



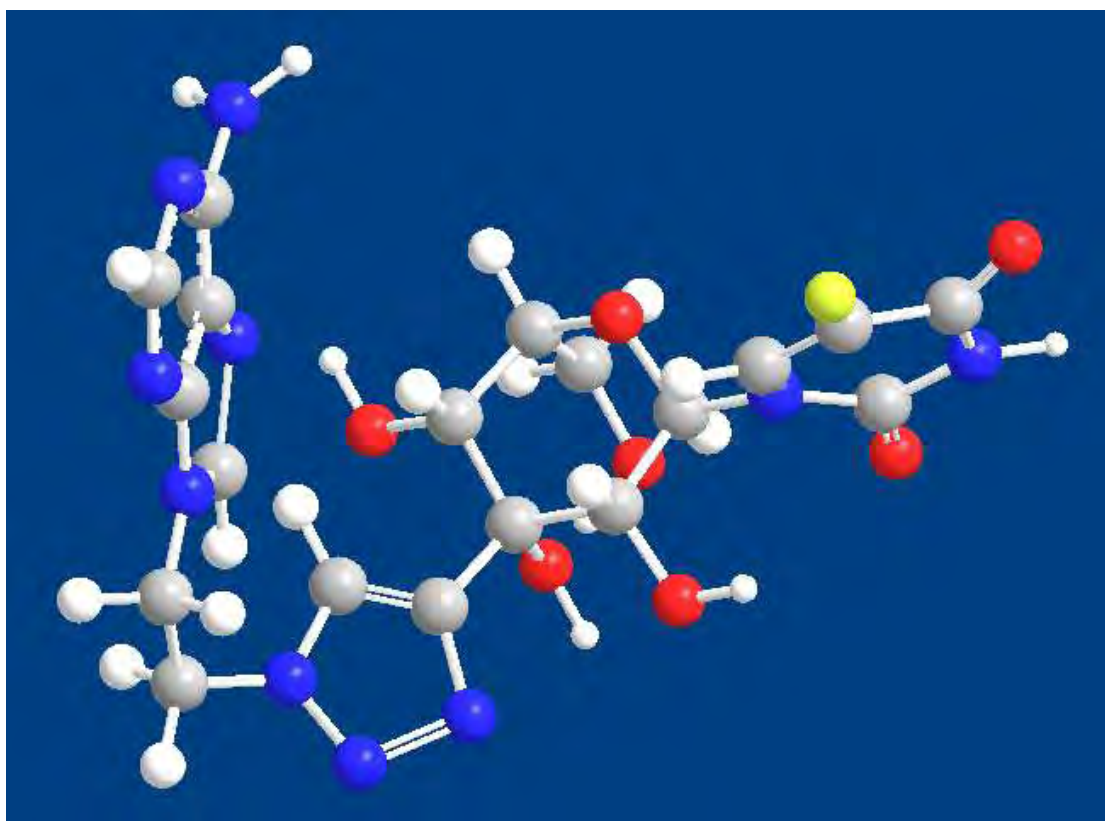
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΔΥΟ ΒΑΣΕΩΝ ΩΣ  
ΠΙΘΑΝΟΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ



**ΚΑΡΥΠΙΔΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2011**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Μαντά Στυλιανή** – Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Κομιώτης Δημήτριος** – Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μαρκουλάτος Παναγιώτης** – Καθηγητής Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής 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. Χρήστο Κυρίτση για την υποστήριξη του καθ' όλη την περίοδο της παραμονής μου στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας. Η εμπειρία του και οι πολύτιμες συμβουλές του αποτέλεσαν εφόδια για την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας.

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

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>5</b>
1.1 Υδατάνθρακες	5
1.2 Υδατάνθρακες και σχηματισμός ημιακετάλης	6
1.3 Νουκλεοζίτες και ανάλογά τους	11
1.4 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια πεντόζη	12
1.5 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη	14
1.6 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με δύο νουκλεϊκές βάσεις	16
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ</b>	<b>18</b>
<b>3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>21</b>
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)	21
3.2 Χρωματογραφία στήλης	21
3.3 Ταυτοποίηση ενώσεων	21
<b>4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>23</b>
4.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού	23
4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης	24
4.2.1 Σύνθεση της 1-[2'-4'-6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-{(5-φθοροουρακίλ-1-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]5φθοροουρακίλης (4α)	25
4.2.2 Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(5-φθοροουρακίλ-1-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο]5φθοροουρακίλης (5α)	26
4.2.3 Σύνθεση της 1-[2'-4'-6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-{(5-φθοροουρακίλ-1-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (4b)	27
4.2.4 Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(5-φθοροουρακίλ-1-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (5b)	28
4.2.5 Σύνθεση της 1-[2'-4'-6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (4c)	29
4.2.6 Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (5c)	30
4.2.7 Σύνθεση της 1-[2'-4'-6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]θυμίνης (4d)	31

4.2.8	Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]θυμίνης (5d)	<b>32</b>
4.2.9	Σύνθεση της 1-[2'-4'-6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]N <sup>4</sup> -βενζοϋλοκυτοσίνης (4e)	<b>33</b>
4.2.10	Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]κυτοσίνης (5e)	<b>34</b>
4.2.11	Σύνθεση της 9-[2'-4'-6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]N <sup>6</sup> -βενζοϋλοαδενίνης (4f)	<b>35</b>
4.2.12	Σύνθεση της 9-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]αδενίνης (5f)	<b>36</b>
4.2.13	Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]5-φθοροουρακίλης (5g)	<b>37</b>
4.2.14	Σύνθεση της 1-[2'-4'-6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-{(θυμίν-1-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (4h)	<b>38</b>
4.2.15	Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(θυμίν-1-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (5h)	<b>39</b>
	<b>5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ <sup>1</sup>H NMR</b>	<b>40</b>
	<b>6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>42</b>
	<b>7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>44</b>

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Έχει αποδειχτεί ότι οι νουκλεοζίτες, αποτελούμενοι από ολιγοσακχαρίτες (φουρανόζη, πυρανόζη) συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση, υπάρχουν σε πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντικαρκινική, αντική αλλά και αντιδιαβητική δράση. Αυτό το γεγονός έθεσε τα θεμέλια για τη σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών οι οποίοι αναμενόταν να συμβάλλουν καθοριστικά στην αντική, αντικαρκινική και αντιδιαβητική θεραπεία. Οι κλινικές έρευνες που ακολούθησαν επιβεβαίωσαν την υπόθεση αυτή με αποτέλεσμα να ξεκινήσει η χρήση τροποποιημένων νουκλεοζιτών στην αντική και αντικαρκινική χημειοθεραπεία.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι νουκλεοζίτες με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο (πύρανο), καθώς πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα εμφάνισαν σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων και κριθήκαν αποτελεσματικά στην αναστολή της μόλυνσης από εντεροϊό. Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιείται η σύνθεση και αξιολόγηση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών, των 1,2,3-τριάζολο δικέφαλων νουκλεοζιτών μέσω μιας νέας σχετικά σειράς αντιδράσεων Κυκλοπροσθήκης Αζιδίων-Αλκινίων Καταλυόμενης από Χαλκό (CuAAC, Cu-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition).

### 1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες αποτελούν μια από τις τέσσερις κύριες κατηγορίες βιομορίων που συναντώνται σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Επίσης, αποτελούν μια ομάδα οργανικών ουσιών που έχουν ως γενικό χημικό τύπο  $C_n(H_2O)_n$ , δηλαδή πρόκειται για έναν ενυδατωμένο άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, οι υδατάνθρακες είναι μια ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών που ονομάζονται σάκχαρα. Τα μοριακά βάρη αυτών των μορίων ποικίλουν και σύμφωνα με αυτά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις κατηγορίες:

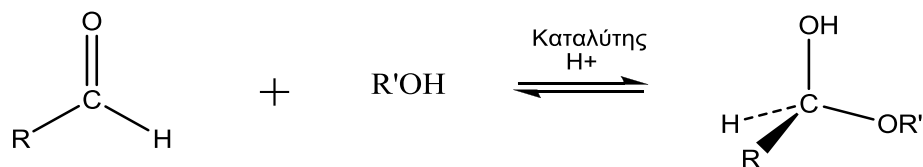
- Μονοσακχαρίτες, με κύριους αντιπροσώπους τη γλυκόζη και φρουκτόζη. Τα μόρια αυτά είναι τα μονομερή για τη σύνθεση πολυπλοκότερων δομών.
- Δισακχαρίτες, με κύριους αντιπροσώπους τη σουκρόζη, λακτόζη και μαλτόζη. Αποτελούνται από δυο μονοσακχαρίτες.

- Ολιγοσακχαρίτες, με κύριους αντιπροσώπους τις μαλτοδεξτρίνες και τους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες. Αποτελούνται από 20-30 μονοσακχαρίτες.
- Πολυσακχαρίτες, με κύριους αντιπροσώπους το άμυλο, το γλυκογόνο και την κυτταρίνη. Τα μόρια αυτά αποτελούνται από εκατοντάδες χιλιάδες υπομονάδες γλυκόζης.

Η βιολογική τους σημασία είναι τεράστια αφού αποτελούν πηγή ενέργειας, δομικά στοιχεία των κυττάρων και άλλων μακρομορίων όπως είναι οι γλυκοπρωτεΐνες, οι λιποπολυσακχαρίτες και τα νουκλεϊκά οξέα.

## 1.2 Υδατάνθρακες και Σχηματισμός Ημιακετάλης

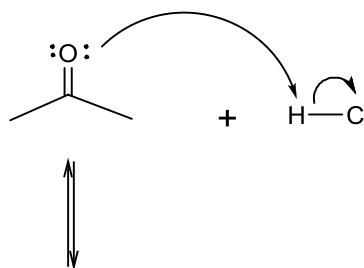
Γενικά, είναι γνωστό ότι οι αλκοόλες πραγματοποιούν μια γρήγορη και αντιστρεπτή πυρηνόφιλη προσθήκη με κετόνες ή αλδεΐδες προς σχηματισμό ημιακεταλών (Mc Murry, 2000, p. 1245).



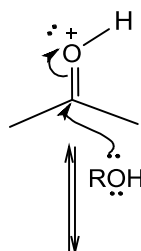
**Εικόνα 1:** Πυρηνόφιλη Προσθήκη

Ο μηχανισμός της αντίδρασης περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα (**Εικόνα 2**) (Mc Murry, 2000, p. 905).

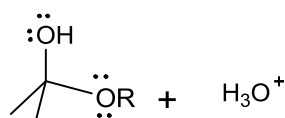
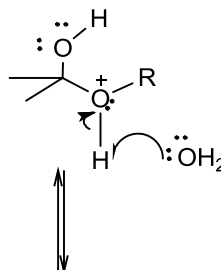
Η πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου πολώνει έντονα το καρβονύλιο και...



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



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



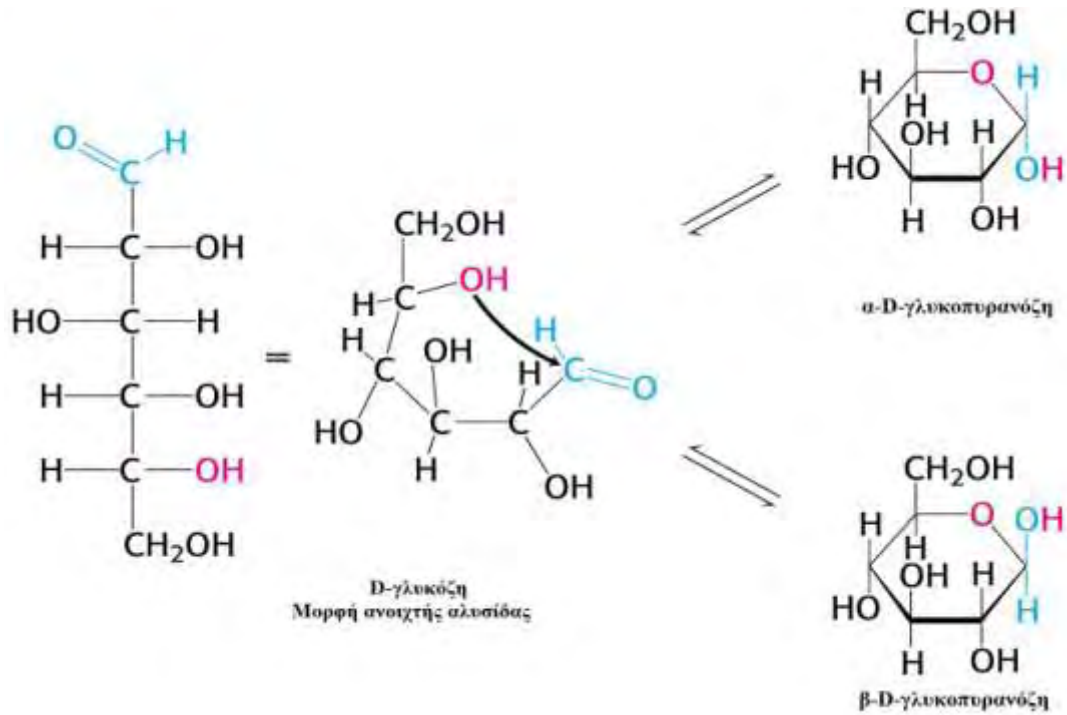
**Εικόνα 2:** Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης

Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν σε δυο μορφές:

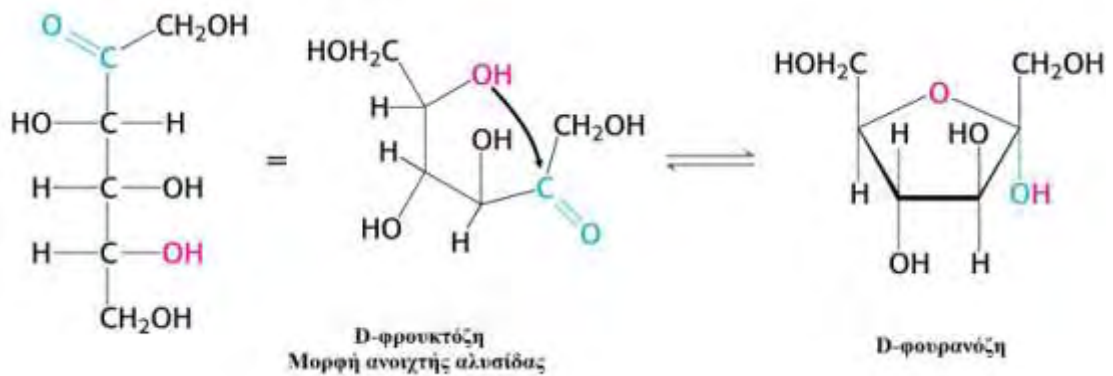
- i. την μορφή ανοιχτής αλυσίδας και
- ii. την κυκλοποιημένη μορφή

Όταν η υδροξυλομάδα και το καρβονύλιο βρίσκονται στο ίδιο μόριο μπορεί να πραγματοποιηθεί η πυρηνόφιλη προσθήκη προς σχηματισμό κυκλικής ημιακετάλης. Αυτή η ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη καταλήγει στη δημιουργία φουρανοζών (πενταμελείς δακτύλιοι) ή πυρανοζών (εξαμελείς δακτύλιοι). Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοιχτής και κλειστής αλυσίδας. Αναλυτικότερα, στην περίπτωση της πυρανόζης η αλδεϋδική ομάδα του άνθρακα C-1 της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο που

βρίσκεται στη θέση C-5, σχηματίζοντας αρχικά μια ενδομοριακή ημιακετάλη και στη συνέχεια το επιθυμητό μόριο (**Εικόνα 3**). Ενώ στην περίπτωση της φουρανόζης, η κετονική ομάδα του άνθρακα C-2 αντιδρά με το υδροξύλιο του άνθρακα C-5 προς σχηματισμό τους πενταμελούς δακτυλίου της φουρανόζης (**Εικόνα 4**).



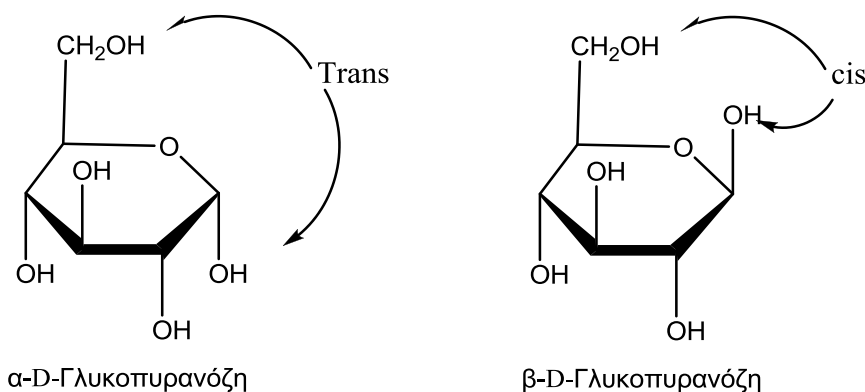
**Εικόνα 3:** Σχηματισμός γλυκοπυρανόζης



**Εικόνα 4:** Σχηματισμός φουρανόζης



Με την κυκλοποίηση των σακχάρων σε ημιακετάλη σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα και παρουσιάζεται το φαινόμενο της ανωμέρειας. Στην περίπτωση της γλυκόζης, ο άνθρακας στη θέση C-1 είναι ανωμερής και σχηματίζονται δυο στερεοχημικές δομές: η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη (**Εικόνα 5**). Οι χαρακτηρισμοί α και β αναφέρονται στη θέση στον χώρο όπου βρίσκεται η υδροξυλομάδα του ανωμερούς άνθρακα σε σχέση με τον υποκαταστάτη του C-5. Όταν ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου ως προς τον υποκαταστάτη του άνθρακα στη θέση C-5 (θέση trans), τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως ανωμερές α. Όταν ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με τον υποκαταστάτη του άνθρακα C-5, τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως ανωμερές β. Στην περίπτωση της φουρανόζης, ο ανωμερής άνθρακας είναι ο C-2.



**Εικόνα 5:** Ανωμερή της D-γλυκόζης

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

Οι δακτύλιοι της πυρανόζης μπορούν να υιοθετήσουν στερεοδιατάξεις ανάκλινδρου, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι τάσεις, αφού όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνίας (Mc Murry, 2000, p. 151). Οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου είναι δύο ειδών: αξονικοί και ισημερινοί (**Εικόνα 6**). Οι αξονικοί δεσμοί έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

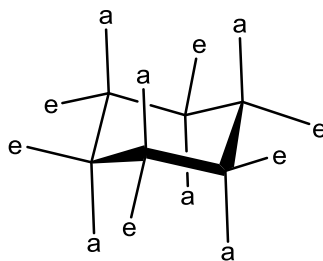
- είναι σχεδόν κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου

- οι υποκαταστάτες προβάλλουν πάνω και κάτω από το μέσο επίπεδο του δακτυλίου
- οι υποκαταστάτες, εκτός του υδρογόνου, παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλον με την προϋπόθεση ότι βρίσκονται στην ίδια πλευρά του δακτυλίου.

Ενώ, οι ισημερινοί δεσμοί έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

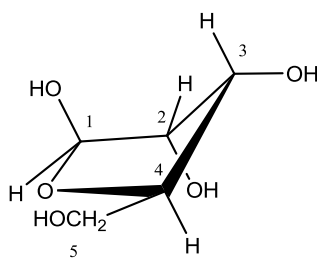
- είναι σχεδόν παράλληλοι προς το επίπεδο του δακτυλίου
- οι υποκαταστάτες διατάσσονται στην περιφέρεια
- οι υποκαταστάτες δεν παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλον, καθώς υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ό τι στην αξονική θέση.



**Εικόνα 6:** Μορφή ανάκλινδρου μιας πυρανόζης (e = ισημερινός υποκαταστάτης, a = αξονικός υποκαταστάτης)

Κατά αναλογία ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να είναι πτυχωμένος, έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού (**Εικόνα 7**). Αυτή η διαμόρφωση καλείται μορφή φακέλου. Οι δακτύλιοι της φουρανόζης είναι σε θέση να αλληλομετατρέπονται ταχύτατα σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις. Είναι πολύ πιο ευέλικτοι από τους δακτυλίους της πυρανόζης, γεγονός που εξηγεί την επιλογή τους ως συστατικών του RNA και DNA (Stryer, 1997).

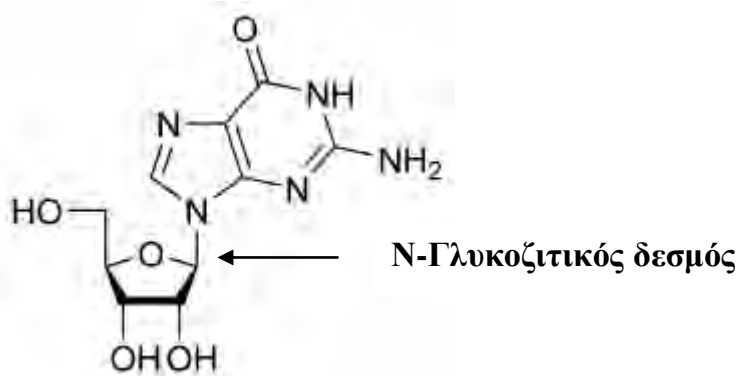


**Εικόνα 7:** Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης

### 1.3 Νουκλεοζίτες και ανάλογα τους

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

Συγκεκριμένα, οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες, οι οποίες προκύπτουν από την ένωση μιας βάσης, είτε είναι πουρίνη (αδενίνη, γουανίνη) είτε είναι πυριμιδίνη (θυμίνη, κυτοσίνη, ουρακίλη), με τον άνθρακα C-1 μιας πεντόζης μέσω β-N-γλυκοζιτικού δεσμού (Berg J. M. et al, 2001). Αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, τότε γίνεται λόγος για ριβονουκλεοζίτη και δεοξυριβονουκλεοζίτη αντίστοιχα. Τα μόρια αυτά έχουν β στερεοδιάταξη, γιατί η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου (**Εικόνα 8**).



**Εικόνα 8:** β- στερεοδιάταξη του N-γλυκοσιζιτικού δεσμού της γουανοσίνης

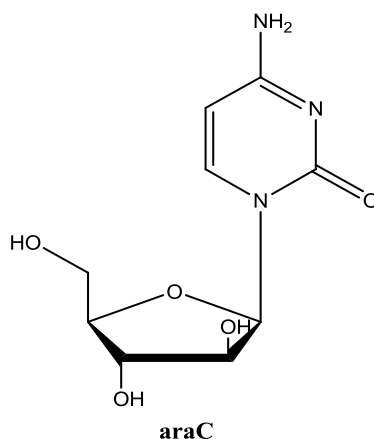
Έχει διαπιστωθεί ότι οι νουκλεοζίτες και τα τροποποιημένα ανάλογά τους επιδεικνύουν σημαντική αντικαρκινική, αντιβακτηριακή και αντική δράση. Επίσης, έχει βρεθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες.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

## 1.4 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια πεντόζη

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

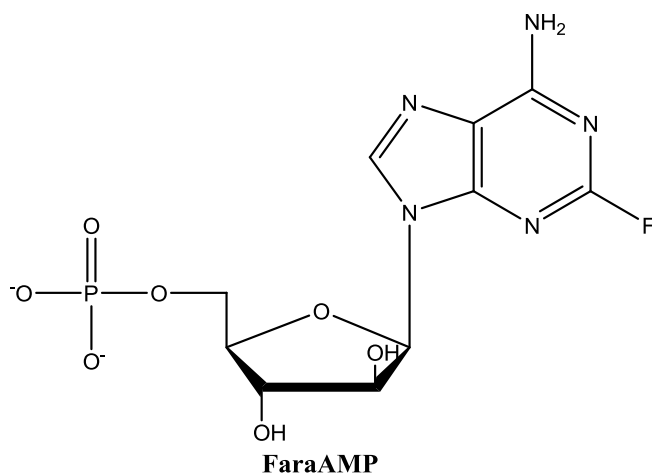
Χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας με σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες αποτελούν οι εξής:

- Το Cytarabine (araC) (**Εικόνα 9**), το οποίο είναι το πρώτο πυραμιδικό νουκλεοζιτικό ανάλογο που χρησιμοποιήθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας



**Εικόνα 9:** Χημική δομή του araC

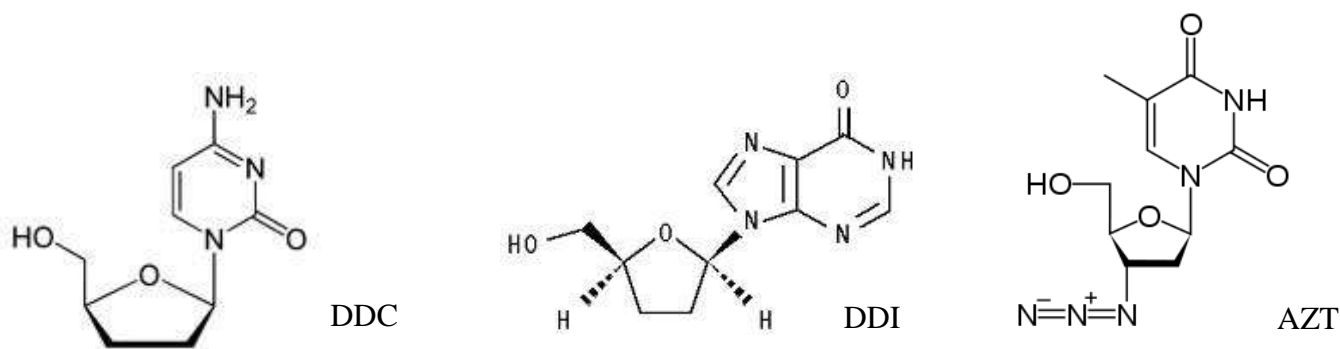
- Η 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλαδεβίνη (araA) είναι ένα από τα πρώτα πουργικά νουκλεοζιτικά ανάλογα, το οποίο απορρίφθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας λόγω της χαμηλής διαλυτότητας και της γρήγορης απαμίνωσης της από την απαμινάση της αδενοσίνης. Η προσθήκη ενός ατόμου φθορίου στο τμήμα της αδεβίνης αύξησε την αντίσταση στην απαμινάση της αδενοσίνης και η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας βελτίωσε τη διαλυτότητα του αναλόγου, συνθέτοντας την 5'-μονοφωσφορική 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-2-φθοροαδεβίνη (fludarabine), (FaraAMP) (Matsuda et al. 2004). Το συγκεκριμένο ανάλογο είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας κατά της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων (**Εικόνα 10**).



**Εικόνα 10:** Χημική δομή του FaraAMP

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

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

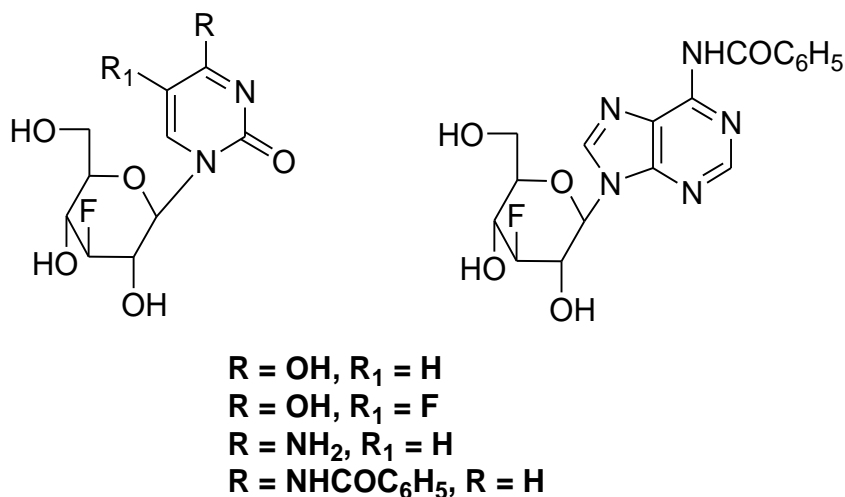


**Εικόνα 11:** Χημική δομή των DDC, AZT, DDI

## 1.5 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη

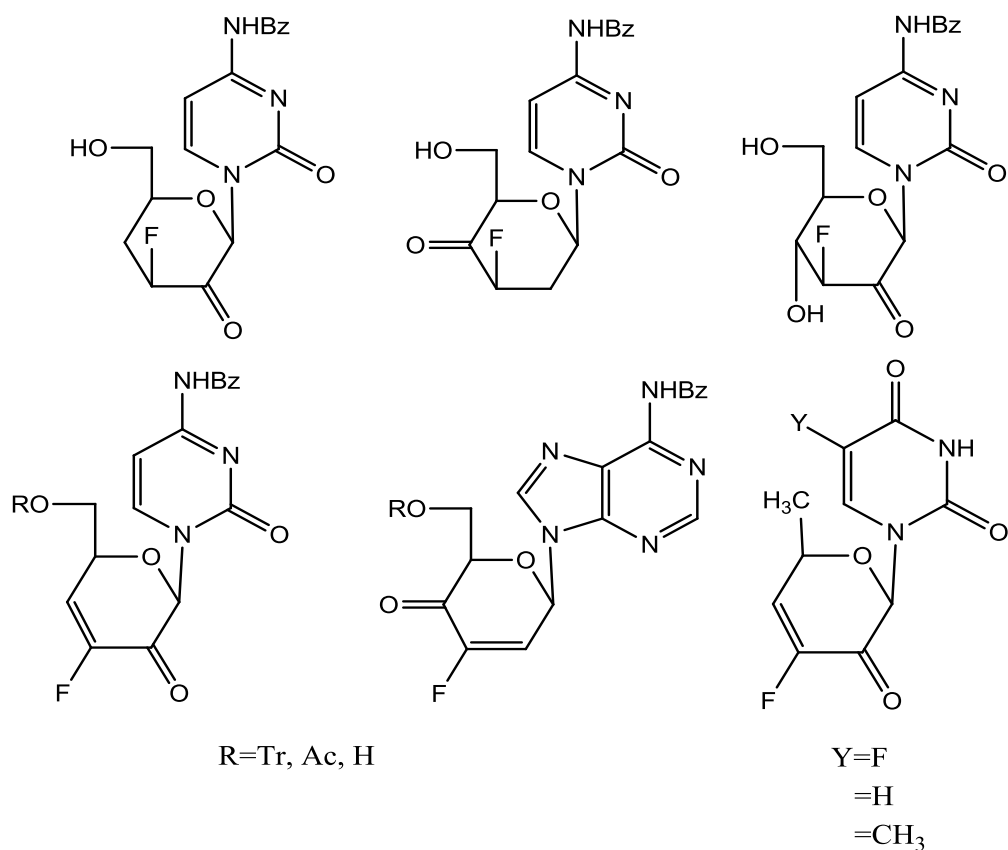
Μια άλλη σημαντική κατηγορία νουκλεοζιτών αποτελούν τα νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο. Οι συγκεκριμένες ενώσεις έχουν εμφανίσει έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον κυρίως λόγω της αντικής, αντικαρκινικής καθώς και αντιδιαβητικής τους δράσης.

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



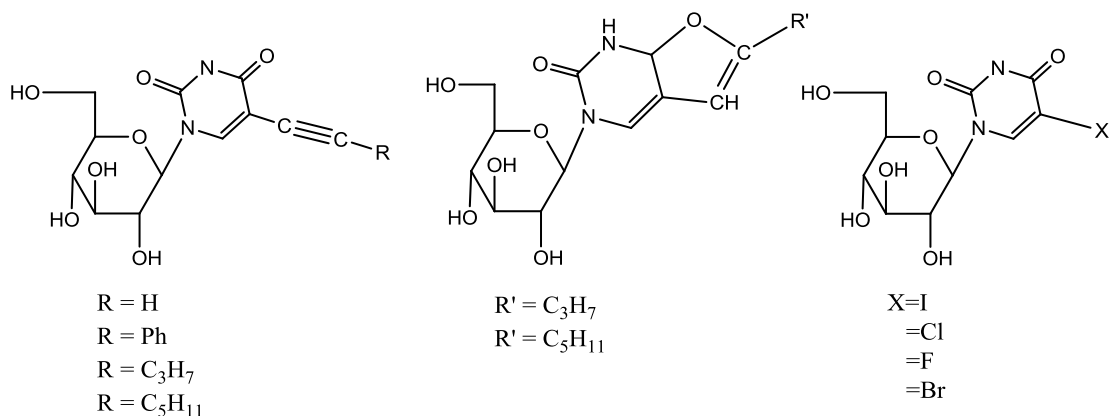
Εικόνα 12: Χημική δομή φθορο πυρανονουκλεοζιτών

Νέες σειρές νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο που επίσης έχουν μελετηθεί αποτελούν οι φθορο κετο και ακόρεστοι φθορο κετο πυρανονουκλεοζίτες. Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης εντεροϊού και αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Manta et al. 2007, Manta et al. 2008, Manta et al. 2009) (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13:** Χημική δομή φθορο κετο και ακόρεστον φθορο κετοπυρανονουκλεοζιτών

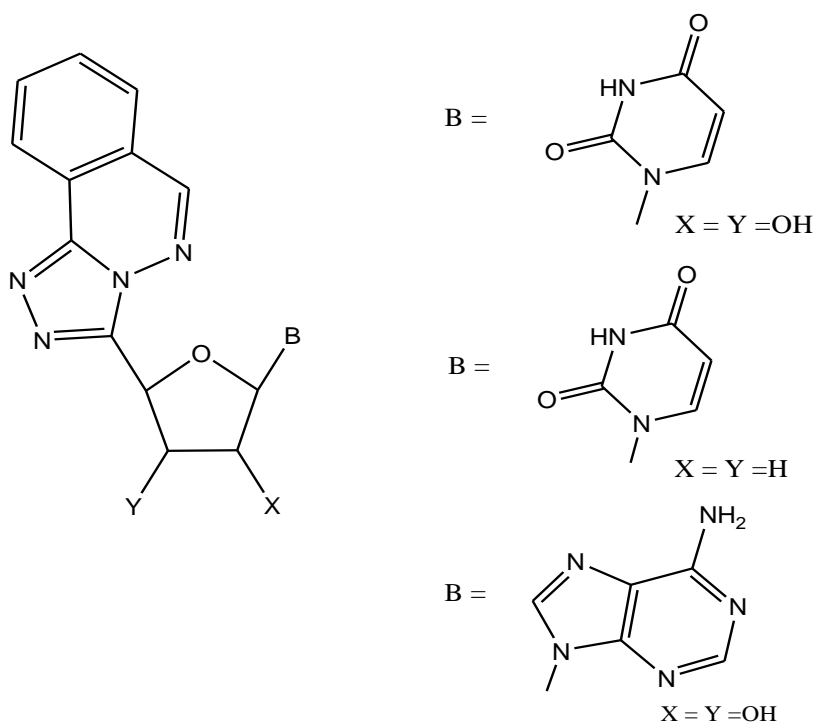
Εκτός των διαφόρων υποκαταστάσεων στο τμήμα του σακχάρου, μελετήθηκε και η τροποποίηση των πυρανονουκλεοζιτών στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης. Διάφοροι 5-αλογονο και 5-αλκυνολο πυριμιδινό πυρανονουκλεοζίτες εμφάνισαν σημαντική δράση ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ένα ένζυμο το οποίο παίζει κύριο ρόλο στη μεταβολική πορεία της γλυκογονόλυσης (Tsirkone et al. 2010). Οι συγκεκριμένες ενώσεις που πρόσφατα συντέθηκαν στο εργαστήριο Βιο-οργανικής του τμήματος μας παρουσιάζονται στην παρακάτω **εικόνα 14**.



**Εικόνα 14:** Χημική δομή υποκατεστημένων στη βάση πυριμιδινό πυρανονουκλεοζιτών

## 1.6 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με δύο νουκλεϊκές βάσεις

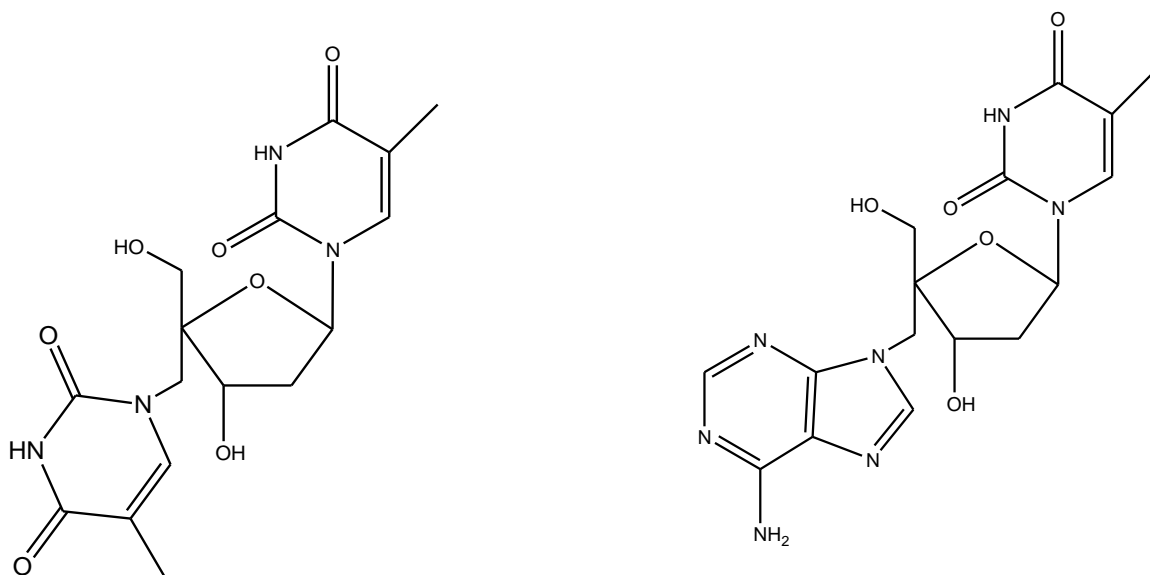
Τα τελευταία χρόνια μια ασυνήθιστη κατηγορία νουκλεοζιτών που έχει μελετηθεί είναι οι νουκλεοζίτες με δύο βάσεις στο τμήμα του σακχάρου, γνωστοί ως δικέφαλοι νουκλεοζίτες. Στο σχήμα φαίνονται κάποιοι χαρακτηριστικοί δικέφαλοι φούρανο νουκλεοζίτες που έχουν αξιολογηθεί για τις αντικές τους ιδιότητες (**Εικόνα 15**).



**Εικόνα 15:** Χημική δομή δικέφαλων φουρανονουκλεοζιτών

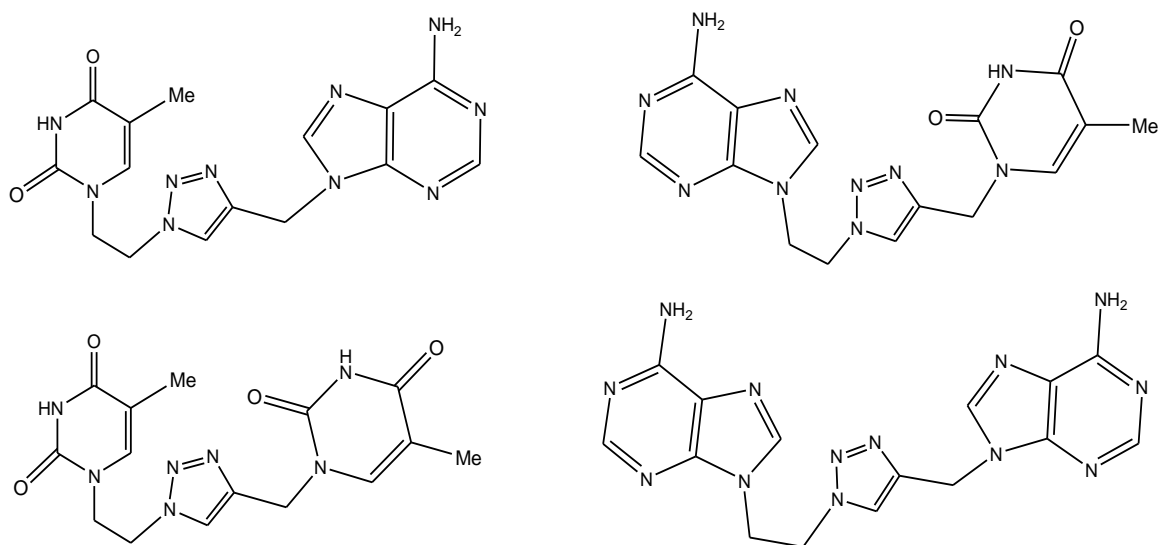
Ενώσεις της κατηγορίας αυτής παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί η συμμετοχή τους σε αλυσίδες ολιγονουκλεοτιδίων μπορεί να αλλάξει την εκλεκτικότητα στην μοριακή αναγνώριση, δίνοντας τη δυνατότητα εφαρμογής τους σε διαγνωστικές μεθόδους και φάρμακα (Nauwelaerts et al. 2006). Παραδείγματα αυτών των ενώσεων παρατίθενται στην **εικόνα 16**.





**Εικόνα 16:** Χημική δομή δικέφαλων νουκλεοζιτών

Τέλος, άκυκλοι νουκλεοζίτες με δυο βάσεις έχουν εμφανίσει ενδιαφέροντα αντιοξειδωτικά αποτελέσματα, όπως οι ενώσεις που φαίνονται στην παρακάτω **εικόνα 17**.



**Εικόνα 17:** Χημική δομή άκυκλων νουκλεοζιτών δυο βάσεων

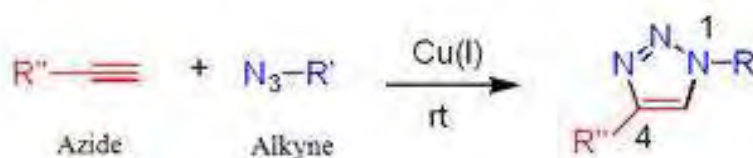
## 2. ΣΚΟΠΟΣ

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. Αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών με σκοπό την εύρεση νέων αντικαρκινικών και αντικών παραγόντων.

Έχει διαπιστωθεί με βάση τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία, ότι οι φουρανο και άκυκλο νουκλεοζίτες με δυο βάσεις αποτελούν μια αξιόλογη κατηγορία ενώσεων, η οποία έχει προσελκύσει σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Επιπλέον, όπως ήδη αναφέραμε, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη εμφανίζουν σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες, γεγονός που καθιστά τη σύνθεση και τη βιολογική τους μελέτη εξαιρετικά ενδιαφέρουσες. Βασιζόμενη στα παραπάνω στοιχεία και λαμβάνοντας υπόψη ότι δεν έχουν μελετηθεί πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα με δυο ετεροκυκλικές βάσεις, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών, οι οποίοι θα φέρουν δυο βάσεις στο τμήμα του σακχάρου.

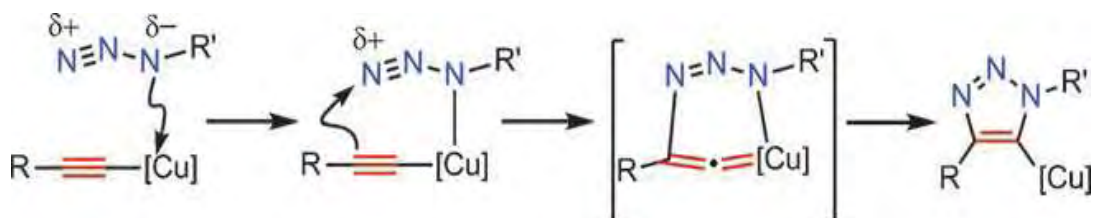
Στην συνθετική μας αυτή προσπάθεια, ελήφθη υπόψη η διαθεσιμότητα των αιθύνυλων πυρανονουκλεοζιτών στο εργαστήριο Βιο-οργανικής χημείας του τμήματός μας, οι οποίοι λόγω της παρουσίας του τριπλού δεσμού παρείχαν μια εξαιρετική ευκαιρία για τη σύνθεση νέων 1,2,3-τριαζολο δικέφαλων νουκλεοζιτών μέσω αντιδράσεων Κυκλοπροσθήκης Αζιδίων-Αλκινίων Καταλυόμενης από Χαλκό (CuAAC). Η CuAAC είναι χαρακτηριστικό παράδειγμα Click χημείας και επιτρέπει τη μετατροπή οργανικών αζιδίων και ακραίων αλκινίων αποκλειστικά στα επιθυμητά 1,4-υποκατεστημένα 1,2,3- τριαζόλια (**Εικόνα 18**).

### Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition



**Εικόνα 18:** Αντίδραση CuAAC

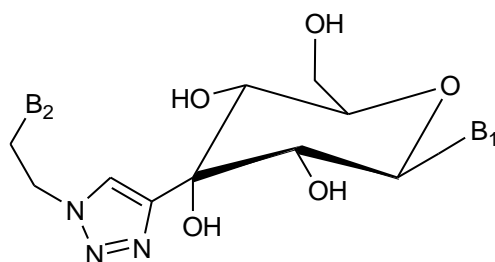
Η κατάλυση με χαλκό αλλάζει δραστικά το μηχανισμό και την πορεία της αντίδρασης και με μια σειρά διαδοχικών σταδίων οδηγεί στο 5-τριαζολο-χαλκό ενδιάμεσο. Ο σχηματιζόμενος δεσμός C-N πραγματοποιείται μεταξύ του πυρηνόφιλου βινυλικού-β-άνθρακα και του ηλεκτρονιόφιλου ακραίου αζώτου του οργανικού αζιδίου (**Εικόνα 19**).



**Εικόνα 19:** Αντιδράσεις σχηματισμού του δεσμού C-N στην CuAAC

Η ταχύτητα της αντίδρασης CuAAC αυξάνεται κατά  $10^7$  φορές σε σχέση με τη θερμική αντίδραση, κάνοντάς την ταχύτερη ακόμα και σε θερμοκρασία δωματίου ή χαμηλότερη από αυτή. Επιπλέον, θα πρέπει να τονιστεί ότι ο 1,2,3-τριαζολικός δακτύλιος που δημιουργείται, παρουσιάζει μεγάλα πλεονεκτήματα όπως σταθερότητα (στην υδρόλυση, σε οξειδοαναγωγικές συνθήκες, υψηλή θερμοκρασία), υψηλή διπολική ροπή, αρωματικό χαρακτήρα και δυνατότητα αποδοχής δεσμών υδρογόνου. Τα δεδομένα αυτά τον καθιστούν ικανό να αλληλεπιδράσει με διάφορα βιολογικά μόρια.

Η δομή των μορίων που στόχευσε η συνθετική μας πορεία φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (**Εικόνα 20**).



**Εικόνα 20:** Χημική δομή 1,2,3-τριαζολο δικέφαλων πυρανονουκλεοζιτών

5a: B1 = 5-φθοροουρακίλη, B2 = 5-φθοροουρακίλη	5e: B1 = , B2 = αδενίνη
5b: B1 = ουρακίλη, B2 = 5-φθοροουρακίλη	5f: B1 = , B2 = αδενίνη

5c: B1 = ουρακίλη, B2 = αδενίνη	5g: B1 = 5-φθοροουρακίλη, B2 = αδενίνη
5d: B1 = θυμίνη, B2 = αδενίνη	5h: B1 = ουρακίλη, B2 = θυμίνη

Τέλος, θεωρήθηκε σκόπιμη η μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας των νεοσυντιθέμενων ενώσεων καθώς και της δράσης τους ως φάρμακα (τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Βέλγιο, στο Rega Institute for Medical Research).

### 3.ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΟΥ/ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΛΛΑΣ

(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 Kieseil 60F<sub>24</sub> ). Τα προϊόντα στα χρωματογραφήματα ανιχνεύονται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (θεικού οξέος) 30%, είτε μέσω UV ακτινοβολίας (254nm). Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής :

- Σύστημα Α : Διχλωρομεθάνιο (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)/Μεθανόλη (MeOH) 9/1
- Σύστημα Β : Διχλωρομεθάνιο (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)/Μεθανόλη (MeOH) 7/3
- Διάλυμα Γ : Διχλωρομεθάνιο (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)/Μεθανόλη (MeOH) 2/8

#### 3.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Η χρωματογραφία στήλης πραγματοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merck grade). Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- Σύστημα Α: Διχλωρομεθάνιο (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)/Μεθανόλη (MeOH) 95/5
- Σύστημα Β : Διχλωρομεθάνιο (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)/Μεθανόλη (MeOH) 90/10

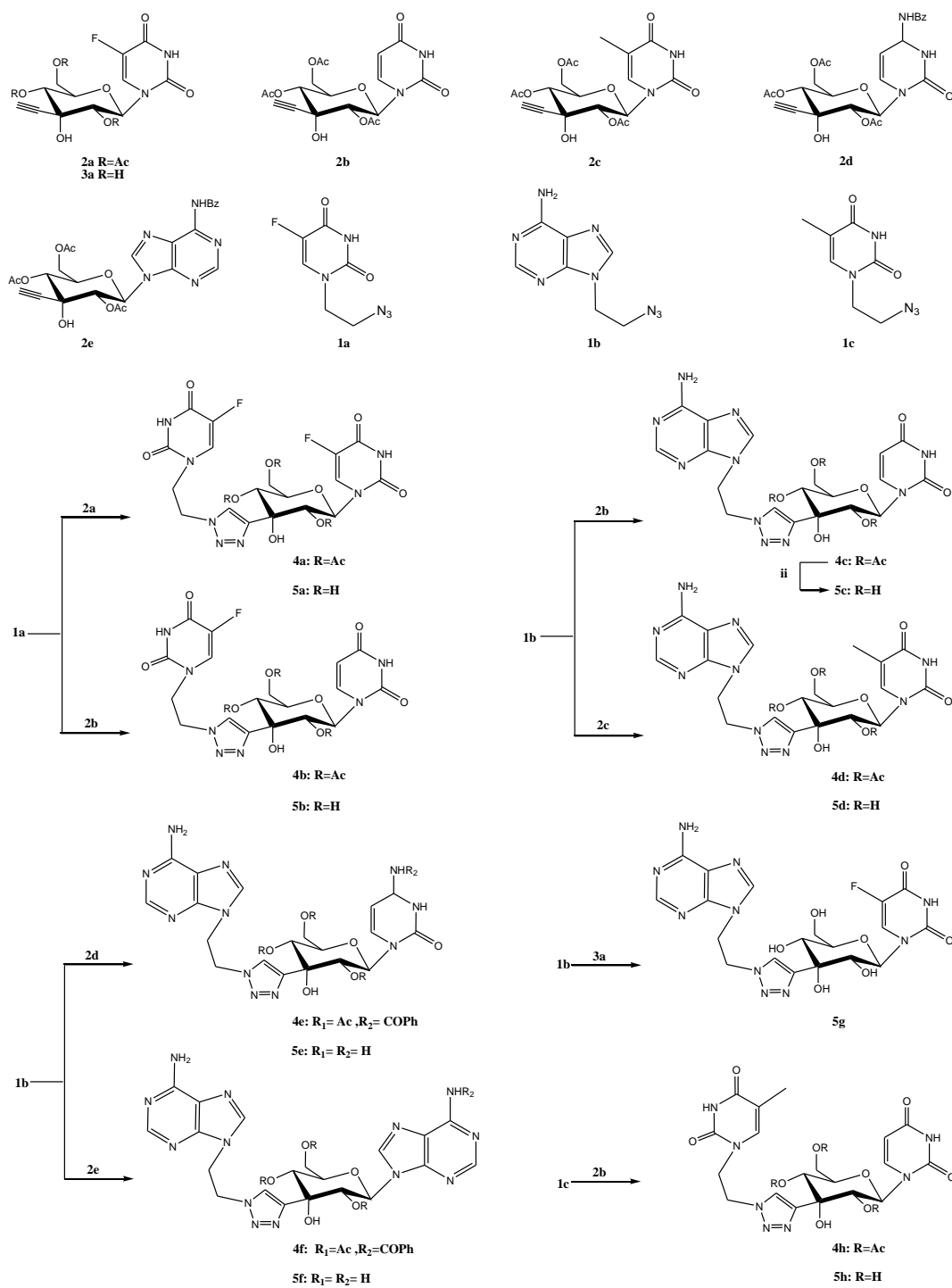
#### 3.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο Bruker AVAMCE<sup>III</sup> 300 και τα φάσματα <sup>13</sup>C-NMR καταγράφηκαν στα 75.5MHz στο ίδιο

φωτόμετρο, χρησιμοποιώντας chloroform-d ( $\text{CDCl}_3$ ), methanol-d<sub>4</sub> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) και dimethyl sulfoxide-d<sub>6</sub> ( $\text{DMSO-d}_6$ ). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για  $^1\text{H}$ .

## 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.1 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ



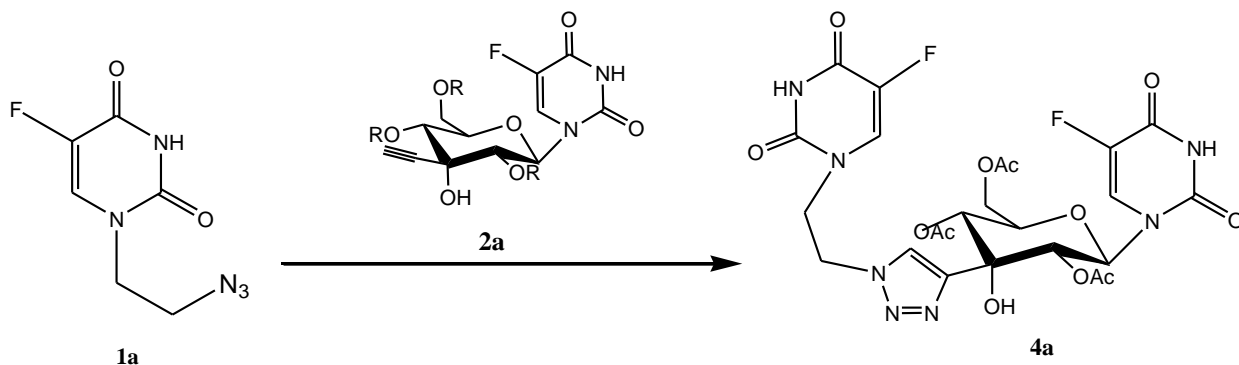
Εικόνα 21: Επισκόπηση συνθετικής πορείας

## 4.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Οι διαθέσιμοι στο εργαστήριο νουκλεοζίτες, **2a-e** και **3a** καθώς και τα αζίδια **1a-c** που παραχωρήθηκαν από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Κ. Κουτούλη, χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των επιθυμητών 1,2,3-τριαζολο δικέφαλων νουκλεοζιτικών αναλόγων **5a-h**. Η αντίδραση CuAAC που πραγματοποιήθηκε ανάμεσα στην αζιδοαιθυλο 5-φθοροουρακίλη **1a** και στους C-αιθύνυλο πυρανονουκλεοζίτες **2a,b** παρουσία καταλυτικών ποσοτήτων  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  και ασκορβικού νατρίου σε διαλύτη THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1), είχε ως τελικό αποτέλεσμα τα επιθυμητά δικέφαλα νουκλεοζιτικά ανάλογα **4a,b** αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα προστατευμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα υφίστανται απακετυλίωση των υδροξυλίων του σακχάρου τους, παρουσία μεθανολικής αμμωνίας, με αποτέλεσμα τη λήψη των ενώσεων **5a,b** σε πολύ καλές αποδόσεις. Με την ίδια πειραματική διαδικασία, η αντίδραση CuAAC ανάμεσα στην αζιδοαιθυλο αδενίνη **1b** και στα C-αιθύνυλο παράγωγα **2b-e** καθώς και η περαιτέρω αποπροστασία των σχηματιζόμενων νουκλεοζιτών **4c-f**, έδωσε τις επιθυμητές ενώσεις **5c-f** αντίστοιχα. Στην περίπτωση του δικέφαλου νουκλεοζίτη **5g**, εφαρμόστηκε μια τροποποιημένη μέθοδος κυκλοπροσθήκης αζιδίων-αλκινίων. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση του μη προστατευμένου νουκλεοζίτη **3a** με το αζίδιο **1b** παρουσία σύρματος χαλκού, σε διαλύτη  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1) έδωσε τον επιθυμητό δικέφαλο νουκλεοζίτη **5g**. Τέλος, το τριαζολο ανάλογο **5h** συντέθηκε με τη συνήθη αντίδραση κυκλοπροσθήκης (CuAAC) μεταξύ της αζιδοαιθυλο θυμίνης **1c** και του προστατευμένου C-αιθύνυλο παραγώγου της ουρακίλης **2b**, ακολουθούμενη από την αντίδραση απακετυλίωσης. Πρέπει να αναφερθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις σχηματισμού των δικέφαλων νουκλεοζιτών, η μετατροπή τους στα τελικά προϊόντα ήταν ποσοτική, χωρίς παραπροϊόντα, ενώ οι αντιδράσεις CuAAC οδήγησαν στο σχηματισμό ενός μόνο regio ισομερούς, του 1,4-δωποκατεστημένου 1,2,3-τριαζολίου.



#### 4.2.1 Σύνθεση της 1-[2'-4'-6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-{(5-φθοροουρακίλ-1-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]5-φθοροουρακίλης (4a)

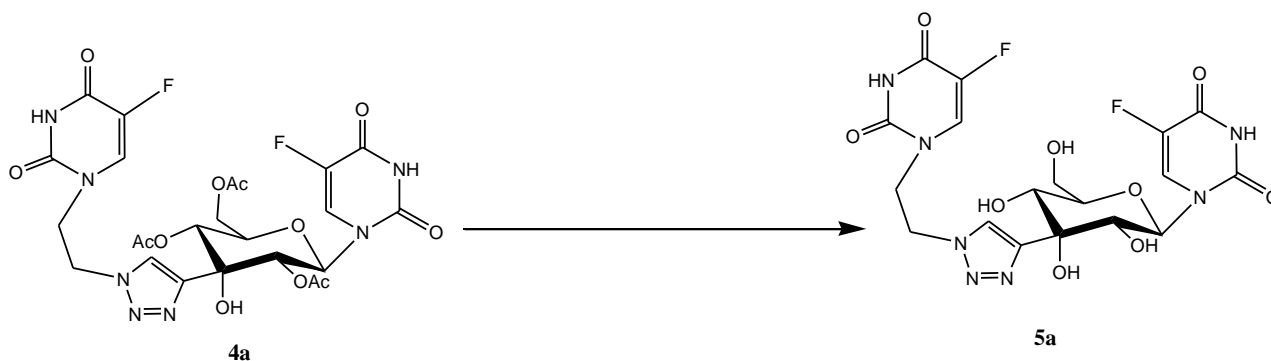


Σ'ένα μίγμα του αλκινίου **2a** (100mg, 0.23mmol) και του αζιδίου **1a** (46mg, 0.23mmol) σε THF (2.3mL) προστέθηκε διάλυμα ασκορβικού νατρίου (8mg, 0.046mmol) και  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (6mg, 0.023mmol) σε  $\text{H}_2\text{O}$  (2.3mL). Το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για δυο ώρες και στη συνέχεια ψύχθηκε. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) προστέθηκε μεθανόλη. Ακολούθησε απομάκρυνση των διαλυτών υπό κενό. Το υπόλειμμα της συμπύκνωσης, καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας το σύστημα A. Το τελικό προϊόν **4a** ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 84%.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **4a**:

TLC (Σύστημα A)	Rf = 0.50
Απόδοση	84%
$\alpha_D$	+4 c = 0.4
$\lambda_{\text{max}}$	264nm

#### 4.2.2 Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-[(5-φθοροουρακίλ-1-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο]5-φθοροουρακίλης (5a)

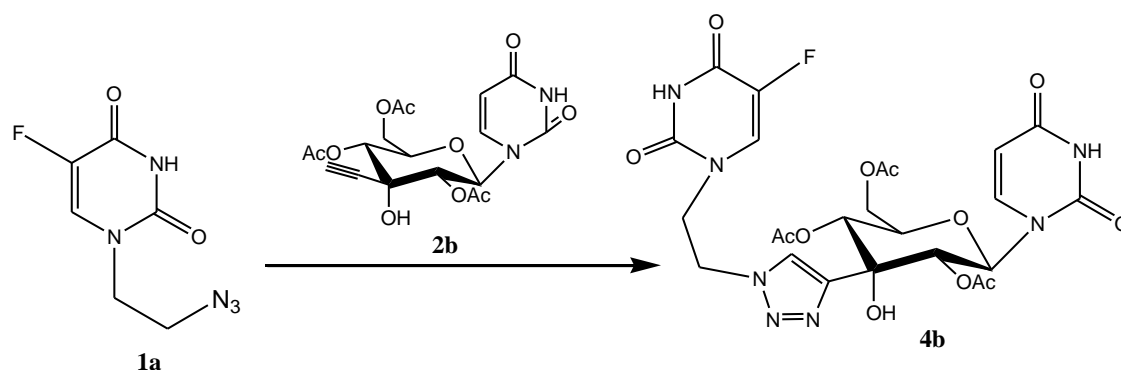


Έγινε κορεσμός διαλύματος MeOH 8mL με αέρια αμμωνία σε πάγο (0 °C) και στη συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα της ένωσης **4a** (124mg, 0.193mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε ολόκληρη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώθηκε υπό μειωμένη πίεση. Ακολούθησε έλεγχος της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) χρησιμοποιώντας ως διαλύτες το σύστημα B. Έπειτα έγινε ανακρυστάλλωση του υπολείμματος με MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, με αποτέλεσμα τη λήψη του καθαρού προϊόντος **5a** σε ποσοστό 83% με τη μορφή λευκού στερεού.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **5a**:

TLC (Σύστημα B)	R <sub>f</sub> = 0,28
Απόδοση	83%
α <sub>D</sub>	+9 c = 0.3
λ <sub>max</sub>	269nm

#### 4.2.3 Σύνθεση της 1-[2'-4'-6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-{(5-φθοροουρακίλ-1-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (**4b**)

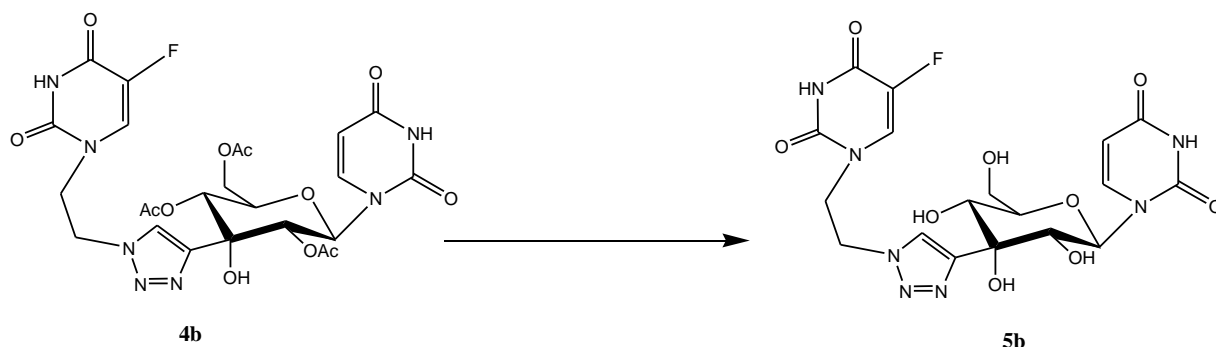


Το προστατευμένο ανάλογο **4b** συντέθηκε από το άζιδο **1a** και το αλκίνιο **2b** με την ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του αναλόγου **4a**. Ακολούθησε καθαρισμός του αναλόγου **4b** σε χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα A. Το επιθυμητό προϊόν **4b** λήφθηκε με τη μορφή λευκού στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε στο 79%.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **4b**:

TLC (Σύστημα A)	R <sub>f</sub> = 0.45
Απόδοση	79%
α <sub>D</sub>	+5 c = 1.1
λ <sub>max</sub>	264nm

#### 4.2.4 Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-[(5-φθοροουρακίλ-1-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (**5b**)

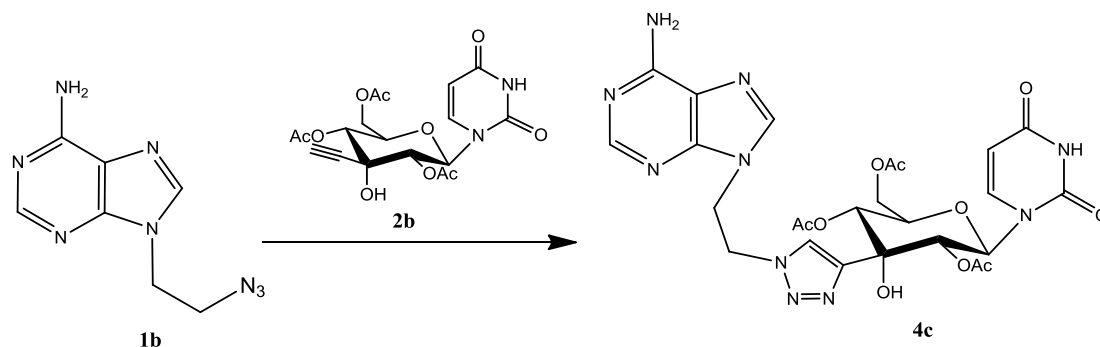


Το αποπροστατευμένο ανάλογο **5b** συντέθηκε από το **4b** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το **5a**. Στη συνέχεια το υπόλειμμα ανακρυσταλλώθηκε χρησιμοποιώντας ως διαλύτες MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ώστε να απομονώσουμε το καθαρό προϊόν **5b** υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 85%.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **5b**:

TLC (Σύστημα Β)	R <sub>f</sub> = 0.25
Απόδοση	85%
α <sub>D</sub>	+2 c = 0.5
λ <sub>max</sub>	258nm

#### 4.2.5 Σύνθεση της 1-[2'-4'-6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (**4c**)

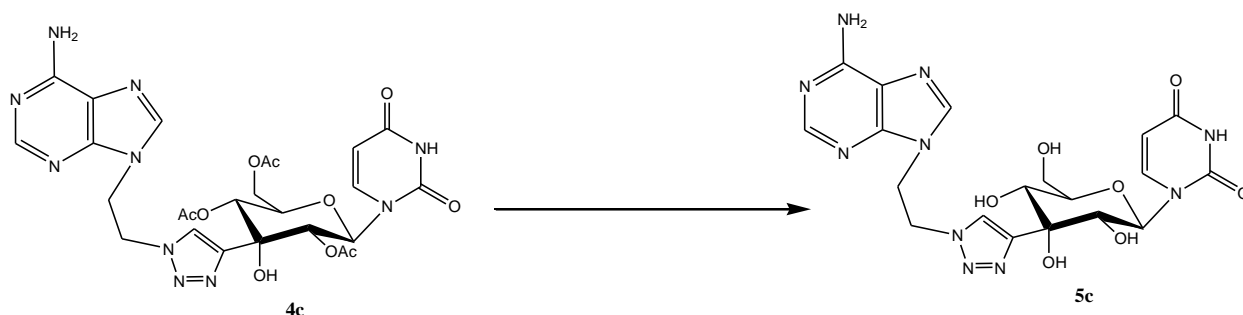


Το προστατευμένο ανάλογο **4c** συντέθηκε από το άζιδο **1b** και το αλκίνιο **2b** με την ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του αναλόγου **4a**. Ακολούθησε καθαρισμός του αναλόγου **4c** σε χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Β. Το επιθυμητό προϊόν **4c** λήφθηκε με τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 74%.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **4c**:

TLC (Σύστημα Α)	R <sub>f</sub> = 0.30
Απόδοση	74%
α <sub>D</sub>	+10 c = 0.5
λ <sub>max</sub>	260nm

#### 4.2.6 Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (5c)

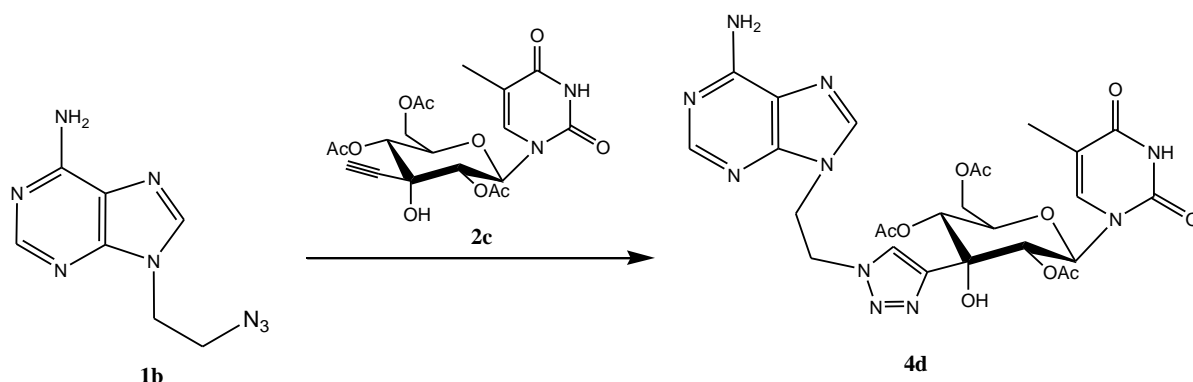


Το αποπροστατευμένο ανάλογο **5c** συντέθηκε από το **4c** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το **5a**. Ακολούθησε ανακρυστάλλωση του υπολείμματος χρησιμοποιώντας ως διαλύτες MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ώστε να απομονώσουμε το καθαρό προϊόν **5c** υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 77%.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **5c**:

TLC (Σύστημα Γ)	R <sub>f</sub> = 0.33
Απόδοση	77%
α <sub>D</sub>	+4 c = 0.3
λ <sub>max</sub>	263nm

#### 4.2.7 Σύνθεση της 1-[2'-4'-6'-Τρι-O-ακετυλο-3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο]-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]θυμίνης (4d)

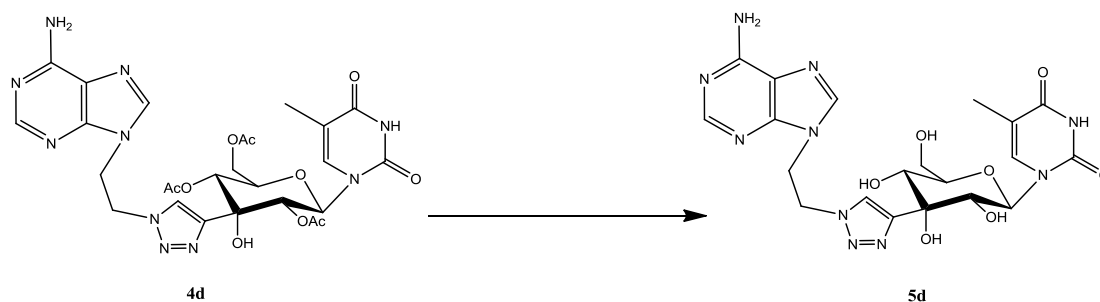


Το ανάλογο **4d** συντέθηκε από το άζιδο **1b** και το αλκίνιο **2c** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του αναλόγου **4a**. Στη συνέχεια, το προϊόν **4d** καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Α.. Η μορφή του επιθυμητού προϊόντος ήταν λευκό αφρώδες στερεό και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 69%.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **4d**:

TLC (Σύστημα Α)	R <sub>f</sub> = 0.38
Απόδοση	69%
α <sub>D</sub>	+4 c = 0.5
λ <sub>max</sub>	262nm

#### 4.2.8 Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]θυμίνης (5d)



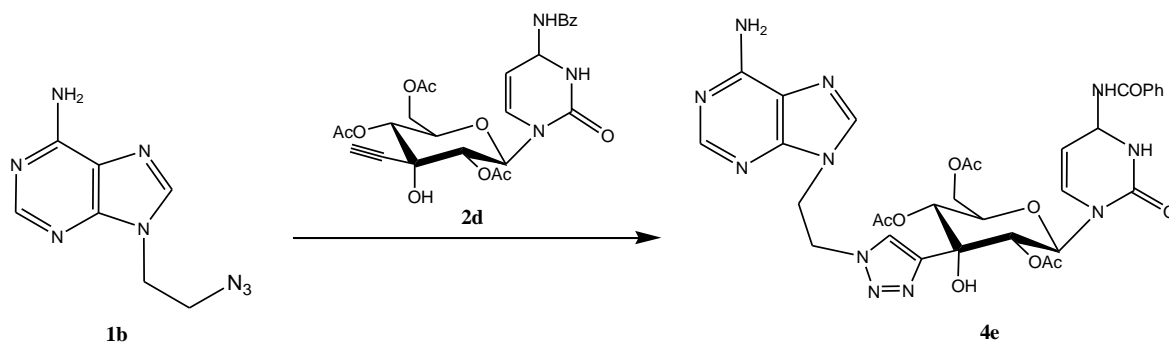
Το αποπροστατευμένο ανάλογο **5d** συντέθηκε από το **4d** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το **5a**. Ακολούθησε ανακρυστάλλωση του υπολείμματος χρησιμοποιώντας ως διαλύτες MeOH/H<sub>2</sub>O ώστε να απομονώσουμε το καθαρό προϊόν **5d** υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 87%.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **5c**:

TLC (Σύστημα Γ)	R <sub>f</sub> = 0.38
Απόδοση	87%
α <sub>D</sub>	+3 c = 0.2
λ <sub>max</sub>	270nm



**4.2.9 Σύνθεση της 1-[2'-4'-6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]N<sup>4</sup>-βενζοϋλοκυτοσίνης (4e)**

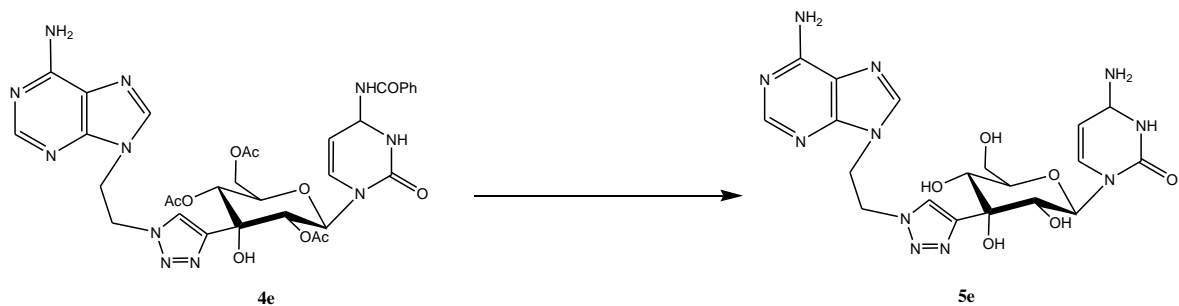


Το ανάλογο **4e** συντέθηκε από το άζιδο **1b** και το αλκίνιο **2d** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του αναλόγου **4a**. Στη συνέχεια, το προϊόν **4e** καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα B. Η μορφή του επιθυμητού προϊόντος ήταν λευκό αφρώδες στερεό και η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 72%.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **4e**:

TLC (Σύστημα A)	R <sub>f</sub> = 0.45
Απόδοση	72%
α <sub>D</sub>	+12 c = 0.5
λ <sub>max</sub>	262nm

#### 4.2.10 Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β- D-αλλοπυρανοζυλο]κυτοσίνης (5e)

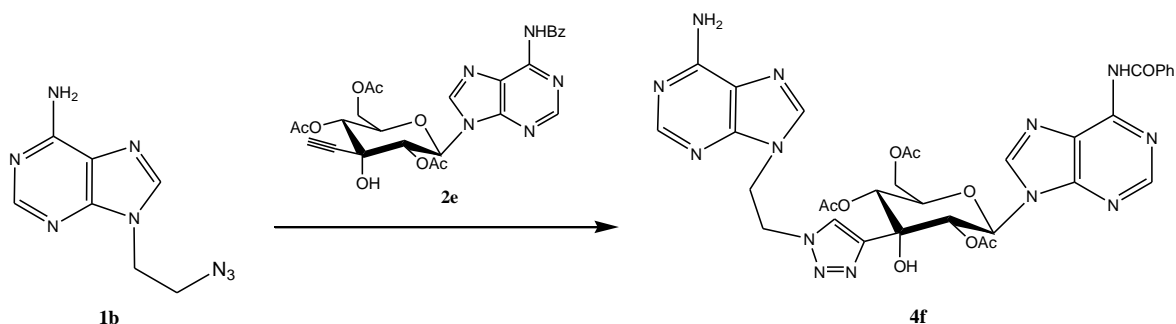


Το αποπροστατευμένο ανάλογο **5e** συντέθηκε από το **4e** με την ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το **5a**. Ακολούθησε ανακρυστάλλωση του υπολείμματος χρησιμοποιώντας ως διαλύτες MeOH/H<sub>2</sub>O, ώστε να απομονώσουμε το καθαρό προϊόν **5e** υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 70%.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **5e**:

TLC (Σύστημα Γ)	R <sub>f</sub> = 0.20
Απόδοση	70%
α <sub>D</sub>	+3 c = 0.5
λ <sub>max</sub>	263nm

**4.2.11 Σύνθεση της 9-[2'-4'-6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο] β-D-αλλοπυρανοζυλο]N<sup>6</sup>-βενζοϋλοαδενίνης (4f)**

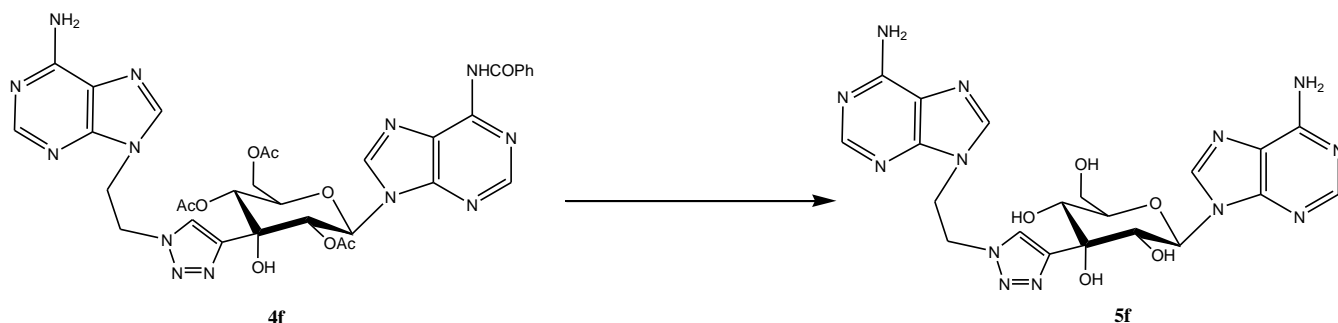


Το προστατευμένο ανάλογο **4f** συντέθηκε από το άζιδο **1b** και το αλκίνιο **2e** με την ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του αναλόγου **4a**. Ακολούθησε καθαρισμός του αναλόγου **4f** σε χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Β. Το επιθυμητό προϊόν **4f** λήφθηκε με τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 79%.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **4f**:

TLC (Σύστημα Α)	R <sub>f</sub> = 0.43
Απόδοση	79%
α <sub>D</sub>	-6 c = 0.5
λ <sub>max</sub>	276nm

#### 4.2.12 Σύνθεση της 9-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β- D-αλλοπυρανοζυλο]αδενίνης (5f)

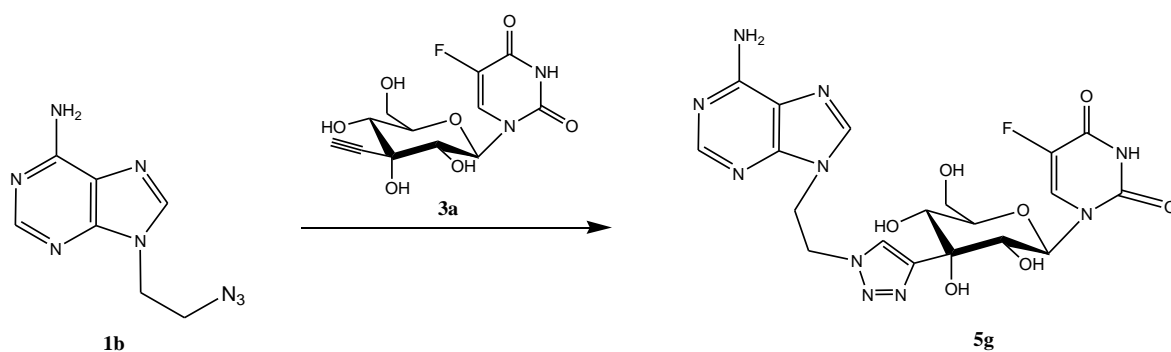


Το αποπροστατευμένο ανάλογο **5f** συντέθηκε από το **4f** με την ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το **5a**. Ακολούθησε ανακρυστάλλωση του υπολείμματος χρησιμοποιώντας ως διαλύτες MeOH/H<sub>2</sub>O, ώστε να απομονώσουμε το καθαρό προϊόν **5f** υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 84%.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **5f**:

TLC (Σύστημα Γ)	R <sub>f</sub> = 0.17
Απόδοση	84%
α <sub>D</sub>	-3 c = 0.4
λ <sub>max</sub>	263nm

#### 4.2.13 Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]5-φθοροουρακίλης (**5g**)

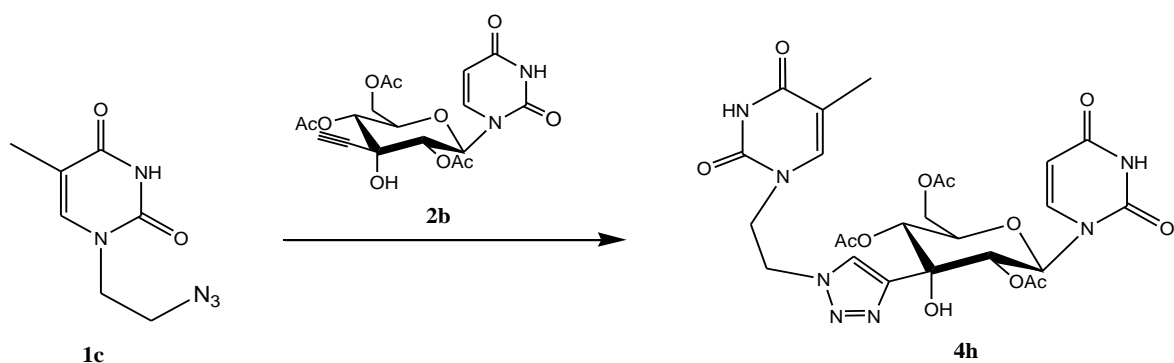


Μίγμα του αζιδίου **1b** (51mg, 0.25mmol) και του μη προστατευμένου αλκινίου **3a** (80mg, 0.25mmol) αναδεύτηκε σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (9:1) παρουσία σύρματος χαλκού. Το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε σε μέτρια θερμοκρασία για 18 ώρες και στη συνέχεια ψύχθηκε. Μετά την προσθήκη MeOH και τη συμπύκνωση της αντίδρασης, το υπόλειμμα ανακρυσταλλώθηκε με MeOH/H<sub>2</sub>O ώστε να ληφθεί το καθαρό προϊόν **5g** με τη μορφή λευκού στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 77%.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **5g**:

TLC (Σύστημα Γ)	R <sub>f</sub> = 0.40
Απόδοση	77%
α <sub>D</sub>	+4 c = 0.2
λ <sub>max</sub>	266nm

**4.2.14 Σύνθεση της 1-[2'-4'-6'-Τρι-Ο-ακετυλο-3'-C-[1-{(θυμίν-1-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (4h)**

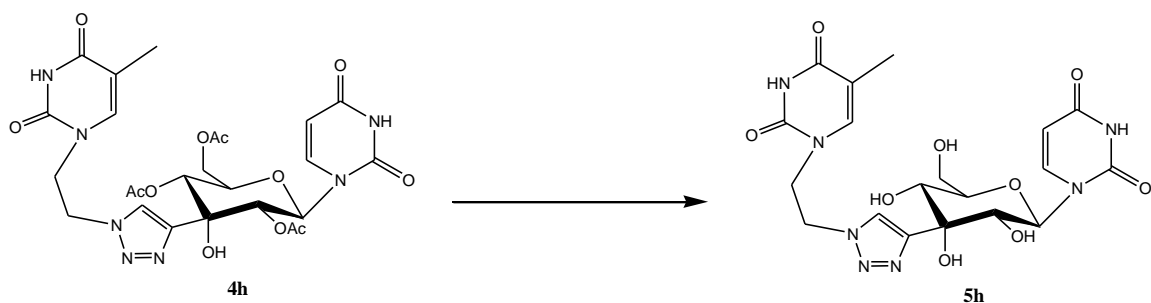


Το προστατευμένο ανάλογο **4h** συντέθηκε από το άζιδο **1c** και το αλκίνιο **2b** με την ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του αναλόγου **4a**. Ακολούθησε καθαρισμός του αναλόγου **4h** σε χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Α. Το επιθυμητό προϊόν **4h** λήφθηκε με τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 67%.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **4h**:

TLC (Σύστημα Α)	R <sub>f</sub> = 0.48
Απόδοση	67%
α <sub>D</sub>	+2 c = 0.5
λ <sub>max</sub>	261nm

#### 4.2.15 Σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(θυμίν-1-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζύλο]ουρακίλης (**5h**)



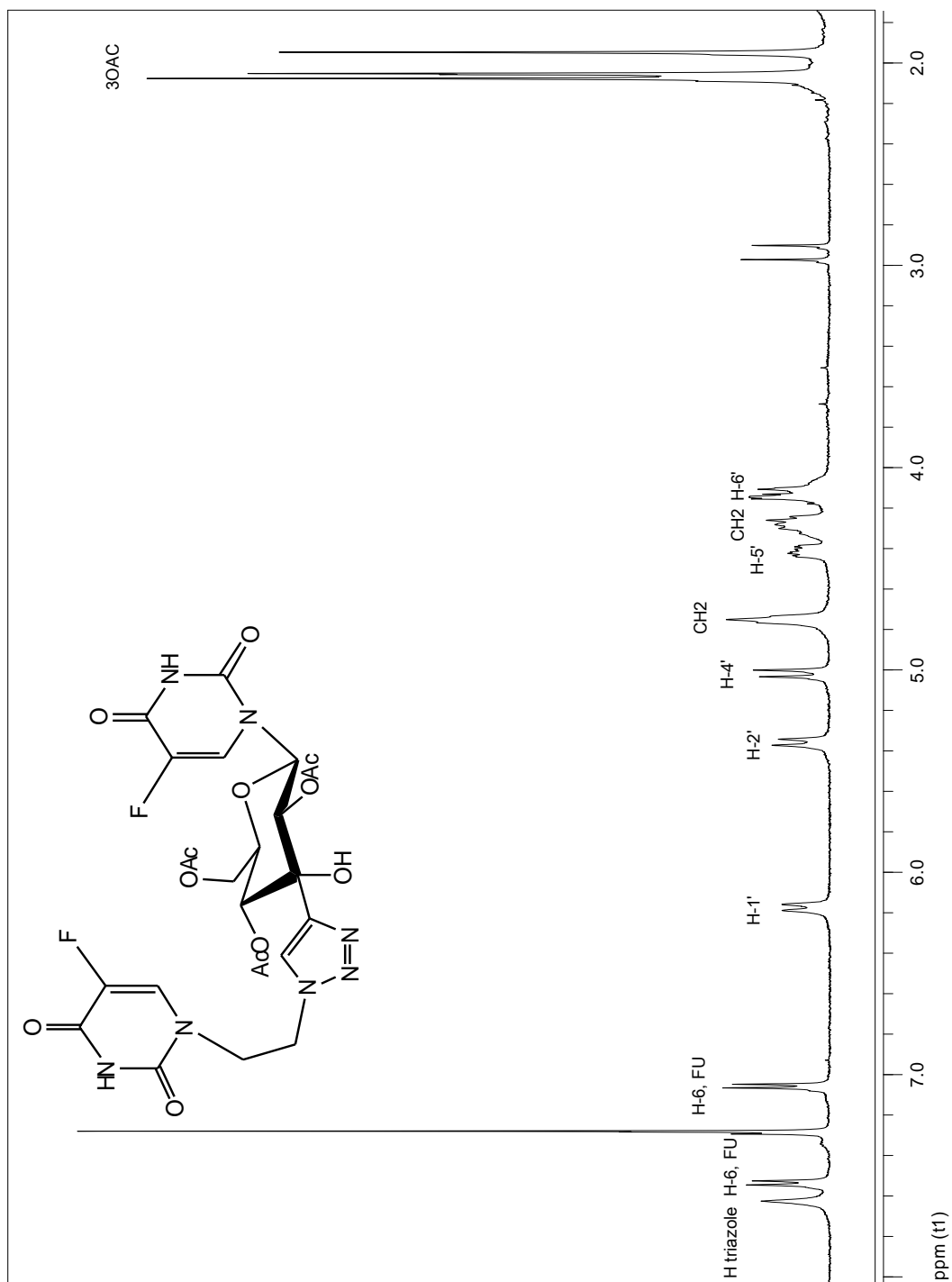
Το αποπροστατευμένο ανάλογο **5h** συντέθηκε από το **4h** με την ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το **5a**. Ακολούθησε ανακρυστάλλωση του υπολείμματος χρησιμοποιώντας ως διαλύτες MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ώστε να απομονώσουμε το καθαρό προϊόν **5h** υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε στο 86%.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **5h**:

TLC (Σύστημα Β)	R <sub>f</sub> = 0.26
Απόδοση	86%
α <sub>D</sub>	+2 c = 0.2
λ <sub>max</sub>	258nm

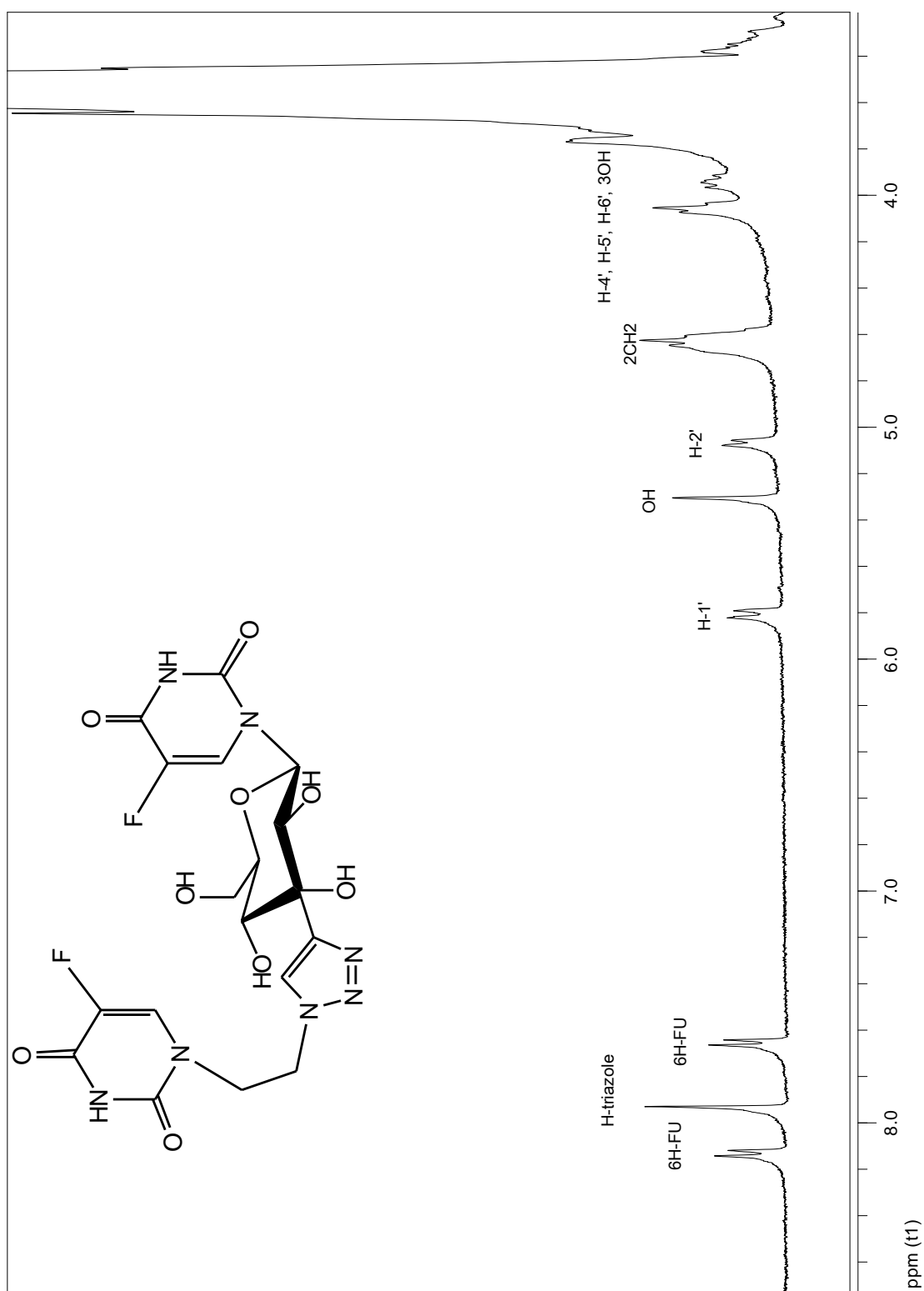
## 5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ $^1\text{H}$ NMR

Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H}$  NMR. Ενδεικτικά αναφέρεται το φάσμα των ενώσεων **4a** και **5a**. Στα παρακάτω διαγράμματα διαφαίνονται τα πρωτόνια τόσο του σακχάρου όσο και των δυο βάσεων που συνδέονται στο τμήμα του σακχάρου.



Εικόνα 21:  $^1\text{H}$  NMR προϊόντος **4a**





Εικόνα 22:  $^1\text{H}$  NMR προϊόντος 5a

## 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία επιτεύχθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες. Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες φέρουν δυο νουκλεϊκές βάσεις στο τμήμα του σακχάρου. Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε ήταν σχετικά απλή, γρήγορη και ιδιαίτερα αποτελεσματική καθώς οι αντιδράσεις της Click Chemistry οδήγησαν στη σύνθεση μορίων με υψηλά ποσοστά απόδοσης και χωρίς την ύπαρξη παραπροϊόντων. Αναλυτικότερα, η σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(5-φθοροουρακίλ-1-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο]5-φθοροουρακίλης (**5a**) είχε απόδοση 83%, η σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(5-φθοροουρακίλ-1-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (**5b**) είχε απόδοση 85% και η σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (**5c**) υπολογίστηκε στο 77%. Επιπλέον, η σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο]θυμίνης (**5d**) είχε απόδοση 87%, η σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]κυτοσίνης (**5e**) είχε απόδοση 70%, η σύνθεση της 9-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο]αδενίνης (**5f**) είχε απόδοση 84%, η σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(αδενίν-9-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]β-D-αλλοπυρανοζυλο]5-φθοροουρακίλης (**5g**) είχε απόδοση 77% και η σύνθεση της 1-[3'-C-[1-{(θυμίν-1-υλο)αιθυλο}-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]-β-D-αλλοπυρανοζυλο]ουρακίλης (**5h**) είχε απόδοση 86%. Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού <sup>1</sup>H NMR.

Τα τελικά προϊόντα εκτιμήθηκαν για την αντική τους δράση έναντι μιας πληθώρας τόσο DNA όσο και RNA ιών. Τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά, αφού βρέθηκαν να μην έχουν δράση σε υψηλές συγκέντρωσεις και επιπλέον κανένα από τα μόρια δεν εμφάνισε αξιόλογη κυτταροτοξική και κυτταροστατική δράση έναντι κυττάρων λευχαιμίας ποντικού (L1210) και ανθρώπινου λεμφώματος (CEM). Ωστόσο, υπήρξαν τρεις ενώσεις, οι **5c**, **5e** και **5g**, οι οποίες εμφάνισαν μια μέτρια κυτταροστατική δράση έναντι των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου (HeLa). Για την εκτίμηση της κυτταροστατικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC<sub>50</sub>, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που

απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%. Τα αποτελέσματα από τα κινητικά πειράματα δίνονται στον παρακάτω πίνακα 1:

**Πίνακας 1**

Compound	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
<b>5a</b>	> 250	> 250	182 ± 95
<b>5b</b>	> 250	> 250	≥ 250
<b>5c</b>	> 200	> 200	89 ± 1
<b>5d</b>	188 ± 22	> 250	≥ 250
<b>5e</b>	> 200	> 200	115 ± 7
<b>5f</b>	> 250	> 250	> 250
<b>5g</b>	129 ± 94	> 250	94 ± 43
<b>5h</b>	> 200	> 200	> 200

Οι ενώσεις, οι οποίες εμφάνισαν μια ενδιαφέρουσα κυτταροστατική δράση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγοί για τη σύνθεση ανάλογων ενώσεων με βελτιωμένες κυτταροστατικές ιδιότητες.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis D. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, p.15, 5448
- Agelis G., Tzioumaki N., Tselios T., Botić T., Cencič A., Komiotis D. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, p.43, 13
- Balatsos, N.A.A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlasi, M.; Komiotis, D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* 2009, 48, 6044-6051.
- Berg, J. M., Tymoczko J. L., Stryer L, *Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 2001 (p) 329-351
- Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* 2010
- Hartman, M. C. T. , Coward J. K., *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 124, 10036
- Hiroyuki Hayakawa, Satoru Kohgo, Kenji Kitano, Noriyuki Ashida, Eiichi Kodama, Hiroaki Mitsuya and Hiroshi Ohru *Antiviral chemistry & chemotherapy* 2004, 15(4):169-87
- Komiotis, D.; Manta S.; Tsoukala E.; Tzioumaki N. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents* 2008, p.7, 219
- Komiotis, D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides Nucleotides* 1991, p.10, 431
- Lui V.W.Y.W., Lau C.P.Y.P., Cheung C.S.F.S., Ho K., Ng M.H.L.H., Cheng S.H.H., Hong B., Tsao S.-W.W., Tsang C.M.M., Lei K.I.K.I., Yamasaki Y., Mita A., Chan A.T. *Biochemical pharmacology* 2010, p.79, 1772–1780
- Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 980
- Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, 43, 420-428
- Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevsek, A.; Pamulapati, R.T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 2696
- Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, p.95, 105
- Mc Murry, *Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 2000, p. 905

- McMurry John, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2000, p.1245-1247
- McMurry John, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2000, p.151- 152
- Nauwelaerts, T. Wu, K.; Van Aerschot, A.; Froeyen, M.; Lescrinier, E.; Herdewijn, P.; J. Org. Chem., 2006, 71, 5423-5431
- Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. Nucleosides Nucleotides 1992, p.11, 903
- Sakellarios Trakossas, Evdoxia Coutouli-Argyropoulou, Dimitra J. Hadjipavlou-Litina, Tetrahedron Letters 52, 2011, 1673–1676
- Stryer Lubert, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997, p.347-354
- Tongfei Wu, Koen Nauwelaerts, Arthur Van Aerschot, Matheus Froeyen, Eveline Lescrinier and Piet Herdewijn, J. Org. Chem, 71, 2006, 5423-5431
- 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. Bioorganic & medicinal chemistry 2010, 18, 3413–3425
- Tsoukala E., Agelis G., Dolinsek J., Botic T., Cencic A., Komiotis D. Bioorganic & medicinal chemistry 2007, p.15, 3241–3247
- Tzioumaki N., Tsoukala E., Manta S., Agelis G., Balzarini J., Komiotis D. Archiv der Pharmazie 2009, p.342, 353
- Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. J. Med. Chem. 2004, 47, 3399