



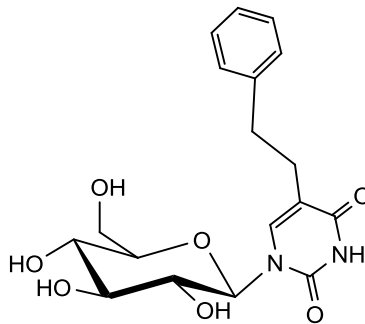
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Διπλωματική Εργασία

Υποκατεστημένοι στη βάση γλυκοπυρανονουκλεοζίτες ως πιθανοί
αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.



ΠΑΛΙΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ - ΧΡΥΣΟΒΑΛΑΝΤΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2014

Διπλωματική Εργασία

Υποκατεστημένοι στη βάση γλυκοπυρανονουκλεοζίτες ως πιθανοί αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.

Substituted at the base glucopyranonucleosides as potential antiviral and anticancer agents.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- ❖ **Κομιώτης Δημήτριος** — Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- ❖ **Μπαλατσός Νικόλαος** — Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- ❖ **Ζίφα Αιμιλία** — Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Κομιώτη Δημήτριο τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για τις πολύτιμες και εποικοδομητικές υποδείξεις του στο ιδιαίτερα ενδιαφέρον θέμα που μου ανέθεσε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω μου την υποψήφια διδάκτορα κα. Δημοπούλου Αθηνά για την πολύτιμη αρωγή της ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή καθώς και την μεταδιδάκτορα κα. Μαντά Στυλιανή για την αμέριστη υποστήριξη της και συνεχή συμπαράσταση της σε αυτό το εγχείρημα μου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το κλίμα συνεργασίας που φρόντισαν να επικρατεί καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας.

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1	ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ	6
1.2	ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ	7
1.2.1	Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες	9
1.2.2.	Θεραπευτικός τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών	9
1.2.3	Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες	11
1.2.4	Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες	13
1.2.5	Νουκλεοζιτικά ανάλογα με διακλάδωση την αιθύνυλο ομάδα.	16
1.2.6	Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη	20
2.	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
2.1	ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	24
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
3.1	Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων	26
3.2	Γενική Μεθοδολογία	26
3.2.1	Χρωματογραφία Στήλης	26
3.2.2	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)	29
3.2.3	Ξήρανση διαλυτών	30
3.2.4	Ταυτοποίηση ενώσεων	31
3.3	Μέθοδοι	32
3.3.1	Επισκόπηση της συνθετικής οδού.	32
3.3.2	Μεθοδολογία της σύνθεσης.	32
3.3.3	Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετράκις-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (2).	34
3.3.4	Σύνθεση του 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο) νουκλεοζίτη της 5-ιωδοουρακίλης (3).	35
3.3.5	Γενική μέθοδος παρασκευής των 1-(β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-5-φαινυλοαιθύνυλο ουρακίλη (4) και των 1-(β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-5-(2-και 3-αιθυνυλοπυριδίνυλο) νουκλεοζιτών της ουρακίλης (5) και (6).	36
3.3.6	Γενική μέθοδος παρασκευής των 1-(β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-5-φαινυλοαιθυλοουρακίλη (7) και των 1-(β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-5-(2-και 3-αιθυλοπυριδίνυλο) νουκλεοζιτών της ουρακίλης (8) και (9).	38
4.	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹ H NMR	41
5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	47
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ

Με το γενικό όρο «υδατάνθρακες» χαρακτηρίζονται πολύ-υδροξυλιωμένα παράγωγα αλδεϋδών και κετονών, προϊόντα συμπύκνωσης αυτών καθώς και περισσότερο πολύπλοκες ενώσεις που μπορούν να υδρολυθούν προς αυτά τα παράγωγα. Συνεπώς οι υδατάνθρακες περιέχουν C, H, O και τις χαρακτηριστικές ομάδες του καρβονυλίου ($>C=O$) και του υδροξυλίου ($-OH$). Στους υδατάνθρακες ανήκουν ενώσεις όπως οι αλδόζες και οι κετόζες που έχουν μοριακό τύπο $C_n(H_2O)_n$, δηλαδή είναι υδρίτες του άνθρακα καθώς και ενώσεις που προκύπτουν από αναγωγή της ομάδας του καρβονυλίου των μονοζακχαριτών (αλδιτόλες), από οξειδωση μιας ή περισσότερων λειτουργικών ομάδων προς καρβοξυλικά οξέα αλλά και από υποκατάσταση μιας ή περισσότερων ομάδων υδροξυλίου από άτομα υδρογόνου, αμινο-ομάδας, σουλφυδρυλίου ή συναφών ομάδων καθώς και τα παράγωγα αυτών. Συνεπώς υπάρχουν υδατάνθρακες που δεν ανταποκρίνονται σε αυτόν τον απλό τύπο καθώς και ενώσεις που ενώ ανήκουν στον τύπο δεν είναι υδατάνθρακες πχ οξικό οξύ. Σε κάποια βιβλία οι υδατάνθρακες ταυτίζονται με τα σάκχαρα ενώ σε άλλα ως σάκχαρα θεωρούνται απλοί υδατοδιαλυτοί υδατάνθρακες.

Οι υδατάνθρακες ταξινομούνται σε απλούς (μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες) και σύνθετους ολιγοσακχαρίτες, πολυσακχαρίτες.

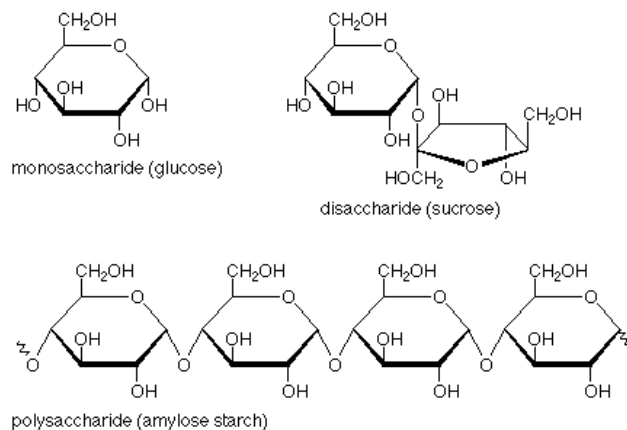
- **Μονοσακχαρίτες:** Ο όρος περιλαμβάνει αλειφατικές πολύ-υδροξυαλδεϋδες (αλδόζες), αλειφατικές πολύ-υδροξυκετόνες (κετόζες) και ευρύ φάσμα παραγώγων που προέρχονται από αντιδράσεις οξειδώσεως, αναγωγής, αλκυλίωσης, ακυλύωσης, εισαγωγής υποκαταστατών κλπ. Είναι οι απλούστεροι υδατάνθρακες και αποτελούν τη δομική μονάδα των υπολοίπων.
- **Ολιγοσακχαρίτες:** Το πρόθεμα «ολιγο-» σημαίνει μικρός αριθμός και χρησιμοποιείται σε ορισμένες ενώσεις για να δείξει ότι υπάρχει ένας μικρός αριθμός δομικών μονάδων –μονομερή- που επαναλαμβάνονται

προκειμένου να σχηματιστεί η ένωση. Ο αριθμός των μονομερών δεν είναι καθορισμένος με σαφήνεια όμως συνήθως κυμαίνεται από 3-10. Με τον τρόπο αυτόν σχηματίζονται δι-σακχαρίτες (δύο δομικές μονάδες σακχάρων) κλπ.

- Πολυσακχαρίτες: Είναι ενώσεις που συνίστανται από μεγάλο αριθμό μονοσακχαριτών, συνήθως πάνω από 10.

Υπάρχουν 3 κατηγορίες υδατανθράκων με βιολογικό ενδιαφέρον (σχήμα 1):

- Οι μονοσακχαρίτες, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, είναι τα μονομερή για τη σύνθεση πολυπλοκότερων δομών.
- Οι ολιγοσακχαρίτες αποτελούνται 2-10 μονοσακχαρίτες. Η λακτόζη, η μαλτόζη και η σακχαρόζη αποτελούνται από δυο μονοσακχαρίτες και λέγονται δισακχαρίτες.
- Οι πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη, που αποτελούνται από εκατοντάδες χιλιάδες υπομονάδες γλυκόζης.

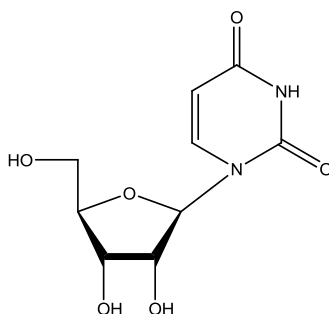


Σχήμα 1. Τύποι υδατανθράκων

1.2 ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ

Οι νουκλεοζίτες αποτελούν θεμελιώδη συστατικά των διαφόρων βιολογικών συστημάτων. Απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στη φύση διότι αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των νουκλεοτιδίων, των βασικών δομικών μονάδων του γενετικού υλικού, καθώς επίσης και το υπόστρωμα των πολυμερασών για τη σύνθεση DNA και RNA. Πρόκειται για γλυκοσυλαμίνες που προκύπτουν από την ένωση μιας βάσης,

πουρίνης (αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδίνης (θυμίνη, κυτοσίνη, ουρακίλη), με τον άνθρακα C-1 μιας πεντόζης (σάκχαρο με 5 άτομα άνθρακα στην αλυσίδα του) η οποία είναι είτε η 2-δεοξυ-*D*-ριβόζη για το DNA είτε η *D*-ριβόζη για το RNA μέσω β -*N*-γλυκοζιτικού δεσμού (Stryer L, 2001). Στους νουκλεοζίτες η ετεροκυκλική βάση ενώνεται στη θέση 1' της πεντόζης με β -*N*-γλυκοζιτικό δεσμό, κατά τον οποίο η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου. Οι *N*-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β (σχήμα 2).



Σχήμα 2. Ουριδίνη (U)

Η ένωση νουκλεοζίτη με φωσφορικό οξύ ονομάζεται νουκλεοτίδιο (ή εστέρας του νουκλεοζίτη) το οποίο πάλι αναλόγως τη φύση της πεντόζης καλείται ριβονουκλεοτίδιο ή δεοξυριβονουκλεοτίδιο. Πολλά νουκλεοτίδια που ενώνονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς αποτελούν τις δομικές μονάδες των νουκλεϊκών οξέων. Ανάλογα αν το νουκλεϊκό οξύ περιέχει *D*-ριβόζη ως υδατάνθρακα, ονομάζεται ριβονουκλεϊνικό οξύ, ενώ αν περιέχει *D*-2-δεοξυριβόζη ονομάζεται δεοξυριβονουκλεονικό οξύ, τα γνωστά RNA και DNA, αντίστοιχα .

Η χημεία των νουκλεοζιτών αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά αντικείμενα στην οργανική σύνθεση. Μεγάλος αριθμός ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη, σύνθεση και βιολογική ταυτοποίηση νουκλεοζιτών και νουκλεοζιτικών αναλόγων. Επίσης, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιϊκή και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες, έχουν γίνει τροποποιήσεις δομής τόσο στο τμήμα της βάσης όσο και του

σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών δραστηριοτήτων τους.

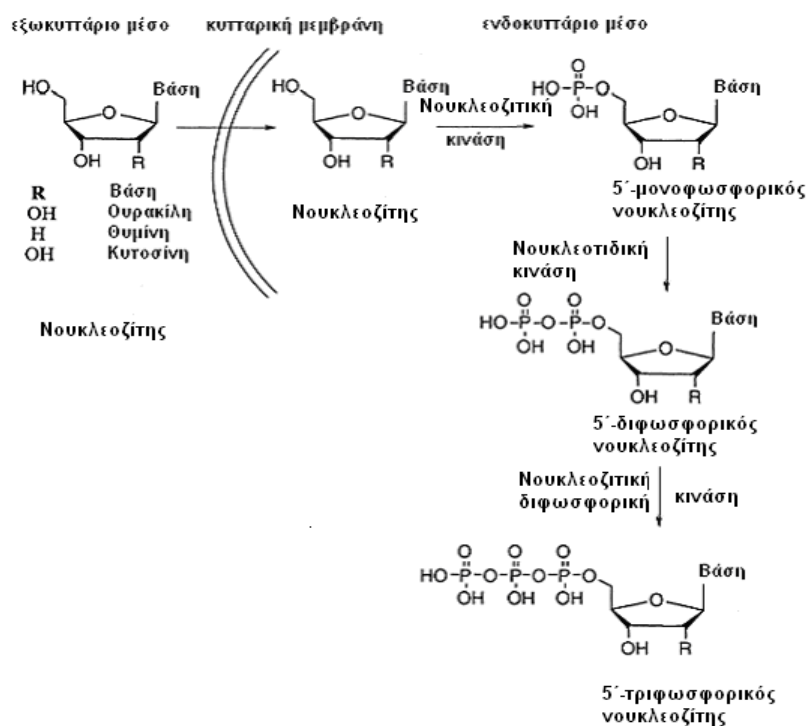
1.2.1 Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες

Έχει βρεθεί ότι οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες διαδραματίζουν σημαντική αντικαρκινική, αντιβακτηριδιακή και αντιϊκή δράση (Zhou W. et al, 2004; Perigaud C. et al, 1992). Σήμερα, το 15% των αντικαρκινικών φαρμάκων και το 55% των αντιικών φαρμάκων σχετίζονται με νουκλεοζιτικά ανάλογα. Ιδίως τις τελευταίες δεκαετίες, νουκλεοζίτες με πενταμελή και εξαμελή υδρογονανθρακικό δακτύλιο έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντιικές και αντικαρκινικές ιδιότητές τους, καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊνικού οξέος, έτσι ώστε η μελέτη των νουκλεοζιτών να έχει ανέλθει κατακόρυφα με στόχο τη θεραπεία του ιού HIV (Verheggen I. et al, 1993), του έρπητα (Zhou W. et al, 2004; De Clercq E, 2002) φάρμακα δηλαδή με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα έναντι των έως τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενων.

1.2.2. Θεραπευτικός τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών, συνήθως δρουν ως προφάρμακα, δηλαδή είναι ανενεργά στην μορφή που χορηγούνται και πρέπει, για να ασκήσουν την θεραπευτική τους δράση, να μεταβολιστούν προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους (Arner E. S. J. and Eriksson S., 1995). Οι φωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών δεν μπορούν να διαπεράσουν με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη λόγω φορτίου, όπως επίσης και όταν δημιουργηθούν μέσα στο κύτταρο η μετακίνησή τους προς γειτονικά κύτταρα είναι δύσκολη λόγω του διαφορετικού pH που υπάρχει στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα. 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 (Balzarini 1993, Wagner et al. 2000). 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 ιϊκές 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 ιϊκές πολυμεράσες. Μιμούμενα τους φυσικούς νουκλεοζίτες, τα αντιικά ανάλογά τους μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τις πολυμεράσες και να ενσωματωθούν στο ιϊκό γονιδίωμα. Το σάκχαρο, είναι το τμήμα του νουκλεοζίτη που χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τις κινάσες και τις πολυμεράσες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την επιμήκυνση των αλυσίδων. Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας (σχήμα 3).



Σχήμα 3. Τροποποίηση των νουκλεοζιτικών αναλόγων προς την ενεργή τους μορφή μέσω ενδοκυτταρικής φωσφορυλίωσης.

Έτσι ενσωμάτωσή τους στο ιϊκό γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει διακοπή της αντιγραφής του ιϊκού γονιδιώματος, να το καταστήσει μη

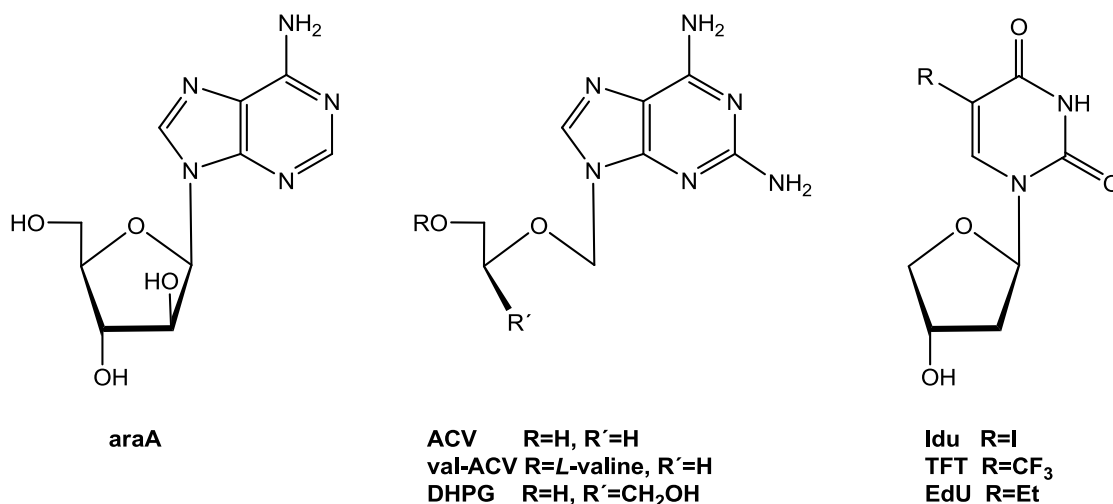
λειτουργικό και κατά συνέπεια να καταστείλει την αντιγραφή του ιού και την περαιτέρω παραγωγή ιικών σωματιδίων. Εκτός του παραπάνω μηχανισμού, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα δρουν και μέσω άλλων μηχανισμών. Μπορούν να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της καταστολής αντιαποπτωτικών γονιδίων (Lui V. W. *et al*, 2010, Bhat U. G. *et al*, 2010).

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση του καρκίνου και του AIDS, παρεμβαίνουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και προωθούν είτε αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα (Pastor-Anglada *et al*. 1998). Πλεονεκτούν λοιπόν λόγω της μεγάλης δυνατότητας τους να τροποποιούνται δομικά, ώστε να προκύπτουν φαρμακολογικά ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν.

1.2.3 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες

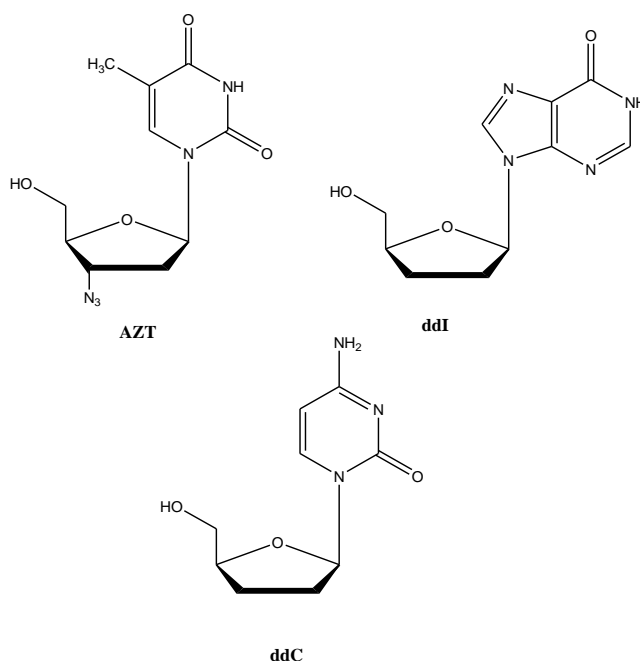
Τα αντιικά φάρμακα σχεδιάζονται με βάση τις διαδικασίες κύκλου ζωής ενός ιού. Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν την προσρόφηση του ιού στο κύτταρο, την συγχώνευσή του σε αυτό, την σύνθεσή του ιικού DNA και RNA και τέλος τις λειτουργίες των ενζύμων του ιού.

Σκοπός των αντιικών φαρμάκων είναι η ανασταλτική τους δράση σε μία ή και περισσότερες από τις παραπάνω διαδικασίες του κύκλου ζωής του ιού, συνήθως στη σύνθεση του ιικού DNA και RNA. Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, στηρίζεται στην ικανότητά αλληλεπίδρασης με τις ιικές πολυμεράσες. Για τη θεραπεία του κυτταρομεγαλοϊού CMV, του ιού του απλού έρπητα HSV 1 και 2 και του ιού του έρπητα ζωστήρα VZV χρησιμοποιείται πλήθος νουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως Vidarabine (**araA**), Acyclovir (**ACV**), Idoxuridine (**Idu**), Trifluridine (**TFT**), Acedurid (**EdU**), Ganciclovir (**DHPG**) και Valaciclovir (**val-ACV**) (Gumina G. *et al*, 2001) (σχήμα 4), τα οποία δρουν ως αναστολείς της DNA πολυμεράσης.



Σχήμα 4. Χημικές δομές των (**araA**), (**ACV**), (**Idu**), (**TFT**), (**EdU**), (**DHPG**), (**val-ACV**)

Επίσης, νουκλεοζιτικά ανάλογα όπως τα παρακάτω, τα οποία χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα, δρώντας ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού HIV είναι το zidovudine (**AZT**), το didanosine (**ddI**) και το zalcitabine (**ddC**) (σχήμα 5).



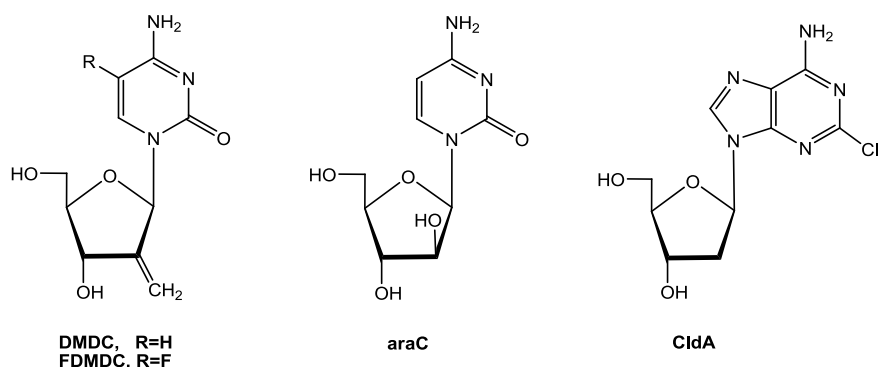
Σχήμα 5. Χημικές δομές των **AZT**, **ddI**, **ddC**

1.2.4 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Αν και η χημειοθεραπεία θεωρείται ως η πλέον κατάλληλη μέθοδος για τη θεραπεία των ιικών λοιμώξεων, στην περίπτωση αντιμετώπισης του καρκίνου συνιστάται ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της μέσω της εύρεσης νέων αντικαρκινικών ουσιών, οι οποίες διαθέτουν αυξημένη δραστηριότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογα τους.

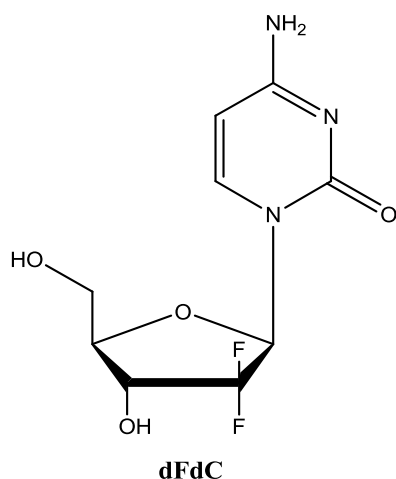
Τα αντικαρκινικά όπως και τα αντίικά νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση (Arner and Eriksson, 1995). Τα μη φωσφορυλιωμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες-μεταφορείς νουκλεοζιτών, διαπερνώντας την κυτταρική μεμβράνη. Φωσφορυλιώνονται στη συνέχεια προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA.

Οι νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύουν στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη (**DMDC**), 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πεντοφουρανοζυλο)5-φθοροκυτοσίνη (**FDMDC**), 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (**araC**) και 2-χλωρο-2'-δεσοξυαδενοσίνη (**CldA**) (σχήμα 6) έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών, όπως διάφοροι τύποι λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Cory A. H. *et al*, 1994, Pontikis R. *et al*, 1997, Yamagami K. *et al*, 1991, Lin T. S. *et al*, 1991, Baker C. H. *et al*, 1991, Matsuda A. and Sasaki T. 2004).



Σχήμα 6. Χημικές δομές των **DMDC, FDMDC, araC, CldA**

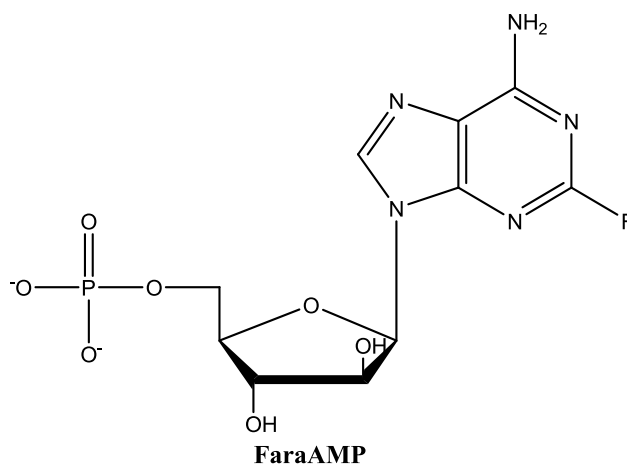
Η γεμισταμπίνη (**gemcitabine** ή **dFdC**) είναι ένα ακόμη πυριμιδινικό ανάλογο που παρουσιάζει αντικαρκινική δράση (Plunkett et al. 1995). Είναι ανάλογο του cytarabine, το οποίο έχει τροποποιηθεί στην 2' θέση του δακτυλίου της ριβόζης με υποκατάσταση από 2 άτομα φθορίου (σχήμα 7).



Σχήμα 7. Χημική δομή του **gemcitabine (dFdC)**

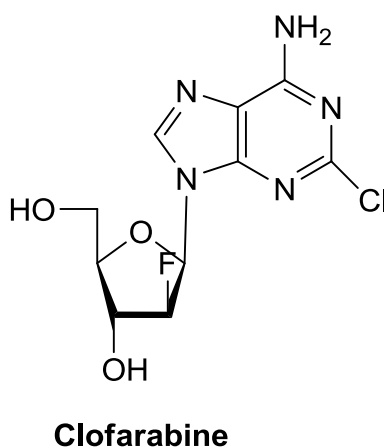
Ένα από τα πρώτα πουργινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα η 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλαδενίνη (*araA*) απορρίφθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας λόγω της χαμηλής διαλυτότητας και της γρήγορης απαμίνωσής της από την απαμινάση της αδενοσίνης. Η προσθήκη ενός ατόμου φθορίου στο τμήμα της αδενίνης αύξησε την αντίσταση στην απαμινάση της αδενοσίνης και η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας βελτίωσε τη διαλυτότητα του αναλόγου, συνθέτοντας την 5'-μονοφωσφορική 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-2-φθοραδενίνη (**fludarabine** ή **FaraAMP**) (Matsuda et

al. 2004). Το fludarabine είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας κατά της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων (σχήμα 8).



Σχήμα 8. Χημική δομή του **fludarabine**

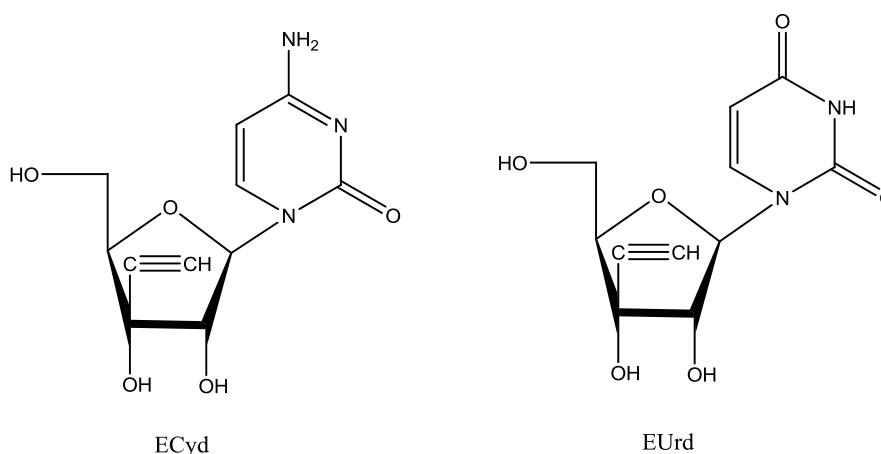
Ένα νουκλεοζιδικό ανάλογο που έχει εγκριθεί για την θεραπεία της αιματολογικής κακοήθειας, της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας είναι το **Clofarabine** [2-χλωρο -(2'-δεοξυφθορο-β-D-αραβινοφουρανοζυλο)αδενίνη] (Faderl S. J. *et al*, 2002, Parker W. B. *et al*, 2004, Faderl S. J. *et al*, 2005, Pui C. H. *et al*, 2005, Secrist J. A., 2005),(σχήμα 9).



Σχήμα 9. Χημική δομή του **Clofarabine**

1.2.5 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με διακλάδωση την αιθύνυλο ομάδα.

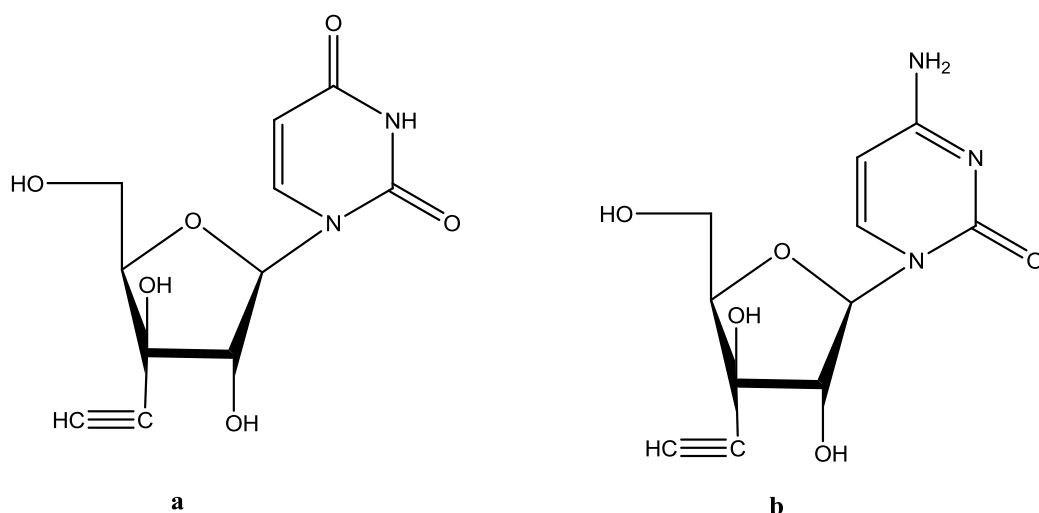
Μια σημαντική κατηγορία νουκλεοζιτικών αναλόγων των οποίων η μελέτη έχει ξεκινήσει και συνεχίζει να προσελκύει το ενδιαφέρον των επιστημόνων λόγω των σημαντικών ιδιοτήτων τους, αποτελούν οι νουκλεοζίτες με διακλάδωση την αιθύνυλο ομάδα. Στη μελέτη του Hattori Hideshi το 1996 είχε διαπιστωθεί ότι οι νουκλεοζίτες της ουρακίλης και της κυτοσίνης (σχήμα 10) που φέρουν αιθύνυλο ομάδα ως διακλαδισμένη αλυσίδα στο τμήμα του σακχάρου εμφανίζουν εξαιρετικές αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι 1-(3-C-αιθυνυλο-β-D-ριβο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη ECyd και 1-(3-C-αιθυνυλο-β-D-ριβο-πενταφουρανοζυλο)ουρακίλη EUrd δοκιμάστηκαν *in vitro* σε 36 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η ECyd ήταν αποτελεσματική σε 22 κυτταρικές σειρές, ενώ αντίστοιχα η EUrd σε 12. Και οι δύο νουκλεοζίτες είχαν παρόμοιο φάσμα παρεμποδιστικής λειτουργίας και συνεπώς παρόμοιο μηχανισμό αντικαρκινικής δράσης. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ECyd και EUrd έχουν πιο ισχυρή αντικαρκινική λειτουργία ενάντια σε καρκινικούς όγκους απ' ότι κάποιες άλλες ουσίες που συχνά χρησιμοποιούνται κλινικά (Matsuda A. *et al*, 1996).



Σχήμα 10. Χημικές δομές της ECyd και EUrd

Μελετήθηκε επιπλέον η σχέση μεταξύ δομής και λειτουργίας των ECyd και EUrd (Hattori H. *et al*, 1998). Έπειτα, συντέθηκαν οι 1-(3'-C-αιθυνυλο-β-D-

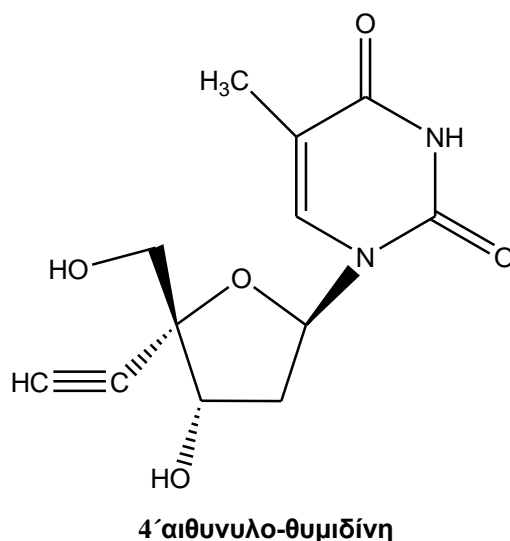
ξύλο-πεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη και ουρακίλη, οι οποίες είναι 3' επιμερή των ECyd και EUrd (σχήμα 11). Η βιολογική δράση αυτών των ξύλο παραγώγων ήταν σημαντικά μικρότερη, παρόλο που είχαν τόσο την αιθύνυλο ομάδα όσο και το υδροξύλιο στην 3'-θέση του σακχάρου. Αποδεικνύεται δηλαδή ότι η παρουσία μιας 2',3'- cis διόλης στην ECyd και EUrd με μια ριβο-διαμόρφωση ήταν απαραίτητη για την κυτταροτοξικότητά τους.



Σχήμα 11. 3' επιμερή των ECyd και EUrd

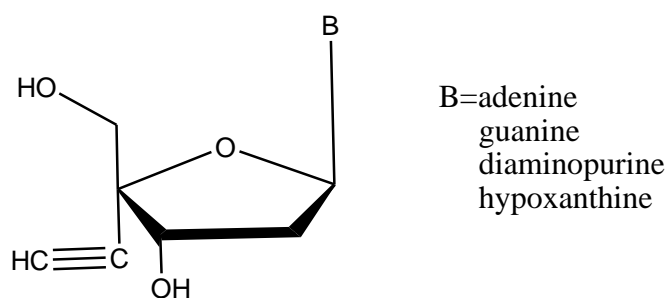
Όσον αφορά το μεταβολισμό της, η ECyd φωσφορυλιώνεται στα κύτταρα προς το μονοφωσφορικό, διφωσφορικό και τελικά τριφωσφορικό της παράγωγο (Nomura M. *et al*, 2003). Το πρώτο βήμα από την ECyd στην 1-(3-C-αιθύνυλο -β-D-ριβο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη μονοφωσφορική (ECMP) καταλύεται από την ουριδινική/κυτιδινική κινάση. Το τριφωσφορικό παράγωγο της κυτιδίνης (ECTP) είναι ένας ενεργός μεταβολίτης της ECyd και παρεμποδίζει την RNA πολυμεράση I, II και III χωρίς εκλεκτικότητα, προκαλώντας παρεμπόδιση της σύνθεσης του RNA. Η ECyd κατανέμεται σε μεγάλο ποσοστό σε καρκινικούς ιστούς (*in vivo*), στους οποίους η ενεργοποίηση της ουριδινικής/κυτιδινικής κινάσης είναι υψηλότερη από τους κανονικούς ιστούς. Αυτά τα δεδομένα θα μπορούσαν να εξηγήσουν την υψηλή ενεργοποίηση και τη χαμηλή τοξικότητα της ECyd ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνου.

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον προέκυψε και από την ανακάλυψη της ισχυρής αντί-HIV δράσης των 4'-αιθύνυλο αναλόγων της θυμιδίνης (σχήμα 12) (O-Yang C. *et al*, 1992 και Kodama E. N. *et al*, 2001).



Σχήμα 12. Δομή 4'- υποκατεστημένων νουκλεοζιτών της θυμίνης

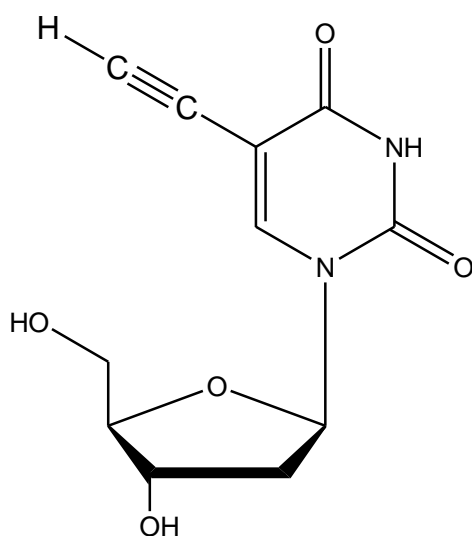
Οι πουρίνο 2'-δεοξυ νουκλεοζίτες που διαθέτουν μια αιθύνυλο ομάδα στον 4' άνθρακα του σακχάρου, εμφανίζουν επίσης πολύ ισχυρή αντί-HIV δράση, παραμένοντας ενεργοί απέναντι σε ανθεκτικά στελέχη του HIV (Kongo S. *et al*, 2003). Η δομή του νουκλεοζίτη απεικονίζεται στο (σχήμα 13).



Σχήμα 13. Δομή του αιθύνυλο πούρινο 2'-δεοξυ νουκλεοζίτη.

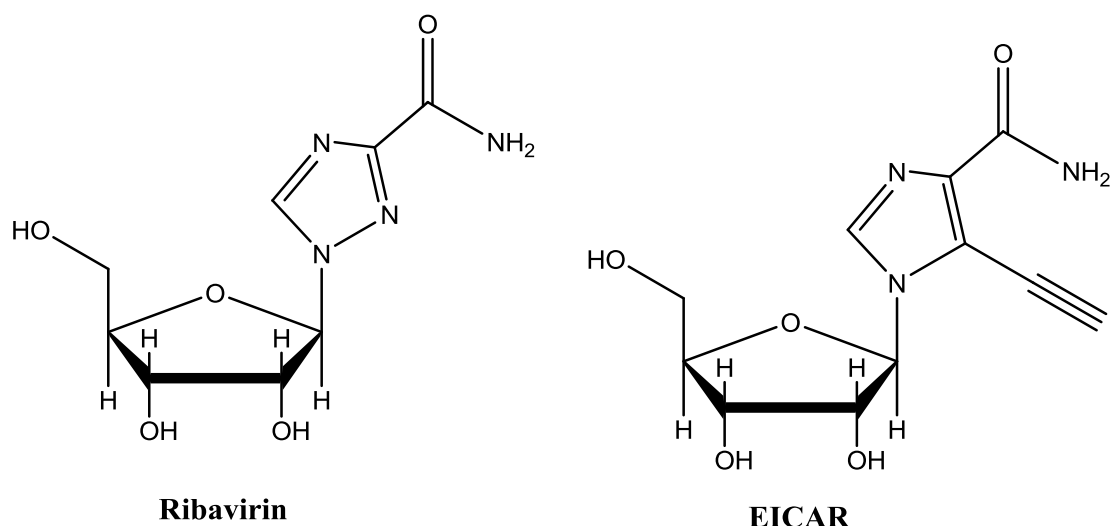
Η παρουσία της αιθύνυλο ομάδας στην ετεροκυκλική βάση οδήγησε επίσης σε νουκλεοζίτες με έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Η 5-αιθύνυλο-2'-δεοξυ ουριδίνη (σχήμα 14), παρουσίασε αυξημένη δράση έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών του ανθρώπινου μαστού MCF-7 και MDA-MB-

231, ξεπερνώντας την αντίστοιχη της 5-φθόρο ουρακίλης (Meneni S. *et al*, 2007).



Σχήμα 14. Χημική δομή της 5-αιθυνο-2'-δεοξυ ουριδίνη.

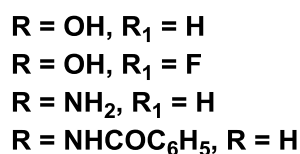
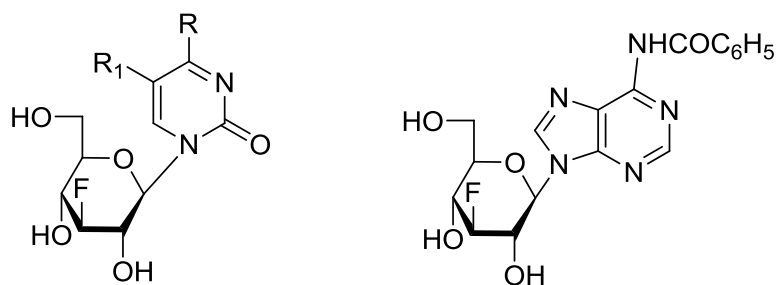
Επιπλέον το 5-αιθυνο-1-β-D-ριβοφουρανοζυλο-1H-ιμιδαζολο-4 καρβοξαμίδιο (EICAR) που επίσης φέρει την αιθύνυλο ομάδα στην ετεροκυκλική βάση παρουσιάζει εξαιρετικές αντιικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα η αντιική του λειτουργία είναι από 10 έως 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του Ribavirin (Minakawa N. *et al*, 1999), του μόνου διαθέσιμου φαρμάκου που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C σε συνδυασμό με interferon-α (De Clercq E. *et al*, 2002). Επιπλέον της αντιικής του δράσης, το EICAR επιδεικνύει αντικαρκινική λειτουργία και εμποδίζει την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών κυττάρων *in vitro* (Minakawa N. *et al*, 1991). Στο παρακάτω, (σχήμα 15) απεικονίζονται οι δομές των Ribavirin και EICAR.



Σχήμα 15. Χημικές δομές του Ribavirin και EICAR.

1.2.6 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη

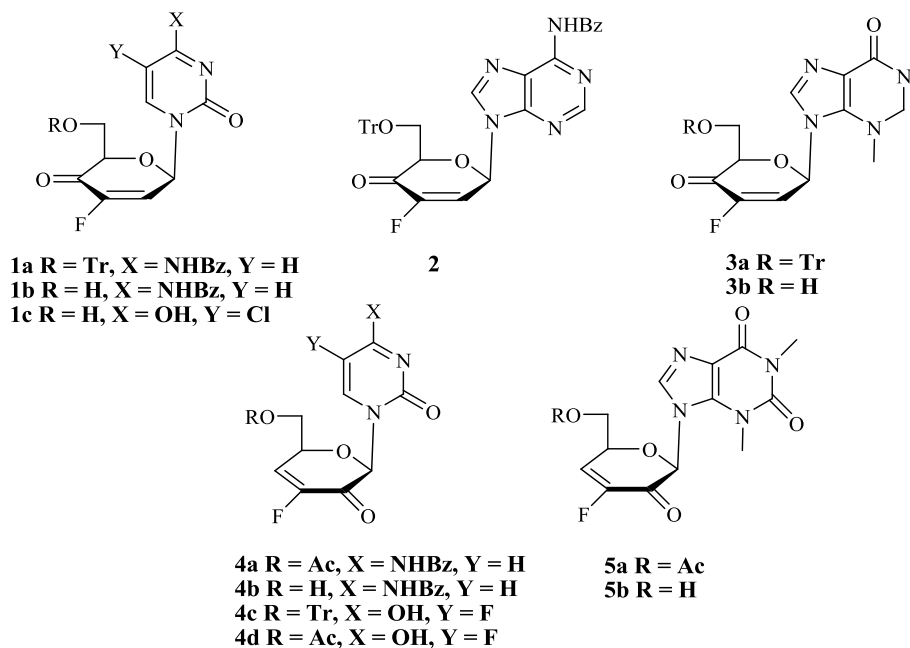
Παρ' όλες τις επιτυχίες στην έρευνα για καινούργια αντιικά και αντικαρκινικά φάρμακα, υπάρχει διαρκής ανάγκη για τη σύνθεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με μειωμένη τοξικότητα αλλά και αυξημένη αποτελεσματικότητα σε νέα ανθεκτικά ιικά στελέχη. Στο εργαστήριο της Οργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έχουν συντεθεί φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Manta S. *et al*, 2007), οι οποίοι έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν αποτελεσματικά τη δραστικότητα της **PARN** (poly(A) specific ribonuclease), ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(A) ουράς) (σχήμα 16). Οι φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες έχουν αξιολογηθεί και ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP), ένζυμο με κεντρικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου και υπεύθυνο για την παραγωγή γλυκόζης στο αίμα (γλυκογενόλυση). Η GP είναι πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται στους μύς και στο ήπαρ, ρυθμίζεται αλλοστερικά από φωσφορυλίωση και είναι παρούσα σε δυο μορφές, την GPb (ανενεργός, T-διαμόρφωση) και την GPa (ενεργός, R-διαμόρφωση). Τα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα λοιπόν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπες ενώσεις για την ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν την PARN (poly(A) specific ribonuclease (Balatsos N. A. *et al*, 2009).



Σχήμα 16. Χημική δομή του **PARN**

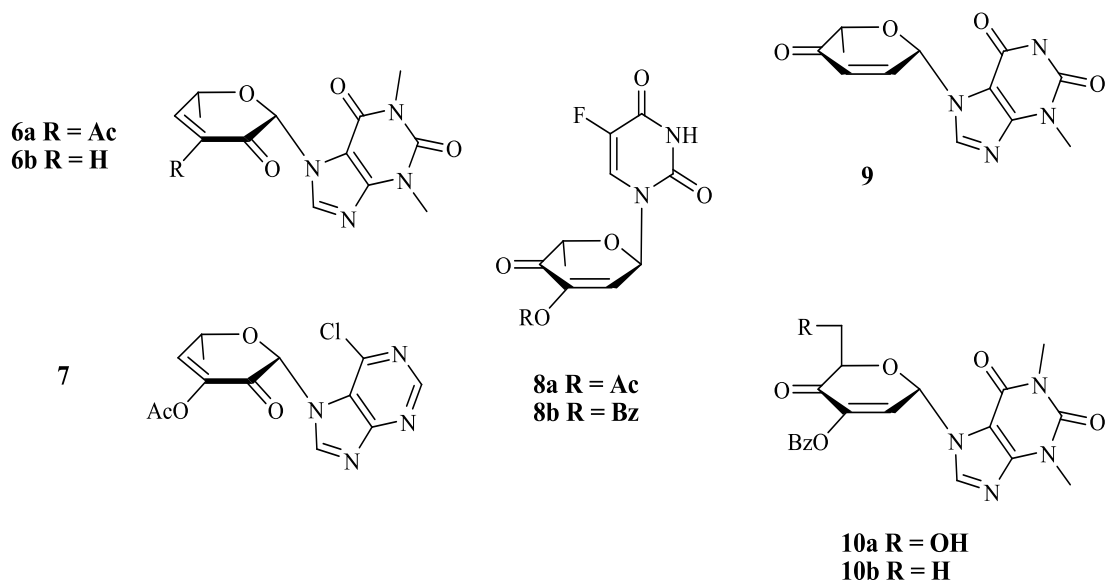
Θα πρέπει να τονιστεί ότι η έρευνα για την ανακάλυψη αντιικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είχε μείνει αρκετά βήματα πίσω σε σχέση με αυτή των βιολογικώς ενεργών νουκλεοζιτών με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίους.

Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφτεί νέες σειρές βιολογικά ενεργών ακόρεστων νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο. Οι ακόρεστοι φθορο κετοπυρανονουκλεοζίτες, οι οποίοι συντέθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Manta et al. 2007) καθώς και άλλοι ανάλογοι πυρανονουκλεοζίτες (Leclercq et al. 1992, Khan et al. 2001, Ollapally et al 1999, Egron et al. 2002) έχουν αξιολογηθεί για τις αντιϊκές και τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες (ενώσεις **1-5**, σχήμα 10). Αξιοσημείωτη είναι η αντιϊκή δράση εναντι του εντεροϊού (rotavirus), που επέδειξαν οι ενώσεις **1a,b**, **2** και **4a,b** (σχήμα 17).



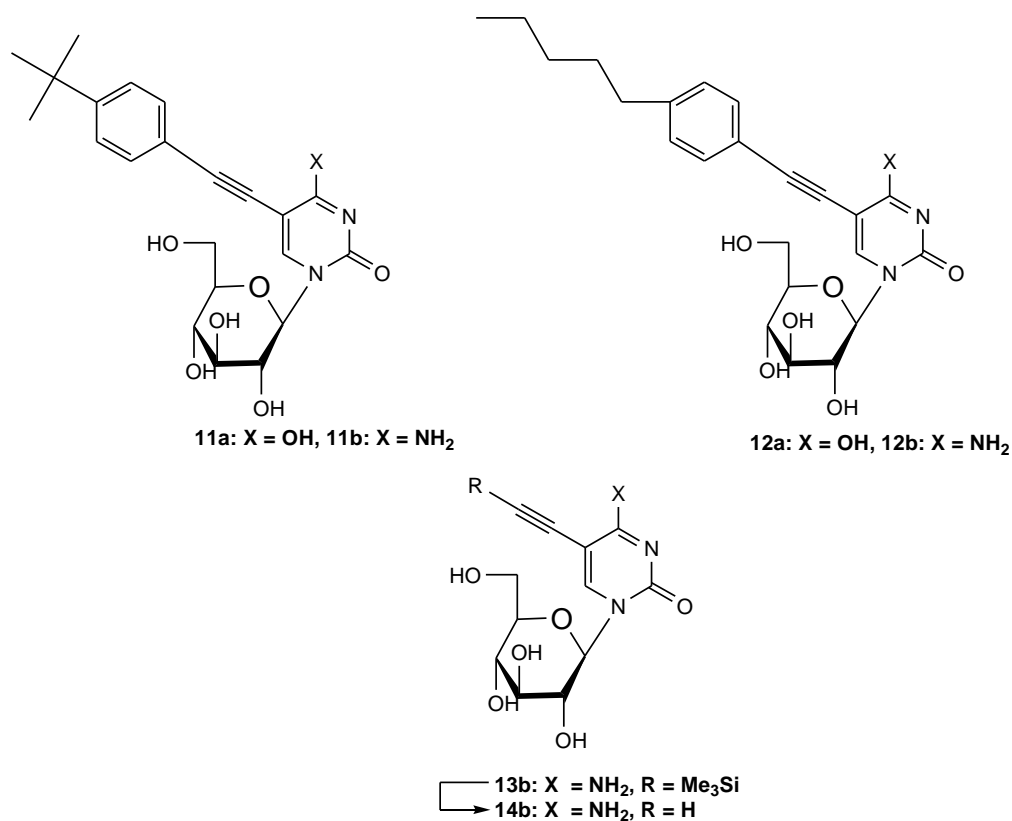
Σχήμα 17. Χημική δομή ανάλογων πυρανονουκλεοζιτών.

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** (σχήμα 18).



Σχήμα 18. Χημική δομή ακόρεστων κετοπυρανονουκλεοζιτικών

Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματός μας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των C5-αλκύνυλο-γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης και της κυτοσίνης, (σχήμα 19) οι οποίοι έχουν επιδείξει αξιόλογη ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών.



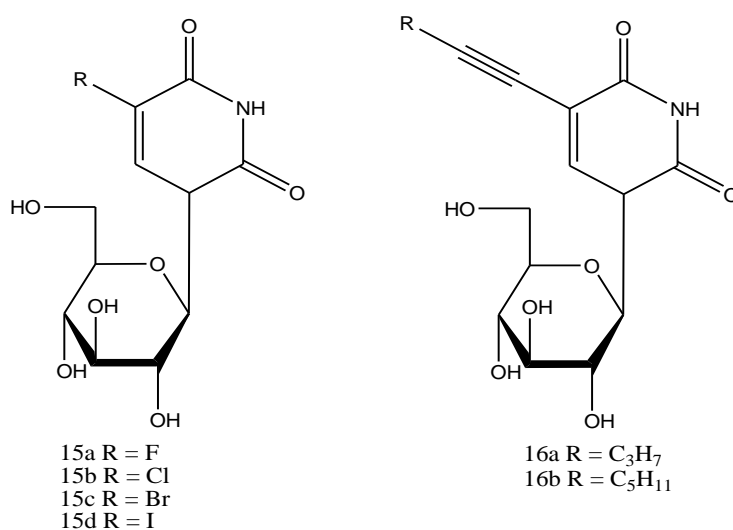
Σχήμα 19. Χημική δομή των C5-αλκύνυλο-γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης και της κυτοσίνης.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

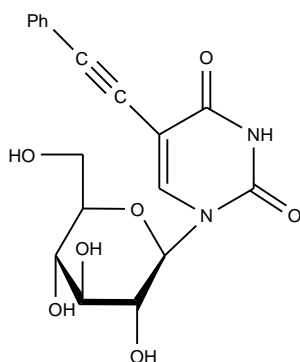
Οι νέοι νουκλεοζίτες στοχεύουν στο να καλύψουν την όλο και αυξανόμενη ανάγκη για φάρμακα με αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα, αυξημένη βιολογική δράση και σταθερότητα, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες. Αρκετές μετατροπές έχουν γίνει τόσο στην ετεροκυκλική βάση όσο και στο τμήμα του σακχάρου για την αναζήτηση αποτελεσματικών και επιλεκτικών παραγώγων με βελτιωμένη βιολογική δράση. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στους νουκλεοζίτες με τροποποιημένη βάση, καθώς ήταν γνωστό ότι οι C5-υποκατεστημένοι νουκλεοζίτες πυριμιδίνης έχουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιικές και αντικαρκινικές.

Βασιζόμενοι στα ανωτέρω, στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματός μας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των C5-αλογο- και C5-αλκυνο-γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης (ένωση 15 και 16, αντίστοιχα, σχήμα 20), οι οποίοι έχουν εμφανίσει αξιοσημείωτες κυτταροτοξικές ιδιότητες και επιπλέον έχουν αποδειχθεί ισχυροί αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.



Σχήμα 20. Χημική δομή C5-αλογο- και C5-αλκυνο-γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης, αντίστοιχα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι C5-αλκύνυλο-γλυκοπυρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης, είναι τα πιο αποτελεσματικά ανάλογα έναντι της ανάπτυξης τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών (L1210, CEM, HeLa) και συγκεκριμένα ο νουκλεοζίτης που φέρει φαινολικό δακτύλιο στην 5-θέση της ουρακίλης αποδείχτηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικός με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονται στα 5-6 μΜ. (σχήμα 21).



Σχήμα 21.

Βασιζόμενοι στην αξιολογημένη δράση του ανωτέρω νουκλεοζίτη και ως συνέχεια του ενδιαφέροντός μας στους τροποποιημένους στην ετεροκυκλική βάση πυρανονουκλεοζίτες, θεωρήσαμε ενδιαφέρουσα την εισαγωγή ενός ετεροατόμου, και ειδικότερα ενός αζώτου, στο φαινολικό δακτύλιο, με στόχο την εύρεση νέων αποτελεσματικότερων θεραπευτικών αναλόγων. Επιπλέον, με στόχο να εξετάσουμε την επίδραση του τριπλού δεσμού στην ανασταλτική δράση των νέων ενώσεων, πραγματοποιήσαμε καταλυτική υδρογόνωση των ενώσεων **5**, **6** και **7** με την οποία ελήφθησαν τα υδρογονωμένα παράγωγα **8**, **9** και **10**, αντίστοιχα σε πολύ καλές αποδόσεις, ως άχρωμα έλαια.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων

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

- Οξικός ανυδρίτης (Ac_2O) (Aldrich, Γερμανία)
- Πυριδίνη (Panreac, Ισπανία)
- Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH) (Merck, Γερμανία)
- Hexamethyldisilazane (HMDS) (Aldrich, Γερμανία)
- Trimethylsilyltrifluoromethane ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Υδρίδιο του ασβεστίου (CaH) (Fluca, Γερμανία)
- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN) (Merck, Γερμανία)
- Πεντοξειδίο του φωσφόρου (P_2O_5) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bicarbonate (NaHCO_3) (Merck, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bisulfate (NaHSO_4) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) (Merck, Γερμανία)

3.2 Γενική Μεθοδολογία

3.2.1 Χρωματογραφία Στήλης

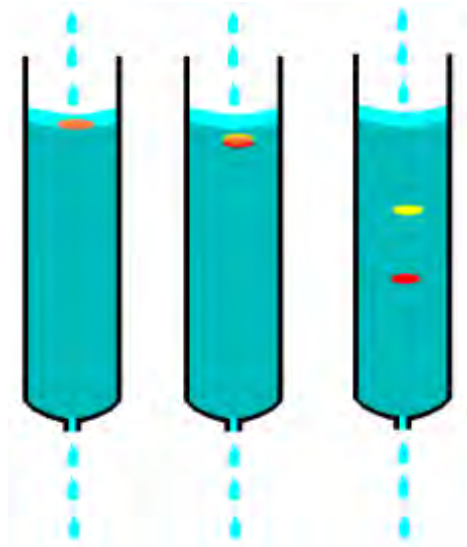
Στη χρωματογραφία στήλης η ακίνητη φάση περιέχεται σ' ένα σωλήνα, συνήθως γυάλινο και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merck grade). Στην άκρη του γυάλινου σωλήνα είναι βολικό να υπάρχει στρόφιγγα από Teflon για ν' αποφεύγεται κατά την έκλουση της στήλης, διαλυτοποίηση του γράσου ή της βαζελίνης που χρησιμοποιούνται στις εσφυρισμένες στρόφιγγες. Αν στη βάση της στήλης δεν υπάρχει πορώδες γυαλί, που έχει σαν σκοπό να συγκρατεί το προσροφητικό, πακτώνεται με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου μια ποσότητα υαλοβάμβακα ή ακόμη και κοινού βαμβακιού. Πάνω από το βαμβάκι

τοποθετείται στρώμα καθαρής άμμου, πάχους μέχρι 5 mm, το οποίο επιπεδοποιείται με ελαφρά κτυπήματα στο πλάι της στήλης. Ένα κομμάτι σκληρό λάστιχο κενού ή ένα πλαστικό στυλό είναι κατάλληλο γι' αυτή τη δουλειά. Η στήλη γεμίζεται κατά το 1/3 περίπου με το μίγμα των διαλυτών που θα χρησιμοποιηθεί για την έκλουση ή με τον λιγότερο πολικό διαλύτη, αν πρόκειται να καταφύγουμε σε έκλουση με διαλύτη αυξανόμενης πολικότητας. Έπειτα προστίθεται το προσροφητικό αυτούσιο ή με τη μορφή λασπώδους αιωρήματος, με αργό ρυθμό ώστε να κατακαθίζει ομοιόμορφα στο εσωτερικό της στήλης. Οι δονήσεις που προκαλούνται από τα συνεχή μικρά κτυπήματα στο πλευρό της στήλης, βοηθούν στο ομοιόμορφο γέμισμα, δηλαδή στην αποφυγή δημιουργίας "καναλιών" και κενών χώρων που επηρεάζουν αρνητικά το διαχωρισμό. Στο επάνω μέρος της στήλης του προσροφητικού τοποθετείται άμμος και/ή τεμάχιο διηθητικού χαρτιού που εφαρμόζει ακριβώς στο εσωτερικό της στήλης. Κατά την εισαγωγή του μίγματος στην κορυφή της στήλης, με τη βοήθεια σιφωνίου Pasteur, το χαρτί και η άμμος θ' αποτρέψουν τη διαταραχή της επιφάνειας τού προσροφητικού και κατά συνέπεια και την εισαγωγή του μίγματος, στον κύριο όγκο του προσροφητικού, κατά δόσεις. Στη συνέχεια διαβιβάζεται επιπλέον διαλύτης διαμέσου της στήλης, ενώ από το κάτω άκρο της συλλέγονται αριθμημένα κλάσματα.

Κατά τη διαδικασία αυτή, η οποία ονομάζεται έκλουση, επέρχεται διαχωρισμός του μίγματος σε ζώνες διαφορετικών συστατικών, οι οποίες, στην ιδανική περίπτωση, είναι απομακρυσμένες η μία από την άλλη, ή τουλάχιστον δεν αλληλεπικαλύπτονται (σχήμα 22). Φυσικά κάποιες, ή όλες οι ζώνες, μπορεί να είναι άχρωμες, όπως επίσης είναι δυνατό ν' αποτελούνται από περισσότερες από μία ουσίες, που κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες χρωματογράφησης δεν διαφοροποιούνται. Ο κυριότερος παράγοντας από τον οποίο εξαρτάται η επιτυχία ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι η σχετική πολικότητα των μορίων στο προς διαχωρισμό μίγμα. Η πολικότητα αυτή σχετίζεται με την ισχύ των διαμοριακών επιδράσεων που αναπτύσσονται ανάμεσα στο υπό εξέταση μόριο και σε άλλα που απαντούν στο περιβάλλον του. Για την έκλουση των ουσιών από το silica gel χρειάζεται να γίνει έκλουση της στήλης με διάφορους διαλύτες αρχίζοντας με τους λιγότερο πολικούς και καταλήγοντας στους περισσότερο πολικούς:

Εξάνιο<Κυκλοεξάνιο<Βενζόλιο<Τολουόλιο<Διαιθυλαιθέρας<Χλωροφόρμιο<Οξικός αιθυλεστέρας<Διχλωρομεθάνιο<Βουτανόλη-1<Ακετόνη<Αιθανόλη<Μεθανόλη<Ακετονιτρίλιο<Νερό

Η συμπεριφορά μιας ουσίας πάνω στη στήλη μπορεί να διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) πάνω σε silica gel έτσι ώστε να βρεθεί ο κατάλληλος διαλύτης.



Σχήμα 22. Μέθοδος χρωματογραφίας στήλης.

Η χρωματογραφία για το πείραμά μας διεκπεραιώθηκε χρησιμοποιώντας τα παρακάτω συστήματα διαλυτών :

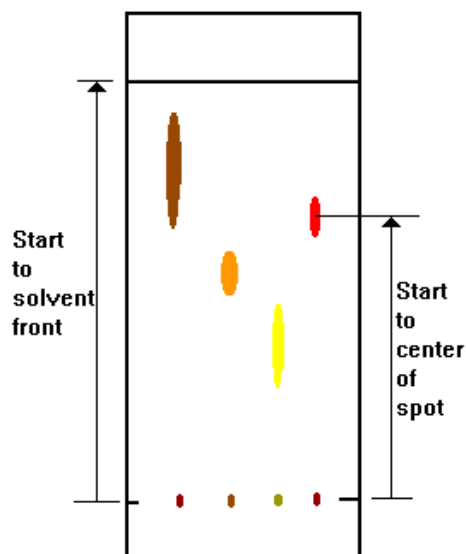
- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 60/40
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας 100
- Διάλυμα Γ : οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 95/5
- Διάλυμα Δ : οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 90/10

3.2.2 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin Layer Chromatography)

Χρησιμοποιείται μια γυάλινη πλάκα (ή φύλλο αργιλίου ή πλαστικού υλικού) επιστρωμένη με λεπτή στιβάδα (250-500 μm) προσροφητικού υλικού π.χ. ενεργοποιημένο SiO_2 , AlO_3 ή μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης. Αφού τοποθετήσουμε μια μικρή ποσότητα διαλύματος σε απόσταση περίπου 1cm από το ένα άκρο της πλάκας, την βάζουμε κατακόρυφα σε θάλαμο που περιέχει το διαλύτη ανάπτυξης έτσι ώστε η βάση της να έρχεται σε επαφή με αυτόν. Ο διαλύτης προσροφάται και ανέρχεται παρασέρνοντας τα συστατικά με διαφορετική ταχύτητα, που εξαρτάται από τη συγγένεια τους με αυτόν. Έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους. Όταν το μέτωπο του διαλύτη φτάσει στο άλλο άκρο σταματάει η χρωματογραφία, στεγνώνουμε την πλάκα και εμφανίζουμε το χρωματογράφημα ψεκάζοντας με αντιδραστήριο κατάλληλο ώστε να σχηματίζει έγχρωμες ουσίες με τα συστατικά του μίγματος (σχήμα 23).

Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254nm ή 356nm) ή μετά από ψεκασμό με διάλυμα H_2SO_4 (θειϊκού οξέος) 30%. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε μορίου στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης R_f , και υπολογίζεται από τον παρακατω τύπο με $R_f < 1$:

$$R_f = \frac{\text{(απόσταση που διανύθηκε από μια ουσία)}}{\text{(απόσταση που διανύθηκε από το μέτωπο του διαλύτη)}}$$



Σχήμα 23. Μέθοδος χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC).

Για την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω συστήματα διαλυτών :

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας/ μεθανόλη 95/5
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας/ μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Γ : οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 80/20
- Διάλυμα Δ : οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 70/30
- Διάλυμα Ε : οξικός αιθυλεστέρας / εξάνιο 60/40

3.2.3 Ξήρανση διαλυτών

Ορισμένες από τις αντιδράσεις που περιγράφονται, επιβάλλουν την χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο CH_3CN και N,N -διμέθυλοφορμαμίδιο DMF. Η ξήρανση του CH_3CN γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA (molecular sieves). Το DMF φυλάσσεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA .

3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

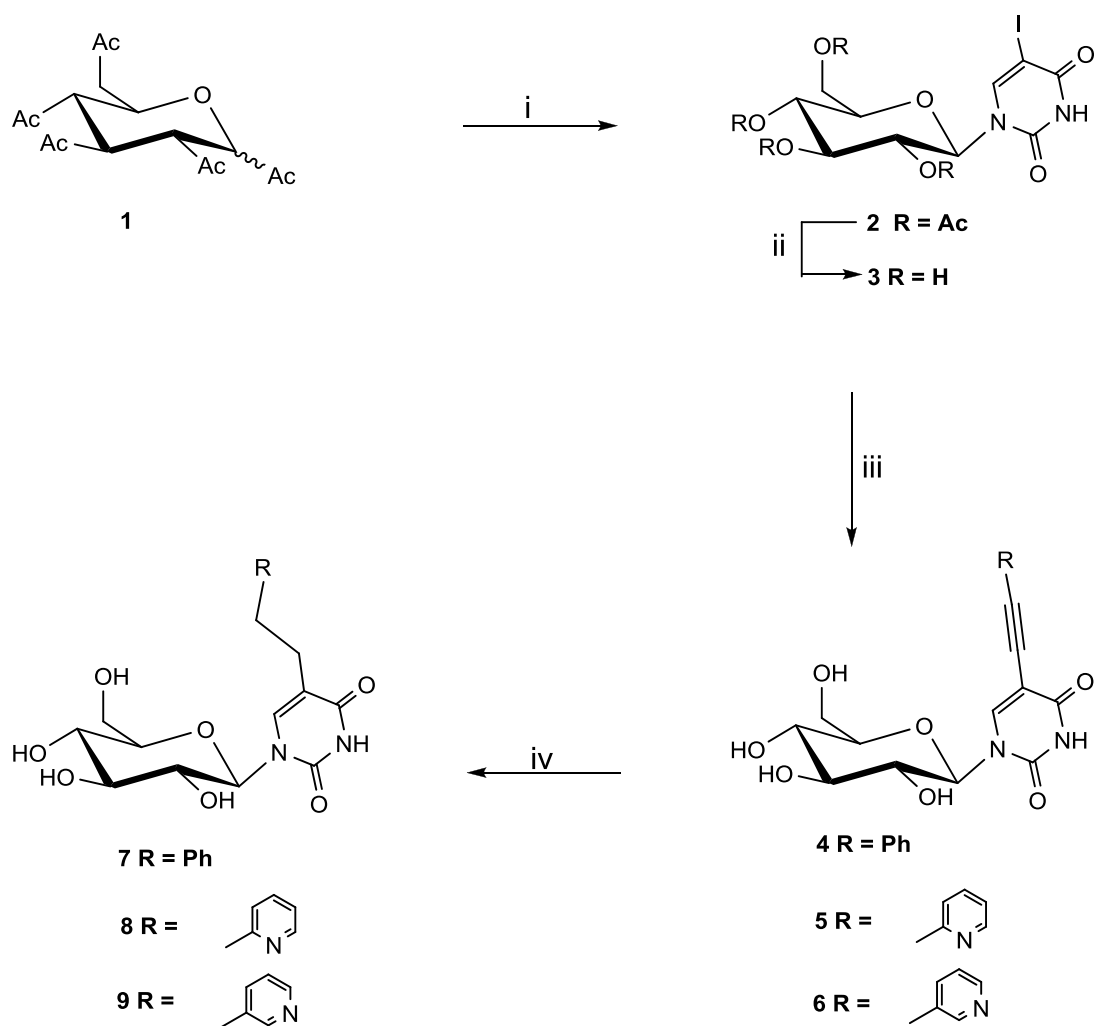
Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Η μελέτη διαφόρων ουσιών με τη χρήση τεχνικών πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στηρίζεται στη λήψη φασμάτων από τις ουσίες ύστερα από διέγερση του δείγματος. Η διέγερση γίνεται με τη χρήση ηλεκτρομαγνητικού πεδίου σε ένα εύρος συχνοτήτων που εξαρτάται από τα στοιχεία που αποτελούν το υλικό καθώς και σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες. Η μελέτη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού με τη βοήθεια ειδικών προγραμμάτων οδηγεί στην αποκάλυψη της σύστασης και της δομής του δείγματος.

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού οφείλονται σε διεγέρσεις μαγνητικών πυρήνων που βρίσκονται σε ισχυρό ομογενές μαγνητικό πεδίο B_0 . Η συχνότητα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που προκαλεί τις διεγέρσεις αυτές βρίσκεται στην περιοχή των βραχέων ραδιοκυμάτων και είναι της τάξης 1000 – 10 MHz εξαρτώμενη από την ισχύ του πεδίου. Η συχνότητα διέγερσης των διαφόρων πυρήνων π.χ. ^1H δεν είναι σταθερή αλλά εξαρτάται από το ηλεκτρονιακό περιβάλλον τους. Η ιδιότητα αυτή καθιστά την φασματοσκοπία NMR ως την πλέον ισχυρή μεθοδολογία μελέτης της ύλης σε μοριακό επίπεδο στη βιοχημεία, βιολογία και ιατρική.

Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με το φωτόμετρο Bruker 300 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και διμεθυλοσουλφοξίδιο (DMSO-d_6). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς. Η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (doublet), dd (doublet doublet), dtr (doublet triplet), m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

3.3 Μέθοδοι

3.3.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού.



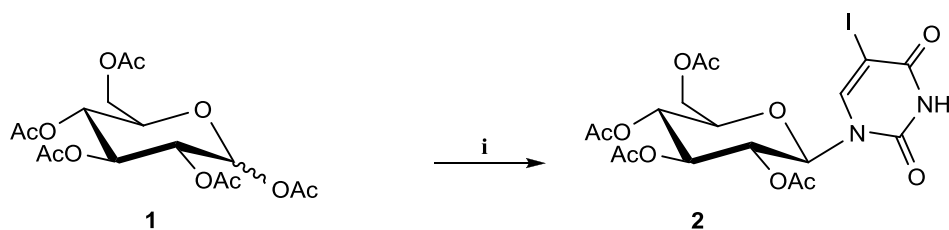
Σχήμα 24. Επισκόπηση της σύνθεσης των φαίνυλο-πυριδινυλο και υδρογονομένων γλυκοπυρανονουκλεοζίτων της ουρακίλης.

3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης.

Η πορεία της σύνθεσης ξεκίνησε με την σύζευξη της εμπορικά διαθέσιμης 1,2,3,4,6-πεντάκις-*O*-ακετυλο-*D*-γλυκοπυρανόζης **1**, με την ετεροκυκλική βάση 5-ιωδοουρακίλη, παρουσία του άνυδρου διαλύτη ακετονιτριλίου (CH₃CN), εξαμεθυλοδισιλαζάνιου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης και με την προσθήκη του

τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων σε συνθήκες 120 Watt για 5 λεπτά. Έτσι λήφθηκε ο προστατευμένος νουκλεοζίτης 1-(2',3',4',6'-τετράκις-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλης **2** με ικανοποιητική απόδοση 83%. Στη συνέχεια, ακολούθησε η αποπροστασία του νουκλεοζίτη **2** με τη χρήση κορεσμένου διαλύματος μεθανολικής αμμωνίας, η οποία οδήγησε στην σύνθεση της αποπροστατευμένης ένωσης 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο) νουκλεοζίτη της 5-ιωδοουρακίλης **3** με ικανοποιητική απόδοση 87%. Για τη σύνθεση του φαίνυλο και των πυριδίνυλο γλυκοπυρανονουκλεοζιτών **4**, **5** και **6**, ο νουκλεοζίτης **3** συζεύχθηκε με τα αλκίνια φαίνυλο ακετυλένιο, 2-αιθύνυλο πυριδίνη και 3-αιθύνυλο πυριδίνη, αντίστοιχα. Κατά την αντίδραση Sonogashira, ο αποπροστατευμένος γλυκοπυρανονουκλεοζίτης της 5-ιωδοουρακίλης **3** διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και με την προσθήκη του κατάλληλου αλκινίου, της τριαιθυλαμίνης (Et_3N), του ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκαταλύτης) και του τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ (καταλύτης), πραγματοποιήθηκε η σύζευξη τους υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων ισχύος 120 W για 3 λεπτά, λαμβάνοντας έτσι τους επιθυμητούς 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-φαινυλο αιθύνυλο νουκλεοζίτες της ουρακίλης **4**, σε απόδοση 85% καθώς και τους αιθύνυλο πυριδινυλο νουκλεοζίτες **5** και **6**, αντίστοιχα, σε πολύ καλές αποδόσεις (70 και 72%, αντίστοιχα). Επιπλέον, με στόχο να εξετάσουμε την επίδραση του τριπλού δεσμού στην ανασταλτική δράση των νέων ενώσεων, πραγματοποιήσαμε καταλυτική υδρογόνωση των ενώσεων **4**, **5** και **6** με την οποία ελήφθησαν τα υδρογονωμένα παράγωγα **7**, **8** και **9**, αντίστοιχα σε πολύ καλές αποδόσεις (72-81%), ως άχρωμα έλαια. Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπίες ^1H NMR και UV/Vis.

3.3.3 Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετράκις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (**2**).

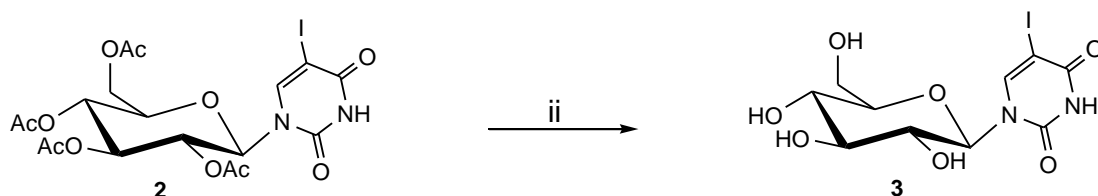


Η σύνθεση του **2** επιτεύχθηκε με τη μέθοδο των μικροκυμάτων ως εξής. Διαλύονται σε 12.8 ml άνυδρου διαλύτη ακετονιτρίλιο (CH_3CN), η 1,2,3,4,6-πεντάκις-O-ακετυλο-D-γλυκοκυρανόζη (**1**, 1 g, 2.6 mmol), η 5-ιωδοουρακίλη (3.6 mmol), το εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS 4.5 mmol), η σακχαρίνη (0.2 mmol) και μετά την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$, 3.6 mmol) ακτινοβολούνται σε συνθήκες 120 Watt για 5 λεπτά. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 1). Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου NaHCO_3 και αραιώθηκε με διχλωρομεθάνιο CH_2Cl_2 (200ml). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα A (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 6:4). Το επιθυμητό προϊόν (**2**) (830mg) ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος με ικανοποιητική απόδοση 83%.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2',3',4',6'- τετράκις -Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (**2**).

TLC(Διάλυμα Ε) EtAc/Hex 6:4	$R_f = 0.18$
Απόδοση	83%
$[\alpha]_D^{22}$	-3.0 $c = 0.11$
λ_{max}	270 nm

3.3.4 Σύνθεση του 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο) νουκλεοζίτη της 5-ιωδοουρακίλης (**3**).

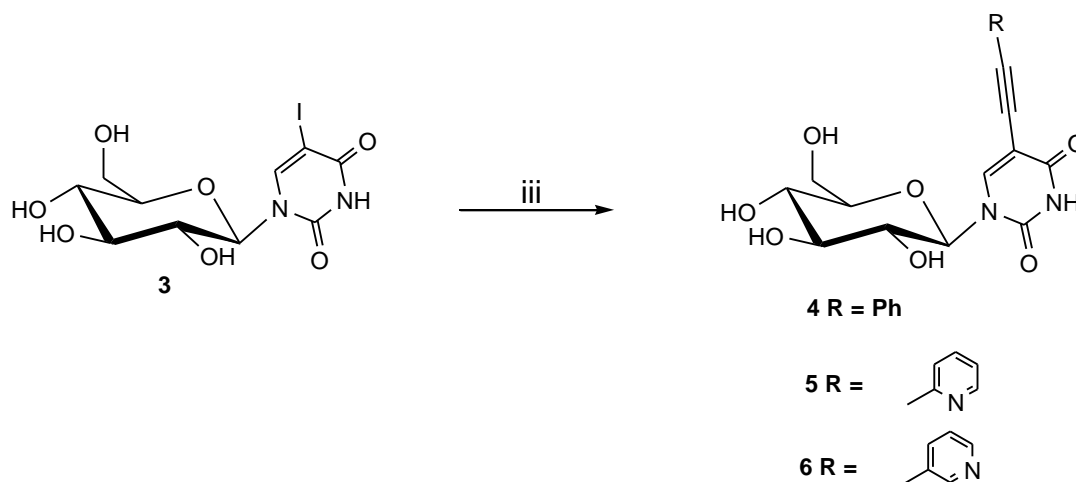


Η αποπροστασία του νουκλεοζίτη **3** έγινε με τη χρήση κορεσμένου διαλύματος μεθανολικής αμμωνίας (56 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε με έντονη ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 2). Έτσι, επιτεύχθηκε η σύνθεση του 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο) νουκλεοζίτη της 5-ιωδοουρακίλης **3**. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Β. Το επιθυμητό προϊόν λήφθηκε υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος με ικανοποιητική απόδοση 87%.

Πίνακας 2. Αποτελέσματα σύνθεσης 1-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο) ουρακίλης **3**

(Διάλυμα A) EtAc/MeOH 9.5:0.5	Προϊόν 3a
TLC	R _f = 0.35
Απόδοση	87%
[α] _D ²²	+2.0 c = 0.50
λ _{max}	269 nm

3.3.5 Γενική μέθοδος παρασκευής των 1-(β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5-φαινυλοαιθύνυλο ουρακίλη (4) και των 1-(β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5-(2- και 3-αιθυλοπυριδίνυλο) νουκλεοζιτών της ουρακίλης (5) και (6).



Ένα μίγμα που αποτελείται από τον νουκλεοζίτη 1-(β-D-γλυκοπυρανόζυλο)5-ιωδο ουρακίλη (**3**) (0.8 g, 2 mmol), άνυδρη DMF (6 mL), τριαιθυλαμίνη (0.83 mL, 3 equiv) και το κατάλληλο ακραίο αλκίνιο (3 equiv), παρουσία CuI (76.18 mg, 0.2 equiv) και Pd(PPh₃)₄ (231.11 mg, 0.1 equiv), ακτινοβολήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων (120 W) για 3 min. Κατόπιν ολοκλήρωσης της αντίδρασης (TLC), οι διαλύτες απομακρύνθηκαν υπό κενό και το υπόλειμμα καθαρίστηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel). Οι επιθυμητοί C-5 αλκύνυλο πυρανονουκλεοζίτες **4**, **5** και **6**, ελήφθησαν σε πολύ καλές αποδόσεις (70-85%).

Πίνακας 3. Αποτελέσματα σύνθεσης των 1-(β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-5-(φαινυλοαιθύνυλο, 2- και 3-αιθυνοπυριδίνυλο) νουκλεοζιτών της ουρακίλης (**4**), (**5**) και (**6**).

TLC	Προϊόν 4 R _f = 0.26, (Διάλυμα Β, 9:1)	Προϊόν 5 R _f = 0.26, (Διάλυμα Γ, 8:2)	Προϊόν 6 R _f = 0.31, (Διάλυμα Γ, 8:2)
Απόδοση	85%	70%	72%
[α] _D ²²	+2.0 c = 0.17	-4.0 c = 0.29	+3.0 c = 0.12
λ _{max}	262 nm	311 nm	308 nm

1-(β-D-Γλυκοπυρανόζυλο)-5-φαινυλοαιθύνυλο ουρακίλη (4**).**

Απόδοση: 85%; R_f = 0.26 (EtOAc/MeOH 9:1); [α]_D²² = + 2.00 (c 0.17, MeOH); λ_{max} 262 nm (ε 1765); ¹H NMR (CD₃OD): δ 8.10 (s, 1H, H-6), 7.53-7.36 (m, 5H, Ph), 5.58 (d, 1H, J_{1',2'} = 9.5 Hz, H-1'), 3.90-3.48 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6a' and H-6b').

1-(β-D-Γλυκοπυρανόζυλο)-5-(πυριδιν-2-υλ)αιθυνοουρακίλη (5).

Απόδοση: 70%; $R_f = 0.26$ (EtOAc/MeOH 8:2); $[\alpha]_D^{22} = -4.00$ (c 0.29, MeOH); λ_{max} 311 nm (ϵ 15338); 1H NMR (DMSO- d_6): δ 11.81 (br s, 1H, NH), 8.60-8.58 (m, 1H, pyridine), 8.30 (s, 1H, H-6), 7.87-7.81 (m, 1H, pyridine), 7.57 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, pyridine), 7.42-7.37 (m, 1H, pyridine), 5.44 (d, 1H, $J_{3'-OH,3'} = 5.0$ Hz, 3'-OH), 5.34 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.2$ Hz, H-1'), 5.23 (d, 1H, $J_{4'-OH,4'} = 3.7$ Hz, 4'-OH), 5.11 (d, 1H, $J_{2'-OH,2'} = 5.0$ Hz, 2'-OH), 4.60 (t, 1H, $J_{6'-OH,6'} = 5.9$ Hz, 6'-OH), 3.70 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 5.1$ Hz, $J_{6a',6b'} = 11.5$ Hz, H6a'), 3.56-3.19 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6b').

1-(β-D-Γλυκοπυρανόζυλο)-5-(πυριδιν-3-υλ)αιθυνοουρακίλη (6).

Απόδοση: 72%; $R_f = 0.31$ (EtOAc/MeOH 8:2); $[\alpha]_D^{22} = +3.00$ (c 0.12, MeOH); λ_{max} 308 nm (ϵ 13213); 1H NMR (DMSO- d_6): δ 11.75 (br s, 1H, NH), 8.70, 8.58 (2m, 2H, pyridine), 8.26 (s, 1H, H-6), 7.91 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, pyridine), 7.46 (m, 1H, pyridine), 5.44 (d, 1H, $J_{3'-OH,3'} = 5.1$ Hz, 3'-OH), 5.37 (d, 1H, $J_{1',2'} = 9.2$ Hz, H-1'), 5.23 (d, 1H, $J_{4'-OH,4'} = 4.0$ Hz, 4'-OH), 5.11 (d, 1H, $J_{2'-OH,2'} = 5.3$ Hz, 2'-OH), 4.59 (t, 1H, $J_{6'-OH,6'} = 5.8$ Hz, 6'-OH), 3.72 (dd, 1H, $J_{5',6a'} = 6.1$ Hz, $J_{6a',6b'} = 12.7$ Hz, H-6a'), 3.55-3.18 (m, 5H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6b').

3.3.6 Γενική μέθοδος παρασκευής των 1-(β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-5-φαινοουρακίλη (7) και των 1-(β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-5-(2-και 3-αιθυλοπυριδίνυλο) νουκλεοζιτών της ουρακίλης (8) και (9).

Σε διάλυμα των αλκύνυλο πυρανονουκλεοζιτών **4** ή **5** ή **6** (0.3 mmol) σε μεθανόλη (40.7 mL) προστέθηκε παλλάδιο σε άνθρακα 10% (102 mg) και το διάλυμα υδρογονώθηκε για μία νύχτα. Την επόμενη μέρα το μίγμα διηθήθηκε και από το διήθημα απομακρύνθηκαν οι διαλύτες υπό κενό. Πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας

(silica gel) και τα επιθυμητά υδρογονωμένα προϊόντα **7**, **8** και **9**, ελήφθησαν σε πολύ καλές αποδόσεις (72-81%).

Πίνακας 4. Αποτελέσματα σύνθεσης 1 - (β-D-γλυκοπυρανοζυλο) - 5 - (φαινυλ, πυριδιν-2 και -3 -υλ) αιθυλο ουρακίλης (**7**), (**8**) και (**9**).

TLC	Προϊόν 7 Rf = 0.17, (Διάλυμα Α, 9.5:0.5)	Προϊόν 8 Rf = 0.2, (Διάλυμα Γ, 8:2)	Προϊόν 9 Rf = 0.2, (Διάλυμα Δ, 7:3)
Απόδοση	72%	75%	81%
$[\alpha]_D^{22}$	+ 2.00 c = 0.11	+ 6.00 c = 0.11	+ 4.00 c = 0.29
λ_{max}	265 nm	311	308

1-(β-D-Γλυκοπυρανόζυλο)-5-φαινυλοαιθυλοουρακίλη (7**).**

Απόδοση: 72%; Rf = 0.17 (EtOAc/MeOH 9.5:0.5); $[\alpha]_D^{22} = + 2.00$ (c 0.11, MeOH); λ_{max} 265 nm (ϵ 5271); $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ 7.39 (s, 1H, H-6), 7.31-7.15 (m, 5H, Ph), 5.51 (d, 1H, $J_{1',2'} = 8.6$ Hz, H-1'), 3.85 (dd, 1H, $J_{6a',6b'} = 12.6$ Hz, $J_{5',6a'} = 1.2$ Hz, H-6a'), 3.71 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 4.8$ Hz, H-6b'), 3.49-3.39 (m, 4H, H-2', H-3', H-4' and H-5'), 2.81 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, methylene), 2.62-2.54 (m, 2H, methylene).

1-(β-D-Γλυκοπυρανόζυλο)-5-(πυριδιν-2-υλ) αιθυλο ουρακίλη (8**).**

Απόδοση: 75%; Rf = 0.2 (EtOAc/MeOH 8:2); $[\alpha]_D^{22} = + 6.00$ (c 0.11, MeOH); λ_{max} 311 nm (ϵ 15276); $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ 8.45 (m, 1H, pyridine), 7.78-7.72 (m, 1H, pyridine), 7.38 (s, 1H, H-6), 7.31 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, pyridine), 7.26-7.22 (m, 1H, pyridine), 5.48 (d, 1H, $J_{1',2'} = 8.8$ Hz, H-1'), 3.85 (dd, 1H, $J_{6a',6b'} = 11.9$ Hz, $J_{5',6a'} = 1.9$ Hz, H-6a'), 3.69 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 4.8$ Hz, H-6b'),

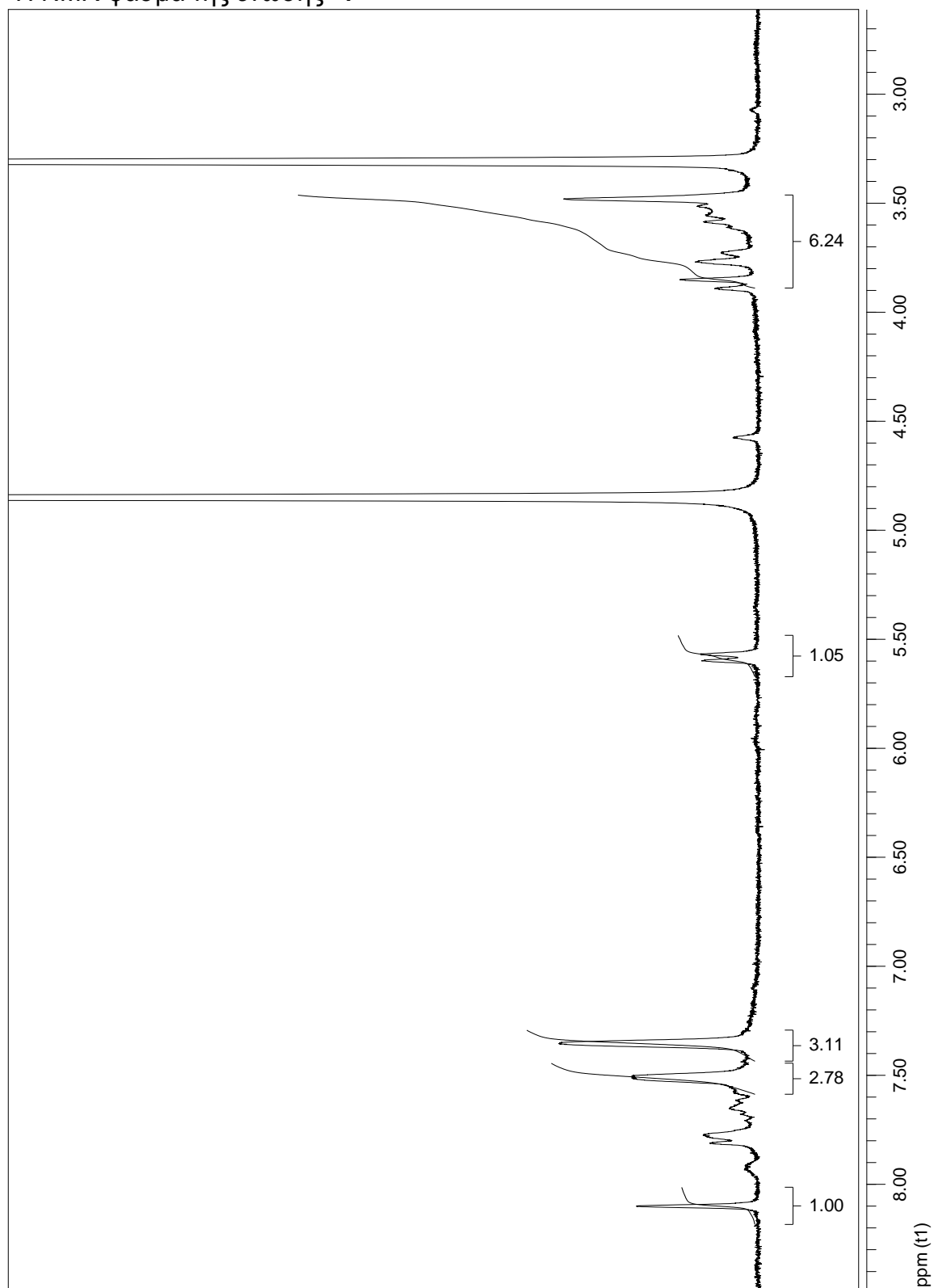
3.51-3.38 (m, 4H, H-2', H-3', H-4' and H-5'), 3.00 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, methylene), 2.74-2.67 (m, 2H, methylene).

1-(β -D-Γλυκοπυρανόζυλο)-5-(πυριδιν-3-υλ) αιθυλο ουρακίλη (9).

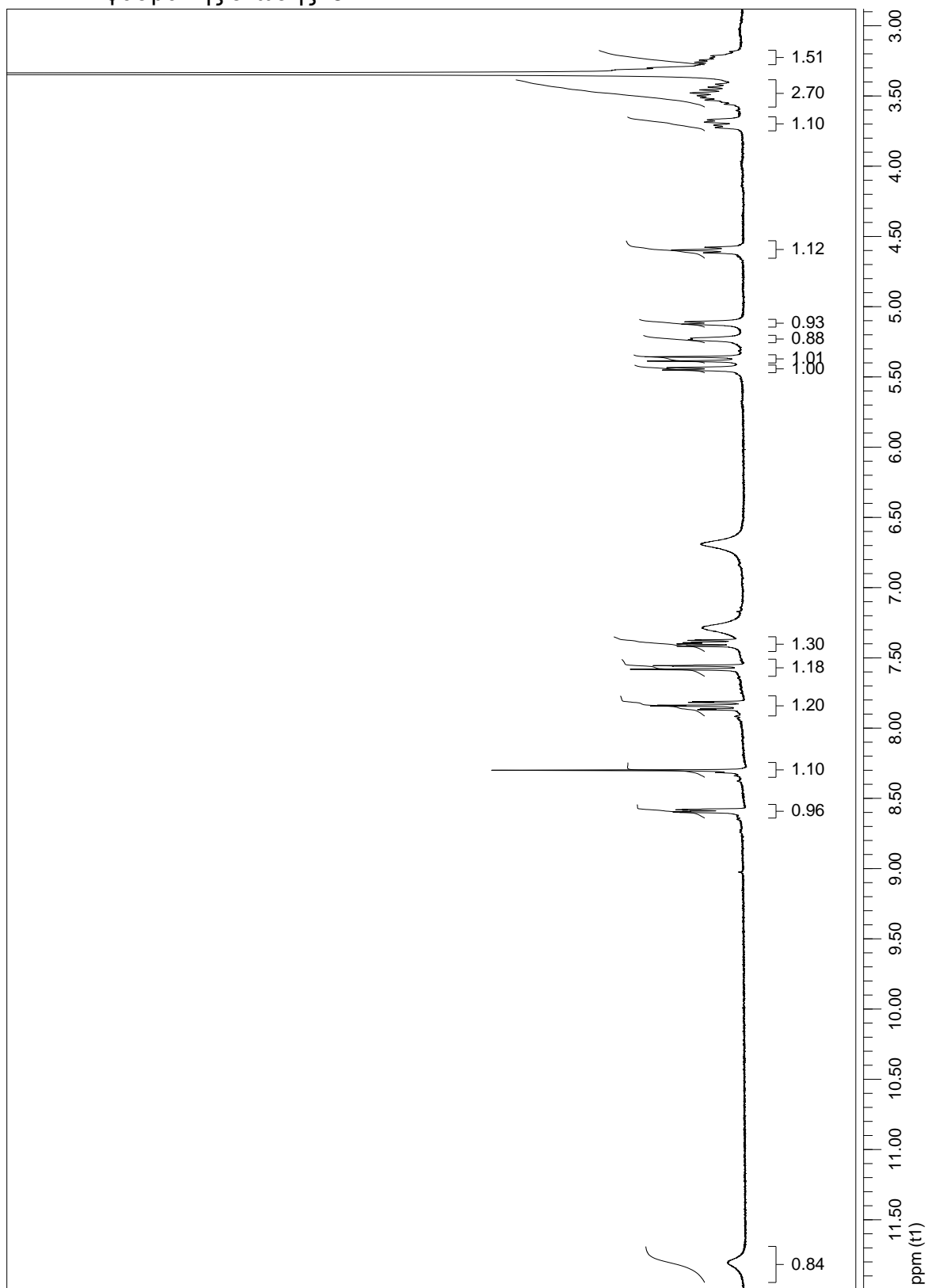
Απόδοση: 81%; $R_f = 0.2$ (EtOAc/MeOH 7:3); $[\alpha]_D^{22} = + 4.00$ (c 0.29, MeOH); λ_{max} 308 nm (ϵ 14131); 1H NMR (CD_3OD): δ 8.41 (m, 2H, pyridine), 7.73 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, pyridine), 7.43 (s, 1H, H-6), 7.40-7.36 (m, 1H, pyridine), 5.52 (d, 1H, $J_{1',2'} = 8.7$ Hz, H-1'), 3.87 (dd, 1H, $J_{6a',6b'} = 12.4$ Hz, $J_{5',6a'} = 1.6$ Hz, H-6a'), 3.70 (dd, 1H, $J_{5',6b'} = 4.1$ Hz, H-6b'), 3.51-3.41 (m, 4H, H-2', H-3', H-4' and H-5'), 2.90 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, methylene), 2.66 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, methylene).

4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR

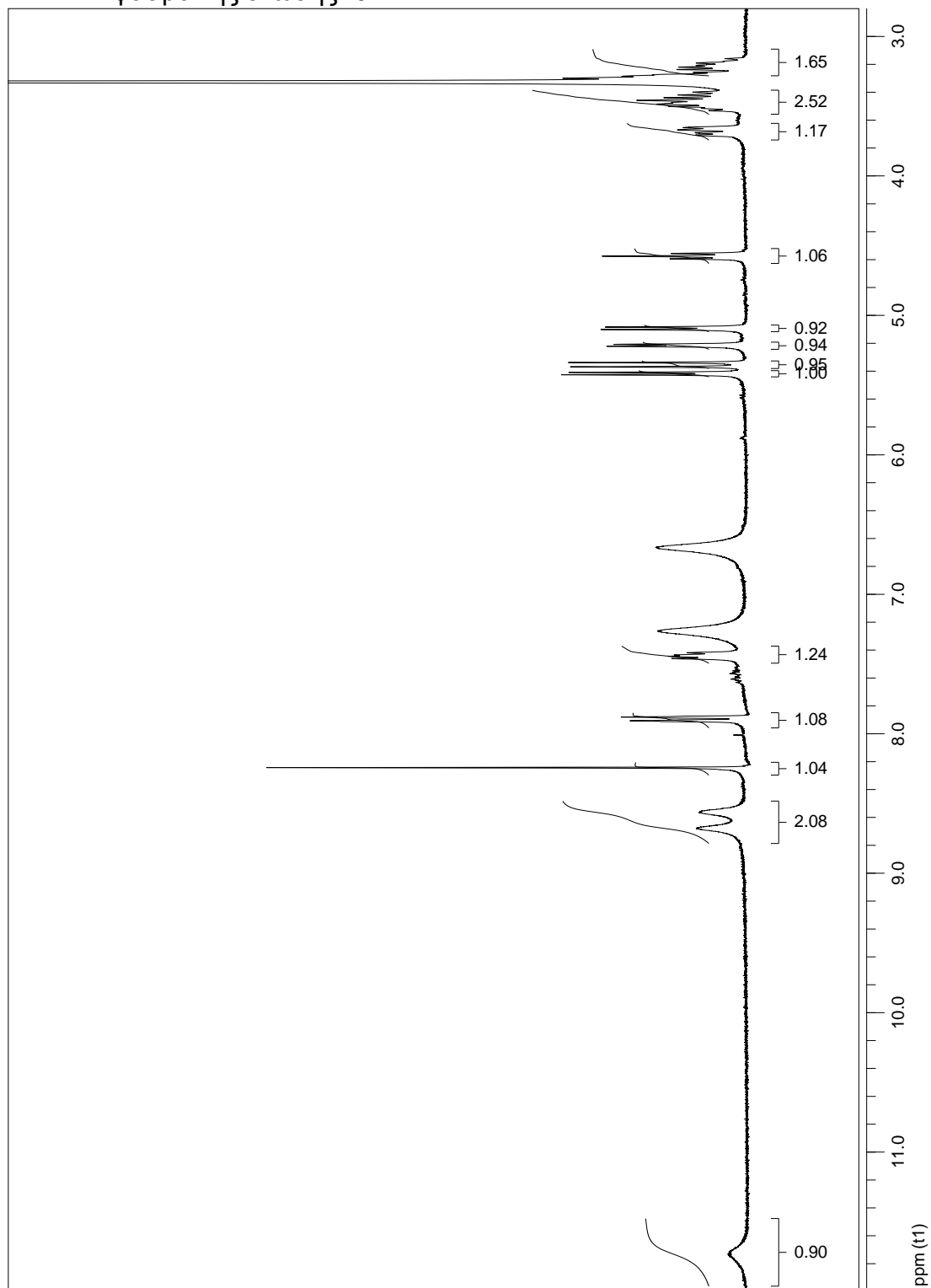
^1H NMR φάσμα της ένωσης 4



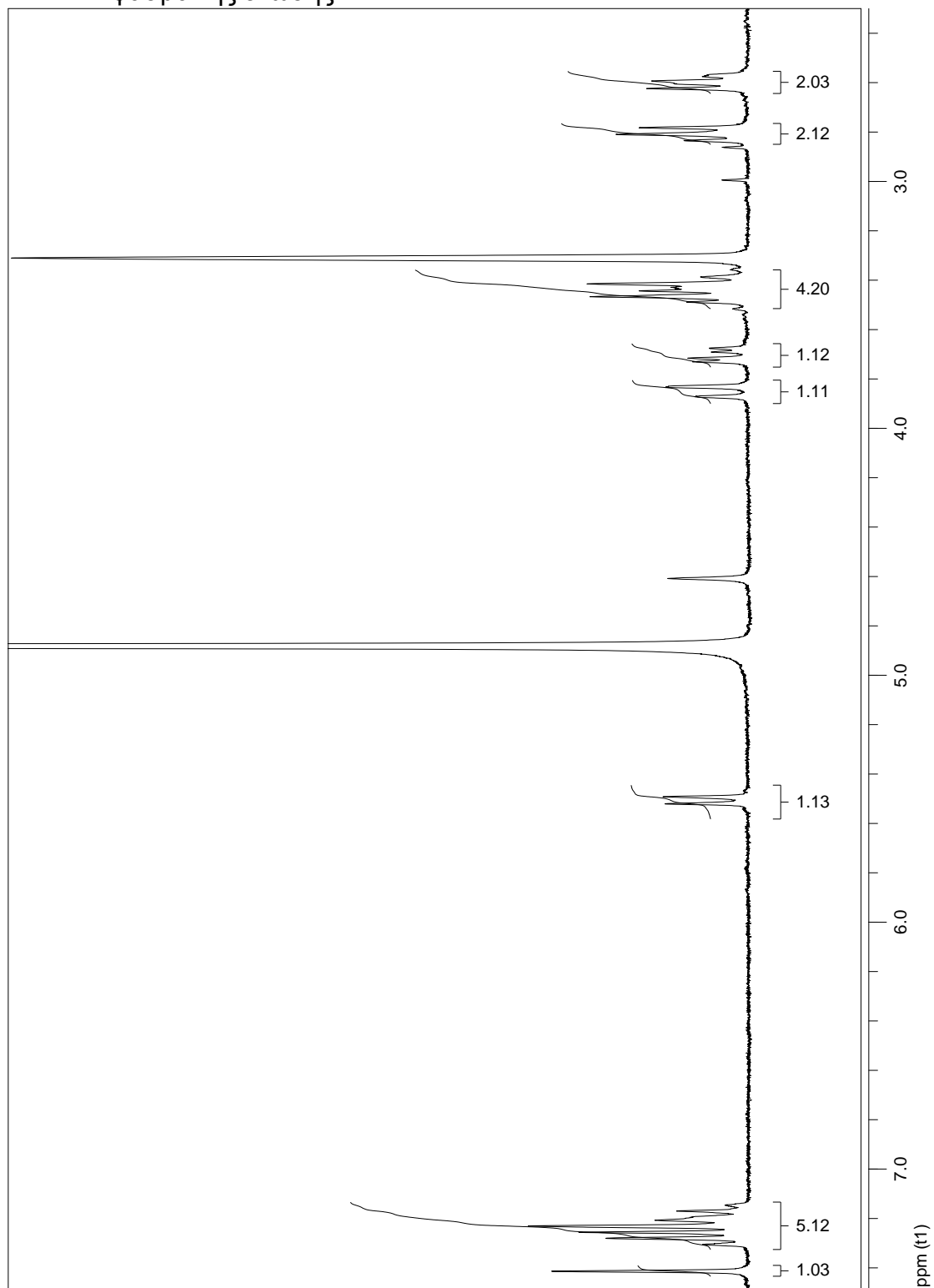
¹H NMR φάσμα της ένωσης **5**



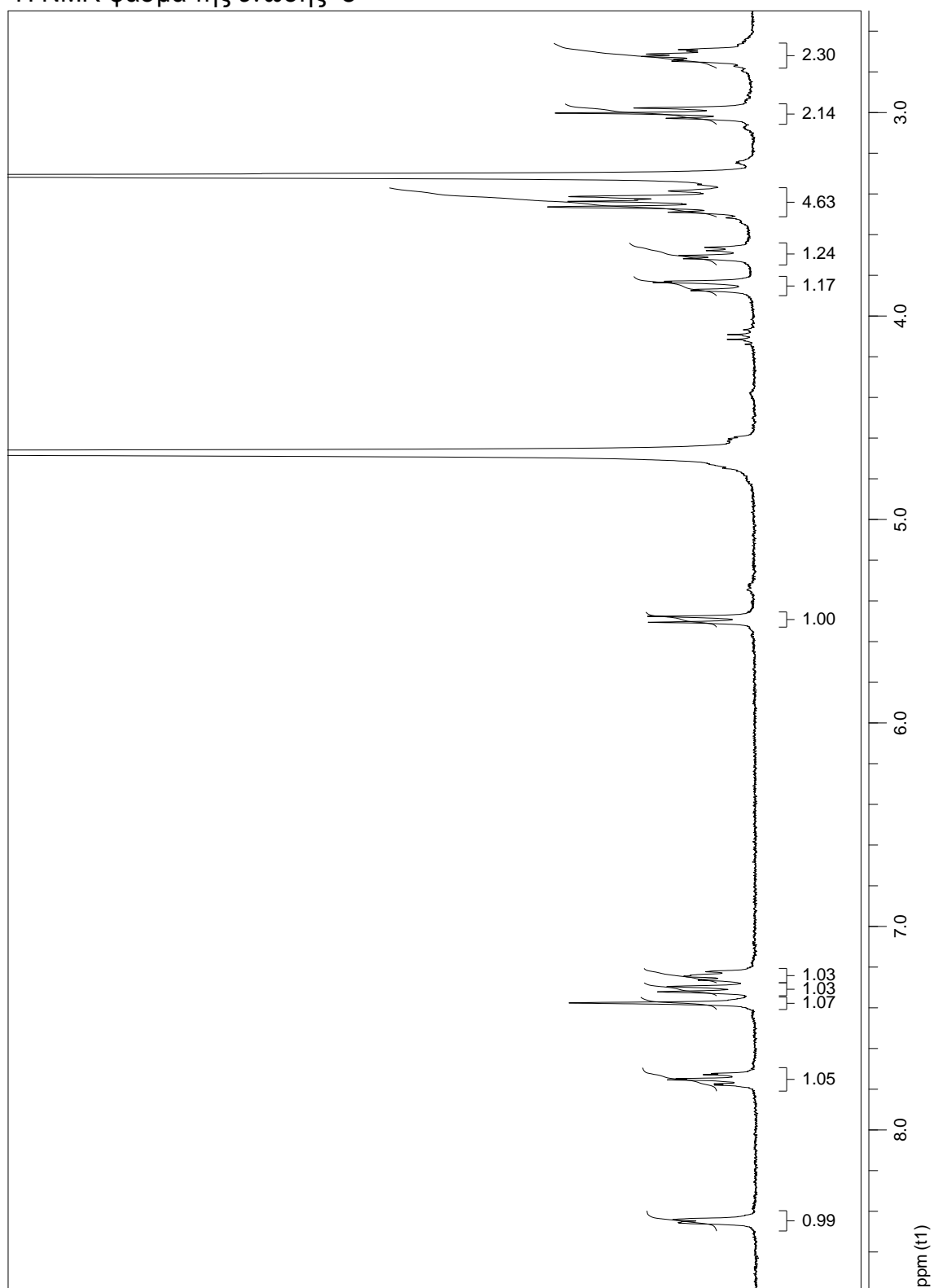
^1H NMR φάσμα της ένωσης **6**



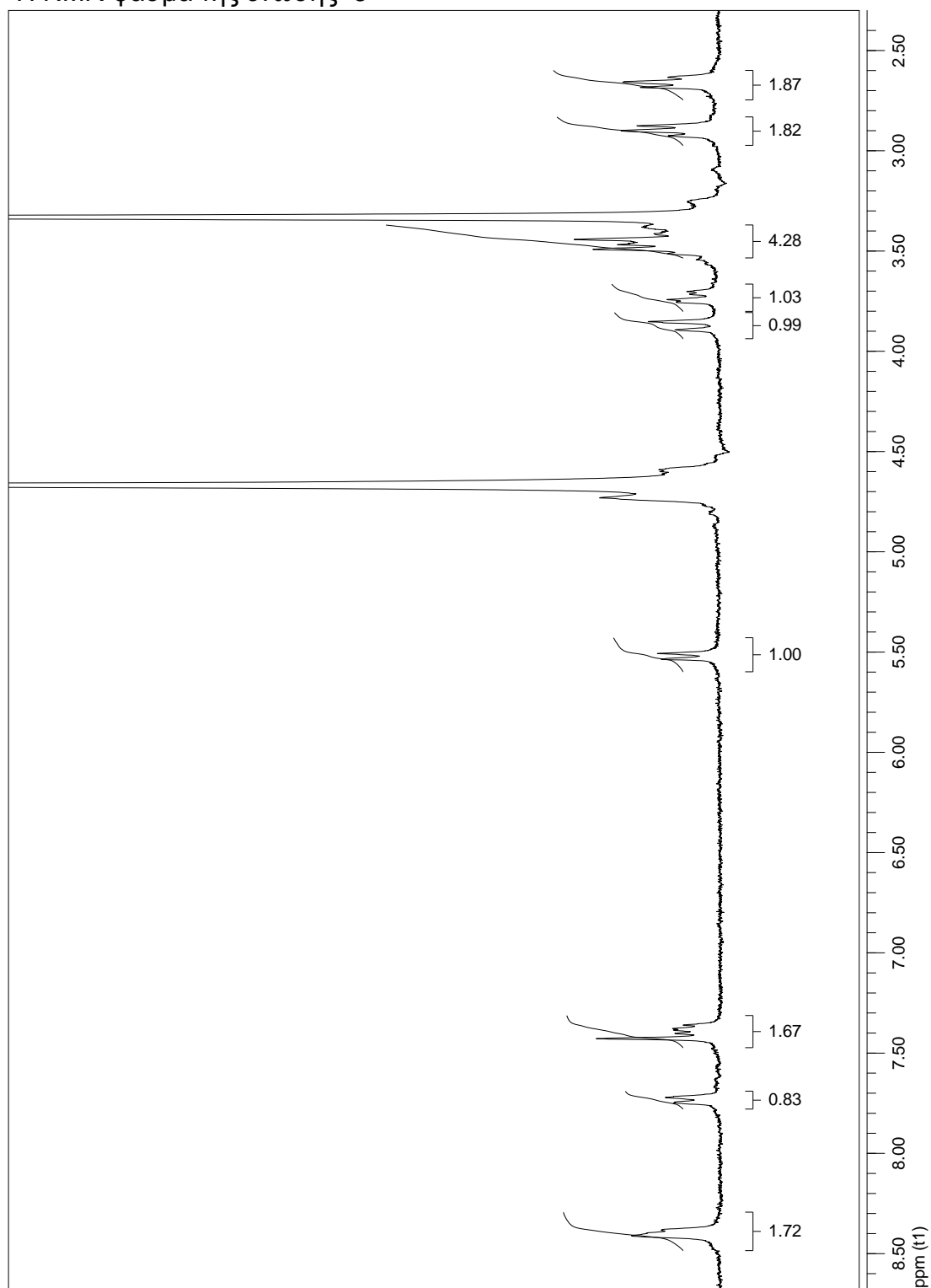
^1H NMR φάσμα της ένωσης **7**



^1H NMR φάσμα της ένωσης **8**



^1H NMR φάσμα της ένωσης **9**



5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη νουκλεοζιδικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προέκυψε από τις προσπάθειες των ερευνητών για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως κακοήθεις νεοπλασίες και ιϊκές μολύνσεις. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιδικών 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 τροποποίηση στο τμήμα της βάσης με πιθανή αντικαρκινική και αντιϊκή δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, ταχεία, έχοντας πραγματοποιήσει σύντομα βήματα. Η αντίδραση Sonogashira επιτεύχθηκε με την χρήση μικροκυμάτων, η οποία αποτελεί “πράσινη” τεχνική και υπερέχει σε σχέση με τη συμβατική θέρμανση στα εξής βασικά σημεία:

- i. Προσφέρει ομοιόμορφη θέρμανση σε όλο το μίγμα της αντίδρασης
- ii. Αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα της αντίδρασης
- iii. Ελαττώνει τον σχηματισμό παραπροϊόντων
- iv. Παρέχει αυξημένες αποδόσεις

Οι τελικές αποδόσεις που πήραμε από τη σύνθεση των τελικών γλυκοπυρανονουκλεοζιτών είναι αρκετά καλές.

Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση της **1-(β-D-Γλυκοπυρανόζυλο)-5-φαινυλοαιθυνοουρακίλη (4)** είχε απόδοση 85% και η **1-(β-D-Γλυκοπυρανόζυλο)-5-(πυριδιν-2-υλ)αιθυνοουρακίλη (5)** είχε απόδοση 70%. Η σύνθεση των **1-(β-D-Γλυκοπυρανόζυλο)-5-(πυριδιν-3-υλ)αιθυνοουρακίλη (6)**, **1-(β-D-Γλυκοπυρανόζυλο)-5-φαινυλοαιθυλοουρακίλη (7)** με απόδοση 72% και οι δύο. Τέλος, η σύνθεση των **1-(β-D-Γλυκοπυρανόζυλο)-5-(πυριδιν-2-υλ)αιθυλοουρακίλη (8)**, **1-(β-D-Γλυκοπυρανόζυλο)-5-(πυριδιν-3-υλ)αιθυλοουρακίλη (9)** με απόδοση 75% και 81%, αντίστοιχα.

Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H NMR.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Berg, J. M.; Tymoczko J. L., Stryer L. *Βιοχημεία (Τόμος Ι)* 2001. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (p) 329-351.
2. Zhou W., Gumina G., Chong Y., Wang J., Schinazi R. F., Chu C. K. *Synthesis, structure-activity relationships, and drug resistance of beta-d-3'-fluoro-2',3'-unsaturated nucleosides as anti-HIV Agents. J Med Chem.* 2004, 47, 3399-408
3. Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* 1992, 11, 903
4. Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* 1993, 36, 2033
5. De Clercq, E. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2002, 2, 163
6. Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* 1995, 67, 155
7. Wagner C. R., Iyer V. V., McIntee E. J. *Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. Med Res Rev.* 2000, 20, 417-51.
8. Balzarini J., Thormar H., Holy A., Jindrich J., Rosenberg I., Debyser Z., Desmyter J., De Clercq E. *Inhibition of visna virus replication by 2',3'-dideoxynucleosides and acyclic nucleoside phosphonate analogs. Antimicrob Agents Chemother.* 1993, 37, 2540-4.
9. Lui V. W., Lau C. P., Cheung C. S., Ho K., Ng M. H., Cheng S. H., Hong B., Tsao S. W., Tsang C. M., Lei K. I., Yamasaki Y., Mita A., Chan A. T. *An RNA-*

directed nucleoside anti-metabolite, 1-(3-C-ethynyl-beta-d-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd), elicits antitumor effect via TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) downregulation. *Biochem Pharmacol.* 2010, 79, 1772-80.

10. Bhat U. G., Pandit B., Gartel A. L. ARC synergizes with ABT-737 to induce apoptosis in human cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2010, 9, 1688-96.

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

12. Cory A. H., Cory J. G. Use of nucleoside kinase-deficient mouse leukemia L1210 cell lines to determine metabolic routes of activation of antitumor nucleoside analogs. *Adv Enzyme Regul.* 1994, 34:1-12

13. Pontikis R., Benhida R., Aubertin A. M., Grierson D. S., Monneret C. Synthesis and anti-HIV activity of novel N-1 side chain-modified analogs of 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT). *J Med Chem.* 1997, 40, 1845-54.

14. Yamagami K., Fujii A., Arita M., Okumoto T., Sakata S., Matsuda A., Ueda T., Sasaki T. Antitumor activity of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine, a new 2'-deoxycytidine derivative. *Cancer Res.* 1991, 51, 2319-23.

15. Lin T. S., Luo M. Z., Liu M. C., Clarke-Katzenburg R. H., Cheng Y. C., Prusoff W. H., Mancini W. R., Birnbaum G. I., Gabe E. J., Giziewicz J. Synthesis and anticancer and antiviral activities of various 2'- and 3'-methylidene-substituted nucleoside analogues and crystal structure of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine hydrochloride. *J Med Chem.* 1991, 34, 2607-15.

16. Baker C. H., Banzon J., Bollinger J. M., Stubbe J., Samano V., Robins M. J., Lippert B., Jarvi E., Resvick R. 2'-Deoxy-2'-methylidenecytidine and 2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine 5'-diphosphates: potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase. *J Med Chem.* 1991, 34, 1879-84.

17. Matsuda A., Sasaki T. *Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides. Cancer Sci.* 2004, 95, 105-11
18. Faderl S., Gandhi V., Kantarjian H., Plunkett W. *New nucleoside analogues in clinical development. Cancer Chemother Biol Response Modif.* 2002, 20, 37-58.
19. Parker W. B., Secrist J. A., Waud W. R. *Purine nucleoside antimetabolites in development for the treatment of cancer. Curr Opin Investig Drugs.* 2004, 5, 592-6.
20. Pui C. H., Jeha S. *Clofarabine. Nat Rev Drug Discov.* 2005, 12-3.
21. Secrist J. A. *Nucleosides as anticancer agents: from concept to the clinic. Nucleic Acids Symp.* 2005, 49, 15-6
22. Matsuda A, Hattori H, Tanaka M, Sasaki T. *Biomed Chem Lett*, 1996, 6: 1887
23. Hattori H., Nozawa E., Iino T., Yoshimura Y., Shuto S., Shimamoto Y., Nomura M., Fukushima M., Tanaka M., Sasaki T., Matsuda A. *Nucleosides and nucleotides. 175. Structural requirements of the sugar moiety for the antitumor activities of new nucleoside antimetabolites, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine and -uracil. J Med Chem.* 1998, 41, 2892-902.
24. Nomura M., Shuto S., Matsuda A. *Synthesis of the cyclic and acyclic acetal derivatives of 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine, a potent antitumor nucleoside. Design of prodrugs to be selectively activated in tumor tissues via the bio-reduction-hydrolysis mechanism. Bioorg Med Chem.* 2003, 11, 2453-61.
25. O-Yang H. Y., Wu E. B., Fraser-Smith, KAM Walker. *Nucleosides and nucleotides. 183. Synthesis of 4' α -branched thymidines as a new type of antiviral agent. Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 37-40.

26. Kodama E.I., Kohgo S., Kitano K., Machida H., Gatanaga H., Shigeta S., Matsuoka M., Ohrui H., Mitsuya H. *4'-Ethyne nucleoside analogs: potent inhibitors of multidrug-resistant human immunodeficiency virus variants in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001, 45, 1539-46.
27. Kohgo S., Yamada K., Kitano K., Sakata S., Hayakawa H., Nameki D., Kodama E., Matsuoka M., Mitsuya H., Ohrui H. *Synthesis of 4'-C-ethyne and 4'-C-cyano purine nucleosides from natural nucleosides and their anti-HIV activity*. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2003, 22, 887-9.
28. Meneni S., Ott I., Sergeant C. D., Sniady A., Gust R., Dembinski R. *Alkynyl-2'-deoxyuridines: chromatography-free synthesis and cytotoxicity evaluation against human breast cancer cells*. *Bioorg Med Chem*. 2007, 15, 3082-8.
29. Minakawa N., Matsuda A. *Mechanism-based design of inosine 5-monophosphate dehydrogenase inhibitors: synthesis and biological activities of 5-ethyne-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives*. *Curr Med Chem*. 1999, 6, 615-28.
30. De Clercq E. *New developments in anti-HIV chemotherapy*. *Biochim Biophys Acta*. 2002, 1587, 258-75.
31. Minakawa N., Takeda T., Sasaki T., Matsuda A., Ueda T. *Synthesis and antitumor activity of 5-ethyne-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives*. *J Med Chem*. 1991, 34, 778-86
32. Manta S., Agelis G., Botić T., Cencic A., Komiotis D. *Fluoro-ketopyranosyl nucleosides: synthesis and biological evaluation of 3-fluoro-2-keto-beta-D-glucopyranosyl derivatives of N4-benzoyl cytosine*. *Bioorg Med Chem*. 2007, 15, 980-7
33. Balatsos N. A., Vlachakis D., Maragozidis P., Manta S., Anastasakis D., Kyritsis A., Vlassi M., Komiotis D., Stathopoulos C. *Competitive inhibition of*

human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides. Biochemistry. 2009, 48, 6044-51.

34. Leclercq F., Egron M. J., Antonakis K., Bennani-Baiti M. I., Frayssinet C. *Synthesis and biological activity of a fluorketonulceoside: 7-(3-deoxy-3-fluoro-beta-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose) theophylline. Carbohydr Res. 1992, 228, 95-102.*

35. Khan A. R., Mulligan K. X., Ollapally A. P. *Synthesis of 5-chloro-1-(2,3-dideoxy-3-fluoro-beta-D-glycero-hex-2-enopyranose-4-ulosyl)uracil as potential anticancer/antiviral agent. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2001, 20, 759-62.*

36. Ollapally A. P., Bennouna-Dorange I., Whitaker T. L. *5-Fluoro-1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-6-O-trityl-beta-D-glycero-hex-3-eno-pyranos-2-ulosyl (uracil): anticancer agent. Nucleosides Nucleotides. 1999, 18, 703-5.*

37. Egron M. J., Dorange B. I., Antonakis K., Herscovici J., Ollapally A. P. *Unsaturated fluoroketonucleosides as anticancer agents: the synthesis and biological activity of 5-fluoro-1-(3,4-di-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-beta-d-glycero-hex-3-eno-pyranos-2-ulosyl) uracil. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2002, 21, 327-34*

38. Komiotis D., Delatre S., Holt L., Ollapally A. P., Balzarini J. *Biologically Important Nucleosides: A General Method for the Synthesis of Unsaturated Ketonucleosides of Uracil and its Analogs. Nucleosides and Nucleotides. 1991, 10, 431-455.*

39. Paterson J., Uriel C., Egron M. J., Herscovici J., Antonakis K., Alaoui-Jamali M. A. *Antiproliferative and apoptotic activities of ketonucleosides and keto-C-glycosides against non-small-cell lung cancer cells with intrinsic drug resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1998, 42, 779-84.*

40. Komiotis D., Tsoukala E., Manta S., Tzioumaki N., Agelis G. *Concise synthesis of 3-fluoro-5-thio-xylo- and glucopyranoses, useful precursors*

towards their corresponding pyranonucleoside derivatives. *Carbohydr Res.* 2008, 343, 1099-103.

41. Agelis G., Tzioumaki N., Botić T., Cencic A., Komiotis D. *Exomethylene pyranonucleosides: efficient synthesis and biological evaluation of 1-(2,3,4-trideoxy-2-methylene-beta-d-glycero-hex-3-enopyranosyl)thymine.* *Bioorg Med Chem.* 2007, 15, 5448-56.