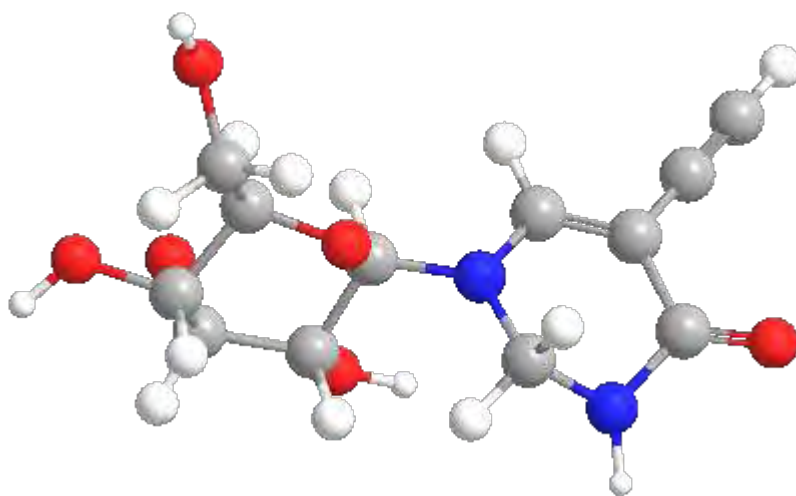


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΟ ΚΑΙ ΑΙΘΥΝΥΛΟ
ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΩΣ ΝΕΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ



ΚΑΡΕΛΙΩΤΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΟ ΚΑΙ ΑΙΘΥΝΥΛΟ
ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΩΣ ΝΕΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ**

ΚΑΡΕΛΙΩΤΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

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

Μαντά Στυλιανή – Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 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 Επίκουρου Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Κομιώτη Δημητρίου. Θα ήθελα να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στον κ. Κομιώτη, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα αλλά και για τη συμβολή του στη σωστή διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών, παρέχοντας μου τις πολύτιμες υποδείξεις του και τη πετυχημένη καθοδήγηση του.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Στυλιανή Μαντά, για την άψογη συνεργασία μας, καθώς και για τη φιλική σχέση που αποκτήσαμε. Οι συμβουλές και η πείρα της αποδείχθηκαν ιδιαίτερα ωφέλιμες για να κατανοήσω και να φέρω εις πέρας την εργασία που μου ανατέθηκε.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την ένθερμη υποδοχή τους, τη συμπαράστασή τους και τη βοήθεια τους, καθώς και για το ευχάριστο κλίμα που μου εξασφάλισαν στον εργαστηριακό χώρο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Υδατάνθρακες.....	6
1.2 Υδατάνθρακες και σχηματισμός ημιακετάλης.....	7
1.3 Νουκλεοζίτες.....	9
1.3.1 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί, αντικοί και αντιοξειδωτικοί παράγοντες... ..	10
1.3.2 Γλυκοζιτικά και νουκλεοζιτικά παράγωγα ως αντιδιαβητικά.....	11
2. ΣΚΟΠΟΣ	20
3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
3.1 Χρωματογραφία χάρτου/ λεπτής στιβάδας.....	22
3.2 Χρωματογραφία στήλης.....	23
3.3 Ξήρανση διαλυτών.....	23
4. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
4.1 Μεθοδολογία σύνθεσης.....	24
4.2 Επισκόπηση της συνθετικής οδού.....	25
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	26
5.1 Σύνθεση της 1,2,3,4,6-Πεντα-Ο-ακετυλο-D-Γλυκοπυρανόζης(2).....	26
5.2 Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-Τετρα-Ο-ακετυλο-α-D-γλυκοπυρανοζυλο)ιωδοουρακίλης (3).....	27
5.3 Σύνθεση της 1-(β-D-Γλυκοπυρανοζυλο)ιωδοουρακίλης(4).....	28
5.4 Σύνθεση της 1-β-D-Γλυκοπυρανοζυλο-5-τριμεθυλοσιλυλοαιθυνο-ουρακίλη(5a).....	29
5.5 Σύνθεση της 1-β-D-Γλυκοπυρανοζυλο-5-αιθυνο-ουρακίλη(5b).....	30
5.6 Σύνθεση της 1-β-D-Γλυκοπυρανοζυλο-5-φαινυλαιθυνο-ουρακίλη(5c).....	31
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	32
7. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR	35
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	36

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Έχει διαπιστωθεί ότι νουκλεοζίτες αποτελούμενοι από ολιγοσακχαρίτες συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση υπάρχουν σε πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντικαρκινική, αντιακτινική αλλά και αντιδιαβητική δράση. Αυτή η ανακάλυψη αποτέλεσε το έναυσμα για την σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών οι οποίοι αναμενόταν να συμβάλλουν καθοριστικά στην αντιϊική, αντικαρκινική και αντιδιαβητική θεραπεία. Οι κλινικές έρευνες που ακολούθησαν πιστοποίησαν την υπόνοια αυτή και έτσι άνοιξαν νέοι δρόμοι προς την χρήση τροποποιημένων νουκλεοζιτών για την καταπολέμηση ιϊκών μολύνσεων και κάποιων μορφών καρκίνου. Μια σχετικά νέα πιθανή εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων είναι η χρήση τους για την ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου II. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα ένζυμο που μπορεί να αποτελέσει στόχο φαρμακευτικής παρέμβασης διότι εμπλέκεται στην διάσπαση του γλυκογόνου προς παραγωγή γλυκόζης (Somsák L. *et al*, 2003). Εκλεκτικοί και ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στον έλεγχο της αποδόμησης του γλυκογόνου και κατά συνέπεια στον έλεγχο της παροχής γλυκόζης προς το κύτταρο (Somsák L. *et al*, 2008). Νουκλεοζιτικά ανάλογα, όπως οι 1-(3'-δεοξυ-3'-φθορο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο) πυριμιδινικοί νουκλεοζίτες, παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και επιπλέον έχει μελετηθεί η σχέση δομής-δράσης τους ώστε να δοθούν κατευθύνσεις προς την ανάπτυξη ισχυρότερων αναστολέων (Tsirkone V. *et al*, 2010).

Στη μελέτη των πυριμιδινονουκλεοζιτών δόθηκε το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, στην προσπάθεια να ανακαλυφθούν νέα αντιδιαβητικά, αντικαρκινικά και αντιϊικά φάρμακα με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και με λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα έναντι των έως τώρα χρησιμοποιούμενων ενώσεων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι μια από τις τέσσερις κύριες κατηγορίες βιομορίων και υπάρχουν σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Απαντώνται ευρέως στην φύση και αποτελούν μια ομάδα οργανικών ενώσεων. Ως γενικό χημικό τύπο έχουν την μορφή $C_n(H_2O)_n$. Επειδή αποτελούν πηγή ενέργειας, δομικά στοιχεία των κυττάρων, καθώς και μέρος άλλων μακρομορίων, όπως είναι γλυκοπρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα, η βιολογική σημασία αυτών των μορίων είναι τεράστια.

Τα μοριακά βάρη των υδατανθράκων ποικίλουν. Κάποιοι υδατάνθρακες μπορεί να είναι μικροί με μοριακά βάρη μικρότερα του 100 ενώ άλλοι μπορεί να είναι μεγάλα μακρομόρια με μοριακό βάρος πολλές εκατοντάδες ή χιλιάδες. Τα σάκχαρα είναι οι δομικές μονάδες όλων των υδατανθράκων. Με βάση τον αριθμό των μορίων των σακχάρων που συνδέονται σε ένα μόριο τους οι υδατάνθρακες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν.

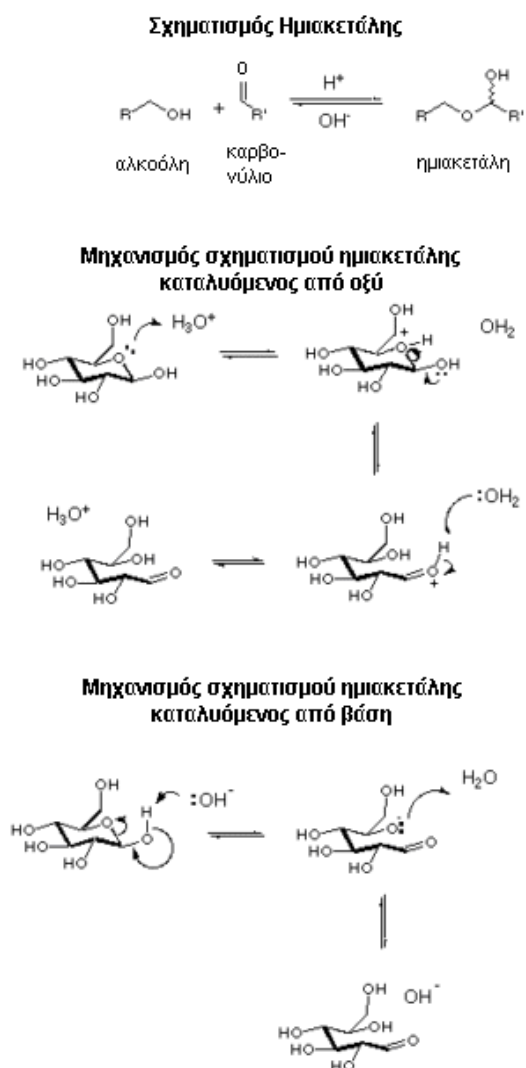
Ο παρακάτω πίνακας δείχνει τους κύριους τύπους διαιτητικών υδατανθράκων.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ	
<u>ΜΟΝΟΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ</u>	γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη
<u>ΔΙΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ</u>	σουκρόζη, λακτόζη, μαλτόζη
<u>ΠΟΛΥΟΛΕΣ</u>	ισομαλτιτόλη, σορβιτόλη, μαλτιτόλη
<u>ΟΛΙΓΟΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ</u>	μαλτοδεξτρίνες, φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες
<u>ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ</u>	άμυλο: αμυλόζη, αμυλοπηκτίνη
Πολυσακχαρίτες	Μη αμυλούχοι: Κυτταρίνη, πηκτίνες, υδροκολλοειδή

Οι απλούστεροι υδατάνθρακες είναι οι μονοσακχαρίτες και μπορεί να είναι αλδεύδες ή κετόνες με δύο ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Απλοί μονοσακχαρίτες με τέσσερα, πέντε, έξι και επτά άτομα άνθρακα καλούνται τετρόζες, πεντόζες, εξόζες και επτόζες αντίστοιχα.

1.2 Υδατάνθρακες και Σχηματισμός Ημιακετάλης

Οι μονοσακχαρίτες απαντώνται σε δύο μορφές είτε στην μορφή ανοιχτής αλυσίδας είτε στην κυκλοποιημένη τους μορφή. Ο επικρατέστερος τύπος γλυκόζης και φρουκτόζης (που αποτελούνται από έξι άτομα άνθρακα) σε διάλυμα δεν είναι η ανοικτή αλυσίδα, αφού οι ανοικτές αλυσίδες αυτών των ενώσεων κυκλοποιούνται σε σε δακτύλιους ⁽¹⁾. Γενικά, μια καρβονυλική ένωση αντιδρά με μια αλκοόλη για να σχηματίσει μια ημιακετάλη (εικόνα 1).



Η αντίδραση μιας καρβονυλικής ένωσης με μια αλκοόλη έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας ημιακετάλης.

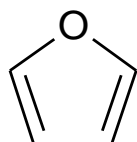
Η αντίδραση του σχηματισμού ημιακετάλης είναι μια αμφίδρομη αντίδραση η οποία καταλύεται παρουσία και οξέος (H_3O^+) και βάσης (OH^-).

Ο μηχανισμός σχηματισμού της ημιακετάλης περιλαμβάνει:

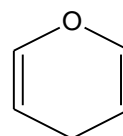
- A) Πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου η οποία πολώνει έντονα το καρβονύλιο.
- B) Ενεργοποίηση της καρβονυλικής ομάδας για πυρηνόφιλη προσβολή από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου των H_3O^+ ή OH^- .
- Γ) απόσπαση ενός πρωτονίου οδηγεί στο σχηματισμό μιας ουδέτερης ακετάλης.

Εικόνα 1. Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης

Δυο παραδείγματα τέτοιας αντίδρασης είναι η δημιουργία φουρανόζης από την φρουκτόζη και η δημιουργία πυρανόζης από την γλυκόζη. Στην περίπτωση της γλυκόζης, η αλδεϋδική ομάδα του άνθρακα C-1 αντιδρά με το υδροξύλιο που βρίσκεται στην θέση C-5, σχηματίζοντας μια ενδομοριακή ημιακετάλη και στην συνέχεια παράγοντας τον εξαμελή δακτύλιο της πυρανόζης. Ενώ στη φρουκτόζη η κετονική ομάδα του άνθρακα C-2 του τύπου της ανοικτής αλυσίδας είναι σε θέση να αντιδράσει με την υδροξυλική ομάδα του άνθρακα C-5 για να σχηματιστεί μια ενδομοριακή ημιακετάλη. Ο πενταμελής δακτύλιος του σακχάρου καλείται φουρανόζη, λόγω της ομοιότητας του με το φουράνιο (εικόνα 2).



Εικόνα 2. (α) φουράνιο ⁽²⁾

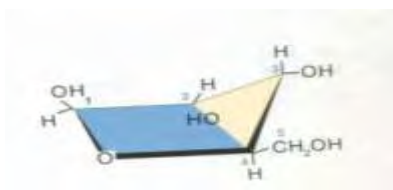


(β) Πυράνιο

Η κυκλοποίηση των σακχάρων μέσω ημιακετάλης είναι μέγιστης σημασίας διότι έτσι σχηματίζεται ένα πρόσθετο στερεογονικό κέντρο στο μόριο και εμφανίζεται το φαινόμενο της ανωμέρειας. Στην περίπτωση της γλυκόζης ο άνθρακας C-1 είναι ανωμερής με αποτέλεσμα να μπορούν να σχηματιστούν δυο στερεοχημικές δομές : η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη .Στην περίπτωση της φρουκτόζης, ο ανωμερής άνθρακας είναι ο C-2. Έτσι, μπορούν να σχηματιστούν δυο δομές η α-D-φρουκτοφουρανόζη και η β-D- φρουκτοφουρανόζη. Ο χαρακτηρισμός α σημαίνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον άνθρακα C-2 βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου, ενώ β σημαίνει ότι βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου.

Οι δακτύλιοι της πυρανόζης και της φουρανόζης μπορούν να αποκτήσουν διάφορες στερεοδιαμορφώσεις ενώ δεν είναι επίπεδοι στο χώρο. Μπορούν να είναι

πτυχωμένοι έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού (εικόνα 3).

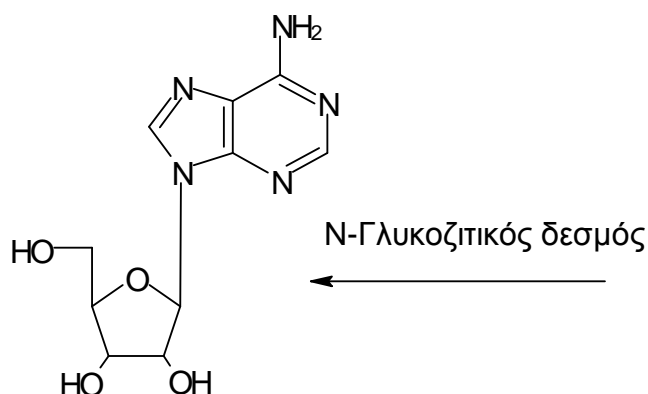


Εικόνα 3. Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης ⁽²⁾

1.3 Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες, οι οποίες προκύπτουν από την ένωση ενός σακχάρου που μπορεί να είναι είτε δεοξυριβόζη είτε ριβόζη με μια εκ των βάσεων (θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, αδενίνη, ουρακίλη). Επειδή αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στην φύση. Κάποια παραδείγματα τέτοιων ριβονουκλεοζιτών είναι η γουανοσίνη, η κυτιδίνη, η θυμιδίνη και η αδενοσίνη.

Η χημική δομή των νουκλεοζιτών είναι η εξής: αποτελούνται από μια βάση, που είναι είτε μια πουρίνη είτε μια πυριμιδίνη, ενωμένη με τον C-1 μιας πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό (Berg J. M. *et al*, 2001). Όταν στη φύση απαντώνται N-γλυκοζιτικοί δεσμοί πάντα η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου, οπότε χαρακτηρίζονται ως νουκλεοζίτες β στερεοδιάταξης (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Η β-στερεοδιάταξη του N-γλυκοζιτικού δεσμού της αδενοσίνης

Οι νουκλεοζίτες και τα τροποποιημένα ανάλογά τους έχουν προκαλέσει το έντονο ενδιαφέρον και έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης μελέτης διότι επιδεικνύουν αντικαρκινικές, αντιιικές και υπογλυκαιμικές ιδιότητες (Tsirkone G. *et*

al, 2010; Balatsos N. A. *et al*, 2009; Tiwari N. *et al*, 2009) Η έρευνα για όσο το δυνατό καλύτερη κατανόηση της σχέσης δομής-δράσης των νουκλεοζιτών έχει ενταθεί με στόχο την δημιουργία ισχυρότερων αναλόγων που θα επεκτείνουν το φάσμα των θεραπευτικών εφαρμογών τους.

1.3.1 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί, αντιικοί και αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια αποτελεί η ανακάλυψη των αντικαρκινικών και κυτταροστατικών ιδιοτήτων των νουκλεοζιτών και των αναλόγων τους (Balatsos, N. A. *et al*, 2009; Tzioumaki N. *et al*, 2009; Agelis G. *et al*, 2008; Tsoukala E. *et al*, 2007). Ήδη, οι αντιμεταβολίτες που κάποιοι από αυτούς συμπεριλαμβάνονται στην κατηγορία των νουκλεοζιτών, χρησιμοποιούνται ως πρώτη γραμμή φαρμακευτικής αντιμετώπισης, εκτεταμένα στην ιατρική, κατά πολλών διαφορετικών μορφών νεοπλασιών στοχεύοντας στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Τέτοιοι αντιμεταβολίτες, όπως οι 1-(2'-deoxy -2'-methylene-β-D-erythropentofurano)κυτοσίνη (DMDC) και 1-β-D-arabino-furanoxycytosine (araC) έχουν εμφανίσει εξαιρετικές κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι διαφόρων τύπων λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Matsuda A. *et al*, 2004; Cory A. H. *et al*, 1994; Yamagami K. *et al*, 1991; Lin T. S. *et al*, 1991; Baker C. H. *et al*, 1991). Στις πιο πρόσφατες μελέτες αποδείχθηκε επίσης πως τα ανάλογα των νουκλεοζιτών έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την προσφορά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui V. *et al*, 2010; Bhat U. G. *et al*, 2010).

Επιπλέον, στην σύνθεση του DNA και του RNA παρεμβάλλονται οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους και έτσι μπορούν να επηρεάσουν εκτός από την σύνθεση νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων και τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς που συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό των ιών. Έτσι, θέτουν ισχυρά θεμέλια για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων (Agelis G. *et al*, 2008; Komiotis D. *et al*, 2008; Agelis G. *et al*, 2007; Zhou W. *et al*, 2004; Perigaund C. *et al*, 1992; Komiotis D. *et al*, 1991). Ήδη πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ιών όπως του ιού που προκαλεί το AIDS (HIV), του ιού της ηπατίτιδας B (HBV), του κυτταρομεγαλοϊού (CMV), του ιού του έρπητα

ζωστήρα (VZV), και γενικά των ερπητοϊών (HSV 1-2). Για τη θεραπεία του HIV ανάμεσα στα νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται είναι και τα ddC, AZT, ddI, abacavir, d4T και 3TC που δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού. Για τον CMV, τον HSV 1 και 2 και τον VZV χρησιμοποιείται πλήθος νουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως βιδαραβίνη, ακυκλοβίρη, ιδοξουριδίνη, τριφλουριδίνη, ασεδουρίδη, γανσικλοβίρη, βαλακυκλοβίρη και άλλα (Gumina G. *et al*, 2001). Για τον ιό HBV χρησιμοποιείται το 3TC σε συνδιασμό με ιντερφερόνη-α κάτι που έχει ήδη εγκριθεί στην Αμερική.

Τέλος, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα εκτός των αντικαρκινικών και αντιικών δράσεών τους, έχουν επιδείξει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Spanou C. *et al*, 2007). Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται οποιαδήποτε ουσία, η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες του προς οξείδωση υποστρώματος δύναται να επιβραδύνει ή να αποτρέψει πλήρως την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Halliwell B. 2001). Ένα παράδειγμα νουκλεοζιτικής σειράς αναλόγων που παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση είναι οι πυρανονουκλεοζίτες της μαννόζης, της γαλακτόζης και της φθορογλυκόζης (Spanou C. *et al*, 2007). Τα συγκεκριμένα ανάλογα όταν φέρουν α,β-κετοακόρεστο σύστημα στο σάκχαρό τους εμφανίζουν αποτελεσματικότητα κατά ελεύθερων ριζών ROO[•]. Αντίθετα, όσα δεν έφεραν το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό είχαν περιορισμένη δράση ως αντιοξειδωτικά, απαιτώντας πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις για την εκδήλωση αποτελεσμάτων.

1.3.2 Γλυκοζιτικά και νουκλεοζιτικά παράγωγα ως αντιδιαβητικά

Οι προσπάθειες για την αντιμετώπιση του διαβήτη έχουν επικεντρωθεί σε αγωγές που περιλαμβάνουν δίαιτα, άσκηση, υπογλυκαιμικά φάρμακα και αν αυτά αποτύχουν, σε χορήγηση ινσουλίνης. Οι προσεγγίσεις αυτές δεν είναι πάντοτε ικανοποιητικές, επομένως, υπάρχει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων για τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο με σκοπό την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου. Η ανακάλυψη αντιδιαβητικών φαρμάκων αποτελεί ένα από τους κύριους στόχους των ερευνητικών τμημάτων πολλών μεγάλων φαρμακοβιομηχανιών (AstraZeneca, Aventis Pharma, Pfizer, Novo Nordisk A/S, κ.ά.). Οι υπάρχουσες θεραπείες είναι ατελείς ή προκαλούν σημαντικές ανεπιθύμητες

ενέργειες. Η διεθνής ερευνητική προσπάθεια εστιάζεται σε αντιγονοειδικές ή γενικότερα εξειδικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις με ενδεχομένως ριζικά αποτελέσματα. Στην προσπάθεια αυτή η απόλυτη γνώση της σχέσης δομής-δράσης είναι απαραίτητη.

Αντικείμενο της συγκεκριμένης πτυχιακής είναι ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων τροποποιημένων γλυκοπυρανόζυλο νουκλεοζιτών, οι οποίοι συμβάλλουν στην αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, με προοπτική τη χρήση τους ως υπογλυκαιμικά φάρμακα. Ο μακρομοριακός στόχος που μελετήθηκε, με σκοπό την ανάπτυξη υπογλυκαιμικών φαρμάκων, είναι η ηπατική φωσφορυλάση γλυκογόνου (GP). Η GP αποτελεί σήμερα, αυτόν τον ελκυστικό στόχο για την ανακάλυψη νέων αποτελεσματικότερων υπογλυκαιμικών φαρμάκων, αφού αποτελεί ένα ένζυμο με κεντρικό ρυθμιστικό ρόλο στη μεταβολική πορεία της γλυκογονόλυσης.

Η GP είναι μία αλλοστερική πρωτεΐνη και υφίσταται σε δύο μορφές, GPb (ανεργός, T-διαμόρφωση) και GPa (ενεργός, R-διαμόρφωση). Στον ήρεμο μυ, υπάρχει ως GPb, η οποία ενεργοποιείται είτε με AMP είτε με φωσφορυλίωση προς GPa με τη δράση της κινάσης της φωσφορυλάσης (PhK). Η Glc-1-P χρησιμοποιείται μέσω της γλυκόλυσης για την παραγωγή ενέργειας και στο ήπαρ μετατρέπεται προς γλυκόζη [Oikonomakos and Somsak, 2008]. Η GP παίζει βασικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου, η οποία είναι η κύρια μορφή αποθήκευσης υδατανδράκων στα κύτταρα των θηλαστικών. Επιπλέον, το ένζυμο καταλύει το πρώτο στάδιο της ενδοκυτταρικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου προς 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P). Η γλυκόζη, που αποτελεί τον φυσιολογικό ρυθμιστικό παράγοντα του μεταβολισμού του γλυκογόνου, προκαλεί απενεργοποίηση της GP και δρα συνεργιστικά με την ινσουλίνη, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η αποικοδόμηση και παράλληλα να αυξάνεται η σύνθεση του γλυκογόνου (που οφείλεται στη δράση της γλυκογονικής συνθάσης, GS) [Oikonomakos, 2002]. Η αναστολή της δράσης της GP από τη γλυκόζη έχει φυσιολογική σημασία στο ήπαρ. Ως εκ τούτου, ενώσεις με ισχυρότερη ανασταλτική δράση (σε σύγκριση με τη δράση της γλυκόζης) έχουν την ικανότητα να μετατοπίζουν την ισορροπία αποικοδόμησης (\leftrightarrow) σύνθεσης γλυκογόνου προς την κατεύθυνση της σύνθεσης, παρουσιάζοντας ενδεχομένως κλινικό ενδιαφέρον για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου II.

Υπάρχουν βασικά δυο τύποι διαβήτη, ο τύπου I και ο τύπου II. Ο τύπου I διαβήτης εμφανίζεται συνήθως σε παιδιά και ενήλικες κάτω των 30 ετών. Ο τύπου II διαβήτης

είναι αποτέλεσμα προοδευτικής δυσλειτουργίας των β-κυττάρων του παγκρέατος και της μειωμένης ικανότητας των κυττάρων του σώματος να χρησιμοποιήσουν την ινσουλίνη που είναι γνωστή και σαν ινσουλινοαντίσταση. Ο διαβήτης τύπου II λέγεται και μη ινσουλινοεξαρτώμενος ή διαβήτης των ενηλίκων. Ο χαρακτηρισμός του ως διαβήτης των ενηλίκων, οφείλεται στο γεγονός ότι κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Συνήθως πάντως εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 χρονών και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών. Στο διαβήτη τύπου II το πάγκρεας παράγει ινσουλίνη. Η ινσουλίνη όμως που παράγεται δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό. Τελικά και η μορφή αυτή του διαβήτη, μπορεί να καταλήξει σε αδυναμία του σώματος να χρησιμοποιήσει το σάκχαρο σαν την κύρια πηγή ενέργειας.

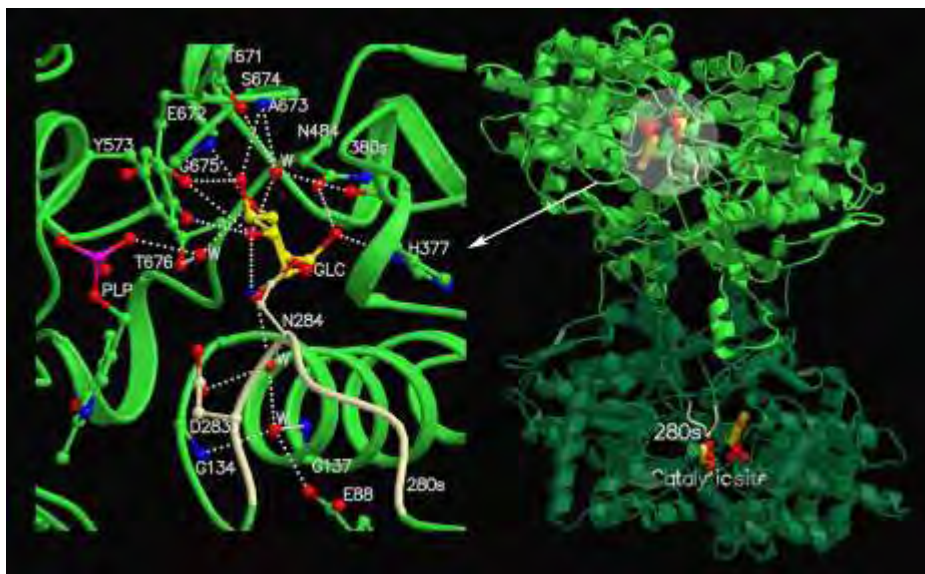
Ωστόσο, η επιβίωση του ατόμου δεν εξαρτάται -σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου I - από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, γι' αυτό και ο διαβήτης τύπου I ονομάζεται και "μη ινσουλινοεξαρτώμενος". Ο διαβήτης τύπου II αποτελεί τη συχνότερη μορφή διαβήτη. Περίπου το 90-95% όλων των περιπτώσεων διαβήτη είναι μορφές διαβήτη τύπου II. Η παχυσαρκία αποτελεί σαφή προδιαθεσικό παράγοντα, αφού σε ποσοστό 80% περίπου, τα άτομα με διαβήτη τύπου II είναι παχύσαρκα. Τα συμπτώματα στο διαβήτη τύπου II εισβάλλουν σταδιακά και δεν είναι τόσο θορυβώδη, όπως εκείνα του διαβήτη τύπου I. Αδυναμία, κόπωση, αδιαθεσία, συχνουρία (ειδικά το βράδυ), δίψα, θολή όραση, συχνές λοιμώξεις, αργή επούλωση των πληγών είναι μερικά από τα συμπτώματα που μπορεί να υποκρύπτουν τη διάγνωση του διαβήτη τύπου II. Η αιτιολογία του τύπου II διαβήτη δεν είναι γνωστή αλλά πολλές αναλύσεις συγκλίνουν στο ότι οφείλεται σε έναν συνδυασμό γενετικής προδιάθεσης και εξωτερικών/περιβαλλοντικών παραγόντων. Αυτοί οι εξωτερικοί παράγοντες είναι η μειωμένη φυσική δραστηριότητα και η αύξηση της ημερήσιας πρόσληψης θερμίδων και ειδικότερα λίπους. Η επίπτωση των εξωτερικών αυτών παραγόντων στην εμφάνιση του διαβήτη τύπου II είναι η βάση για την παγκόσμια αύξηση του επιπολασμού του, που έχει πάρει διαστάσεις επιδημίας.

Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση διαβήτη τύπου II είναι:

- Οικογενειακό ιστορικό με διαβήτη τύπου II
- Ηλικία άνω των 45

- Ένδειξη διαταραγμένης ανοχής στη γλυκόζη
- Καθιστική ζωή
- Αυξημένο σωματικό βάρος
- Διαβήτης κύησης

Για το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων χρησιμοποιούνται ως «στόχοι» τα επί μέρους κέντρα σύνδεσης του ενζύμου, τα οποία παρουσιάζονται στο **Σχήμα 1**. Η γνώση της τρισδιάστατης δομής της α-D γλυκόζης ως συμπλόκου με την RMGPb βοήθησε στη λεπτομερή καταγραφή των αλληλεπιδράσεων αυτής με τα αμινοξέα στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου και ειδικότερα με την πλευρική αλυσίδα των Asn284 και Asp283 (**Σχήμα 1**). Τα αμινοξέα αυτά προέρχονται από τον εύκαμπτο βρόχο 280, ο οποίος παρεμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο.



Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση του τρόπου σύνδεσης της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb. Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές. Υποδεικνύεται η θέση του βρόχου 280s με υποκίτρινο χρώμα.

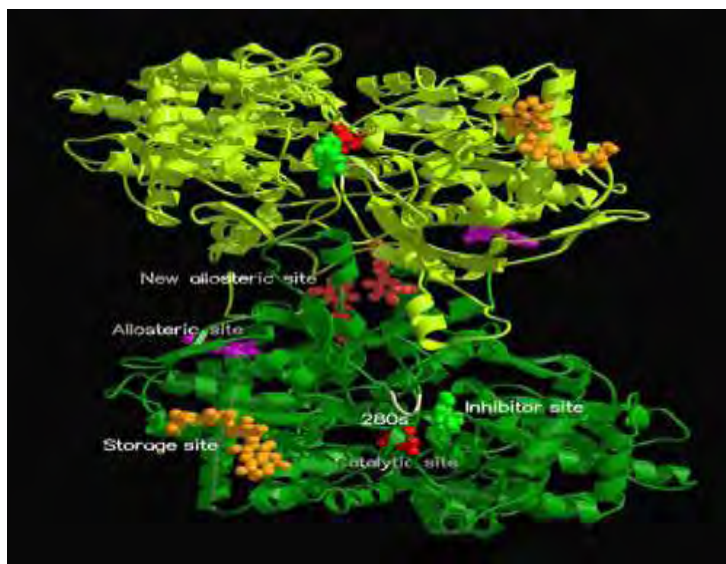
Η γλυκόζη αποτέλεσε πρόδρομο ένωση για το σχεδιασμό νέων αναστολέων, αναλόγων αυτής οι οποίοι μελετήθηκαν με βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μεθόδους. Αξίζει να σημειωθούν οι πρώτες πρόδρομες ενώσεις της N-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλαμίνης (1-GlcNac) με σταθερά αναστολής $K_i=32 \mu\text{M} \sim 60$ φορές καλύτερη από αυτή της γλυκόζης. Πλήθος ενώσεων, αναλόγων γλυκόζης, έχει

μελετηθεί και νέοι ισχυροί αναστολείς του ενζύμου έχουν ήδη ταυτοποιηθεί (στο εύρος των nM) με στόχο τόσο το καταλυτικό όσο και άλλα κέντρα σύνδεσης του ενζύμου [Oikonomakos 2008, Somsak et al. 2008].

Πρόσφατα, ένας αριθμός υποκαταστατών στη 3'-θέση (αξονικές και ισημερινές) του τμήματος της γλυκόζης έχει μελετηθεί *in silico* χρησιμοποιώντας α -D-γλυκόζη σαν μοντέλο [Lamprakakis et al. 2009]. Τα αποτελέσματα προέβλεπαν ότι καμία από τις ισημερινές υποκαταστάσεις δε θα αποδώσει καλύτερα τις GPb συγγένειες από ότι η υδροξυλική ομάδα -OH στην α -D-γλυκόζη. Όμως, για την αξονική θέση -CH₂OH προβλέπεται να είναι πιο δραστική. Συνεπώς, αυτή η ελπιδοφόρα υποκατάσταση θεωρείται υποψήφια για τη σύνθεση και την *in vitro* κινητική ανάλυση.

Τα τελευταία 6 έτη, μελέτες κατευθυνόμενου (από την 3D) σχεδιασμού, κινητικές και κρυσταλλογραφικές αναλύσεις έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη πληθώρας (>100 ενώσεων) παραγώγων του α - και β -ανυδρο-γλυκο-επτονικού οξέος, της 1-δεσοξυ-1-θειο- β -D-γλυκόζης, της β -D-γλυκοκυρανοζυλαμίνης και της σπιρουδαντοΐνης. με αυξημένη χημική συγγένεια (συγκριτικά με την α -D-γλυκόζη) προς τη GPb (Kontou et al. 2000, Tiraidis et al. 2007, Zographos et al. 2007, Zographos et al. 1997). Σε νεώτερη μελέτη, η ένωση (-)(S)-3-isopropyl 4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-1-ethyl-2-methyl-pyridine-3,5,6-tricarboxylate (W1807), της οποίας η σύνθεση έγινε στα εργαστήρια της Bayer AG βρέθηκε ως ο πλέον ισχυρός (μέχρι σήμερα) αναστολέας της GPb (με σταθερά αναστολής, $K_i=1.6$ nM, δηλαδή 106 φορές μικρότερη της αντίστοιχης K_i για την α -D-γλυκόζη). Η κρυσταλλογραφική ανάλυση του συμπλόκου GPb-W1807, σε ευκρίνεια 2.3 Å (Zographos et al, 1997) και του συμπλόκου GP α - α -D-γλυκόζη-W1807, σε ευκρίνεια 2.1 Å (Oikonomakos et al, 1999) αποκάλυψε ότι η W1807 συνδέεται στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου (κέντρο σύνδεσης του AMP). Πρόσφατες μελέτες, στην κατεύθυνση ταυτοποίησης ενώσεων με ενδεχόμενο κλινικό ενδιαφέρον στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο διαβήτη τύπου II, οδήγησαν στην ανακάλυψη μιας νέας τάξης αναστολέων της γλυκογονικής φωσφορυλάσης (Hoover et al. 1998; Martin et al. 1998). Η ένωση 5-chloro-1H-indole-2-carboxylic acid [1-(4-fluorobenzyl)-2-(4-hydroxypiperidin-1-yl)-2-oxoethyl]amide (CP320626) είναι ισχυρός αναστολέας της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης α ($IC_{50}=1$ μ M), δρα συνεργιστικά με τη γλυκόζη ($IC_{50}=0.13$ μ M) και προκαλεί ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης σε διαβητικά ob/ob ποντίκια (χωρίς να μεταβάλλονται τα επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος) (Oikonomakos and Somsak, 2008).

Προφανώς, η κατανόηση του μηχανισμού δράσης αυτής και χημικά συγγενών ενώσεων καθώς επίσης και ο σχεδιασμός δομικών αναλόγων, αυξημένης συγγένειας και εξειδίκευσης προς τη φωσφορυλάση, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη φαρμάκων για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου II. Η κρυσταλλογραφική ανάλυση του συμπλόκου GPb-CP320626 (Oikonomakos et al, 2000) αποκάλυψε ένα νέο αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης, που βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς (**Σχήμα 2**), στη μεσεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Το νέο κέντρο σύνδεσης απέχει > 30 Å από το καταλυτικό κέντρο, όμως, η σύνδεση της ένωσης CP320626 προκαλεί σταθεροποίηση της ανενεργούς T-διαμόρφωσης (ή επάγει την ανενεργό T διαμόρφωση).



Σχήμα 2. απεικόνιση της δομής της GPb (ως προς τον άξονα συμμετρίας 2ης τάξης), με τα κέντρα σύνδεσης που αποτελούν «στόχους» για το σχεδιασμό υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η μία υπομονάδα αποδίδεται με σκούρο πράσινο και η άλλη με ανοιχτό πράσινο. Το καταλυτικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης του υποστρώματος-Glc-1-P και του αναστολέα-γλυκόζης) βρίσκεται στο κέντρο του μορίου. Στην T-διαμόρφωση δεν υπάρχει άμεση πρόσβαση προς το καταλυτικό κέντρο από τον περιβάλλοντα διαλύτη. Η πρόσβαση γίνεται μέσω ενός καναλιού πλάτους ~5 Å και μήκους περίπου ~15 Å, αλλά περιορίζεται (κυρίως) από το βρόχο 280s (αμινοξικής αλληλουχίας 282-286) (κίτρινο). Η φλαβοπιριδόλη συνδέεται στο κέντρο αναστολής που απαρτίζεται από ομάδες με υδροφοβικά χαρακτηριστικά (Phe285 από το βρόχο 282-286 και Tyr613) και βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου (~12 Å). Η κατάληψη του κέντρου αναστολής αναστέλλει τη δράση του ενζύμου συνεργιστικά με τη γλυκόζη. Το αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης του ενεργοποιητή AMP και αναστολέα W1807), εντοπίζεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων και απέχει από το καταλυτικό κέντρο περίπου 30 Å. Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς και απέχει 15 Å από το αλλοστερικό, 33 Å από το καταλυτικό και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Το κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου (μέσω του οποίου η φωσφορυλάση συνδέεται στα σωματίδια γλυκογόνου *in vivo*), βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου, σε απόσταση 30 Å από το καταλυτικό και 40 Å από το αλλοστερικό κέντρο.

Η φλαβοπιριδόλη (L86-8276), ισχυρός αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) και εν δυνάμει αντικαρκινικό φάρμακο (κλινική φάση II), βρέθηκε να αναστέλλει τη GP και να προκαλεί συσσώρευση γλυκογόνου σε A549 NSCLC κύτταρα (Kaiser et al. 2001). Οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων GPb-φλαβοπιριδόλης (1.76 Å) και GPa-α-D-γλυκόζη-φλαβοπιριδόλης (2.23 Å) έδειξαν ότι η φλαβοπιριδόλη συνδέεται στο κέντρο αναστολής, το οποίο, στην T-διαμόρφωση, σχηματίζεται από δυο υδρόφοβα αμινοξέα, Phe285 (από το βρόχο 280s) και Tyr613 (από την αρχή της α19 έλικας) (Oikonomakos et al. 2000). Σε προκαταρκτικά κινητικά και κρυσταλλογραφικά πειράματα έχουν ταυτοποιηθεί 12 παράγωγα της γλυκόζης, τα οποία προκαλούν σημαντική αναστολή της ενζυμικής δράσης της GP και τα οποία φέρουν τροποποιήσεις στις θέσεις 2' και 3' του γλυκοπυρανοζιλικού δακτυλίου (Tsirkone et al. 2010).

Η κρυσταλλογραφική ανάλυση των παραγώγων αυτών (ως συμπλόκων με τη GP) και η βελτίωση τους με τη μέθοδο του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού αναστολέων θα αποτελέσει μέρος του κοινού ερευνητικού έργου.

Αντικείμενο της έρευνας μας θα αποτελέσουν επίσης αναστολείς φυσικής προέλευσης που θα αξιοποιηθούν ως ενώσεις οδηγοί για την ανάπτυξη φαρμάκων με υπογλυκαιμική δράση. Τέτοια παραδείγματα είναι:

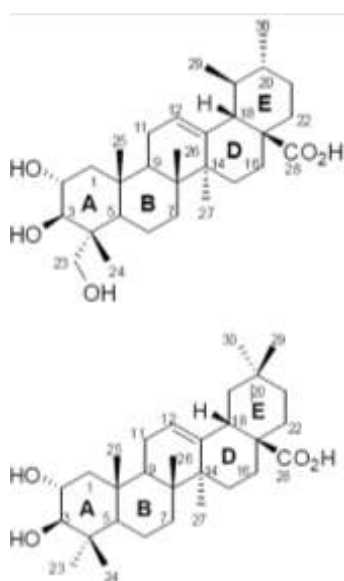
(α) Η ένωση FR258900 [(2R,3S) 2,3-bis[(E)-3-(4-hydroxyphenyl)] είναι ένας νέος αναστολέας τη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που απομονώθηκε από τον μύκητα Fungus No. 138,354. Ο FR258900, βρέθηκε ότι διεγείρει την σύνθεση του γλυκογόνου και την δράση της συνθάσης του γλυκογόνου σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα αρουραίου. Επίσης παρουσιάζει ισχυρή ανασταλτική δράση στην ηπατική φωσφορυλάση α και μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της γλυκόζης του πλάσματος σε μοντέλα διαβητικών ποντικών. Αυτή η επίδραση συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα γλυκογόνου υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση της σύνθεσης του γλυκογόνου λαμβάνει χώρα μέσω αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Η δομική μελέτη του συμπλόκου φωσφορυλάσης-FR258900 (**Σχήμα 3**), αποκάλυψε ότι η ένωση συνδέεται στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου και ότι καταλαμβάνει τη θέση του φυσικού αλλοστερικού ενεργοποιητή AMP (Tiraidis et al., 2007). Τα δομικά αποτελέσματα μπορούν περαιτέρω να αξιοποιηθούν μέσω χημικής τροποποίησης για την ανάπτυξη νέων αναστολέων με βελτιωμένη αντι-υπεργλυκαιμική δράση. Για παράδειγμα η μερική υδρόλυση της 2-εστερικής ομάδας που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη μπορεί να

παράσχει μια υδροξυλομάδα κατάλληλη για την σύνθεση παραγώγων με αυξημένη συγγένεια για το αλλοστερικό κέντρο.



Σχήμα 3. Η δομή της ένωσης FR258900 και η ηλεκτρονιακής της πυκνότητα όπως παρατηρήθηκε κατά τη σύνδεση της στην GPb.

(β) Το ασιατικό και το μασλινικό οξύ (**Σχήμα 4**) είναι φυσικής προέλευσης πεντακυκλικά τριτερπένια. Το ασιατικό οξύ απομονώνεται από φυτό *Centella asiatica* το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως φαρμακευτικό βότανο σε πολλές χώρες, ενώ το μασλινικό οξύ βρίσκεται εν αφθονία στον καρπό της ελιάς (*Olea europaea*).



Σχήμα 4. Οι χημικές δομές του ασιατικού (πάνω) και του μασλινικού οξέος (κάτω)

Μελέτες σε υπεργλυκαιμικά ποντίκια έδειξαν ότι οι ενώσεις ανταγωνίζονται την αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος που προκαλείται από ένεση αδρεναλίνης ή τη λήψη γλυκόζης μέσω της τροφής. Επιπλέον οι ενώσεις βρέθηκε να μην επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδα γλυκόζης του πλάσματος σε νηστικά πειραματόζωα αλλά αυξάνουν τη συγκέντρωση γλυκογόνου, υποδεικνύοντας ότι η υπογλυκαιμική τους δράση πιθανόν να οφείλεται στη ρύθμιση του ηπατικού και περιφερειακού μεταβολισμού του γλυκογόνου. Η δομική μελέτη απέδειξε ότι οι δύο ενώσεις συνδέονται παρόμοια στο αλλοστερικό κέντρο της φωσφορυλάσης και προάγουν την μη δραστική τριτοταγή διαμόρφωση του ενζύμου [11]. Η μελέτη της σχέσης δομής/δράσης (SAR) από το συνεργαζόμενο εργαστήριο του Καθηγητή H. Sun, China Pharmaceutical University, έχει ήδη οδηγήσει στην παραγωγή αναλόγων όπως ο βενζυλεστερας του ασιατικού οξέος με βελτιωμένη ανασταλτική δράση ($IC_{50}=3.8 \mu M$) σε σχέση με την μητρική ένωση ($IC_{50}=17 \mu M$) (Zhang et al, 2009). Η δομική μελέτη της φωσφορυλάσης με τα βελτιωμένα παράγωγα θα δώσει χρήσιμες πληροφορίες για την σύνδεση των αναστολέων και τη σχέση της με την ανασταλτική τους δράση και θα οδηγήσει σε περαιτέρω βελτιστοποίηση.

(γ) Τα φλαβονοειδή περιέχονται σε αφθονία στα λαχανικά, τα φρούτα, το τσάι και το κρασί και αποτελούν μέρος της καθημερινής διατροφής πολλών ανθρώπων. Πολλά παράγωγα φυσικών φλαβονοειδών όπως φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, κατεχίνες και ανθοκυανιδίνες έχουν αποδειχθεί να αναστέλλουν τη γλυκογονική φωσφορυλάση. Η κατανάλωση αυτών των ουσιών είναι πιθανό να συμβάλλει στην παρεμπόδιση της εξέλιξης της υπεργλυκαιμίας και των επιπλοκών του διαβήτη, είναι πιθανό να συμβάλλει στην παρεμπόδιση της εξέλιξης της υπεργλυκαιμίας και των επιπλοκών του διαβήτη, ωστόσο μέχρι σήμερα ο τρόπος αλληλεπίδρασης τους με τη φωσφορυλάση παρέμεινε άγνωστο .

Για τη διαλεύκανση του μηχανισμού αναστολής διεξήχθη η δομική και κινητική μελέτη του φλαβονοειδούς χρυσίνης. Η χρυσίνη αποδείχθηκε να αναστέλλει τη φωσφορυλάση με μια σταθερή αναστολής $K_i=5 \mu M$, ενώ η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου φωσφορυλάση-χρυσίνη προσδιορίστηκε σε ευκρίνεια 1.9 \AA . Η ανάλυση της δομής έδειξε ότι η χρυσίνη συνδέεται στο κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης όπου επίσης συνδέεται η καφεΐνη, ένας φυσικός αναστολέας του ενζύμου. Η χρυσίνη δεσμεύεται μέσω αλληλεπιδράσεων επιστοίβασης των αρωματικών της δακτυλίων και των αρωματικών αμινοξέων (Y613 και F285) που φράζουν την είσοδο του

καταλυτικού κέντρου του ενζύμου. Παράλληλα, με σκοπό τη σύγκριση μεταξύ του τρόπου αλληλεπίδρασης της χρυσίνης και της φλαβοπυριδόλης, προσδιορίστηκε η δομή του συμπλόκου φωσφορυλάση-φλαβοπυριδόλη σε υψηλότερη από προηγουμένως ευκρίνεια (2.00 Å), και χρησιμοποιήθηκαν υπολογιστικές μέθοδοι για τη κατανόηση της υψηλότερης συγγένειας της φλαβοπυριδόλης ($K_i=1 \mu\text{M}$) σε σύγκριση με τη χρυσίνη. Εν εξελίξει βρίσκεται η δομική και κινητική μελέτη μιας σειράς παραγώγων τα οποία παρασκευάζονται στο συνεργαζόμενο εργαστήριο του Καθηγητή Atsushi Kato, Dept. of Hospital Pharmacy, University of Toyama, Japan, περιλαμβανομένων της κερκετίνης, λουτεολίνης, απιγενίνης, καμπφερόλης και 4',7-dihydroxyflavone (DHF).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων τροποποιημένων γλυκοπυρανόζυλο νουκλεοζιτών, αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

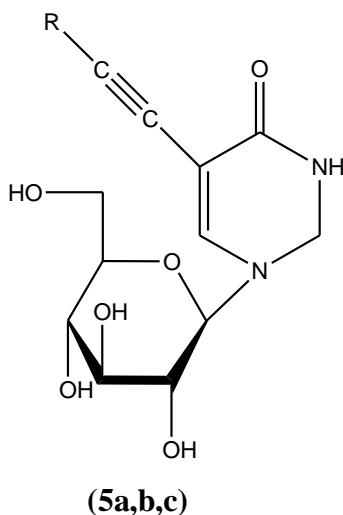
Οι νουκλεοζίτες μαζί με τα ανάλογά τους αποτελούν το θεμελιώδη λίθο για την ανάπτυξη ενώσεων με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες σε σχέση με αυτές που χρησιμοποιούσαμε κλινικά, μέχρι τώρα. Η ραγδαία και συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά πληθώρας φαρμάκων που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο.

Η ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου είναι μια σημαντική στρατηγική για τον έλεγχο του σακχάρου στον διαβήτη τύπου II. Η GP είναι ένα ένζυμο που κατέχει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό του γλυκογόνου και αποτελεί σημαντικό μοριακό στόχο για την σχεδίαση νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Λαμβάνοντας υπόψη μελέτες που υποδεικνύουν υποκατεστημένους στο σάκχαρο πυριμιδινικούς πυρανονουκλεοζίτες ως εν δυνάμει αναστολείς της GP, κρίθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας γενιάς πυρανονουκλεοζιτικών αναστολέων. Η τροποποίηση, πλέον, γίνεται στην βάση που συνδέεται με τον

δακτύλιο και συγκεκριμένα στη 5 θέση της ιωδοουρακίλης, όπου απομακρύνεται το ιώδιο και στη θέση του προστίθενται ακραία αλκίνια. Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων των νέων νουκλεοζιτικών παραγώγων καταδεικνύει- όπως αναφέρεται και στα συμπεράσματα της παρούσης εργασίας- τη δυνατότητα αξιοποίησής τους ως θεραπευτικά μέσα για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου II .

Η δομή των μορίων που στόχευσαν οι συνθετικές μας πορείες φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 15: Νέοι πυρανονουκλεοζιτικοί αναστολείς

Όπου: **5a** R= Me₃Si , **5b** R= H, **5c** R= Ph

3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΟΥ/ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ

(TLC : Thin layer chromatography)

Οι αντιδράσεις ελέγχονται με χρωματογραφία χάρτου με πλάκες silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₄). Τα προϊόντα στα χρωματογραφήματα ανιχνεύονται ψεκάζοντας με διάλυμα H₂SO₄ (θεικού οξέος) 30%, ή μέσω UV ακτινοβολίας Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής :

- Διάλυμα Α : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 30/70
- Διάλυμα Β : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 60/40
- Διάλυμα Γ : Μεθανόλη/Οξικός Αιθυλεστέρας 10/90

3.2 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 : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 30/70
- Διάλυμα Β : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 60/40
- Διάλυμα Γ : Μεθανόλη/Οξικός Αιθυλεστέρας 10/90

3.3 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Χρησιμοποιούνται άνυδροι διαλύτες ακετονιτρίλιο (CH_3CN) και *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Η ξήρανση του CH_3CN γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου υπό αναβρασμό overnight. Ακολουθεί απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (Molecular Sieves). Το DMF αποθηκεύεται επίσης σε μοριακά κόσκινα 3Å.

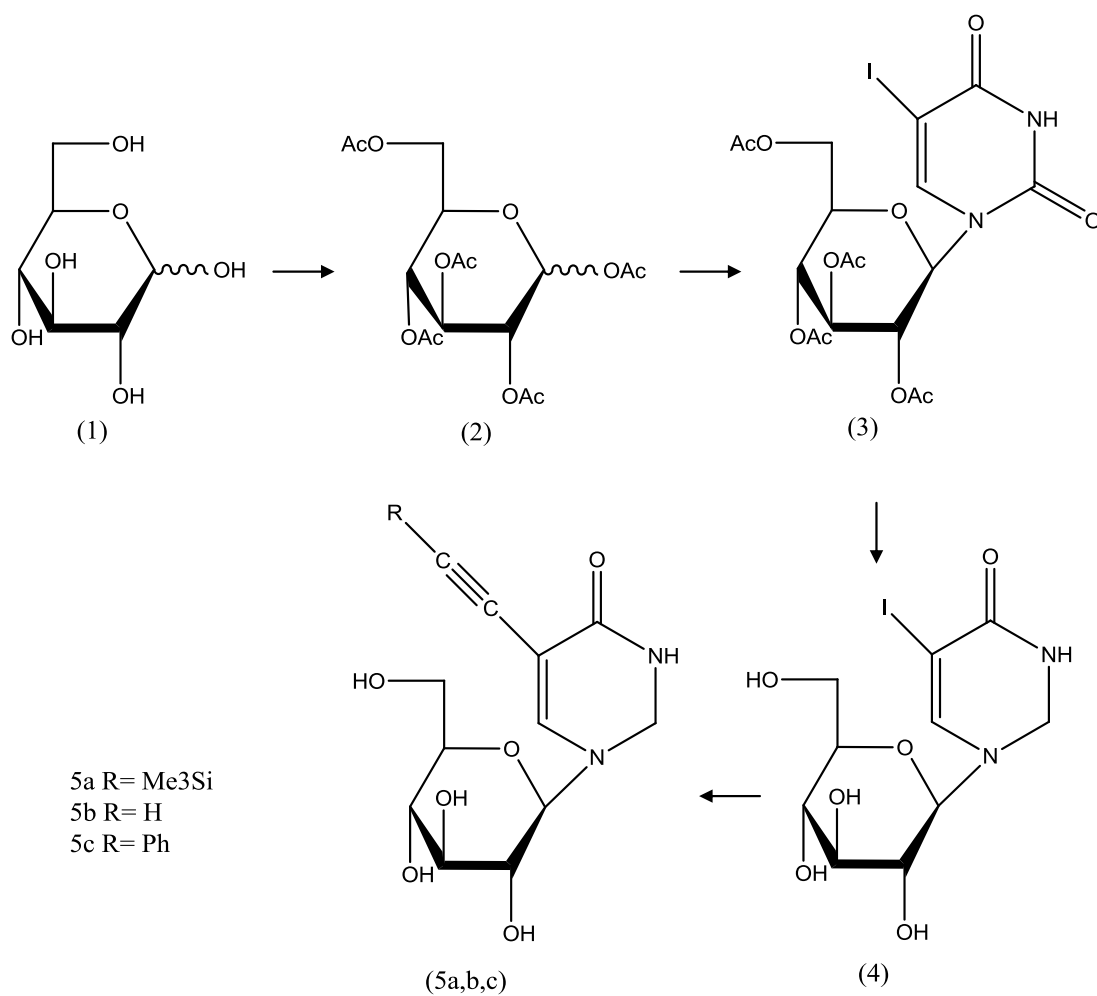
4. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Η σύνθεση των επιθυμητών 5-υποκατεστημένων πυριμιδινικών γλυκοπυρανονουκλεοζιτών **5a-c**, απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 1). Αρχικά μέσω ακετυλίωσης της D-γλυκόζης (**1**), η οποία πραγματοποιήθηκε σε πυριδίνη παρουσία Ac_2O επιτυγχάνεται η παραγωγή της 1,2,3,4,6-πεντα-O-ακετυλο D-γλυκοπυρανόζης (**2**). Η πυρανόζη **2** συζεύγνυται παρουσία καταλύτη $Me_3SiOSO_2CF_3/SnCl_4$ και CH_3CN με τη σιλιωμένη 5-ιωδοουρακίλη και προκύπτει η 1-(2,4,6-τρι-O-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (**3**). Απακετυλίωση του β-νουκλεοζίτη με κορεσμένο διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας οδηγεί στην παραγωγή της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλης (**4**). Η τελευταία φαίνεται να είναι η πιο κατάλληλη πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση των επιθυμητών 5 αλκινυλο-νουκλεοζιτών. Η αντίδραση των τελικών αλκινίων με τον νουκλεοζίτη της 5-ιωδοουρακίλης λαμβάνει χώρα σύμφωνα με την αντίδραση Sonogashira. Συνεπώς, η αντίδραση του νουκλεοζίτη **4** με το τριμεθυλοσιλυλοακετυλένιο (TMS) πραγματοποιείται παρουσία τριαιθυλαμίνης (βάση), CuI (συγκαταλύτης) και $Pd(PPh_3)_4$ (καταλύτης) σε άνυδρη DMF και οδηγεί στον νουκλεοζίτη **5a**. Η απομάκρυνση της τριμεθυλοσιλυλομάδας με επίδραση *n*-tetrabutylammonium fluoride (*n*-Bu₄NF) δίνει τον νουκλεοζίτη της 5-αιθυνυλο ουρακίλης **5b**.

Με τον ίδιο τρόπο πραγματοποιείται και η σύζευξη του νουκλεοζίτη **4** με το φαινυλο ακετυλένιο, οπότε προκύπτει ο νουκλεοζίτης 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-φαινυλοαιθυνυλο ουρακίλη (**5c**).

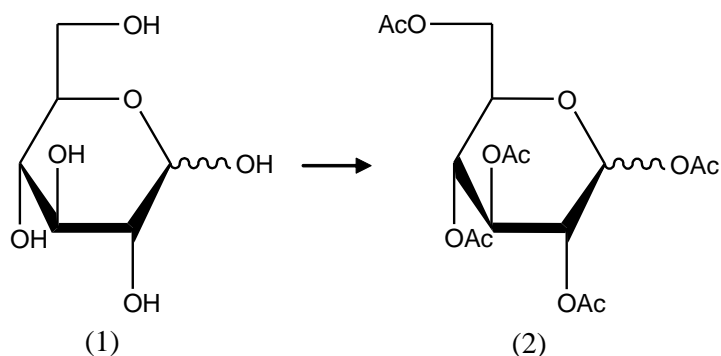
4.2 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ



5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΤΕΡΑ:

5.1) Σύνθεση της 1,2,3,4,6-Πεντα-*O*-ακετυλο-*D*-Γλυκοπυρανόζης(2) (Foster *et al.* 1967, Tewson, Welsh 1978)



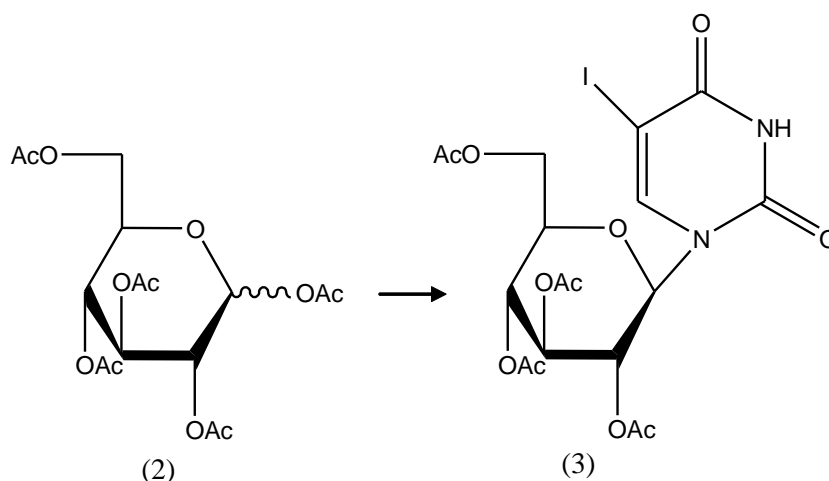
Σε διάλυμα της *D*-γλυκόζης (1) (5 g, 27.75 mmol) σε πυριδίνη (121.5 mL) προστίθεται Ac_2O (60.45 mL, 35.87 mmol) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) το διάλυμα ψύχεται στους 0°C , και προστίθεται μεθανόλη (27 mL). Στη συνέχεια, οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο και εκχυλίζεται αρχικά με κορεσμένο διάλυμα NaHSO_4 και στη συνέχεια με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 . Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **2** (9.2 g, 85%) παραλαμβάνεται ως παχύρρευστο υποκίτρινο έλαιο και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (2)

ΠΙΝΑΚΑΣ 1:

TLC (Σύστημα A)	$R_f = 0,37$
Απόδοση	85%

5.2) Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-Τετρα-*O*-ακετυλο- α -*D*-Γλυκοπυρανοζυλο)ιωδοουρακίλης (3)



Διάλυμα αποτελούμενο από 5-ιωδοουρακίλη (4.96 g, 44.2 mmol), HMDS (11 mL, 52.8 mmol) και σακχαρίνη (0.37 g, 2.03 mmol) σε άνυδρο CH_3CN (152 mL) θερμαίνεται με κάθετο ψυκτήρα για 20 λεπτά στους 120°C και στη συνέχεια προστίθεται η 1,2,3,4,6-πεντα-*O*-ακετυλο-*D*-γλυκοπυρανόζη (2) (9,2 g, 23.58 mmol) καθώς και ο $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (8 mL, 44.2 mmol). Ακολουθεί θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 80°C για περίπου 2h (TLC), ψύξη του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη κορεσμένου διαλύματος όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO_3) και εκχύλιση με EtOAc (1000 mL). Η οργανική φάση πλένεται με νερό (20 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση,

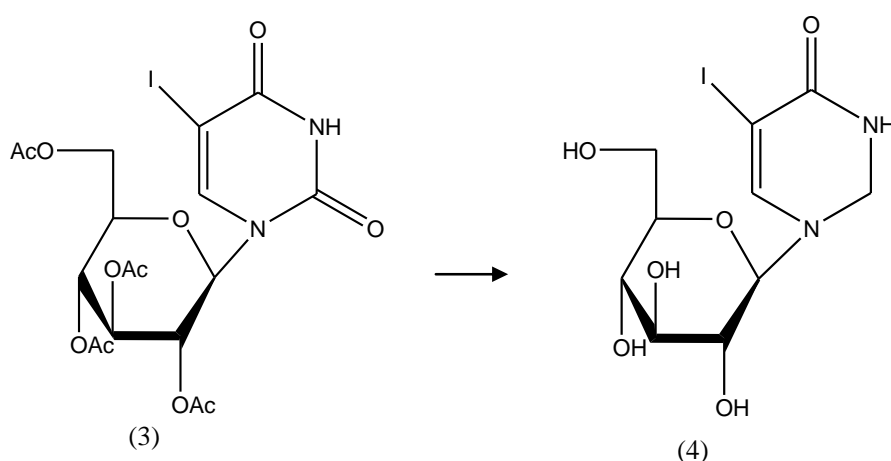
χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Β. Το επιθυμητό προϊόν **3** (10.72 g, 80%) παραλαμβάνεται ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**3**)

ΠΙΝΑΚΑΣ 2:

TLC (Σύστημα Β)	$R_f = 0,37$
Απόδοση	80%

5.3) Σύνθεση της 1-(β-D-Γλυκοπυρανοζυλο)ιωδοουρακίλης (**4**)



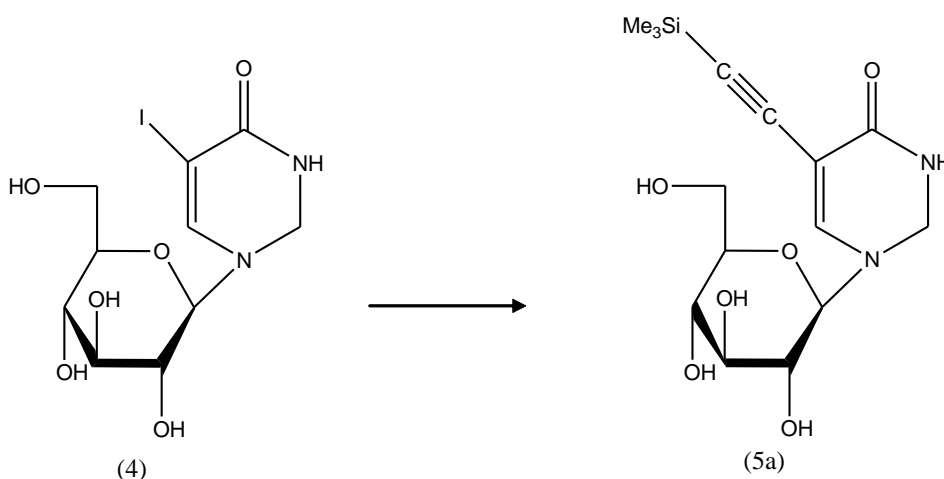
Διάλυμα της ένωσης **3** (10.72g, 18.86 mmol) σε μεθανολική αμμωνία αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Γ, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4** (5.74g, 76%) με λευκή αφρώδη υφή.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (4)

ΠΙΝΑΚΑΣ 3:

TLC (ΣΥΣΤΗΜΑ Γ)	R _f = 0,2
Απόδοση	76%

5.4) Σύνθεση της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-τριμεθυλοσιλυλοαιθυνο-ουρακίλη (5a)



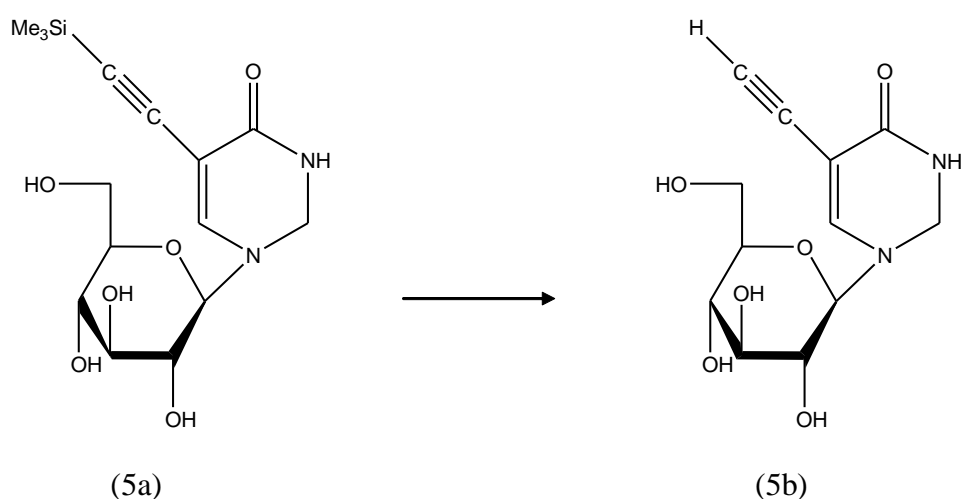
Διάλυμα της προηγούμενης ένωσης **4** (6.25 mmol ή 2.5 gr.) διαλύθηκε σε μείγμα των 43 ml άνυδρης DMF, των 1.8 ml άνυδρου ET₃N και 31.25 mmol MeSi-C≡-CH (4.5 ml και 3 equiv) , 119 mg CuI (0.3 equiv) και 722.3 mg Pd(PPh₃)₄ (0.1 equiv) προστέθηκαν και η αντίδραση του μίγματος παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 5-20 ώρες ελεγχόμενο μέσω TLCs. Έπειτα οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο διαλύεται σε 100 mL οξικού αιθυλεστέρα (AcOEt) και μετά πλένεται με νερό (7x10 mL) και brine (10 mL) . Οι διαλύτες της οργανικής φάσης απομακρύνονται υπό κενό για να προκύψει ένα σκούρο έλαιο. Ο πρώτος καθαρισμός μέσω μιας χρωματογραφίας στήλης (διαλύουμε σε CH₂Cl₂ και έπειτα χρησιμοποιούμε σύστημα 0.5 MeOH/9.5 AcOEt) δίνουν το επιθυμητό προϊόν μολυσμένο με κάποια παραπροϊόντα. Καθαρά αλκύνια προκύπτουν μετά από μια δεύτερη χρωματογραφία στήλης (σύστημα eth.8/ AcOEt 2 και έπειτα αλλαγή συστήματος σε 1/1). Οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5a** (1.97 gr ,85%)

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**5a**)

ΠΙΝΑΚΑΣ 4:

TLC (ΣΥΣΤΗΜΑ Γ)	R _f = 0,2
Απόδοση	85%

5.5) Σύνθεση της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-αιθυνυλο-ουρακίλη (5b**)**



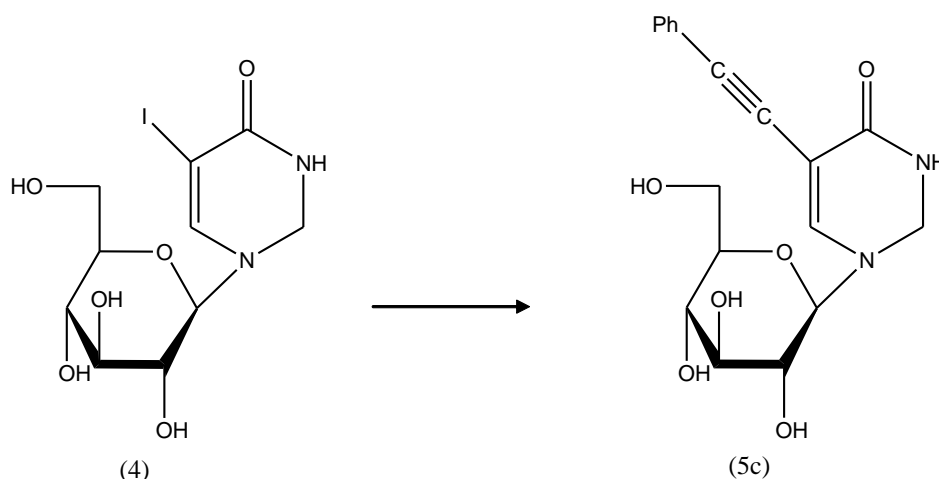
Το καθαρό συλιωμένο αλκύνιο **5b** που προέκυψε (1.97gr ή 5.3mmol) από τη χρωματογραφία στήλης, διαλύθηκε σε άνυδρο CH₃CN, (53 mL), TBAF ένυδρο (1.8 g, 1.05 equiv) προστέθηκε στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης (σύστημα Γ) το τελικό διάλυμα διατηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5b** (1.028 gr ,65%)

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**5b**)

ΠΙΝΑΚΑΣ 5:

TLC (ΣΥΣΤΗΜΑ Γ)	R _f = 0,3
Απόδοση	65%

5.6) Σύνθεση της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-φαινυλαιθινυλο-ουρακίλη (5c)



Διάλυμα της προηγούμενης ένωσης **4** (6.25 mmol ή 2.5 gr.) διαλύθηκε σε μείγμα των 25 ml άνυδρης DMF, των 75 ml άνυδρου ET3N και 18.75 mmol P-C≡CH (3 equiv, 2.1ml) (4.5 ml και 3 equiv) , 238 mg CuI (0.2 equiv) και 723 mg Pd(PPh₃)₄ (0.1 equiv) προστέθηκαν και η αντίδραση του μίγματος παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 5-20 ώρες ελεγχόμενο μέσω TLCs. Έπειτα οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο διαλύεται σε 100 mL οξικού αιθυλεστέρα (AcOEt) και μετά πλένεται με νερό (7x10 mL) και brine (10 mL) . Οι διαλύτες της οργανικής φάσης απομακρύνονται υπό κενό για να προκύψει ένα σκούρο έλαιο. Ο πρώτος καθαρισμός μέσω μιας χρωματογραφίας στήλης (διαλύουμε σε AcOEt και έπειτα χρησιμοποιούμε σύστημα 1 MeOH/9 AcOEt) δίνουν το επιθυμητό προϊόν μολυσμένο με κάποια παραπροϊόντα. Καθαρά αλκύνια προκύπτουν μετά από μια δεύτερη χρωματογραφία στήλης (σύστημα AcOEt 8/ MeOH 2). Οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5c** (1.2gr ,54%)

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**5c**)

ΠΙΝΑΚΑΣ 6:

TLC (ΣΥΣΤΗΜΑ Γ)	R _f = 0,28
Απόδοση	54%

6.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

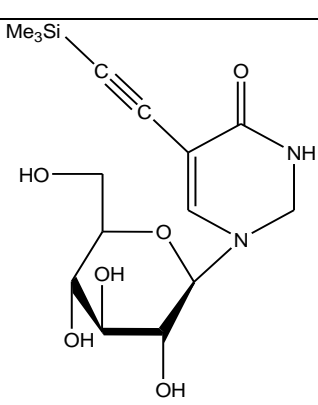
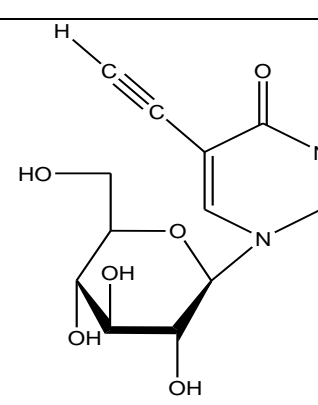
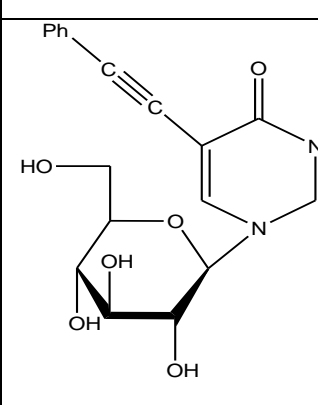
Η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προέκυψε από τις προσπάθειες των ερευνητών για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως κακοήθειες νεοπλασίες, ικές μολύνσεις και υπογλυκαιμικές νόσοι. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων,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

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης γλυκοπυρανονουκλεοζιτών με πιθανή αντιδιαβητική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, εύκολη, έχοντας πραγματοποιήσει σύντομα βήματα. Οι τελικές αποδόσεις που πήραμε από τη σύνθεση των τελικών γλυκοπυρανονουκλεοζιτών είναι αρκετά καλές. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση της 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλο-D-γλυκοπυρανόζης (**2**) είχε απόδοση 85%, της 1-(2,3,6-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδο ουρακίλη (**3**) είχε απόδοση 80%, της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδο ουρακίλης (**4**) είχε απόδοση 76%. Η σύνθεση της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-τριμεθυλοσιλυλοαιθυνο-ουρακίλη (αντίδραση Sonogashira) (**5a**) είχε απόδοση 85%, της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-αιθυνο-ουρακίλη (αντίδραση Sonogashira) (**5b**) είχε απόδοση 65%, της 1-β-D- Γλυκοπυρανόζυλο-5-φαινυλαιθυνο-ουρακίλη (**5c**) είχε απόδοση 54%.

Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹H NMR. Η ικανότητα αναστολής των

5-υποκατεστημένων πυριμιдино γλυκοπυρανονουκλεοζιτών για τη GPb μελετήθηκε με κινητικά πειράματα και οι σταθερές αναστολής απεικονίζονται στον **Πίνακα 1**.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1:

	5a	5b	5c
ΕΝΩΣΕΙΣ			
IC₅₀ (μM)	839.3±28.5	15.4±0.3	No inhibition at 1.0 mM

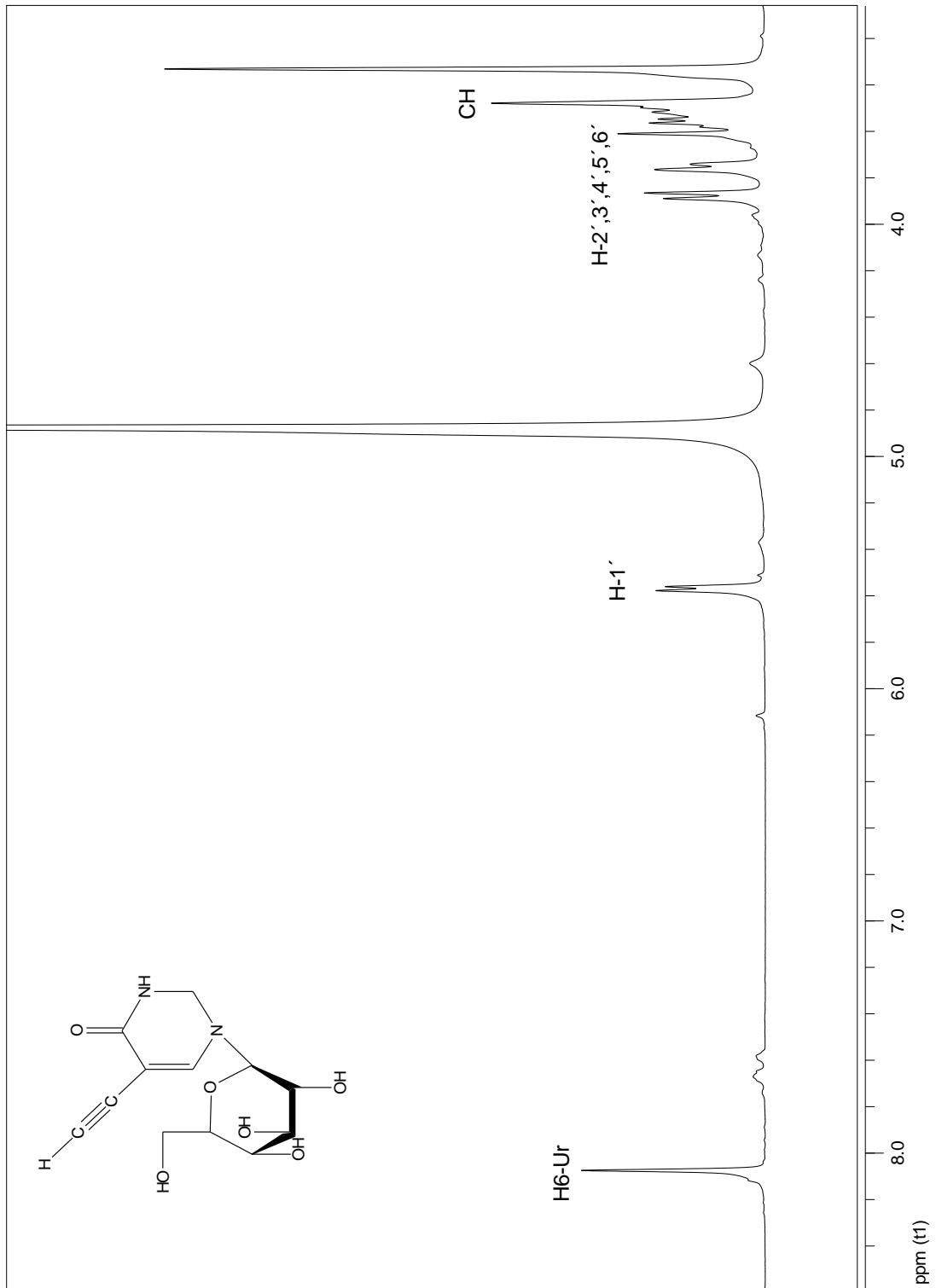
Όπως φαίνεται και παραπάνω, όλες οι ενώσεις παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Στη συνέχεια στη θέση 5 της ουρακίλης προστέθηκαν τελικά αλκύλια. Από τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι η ένωση **5b** η οποία στην θέση 5 έχει έναν αιθύνυλο (ακετυλένιο) υποκαταστάτη, αποτελεί τον καλύτερο αναστολέα με IC_{50} 15,4μM. Η ένωση **5a** αποτελεί πυριτικός ενδιάμεσος νουκλεοζίτης κατά την διαδικασία σύνθεσης της 5-αιθύνυλο-πυριμιдино-γλυκοπυρανονουκλεοζίτη **5b**. Το πυρίτιο που βρίσκεται στη θέση 5 της ουρακίλης είναι ιδιαίτερα ογκώδες με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η είσοδος του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και η τιμή της IC_{50} να αυξάνεται στα 839.3μM.

Ο **5c** διαθέτει ως υποκαταστάτη ένα φαίνυλο-ακετυλένιο. Ο υποκαταστάτης είναι πολύ ογκώδης με αποτέλεσμα να καθιστά αδύνατη την πρόσδεση του αναστολέα στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.

Απο τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα πως η δραστηκότητα των αναστολέων που μελετήθηκαν, εξαρτάται από τον υποκαταστάτη που προστίθεται στη θέση 5 της ουρακίλης. Είναι προφανές πως η ανασταλτική δραστηκότητα ελαττώνεται με την αύξηση

του όγκου των υποκαταστατών στην 5-θέση. Υποκαταστάτες με ιδιαίτερα μεγάλο μήκος ή μέγεθος παρεμποδίζουν την πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται και η αναστολή της βιολογικής δραστηρότητας του ενζύμου.

7. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR



8.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agelis G.; Tzioumaki N.; Tselios T.; Botic, T.; Cencic, A.; Komiotis D. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1366.
- Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1879.
- Balatsos, N. A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6044–6051
- Berg, J. M.; Tymoczko J. L., Stryer L. (2001). Βιοχημεία (Τόμος Ι) Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (p) 329-351.
- Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* **2010**.
- Halliwell, B., (2001). Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopaedia of life sciences*
- Kaiser, A., Nishi, K., Gorin, F.A., Walsh, D.A., Bradbury, E.M., and Schnier, J.B., *The cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase.* (2001). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **386**(2): p. 179-187.
- Komiotis D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic acids* **1991**, *10*, 431.
- Komiotis D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, *7*, 219.
- Kontou, M., Leonidas, D.D., Vatzaki, E.H., Tsantili, P., Mamalaki, A., Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R., and Tzartos, S.J., *The crystal structure of the Fab fragment of a rat monoclonal antibody against the main immunogenic region of the human muscle acetylcholine receptor.* (2000). *Eur. J. Biochem.* **267**: p. 2389-2397
- Lui, V. W. Y. W.; Lau, C. P. Y. P.; Cheung, C. S. F. S.; Ho, K.; Ng, M. H. L. H.; Cheng, S. H. H.; Hong, B.; Tsao, S.-W. W.; Tsang, C. M. M.; Lei, K. I. K. I.; Yamasaki, Y.; Mita, A.; Chan, A. T. *Biochemical pharmacology* **2010**, *79*, 1772–1780.
- Martin, W.H., Hoover, D.J., Armento, S.J., Stock, I.A., McPherson, R.K., Danley, D.E., Stevenson, R.W., Barrett, E.J., and Treadway, J.L., *Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo.* (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: p. 1776-1781
- Oikonomakos, N. G. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2002**, *3*, 561–586; (b) Oikonomakos, N. G.; Somsák, L. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2008**, *9*, 379–395; 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.
- Oikonomakos, N.G., *Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy.* (2002). *Curr Protein Pept Sci* **3**(6): p. 561-86.
- Oikonomakos, N.G., Schnier, J.B., Zographos, S.E., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., and Johnson, L.N., *Flavopiridol inhibits glycogen phosphorylase by binding at the inhibitor site.* (2000). *J. Biol. Chem.* **275**(44): p. 34566-34573.
- Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G., and Johnson, L.N., *A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions.* (2000). *Structure* **8**: p. 575-584.

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

Tiraidis, C., Alexacou, K.M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Gimisis, T., and Oikonomakos, N.G., *FR258900, a potential anti-hyperglycemic drug, binds at the allosteric site of glycogen phosphorylase.* (2007). *Protein Sci* **16**(8): p. 1773-82.

Tiraidis, C., Alexacou, K.M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Gimisis, T., and Oikonomakos, N.G., *FR258900, a potential anti-hyperglycemic drug, binds at the allosteric site of glycogen phosphorylase.* (2007). *Protein Sci* **16**(8): p. 1773-82.

Zhang, L., Chen, J., Gong, Y., Liu, J., Hua, W., and Sun, H., *Synthesis and biological evaluation of asiatic acid derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylases.* (2009). *Chem Biodivers* **6**(6): p. 864-74.

Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3399.

Gumina, G.; Song, G. Y.; Chu, C. K. *FEMS Microbiology Letters* **2001**, *202*, 9.

Zographos, S.E. Leonidas, D.D., Lazoura, E., Dossi, K., Konarev, P.V., Kikhney, A.G., Svergun, D.I., Schmoll, D., Defossa, E., and Oikonomakos, N.G. (2007). Experimental evidence for the existence of an intermediate form of glucokinase, which accounts for the sigmoidal kinetic behaviour of the enzyme. *EMBL, Hamburg Outstation, Annual Report 2007, Part II*, pp. 371-372

Zographos, S.E., Oikonomakos, N.G., Tsitsanou, K.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Skamnaki, V.T., Bischoff, H., Goldmann, S., Watson, K.A., and Johnson, L.N., *The structure of glycogen phosphorylase b with an alkyldihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor.* (1997). *Structure* **5**(11): p. 1413-25.

Oikonomakos, N.G., Tsitsanou, K.E., Zographos, S.E., Skamnaki, V.T., Goldmann, S., and Bischoff, H., *Allosteric inhibition of glycogen phosphorylase a by the potential antidiabetic drug 3-isopropyl-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-1-ethyl-2-methyl-pyridine-3,5,6-tricarboxylate.* (1999). *Protein Sci.* **8**: p. 1930-1945.