



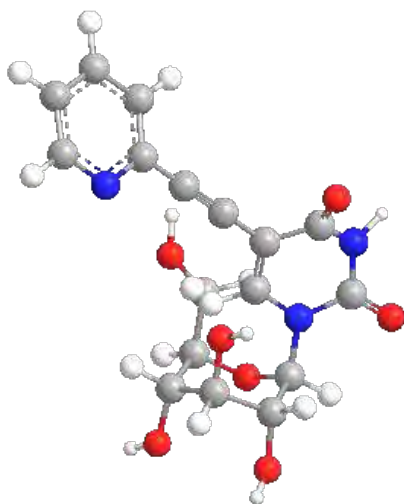
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ  
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**<<ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ  
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ>>**

**ΚΟΥΤΑΡΕΛΟΥ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ  
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Πυριδινυλο και πυριδινιμυλο γλυκοπυρανουκλεοζίτες ως  
εν δυνάμει αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.**



**ΛΑΡΙΣΑ 2013**

## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Πυριδινυλο και πυριδινιμυλο  
γλυκοπυρανονουκλεοζίτες ως εν δυνάμει αντιικοί και  
αντικαρκινικοί παράγοντες.**

**Pyridinyl and pyridiniumyl glucopyranonucleosides as  
potential antiviral and anticancer agents.**

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Κομιώτης Δημήτριος** — Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Ζίφα Αιμιλία** — Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Μπαλατσός Νικόλαος** — Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα καθηγητή τον κο Κομιώτη Δημήτριο τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το ιδιαίτερα αυτό ενδιαφέρον θέμα καθώς και για τις πολύτιμες και εποικοδομητικές υποδείξεις του.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην υποψήφια διδάκτορα κα. Δημοπούλου Αθηνά για όλα τα εφόδια που μου μεταβίβασε και χρειάστηκαν ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή καθώς και στην μεταδιδάκτορα κα. Μαντά Στυλιανή για την πολύτιμη βοήθεια της.

Τέλος, δε θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την υποδοχή και το κλίμα συνεργασίας που φρόντισαν να επικρατεί καθ' όλη τη διάρκεια.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	6
ABSTRACT	7
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	8
1.1 Υδατάνθρακες	8
1.1.1 Σχηματισμός ημιακετάλης	9-11
1.2 Νουκλεοζίτες	12-13
1.2.1 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών	13-17
1.3 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες	17-20
1.4 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες	20-22
1.5 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρα μια εξόζη	22-25
1.6 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με διακλάδωση την αιθύνυλο ομάδα	26-30
<b>2.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	30
2.1 Στόχος – Σκοπός μελέτης	30-32
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	33
3.1 Υλικά	33
3.1.1 Υλικά σύνθεσης νουκλεοζιτικών αναλόγων	33
3.2 Γενική μεθοδολογία	33
3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	33-35
3.2.2 Χρωματογραφία στήλης	35-36
3.2.3 Ξήρανση διαλυτών	36
3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων	37
3.3 Μέθοδοι	38
3.3.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού	38-39
3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης	39-40
3.3.3 Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη <b>2</b>	40-41

3.3.4	Σύνθεση των 1-(2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(2 ή -3 πυριδινυλο) της ουρακίλης <b>3a,b</b>	41-42
3.3.5	Σύνθεση των 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-πυριδινυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης <b>4a,b</b>	42-43
3.3.6	Σύνθεση των 1-(2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(N-μεθυλ πυριδινιμυλο) νουκλεοζιτών της ουρακίλης <b>5a,b</b>	44-45
3.3.7	Σύνθεση των 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)πυριδινιμυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης <b>6a,b</b>	46-47
<b>4.</b>	<b>ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ <sup>1</sup>H NMR</b>	48-49
<b>5.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	50-52
<b>6.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	53-61

## Περίληψη

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι μόρια τα οποία προκύπτουν από δομικές τροποποιήσεις των φυσικών νουκλεοζιτών που ανήκουν στην γενικότερη κατηγορία των  $\beta$ -N-γλυκοζιτών και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου και των ιογενών λοιμώξεων.

Μεγάλος αριθμός νουκλεοζιτικών αναλόγων δρουν ως αντιμεταβολίτες, ανταγωνίζονται τους φυσικούς νουκλεοζίτες και αλληλεπιδρούν με ενδοκυττάριους στόχους με σκοπό την πρόκληση της κυτταροτοξικότητας. Άλλοι πάλι ενσωματώνονται κατά την αντιγραφή ή την επιδιόρθωση του DNA, οδηγώντας έτσι στον τερματισμό της διαδικασίας σύνθεσής του ενώ άλλοι λειτουργούν ως αναστολείς της πολυμεράσης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η συνθετική πορεία νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων, με τροποποίηση στη βάση, ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί και αντιικοί παράγοντες.

Τα νέα μόρια που συντέθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας είναι τα : 2- και 3- πυριδινυλο και πυριδινιμυλο γλυκοπυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα της ουρακίλης.

## ABSTRACT

Nucleoside analogs are molecules that result from structural modifications of natural nucleosides belonging to the general class of beta-*N*-glycosides and play a key role in the treatment of cancer and viral infections. Many nucleoside analogs act as antimetabolites, natural nucleosides compete and interact with intracellular targets to cause cytotoxicity. Others incorporated during replication or repair of DNA, leading to the termination of the composition process while others function as polymerase inhibitors. This dissertation describes the new synthetic route nucleosidic analogues, bearing modifications at the base moiety, as potential anticancer and antiviral agents.

The new molecules which were synthesized in the laboratory of Organic Chemistry, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly are: 1-( $\beta$ -*D*-glucopyranosyl)-5-(2-and 3-ethynylpyridinyl)uracil **4a,b** and 1-( $\beta$ -*D*-glucopyranosyl)-5-(*N*-methyl-pyridiniumyl)uracil nucleosides **6a,b**.



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων που απαντώνται ευρέως στη φύση και είναι σημαντικοί για τη λειτουργία του σώματός μας. Αποτελούν μια ομάδα οργανικών ουσιών, που ως προς το χημικό τύπο τους, είναι ενυδατωμένος άνθρακας, με γενικό τύπο  $C_n(H_2O)_n$ . Χρησιμεύουν κυρίως σαν αποθήκες ενέργειας και σαν ενδιάμεσες ενώσεις του μεταβολισμού. Οι βιολογικής σημασίας υδατάνθρακες ονομάζονται και σάκχαρα ή ακόμα και γλυκίδια, αρχίζουν από τους μονοσακχαρίτες (π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη), και φθάνουν μέχρι σύνθετα μόρια, που λέγονται πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο και η κυτταρίνη. Έτσι μερικοί είναι σχετικά μικροί, με μοριακά βάρη μικρότερα του  $100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , ενώ άλλοι είναι πραγματικά μακρομόρια, με μοριακό βάρος πολλές εκατοντάδες ή χιλιάδες  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες υδατανθράκων βιολογικού ενδιαφέροντος:

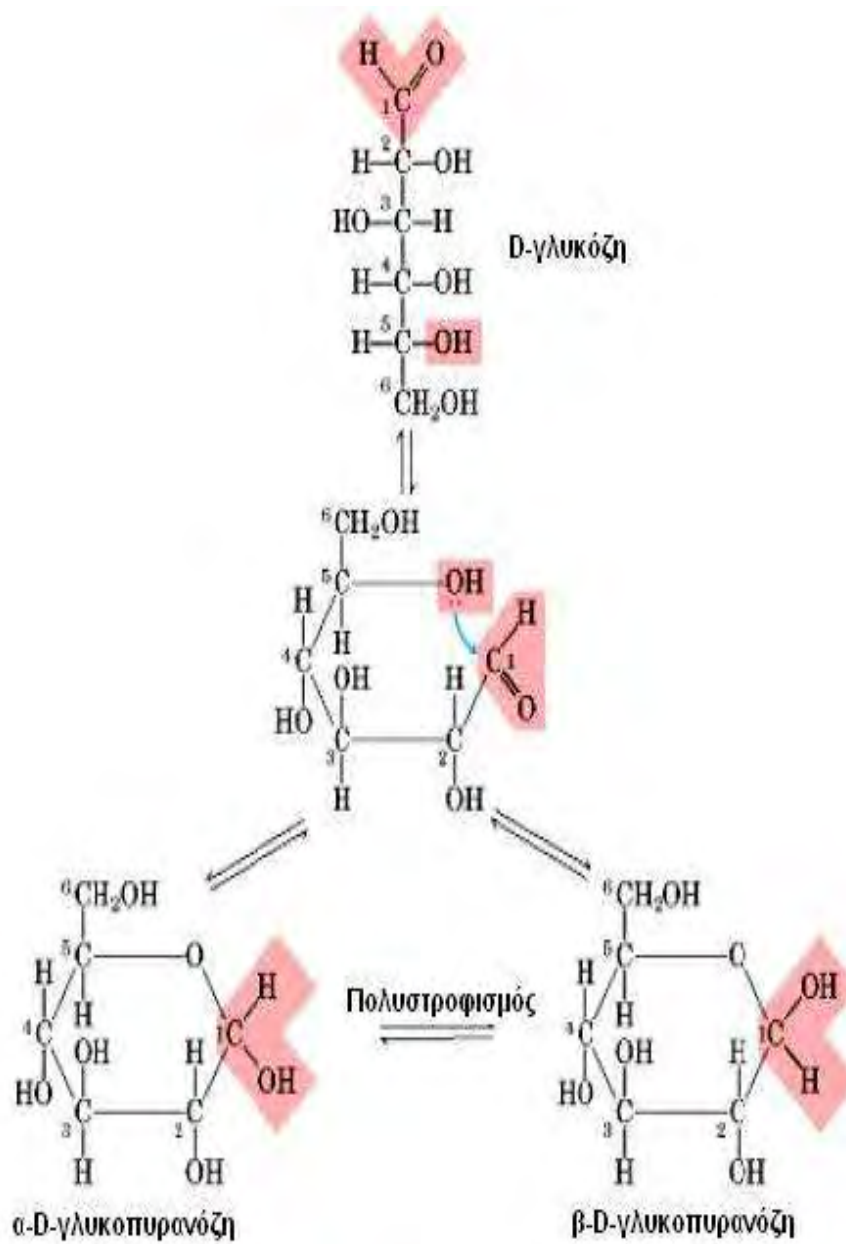
- Οι μονοσακχαρίτες, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, που είναι τα μονομερή για τη σύνθεση πολυπλοκότερων δομών.
- Οι δισακχαρίτες που αποτελούνται από δυο μονοσακχαρίτες.
- Οι ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται 2-10 μονοσακχαρίτες.
- Τέλος, οι πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη,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

Συνεπώς όλοι οι σύνθετοι υδατάνθρακες είναι δημιουργήματα από απλές μονάδες που λέγονται μονοσακχαρίτες οι οποίες δεν μπορούν να υδρολυθούν σε απλούστερη δομή. Κυριότεροι υδατάνθρακες είναι: οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη και φρουκτόζη, οι δισακχαρίτες (λακτόζη, μαλτόζη και σακχαρόζη), οι πολυσακχαρίτες (άμυλο, γλυκογόνο και κυτταρίνη) και τέλος οι ανάγοντες μονοσακχαρίτες ( ριβόζη και δεοξυριβόζη). Τα σάκχαρα κατηγοριοποιούνται αναλόγως με το μέγεθος της αλυσίδας του άνθρακα. Για παράδειγμα σε τριόζες με τρία άτομα άνθρακα, σε πεντόζες αν έχουν πέντε άτομα άνθρακα ή εξόζες αν έχουν έξι.

### 1.1.1 Σχηματισμός ημιακετάλης

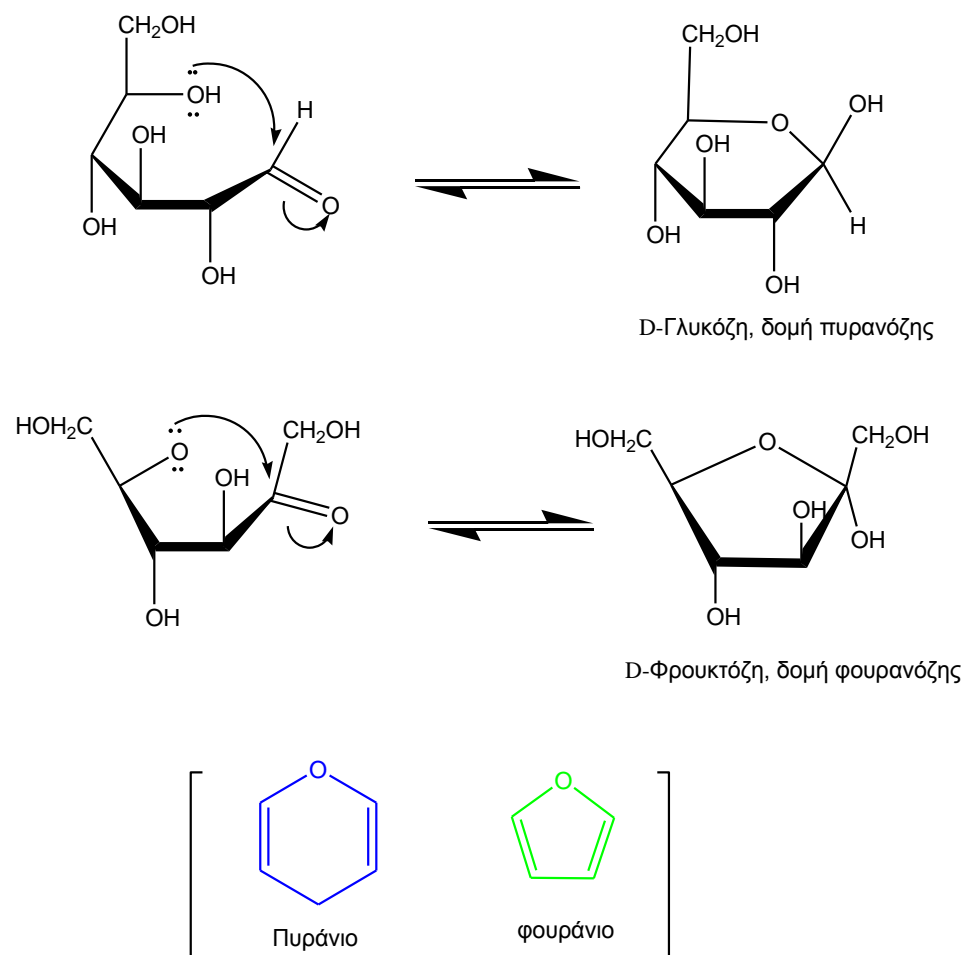
Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν σε δυο μορφές. Στη μορφή της ανοιχτής αλυσίδας και την κυκλοποιημένη τους μορφή. Η ανοιχτή αλυσίδα μπορεί να κυκλοποιηθεί όταν μια καρβονυλική ομάδα του μορίου τους αντιδρά με μια ομάδα υδροξυλίου, προς δημιουργία ημιακετάλης. Αυτή η ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη οδηγεί στην δημιουργία φουρανοζών (πενταμελείς δακτύλιοι) ή πυρανοζών (εξαμελείς δακτύλιοι).

Οι πενταμελείς και εξαμελείς ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα σε δομές ανοιχτής και κλειστής αλυσίδας. 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 ανωμέρειας (άτομο άνθρακα με τέσσερις διαφορετικούς υποκαταστάτες). Στην περίπτωση της γλυκόζης ο άνθρακας C-1 είναι ανωμερής με αποτέλεσμα να μπορούν να σχηματιστούν δυο στερεοχημικές δομές : της  $\alpha$ -D-γλυκοπυρανόζης και της  $\beta$ -D-γλυκοπυρανόζης (εικόνα 1).



**Εικόνα 1:** Κυκλοποίηση μονοσακχαρίτη μέσω αντίδρασης ημιακετάλης.

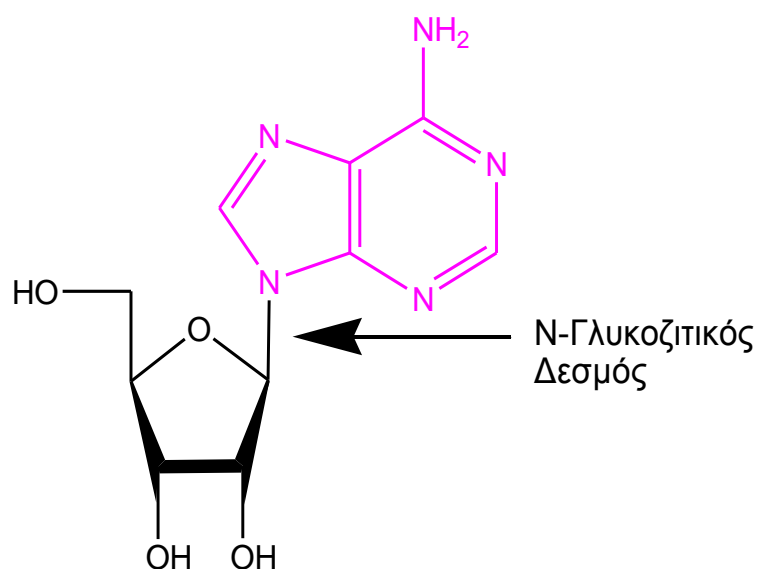
Οι κυκλικές δομές της πυρανόζης και της φουρανόζης καθώς και του πυρανίου και του φουρανίου παρατίθενται στο σχήμα 1.



**Σχήμα 1.** Κυκλικές δομές πυρανόζης και φουρανόζης.

## 1.2 Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες είναι βιομόρια που αποτελούν τους δομικούς λίθους των νουκλεικών οξέων 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  $\beta$ -*N*-γλυκοζιτικού δεσμού (Stryer L, 2001). Οι *N*-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη  $\beta$ , δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Berg J. M. *et al*, 2001) (σχήμα 2).



**Σχήμα 2.** Η  $\beta$ -στερεοδιάταξη του *N*-γλυκοζιτικού δεσμού της αδενοσίνης.

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των ιδιοτήτων τους που τα καθιστούν αντικαρκινικούς, αντιβακτηριδιακούς, αντιικούς παράγοντες, καθώς και ως αντιοξειδωτικά. Το εξαιρετικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση και μελέτη ενός μεγάλου αριθμού παραγώγων με ιδιαίτερη ποικιλομορφία.

Μια ποικιλομορφία νουκλεοζιτών που σε σχέση με τους γνωστούς στα βιολογικά συστήματα διαφοροποιούνται είτε στη βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης είτε στο φουραζονικό υπόστρωμα ή και στα δυο.

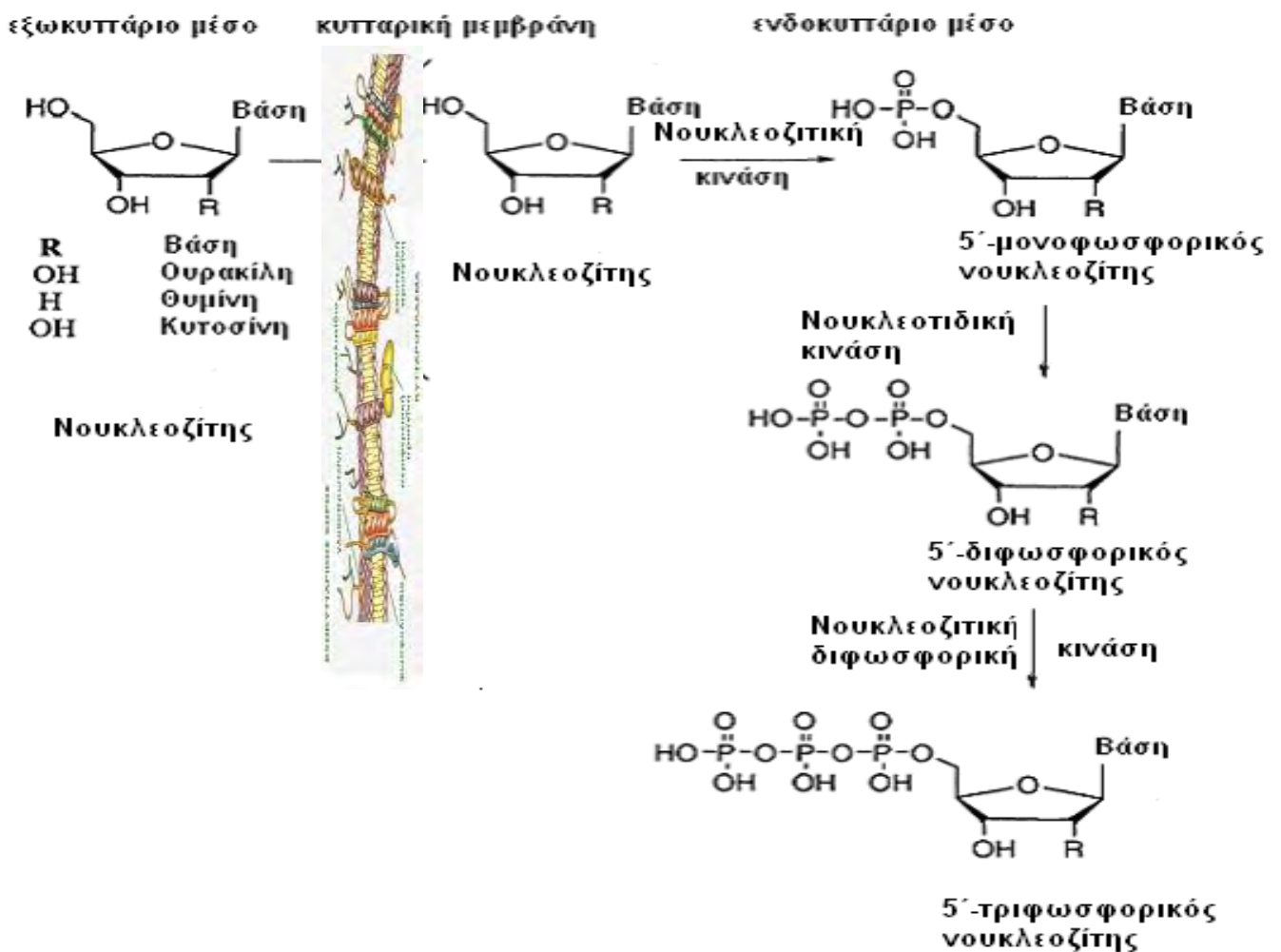
### 1.2.1 Τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών.

Η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά αλλά έχουν και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση, όπως επίσης και μέσω πρωτεϊνών μεταφορέων νουκλεοζιτών, ιδιότητες τις οποίες εκμεταλλεόμαστε στην χρήση νουκλεοζιτικών αναλόγων ως αντικαρκινικά και αντιικά φάρμακα (Zhou W. *et al*, 2004). 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 και αντιική δράση (Tsirkone V. *et al*, 2010; Lui V. W. *et al*, 2010; Somsák L. *et al*, 2008).

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.

Η φωσφορυλίωση αρχίζει με την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στην 5'-θέση του σακχάρου, η οποία καταλύεται από ειδικές ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες, προς τη δημιουργία ενός μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (Wagner C. R. *et al*, 2000, Balzarini J., 1993) (σχήμα 3). Οι μετέπειτα φωσφορυλιώσεις προς τις διφωσφορικές και τριφωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών καταλύονται από νουκλεοτιδικές κινάσες και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντιστοίχως. Η φωσφορυλίωση από

ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες όπως επίσης και η χαμηλή ικανότητα διαπερατότητας των φωσφορυλιωμένων νουκλεοζιτών οδηγούν στην συσσώρευση των φαρμακολογικά ενεργών μορφών τους, στα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό. Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, εντοπίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Μιμούμενα τους φυσικούς νουκλεοζίτες, τα αντιικά ανάλογά τους μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τις πολυμεράσες και να ενσωματωθούν στο ιικό γονιδίωμα.



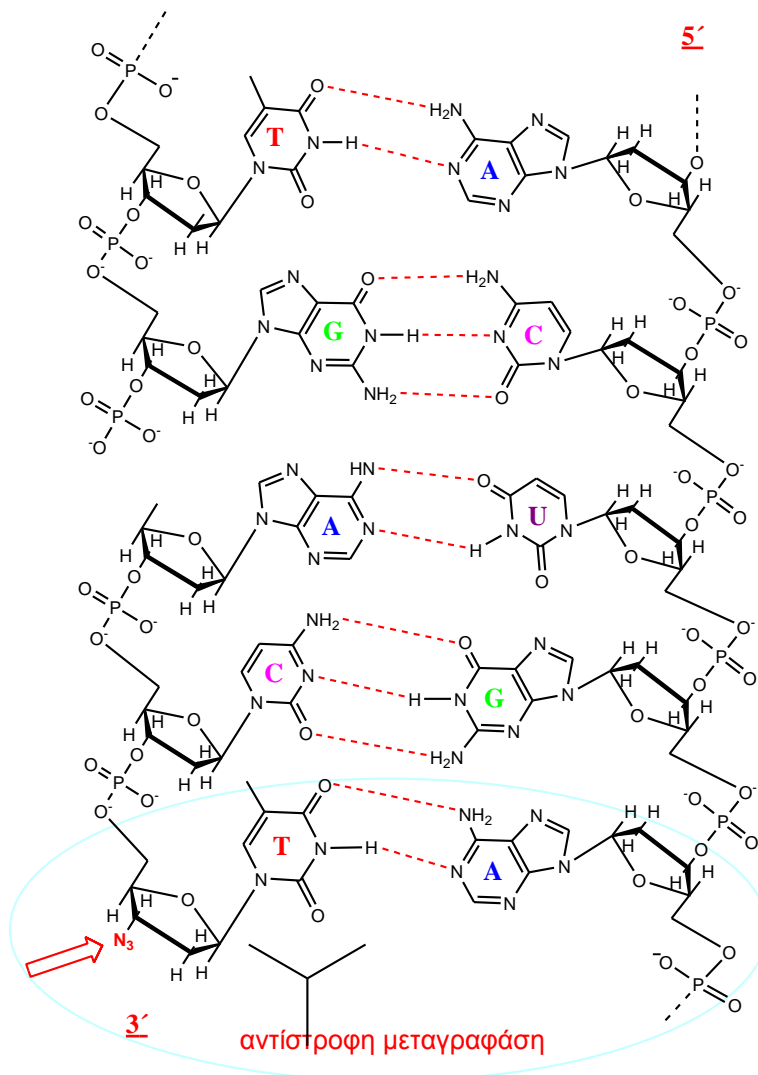
**Σχήμα 3:** Τροποποίηση των νουκλεοζιτικών αναλόγων προς την ενεργή τους μορφή μέσω ενδοκυτταρικής φωσφορυλίωσης.

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 ιικών σωματιδίων. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του γονιδιώματος του ιού είναι συντηρημένος σε πολλά είδη ιών, τα νουκλεοζιδικά ανάλογα μπορούν να παρουσιάσουν δράση έναντι μεγάλου φάσματος ιών (Chong Y. *et al*, 2002). Αξίζει να σημειωθεί πως μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιδικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιδικού αναλόγου με την ιική πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητα τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

Ένας κοινός μηχανισμός αντιικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωση των νουκλεοζιτών στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της (σχήμα 4). Η ένωση των νουκλεοτιδίων 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 B., 2003, Burns C. J. *et al*, 2005).





**Σχήμα 4**

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).

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. Ο μηχανισμός

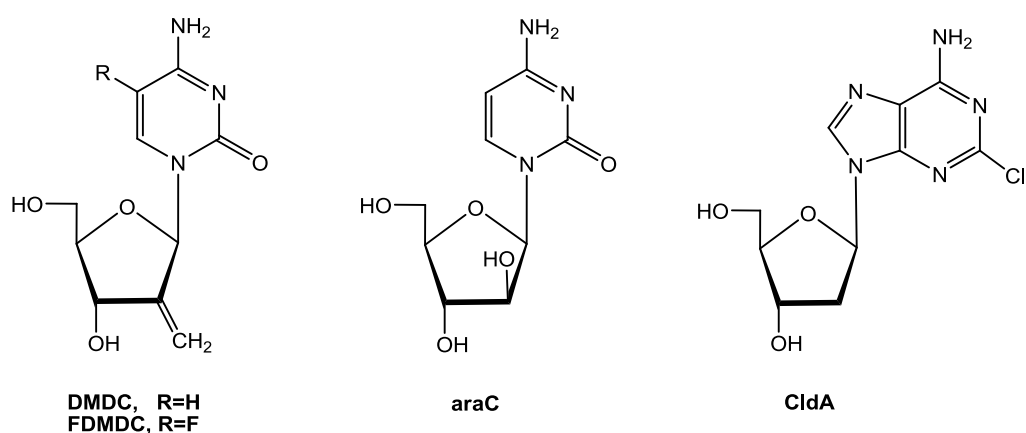
δράσης των νουκλεοζιτών, οι οποίοι δρουν ως αντιβιοτικά βασίζεται είτε στο ότι καταστρέφουν συγκεκριμένα τμήματα των βακτηρίων, όπως τη μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμά τους, είτε στο ότι επιδρούν στην σύνθεση των πρωτεϊνών (Siev M. *et al*, 1969) και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης (Ahn Y. J. *et al*, 2000).

### 1.3 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.

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. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις ρυθμίσεις αυτές, 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 ανεξέλεγκτα χωρίς να υπακούει σε περιοριστικούς κανόνες. Τα κύτταρα χάνουν τη διαφοροποιημένη μορφή τους και περνούν σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία όγκων ή καρκινωμάτων.

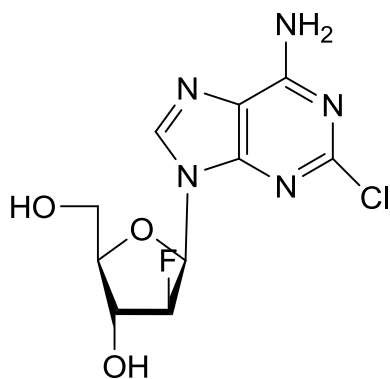
Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία διαθέτουν αυξημένη δραστηριότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Νέες αντικαρκινικές ουσίες, οι οποίες έχουν μελετηθεί εντατικά, είναι οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους. 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 (CIdA)

(εικόνα 2) 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). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui V. W. *et al*, 2010, Bhat U. G. *et al*, 2010).



**Εικόνα 2.**

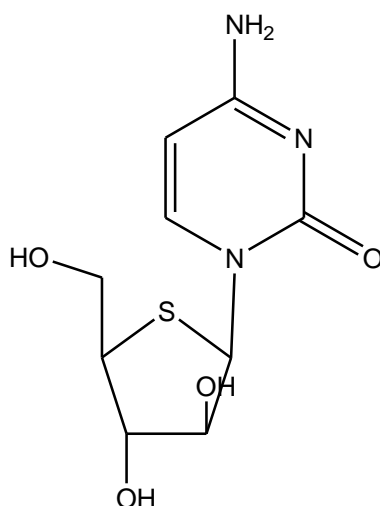
Ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο που έχει εγκριθεί για την θεραπεία της αιματολογικής κακοήθειας, της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και πιθανόν άλλων μορφών καρκίνου, όπως η οξεία μυελογενής λευχαιμία είναι το Clofarabine [2-χλωρο -(2'-δεοξυ-φθορο-β-D-αραβινοφουρανοζυλο)αδενίνη] (Faderl S. J. *et al*, 2002, Parker W. B. *et al*, 2004, Faderl S. J. *et al*, 2005, Pui C. H. *et al*, 2005, Secrist J. A., 2005),(εικόνα 3).



**Clofarabine**

### Εικόνα 3

Η ένωση 1-(4'-θειο-β-D-αραβινοφουρανοζυλο)κυτοσίνη (Thiarabine, 4'thio-araC) (Tiwari K. N. *et al*, 2000, Waud W. R. *et al*, 2003, Someya H. *et al*, 2003, Secrist J. A., 2005) (εικόνα 4), μετά το πρώτο στάδιο μελετών, βρέθηκε ότι είναι δραστική έναντι, κακοήθων όγκων, συμπεριλαμβανομένων του παχέος εντέρου, των πνευμόνων, του παγκρέατος, του νεφρού, του προστάτη καθώς και του μαστού.



**Thiarabine 4'thio-araC**

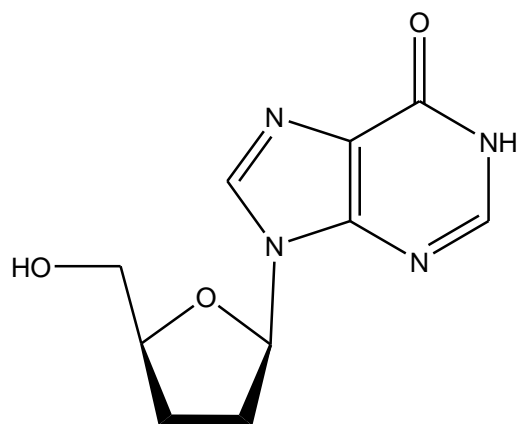
### Εικόνα 4

Μικρές μεταβολές στη δομή των νουκλεοζιτών μπορούν να έχουν βαθιά επίδραση στις αντικαρκινικές ιδιότητες των ενώσεων αυτών, και έχει υπάρξει εκτενής έρευνα σε ανάλογα νουκλεοζιτών όπως για παράδειγμα η έρευνα χημικών ενώσεων κατά του AIDS, ώστε να παραχθούν ενώσεις με βελτιωμένη δραστηριότητα.

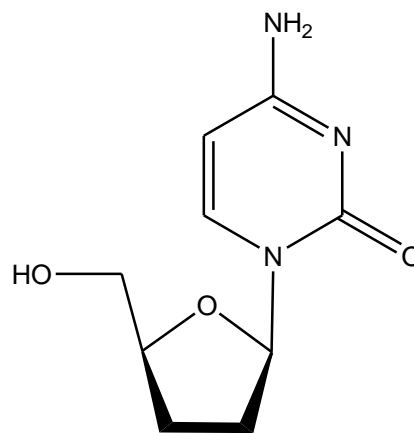
## 1.4 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρεμβάλλονται στην σύνθεση του DNA και του RNA και μπορούν να επηρεάσουν εκτός από την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων και τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων (Komiotis D. *et al*, 2008, Zhou W. *et al*, 2004, Perigaund C. *et al*, 1993). Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, στηρίζεται στην ικανότητά αλληλεπίδρασης με τις ιικές πολυμεράσες. Οι αντιικοί νουκλεοζίτες αποτελούν θεμελιώδη λίθο στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τον ιό του απλού έρπητα (HSV), τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV), τον ιό του έρπη ζωστήρα (VZV), τον ιό της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV) και τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και C (HCV).

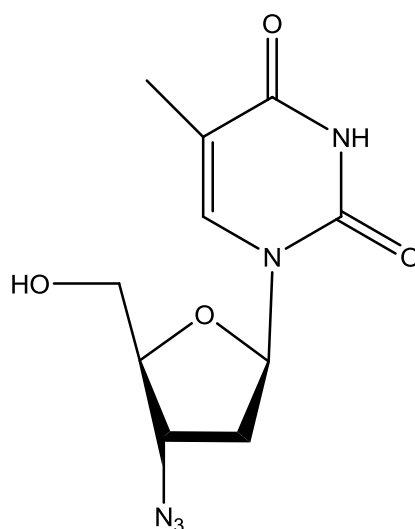
Μερικά χαρακτηριστικά νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα κατά του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) είναι το Zidovudine (AZT) 3-αζιδο-3' δεσοξυθυμιδίνη, το Didanosine (DDI) 2'-3' διδεοξυιουσίνη, το Zalcitabine (DDC) 2'-3' διδεοξυκυτιδίνη και το 2'-3' διδεσοξυ-3'-θειακυτιδίνη 3TC, που δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού (σχήμα 5).



**Didanosine (DDI)**



**Zalcidabine (DDC)**

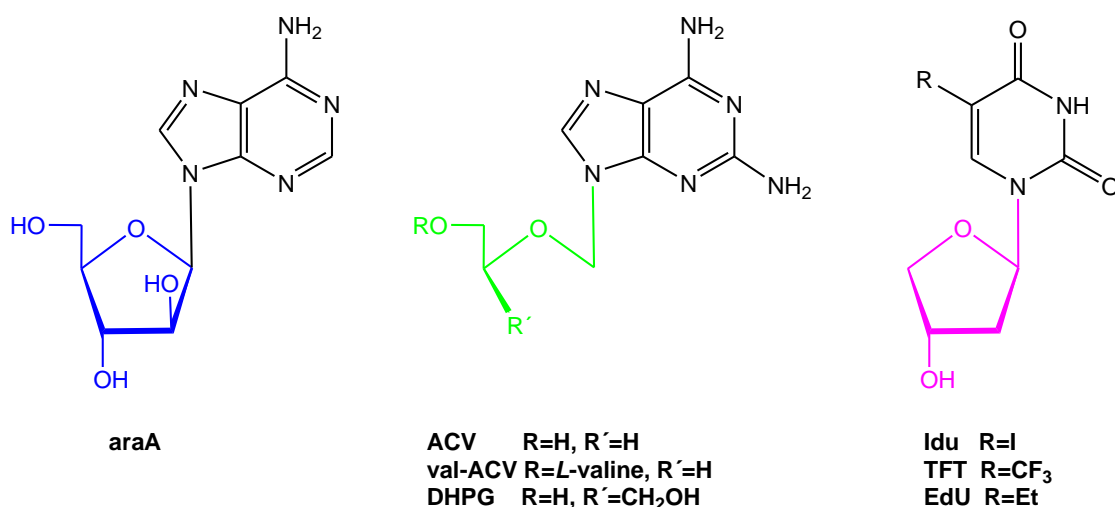


**Zidovudine (AZT)**

## Σχήμα 5

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 6), τα οποία δρουν ως αναστολείς της DNA πολυμεράσης.



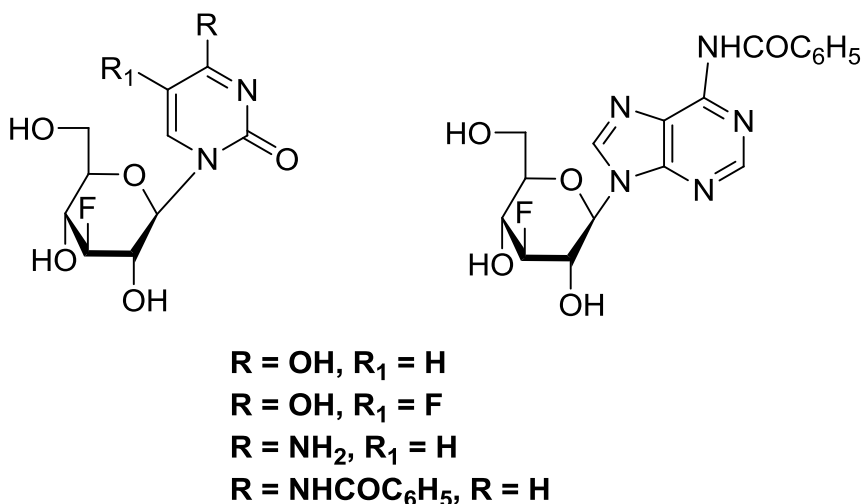
Σχήμα 6

## 1.5 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν κυρίως στη χρήση νουκλεοζιτικών αναλόγων που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη και φέρουν τη β-απεικόνιση. Η σπουδαιότητα των πεντοζών αναγνωρίστηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως συστατικά των νουκλεϊκών οξέων. Όμως, ορισμένα προβλήματα που προέκυψαν από τη χρήση των φουρανουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως ο ανεπαρκής μεταβολισμός προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, η χημική ή ενζυματική απενεργοποίησή τους, η τοξικότητα, η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και όγκων και τέλος ο μικρός χρόνος ημιζωής και κατά συνέπεια χρόνος δράσης τους, έστρεψαν το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντιικής δράσης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων και ειδικότερα αυτών που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη. 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.

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) (εικόνα 5). Τα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα 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).



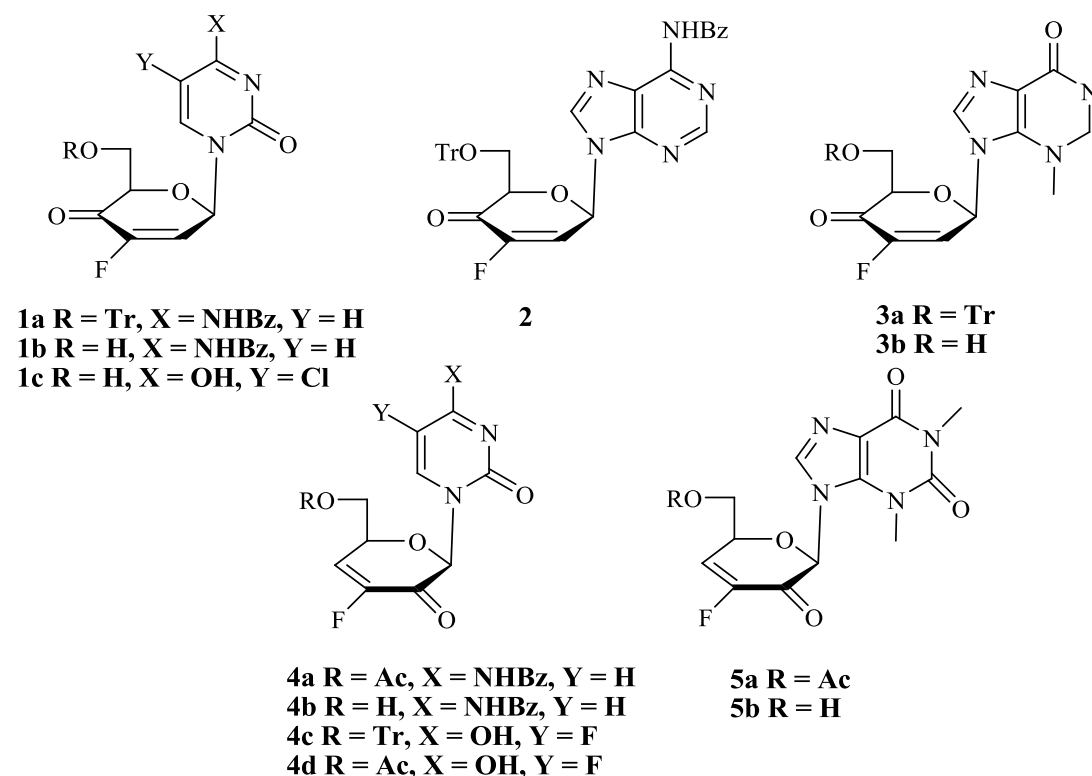
### Εικόνα 5

Ακόμη, 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 μύες και το ήπαρ, ρυθμίζεται αλλοστερικά από φωσφορυλίωση και είναι παρούσα σε δυο μορφές, την GPb (ανενεργός, T-διαμόρφωση) και την GPa (ενεργός, R-διαμόρφωση). Η λεπτομερής ανάλυση των παραγόντων που καθορίζουν τη σύνδεση μικρομοριακών ενώσεων (αναστολέων) στη GP σε μοριακό επίπεδο, παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της ενζυμικής τους δράσης ή και της ανεπιθύμητης αποικοδόμησης γλυκογόνου, στο σακχαρώδη διαβήτη



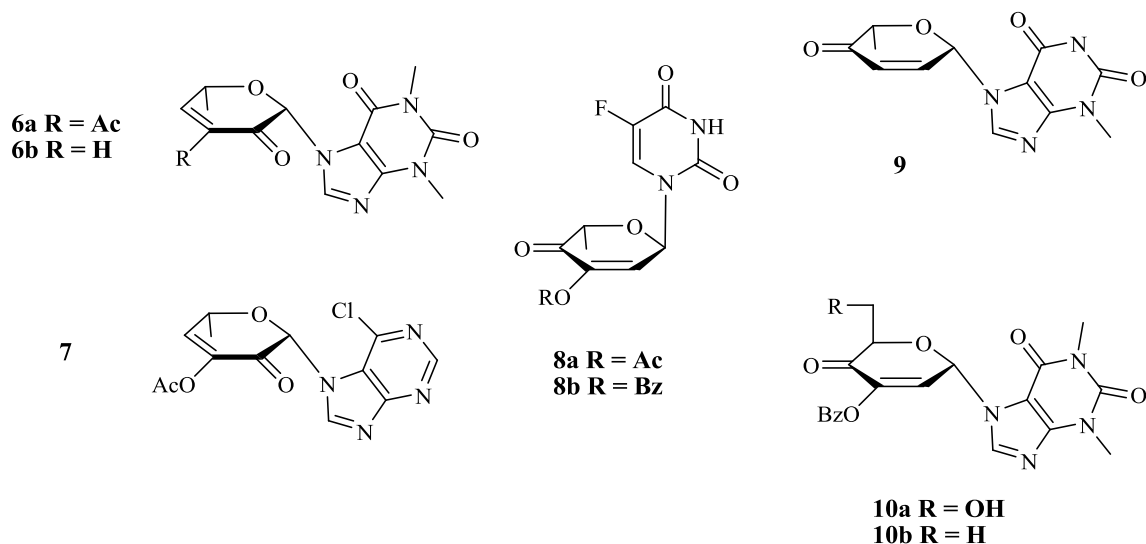
τύπου 2, όπου η υπεργλυκαιμία αποτελεί σοβαρό ιατρικό πρόβλημα. Συγκεκριμένα, φθοριωμένοι πυριμιδινικοί γλυκοπυρανονουκλεοζίτες καθώς και ένα φθοριωμένο δεοξυ-πυρανονουκλεοζιτικό ανάλογο της *N*<sup>4</sup>-βενζοϋλοκυτοσίνης αποδείχθηκαν ανταγωνιστικοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του μυϊκού γλυκογόνου (GPb) (Tsirkone V. *et al*, 2010).

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί 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 S. *et al*, 2007) καθώς και άλλοι ανάλογοι πυρανονουκλεοζίτες (Leclercq E. *et al*, 1992, Khan A. R. *et al*, 2001, Ollapally A. P. *et al*, 1999, Egron M. J. *et al*, 2002) έχουν αξιολογηθεί για τις αντιικές και τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες (ενώσεις 1-5, εικόνα 6). Αξιοσημείωτη είναι η αντιική δράση έναντι του εντεροϊού (rotavirus), που επέδειξαν οι ενώσεις 1a,b, 2 και 4a,b (εικόνα 6).



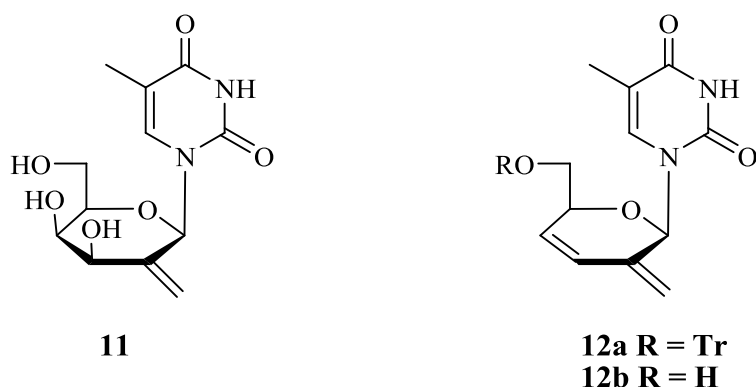
**Εικόνα 6**

Επιπρόσθετα, ακόρεστα κετοπυρανονουκλεοζιδικά ανάλογα παρουσίασαν, σε προηγούμενες μελέτες, σημαντική ανασταλτική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων *in vitro* αλλά και *in vivo* (Komiotis D. *et al*, 1991, Paterson J. *et al*, 1998, Komiotis D. *et al*, 2008). Η χημική δομή των συγκεκριμένων ενώσεων **6-10** φαίνεται στην (εικόνα 7).



**Εικόνα 7**

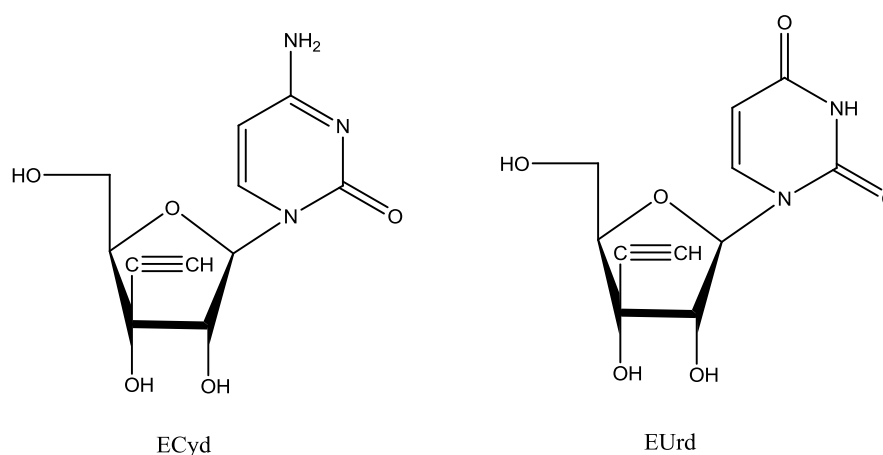
Το ερευνητικό ενδιαφέρον του εργαστηρίου στράφηκε και στη σύνθεση μιας νέας ενδιαφέρουσας σειράς εξομεθυλενικών και ακόρεστων εξομεθυλενικών πυρανονουκλεοζιτών (Agelis G. *et al*, 2007), οι οποίοι επίσης παρουσίασαν σημαντική αντιική δράση έναντι του εντεροϊού ενώσεις **11** και **12a**, (εικόνα 8).



**Εικόνα 8**

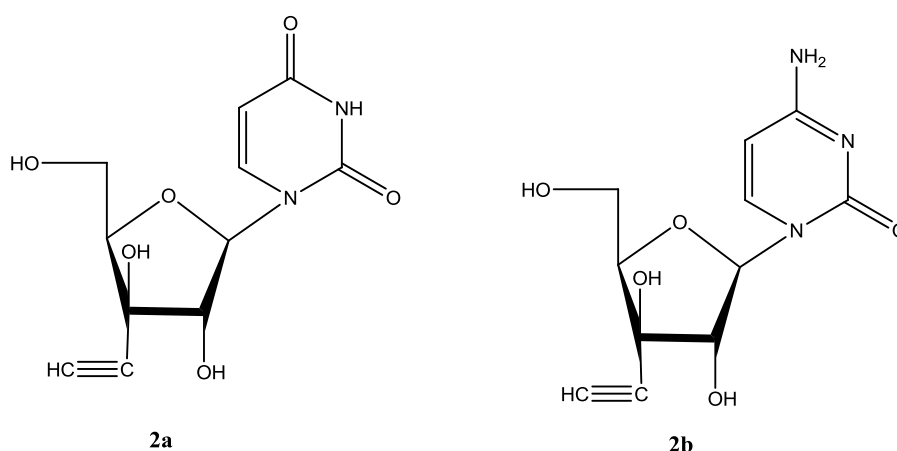
## 1.6 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με διακλάδωση την αιθύνυλο ομάδα.

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 7) που φέρουν αιθύνυλο ομάδα ως διακλαδισμένη αλυσίδα στο τμήμα του σακχάρου εμφανίζουν εξαιρετικές αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι 1-(3-C-ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine ECyd και 1-(3-C-ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl)uracil 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 7. Χημικές δομές της ECyd και EUrd

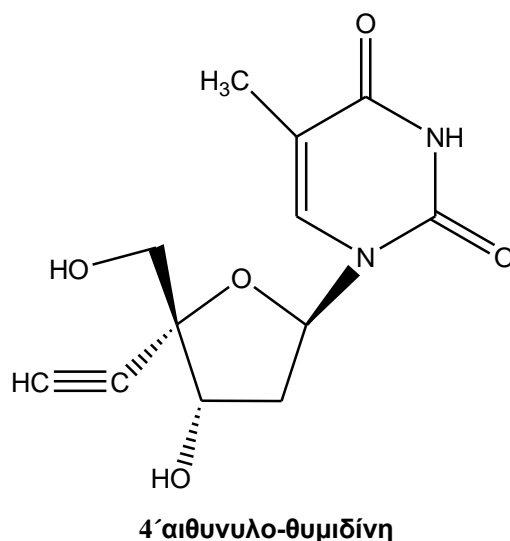
Μελετήθηκε επιπλέον η σχέση μεταξύ δομής και λειτουργίας των ECyd και EUrd (Hattori H. *et al*, 1998). Έπειτα, συντέθηκαν οι 1-(3'-C-αιθυνυλο-β-D-ξυλο-πεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη και ουρακίλη, οι οποίες είναι 3' επιμερή των ECyd και EUrd (σχήμα 8). Η βιολογική δράση αυτών των ξύλο παραγώγων ήταν σημαντικά 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 8.** 3' επιμερή των ECyd και EUrd

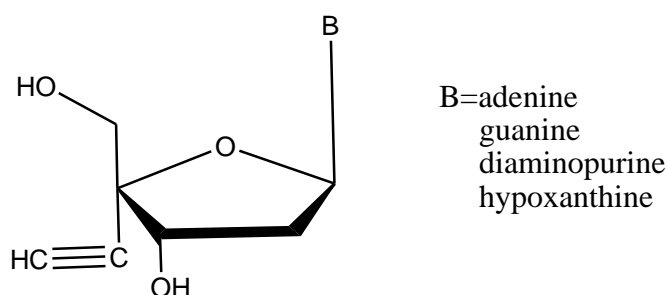
Όσον αφορά το μεταβολισμό της, η ECyd φωσφορυλιώνεται στα κύτταρα προς το μονοφωσφορικό, διφωσφορικό και τελικά τριφωσφορικό της παράγωγο (Nomura M. *et al*, 2003). Το πρώτο βήμα από την ECyd στην 1-(3-C-ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine monophosphato (ECMP) καταλύεται από την ουριδινική/κυτιδινική 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 9) (O-Yang C. *et al*, 1992 και Kodama E. N. *et al*, 2001).



**Σχήμα 9.** Δομή 4' - υποκατεστημένων νουκλεοζιτών της θυμίνης

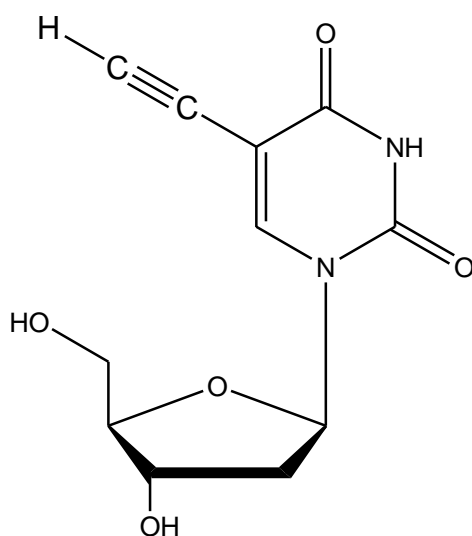
Οι πουρίνο 2'-δεοξυ νουκλεοζίτες που διαθέτουν μια αιθύνυλο ομάδα στον 4' άνθρακα του σακχάρου, εμφανίζουν επίσης πολύ ισχυρή αντί-HIV δράση, παραμένοντας ενεργοί απέναντι σε ανθεκτικά στελέχη του HIV (Kongo S. *et al*, 2003). Η δομή του νουκλεοζίτη απεικονίζεται στο (σχήμα 10).



**Σχήμα 10.** Δομή του αιθύνυλο πούρινο 2'-δεοξυ νουκλεοζίτη.

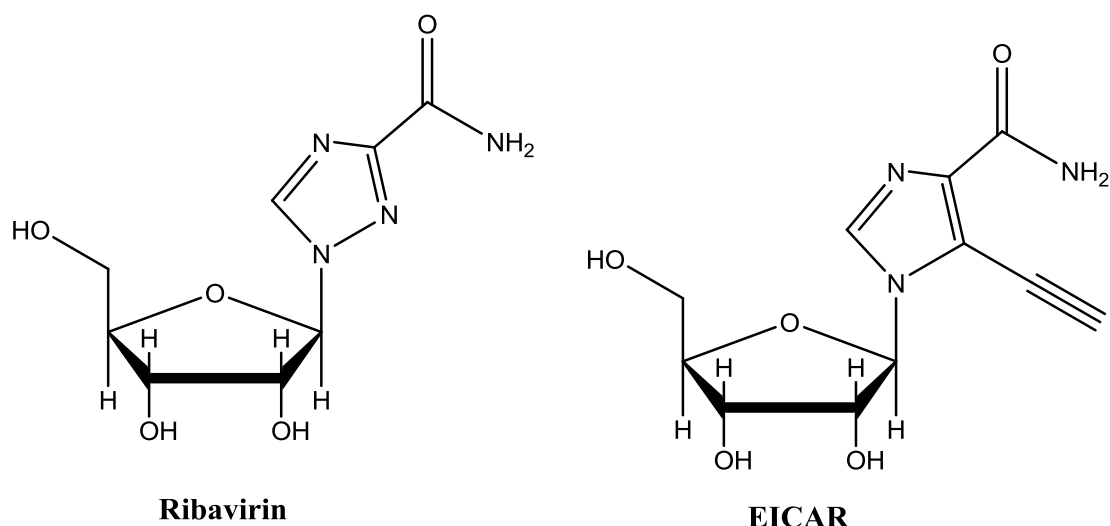
Η παρουσία της αιθύνυλο ομάδας στην ετεροκυκλική βάση οδήγησε επίσης σε νουκλεοζίτες με έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Η 5-αιθύνυλο-2'-δεοξυ ουριδίνη (σχήμα 11), παρουσίασε αυξημένη δράση έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών του ανθρώπινου μαστού MCF-7 και MDA-MB-

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



**Σχήμα 11.** Χημική δομή της 5-αιθυνυλο-2'-δεοξυ ουριδίνη.

Επιπλέον το 5-αιθυνυλο-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 12) απεικονίζονται οι δομές των Ribavirin και EICAR.



**Σχήμα 12.** Χημικές δομές του Ribavirin και EICAR.

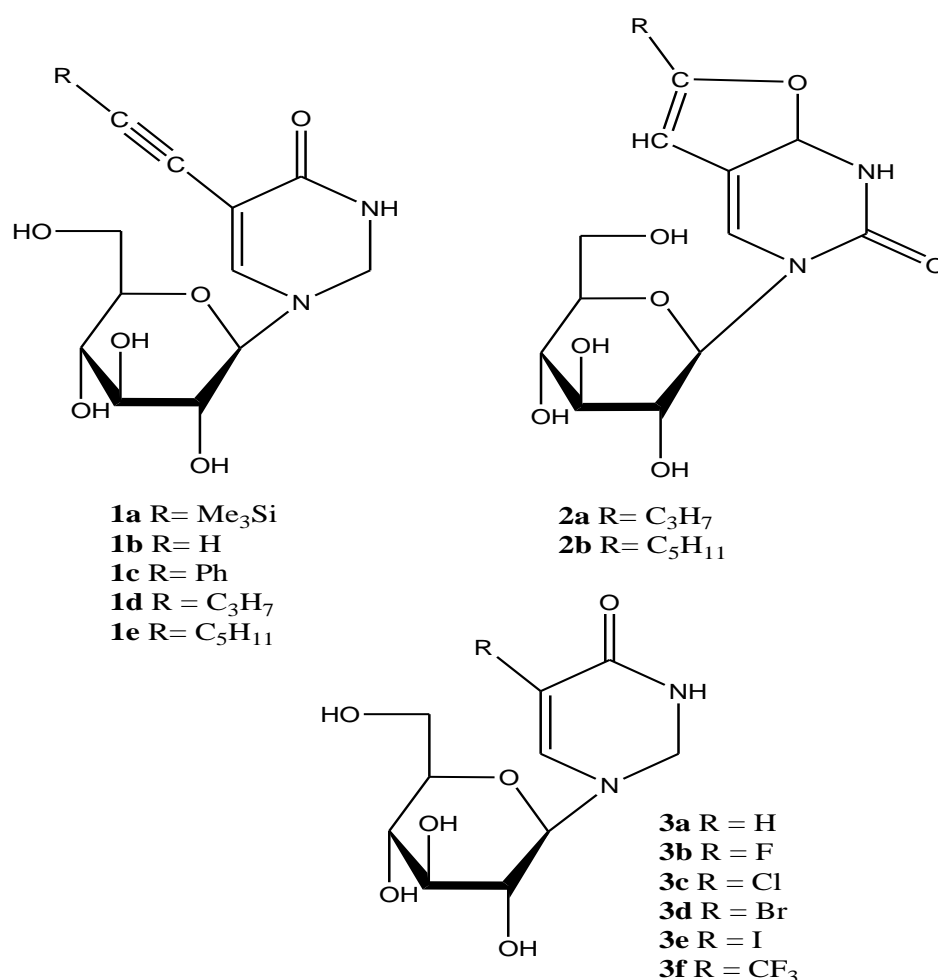
## 2.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Στόχος-Σκοπός μελέτης

Η ανάγκη για την εύρεση νέων χημειοθεραπευτικών ουσιών, με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες καθώς και η ραγδαία και συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά, πληθώρας φαρμάκων που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο.

Εκτεταμένες μετατροπές έχουν γίνει τόσο στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης όσο και στο τμήμα του σακχάρου για την εύρεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με καλύτερη βιολογική δράση. Όπως ήδη αναφέραμε από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία έτη, νέες τάξεις φούρανο-νουκλεοζιτών με τροποποιημένη βάση, όπως 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-αλογόνο- και C5-αλκύνυλο-γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης, (σχήμα 13) οι οποίοι αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Επιπλέον οι C5-αλκύνυλο-γλυκοπυρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης, έχουν επιδείξει αξιόλογη ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών και συγκεκριμένα ο νουκλεοζίτης που φέρει φαινολικό δακτύλιο στην 5-θέση της ουρακίλης αποδείχτηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικός έναντι της ανάπτυξης καρκινικών κυτταρικών σειρών L1210, CEM, HeLa σε τιμές IC<sub>50</sub> που κυμαίνονται στα 5-6 μM.



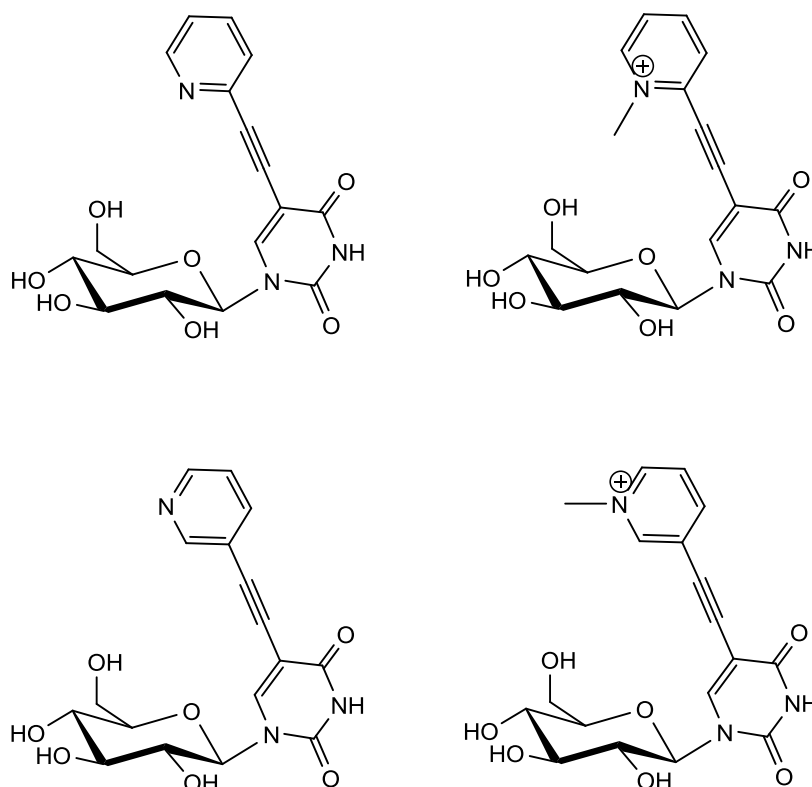
**Σχήμα 13**

Με βάση τις αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες των ανωτέρω ενώσεων, θεωρήσαμε ενδιαφέρουσα την εισαγωγή ενός ετεροατόμου, και ειδικότερα ενός αζώτου, στο φαινολικό δακτύλιο, με στόχο την εύρεση νέων



αποτελεσματικότερων θεραπευτικών αναλόγων. Συνεπώς, στην παρούσα εργασία περιγράφεται η σύνθεση και η βιολογική αποτίμηση των πυριδινυλο γλυκοπυρανονουκλεοζιτών καθώς και των αναλόγων τους που φέρουν την τεταρτοταγή κατιονική μορφή, των πυριδινιμυλο γλυκοπυρανονουκλεοζιτών. Συγκεκριμένα, τα τελευταία μόρια θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως δέκτες ηλεκτρονίων όταν ενσωματωθούν σε διμερή DNA μόρια.

Η δομή των μορίων που στόχευσαν οι συνθετικές μας πορείες παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα:



## 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 Υλικά

#### 3.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιδικών αναλόγων

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

- Οξικός ανυδρίτης ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) (Aldrich, Γερμανία)
- Πυριδίνη (Panreac, Ισπανία)
- Διάλυμα Μεθανόλης ( $\text{MeOH}$ ) (Merck, Γερμανία)
- Hexamethyldisilazane (HMDS) (Aldrich, Γερμανία)
- Trimethylsilyltrifluoromethane ( $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ ) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Υδρίδιο του ασβεστίου ( $\text{CaH}$ ) (Fluca, Γερμανία)
- Ακετονιτρίλιο ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (Merck, Γερμανία)
- Πεντοξείδιο του φωσφόρου ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Merck, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bisulfate ( $\text{NaHSO}_4$ ) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδρο θειικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (Merck, Γερμανία)

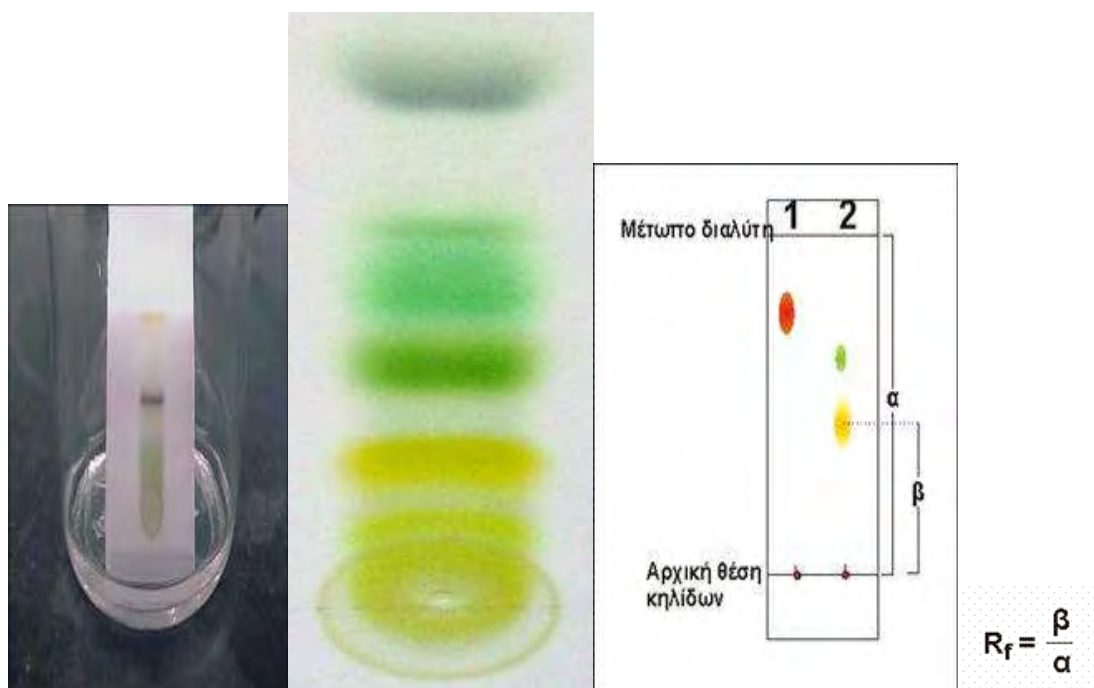
### 3.2 Γενική Μεθοδολογία

#### 3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου λεπτής στιβάδας TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F<sub>24</sub>) πάχους 0.2mm.

Το διάλυμα του υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς θαλάμου στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Ακολουθώς ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Ύστερα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε μορίου στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης  $R_f$ , που ορίζεται από το λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση ( $\beta$ ) προς την απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη ( $\alpha$ ). Η τιμή  $R_f$  ενός συγκεκριμένου μορίου χρησιμεύει για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας. 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%.

Μια χρωματογραφία λεπτής στιβάδας απεικονίζεται στην εικόνα 9.



**Εικόνα 9**

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

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 70/30
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 60/40
- Διάλυμα Γ : οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 80/20
- Διάλυμα Δ : διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 70/30
- Διάλυμα Ε : μεθανόλη 100

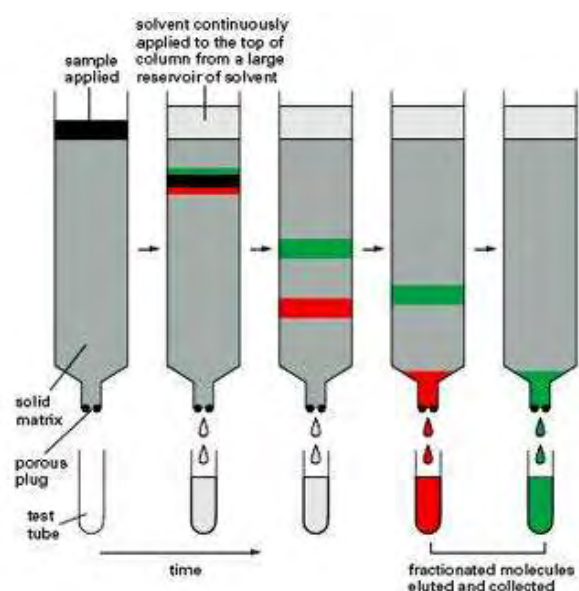
### 3.2.2 Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί αυτό είναι η χρωματογραφία στήλης και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merck grade).

Η χρωματογραφία στήλης είναι μια τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην προσρόφηση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μια ακίνητη φάση, συνήθως silica gel και την έκλουσή τους με μια ακίνητη φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών. Οι πολικές ουσίες προσροφούνται και κολλούν στην αφετηρία, κορυφή, της στήλης και χρειάζονται πιο πολικό διαλύτη για να προχωρήσουν. Οι άπολες ουσίες συνήθως προχωρούν ή κατεβαίνουν πιο εύκολα ακόμη και με διαλύτες χαμηλής πολικότητας. Για την έκλουση των ουσιών από το silica gel χρειάζεται να γίνει έκλουση της στήλης με διάφορους διαλύτες αρχίζοντας από τους λιγότερο πολικούς και καταλήγοντας στους περισσότερο πολικούς.

Στη χρωματογραφία στήλης η στατική φάση τοποθετείται σε μια στήλη κατασκευασμένη από αδρανές υλικό ( ύαλος, πηκτική πυριτίδας, ανοξειδωτος χάλυβας). Το δείγμα τοποθετείται στην αρχή (κορυφή) της στήλης και η κινητή φάση διέρχεται εξαναγκασμένα μέσω της στατικής φάσης με την εφαρμογή πίεσης σε αυτήν ή λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος

μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από την συγγένεια των συστατικών ως προς την στατική φάση (εικόνα 10).



Εικόνα 10

### 3.2.3 Ξήρανση διαλυτών

Ορισμένες από τις αντιδράσεις που περιγράφονται, επιβάλλουν την χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο  $\text{CH}_3\text{CN}$  και *N,N*-διμέθυλοφορμαμίδιο DMF. Η ξήρανση του  $\text{CH}_3\text{CN}$  γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το DMF φυλάσσεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å.

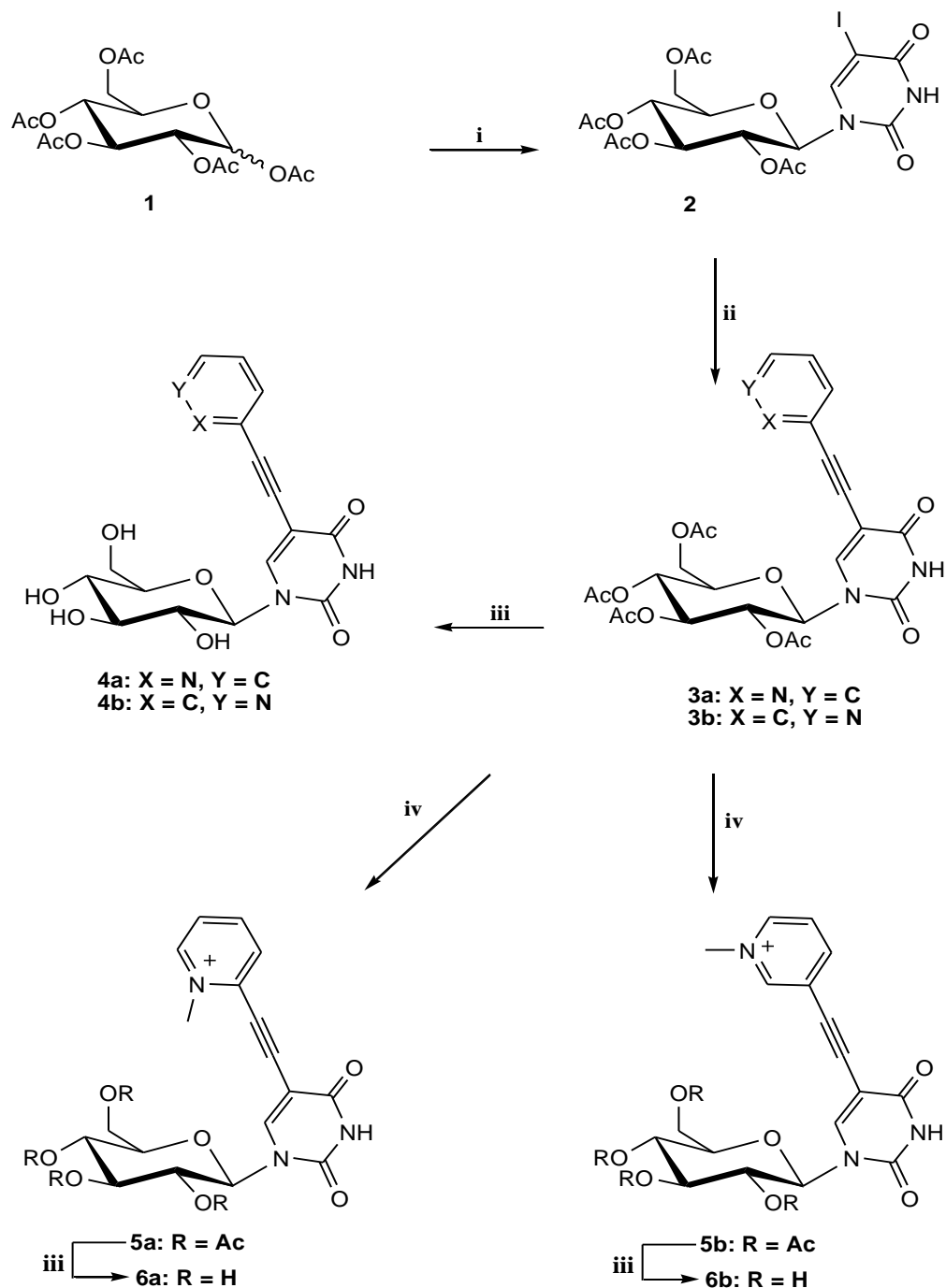
### 3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR μετρήθηκαν με το φωτόμετρο Bruker 300 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ) και διμεθυλοσουλφοξείδιο ( $\text{DMSO}-d_6$ ). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς. Η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (doublet), dd (doublet doublet), dt (doublet triplet), m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός NMR, είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο NMR, άλλοι, οι λιγότεροι όχι. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανακλώνται στην ιδιότητα του σπίν. Στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη, για την μελέτη των χημικών, φυσικών και βιολογικών ιδιοτήτων της.

### 3.3 Μέθοδοι

#### 3.3.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού.



**Σχήμα 14.** Επισκόπηση της σύνθεσης των πυριδινυλο και πυριδινιμυλο γλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης.

Αντιδραστήρια και συνθήκες: i) silylated base, Me<sub>3</sub>SiOSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, HMDS, Saccharine, MW (120 Watt), 5 min; ii) 2-or 3-ethynyl pyridine, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Et<sub>3</sub>N, DMF, MW, (120 Watt), 3 min; iii) ammonia/MeOH; iv) CH<sub>3</sub>I, CH<sub>3</sub>CN.

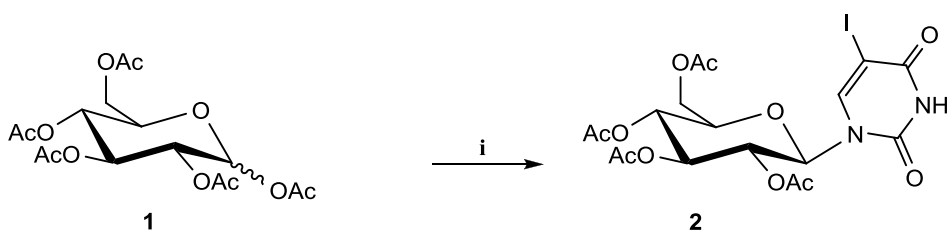
### 3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης.

Η πορεία της σύνθεσης ξεκίνησε με την σύζευξη της εμπορικά διαθέσιμης 1',2',3',4',6'-πεντε-*O*-ακετυλο-*D*-γλυκοπυρανόζης (**1**), με την ετεροκυκλική βάση 5-ιωδοουρακίλη, παρουσία του άνυδρου διαλύτη ακετονιτριλίου (CH<sub>3</sub>CN), εξαμεθυλοδισιλαζάνιου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης και με την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα (Me<sub>3</sub>SiOSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων σε συνθήκες 120 Watt για 5 λεπτά . Έτσι λήφθηκε ο προστατευμένος νουκλεοζίτης 1-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (**2**) με ικανοποιητική απόδοση 83%. Στη συνέχεια ο προστατευμένος νουκλεοζίτης 1-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (**2**) διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF), και με την προσθήκη καταλύτη τετρακίς τρις φαινυλοφωσφορικό παλλαδίο Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, συγκαταλύτη ιωδοχαλκό (CuI), της βάσης τριαιθυλαμίνης (Et<sub>3</sub>N) και του 2- ή 3-αιθύνυλο πυριδίνης πραγματοποιήθηκε η σύζευξη τους υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων σε συνθήκες 120 Watt για 3 λεπτά λαμβάνοντας τους προστατευμένους νουκλεοζίτες 1-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(2 ή -3- πυριδινυλο) της ουρακίλης **3a,b** με απόδοση 65% και 62%, αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολουθεί η μετατροπή των 1-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(2 ή -3- πυριδινυλο) νουκλεοζιτών της ουρακίλης **3a,b** στην τεταρτοταγή τους κατιονική δομή με την προσθήκη του ιωδομεθανίου (CH<sub>3</sub>I), παρουσία άνυδρου διαλύτη ακετονιτριλίου (CH<sub>3</sub>CN), υπό αναβρασμό με κάθετο ψυκτήρα, λαμβάνοντας τους προστατευμένους 1-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-(*N*-μεθυλ- πυριδινιμυλο) νουκλεοζιτών της ουρακίλης **5a,b** με απόδοση 64–66%. Το τελευταίο βήμα της πορείας



αυτής είναι η απακετυλίωση των ενώσεων **3a,b** και **5a,b** με κορεσμένο διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας, η οποία οδήγησε στην σύνθεση των αποπροστατευμένων ενώσεων 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-πυριδινυλο και πυριδινυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης **4a,b** και **6a,b** με απόδοση 65%–68%.

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



Η σύνθεση του **2** επιτεύχθηκε με τη μέθοδο των μικροκυμάτων ως εξής. Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml διαλύονται σε 12.8 ml άνυδρου διαλύτη ακετονιτρίλιο ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), η 1',2',3',4',6'-πεντε-O-ακετυλο-D-γλυκοπυρανόζη (**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  $\text{NaHCO}_3$  και αραιώθηκε με διχλωρομεθάνιο  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200ml). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο θειικό νάτριο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα B (οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 6:4). Το επιθυμητό προϊόν (**2**) (830mg) ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος με ικανοποιητική απόδοση 83%.

TLC(Διάλυμα Β) EtAc/Hex 6:4	R <sub>f</sub> = 0.18
Απόδοση	83%
[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup>	-3.0 c = 0.11
λ <sub>max</sub>	270 nm

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

### 3.3.4 Σύνθεση των 1-(2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(2 ή -3- πυριδινυλο) της ουρακίλης **3a,b**.



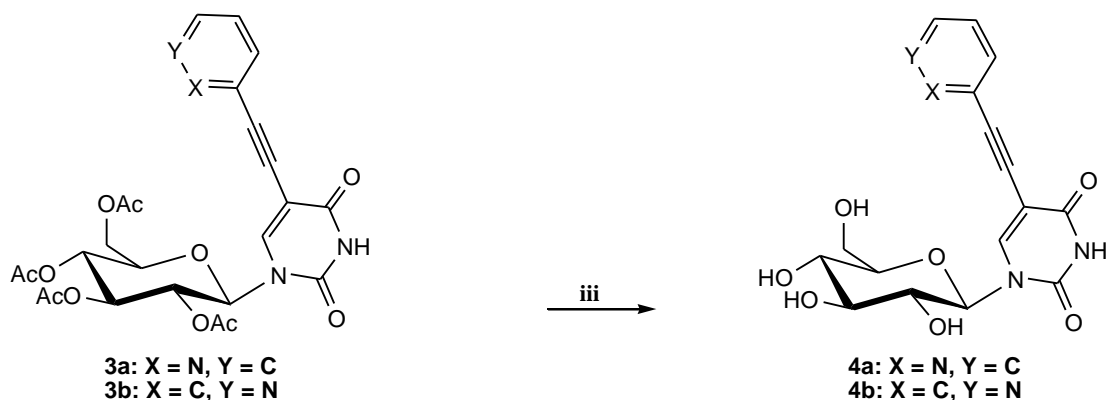
Η σύνθεση του **3a,b** επιτεύχθηκε με τη μέθοδο των μικροκυμάτων ως εξής. Σε σφαιρική φιάλη των 10 ml διαλύονται σε 2 ml άνυδρου διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF), 0.4 mmol (0.25 g) της 1-(2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλης (**2**), 1.2 mmol του 2- or 3-ethynyl pyridine, 0.02 mmol Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 0.04 mmol CuI, 0.8 mmol Et<sub>3</sub>N και εν συνεχεία ακτινοβολούνται σε συνθήκες 120 Watt, για 3 λεπτά. Η επεξεργασία που ακολουθείται για την παραλαβή του προϊόντος περιλαμβάνει καθαρισμό του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης τα διαλύματα: A (οξικός αιθυλεστέρας/Εξάνιο 7:3) και B (οξικός αιθυλεστέρας/Εξάνιο 6:4) αντίστοιχα. Τα επιθυμητά προϊόντα (**3a,b**)

ελήφθησαν υπό τη μορφή αφρώδους στερεού κίτρινου χρώματος με απόδοση 65% και 62% αντίστοιχα.

	Προϊόν <b>3a</b>	Προϊόν <b>3b</b>
TLC	R <sub>f</sub> = 0.24 (Διάλυμα A) EtOAc/Hex 7:3	R <sub>f</sub> = 0.23 (Διάλυμα B) EtOAc/Hex 6:4
Απόδοση	65%	62%
[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup>	-2.0 c = 0.13	-4.0 c = 0.14
λ <sub>max</sub>	310 nm	306 nm

**Πίνακας 2.** Αποτελέσματα σύνθεσης των 1-(2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(-2 ή -3- πυριδινυλο) της ουρακίλης **3a,b**.

### 3.3.5 Σύνθεση των 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-πυριδινυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης **4a,b**.

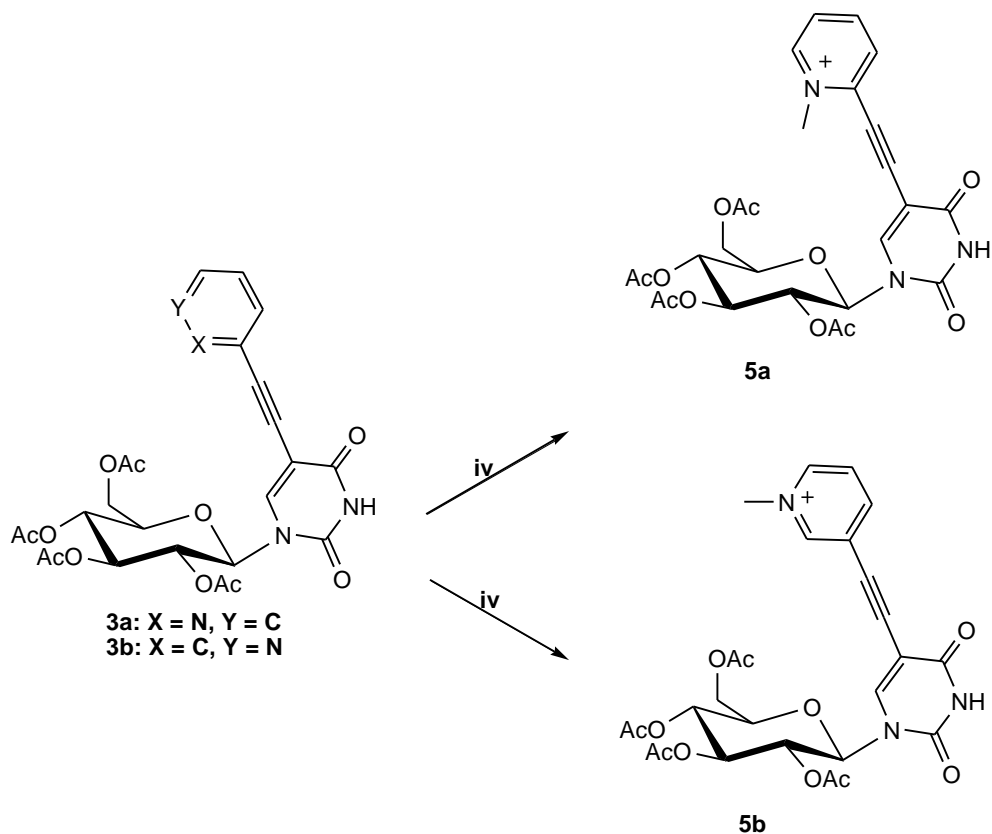


Διάλυμα των προστατευμένων νουκλεοζιτών **3a,b** (0.9 mmol) σε μεθανολική αμμωνία αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 12h ώρες. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες καθαρίζονται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Γ (οξικός αιθυλεστέρας/μεθανόλη 8:2), οπότε παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα **4a,b** με απόδοση 67% και 65% αντίστοιχα, με μορφή ελαίου κίτρινου χρώματος.

	Προϊόν <b>4a</b>	Προϊόν <b>4b</b>
TLC	R <sub>f</sub> = 0.26 (Διάλυμα Γ) EtOAc/MeOH 8:2	R <sub>f</sub> = 0.13 (Διάλυμα Γ) EtOAc/MeOH 8:2
Απόδοση	67%	65%
[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup>	-4.0 c = 0.29	+3.0 c = 0.12
λ <sub>max</sub>	311 nm	308 nm

**Πίνακας 3.** Αποτελέσματα σύνθεσης των 1-(β-D-γλυκοπιρανοζυλο)-πυριδινυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης **4a, b**.

### 3.3.6 Σύνθεση των 1-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-(*N*-μεθυλ- πυριδινιμυλο) νουκλεοζιτών της ουρακίλης **5a,b**.

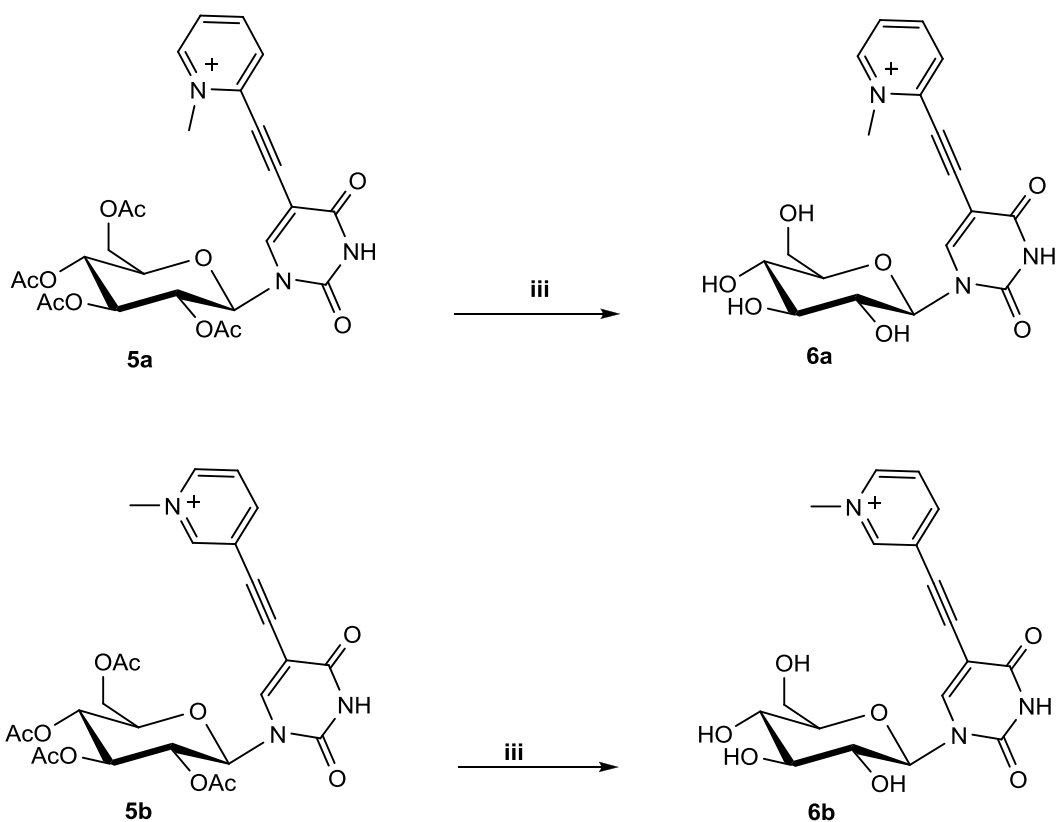


Διάλυμα των 1-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(-2 ή -3- πυριδινυλο) νουκλεοζιτών της ουρακίλης **3a,b** 0.2 mmol διαλύονται σε 7.5 ml άνυδρου διαλύτη ακετονιτρίλιο (CH<sub>3</sub>CN) και με την προσθήκη 3.2 mmol CH<sub>3</sub>I αφήνονται υπό αναβρασμό με κάθετο ψυκτήρα για 20h ώρες. Η επεξεργασία που ακολουθείται για την παραλαβή των προϊόντων **5a,b** περιλαμβάνει καθαρισμό του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης τα διαλύματα, Γ (οξικός αιθυλεστέρας/Μεθανόλη 8:2) και Δ (διχλωρομεθάνιο/Μεθανόλη 7:3) αντίστοιχα, λαμβάνοντας τους προστατευμένους 1-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-(*N*-μεθυλ- πυριδινιμυλο) νουκλεοζίτες της ουρακίλης **5a,b** με απόδοση 66% και 64% αντίστοιχα.

	Προϊόν <b>5a</b>	Προϊόν <b>5b</b>
TLC	R <sub>f</sub> = 0.16 (Διάλυμα Γ) EtOAc/MeOH 8:2	R <sub>f</sub> = 0.29 (Διάλυμα Δ) CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 7:3
Απόδοση	66%	64%
[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup>	-2.0 c = 0.22	-4.0 c = 0.20
λ <sub>max</sub>	289 nm	312 nm

**Πίνακας 4.** Αποτελέσματα σύνθεσης των 1-(2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- 5-(N-μεθυλ- πυριδινιμυλο) νουκλεοζιτών της ουρακίλης **5a,b**.

### 3.3.7 Σύνθεση των 1-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-πυριδινιμυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης 6a,b.



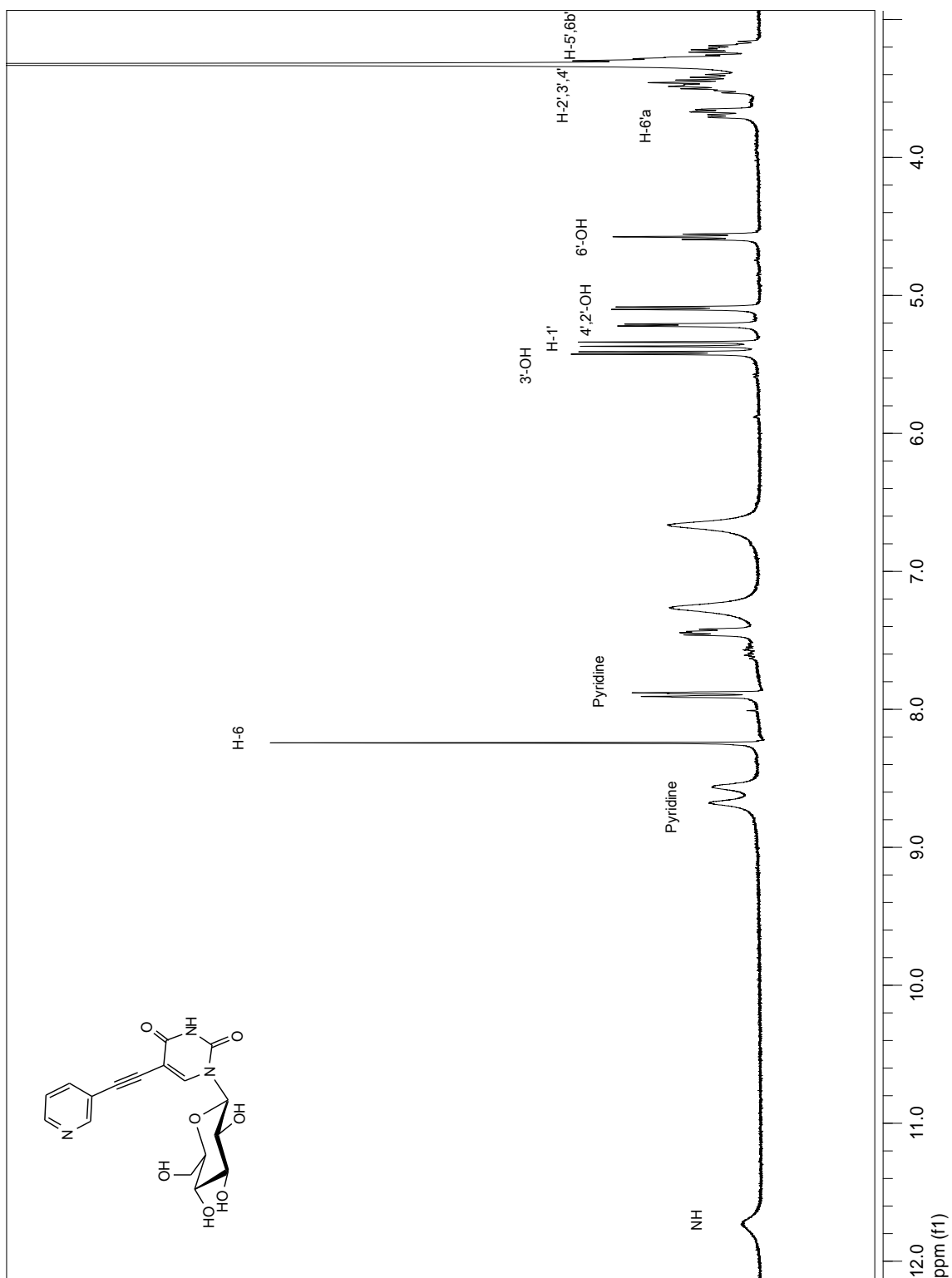
Διάλυμα των προστατευμένων νουκλεοζιτών **5a,b** (0.9 mmol) σε μεθανολική αμμωνία αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 12h ώρες. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες καθαρίζονται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Γ (οξικός αιθυλεστέρας/Μεθανόλη 8:2), οπότε παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα **6a,b** με απόδοση 68% και 66% αντίστοιχα, με μορφή ελαίου κίτρινου χρώματος.

	Προϊόν <b>6a</b>	Προϊόν <b>6b</b>
TLC	$R_f = 0.15$ (Διάλυμα Ε) MeOH	$R_f = 0.10$ (Διάλυμα Ε) MeOH
Απόδοση	68%	66%
$[\alpha]_D^{22}$	-2.0 $c = 0.11$	+3.0 $c = 0.13$
$\lambda_{max}$	299 nm	312 nm

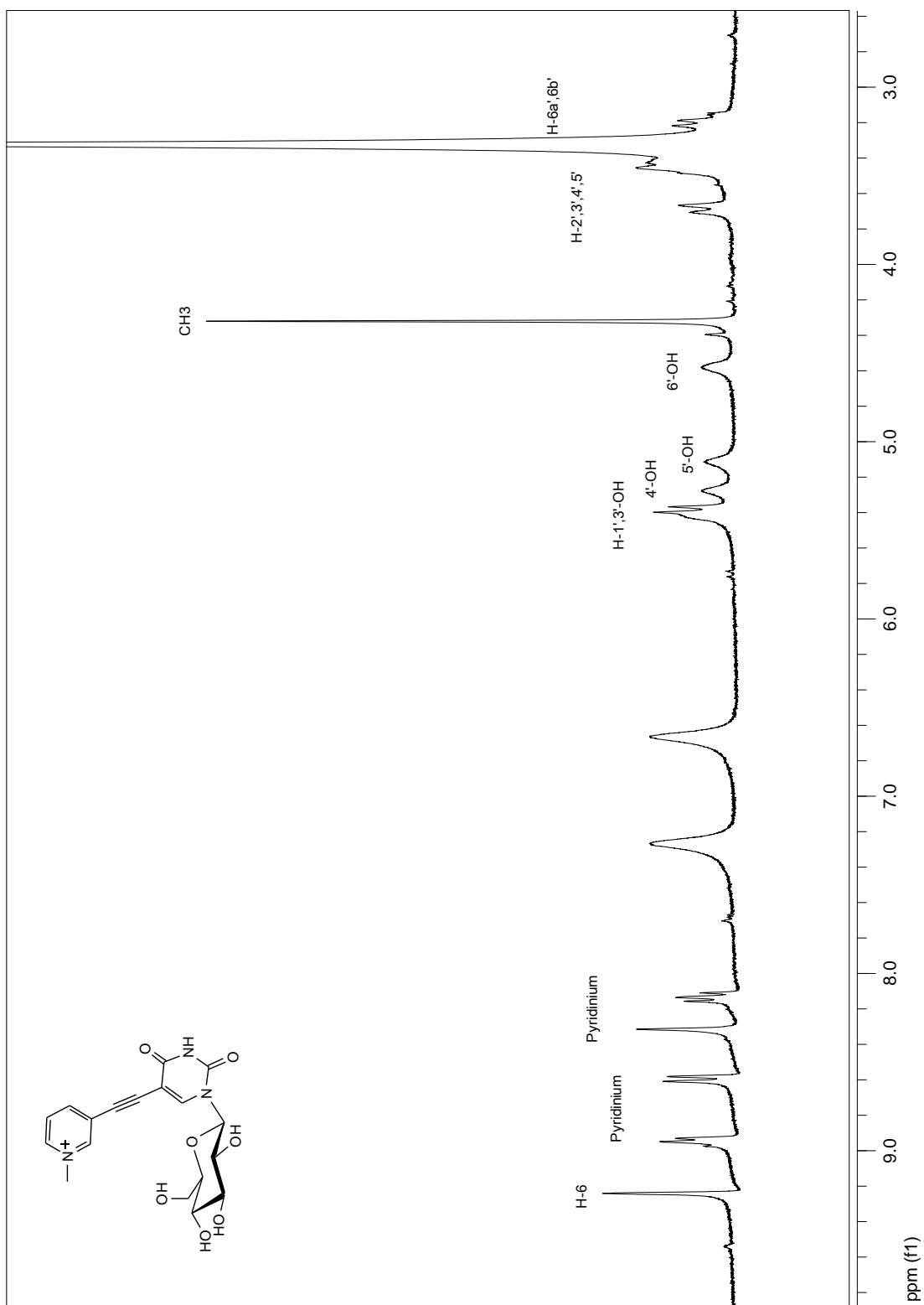
**Πίνακας 5.** Αποτελέσματα σύνθεσης των 1-(β-D-γλυκοπιρανοζυλο)-πυριδινιμυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης **6a,b**.



## 4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ $^1\text{H}$ NMR



**Εικόνα 11:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του τελικού προϊόντος **4b**.



Εικόνα 12: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του τελικού προϊόντος **6b**.

## 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 ιικές μολύνσεις. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιδικών αναλόγων, που 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 αντιική 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:

1. Προσφέρει ομοιόμορφη θέρμανση σε όλο το μίγμα της αντίδρασης.
2. Αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα της αντίδρασης.
3. Ελαττώνει τον σχηματισμό παραπροϊόντων.
4. Παρέχει αυξημένες αποδόσεις.

Οι τελικές αποδόσεις που πήραμε από τη σύνθεση των τελικών γλυκοπυρανονουκλεοζιτών είναι αρκετά καλές. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (**2**) είχε απόδοση 83%. Η σύνθεση των 1-(2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(2 ή -3- πυριδινυλο) της ουρακίλης **3a,b** (αντίδραση Sonogashira) είχε απόδοση 65% και 62% αντίστοιχα, των 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-πυριδινυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης **4a,b** είχε απόδοση 67% και 65% αντίστοιχα, των 1-(2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(N-μεθυλ-πυριδινιμυλο) νουκλεοζιτών της ουρακίλης **5a,b** είχε απόδοση 66% και 64% και των 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-πυριδινιμυλο νουκλεοζιτών της ουρακίλης **6a,b** είχε απόδοση 68% και 66%.

Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού <sup>1</sup>H NMR.

COMPOUND	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
<b>3a</b>	115 ± 4	139 ± 39	90 ± 1
<b>4a</b>	71 ± 10	79 ± 11	66 ± 0
<b>5a</b>	203 ± 49	>250	232 ± 25
<b>6a</b>	152 ± 12	>250	244 ± 6
<b>3b</b>	>250	182 ± 95	>250
<b>4b</b>	>250	>250	>250
<b>5b</b>	>250	>250	>250
<b>6b</b>	>250	>250	>250
<b>Ph-Ur-Glucose</b>	6.2 ± 0.4	5.2 ± 2.6	5.4 ± 0.0

Όλα τα μόρια αξιολογήθηκαν για την κυτταροτοξική και κυτταροστατική τους δράση έναντι κυτάρων λευχαιμίας ποντικού (L1210), ανθρώπινου λεμφώματος (CEM) καθώς και των ανθρώπινων καρκινικών κυτάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Για την εκτίμηση της κυτταροστατικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC<sub>50</sub>, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%.

Όπως παρατηρούμε από τον παραπάνω πίνακα τόσο τα 2-αιθυλ-πυριδινυλο όσο και τα πυριδινυλο ανάλογά τους εμφάνισαν αξιοσημείωτη

κυτταροστατική δράση έναντι των τριών αυτών καρκινικών σειρών, κανένα όμως δεν εμφάνισε καλύτερη δράση από το 1( $\beta$ -D-γλυκοπυρανοζυλο)-5 φαινυλοαιθύνυλο νουκλεοζίτη της ουρακίλης.

## 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. Tsirkone V. G., Tsoukala E., Lamprakis C., Manta S., Hayes J. .M., Skamnaki V. T., Drakou C., Zographos S. E., Komiotis D., Leonidas D. D. **1-(3-Deoxy-3-fluoro-beta-d-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies**. Bioorg Med Chem. **2010**, 38, 3413-25.
4. 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.
5. Somsák L., Czifrák K., Tóth M., Bokor E., Chrysina E. D., Alexacou K. M., Hayes J. M., Tiraidis C., Lazoura E., Leonidas D. D., Zographos S. E., Oikonomakos N. G. **New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents**. Curr Med Chem. **2008**, 15, 2933-83.
6. Arnér E. S. J., Eriksson S. **Mammalian deoxyribonucleoside kinases**. Pharmacol Ther. **1995**; 67, 155-86.

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. Chong Y., Choo H., Choi Y., Mathew J., Schinazi R. F., Chu C. K. **Stereoselective synthesis and antiviral activity of D-2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-2'-fluoro-4'-thionucleosides.** *J Med Chem.* **2002**, 45, 4888-98.
10. Lewin B. *Genes* **2003**, VIII, 6.
11. Burns C. J., Milne H. M., Squires P. E., Evans N. D., Pickup J., Jones P. M., Persaud S. J. **Uncoupling of nutrient metabolism from insulin secretion by overexpression of cytosolic phospholipase A(2).** *Diabetes.* **2005**, 54, 116-24.
12. 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.

13. 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.
14. Siev M., Weinberg R., Penman S. **The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in HeLa cells by cordycepin.** J Cell Biol. **1969**, 41, 510-20
15. Ahn Y. J., Park S. J., Lee S. G., Shin S. C., Choi D. H. **Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of Cordyceps militaris against Clostridium spp.** J Agric Food Chem. **2000**, 48, 2744-8.
16. 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
17. 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.
18. 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.



19. 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.
20. Baker C. H., Banzon J., Bollinger J. M., Stubbe J., Samano V., Robins M. J., Lippert B., Jarvi E., Resvick R. **2'-Deoxy-2'-methylenecytidine and 2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine 5'-diphosphates: potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase.** J Med Chem. **1991**, 34, 1879-84.
21. Matsuda A., Sasaki T. **Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides.** Cancer Sci. **2004**, 95, 105-11
22. Faderl S., Gandhi V., Kantarjian H., Plunkett W. **New nucleoside analogues in clinical development.** Cancer Chemother Biol Response Modif. **2002**, 20, 37-58.
23. 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.
24. Pui C. H., Jeha S. **Clofarabine.** Nat Rev Drug Discov. **2005**, 12-3.
25. Secrist J. A. **Nucleosides as anticancer agents: from concept to the clinic.** Nucleic Acids Symp. **2005**, 49, 15-6
26. Tiwari K. N., Shortnacy-Fowler A. T., Cappellacci L., Waud W. R., Parker W. B., Montgomery J. A., Secrist J. A. **Synthesis and structure activity relationships of 5-substituted-4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosines.** Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. **2000**, 19, 2005-17.

27. Waud W. R., Gilbert K. S., Shepherd R. V., Montgomery J. A., Secrist J. A. **Preclinical antitumor activity of 4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosine (4'-thio-ara-C)**. *Cancer Chemother Pharmacol.* **2003**, 51, 422-6
28. Someya H., Shaddix S. C., Tiwari K. N., Secrist J. A., Parker W. B. **Phosphorylation of 4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosine and its analogs by human deoxycytidine kinase**. *J Pharmacol Exp Ther.* **2003**, 304, 1314-22.
29. 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.
30. Gumina G., Song G. Y., Chu C. K. **L-Nucleosides as chemotherapeutic agents**. *FEMS Microbiol Lett.* **2001**, 202, 9-15.
31. 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
32. Balatsos N. A., Vlachakis D., Maragozidis P., Manta S., Anastasakis D., Kyritsis A., Vlasi M., Komiotis D., Stathopoulos C. **Competitive inhibition of human poly(A)-specific ribonuclease (PARN) by synthetic fluoro-pyranosyl nucleosides**. *Biochemistry.* **2009**, 48, 6044-51.
33. 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.

34. 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.
35. 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-enopyranos-2-ulosyl (uracil): anticancer agent.** *Nucleosides Nucleotides.* **1999**, 18, 703-5.
36. 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-dideoxy-3-fluoro-6-O-trityl-beta-D-glycero-hex-3-enopyranos-2-ulosyl) uracil.** *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **2002**, 21, 327-34
37. 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.
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. Kodama E.I., Kohgo S., Kitano K., Machida H., Gatanaga H., Shigeta S., Matsuoka M., Ohruji H., Mitsuya H. **4'-Ethylnyl nucleoside analogs: potent**

**inhibitors of multidrug-resistant human immunodeficiency virus variants in vitro.** *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**, 45, 1539-46.

41. Minakawa N., Matsuda A. **Mechanism-based design of inosine 5-monophosphate dehydrogenase inhibitors: synthesis and biological activities of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives.** *Curr Med Chem.* **1999**, 6, 615-28.

42. De Clercq E. **New developments in anti-HIV chemotherapy.** *Biochim Biophys Acta.* **2002**, 1587, 258-75.

43. Minakawa N., Takeda T., Sasaki T., Matsuda A., Ueda T. **Synthesis and antitumor activity of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives.** *J Med Chem.* **1991**, 34, 778-86

44. Matsuda A. **Design of a new antitumor nucleoside CNDAC, against solid tumors.** *Gan To Kagaku Ryoho.* **1996**, 23, 202-10

45. 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.

46. Kohgo S., Yamada K., Kitano K., Sakata S., Hayakawa H., Nameki D., Kodama E., Matsuoka M., Mitsuya H., Ohri H. **Synthesis of 4'-C-ethynyl and 4'-C-cyano purine nucleosides from natural nucleosides and their anti-HIV activity.** *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **2003**, 22, 887-9.

47. Hattori H., Tanaka M., Fukushima M., Sasaki T., Matsuda A. **Nucleosides and nucleotides. 158. 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)-cytosine, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)uracil, and their nucleobase analogues as new potential multifunctional antitumor nucleosides with a broad spectrum of activity.** J Med Chem. **1996**, 39, 5005-11.
48. Agelis G., Tzioumaki N., Tselios T., Botić T., Cencic A., Komiotis D. **Synthesis and molecular modelling of unsaturated exomethylene pyranonucleoside analogues with antitumor and antiviral activities.** Eur J Med Chem. **2008**, 43, 1366-75.
49. 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.
50. O-Yang H. Y., Wu E. B., Fraser-Smith, KAM Walker. **Nucleosides and nucleotides. 183. Synthesis of 4'  $\alpha$ -branched thymidines as a new type of antiviral agent.** Tetrahedron Lett. **1992**, 33, 37–40.
51. 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.
52. Kantsadi A. L., Hayes J. M., Manta S., Skamnaki V. T., Kiritsis C., Psarra A. M., Koutsogiannis Z., Dimopoulou A., Theofanous S., Nikoleousakos N., Zoumpoulakis P., Kontou M., Papadopoulos G., Zographos S. E., Komiotis D., Leonidas D. D. **The  $\sigma$ -hole phenomenon of halogen atoms forms the**

**structural basis of the strong inhibitory potency of C5 halogen substituted glucopyranosyl nucleosides towards glycogen phosphorylase b.** ChemMedChem. **2012**, 7, 722-32.

53. Perigaud C., Gosselin G., Imbach J. L. **Nucleoside Analogues as Chemotherapeutic Agents.** Nucleosides & Nucleotides. **1992**, 11, 903–945.