

Σύνθεση νέων
πυρανονουκλεοζιτών
επισημασμένων με ^{18}F για
χρήση στη μοριακή
απεικόνιση και *in vivo*
παρακολούθηση του
καρκίνου

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Βαϊτσοπούλου Αφροδίτη

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Κομιώτης Δημήτριος: Καθηγητής Οργανικής Χημείας

Μαντά Στυλιανή: Επισκέπτης Λέκτορας

Μπαλατσός Νικόλαος: Επίκουρος καθηγητής βιοχημείας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Δημήτριο Κομιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το ιδιαίτερα ενδιαφέρον αυτό θέμα καθώς και για τις πολύτιμες και εποικοδομητικές υποδείξεις του.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη διδάσκουσα και επιβλέπουσα της διπλωματικής εργασίας, κα. Στυλιανή Μαντά για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια. Οι συμβουλές της, οι γνώσεις και η εμπειρία της αποδείχθηκαν ωφέλιμες ώστε να κατανοήσω και να φέρω εις πέρας την εργασία που μου ανατέθηκε.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Νικόλαο Κολλάτο για την υποστήριξη του καθ' όλη την περίοδο της παραμονής μου στο εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας. Η εμπειρία του, οι πολύτιμες συμβουλές του και η αρωγή του αποτέλεσαν εφόδια για την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κα. Αθηνά Δημοπούλου που μου είχε μεταλαμπαδεύσει τις γνώσεις της και με στήριξε από την πρώτη στιγμή που συμμετείχα στην ομάδα του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοοργανικής Χημείας για την ένθερμη υποδοχή αλλά και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιουργήθηκε εντός του εργαστηριακού χώρου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ.....	6
1.2 ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ.....	8
1.3 ΕΝΩΣΕΙΣ ΜΕ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	13
1.4 ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ.....	16
1.5 ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	19
1.6 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	21
1.7 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ.....	22
1.8 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	23
1.9 ΡΕΤ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑ ΜΕ ¹⁸ F.....	24
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	25
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
3.1 ΥΛΙΚΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ.....	25
3.2 ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	25
3.2.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC : THIN LAYER CHROMATOGRAPHY).....	26
3.2.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ.....	26
3.2.3 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ.....	29
3.2.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	29
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	30
4.1 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ.....	30
4.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ.....	31
4.2.1 1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη	
4.2.2 1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη.....	33
4.2.3 1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-Ο-π-τολουολοσουλφονυλο-α-D- αλλοφουρανόζη	34
4.2.4 3-Δεοξυ-3-π-τολουολοσουλφονυλο-γλυκόζη.....	34
4.2.5 3-Δεοξυ-3-π-τολουολοσουλφονυλο -1,2,4,6-τετρακίς-Ο- ακετυλογλυκοπυρανόζη.....	35
4.2.6 1-(3'-Δεοξυ-3'-π-τολουολοσουλφονυλο-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο- β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-ουρακίλη.....	35
4.2.7 1-(3'-Δεοξυ-3'-π-τολουολοσουλφονυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- ουρακίλη.....	35
5. NMR.....	36
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	38

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

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

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η συνθετική πορεία νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων, με τροποποίηση στη βάση, ώστε να επισημανθούν με ¹⁸F και να χρησιμοποιηθούν σε απεικονίσεις PET για να ελέγχεται ο καρκίνος.

Τα νέα μόρια που συντέθηκαν στο εργαστήριο Βιοργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας είναι τα : 1-(3'-Δεοξυ-3'-π-τολουολοσουλφονυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-ουρακίλη και 1-(3'-Δεοξυ-3'-π-τολουολοσουλφονυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-φθορο-ουρακίλη

ABSTRACT

Nucleoside analogs are molecules that result from structural modifications of natural nucleosides belonging to the general class of beta-*N*-glycosides and play a key role in the treatment of cancer and viral infections. Many nucleoside analogs act as antimetabolites, natural nucleosides compete and interact with intracellular targets to cause cytotoxicity. Others incorporated during replication or repair of DNA, leading to the termination of the composition process while others function as polymerase inhibitors. This dissertation describes the new synthetic route nucleosidic analogues, bearing modifications at the base moiety, in order to be marked with ^{18}F and then used in PET displays so as to predict cancer. The new molecules synthesized in the laboratory of Organic Chemistry, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly are: 1-(3'-deoxy-3'-p-toluenesulfonyl- β -D-glucopyranosyl)-uracil and 1-(33'-deoxy-3'-p-toluenesulfonyl- β -D-glucopyranosyl)-5-fluoro-uracil

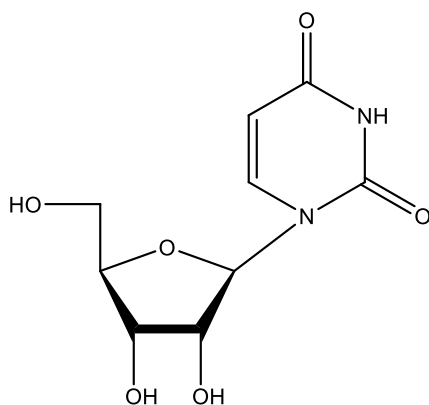
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Νουκλεοζίτες

Ο νουκλεοζίτης αποτελείται από μια πουρινική (αδερίνη, γουανίνη) ή πυριμιδική (θυμίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη) βάση ενωμένη με μια πεντόζη. Αναλόγως αν η πεντόζη είναι η ριβόζη ή η δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης. Η ένωση νουκλεοζίτη με φωσφορικό οξύ ονομάζεται νουκλεοτίδιο (ή εστέρας του νουκλεοζίτη) το οποίο πάλι αναλόγως τη φύση της πεντόζης καλείται ριβονουκλεοτίδιο ή δεοξυριβονουκλεοτίδιο. Σε ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο το άτομο C-1 της δεοξυριβόζης δεσμεύεται στο N-1 μιας πυριμιδίνης ή στο N-9 μιας πουρίνης. Η διαμόρφωση αυτού του νουκλεοζιτικού δεσμού είναι μορφής β, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Stryer, 1995).

Πολλά νουκλεοτίδια που ενώνονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς αποτελούν τις δομικές μονάδες των νουκλεϊκών οξέων. Η φωσφορική ομάδα στην 5' θέση ενός νουκλεοτιδίου εστερεοποιείται με την ελεύθερη υδροξυλομάδα στην 3' θέση του επόμενου νουκλεοτιδίου, κ.ο.κ. Μ'αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται δινουκλεοτίδια, τρινουκλεοτίδια, τετρανουκλεοτίδια, ολιγονουκλεοτίδια και τέλος, πολυνουκλεοτίδια. Δημιουργείται στα νουκλεϊνικά οξέα ένα μόρφωμα που έχει ως ραχοκοκαλιά μια αλληλουχία από φωσφορικά και ριβόζες που επάνω τους είναι αγκιστρωμένες οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης. Ανάλογα αν το νουκλεϊκό οξύ περιέχει D-ριβόζη ως υδατάνθρακα, ονομάζεται ριβονουκλεϊνικό οξύ, ενώ αν περιέχει D-2-δεοξυριβόζη ονομάζεται δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ, τα γνωστά RNA και DNA, αντίστοιχα (Γεωργιάτσου, 1993).

Στους νουκλεοζίτες η ετεροκυκλική βάση ενώνεται στη θέση 1' της πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό, κατά τον οποίο η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου. Ο ανωμερής άνθρακας ενός σακχάρου είναι σε θέση να ενωθεί με το άζωτο μιας αμίνης με ένα N-γλυκοζιτικό δεσμό. Οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β (σχήμα 1).



Σχήμα 1. Ουριδίνη (U)

Η χημεία των νουκλεοζιτών αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά αντικείμενα στην οργανική σύνθεση . Μεγάλος αριθμός ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη, σύνθεση και βιολογική ταυτοποίηση νουκλεοζιτών και νουκλεοζιτικών αναλόγων. Επίσης, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιϊκή και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες, έχουν γίνει τροποποιήσεις δομής τόσο στο τμήμα της βάσης όσο και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών δραστηριοτήτων τους.

Σχετικά με τις ιδιότητές τους, έχει αποδειχθεί ότι ορισμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν αντικαρκινικές και κυτταροστατικές ιδιότητες για αυτό και αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Komiotis *et al*, 2008). Επίσης, έχει διαπιστωθεί και η ικανότητα τους να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών (Lui V. *et al*, 2010; Bhat U. G. *et al*, 2010). Επιπλέον, επηρεάζουν τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς του πολλαπλασιασμού των ιών και για το λόγο αυτό παρέχουν ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιϊκών φαρμάκων. Τέλος, ορισμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν επιδείξει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Spanou C. *et al*, 2007), καθώς μπορούν να επιβραδύνουν ή να αποτρέψουν την οξείδωση ενός υποστρώματος ενώ βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το υπόστρωμα. Ανήκουν δηλαδή στην κατηγορία των αντιοξειδωτικών ουσιών (Halliwell B. 2001).

1.2 Τρόπος Δράσης Νουκλεοζιτών

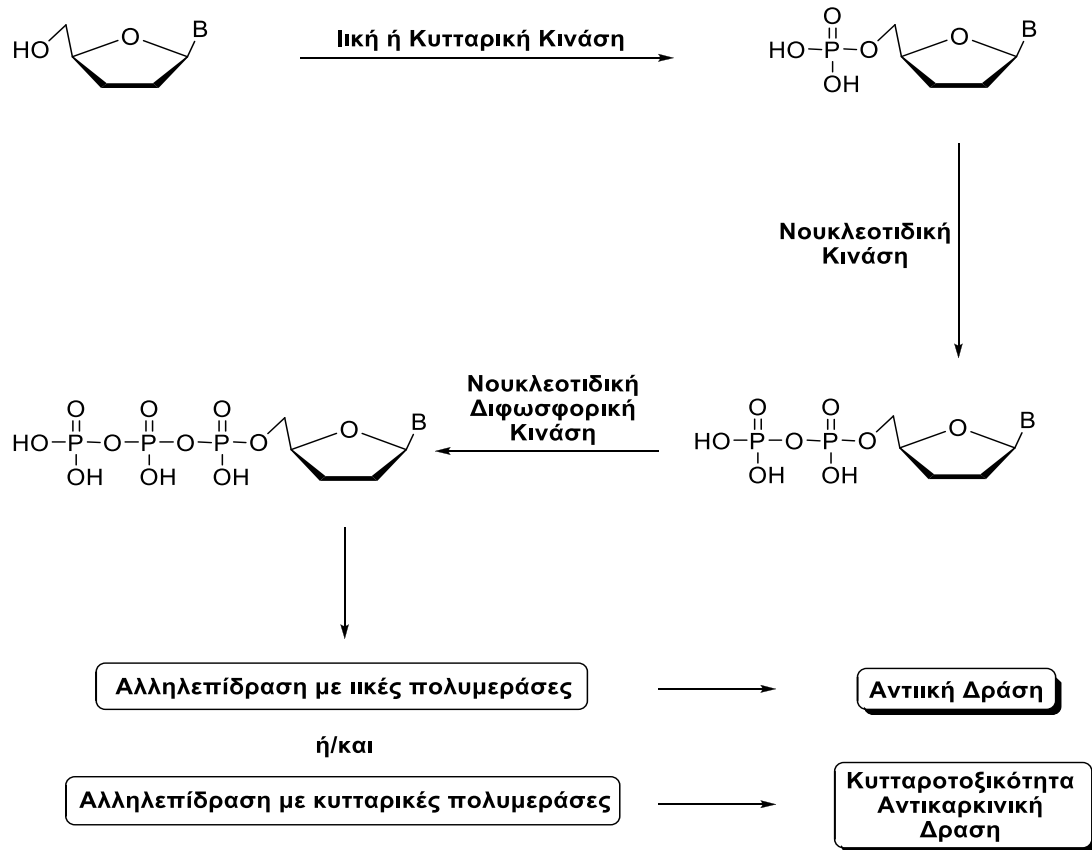
Όλες οι φαρμακευτικές ουσίες ασκούν την δράση τους αλληλεπιδρώντας με κάποιο μοριακό στόχο, αλλάζοντας την φυσιολογία της λειτουργίας των κυττάρων και κατ' επέκταση του οργανισμού. Για να γίνει κάτι τέτοιο πρέπει πρώτα από όλα το φάρμακο να μπορεί να έρθει σε επαφή με το μοριακό στόχο του. Οι μοριακοί στόχοι των φαρμάκων ποικίλουν, μπορεί να είναι υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων, δίαυλοι ιόντων, μόρια μεταφορείς, ένζυμα, πυρηνικοί υποδοχείς και άλλοι πολλοί. Στην περίπτωση που ο μοριακός στόχος του φαρμάκου είναι ενδοκυτταρικός πρέπει το φάρμακο, για να είναι δραστικό, να μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου. Επίσης, ένα σημαντικό κριτήριο επιλογής ενός φαρμακευτικού μορίου είναι η εκλεκτικότητά του όσον αφορά τον μοριακό στόχο, δηλαδή η ικανότητά του να αλληλεπιδρά εκλεκτικά με τον μοριακό στόχο του οποίου την λειτουργία θέλουμε να τροποποιήσουμε με όσο το δυνατόν μικρότερη αλληλεπίδραση με άλλα μόρια του κυττάρου ώστε να αποφευχθεί πιθανή παρεμβολή σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου και η πιθανή τοξικότητα που μπορεί να προκύψει από αυτές.

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα έχουν ενδοκυτταρικούς μοριακούς στόχους. Στοχεύουν κυρίως τα νουκλεϊκά οξέα και την σύνθεσή τους, όπως επίσης και ένζυμα σχετιζόμενα με αυτά (Vender M. D. *et al*, 2001). Στην φύση οι νουκλεοζίτες συντίθενται ενδοκυτταρικά αλλά είναι δυνατή και η είσοδός τους στο κύτταρο με παθητική διάχυση όπως επίσης και μέσω πρωτεϊνών μεταφορέων νουκλεοζιτών, ιδιότητες τις οποίες εκμεταλλευόμαστε στην χρήση νουκλεοζιτικών αναλόγων ως αντικαρκινικά και αντιϊικά φάρμακα (Zhou W. *et al*, 2004). Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα διατηρούν χαρακτηριστικά των φυσικών μορίων αλλά είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε, όταν εισέλθουν στο κύτταρο και μεταβολιστούν, να μπορούν να παρέμβουν στην σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και έτσι να ασκήσουν κυτταροστατική, αντιϊκή ή και αντιδιαβητική δράση (Tsirkone V. *et al*, 2010; Lui V. *et al*, 2010; Somsák L. *et al*, 2008).

Τα θεραπευτικά ανάλογα συνήθως δρουν ως προφάρμακα, δηλαδή είναι ανενεργά στην μορφή που χορηγούνται και πρέπει, για να ασκήσουν την θεραπευτική τους δράση, να μεταβολιστούν προς τις ενεργές τριφωσφορυλιωμένες μορφές τους

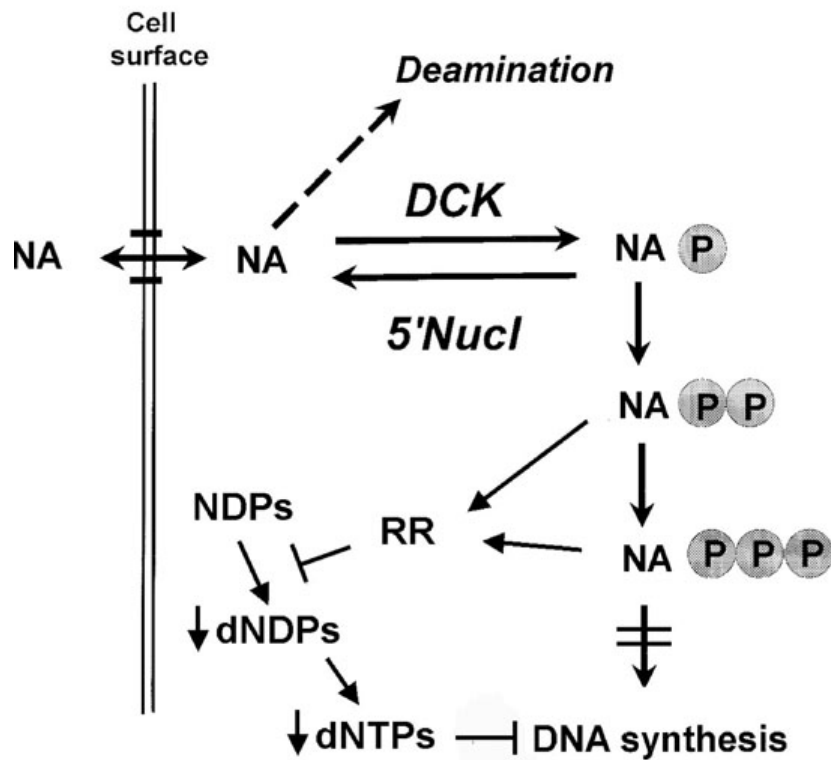
(Arner E. S. J. *et al*, 1995). Οι φωσφορυλιωμένες μορφές των νουκλεοζιτών δεν μπορούν να διαπεράσουν με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη λόγω φορτίου, όπως επίσης και άπαξ και δημιουργηθούν μέσα στο κύτταρο η μετακίνησή τους προς γειτονικά κύτταρα είναι δύσκολη λόγω του διαφορετικού pH που υπάρχει στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα.

Ένας κοινός μηχανισμός αντιικικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωσή τους στην επιμήκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της. Οι κυτταρικές πολυμεράσες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με ταυτόχρονη απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων (Lewin 2003, Burns *et al*. 2005). 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 2).



Εικόνα 2: Φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιικές κινάσες

Εκτός του παραπάνω μηχανισμού, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα δρουν και μέσω άλλων μηχανισμών. Μπορούν να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της καταστολής αντιαποπτωτικών γονιδίων (Lui V. W. *et al*, 2010, Bhat U. G. *et al*, 2010).



Εικόνα 3. Νουκλεοζιτικά ανάλογα. Μηχανισμός δράσης και παρεμπόδιση

Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται ο μεταβολισμός και οι αλληλεπιδράσεις του στόχου και αναλόγου δεοξυριβονουκλεοζίτη σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Το νουκλεοζιτικό ανάλογο (NA) εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ειδικών νουκλεοζιτικών μεταφοράσων. Μόλις βρεθεί στο εσωτερικό του κυττάρου, το NA φωσφορυλιώνεται από την κινάση δεοξυκυτιδίνης (DCK), NMPK και NDPK προς τα δραστικά 5'-τριφωσφορικά παράγωγα. Ο καταβολισμός του NA μπορεί να προκύψει από την ταχεία απαμίνωση από την απαμινάση κυτιδίνης προς μη τοξικούς μεταβολίτες. Η δραστηριότητα από την κυτταροπλασματική 5'-νουκλεοτιδάση (5'Nucl) αντιτίθεται με εκείνης του DCK με αποφωσφορυλιώσεις 5'-μονοφωσφορικών παράγωγων, αποτρέποντας έτσι την παραγωγή της δραστικής μορφής. Το NA ασκεί την δραστηριότητα του με την ενσωμάτωση στο νέο-συντιθέμενο DNA που έχει ως αποτέλεσμα τον τερματισμό της αλυσίδας και τον κυτταρικό θάνατο. Επίσης, μερικά NA μπλοκάρουν έμμεσα την αντιγραφή του DNA μέσω την αναστολής της αναγωγάσης ριβονουκλεοτιδίου (RR) ένζυμου, που με τη σειρά του αναστέλλει τη μείωση των διφωσφορικών ριβονουκλεοτιδίων (NDPs) προς διφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNDPs). Η μείωση των τριφωσφορικών

δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) ευνοεί την ενσωμάτωση της δραστικών 5'-τριφωσφορικών παραγώγων στο DNA. (Error! Reference source not found.

Η μελέτη των νουκλεοζιτικών αναλόγων για πιθανή αντιοξειδωτική δράση ξεκίνησε όταν παρατηρήθηκε πως είναι ικανά να προστατεύσουν το DNA από θραύσεις που προέρχονται από ρίζες υπεροξειδίου. Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα που φέρουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα με αποτέλεσμα να είναι πολύ αντιδραστικά και να μπορούν να προσβάλουν ένα πλήθος βιομορίων όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, σάκχαρα οξειδώνοντάς τα και προκαλώντας δυσλειτουργία στο κύτταρο (Undurti N., 2002). Τα αντιοξειδωτικά ασκούν την προστατευτική τους δράση έναντι των ελευθέρων ριζών είτε μέσω εξουδετέρωσής τους είτε μέσω περιορισμού της παραγωγής τους (Scalbert A. *et al*, 2005). Η παραγωγή ελευθέρων ριζών έχει συσχετιστεί με την διαδικασία της γήρανσης και πλειάδας παθολογικών οντοτήτων όπως νευροεκφυλιστικές νόσους, καρκίνο, και καρδιαγγειακές παθήσεις, αν και ο ρόλος τους στον καρκίνο δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως (Undurti N., 2002; Halliwell B., 2001). Υπάρχουν στοιχεία πως εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης μέσω δημιουργίας βλαβών στο DNA που μπορούν να απενεργοποιήσουν αντιογκογόνα γονίδια και να αποσταθεροποιήσουν τον κυτταρικό κύκλο, ασκώντας επιβλαβή δράση (Undurti N., 2002). Αντίθετα, σε καρκινικά κύτταρα οι ελεύθερες ρίζες μέσω της εμπλοκής τους στην μείωση των τελομερών, μπορούν να έχουν αντικαρκινική δράση (Undurti N., 2002).

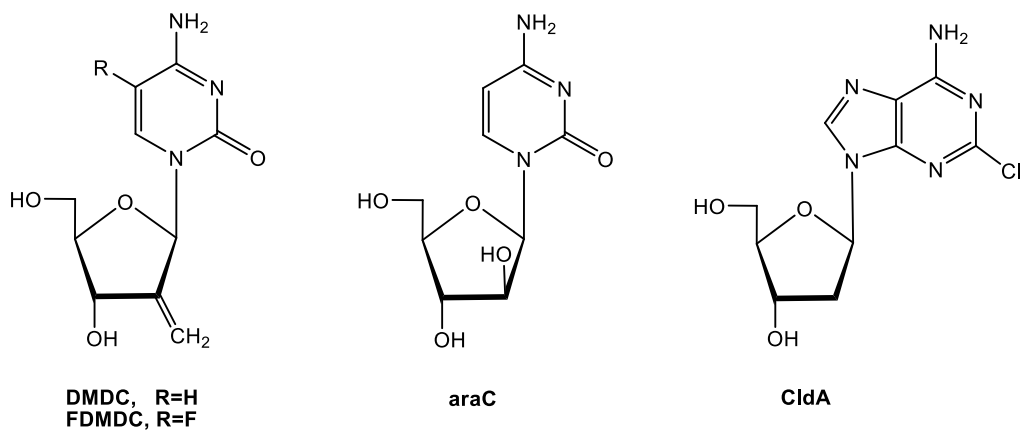
Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα θα μπορούσαν επίσης να αποτελέσουν πιθανά αντιδιαβητικά φάρμακα. Μελέτες έχουν δείξει πως ορισμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα διαθέτουν ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην ανάπτυξη και εξέλιξη του διαβήτη τύπου 2 (Tsirkone V. *et al*, 2010; Lui V. *et al*, 2010; Somsák L. *et al*, 2008)

1.3 Ενώσεις με αντικαρκινικές ιδιότητες

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σ' έναν υγιή οργανισμό υπόκειται πάντα σε αυστηρές ρυθμίσεις, που επιτρέπουν στα κύτταρα να αυξηθούν, να διαφοροποιηθούν και να λειτουργήσουν αρμονικά. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις ρυθμίσεις αυτές, περιλαμβάνουν ένα σύστημα χημικών μηνυμάτων με τη διαμεσολάβηση, για παράδειγμα, ορμονών και συγκεκριμένων μεμβρανικών υποδοχέων. Τα κύτταρα σε καλλιέργεια, σταματούν την διαίρεσή τους όταν έρθουν σ' επαφή το ένα με το άλλο. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται και η μιτωτική διαίρεση ορισμένων κυττάρων συνεχίζεται ανεξέλεγκτα χωρίς να υπακούει σε περιοριστικούς κανόνες. Τα κύτταρα χάνουν τη διαφοροποιημένη μορφή τους και περνούν σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία όγκων ή καρκινωμάτων. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μπορεί να είναι περιορισμένος (καλοήθεις όγκοι), ή έντονος με μεταστάσεις σε άλλους ιστούς (κακοήθεις όγκοι), οι οποίοι θεραπεύονται κυρίως με χημειοθεραπεία ή ακτινοβολίες.

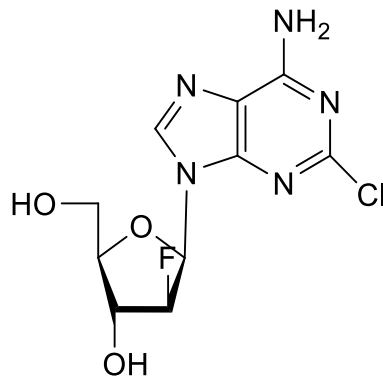
Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία διαθέτουν αυξημένη δραστηριότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Νέες αντικαρκινικές ουσίες, οι οποίες έχουν μελετηθεί εντατικά, είναι οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους. Οι νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύουν στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC), 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πεντοφουρανοζυλο)5-φθοροκυτοσίνη (FDMDC), 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC) και 2-χλωρο-2'-δεσοξυαδενοσίνη (CldA) (εικόνα 4) έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών, όπως διάφοροι τύποι λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Cory A. H. *et al*, 1994, Pontikis R. *et al*, 1997, Yamagami K. *et al*, 1991, Lin T. S. *et al*, 1991, Baker C. H. *et al*, 1991, Matsuda A. and Sasaki T. 2004). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς

μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui V. W. *et al*, 2010, Bhat U. G. *et al*, 2010).



Εικόνα 4

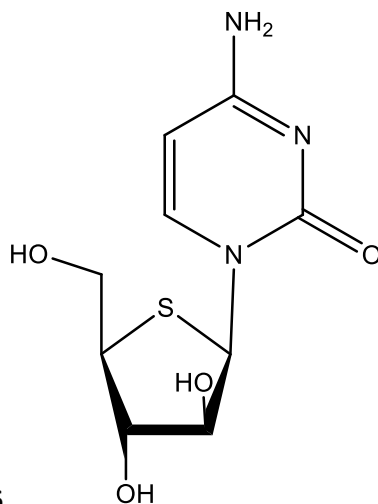
Ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο που έχει εγκριθεί για την θεραπεία της αιματολογικής κακοήθειας, της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και πιθανόν άλλων μορφών καρκίνου, όπως η οξεία μυελογενής λευχαιμία είναι το Clofarabine [2-χλωρο –(2'-δεοξυ-φθορο-β-D-αραβινοφουρανοζυλο)αδενίνη] (Faderl S. J. *et al*, 2002, Parker W. B. *et al*, 2004, Faderl S. J. *et al*, 2005, Pui C. H. *et al*, 2005, Secrist J. A., 2005), (Εικόνα 5).



Clofarabine

Εικόνα 5

Η ένωση 1-(4'-θειο-β-D-αραβινοφουρανοζυλο)κυτοσίνη (Thiarabine, 4'thio-araC) (Tiwari K. N. *et al*, 2000, Waud W. R. *et al*, 2003, Someya H. *et al*, 2003, Secrist J. A., 2005) (εικόνα 6), μετά το πρώτο στάδιο μελετών, βρέθηκε ότι είναι δραστική έναντι, κακοήθων όγκων, συμπεριλαμβανομένων του παχέος εντέρου, των πνευμόνων, του παγκρέατος, του νεφρού, του προστάτη καθώς και του μαστού.



Εικόνα 6

Thiarabine 4'thio-araC

1.4 Πυρανονουκλεοζίτες

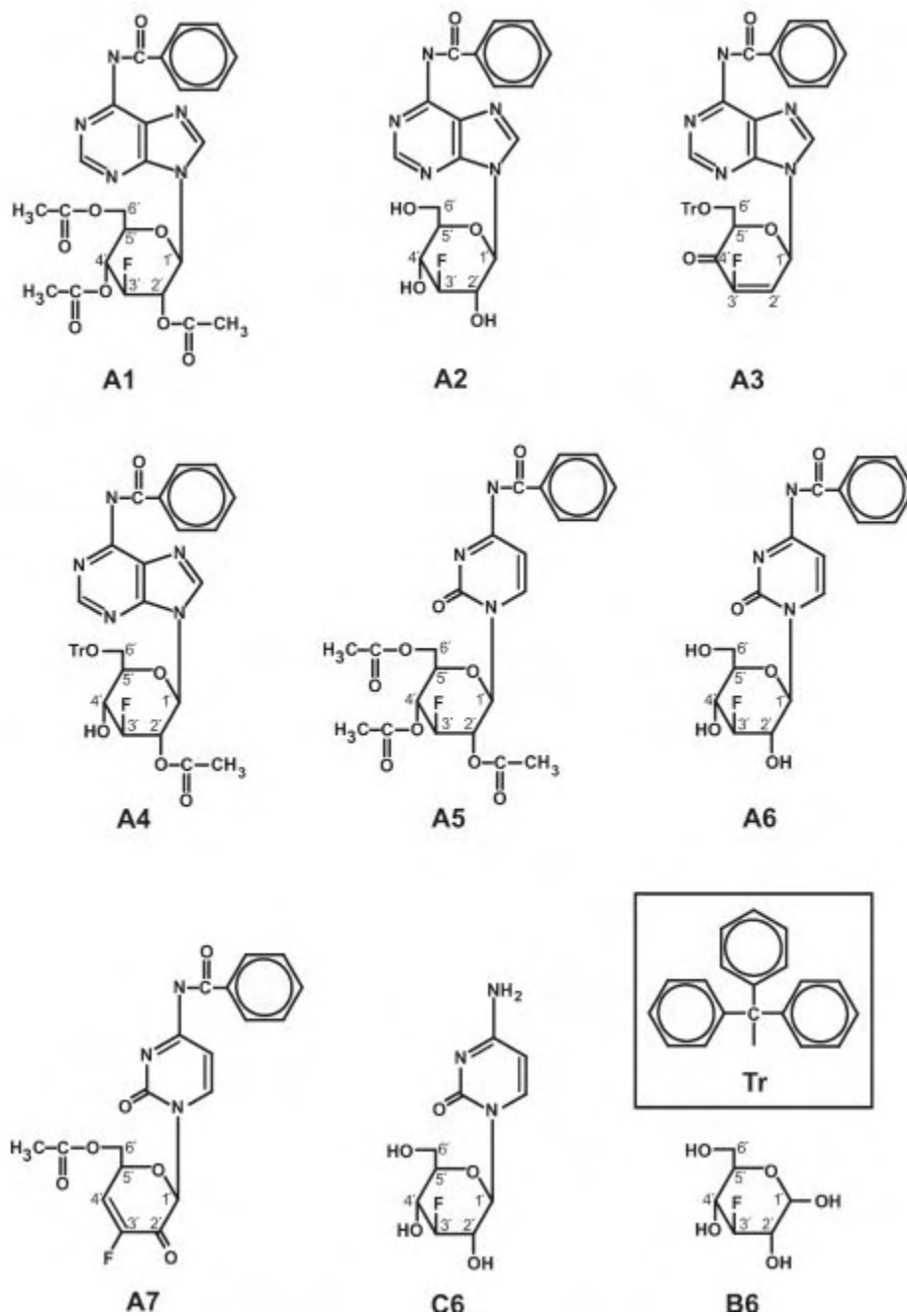
Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντική ή/και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη και φέρουν τη β-απεικόνιση. Η σπουδαιότητα των πεντοζών αναγνωρίστηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως συστατικά των νουκλεϊκών οξέων. Όλοι οι νουκλεοζίτες στο DNA και RNA αποτελούνται από ένα D-πεντοφουρανοζικό σάκχαρο συνδεδεμένο με μία ετεροκυκλική νουκλεοβάση (πουρίνη ή πυριμιδίνη), μέσω ενός β-N-γλυκοσιδικού δεσμού (Saenger 1984, Blackburn and Gait 1996, Bloomfield *et al.* 1999). Όμως, ορισμένα προβλήματα που προέκυψαν από τη χρήση των φουρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως ο ανεπαρκής μεταβολισμός προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, η χημική ή ενζυματική απενεργοποίησή τους, η τοξικότητα, η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και όγκων και τέλος ο μικρός χρόνος ημιζωής και κατά συνέπεια χρόνος δράσης τους, έστρεψαν το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντικής δράσης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων και ειδικότερα αυτών που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη (www.cf.ac.uk/phrmy/ChemEd/presentations.html).

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η έρευνα για την ανακάλυψη αντικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είχε μείνει αρκετά βήματα πίσω σε σχέση με αυτή των βιολογικώς ενεργών νουκλεοζιτών με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίους. Παρόλα αυτά, νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντικές (Verheggen *et al.* 1993, Verheggen *et al.* 1995, Maurinsh *et al.* 1997, Ostrowski *et al.* 1998), αντικαρκινικές (Antonakis 1989) και αντιβιοτικές τους ιδιότητες (Haouz *et al.* 2003), καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων (Vastmans *et al.* 2000, Vastmans *et al.* 2001).

Παρομοίως, η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων που φέρουν μεθυλομάδα σαν τροποποίηση στο τμήμα του σακχάρου τους, έχει περιοριστεί στη σύνθεση φουρανονουκλεοζιτικών αναλόγων (Mitsuhiro Kinoshita *et al.* 1975, Rosanne Bonjouklian *et al.* 1979, Olivier R. Martin *et al.* 1983). Κάποια από αυτά τα ανάλογα,

όπως οι 3'-δεοξυ-3'- C- μεθυλο-β-D- ριβονουκλεοζίτες (Sarah Couturier *et al.* 2007) και 3'-δεοξυ-3'- C- μεθυλο ριβοφουρανοναζυλονουκλεοζίτες (Mohamed Aljarah *et al.* 2008), έχουν συντεθεί και έχουν εξεταστεί ως προς τις αντικές τους ιδιότητες με πειράματα κυτταρικών καλλιιεργειών, αλλά καμιά ένωση δεν επέδειξε σημαντική δράση. Έχουν βέβαια συντεθεί και ενώσεις που έδειξαν αξιοσημείωτη κυτταροτοξική και αντιική δράση, όπως η (2S')- 2'- δεοξυ- 2'-C- μεθυλοκυτιδίνη (Akira Matsuda *et al.* 1991) με τιμή IC₅₀ 0.26 μg/ml σε λευχαιμικά καρκινικά κύτταρα L1210 και οι 2'- δεοξυ-2'- C- μεθυλο- κυτιδίνες και -ουριδίνες (Hirokazu Awano *et al.* 1996) με τιμές IC₅₀ 0.14-0.22 μg/ml έναντι του ιού HSV- 1.

Στο εργαστήριο Βιο-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 7). Τα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπες ενώσεις για την ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν την PARN (Balatsos *et al.* 2009).



Εικόνα 7. Οι δομές φθοριωμένων πυρανοουκλεοζιτών.

Ακόμη, φθοριωμένοι πυρανοουκλεοζίτες έχουν αξιολογηθεί και ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP), ένζυμο με κεντρικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου και υπεύθυνο για την παραγωγή γλυκόζης στο αίμα (γλυκογενόλυση). Η λεπτομερής ανάλυση των παραγόντων που καθορίζουν τη σύνδεση μικρομοριακών ενώσεων (αναστολέων) στη GP σε μοριακό επίπεδο, παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της ενζυμικής τους δράσης ή και της ανεπιθύμητης αποικοδόμησης γλυκογόνου, στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, όπου η

υπεργλυκαιμία αποτελεί σοβαρό ιατρικό πρόβλημα. Συγκεκριμένα, φθοριωμένοι πυριμιδινικοί γλυκοπυρανονουκλεοζίτες καθώς και ένα φθοριωμένο δεοξυπυρανονουκλεοζιτικό ανάλογο της N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνης αποδείχθηκαν ανταγωνιστικοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του μυϊκού γλυκογόνου (GPb) (Tsirkone *et al.* 2010).

1.5 Καρκίνος

Στο ανθρώπινο σώμα, τα κύτταρα συνεχώς πεθαίνουν και αντικαθίστανται. Φυσιολογικά, το σώμα δημιουργεί καινούρια κύτταρα αντιγράφοντας τα παλαιότερα. Σε σπάνιες περιπτώσεις όμως, κατά την αντιγραφή ενσωματώνονται "λάθη" στα νεοσχηματισμένα κύτταρα. Εάν το λάθος συμβεί στο γενετικό υλικό του κυττάρου, αυτό ονομάζεται "μετάλλαξη". Οι μεταλλάξεις μπορεί να είναι ακίνδυνες και το αποτέλεσμά τους εξαρτάται από το εάν συμβούν σε ζωτικής σημασίας γονίδιο ή όχι. Οι περισσότερες των μεταλλάξεων είναι ακίνδυνες καθώς μόνο ένα μικρό ποσοστό του συνόλου του γενετικού υλικού αποτελεί "λειτουργικά" γονίδια (κατά προσέγγιση μόνο το 1,5% του συνολικού γονιδιώματος κωδικοποιεί "λειτουργικά" γονίδια, και ο αριθμός των "λειτουργικών" γονιδίων όπως αυτός περιγράφεται στο *Human Genome Project* είναι περίπου 30.000). Κατά συνέπεια, η πιθανότητα οποιαδήποτε δεδομένη μετάλλαξη να συμβεί σε ένα σημαντικό γονίδιο και να οδηγήσει σε αλλαγές στην λειτουργία ή σε προϊόντα του κυττάρου είναι σχετικά μικρή. Συνήθως, χρειάζονται πολλά σεν μεταλλάξεων για να δημιουργηθεί ένα αθροιστικό αποτέλεσμα το οποίο θα τροποποιήσει τα κύτταρα. Όμως, η πιθανότητα να επηρεαστεί ένα κύτταρο αυξάνεται εάν η πρώτη μετάλλαξη συμβεί σε γονίδιο που ευθύνεται για την αποτροπή ή επιδιόρθωση άλλων μεταλλάξεων. Επιπροσθέτως, λόγω αποτελεσματικών αυτο-διορθωτικών μηχανισμών που σχεδόν όλοι οι επιτυχημένοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει, οι περισσότεροι καρκίνοι που προέρχονται από αυτή τη διαδικασία αθροιστικών μεταλλάξεων είναι σποραδικοί και δεν κληροδοτούνται στις επόμενες γενιές.

Σε σπάνιες περιπτώσεις όπου η μετάλλαξη συμβαίνει σε γαμετικά κύτταρα, μπορεί να κληροδοτηθεί στους απογόνους του οργανισμού. Αυτές οι μεταλλάξεις αποτελούν το περίπου 3-5% του συνολικών περιπτώσεων καρκίνου. Συνηθέστερα, συμβαίνουν όταν τα κύτταρα των ωοθηκών και των όρχεων, στα οποία δημιουργούνται τα ωάρια και το σπέρμα, περιέχουν τη μετάλλαξη, και όταν ο οργανισμός αναπαράγεται αυτές οι μεταλλάξεις κληρονομούνται στους απογόνους. Παρόλο που γενικά μία μετάλλαξη από μόνη της δεν οδηγεί σε καρκίνο, άνθρωποι που έχουν κληρονομήσει τέτοιου είδους μεταλλάξεις είναι ένα βήμα πιο κοντά στο να αναπτύξουν καρκίνο σε σχέση με ανθρώπους που δεν έχουν τέτοια διαφοροποιημένα γονίδια. Μερικές ευρέως γνωστές καρκινικές μεταλλάξεις περιλαμβάνουν αυτές που βρίσκονται σε κάποια από τα συγκεκριμένα γονίδια τα οποία σχετίζονται με ρυθμίσεις πρωτεϊνικής έκφρασης όπως τα BRCA1 και BRCA2 στον καρκίνο του στήθους και των ωοθηκών, και πρωτο-ογκογονίδια όπως το RET στον καρκίνο του κόλον (Πίνακας 1).

Επίκτητες μεταλλάξεις συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ανθρώπου και δεν μεταβιβάζονται από τον γονέα στο παιδί. Η χρήση καπνού ή η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, ορισμένοι ιοί, το γήρας, και άλλοι παράγοντες είναι συχνά αίτια επίκτητων μεταλλάξεων οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν "σποραδικό καρκίνο", ο οποίος είναι πολύ πιο συνηθής από ότι οι κληρονομήσιμοι τύποι καρκίνου. Σε ανθρώπους με σποραδικό καρκίνο, ορισμένα κύτταρα του σώματός τους (σωματικά κύτταρα) αναπτύσσουν μεταλλάξεις που οδηγούν σε καρκίνο. Ακόμη, στον σποραδικό τύπο καρκίνου, μόνο τα κύτταρα του όγκου περιέχουν αυτές τις βλαβερές μεταλλάξεις. Αντιθέτως, στον κληρονομικό καρκίνο, κάθε κύτταρο στο σώμα του ανθρώπου περιέχει την μετάλλαξη, καθώς κάθε κύτταρο προέρχεται από το γαμετικό κύτταρο με το μεταλλαγμένο(α) γονίδιο(α). Όπως και στον σποραδικό καρκίνο, ένα σύνολο περιβαλλοντικών και γενετικών παραγόντων ευθύνονται για τον οικογενειακό ή κληρονομικό τύπο καρκίνου. Στον Πίνακα 1 φαίνονται μερικά από τα γονίδια που σχετίζονται με τον κληρονομικό καρκίνο στους ανθρώπους. (R. Paulmurugan, 2012)

<i>Gene Name</i>	<i>Type of Gene</i>	<i>Syndrome</i>
<i>BRC1 and BRC2</i>	<i>DNA repair genes</i>	<i>Hereditary Breast/Ovarian Cancer</i>
<i>MSH2, MLH1, MSH6, PMS1, PMS2</i>	<i>DNA repair genes</i>	<i>Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer syndrome (HNPCC)</i>
<i>RET (Rearranged during transfection)</i>	<i>Proto- oncogene</i>	<i>Multiple Endocrine Neoplasia type 2a and 2b</i>
<i>PTEN</i>	<i>Tumor suppressor gene</i>	<i>Cowden syndrome</i>
<i>VHL μετάλλαξη στο 3P25.3:</i>	<i>Tumor suppressor gene</i>	<i>Renal angioma, renal cell carcinoma</i>
<i>p53 tumor suppressor gene</i>	<i>Tumor suppressor gene</i>	<i>Li-Fraumeni syndrome, breast cancer, brain tumors</i>
<i>Autosomal recessive genetic disorder</i>	<i>DNA repair genes</i>	<i>Xeroderma pigmentosa, metastatic malignant melanoma and squamous cell carcinoma</i>

Πίνακας 1: Ελάττωμα σε σημαντικά κυτταρορυθμιστικά γονίδια οδηγεί σε κληρονομικούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο. (R. Paulmurugan, 2012)

1.6 Μοριακοί μηχανισμοί σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα

Οι φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες διαχειρίζονται και συντηρούνται από ένα δίκτυο συνεργατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ αρκετών κυτταρικών μονοπατιών, τα οποία περιλαμβάνουν κυτταρικές κυκλικές πρωτεΐνες, ελεγχόμενη αποπτωτική διαδικασία, λειτουργικές ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, υπεύθυνους κυτταρικούς υποδοχείς, ελεγχόμενο δίκτυο μεταφοράς σημάτων και ενεργούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA. Όλα μαζί, αυτά τα μονοπάτια δημιουργούν αυτό που είναι γνωστό ως οι «έξι σημαντικοί κανόνες», απαιτούμενοι για τη συντήρηση των κυττάρων σε φυσιολογική κατάσταση. Ο κληρονόμος διατηρεί την φυσιολογική κυτταρική λειτουργία, αλλά εάν υπάρξει μία σημαντική ρωγμή σε οποιονδήποτε από τους μηχανισμούς αυτού του κυκλώματος, μπορεί να οδηγήσει σε μία παθολογική κατάσταση του κυττάρου η οποία με τη σειρά της μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο. Επιπροσθέτως, κάθε ένας από αυτούς τους μηχανισμούς ρυθμίζεται

από ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Σε αντιπαράθεση με τους έξι σημαντικούς κανόνες που απαιτούνται για τη διατήρηση των κυττάρων σε φυσιολογική κυτταρική κατάσταση, η ανάπτυξη του καρκίνου περιλαμβάνει μεταλλαγμένες ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, ενεργοποιημένη και αυξημένη αγγειογένεση, απενεργοποιημένα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, αντι-αποπτωτικές ιδιότητες, ενεργό σήμα ανάπτυξης (growth signaling), και ανεπαρκή συστήματα επιδιόρθωσης DNA. (R. Paulmurugan, 2012)

1.7 Ανάπτυξη φαρμάκων για καταπολέμηση του καρκίνου

Για την ανάπτυξη φαρμάκων κατά του καρκίνου, είναι πολύ σημαντικό να αναγνωρισθεί ένας ή περισσότεροι μοριακοί στόχοι που να είναι διαφορετικοί ειδικά στα καρκινικά κύτταρα και να μην είναι διαθέσιμοι, ή να είναι διαθέσιμοι σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτοί μπορεί να περιλαμβάνουν υποδοχείς της επιφάνειας του κυττάρου όπως είναι οι EGFR και VEGFR και η ιντεγκρίνη, ή άλλους μηχανισμούς όπως η σύνθεση του DNA ή καταστολείς του μεταλλαγμένου όγκου και ενεργοποιημένα ογκογονίδια. Ακόμη, ο καρκίνος είναι ετερογενούς φύσης, οπότε οι αναγνωρισμένοι μοριακοί στόχοι για έναν συγκεκριμένο τύπο καρκίνου μπορεί να μην είναι αποτελεσματικοί για κάποιον άλλο τύπο. Έτσι, απαιτείται ειδική στόχευση συγκεκριμένων μεμονωμένων ειδών καρκίνου, ή ίσως είναι δυνατή η αναγνώριση ενός κοινού μηχανισμού που να είναι αποτελεσματικός για μια πληθώρα τύπων καρκίνου. Η επιτυχημένη ανάπτυξη φαρμάκων κατά του καρκίνου απαιτεί την συνεργασία ειδικών σε διαφορετικά πεδία, συμπεριλαμβανομένων της βιοχημείας, κυτταρικής βιολογίας, μοριακής βιολογίας, και κλινικούς ειδικούς. (R. Paulmurugan, 2012)

1.8 Μοριακοί θεραπευτικοί στόχοι των καρκινικών κυττάρων

Έχουν ταυτοποιηθεί και ερευνηθεί πολλοί διαφορετικοί τύποι μοριακών στόχων με σκοπό την ανάπτυξη και εφαρμογή φαρμάκων κατά του καρκίνου. Οι πρωτεύοντες στόχοι περιλαμβάνουν ενεργοποιημένες ογκογενετικές πρωτεΐνες ή μεταλλαγμένα μη-λειτουργικά ογκοκατασταλτικά γονίδια. Σε κάποιες περιπτώσεις μπορούν να λειτουργήσουν ως στόχοι για τη θεραπεία τα ειδικά χαρακτηριστικά του ιστού ή η διαφοροποίηση στο μονοπάτι. Για παράδειγμα, κάποια οιστρογόνα δρουν ως μιτογόνα στον ιστό του στήθους και είναι υπερδραστήρια στα καρκινικά κύτταρα του στήθους. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει μέσω ενός στεροειδούς υποδοχέα που ονομάζεται υποδοχέας οιστρογόνου (ER). Η αναστολή της δράσης των οιστρογόνων (με τη χρήση αντι-οιστρογόνου όπως είναι το tamoxifen), έχει αποδειχθεί αποτελεσματικός τρόπος θεραπείας των ER-θετικών καρκίνων του στήθους. Ομοίως, το διαφοροποιημένο μονοπάτι που ξεκινά από τα διαφοροποιημένα αιμοποιητικά κύτταρα (hematopoietic lineage) έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της προμυελοκυτικής λευχαιμίας (promyelocytic leukemia). Σε αυτήν την στρατηγική, κύτταρα σε καλοήγη κατάσταση προκαλούνται να προωθήσουν την ωρίμανση και διαφοροποίηση κυττάρων, ώστε να αποκτήσουν κακοήγη φαινότυπο. Ακολουθεί θεραπεία με στελέχη τα οποία μπορούν, μέσω ρύθμισης των γονιδίων, να προκαλέσουν απόπτωση και έτσι να "σκοτώσουν" αποτελεσματικά τα ογκοκύτταρα. Η οξεία προμυελοκυτική λευχαιμία, ένας τύπος της οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας (myeloid leukemia), θεραπεύεται αποτελεσματικά με αυτή την τεχνική. Η χρήση του all-trans ρετινοϊκού οξέος (ATRA) έχει έτσι μετατρέψει ένα θανατηφόρο είδος λευχαιμίας σε έναν θεραπεύσιμο τύπο καρκίνου. (R. Paulmurugan, 2012)

1.9 PET και μόρια με ^{18}F

Η τομογραφία εκπομπής ποσιτρονίων είναι μια τεχνική απεικόνισης που χρησιμοποιείται στην μελέτη λειτουργικής και βιοχημικής δραστηριότητας στους ιστούς στόχους in vivo. Η PET έχει οδηγήσει σε σημαντικές γνώσεις στη βιολογία, φυσιολογία και παθοφυσιολογία του νευρικού συστήματος σε καταστάσεις υγείας και ασθένειας. Πολλές από αυτές τις γνώσεις και τις εφαρμογές χρησιμεύουν άμεσα στους νευρολόγους. Παρόλο που η ^{18}F -δεοξυγλυκόζη (^{18}F -FDG) υπήρξε κινητήριος δύναμη για τις κλινικές απεικονίσεις PET, παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα, γι' αυτό έχουν μελετηθεί πολλά βιομόρια επισημασμένα με ^{18}F μέσω της PET.

Η ^{18}F -FDG χρησιμοποιείται ευρέως ως ανιχνευτής στις απεικονίσεις PET. Αφού ενεθεί στο ανθρώπινο σώμα, λαμβάνεται μέσω μεταφορέων γλυκόζης από διάφορους ιστούς και παγιδεύεται στα κύτταρα. Η αυξημένη γλυκόλυση και η αντίστοιχη αυξημένη δραστηριότητα της εξοκίνησης οδηγούν σε υψηλή συσσώρευση ^{18}F -FDG στα καρκινικά κύτταρα που τα κάνει να ξεχωρίζουν σημαντικά από τους καλοήθεις ιστούς.

Ωστόσο, η ^{18}F -FDG δεν είναι τόσο εξειδικευμένος ανιχνευτής και δεν είναι δυνατόν να ξεχωρίσουμε κύτταρα με υψηλό μεταβολικό ρυθμό όπως νεοπλασίες από άλλες αιτιολογίες όπως μόλυνση ή φλεγμονή. Επιπλέον, άλλες κακοήθειες όπως ο καρκίνος των νεφρών, δεν εμφανίζουν υψηλή συσσώρευση γλυκόζης και δεν μπορεί να γίνει διάγνωση με ^{18}F -FDG PET απεικόνιση. Γι' αυτό οι έρευνες έχουν στραφεί και σε άλλα μόρια τα οποία δε θα εμφανίζουν αυτά τα μειονεκτήματα.

Χάρη στα πυρηνικά και χημικά χαρακτηριστικά του ^{18}F , αυξήθηκε το ενδιαφέρον για τη δημιουργία μορίων επισημασμένων με ^{18}F για κλινική χρήση. Ο χρόνος ημιζωής του ^{18}F είναι 109,8 λεπτά, χρόνος αρκετός για time-consuming multi-steps radio-syntheses και για την απεικόνιση διαδικασιών που επεκτείνονται πολλές ώρες.

Στην παρούσα φάση οι επιθυμητοί στόχοι για απεικόνιση περιλαμβάνουν κυτταρικό μεταβολισμό (γλυκόζη, αμινοξέα, λιπίδια, νουκλεοτίδια), βιολογικά φαινόμενα (υποξία όγκων, απόπτωση, πολλαπλασιασμός, αγγειογένεση) ή άλλους μοριακούς βιοδείκτες (υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, ειδικά ένζυμα).

2. Σκοπός

Όπως είναι γνωστό οι νουκλεοζίτες μαζί με τα ανάλογά τους αποτελούν το θεμέλιο λίθο για την ανάπτυξη ενώσεων με αυξημένη βιολογική δράση, μειωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες σε σχέση με τις μέχρι πρότινος χρησιμοποιούμενες ενώσεις. Ειδικότερα, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη εμφανίζουν σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες, γεγονός που καθιστά τη σύνθεση και τη βιολογική τους μελέτη εξαιρετικά ενδιαφέρουσες από τη στιγμή μάλιστα που οι φουρανονουκλεοζίτες εμφάνιζαν ορισμένα προβλήματα.

Αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση νέων ρ-τολουολοσουλφονυλο πυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης και της 5-φθοροουρακίλης με σκοπό την περαιτέρω αξιοποίησή τους για εισαγωγή του ^{18}F με στόχο τη χρήση τους στη μοριακή απεικόνιση και in vivo παρακολούθηση του καρκίνου.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων

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

- Οξικός ανυδρίτης (Ac_2O) (Aldrich, Γερμανία)
- Πυριδίνη (Panreac, Ισπανία)

- Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH) (Merck, Γερμανία)
- Hexamethyldisilazane (HMDS) (Aldrich, Γερμανία)
- Trimethylsilyltrifluoromethane (Me₃SiOSO₂CF₃) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Υδρίδιο του ασβεστίου (CaH) (Fluca, Γερμανία)
- Ακετονιτρίλιο (CH₃CN) (Merck, Γερμανία)
- Πεντοξείδιο του φωσφόρου (P₂O₅) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bicarbonate (NaHCO₃) (Merck, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bisulfate (NaHSO₄) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδροθειικό νάτριο (Na₂SO₄) (Merck, Γερμανία)

3.2 Γενική Μεθοδολογία

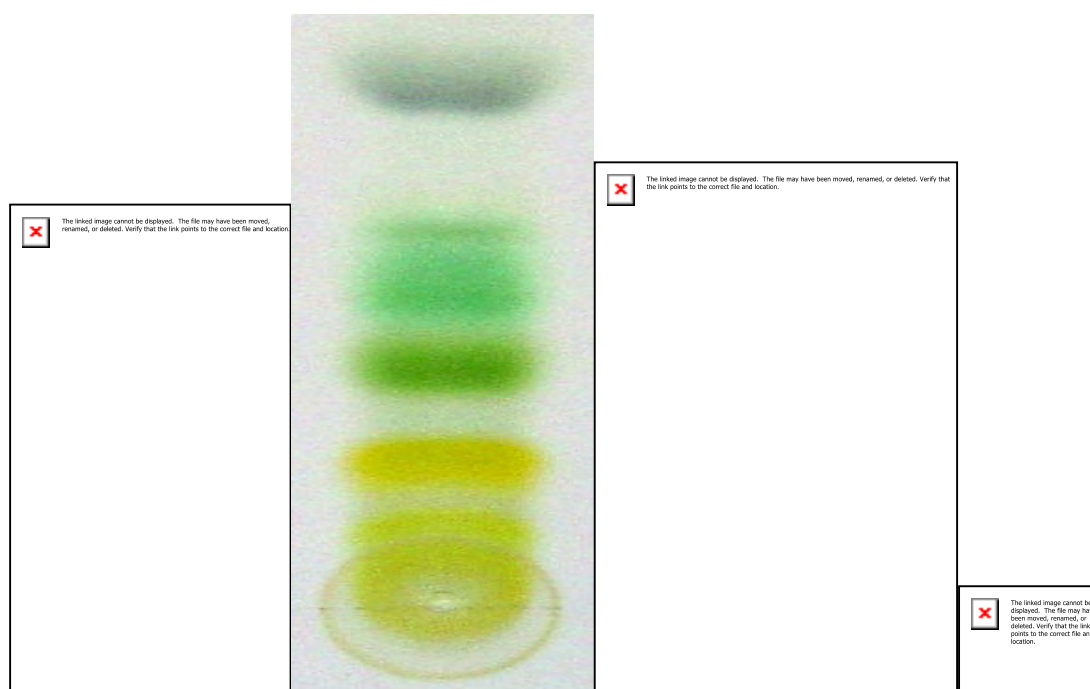
3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)

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

Το διάλυμα του υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς θαλάμου στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Ακολούθως ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Ύστερα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε μορίου στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης R_f, που

ορίζεται από το λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη (α). Η τιμή Rf ενός συγκεκριμένου μορίου χρησιμεύει για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254nm ή 356nm) ή μετά από ψεκασμό με διάλυμα H_2SO_4 (θειικού οξέος) 30%.

Μια χρωματογραφία λεπτής στιβάδας απεικονίζεται στην εικόνα 8.



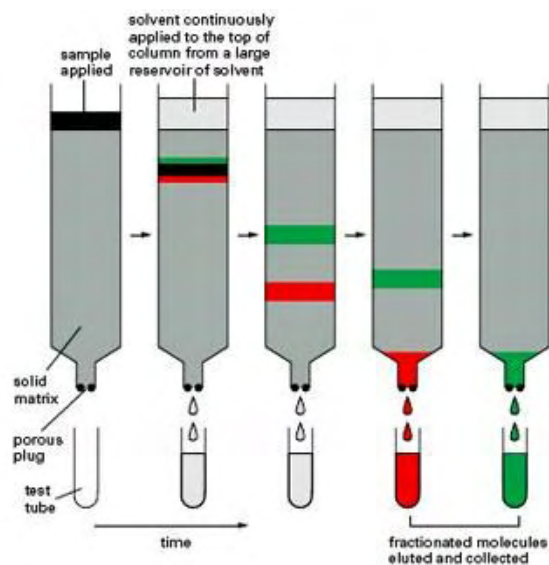
Εικόνα 8

3.2.2 Χρωματογραφία στήλης

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

Η χρωματογραφία στήλης είναι μια τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην προσρόφηση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μια ακίνητη φάση, συνήθως silica gel και την έκλουσή τους με μια ακίνητη φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών. Οι πολικές ουσίες προσροφούνται και κολλούν στην αφετηρία, κορυφή, της στήλης και χρειάζονται πιο πολικό διαλύτη για να προχωρήσουν. Οι άπολες ουσίες συνήθως προχωρούν ή κατεβαίνουν πιο εύκολα ακόμη και με διαλύτες χαμηλής πολικότητας. Για την έκλυση των ουσιών από το silica gel χρειάζεται να γίνει έκλυση της στήλης με διάφορους διαλύτες αρχίζοντας από τους λιγότερο πολικούς και καταλήγοντας στους περισσότερο πολικούς.

Στη χρωματογραφία στήλης η στατική φάση τοποθετείται σε μια στήλη κατασκευασμένη από αδρανές υλικό (ύαλος, πηκτή πυριτίας, ανοξειδωτος χάλυβας). Το δείγμα τοποθετείται στην αρχή (κορυφή) της στήλης και η κινητή φάση διέρχεται εξαναγκασμένα μέσω της στατικής φάσης με την εφαρμογή πίεσης σε αυτήν ή λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από την συγγένεια των συστατικών ως προς την στατική φάση (εικόνα 9).



Εικόνα 9

3.2.3 Ξήρανση διαλυτών

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

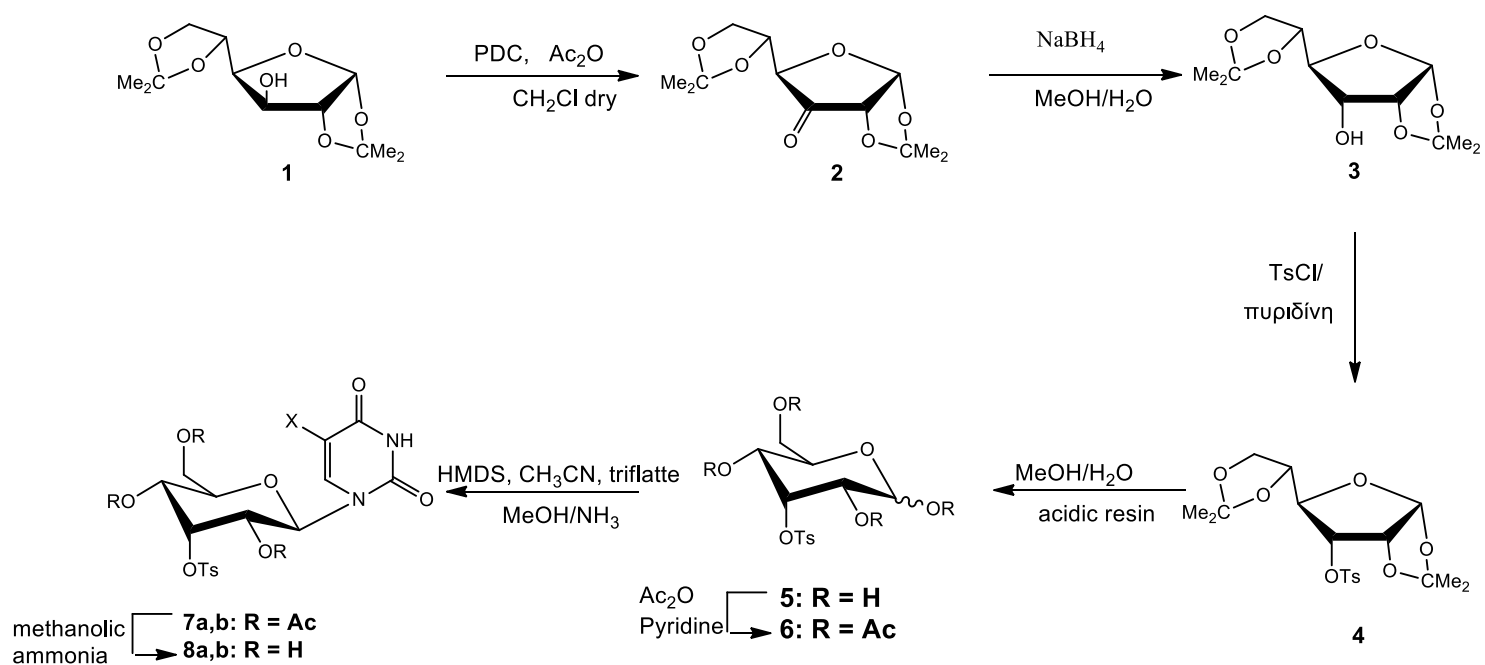
3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με το φωτόμετρο Bruker 300 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO}-d_6$). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς. Η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (doublet), dd (doublet doublet), dtr (doublet triplet), m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

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

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

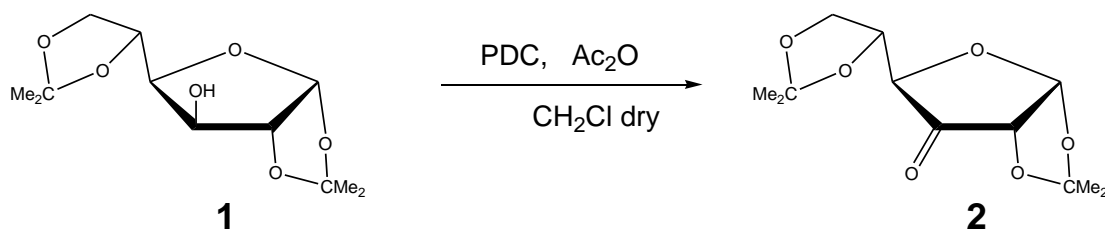
4.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού



Me = Μεθύλιο, Ac = Ακετύλιο, Ts = Τοσυλομάδα

a: X = H, b: X = F

4.2 Μεθοδολογία Σύνθεσης

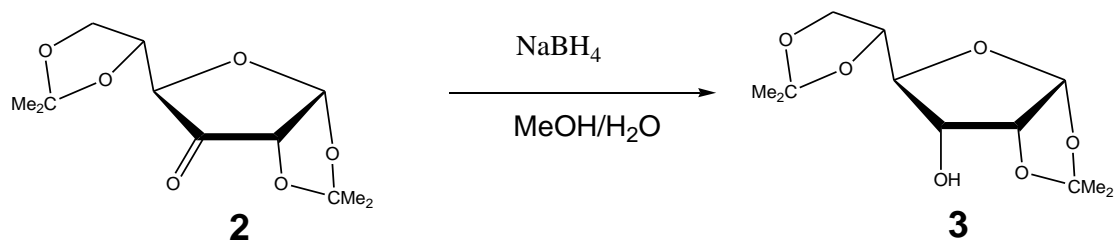


4.2.1) 1,2:5,6-Δις-*O*-ισοπροπυλιδενο- α -*D*-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη (2)

(Elhalabi and Rice 2004)

Η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2:5,6-δις-*O*-ισοπροπυλιδενο- α -*D*-γλυκοφουρανόζη (DAG) (**1**) (20.00 g, 76.84 mmol) διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο (200 mL) και στη συνέχεια προστέθηκε Ac_2O (21.75 mL, 230.52 mmol). Στο προκύπτον μίγμα προστέθηκε PDC (34.69 g, 92.21 mmol) και ακολούθησε θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης στο μίγμα προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας (300 mL) και το προκύπτον παχύρρευστο διάλυμα μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel). Πραγματοποιήθηκε έκλουση με οξικό αιθυλεστέρα και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα, που περιείχε Ac_2O αραιώθηκε με τολουόλιο και στη συνέχεια με απόσταξη εξατμίστηκε μέχρις ξηρού. Το επιθυμητό προϊόν **2** (17.05 g) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

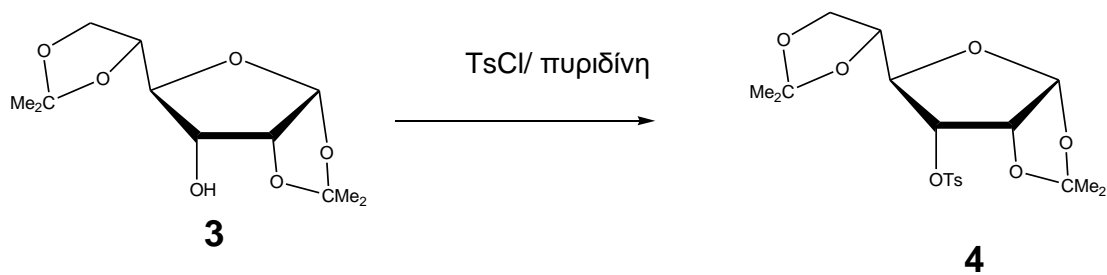
Απόδοση = 86%



4.2.2) 1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (3) (Baker *et al.* 1972)

Η κετόνη **2** (17.05 g, 66.09 mmol), η οποία ελήφθη από την προηγούμενη αντίδραση, διαλύθηκε σε διάλυμα 104.7 mL αποτελούμενο από MeOH-νερό 3:7 και έπειτα NaBH₄ (3.25 g, 85.92 mmol) προστέθηκε βραδέως υπό συνεχή ανάδευση και σε πάγο ούτως ώστε να περιοριστεί η εξώθερμη αντίδραση. Μετά από μία ώρα το μίγμα εκχυλίστηκε 4 φορές με 20 mL διχλωρομεθάνιο την κάθε φορά. Η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο (Na₂SO₄) και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **3** (16 g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων (εξάνιο). Σημείο Τήξεως 73-75 °C (βιβλ.: Σημείο Τήξεως 75-76 °C).

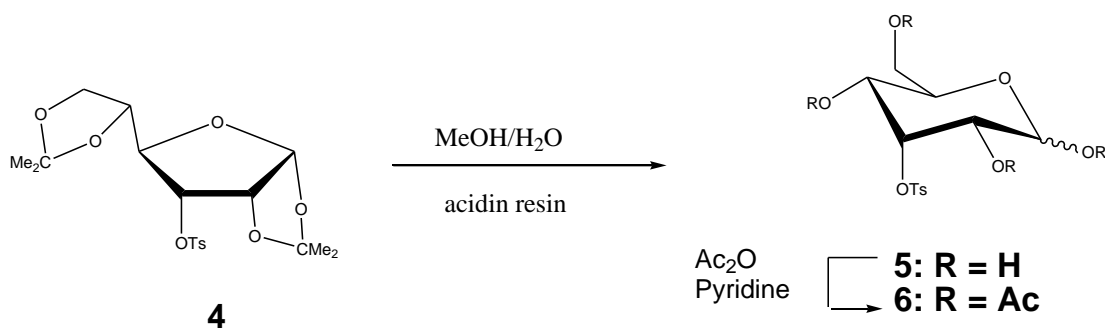
Απόδοση = 80% από την **1**



4.2.3) 1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-Ο-π-τολουολοσουλφονυλο-α-D-αλλοφουρανόζη (4) (Foster *et al.* 1967)

Σε ένα διάλυμα της ένωσης **3** (16.0 g, 61.47 mmol) σε άνυδρη πυριδίνη (157.8 mL) προστέθηκε TsCl (15.63 g, 81.96 mmol) και το μίγμα αναδεύτηκε για 2 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) μέσα στο μίγμα προστέθηκε κρύο νερό (20 mL) και μετά από μερικά λεπτά προστέθηκε άφθονα επιπλέον κρύο νερό (2.5 L) και καταβυθίστηκε ίζημα που διαχωρίστηκε με διήθηση. Το επιθυμητό προϊόν **4** (18.35 g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκής σκόνης. Σημείο Τήξεως 118-120 °C (βιβλ.: Σημείο Τήξεως 120-121 °C).

Απόδοση = 72%



4.2.4) 3-Δεοξυ-3-π-τολουολοσουλφονυλο-γλυκόζη (5) (Foster *et al.* 1967, Tewson and Welsh 1978)

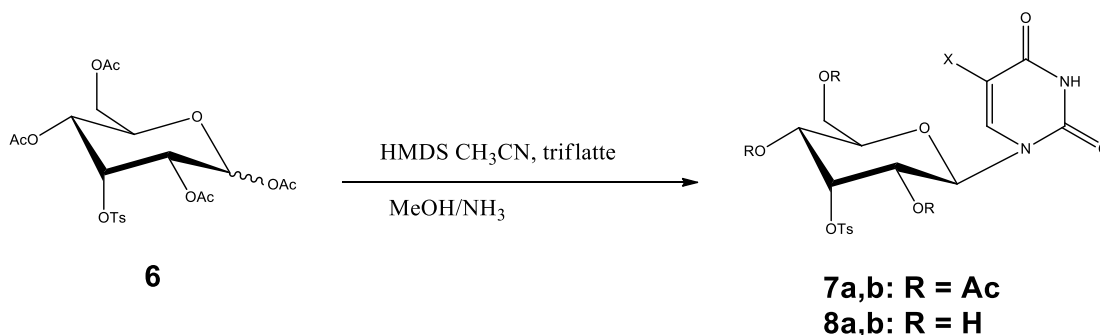
Ένα διάλυμα της ένωσης **4** (7.2 g, 27.45 mmol) σε MeOH (43.34 mL) και νερό (245.4 mL) αναδεύτηκε στους 60-70 °C με ρητίνη Amberlite IR-120 (H⁺) (14.27 g). Μετά από 10 ώρες το μίγμα διηθήθηκε και από το διήθημα απομακρύνθηκαν οι διαλύτες υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **5** (4.85 g) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Απόδοση = 97%

4.2.5) 3-Δεοξυ-3-π-τολουολοσουλφονυλο -1,2,4,6-τετρακίς-Ο-ακετυλογλυκοκυρανόζη (6) (Foster *et al.* 1967, Tewson and Welsh 1978)

Σε ένα διάλυμα της ένωσης **5** (4.85 g, 26.65 mmol) σε πυριδίνη (116.8 mL) προστέθηκε Ac₂O (58.4 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) το διάλυμα κρύωσε στους 0°C και προστέθηκε μεθανόλη (29.2 mL) για να καταστείλει την αντίδραση. Οι διαλύτες απομακρύνθηκαν υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο και εκχυλίστηκε αρχικά με κορεσμένο διάλυμα όξινου θειϊκού νατρίου (NaHSO₄) και στη συνέχεια με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃. Η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **6** (7.38 g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο). Σημείο Τήξεως 114-117 °C (βιβλ.: Σημείο Τήξεως 119-120 °C, Σημείο Τήξεως 116-120 °C).

Απόδοση = 79%



4.2.6) 1-(3'-Δεοξυ-3'-π-τολουολοσουλφονυλο-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-ουρακίλη (7α)

Ένα διάλυμα της ουρακίλης (13,3 mg, 1,183 mmol), του HMDS (0,31 mL, 1,47 mmol) και της σακχαρίνης (10 mg, 0,0544 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (5 mL), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 30 λεπτά και αφότου το μίγμα έγινε διαυγές προστέθηκε τετρακετυλιωμένη 3-δεοξυ-3-φθορογλυκοκυρανόζη (6) (400 mg, 0,91 mmol) καθώς και ο Me₃SiOSO₂CF₃ (0.23 mL, 1.274 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 5 ώρες (TLC) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 120 °C. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, αραιώθηκε με διχλωρομεθάνιο (1000 mL) και εκχυλίστηκε μία φορά με νερό (1 x 20 mL). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Γ. Το επιθυμητό προϊόν **7α** (360 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο). Σημείο Τήξεως 277-279°C.

Απόδοση = 68%

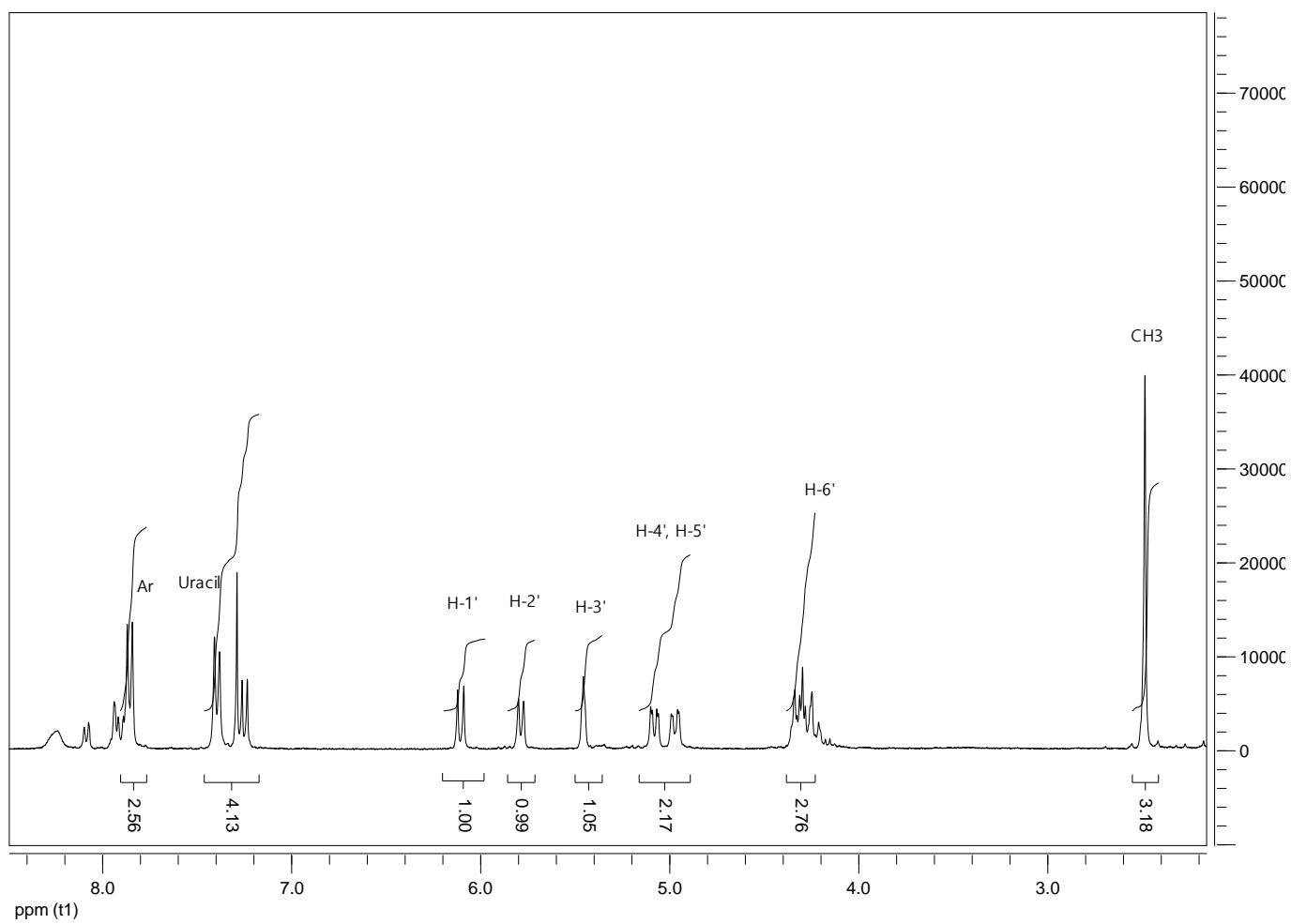
Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την ένωση **7b**.

4.2.7) 1-(3'-Δεοξυ-3'-π-τολουολοσουλφονυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-ουρακίλη

Στην ένωση **7α** (360 mg, 0.649 mmol) που ελήφθη με τη μορφή λευκών κρυστάλλων προστέθηκε μεθανόλη (36 mL) και διοχετεύθηκε στο διάλυμα αέρια αμμωνία μέχρι να γίνει βασικό και να επιτευχθεί αποπροστασία της **7α** και να ληφθεί η **8α** (360 mg).

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την **8b**.

5. NMR



6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντική ή/και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη, τους φουρανονουκλεοζίτες. Όμως, προέκυψαν κάποια προβλήματα από τη χρήση τους, οπότε το ενδιαφέρον των επιστημόνων στράφηκε στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντικής δράσης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων και ειδικότερα αυτών που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη, τους πυρανονουκλεοζίτες.

Μέσα από μια σειρά αντιδράσεων με καλές αποδόσεις, στο εργαστήριο βιοργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δημιουργήθηκαν δύο πυρανονουκλεοζίτες: : 1-(3'-Δεοξυ-3'-π-τολουολοσουλφονυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-ουρακίλη και 1-(3'-Δεοξυ-3'-π-τολουολοσουλφονυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-φθορο-ουρακίλη οι οποίοι στάλθηκαν στο ίδρυμα ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ ώστε να επισημανθούν με ραδιενεργό φθόριο και να χρησιμοποιηθούν σε αναλύσεις PET για *in vivo* απεικόνιση και παρακολούθηση του καρκίνου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Berg, J. M.; Tymoczko J. L., Stryer L. **Βιοχημεία** (Τόμος Ι) **2001**. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (p) 329-351.
2. Zhou W., Gumina G., Chong Y., Wang J., Schinazi R. F., Chu C. K. **Synthesis, structure-activity relationships, and drug resistance of beta-d-3'-fluoro-2',3'-unsaturated nucleosides as anti-HIV Agents.** *J Med Chem.* **2004**, 47, 3399-408
3. Tsirkone V. G., Tsoukala E., Lamprakis C., Manta S., Hayes J. .M., Skamnaki V. T., Drakou C., Zographos S. E., Komiotis D., Leonidas D. D. **1-(3-Deoxy-3-fluoro-beta-d-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies.** *Bioorg Med Chem.* **2010**, 38, 3413-25.
4. Lui V. W., Lau C. P., Cheung C. S., Ho K., Ng M. H., Cheng S. H., Hong B., Tsao S. W., Tsang C. M., Lei K. I., Yamasaki Y., Mita A., Chan A. T. **An RNA-directed nucleoside anti-metabolite, 1-(3-C-ethynyl-beta-d-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd), elicits antitumor effect via TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) downregulation.** *Biochem Pharmacol.* **2010**, 79, 1772-80.
5. Somsák L., Czifrák K., Tóth M., Bokor E., Chrysinia E. D., Alexacou K. M., Hayes J. M., Tiraidis C., Lazoura E., Leonidas D. D., Zographos S. E., Oikonomakos N. G. **New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents.** *Curr Med Chem.* **2008**, 15, 2933-83.
6. Arnér E. S. J., Eriksson S. **Mammalian deoxyribonucleoside kinases.** *Pharmacol Ther.* **1995**; 67, 155-86.
7. Wagner C. R., Iyer V. V., McIntee E. J. **Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides.** *Med Res Rev.* **2000**, 20, 417-51.
8. Balzarini J., Thormar H., Holy A., Jindrich J., Rosenberg I., Debyser Z., Desmyter J., De Clercq E. **Inhibition of visna virus replication by 2',3'-dideoxynucleosides and acyclic nucleoside phosphonate analogs.** *Antimicrob Agents Chemother.* **1993**, 37, 2540-4.
9. Chong Y., Choo H., Choi Y., Mathew J., Schinazi R. F., Chu C. K. **Stereoselective synthesis and antiviral activity of D-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-2'-fluoro-4'-thionucleosides.** *J Med Chem.* **2002**, 45, 4888-98.
10. Lewin B. *Genes* **2003**, VIII, 6.

11. Burns C. J., Milne H. M., Squires P. E., Evans N. D., Pickup J., Jones P. M., Persaud S. J. **Uncoupling of nutrient metabolism from insulin secretion by overexpression of cytosolic phospholipase A(2).** Diabetes. 2005, 54, 116-24.
12. Lui V. W., Lau C. P., Cheung C. S., Ho K., NG M. H., Cheng S. H., Hong B., Tsao S. W., Tsang C. M., Lei K. I., Yamasaki Y., Mita A., Chan A. T. **An RNA-directed nucleoside anti-metabolite, 1-(3-C-ethynyl-beta-d-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd), elicits antitumor effect via TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) downregulation.** Biochem Pharmacol. 2010, 79, 1772-80.
13. Bhat U. G., Pandit B., Gartel A. L. **ARC synergizes with ABT-737 to induce apoptosis in human cancer cells.** Mol Cancer Ther. 2010, 9, 1688-96.
14. Siev M., Weinberg R., Penman S. **The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in HeLa cells by cordycepin.** J Cell Biol. 1969, 41, 510-20
15. Ahn Y. J., Park S. J., Lee S. G., Shin S. C., Choi D. H. **Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of Cordyceps militaris against Clostridium spp.** J Agric Food Chem. 2000, 48, 2744-8.
16. Cory A. H., Cory J. G. **Use of nucleoside kinase-deficient mouse leukemia L1210 cell lines to determine metabolic routes of activation of antitumor nucleoside analogs.** Adv Enzyme Regul. 1994, 34:1-12
17. Pontikis R., Benhida R., Aubertin A. M., Grierson D. S., Monneret C. **Synthesis and anti-HIV activity of novel N-1 side chain-modified analogs of 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT).** J Med Chem. 1997, 40, 1845-54.
18. Yamagami K., Fujii A., Arita M., Okumoto T., Sakata S., Matsuda A., Ueda T., Sasaki T. **Antitumor activity of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine, a new 2'-deoxycytidine derivative.** Cancer Res. 1991, 51, 2319-23.
19. Lin T. S., Luo M. Z., Liu M. C., Clarke-Katzenburg R. H., Cheng Y. C., Prusoff W. H., Mancini W. R., Birnbaum G. I., Gabe E. J., Giziewicz J. **Synthesis and anticancer and antiviral activities of various 2'- and 3'-methylidene-substituted nucleoside analogues and crystal structure of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine hydrochloride.** J Med Chem. 1991, 34, 2607-15.

20. Baker C. H., Banzon J., Bollinger J. M., Stubbe J., Samano V., Robins M. J., Lippert B., Jarvi E., Resvick R. **2'-Deoxy-2'-methylene-cytidine and 2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine 5'-diphosphates: potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase.** J Med Chem. **1991**, 34, 1879-84.
21. Matsuda A., Sasaki T. **Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides.** Cancer Sci. **2004**, 95, 105-11
22. Faderl S., Gandhi V., Kantarjian H., Plunkett W. **New nucleoside analogues in clinical development.** Cancer Chemother Biol Response Modif. **2002**, 20, 37-58.
23. Parker W. B., Secrist J. A., Waud W. R. **Purine nucleoside antimetabolites in development for the treatment of cancer.** Curr Opin Investig Drugs. **2004**, 5, 592-6.
24. Pui C. H., Jeha S. **Clofarabine.** Nat Rev Drug Discov. **2005**, 12-3.
25. Secrist J. A. **Nucleosides as anticancer agents: from concept to the clinic.** Nucleic Acids Symp. **2005**, 49, 15-6
26. Tiwari K. N., Shortnacy-Fowler A. T., Cappellacci L., Waud W. R., Parker W. B., Montgomery J. A., Secrist J. A. **Synthesis and structure activity relationships of 5-substituted-4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosines.** Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. **2000**, 19, 2005-17.
27. Waud W. R., Gilbert K. S., Shepherd R. V., Montgomery J. A., Secrist J. A. **Preclinical antitumor activity of 4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosine (4'-thio-ara-C).** Cancer Chemother Pharmacol. **2003**, 51, 422-6
28. Someya H., Shaddix S. C., Tiwari K. N., Secrist J. A., Parker W. B. **Phosphorylation of 4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosine and its analogs by human deoxycytidine kinase.** J Pharmacol Exp Ther. **2003**, 304, 1314-22.
29. Komiotis D., Tsoukala E., Manta S., Tzioumaki N., Agelis G. **Concise synthesis of 3-fluoro-5-thio-xylo- and glucopyranoses, useful precursors towards their corresponding pyranonucleoside derivatives.** Carbohydr Res. **2008**, 343, 1099-103.
30. Gumina G., Song G. Y., Chu C. K. **L-Nucleosides as chemotherapeutic agents.** FEMS Microbiol Lett. **2001**, 202, 9-15.

31. Manta S., Agelis G., Botić T., Cencic A., Komiotis D. **Fluoro-ketopyranosyl nucleosides: synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-2-keto-beta-D-glucopyranosyl derivatives of N4-benzoyl cytosine.** Bioorg Med Chem. **2007**, 15, 980-7

32. Balatsos N. A., Vlachakis D., Maragozidis P., Manta S., Anastasakis D., Kyritsis A., Vlassi M., Komiotis D., Stathopoulos C. **Competitive inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides.** Biochemistry. **2009**, 48, 6044-51.

33. Leclercq F., Egron M. J., Antonakis K., Bennani-Baiti M. I., Frayssinet C.

Synthesis and biological activity of a fluorketonucleoside: 7-(3-deoxy-3-fluoro-beta-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose) theophylline. Carbohydr Res. **1992**, 228, 95-102.

34. Khan A. R., Mulligan K. X., Ollapally A. P. **Synthesis of 5-chloro-1-(2,3-dideoxy-3-fluoro-beta-D-glycero-hex-2-enopyranose-4-ulosyl)uracil as potential anticancer/antiviral agent.** Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. **2001**, 20, 759-62.

35. Ollapally A. P., Bennouna-Dorange I., Whitaker T. L. **5-Fluoro-1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-6-O-trityl-beta-D-glycero-hex-3-eno-pyranos-2-ulosyl (uracil): anticancer agent.** Nucleosides Nucleotides. **1999**, 18, 703-5.

36. Egron M. J., Dorange B. I., Antonakis K., Herscovici J., Ollapally A. P. **Unsaturated fluoroketonucleosides as anticancer agents: the synthesis and biological activity of 5-fluoro-1-(3,4-di-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-beta-d-glycero-hex-3-eno-pyranos-2-ulosyl) uracil.** Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. **2002**, 21, 327-34

37. Agelis G., Tzioumaki N., Botić T., Cencic A., Komiotis D. **Exomethylene pyranonucleosides: efficient synthesis and biological evaluation of 1-(2,3,4-trideoxy-2-methylene-beta-d-glycero-hex-3-enopyranosyl)thymine.** Bioorg Med Chem. **2007**, 15, 5448-56.

38. Komiotis D., Delatre S., Holt L., Ollapally A. P., Balzarini J. **Biologically Important Nucleosides: A General Method for the Synthesis of Unsaturated Ketonucleosides of Uracil and its Analogs.** Nucleosides and Nucleotides. **1991**, 10, 431-455.

39. Paterson J., Uriel C., Egron M. J., Herscovici J., Antonakis K., Alaoui-Jamali M. A. **Antiproliferative and apoptotic activities of ketonucleosides and keto-C-glycosides against non-small-cell lung cancer cells with intrinsic drug resistance.** Antimicrob Agents Chemother. **1998**, 42, 779-84.

40. Kodama E.I., Kohgo S., Kitano K., Machida H., Gatanaga H., Shigeta S., Matsuoka M., Ohrui H., Mitsuya H. **4'-Ethyne nucleoside analogs: potent inhibitors of multidrug-resistant human immunodeficiency virus variants in vitro.** *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**, 45, 1539-46.

41. Minakawa N., Matsuda A. **Mechanism-based design of inosine 5-monophosphate dehydrogenase inhibitors: synthesis and biological activities of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives.** *Curr Med Chem.* **1999**, 6, 615-28.

42. De Clercq E. **New developments in anti-HIV chemotherapy.** *Biochim Biophys Acta.* **2002**, 1587, 258-75.

43. Minakawa N., Takeda T., Sasaki T., Matsuda A., Ueda T. **Synthesis and antitumor activity of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives.** *J Med Chem.* **1991**, 34, 778-86

44. Matsuda A. **Design of a new antitumor nucleoside CNDAC, against solid tumors.** *Gan To Kagaku Ryoho.* **1996**, 23, 202-10

45. Hattori H., Nozawa E., Iino T., Yoshimura Y., Shuto S., Shimamoto Y., Nomura M., Fukushima M., Tanaka M., Sasaki T., Matsuda A.

Nucleosides and nucleotides. 175. Structural requirements of the sugar moiety for the antitumor activities of new nucleoside antimetabolites, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine and -uracil. *J Med Chem.* **1998**, 41, 2892-902.

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

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

48. Agelis G., Tzioumaki N., Tselios T., Botić T., Cencic A., Komiotis D. **Synthesis and molecular modelling of unsaturated exomethylene pyranonucleoside analogues with antitumor and antiviral activities.** Eur J Med Chem. **2008**, 43, 1366-75.
49. Nomura M., Shuto S., Matsuda A. **Synthesis of the cyclic and acyclic acetal derivatives of 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine, a potent antitumor nucleoside. Design of prodrugs to be selectively activated in tumor tissues via the bio-reduction-hydrolysis mechanism.** Bioorg Med Chem. **2003**, 11, 2453-61.
50. O-Yang H. Y., Wu E. B., Fraser-Smith, KAM Walker. **Nucleosides and nucleotides. 183. Synthesis of 4' α -branched thymidines as a new type of antiviral agent.** Tetrahedron Lett. **1992**, 33, 37-40.
51. Meneni S., Ott I., Sergeant C. D., Sniady A., Gust R., Dembinski R.
Alkynyl-2'-deoxyuridines: chromatography-free synthesis and cytotoxicity evaluation against human breast cancer cells. Bioorg Med Chem. **2007**, 15, 3082-8.
52. Kantsadi A. L., Hayes J. M., Manta S., Skamnaki V. T., Kiritsis C., Psarra A. M., Koutsogiannis Z., Dimopoulou A., Theofanous S., Nikoleousakos N., Zoumpoulakis P., Kontou M., Papadopoulos G., Zographos S. E., Komiotis D., Leonidas D. D. **The σ -hole phenomenon of halogen atoms forms the structural basis of the strong inhibitory potency of C5 halogen substituted glucopyranosyl nucleosides towards glycogen phosphorylase b.** ChemMedChem. **2012**, 7, 722-32.
53. Perigaud C., Gosselin G., Imbach J. L. **Nucleoside Analogues as Chemotherapeutic Agents.** Nucleosides & Nucleotides. **1992**, 11, 903-945.
54. Faye Buckingham and Véronique Gouverneur **Asymmetric ^{18}F -fluorination for applications in positron emission tomography**, 12 December 2015
55. Tarun Singhal, MDa, Abass Alavi, MDb, Chun K. Kim, MDa, Brain: Positron Emission Tomography Tracers Beyond [^{18}F]Fluorodeoxyglucose,