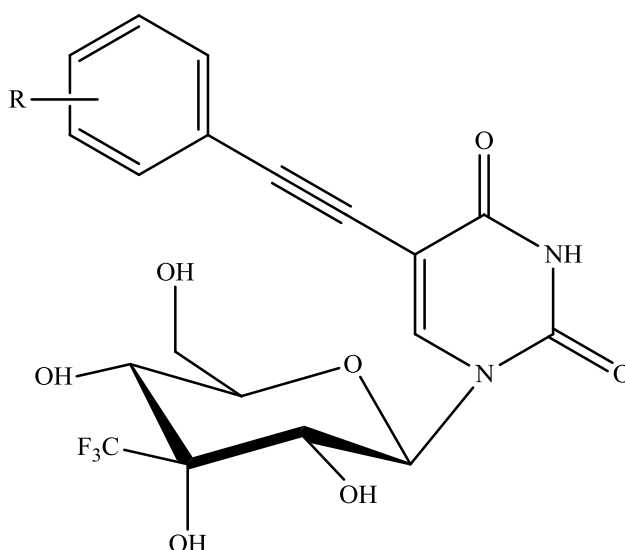




Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΜΗΛΙΟΥΔΗ ΜΕΛΑΝΘΙΑ



Πτυχιακή Εργασία

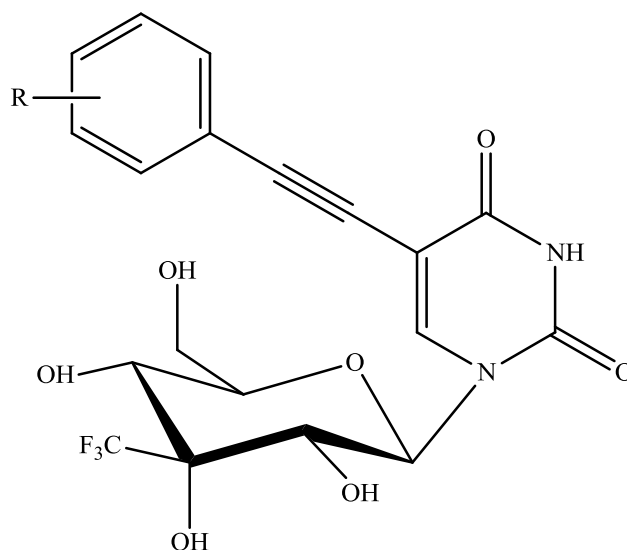
Σύνθεση και κυτταροτοξική δράση των νέων  
τροποποιημένων στην ετεροκυκλική βάση 3'  
τριφθορομέθυλο πυρανονουκλεοζιτών

Λάρισα Ιούλιος 2019



University of Thessaly  
Faculty of Health Sciences  
Department of Biochemistry and Biotechnology

Milioudi Melanthis



Diplomatic assay

Synthesis and cytotoxic activity of the new modified  
at the heterocyclic base 3' trifluoromethyl-  
pyranonucleosides

## Τριμελής εξεταστική επιτροπή

**Κομιώτης Δημήτριος** – Καθηγητής Οργανικής Χημείας  
του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**Μαρκουλάτος Παναγιώτης**– Καθηγητής Εφαρμοσμένης  
Μικροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας

**Μαντά Στυλιανή**– ΠΔ 407 του τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας

## Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο- Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Κομιώτη Δημήτριο τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη και τις εύστοχες υποδείξεις του πάνω στο θέμα της πτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την διδάσκουσα κα. Μαντά Στυλιανή και τον υποψήφιο διδάκτορα Κολλάτο Νικόλαο για το αμείωτο ενδιαφέρον τους να με φωτίσουν με τις γνώσεις τους και να μου παρέχουν βοήθεια σε οποιοδήποτε στάδιο της εργασίας. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για τον κ. Μαρκουλάτο που δέχθηκε να είναι στην τριμελή μου επιτροπή.

Τέλος οφείλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για το άρτιο και ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο ώστε να τεθεί εις πέρας με επιτυχία η πτυχιακή μου εργασία.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Υδατάνθρακες.....	8
1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης.....	12
1.3 Ανωμερή μονοσακχαριτών και διαμορφώσεις τους.....	15
1.4 Νουκλεοζίτες και ανάλογά τους.....	18
1.5 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών.....	21
1.6 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.....	23
1.7 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες.....	25
1.8 Τριφθορομεθυλο φουρανονουκλεοζίτες.....	29
1.9 Πυρανονουκλεοζίτες.....	30
2. Ειδικό μέρος.....	36
2.1 Σκοπός.....	36
3. Γενικές μέθοδοι.....	38
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography).....	38
3.2 Χρωματογραφία στήλης.....	40
3.3 Ξήρανση διαλυτών.....	41
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων.....	41
4. Πειραματικό μέρος.....	43
4.1.1 Επισκόπηση της συνθετικής πορείας.....	43
4.1.2 Μεθοδολογία σύνθεσης.....	43
4.1.3 Σύνθεση της 3-C- τριφθορομέθυλο -1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη(3).....	45
4.1.4 Σύνθεση της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοκυρανόζης (3).....	46
4.1.5 Σύνθεση της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-υδρόξυ-2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)5-ιώδοουρακίλης (4).....	48
4.1.6 Σύνθεση των 5.....	49
4.1.7 Σύνθεση των 6.....	50
5. Ταυτοποίηση με <sup>1</sup> HNMR.....	51
6. Αποτελέσματα- Συζήτηση.....	53
7. Βιβλιογραφία.....	60

## Περίληψη

Οι υδατάνθρακες αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία πολυ υδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών που βρίσκονται σε κάθε ζωντανό οργανισμό και ονομάζονται κοινώς σάκχαρα. Περισσότερη από την μισή οργανική ύλη που βρίσκεται στη γη είναι υδατάνθρακες με εντονότερη την παρουσία τους στο φυτικό βασίλειο, ενώ η ποσότητά τους στο ζωικό βασίλειο είναι περιορισμένη. Υδατάνθρακες που είναι τροποποιημένοι αποτελούν μέρος του περιβλήματος των κυττάρων, συνιστούν συστατικά στοιχεία του DNA που μεταφέρει γενετικές πληροφορίες και χρησιμοποιούνται ως δυνητικά αντικαρκινικά φάρμακα.

Οι νουκλεοζίτες που είναι τροποποιημένοι αποτελούν επίκεντρο της έρευνας τα τελευταία χρόνια λόγω της αντιιικής, αντικαρκινικής και αντιβιοτικής δράσης που παρουσιάζουν. Ανάμεσα σε αυτούς βρίσκονται και οι νουκλεοζίτες που φέρουν δομικές τροποποιήσεις στο τμήμα του σακχάρου και έχουν ενδιαφέρον ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Μέχρι σήμερα πολλές τέτοιες ενώσεις έχουν συντεθεί και αξιολογηθεί για τις ιδιότητές τους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση του 3' τριφθορομεθυλο πυρανονουκλεοζίτη έναντι της 5 φθοροουρακίλης ως πιθανού αντικαρκινικού παράγοντα. Παρουσιάζεται αναλυτικά η συνθετική οδός που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του, η μέθοδος ταυτοποίησης του καθώς και η βιολογική του αποτίμηση.

## **Abstract**

The carbohydrates constitute a big class of polyhydroxylated aldehydes and ketones that are present in every living organism and which are called commonly sugars. Most of the half organic compound that exist in earth are carbohydrates with more intense their presence in the plant kingdom, while their quantity in the mammalian kingdom is limited. Carbohydrates that are modified constitute part of the cellular envelope, are constituent elements of the DNA that transfer genetic information and are used as anti- cancer drugs.

The nucleosides that are modified consist the center of the research the last years due to their anti-viral, anti-cancer and antibiotic activity that exhibit. Amongst them there are and the nucleosides that consist of structural modifications to the section of the sugar and have interest as anti-cancer agents. Till nowadays, many of these compounds have been synthesized and have been valued for their properties.

In this diplomatic assay, it is described the synthesis of 3'- trifthoro methyl pyranonucleosides against 5-fthorouracil as anti-cancer agent. It is demonstrated in details the synthetic pathway that followed for its synthesis, the method of its identification and the biological evaluation.

## 1. Εισαγωγή

### 1.1. Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες αποτελούν πολυ υδροξυλιωμένες κετόνες ή αλδεΐδες ή ενώσεις που μπορούν να υδρολυθούν προς αυτές με γενικό τύπο  $C_n(H_2O)_n$ . Αποτελούν ουσιαστικά υδρίτες του άνθρακα. Ο ρόλος τους είναι πολλαπλός σε κάθε μορφή ζωής. Πρώτον χρησιμεύουν ως αποθήκες ενέργειας, ως καύσιμα και ως μεταβολικά ενδιάμεσα. Δεύτερον αποτελούν στοιχεία του DNA και RNA (ριβόζη και δεοξυριβόζη) που αποτελούν μεταφορείς της γενετικής πληροφορίας. Τρίτον αποτελούν δομικά συστατικά των στα κυτταρικά τοιχώματα βακτηρίων και φυτών. Τέλος είναι συνδεδεμένοι με πολλές πρωτεΐνες και λιπίδια όπου παίζουν σημαντικό μεσολαβητικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων. Αυτές οι ενώσεις έχουν μεγάλη σημασία για τους ζωντανούς οργανισμούς γιατί αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας. Γενικά χωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες :

- ✓ Μονοσακχαρίτες ή απλά σάκχαρα που είναι μονομερείς ενώσεις που δεν μπορούν να υδρολυθούν σε άλλα μικρότερα μόρια. Οι μικρότεροι μονοσακχαρίτες με  $n = 3$  είναι η διυδροξυακετόνη και η D- ή L-γλυκεραλδεΐδη και αναφέρονται ως τριόζες. Επίσης παραδείγματα μονοσακχαριτών αποτελούν η γλυκόζη και η φρουκτόζη που είναι οι δομικοί λίθοι για πιο περίπλοκες δομές.
- ✓ Δισακχαρίτες που αποτελούνται από δυο μονοσακχαρίτες συνδεδεμένους με ομοιοπολικό δεσμό. Ο ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ των μονοσακχαριτών ονομάζεται γλυκοζιτικός δεσμός. Οι κυριότεροι δισακχαρίτες είναι η μαλτόζη που προκύπτει από την συμπύκνωση δυο μορίων γλυκόζης, η σακχαρόζη που προκύπτει από την ομοιοπολική σύνδεση ενός μορίου γλυκόζης και ενός μορίου φρουκτόζης και η λακτόζη που προκύπτει από την συμπύκνωση ενός μορίου γλυκόζης και ενός μορίου γαλακτόζης. Η μαλτόζη αποτελεί προϊόν



διάσπασης του αμύλου. Η σακχαρόζη αποτελεί συστατικό των φρούτων και πηγή γλυκόζης για τους ζωικούς οργανισμούς. Η λακτόζη είναι το σάκχαρο του γάλακτος.

- ✓ Ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι παρασκευάζονται με σύνδεση μερικών μονοσακχαριτών. Συνήθως αποτελούνται από 2-10 μονάδες μονοσακχαριτών, π.χ. ραφινόζη (τρισακχαρίτης).
- ✓ Πολυσακχαρίτες, οι οποίοι προκύπτουν από τον πολυμερισμό πολλών μορίων μονοσακχαριτών. Παραδείγματα αποτελούν το άμυλο, η κυτταρίνη, το γλυκογόνο και άλλα σημαντικά βιολογικά μόρια. Με την υδρόλυση οι πολυσακχαρίτες διασπώνται στις μονοσακχαριτικές δομικές τους μονάδες.

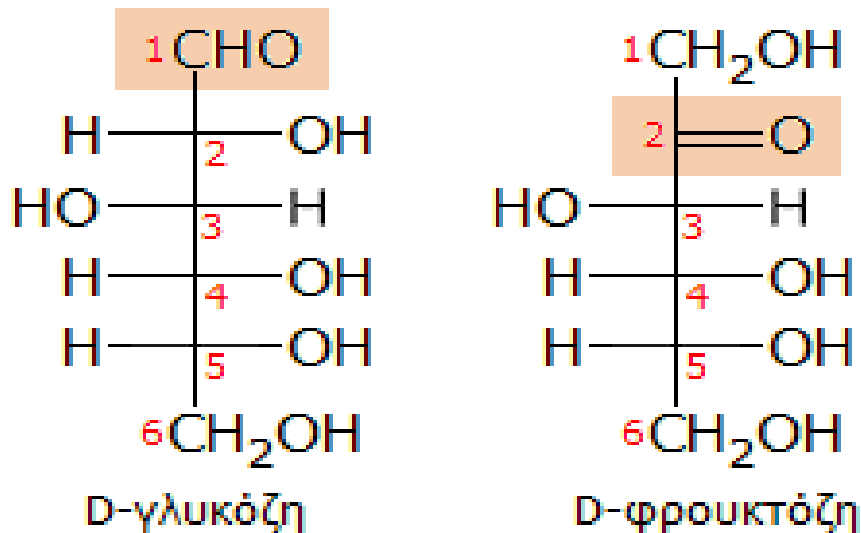


1 μόριο σακχαρόζης  $\rightarrow$  1 μόριο γλυκόζης + 1 μόριο φρουκτόζης



Κυτταρίνη  $\rightarrow$  ~ 3000 μόρια γλυκόζης

Η κατάληξη -όζη χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει τον υδατάνθρακα, ενώ τα προθέματα αλδο- και κετο-, προσδιορίζουν τη φύση της καρβονυλικής ομάδας. Ο αριθμός των ατόμων άνθρακα σε ένα μονοσακχαρίτη υποδηλώνεται χρησιμοποιώντας τα προθέματα τρι-, τετρ-, πεντ-, εξ-, και ούτω καθεξής. Για παράδειγμα η γλυκόζη είναι μια αλδοεξόζη, δηλαδή ένα σάκχαρο με έξι άτομα άνθρακα και μια αλδεϋδομάδα, η φρουκτόζη είναι μια κετοεξόζη, δηλαδή ένα σάκχαρο με πέντε άτομα άνθρακα και μια κετο ομάδα, ενώ η ριβόζη μια αλδοπεντόζη, δηλαδή ένα σάκχαρο με πέντε άνθρακες και μια αλδεϋδομάδα. Τα περισσότερα από τα συνήθη σάκχαρα είναι είτε αλδοπεντόζες, είτε αλδοεξόζες.



Στα D- σάκχαρα η υδροξυλομάδα στο κατώτερο στερεογονικό κέντρο έχει διεύθυνση προς τα δεξιά, ενώ στα L- σάκχαρα η αντίστοιχη υδροξυλομάδα έχει διεύθυνση προς τα αριστερά.

### D,L Σάκχαρα

Η γλυκεραλδεΐδη έχει ένα μόνο στερεογονικό κέντρο (άνθρακας συνδεδεμένος με τέσσερις διαφορετικές ομάδες) και ως εκ τούτου μπορεί να υπάρξει σε δυο εναντιομερείς μορφές. Στην φύση, όμως, απαντά μόνο το δεξιόστροφο ισομερές. Αυτό σημαίνει ότι εάν ένα δείγμα φυσικής γλυκεραλδεΐδης τοποθετηθεί σε πολωσίμετρο θα παρατηρηθεί στροφή του επιπέδου του πολωμένου φωτός κατά την διεύθυνση των δεικτών του ρολογιού, που υποδηλώνεται με το πρόσημο (+).

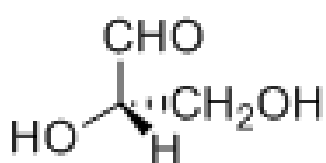
Για ιστορικούς λόγους, πολύ πριν την καθιέρωση της ορολογίας R και S, η (R)-(+)- γλυκεραλδεΐδη αναφέρεται ως D-γλυκεραλδεΐδη ( το D αναφέρεται στην δεξιόστροφη περιστροφή του πολωμένου φωτός). Το άλλο ισομερές, η (S)-(-) γλυκεραλδεΐδη είναι γνωστή ως L-γλυκεραλδεΐδη (το L αναφέρεται στην αριστερόστροφη περιστροφή).

Εξαιτίας του τρόπου με τον οποίο βιοσυντίθενται οι μονοσακχαρίτες, η γλυκόζη, η φρουκτόζη και γενικά όλοι οι μονοσακχαρίτες εμφανίζουν στο στερεογονικό κέντρο που βρίσκεται στην πλέον απομακρυσμένη θέση ως προς το καρβονύλιο την ίδια στερεοχημική απεικόνιση με αυτή

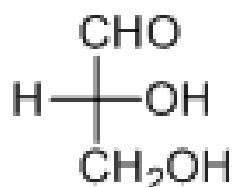
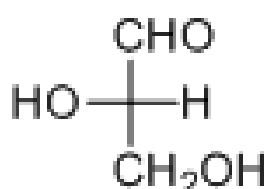
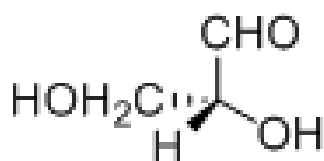
της D-γλυκεραλδεΐδης. Για το λόγο αυτό, στις προβολές κατά Fischer των περισσότερων φυσικών σακχάρων το υδροξύλιο στο κατώτερο στερεογονικό κέντρο έχει πάντοτε διεύθυνση προς τα δεξιά. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται D- σάκχαρα.

Σε αντίθεση με τα D σάκχαρα, στις προβολές Fischer των L-σακχάρων η υδροξυλομάδα στο κατώτερο στερεογονικό κέντρο έχει διεύθυνση προς τα αριστερά. Έτσι, ένα L σάκχαρο αποτελεί κατοπτρικό είδωλο (εναντιομερές) του αντίστοιχου D σακχάρου και διαφέρει από αυτό σε όλα τα υπόλοιπα στερεογονικά κέντρα. Πρέπει να αναφερθεί ότι ο συμβολισμός D και L δεν έχει σχέση με την κατεύθυνση προς την οποία ένα σάκχαρο στρέφει το επίπεδο του πολωμένου φωτός. Έτσι, ένα D σάκχαρο μπορεί να είναι είτε δεξιόστροφο είτε αριστερόστροφο. Το πρόθεμα D υποδηλώνει μόνον ότι η στερεοχημεία του κατώτερου στερεογονικού ατόμου του άνθρακα βρίσκεται στη δεξιά πλευρά της προβολής κατά Fischer, εφόσον το καρβονύλιο βρίσκεται στην κορυφή ή κοντά στην κορυφή.

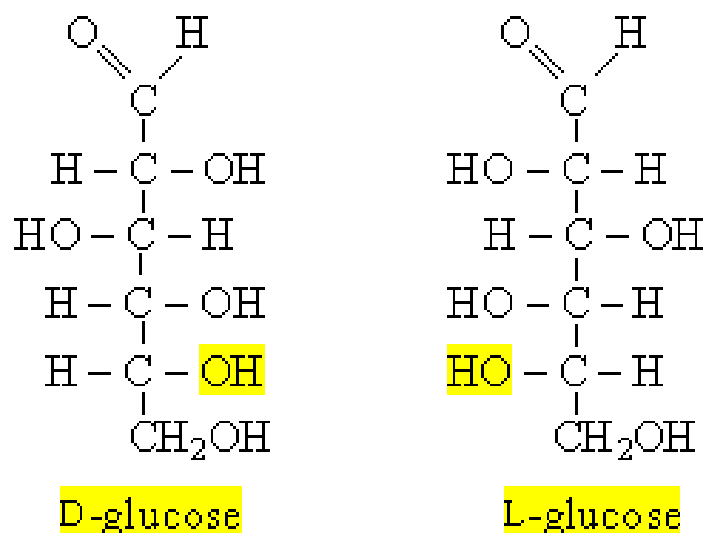
L-glyceraldehyde



D-glyceraldehyde



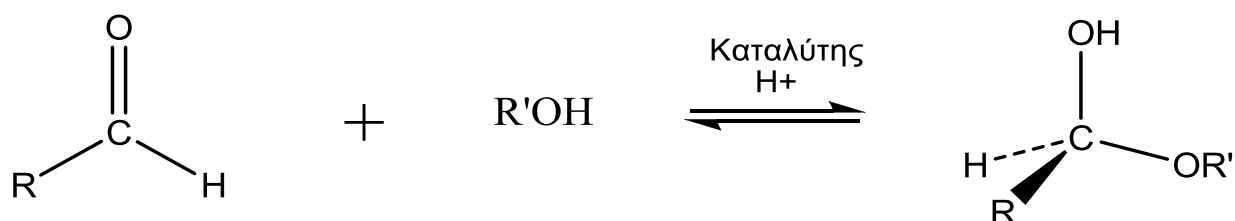
Εικόνα 1 : Χημική δομή D- και L- γλυκεραλδεΐδης



Εικόνα 2 : D- και L- γλυκόζη

## 1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών : σχηματισμός ημιακετάλης

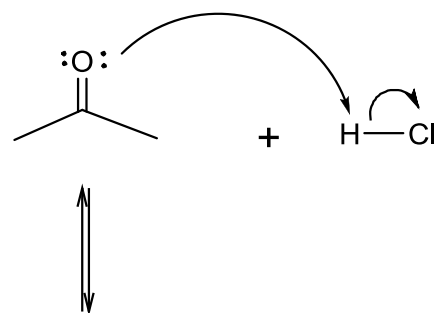
Οι αλκοόλες πραγματοποιούν μια γρήγορη και αντιστρεπτή πυρηνόφιλη προσθήκη με κετόνες και αλδεΐδες προς σχηματισμό ημιακεταλών (McMurry, τόμος II, p. 1245).



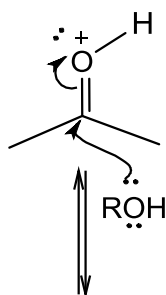
Σχήμα 1 : Σχηματισμός ημιακετάλης

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

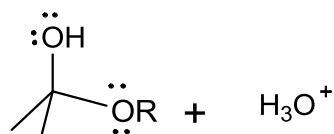
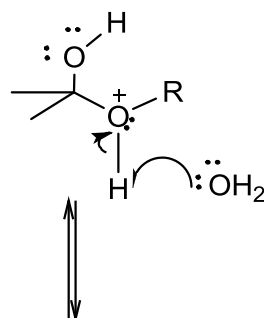
Η πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου πολώνει έντονα το καρβονύλιο και...



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



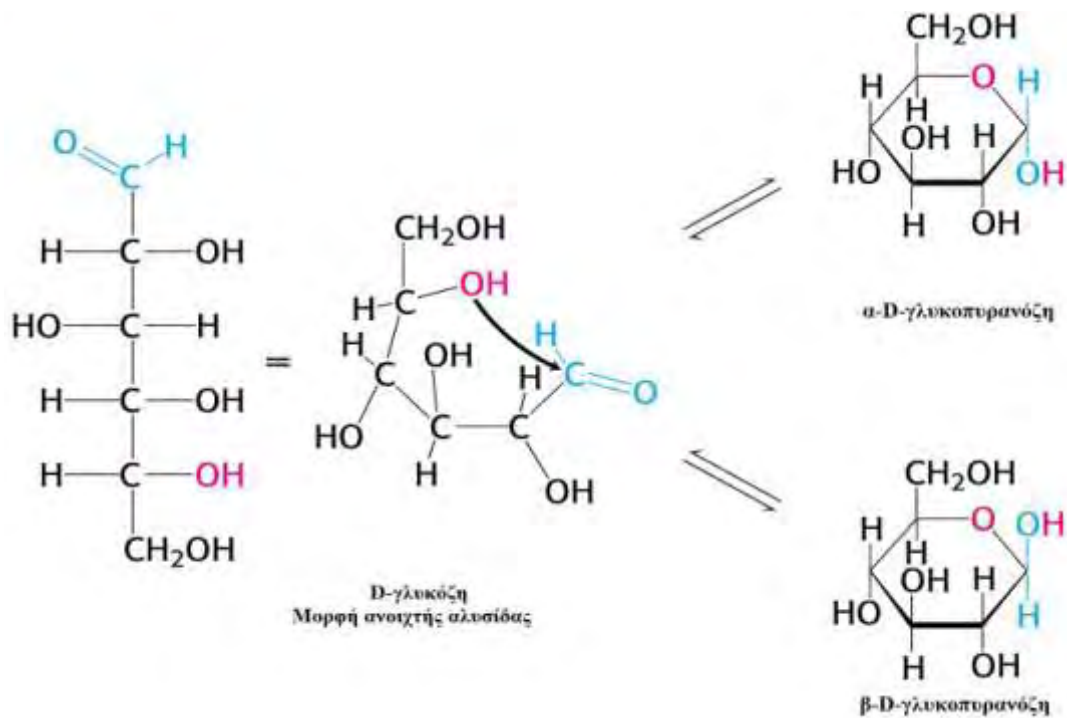
Απόσπαση ενός πρωτονίου οδηγεί σε ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, μια ουδέτερη ημιακετάλη



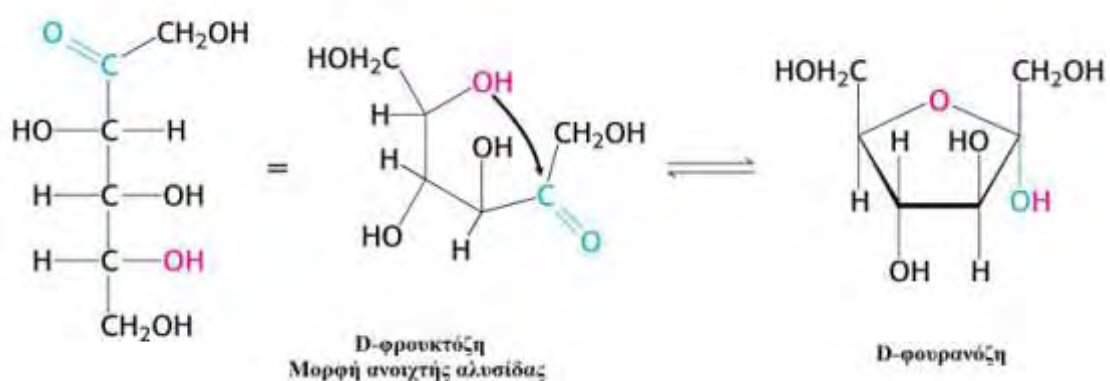
Εικ.3 Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης

Εάν η υδροξυλομάδα και το καρβονύλιο βρίσκονται στο ίδιο μόριο, μπορεί να λάβει χώρα ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη, που οδηγεί στο σχηματισμό μιας κυκλικής ημιακετάλης. Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, για αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοιχτής και κλειστής αλυσίδας. Για παράδειγμα, η γλυκόζη σε υδατικό διάλυμα απαντά με τη δομή εξαμελούς δακτυλίου της πυρανόζης,

που οφείλεται στην ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη του – OH του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα (C1). Η φρουκτόζη, αντίθετα απαντά κατά 80% στην φουρανοζική δομή και κατά 20% στη δομή του πενταμελούς δακτυλίου της φουρανόζης, που σχηματίζεται με την προσθήκη του – OH του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C2 (σχήμα 3).

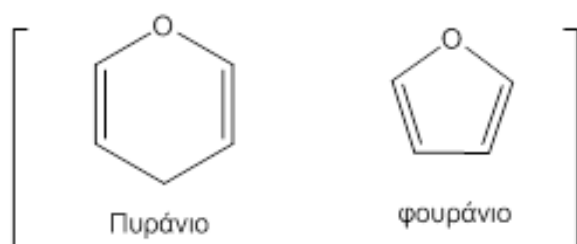


Σχήμα 2 : Σχηματισμός γλυκοπυρανόζης



Σχήμα 3 : Σχηματισμός φουρανόζης

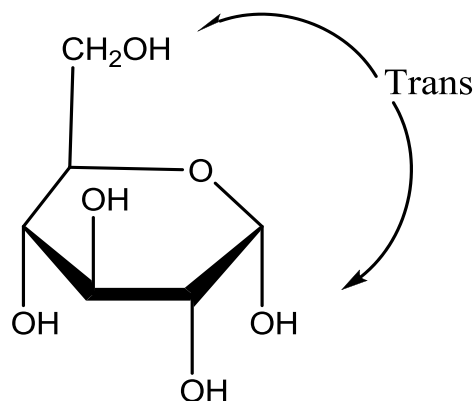
Οι ονομασίες πυρανόζη για τον εξαμελή δακτύλιο και φουρανόζη για τον πενταμελή δακτύλιο προέρχονται από τις ονομασίες των απλών κυκλικών αιθέρων πυράνιο και φουράνιο. Οι κυκλικές δομές της γλυκόζης και της φρουκτόζης παρατίθενται στο παρακάτω σχήμα.



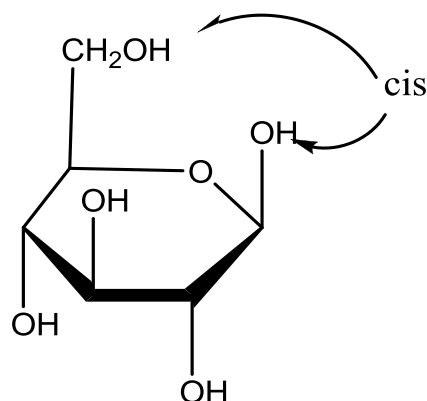
### 1.3 Ανωμερή μονοσακχαριτών και διαμορφώσεις τους

Όταν η ανοικτή αλυσίδα ενός μονοσακχαρίτη υποστεί κυκλοποίηση, αποκτώντας τη δομή της φουρανόζης ή της πυρανόζης, σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Τα δυο νέα διαστερομερή ονομάζονται **ανωμερή** και ο ημικεταλικός άνθρακας **ανωμερικό κέντρο** (McMurry, τόμος II, p. 1249). Για παράδειγμα, η γλυκόζη κυκλοποιείται αντιστρεπτά σε υδατικό διάλυμα, σχηματίζοντας ένα μίγμα δυο ανωμερών σε αναλογία 36:64. Το δευτερεύον ανωμερές, στο οποίο η ομάδα  $-OH$  του C1 βρίσκεται σε θέση *trans* ως προς τον υποκαταστάτη  $-CH_2OH$  του C5 (δηλ. με κατεύθυνση προς τα κάτω στην προβολή Haworth) ονομάζεται  $\alpha$ -ανωμερές [ως ανωμερές θεωρείται κατά σύμβαση αυτό στο οποίο το ανωμερικό κέντρο και το τελευταίο στερεογονικό κέντρο του C5 έχουν την ίδια απεικόνιση. Το  $\beta$  ανωμερές έχει αντίθετες απεικονίσεις στο ανωμερικό και στο στερεογονικό κέντρο του C5] και η πλήρης ονομασία του είναι  $\alpha$ -D-γλυκοπυρανόζη. Το κύριο ανωμερές, στο οποίο η ομάδα  $-OH$  του C1 βρίσκεται σε θέση *cis* ως προς τον

υποκαταστάτη  $-CH_2OH$  του C5 (δηλ. με κατεύθυνση προς τα πάνω στην προβολή κατά Haworth), ονομάζεται  **$\beta$ -ανωμερές**. Η πλήρης ονομασία του είναι  $\beta - D -$  γλυκοπυρανόζη.



$\alpha$ -D-Γλυκοπυρανόζη (36%)  
( $\alpha$  ανωμερές: οι ομάδες OH και  $CH_2OH$  είναι trans)



$\beta$ -D-Γλυκοπυρανόζη (64%)  
( $\beta$  ανωμερές: οι ομάδες OH και  $CH_2OH$  είναι cis)

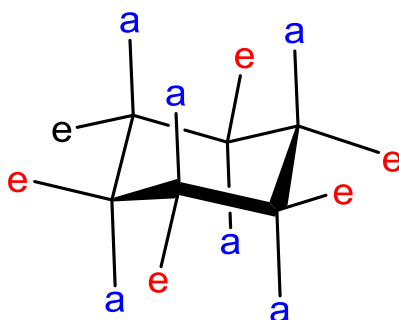
Σχήμα 4. Προβολές των ανωμερών της D- γλυκόζης

Στη φρουκτόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ίδια ονοματολογία για τα δυο ανωμερή  $\alpha$  και  $\beta$ . Η μόνη διαφορά είναι ότι αναφέρονται στο υδροξύλιο που είναι ενωμένο στον άνθρακα C-2, που είναι ανωμερής.

Οι προηγούμενες δομές (Haworth) αν και εύχρηστες δεν μας παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης. Ο εξαμελής δακτύλιος της πυρανόζης δεν είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα. Αντίθετα, οι δακτύλιοι της πυρανόζης υιοθετούν δυο τάξεις στερεοδιατάξεων, του ανακλίντρου (chair) και του λουτήρα (boat), λόγω της ομοιότητάς τους με τα αντικείμενα αυτά. (Εικόνα 2). Στη μορφή ανακλίντρου, οι υποκαταστάσεις των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου έχουν δυο προσανατολισμούς: αξονικό και ισημερινό ( Stryer, p.334). Οι αξονικοί δεσμοί είναι σχεδόν κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί δεσμοί είναι σχεδόν παράλληλοι προς το επίπεδο αυτό. Οι αξονικοί υποκαταστάτες παρεμποδίζουν

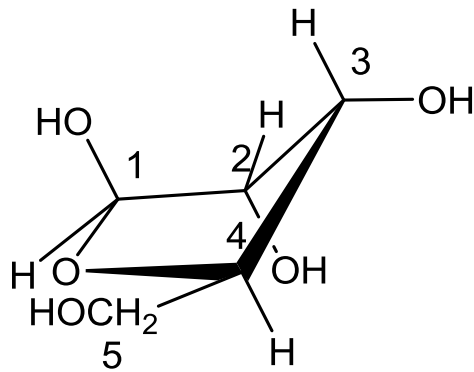


στεreoχημικά ο ένας τον άλλο εάν προβάλλουν από την ίδια πλευρά του δακτυλίου (π.χ. 1,3 –διαξονικές ομάδες). Αντίθετα, υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για τους ισημερινούς υποκαταστάτες. Η μορφή του ανάκλιντρου της β-D- γλυκοπυρανόζης είναι η επικρατέστερη, διότι όλες οι αξονικές θέσεις καταλαμβάνονται από άτομα υδρογόνου. Οι ογκωδέστερες ομάδες –OH και –CH<sub>2</sub>OH προβάλλουν στην περιφέρεια με μικρή στεreoχημική παρεμπόδιση. Η μορφή λουτήρα της γλυκόζης δεν ευνοείται διότι στεreoχημικά παρεμποδίζεται εντελώς.



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

Οι δακτύλιοι φουρανόζης, όπως και της πυρανόζης, δεν είναι επίπεδοι. Είναι δυνατόν να είναι πτυχωμένοι έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα άνθρακα να είναι σχεδόν στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο 0,5 Å μακριά από το επίπεδο. Αυτή η στερεοδιάταξη καλείται μορφή φακέλου διότι η δομή αυτή μοιάζει με ανοιχτό φάκελο με το πίσω μέρος ανασηκωμένο. Στην ομάδα της ριβόζης των περισσότερων βιομορίων, είτε ο C-2 είτε ο C-3 είναι εκτός επιπέδου, στην ίδια πλευρά με τον C-5. Αυτές οι διαμορφώσεις καλούνται αντίστοιχα C<sub>2</sub>- ενδο και C<sub>3</sub>- ενδο.



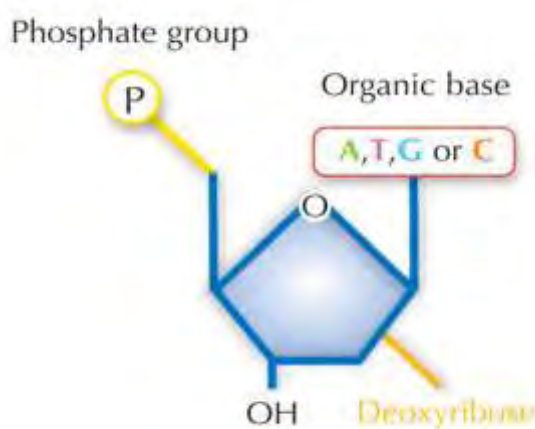
Σχήμα 6: Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης

#### **1.4 Νουκλεοζίτες και ανάλογά τους**

Οι νουκλεοζίτες υπάρχουν σε αφθονία στη φύση καθώς αποτελούν δομικά συστατικά του DNA και του RNA. Θα αναφέρουμε μερικά στοιχεία που τους προσδιορίζουν. Πρώτον είναι οι ενεργοποιημένοι πρόδρομοι νουκλεϊκών οξέων και ως εκ τούτου είναι απαραίτητοι για την αντιγραφή του γονιδιώματος. Δεύτερον ένα αδενο νουκλεοτίδιο, η ATP, είναι το παγκόσμιο νόμισμα ενέργειας. Τρίτον, παράγωγα νουκλεοτιδίων όπως η UDP – γλυκόζη, συμμετέχουν σε βιοσυνθετικές εργασίες όπως ο σχηματισμός γλυκογόνου. Τέταρτον, τα νουκλεοτίδια είναι ουσιώδη συστατικά των πορειών μεταγωγής σήματος. Κυκλικά νουκλεοτίδια όπως η κυκλική AMP και η κυκλική GMP είναι δεύτεροι αγγελιαφόροι που μεταβιβάζουν σήματα τόσο μέσα στα κύτταρα όσο και μεταξύ τους.

Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης (αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδίνης (θυμίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη) , συνδεδεμένη με ένα σάκχαρο- πεντόζη. Η ένωση νουκλεοζίτη με φωσφορικό οξύ ονομάζεται νουκλεοτίδιο (ή εστέρας του νουκλεοζίτη) που πάλι

αναλόγως τη φύση της πεντόζης είναι ριβονουκλεοτίδιο ή δεοξυριβονουκλεοτίδιο. Τα νουκλεοτίδια αποτελούνται από μια αζωτούχο βάση που συνδέεται με ένα σάκχαρο (πεντόζη) και μια φωσφορική ομάδα που συνδέεται επίσης με το σάκχαρο. Η αζωτούχος βάση του νουκλεοτιδίου είναι συνδεδεμένη με τον άνθρακα 1 της πεντόζης του. Η φωσφορική ομάδα είναι συνδεδεμένη με τον άνθρακα 5 της πεντόζης. Ένα νουκλεοτίδιο μπορεί να συνδεθεί σε ένα δινουκλεοτίδιο με 3'-5' φωσφοδιεστερικό δεσμό δημιουργώντας αλυσίδες νουκλεοτιδίων.



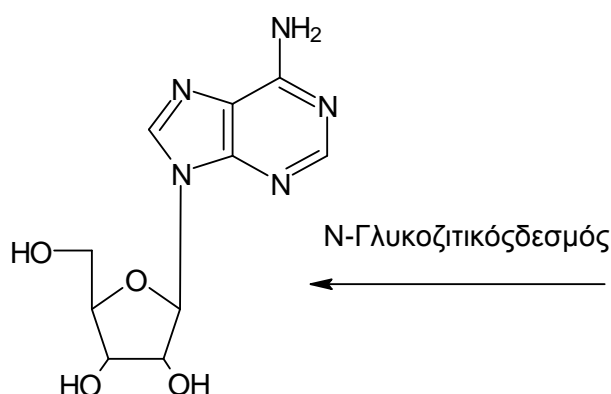
Εικ.4: Δομή νουκλεοτιδίου

Ο δεσμός που συνδέει δυο διαδοχικά νουκλεοτίδια σχηματίζεται μεταξύ του OH του άνθρακα 3 του πρώτου νουκλεοτιδίου και της φωσφορικής ομάδας του άνθρακα 5 του επόμενου με ταυτόχρονη απόσπαση ενός μορίου νερού. Ο δεσμός μεταξύ των νουκλεοτιδίων είναι ομοιοπολικός και ονομάζεται 3'-5' φωσφοδιεστερικός δεσμός.

Από τη σύνδεση δυο νουκλεοτιδίων σχηματίζεται ένα δινουκλεοτίδιο, από τη σύνδεση ενός τρίτου νουκλεοτιδίου ένα τρινουκλεοτίδιο και ούτω καθεξής. Τα ελεύθερα νουκλεοτίδια έχουν 3 φωσφορικές ομάδες. Κατά τη δημιουργία του φωσφοδιεστερικού δεσμού αποσπώνται οι δυο και έτσι τα νουκλεοτίδια των νουκλεοτιδικών αλυσίδων έχουν μόνο μια φωσφορική ομάδα.

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. Οι N- γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυτικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β.

Ετεροκυκλικές ονομάζονται οι κυκλικές χημικές ενώσεις των οποίων ο δακτύλιος περιέχει άτομα τουλάχιστον δυο διαφορετικών χημικών στοιχείων, σύμφωνα με τον ορισμό της IUPAC (Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας).



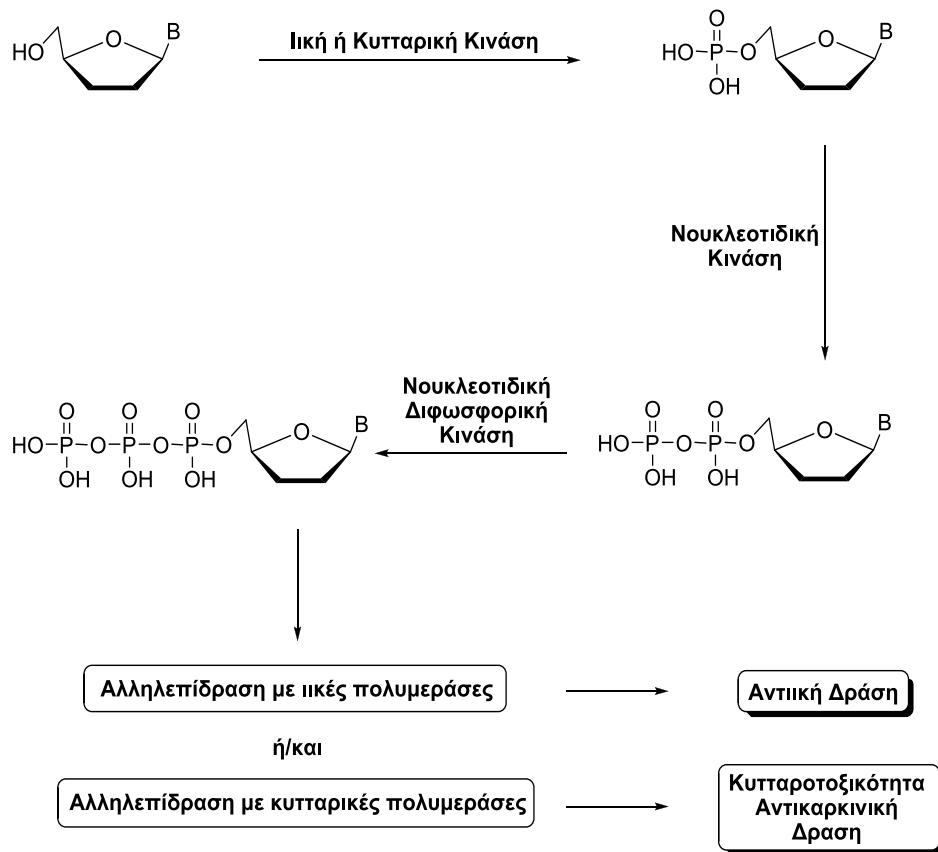
Εικόνα 5: Αδενοσίνη

Τα τελευταία χρόνια έχουν παρουσιάσει τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον ανάλογα φυσικών νουκλεοζιτών, κυρίως λόγω των αντικαρκινικών, αντιικών, αντιβακτηριδιακών, καθώς και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους (Zhou et. al 2004, Perigaud et al. 1992, Robinsetal. 1990, MacCossetal. 1990). Ως εκ τούτου έχουν πραγματοποιηθεί πολλές τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα της βάσης όσο και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί ενδελεχώς το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους. Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση αφορούσαν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μια πεντόζη με β-απεικόνιση.

## **1.5. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών**

Σε γενικές γραμμές, ο τρόπος δράσης των φαρμάκων στηρίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό στόχο, ο οποίος μπορεί να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη, όπως ένας υποδοχέας, ένα κανάλι ιόντων, ένα ένζυμο, ένας μόριο μεταφορέας, είτε τα νουκλεϊκά οξέα. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση νουκλεοζιτικών αναλόγων που διαθέτουν αντιική ή αντικαρκινική δράση, τα οποία λόγω της δυνατότητας μεταφοράς τους εντός των κυττάρων με παθητική διάχυση είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν για την θεραπεία πολλών ασθενειών (Zhouetal. 2004).

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών είναι στην πραγματικότητα ανενεργά προφάρμακα, τα οποία ενδοκυτταρικά πρέπει να τροποποιηθούν ώστε να μπορέσουν να δράσουν. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στη φωσφορυλίωσή τους από τις κυτταρικές ή ιικές κινάσες (Arner and Eriksson 1995). Αφού φωσφορυλιωθούν προς τις τριφωσφορικές δομές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό προωθώντας αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες ή παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό προβάλλοντας αντίσταση στην αντιγραφή του DNA.



Σχήμα 7: Φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιικές κινάσες

Ένας κοινός μηχανισμός αντιικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωσή τους στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας διακοπή της επιμήκυνσής της. Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ελεύθερη ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5' – φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου και η αλυσίδα δεν επιμηκώνεται. Μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένειά του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιική πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητά τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

Εκτός από τον παραπάνω μηχανισμό, 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 et al. 2010, Bhat et al. 2010).

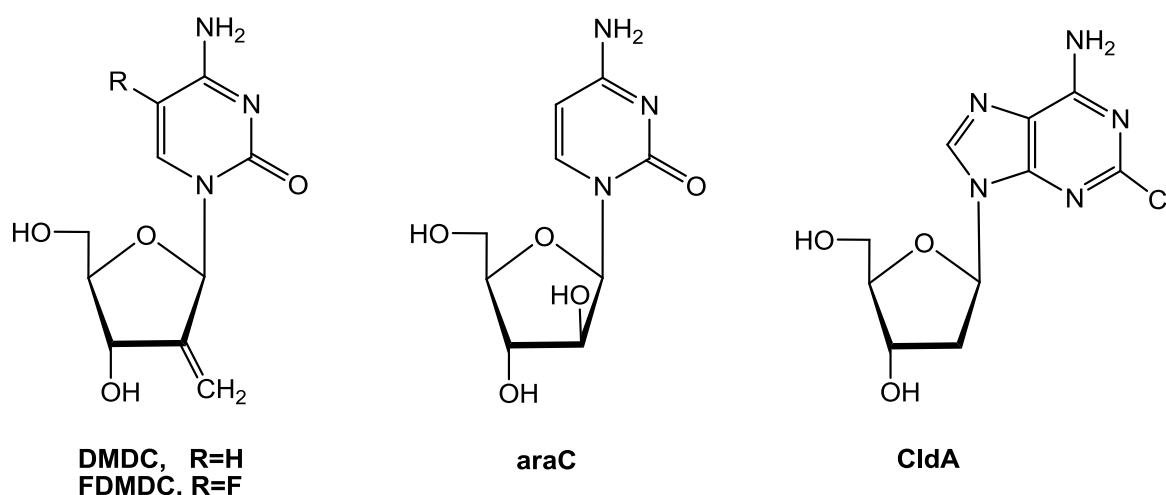
Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών, οι οποίοι δρουν ως αντιβιοτικά βασίζεται είτε στο ότι καταστρέφουν συγκεκριμένα τμήματα των βακτηρίων, όπως τη μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμά τους, είτε στο ότι επιδρούν στην σύνθεση πρωτεϊνών (Siev et al. 1969) και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης (Ahn et al. 2000).

### **1.6 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες**

Σε έναν υγιή οργανισμό ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων υπόκειται σε έναν αυστηρό έλεγχο που επιτρέπει στα κύτταρα να αυξηθούν, να διαφοροποιηθούν και να λειτουργήσουν αρμονικά στον οργανισμό υπό αυστηρές ρυθμίσεις. Οι περισσότεροι μηχανισμοί που ελέγχουν αυτές τις ρυθμίσεις αυτές, αν και ακατανόητοι οι περισσότεροι, περιλαμβάνουν ένα σύστημα χημικών μηνυμάτων με την μεσολάβηση για παράδειγμα ορμονών και συγκεκριμένων μεμβρανικών υποδοχέων. Τα κύτταρα σε καλλιέργεια, σταματούν την διαίρεσή τους όταν έρθουν σε επαφή το ένα με το άλλο. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται και η μιτωτική διαίρεση αρκετών κυττάρων συνεχίζεται άναρχα, χωρίς να υπακούει σε περιοριστικούς κανόνες. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία όγκων ή καρκινωμάτων. Τα κύτταρα χάνουν την διαφοροποιημένη μορφή τους και περνούν σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μπορεί να είναι περιορισμένος (καλοήθεις όγκοι), ή έντονος με μεταστάσεις σε άλλους ιστούς (κακοήθεις όγκοι), οι οποίοι θεραπεύονται κατεξοχήν με χημειοθεραπείες.

Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο

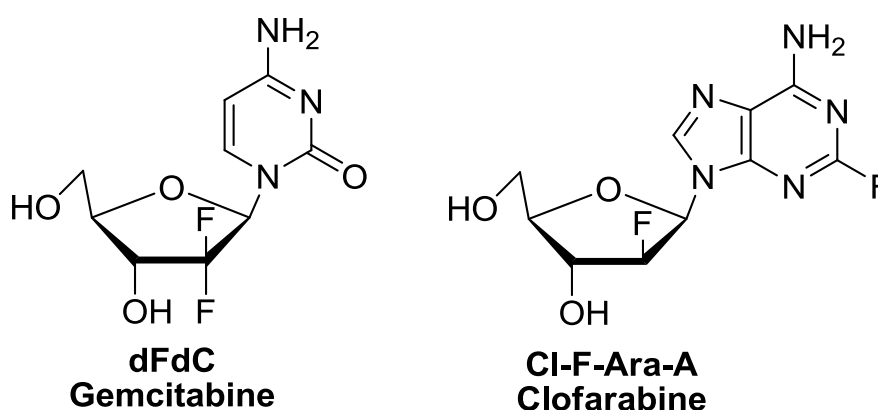
θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Πληθώρα νουκλεοζιτικών αντιμεταβολικών χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στη φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μιας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύει στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα οι 1- (2' – δεσοξυ- 2' – μεθυλενο- β- D – ερυθρο-πενταφουρανοζυλο) κυτοσίνη (DMDC), 1- (2' – δεσοξυ- 2' – μεθυλενο- β- D – ερυθρο-πενταφουρανοζυλο) 5 φθοροκυτοσίνη (FDMDC), 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλο κυτοσίνη (araC) και 2-χλωρο-2'-δεσοξυαδενοσίνη(CIdA) (σχήμα 8) έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών, όπως διάφοροι τύποι λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Cory et al. 1994, Pontikis et al. 1995, Yamagami et al. 1991, Lin et al. 1991, Baker et al. 1991, Matsuda and Sasaki 2004). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιήσουν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui et al. 2010, Bhat et al. 2010).



Σχήμα 8 : Νουκλεοζιτικά παράγωγα DMDC, FDMDC, araC, CIdA



Ορόσημο στη μελέτη των φθορονουκλεοζιτών αποτελεί η ανακάλυψη της 2'-δεοξυ-2',2' – διφθοροκυτιδίνης (gemcitabine (γεμισιταμπίνη), dFdC ) (Plunkett et al. 1995) (Σχήμα 9), η οποία αποτελεί σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα έναντι μεγάλου φάσματος κακοήθων όγκων, όπως αυτού του παγκρέατος. Είναι ένα πυριμιδινικό ανάλογο του cytarabine, το οποίο έχει τροποποιηθεί στην 2' θέση του δακτυλίου της ριβόζης με υποκατάσταση από 2 άτομα φθορίου. Η γεμισιταμπίνη δρα αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA μέσω ανταγωνιστικής ενσωμάτωσης στη νεοσυντιθέμενη κάθε φορά αλυσίδα.



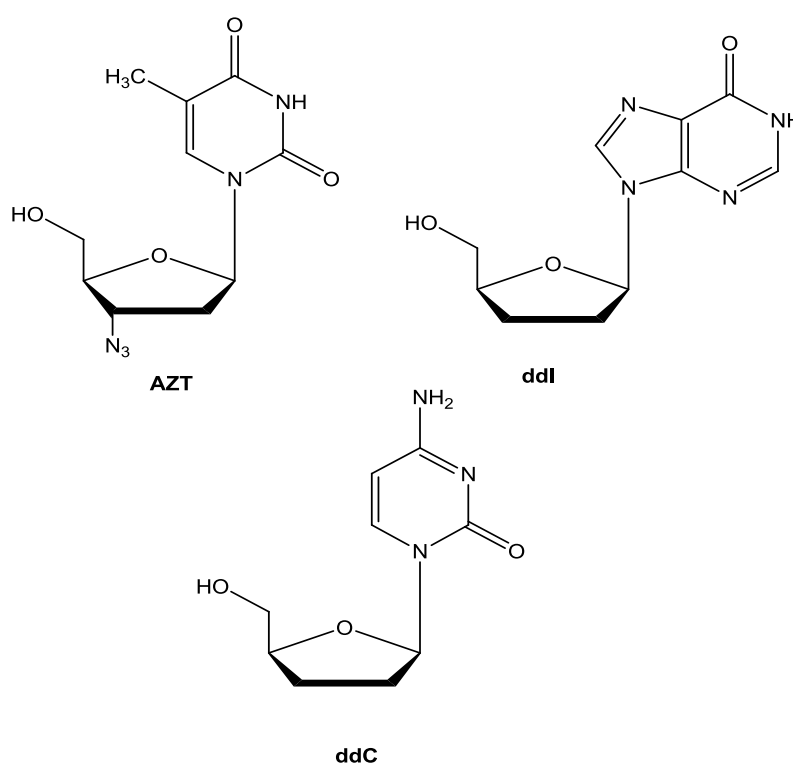
Σχήμα 9 : dFdC, Clofarabine

### 1.7. Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρεμβάλλονται στην σύνθεση του DNA και του RNA και μπορούν να επηρεάσουν εκτός από την σύνθεση νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων και τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων (Komiotis D. et al, 2008, Zhou W. et al, 2004, Perigaund C. et al, 1993). Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, στηρίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με τις ιικές πολυμεράσες. Οι αντιικοί νουκλεοζίτες αποτελούν θεμελιώδη λίθο στη θεραπεία λοιμώξεων που

προκαλούνται από τον ιό του απλού έρπητα (HSV), τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV), τον ιό του έρπη ζωστήρα (VZV), τον ιό της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV) και τον ιό της ηπατίτιδας B (HBV) και C (HCV).

Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα από νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα εναντίον του HIV είναι το zidovudine (AZT), το didanosine (DDI) και το zalcitabine (DDC) (σχήμα 10).

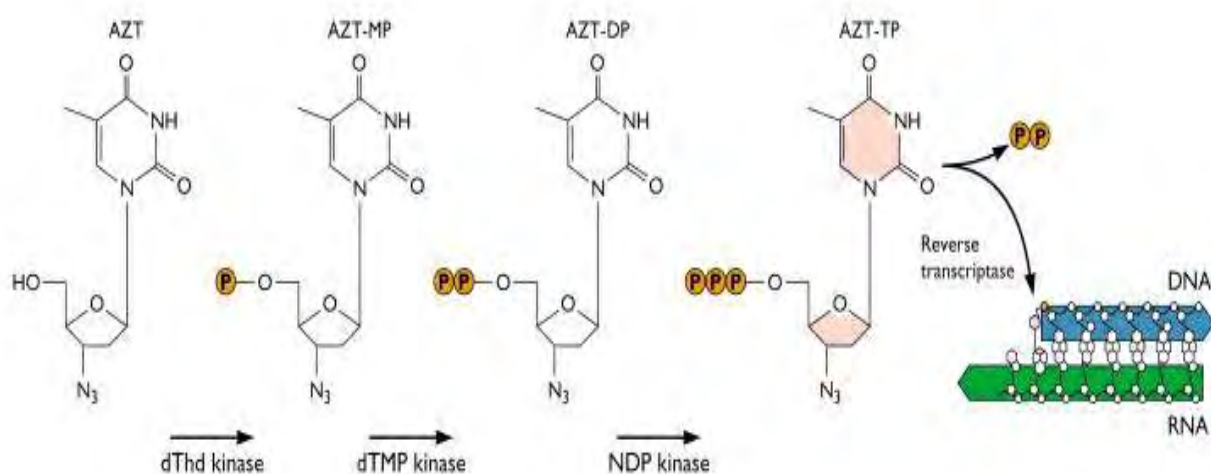


Σχήμα 10 : Χημικές δομές των AZT, DDI, DDC

Πρόκειται για 2',3'- διδεοξυνουκλεοζίτες που προκύπτουν από την απομάκρυνση των υδροξυλομάδων από τις 2',3' – θέσεις του δακτυλίου της ριβόζης. Δρουν σας αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Hiroguki et al. 2004). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το ένζυμο που χρησιμοποιεί ο ιός για να συνθέσει το νέο DNA με μήτρα το ιικό RNA. Το ένζυμο αυτό συνθέτει μια αλυσίδα DNA συμπληρωματική με το RNA. Τα συγκεκριμένα ανάλογα

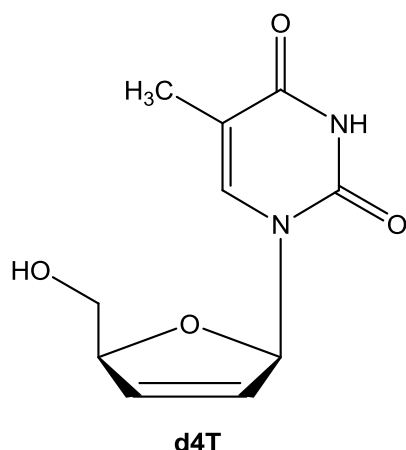
νουκλεοζιτών αναστέλλουν τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή του ιικού DNA.

Το AZT (3' – αζιδο-2'- δεοξυθυμιδίνη) ήταν το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για την θεραπεία του AIDS. Φωσφορυλιώνεται από τα κυτταρικά ένζυμα στην ενεργή του μορφή και δρα ως αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης τερματίζοντας την αλυσίδα μόλις συνδεθεί στο DNA (σχήμα 11). Επειδή έχει την αζιδο ομάδα αντί για την υδροξυλομάδα, η επόμενη βάση δεν μπορεί να ενωθεί και η σύνθεση της αλυσίδας σταματά.



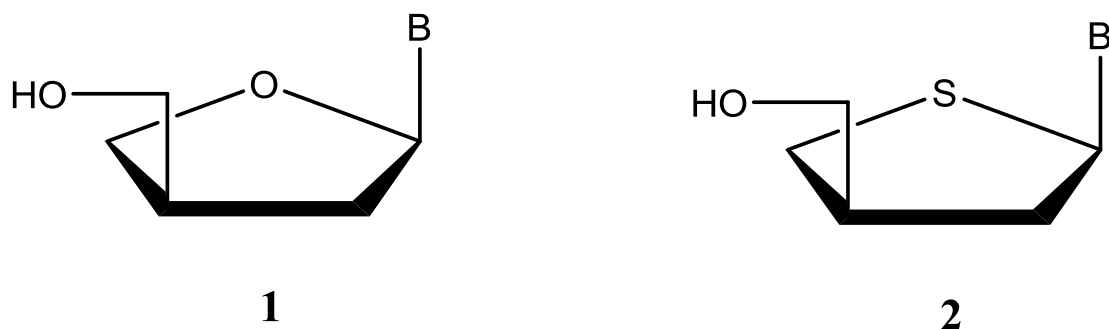
Σχήμα 11 : Τερματισμός της αλυσίδας του ιικού DNA από το φωσφορυλιωμένο AZT.

Το συνθετικό ενδιαφέρον στράφηκε επίσης στους 2',3' – ακόρεστους νουκλεοζίτες, όπου η 3'- δεοξυ- 2',3' – διδεϋδροθυμιδίνη (d4T) δρα επίσης σαν αναστολέας την αντίστροφης τρανσκριπτάσης στην θεραπεία κατά του AIDS (Brossette et al. 2001). Η χημική δομή του d4T απεικονίζεται στο σχήμα 12.



Σχήμα 12 : Χημική δομή της d4T

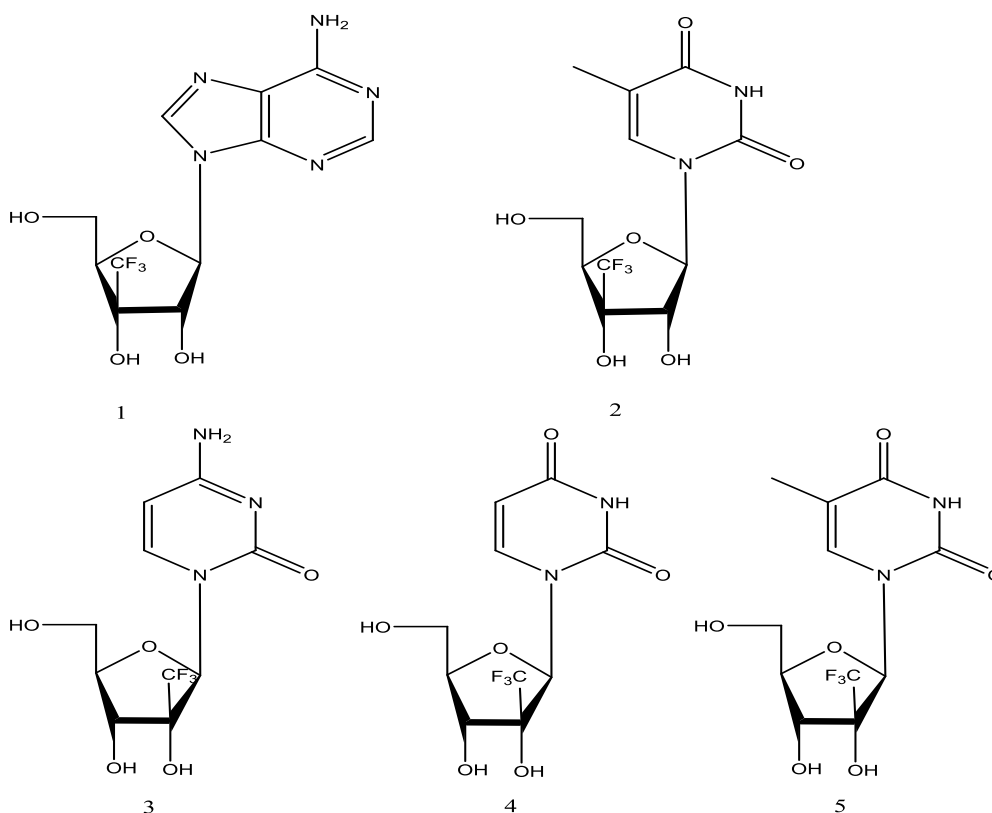
Στην κατηγορία των αντιικών ενώσεων συναντάμε και μη κλασικές κατηγορίες νουκλεοζιτών. Μια χαρακτηριστική ομάδα είναι οι απιο- διδεοξυνουκλεοζίτες 1, όπου η 4' – υδροξυμεθυλο ομάδα έχει μετατοπιστεί στον C-3' (Moon et al. 2002). Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν αντιική δράση, ενώ αντικαθιστώντας την θέση του οξυγόνου με ένα άτομο θείου, έχουμε τους αντίστοιχους θειο- απιο- διδεοξυνουκλεοζίτες 2 (Σχήμα 13).



Σχήμα 13

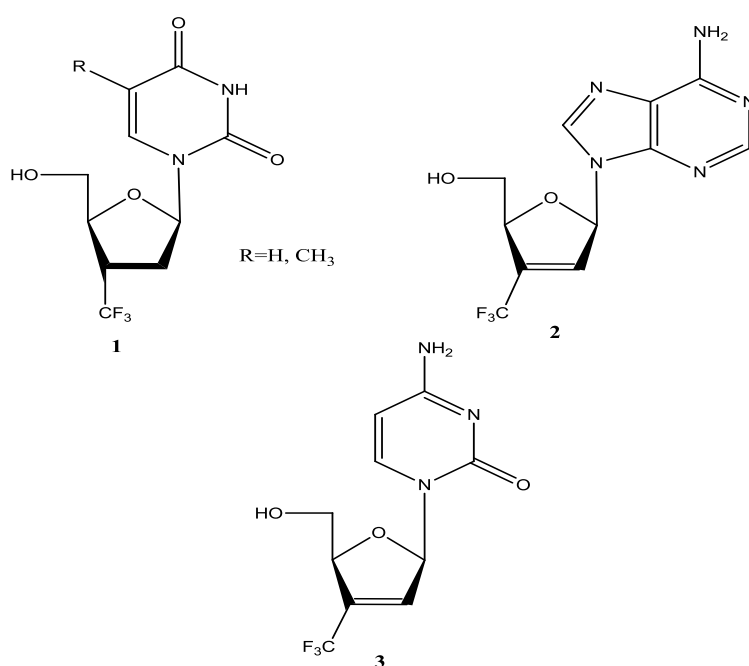
## 1.8 Τριφθορομέθυλο φουρανουκλεοζίτες

Τις τελευταίες δεκαετίες σημαντική ήταν η έρευνα για τους τριφθορομέθυλο νουκλεοζίτες, η οποία στηρίχτηκε στα όμοια επαγωγικά φαινόμενα της CF<sub>3</sub> ομάδας με το άτομο του F, σε συνδυασμό με το ότι η παρουσία της στερικώς απαιτητικής τριφθορομεθυλο ομάδας σε στρατηγικές θέσεις βιοενεργών ενώσεων προκαλεί συχνά μείωση του μεταβολισμού, αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας καθώς και αυξημένη λιποφιλικότητα (Carl R. Johnson and Dilip R. Bhumralkar). Το 1995, ο Carl Johnson παρουσίασε τη σύνθεση και τη βιολογική αποτίμηση νέων 3'-τριφθορομεθυλο νουκλεοζιτών 1,2, οι οποίοι εμφάνισαν σημαντική αντιϊκή δράση έναντι διάφορων DNA και RNA ιών, σε αντίθεση με τους 2'-τριφθορομέθυλο νουκλεοζίτες 3-5, οι οποίοι δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτη αντιϊκή δράση Frederic Jeannot (Σχήμα 14).



Σχήμα 14

Μετά τα πρώτα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, όσον αφορά τους τριφθορομέθυλο φουρανουκλεοζίτες, ο Lavaire συνέθεσε τους 2',3'- διδεοξυ-3'-C-τριφθορομέθυλο νουκλεοζίτες της ουρακίλης και της θυμίνης 1 (σχήμα 15), οι οποίοι όμως δεν εμφάνισαν αξιόλογη βιολογική δράση. Κατόπιν, ο Jeannot παρουσίασε νεους 2'3'- ακόρεστους 3'- τριφθορομέθυλο φουρανουκλεοζίτες της αδενίνης και της κυτοσίνης (ενώσεις 2,3, σχήμα 15), οι οποίοι εμφάνισαν μέτρια αντιική δράση έναντι του HBV (Hepatitis B) .



Σχήμα 15

## 1.9 Πυρανουκλεοζίτες

Μέχρι σήμερα έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες για τη δημιουργία φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, που αφορούσαν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μια πεντόζη και φέρουν τη β- απεικόνιση. Η σπουδαιότητα των πεντοζών αναγνωρίστηκε όταν 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 μια ετεροκυκλική νουκλεοβάση (πουρίνη ή πυριμιδίνη), μέσω ενός β-N-γλυκοσιδικού δεσμού (Saenger 1984, Blackburn and Gait 1996, Bloomfield et al. 1999).

Ορισμένα προβλήματα που προέκυψαν από τη χρήση των φουρανονουκλεοζιτών αναλόγων, όπως ο ανεπαρκής μεταβολισμός προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, η χημική ή ενζυμική απενεργοποίησή τους, η τοξικότητα, η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και όγκων και τέλος ο μικρός χρόνος ημιζωής και κατά συνέπεια ο χρόνος δράσης τους, έστρεψαν το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντιικής δράσης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων και ειδικότερα αυτών που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η έρευνα για την ανακάλυψη αντιικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανρακικό δακτύλιο έχει μείνει πίσω αρκετά βήματα 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 αντιικές (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 (Vastamans et al. 2000, Vastmans et al. 2001).

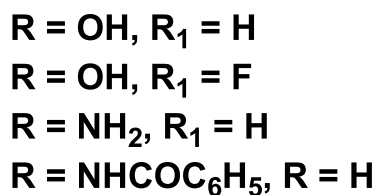
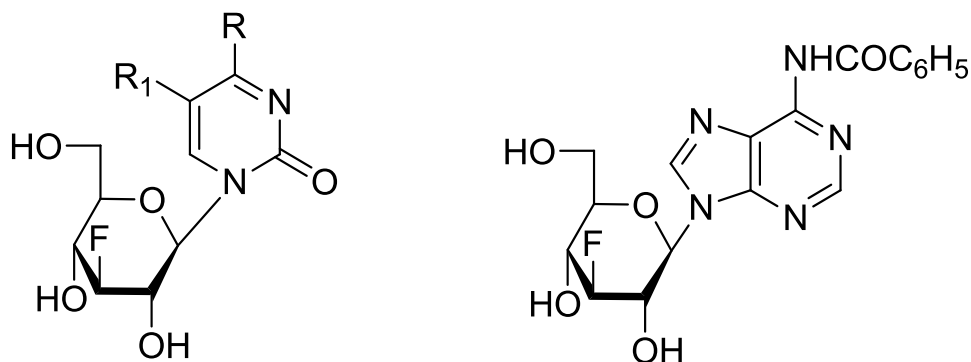
Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη μελέτη φθορονουκλεοζιτών προκειμένου να βρεθούν νέα αντικαρκινικά, αντιικά ή αντι-HIV φάρμακα με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες σε σχέση με τα έως τώρα χρησιμοποιούμενα σε κλινικό επίπεδο (Lee et al. 1999, Lee et al 2002, Chong et al. 2002, Kumar et al. 2004, Clark et al. 2006). Η εισαγωγή ενός φθορίου είτε στο τμήμα του σακχάρου είτε στη νουκλεοβάση των

φουρανονουκλεοζιτών, οδηγεί σε ενώσεις, οι οποίες διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα αντιικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων (Herdewijn et al. 1989, Tsuchiya 1990, Ternansky et al. 1993, Pankiewicz 2000). Ειδικότερα η παρουσία ενός φθορίου στο μόριο του σακχάρου των νουκλεοζιτών με πενταμελή δακτύλιο αποδείχθηκε ότι είναι μια αναποτελεσματική μέθοδος αύξησης της δράσης τους (Van Aerschot 1989, Matthes et al. 1990, Daluge et al. 1994, Fuentes et al. 2002).

Φαίνεται ότι η παρουσία φθορίου αυξάνει το λιπόφιλο χαρακτήρα του μορίου διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο τη διαπερατότητα στην κυτταρική μεμβράνη (Morton et al. 1969, Blandin et al. 1974, Lipnick and Fissekis 1980, Van Aerschot et al. 1989). Η αντικατάσταση ενός υδρογόνου από ένα φθόριο σε ένα βιολογικά ενεργό μόριο δεν αναμένεται να προκαλέσει στερεοχημικές μεταβολές όσον αφορά στον τρόπο σύνδεσης του μορίου έναντι διαφόρων υποδοχέων και ενζύμων. Αντίθετα η μεγάλη ισχύς του δεσμού C-F, σε σχέση με αυτή του δεσμού C-H, παρεμποδίζει το μεταβολισμό με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημιζωής του μορίου. Επιπλέον, η ικανότητα έλξης ηλεκτρονίων από το φθόριο, δεδομένου ότι είναι το πιο ηλεκτραρνητικό όλων των στοιχείων, μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη χημική δραστηριότητα.

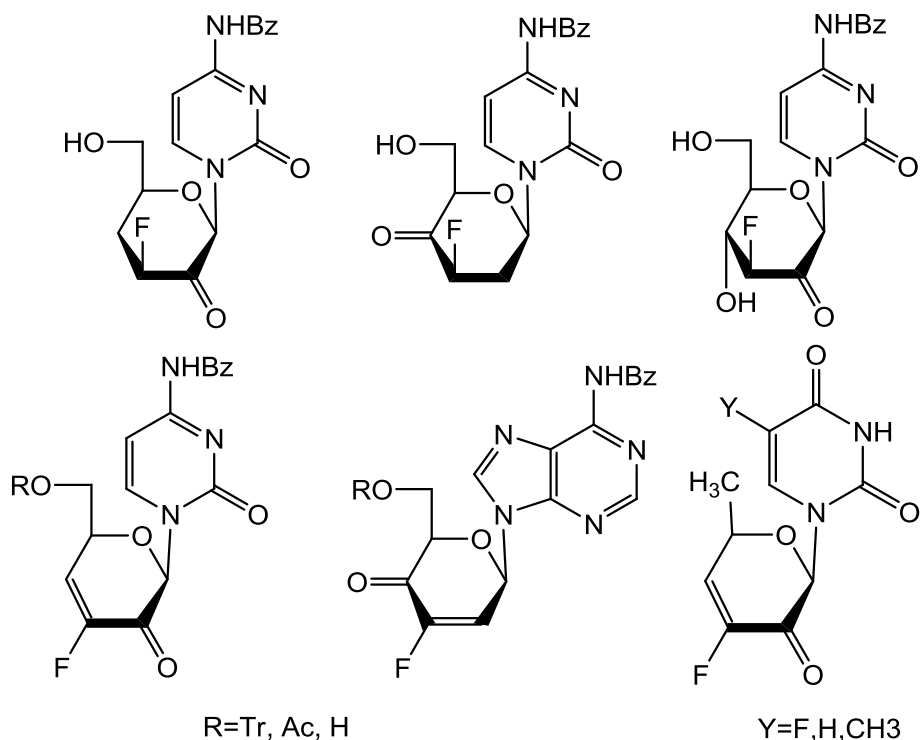
Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έχουν συντεθεί φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Manta et al. 2007), οι οποίοι εμφάνισαν ανασταλτική δράση έναντι της PARN, ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής (πολύ(A) ουράς), καθώς και της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (σχήμα 16).





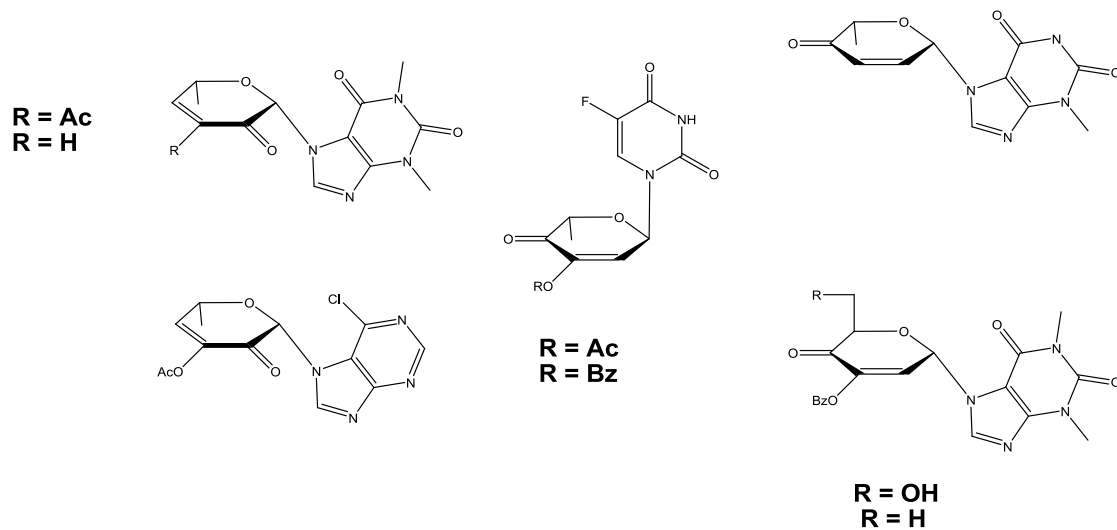
Σχήμα 16 : Χημική δομή φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών

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) (σχήμα 17).



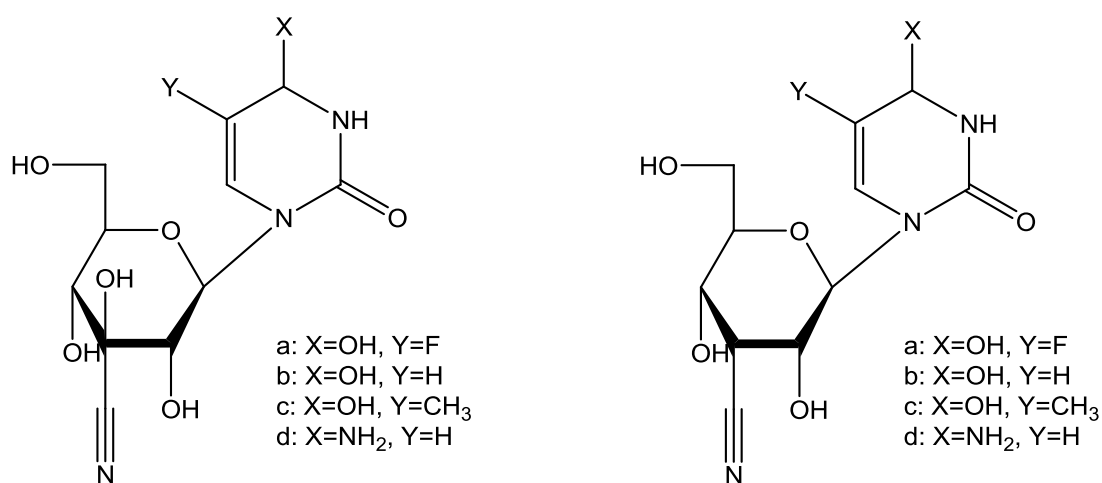
Σχήμα 17 : Χημική δομή φθοροκετο και ακόρεστων φθοροκετο πυρανονουκλεοζιτών

Επιπρόσθετα, ακόρεστα κετο- πυρονουκλεοζιτικά 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) (σχήμα 18).



Σχήμα 18 : Ακόρεστα κετο – πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα

Πρόσφατα μια νέα τάξη πυρανονουκλεοζιτών που έχει μελετηθεί είναι αυτή των 3'-κυανοδρινών και 3'-δεοξυκυανοπυρανονουκλεοζιτών (Kiritsis et al. 2011). Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες αξιολογήθηκαν για την αντιική τους δράση έναντι μιας πληθώρας DNA και RNAϊών, ενώ παρουσίασαν σημαντική κυτταροστατική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και κατά του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa) (σχήμα 19).



Σχήμα 19 : 3' κυανο-νουκλεοζίτες

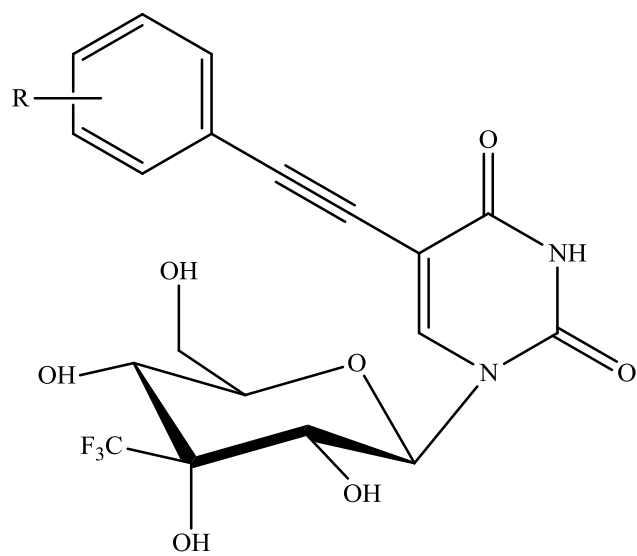
## **2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **2.1 Σκοπός**

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους αποτελούν μια αξιόλογη βάση για την ανάπτυξη ενώσεων με αυξημένη βιολογική δράση, μειωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες σε σχέση με τις μέχρι πρότινος χρησιμοποιούμενες ενώσεις. Αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση νέων τροποποιημένων νουκλεοζιτών ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί και αντιικοί παράγοντες.

Με βάση την διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία έχει διαπιστωθεί ότι οι φθορο- φουρανονουκλεοζίτες αποτελούν μια αξιόλογη κατηγορία ενώσεων που έχει προσελκύσει σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Επιπλέον πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι νέες τάξεις ασυνήθιστων φθοριομένων πυρανονουκλεοζιτών αποτελούν εν δυνάμει αντι-εντεροϊκούς παράγοντες, θεραπευτικά μέσα για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, καθώς και αποτελεσματικούς αναστολείς την ανάπτυξης καρκινικών όγκων.

Στηριζόμενοι στα παραπάνω στοιχεία, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών στους οποίους η ηλεκτραρνητική τριφθορομεθυλο ομάδα θα αντικαταστήσει το άτομο του φθορίου. Οι νέοι νουκλεοζίτες φέρουν την τριφθορομεθυλο ομάδα στην θέση 3' του σακχάρου και ως ετεροκυκλική βάση τροποποιημένη στην θέση 5 ουρακίλη (σχήμα 20). Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες.



**R= ( $\alpha$ ) 2,5-dimethyl, ( $\beta$ ) 2,4,5 - trimethyl**

Σχήμα 20

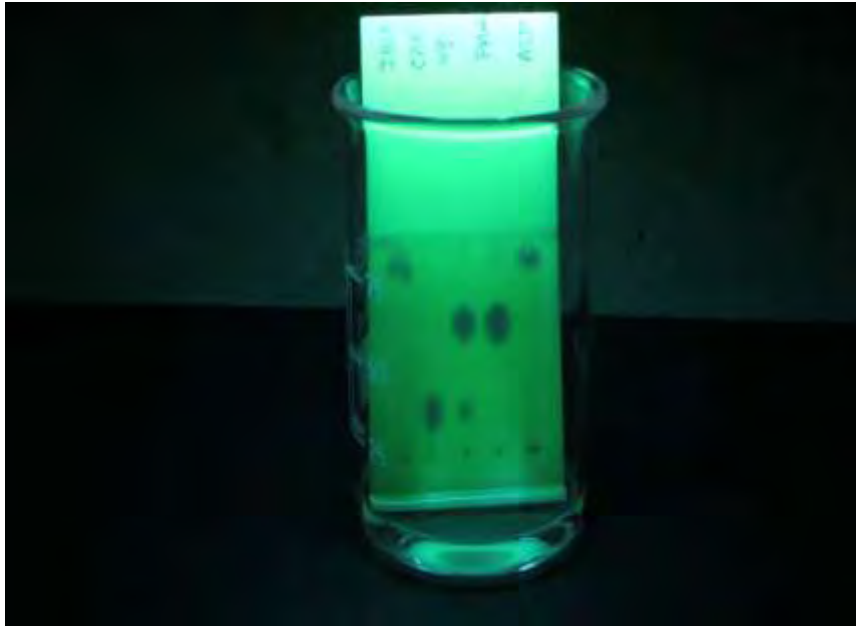
### **3. Γενικές Μέθοδοι**

#### **3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)**

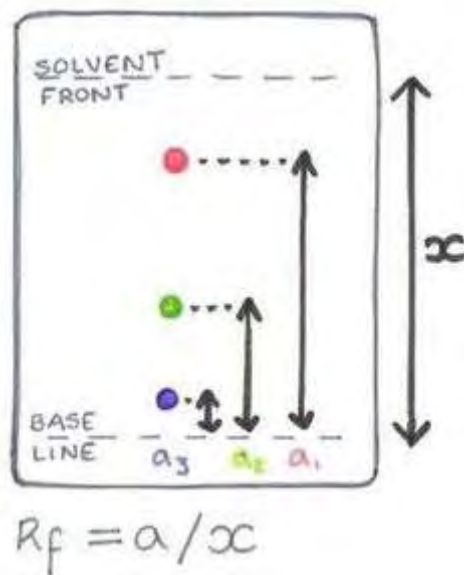
Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieseilel 60 F<sub>24</sub>) πάχους 0,2mm.

Το υπό εξέταση δείγμα τοποθετείται ως κηλίδα στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2cm από τη βάση. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται αεροστεγώς σε ένα θάλαμο 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 και 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 πολικότητά τους και φαίνονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε μορίου στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης R<sub>f</sub>, που ορίζεται από τον λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από τον διαλύτη (α). Η τιμή R<sub>f</sub> ενός συγκεκριμένου μορίου χρησιμεύει για την ταυτοποίηση μια άγνωστης ουσίας. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254 nm ή 356 nm) ή μετά από ψεκασμό με διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (θειικού οξέος) 30%.

Μια χρωματογραφία λεπτής στιβάδας απεικονίζεται στο σχήμα 21.



Σχήμα 21α : Θάλαμος με το σύστημα διαλυτών



Σχήμα 21β: Προσδιορισμός Rf



Σχήμα 21γ : Προσδιορισμός της απόστασης που διένυσε κάθε ένωση

### 3.2 Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από παραπροϊόντα και διαλύτες. Ο καθαρισμός οργανικών ενώσεων πραγματοποιείται κατά κόρον μέσω χρωματογραφίας μιας τεχνικής κατά την οποία το επιθυμητό προϊόν διαλύεται σε έναν οργανικό διαλύτη ή σύστημα διαλυτών με συγκεκριμένη αναλογία κάθε φορά και στη συνέχεια αφήνεται να διαρρεύσει μέσω ενός γυάλινου κατακόρυφου σωλήνα ο οποίος είναι γεμάτος με προσροφητικό υλικό. Το προς διαχωρισμό μείγμα ονομάζεται κινητή φάση ενώ το προσροφητικό υλικό εντός του σωλήνα στατική φάση. Επειδή οι διάφορες ενώσεις προσροφώνται στην στατική φάση με διαφορετική έκταση, μετακινούνται διαμέσου αυτής με διαφορετικές ταχύτητες και τια το λόγο αυτό, εξέρχονται από τη στήλη- εκκλύονται από το άκρο της με διαφορετική ταχύτητα. Ο χρόνος έκλουσης 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.

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



Σχήμα 22 : Στήλη χρωματογραφίας και κλάσματα της ένωσης



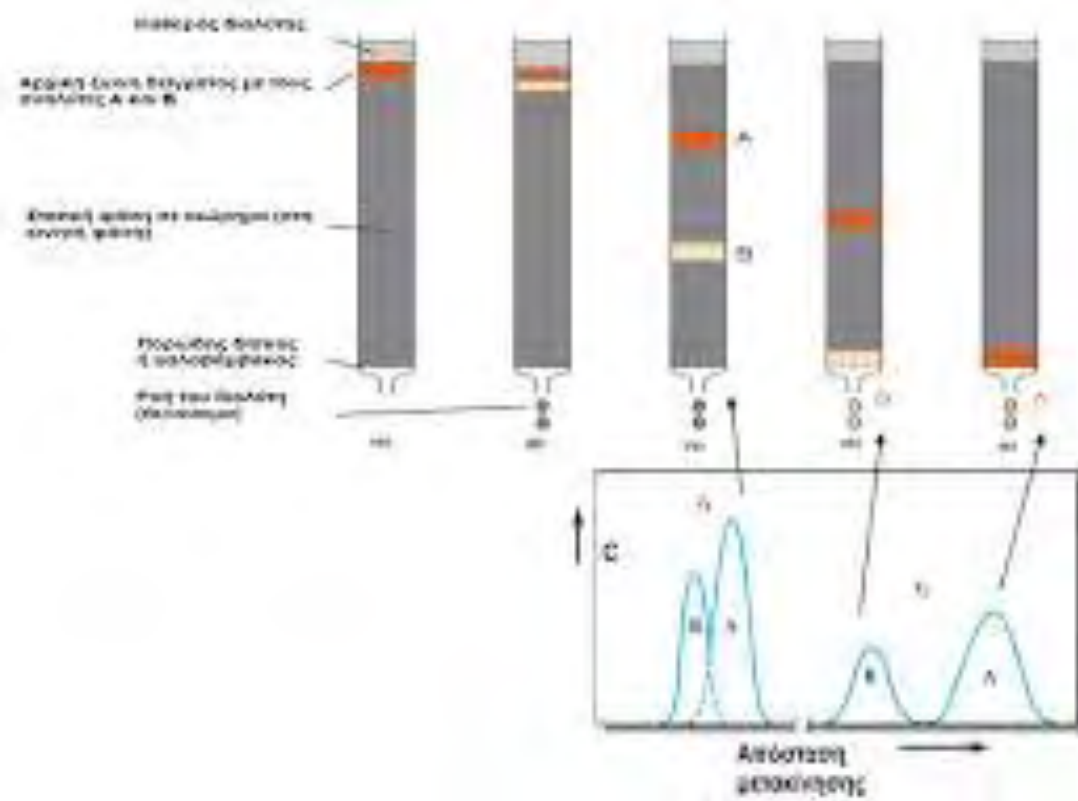
### **3.3 Ξήρανση διαλυτών**

Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων, απαιτείται η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο, τολουόλιο και μεθανόλη. Η ξήρανση του ακετονιτριλίου και του τολουολίου 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 ξήρανση της μεθανόλης γίνεται σε φιάλη με μοριακό κόσκινα 3Å (molecular sieves) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου για μια ώρα.

### **3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων**

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι η χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική μέθοδος που έχουν στη διάθεσή τους οι οργανικοί χημικοί. Αυτό συμβαίνει γιατί παρέχει τον χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα του σε ένα οργανικό μόριο.

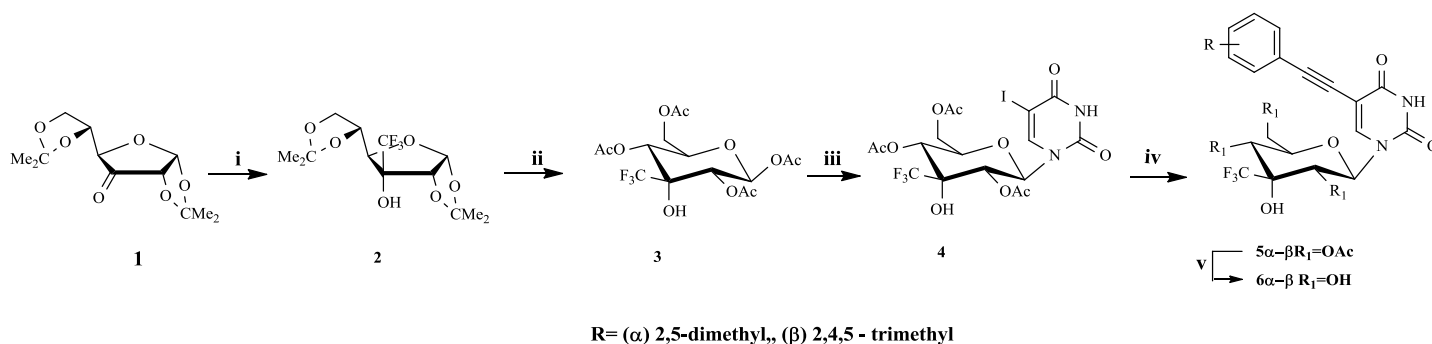
Η ταυτοποίηση των ενώσεων που παρασκευάστηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR ( Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα  $^1\text{H}$ -NMR καταγράφηκαν στα 300 MHz στο φωτόμετρο Bruker AVAMCEIII 300, χρησιμοποιώντας chloroform-d ( $\text{CDCl}_3$ ), methanol-d4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Το τριμέθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για  $^1\text{H}$ .



Σχήμα 23 : NMR

## 4. Πειραματικό Μέρος

### 4.1.1 Επισκόπηση της συνθετικής πορείας



Σχήμα 24

### 4.1.2 Μεθοδολογία Σύνθεσης

Η πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδανο-α-D-γλυκοφουρανόζη (DAG) η οποία οξειδώνεται προς 1,2:5,6-Δισ-O-ισοπροπυλιδανο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη (**1**) χρησιμοποιώντας PDC παρουσία  $AC_2O$  σε διαλύτη  $CH_2Cl_2$ . Η αντίδραση προχωράει ποσοτικά με απόδοση 89%.

Η επόμενη αντίδραση είναι μία πυρηνόφιλη προσθήκη της τριφθορομέθυλο ομάδας στην κετονομάδα του αντιδραστήριου **1**. Λαμβάνουμε με αυτό τον τρόπο με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα την 3-C-τριφθορομέθυλο-1,2:5,6-δισ-O-ισοπροπυλιδανο-α-D-αλοφουρανόζη (**2**) με αντιδραστήριο τριφθορομέθυλοτριμέθυλο πυρίτιο (TFMTS), παρουσία τετραβουτυλο αμμώνιο φθοριδίου

(TBAF) σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF), με απόδοση 90%.

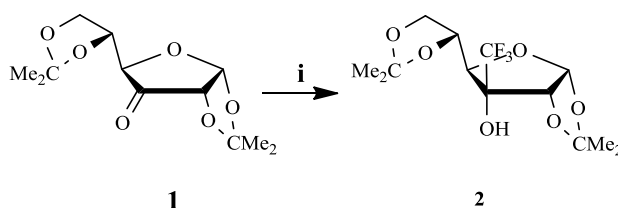
Η σύνθεση συνεχίζεται με την υδρόλυση του προϊόντος **2** με ένα θερμό υδατικό διάλυμα της ρητίνης Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>) και στη συνέχεια, ακετυλίωση του προϊόντος παρουσία οξικού ανυδρίτη (Ac<sub>2</sub>O) σε πυριδίνη, λαμβάνεται το επιθυμητό σάκχαρο, 3-C-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρακίς-O-ακετυλογλυκοπυρανόζη (**3**), με απόδοση (64%).

Ακολουθεί η σύζευξη του σακχάρου **3** με τη βάση 5-ιωδοουρακίλη. Αρχικά, σιλυλιώνεται η βάση παρουσία του διαλύτη ακετονιτριλίου (MeCN), εξαμεθυλο δισιλαζανίου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης. Στη συνέχεια, προστίθεται στο σάκχαρο **3** και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορομεθανο σουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα (Me<sub>3</sub>SiOSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) και θέρμανση της αντίδρασης, λαμβάνοντας την επιθυμητή 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο-3'-υδροξυ-2',4',6'-τρικίς-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο) 5-ιωδοουρακίλη (**4**), σε απόδοση 82%.

Το επόμενο στάδιο της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει την διασταυρούμενη σύζευξη καταλυόμενη από Pd των τελικών αλκυνίων με τον 3'-C-τριφθορομέθυλο πυρανονουκλεοζίτη της 5-ιωδοουρακίλης (**4**) (Σχήμα 24).

Συγκεκριμένα, ο πυρανονουκλεοζίτης της 5-ιωδοουρακίλης (**4**) διαλύεται σε άνυδρο *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), προσθέτοντας το κατάλληλο αλκύνιο, το τετράκις-τριφαίνυλο φωσφορικό παλλάδιο ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ) ως καταλύτη, τον ιωδιούχο χαλκό (CuI) ως συγκαταλύτη, και την τριαιθυλαμίνη ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) ως βάση υπό ατμόσφαιρα αζώτου και στη συνέχεια ακτινοβολούνται με μικροκύματα σε 200 Watt, για 5 λεπτά στους  $50^\circ\text{C}$  (Meneni *et al*, 2007). Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης υπό κενό και ακολουθεί καθαρισμός των υπολειμμάτων σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) υπό πίεση, οπότε παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα **5α-β** (79-83%). Το τελικό στάδιο της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει την αποπροστασία των ενώσεων **5α-β** με κατεργασία τους με μεθανολική αμμωνία (Neilson και Werstuik 1971), οπότε και λαμβάνονται οι επιθυμητοί τελικοί νουκλεοζίτες **6α-β**.

#### 4.1.3 Σύνθεση της 3-C-τριφθορομέθυλο -1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδανο-α-D-αλλοφουρανόζη (2) (Johnson *et al*. 1995)

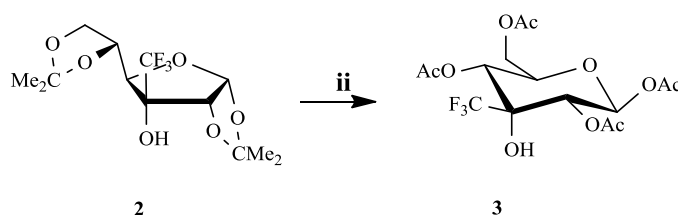


Σε διάλυμα που περιέχει το **1** (1g, 3.9 mmol) και τριφθορομέθυλ-τριμεθυλπυρίτιο (0.8 ml, 8 mmol) σε

THF(10 ml) προστέθηκε στάγδην διάλυμα 1M TBAF σε THF (1.1 g, 8 mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες. Το διάλυμα συμπυκνώθηκε και το προϊόν μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel). Πραγματοποιήθηκε έκλουση με 20% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **2** ( 1.15 g ) ελήφθη υπό τη μορφή λεύκου κρυστάλλου.

TLC (Διάλυμα E)	R <sub>f</sub> =0.52
Απόδοση	90%

#### 4.1.4 Σύνθεση της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζης (3) (Foster et al. 1967, Tewson et al. 1978)

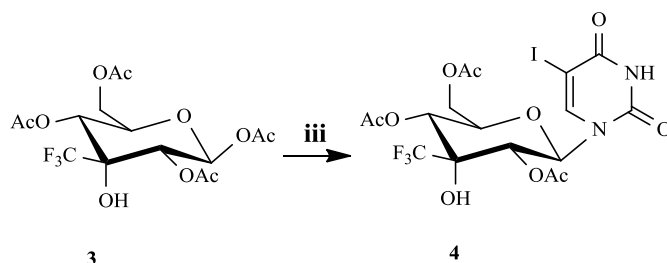


Ένα διάλυμα της ένωσης **2** (700 mg, 2.13 mmol) σε MeOH (3.31 ml) και νερό (19 ml) αναδεύτηκε στους 60-70 °C με ρητίνη Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>) (1.10mg). Μετά από 10 ώρες η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 3), το μείγμα διηθήθηκε και απομακρύνθηκαν οι διαλύτες από το

δινήθημα υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Στη συνέχεια διαλύθηκε σε πυριδίνη (6.02ml) προστέθηκε  $\text{Ac}_2\text{O}$  (3.10ml). Το μείγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC πίνακας 4) το διάλυμα κρύωσε στους  $0\text{ }^\circ\text{C}$  και προστέθηκε μεθανόλη (0.7 ml) για να καταστείλει την αντίδραση. Η αντίδραση συμπυκνώνεται υπό κενό πολλές φορές με MeOH για να απομακρυνθεί η πυριδίνη. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 50% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο και το επιθυμητό προϊόν **3** (429 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα B)	$R_f=0.57$
Απόδοση	64%

#### 4.1.5 Σύνθεση της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-υδροξυ-2',4',6'-τρिस-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-ιωδοουρακίλης (4)



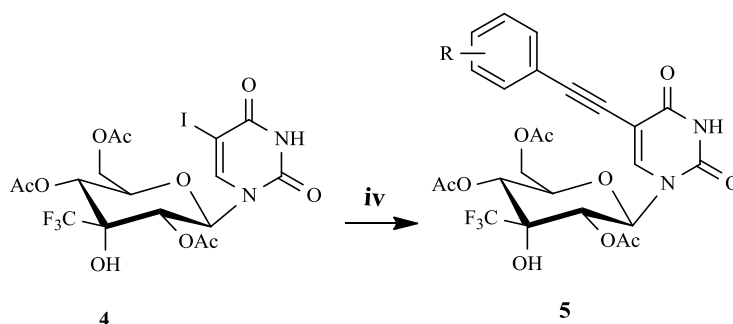
Ένα διάλυμα της ιωδοουρακίλης (200 mg, 1.44 mmol), του HMDS (380 μl, 1.79 mmol) και της σακχαρίνης (12.15 mg, 0.066 mmol) σε άνυδρο CH<sub>3</sub>CN (10 ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 1 ώρα στους 120 °C και αφότου το μείγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 3-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζη (**3**) (429mg, 1.03mmol) καθώς και ο Me<sub>3</sub>SiOSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (0.26ml, 1.44mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες (TLC πίνακας 5) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 90°C. Στη συνέχεια το μείγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO<sub>3</sub>, αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (90 ml) και εκχυλίστηκε μία φορά με νερό. Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40%



εξάνιο σε οξικό αιθυλεστέρα. Το επιθυμητό προϊόν **5** (352mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα Γ)	R <sub>f</sub> =0.46
Απόδοση	82%

#### 4.1.6 Σύνθεση των 5

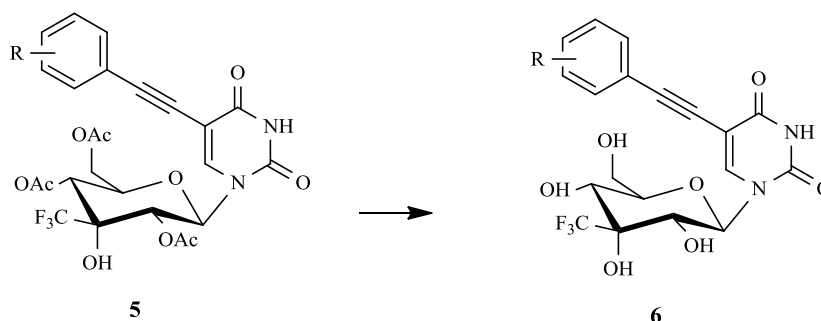


R= (α) 2,5-dimethyl,, (β) 2,4,5 - trimethyl

Ο πυρανονουκλεοζίτης της 5-ιωδοουρακίλης (**4**) διαλύεται σε άνυδρο *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), προσθέτοντας το κατάλληλο αλκύνιο, το τετράκις-τριφαίνυλοφωσφορικό παλλάδιο ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ) ως καταλύτη, τον ιωδιούχο χαλκό (CuI) ως συγκαταλύτη, και την τριαιθυλαμίνη ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) ως βάση υπό ατμόσφαιρα αζώτου και στη συνέχεια ακτινοβολούνται με μικροκύματα σε 200 Watt, για 5 λεπτά στους 50°C (Meneni *et al*, 2007).

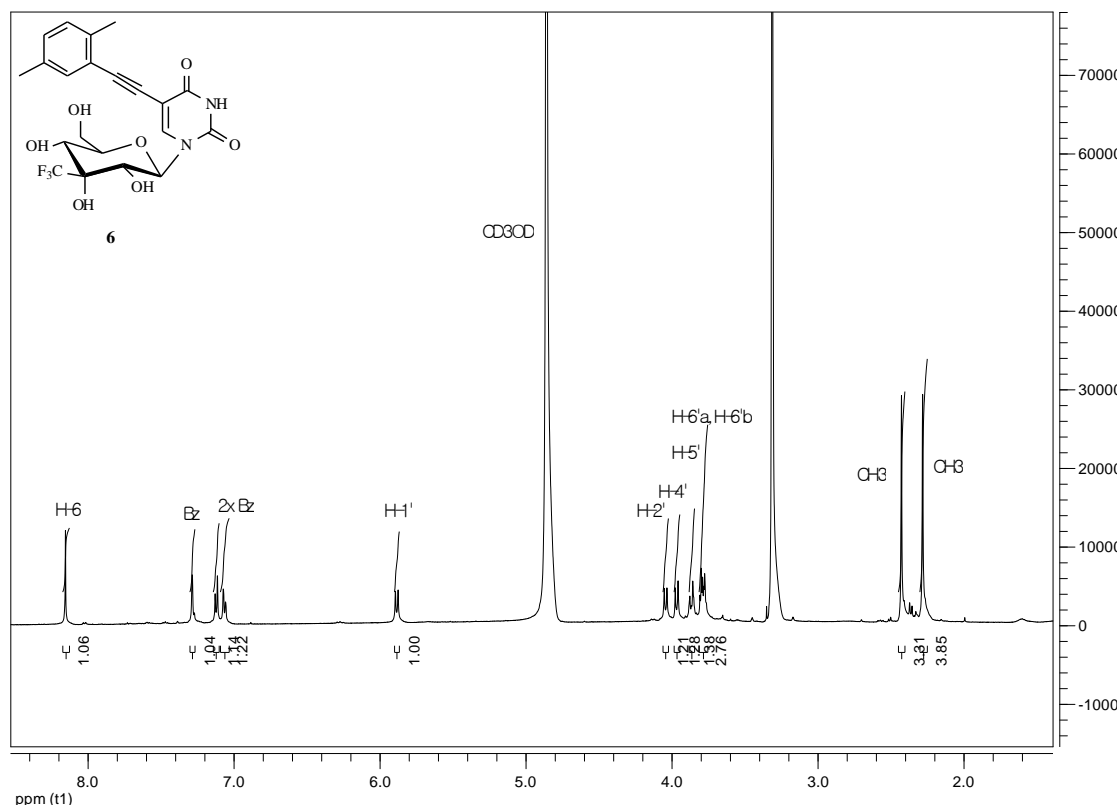
Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC), απομακρύνεται ο διαλύτης υπό κενό και ακολουθεί καθαρισμός των υπολειμμάτων σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) υπό πίεση, οπότε παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα **5α-β** (79-83%).

#### 4.1.7 Σύνθεση των 6



Σε διάλυμα της ένωσης **5** ( 352 mg, 0.72 mmol ) και κορεσμένης με αέρια NH<sub>3</sub>/μεθανόλης ( 30.25 ml ) αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10ώρες. Το διάλυμα συμπυκνώνεται και μεταφέρεται σε χρωματογραφική στήλη και εκλούεται με οξικό αιθυλεστέρα και παίρνουμε τα τελικά προϊόντα (**6**).

## 5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ $^1\text{H}$ NMR

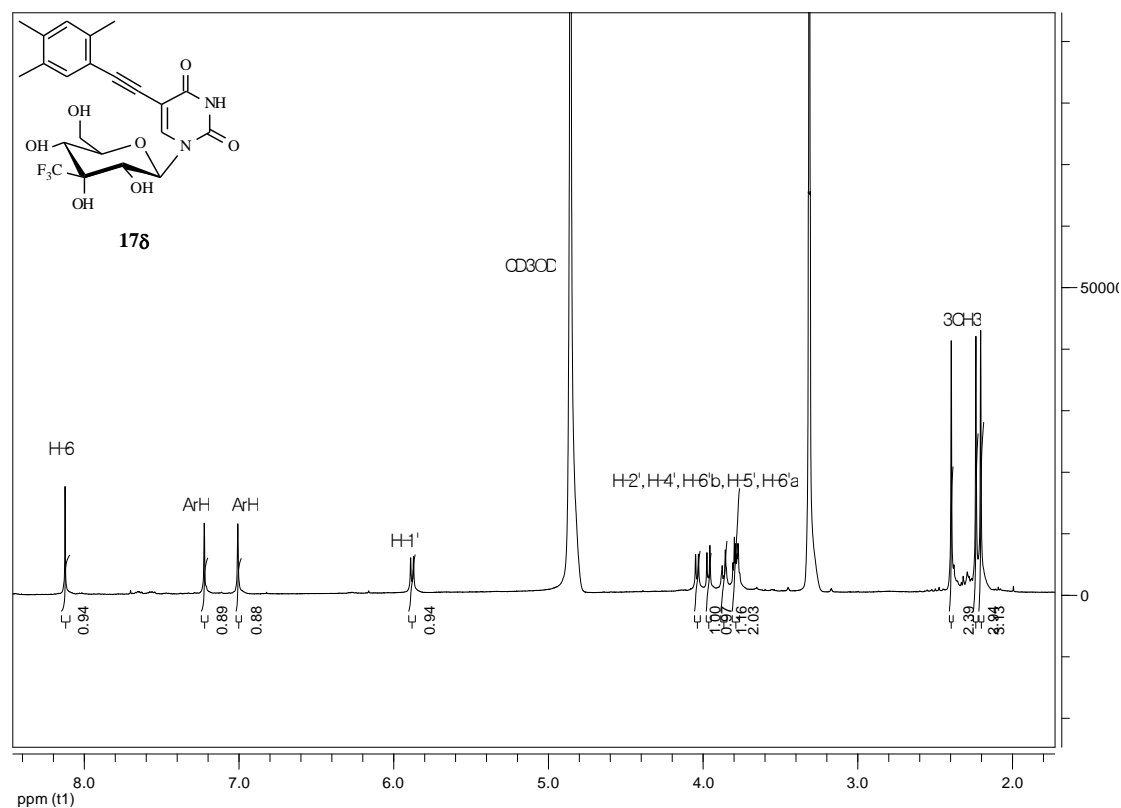


Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του τελικού προϊόντος **6a**

Από τη μελέτη του παραπάνω φάσματος  $^1\text{H}$ -NMR προκύπτει το σήμα του πρωτονίου H-1' στα 5,75 ppm ως διπλή κορυφή γιατί γειτνιάζει με τον C-2' που έχει ένα H (κανόνας  $n+1$ ). Το H-5' έχει σήμα στα 3,86 ppm και πολλαπλή κορυφή γιατί γειτνιάζει με τον C-4' και τα δύο πρωτόνια του C-6. Στα 2.43 και 2.28 ppm εμφανίζονται δύο απλές κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στις δύο μέθυλο ομάδες του βενζολίου. Το H-2' έχει διπλή κορυφή στα 4.05 ppm γιατί γειτνιάζει με τον C C-1' που έχει 1H. Παρόμοια το H-4' έχει διπλή κορυφή στα 3.96 ppm. Οι δύο

διπλές διπλών κορυφές που εμφανίζονται στα 3.80 και 3.77 ppm αντιστοιχούν στα δύο πρωτόνια του C-6.

Τα σήματα των αρωματικών πρωτονίων φαίνονται στα 8.16 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της ουρακίλης. Ενώ στα 7.29, 7.11 και 7.06 εμφανίζονται τα τρία πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου. Με παρόμοιο τρόπο γίνεται και η ανάλυση  $^1\text{H-NMR}$  του προϊόντος 6-β.



Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του τελικού προϊόντος 6β

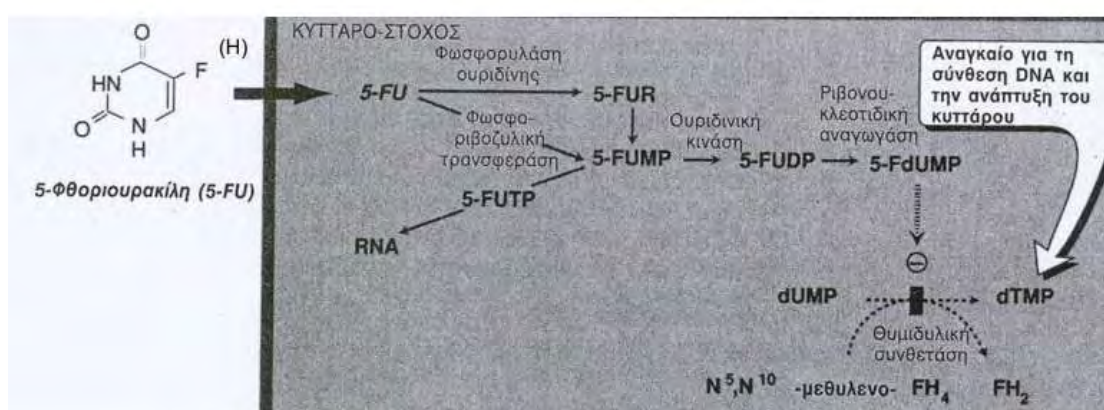
## 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προέκυψε από τις προσπάθειες των ερευνητών για καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως κακοήθεις νεοπλασίες και οι ιικές μολύνσεις. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων, τα οποία να παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα όπως τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και εκλεκτικότητα όσον αφορά την δράση τους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών με πιθανή αντιική και αντικαρκινική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, εύκολη, με σύντομα βήματα. Οι τελικές αποδόσεις που πήραμε από την σύνθεση των τελικών πυρανονουκλεοζιτών είναι ικανοποιητικές. Πιο συγκεκριμένα, σύνθεση 3-C-τριφθορομέθυλο -1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενό-α-D-αλλοφουρανόζη (2) με απόδοση 90%, 3-C-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζης (3) με απόδοση 64%, 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο -3'-υδρόξυ-2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-ίωδοουρακίλης (4) με απόδοση 82%, σύνθεση των 5 με αποδόσεις 79 και 83% αντίστοιχα και

σύνθεση των προϊόντων 6. Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H-NMR}$ .

Οι ενώσεις που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο, εξετάστηκαν για την πιθανή ανασταλτική τους δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T- λεμφοκυττάρων CEM, καθώς επίσης και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa). Η ικανότητα αναστολής πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων από τους νεοσυντιθέμενους πυρανονουκλεοζίτες απεικονίζεται στον παραπάνω πίνακα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τις νέες ενώσεις συγκρίνονται με αυτά του αντιμεταβολίτη 5-φθοριουρακίλη.



Εικόνα 6: Αναστολή της θυμιδυλικής συνθετάσης από την 5-FU

Η 5-φθοριουρακίλη είναι ένας αντιμεταβολίτης που ενσωματώνεται στο RNA. Για να ενεργοποιηθεί πρέπει να φωσφορυλιωθεί προς μονοφωσφορική 5-φθοριο δεοξουρακίλη. Ο μοριακός μηχανισμός δράσης της μονοφωσφορικής 5-φθοριο-δεοξουρακίλης είναι η αναστολή της θυμιδυλικής συνθετάσης. Έτσι δεν πραγματοποιείται η μετατροπή της μονοφωσφορικής ουριδίνης σε τριφωσφορική θυμιδίνη που είναι αναγκαία για την σύνθεση του DNA και την ανάπτυξη του κυττάρου. Έτσι η 5-φθοριουρακίλη δρα ως κατασταλτικό της κυτταρικής διαίρεσης, έχει δηλαδή κυτταροστατική δράση.

Η σύγκριση των νεοσυντιθέμενων πυρανονουκλεοζιτών με την 5-φθοριουρακίλη μας δίνει την δυνατότητα να αντικαταστήσουμε τη δεύτερη με νέα μόρια με μικρότερες και ηπιότερες παρενέργειες και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.

Τα καρκινικά κύτταρα λευχαιμίας (L1210) τις περισσότερες φορές ξεφεύγουν από την διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού κύκλου και διαιρούνται άσκοπα, αναίτια και ανεξέλεγκτα οδηγώντας σε υπερπλασία της λεμφικής σειράς και με πλήρη αναστολή της διαφοροποίησης. Τα βλαστικά κύτταρα διηθούν τον μυελό και διαχέονται στο αίμα, για να διηθήσουν στην συνέχεια άλλα ευγενή όργανα και να επιφέρουν τον

θάνατο. Η αγωγή περιλαμβάνει πολύπλοκους συνδυασμούς κορτικοειδών με άλλα κυτταροστατικά φάρμακα όπως η 5-φθοριουρακίλη.

Ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι απόρροια κάποιου ή παραπάνω από έναν από τους παρακάτω παράγοντες:

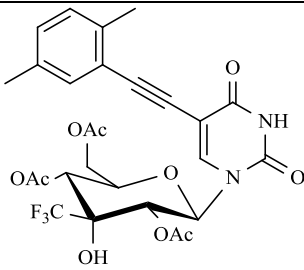
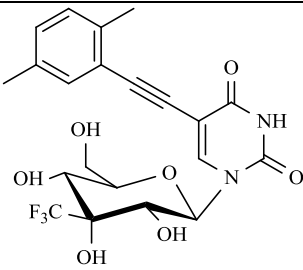
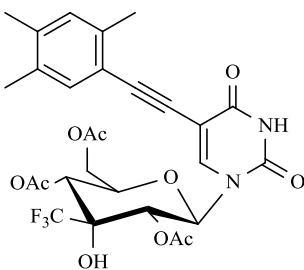
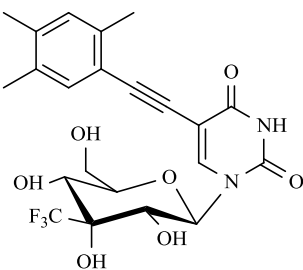
- i. Αντιμεταθέσεις τμημάτων χρωμοσωμάτων, όπου σχηματίζονται υβριδικά γονίδια με υπεραυξημένη μεταγραφική ικανότητα.
- ii. Διαταραχές γονιδίων που επιφέρουν καλύτερη επιβίωση και πολλαπλασιασμό.
- iii. Διαταραχές που επιφέρουν απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.
- iv. Διαταραχές των γονιδίων που επιφέρουν αναστολή της διαφοροποίησης.
- v. Μεταλλάξεις του γονιδίου NOTC1 που επιφέρουν αυτόνομη αύξηση της δράσης του στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Οι ενώσεις που παρασκευάστηκαν ελέγχθηκαν για την πιθανή ανασταλτική τους δράση έναντι και του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων T- λεμφοκυττάρων CEM, καθώς επίσης και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa). Τα κύτταρα HeLa είναι μια αθάνατη κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται στην



έρευνα και προέκυψε από τα καρκινικά τραχηλικά κύτταρα.

**Πίνακας 1.** Ανασταλτική δράση ( $IC_{50}$ ,  $\mu M$ ) των ενώσεων 5α,β και 6α,β, έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων CEM και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa).

<u>Προϊόν</u>	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )			<u>Προϊόν</u>	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )		
	L1210	CEM	HeLa		L1210	CEM	HeLa
 5α	23 ± 4	20 ± 1	23 ± 1	 6α	> 250	> 250	> 250
 5β	23 ± 1	19 ± 3	20 ± 2	 6β	170 ± 61	178 ± 28	> 250
5-Fluorouracil	0.33 ± 0.17		18 ± 5				0.54 ± 0.12

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 1, οι νεοσυντιθέμενοι πυρανονουκλεοζίτες 5α και β παρουσίασαν ανασταλτική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των λευχαιμικών κυττάρων (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων

(CEM) και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου (HeLa), σε τιμές IC<sub>50</sub> 23,20,23 και 23,19,20μΜ αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα δεν ήταν αποτελεσματικά για την αναστολή της διαφοροποίησης των παραπάνω κυττάρων για τους πυρανονουκλεοζίτες 6α και 6β.

Συμπεραίνουμε επομένως ότι οι προστατευόμενοι νουκλεοζίτες 5α και 5β έχουν καλύτερη δράση έναντι των αποπροστατευμένων, λόγω αυξημένης λιποφιλικότητας. Αυτό οφείλεται στο ότι, εν γένει τα λιπόφιλα μόρια διαχέονται πιο εύκολα και γρήγορα δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης, επειδή είναι λιπώδης. Αντίθετα οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες 6α και 6β είναι λιγότερο δραστικοί έναντι των 5α και 5β καθώς έχουν ελεύθερες υδροξυλομάδες στο μόριό τους και άρα, μειωμένη λιποφιλικότητα.

Όπως φαίνεται στον πίνακα την καλύτερη δράση έχει η ένωση 5β με έναν επιπλέον υποκαταστάτη άνθρακα στο βενζόλιο.

Αν και οι πυρανονουκλεοζίτες που παρασκευάσαμε και συγκεκριμένα οι 5α και 5β, παρουσίασαν ανταγωνιστική δράση έναντι της 5-φθοριοουρακίλης επιδέχονται βελτίωση ώστε να γίνουν ακόμη πιο ανταγωνιστικοί. Ίσως η αντικατάσταση ενός μεθυλίου στο βενζόλιο με ένα αλογόνο βοηθήσει προς αυτή την κατεύθυνση. Περαιτέρω

πειράματα πρέπει να πραγματοποιηθούν για την σύνθεση τέτοιων μορίων.

## 7. Βιβλιογραφία

1. McMurry J. Οργανική Χημεία, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, σελ. 151,154,369, 572-573,578,583.
2. McMurry J. Οργανική Χημεία, τόμος ΙΙ, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, σελ. 905,1237-1243,1249.
3. Stryer, Tymoczko, Berg, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης σελ. 329,332,333-334.
4. Βαφοπούλου, Μαστρογιαννάκη, Βιοχημεία τροφίμων, Εκδόσεις Ζήτη σελ. 17-18.
5. Hoffman, Walker, Sutter, Curtis, Page, Φαρμακολογία, Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη, σελ. 512-513.
6. Sweetly. Mehta , Thin Layer Chromatography, Principle, 8 November 2012.
7. Chen CH et al. Effect of anti-human immunodeficiency virus nucleoside analogs on mitochondrial DNA and its implication for delayed toxicity. Mol Pharmacol 39: 625-638, 1991.
8. Seidlin M et al. Pancreatitis and pancreatic dysfunction in patients taking dideoxyinosine. AIDS 6: 831-835, 1992.
9. Lai KK et al. Fulminant hepatic failure associated with 2',3'-dideoxyinosine (ddI). Ann Intern Med 115: 283-284, 1991.
10. Boxwell D et al. Fatal hepatotoxicity associated with combination hydroxyurea and nucleoside

reverse transcriptase inhibitors (NRTIs): cases from the FDA adverse event reporting system (AERS). Eighth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, abstract 617, 2001.

11. Bani-Sadr F et al. Risk factors for symptomatic mitochondrial toxicity in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients during interferon plus ribavirin-based therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 40: 47-52, 2005.
12. U.S. National Library of Medicine, Feb.1.1993; Clinical alert: Important Therapeutic information on treatment of HIV Infection in HIV- Infected patients who are intolerant of or have Failed Zidovudine Therapy.
13. De Clercq E (2002) Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov* 1:13–25.
14. De Clercq E (2004a) Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol* 30:115–133.
15. De Clercq E (2004b) Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol* 2:704–720.
16. Chemguide, Jim Clarck 2007, thin layer chromatography.
17. Chemguide, Jim Clarck 2007, column chromatography.

18. Campana, D. (2010) Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. American Society of Hematology Education Program (pp. 7-12).
19. Mullighan, C. (2012) Genomic analysis of acute lymphoblastic leukemia; insights from next generation sequencing. European Association of Hematology Education Program (pp.1-8).
20. Mullighan, C. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. American Society of Hematology Education Program (pp.389-396).
21. Harrison C. (2013) Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. American Society of Hematology Education Program (pp. 118-125).
22. Hoelzer, D. (2011) Novel antibody-based therapies for acute lymphoblastic leukemia. American Society of Hematology Education Program (pp. 243-249).
23. Schrappe, M. (2014) Detection and management of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. American Society of Hematology Education Program (pp245-249).
24. Hunger, S.P., Mullighan, C.G. (2015) Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. Blood, Jabbour, E.,

- O'Brien, S., Ravandi, F., Kantarjian H. Monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia, 2015.
25. Komiotis, D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents* 2008, 7, 219.
26. Tim Soderberg, Conformation of cyclic organic molecules, 2 June 2019.
27. Anne Marie Helmstine, Nucleotides in DNA and RNA, 6 May 2019.
28. Madhusa, Difference between D- and L- glucose, 7 July 2017.
29. N. Arjona, G. Trejo, an electrokinetic- combined electrochemical study of glucose electro- oxidation reaction : effect of gold surface energy, 2016.
30. Komiotis, D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides Nucleotides* 1991, 10, 431.
31. Kiritsis C, Manta S, Parmenopoulou V, Balzarini J, Komiotis D. *Eur J Med Chem.* 2011 Nov;46(11):5668-74.
32. Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Panagiotopoulou, A.; Pelecanou, M.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2009a, 44.
33. Νικόλαος Κολλάτος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 3' C- Τριφθορομεθυλογλυκοπυρανονουκλεοζίτες ως

νέοι πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες, Διπλωματική Εργασία 2012.

34. Κυρίσης Χρήστος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σύνθεση νέων αιθυνυλο και κυανονουκλεοζιτών ως πιθανοί αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες, Μεταπτυχιακή εργασία, 2010.
35. Στυλιανός Λιοδάκης, Αναλυτική Χημεία, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, σελ. 299-230.
36. Σ. Λιοδάκης, Ανόργανη Χημεία, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου, σελ. 590-591.
37. Dimoroulou, Manta, Parmenopoulou, Kollatos, Christidou, Triantakonstanti Dominique Schools, Komiotis, an easy microwave-assisted synthesis of C8- alkyl adenine pyranonucleosides as novel cytotoxic antitumor agents, 2007.
38. Carbohydrate Chemistry, Neilson and Werstuik 1971, τόμος 5, σελ. 143.
39. Sakuma R, Sakuma, AZT inhibits XMRV, 8 December 2009.
40. Perigaud, C. ; Gosselin, G. ; Imbach, J. L. Nucleosides Nucleotides 1992,11,903.
41. Zhou, W. ; Gumina, G. ; Chong. Y; Wang J. ; Schinazi, R.F. ; Chu, C.K. J Med. Chem 2004,47,3399.



42. Burns, C. J. Curr, Med. Chem – Anti – Infective agents, 2005, 4, 4.
43. Lui, V.W.Y.W. ; Lau, C.P.Y.P, Biochemical pharmacology 2010,79 , 1772.
44. Bhat, U. G. ; Pandit, B, Molecular cancer therapeutics, 2010.
45. Siev, M. ; Weinberg, R, Cell Biology, 1969, 41, 510.
46. Ahn, Y. J. ; Park, S. J. Food Chem. , 2000, 48, 2744.
47. Cory, A. H. ; Samano, V. , Biochem. Pharmacol. , 1994, 47, 365.
48. Pontikis, R.; Wolf, J.; Monneret, C.; Florent, J. – C. Tetrahedron Lett. 1995, 36, 3523.
49. Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. Cancer Res.1991, 51, 2319.
50. Matsuda, A.; Sasaki, T. Cancer Sci.2004,95, 105.
51. Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. Molecular cancer therapeutics 2010.
52. Hiroyuki Hayakawa, Satoru Kohgo, Kenji Kitano, Noriyuki Ashida, Antiviral chemistry & chemotherapy 2004;15(4):169-87.
53. Brossette T., Emmanuel Klein, Christophe Creminon, Jacques Grassi, Tetrahedron, 2001, 57, 8129-8143.

54. Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Van Meervelt, L.; Rozenski, J. , Med. Chem. 1995, 38, 826.
55. Maurinsh, Y.; Schraml, J.; De Winter, H.; Blaton, N.; Peeters, O.; Lescrinier, E. , Org. Chem. 1997, 62, 2861.
56. Antonakis, K. "Hexopyranose nucleosides". In Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C); Elsevier, Amsterdam, 1989, 4, p. 241.
57. Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A. , Biochemistry 2000, 39, 12757.
58. Chong, Y.; Choo, H. , Med. Chem. 2002, 45,4888.
59. VanAerschot, A.; Herdewijn, P. , Med. Chem. 1989, 32, 1743.
60. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. Bioorg. Med. Chem., 2007, 15, 980.
61. Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Panagiotopoulou, A.; Pelecanou, M.; Balzarini, J.; Komiotis, D. Eur. J. Med. Chem. 2009a, 44, 4764.
62. Lipnick, R. L. ; Fissekis, J. D. Biochim. Biophys. Acta 1980, 608, 96.
63. Johnson, Hold, Ho, Βιοφυσική, αρχές φυσικής βιοχημείας, Εκδόσεις Έμβρυο, σελ. 631.

