



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΟΝΤΟΠΟΥΛΟΥ ΣΤΕΡΓΙΑΝΗ-ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ 4'-ΔΕΟΞΥ-4'-C-ΚΥΑΝΟ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΩΣ
ΠΙΘΑΝΟΙ ΑΝΤΙΙΚΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**



ΛΑΡΙΣΑ 2012

**«ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ 4'-ΔΕΟΞΥ-4'-C-ΚΥΑΝΟ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΩΣ
ΠΙΘΑΝΟΙ ΑΝΤΙΙΚΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Μαρκουλάτος Παναγιώτης— Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Κομιώτη Δημήτριο τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω προσωπικά για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, και τις εποικοδομητικές του υποδείξεις.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Στυλιανή Μαντά, για την άψογη συνεργασία μας και για την καθημερινή της υποστήριξη καθ' όλη την περίοδο της παραμονής μου στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας. Οι συμβουλές και η πείρα της αποδείχθηκαν ιδιαίτερα ωφέλιμες για να κατανοήσω και να φέρω εις πέρας την εργασία που μου ανατέθηκε. Ιδιαίτέρως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Κυρίτση Χρήστο για την υποστήριξη και τις υποδείξεις του κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας. Η εργαστηριακή και επιστημονική του κατάρτιση καθώς και οι πολύτιμες συμβουλές του υπήρξαν καθοριστικοί παράγοντες για την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την ένθερμη υποδοχή τους αλλά και για το ευχάριστο και δημιουργικό κλίμα συνεργασίας εντός του εργαστηριακού χώρου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Υδατάνθρακες	9
1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών:Σχηματισμός ημιακετάλης	10
1.3 Νουκλεοζίτες	13
1.3.1 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών.....	15
1.3.2 Αντικα νουκλεοζιτικά ανάλογα	20
1.3.3 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα.....	23
1.3.4 Κυανονουκλεοζίτες	27
1.3.5 Πυρανονουκλεοζίτες.....	29
1.3.6 Δεοξυπυρανονουκλεοζίτες.....	34
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	36
2.1 Στόχος – σκοπός μελέτης	36
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
3.1 Υλικά	38
3.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων	38
3.2 Γενική Μεθοδολογία.....	39
3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)	39
3.2.2 Χρωματογραφία στήλης	40
3.2.3 Ξήρανση διαλυτών.....	40
3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων	41
3.3 Μέθοδοι	42
3.3.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού.....	42
3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης	43
3.3.3 Σύνθεση της 1-(4'-Δεοξυ-4'-κυανο-ταλοπυρανοζυλο) ουρακίλης	45
3.3.3.1. Σύνθεση της 1,2,3,4,6-Πεντα-Ο-ακετυλο- <i>D</i> -μαννοπυρανόζης (2)	45
3.3.3.2. Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-Τετρα-Ο-ακετυλο- α - <i>D</i> -μαννοπυρανοζυλο)ουρακίλης (3)	46
3.3.3.3 Σύνθεση της 1-(α - <i>D</i> -Μαννοπυρανοζυλο)ουρακίλης (4)	48

3.3.3.4	Σύνθεση της 1-(2',3'-O-Ισοπροπυλιδενο-α-D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης (5)	49
3.3.3.5	Σύνθεση της 1-(2',3'-O-Ισοπροπυλιδενο-6'-O-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης (6)	50
3.3.3.6	Σύνθεση της 1-(2',3'-O-Ισοπροπυλιδενο-6'-O-τριτυλο-α-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-4'-ουλοζ)ουρακίλης (7)	51
3.3.3.7	Σύνθεση της 1-(2',3'-O-Ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-O-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης(8)	52
3.3.3.8	Σύνθεση της 1-(2',3'-O-Ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-O-τριτυλο-4'-O-φαινοξυθειοκαρβονυλο- α-D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης (9)	53
3.3.3.9	Σύνθεση της 1-(4'-Δεοξυ-2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-O-τριτυλο-α-D-ταλοπυρανοζυλ)ουρακίλης (10)	54
3.3.3.10	Σύνθεση της 1-(4'-Δεοξυ-4'-κυανο-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλης (11).....	55
4.	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹HNMR.....	56
5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	57
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εστιάστηκε στη σύνθεση ενός νέου νουκλεοζιτικού αναλόγου, του δεοξυ-κυανοπυρανονουκλεοζίτη της ουρακίλης.

Στηριζόμενοι στην ισχυρή αντικαρκινική και αντική δράση που έχουν επιδείξει νουκλεοζίτες αποτελούμενοι από μονοσακχαρίτες με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο συνδεδεμένοι με κάποια ετεροκυκλική βάση, στην παρούσα εργασία περιγράφεται η σύνθεση τροποποιημένων πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, τα οποία αναμένεται να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην αντική και αντικαρκινική θεραπεία. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία αναλύεται επίσης η συνθετική οδός που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του νουκλεοζίτη καθώς και η μέθοδος ταυτοποίησής του.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι υδατάνθρακες είναι αλδεϋδικές ή και κετονικές ενώσεις με πολλαπλές υδροξυλικές ομάδες. Αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό της οργανικής ύλης επάνω στη γη λόγω των πολλαπλών ρόλων τους σε κάθε μορφή ζωής. Οι υδατάνθρακες εξυπηρετούν ένα πλήθος αναγκών στους ζωντανούς οργανισμούς. Είναι πηγές ενέργειας (όπως η ζάχαρη και η γλυκόζη), προσφέρουν εξωτερική προστασία σε κύτταρα (όπως η κυτταρίνη που αποτελεί το στήριγμα ολόκληρου του φυτικού βασιλείου), ενώ προσκολλημένοι σε πρωτεΐνες και λιπίδια, βοηθούν τα κύτταρα να αναγνωρίζουν μόρια ή άλλα κύτταρα στο περιβάλλον τους και τέλος αποτελούν μέρος κάθε δομικού λίθου των νουκλεϊκών οξέων (ως ριβόζη ή δεοξυριβόζη).

Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντική και αντικαρκινική δράση περιέχουν νουκλεοζίτες αποτελούμενους από ολιγοσακχαρίτες συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μεγάλο μέρος της έρευνας σχετικά με την ανακάλυψη φαρμάκων με αντικές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες να εστιάζεται στα ανάλογα των νουκλεοζιτών.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση **νέων 4'-δεοξυ-4'-C-κυανο νουκλεοζιτών ως πιθανοί αντικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες**. Αναλύεται η συνθετική οδός που ακολουθήθηκε για την παρασκευή τους καθώς και η μέθοδος ταυτοποίησής τους.

1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες αποτελούν μια από τις τέσσερις κύριες κατηγορίες βιομορίων και απαντούν σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Οι υδατάνθρακες, ή αλλιώς σάκχαρα, αποτελούν μια ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών με γενικό τύπο $(\text{CH}_2\text{O})_n$, δηλ. αποτελούνται από υδρογόνο και οξυγόνο σε αναλογία 2:1. Οι σχετικές αναλογίες άνθρακα, υδρογόνου και οξυγόνου όπως υπαγορεύονται από τον γενικό τους τύπο ισχύουν για τους μονοσακχαρίτες, ενώ για τους υπόλοιπους είναι κάπως διαφορετικές. 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. Οι υδατάνθρακες σχηματίζονται από μονοσακχαρίτες, μικρά μόρια που τυπικά περιέχουν τρία έως εννέα άτομα άνθρακα. Αυτοί οι μονοσακχαρίτες μπορεί να συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν μια ποικιλία δομών ολιγοσακχαριτών. Οι υδατάνθρακες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάσει του αριθμού μορίων σακχάρων που συνδέονται σε ένα μόριο τους. Είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους σε τέσσερις κύριες κατηγορίες :

- Μονοσακχαρίτες -όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη – είναι αλειφατικές πολυυδροξυ-αλδεϋδες και κετόνες του τύπου $\text{HO}-(\text{CHOH})_n-\text{CHO}$ και $\text{HO}-\text{CH}_2-(\text{CHOH})_{n-1}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ (αλδόζη, κετόζη). Ωστόσο, τόσο στη στερεή κατάσταση όσο και σε μεγάλο βαθμό στα διαλύματα επικρατεί ο κυκλικός τύπος της ημιακετάλης. Οι μικρότεροι μονοσακχαρίτες με $n=3$ είναι η διυδροξυακετόνη και η D- ή L-γλυκεραλδεϋδη και αναφέρονται ως τριόζες. Απλοί μονοσακχαρίτες με

τέσσερα, πέντε, έξι και επτά άτομα άνθρακα καλούνται τετρόζες, πεντόζες, εξόζες και επτόζες αντίστοιχα.

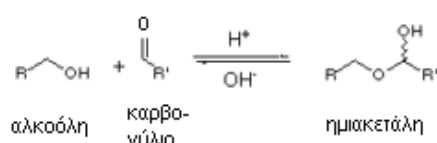
- Δισακχαρίτες, που σχηματίζονται από δύο μόρια μονοσακχαριτών ενωμένα με γλυκοζιτικό δεσμό O. Οι πιο γνωστοί δισακχαρίτες είναι η σακχαρόζη, η λακτόζη και η μαλτόζη.
- Ολιγοσακχαρίτες -όπως μαλτοδεξτρίνες, φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες- που περιέχουν μέχρι πέντε μόρια απλών σακχάρων.
- Πολυσακχαρίτες χαρακτηρίζονται οι υδατάνθρακες που έχουν πάνω από δέκα μονάδες μονοσακχάρων. Οι πιο συνηθισμένοι πολυσακχαρίτες που απαντούν στη φύση έχουν μεγάλο μοριακό βάρος και το μόριο τους αποτελείται από εκατοντάδες ή χιλιάδες μόρια μονοσακχαριτών. Ανάλογα με τη χημική τους σύσταση οι πολυσακχαρίτες διακρίνονται σε ομοπολυσακχαρίτες, όπως άμυλο, γλυκογόνο και κυτταρίνη που στο μόριο τους υπάρχει ένα απλό σάκχαρο ως δομικός λίθος και ετεροπολυσακχαρίτες, όπως οι ημικυτταρίνες, οι πηκτινικές ύλες κλπ. που το μόριο τους αποτελείται από δύο ή περισσότερα συστατικά.

1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών : Σχηματισμός ημιακετάλης

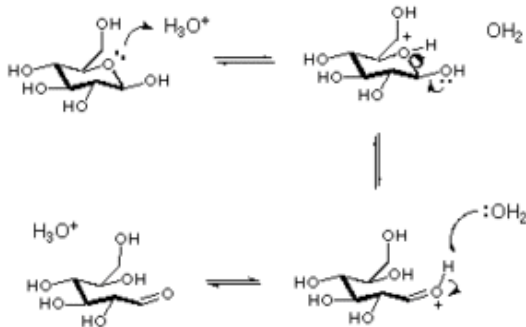
Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν σε δύο μορφές. Την μορφή ανοιχτής αλυσίδας και την κυκλοποιημένη τους μορφή. Ο επικρατέστερος τύπος γλυκόζης και φρουκτόζης σε διάλυμα δεν είναι η ανοικτή αλυσίδα, επειδή οι ανοικτές αλυσίδες των ενώσεων αυτών κυκλοποιούνται σε δακτύλιους. Γενικά, μια καρβονυλική ένωση αντιδρά με μια αλκοόλη για να σχηματίσει μια ημιακετάλη (εικόνα 1).

Μία ημιακετάλη σχηματίζεται κατά την προσθήκη του πυρηνόφιλου μορίου της αλκοόλης στην καρβονυλική ομάδα. Η ημιακετάλη είναι και αιθέρας και αλκοόλη ανάλογα τις συνθήκες και συνήθως είναι τόσο ασταθής ώστε να μην απομονώνεται.

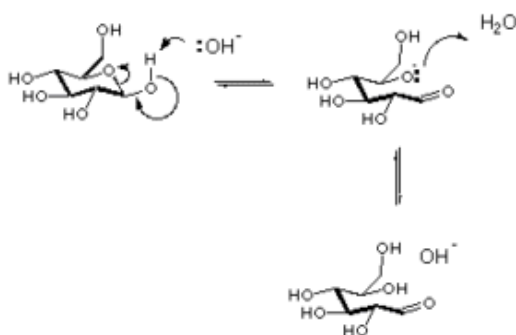
Σχηματισμός Ημιακετάλης



Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης καταλυόμενος από οξύ



Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης καταλυόμενος από βάση



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

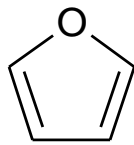
Η αντίδραση του σχηματισμού ημιακετάλης είναι μια αμφίδρομη αντίδραση η οποία καταλύεται παρουσία και οξέος (H_3O^+) και βάσης (OH^-).

Ο μηχανισμός σχηματισμού της ημιακετάλης περιλαμβάνει:

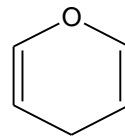
- A) Πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου η οποία πολώνει έντονα το καρβονύλιο.
- B) Ενεργοποίηση της καρβονυλικής ομάδας για πυρηνόφιλη προσβολή από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου των H_3O^+ ή OH^- .
- Γ) απόσπαση ενός πρωτονίου οδηγεί στο σχηματισμό μιας ουδέτερης ακετάλης.

Εικόνα 1. Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης

Εάν η υδροξυλομάδα και το καρβονύλιο βρίσκονται στο ίδιο μόριο, μπορεί να λάβει χώρα ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη, που οδηγεί στο σχηματισμό μιας κυκλικής ημιακετάλης. Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές της κλειστής και ανοικτής αλυσίδας. Δυο παραδείγματα αυτής της αντίδρασης είναι η δημιουργία πυρανόζης από την γλυκόζη και η δημιουργία φουρανόζης από την φρουκτόζη. 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. Στη φρουκτόζη η κετονική ομάδα στον C-2 του τύπου της ανοικτής αλυσίδας είναι σε θέση να αντιδράσει με την υδροξυλική ομάδα του 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



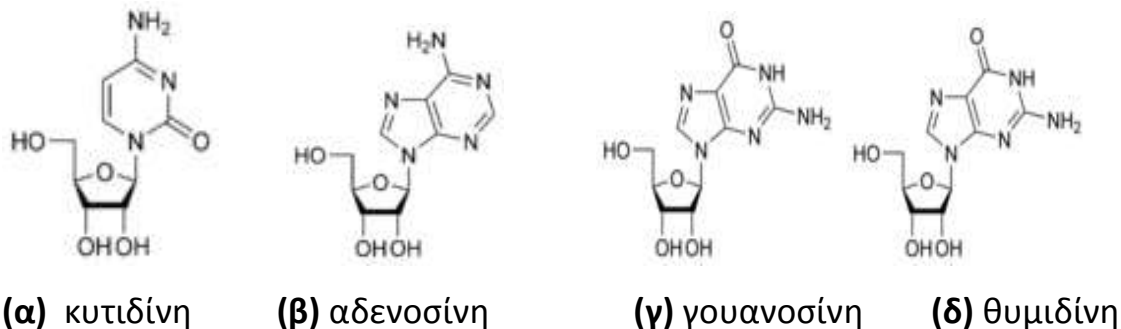
(β) Πυράνιο

Η κυκλοποίηση των σακχάρων μέσω ημιακετάλης είναι μεγάλης σημασίας διότι με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα πρόσθετο στερεογονικό κέντρο στο μόριο και παρουσιάζεται το φαινόμενο της ανωμερείας. 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.

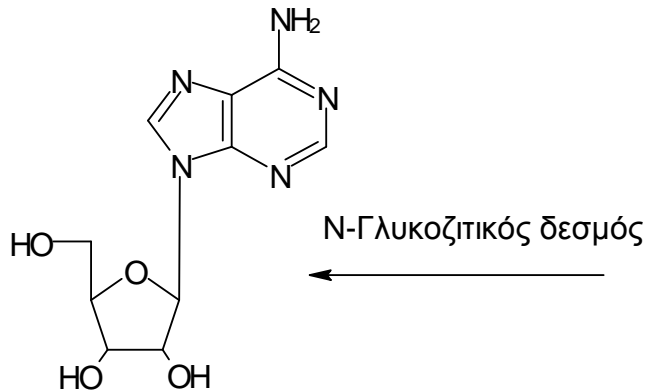
1.3 Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες που αποτελούνται από μια βάση (θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, αδερίνη, ουρακίλη) δεσμευμένη σε ένα σάκχαρο(δεοξυριβόζη ή ριβόζη). Αναλόγως αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης. Το συνθετικό δεοξυ- προσδιορίζει ότι το 2'-άτομο C του σακχάρου δεν έχει το άτομο οξυγόνου που βρίσκουμε συνδεδεμένο στο 2'-άτομο άνθρακα της ριβόζης. Οι τέσσερις μονάδες νουκλεοζιτών στο RNA ονομάζονται αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη και ουριδίνη, ενώ στο DNA ονομάζονται δεοξυαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυκυτιδίνη και θυμιδίνη.



Εικόνα.3 Ριβονουκλεοζίτες

Σε κάθε περίπτωση, το N-9 μιας πουρίνης ή το N-1 μιας πυριμιδίνης συνδέεται στο C- 1' του σακχάρου. Η βάση βρίσκεται επάνω από το επίπεδο του σακχάρου όταν η δομή γράφεται με τον κλασικό τρόπο, δηλαδή η διαμόρφωση του γλυκοζιτικού δεσμού N είναι β. Τα σάκχαρα στα νουκλεϊκά οξέα συνδέονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικές γέφυρες. Ειδικότερα η 3'- υδροξυλική ομάδα (3'- OH) μιας μονάδας σακχάρου ενός νουκλεοτιδίου έχει εστεροποιηθεί με τη φωσφορική ομάδα, και αυτή με τη σειρά της συνδέεται στην 5'- υδροξυλική ομάδα του γειτονικού σακχάρου. Η αλυσίδα των σακχάρων που συνδέονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικές γέφυρες ονομάζεται κορμός του νουκλεϊκού οξέος. Ενώ ο κορμός είναι σταθερός στο RNA και DNA, οι βάσεις διαφέρουν μεταξύ μονομερών.



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

Ένα νουκλεοτίδιο είναι ο φωσφορικός εστέρας του νουκλεοζίτη. Η πιο κοινή θέση εστεροποίησης σε ένα φυσικό νουκλεοτίδιο είναι η υδροξυλική ομάδα που συνδέεται στη θέση C-5' του σακχάρου. Τα νουκλεοτίδια είναι τα μονομερή που συνδέονται για να δώσουν τα νουκλεϊκά οξέα RNA και DNA.

1.3.1 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Οι φυσικοί νουκλεοζίτες συντίθενται εντός των κυττάρων αλλά είναι δυνατόν, να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Η παραπάνω ιδιότητα επιτρέπει το σχεδιασμό και τη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα διατηρούν χαρακτηριστικά των φυσικών μορίων αλλά είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε, όταν εισέλθουν στο κύτταρο και μεταβολιστούν να μπορούν να παρέμβουν στην σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και έτσι να ασκήσουν κυτταροστατική, αντική ή και αντιδιαβητική δράση

Η αναγνώριση των αντικαρκινικών και των αντικών νουκλεοζιτών αποτελεί αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια. Πρόσφατες μελέτες

έχουν αποδείξει την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν ως αντικοί παράγοντες επηρεάζοντας τους μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών.

Προκειμένου να προκαλέσει κάποια ενέργεια το φάρμακο πρέπει να αλληλεπιδράσει με ένα μοριακό στόχο. Ο "στόχος" για τα περισσότερα φάρμακα είναι μια πρωτεΐνη αν και για κάποια απ' αυτά είναι ένα μακρομοριακό λιπιδικό ή πρωτεολιπιδικό συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης ενώ, τέλος, μερικά φάρμακα επιδρούν άμεσα στα πυρηνικά οξέα. Οι πιο κοινοί τύποι πρωτεϊνών με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα φάρμακα είναι οι υποδοχείς, οι διάλυτοι ιόντων, τα ένζυμα, τα μόρια-μεταφορείς ή νουκλεϊκά οξέα. Οι υποδοχείς ανάλογα με τη θέση τους στο κύτταρο διακρίνονται σε μεμβρανικούς και κυτταροπλασματικούς ή πυρηνικούς υποδοχείς. Σε περίπτωση που ο μοριακός στόχος του φαρμάκου είναι κυτταροπλασματικός πρέπει το φάρμακο να μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου για να είναι δραστικό.

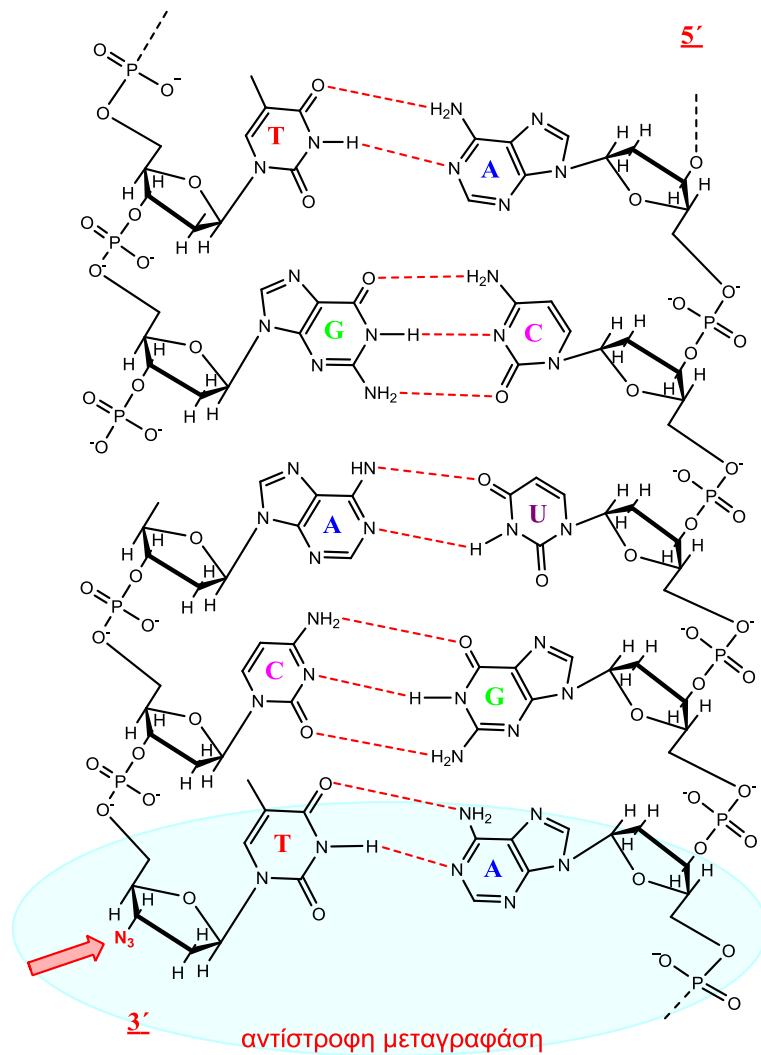
Τα αντικαρκινικά και τα αντικά ανάλογα νουκλεοζιτών αποτελούν προφάρμακα. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να τροποποιηθούν ενδοκυτταρικά έτσι ώστε να μπορέσουν να δράσουν. Εξαρτώνται δηλαδή από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση. Τα φωσφορυλιωμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη σε αντίθεση με τα μη φωσφορυλιωμένα τα οποία εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες-μεταφορείς νουκλεοζιτών.

Φωσφορυλιώνονται στη συνέχεια 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.

Για να επιτευχθεί η πρώτη φωσφορυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (MP) συνήθως καταλύεται από μία νουκλεοζιτική κινάση. Η συγκεκριμένη κινάση κωδικοποιείται από το κύτταρο-ξενιστή ή τον ιό που μολύνει το κύτταρο-ξενιστή. Οι μονοφωσφορικοί νουκλεοζίτες (MP) μετατρέπονται προς τις αντίστοιχες 5'-διφωσφορικές και τριφωσφορικές δομές τους καταλυόμενοι από νουκλεοτιδικές κινάσες, καθώς και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντίστοιχα. Συνεπώς, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι ιικές κινάσες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών. Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, εντοπίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Μιμούμενα τους φυσικούς νουκλεοζίτες, τα αντικά ανάλογά τους μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τις πολυμεράσες και να ενσωματωθούν στο ιικό γονιδίωμα. Η ενσωμάτωσή τους στο ιικό γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει διακοπή της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, να το καταστήσει μη λειτουργικό και κατά συνέπεια να καταστείλει την αντιγραφή του ιού και την περαιτέρω παραγωγή ιοσωματιδίων. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος είναι συντηρημένος σε πολλά είδη ιών, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να παρουσιάσουν δράση έναντι μεγάλου φάσματος ιών.

Αξίζει να σημειωθεί πως μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιική πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητα τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

Ένας κοινός μηχανισμός αντικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωση των νουκλεοζιτών στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της (Εικόνα 5). Η ένωση των νουκλεοτίδιων καταλύεται από κυτταρικές πολυμεράσες οι οποίες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των σακχάρων (Lewin 2003, Burns *et al.* 2005).

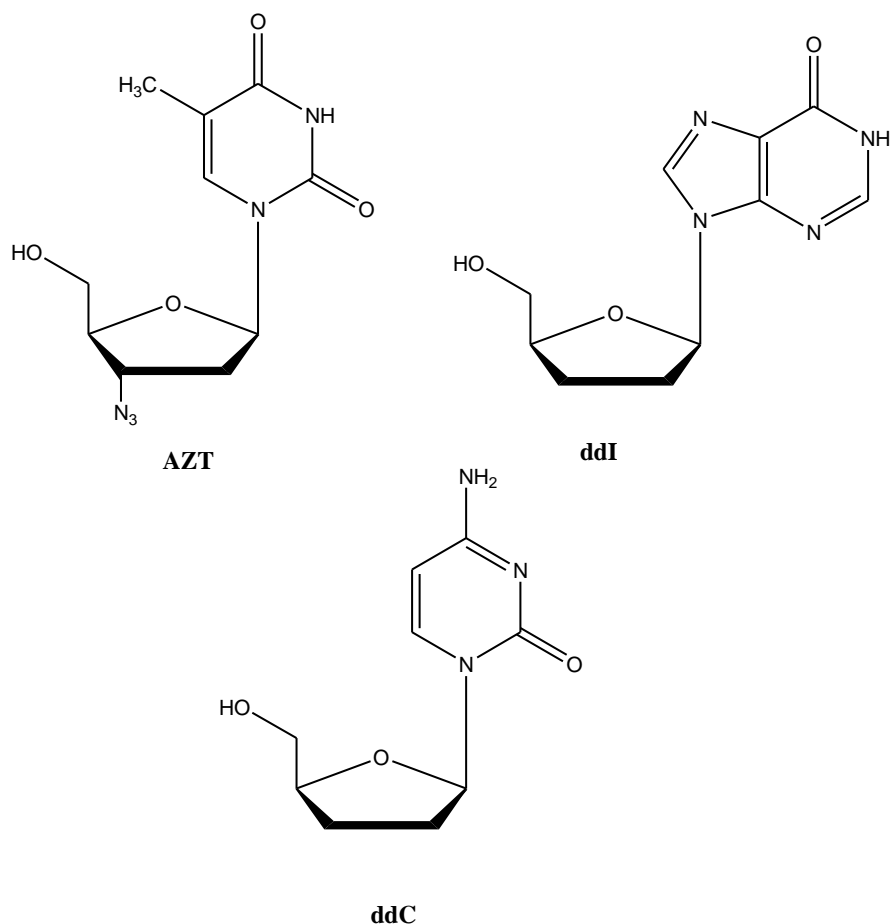


Εικόνα 5.

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

1.3.2 Αντικα νουκλεοζιτικά ανάλογα

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους, παρεμβαλλόμενοι στη σύνθεση του DNA και του RNA, μπορούν να επηρεάσουν εκτός από τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων, τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων (Zhou *et al.* 2004; Perigaund *et al.* 1992). Ιδίως τις τελευταίες δύο δεκαετίες η σύνθεση και η μελέτη των νουκλεοζιτών έχει ανέλθει κατακόρυφα με στόχο τη θεραπεία του AIDS (HIV) (Verheggen *et al.* 1993), του ιού έρπητα ζωστήρα (VZV) (De Clercq *et al.* 2002) και της ηπατίτιδας Β (HBV) (Brady *et al.* 2001). Στην περίπτωση του HIV, μερικά από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι το Zidovudine azidothymidine (AZT), το Didanosine (DDI) και το Zalcitabine (DDC) (Εικόνα 6). Τα συγκεκριμένα ανάλογα δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού.

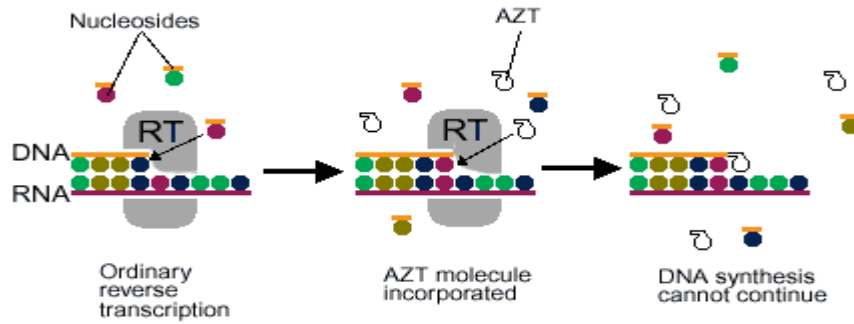


Εικόνα 6. Χημικές δομές των AZT, ddI, ddC

Zidovudine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine)

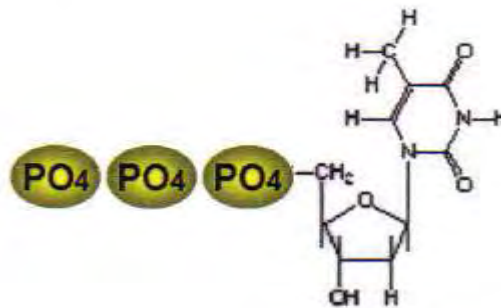
Το Zidovudine ή AZT (3'-Azido-2'-deoxythymidine) ονομάζεται επίσης ZDV, είναι ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο που δρα σαν αναστολέας αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTI). Αποτελεί ένα είδος αντιρετροϊκών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του HIV / AIDS και πρόκειται για ένα ανάλογο της θυμιδίνης. Το AZT ήταν η πρώτη εγκεκριμένη θεραπεία για τον ιό HIV.

Το AZT αναστέλλει τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης παρεμποδίζοντας έτσι την σύνθεση RNA και κατ' επέκταση DNA και τον πολλαπλασιασμό των ιών. Τα κυτταρικά ένζυμα μετατρέπουν το Zidovudine σε ενεργή μορφή 5'-τριφωσφορικού άλατος (εικόνα 7 και 8).



Εικόνα 7. Τρόπος δράσης του AZT

Ο τερματισμός της αλυσίδας του DNA, είναι αποτέλεσμα της απουσίας της ομάδας του 3'-υδροξυλίου στο zidovudine, το οποίο καθιστά αδύνατη τη σύνδεση άλλων νουκλεοτιδίων.



Εικόνα 8. Ενεργή μορφή του AZT. Στη θυμιδίνη προστίθενται τρία φωσφορικά οξέα. Το ένα προστίθεται από το ιικό ένζυμο και τα υπόλοιπα δύο από τα κυτταρικά ένζυμα.

DDI ή Didanosine

Το Didanosine (2', 3'-dideoxyinosine, DDI) είναι ένας αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης, αποτελεσματικό κατά του ιού HIV.

Το DDI είναι ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο της γουανοσίνης. Διαφέρει από τα άλλα νουκλεοζιτικά ανάλογα, επειδή δεν έχει καμία από τις

κανονικές βάσεις. Η δράση του είναι ανάλογη του AZT, δηλαδή παρεμποδίζει τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης.

DDC ή zalcitabine

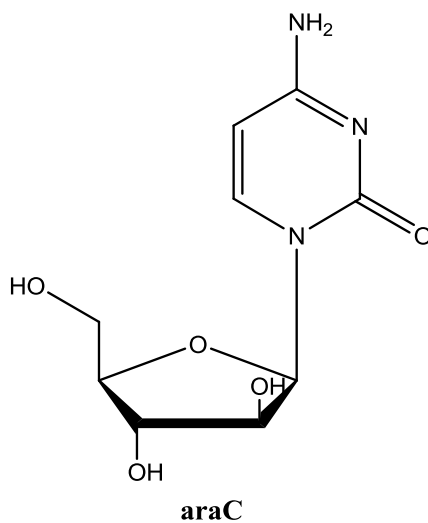
Το zalcitabine (2'-3'-dideoxycytidine, ddC), που ονομάζεται επίσης διδεοξυκυτιδίνη, είναι νουκλεοζιτικό ανάλογο, αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης (NARTI). Είναι ένα ανάλογο της πυριμιδίνης, έχει παρόμοια δράση με το AZT και αποτελεί νουκλεοζιτικό ανάλογο που δρα ενάντια στον HIV, δηλαδή ως αντιρετροϊκό φάρμακο.

1.3.3 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σ' έναν υγιή οργανισμό υπόκειται πάντα σε αυστηρές ρυθμίσεις, που επιτρέπουν στα κύτταρα να αυξηθούν, να διαφοροποιηθούν και να λειτουργήσουν αρμονικά μέσα στον οργανισμό. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις ρυθμίσεις αυτές, αν και οι περισσότεροι παραμένουν ακατανόητοι, περιλαμβάνουν ένα σύστημα χημικών μηνυμάτων με τη διαμεσολάβηση, για παράδειγμα, ορμονών και συγκεκριμένων μεμβρανικών υποδοχέων. Τα κύτταρα σε καλλιέργεια, σταματούν την διαίρεσή τους όταν έρθουν σ' επαφή το ένα με το άλλο. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται και η μιτωτική διαίρεση ορισμένων κυττάρων συνεχίζεται άναρχα, χωρίς να υπακούει σε περιοριστικούς κανόνες. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία

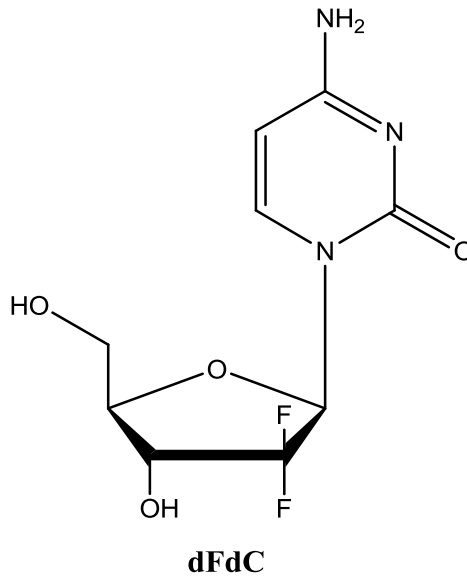
όγκων ή καρκινωμάτων. Τα κύτταρα χάνουν τη διαφοροποιημένη μορφή τους και περνούν σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μπορεί να είναι περιορισμένος (καλοήθεις όγκοι), ή έντονος με μεταστάσεις σε άλλους ιστούς (κακοήθεις όγκοι), οι οποίοι θεραπεύονται κυρίως με χημειοθεραπεία.

Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία διαθέτουν αυξημένη δραστικότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες χρησιμοποιούνται ήδη σαν αντιμεταβολίτες έναντι του καρκίνου, χρησιμοποιούνται δηλαδή εκτεταμένα στην φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύει στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Ένα από τα πρώτα πυριμιδικά νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιήθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας ήταν το cytarabine (araC ή 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη) (εικόνα 9).



Εικόνα 9. Χημική δομή του araC

Η γεμισιταμπίνη (gemcitabine ή dFdC) είναι ένα ακόμη πυριμιδινικό ανάλογο που παρουσιάζει αντικαρκινική δράση. Είναι ανάλογο του cytarabine, το οποίο έχει τροποποιηθεί στην 2' θέση του δακτυλίου της ριβόζης με υποκατάσταση από 2 άτομα φθορίου (εικόνα 10).

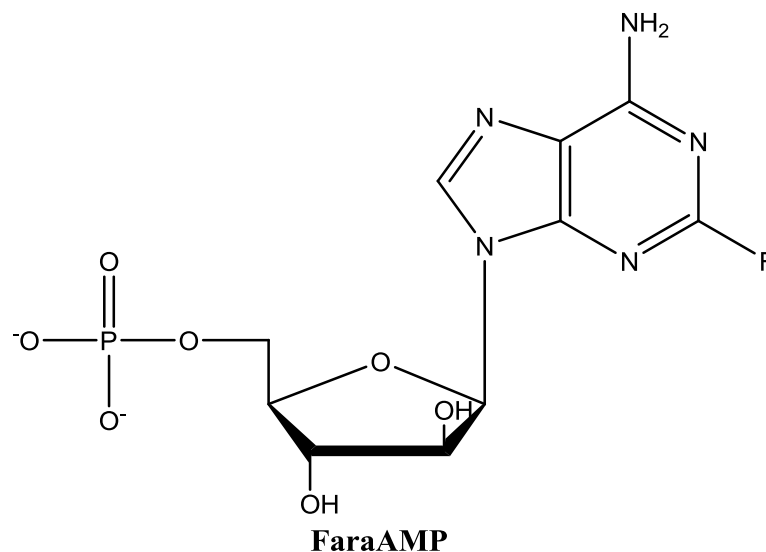


Εικόνα 10. Χημική δομή του gemcitabine (dFdC)

Η γεμισιταμπίνη είναι ένα ανάλογο της κυτιδίνης, που αναπτύχθηκε για τη θεραπεία συμπαγών όγκων. Είναι παρόμοια με την καταραβίνη στο ότι είναι προφάρμακο, απαμινούται και ενεργοποιείται από την δεξοϋριβοζοκινάση της κυτιδίνης. Ο κυτταρικός μηχανισμός δράσης της, αφορά την αναστολή της σύνθεσης του DNA.

Ένα από τα πρώτα πουρινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα η 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλαδενίνη (araA) απορρίφθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας λόγω της χαμηλής διαλυτότητας και της γρήγορης απαμίνωσής της από την απαμινάση της αδενοσίνης. Η προσθήκη ενός

ατόμου φθορίου στο τμήμα της αδερίνης αύξησε την αντίσταση στην απαμινάση της αδενοσίνης και η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας βελτίωσε τη διαλυτότητα του αναλόγου, συνθέτοντας την 5'-μονοφωσφορική 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-2-φθοροαδερίνη (fludarabine), (FaraAMP) (Matsuda et al. 2004). Το fludarabine είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας κατά της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων (εικόνα 11).

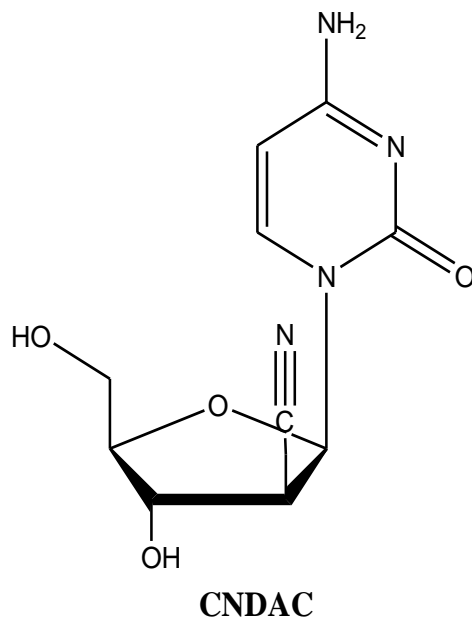


Εικόνα 11. Χημική δομή του fludarabin

1.3.4 Κυανονουκλεοζίτες

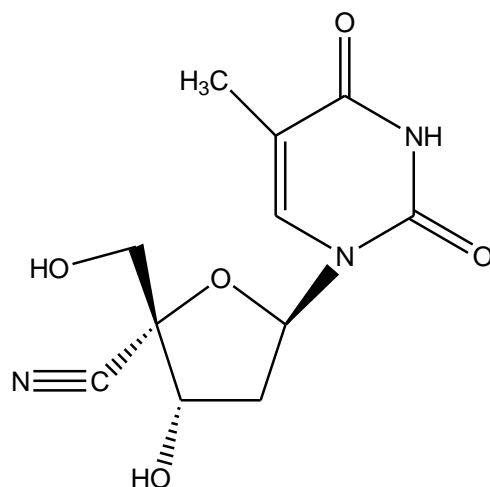
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών πολλοί νουκλεοζίτες έχουν προσελκύσει επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των εν δυνάμει αντικαρκινικών ή των αντικών τους ιδιοτήτων. Η εισαγωγή της κυανο ομάδας σε διάφορες θέσεις ενός φουρανο-νουκλεοζίτη προκαλεί ελάχιστες στερεοχημικές παρεμποδίσεις εξαιτίας του μικρού της μεγέθους και εμφανίζει ισχυρή

ηλεκτραρνητικότητα με αποτέλεσμα να προσδίδει ιδιαίτερες χημικές ιδιότητες στο μόριο και να αλλάζει τη βιολογική του δραστικότητα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας ενώσεων αποτελεί το CNDAC (2'-C-κυανο-2'-δεοξυ-1-β-D-αραβινοφουρανοσυλοκυτοσίνη), που προέκυψε με αντικατάσταση της 2' υδροξυλομάδας του γνωστού αντιμεταβολίτη Ara-C από την κυανο ομάδα και αποτελεί σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα έναντι μεγάλου φάσματος κακοήθων όγκων, όπως αυτού του πνεύμονα και του στομάχου(εικόνα 12).



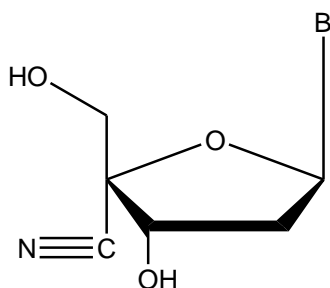
Εικόνα 12

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον προέκυψε και από την ανακάλυψη της ισχυρής αντι- HIV δράσης του 4'-κυανο αναλόγου της θυμιδίνης (εικόνα 13) (O-Yang et al. 1992).



Εικόνα 13. Δομή 4'- υποκατεστημένων νουκλεοζιτών της θυμίνης

Οι πουρινο 2'-δεοξυ νουκλεοζίτες που διαθέτουν μια κυανο ομάδα στον 4' άνθρακα του σακχάρου, εμφανίζουν επίσης πολύ ισχυρή αντι- HIV δράση, παραμένοντας ενεργοί απέναντι σε ανθεκτικά στελέχη του HIV (Satoru et al. 2003). Μάλιστα, επειδή τα 4-C-κυανο σάκχαρα έχουν χαμηλή δραστηριότητα στις αντιδράσεις τους με τις βάσεις, προτιμάται να παρασκευάζονται τροποποιώντας ήδη τους αντίστοιχους νουκλεοζίτες στην 4' θέση. Η δομή των νουκλεοζιτών απεικονίζεται στην (εικόνα 14).



Εικόνα 14. Δομές των κυανο πουρινο 2'-δεοξυ νουκλεοζιτών

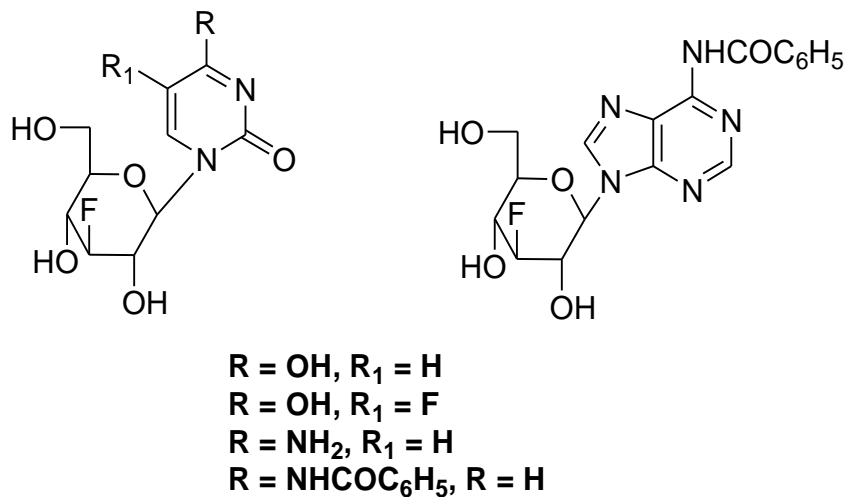
1.3.5 Πυρανονουκλεοζίτες

Παρά το μεγάλο ενδιαφέρον προς τα νουκλεοζιτικά ανάλογα με πενταμελή δακτύλιο, οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν περιορισμένη δράση διότι υφίστανται, σχετικά εύκολα, χημική ή ενζυμική απενεργοποίηση, δεν μεταβολίζονται επαρκώς προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, έχουν μικρό χρόνο ημιζωής, αυξημένη τοξικότητα και τέλος ευθύνονται για την εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και κακοηθών όγκων. Έτσι, το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε προς μια άλλη κατηγορία νουκλεοζιτών, αυτή των πυρανονουκλεοζιτών.

Τα τελευταία χρόνια, νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντιικές (Ostrowski *et al.* 1998), αντικαρκινικές (Malsen *et al.* 2004), αντιοξειδωτικές (Spanou *et al.* 2007) και αντιβιοτικές τους ιδιότητες (Haouz *et al.* 2003) καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων (Vastmans *et al.* 2001). Μάλιστα νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη έδειξαν αντίσταση στην υδρόλυση, καθώς το σπάσιμο του γλυκοζιτικού δεσμού είναι ένα συνηθισμένο μονοπάτι αποικοδόμησης των νουκλεοζιτικών αντιικών, ιδιαίτερα των 2',3'-διδεοξυνουκλεοζιτών. Τα πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα διαθέτουν λοιπόν αυξημένη σταθερότητα, μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής, άρα και εν δυνάμει περισσότερο χρόνο δράσης.

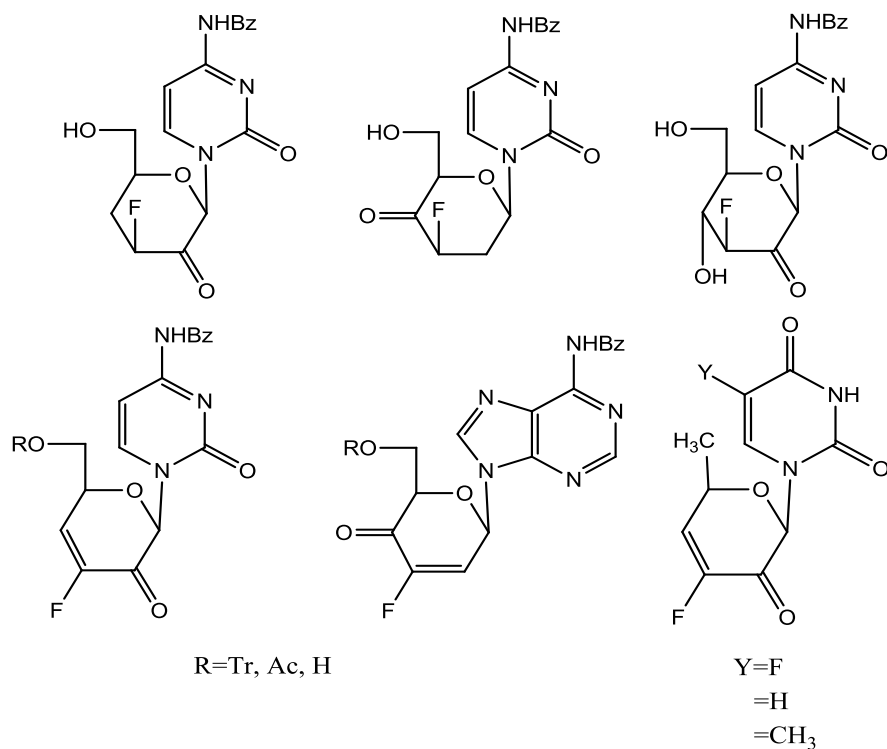
Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί νέες σειρές βιολογικά ενεργών ακόρεστων νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο.

Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έχουν συντεθεί φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Manta et al. 2007), οι οποίοι μειώνουν αποτελεσματικά τη δραστικότητα της PARN, ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(A) ουράς) (**εικόνα 15**).



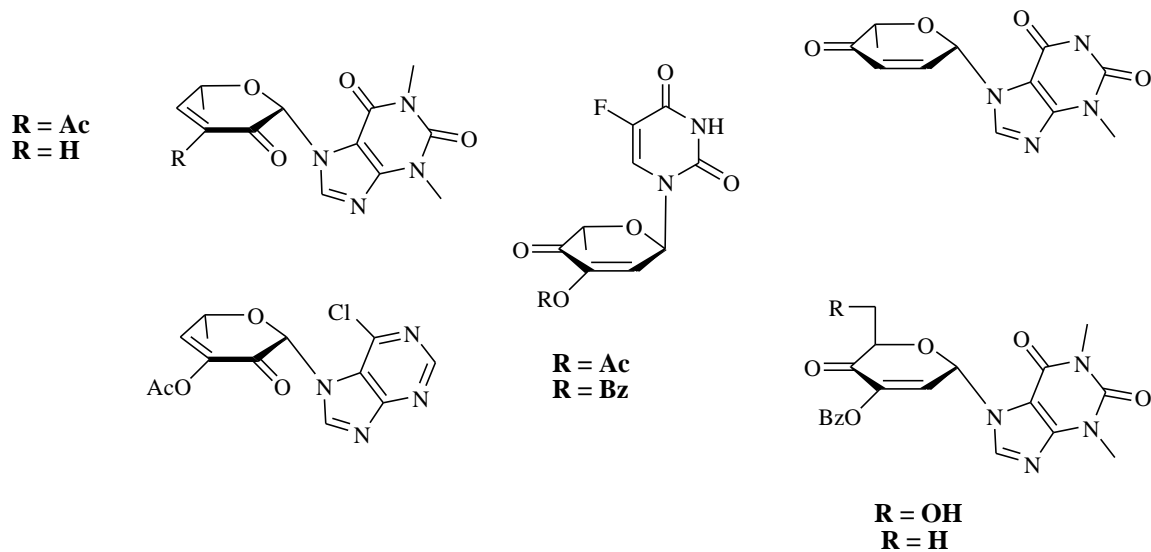
Εικόνα 15: Χημική δομή φθορο- πυρανονουκλεοζιτών

Νέες σειρές νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο που επίσης έχουν μελετηθεί αποτελούν οι φθορο κετο και ακόρεστοι φθορο κετοπυρανονουκλεοζίτες. Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης εντεροϊού και αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Manta et al. 2007, Manta et al. 2008, Manta et al. 2009) (**Εικόνα 16**).



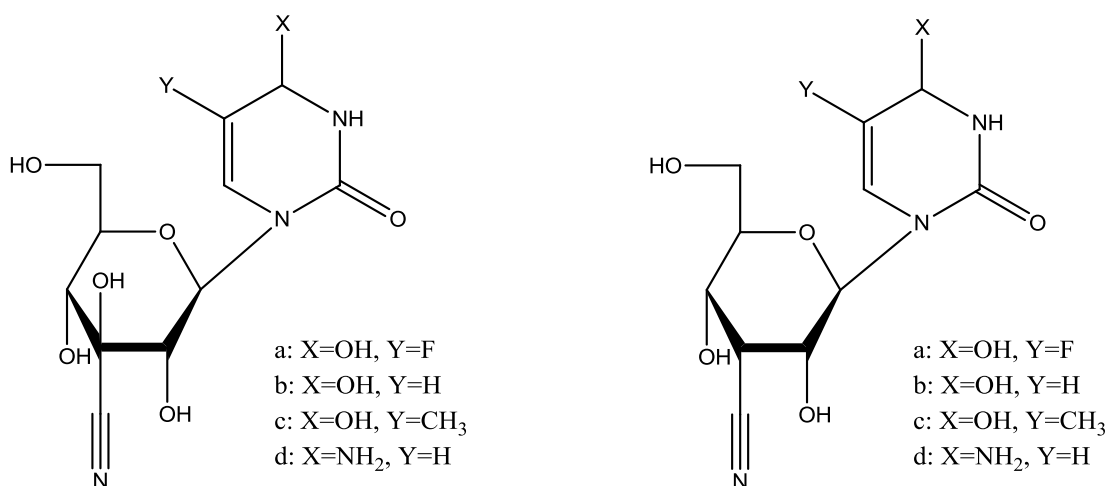
Εικόνα 16: Χημική δομή φθορο κετο και ακόρεστων φθορο κετοπυρανονουκλεοζιτών

Επιπρόσθετα, ακόρεστα κετοπυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα παρουσίασαν, σε προηγούμενες μελέτες, σημαντική ανασταλτική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων *in vitro* αλλά και *in vivo* (Komiotis et al. 1991, Patterson et al. 1998, Komiotis et al. 2008). Η χημική δομή των συγκεκριμένων ενώσεων (**6-10**) φαίνεται στην (εικόνα 17).



Εικόνα 17

Τέλος πρόσφατα έχει συντεθεί μια νέα τάξη κυανο πυρανονουκλεοζιτών, με την κυανο ομάδα στην 3' θέση τους σακχάρου (Kiritsis et al., 2011) των οποίων η αντική δράση έχει αξιολογηθεί έναντι μιας πληθώρας DNA και RNA ιών, ενώ παρουσίασαν σημαντική κυτταροστατική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και κατά του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa) (**εικόνα 18**).

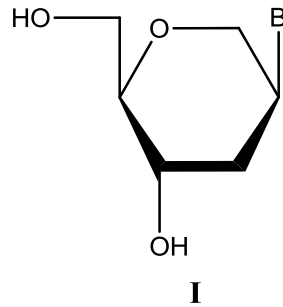


Εικόνα 18: Κυανο-νουκλεοζίτες με την κυανο ομάδα στην 3' θέση τους σακχάρου.

1.3.6 Δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες

Άλλη μία σημαντική κατηγορία νουκλεοζιτών με τροποποιημένο εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είναι οι δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες, οι οποίοι παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες. Με τον όρο δεοξυνουκλεοζίτες υποδηλώνεται η αντικατάσταση ενός υδροξυλίου από ένα υδρογόνο σε οποιαδήποτε θέση του σακχάρου, το οποίο ενώνεται απευθείας με την αζωτούχο βάση. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε σε αυτήν την τάξη των νουκλεοζιτών από τη στιγμή που οι 6'-δεοξυ-κετονουκλεοζίτες παρουσίασαν αξιοσημείωτη αντικαρκινική δράση, και επιπλέον από την εμφάνιση αντιβιοτικών, τα οποία περιέχουν 6'-δεοξυπυρανόζες. Αξιοσημείωτη όμως, είναι και η αντική, καθώς και η αντιλευχαιμική δράση που εμφάνισαν ορισμένοι πουρινικοί και πυριμιδινικοί 2'-δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες. Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί και η αντική

δράση των 1,5-ανυδροεξιτολο-νουκλεοζιτών έναντι του ιού του απλού έρπητα τύπου 1 και τύπου 2, του κυτταρομεγαλοϊού καθώς και του ιού έρπητα ζωστήρα (ένωση I, εικόνα 19) (Verheggen I. et al, 1993, Verheggen I. et al, 1995).



a=αδενίνη
b=5-ιοδοουρακίλη
c=κυτοσίνη
d=θυμίνη
e=γουανίνη

Εικόνα 19 : Δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες

2.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Στόχος-σκοπός μελέτης

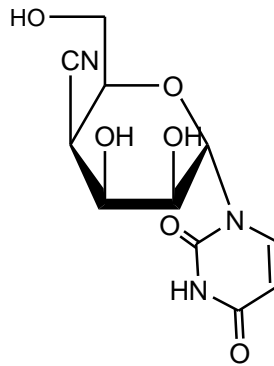
Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση και η μελέτη τροποποιημένων νουκλεοζιτών με σκοπό την εύρεση νέων αντικαρκινικών, αντικών φαρμάκων με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα από τα μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενα.

Με βάση τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία έχει διαπιστωθεί ότι φουρανονουκλεοζίτες που φέρουν διακλαδωμένη κυανο αλυσίδα στο υδατανθρακικό τους τμήμα εμφανίζουν εξαιρετικό φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Κάποιες φορές μάλιστα η δράση τους είναι καλύτερη από τα ήδη χρησιμοποιούμενα φάρμακα.

Πρόσφατες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, απέδειξαν ότι νέες τάξεις 3'-C-κυανο και 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο πυρανονουκλεοζιτών αποτελούν εν δυνάμει αποτελεσματικούς αναστολείς της ανάπτυξης καρκινικών όγκων του τραχήλου της μήτρας όπως επίσης και των λεμφοκυττάρων. Βασιζόμενοι στις ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες των ανωτέρω ενώσεων, αποφασίσαμε να διευρύνουμε τις μελέτες μας προς τη σύνθεση νέων μορίων, στα οποία μία ηλεκτραρνητική κυανο ομάδα θα εισαχθεί στην 4' θέση αντί της 3'.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω και με βάση τις σημαντικές αντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες που παρουσιάζουν οι δεοξυ πυρανονουκλεοζίτες, κρίθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης

δεοξυ κυανο πυρανονουκλεοζιτών. Οι νέοι νουκλεοζίτες φέρουν κυανο αλλά και δεοξυ στη 4'-θέση του σακχάρου και ως ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη. Η δομή του μορίου που στόχευσε η συνθετική μας πορεία φαίνεται στην (εικόνα 20).



Εικόνα 20

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων

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

- οξικός ανυδρίτης (Ac_2O)
- πυριδίνη
- διάλυμα Μεθανόλης (MeOH)
- ακετονιτρίλιο (CH_3CN)
- Τριφθορομεθανοσουλφονικός
τριμεθυλοσιλυλεστέρας ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$)
- π-Τολουολοσουλφονικό οξύ ($p\text{-TsOH}$)
- 2,2-Διμεθοξυπροπάνιο [$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$]
- 4,4-Διμεθυλαμινοπυριδίνη (DMAP καταλυτικά)
- τριαιθυλαμίνη Et_3N
- άνυδρο N,N-Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)
- Διχρωμική πυριδίνη (PDC)
- Διχλωρομεθάνιο [CH_2Cl_2]
- όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3)
- αιθέρας
- κυανιούχο νάτριο NaCN

- άνυδρο τολουόλιο (dry Tol)
- Αζοδισισοβουτυρονιτρίλιο AIBN
- Τριβούτυλο υδρίδιο του κασσιτέρου Bu_3SnH
- Τριφθοροξικό οξύ (TFA)

3.2 Γενική Μεθοδολογία

3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Οι αντιδράσεις ελέγχονται με χρωματογραφία χάρτου, με πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με silica gel F_{254} (0.2 mm) της εταιρίας E.Merck. Γενικά, τα χρωματογραφήματα εμφανίζονται με ψεκασμό με διάλυμα H_2SO_4 (θειικού οξέος) 30%, ενώ άλλοτε οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων (TLC) είναι ορατές υπό λυχνία υπεριώδους (UV).

Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 80/20
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 80/20
- Διάλυμα Γ : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Δ : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 40/60
- Διάλυμα Ε: οξικός αιθυλεστέρας
- Διάλυμα ΣΤ: διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Ζ: διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 98/2
- Διάλυμα Η: διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 95/5

3.2.2 Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης, επιτεύχθηκε με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση σε silica gel 60 (230-400 mesh) της εταιρίας E. Merck (flash chromatography) και οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω:

- Διάλυμα Α: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Β: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 80/20
- Διάλυμα Γ: διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Δ: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 70/30
- Διάλυμα Ε: διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 98/2

3.2.3 Ξήρανση διαλυτών

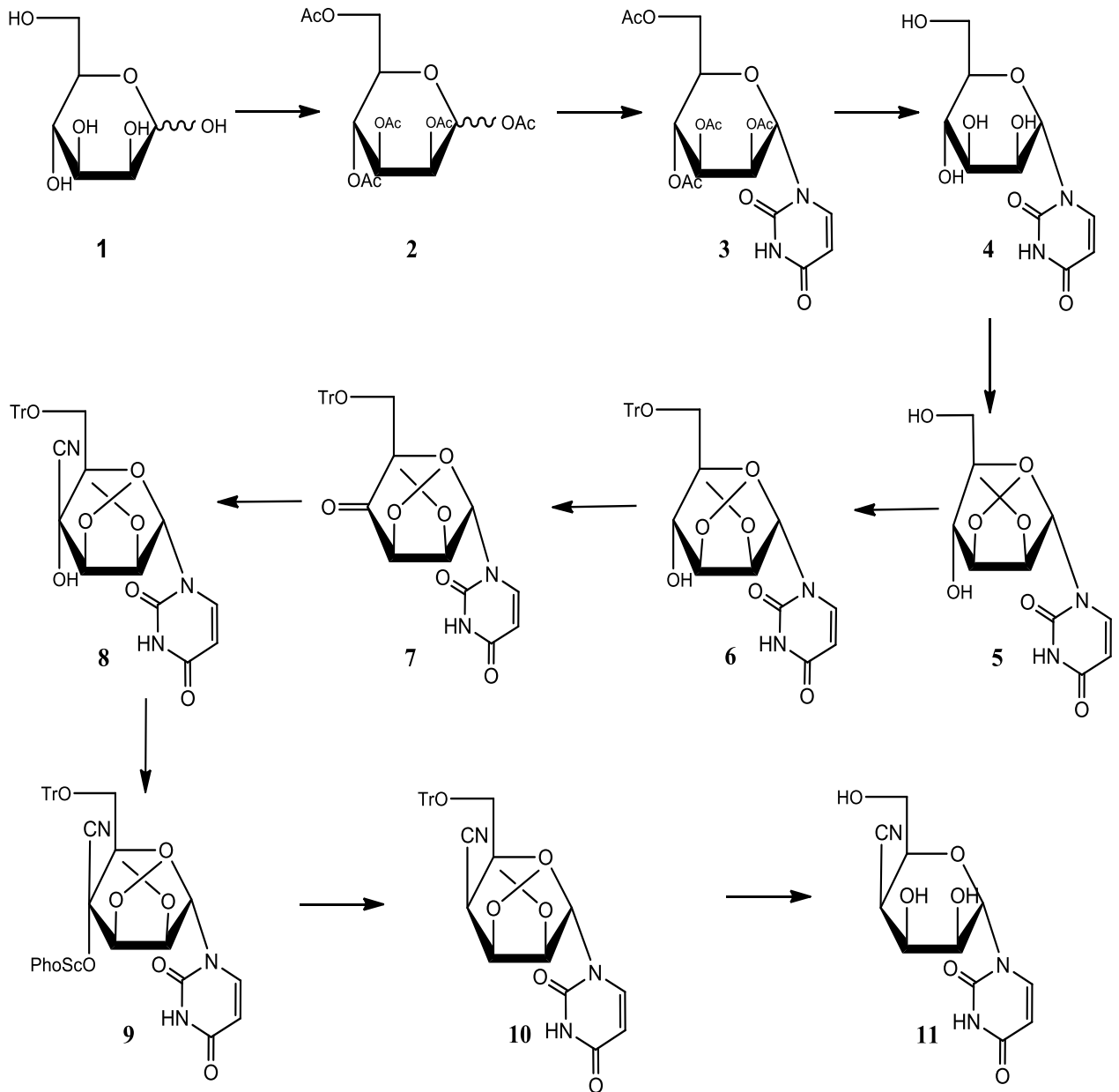
Χρησιμοποιούνται άνυδροι διαλύτες ακετονιτρίλιο (CH_3CN), *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και τολουόλιο. Η ξήρανση του CH_3CN έγινε παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα κατά τη διάρκεια μιας νύχτας (reflux overnight). Στη συνέχεια έγινε απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το DMF φυλάσσεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å, καθώς και η πυριδίνη σε σφαιρίδια KOH (pellets).

3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με Bruker 250 MHz. Το tetramethylsilan (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (double), t (triple), q (quadruple), m (multiple). Οι συχνότητες J μετρήθηκαν σε Hz.

3.3 Μέθοδοι

3.3.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού



3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης

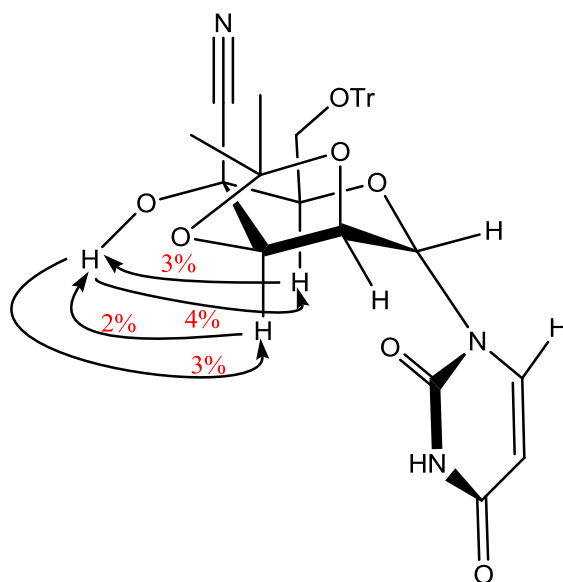
Η πρώτη αντίδραση αυτής της πορείας περιλαμβάνει την ακετυλίωση της D-μαννόζης **1** χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια πυριδίνη και οξικό ανυδρίτη Ac_2O . Λαμβάνουμε με τον τρόπο αυτό την 1,2,3,4,6 πεντα-O-ακέτυλο-D-μαννοπυρανόζη **2**. Αφού εξασφαλιστεί η διαθεσιμότητα του επιθυμητού ακετυλιωμένου σακχάρου **2**, ακολουθεί σιλυλίωση της ουρακίλης. Για να επιτευχθεί η συμπύκνωση της εμπορικά διαθέσιμης ουρακίλης με την ακετυλιωμένη μαννόζη, χρησιμοποιείται η σιλυλιωμένη ουρακίλη, η οποία προκύπτει μετά από αντίδραση με εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο (CH_3CN). Η αντίδραση καταλύεται από τη σακχαρίνη. Η σιλυλιωμένη ουρακίλη αντιδρά με την ακετυλιωμένη μαννόζη παρουσία του καταλύτη τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα ($Me_3SiOSO_2CF_3$) και λαμβάνουμε την 1-(2',3',4',6'-Τετρα-O-ακετυλο- α -D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης (**3**).

Στη συνέχεια, η ένωση **3**, μέσω μίας εύκολης πειραματικής διαδικασίας, κατεργάζεται με μεθανολική αμμωνία για μία νύχτα, με αποτέλεσμα τη λήψη του πλήρως αποπροστατευμένου νουκλεοζίτη **4**. Ακολουθεί η εκλεκτική προστασία των γειτονικών υδροξυλίων στις 2' και 3' θέσεις του σακχάρου, η οποία οδηγεί στη λήψη της ένωσης **5**. Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται με επίδραση του 2,2-διμεθοξυπροπανίου [$(CH_3)_2C(OCH_3)_2$] επί της ένωσης **4** καθώς και του π-τολουολοσουλφονικού οξέος (p -TsOH) ως καταλύτη.

Για την παρασκευή του κορεσμένου 4'-κετοπυρανονουκλεοζίτη το πρώτο βήμα της σύνθεσης περιλαμβάνει την εκλεκτική τριτυλίωση του πρωτοταγούς υδροξυλίου του προϊόντος **5**, η οποία λαμβάνει χώρα μέσω κατεργασίας με τριφαινυλομεθυλοχλωρίδιο ($TrCl$) σε πυριδίνη, παρουσία καταλυτικής ποσότητας 4,4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (DMAP). Στη συνέχεια, ακολουθεί η οξείδωση του ελεύθερου υδροξυλίου στην 4' θέση του σακχάρου της τριτυλιωμένης ένωσης **6**, με επίδραση διχρωμικής πυριδίνης (PDC) και Ac_2O σε διχλωρομεθάνιο, με αποτέλεσμα τη λήψη του κετονουκλεοζίτη **7**.

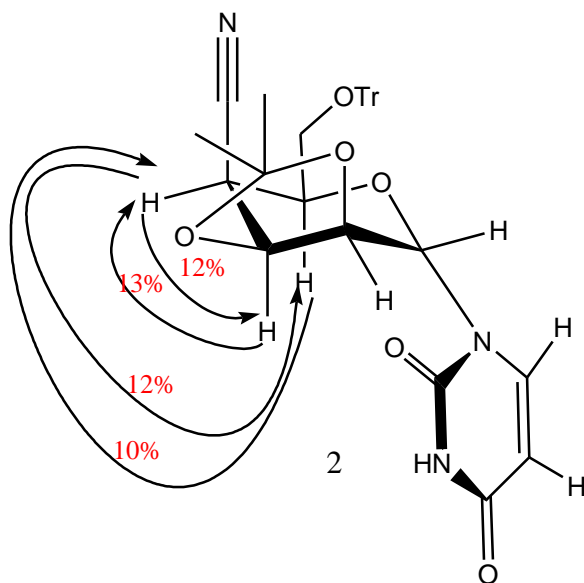
Η επόμενη αντίδραση περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσθήκη της κυανο ομάδας στην κετονομάδα του προϊόντος **7**, χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια του κυανικού και ανθρακικού νατρίου σε διάλυμα δύο φάσεων νερού και αιθυλαιθέρα (ένωση **8**). Η προτεινόμενη β -στερεοχημεία της κυανο ομάδας στηρίχθηκε με μετρήσεις NOE που έγιναν

στο προϊόν **8**. Όπως απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα η αύξηση της έντασης του υδροξυλίου κατά 3% και 2% με την ακτινοβόληση των 5'-H κ 3'-H αντίστοιχα, αποδεικνύει ότι το υδροξύλιο βρίσκεται στην κάτω πλευρά του δακτυλίου. Ομοίως κορεσμός της ελεύθερης υδροξυλομάδας οδηγεί στην αύξηση των εντάσεων των 5'-H κ 3'-H κατά 4% και 3% αντίστοιχα.



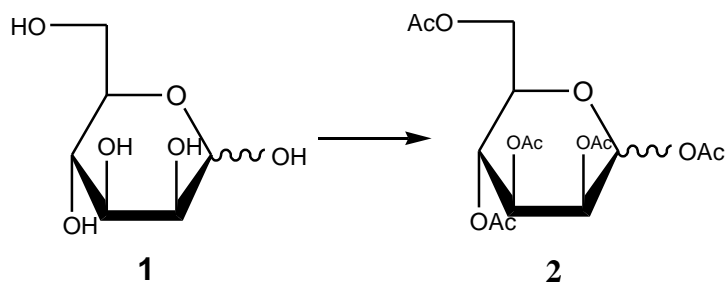
Η επόμενη αντίδραση της συνθετικής πορείας είναι η φαινοξυθειοκαρβονυλίωση του νουκλεοζίτη **8**, η οποία πραγματοποιείται με επίδραση φαινοξυθειοκαρβονυλοχλωριδίου (PhOC(S)Cl), παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et₃N) και 4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (DMAP) σε CH₃CN. Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνεται το 3'-O-φαινοξυθειοκαρβονυλο παράγωγο **9**.

Στη συνέχεια, το προϊόν **9** χωρίς περαιτέρω απομόνωση ανάγεται παρουσία του υδριδίου του τριβουτυλοκασιτέρου (Bu₃SnH), καθώς και του αζωδισ-ισοβουτυρονιτριλίου (AIBN) σε διαλύτη τολουόλιο στους 100 °C. Ο δεοξυ κυανονουκλεοζίτης **10** λαμβάνεται ύστερα από τη σχάση του δεσμού C4-O4 σε μία αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών. Η αναγωγή επιτεύχθηκε στερεοεκλεκτικά και η απόσπαση του υδρογόνου από το Bu₃SnH έγινε από την κάτω α όψη του δακτυλίου. Η β-στερεοχημεία της κυανο ομάδας διαπιστώθηκε με μετρήσεις NOE που έγιναν στο προϊόν **10** του παρακάτω σχήματος. Οι αμοιβαίες αυξήσεις της έντασης που παρατηρούνται μεταξύ του H-3' και των H-4' και H-5', δείχνουν ότι τα τρία αυτά πρωτόνια βρίσκονται στην κάτω α όψη του πυρανικού δακτυλίου.



3.3.3 Σύνθεση 1-(4'-Δεοξυ-4'-κυανο-ταλοπυρανοζυλο) ουρακίλης

3.3.3.1 Σύνθεση της 1,2,3,4,6-Πεντα-Ο-ακετυλο-D-μαννοπυρανόζη(2)



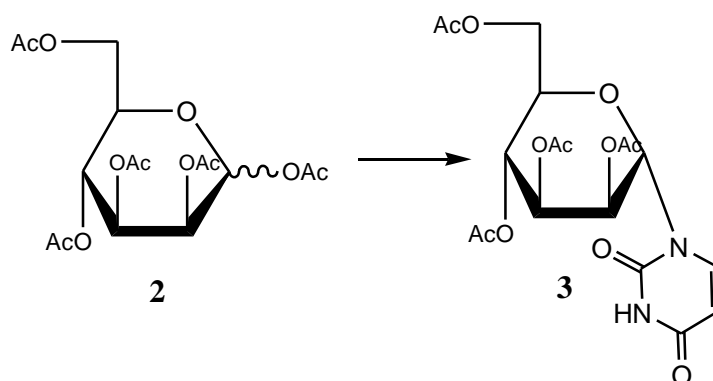
Σε διάλυμα της *D*-μαννόζης (**1**) (2000 mg ή 11,1 mmol) σε πυριδίνη (38,85 mL) προστίθεται Ac_2O (19,98 mL, mmol) και το προκύπτον ελαιώδες αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) το διάλυμα ψύχεται στους 0 °C, και προστίθεται μεθανόλη (7 mL). Στη συνέχεια, οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό με MeOH και τολουόλιο, το υπόλειμμα καθαρίζεται σε στήλη

χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Α. Το επιθυμητό προϊόν **(2)** (4,541 g) ελήφθη υπό τη μορφή λαδιού.

TLC (Διάλυμα Α)	R _f = 0,58
Απόδοση	99%

Πίνακας 1

3.3.3.2 Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-Τετρα-Ο-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης (**3**)



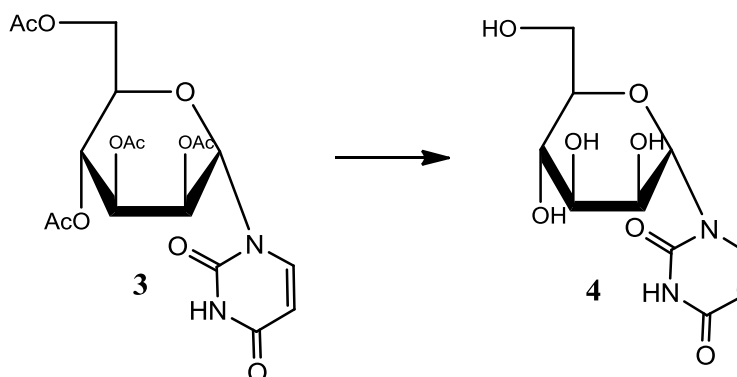
Διάλυμα αποτελούμενο από ουρακίλη (1,56g, 13,92mmol), εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) (3,64 mL, 17,26 mmol) και σακχαρίνη (117mg, 0,64 mmol) σε άνυδρο διαλύτη ακετονιτρίλιο (CH₃CN) (63 ml) θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 40 λεπτά στους 120° C υπό την επίδραση αζώτου και στην συνέχεια προστίθεται η 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανόζη (**2**) (4,541 g, 11,6 mmol) καθώς και ο Me₃SiOSO₂CF₃ (2,93 mL, 16,24 mmol). Ακολουθεί θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 90° C για περίπου 2,5h (TLC), ψύξη του μίγματος σε

θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NaHCO_3 , και εκχύλιση με EtOAc . Η οργανική φάση πλένεται με νερό (4 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης , χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα B, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **3** (3,752g) ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο.

TLC (Διάλυμα B)	$R_f = 0,27$
Απόδοση	73%
α_D	+ 45.5 (c = 0,23)
λ_{max}	261 nm

Πίνακας 2

3.3.3.3 Σύνθεση της 1-(α -D-Μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης (4)

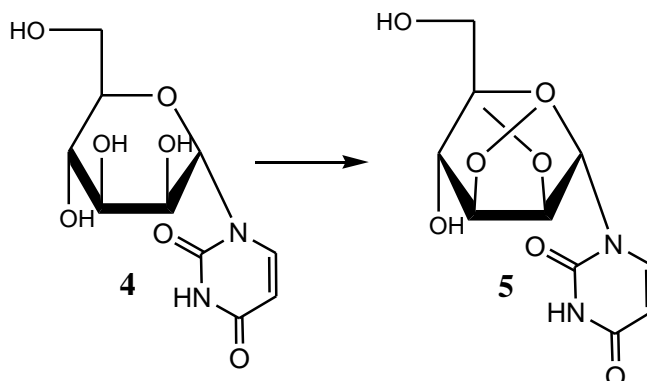


Διάλυμα της ένωσης **3** (750mg, 1,69 mmol) σε μεθανολική αμμωνία (κορεσμένη στους 0° C, 10ml) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα EtOAc/MeoD 8:2 οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4** με λευκή αφρώδη υφή και απόδοση 98%.

TLC (Διάλυμα Β)	Rf = 0,13
Απόδοση	98%
α_D	+ 34.7 (c = 0,15)
λ_{max}	260 nm

Πίνακας 3.

3.3.3.4 Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-Ισοπροπυλιδανο-α-D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης (5)

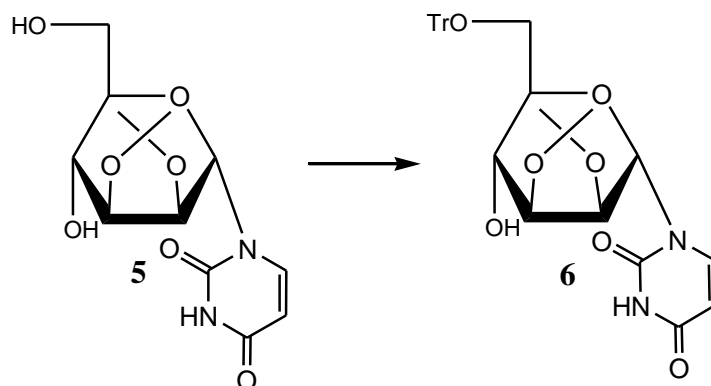


Σε διάλυμα του προϊόντος **4** (845mg, 3,08mmol) με άνυδρη ακετόνη (6,16 mL) προστίθεται $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$ (6,16 mL) και *p*-TsOH (0,12 g, 0,64 mmol) ως καταλύτης οπότε αρχικά προστατεύονται τα υδροξύλια στις 2',3' και 4',6' θέσεις του σακχάρου και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Έπειτα από προσθήκη νερού (12,32 ml) διασπάται το ένα ακετονίδιο, με αποτέλεσμα τη λήψη της επιθυμητής ένωσης **5** και το μίγμα αναδεύεται για περίπου 16h (TLC). Στη συνέχεια προστίθεται τριαιθυλαμίνη μέχρι ουδετέρου pH ($\text{pH} \leq 7$) και οι διαλύτες απομακρύνονται υπό υψηλό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Γ, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5** (833mg) με λευκή αφρώδη υφή.

TLC (Διάλυμα ΣΤ)	Rf = 0,2
Απόδοση	55 %
α_D	+ 25.8 (c = 0,28)
λ_{max}	260nm

Πίνακας 4.

3.3.3.5 Σύνθεση 1-(2',3'-Ο-Ισοπροπυλιδανο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης (6)

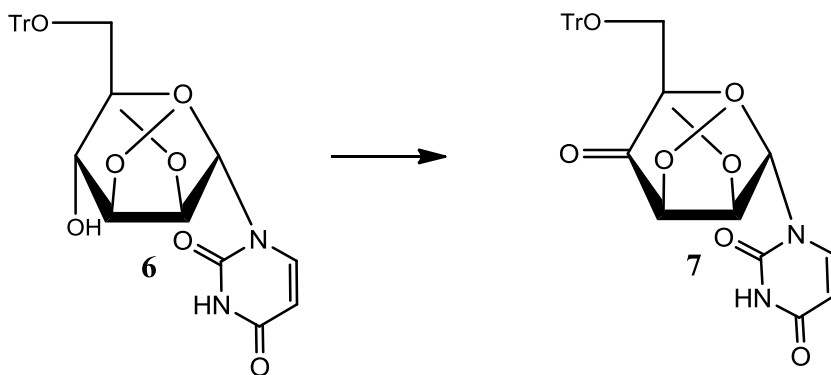


Σε διάλυμα της ένωσης **5** (933 mg, 2,97 mmol) σε DMF (7,43 mL), και τριαιθυλαμίνη (Et_3N) (1,317 μl , 9,5 mmol) προστίθεται TrCl (1,33 g, 4,75 mmol) και καταλυτική ποσότητα DMAP και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3h. Ακολουθεί προσθήκη μεθανόλης (7 mL) και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Δ, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **6** (815 mg) υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα E)	$R_f = 0.57$
Απόδοση	52%
α_D	+ 18.2 (c = 0.1)
λ_{max}	260 nm $\epsilon = 2324$

Πίνακας 5 .

3.3.3.6 Σύνθεση της 1-(2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-6'-O-τριτυλο-α-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-4'-ουλοζ)ουρακίλης (7)

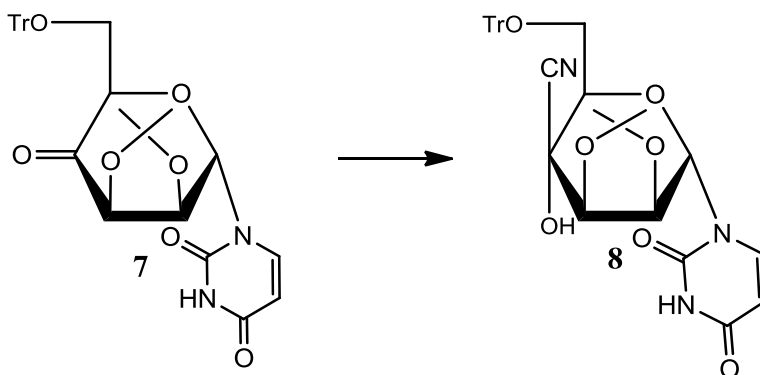


Σε διάλυμα της ένωσης **6** (1000mg, 1,79mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (18mL) προστίθεται PDC (803mg, 2,13 mmol) και Ac₂O (500mL, 5,03mmol) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3h. Στη συνέχεια προστίθεται EtOAc (5 mL) και το προκύπτον παχύρρευστο έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα B, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **7** (516mg) υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα B)	Rf = 0,58
Απόδοση	61%
α_D	+ 4.5 (c = 0,15)
λ_{max}	260 nm ε=7858

Πίνακας 6.

3.3.3.7 Σύνθεση της 1-(4'κυανο-2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης (8)

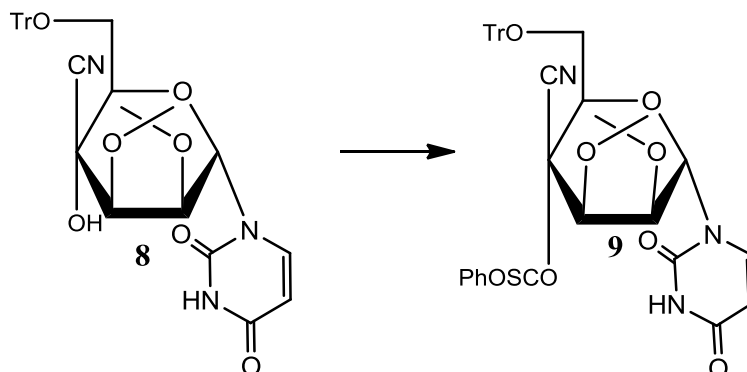


Η ένωση 7 (516 mg, 0,93 mmol) διαλύεται σε αιθέρα (8mL) και στη συνέχεια προστίθεται νερό (4 ml), ώστε να σχηματιστούν δύο φάσεις. Κατόπιν προστέθηκε NaCN(48mg, 0,98mmol) και NaHCO₃ (165mg, 1,96mmol) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 h. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC. Η οργανική φάση διαχωρίστηκε και η υδατική φάση πλύθηκε δυο φορές με οξικό αιθυλεστέρα (3 ml). Οι οργανικές φάσεις ενώθηκαν, ξηράθηκαν με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα E.

TLC (Διάλυμα Z)	Rf = 0,58
Απόδοση	51%
α_D	+ 4.5 (c = 0,15)
λ_{max}	260 nm ε=6225

Πίνακας 7.

3.3.3.8 Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-Ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-Ο-τριτυλο-4'-Ο-φαινοξυθειοκαρβονυλο- α-D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης (**9**)

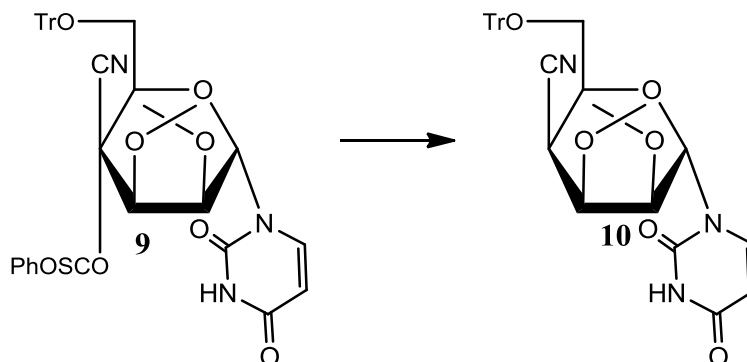


Σε διάλυμα της ένωσης **8** (150mg, 0,62mmol) σε CH₃CN(2,74mL) DMAP(14mg) και Et₃N(110μL, 0,78mmol). Στο προκύπτον εναιώρημα προστίθεται και phenyl chlorothionocarbonate(104μL, 0,76mmol) και αναδεύεται στους 0° C για 1h. Το μίγμα αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (250 mL) και εκχυλίστηκε τρεις φορές με νερό (3 x 50 mL). Κατόπιν η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα (**9**) συμπυκνώνεται δυο φορές με άνυδρο τολουόλιο και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω απομόνωση.

TLC (Διάλυμα Η)	R _f = 0.5
Απόδοση	58%

Πίνακας 8.

3.3.3.9 Σύνθεση της 1-(4'-Δεοξυ-2',3'-Ο-ισοπροπυλιδανο-4'-κυανο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-ταλοπυρανοζυλ)ουρακίλης (10)

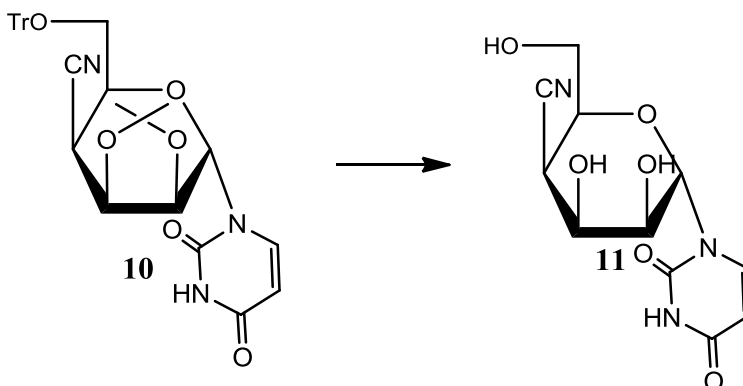


Σε διάλυμα της ένωσης **9** (151 mg, 0,21 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (2,2 mL), και AIBN (5mg) προστίθεται Bn_3SnM (88mL, 0,33 mmol) και το προκύπτον εναιώρημα θερμαίνεται στους 100°C . Στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Το προκύπτον προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα E, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **10** (87mg) υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου.

TLC (Διάλυμα Z)	$R_f = 0,62$
Απόδοση	73 %

Πίνακας 9.

3.3.3.10 Σύνθεση της 1-(4'-Δεοξυ-4'-κυανο-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλης (11)

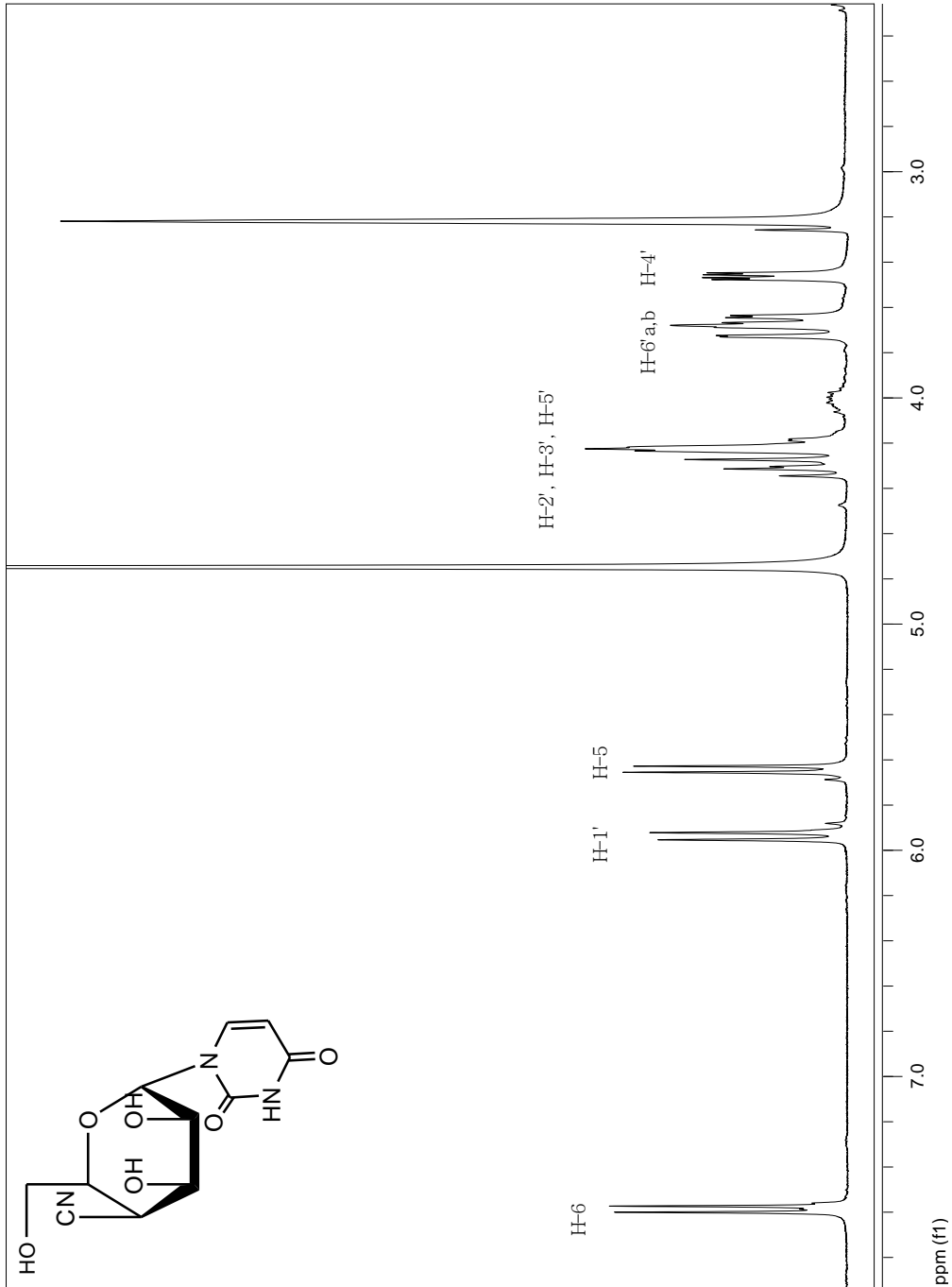


Σε διάλυμα από την ένωση **10** (70 mg, 0,12 mmol) προστέθηκαν άνυδρη μεθανόλη (0,07 mL) και TFA (0,63 mL) και το προκύπτον εναιώρημα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και ήπια ανάδευση για 8 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη μεθανόλης (5 mL) και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Για την απομόνωση της ένωσης ενδιαφέροντος (**11**) χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης το σύστημα ΣΤ σε αναλογία 9:1 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται ως εξής:

TLC (Διάλυμα ΣΤ)	Rf = 0,2
Απόδοση	58%
α_D	+ 27.0 (c = 0,50)
λ_{max}	260 nm $\epsilon=4396$

Πίνακας 10

4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR



5.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βασιζόμενοι στην αντικαρκινική και αντική δράση που παρουσιάζουν οι πυρανονουκλεοζίτες με διακλαδωμένη αλυσίδα την κυανο ομάδα και λαμβάνοντας υπόψη τις σημαντικές βιολογικές ιδιότητες των δεοξυ νουκλεοζιτών, στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών που φέρουν τη χαρακτηριστική κυανο ομάδα και δεοξυ στη θέση 4' του σακχάρου και ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη.

Σημαντικό στάδιο στη συνθετική μας πορεία αποτελεί η πυρηνόφιλη προσθήκη της κυανο ομάδας στην κετονομάδα της ένωσης **7** για το σχηματισμό του κυανο πυρανικού παραγώγου **8**. Το επόμενο κρίσιμο στάδιο στην συνθετική μας πορεία είναι η αναγωγή του υδροξυ κυανο νουκλεοζιτικού παραγώγου **8** που πραγματοποιείται με δύο διαδοχικές αντιδράσεις. Αρχικά εισάγεται η φαινοξυθειοκαρβονυλο ομάδα στο τριτοταγές υδροξύλιο της ένωσης **8** και έπειτα το προϊόν ανάγεται σε μια αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η αντίδραση αναγωγής γίνεται υπό αυστηρά άνυδρες συνθήκες, λόγω της σχετικά εύκολης υδρόλυσης του ενδιάμεσου φαινοξυθειοκαρβονυλο εστέρα **9**. Η αντίδραση αναγωγής πραγματοποιείται με στερεοεκλεκτικό τρόπο, με αποτέλεσμα η κυανο ομάδα στο κυανο πυρανονουκλεοζίτη **10** να βρίσκεται στην πάνω β όψη του υδατανθρακικού δακτυλίου, όπως αποδείχτηκαν ύστερα από τη πραγματοποίηση των μετρήσεων NOE.

Ο τελικός νουκλεοζίτης ελήφθη με μια βολική συνθετική πορεία, η οποία περιελάμβανε σύντομα βήματα με ικανοποιητικά ποσοστά απόδοσης για τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν . Η συνθετική

πορεία από την *D*-μαννόζη έως τη σύνθεση της 1-(2',3'-*O*-Ισοπροπυλιδενο-6'-*O*-τριτυλο- α -*D*-λυξο-εξωπυρανοζυλο-4'-ουλοζ)ουρακίλης **(7)** είχε αποδόσεις από μέτριες έως ποσοτικές (52%-99%). Η σύνθεση του 4'κυανο παραγώγου **8** είχε απόδοση 51%, ενώ η αναγωγή του νουκλεοζίτη **8** προς το αντίστοιχο 4'-δεοξυ-κυανο ανάλογο είχε πολύ καλή απόδοση (73%). Τέλος, το πλήρως αποπροστατευμένο προϊόν **11** ελήφθηκε με απόδοση 58%.

Με δεδομένες τις ενδιαφέρουσες αντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες που παρουσιάζουν πολλοί τροποποιημένοι νουκλεοζίτες, θα διεξαχθούν βιολογικές μελέτες στον νεοσυντιθέμενο νουκλεοζίτη **11**, ώστε να εκτιμηθεί η αντική του δράση έναντι μιας πληθώρας DNA και RNA ιών καθώς και οι κυτταροτοξικές του ιδιότητες. Τα συγκεκριμένα βιολογικά αποτελέσματα πρόκειται να αναφερθούν σε μελλοντικές εργασίες.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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.
- Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L., *Βιοχημεία* 1997/2001, τόμος I, II
- Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* **2010**.
- Brady, R. C.; Bernstein, D. I. *Antiviral Res.* 2001, 61, 73.
- Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, **2005**, 4, 4.
- Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 47, 365.
- De Clercq, E. *Biochim Biophys Acta.* **2002**, 1587, 258
- Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 4963.
- Komiotis, D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides Nucleotides* **1991**, 10, 431.
- Komiotis, D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, 7, 219.
- Kiritsis C, Manta S, Parmenopoulou V, Balzarini J, Komiotis D. Branched-chain C-cyano pyranonucleosides: synthesis of 3'-C-cyano

- & 3'-C-cyano-3'-deoxy pyrimidine pyranonucleosides as novel cytotoxic agents. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(11): 5668-74.
- 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.
 - Malsen, H. J.; Hughes, D.; Hursthouse, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Simons, C. J. *Med. Chem.* **2004**, 47, 5482.
 - Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 980.
 - Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, 43, 420.
 - Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Panagiotopoulou, A.; Pelecanou, M.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2009a, 44, 4764.
 - Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, 95, 105.
 - Mc Murry J. *Οργανική Χημεία, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*
 - Lewin, B. *Genes* **2003**, VIII, 6.
 - 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.; Giziwicz, J. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 2607.

- 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.
- O-Yang C., Wu H.Y., Fraser-Smith E.B., Walker K.A.M. *Tetrahedron Lett.* 1992, *1*, 37-40.
- Patterson, J.; Uriel, C.; Egron, M.J.; Herscovici, J.; Antonakis, K.; Alaoui-Jamali, M.A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, *42*, 779 and references cited therein
- Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* **1992**, *11*, 903.
- Pontikis, R.; Wolf, J.; Monneret, C.; Florent, J. –C. *Tetrahedron Lett.* 1995, *36*, 3523.
- Satoru Kohgo, Kohei Yamada, Kenji Kitano, Shinji Sakata, Hiroyuki Hayakawa, Daisuke Nameki, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Hiroaki Mitsuya, and Hiroshi Ohruai, *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS*, Vol. 22, Nos. 5–8, pp. 887–889, 2003.
- Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, *8*, 695.
- Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3154.
- 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.
- Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3399.
- Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* 1991, 51, 2319.