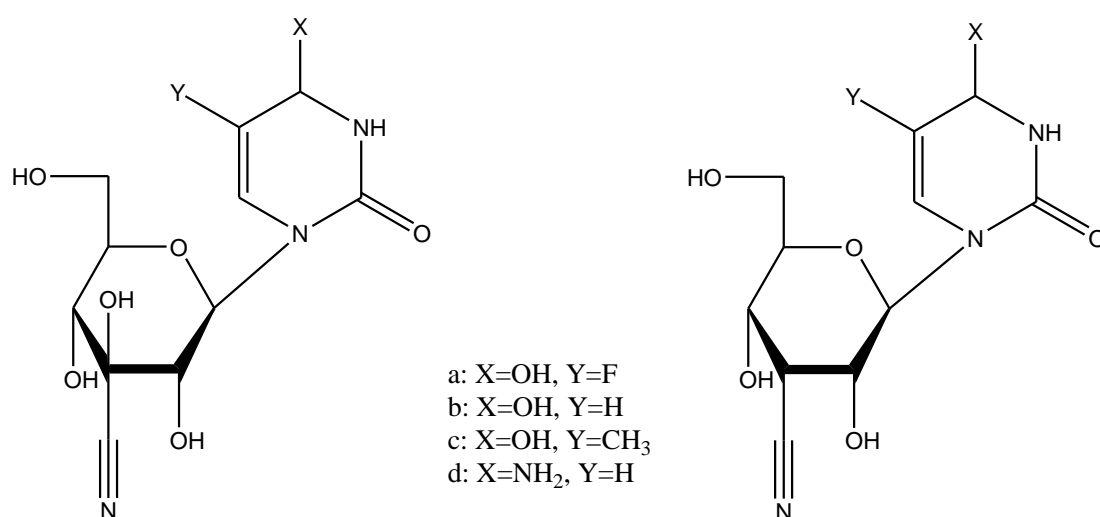
Εικόνα 13: Χημική δομή φθοροκέτο και ακόρεστων φθοροκέτο-πυρανονουκλεοζιτών

Επιπρόσθετα, ακόρεστα κετο-πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα παρουσίασαν, σε προηγούμενες μελέτες, σημαντική ανασταλτική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων *in vitro* αλλά και *in vivo* (Komiotis et al. 1991, Patterson et al. 1998, Komiotis et al. 2008). **(Εικόνα 14)**.



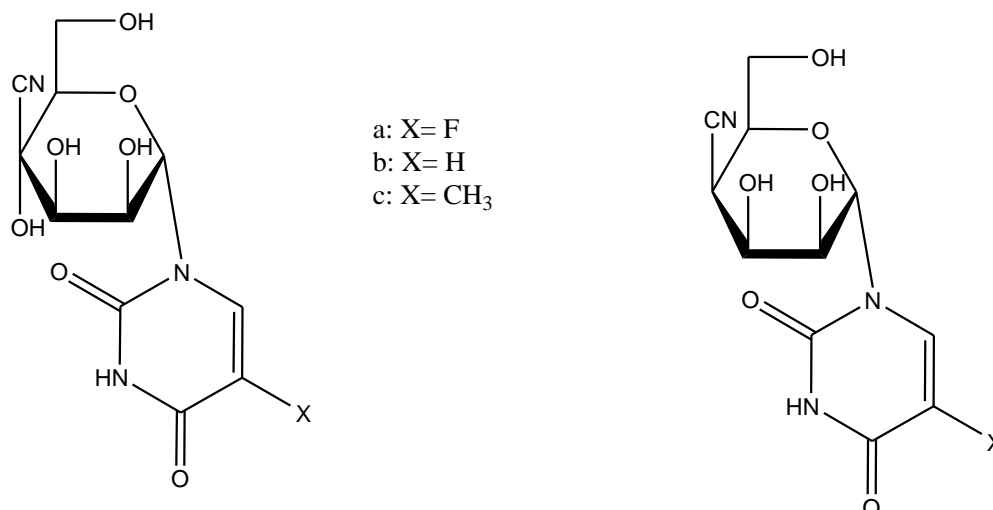
Εικόνα 14: Ακόρεστα κετο-πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα

Επίσης, τα τελευταία χρόνια ενδιαφέρον προέκυψε από μελέτες στην τάξη των 3'-κυανο- και 3'-δεοξυ-κυανο πυρανονουκλεοζιτών (Kiritsis et al., 2011) που παρουσίασαν σημαντική κυτταροστατική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων Τ-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και κατά του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: 3' κύανο-νουκλεοζίτες

Τέλος ενδιαφέρον παρουσίασαν και μια νέα πρόσφατη τάξη των 4'κυανο- και 4'-δεοξυ-κυανο πυρανονουκλεοζιτών οι οποίες έδειξαν την ανασταλτική και κυτταροτοξική τους δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa).



Εικόνα 16: 4' κύανο-νουκλεοζίτες

Τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών

Η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών όπως είναι γνωστό πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά αλλά έχουν και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επίσης πραγματοποιείται ενδοκυτταρική τροποποίησή τους με σκοπό την παραγωγή των νουκλεοτιδίων. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν τα νουκλεοτίδια ως βασικές δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA. Με βάση την παραπάνω αναφορά για παθητική διάχυση, χρησιμοποιήθηκε η παρούσα ιδιότητα για την εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων, μορίων που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, ως αντιικών και αντικαρκινικών παραγόντων για τη θεραπεία πολλών ασθενειών .

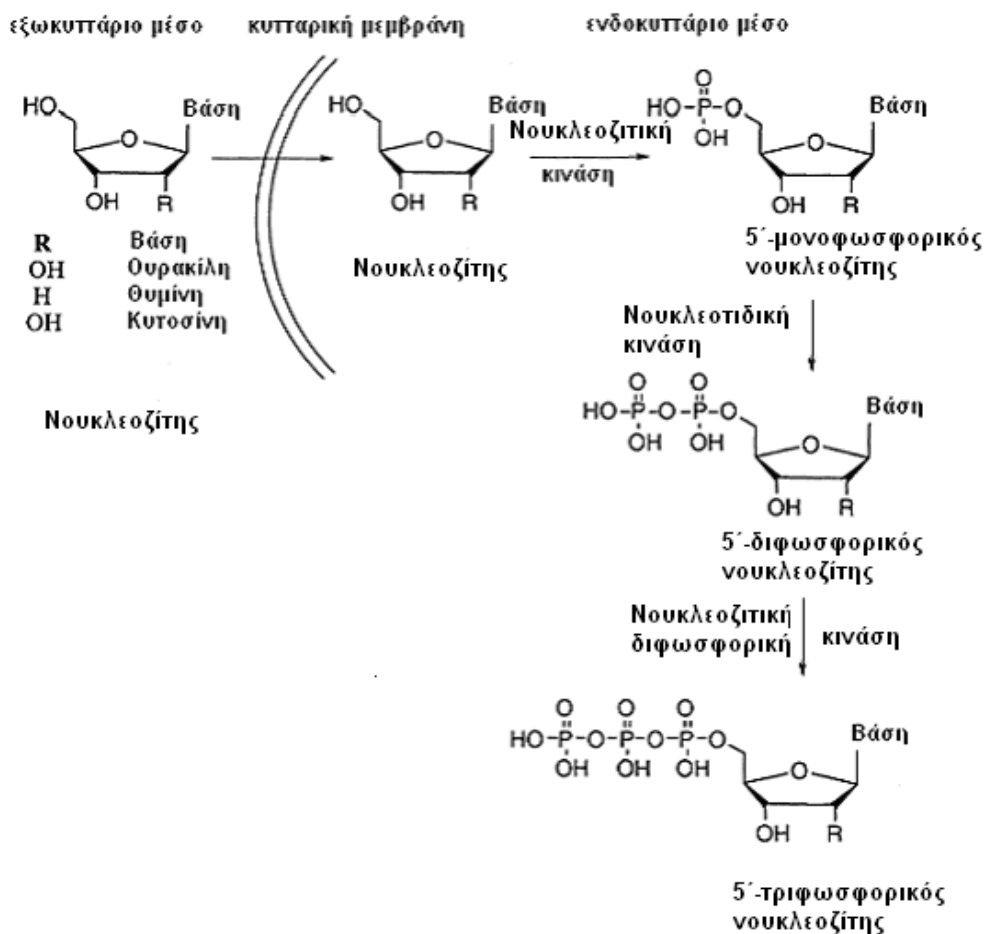
Τα φάρμακα, που ως δραστική ουσία έχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο, επιβάλλεται να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μοριακό στόχο προκειμένου να είναι

δραστικά. Στην κατηγορία των μοριακών στόχων των νουκλεοζιτικών αναλόγων υπάγονται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα . Οι πιο κοινοί τύποι πρωτεϊνών με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα φάρμακα είναι οι υποδοχείς, οι διάλυτοι ιόντων, τα ενζυμα και τα μόρια μεταφορείς.Ο βασικός λόγος που τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου και του AIDS, είναι ότι μπορούν να τροποποιηθούν δομικά, έτσι ώστε να παράγουν φαρμακολογικώς ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας τις περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Στη συνέχεια, μπορούν να παρέμβουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, έτσι ώστε να προωθήσουν είτε αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα. Τα αντικαρκινικά και τα αντικά ανάλογα εμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό και την επισκευή του κυτταρικού DNA και τον αναδιπλασιασμό του ιικού γενώματος. Αυτά τα θεραπευτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση. Αν και τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, τα μη φωσφορυλιωμένα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες - μεταφορείς νουκλεοζιτών. Φωσφορυλιώνονται κατόπιν προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αλληλεπιδρούν με τις ικές πολυμεράσες.

Οι ικές πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντικό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντικών φαρμάκων. Μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοζιτών, τα αντικά φάρμακα νουκλεοζιτικών αναλόγων ενσωματώνονται στο ιικό γονιδίωμα από τις ικές πολυμεράσες, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του γενετικού υλικού. Αυτό το γεγονός εξασθενίζει τη σύνθεση ή τη λειτουργία του ιικού γονιδιώματος που προκύπτει και επομένως καταστέλλει την αντιγραφή του ιού. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα πιθανόν να είναι κατάλληλα για τη θεραπεία χρόνιων ιικών ασθενειών. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ως φάρμακα έχουν γενικά υψηλή εκλεκτικότητα, εξαιρετη δραστική

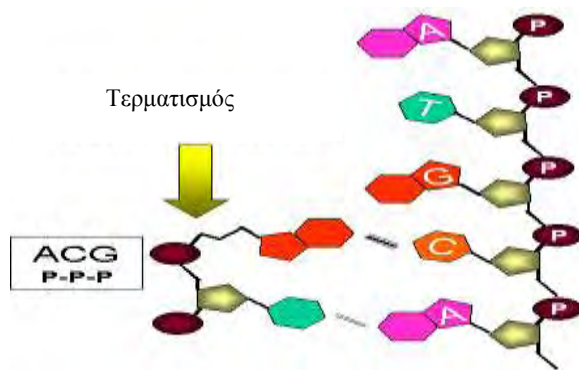
ικανότητα και μεγάλη διάρκεια δράσης. Επίσης τα ανάλογα των νουκλεοζιτών μπορούν να δράσουν και ως προφάρμακα, δεδομένου ότι πρέπει να φωσφορυλιωθούν στην 5' θέση του υδατάνθρακα από τις κυτταρικές κινάσες για να μπορέσουν να δράσουν κι αυτό είναι το «κλειδί» στην επιλεκτικότητά τους.

Η φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων στο κύτταρο, τα ενεργοποιεί και ανταγωνίζονται με τα φυσικά νουκλεοτίδια για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Επειδή η αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων είναι κοινή για όλες τις μορφές ιών, τα ανάλογα νουκλεοζιτών έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντική θεραπεία. Επειδή οι φωσφορυλιωμένες ενώσεις ιονίζονται συνήθως στο σώμα λόγω του διαφορετικού pH στα διάφορα διαμερίσματα, δεν μεταφέρονται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Οι ενεργές μορφές των νουκλεοτιδίων αποτελούν τριφωσφορικά άλατα, με όλες τις αντικαταστάσεις φωσφορικών στην 5'-θέση από ειδικές ιικές-κινάσες που συχνά καταλύουν την πρώτη 5'-φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων, με την επόμενη φωσφορυλίωση από τις κυτταρικές κινάσες. Η πρώτη φωσφορυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (MP) συνήθως καταλύεται από μία νουκλεοζιτική κινάση που κωδικοποιείται από το κύτταρο-ξενιστή ή τον ιό που μολύνει το κύτταρο-ξενιστή. Η μετατροπή των νουκλεοζιτών-MP προς τις αντίστοιχες 5'-διφωσφορικές και τριφωσφορικές δομές πραγματοποιείται από νουκλεοτιδικές κινάσες, καθώς και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντίστοιχα (**Εικόνα 17**). Συνεπώς, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι ιικές κινάσες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών.



Εικόνα 17 : Φωσφορυλίωση των ανάλογων νουκλεοζιτών

Αυτό μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση των ανάλογων φωσφορυλιωμένων νουκλεοτιδίων κυρίως στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί με ιό. Τα τμήματα των νουκλεϊκών οξέων διαμορφώνονται από τις κυτταρικές πολυμεράσες, οι οποίες συνδέουν το 5'-νουκλεοτίδιο στην ομάδα 3'-υδροξυλίου ενός άλλου νουκλεοτιδίου. Σε αυτή την διαδικασία, απελευθερώνεται πυροφωσφορική ομάδα (PPi) και οι δύο ζάχαρες συνδέονται με φωσφοδιεστερική γέφυρα. Το σάκχαρο, είναι το τμήμα του νουκλεοζίτη που χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τις κινάσες και τις πολυμεράσες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την επιμήκυνση των αλυσίδων. Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας (**Εικόνα 18**).



Εικόνα 18: Τερματισμός αλυσίδας νουκλεϊκών οξέων

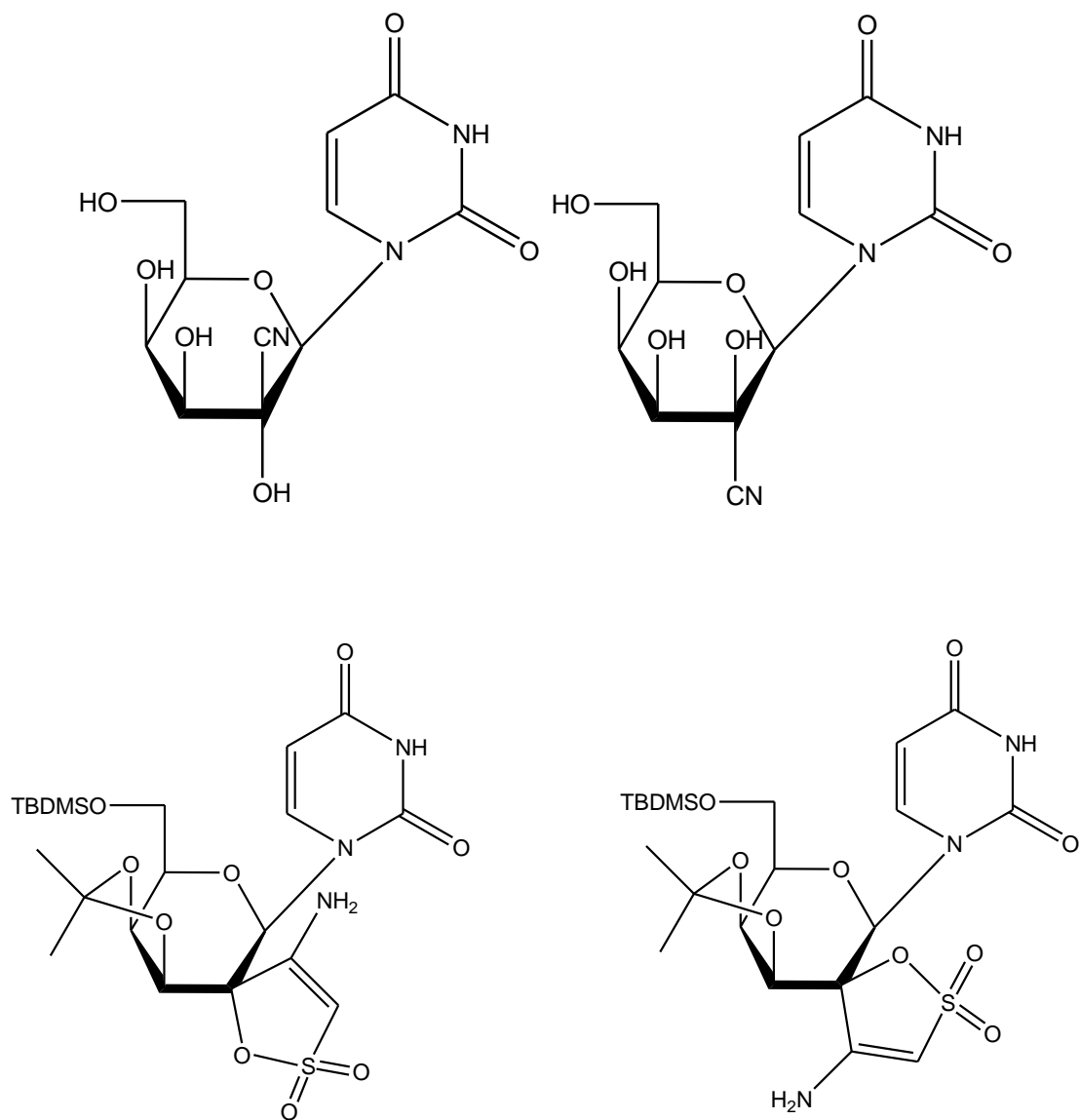
Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στον καρκίνο δεν έχει προσδιοριστεί. Πιο συγκεκριμένα οι ελεύθερες ρίζες σχετίζονται ιδιαίτερα με την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας. Όταν οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν φυσιολογικά κύτταρα προκαλείται βλάβη στο DNA, η οποία αποτελεί βασική προϋπόθεση για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας. Ωστόσο, οι επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν. Όταν οι ελεύθερες ρίζες παράγονται στα καρκινικά κύτταρα, φαίνεται να έχουν ευεργετική δράση καθώς προκαλούν την καταστροφή αυτών των κυττάρων με διάφορους μηχανισμούς. Έχει αποδειχθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες παίζουν ρόλο στη μείωση των τελομερών των κυττάρων, τα οποία στα καρκινικά κύτταρα διατηρούνται σε ένα συγκεκριμένο μέγεθος και συμβάλλουν στη διατήρηση του καρκινικού κυτταρικού φαινότυπου .

2.ΣΤΟΧΟΣ-ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα αποτελούμενα από μονοσακχαρίτες με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο συνδεδεμένα με κάποια ετεροκυκλική βάση παρουσιάζουν ισχυρή βιολογική δράση. Κατά συνέπεια, σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η σύνθεση και η μελέτη τροποποιημένων νουκλεοζιτών με σκοπό την εύρεση νέων αντικαρκινικών, αντιικών φαρμάκων με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα από τα μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενα.

Πρόσφατες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, απέδειξαν ότι νέες τάξεις 3' και 4'-δεοξυ-κυανο πυρανονουκλεοζιτών αποτελούν εν δυνάμει αποτελεσματικούς αναστολείς της ανάπτυξης καρκινικών όγκων του τραχήλου της μήτρας όπως επίσης και των λεμφοκυττάρων. Επίσης πλήθος σπειρο-νουκλεοζιτικών αναλόγων συντέθηκαν τα τελευταία χρόνια, ενώ κάποια απ' αυτά εμφάνισαν αξιοσημείωτη δράση έναντι του ιού HIV. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ύπαρξη ισχυρής αντιϊκής δράσης αποτελεί η παρουσία της λιπόφιλης tert-βουτυλο-διμεθυλο-σιλυλο ομάδας στο φουρανοζικό δακτύλιο.

Ως εκ τούτου, αποφασίστηκε να διερευνηθούν οι μελέτες μας προς τη σύνθεση νέων μορίων, στα οποία η ηλεκτραρνητική κυανο ομάδα εισάγεται στην 2' θέση αντί των 3' και 4', καθώς και η σύνθεση των 2'-σπείρο νουκλεοζιτικών αναλόγων τους. **(Εικόνα 19)**



Εικόνα 19:Χημική δομή των μορίων που συντέθηκαν

3.ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων

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

- Οξικός ανυδρίτης (Ac_2O)
- Πυριδίνη
- Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH)
- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN)
- 2,2-Διμεθοξυπροπάνιο [$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$]
- 4,4-Διμεθυλαμινοπυριδίνη (DMAP καταλυτικά)
- Τριαιθυλαμίνη (Et_3N)
- Διχρωμική πυριδίνη (PDC)
- Διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3)
- Αιθέρας (Et_2O)
- Κυανιούχο νάτριο (NaCN)
- Άνυδρο Τολουόλιο (Dry Tol)
- Τριφθορομεθανοσουλφονικός τριμεθυλοσιλυλεστέρας ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$)
- Ρ-τολουολοσουλφονικό οξύ (p-TsOH)
- Hexamethyldisilazane (HMDS)
- Άνυδρου θειικό νάτριο (Na_2SO_4)
- χλωρίδιο του tert-βουτυλο-διμεθυλο-σιλυλανιου (TBDMSCl)

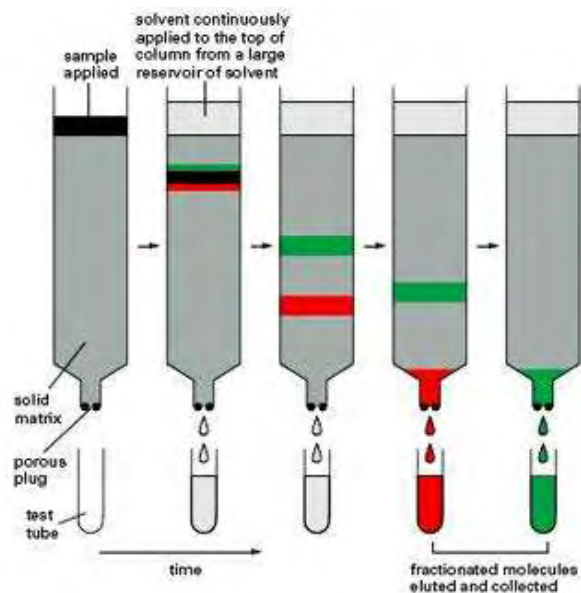
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieseilel 60F₂₄). Τα προϊόντα στα χρωματογραφήματα ανιχνεύονται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα H_2SO_4 (θειικού οξέος) 30%, είτε μέσω UV ακτινοβολίας (254nm).

Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Οι πλειοψηφία των καθαρισμών οργανικών ουσιών πραγματοποιούνται μέσω της χρωματογραφίας μιας τεχνικής κατά την οποία το επιθυμητό προϊόν διαλύεται σε έναν οργανικό διαλύτη ή σύστημα διαλυτών σε συγκεκριμένη κάθε φορά αναλογία και στη συνέχεια αφήνεται να διαρεύσει μέσω ενός κατακόρυφου γυάλινου σωλήνα ο οποίος είναι γεμάτος με προσροφητικό υλικό. Το προς διαχωρισμό μίγμα ονομάζεται κινητή φάση ενώ το προσροφητικό υλικό εντός του σωλήνα στατική. Επειδή οι διαφορετικές ενώσεις προσροφώνται στη στατική φάση σε διαφορετική έκταση, μετακινούνται διαμέσου αυτής με διαφορετικές ταχύτητες και για το λόγο αυτό, εξέρχονται από τη στήλη –εκκλύονται- από το άκρο της. Ο χρόνος έκλυσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα από την πολικότητά της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες προσροφώνται κατά κανόνα, εντονότερα και άρα μετακινούνται βραδύτερα μέσω της στατικής φάσης σε σχέση με τα περισσότερα άπολα.

Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της κοινά χρησιμοποιούμενης χρωματογραφίας ανάλογα με τις ανάγκες που προκύπτουν και το προϊόν που επιθυμούμε να διαχωριστεί. Η υγρή χρωματογραφία ή χρωματογραφία στήλης είναι ίσως η συχνότερα χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική μέθοδος.



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

Ξήρανση διαλυτών

Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων, απαιτείται η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο, ακετόνη, πυριδίνη, διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη.

Η ξήρανση του ακετονιτρίλιου και της μεθανόλης γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε. Η δε πυριδίνη αποστάχθηκε παρουσία υδροξειδίου του καλίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε.

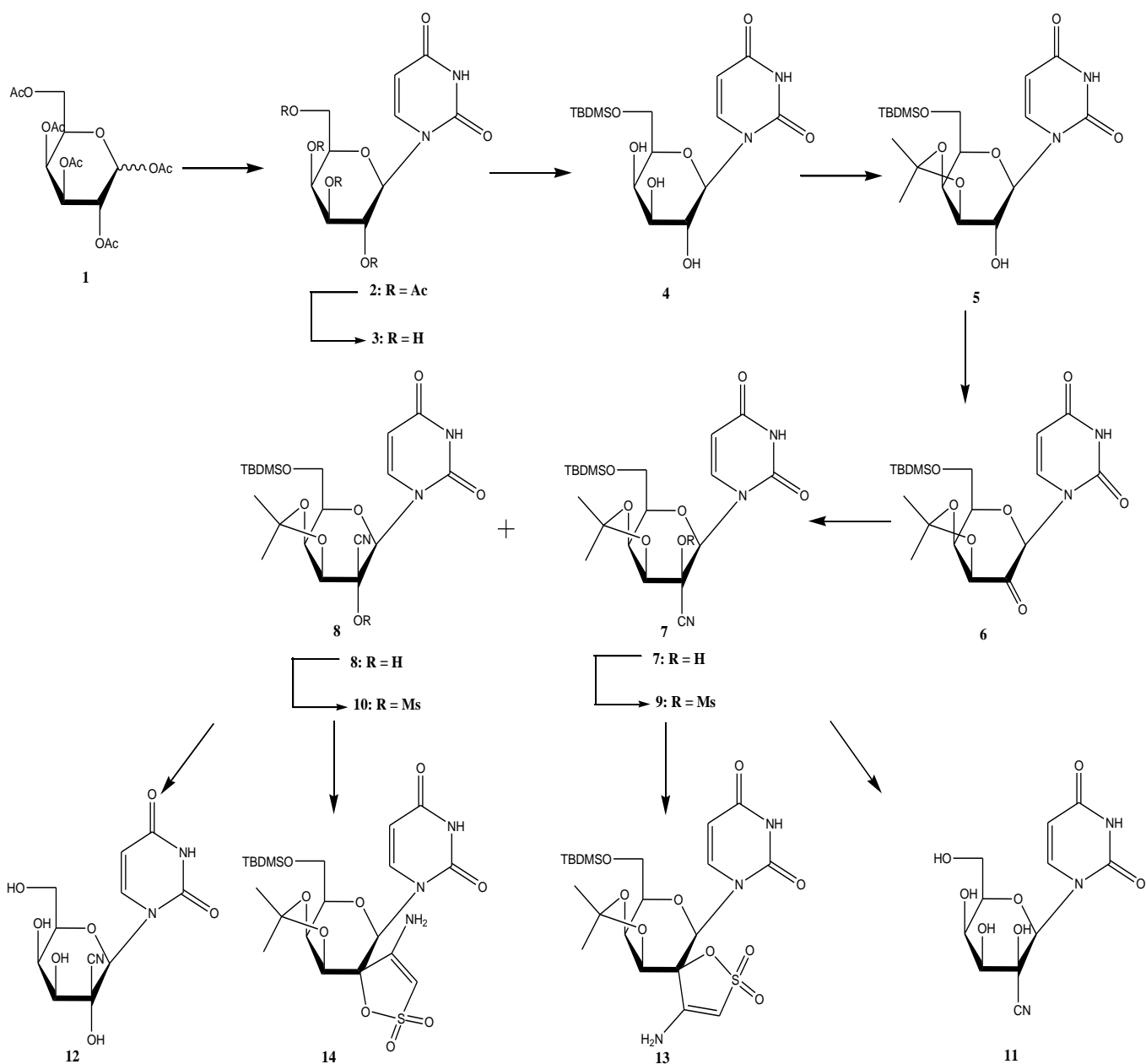
Ταυτοποίηση ενώσεων

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί την πρώτη και χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική προσδιορισμού της δομής των μορίων καθώς παρέχει ένα χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H -NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο Bruker AVAMCE^{III} 300 και τα φάσματα ^{13}C -NMR καταγράφηκαν στα 75.5MHz στο ίδιο φωτόμετρο, χρησιμοποιώντας chloroform-d (CDCl_3), DMSO-d_6 . Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^1H .

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Επισκόπηση συνθετικής οδού



Μεθοδολογία σύνθεσης

Αρχικά για να επιτευχθεί η σύνθεση των νουκλεοζιτών, το γλυκοζιτικό μέρος πρέπει να χρησιμοποιείται πάντα υπό τη μορφή του ακετυλιωμένου σακχάρου, γεγονός που ισχύει και στην προκειμένη περίπτωση με την ακετυλιωμένη D-γαλακτόζη **1**. Από την άλλη πλευρά, η βάση, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, πρέπει να ενεργοποιηθεί υπό τη μορφή άλατος ή συμπλόκου, όπου τα δραστικά υδρογόνα της ίδιας της βάσης αντικαθίστανται από τριμεθυλοσιλυλομάδες. Συνεπώς, αφού εξασφαλιστεί η διαθεσιμότητα του επιθυμητού ακετυλιωμένου σακχάρου **1**, ακολουθεί σιλυλίωση της ουρακίλης. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το 1974 από τους Niedballa και Vorbruggen (Niedballa and Vorbruggen, 1974), απέδειξαν ότι οι σιλυλιωμένες ουρακίλες αντιδρούν εύκολα με τα ακυλιωμένα σάκχαρα, καθώς ενισχύεται ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας τους, για να σχηματίσουν τους αντίστοιχους ακυλιωμένους νουκλεοζίτες σε πολύ καλές αποδόσεις. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, για να επιτευχθεί η συμπύκνωση της εμπορικά διαθέσιμης ουρακίλης με την ακετυλιωμένη γαλακτόζη, χρησιμοποιείται η σιλυλιωμένη ουρακίλη, η οποία προκύπτει μετά από αντίδραση με εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο (CH_3CN). Η αντίδραση καταλύεται από τη σακχαρίνη και λαμβάνεται το παράγωγο δις-τριμεθυλοσιλυλο-ουρακίλη. Η επίδραση ενός όξινου καταλύτη Lewis στην ακετυλιωμένη γαλακτόζη οδηγεί στον σχηματισμό ενός κατιονικού ενδιάμεσου στον ανωμερικό άνθρακα του σακχάρου, το οποίο στη συνέχεια προσβάλλεται από το πιο πυρηνόφιλο άζωτο της ενεργής πλέον σιλυλιωμένης ουρακίλης λαμβάνοντας την ένωση **2**.

Στη συνέχεια, η ένωση **2**, μέσω μίας εύκολης πειραματικής διαδικασίας, κατεργάζεται με μεθανολική αμμωνία (Neilson and Werstiuk 1971) για μία νύχτα, με αποτέλεσμα τη λήψη του πλήρως αποπροστατευμένου νουκλεοζίτη **3**.

Ακολουθεί η εκλεκτική προστασία του υδροξυλίου στη θέση 6' του σακχάρου του αποπροστατευμένου νουκλεοζίτη **3** που οδηγεί στην λήψη της ένωσης **4**. Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται με την επίδραση του τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωριδίου (TBDMCl) επί της ένωσης **3** παρουσία καταλυτικής ποσότητας 4,4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (DMAP) σε πυριδίνη με αποτέλεσμα τη λήψη της επιθυμητής ένωσης **4**.

Έπειτα γίνεται η εκλεκτική προστασία των γειτονικών υδροξυλίων στις 3' και 4' θέσεις του σακχάρου που οδηγεί στη λήψη της ένωσης **5**. Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται με επίδραση του 2,2-διμεθοξυπροπανίου $[(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2]$ επί της ένωσης **4** καθώς και του π-τολουολοσουλφονικού οξέος (*p*-TsOH) ως καταλύτη σε διάλυμα άνυδρης ακετόνης, οπότε αρχικά προστατεύονται τα υδροξύλια στις 3' και 4' θέσεις του σακχάρου (Vanheusden *et al.* 2004) με αποτέλεσμα τη λήψη της επιθυμητής ένωσης (**5**).

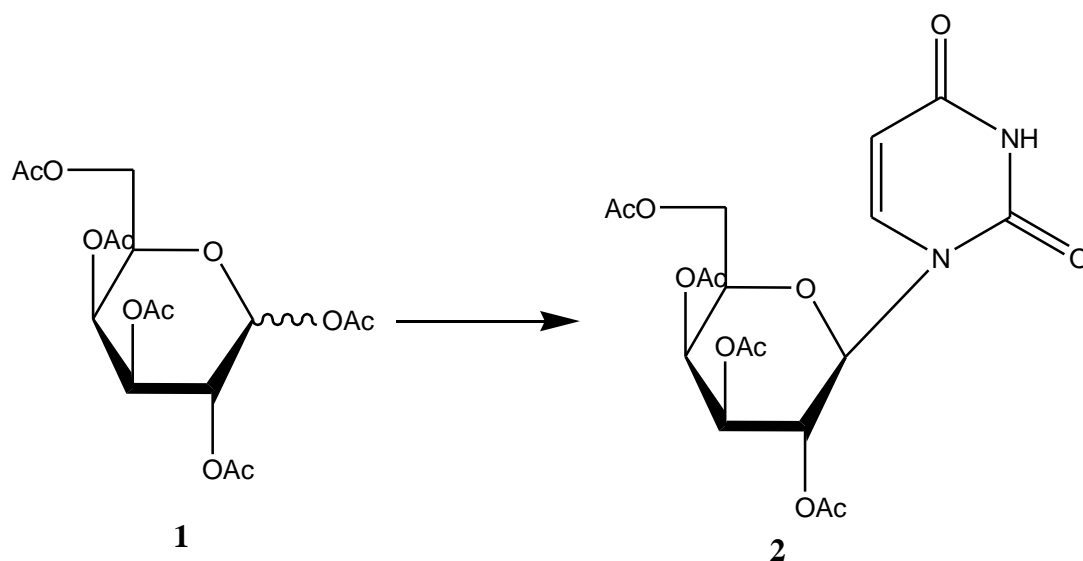
Για την παρασκευή του κορεσμένου 2'-κετοπυρανονουκλεοζίτη ένωση **6** ακολουθεί η οξειδωση του ελεύθερου υδροξυλίου στην 2' θέση του σακχάρου της ένωσης **5**, με επίδραση διχρωμικής πυριδίνης (PDC) και Ac_2O (Herscovici and Antonakis, 1980) σε διχλωρομεθάνιο, με αποτέλεσμα τη λήψη του κετονουκλεοζίτη **6**.

Η επόμενη αντίδραση περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσθήκη της κύανο ομάδας στην κετονομάδα του προϊόντος **6**, χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια του κυανικού και ανθρακικού νατρίου σε διάλυμα δύο φάσεων νερού και αιθυλαιθέρα. Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή των ενώσεων **7** και **8**. Ακολουθεί πλήρης αποπροστασία των κύανο πύρανονουκλεοζιτών **7** και **8** με τετραφθοροοξικό οξύ και άνυδρη μεθανόλη ώστε να ληφθούν τα πρώτα δύο τελικά προϊόντα (**ενώσεις 11 και 12**).

Στη συνέχεια έγινε η προσθήκη του χλωριδίου του μεσιλίου (MsCl) στη θέση 2' στο μίγμα των κύανο πύρανονουκλεοζιτών **7** και **8** σε διάλυμα πυριδίνης σε παγόλουτρο με αποτέλεσμα τη λήψη των επιθυμητών ενώσεων **9** και **10**.

Ακολουθεί μια αντίδραση κυκλοποίησης στη θέση 2' στο μίγμα των ενώσεων **9** και **10** αφού έχουν διαλυτοποιηθεί σε ακετονιτρίλιο (CH_3CN) προσθέτοντας το αντιδραστήριο 1,8-Diazabicycloundec-7-ene (DBU) λαμβάνοντας τις επιθυμητές ενώσεις **13** και **14**.

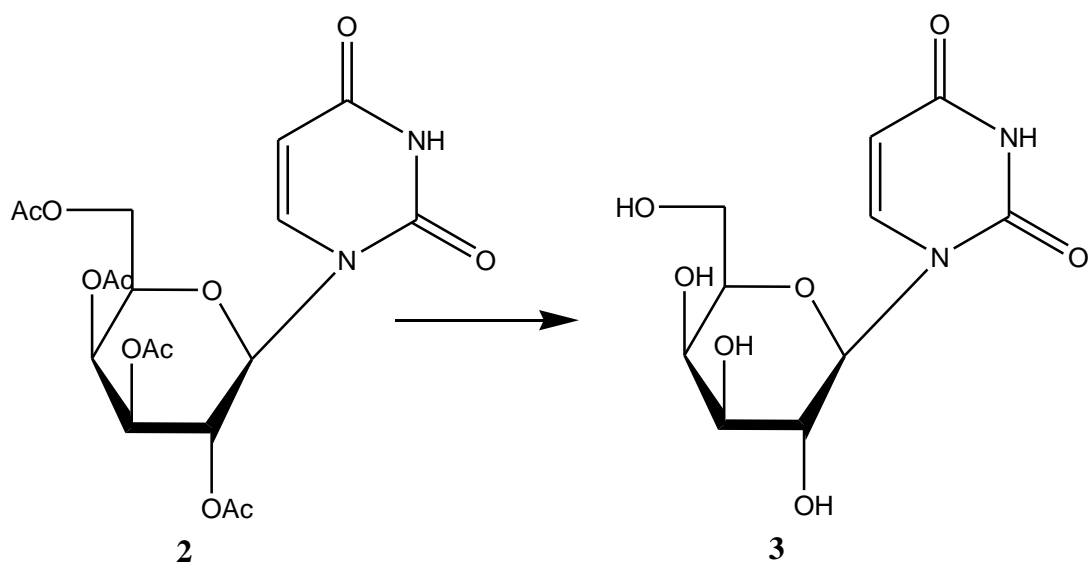
Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-πέντα-O-ακετυλο-α-D-γαλακτοπυρανόζυλο)ουρακίλης



Διάλυμα αποτελούμενο από ουρακίλη (816 mg, 7,28 mmol), HMDS (hexamethyldisilazane) (1,904 mL, 9,0 mmol) και σακχαρίνη (61 mg, 0,34 mmol) σε άνυδρο CH_3CN (25,4 mL) θερμαίνεται με κάθετο ψυκτήρα για 20 λεπτά στους 120°C και στη συνέχεια προστίθεται η 1,2,3,4,6-πεντα-O-ακετυλο-D-γαλακτοπυρανόζη (**2**) (2 g, 5,2 mmol) καθώς και ο $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (1,314 mL, 7,28 mmol). Ακολουθεί θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 80°C για περίπου 2h (TLC), ψύξη του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη κορεσμένου διαλύματος όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO_3) και εκχύλιση με EtOAc. Η οργανική φάση πλένεται με νερό (4 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα EtOAc/Hexane σε αναλογία 8:2. Το επιθυμητό προϊόν **2** παραλαμβάνεται ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο με απόδοση 81%(1,864 g).

TLC (EtOAc/Hexane 8:2)	Rf = 0,23
Απόδοση	81%
α_D	+ 44.5 (c = 0.23)
λ_{max}	261 nm

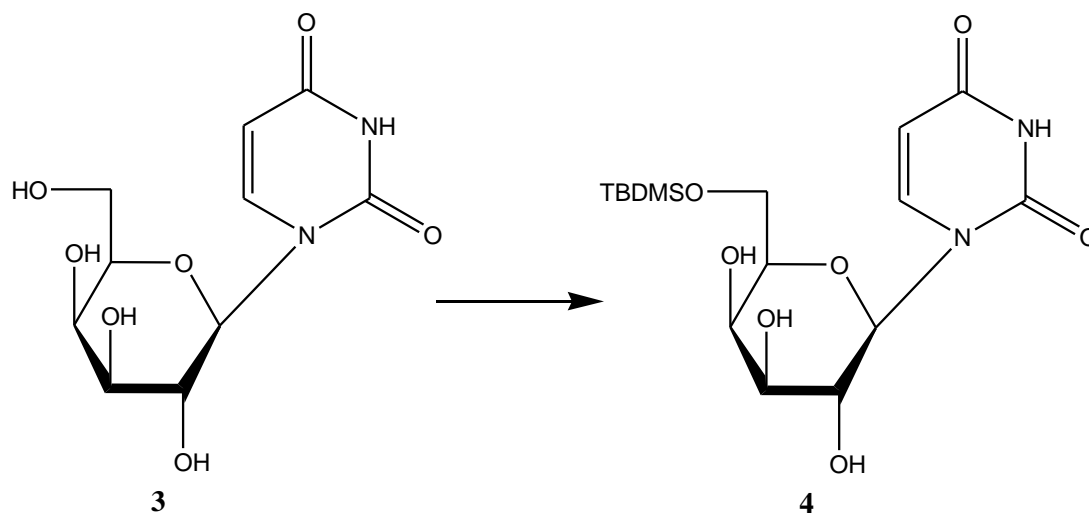
Σύνθεση της 1-(α-D-γαλακτοπυρανόζυλο)ουρακίλης



Διάλυμα της ένωσης **2** (1g, 2,26 mmol) σε μεθανολική αμμωνία (11 mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα EtOAc/MeOH 8:2 οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **3** με λευκή αφρώδη υφή και απόδοση 89%(551mg).

TLC (EtOAc/MeOH 8:2)	R _f = 0,13
Απόδοση	89%
α_D	+ 35.7 (c = 0.15)
λ_{max}	260 nm

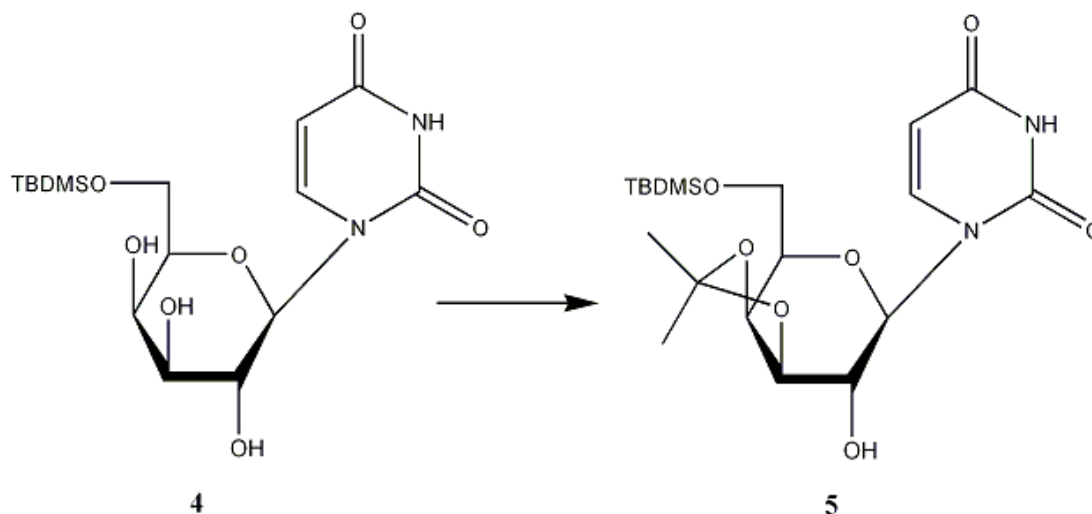
Σύνθεση της 1-(6'-O-τριβουτυλοδιμέθυλοσιλλο-α-D-γαλακτοπυρανόζυλο) ουρακίλης



Σε διάλυμα της ένωσης **3** (500mg, 1,8mmol) σε άνυδρη πυριδίνη (8 mL), προστίθεται TBDMSCl (352 mg) και καταλυτική ποσότητα DMAP και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4h. Ακολουθεί προσθήκη μεθανόλης και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα EtOAc/Hexane σε αναλογία 7:3, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4** υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων και απόδοση 62%(433mg).

TLC (EtOAc)	R _f = 0,2
Απόδοση	62 %
α_D	+ 25.8 (c = 0.28)
λ_{max}	260nm

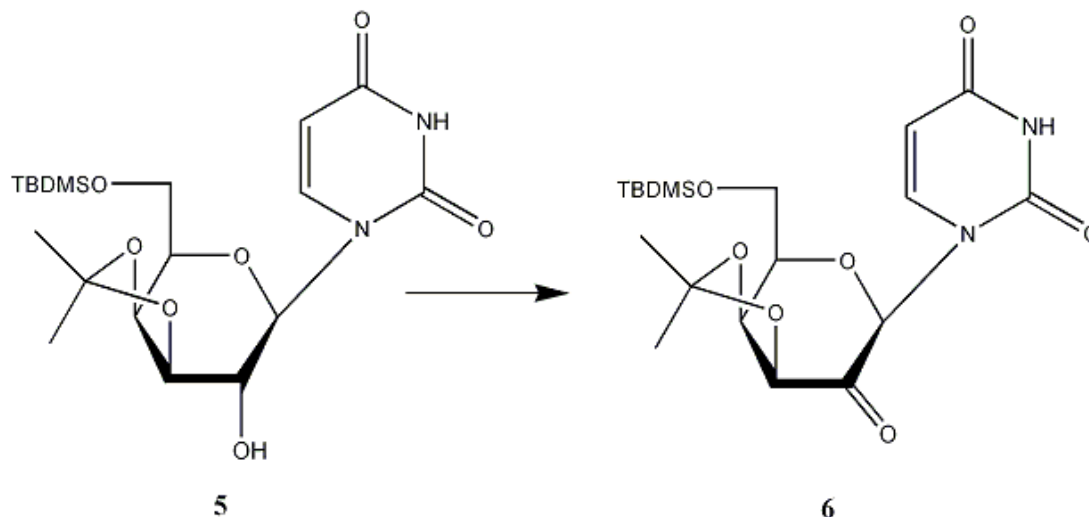
Σύνθεση της 1-(3',4'-O-ισοπροπυλιδENO-6'-O- τριβουτυλοδιμέθυλοσιλυλο -α-D-γαλακτοπυρανόζυλο)ουρακίλης



Σε διάλυμα του προϊόντος **4** (430mg, 1,15 mmol) με άνυδρη ακετόνη (20 mL) προστίθεται DMP (1,15 mL) και *p*-TsOH (41 mg, 0,22 mmol) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Στη συνέχεια προστίθεται τριαιθυλαμίνη μέχρι ουδετέρου pH ($\text{pH} \leq 7$) και οι διαλύτες απομακρύνονται υπό υψηλό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης EtOAc, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5** με λευκή αφρώδη υφή και απόδοση 63% (298 mg).

TLC (EtOAc/Hexane 7:3)	R _f = 0.57
Απόδοση	63%
α_D	+ 18.2 (c = 0.1)
λ_{max}	260 nm
Σ.Τ.	205-207

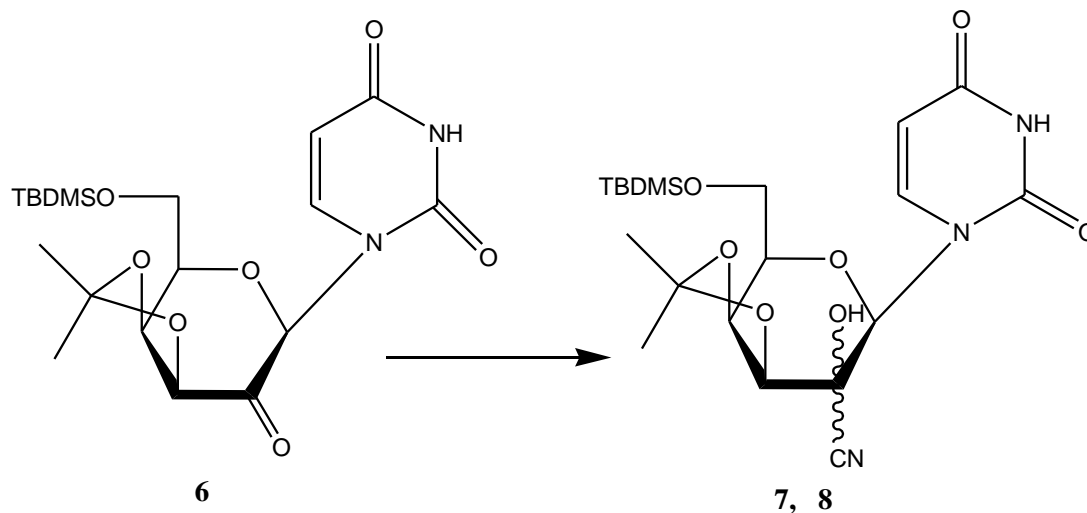
Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-Ισοπροπυλιδενο-6'-Ο- τριβουτυλοδιμέθυλοσιλιλο -α-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-2'-ουλοζο)ουρακίλης



Σε διάλυμα της ένωσης **5** (290mg, 0,92 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (9,2 mL) προστίθεται PDC (Pyridiniumchloromate, 413 mg, 1,09 mmol) και Ac₂O (οξικός ανυδρίτης, 258 μL) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4h. Στη συνέχεια προστίθεται EtOAc (3 mL) και το προκύπτον παχύρρευστο έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα EtOAc/Hexane σε αναλογία 8:2, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **6** υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων και απόδοση 83% (223mg). Στον κατωτέρω πίνακα παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά προϊόντος **6** ως εξής:

TLC (EtOAc/Hexane 8:2)	R _f = 0,58
Απόδοση	83%
α_D	+ 45 (c = 0.15)
λ_{max}	260 nm
Σ.Τ.	153-155

Σύνθεση των 1-(2'-C-κυανο-3',4'-O-ισοπροπυλιδανο-6'-O-τριβουτυλοδιμέθυλοσιλλιο-
α-D-γαλακτοπυρανόζυλο)ουρακίλης και 1-(2'-C-κυανο-3',4'-O-ισοπροπυλιδανο-6'-O-
τριβουτυλοδιμέθυλοσιλλιο-α-D-ταλοπυρανόζυλο)ουρακίλης

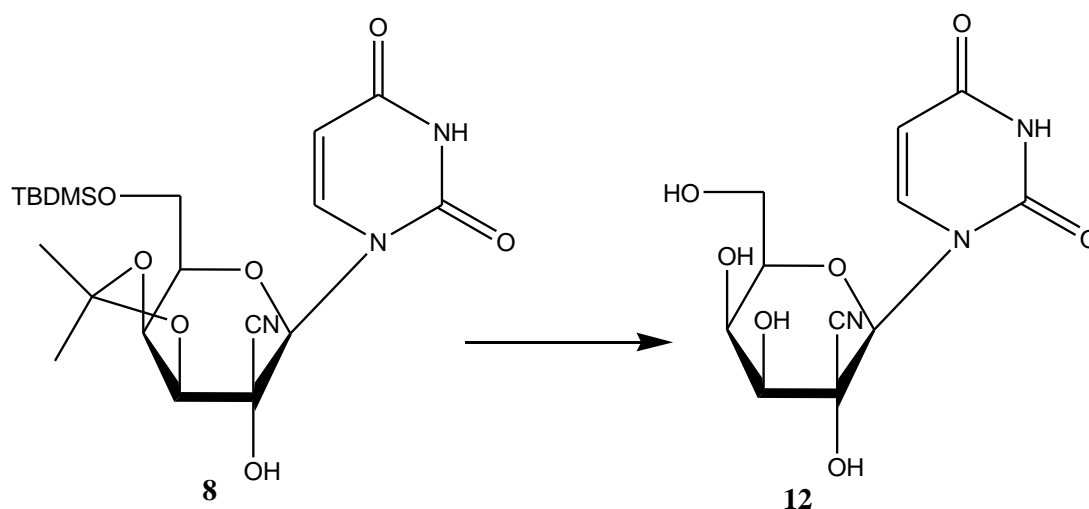


Η ένωση **6** (210 mg, 0,49 mmol) διαλύθηκε σε αιθυλεθέρα (3 ml) και στη συνέχεια προστέθηκε νερό (1,5 ml), ώστε να σχηματιστούν δύο φάσεις. Κατόπιν προστέθηκε NaHCO_3 (0,98 mmol, 82 mg) και NaCN (0,49 mmol, 24 mg). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε με έντονη ανάδευση για 48 ώρες. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC. Η οργανική φάση διαχωρίστηκε και η υδατική φάση πλύθηκε δυο φορές με οξικό αιθυλεστέρα (3 ml). Οι οργανικές φάσεις ενώθηκαν, ξηράθηκαν με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες έκλουσης διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη σε αναλογία 9,8:0,2.

Τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά των προϊόντων **7**(60 mg) και **8**(95 mg) φαίνονται παρακάτω:

TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9,8:0,2)	$R_f = 0,48$ και $R_f:0,46$
Απόδοση	70%
α_D	+ 3.0 (c = 0.20)
λ_{max}	258 nm

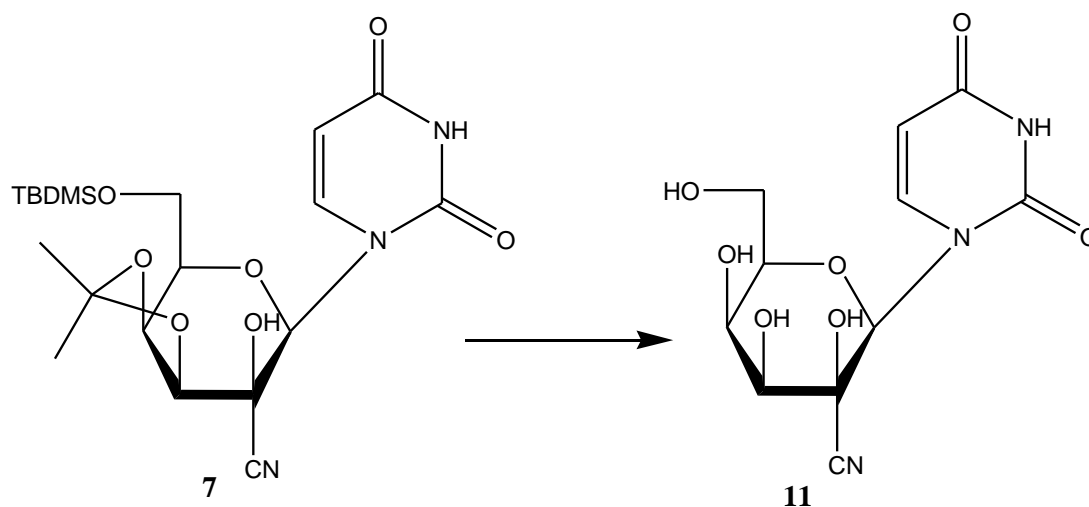
Σύνθεση της 1-(2'-C-κυανο-α-D-γαλακτοπυρανόζυλο)ουρακίλης



Σε διάλυμα από την ένωση **8** (45 mg, 0,09 mmol) προστέθηκαν άνυδρη μεθανόλη (45 μ L) και TFA (405 μ L) και το προκύπτον εναιώρημα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και ήπια ανάδευση για 8 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη μεθανόλης (5 mL) και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Για την απομόνωση της ένωσης ενδιαφέροντος **12** (19 mg) χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης το σύστημα $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ σε αναλογία 9:1 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα δε της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται ως εξής:

TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1)	R _f = 0,4
Απόδοση	71%
α_D	+ 4.0 (c = 0.20)
λ_{max}	262 nm

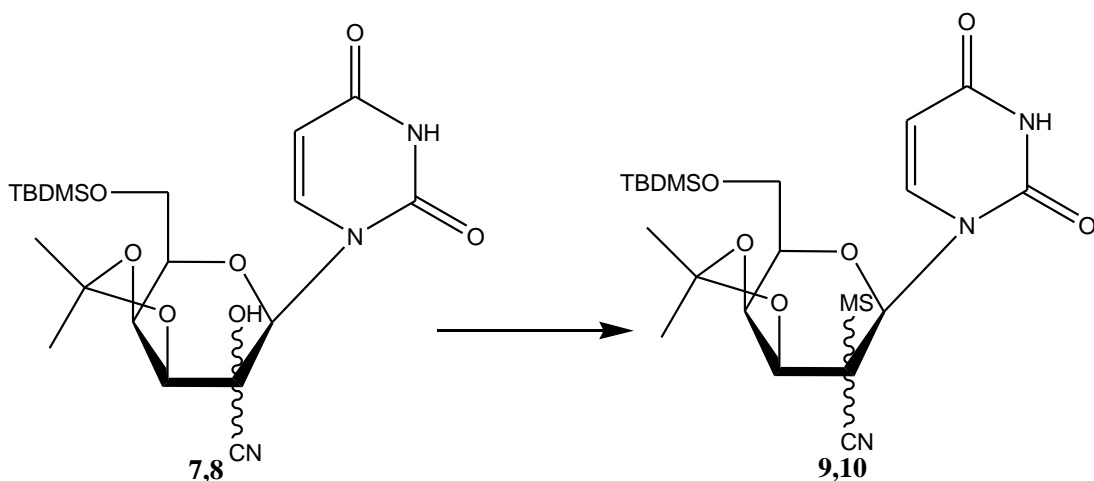
Σύνθεση της 1-(2'-C-κυανο-α-D-ταλοπυρανόζυλο)ουρακίλης



Σε διάλυμα από την ένωση **7** (30 mg, 0,07 mmol) προστέθηκαν άνυδρη μεθανόλη (35 μ L) και TFA (315 μ L) και το προκύπτον εναιώρημα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και ήπια ανάδευση για 8 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη μεθανόλης (5 mL) και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Για την απομόνωση της ένωσης ενδιαφέροντος **11** (15 mg) χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης το σύστημα $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ σε αναλογία 9:1 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα δε της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται ως εξής:

TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1)	R _f = 0,4
Απόδοση	74%
α_D	+ 4.0 (c = 0.20)
λ_{max}	262 nm

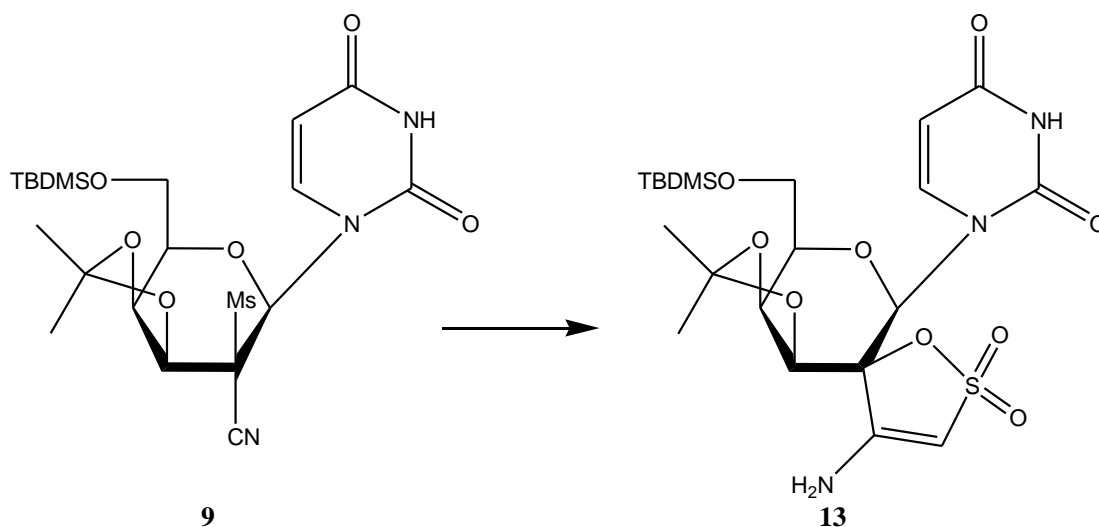
Σύνθεση των 1-(3',4'-O-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-2'-O-μεζυλο-6'-O-τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-α-D-γαλακτοπυρανόζυλο)ουρακίλης και 1-(3',4'-O-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-2'-O-μεζυλο-6'-O-τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-α-D-ταλοπυρανόζυλο)ουρακίλης



Σε μείγμα με τις έννοιες **7** και **8** (80mg, 0,176 mmol) διαλύθηκε σε άνυδρη πυριδίνη(0,5 mL) το προκύπτον εναιώρημα βυθίστηκε σε παγόλουτρο και προστέθηκε το MsCl (68 μl) με ήπια ανάδευση για 2 μέρες. Ακολουθεί προσθήκη μεθανόλης (5 mL) και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Για την απομόνωση των ενώσεων ενδιαφέροντος **9**(31 mg) και **10**(53 mg) χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης το σύστημα CH₂Cl₂/MeOH σε αναλογία 9:1 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα δε της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται ως εξής:

TLC (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1)	R _f = 0,4
Απόδοση	90%
α_D	+ 4.0 (c = 0.20)
λ_{max}	262 nm

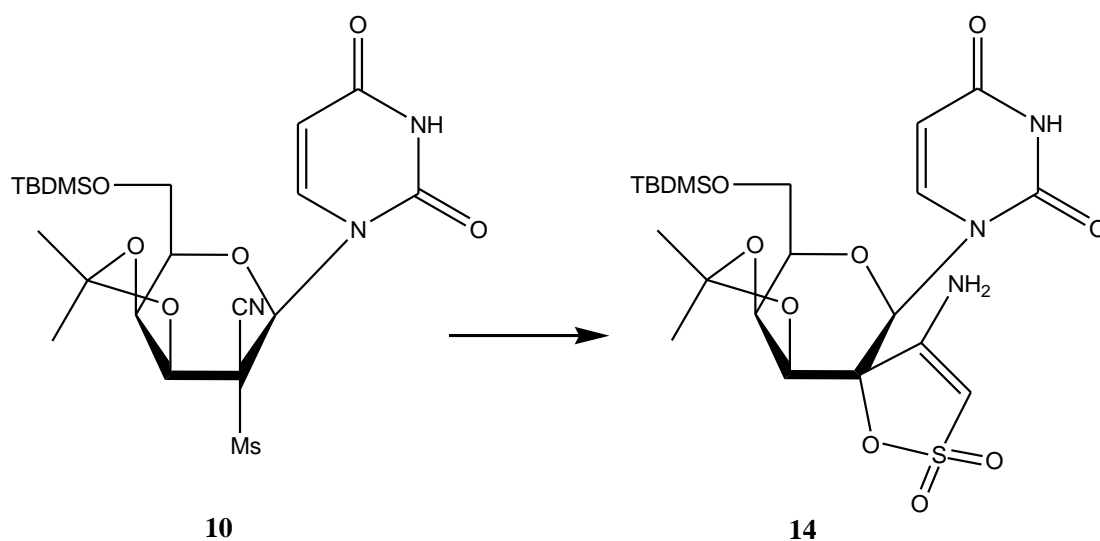
Σύνθεση των [1-(3',4'-O-ισοπροπυλιδενο-6'-O-τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-α-D-γαλακτοπυρανόζυλο)ουρακίλης]- 2'-σπείρο-5''-(4''-αμινο-1'',2''-οξαθειολο-2'',2''-διοξείδιο)



Σε διάλυμα με την ένωση **9** (31mg, 0,06 mmol) διαλύθηκε σε ακετονιτρίλιο (CH₃CN)(0,75 mL) και προστέθηκε το DBU(19,5 μl) για 1 μέρα σε θερμοκρασία δωματίου. Για την απομόνωση των ένωσης ενδιαφέροντος **13** (29 mg) χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης το σύστημα CH₂Cl₂/MeOH σε αναλογία 9:1 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα δε της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται ως εξής:

TLC (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1)	R _f = 0,4
Απόδοση	91%
α_D	+ 5.0 (c = 0.20)
λ_{max}	261 nm

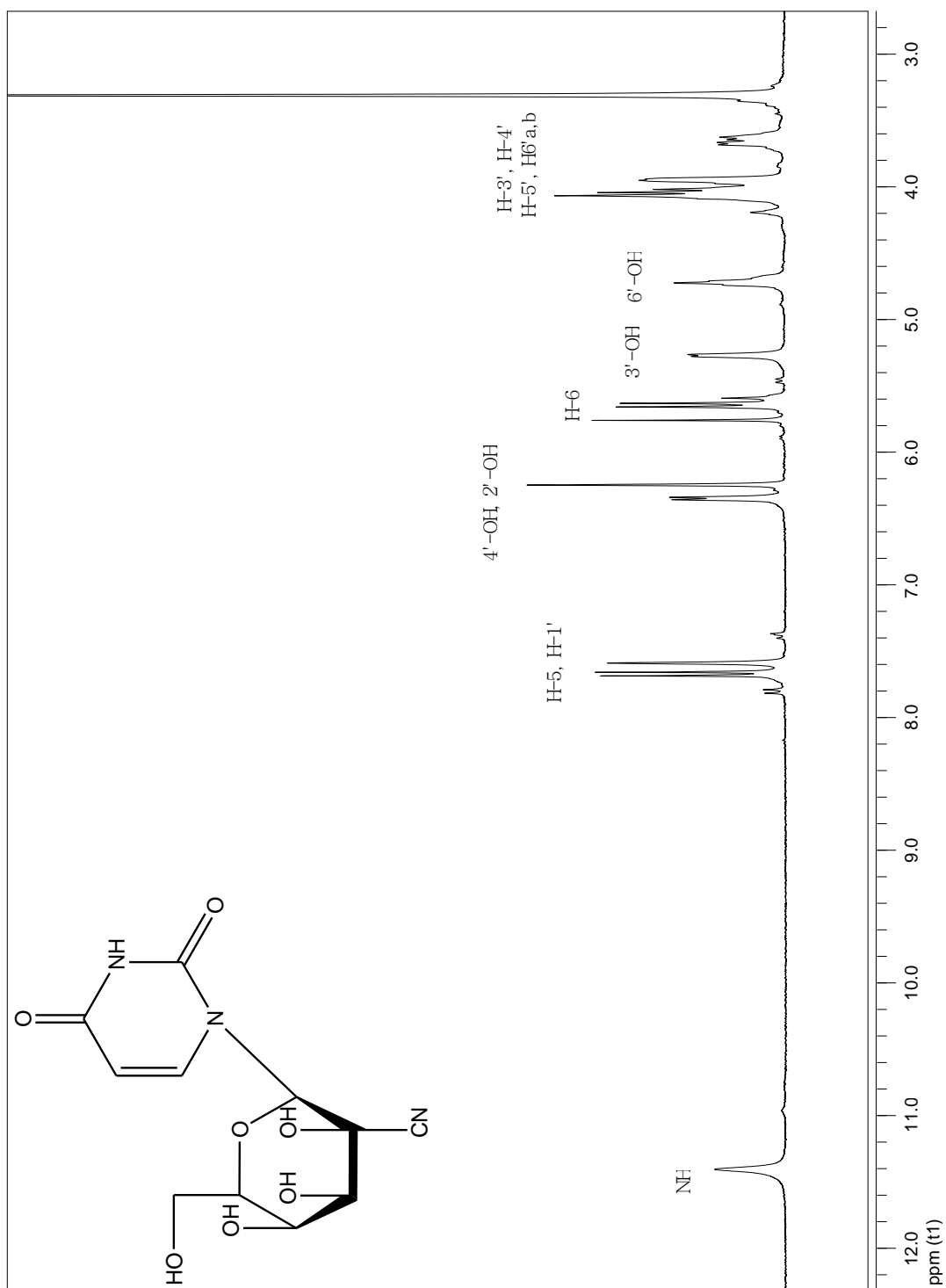
Σύνθεση της [1-(3',4'-Ο-ισοπροπυλιδENO-6'-Ο-τριβουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-α-D-ταλοπυρανόζυλο)ουρακίλης]-2'-σπείρο-5''-(4''-αμινο-1'',2''-οξαθειολο-2'',2''-διοξειδίο)

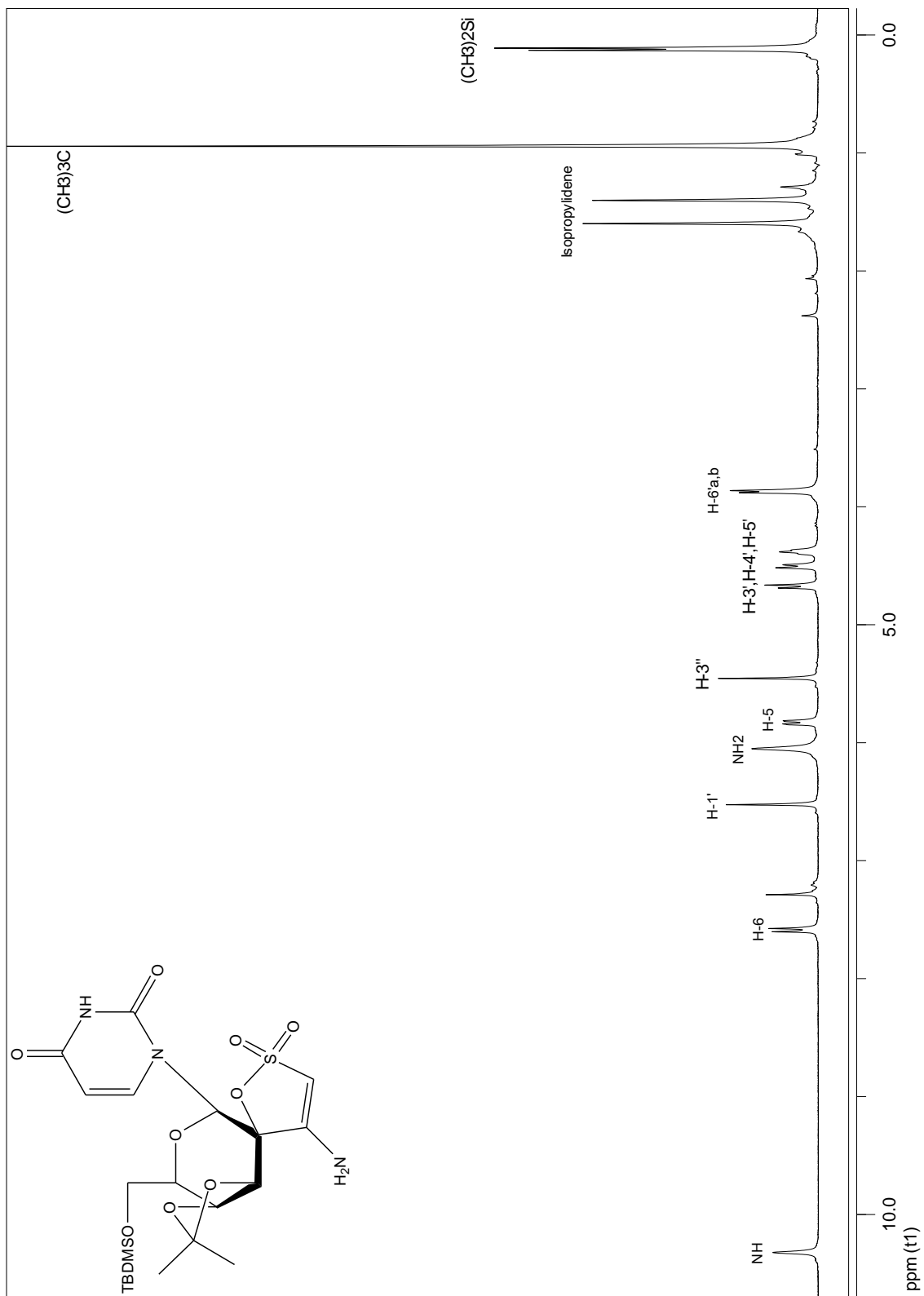


Σε διάλυμα με την ένωση **10** (53 mg, 0,099 mmol) διαλύθηκε σε ακετονιτρίλιο (CH₃CN)(1,2 mL) και προστέθηκε το DBU(32 μl) για 1 μέρα σε θερμοκρασία δωματίου. Για την απομόνωση των ένωσης ενδιαφέροντος **14** (46 mg) χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης το σύστημα CH₂Cl₂/MeOH σε αναλογία 9:1 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα δε της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται ως εξής:

TLC (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1)	R _f = 0,42
Απόδοση	88%
α_D	+ 4.0 (c = 0.20)
λ_{max}	260 nm

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR





6.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βασιζόμενοι στις σημαντικές βιολογικές ιδιότητες που παρουσιάζουν οι 3' και 4' κυανο πυρανονουκλεοζίτες αλλά και οι σπείρο-φουρανονουκλεοζίτες, η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία περιγράφει τη σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών οι οποίοι φέρουν τη χαρακτηριστική κύανο ομάδα στη θέση 2' του σακχάρου με ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη και τον σπείρο δακτύλιο στην θέση 2'.

Η συνθετική πορεία των αντιδράσεων που περιγράφηκαν στο πειραματικό μέρος ήταν η πιο απλή και αποτελεσματική από τις πειραματικές μεθόδους που δοκιμάστηκαν, εφόσον οδήγησαν στη σύνθεση μορίων με πολύ καλά ποσοστά απόδοσης. Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H NMR}$.

Τα νέα κυανο πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα **11** και **12** και τα σπείρο παράγωγα **13** και **14** έχουν σταλεί για να μελετηθούν ως προς την αντιική και αντικαρκινική τους δράση. Τα πειράματα θα πραγματοποιηθούν στο εργαστήριο Ιολογίας και Χημειοθεραπείας, του Τμήματος Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του Πανεπιστήμιο της Λουβένης, στο Βέλγιο. Για την εκτίμηση της κυτταροστατικής δράσης πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η παράμετρος IC_{50} , η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%.

Με βάση τα αποτελέσματα των αναλύσεων, οι νέες ενώσεις θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγοί για τη σύνθεση ανάλογων ενώσεων με βελτιωμένες κυτταροστατικές, αντιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες εφόσον υποστούν περαιτέρω τροποποιήσεις είτε στο τμήμα του σακχάρου είτε στο τμήμα της βάσης.

Βιβλιογραφία:

1. Mc Murry J. Οργανική Χημεία, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 1245, 905.
2. Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L., Βιοχημεία 1997/2001, τόμος ,σελ.
3. Camarasa, M.J.; Pérez-Pérez, M.J.; San-Félix, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.*, **1992**, 35(15), 2721-2727.
4. Δ.Ν. Νικολαΐδης, Οργανική Χημεία, τόμος 2, σελ. 42, 148.
5. Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2002 Jul;3(7):415-24. Review.
6. Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 3399.
7. Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* 1992, 11, 903.
8. Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* 1993, 36, 2033.
9. De Clercq, E. *Biochim Biophys Acta.* 2002a, 1587, 258.
10. Gumina, G.; Song, G. Y.; Chu, C. K. *FEMS Microbiology Letters* 2001, 202, 9.
11. Brady, R. C.; Bernstein, D. I. *Antiviral Res.* 2001, 61, 73.
12. Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 47, 365.
13. Pontikis, R.; Wolf, J.; Monneret, C.; Florent, J. –C. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 3523.
14. Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* 1991, 51, 2319.
15. Lin, T. S.; Luo, M. Z.; Liu, M. C.; Clarkatzenburg, R. H.; Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H.; Mancini, W. R.; Birnbaum, G. I.; Gabe, E.; Giziewicz, J. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 2607.
16. Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 1879.

17. Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, 95, 105.
18. Lui, V. W. Y. W.; Lau, C. P. Y. P.; Cheung, C. S. F. S.; Ho, K.; Ng, M. H. L. H.; Cheng, S. H. H.; Hong, B.; Tsao, S.-W. W.; Tsang, C. M. M.; Lei, K. I. K. I.; Yamasaki, Y.; Mita, A.; Chan, A. T. *Biochemical pharmacology* 2010, 79, 1772.
19. Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* 2010.
20. Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* 1995, 67, 155.
21. Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* 2000, 20, 417.
22. Balzarini, J. *Pharmacy World Sci.* 1993, 16, 113.
23. Chong, Y.; Choo, H.; Lee, S.; Choi, Y.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 4888.
24. Lewin, B. *Genes* 2003, VIII, 6.
25. Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, 2005, 4, 4.
26. Siev, M.; Weinberg, R.; Penman, S. *J. Cell Biol.* 1969, 41, 510.
27. Ahn, Y. J.; Park, S. J.; Lee, S. G.; Shin, S. C.; Choi D. H. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 2744.
28. O-Yang C., Wu H.Y., Fraser-Smith E.B., Walker K.A.M. *Tetrahedron Lett.* 1992, 1, 37-40.
29. Satoru Kohgo, Kohei Yamada, Kenji Kitano, Shinji Sakata, Hiroyuki Hayakawa, Daisuke Nameki, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Hiroaki Mitsuya, and Hiroshi Ohruai, *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS*, Vol. 22, Nos. 5–8, pp. 887–889, 2003.
30. Motohiro Tanaka et al, 1992 Antitumor activity of CNDAC.
31. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 980.
32. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, 43, 420.
33. Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Panagiotopoulou, A.; Pelecanou, M.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2009a, 44, 4764.
34. Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevšek, A.; Pamulapati, R. T.; Cencič, A.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2009b, 44, 2696.

35. Balatsos, N. A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* 2009, 48, 6044.
36. Kiritsis C, Manta S, Parmenopoulou V, Balzarini J, Komiotis D. Branched-chain C-cyano pyranonucleosides: synthesis of 3'-C-cyano & 3'-C-cyano-3'-deoxy pyrimidine pyranonucleosides as novel cytotoxic agents. *Eur J Med Chem.* 2011 Nov;46(11):5668-74.
37. Niedballa U, Vorbrüggen H. A general synthesis of N-glycosides. I. Synthesis of pyrimidine nucleosides. *J Org Chem.* 1974 Dec 13;39(25):3654-60.
38. Neilson, T.; Werstiuk, E. S. *Can. J. Chem.* 1971, 49, 493.
39. Vanheusden V, Busson R, Herdewijn P, Van Calenbergh S. Synthesis and conformational analysis of 1-[2,4-dideoxy-4-C-hydroxymethyl-alpha-l-lyxopyranosyl]thymine. *J Org Chem.* 2004 Jun 25;69(13):4446-53.
40. Velázquez, S.; Jimeno, M.L.; Camarasa, M.J.; Balzarini, J. *Tetrahedron*, **1994**, 50(37), 11013-11022.
41. Herscovici, J.; Antonakis, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 12, 561.