



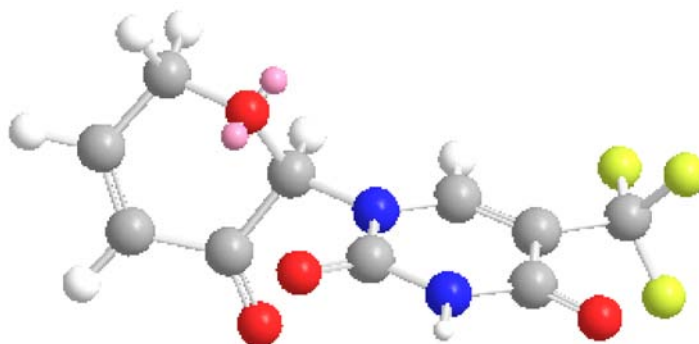
**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

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

**ΘΕΟΦΑΝΗΣ ΒΑΒΙΛΗΣ**

Διπλωματική Εργασία

**Σύνθεση και βιολογική αποτίμηση του κετοακόμεστου  
νουκλεοζίτη της τριφθορομεθυλοουρακίλης**



Λάρισα 2010

Διπλωματική Εργασία

Σύνθεση και βιολογική αποτίμηση του κετοακόρεστου  
νουκλεοζίτη της τριφθορομεθυλοουρακίλης

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

Κουρέτας Δημήτριος — Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λεωνίδας Δημήτριος — Αναπληρωτής 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.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Κομιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το ιδιαίτερα ενδιαφέρον αυτό θέμα, τις εποικοδομητικές και πολύτιμες υποδείξεις του και την αμέριστη συμπαράστασή του.

Επίσης εκφράζω τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές κ. Δημήτριο Κουρέτα και κ. Δημήτριο Λεωνίδα για την ευγενική συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Στην κα. Στυλιανή Μαντά-ΠΔ407 του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και στην κα. Νίκη Τζιουμάκη, υποψήφια διδάκτορα, εκφράζω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την ουσιαστική βοήθεια, συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχαν όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για το δημιουργικό, ευχάριστο και φιλικό κλίμα, με το οποίο με περιέβαλε.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>9</b>
1.1 Υδατάνθρακες .....	9
1.1.1 Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές :Σχηματισμός ημιακετάλης....	10
1.2 Νουκλεοζίτες .....	13
1.2.1 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.....	14
1.2.2 Νουκλεοζίτες ως αντιπυρηνικοί παράγοντες .....	14
1.2.3 Νουκλεοζίτες ως αντιοξειδωτικά.....	15
1.2.4 Νουκλεοζίτες ως αντιδιαβητικά .....	15
1.2.5 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών .....	16
1.2.6 Πυρανονουκλεοζίτες .....	20
1.2.7 Κετο-πυρανονουκλεοζίτες.....	21
1.2.8 Ακόρεστοι κετοπυρανονουκλεοζίτες .....	21
<b>2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>23</b>
2.1 Στόχος – σκοπός μελέτης.....	23
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>25</b>
3.1 Υλικά .....	25
3.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων.....	25
3.2 ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	27
3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography).....	27
3.2.2 Χρωματογραφία στήλης.....	27
3.2.3 Ξήρανση διαλυτών.....	28
3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων .....	28
3.3 Μέθοδοι .....	29
3.3.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού .....	29
3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης .....	30
3.3.3 Σύνθεση προϊόντων με βάση τη τριφθοροουρακίλη.....	31
3.3.3.1. Σύνθεση της 1-(2',3',4'-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (2).....	31
3.3.3.2. Σύνθεση της 1-( $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (3).....	33
3.3.3.3 Σύνθεση της 1-(3',4'-O-isopropylidene- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (4).....	34
3.3.3.4 Σύνθεση της 1-(2'-O-acetyl-3',4'-O-isopropylidene- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (5) .....	35
3.3.3.5 Σύνθεση της 1-(2'-O-acetyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (6).....	36
3.3.3.6 Σύνθεση της 1-(2'-O-acetyl-3',4'-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-pent-3'-enopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (7) .....	37
3.3.3.7 Σύνθεση της 1-(3',4'-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-pent-3'-enopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (8).....	38
3.3.3.8 Σύνθεση της 1-(3',4'-dideoxy- $\alpha$ -pent-3'-enopyranosyl-2'-ulose)-5-trifluoromethyluracil (9).....	39
<b>4.ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ <sup>1</sup>H NMR</b> .....	<b>40</b>

<b>5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>41</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>45</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντιιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες ανήκουν στην τάξη των νουκλεοζιτών. Οι νουκλεοζίτες αποτελούνται από έναν μονοσακχαρίτη με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο, ενωμένο με μια ετεροκυκλική βάση. Λόγω αυτών τους των ιδιοτήτων, μεγάλο μέρος της έρευνας για ανάπτυξη φαρμάκων με παρόμοιες αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες εστιάζεται στα ανάλογα των νουκλεοζιτών.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση και η βιολογική αποτίμηση ενός καινούργιου νουκλεοζιτικού αναλόγου, της κετοακόρεστης τριφθορομεθυλουρακίλης. Αναλύεται η συνθετική οδός που ακολουθήθηκε για την παρασκευή της, η μέθοδος ταυτοποίησής της καθώς επίσης και οι ανασταλτικές ιδιότητες που παρουσίασε έναντι καρκινικών σειρών *in vitro*.

Το αποτέλεσμα της ανασταλτικής δράσης της παραπάνω ουσίας καταδεικνύει ότι ο νεοσυντεθήμενος κετοακόρεστος νουκλεοζίτης της τριφθορομεθυλουρακίλης δεν παρουσίασε αξιόλογη κατασταλτική δράση έναντι των κυτταρικών σειρών L1210, FM3A, CEM και HELA. Το προαναφερόμενο αποτέλεσμα ενισχύει την υπόθεση πως ο μελετηθείς κετοακόρεστος νουκλεοζίτης δρα ως προφάρμακο, του οποίου η ελεύθερη βάση μετατρέπεται στον ενεργό μεταβολίτη.

## ABSTRACT

Many naturally occurring antibiotics with antiviral and antineoplastic qualities belong to the nucleoside family. Nucleosides are comprised by a monosaccharide with a five membered or six membered ring joined with a heterocyclic base. Due to the qualities exhibited by nucleosides, a great deal of research is focused on the synthesis of nucleoside analogues that carry similar antiproliferative properties to the parent compounds.

This thesis describes the synthesis and biological evaluation of a novel nucleoside analogue, that of the ketounsaturated trifluoromethyluracil. Within, the synthetic route and identification of the said compound are detailed, as well as its *in vitro* antiproliferative action against a number of cancer cell lines.

The results of the inhibitory activity of the aforementioned compound signifies that the novel ketounsaturated nucleoside of trifluoromethyluracil did not exhibit remarkable suppressant action against L1210, FM3A, CEM and HELA cell lines. The aforementioned result strengthens the hypothesis that the studied ketounsaturated nucleoside acts as a prodrug whose free base gets converted to the active metabolite.



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων που απαντώνται ευρέως στην φύση και έχουν ως γενικό χημικό τύπο την μορφή  $C_n(H_2O)_n$ . Η βιολογική τους σημασία ως μόρια είναι μεγάλη, διότι μπορούν να αποτελέσουν δομικά στοιχεία των κυττάρων, πηγή ενέργειας, όπως επίσης και μέρος άλλων μακρομορίων, όπως γλυκοπρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα.

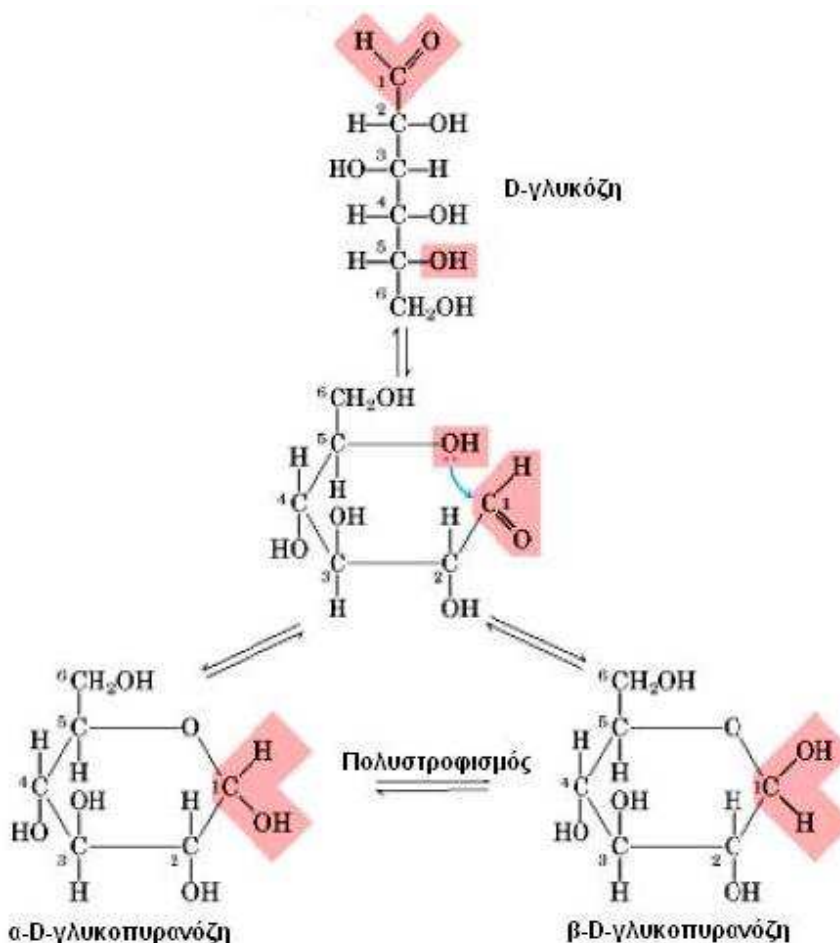
Ο όρος υδατάνθρακες αναφέρεται σε μια ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών, που ονομάζονται κοινώς σάκχαρα. Τα μικρότερα από άποψη μοριακού βάρους είναι οι μονοσακχαρίτες, ακολουθούν οι δισακχαρίτες, οι ολιγοσακχαρίτες και τέλος οι πολυσακχαρίτες με πολύ υψηλά μοριακά βάρη. Πιο αναλυτικά, οι παραπάνω κατηγορίες υδατανθράκων είναι οι εξής:

- Μονοσακχαρίτες: χαρακτηριστικές ενώσεις της κατηγορίας αυτής είναι η γλυκόζη, η μαλτόζη και η φρουκτόζη. Αποτελούν μονομερή για τη σύνθεση πολυπλοκότερων δομών που προκύπτουν από πολυμερισμό τους.
- Δισακχαρίτες: χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι η λακτόζη, η σουκρόζη και η μαλτόζη που αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες.
- Ολιγοσακχαρίτες όπως οι φρουκτολιγοσακχαρίτες. Αυτές οι ενώσεις αποτελούνται από 20-30 μονομερή μονοσακχαριτών.
- Πολυσακχαρίτες: χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη. Δημιουργούνται με πολυμερισμό μονοσακχαριτών και το κάθε μόριο πολυσακχαρίτη δύναται να αποτελείται από εκατοντάδες χιλιάδες μονομερή.

### 1.1.1 Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές :Σχηματισμός ημιακετάλης

Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν σε δύο μορφές. Την μορφή ανοιχτής αλυσίδας και την κυκλοποιημένη τους μορφή. Από άποψη χημικής δομής τα σάκχαρα χωρίζονται αναλόγως με το μέγεθος της αλυσίδας του άνθρακα, παραδείγματος χάριν σε πεντόζες, αν έχουν πέντε μόρια άνθρακα, ή εξόζες αν έχουν έξι.

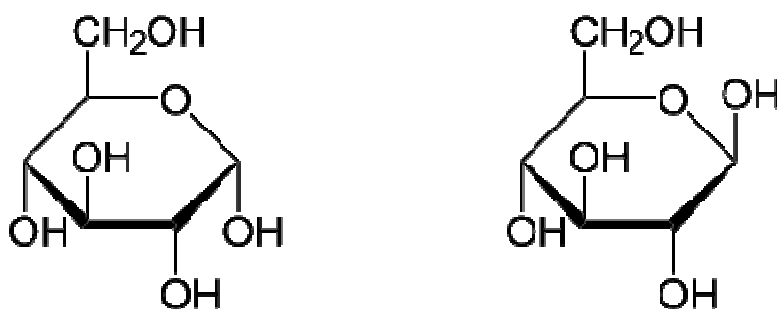
Τα σάκχαρα απαντώνται σε κυκλική μορφή όταν μια καρβονυλική ομάδα του μορίου τους αντιδρά με μια ομάδα υδροξυλίου, προς δημιουργία ημιακετάλης. Αυτή η αντίδραση είναι μια ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη που οδηγεί στην δημιουργία πυρανοζών ή φουρανοζών (Εικόνα 1) Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοιχτής και κλειστής αλυσίδας.



Εικόνα 1: Κυκλοποίηση μονοσακχαρίτη μέσω αντίδρασης ημιακετάλης.

Δυο παραδείγματα αυτής της αντίδρασης είναι η δημιουργία πυρανόζης από την γλυκόζη και η δημιουργία φουρανόζης από την φρουκτόζη. Στην περίπτωση της γλυκόζης, η αλδεϋδική ομάδα του άνθρακα C-1 αντιδρά με το υδροξύλιο που βρίσκεται στην θέση C-5, σχηματίζοντας μια ενδομοριακή ημιακετάλη και στην συνέχεια παράγοντας τον εξαμελή δακτύλιο της πυρανόζης. Η περίπτωση της φουρανόζης είναι παρόμοια. Η κετονική ομάδα στον άνθρακα C-2 αντιδρά με το υδροξύλιο του άνθρακα C-5 που οδηγεί στον σχηματισμό μιας ενδομοριακής ημιακετάλης, έχοντας ως αποτέλεσμα την δημιουργία δακτυλίου φουρανόζης.

Η κυκλοποίηση των σακχάρων μέσω ημιακετάλης είναι μεγάλης σημασίας διότι με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα πρόσθετο στερεογονικό κέντρο στο μόριο και παρουσιάζεται το φαινόμενο της ανωμερείας. Στην περίπτωση της γλυκόζης ο άνθρακας C-1 είναι ανωμερής με αποτέλεσμα να μπορούν να σχηματιστούν δυο στερεοχημικές δομές : της α-D-γλυκοπυρανόζης και της β-D-γλυκοπυρανόζης (εικόνα 2). Στην περίπτωση της φρουκτόζης, ο ανωμερής άνθρακας είναι ο C-2. Το α ή το β καταδεικνύει σε ποια θέση στον χώρο βρίσκεται η ύδροξυ ομάδα του ανωμερούς άνθρακα σε σχέση με τον υποκαταστάτη του C-5 άνθρακα. Αν ο υποκαταστάτης (υδροξύλιο σε αυτή την περίπτωση) του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται σε θέση trans, κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου προς τον υποκαταστάτη στον άνθρακα C-5 τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως μορφής α. Αν συμβαίνει το αντίθετο, δηλαδή ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται σε θέση cis, πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου, ως προς τον υποκαταστάτη του άνθρακα C-5 τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως μορφής β.

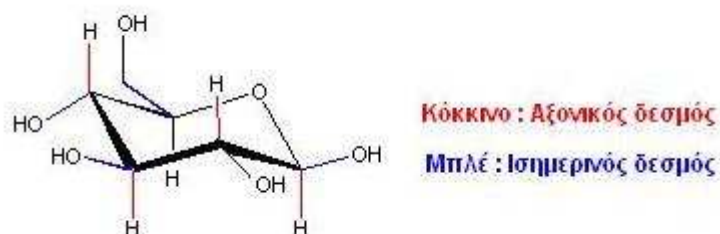


Εικόνα 2: Αριστερά α-D-γλυκοπυρανόζη, Δεξιά β-D-γλυκοπυρανόζη

Η στερεοδιάταξη του δακτυλίου παρουσιάζει επίσης ενδιαφέρον λόγω της συμπεριφοράς των υποκαταστατών του, όσον αφορά την διάταξή τους σε σχέση με το επίπεδο του δακτυλίου. Συγκεκριμένα διακρίνονται δυο είδη υποκαταστατών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί. Ως αξονικοί υποκαταστάτες ορίζονται οι υποκαταστάτες που βρίσκονται παράλληλα στον άξονα του δακτυλίου, δηλαδή κάθετα στο επίπεδό του. Αντιθέτως, οι ισημερινοί υποκαταστάτες βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με τον δακτύλιο (Εικόνα 3).

Τα παραπάνω έχουν επίπτωση στην χημική συμπεριφορά του μορίου. Δύναται να εμφανιστούν φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης μεταξύ αξονικών υποκαταστατών, εκτός υδρογόνου, αν αυτοί βρεθούν στην ίδια πλευρά του δακτυλίου. Το αν θα εμφανιστούν έχει σχέση με την φύση του υποκαταστάτη όπως την ακτίνα Van der Waals του και την πυκνότητα του νέφους ηλεκτρονίων. Οι ισημερινοί υποκαταστάτες δεν παρουσιάζουν αυτό το φαινόμενο, οπότε η υποκατάσταση στο ισημερινό επίπεδο είναι κατά κόρον σταθερότερη.

Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρείται είναι η αλληλεπίδραση αξονικών και ισημερινών υποκαταστατών, που προκαλεί τάση στο μόριο ικανή να το διαμορφώσει περαιτέρω στερεοχημικά. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται 1,3-διαξονική στερεοχημική τάση και εξαρτάται από το μέγεθος όπως επίσης και την φύση του εκάστοτε υποκαταστάτη. Ως αποτέλεσμα του παραπάνω οι φουρανόζες και οι πυρανόζες δεν είναι επίπεδες στον χώρο αλλά μπορούν να υιοθετήσουν διάφορες στερεοδιαμορφώσεις. Ο δακτύλιος της πυρανόζης μπορεί να λάβει τις μορφές chair, boat, half-chair, skew και envelope, ενώ ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να λάβει λιγότερες μορφές στερεοχημικών διαμορφώσεων, δηλαδή τις μορφές envelope και twist.

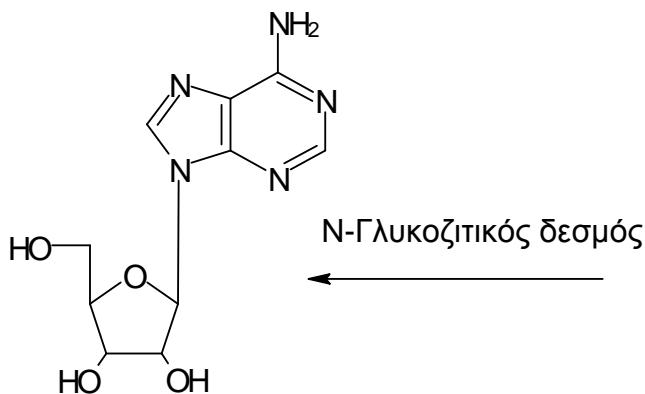


Εικόνα 3: Αξονικοί (κόκκινοι) υποκαταστάτες και ισημερινοί (μπλέ) υποκαταστάτες

## 1.2 Νουκλεοζίτες

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

Από άποψη χημικής δομής οι νουκλεοζίτες αποτελούνται από μια βάση, που είναι είτε μια πουρίνη είτε μια πυριμιδίνη, ενωμένη με τον C-1 μιας πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό (Berg J. M. *et al*, 2001). Στη φύση όπου απαντώνται N-γλυκοζιτικοί δεσμοί πάντα η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου, οπότε χαρακτηρίζονται ως νουκλεοζίτες β στερεοδιάταξης (Εικόνα 4).



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

Οι νουκλεοζίτες και τα τροποποιημένα ανάλογά τους έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης μελέτης διότι επιδεικνύουν πολύ ενδιαφέρουσες αντικαρκινικές, αντιιικές, αντιοξειδωτικές και αντιυπεργλυκαιμικές ιδιότητες (Tsirkone G. *et al*, 2010; Balatsos N. A. *et al*, 2009; Tiwari N. *et al*, 2009) Το ενδιαφέρον για την όσο το δυνατό καλύτερη κατανόηση της σχέσης δομής-δράσης των νουκλεοζιτών έχει ενταθεί με σκοπό την δημιουργία ισχυρότερων αναλόγων και επέκτασης της του φάσματος των πιθανών θεραπευτικών εφαρμογών τους.

### 1.2.1 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Η αναγνώριση των αντικαρκινικών και κυτταροστατικών ιδιοτήτων των νουκλεοζιτών και των αναλόγων τους, αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Balatsos, N. A. *et al*, 2009; Tzioumaki N. *et al*, 2009; Agelis G. *et al*, 2008; Tsoukala E. *et al*, 2007). Ήδη, οι αντιμεταβολίτες που ορισμένοι από αυτούς ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεοζιτών, χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην ιατρική ως πρώτης γραμμής φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύει στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Τέτοιοι αντιμεταβολίτες, όπως οι 1-(2'-deoxy -2'-methylene-β-D-erythropentofurano)cytosine (DMDC) και 1-β-D-arabinofuranoxycytosine (araC) έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών όπως διάφορους τύπους λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Matsuda A. *et al*, 2004; Cory A. H. *et al*, 1994; Yamagami K. *et al*, 1991; Lin T. S. *et al*, 1991; Baker C. H. *et al*, 1991). 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. *et al*, 2010; Bhat U. G. *et al*, 2010).

### 1.2.2 Νουκλεοζίτες ως αντιιικοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρεμβαλλόμενα στην σύνθεση του DNA και του RNA μπορούν να επηρεάσουν εκτός από την σύνθεση νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων και τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιιικών φαρμάκων (Agelis G. *et al*, 2008; Komiotis D. *et al*, 2008; Agelis G. *et al*, 2007; Zhou W. *et al*, 2004; Perigaund C. *et al*, 1992; Komiotis D. *et al*, 1991). Ήδη πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στην ιατρική έναντι ιών όπως το ιού που προκαλεί το AIDS (HIV), του ιού της ηπατίτιδας B (HBV), των ερπητοϊών

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

### 1.2.3 Νουκλεοζίτες ως αντιοξειδωτικά

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

### 1.2.4 Νουκλεοζίτες ως αντιδιαβητικά

Μια σχετικά νέα πιθανή εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων είναι η χρήση τους για την ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου 2. Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι ένα

ένζυμο που μπορεί να αποτελέσει στόχο φαρμακευτικής παρέμβασης διότι εμπλέκεται στην διάσπαση του γλυκογόνου προς παραγωγή γλυκόζης (Somsák L. *et al*, 2003). Εκλεκτικοί και ισχυροί αναστολείς αυτού του ενζύμου θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στον έλεγχο της αποδόμησης του γλυκογόνου και κατά συνέπεια στον έλεγχο της παροχής γλυκόζης προς το κύτταρο (Somsák L. *et al*, 2008). Νουκλεοζιτικά ανάλογα όπως τα ανάλογα της 1-(3'-deoxy -3'-fluoro -β-D-glycopyranosyl) pyrimidine έχουν παρουσιάζουν ανασταλτική δράση κατά της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου και έχει μελετηθεί η σχέση δομής-δράσης τους ώστε να δοθούν κατευθύνσεις προς την ανάπτυξη ισχυρότερων αναστολέων (Tsirkone V. *et al*, 2010).

### 1.2.5 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Όλες οι φαρμακευτικές ουσίες ασκούν την δράση τους αλληλεπιδρώντας με κάποιο μοριακό στόχο, αλλάζοντας την φυσιολογία της λειτουργίας των κυττάρων και κατ' επέκταση του οργανισμού. Για να γίνει κάτι τέτοιο πρέπει πρώτα από όλα το φάρμακο να μπορεί να έρθει σε επαφή με το μοριακό στόχο του. Οι μοριακοί στόχοι των φαρμάκων ποικίλουν, μπορεί να είναι υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων, διάλυτοι ιόντων, μόρια μεταφορείς, ένζυμα, πυρηνικοί υποδοχείς και άλλοι πολλοί. Στην περίπτωση που ο μοριακός στόχος του φαρμάκου είναι ενδοκυτταρικός πρέπει το φάρμακο, για να είναι δραστικό, να μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου. Επίσης, ένα σημαντικό κριτήριο επιλογής ενός φαρμακευτικού μορίου είναι η εκλεκτικότητά του όσον αφορά τον μοριακό στόχο, δηλαδή η ικανότητά του να αλληλεπιδρά εκλεκτικά με τον μοριακό στόχο του οποίου την λειτουργία θέλουμε να τροποποιήσουμε με όσο το δυνατόν μικρότερη αλληλεπίδραση με άλλα μόρια του κυττάρου ώστε να αποφευχθεί πιθανή παρεμβολή σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου και η πιθανή τοξικότητα που μπορεί να προκύψει από αυτές.

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα έχουν ενδοκυτταρικούς μοριακούς στόχους. Στοχεύουν κυρίως τα νουκλεϊκά οξέα και την σύνθεσή τους, όπως επίσης και ένζυμα σχετιζόμενα με αυτά (Vender M. D.



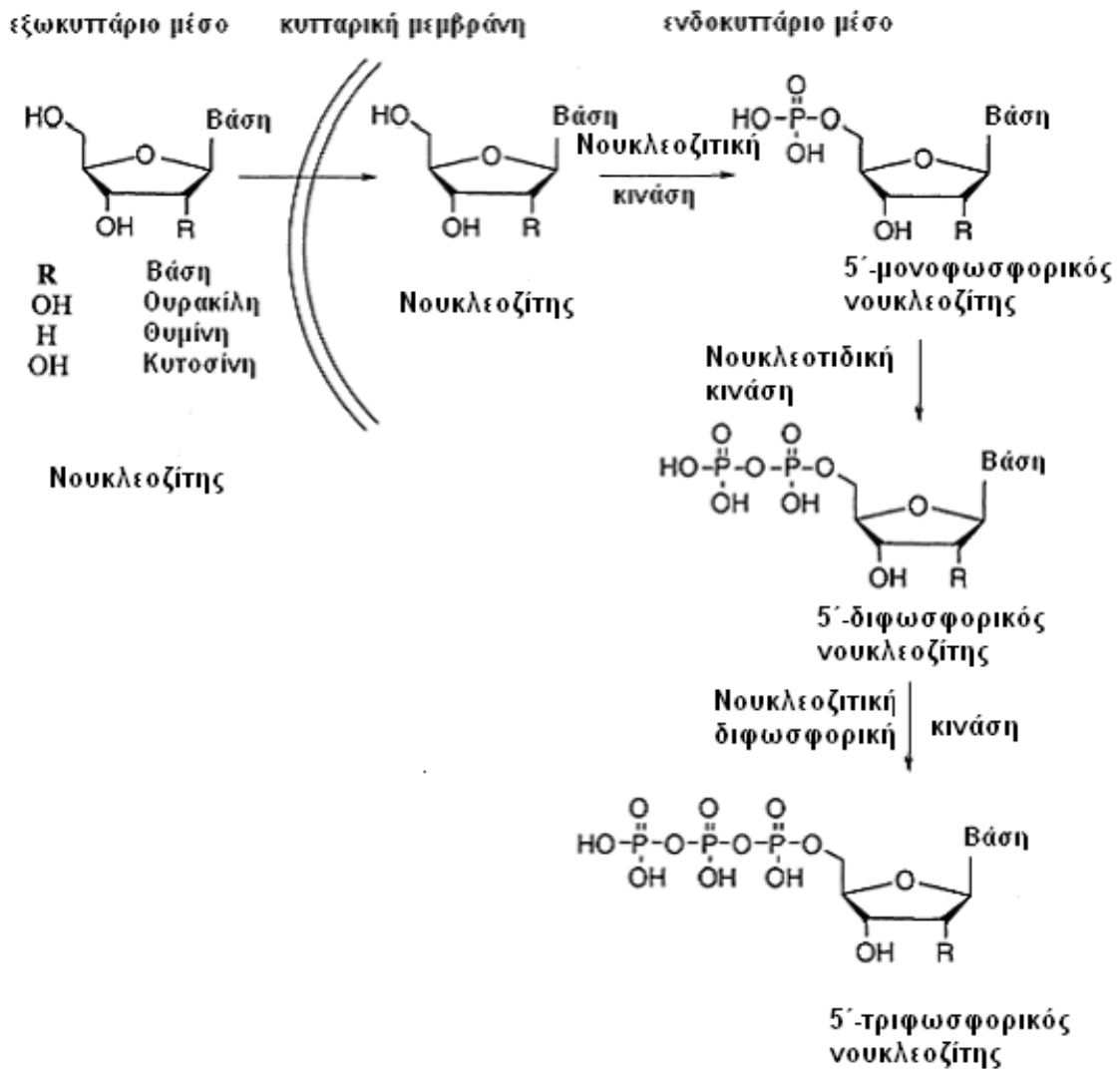
*et al*, 2001). Στην φύση οι νουκλεοζίτες συντίθενται ενδοκυτταρικά αλλά είναι δυνατή και η είσοδός τους στο κύτταρο διαμέσω παθητικής διάχυσης όπως επίσης και μέσω πρωτεϊνών μεταφορέων νουκλεοζιτών, ιδιότητες τις οποίες εκμεταλλευόμαστε στην χρήση νουκλεοζιτικών αναλόγων ως αντικαρκινικά και αντιιικά 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, αντιιική ή και αντιδιαβητική δράση (Tsirkone V. *et al*, 2010; Lui V. *et al*, 2010; Somsák L. *et al*, 2008).

Τα θεραπευτικά ανάλογα 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 τριφωσφορυλιωμένες μορφές τους (Arner E. S. J. *et al*, 1995). Οι φωσφορυλιωμένες μορφές των νουκλεοζιτών δεν μπορούν να διαπεράσουν με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη λόγω φορτίου, όπως επίσης και άπαξ και δημιουργηθούν μέσα στο κύτταρο η μετακίνησή τους προς γειτονικά κύτταρα είναι δύσκολη λόγω του διαφορετικού pH που υπάρχει στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα.

Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, εντοπίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Μιμούμενα τους φυσικούς νουκλεοζίτες, τα αντιιικά ανάλογά τους μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τις πολυμεράσες και να ενσωματωθούν στο ιικό γονιδίωμα. Η ενσωμάτωσή τους στο ιικό γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει διακοπή της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, να το καταστήσει μη λειτουργικό και κατά συνέπεια να καταστείλει την αντιγραφή του ιού και την περαιτέρω παραγωγή ιοσωματιδίων. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος είναι συντηρημένος σε πολλά είδη ιών, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να παρουσιάσουν δράση έναντι μεγάλου φάσματος ιών (Chong Y. *et al*, 2003). Αξίζει να σημειωθεί πως μέρος της επιλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιική πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η επιλεκτικότητα τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

Ο μηχανισμός φωσφορυλίωσης των νουκλεοζιτών αποτελεί επίσης μέρος της εκλεκτικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών. Η φωσφορυλίωση αρχίζει με την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στην 5' θέση του σακχάρου, η οποία καταλύεται ειδικές ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες, προς δημιουργία ενός μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (Wagner C. R. *et al*, 2000; Balzarini J. *et al*, 1993). Οι μετέπειτα φωσφορυλιώσεις προς τις διφωσφορικές και τριφωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών καταλύεται από νουκλεοδιτικές κινάσες και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες αντιστοίχως (εικόνα 5). Η φωσφορυλίωση από ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες όπως επίσης και η χαμηλή διαπερατική ικανότητα των φωσφορυλιωμένων νουκλεοζιτών οδηγούν στην συσσώρευση των φαρμακολογικά ενεργών μορφών τους στα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό.

Ένας κοινός μηχανισμός αντιιικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωση των νουκλεοζιτών στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της. 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 (John M. Clark Jr. and Robert L. Switzer, 1992; Benjamin Lewin, 2003; Christopher J. Burns, 2005). Εκτός του παραπάνω μηχανισμού, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να ασκήσουν αντικαρκινική δράση και μέσω άλλων μηχανισμών. Μπορούν να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της καταστολής αντιαποπτωτικών γονιδίων. Δυο νουκλεοζιτικά ανάλογα, στα οποία ο τρόπος δράσης τους έχει εντοπιστεί στον παραπάνω μηχανισμό είναι το νουκλεοζιτικό ανάλογο 1-(3'-ethynyl-β-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd) και το νουκλεοζιτικό ανάλογο 4-amino-6-hydrazino-7-β-D-ribofuranosyl-7H-pyrrolo(2,3-d)-pyrimidine-5-carboxamide (ARC) (Lui V. *et al*, 2010; Bhat U. G. *et al*, 2010).



Εικόνα 5: Μηχανισμός ενεργοποίησης αναλόγων των νουκλεοζιτών μέσω φωσφορυλίωσης.

Η μελέτη των νουκλεοζιτικών αναλόγων για πιθανή αντιοξειδωτική δράση ξεκίνησε όταν παρατηρήθηκε πως είναι ικανά να προστατεύσουν το DNA από θραύσεις που προέρχονται από ρίζες υπεροξειδίου. Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα που φέρουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα με αποτέλεσμα να είναι πολύ αντιδραστικά και να μπορούν να προσβάλουν ένα πλήθος βιομορίων όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, σακχαρα οξειδώνοντάς τα και προκαλώντας δυσλειτουργία στο κύτταρο (Undurti N., 2002). Τα αντιοξειδωτικά ασκούν την προστατευτική τους δράση έναντι των ελευθέρων ριζών είτε μέσω εξουδετέρωσής τους είτε μέσω περιορισμού της παραγωγής τους (Scalbert A. *et al*, 2005). Η παραγωγή ελευθέρων ριζών έχει συσχετιστεί με την διαδικασία της γήρανσης και

πλειάδας παθολογικών οντοτήτων όπως νευροεκφυλιστικές νόσους, καρκίνο, και καρδιαγγειακές παθήσεις, αν και ο ρόλος τους στον καρκίνο δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως (Undurti N., 2002; Halliwell B., 2001). Υπάρχουν στοιχεία πως εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης μέσω δημιουργίας βλαβών στο DNA που μπορούν να απενεργοποιήσουν αντιογκογόνα γονίδια και να αποσταθεροποιήσουν τον κυτταρικό κύκλο, ασκώντας επιβλαβή δράση (Undurti N., 2002). Αντίθετα, σε καρκινικά κύτταρα οι ελεύθερες ρίζες μέσω της εμπλοκής τους στην μείωση των τελομερών, μπορούν να έχουν αντικαρκινική δράση (Undurti N., 2002).

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα θα μπορούσαν επίσης να αποτελέσουν πιθανά αντιδιαβητικά φάρμακα. Μελέτες έχουν δείξει πως ορισμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα διαθέτουν ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην ανάπτυξη και εξέλιξη του διαβήτη τύπου 2 (Tsirkone V. *et al*, 2010; Lui V. *et al*, 2010; Somsák L. *et al*, 2008)

### 1.2.6 Πυρανονουκλεοζίτες

Μεγάλο μέρος της ερευνητικής προσπάθειας για την ανάπτυξη αντικαρκινικών και αντιογκογόνων νουκλεοζιτών επικεντρώθηκε στην σύνθεση και μελέτη νουκλεοζιτικών αναλόγων που έφεραν ως σάκχαρο μια πεντόζη. Η χρήση πεντοζών ως σάκχαρο των νουκλεοζιτικών αναλόγων αποδείχθηκε προβληματική για μια πλειάδα λόγων. Οι πυρανονουκλεοζίτες παρουσίαζαν περιορισμένη δράση ως φάρμακα διότι υφίστανται χημική ή ενζυματική απενεργοποίηση σχετικά εύκολα, δεν μεταβολίζονται επαρκώς προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, παρουσιάζουν μικρό χρόνο ημιζωής και τοξικότητα. Ένα άλλο αρκετά σημαντικό πρόβλημα είναι η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και καρκινικών κυττάρων προς αυτές τις ενώσεις. Έτσι, το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε σε πυρανονουκλεοζίτες, δηλαδή νουκλεοζίτες που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη. Ήδη αρκετοί πυρανονουκλεοζίτες έχουν αξιολογηθεί όσον αφορά την βιολογική τους δράση και έχουν επιδείξει αντιογκογόνες και αντιβιοτικές ιδιότητες όπως επίσης και

ικανότητα να αποτελέσουν δομικές μονάδες για την σύνθεση νουκλεϊκών οξέων (Tsoukala E *et al*, 2008; Haouz A. *et al*, 2003; Vastmans K. *et al*, 2001)

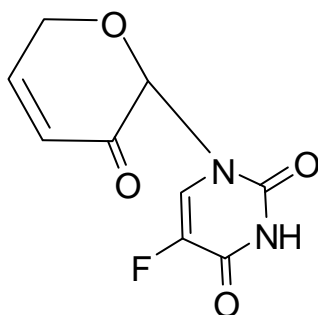
### **1.2.7 Κετο-πυρανονουκλεοζίτες**

Οι κετοπυρανονουκλεοζίτες αποτελούν ακόμα μια κατηγορία νουκλεοζιτών με ενδιαφέρουσα βιολογική δράση, παρουσιάζοντας αξιόλογη αντικαρκινική και αντιιική δράση (Tzioumaki N. *et al*, 2010; Agelis G. *et al*, 2008; Komiotis D. *et al*, 2008; Agelis G. *et al*, 2007; Manta S. *et al*, 2007) Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες φέρουν στο σάκχαρό τους μια κετονομάδα, η οποία προέρχεται από οξειδωση υδροξυομάδας. Τα κετοφουρανοανάλογα είχαν διερευνηθεί στο παρελθόν για πιθανή αντιιική και αντικαρκινική δράση, αλλά αποδείχθηκαν ιδιαίτερα ασταθή, οπότε το ενδιαφέρον στράφηκε προς την μελέτη των κετοπυρανονουκλεοζιτών (Tzioumaki N. *et al*, 2010; Agelis G. *et al*, 2008; Egron *et al*, 2005; Antonakis K. and Leclercq F. 1971; Antonakis K. and Leclercq F. 1970). Οι κετοπυρανονουκλεοζίτες παρουσιάζουν επίσης και συνθετικό ενδιαφέρον διότι με πυρηνόφιλη προσθήκη, μπορούν να προστεθούν αμινοομάδες στο σάκχαρό τους ή διακλαδισμένες αλυσίδες (Egron M. *et al*, 2005; Antonakis K. 1989; Halmos T. and Antonakis K. 1975; Antonakis K. and Egron M. 1973).

### **1.2.8 Ακόρεστοι κετοπυρανονουκλεοζίτες**

Μια ενδιαφέρουσα τροποποίηση των κετοπυρανονουκλεοζιτών είναι η δημιουργία διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα στον δακτύλιο του σακχάρου σε σχέση α,β ως προς την κετονομάδα που αποδίδει ένα ακόρεστο ανάλογο του αρχικού κετοπυρανονουκλεοζίτη (εικόνα 6). Η δημιουργία διπλού δεσμού έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι κάνει τον δακτύλιο του σακχάρου πιο άκαμπτο, όπως δηλαδή ενός φούρανονουκλεοζίτη, διατηρώντας όμως την βιολογική σταθερότητα του πυραονικού δακτυλίου. Αυτό το χαρακτηριστικό κάνει τους

ακόρεστους κετοπυρανονουκλεοζίτες να αποτελούν βιοισοστερή των φυσικών νουκλεοζιτών (Egroun M. *et al*, 2005; Herdewijn and De Clercq, 2001).



Εικόνα 6: 1-(3',4'-Dideoxy-α-pent-3'-enopyranosyl-2'-ulose)-5-fluorouracil  
Παράδειγμα ακόρεστου κετοπυρανονουκλεοζίτη (Tzioumaki N. *et al*, 2010).

Οι ακόρεστοι κετοπυρανονουκλεοζίτες παρουσιάζουν αρκετά ενδιαφέρουσα αντιιική και αντινεοπλασματική δράση, όπως έχουν δείξει αρκετές μελέτες (Tzioumaki N. *et al*, 2010; Manta S. *et al*, 2010; Manta S. *et al*, 2009a,b; Agelis G. *et al*, 2008; Agelis G. *et al*, 2007) Η δράση αυτών των νουκλεοζιτικών αναλόγων δεν περιορίζεται μόνο σε καρκινικές σειρές *in vitro* (Manta S. *et al*, 2008; Halmos T. *et al*, 1983; Antonakis K. and Chouroulinkon I. 1974) αλλά την διατηρούν και σε *in vivo* δοκιμές όπως κατά της λευχαιμίας και άλλων νεοπλασιών (Komiotis D. *Et al*, 1991; Antonakis K. *et al*, 1980; Chouroulinkon I. and Antonakis K. 1977) που σημαίνει πως έχουν επαρκή βιοδιαθεσιμότητα ώστε να μπορούν φτάσουν σε θεραπευτικά επίπεδα στο πλάσμα του αίματος. Ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως αλλά έρευνες έχουν δείξει πως οι κυτταροστατικές και αντιιικές ιδιότητές τους ίσως να οφείλονται στην παρεμπόδιση σύνθεσης DNA, RNA και πρωτεϊνών (Antonakis K. 1975), όπως επίσης και στην αλληλεπίδρασή τους με πρωτεϊνικές ομάδες σουλφυδρυλίου (Halmos T. *et al*. 1983). Μελέτες δομής-δράσης έχουν υποδείξει πως για τις παραπάνω ιδιότητες των κετοπυρανονουκλεοζιτών απαραίτητη είναι η ύπαρξη ηλεκτρονιόφιλου συστήματος C=C-C=O και δεν φαίνεται η δραστηριότητα να επηρεάζεται από την L ή D διάταξη του σακχάρου και την ανωμερική θέση της βάσης (Agelis G. *et al*, 2008; Agelis G. *et al*, 2007 Alaoui M. *et al*,1986).

## 2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Στόχος – σκοπός μελέτης

Μελέτες έχουν δείξει πως οι κετοακόρεστοι πυρανονουκλεοζίτες επιδεικνύουν σημαντική αντικαρκινική και αντιιική δράση (Manta S. *et al*, 2010; Tzioumaki N, *et al*, 2009; Agelis G *et al*, 2008; Komiotis D. *et al*, 2008; Tsoukala E. *et al*, 2007; Agelis G. *et al*, 2007). Το σάκχαρό τους μπορεί να θεωρηθεί ως βιοϊσοστερές του φουρανικού δακτυλίου των φυσικών νουκλεοζιτών, διατηρώντας την σταθερότητα των πυρανοζών (Herdewijn and De Clercq, 2001). Ως επέκταση μιας εκτεταμένης έρευνας στον τομέα της δομής-δράσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων παρασκευάστηκαν πρόσφατα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κετοακόρεστοι νουκλεοζίτες με ετεροκυκλική βάση την φθοροουρακίλη (Tzioumaki *et al*, 2010). Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα της αραβινόζης δρουν ως προφάρμακα, χωρίς όμως να είναι πλήρως γνωστός ο μηχανισμός της βιολογικής τους δράσης. Για να διαπιστωθεί λοιπόν, αν για την παρατηρούμενη κυτταροστατική/κυτταροτοξική δράση είναι υπεύθυνη ολόκληρη η ένωση ή η αποσπώμενη ετεροκυκλική βάση (φθοροουρακίλη, γνωστό ενεργό προφάρμακο), πραγματοποιήθηκε η παρούσα πτυχιακή εργασία.

Συγκεκριμένα, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση του κετοακόρεστου νουκλεοζιτικού αναλόγου της τριφθορομεθυλοουρακίλης με στόχο να συγκριθεί με το αντίστοιχο της φθοροουρακίλης. Δεδομένου ότι η τριφθοροθυμιδίνη -φουρανονουκλεοζίτης με ετεροκυκλική βάση την τριφθορομεθυλοουρακίλη- είναι ισχυρός αναστολέας της συνθάσης της θυμιδίνης, θα ήταν αναμενόμενο και ο αντίστοιχος κετοακόρεστος νουκλεοζίτης της να αποτελεί ισοδύναμο αναστολέα. Στην περίπτωση όμως που ενεργό μεταβολίτη αποτελεί μόνο η ελεύθερη βάση (φθοροουρακίλη) τότε το κετοακόρεστο νουκλεοζιτικό ανάλογο της τριφθορομεθυλοουρακίλης θα εμφανιστεί πολύ λιγότερο δραστικό από το αντίστοιχο της φθοροουρακίλης,

καθώς η τριφθορομεθυλοουρακίλη είναι πολύ πιο δύσκολα μετατρέψιμη στον ενεργό της μεταβολίτη από ότι η φθοροουρακίλη.

Δεδομένων των ανωτέρω κρίθηκε σκόπιμη η σύνθεση και η βιολογική αποτίμηση του κετοακόρεστου πυρανουκλεοζιτικού αναλόγου της τριφθορομεθυλοουρακίλης, με σκοπό να ενισχυθεί ή να αποδυναμωθεί η υπόθεση ότι το πρόσφατα μελετηθέν κετοακόρεστο πυρανουκλεοζιτικό ανάλογο της φθοροουρακίλης δρα ή όχι ως προφάρμακο.



### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Υλικά

##### 3.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων

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

- Πυριδίνη (Panreac, Ισπανία)
- Οξικός ανυδρίτης ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) (Aldrich, Γερμανία)
- Διάλυμα Μεθανόλης ( $\text{MeOH}$ ) (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 Θεικό μαγνήσιο ( $\text{MgSO}_4$ ) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδρο θεικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (Merck, Γερμανία)
- Sodium Thiosulfate ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) (Merck, Γερμανία)
- Τριφθοροουρακίλη (Sigma, Γερμανία)
- Hexamethyldisilazane (HMDS) (Aldrich, Γερμανία)
- Trimethylsilyltrifluoromethane ( $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ ) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- 2,2-dimethoxypropane (DMP) (Aldrich, Γερμανία)
- p-toluenesulfonic acid monohydrate (p-TsOH) (Aldrich, Γερμανία)
- Διάλυμα formic acid ( $\text{HCOOH}$ ) (Panreac, Ισπανία)
- Imidazole (Fluca, Γερμανία)
- Υδρίδιο του ασβεστίου ( $\text{CaH}$ ) (Fluca, Γερμανία)
- Ακετονιτρίλιο ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (Merck, Γερμανία)
- Τολουόλιο (Tol) (Merck, Γερμανία)
- Dimethylformamide (DMF) (Fluca, Γερμανία)
- Dess-Martin Periodinane (Aldrich, Γερμανία)
- Triphenylphosphine ( $\text{Ph}_3\text{P}$ ) (Fluca, Γερμανία)

- Iodoform (Aldrich, Γερμανία)

## 3.2 ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

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

Για τον έλεγχο της αντίδρασης μέσω της χρωματογραφικής μεθόδου TLC, χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F<sub>254</sub>). Η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται ψεκάζοντας με διάλυμα θειικού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 30%, μέσω UV ακτινοβολίας (254 nm) και χρήσης 2,4-δινιτροφαινυλυδραζίνης για την ταυτοποίηση κετονομάδων. Η χρωματογραφία διεκπεραιώθηκε χρησιμοποιώντας τα παρακάτω συστήματα διαλυτών :

- Διάλυμα Α : Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 5:5
- Διάλυμα Β : Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 7:3
- Διάλυμα Γ : Διχλωρομεθάνιο (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) / Μεθανόλη (MeOH) 9.5:0.5

### 3.2.2 Χρωματογραφία στήλης

Για τον καθαρισμό των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με υπο πίεση αέρα (flash chromatography), η οποία ήταν γομωμένη με silica gel (240-400, Merck grade). Ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι:

- Διάλυμα Α : Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 5:5
- Διάλυμα Δ : Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 8:2
- Διάλυμα Ε : Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 4:6
- Διάλυμα Ζ : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 9.8:0.2

### 3.2.3 Ξήρανση διαλυτών

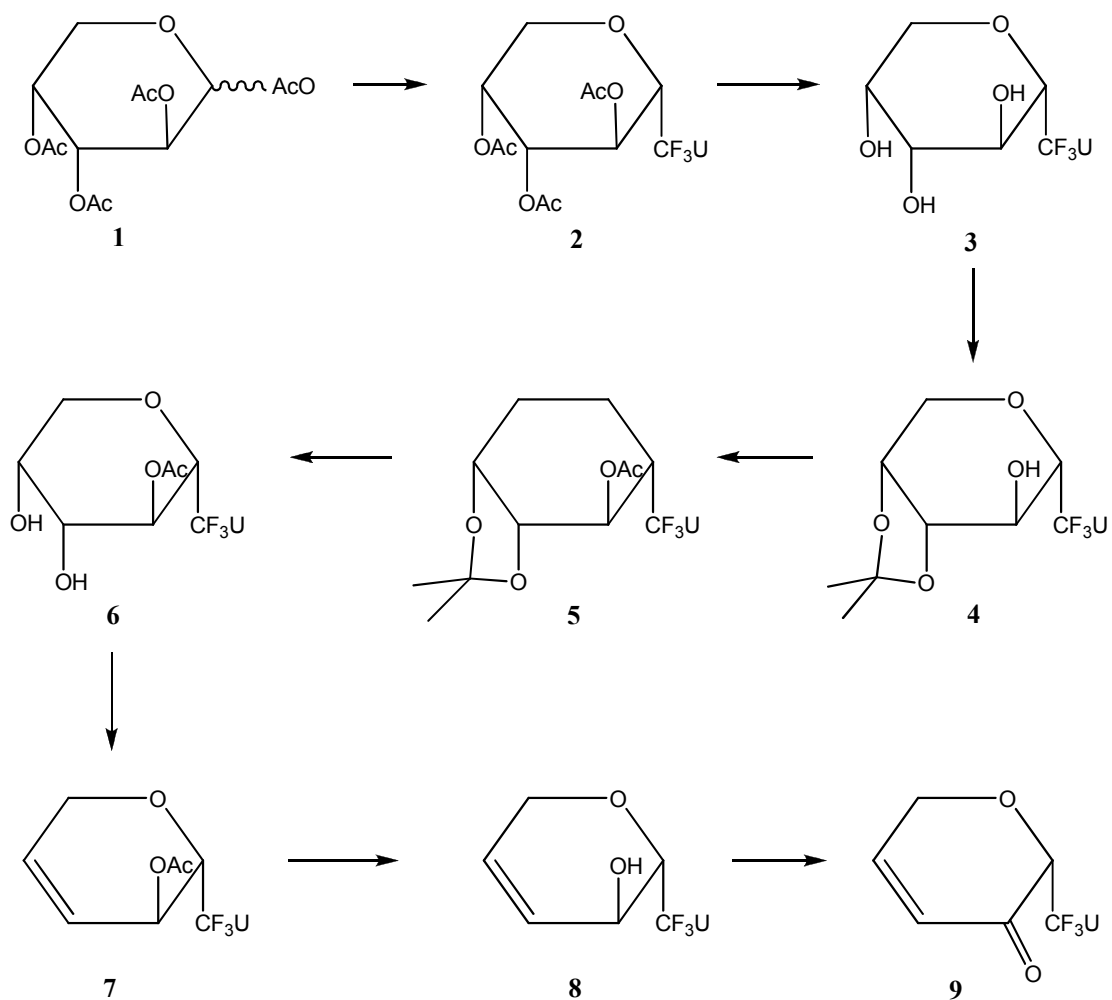
Ορισμένες από τις αντιδράσεις που περιγράφονται, επιβάλλουν την χρήση άνυδρων διαλυτών όπως  $\text{CH}_3\text{CN}$ , ακετόνη, DMF και  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Η ξήρανση του  $\text{CH}_3\text{CN}$  και του DMF γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα  $3\text{\AA}$  (molecular sieves). Το  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ξηραίνεται σε παρόμοια διάταξη παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα  $4\text{\AA}$ . Η ακετόνη ξηραίνεται παρουσία  $\text{MgSO}_4$ .

### 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 400 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για  $^1\text{H}$ . 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



Εικόνα 7: Επισκόπηση της σύνθεσης κετοακόμεστων νουκλεοζιτικών αναλόγων με βάση την τριφθοροουρακίλη

### 3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης

Το πρώτο βήμα της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει τη σύνθεση του νουκλεοζίτη **2** μέσω αντίδρασης της διαθέσιμης στο εργαστήριο ακετυλιωμένης αραβινόζης **1** και της 5-τριφθορομεθυλοουρακίλης. Η συνθετική αυτή διαδικασία περιλαμβάνει την σιλλιλίωση της βάσης με HMDS και την προσθήκη αυτής στην πυρανόζη παρουσία καταλύτη  $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ .

Στην συνέχεια η ένωση **2** απακετυλιώνεται με κορεσμένο διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας για να ληφθεί η πλήρης αποπροστατευμένη ένωση **3** υπό τη μορφή λευκού στερεού.

Εκλεκτική προστασία των ελεύθερων υδροξυλίων των θέσεων 3' και 4' της ένωσης **3**, χρησιμοποιώντας DMP σε ακετόνη, οδήγησε στην ένωση 1-(3',4'-O-isopropylidene- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (**4**).

Το επόμενο βήμα που ακολουθεί είναι η επιλεκτική ακετυλίωση του ελεύθερου υδροξυλίου της θέσεως 3' της ένωσης **4**, η οποία πραγματοποιήθηκε σε πυριδίνη παρουσία  $\text{Ac}_2\text{O}$ , από όπου ελήφθη η ένωση **5** υπό τη μορφή λευκού στερεού.

Ακολουθεί η διάνοιξη του ακετονιδίου της ένωσης **5** όπου έδωσε την ένωση 1-(2'-O-acetyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (**6**).

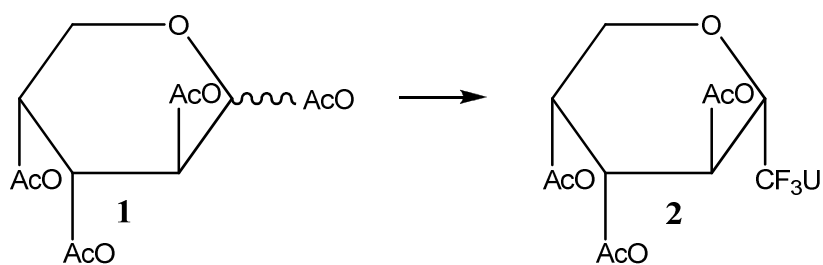
Η δημιουργία διπλού δεσμού μεταξύ των θέσεων 3' και 4' για την παρασκευή του ακόρεστου νουκλεοζίτη **7**, επιτυγχάνεται με την αντίδραση του προϊόντος **6** με ιωδοφορμίο, ιμιδαζόλη και  $\text{P}_3\text{P}$  σε ικανοποιητική απόδοση (απόδοση 65%).

Η συνθετική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απόσπαση της ακετυλομάδας της θέσεως 3' πραγματοποιήθηκε με διάλυμα κορεσμένης μεθανολικής αμμωνίας.

Τέλος έπειτα από οξείδωση του υδροξυλίου του προϊόντος **8** με διάλυμα Dess-Martin periodinane λήφθηκε η επιθυμητή ένωση 1-(3',4'-dideoxy- $\alpha$ -pent-3'-enopyranosyl-2'-ulose)-5-trifluoromethyluracil (**9**) υπό τη μορφή λευκού στερεού.

### 3.3.3 Σύνθεση προϊόντων με βάση τη τριφθοροουρακίλη

#### 3.3.3.1. Σύνθεση της 1-(2',3',4'-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (**2**)



Ένα διάλυμα της τριφθορομεθυλοουρακίλης (990.49 mg, 5.5 mmol), του HMDS (1.45 mL, 6.82 mmol) και της σακχαρίνης (46.3 mg, 0.253 mmol) σε άνυδρο CH<sub>3</sub>CN (21.1 mL) θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα στους 120 °C υπό άζωτο. Όταν το μίγμα έγινε διαυγές, προστέθηκαν η 1,2,3,4-tetra-O-acetyl-D-arabinopyranose (**1**) (1.59 g, 5 mmol) και Me<sub>3</sub>SiOSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (7 mmol, 1.26 mL). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα (TLC, Πίνακας 1) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 55 °C. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO<sub>3</sub>, αραιώθηκε με EtOAc, εκχυλίστηκε με νερό και μετά από διήθηση συμπυκνώθηκε. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος αφού πρώτα διαλύθηκε σε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα A. Το επιθυμητό προϊόν **2** (2.33 g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού.

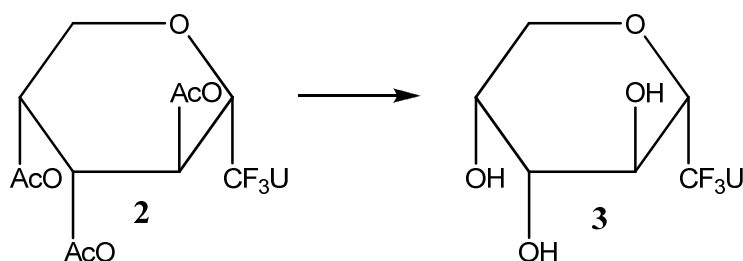
Πίνακας 1: Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος **2**

TLC (Σύστημα A)	R <sub>f</sub> = 0,42
Σημείο τήξεως	84 °C

Απόδοση	88 %
---------	------



### 3.3.3.2. Σύνθεση της 1-( $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (**3**)

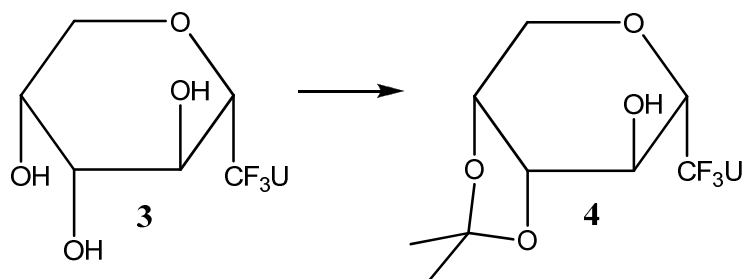


Η ένωση **2** (1.92 g, 4.4 mmol) που ελήφθη από την προηγούμενη διαδικασία, προστέθηκε σε 184.8 mL κορεσμένου διαλύματος στους 0 °C, αμμωνίας/MeOH. Το διάλυμα αναδεύτηκε ολόκληρη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώθηκε υπό μειωμένη πίεση. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC με διαλύτη EtOAc (πίνακας 2). Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης EtOAc. Το επιθυμητό προϊόν **3** (1.33 g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού.

Πίνακας 2: Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος **3**

TLC (EtOAc)	R <sub>f</sub> = 0,15
Σημείο τήξεως	86 °C
Απόδοση	97 %

### 3.3.3.3 Σύνθεση της 1-(3',4'-O-isopropylidene- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (**4**)

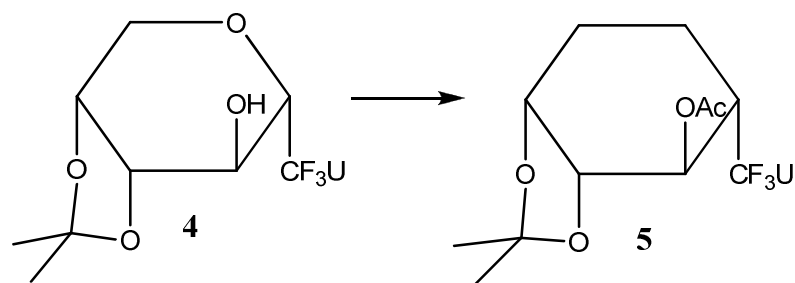


Σε ένα υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **3** (1.33 g, 4.26 mmol) με άνυδρη ακετόνη (59.19 mL) και DMP (3 mL) προστέθηκε *p*-TsOH (138 mg, 0.72 mmol). Μετά από 3 ώρες το μίγμα της αντίδρασης εξουδετερώθηκε με τριαιθυλαμίνη. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC σε EtOAc (πίνακας 3). Στη συνέχεια από το μίγμα απομακρύνθηκαν οι διαλύτες υπό υψηλό κενό και ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Δ. Το επιθυμητό προϊόν **4** (1.17g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού.

Πίνακας 3: Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος **4**

TLC (EtOAc)	R <sub>f</sub> = 0,6
Σημείο τήξεως	106.2 °C
Απόδοση	78 %

### 3.3.3.4 Σύνθεση της 1-(2'-O-acetyl-3',4'-O-isopropylidene-α-D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (5)

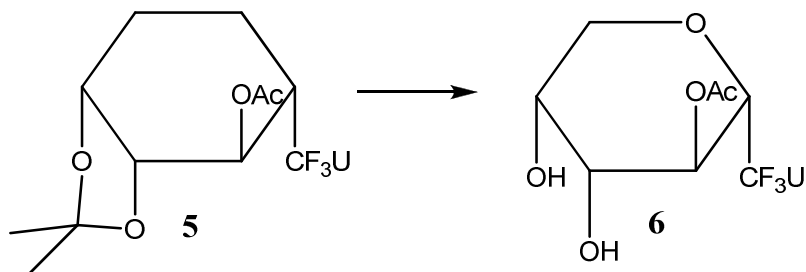


Σε ένα διάλυμα της ένωσης **4** (1.17 gr, 3.33 mmol) σε pyridine (2.79 mL) προστέθηκε  $\text{Ac}_2\text{O}$  (1.5 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) το διάλυμα κρύωσε στους 0 °C και προστέθηκε μεθανόλη (1.5 mL) για να καταστείλει την αντίδραση. Οι διαλύτες απομακρύνθηκαν υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε EtOAc και εκχυλίστηκε αρχικά με κορεσμένο διάλυμα  $\text{NaHSO}_4$  και στη συνέχεια με κορεσμένο διάλυμα  $\text{NaHCO}_3$ . Η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , διηθήθηκε και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα E. Το επιθυμητό προϊόν **5** (1.18 g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού.

Πίνακας 4: Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος **5**

TLC (Σύστημα A)	$R_f = 0,37$
Απόδοση	90 %

### 3.3.3.5 Σύνθεση της 1-(2'-O-acetyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (**6**)

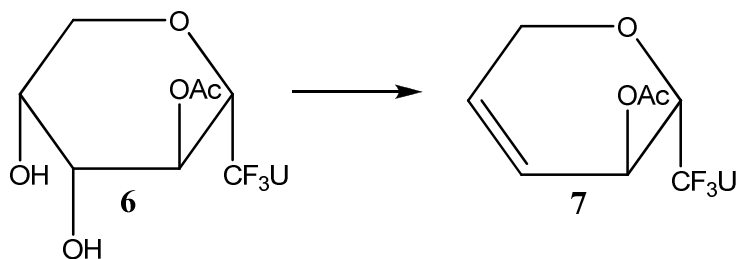


Η ένωση **5** (1.18 g, 2.99 mmol) που ελήφθη από την προηγούμενη διαδικασία, διαλύθηκε σε ένα μίγμα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9.8 mL) και HCOOH (9.8 mL, 90%). Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό άζωτο, διαλύθηκε σε toI, έπειτα σε MeOH και στη συνέχεια συμπυκνώθηκε υπό κενό μέχρις ξηρού. Ακολούθησε ο καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης EtOAc. Το επιθυμητό προϊόν **6** (1.00 g) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου λαδιού. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC (πίνακας 5).

Πίνακας 5: Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος **6**

TLC (EtOAc)	R <sub>f</sub> = 0,28
Απόδοση	95 %

### 3.3.3.6 Σύνθεση της 1-(2'-O-acetyl-3',4'-dideoxy-α-D-glycero-pent-3'-enopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (7)

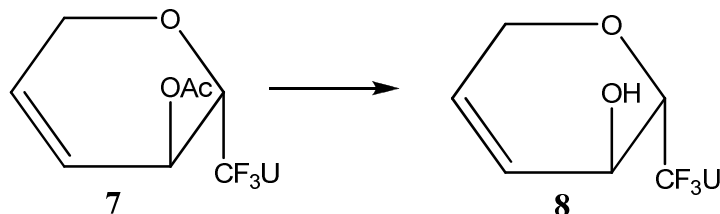


Σε μείγμα που αποτελείται από την ένωση **6** (1g, 2.85 mmol) σε 22.9 mL ξηρού διαλύματος Tol/DMF (4:1), προστίθεται imidazole (406.98 mg, 5.98 mmol), Ph<sub>3</sub>P (3.14g, 11.965mmol) και iodoform (2.35g, 5.98mmol). Το μείγμα θερμαίνεται στους 120 °C υπό άζωτο για 2.5h, συμπυκνώνεται υπό κενό και το υπόλειμμα διαλύεται σε EtOAc, πλένεται με κορεσμένο NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> και νερό. Η οργανική φάση ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ο διαλύτης απομακρύνεται με κενό και ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης με διάλυμα B δίνοντας την ένωση **7** (592.4 mg) υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος **7**

TLC (Σύστημα B)	R <sub>f</sub> = 0,74
Απόδοση	65 %

### 3.3.3.7 Σύνθεση της 1-(3',4'-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-pent-3'-enopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (**8**)

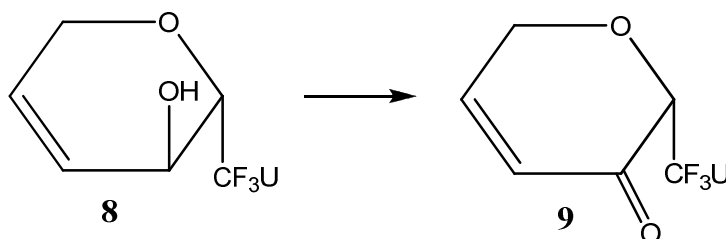


Η ένωση **7** (592.4 mg, 1.85 mmol) που ελήφθη από την προηγούμενη διαδικασία, προστέθηκε σε 25.77 mL κορεσμένου διαλύματος στους 0 °C, αμμωνίας/MeOH. Το διάλυμα αναδεύτηκε ολόκληρη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώθηκε υπό μειωμένη πίεση. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC, διάλυμα B (πίνακας 7). Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα A. Το επιθυμητό προϊόν **8** (489 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού.

Πίνακας 7: Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος **8**

TLC (Σύστημα B)	R <sub>f</sub> = 0,5
Σημείο τήξεως	120°C
Απόδοση	95 %

### 3.3.3.8 Σύνθεση της 1-(3',4'-dideoxy- $\alpha$ -pent-3'-enopyranosyl-2'-ulose)-5-trifluoromethyluracil (**9**)

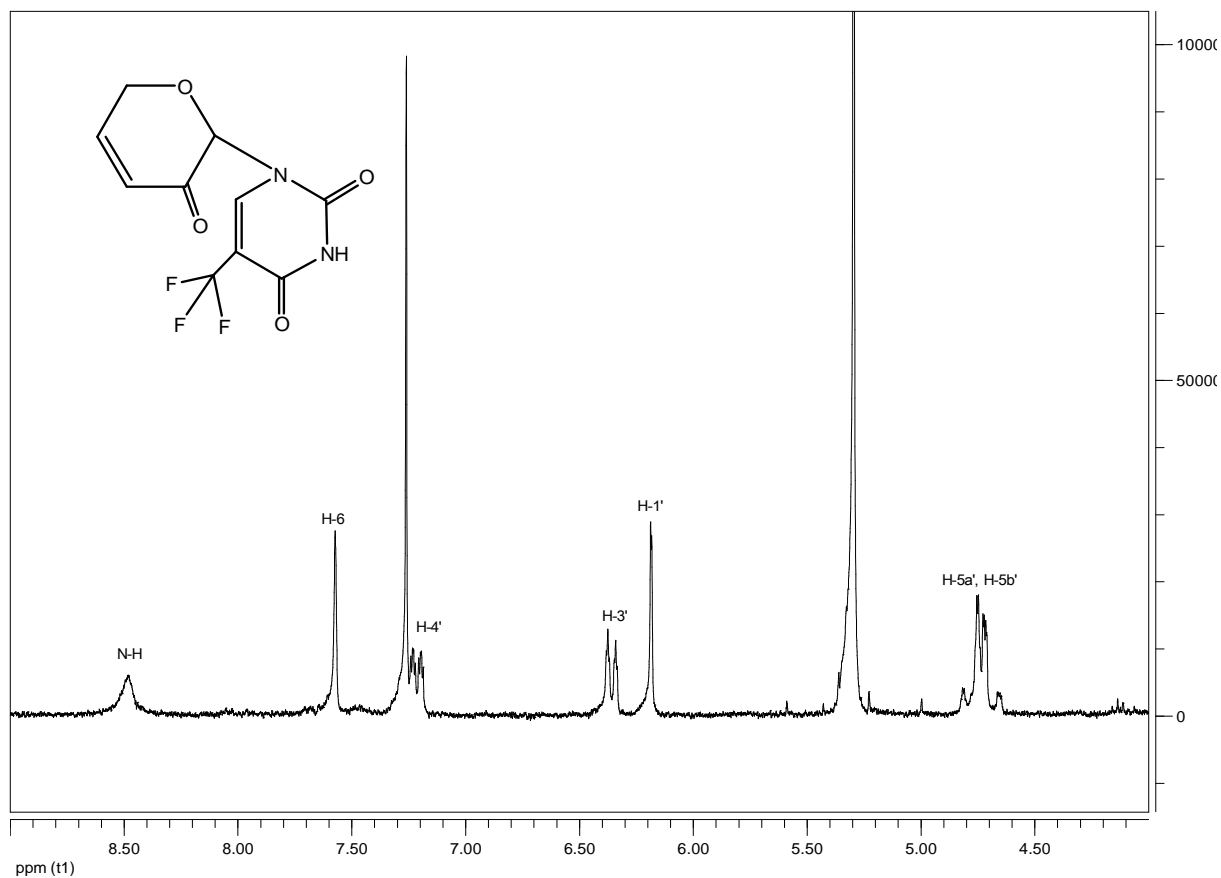


Το προϊόν **8** (489 mg, 1.76 mmol) αρχικά διαλύεται σε ποσότητα ξηρού CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (13.42 ml). Dess-Martin periodinane (915.32 mg, 2.28 mmol) διαλύεται σε ξεχωριστή φιάλη σε ποσότητα ξηρού CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.89 ml). Το διάλυμα του προϊόντος **8** προστίθεται στο διάλυμα του Dess-Martin και ακολουθεί ανάδευση. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα εκχυλίζεται διαδοχικά με σύστημα διαλυτών EtOAc/διαιθυλαιθέρα 1:1, κορεσμένο διάλυμα Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> και τέλος με νερό. Η οργανική φάση ξηραίνεται παρουσία άνυδρου Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, διηθείται και ο διαλύτης αφαιρείται υπο κενό. Ο τελικός καθαρισμός γίνεται με χρωματογραφία στήλη με διαλύτη έκλουσης το διαλύτη Z, και δίνει το τελικό προϊόν **9** (289.59 mg) υπό τη μορφή λευκού στερεού (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος **9**

TLC (Σύστημα Γ)	R <sub>f</sub> = 0,51
Σημείο τήξεως	189-191°C
Απόδοση	58 %

#### 4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ $^1\text{H}$ NMR



Εικόνα 8: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του επιθυμητού προϊόντος 1-(3',4'-dideoxy- $\alpha$ -pent-3'-enopyranosyl-2'-ulose)-5-trifluoromethyluracil (**9**)



## 5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ερευνητικές προσπάθειες για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως κακοήθειες νεοπλασίες και ιικών μολύνσεων έχουν στραφεί στην ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα. Κύριος στόχος των ερευνητικών προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων, τα οποία να παρουσιάζουν εκλεκτικότητα όσον αφορά στην δράση τους και να έχουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

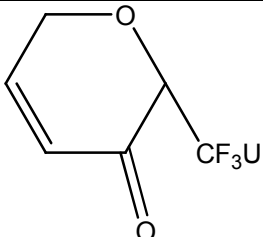
Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ενός κετοακόρεστου πυρανονουκλεοζίτη με την κετονομάδα στην θέση 2' του σακχάρου και διπλό δεσμό μεταξύ των θέσεων 3' και 4' που φέρει ως βάση την 5-τριφθορομεθυλοουρακίλη (**9**). Πέραν της συνθέσεως, αυτό το νουκλεοζιτικό ανάλογο αποτιμήθηκε όσον αφορά στις κυτταροστατικές του ιδιότητες.

Το συνθετικό μέρος συνιστάται από λίγα βήματα τα οποία συνοδεύονται από ικανοποιητικές αποδόσεις. Το πρώτο βήμα της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει την σύνθεση του νουκλεοζίτη **2** μέσω αντίδρασης της ακετυλιωμένης αραβινόζης και της βάσης 5-τριφθορομέθυλοουρακίλη με απόδοση 88%. Ακολουθεί η απακετυλίωση της 1-(2',3',4'-tri-O-acetyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (**2**) με απόδοση 97%, και η εκλεκτική προστασία των υδροξυλίων στις θέσεις 3' και 4' που έδωσε την ένωση **4** με απόδοση 78%. Για την λήψη της ένωσης 1-(2'-O-acetyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (**5**) ακετυλιώθηκε επιλεκτικά το υδροξύλιο της θέσης 2' με καλή απόδοση 90%. Ακολούθησε η διάνοιξη του ακετονιδίου της ένωσης **5** όπου έδωσε την ένωση 1-(2'-O-acetyl- $\alpha$ -D-arabinopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (**6**) με απόδοση 95%. Η δημιουργία του διπλού δεσμού μεταξύ των θέσεων 3' και 4' είχε απόδοση 65% και έδωσε τον ακόρεστο νουκλεοζίτη 1-(2'-O-acetyl-3',4'-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-pent-3'-enopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (**7**). Ακολούθησε αποπροστασία της θέσης 3' με απόδοση 95%. Το τελικό προϊόν 1-(3',4'-dideoxy- $\alpha$ -pent-3'-enopyranosyl-2'-ulose)-5-trifluoromethyluracil (**9**) προέκυψε από την οξειδωση του υδροξυλίου της θέσης 2' της ένωσης 1-(3',4'-dideoxy- $\alpha$ -D-

glycero-pent-3'-enopyranosyl)-5-trifluoromethyluracil (**8**) προς δημιουργία κετονομάδας, με απόδοση 58%.

Η ένωση **9** ταυτοποιήθηκε με την ανάλυση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H}$  NMR. Στο φάσμα της ένωσης 1-(3',4'-dideoxy- $\alpha$ -pent-3'-enopyranosyl-2'-ulose)-5-trifluoromethyluracil (**9**) (εικόνα 8) το σήμα του πρωτονίου H-1' του δακτυλίου του σακχάρου εμφανίζεται ως μια απλή κορυφή στην περιοχή 6.2 ppm. Τα σήματα των πρωτονίων H-3' και H-4', εμφανίζονται ως δυο διπλές κορυφές στις περιοχές 6.4 ppm και 7.2 αντίστοιχα. Χαρακτηριστική είναι η έλλειψη της κορυφής H-2' που πιστοποιεί την ύπαρξη της κετονομάδας στην θέση 2'. Στο φάσμα επίσης διακρίνονται τα σήματα H-5a' και H-5b' του σακχάρου σαν μια πολλαπλή κορυφή στην περιοχή 4.61-4.81 ppm. Το σήμα της δευτεροταγούς αμίνης της βάσης 5-τριφθορομέθυλοουρακίλης εμφανίζεται ως απλή κορυφή στην περιοχή των 8.50 ppm. Το σήμα H-6 της βάσης παρουσιάζεται ως απλή κορυφή στην περιοχή 7.65 ppm του φάσματος.

Ο νέος κετοακόρεστος πυρανοουκλεοζίτης 1-(3',4'-dideoxy- $\alpha$ -pent-3'-enopyranosyl-2'-ulose)-5-trifluoromethyluracil που παρασκευάστηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μελετήθηκε ως προς την αντικαρκινική του δράση στο Rega Institute for Medical Research στο Βέλγιο. Ο ουκλεοζίτης δοκιμάστηκε για κατασταλτική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων μαστού ποντικού FM3A, των κυττάρων λευχαιμίας L1210 των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων CEM καθώς επίσης και κατά του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων HeLa. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 9.

Ένωση	IC <sub>50</sub> (μM)			
	L1210	FM3A	CEM	HeLa
	23 ± 12	42 ± 2	39 ± 6	34 ± 3

Πίνακας 9 : Ανασταλτική δράση της ένωσης 1-(3',4'-Dideoxy-α-pent-3'-enopyranosyl-2'-ulose)-5-trifluoromethyluracil έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων L1210, FM3A, HeLa και CEM

Στον πίνακα 9, φαίνονται οι συγκεντρώσεις της ένωσης **9** που κατέστειλαν την ανάπτυξη της εκάστοτε κυτταρικής σειράς κατά 50% (IC<sub>50</sub>), οι οποίες παρουσιάζουν διακύμανση από 11 μM έως 44 μM. Όπως καταδεικνύεται από αυτές τις τιμές ο νέος κετοακόρεστος νουκλεοζίτης της 5-τριφθορομεθυλοουρακίλης δεν παρουσίασε αξιόλογη κατασταλτική δράση έναντι των κυτταρικών σειρών L1210, FM3A, CEM και HeLa.

Όπως προαναφέρθηκε, εάν το κετοακόρεστο αραβινονουκλεοζιτικό ανάλογο της φθοροουρακίλης ήταν αναστολέας της συνθάσης της θυμιδίνης, τότε θα έπρεπε αναλόγως και το κετοακόρεστο ανάλογο της τριφθορομέθυλοουρακίλης να είναι ουσιαστικά ισοδύναμο. Στην περίπτωση όμως που μόνο η ελεύθερη βάση, δηλαδή μόνο η φθοροουρακίλη, είναι ο ενεργός μεταβολίτης, τότε θα έπρεπε το νουκλεοζιτικό κετο ακόρεστο ανάλογο της τριφθορομεθυλοουρακίλης να είναι πολύ λιγότερο κυταροτοξικό από το νουκλεοζιτικό ανάλογο της φθοροουρακίλης, από τη στιγμή που η ελεύθερη βάση τριφθορομεθυλοουρακίλη είναι πολύ πιο δύσκολα μετατρέψιμη στον ενεργό της μεταβολίτη από ότι η φθοροουρακίλη.

Αυτό ακριβώς αποδείξαμε με την όλη βιολογική πειραματική διαδικασία, ότι δηλαδή η φθοροουρακίλη και το προφάρμακό της έχουν την ίδια κυτταροστατική δράση και ότι είναι πιο ανασταλτικά από το κετοακόρεστο νουκλεοζιτικό ανάλογο-προφάρμακο της τριφθορομεθυλοουρακίλης. Αυτή είναι μια επιπλέον ένδειξη ότι στο μόριο πρώτα λαμβάνει χώρα η διάσπαση

της βάσης για να επιτευχθεί αυτή η βιολογική δράση μιας και η φθοροουρακίλη είναι από μόνη της ενεργό προφάρμακο.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botic, T.; Cencic, A.; Komiotis D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5448.
- Agelis G.; Tzioumaki N.; Tselios T.; Botic, T.; Cencic, A.; Komiotis D. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1366.
- Alaoui, M.; Lasnes, C.; Antonakis, K.; Chouroulinkov, I. *Mutagenesis* **1986**, *1*, 411.
- Antonakis, K. "Hexopyranose nucleosides". In *Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C)*; Elsevier, Amsterdam, **1989**, *4*, p. 241.
- Antonakis, K.; Arvor, M. J. *C. R. Acad. Sci.* **1971**, *272-c*, 1982.
- Antonakis, K.; Chouroulinkov, I. *Biochem. Pharmacol.* **1974**, *23*, 2095.
- Antonakis, K. *Chimia* **1975**, *29*, 59.
- Antonakis, K.; Egron, M. J. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 468.
- Antonakis, K.; Leclercq, F. *C. R. Acad. Sci., Ser. C* **1970**, *271*, 1197.
- Antonakis, K.; Leclercq, F. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1971**, 2142.
- Antonakis, K.; Halmos, T.; Bach, J.; Chouroulinkov, I. *Eur. J. Med. Chem.* **1980**, *15*, 237.
- Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* **1995**, *67*, 155.
- Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1879.
- Balatsos, N. A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6044–6051
- Balzarini, J. *Pharmacy World Sci.* **1993**, *16*, 113.
- Benjamin Lewin. **(2003)** *Genes VIII*,: 6- 8.
- Berg, J. M.; Tymoczko J. L., Stryer L. **(2001)**. Βιοχημεία (Τόμος Ι) Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (p) 329-351.
- Brady, R. C.; Bernstein, D. I. *Antiviral Res.* **2001**, *61*, 73.
- Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* **2010**.
- Chong, Y.; Choo, H.; Lee, S.; Choi, Y.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4888.

Chong, Y.; Gumina, G.; Mathew, J. S.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2003** *45*, 3245.

Chouroulinkov, I.; Antonakis, K. *C. R. Acad. Sci. Hebd Seances Acad. Sci. D.* **1977**, *285*, 1021.

Clark, J. L.; Mason, J. C.; Hollecker, L.; Stuyver, L. J.; Tharnish, P. M.; McBrayer, T. R.; Otto, M. J.; Furman, A. P.; Schinazi, R. F.; Watanabe, K. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1712.

Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 365.

Christopher, J. Burns, Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Hepatitis C Virus (HCV), *Current Medicinal Chemistry- Anti-Infective Agents*, Vol. 4, No. 2, 2005.

De Clercq, E. *Biochim Biophys Acta.* **2002**, *1587*, 258.

Egron, M. J. J.; Komiotis D.; Dorange, I.; Herscovici, J.; Ollapally, A. P.; Antonakis, K. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2005**, *24*, 243–246.

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

Halliwell, B., (2001). Free Radicals and other reactive species in disease. *Encyclopaedia of life sciences*

Halmos, T.; Cardon, A.; Antonakis, K. *Chem.-Biol. Interactions* **1983**, *46*, 11.

Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4963.

Herdewijn, P.; De Clercq, E., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1591.

John M. Clark, Jr and Robert L. Switzer, Πειραματική βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1992.

Khan, A. R.; Mulligan, K. X.; Redda, K. K.; Ollapally, A. P. *Synth. Commun.* **2002**, *32*, 1023.

Komiotis D.; Agelis, G.; Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E. *J. Carb. Chem.* **2006**, *25*, 441.

Komiotis D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic acids* **1991**, *10*, 431.

Komiotis D.; Lim, C. T.; Dieter, J. P.; Le Breton, G. C.; Venton, D. L. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3033.

Komiotis D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* **2008**, *7*, 219.

- Leclercq, F.; Antonakis, K. *Carbohydr. Res.* **1988**, *181*, 217 and references cited therein.
- Leclercq, F.; Antonakis, K. *Carbohydr. Res.* **1989**, *193*, 307.
- Lee, K.; Choi, Y.; Gumina, G.; Zhou, W.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1313.
- Lin, T. S.; Luo, M. Z.; Liu, M. C.; Clarkatzenburg, R. H.; Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H.; Mancini, W. R.; Birnbaum, G. I.; Gabe, E.; Giziewicz, J. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2607.
- Lui, V. W. Y. W.; Lau, C. P. Y. P.; Cheung, C. S. F. S.; Ho, K.; Ng, M. H. L. H.; Cheng, S. H. H.; Hong, B.; Tsao, S.-W. W.; Tsang, C. M. M.; Lei, K. I. K. I.; Yamasaki, Y.; Mita, A.; Chan, A. T. *Biochemical pharmacology* **2010**, *79*, 1772–1780.
- Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencic, A.; Komiotis D. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2007**, *15*, 980–987
- Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencic, A.; Komiotis D. *European journal of medicinal chemistry* **2008**, *43*, 420–428
- Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevsek, A.; Pamulapati, R. T. T.; Cencic, A.; Balzarini, J.; Komiotis D. *European journal of medicinal chemistry* **2009**, *44*, 2696–2704
- Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Kiritsis, C.; Balzarini, J.; Komiotis D. *Bioorganic chemistry* **2010**, *38*, 48–55.
- Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Panagiotopoulou, A.; Pelecanou, M.; Balzarini, J.; Komiotis D. *European journal of medicinal chemistry* **2009**, *44*, 4764–4771
- Matsuda, A.; Nakajima, Y.; Azuma, A.; Tanaka, M.; Sasaki, T. *J. Med. Chem.* **1991b**, *34*, 2917.
- Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 105.
- Matsuda, A.; Takenuki, K.; Sasaki, T.; Ueda, T. *J. Med. Chem.* **1991a**, *34*, 812.
- McMurry, John Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, **(2000)** : 151- 152, 905
- Ollapally, A. P.; Dorange, I. B.; Whitaker, T. L. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*, 703.

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

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

Somsák, L.; Czifrák, K.; Tóth, M.; Bokor, E.; Chrysina, E. D.; Alexacou, K.-M. M.; Hayes, J. M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D. D.; Zographos, S. E.; Oikonomakos, N. G. *Current medicinal chemistry* **2008**, *15*, 2933–2983.

Somsák, L.; Nagy, V.; Hadady, Z.; Docsa, T.; Gergely, P. *Current pharmaceutical design* **2003**, *9*, 1177–1189.

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

Szafraniec, S. I.; Stachnik, K. J.; Skierski, J. S. *Acta poloniae pharmaceutica* **2004**, *61*, 297–305.

Tiwari, K. N.; Shortnacy-Fowler, A. T.; Parker, W. B.; Waud, W. R.; Secrist, J. A. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2009**, *28*, 657–677.

Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J. M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis D.; Leonidas, D. D. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, *18*, 3413–3425.

Tsoukala, E.; Agelis, G.; Dolinsek, J.; Botić, T.; Cencic, A.; Komiotis D. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2007**, *15*, 3241–3247.

Tsoukala, E.; Manta, S.; Tzioumaki, N.; Agelis, G.; Komiotis D. *Carbohydrate research* **2008**, *343*, 1099–1103.

Tzioumaki N.; Manta S.; Tsoukala E.; Voorde J. V.; Liekens S.; Komiotis D.; Balzarini J. *ChemMedChem* **2010**, submitted.

Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Manta, S.; Agelis, G.; Balzarini, J.; Komiotis D. *Archiv der Pharmazie* **2009**, *342*, 353.

Undurti N. Das, *Med Sci Monit*, **2002**, *8*, 79.

Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3154.

Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12757.



Vender, M. D.; Sherman, P. D.; Luciano, P. D.; Tsakoulos, D. M.; Φυσιολογία του ανθρώπου: μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού. Εκδόσεις Πασχαλίδης (8<sup>η</sup> έκδοση) **2001**.

Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 417.

Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 2319.

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