



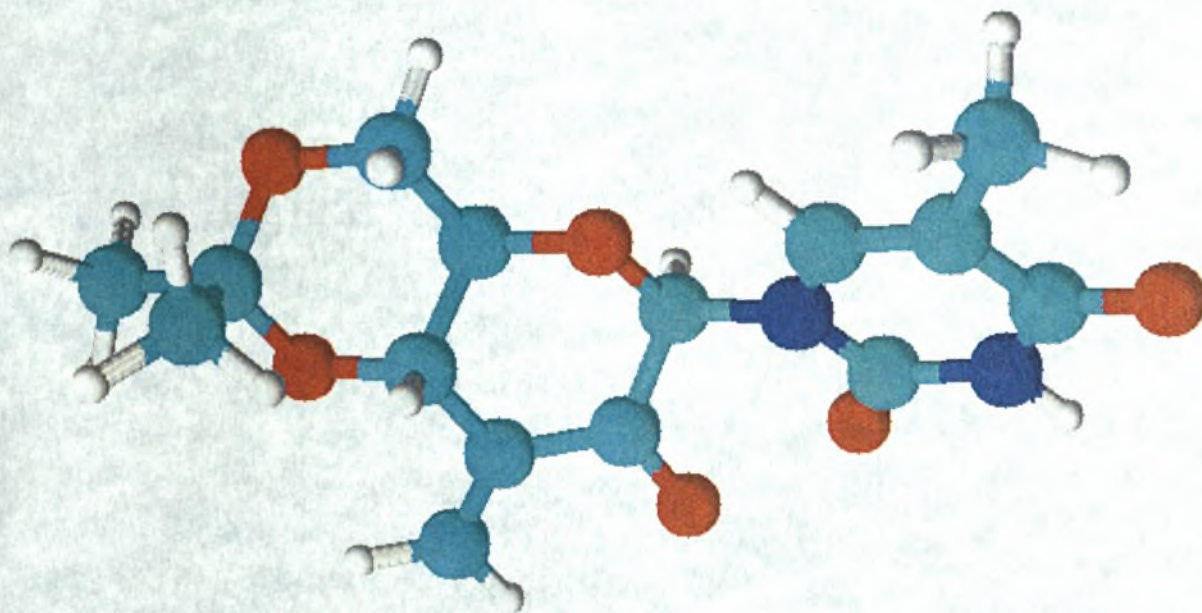
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΦΟΥΝΤΑΡΛΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Διπλωματική Εργασία

**Σύνθεση και πιθανή αντιοξειδωτική δράση νέων κετο-
εξωμεθυλενικών νουκλεοζιτών με βάση τη θυμίνη**



Λάρισα 2010

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Αριθ. Πρωτ.6.....
Ημερομηνία ..10-2-10.....

Διπλωματική Εργασία

Σύνθεση και πιθανή αντιοξειδωτική δράση νέων κετο-
εξωμεθυλενικών νουκλεοζιτών με βάση τη θυμίνη



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8111/1
Ημερ. Εισ.: 08-03-2010
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
572.854 5
ΦΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087138

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Μακρίδης Ζίσης - Καθηγητής Γενετικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Κομιώτη Δημητρίου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Κομιώτη για τη θέση που μου πρόσφερε στο εργαστήριο του και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα με την απόκτηση σημαντικών και πολύτιμων γνώσεων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Δρ. Νίκη Τζιουμάκη για την συνεχή της συμπαράσταση και τον καθοριστικό ρόλο που είχε στην εργαστηριακή μου πορεία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την δημιουργία του ευχάριστου και παραγωγικού κλίματος συνεργασίας εντός του εργαστηριακού χώρου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.Εισαγωγή.....	8
1.1 Υδατάνθρακες.....	8
1.1.1 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών : σχηματισμός ημιακεταλών ...	9
1.2 Νουκλεοζίτες	12
1.2.1 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.....	13
1.2.2 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες.....	14
1.2.3 Νουκλεοζίτες ως αντιοξειδωτικά	15
1.2.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών	16
1.2.5 Πυρανονουκλεοζίτες	20
1.2.6 Νουκλεοζίτες με εξωκυκλικό μεθυλένιο	21
1.2.7 Κετο- Πυρανονουκλεοζίτες	21
1.2.8 Ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες	22
2.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
Στόχος-σκοπός μελέτης.....	24
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	25
3.1 ΥΛΙΚΑ.....	25
3.1.1. Υλικά Σύνθεσης των Νουκλεοζιτικών αναλόγων	25
3.2 ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
3.2.1 Χρωματογραφία χάρτου/λεπτής στιβάδας	26
3.2.2 Χρωματογραφία στήλης.....	26
3.2.3 Ξήρανση διαλυτών	26
3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων.....	27
3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ	28
3.3.1 Σύνθεση προϊόντων	28
3.3.2 Μεθοδολογία σύνθεσης.....	29
3.3.3 Σύνθεση προϊόντων με βάση τη θυμίνη	30
4. Ταυτοποίηση με ¹ H NMR.....	39
5. Συζήτηση.....	40
6. Βιβλιογραφία.....	43

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντικαρκινική, αντιβακτηριδιακή και αντιική δράση περιέχουν νουκλεοζίτες αποτελούμενους από μονοσακχαρίτες με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση. Αυτό το γεγονός ώθησε στην σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών με εξαμελή δακτύλιο, οι οποίοι αναμένεται να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη αντιική και αντικαρκινική θεραπεία.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση νέων κετο εξωμεθυλενικών νουκλεοζιτών, που φέρουν ως ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη. Έτσι αρχικά περιγράφηκε η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση μιας νέας σειράς πυρανονουκλεοζιτικών παραγώγων που φέρουν εξωμεθυλενική ομάδα στη θέση 3' του σακχάρου. Τέλος, ακολούθησε η εισαγωγή της κετονομάδας στη θέση 2' του σακχάρου. Συνεπώς, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση νέων τροποποιημένων γλυκοπυρανονουκλεοζιτών που φέρουνε κετονομάδα στη θέση 2', εξωκυκλικό μεθυλένιο στη θέση 3' του σακχάρου και θυμίνη ως ετεροκυκλική βάση.

ABSTRACT

Nucleosides and nucleoside analogues have shown a particular research interest in recent years, mainly because of their properties. It is recognized that many natural antibiotics with anticancer, antibacterial and antiviral action containing nucleosides consisting of monosaccharides with five or six-member ring connected to a ring-position hetero basis. This fact led to the synthesis of modified nucleosides of six-member ring, which is expected to play an important role in antiviral and anticancer therapy.

This thesis was the synthesis of new series keto- exomethylene nucleosides bearing a ring-position hetero basis of thymine. So initially has been described the procedure followed for the synthesis of a new series of derivatives bearing pyranonucleosides with exomethylene group in position 3' of sugar. Finally, follow the composition of keto group in position 2' of sugar. It was interesting to synthesize a new modified series of glucopyranonucleosides with keto group in position 2', exomethylene in position 3' of the sugar and thymine as hetero basis.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες, αποτελούν μια ομάδα οργανικών ουσιών, που ως προς το χημικό τύπο τους, είναι ενυδατωμένος άνθρακας, με γενικό τύπο $C_n(H_2O)_n$.

Οι βιολογικής σημασίας υδατάνθρακες ονομάζονται και σάκχαρα ή ακόμα και γλυκίδια αρχίζουν από τους μονοσακχαρίτες και φθάνουν μέχρι σύνθετα μόρια, που λέγονται πολυσακχαρίτες. Έτσι μερικοί είναι σχετικά μικροί, με μοριακά βάρη μικρότερα του $100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, ενώ άλλοι είναι πραγματικά μακρομόρια, με μοριακό βάρος πολλές εκατοντάδες ή χιλιάδες $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

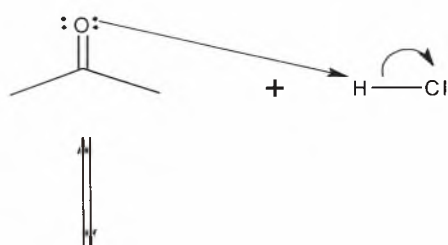
Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες υδατανθράκων βιολογικού ενδιαφέροντος:

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

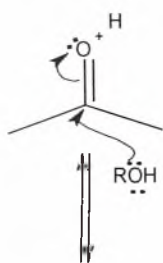
Οι υδατάνθρακες αποτελούν σημαντικές συνιστώσες στη διατροφή όλων των ζωικών οργανισμών τροφοδοτώντας αυτούς με την απαιτούμενη ενέργεια επιβίωσης. Τα φυτά δημιουργούν μόνα τους υδατάνθρακες και οξυγόνο από διοξείδιο του άνθρακα και νερό με τη βοήθεια του ηλιακού φωτός κατά τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης.

1.1.1 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακεταλών

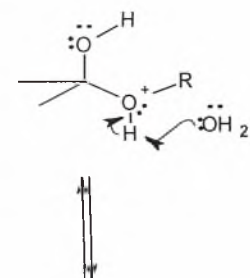
Οι υδατάνθρακες είναι αλδεϋδικές ή κετονικές ενώσεις με πολλαπλές υδροξυλικές ομάδες. Τα σάκχαρα που αποτελούνται από πέντε άτομα άνθρακα ονομάζονται πεντόζες και αυτά που αποτελούνται από έξι άτομα άνθρακα ονομάζονται εξόζες. Γενικά, μια καρβονυλική ένωση αντιδρά με μια αλκοόλη για να σχηματίσει μια ημιακετάλη (Εικόνα 1).



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



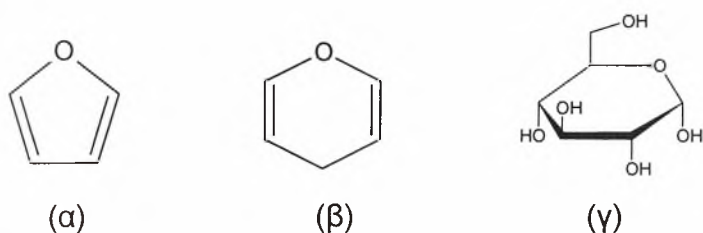
Απόσπαση ενός πρωτονίου οδηγεί σε ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, μια ουδέτερη ημιακετάλη



Εικόνα 1. Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης

Εάν η υδροξυλομάδα βρίσκεται στο ίδιο μόριο μπορεί να λάβει χώρα μια ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη που οδηγεί στο σχηματισμό μιας ημιακετάλης. Στην περίπτωση της γλυκόζης, η C-1 αλδεϋδική ομάδα του τύπου ανοικτής αλυσίδας αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 και σχηματίζει μια ενδομοριακή ημιακετάλη. Απόρροια της παραπάνω αντίδρασης αποτελεί η παραγωγή του εξαμελούς δακτυλίου

του σακχάρου (Εικόνα 2γ), που ονομάζεται πυρανόζη, λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο (Εικόνα 2β). Στην περίπτωση της φρουκτόζης, η κετονική ομάδα στον C-2 του τύπου της ανοικτής αλυσίδας αντιδρά με την υδροξυλική ομάδα του C-5 και σχηματίζει μία ενδομοριακή ημιακετάλη. Ως αποτέλεσμα επέρχεται ο σχηματισμός πενταμελούς δακτυλίου, που ονομάζεται φουρανόζη, λόγω της ομοιότητας του με το φουράνιο (Εικόνα 2α).



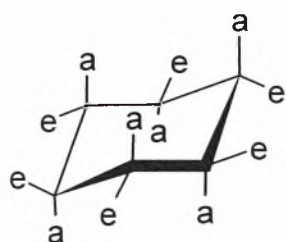
Εικόνα 2. (α) Φουράνιο, (β) Πυράνιο (γ) γλυκόζη

Αξίζει να τονιστεί ότι κατά την κυκλοποίηση της γλυκόζης δημιουργείται ένα πρόσθετο στερεογονικό κέντρο. Συγκεκριμένα, ο άνθρακας C-1, ο καρβονυλικός άνθρακας στην ανοικτή αλυσίδα, μετατρέπεται σε ένα στερεογονικό κέντρο στο δακτύλιο. Υπάρχει το ενδεχόμενο να προκύψουν δύο δομές, η α -D-γλυκοπυρανόζη και η β -D-γλυκοπυρανόζη. Στην περίπτωση της α -D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός « α » υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση trans ως της τον υποκαταστάτη $-\text{CH}_2\text{OH}$ του C-5 (δηλαδή βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). Στην περίπτωση της β -D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός « β » υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση cis ως της τον υποκαταστάτη $-\text{CH}_2\text{OH}$ του C-5 (δηλαδή βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου). Ο άνθρακας C-1 καλείται ανωμερής και έτσι οι μορφές α και β καλούνται ανωμερείς.

Όσον αφορά τον φουρανοζικό δακτύλιο της φρουκτόζης, ο άνθρακας C-2 είναι ανωμερής και η ονοματολογία εφαρμόζεται με τον ίδιο τρόπο δεδομένου ότι οι μορφές α και β αναφέρονται στο υδροξύλιο που είναι ενωμένο στον άνθρακα C-2.

Υπάρχουν δύο ειδών υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου: οι αξονικοί και οι ισημερινοί. Οι αξονικοί δεσμοί είναι διατεταγμένοι κάθετα στο δακτύλιο δηλαδή παράλληλα της τον άξονα του δακτυλίου. Οι ισημερινοί δεσμοί διατάσσονται περίπου στο ίδιο επίπεδο του δακτυλίου δηλαδή γύρω από τον ισημερινό του (Εικόνα 3). Οι αξονικοί υποκαταστάτες, πλην του υδρογόνου, παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο

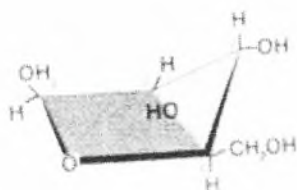
έναν τον άλλο, εάν ξεπροβάλουν από την ίδια πλευρά του δακτυλίου. Αντίθετα, υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για της ισημερινούς υποκαταστάτες, γι' αυτό της υποκαταστάτης είναι σταθερότερη στην ισημερινή απ' ό τι στην αξονική θέση. Η ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στα αξονικά και στα ισημερινά διαμορφομερή οφείλεται στη στερεοχημική τάση που προκαλείται από της λεγόμενες 1,3-διαξονικές αλληλεπιδράσεις. Το ακριβές μέγεθος της 1,3-διαξονικής στερεοχημικής τάσης σε μία συγκεκριμένη ένωση εξαρτάται από τη φύση και το μέγεθος του αξονικού υποκαταστάτη.



Εικόνα 3. Μορφή ανάκλιντρου μιας πυρανόζης

(e= ισημερινός υποκαταστάτης , a= αξονικός υποκαταστάτης)

Ο πενταμελής δακτύλιος της φουρανόζης δεν είναι επίπεδος. Μπορεί να έχει πτυχωμένη μορφή έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού. Η διαμόρφωση αυτή καλείται «μορφή φακέλου» επειδή η δομή αυτή μοιάζει με ανοιχτό φάκελο με το πίσω μέρος ανασηκωμένο (Εικόνα 4). Οι δακτύλιοι της φουρανόζης αλληλομετατρέπονται ταχύτατα σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις και είναι πολύ πιο ευέλικτοι από της δακτυλίου της πυρανόζης. Η παρατήρηση αυτή εξηγεί την επιλογή της ως συστατικών του RNA και DNA.

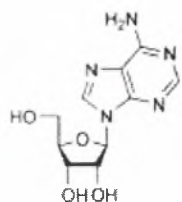


Εικόνα 4. Μορφή φακέλου της β -D-ριβόζης

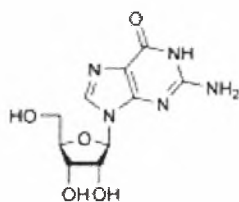
1.2 Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες που προέρχονται από την ένωση μιας νουκλεοβάσης (αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, θυμίνη, ουρακίλη) και της ριβόζης (ριβονουκλεοζίτες) ή της δεοξυριβόζης (δεοξυριβονουκλεοζίτες).

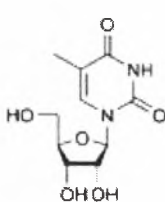
Παραδείγματα ριβονουκλεοζιτών αποτελούν η αδενοσίνη, η γουανοσίνη, η κυτιδίνη, η θυμιδίνη, η ουριδίνη και η ινοσίνη (Εικόνα 5).



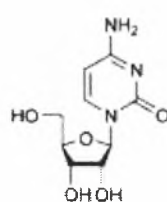
Αδενοσίνη



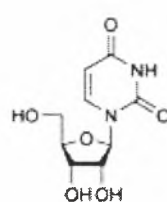
Γουανοσίνη



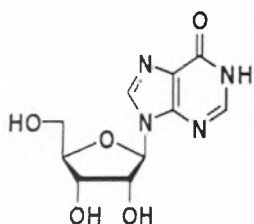
Θυμιδίνη



Κυτιδίνη



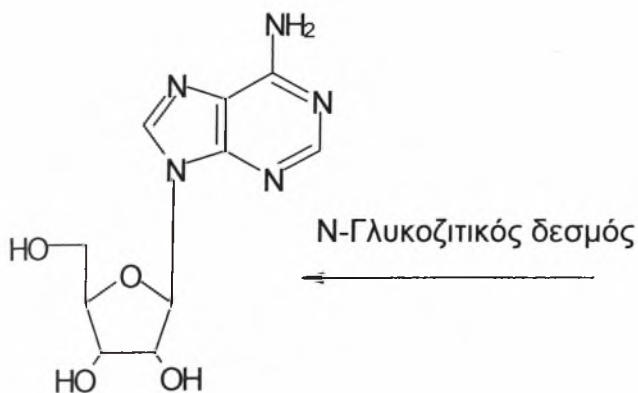
Ουριδίνη



Ινοσίνη

Εικόνα 5. Νουκλεοζίτες (αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη, θυμιδίνη, ουριδίνη, ινοσίνη).

Ο νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης ενωμένη στη θέση 1 μιας πεντόζης με β -*N*-γλυκοζιτικό δεσμό (Berg J.M. *et al*, 2001). Ο ανωμερής άνθρακας ενός σακχάρου είναι σε θέση να ενωθεί με το άζωτο μιας αμίνης με ένα *N*-γλυκοζιτικό δεσμό. Ο συγκεκριμένος τρόπος γλυκοζιτικής σύνθεσης είναι συνήθης σε πολλά βασικά μακρομόρια, όπως νουκλεοτίδια, RNA και DNA. Οι *N*-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β , δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Berg J.M. *et al*, 2001) (Εικόνα 6).



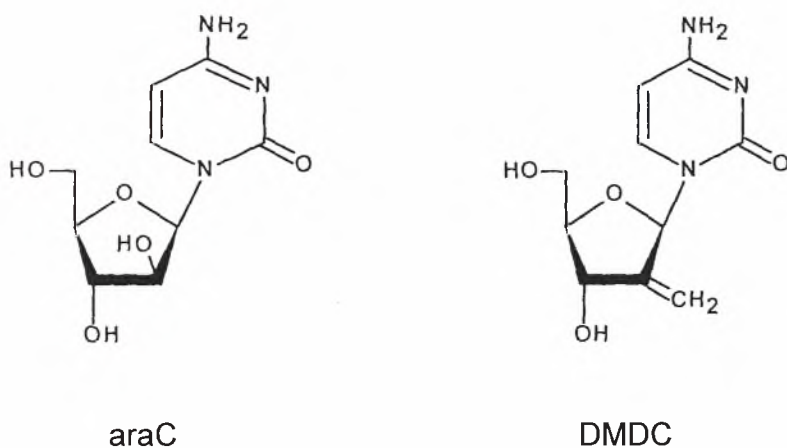
Εικόνα 6. Αδενοσίνη

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των ιδιοτήτων τους που τα καθιστούν αντικαρκινικούς, αντιβακτηριδιακούς, αντιικούς παράγοντες, καθώς και ως αντιοξειδωτικά. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες (Zhou W. *et al*, 2004; Perigaund C. 1992; Robins R.K. *et al*, 1990; MacCoss M. *et al*, 1990). Ως εκ τούτου έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους.

1.2.1 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν μελετηθεί πολύ εντατικά ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (Elion G.B., 1989; Robins R.K. *et al*, 1990; MacCoss M. *et al*, 1990). Ένας μεγάλος αριθμός αναλόγων φυσικών νουκλεοζιτών χρησιμοποιείται επί πολλά έτη στην ιατρική για τη θεραπεία καρκινικών ασθενειών. Μία εκτενής μελέτη των αντικαρκινικών φαρμάκων που έχουν ήδη εγκριθεί από τη Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA), έδειξε ότι οι νουκλεοζίτες απαρτίζουν μία σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών μέσων. Θα πρέπει να τονιστεί ότι από τα εξήντα αντικαρκινικά μόρια που έχουν εγκριθεί μέχρι σήμερα από τον FDA, έντεκα είναι αντιμεταβολίτες και επιπλέον, δέκα από τα έντεκα είναι νουκλεοζίτες ή συγγενικά μόρια, τα οποία επηρεάζουν τη σύνθεση του DNA με

διάφορους τρόπους. Επιπρόσθετα αξίζει να σημειωθεί ότι το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία το 15% των αντικαρκινικών φαρμάκων σχετίζονταν με νουκλεοζιτικά ανάλογα. Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες, όπως οι 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC, Εικόνα 7) (Matsuda A. *et al*, 2004), 1-(2'-δεοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθροπεντο-φουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC, Εικόνα 7), έχουν μελετηθεί ως προς τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες και είναι αποτελεσματικές ενώσεις όχι μόνο ενάντια στη λευχαιμία και τα λεμφώματα, αλλά και σε κακοήθεις όγκους (Takenuki K. *et al*, 1988; Matsuda A. *et al*, 1991; Yamagami K. *et al*, 1991; Lin T.S. *et al*, 1991; Baker C.H. *et al*, 1991; Cory A.H. *et al*, 1994).



Εικόνα 7. Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες

1.2.2 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αποτελούν το θεμελιώδη λίθο και για την ανάπτυξη αντιικών παραγόντων (Zhou W. *et al*, 2004; Perigaund C. *et al*, 1992; Komiotis D. *et al*, 1991). Το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία, το 55% των αντιικών φαρμάκων σχετίζονταν με νουκλεοζιτικά ανάλογα. Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός, ότι έξι από τα δεκαπέντε φάρμακα, τα οποία διατίθενται για τη θεραπεία του AIDS (AZT, ddC, ddI, d4T, 3TC και abacavir), είναι νουκλεοζιτικά ανάλογα (νουκλεοζίτες, αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης, NRTIs) μαζί με τρία μη – NRTIs (nevirapin; delavirdin και efavirenz), καθώς και έξι αναστολείς της πρωτεάσης (saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir). Μεταξύ των NRTIs, η 3TC είναι το φάρμακο, το οποίο χρησιμοποιείται επίσης και για τη θεραπεία της μόλυνσης από τον ιό της

ηπατίτιδας Β (HBV) και είναι το μόνο που έχει εγκριθεί από τον FDA, εκτός από την ιντερφερόνη-α. Εννέα ακόμη νουκλεοζίτες idoxuridine (ιδοξουριδίνη, IdU), trifluridine (τριφλουριδίνη, TFT), acedurid (ασεδουρίδη, EdU), vidarabine (βιδαραβίνη, araA), acyclovir (ακυκλοβίρη, ACV), valaciclovir (βαλακυκλοβίρη, val-ACV), ganciclovir (γανσικλοβίρη, DHPG), famciclovir (φαμσικλοβίρη, FCV) και cidofovir (σιντοφοβίρη, HPMPC), χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ασθενειών που προκαλούνται από ερπητοϊούς, όπως από τον ιό απλού έρπητα τύπου 1 (Herpes Simplex Virus, HSV-1) και τύπου 2 (HSV-2), τον κυτταρομεγαλοϊό (cytomegalovirus, HCMV) και τον ιό έρπητα ζωστήρα (varicella-zoster virus, VZV) (Gumina, 2001). Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται μόρια, όπως το acyclovir (ακυκλοβίρη), το οποίο χρησιμοποιείται επί δεκαετίες και ακόμη εξακολουθεί να κατατάσσεται μεταξύ των πιο αποτελεσματικών φαρμάκων ενάντια στους ερπητοϊούς. Τέλος, το ribavirin (ριμπαβιρίνη), ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο που περιέχει μία μη φυσική βάση, έχει εγκριθεί για τη θεραπεία του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού και επιπλέον είναι το μόνο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία της μόλυνσης από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), σε συνδυασμό με την interferon-α (ιντερφερόνη-α) και τον ιό έρπητα ζωστήρα (VZV) (Zhou W. *et al*, 2004).

1.2.3 Νουκλεοζίτες ως αντιοξειδωτικά

Αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία, η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξειδωση υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξειδωση αυτού του υποστρώματος (Halliwell B., 2001).

Έρευνες, οι οποίες αφορούσαν τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης σειράς πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων της φθορογλυκόζης (Spanou C. *et al*, 2007), της γαλακτόζης και της μαννόζης έδειξαν ότι τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που φέρουν το α,β -κετοακόρεστο σύστημα στο τμήμα του σακχάρου, εμφανίστηκαν αποτελεσματικά έναντι των ROO[•] ριζών. Αντίθετα αυτά που δεν φέρουν το α,β -κετοακόρεστο σύστημα στη δομή τους, εμφάνισαν μηδενική ή μικρή ανασταλτική δράση και μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις. Φαίνεται ότι η παρουσία του διπλού δεσμού σε α,β -θέση ως προς την κετονομάδα προκαλεί σημαντική σταθεροποίηση και αυξάνει την παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση.

1.2.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών όπως είναι γνωστό πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά αλλά έχουν και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επίσης πραγματοποιείται ενδοκυτταρική τροποποίησή τους με σκοπό την παραγωγή των νουκλεοτιδίων. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν τα νουκλεοτίδια ως βασικές δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA.

Με βάση την παραπάνω αναφορά για παθητική διάχυση, χρησιμοποιήθηκε η παρούσα ιδιότητα για την εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων, μορίων που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, ως αντιικών και αντικαρκινικών παραγόντων για τη θεραπεία πληθώρας ασθενειών (Zhou W. *et al*, 2004).

Τα φάρμακα, που ως δραστική ουσία έχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο, επιβάλλεται να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μοριακό στόχο προκειμένου να είναι δραστικά. Στην κατηγορία των μοριακών στόχων των νουκλεοζιτικών αναλόγων υπάγονται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα (Vender M. D. *et al*, 2001).

Οι πιο κοινοί τύποι πρωτεϊνών με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα φάρμακα είναι οι υποδοχείς, οι δίαυλοι ιόντων, τα ενζυμα και τα μόρια μεταφορείς.

Ο βασικός λόγος που τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου και του AIDS, είναι ότι μπορούν να τροποποιηθούν δομικά, έτσι ώστε να παράγουν φαρμακολογικώς ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Στη συνέχεια, μπορούν να παρέμβουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, έτσι ώστε να προωθήσουν είτε αντιπλλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα (Pastor-Anglada M. *et al*, 1998).

Τα αντικαρκινικά και τα αντιικά ανάλογα εμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό και την επισκευή του κυτταρικού DNA και τον αναδιπλασιασμό του ιικού γενώματος. Αυτά τα θεραπευτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση (Arner E. S. J. *et al*, 1995). Αν και τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, τα μη φωσφορυλιωμένα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες - μεταφορείς νουκλεοζιτών. Φωσφορυλιώνονται κατόπιν προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε

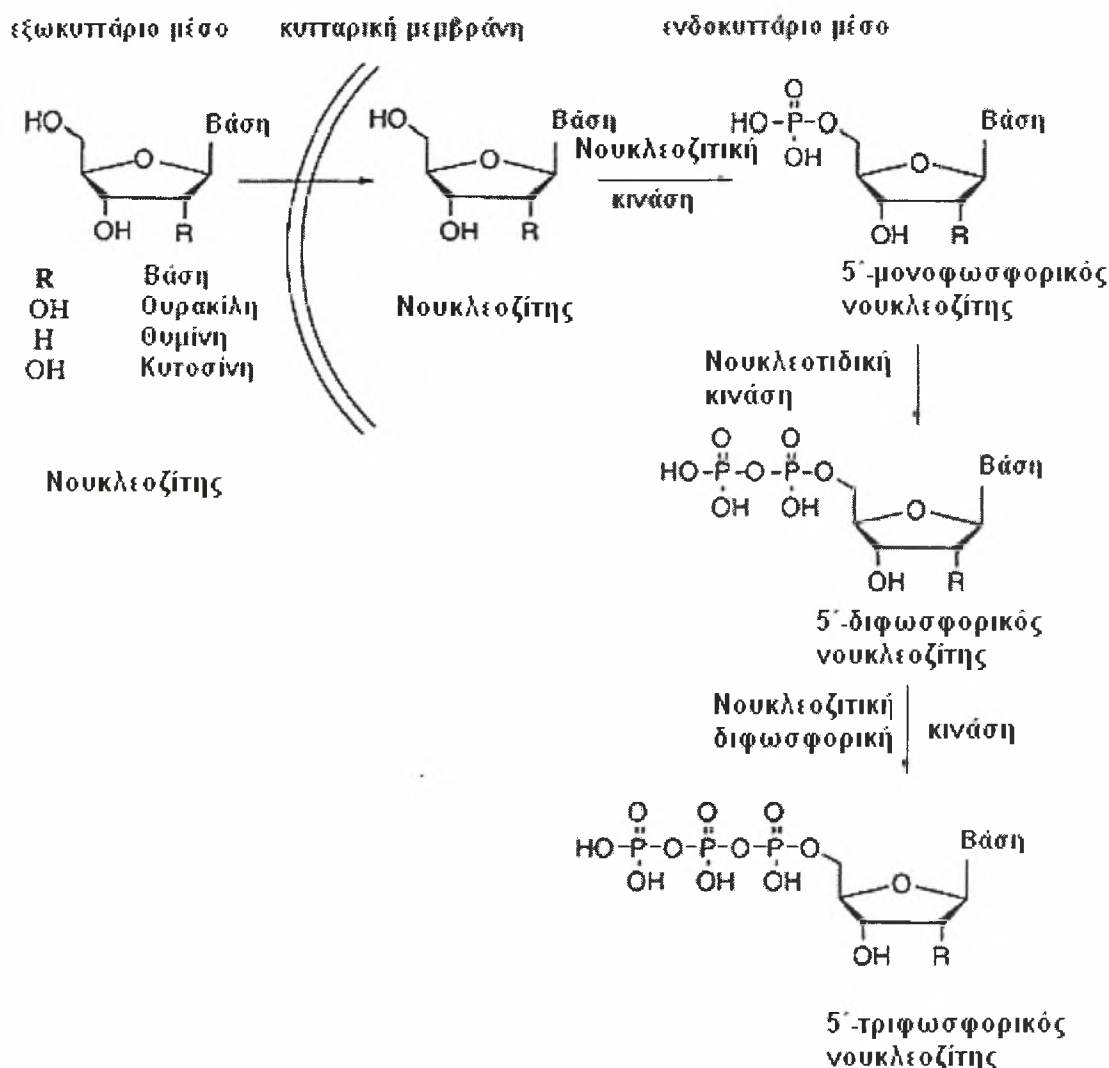
έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA.

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

Επίσης τα ανάλογα των νουκλεοζιτών μπορούν να δράσουν και ως προφάρμακα, δεδομένου ότι πρέπει να φωσφορυλιωθούν στην 5' θέση του υδατάνθρακα από τις κυτταρικές κινάσες για να μπορέσουν να δράσουν κι αυτό είναι το «κλειδί» στην επιλεκτικότητά τους. Η φωσφορυλίωση των ανάλογων νουκλεοζιτών στο κύτταρο, τα ενεργοποιεί και ανταγωνίζονται με τα φυσικά νουκλεοτίδια για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Επειδή η αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων είναι κοινή για όλες τις μορφές ιών, τα ανάλογα νουκλεοζιτών ενδεχομένως έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντιική θεραπεία (Chong Y. *et al*, 2003).

Επειδή οι φωσφορυλιωμένες ενώσεις ιονίζονται συνήθως στο σώμα λόγω του διαφορετικού pH στα διάφορα διαμερίσματα, δεν μεταφέρονται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Οι ενεργές μορφές των νουκλεοτιδίων αποτελούν τριφωσφορικά άλατα, με όλες τις αντικαταστάσεις φωσφορικών στην 5'-θέση από ειδικές ιικές-κινάσες που συχνά καταλύουν την πρώτη 5'-φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων, με την επόμενη φωσφορυλίωση από τις κυτταρικές κινάσες. Η πρώτη φωσφορυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (MP) συνήθως καταλύεται από μία νουκλεοζιτική κινάση που κωδικοποιείται από το κύτταρο-ξενιστή ή τον ιό που μολύνει το κύτταρο-ξενιστή (Balzarini J. *et al*, 1993, Wagner C. R. *et al*, 2000). Η μετατροπή των νουκλεοζιτών-MP προς τις αντίστοιχες 5'-διφωσφορικές και τριφωσφορικές δομές πραγματοποιείται από νουκλεοτιδικές κινάσες, καθώς και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντίστοιχα (Εικόνα 8). Συνεπώς, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι

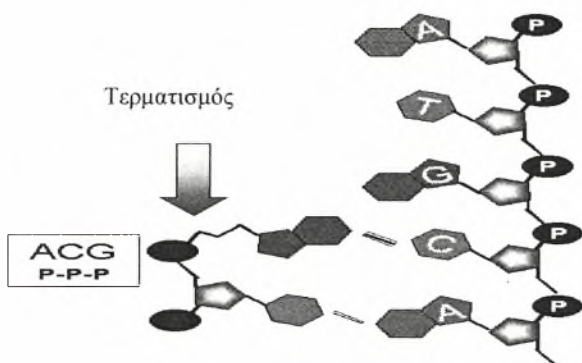
Πικές κινάσες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών.



Εικόνα 8 . Φωσφορυλίωση των ανάλογων νουκλεοζιτών

Αυτό μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση των ανάλογων φωσφορυλιωμένων νουκλεοτιδίων κυρίως στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί με ιό. Τα τμήματα των νουκλεϊκών οξέων διαμορφώνονται από τις κυτταρικές πολυμεράσες, οι οποίες συνδέουν το 5'-νουκλεοτίδιο στην ομάδα 3'-υδροξυλίου ενός άλλου νουκλεοτιδίου. Σε αυτή την διαδικασία, απελευθερώνεται πυροφωσφορική ομάδα (PPi) και οι δύο ζάχαρες συνδέονται με φωσφοδιεστερική γέφυρα (John M. Clark, Jr and Robert L. Switzer, Benjamin Lewin, Christopher J. Burns).

Το σάκχαρο, είναι το τμήμα του νουκλεοζιτη που χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τις κινάσες και τις πολυμεράσες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την επιμήκυνση των αλυσίδων. Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας (Εικόνα 9).



Εικόνα 9 . Τερματισμός αλυσίδας νουκλεϊκών οξέων

Η πιθανή αντιοξειδωτική δράση των νουκλεοζιτών εστιάστηκε στην ικανότητά τους να προστατεύουν το DNA από την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου (ROO^\cdot) πρόκληση θραυσμάτων. Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους, είτε εμποδίζοντας την οξείδωση των βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, είτε περιορίζοντας το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών (Scalbert A. *et al*, 2005). Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν διάφορα βιομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες, σάκχαρα, DNA κ.ά.), προκαλώντας οξειδωτική καταστροφή των κυττάρων, δυσλειτουργία των μεμβρανών, τροποποίηση πρωτεϊνών, απενεργοποίηση ενζύμων και σχάση ή τροποποίηση των βάσεων του DNA. Ακόμη οδηγούν στην καταστροφή των κυτταρικών δομών αδρανοποιώντας ορισμένα συστατικά, όπως ένζυμα και πρωτεΐνες απαραίτητα για την ανάπτυξη και επιβίωση των κυττάρων (Undurti N., 2002). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη συσχέτιση των ελευθέρων ριζών με την πρόωρη γήρανση και διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως καρκίνος, καρδιαγγειακές παθήσεις και νευροεκφυλιστικές νόσοι (Halliwell B., 2001).

Ωστόσο ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στον καρκίνο δεν έχει προσδιοριστεί ακριβώς. Πιο συγκεκριμένα οι ελεύθερες ρίζες σχετίζονται ιδιαίτερα με την έναρξη της

καρκινογενετικής διαδικασίας. Όταν οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν φυσιολογικά κύτταρα προκαλείται βλάβη στο DNA, η οποία αποτελεί βασική προϋπόθεση για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας. Ωστόσο, οι επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν. Όταν οι ελεύθερες ρίζες παράγονται στα καρκινικά κύτταρα, φαίνεται να έχουν ευεργετική δράση καθώς προκαλούν την καταστροφή αυτών των κυττάρων με διάφορους μηχανισμούς (Undurti N., 2002). Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες παίζουν ρόλο στη μείωση των τελομερών των κυττάρων, τα οποία στα καρκινικά κύτταρα διατηρούνται σε ένα συγκεκριμένο μέγεθος και συμβάλλουν στη διατήρηση του καρκινικού κυτταρικού φαινότυπου (Undurti N., 2002).

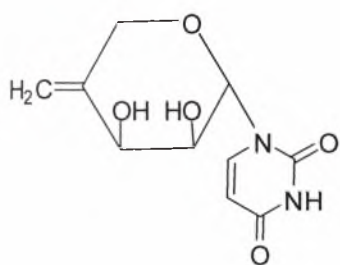
1.2.5 Πυρανονουκλεοζίτες

Πληθώρα ερευνητικών προγραμμάτων με σκοπό την παραγωγή φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, επικεντρώθηκαν στη χρήση νουκλεοζιτικών αναλόγων με σάκχαρο μια πεντόζη. Όμως, ορισμένα προβλήματα που προέκυψαν από τη χρήση των φουρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως ο ανεπαρκής μεταβολισμός προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, η χημική ή ενζυματική απενεργοποίηση τους, η τοξικότητα, η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και όγκων και τέλος ο μικρός χρόνος ημιζωής και κατά συνέπεια χρόνος δράσης τους, έστρεψαν το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντιικής δράσης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων και ειδικότερα αυτών που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη (www.cf.ac.uk/phrmy/chemEd/presentations.html).

Η έρευνα για την ανακάλυψη αντιικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είχε μείνει αρκετά βήματα πίσω σε σχέση με αυτή των βιολογικώς ενεργών νουκλεοζιτών με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίου. Παρόλα αυτά, νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίου έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντιικές (Verheggen I. *et al*, 1993, Verheggen I. *et al*, 1995, Maurinsh Y. *et al*, 1997, Ostrowski T. *et al*, 1998), αντικαρκινικές (Antonakis K. *et al*, 1989) και αντιβιοτικές τους ιδιότητες (Haouz A. *et al*, 2003) καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων (Vastmans K. *et al*, 2001).

1.2.6 Νουκλεοζίτες με εξωκυκλικό μεθυλένιο

Οι νουκλεοζίτες με εξωκυκλικό μεθυλένιο είναι μία ομάδα νουκλεοζιτικών αναλόγων που προκύπτουν από την αντικατάσταση μίας καρβονυλικής ομάδας από ένα εξωκυκλικό μεθυλένιο (Εικόνα 10). Σύμφωνα με μελέτες έχει αποδειχθεί ότι αυτού του είδους οι νουκλεοζίτες επιδεικνύουν ισχυρή τόσο αντιική όσο και αντικαρκινική δράση (Jeong L.S. *et al*, 1998; Yoo S.J. *et al*, 2002, Gunaga P. *et al*, 2004). Συγκεκριμένα, σε πιο πρόσφατες μελέτες νουκλεοζιτικά ανάλογα της γαλακτόζης (Aggelis G. *et al*, 2007), της μαννόζης (Aggelis G. *et al*, 2008) και της λυξόζης (Tzioumaki N. *et al*, 2009) που έφεραν εξωκυκλικό μεθυλένιο στο δακτύλιο του σακχάρου, επέδειξαν αυξημένη αντιική και αντικαρκινική δράση (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Νουκλεοζίτης με εξωκυκλικό μεθυλένιο 1-(4-deoxy-4-methylene- α -L-erythro-pentopyranosyl)uracil (Tzioumaki N. *et al*, 2009)

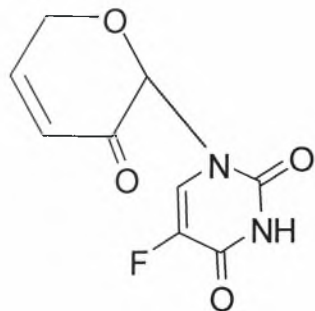
1.2.7 Κετο-πυρανονουκλεοζίτες

Μία ενδιαφέρουσα τάξη πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων αποτελούν οι κετο-πυρανονουκλεοζίτες, οι οποίοι περιλαμβάνουν μία κετονομάδα στο τμήμα του σακχάρου, ως αποτέλεσμα της οξείδωσης ενός ασύμμετρου ατόμου άνθρακα. Παρόλο που τα κετο-παράγωγα των φουρανονουκλεοζιτών, στις περισσότερες των περιπτώσεων, αποδείχθηκαν ασταθή, τα κετο-παράγωγα των νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο έδωσαν το έναυσμα για τη μελέτη μιας νέας και ενδιαφέρουσας χημείας (Antonakis K. and Leclercq F. 1970, Antonakis K. and Leclercq F. 1971). Η διαθεσιμότητα αυτών των μορίων ήταν καθοριστική για τη βιολογική έρευνα, αφού άνοιξε νέους ορίζοντες προς τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των αντιβιοτικών, δεδομένου ότι οι κετο-πυρανονουκλεοζίτες αποτελούν απαραίτητα ενδιάμεσα στη βιοσύνθεση πολλών φυσικών νουκλεοζιτικών αντιβιοτικών

προϊόντων (Antonakis K. 1989). Επιπλέον, τα συγκεκριμένα μόρια εμφανίζουν το πλεονέκτημα ότι οδηγούν σε σύνθετους νουκλεοζίτες μεγάλου βιολογικού ενδιαφέροντος. Ειδικότερα, νουκλεοζίτες με διακλαδισμένη αλυσίδα στο τμήμα του σακχάρου, καθώς και νουκλεοζίτες που φέρουν αμινοσάκχαρα, λήφθηκαν από τους κετονουκλεοζίτες με απευθείας πυρηνόφιλη προσθήκη (Antonakis K. and Egron M. 1973, Halmos T. and Antonakis K. 1975, Antonakis K. 1989). Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι οι κετο-πυρανονουκλεοζίτες αποτελούν συνθόνες σε συνθετικές και βιοσυνθετικές διαδικασίες και επιπλέον ένας σημαντικός αριθμός αυτών εμφανίζει ενδιαφέρουσα αντικαρκινική και αντιική δράση (Antonakis K. 1975, Antonakis K. 1984, Komiotis D. *et al*, 1991, Khan A. R. *et al*, 2002).

1.2.8 Ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες

Μία ασυνήθιστη κατηγορία νουκλεοζιτών με τροποποιημένο εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο αποτελούν οι ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες, οι οποίοι διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικών και αντιικών ιδιοτήτων (Antonakis and Chouroulinkon 1974, Chouroulinkon and Antonakis 1977, Antonakis *et al*, 1980, Komiotis *et al*, 1991, Ollapaly *et al*, 1999). Στα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα ο δακτύλιος του σακχάρου περιλαμβάνει ένα διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα σε α,β -θέση ως προς την κετονομάδα. Οι ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες έχουν καθιερωθεί για την αντινεοπλασματική δραστηριότητα και τα ανοσοκατασταλτικά τους χαρακτηριστικά (Alaoui *et al*, 1986, Chouroulinkon and Antonakis 1977, Paterson *et al*, 1998). Αποδείχθηκε ότι όχι μόνο παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών *in vitro* (Antonakis and Chouroulinkon 1974, Halmos *et al*, 1983) και της λευχαιμίας L1210 *in vivo* (Chouroulinkon and Antonakis 1977, Antonakis *et al*, 1980), αλλά επίσης ότι αποτελούν και σημαντικά συνθετικά ενδιάμεσα στο πεδίο των νουκλεοζιτών, λόγω της χημικής τους σταθερότητας στα διάφορα μέσα (Antonakis 1975). Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αυτών των νουκλεοζιτών, αποτελεί η ένωση 1-(3',4'-dideoxy- α -pent-3'-enopyranosyl-2'-ulose)-5-fluorouracil (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. 1-(3',4'-dideoxy- α -pent-3'-enopyranosyl-2'-ulose)-5-fluorouracil

Οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν για να προσδιοριστεί η σχέση δομής-δράσης των ακόρεστων κετονουκλεοζιτών, απέδειξαν ότι μοναδική δομική απαίτηση για την εμφάνιση της αντικαρκινικής τους δράσης αποτελεί η ύπαρξη του ηλεκτρονιόφιλου C=C-C=O συστήματος στο τμήμα του σακχάρου (Alaoui *et al*, 1986). Επιπλέον, η δράση αυτή εμφανίστηκε να είναι ανεξάρτητη από την ανωμερική απεικόνιση, την αξονική ή ισημερινή θέση της βάσης και τέλος την *L*- ή *D*- διάταξη του σακχάρου. Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης αυτών των ενώσεων δεν είναι σαφής, φαίνεται ότι παρεμποδίζουν τη σύνθεση του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών (Antonakis K. 1975) και ότι αντιδρούν με τις πρωτεϊνικές ομάδες σουλφυδρυλίου (Halmos T. *et al*. 1983). Μία άλλη σημαντική παράμετρος που συνεισφέρει στη βιολογική σπουδαιότητα των ανωτέρω μορίων αποτελεί η ύπαρξη του διπλού δεσμού στο τμήμα του σακχάρου, ο οποίος προκαλεί ακαμψία στο δακτύλιο, όμοια με αυτή ενός φουρανουκλεοζίτη, με αποτέλεσμα να μπορούν να θεωρηθούν ως (βιο)ισοστερή των φυσικών νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων (Herdewijn and De Clercq, 2001).

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στόχος – σκοπός μελέτης

Τα αντιβακτηριδιακά, αντιικά και αντιογκογονικά φάρμακα περιλαμβάνονται μεταξύ των πιο σημαντικών θεραπευτικών ανακαλύψεων του εικοστού αιώνα και έχουν αλλάξει δραστικά τη θεραπευτική αγωγή πολλών ασθενειών, μειώνοντας τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα.

Τροποποιημένα νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξαμελή δακτύλιο έχουν επιδείξει σημαντική αντιική, αντικαρκινική και αντιβιοτική δράση (Zhou W. *et al*, 2004).

Μια σημαντική κατηγορία αποτελούν οι ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες, οι οποίοι αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης αποτελούν το κλειδί που μεσολαβεί σε συνθετικές και βιοσυνθετικές διαδικασίες, πολλές από τις οποίες έχουν ως αποτέλεσμα αντιογκογονική δράση (Antonakis K. *et al*, 1989).

Από την άλλη, νουκλεοζιτικά ανάλογα που φέρουν εξωκυκλικό μεθυλένιο, επέδειξαν επίσης αντικαρκινική και αντιική δράση (Aggelis G. *et al*, 2007, Aggelis G. *et al*, 2008, Tzioumaki N. *et al*, 2009).

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που φέρουν το α,β -κετοακόρεστο σύστημα στο τμήμα του σακχάρου, εμφανίστηκαν αποτελεσματικά έναντι των ROO[•] ριζών (Spanou C. *et al*, 2007), αφού η παρουσία του διπλού δεσμού σε α,β -θέση ως προς την κετονομάδα προκαλεί σημαντική σταθεροποίηση και αυξάνει την παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών και συγκεκριμένα κετονουκλεοζιτών με εξωκυκλικό μεθυλένιο σε συνδυασμό με την ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη, για την εύρεση νέων αντικαρκινικών και αντιικών φαρμάκων με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα από τα μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενα, καθώς και η μελέτη της πιθανής αντιοξειδωτικής τους δράσης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Υλικά Σύνθεσης των Νουκλεοζιτικών αναλόγων

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση που ακολουθεί ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιρειών:

- >Πυριδίνη (Panreac, Ισπανία)
- >Pyridinium dichromate (PDC) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- > Οξικός ανυδρίτης (Ac_2O) (Aldrich, Γερμανία)
- >Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH) (Merck, Γερμανία)
- >Όξινο θειικό νάτριο (NaHSO_4) (Merck, Γερμανία)
- >Πεντοξείδιο του φωσφόρου (P_2O_5) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- >Κορεσμένο sodium bicarbonate (NaHCO_3) (Merck, Γερμανία)
- >Κορεσμένο sodium bisulfate (NaHSO_4) (Merck, Γερμανία)
- >Άνυδρο Θειικό μαγνήσιο (MgSO_4) (Merck, Γερμανία)
- >Άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) (Merck, Γερμανία)
- >Sodium Thiosulfate (Merck, Γερμανία)
- >Θυμίνη (Sigma, Γερμανία)
- >Hexamethyldisilazane (HMDS) (Aldrich, Γερμανία)
- >Trimethylsilyltrifluoromethane ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- >2,2-dimethoxypropane (DMP) (Aldrich, Γερμανία)
- >p-toluenesulfonic acid monohydrate (p-TsOH) (Aldrich, Γερμανία)
- >Διάλυμα formic acid (HCOOH) (Panreac, Ισπανία)
- >Imidazole (Fluca, Γερμανία)
- >Methyl triphenyl – phosphonium bromide (Aldrich, Γερμανία)
- >Υδρίδιο του Νατρίου (NaH) (Fluca, Γερμανία)
- >Ακετονιτρίλιο (CH_3CN) (Merck, Γερμανία)
- >Τολουόλιο (Tol) (Merck, Γερμανία)
- >Dimethylformamide (DMF) (Fluca, Γερμανία)
- >Benzophenone (Fluca, Γερμανία)

3.2 ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΟΥ/ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC : Thin layer chromatography)

Οι αντιδράσεις ελέγχονται με χρωματογραφία χάρτου με πλάκες silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₅₄). Τα προϊόντα στα χρωματογραφήματα ανιχνεύονται ψεκάζοντας με διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 30%, ή μέσω UV ακτινοβολίας. Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής :

- Διάλυμα Α : Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 40/60
- Διάλυμα Β : Οξικός Αιθυλεστέρας / Μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Γ : Οξικός Αιθυλεστέρας / Μεθανόλη 95/05
- Διάλυμα Δ : Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 60/40
- Διάλυμα Ε : Οξικός Αιθυλεστέρας / Μεθανόλη 80/20

3.2.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Η χρωματογραφία στήλης επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση σε silica gel (240-400, Merck grade) (flash chromatography) και οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι:

- Διάλυμα Α : Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 40/60
- Διάλυμα Δ : Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 60/40
- Διάλυμα ΣΤ : Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 50/50

3.2.3 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Χρησιμοποιούνται άνυδροι διαλύτες ακετονιτρίλιο (CH₃CN), πυριδίνη, διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), Ν,Ν-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και τετραϋδροφουράνιο (THF). Η ξήρανση του CH₃CN γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το THF αναδεύεται με μίγμα νατρίου/βενζοφαινόνης και αποστάζεται αμέσως πριν από τη χρήση. Η πυριδίνη

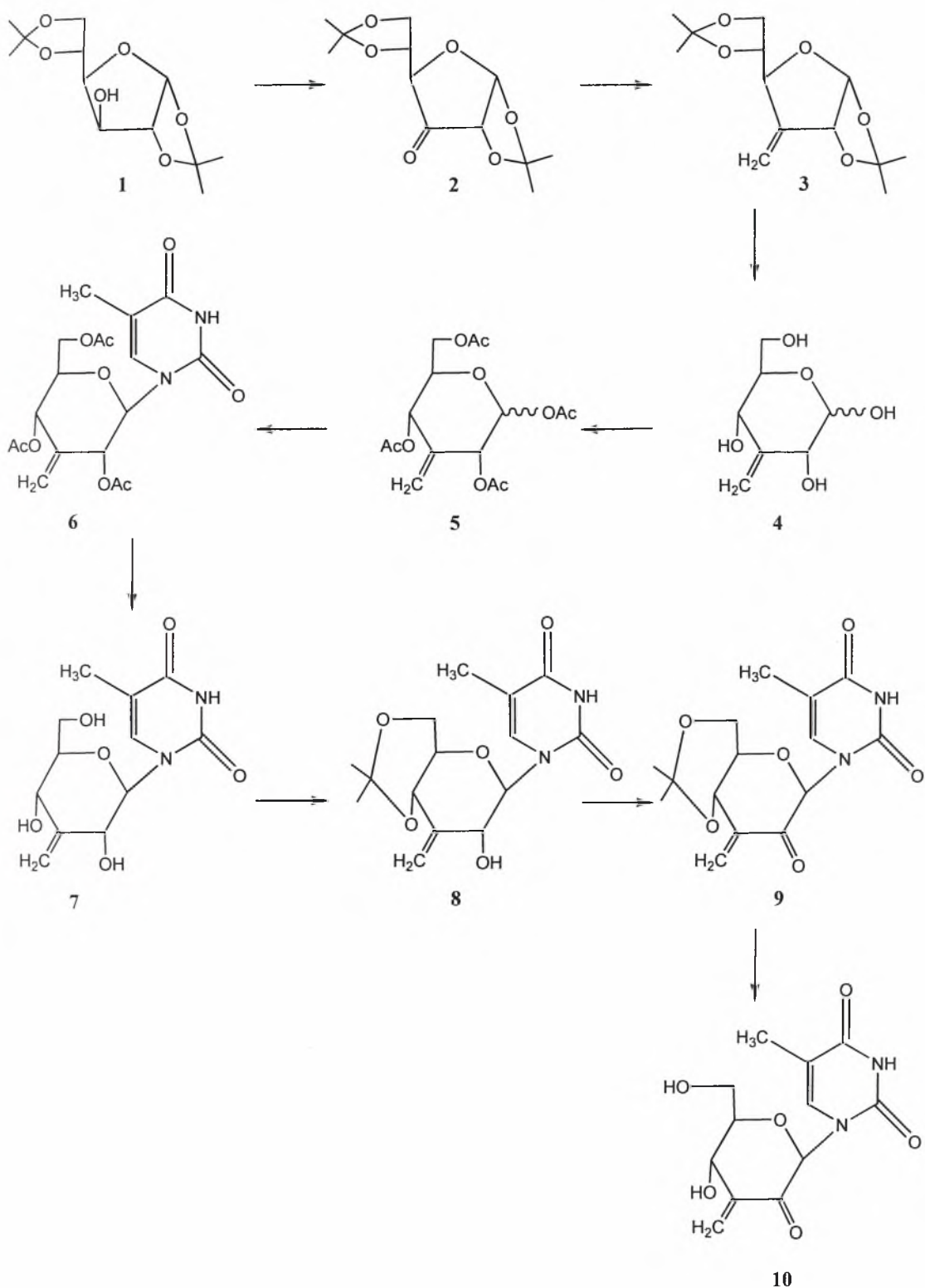
αποθηκεύεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4Å. Το DMSO αποθηκεύεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å.

3.2.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με το φωτόμετρο Bruker 400 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^1H . Η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (doublet), dd (doublet doublet), dtr (doublet triplet), m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.3.1 Σύνθεση προϊόντων



Εικόνα 12 : Μεθοδολογία σύνθεσης νουκλεοζιτικών αναλόγων με ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη

3.3.2 Μεθοδολογία σύνθεσης

Το πρώτο στάδιο της συνθετικής διαδικασίας για τη λήψη του επιθυμητού σακχάρου **5** περιλαμβάνει την οξειδωση της εμπορικά διαθέσιμης, 1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucopyranose (DAG) (**1**) παρουσία PDC και Ac₂O σε διχλωρομεθάνιο, με την οποία λαμβάνεται η ένωση 1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-ribohexofuranose-3-ulose (**2**).

Στη συνέχεια με αντίδραση Wittig της κετόνης **2** παράγεται η 1,2:5,6-di-O-isopropylidene-3-methylene- α -D-ribohexofuranose (**3**), σε ικανοποιητική απόδοση (75%).

Η συνθετική πορεία συνεχίζεται με την υδρόλυση του προϊόντος **3** με ένα θερμό υδατικό διάλυμα της ρητίνης Amberlite IR-120 (H⁺), η οποία οδηγεί στην ένωση, 3'-deoxy-3-methylene- α -D-glucopyranose (**4**) σε αρκετά καλή απόδοση (85%). Τέλος, με ακετυλίωση του προϊόντος **4** παρουσία Ac₂O σε πυριδίνη, λαμβάνεται το επιθυμητό σάκχαρο, 1,2,4,6-tetra-O-acetyl-3-methylene-D-glucopyranose (**5**) υπό τη μορφή λευκού στερεού σε άριστη απόδοση (98%).

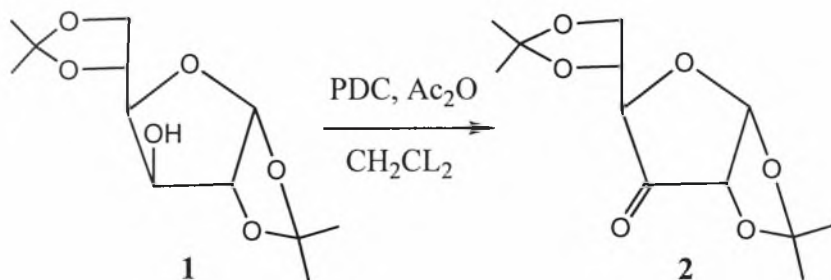
Μετά τη σύνθεση του επιθυμητού σακχάρου **5**, που αποτελεί το προϊόν αφετηρία για τη λήψη των επιθυμητών κέτο- εξωμεθυλενικών νουκλεοζιτικών παραγώγων, το επόμενο βήμα της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει τη σύνθεση νουκλεοζίτη, ο οποίος φέρει ως σάκχαρο την ένωση **5** και ως ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη.

Η συνθετική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του επιθυμητού νουκλεοζίτη 1-(2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-methylene- β -D-glucopyranosyl)thymine (**6**), περιλαμβάνει ως πρώτες ύλες την ένωση **5** και την σιλυλιωμένη βάση: τη θυμίνη. Η απομάκρυνση όλων των ακετυλίων με κορεσμένο μεθανολικό διάλυμα αμμωνίας έδωσε την ένωση 1-(3'-deoxy-3'-methylene- β -D-glucopyranosyl)thymine (**7**). Εκλεκτική προστασία των ελεύθερων υδροξυλίων των θέσεων 4' και 6' της ένωσης **7**, χρησιμοποιώντας το 2,2-dimethoxypropane σε ακετόνη, οδήγησε στην ένωση 1-(3'-deoxy-4',6'-O-isopropylidene-3'-methylene- β -D-glucopyranosyl)thymine (**8**). Ακολούθησε η οξειδωση στη θέση 2' της ένωσης **8** όπου έδωσε την ένωση 1-(3'-deoxy-4',6'-O-isopropylidene-3'-methylene- β -D-glucopyranosyl-2'-ulose)thymine (**9**).

Τέλος έπειτα από διάνοιξη του ακετονιδίου της ένωσης **9** λήφθηκε η επιθυμητή ένωση 1-(3'-deoxy-3'-methylene- β -D-glucopyranosyl-2'-ulose)thymine (**10**).

3.3.3 Σύνθεση προϊόντων με βάση τη θυμίνη

3.3.3.1. Σύνθεση της 1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-ribohexofuranose-3-ulose (2)



Η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucopyranose (**1**) (5.0 g, 19.20 mmol) διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο (57.2 ml) και στη συνέχεια προστέθηκε Ac₂O (5.43 mL, 57.60 mmol). Στο προκύπτον μίγμα προστέθηκε PDC (8.67 g, 23.05 mmol) και ακολούθησε θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης στο μίγμα προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας (AcOEt) και το προκύπτον παχύρρευστο διάλυμα μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel). Πραγματοποιήθηκε έκλουση με οξικό αιθυλεστέρα και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα, που περιείχε Ac₂O αραιώθηκε με τολουόλιο και στη συνέχεια με απόσταξη εξατμίστηκε μέχρις ξηρού. Το επιθυμητό προϊόν **2** (4.26 g) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

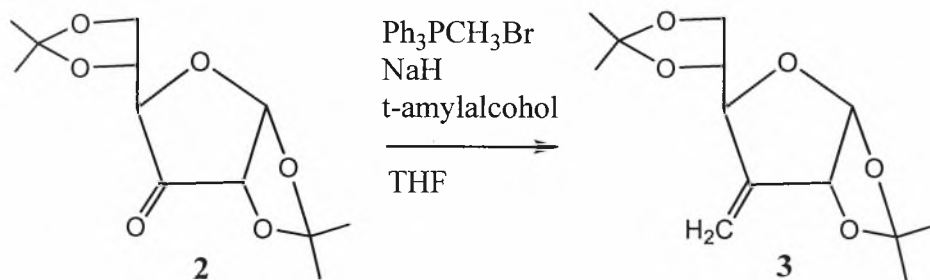
Απόδοση = 86%

Πίνακας 1: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-ribohexofuranose-3-ulose (**2**)

TLC (AcOEt)	R _f = 0,41
Απόδοση	86 %

3.3.3.2. Σύνθεση της 1,2:5,6-di-O-isopropylidene-3-methylene- α -D-glucofuranose

(3)

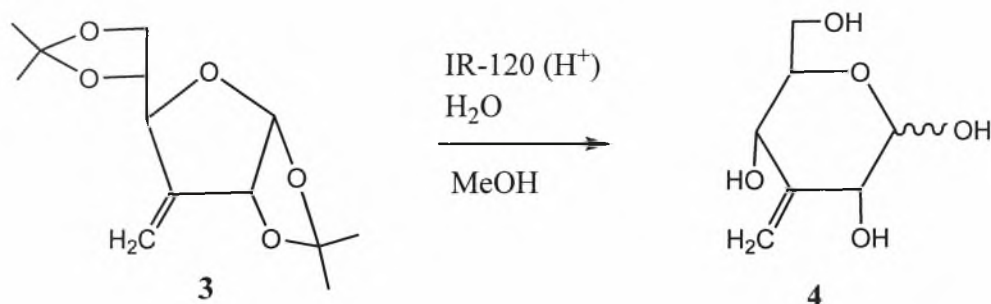


Σε ένα υπό ανάδευση μείγμα αποτελούμενο από $\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{Br}$ (19.50 g, 54.48 mmol) και t -amyl alcohol (59.44 mmol, 6.51 mL) σε dry THF (268.11 mL) προστέθηκε NaH (95.10 mmol, 2.28 g) στους 0°C υπό άζωτο και το μίγμα αναδεύτηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το κίτρινο υλίδιο του φωσφόρου προστέθηκε στάγδην διάλυμα της ένωση **2** (4.26g, 16.51 mmol) σε dry THF (26.28 mL) υπό άζωτο. Έπειτα το μείγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 αραιώθηκε με CH_2Cl_2 και εκχυλίστηκε με νερό. Η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και μετά από διήθηση συμπυκνώθηκε. Καθαρίστηκε σε χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης εξάνιο. Η ένωση συλλέχθηκε, συμπυκνώθηκε και το επιθυμητό προϊόν **3** ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού (3.17 g) (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1,2:5,6-di-O-isopropylidene-3-methylene- α -D-glucofuranose (**3**)

TLC (Διάλυμα A)	$R_f = 0,82$
Απόδοση	75 %

3.3.3.3. Σύνθεση της 3-deoxy-3-methylene-D-glucopyranose (4)



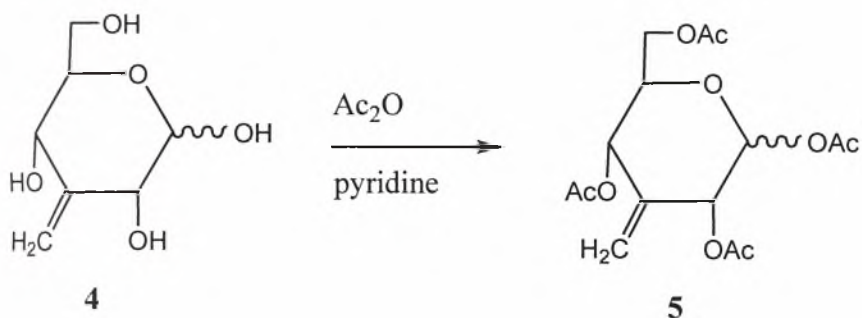
Ένα διάλυμα της ένωσης **3** (3.17g, 12.38 mmol) σε MeOH (19.54 mL) και νερό (110.56 mL) αναδεύτηκε στους 65 °C με ρητίνη Amberlite IR-120 (H⁺) (6.38 g). Μετά από θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα, για ένα βράδυ, το μίγμα διηθήθηκε και από το διήθημα απομακρύνθηκαν οι διαλύτες υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **4** (1.85g) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό (πίνακας 3).

Πίνακας 3 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-deoxy-3-methylene-D-glucopyranose (**4**)

TLC (Διάλυμα Β)	R _f = 0,41
Απόδοση	85 %

3.3.3.4 Σύνθεση της 1,2,4,6-tetra-O-acetyl-3-deoxy-3-methylene-D-glucopyranose (5)

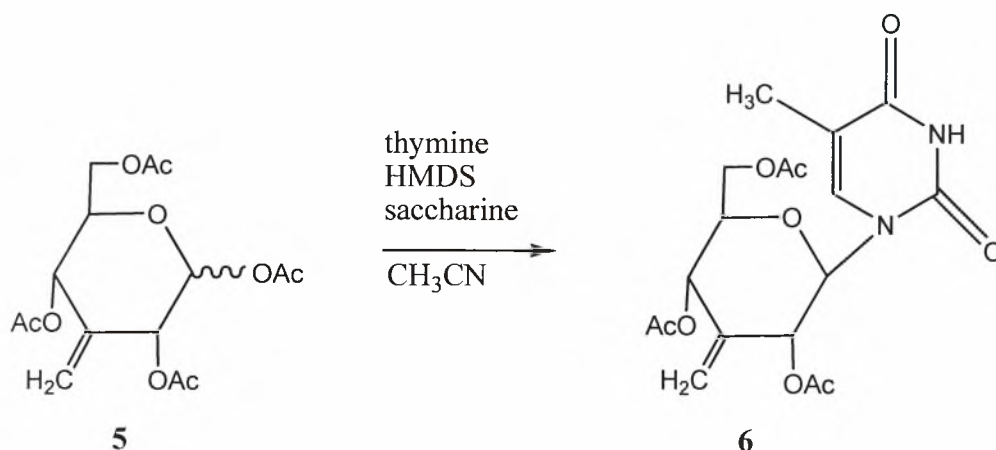
Σε ένα διάλυμα της ένωσης **4** (1.85 gr, 10.53 mmol) σε pyridine (37.12 mL) προστέθηκε Ac_2O (19.37 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) το διάλυμα κρύωσε στους $0\text{ }^\circ\text{C}$ και προστέθηκε μεθανόλη (9.66 mL) για να καταστείλει την αντίδραση. Οι διαλύτες απομακρύνθηκαν υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε AcOEt και εκχυλίστηκε αρχικά με κορεσμένο διάλυμα NaHSO_4 και στη συνέχεια με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 . Η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 , διηθήθηκε και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **5** (3.55 gr) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού με άριστη απόδοση 98%.



Πίνακας 4: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1,2,4,6-tetra-O-acetyl-3-methylene-D-glucopyranose (**5**)

TLC (Διάλυμα Γ)	$R_f = 0,54$
Απόδοση	98 %

3.3.3.5 Σύνθεση της 1-(2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-methylene-β-D-glucopyranosyl) thymine (6)

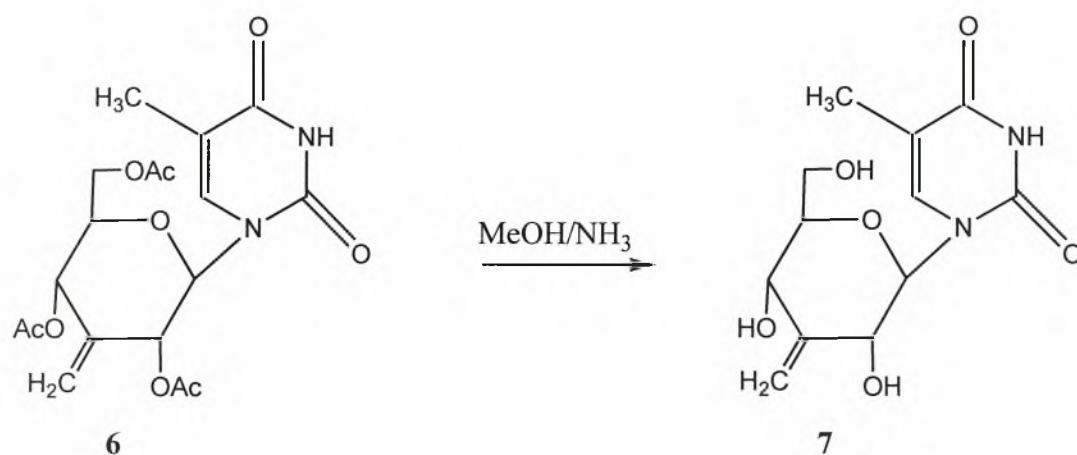


Ένα διάλυμα της θυμίνης (1.82 g, 14.45.mmol), του HMDS (3.78 mL, 17.92 mmol) και της σακχαρίνης (121.76 mg, 0.66 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (47.32 mL) θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 30 λεπτά υπό άζωτο. Όταν το μίγμα έγινε διαυγές, προστέθηκαν η 1,2,4,6-tetra-O-acetyl-3-methylene-D-glucopyranose (**5**) (3.55 g, 10.32 mmol) και ο SnCl₄ (14.45 mmol, 1.69 mL) Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα (TLC, Πίνακας 5) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 110 °C. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, αραιώθηκε με AcOEt, εκχυλίστηκε με νερό και μετά από διήθηση συμπυκνώθηκε. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος αφού πρώτα διαλύθηκε σε CH₂Cl₂ σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Δ. Το επιθυμητό προϊόν **6** (2.33 g) ελήφθη σαν καθαρό παχύρευστο λάδι.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',4',6'-tri-O-acetyl-3'-methylene-β-D-glucopyranosyl)thymine (**6**)

TLC (Διάλυμα Δ)	R _f = 0,38
Απόδοση	55 %

3.3.3.6 Σύνθεση της 1-(3'-deoxy-3'-methylene-β-D-glucopyranosyl)thymine (7)

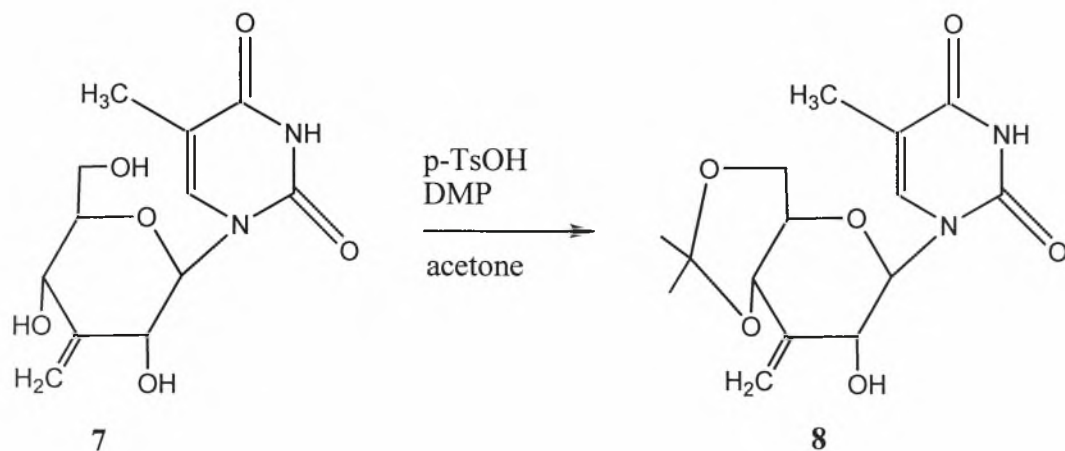


Η ένωση **6** (2.33 g, 5.67 mmol) που ελήφθη από την προηγούμενη διαδικασία, προστέθηκε σε 237 mL κορεσμένου διαλύματος στους 0 °C, αμμωνίας/MeOH. Το διάλυμα αναδεύτηκε ολόκληρη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώθηκε υπό μειωμένη πίεση. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC, διάλυμα E (πίνακας 6). Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα E. Το επιθυμητό προϊόν **7** (1.55 g) ελήφθη με άριστη απόδοση (96%).

Πίνακας 6: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3'-deoxy-3'-methylene-β-D-glucopyranosyl)thymine (**7**)

TLC (Διάλυμα E)	R _f = 0.45
Απόδοση	96 %

3.3.3.7 Σύνθεση της 1-(3'-deoxy-4',6'-O-isopropylidene-3'-methylene-β-D-glucopyranosyl)thymine (**8**)

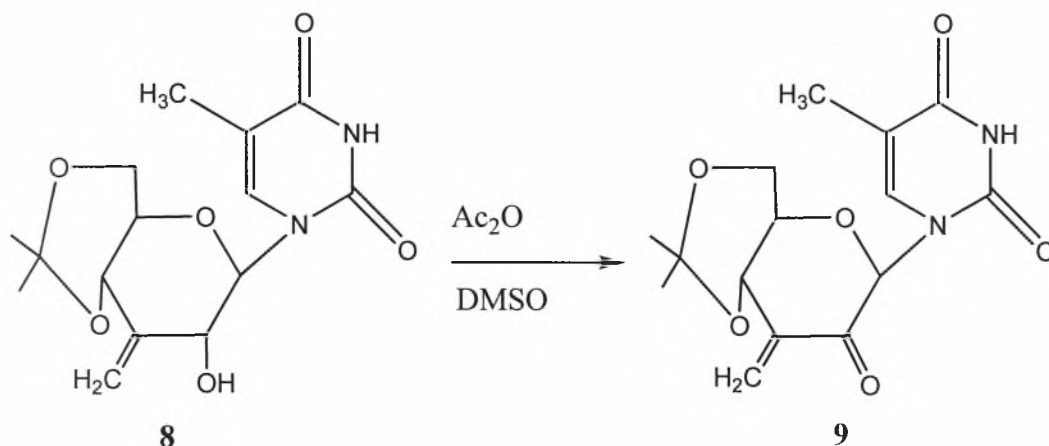


Σε ένα υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **7** (1.55 g, 5.45 mmol) με άνυδρη ακετόνη (93.12 mL) και DMP (4.87 mL) προστέθηκε p-TsOH (176.24 mg, 0.93 mmol). Μετά από 3 ώρες το μίγμα της αντίδρασης εξουδετερώθηκε με τριαιθυλαμίνη. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC σε AcOEt (πίνακας 7). Στη συνέχεια από το μίγμα απομακρύνθηκαν οι διαλύτες υπό υψηλό κενό και ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Δ. Το επιθυμητό προϊόν **8** (1.27g) ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 72 %.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3'-deoxy-4',6'-O-isopropylidene-3'-methylene-β-D-glucopyranosyl)thymine (**8**)

TLC (AcOEt)	R _f =0,66
Απόδοση	72 %

3.3.3.8 Σύνθεση της 1-(3'-deoxy-4',6'-O-isopropylidene-3'-methylene-β-D-glucopyranosyl-2'-ulose)thymine (9)

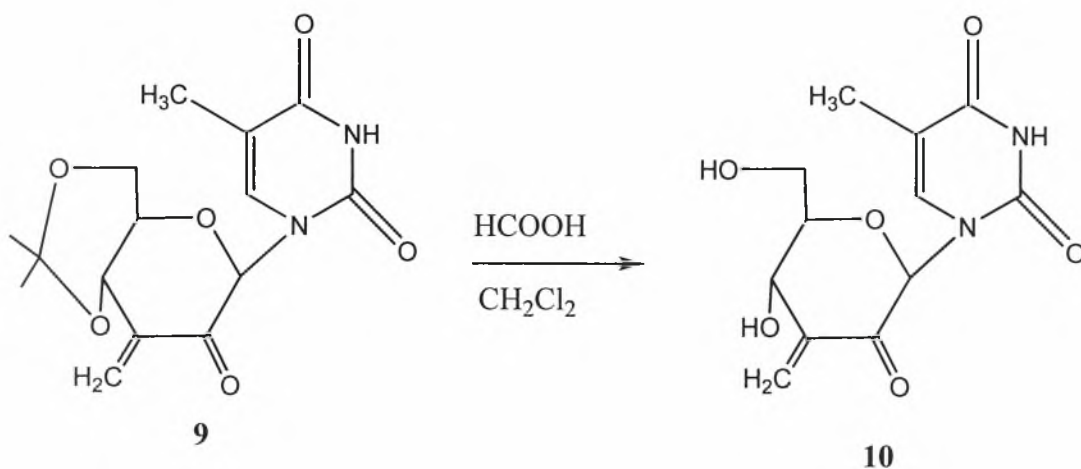


Η ένωση 1-(3'-deoxy-4',6'-O-isopropylidene-3'-methylene-β-D-glucopyranosyl)thymine (**8**) (1.27 g, 3.92 mmol) αναμιγνύεται με dry DMSO (19.05 mL) και Ac_2O (9.58 mL) και θερμαίνεται με κάθετο ψυκτήρα στους 98 °C για 8 λεπτά υπό άζωτο. Το μίγμα της αντίδρασης υφίσταται μερική συμπύκνωση υπό κενό και στη συνέχεια εκχυλίζεται με CH_2Cl_2 και πλένεται με H_2O . Στην οργανική φάση προστέθηκε άνυδρο Na_2SO_4 , ακολούθως διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Δ. Το επιθυμητό προϊόν **9** (0.61 g) ελήφθη με απόδοση της 48 %. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC (πίνακας 8).

Πίνακας 8 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3'-deoxy-4',6'-O-isopropylidene-3'-methylene-β-D-glucopyranosyl-2'-ulose)thymine (**9**)

TLC (Διάλυμα Δ)	$R_f = 0,44$
Απόδοση	48 %

3.3.3.9 Σύνθεση της 1-(3'-deoxy-3'-methylene-β-D-glucopyranosyl-2'-ulose)thymine (10)

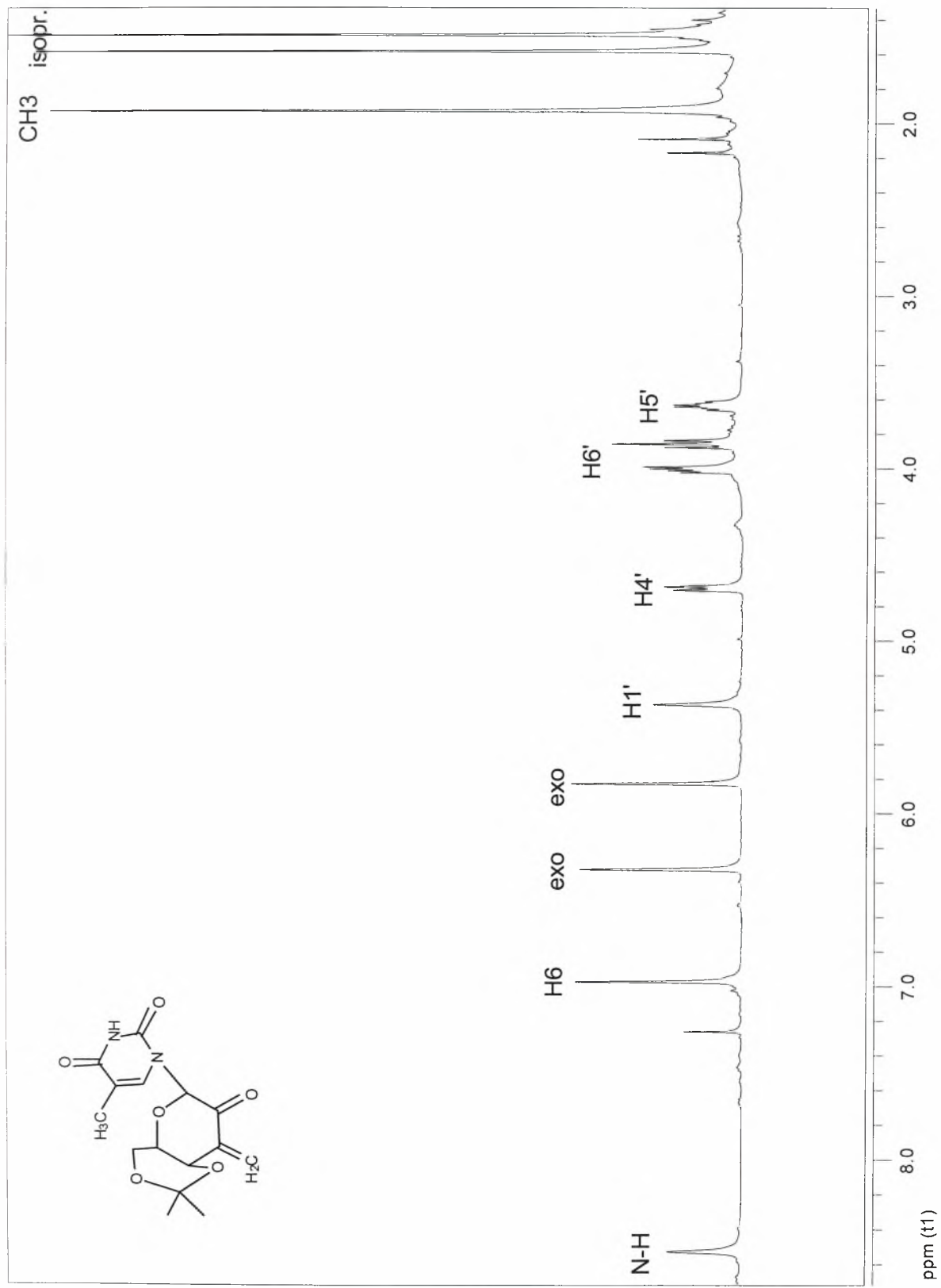


Η ένωση **9** (0.61 g, 1.88 mmol) που ελήφθη από την προηγούμενη διαδικασία, διαλύθηκε σε ένα μίγμα διχλωρομεθανίου (6.41 mL) και HCOOH (6.41 mL, 90%). Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό άζωτο, διαλύθηκε σε τολουόλιο, έπειτα σε μεθανόλη και στη συνέχεια συμπυκνώθηκε υπό κενό μέχρις ξηρού. Ακολούθησε ο καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης AcOEt. Το επιθυμητό προϊόν **10** (0.28 g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC (πίνακας 9).

Πίνακας 9 : Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3'-deoxy-3'-methylene-β-D-glucopyranosyl-2'-ulose)thymine (**10**)

TLC (AcOet)	R _f = 0,35
Απόδοση	53 %

4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR



Εικόνα 13. Φάσμα ^1H NMR του επιθυμητού προϊόντος 9

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης γλυκοπυρανονουκλεοζιτών. Η νέα αυτή τάξη αποτελείται από πυρανονουκλεοζίτες που φέρουν ως ετεροκυκλική βάση τη θυμίνη, εξωμεθυλένιο στη θέση 3' και κετονομάδα στη θέση 2' του σακχάρου. Η πιθανή αντιική, αντικαρκινική και βιολογική δράση αποτέλεσε το έναυσμα για την εύρεση μιας σχετικά εύκολης πειραματικής διαδικασίας, με σύντομα βήματα, για την σύνθεση αυτών των γλυκοπυρανονουκλεοζιτών.

Η εμπορικά διαθέσιμη 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidene- α -*D*-glucofuranose (**1**) μετατρέπεται σε τέσσερα στάδια στο σάκχαρο 1,2,4,6-tetra-*O*-acetyl-3-deoxy-3-methylene-*D*-glucopyranose (**5**) με πολύ καλή απόδοση. Μετά την αντίδραση συμπύκνωσης με τη θυμίνη επικράτησε το β ανωμερές με αρκετά καλή απόδοση 55%. Η σύνθεση της ένωσης 1-(3'-deoxy-3'-methylene- β -*D*-glucopyranosyl)thymine (**7**) μετά από αποπροστασία των θέσεων 2', 4' και 6' του σακχάρου είχε απόδοση 96%, ενώ ακολουθεί η εκλεκτική προστασία των θέσεων 4',6' με μια ομάδα ακετονιδίου με αποτέλεσμα τη λήψη της 1-(3'-deoxy-4',6'-*O*-isopropylidene-3'-methylene- β -*D*-glucopyranosyl)thymine (**8**), η οποία είχε απόδοση 72%. Τέλος, η σύνθεση των τελικών προϊόντων 1-(3'-deoxy-4',6'-*O*-isopropylidene-3'-methylene- β -*D*-glucopyranosyl-2'-ulose)thymine (**9**) και 1-(3'-deoxy-3'-methylene- β -*D*-glucopyranosyl-2'-ulose)thymine (**10**) είχε απόδοση 48% και 53%, αντίστοιχα.

Η ταυτοποίηση των παραπάνω ενώσεων έγινε μέσω του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H NMR.

Στο φάσμα ^1H NMR της ένωσης, 1-(3'-deoxy-4',6'-*O*-isopropylidene-3'-methylene- β -*D*-glucopyranosyl-2'-ulose)thymine (**9**) (Εικόνα 13), το σήμα του πρωτονίου H-1' του δακτυλίου του σακχάρου εμφανίζεται ως μια απλή κορυφή στην περιοχή των 5.40 ppm, ενώ το χαρακτηριστικό σήμα των πρωτονίων του εξωμεθυλενίου εμφανίζεται ως δύο απλές κορυφές στα 5.80 και 6.40 ppm. Το σήμα του πρωτονίου H-4' εμφανίζεται ως διπλή κορυφή στα 4.80 ppm. Τέλος, διακρίνονται τα σήματα των πρωτονίων H-5' και H-6' του σακχάρου ως πολλαπλές κορυφές περίπου στα 3.85 και 4.20 ppm αντίστοιχα, ενώ το σήμα των πρωτονίων του ισοπροπυλιδενίου εμφανίζεται στα 1.60 ppm. Στο συγκεκριμένο φάσμα επίσης εμφανίζεται το H-6 της θυμίνης στα 7.00 ppm ως απλή κορυφή και στα 2.00 ppm εμφανίζονται τα τρία υδρογόνα του μεθυλενίου της θέσης 5 της θυμίνης.

Η σύνθεση και η βιολογική δράση των πυρανονουκλεοζιτών που έχουν θυμίνη ως ετεροκυκλική βάση, εξωμεθυλένιο στη θέση 3' και κετονομάδα στη θέση 2' του σακχάρου αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες συντελούν στην αντιμετώπιση και στη θεραπεία ασθενειών δρώντας ως αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.

Οι κετονουκλεοζίτες αποτελούν το «κλειδί» που μεσολαβεί σε συνθετικές και βιοσυνθετικές διαδικασίες, πολλές από τις οποίες έχουν ως αποτέλεσμα αντιογκογονική δράση. Έχει βρεθεί ότι οι κετονουκλεοζίτες επιδεικνύουν αξιόλογη αντικαρκινική δράση αναστέλλοντας την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων.

Επίσης, νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξωμεθυλένιο χρησιμοποιούνται ως αποτελεσματικά φάρμακα για την αντιμετώπιση ασθενειών ή βρίσκονται υπό κλινικές μελέτες με σκοπό μακροπρόθεσμα να εφαρμοστεί η δράση τους. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που περιέχουν εξωμεθυλένιο φωσφορυλιώνονται από κινάση του κυττάρου ξενιστή και ενεργοποιούνται. Αυτή η ενεργός τους μορφή αναστέλλει τη δράση της ιικής DNA πολυμεράσης, επειδή δεσμεύονται στην ενεργό περιοχή του ενζύμου. Με αυτόν τον τρόπο δεν ολοκληρώνεται η αντιγραφή του γενετικού υλικού του ιού και έτσι ο ιός δεν καταφέρνει να επιβιώσει, να πολλαπλασιαστεί και να εξελιχθεί έτσι ώστε να δυσχεραίνει την υγεία του ασθενούς.

Η ραγδαία ανάπτυξη της φαρμακολογίας και της φαρμακευτικής χημείας συνετέλεσε στην ανέλιξη του βιοτικού επιπέδου, στη διεύρυνση των ορίων ηλικίας και στην αντιμετώπιση ασθενειών που δυσχεραίνουν τη ζωή του ατόμου. Φάρμακα που ως δραστική ουσία έχουν νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία θανατηφόρων ασθενειών όπως η ηπατίτιδα Β (HBV), AIDS και καρκίνος. Στον αντίποδα των θετικών ένα πλήθος αρνητικών συνεπειών κάνει την εμφάνισή του. Φαρμακευτικά σκευάσματα που περιέχουν νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι λογικό να έχουν παρενέργειες. Ένα μεγάλο μέρος της τοξικότητας των αναλόγων νουκλεοζιτών, συσχετίζεται άμεσα με το βαθμό, στον οποίο οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για τις ανθρώπινες κινάσες και πολυμεράσες. Οι περισσότεροι νουκλεοζίτες που χρησιμοποιούνται, παρουσιάζουν ήπια συμπτώματα όπως ναυτία, διάρροια, ίλιγγο, υπνηλία. Για το λόγο αυτό, οι έρευνες εντείνονται προκειμένου να βελτιωθεί η δράση τέτοιου τύπου φαρμακευτικών σκευασμάτων, να μειωθούν οι παρενέργειες και τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά.

Στα πλαίσια αυτού του ερευνητικού ενδιαφέροντος έγινε η σύνθεση μίας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων με μία κετονομάδα και μία εξωμεθυλενική ομάδα

στο δακτύλιο του σακχάρου, που είναι πιθανόν να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων ειδικευμένων θεραπευτικών ενώσεων, ικανών να αντιμετωπίσουν με επιτυχία σοβαρές ασθένειες.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botic, T.; Cencic, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5448.
- Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Tselios, T.; Botic, T.; Cencic, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1366.
- Alaoui, M.; Lasnes, C.; Antonakis, K.; Chouroulinkov, I. *Mutagenesis* **1986**, *1*, 411.
- Antonakis, K. "Hexopyranose nucleosides". In *Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C)*; Elsevier, Amsterdam, **1989**, *4*, p. 241.
- Antonakis, K. "Ketonucleosides". In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Tipson, R. S. and Horton, D. (Eds), Academic Press, New York, **1984**, *42*, p. 227.
- Antonakis, K.; Arvor, M. J. *C.R. Acad. Sci.* **1971**, 272-c, 1982.
- Antonakis, K.; Chouroulinkov, I. *Biochem. Pharmacol.* **1974**, *23*, 2095.
- Antonakis, K. *Chimia* **1975**, *29*, 59.
- Antonakis, K.; Egron, M. J. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 468.
- Antonakis, K.; Leclercq, F. *C. R. Acad. Sci., Ser. C* **1970**, *271*, 1197.
- Antonakis, K.; Leclercq, F. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1971**, 2142.
- Antonakis, K.; Halmos, T.; Bach, J.; Chouroulinkov, I. *Eur. J. Med. Chem.* **1980**, *15*, 237.
- Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* **1995**, *67*, 155.
- Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1879.
- Balzarini, J. *Pharmacy World Sci.* **1993**, *16*, 113.
- Benjamin Lewin, *Genes* VIII:6- 8.
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L., Stryer L. (**2001**). Βιοχημεία (Τόμος Ι) Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (p) 329-351.
- Brady, R. C.; Bernstein, D. I. *Antiviral Res.* **2001**, *61*, 73.
- Chong, Y.; Choo, H.; Lee, S.; Choi, Y.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4888.
- Chong, Y.; Gumina, G.; Mathew, J. S.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2003**, *45*, 3245.
- Chouroulinkov, I.; Antonakis, K. *C. R. Acad. Sci. Hebd Seances Acad. Sci. D.* **1977**, *285*, 1021.

- Clark, J. L.; Mason, J. C.; Hollecker, L.; Stuyver, L. J.; Tharnish, P. M.;McBrayer, T. R.; Otto, M. J.; Furman, A. P.; Schinazi, R. F.; Watanabe, K. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1712.
- Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 365.
- Christopher, J. Burns, Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Hepatitis C Virus (HCV), *Current Medicinal Chemistry- Anti-Infective Agents*, Vol. 4, No. 2, 2005.
- De Clercq, E. *Biochim Biophys Acta.* **2002**, *1587*, 258.
- Elion, G. B. The purine path to chromatography . *Science* **1989**, *244*, 41.
- Gumina, G.; Song, G. Y.; Chu, C. K. *FEMS Microbiology Letters* **2001**, *202*, 9.
- Gunaga, P.; Baba, M.;Jeong L.S. *J. Org. Chem.* **2004**,*69*, 3208.
- Halliwell, B., **(2001)**. Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopaedia of life sciences*
- Halmos, T.; Cardon, A.; Antonakis, K. *Chem.-Biol. Interactions* **1983**, *46*, 11.
- Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4963.
- Herdewijn, P.; De Clercq, E., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1591.
- Herdewijn, P.; Van Aerschot, A.; Kerremans, L. *Nucleosides Nucleotides* **1989**, *8*, 65.
- Jeong, L.S. ; Yoo, S.J. *Bioorg.Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 847.
- John M. Clark, Jr and Robert L. Switzer, Πειραματική βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1992.
- Khan, A. R.; Mulligan, K. X.; Redda, K. K.; Ollapally, A. P. *Synth. Commun.* **2002**, *32*, 1023.
- Komiotis, D.; Agelis, G.; Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E. *J. Carb. Chem.* **2006**, *25*, 441.
- Komiotis, D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides Nucleotides* **1991**, *10*, 431.
- Komiotis, D.; Lim, C. T.; Dieter, J. P.; Le Breton, G. C.; Venton, D. L. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3033.
- Komiotis, D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, *7*, 219.
- Leclercq, F.; Antonakis, K. *Carbohydr. Res.* **1988**, *181*, 217 and references cited therein.
- Leclercq, F.; Antonakis, K. *Carbohydr. Res.* **1989**, *193*, 307.

Lee, K.; Choi, Y.; Gumina, G.; Zhou, W.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1313.

Lin, T. S.; Luo, M. Z.; Liu, M. C.; Clarkatzenburg, R. H.; Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H.; Mancini, W. R.; Birnbaum, G. I.; Gabe, E.; Giziewicz, J. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2607.

MacCoss, M.; Robins, M. J. "Anticancer Pyrimidines, Pyrimidine Nucleosides and Prodrugs". In the chemistry of Antitumor Agents; Wilman, D. E. V. Ed.; Chapman and Hall: New York, **1990**, p. 261.

Matsuda, A.; Nakajima, Y.; Azuma, A.; Tanaka, M.; Sasaki, T. *J. Med. Chem.* **1991b**, *34*, 2917.

Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 105.

Matsuda, A.; Takenuki, K.; Sasaki, T.; Ueda, T. *J. Med. Chem.* **1991a**, *34*, 812.

Maurinsh, Y.; Schraml, J.; De Winter, H.; Blaton, N.; Peeters, O.; Lescrinier, E.; Rozenski, J.; Van Aerschot, A.; De Clercq, E.; Busson, R.; Herdewijn, P. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2861.

McMurry, John Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, **(2000)** : 151- 152, 905

Ollapally, A. P.; Dorange, I. B.; Whitaker, T. L. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*, 703.

Ostrowski, T.; Wroblowski, B.; Busson, R.; Rozenski, J.; De Clercq, E.; Bennet, M. S.; Champness, J. N.; Summers, W. C.; Sanderson, M. R.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4343.

Pastor-Anglada, M.; Felipe, A.; Casado, J. *TiPS* **1998**, *19*, 424.

Paterson, J.; Uriel, C.; Egron, M. J.; Herscovici, J.; Antonakis, K.; Alaoui, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 779.

Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* **1992**, *11*, 903.

Robins, R. K.; Kini, G. D. "Purines and Purine Nucleoside Analogues as Antitumor Agents". In The Chemistry of Antitumor Agents; Wilman, D. E. V. Ed. Chapman and Hall: New York, **1990**, p.299.

Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Ramsey, C. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2005**, *45*,287.

Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis, D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *International Journal of Molecular Sciences* **2007** *8*, 695

- Takenuki, K.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T.; Fujii, A.; Yamagami, K. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1063.
- Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Manta, S.; Agelis, G.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Archiv der Pharmazie* **2009**, *342*, 353.
- Undurti N.Das, *Med Sci Monit*, **2002** *8*, 79.
- Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3154.
- Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12757.
- Vender, M.D.; Sherman, P.D.; Luciano, P.D.; Tsakoulos, D.M.; Φυσιολογία του ανθρώπου: μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού. Εκδόσεις Πασχαλίδης (8^η εκδοση) **2001**.
- Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2033.
- Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Van Meervelt, L.; Rozenski, J.; Wiebe, L.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Claes, P.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 826.
- Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417.
- www.cf.ac.uk/phrmy/chemEd/presentations.html
- Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2319.
- Yoo S. J.; Kim, H.O.; Lim Y.; Kim J.; Jeong, L. S.; *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 215.
- Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3399.