

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΤΟΥ

ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ**

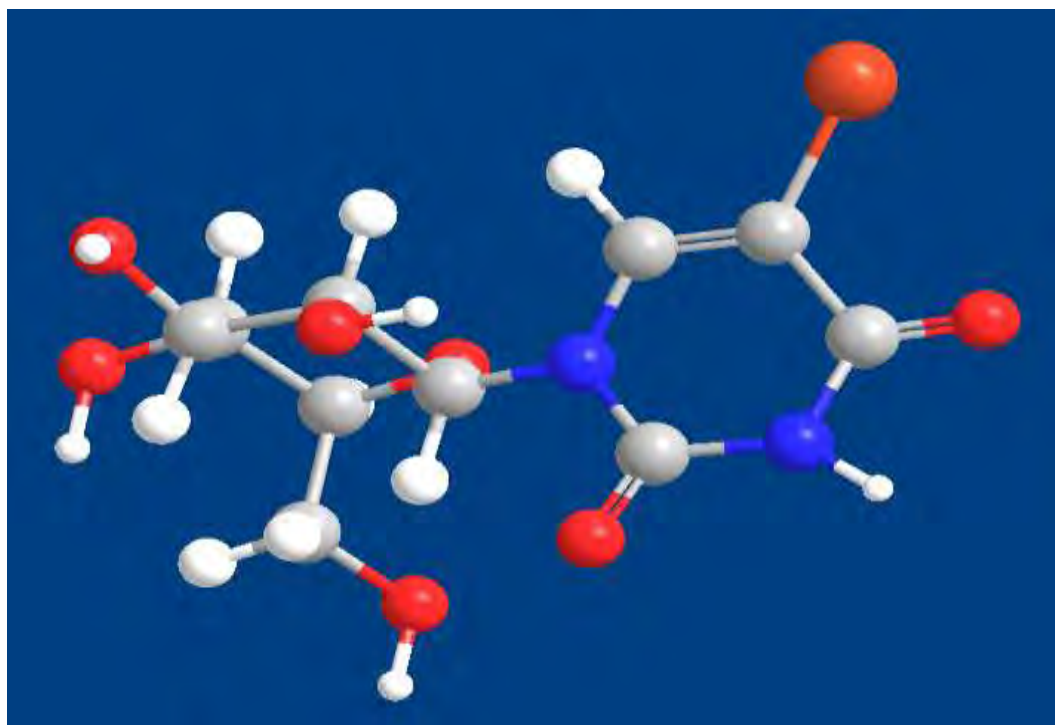
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΑΠΑΚΥΡΙΤΣΗ ΜΥΡΤΙΛΑ**

*ΣΥΝΘΕΣΗ 5-ΑΛΟΓΟΝΟ ΠΥΡΙΜΙΔΙΝΟ ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ*

*ΩΣ ΝΕΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ*

*ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ*



ΛΑΡΙΣΑ 2011

**Θέμα:**

Σύνθεση 5- αλογονο πυριμιδινό πυρανονουκλεοζιτών ως νέοι αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

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

**Λεωνίδας Δημήτριος** –Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

Ευχαριστίες	4
Εισαγωγή	6
Νουκλεοζίτες	7
Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί, αντιυικοί και αντιοξειδωτικοί παράγοντες	8
Γλυκοζιτικά και νουκλεοζιτικά παράγωγα ως αντιδιαβητικά	9
Σκοπός μελέτης	15
Πειραματικό μέρος	16
<i>Γενική μεθοδολογία</i>	17
Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	17
Χρωματογραφία στήλης	17
Ξήρανση διαλυτών	18
Ταυτοποίηση ενώσεων	18
<i>Πειραματική διαδικασία</i>	19
Επισκόπηση συνθετικής οδού	19
Μεθοδολογία σύνθεσης	19
Σύνθεση 1,2,3,4,6-πεντα- <i>O</i> -ακετυλο- <i>D</i> -γλυκοπυρανόζης	20
Σύνθεση 1 - (2,3,4,6-τετρα- <i>O</i> -ακετυλο-β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδο ουρακίλης	21
Σύνθεση 1 - (2,3,4,6-τετρα- <i>O</i> -ακετυλο-β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο)-5-χλωρο ουρακίλης	23
Σύνθεση 1 - (2,3,4,6-τετρα- <i>O</i> -ακετυλο-β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο)-5-βρωμο ουρακίλης	24
Σύνθεση 1 - (2,3,4,6-τετρα- <i>O</i> -ακετυλο-β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο)-5-φθορο ουρακίλης	25
Σύνθεση 1 - (β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο) – 5 – ιωδοουρακίλης	26
Σύνθεση 1 - (β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο) – 5 – χλωροουρακίλης	27
Σύνθεση 1 - (β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο) – 5 – βρωμοουρακίλης	28
Σύνθεση 1 - (β- <i>D</i> -γλυκοπυρανοζυλο) – 5 – φθοροουρακίλης	29
Ταυτοποίηση ενώσεων με NMR	30
<b>NMR</b>	<b>31</b>

Πίνακας <b>Ki</b>	<b>34</b>
Αποτελέσματα – Συζήτηση	<b>35</b>
Βιβλιογραφία	<b>36</b>

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*Ήθελα να γίνω χημικός. Έγινα όμως γεωπόνος. Όντας οπαδός της δια βίου μάθησης, οι επιλογές μου και οι ευνοϊκές συγκυρίες με ώθησαν στο να ασχοληθώ με την Χημεία και μάλιστα την Βιο-οργανική Χημεία στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου διατριβής.*

Η παρούσα, λοιπόν, μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Είμαι από καρδιάς ευγνώμων στον **επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Κομιώτη** για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το ιδιαίτερα ενδιαφέρον αυτό θέμα καθώς και για τις πολύτιμες και εποικοδομητικές υποδείξεις του. Η βοήθεια του ήταν ουσιαστική δεδομένου ότι οι γνώσεις, η εμπειρία και ο κατανοητός τρόπος της διδασκαλίας του έκαναν τα δύσκολα, εύκολα για μένα.

Τις θερμές ευχαριστίες μου στη Δρ. κα. Στυλιανή Μαντά για την αμέριστη συμπαράστασή της. Η καλή της διάθεση, οι συμβουλές της, οι διορθώσεις της και η καθημερινή βοήθεια της, ήταν ότι χρειαζόμουν για να μπω στο πνεύμα, να πειραματιστώ και να τελειώσω την εργασία που μου ανατέθηκε.

Συν τοις άλλοις, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Χρήστο Κυρίτση για την υποστήριξη του καθ' όλη την περίοδο της παραμονής μου στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας. Η αρωγή του και το ευχάριστο και ήρεμο κλίμα που δημιουργούσε συντέλεσαν πραγματικά ώστε να κάνω τα σωστά βήματα μέχρι την ολοκλήρωση της εργασίας μου.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιο-Οργανικής Χημείας για την ένθερμη υποδοχή τους αλλά και για την αгаστή συνεργασία τους εντός του εργαστηριακού χώρου.

Επειδή, λοιπόν, όλα γύρω μας είναι ...« χημεία »... και μάλιστα ότι έχει σχέση με τη ζωή, περισσότερο ...« οργανική χημεία »..., πιστεύω ότι έμαθα πολλά που δεν ήξερα και αφιέρωσα πολύτιμο χρόνο για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Άξιζε τον κόπο αφού όλοι με βοήθησαν όχι μόνο να δώσω τον καλύτερο μου εαυτό αλλά και να τον ξεπεράσω.

**\*\*\*Αφιερώνω την μεταπτυχιακή μου διατριβή, στον άνθρωπο που με έφερε στη ζωή, την πολυαγαπημένη μου μητέρα\*\*\*.**

## ***ΕΙΣΑΓΩΓΗ***

Ο σακχαρώδης διαβήτης, μία από τις σοβαρότερες ορμονικές διαταραχές, εκδηλώνεται όταν τα επίπεδα γλυκόζης (σακχάρου) στο αίμα δεν διατηρούνται σταθερά. Τα επίπεδα γλυκόζης, στα υγιή άτομα, ρυθμίζονται από τη δράση της ινσουλίνης. Στο σακχαρώδη διαβήτη, το πάγκρεας παράγει ελάχιστη ή καθόλου ινσουλίνη (διαβήτης τύπου I), είτε η ινσουλίνη που παράγεται δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό (διαβήτης τύπου II) οδηγώντας έτσι σε υπεργλυκαιμία. Ο διαβήτης τύπου I ή νεανικός διαβήτης πλήττει κυρίως άτομα νεαρής ηλικίας και οφείλεται στην καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, που εκκρίνουν ινσουλίνη. Ο διαβήτης τύπου II χαρακτηρίζεται και ως διαβήτης των ενηλίκων και κατά κανόνα εμφανίζεται σε μεγαλύτερη ηλικία, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Συνήθως πάντως εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 χρονών και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών.

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία για το διαβήτη (IDF) 194 εκ. άνθρωποι υποφέρουν από σακχαρώδη διαβήτη παγκοσμίως και αυτός ο αριθμός προβλέπεται να αυξηθεί σε 333 εκ. το 2025, κυρίως λόγω της γήρανσης του πληθυσμού, τις αλλαγές στον τρόπο ζωής και της καθιστικής ζωής. Στην Ευρώπη σύμφωνα με τα στοιχεία της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας, το 2000 υπήρχαν 33.3 εκ άτομα με διαβήτη ενώ προβλέπεται ότι το 2030 ο αριθμός αυτός θα φτάσει τα 48 εκ.

Στην Ελλάδα το ποσοστό του πληθυσμού που φαίνεται να πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη είναι περίπου 10%. Το 80% των ασθενών με διαβήτη τύπου II είναι παχύσαρκοι και σύμφωνα με την επιδημιολογική μελέτη της Ελληνικής Εταιρίας Παχυσαρκίας, το 41% των ανδρών και το 30% των γυναικών είναι υπέρβαροι γεγονός που κατατάσσει τη χώρα μας στις πρώτες θέσεις στην ΕΕ κατανάλωσης φαρμάκων έναντι του σακχαρώδη διαβήτη. [Ινστιτούτο Φαρμακευτικής Έρευνας & Τεχνολογίας <http://www.ifet.gr/diabetes2005IFET.pdf>].

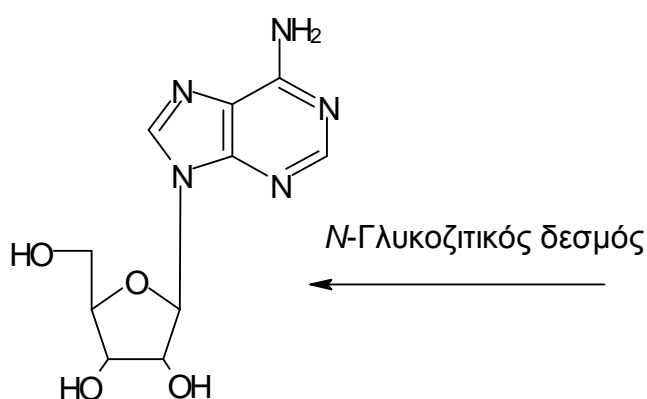
Μεγάλο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι νουκλεοζιτικά ανάλογα, όπως οι 1-(3'-δεοξυ-3'-φθορο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο) πυριμιδινικοί νουκλεοζίτες, παρουσίασαν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (IC<sub>50</sub>: 6.55 μM -46.42 μM) και επιπλέον έχει μελετηθεί η σχέση δομής-δράσης τους ώστε να δοθούν κατευθύνσεις προς την ανάπτυξη ισχυρότερων

αναστολέων. Τέλος, πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι νουκλεοζίτες που φέρουν αλκύνυλο υποκαταστάτες στην ετεροκυκλική βάση, εμφάνισαν αξιοσημείωτη αντιδιαβητική δράση.

Βασιζόμενοι στα ανωτέρω, στη συγκεκριμένη μελέτη γίνεται σχεδιασμός και σύνθεση νέων τροποποιημένων γλυκοπυρανόζυλο νουκλεοζιτών που φέρουν αλογονο υποκαταστάτες στην 5-θέση της ετεροκυκλικής βάσης, αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων των νέων νουκλεοζιτικών παραγώγων καταδεικνύει- όπως αναφέρεται και στα συμπεράσματα της παρούσης εργασίας- τη δυνατότητα αξιοποίησής τους ως θεραπευτικά μέσα για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου II .

## **ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ**

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στην φύση διότι αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Ο νουκλεοζίτης προκύπτει από την ένωση μιας πουρινικής (αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδινικής (θυμίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη) βάσης με τον C-1 μιας πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό (Berg J. M. *et al*, 2001). Αναλόγως αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης και χαρακτηρίζεται ως β στερεοδιάταξης γιατί η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου (**Εικόνα7**).



**Εικόνα 7:** Η β-στερεοδιάταξη του N-γλυκοζιτικού δεσμού της αδενοσίνης

Επίσης, έχει βρεθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. Συνεπώς έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα του σακχάρου της και βάσης των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών δραστηριοτήτων τους.

### **ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ, ΑΝΤΙΪΚΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρουσιάζουν **αντικαρκινικές** και κυτταροστατικές ιδιότητες και αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Agelis *et al*, 2008; Agelis *et al*, 2007; Manta *et al*, 2010; Manta *et al*; 2009, Manta *et al*, 2009; Komiotis *et al*, 2008;). Επίσης, έχει διαπιστωθεί και η ικανότητα τους να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών (Lui V. *et al*, 2010; Bhat U. G. *et al*, 2010). Επηρεάζουν τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς του πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη **αντιικών φαρμάκων**. Πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα σήμερα. Επιπλέον, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν επιδείξει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Spanou C. *et al*, 2007), σαν ουσίες που μπορούν να επιβραδύνουν ή να αποτρέψουν την οξειδωση ενός υποστρώματος ενώ βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το υπόστρωμα, δηλαδή **αντιοξειδωτικές** (Halliwell B. 2001).

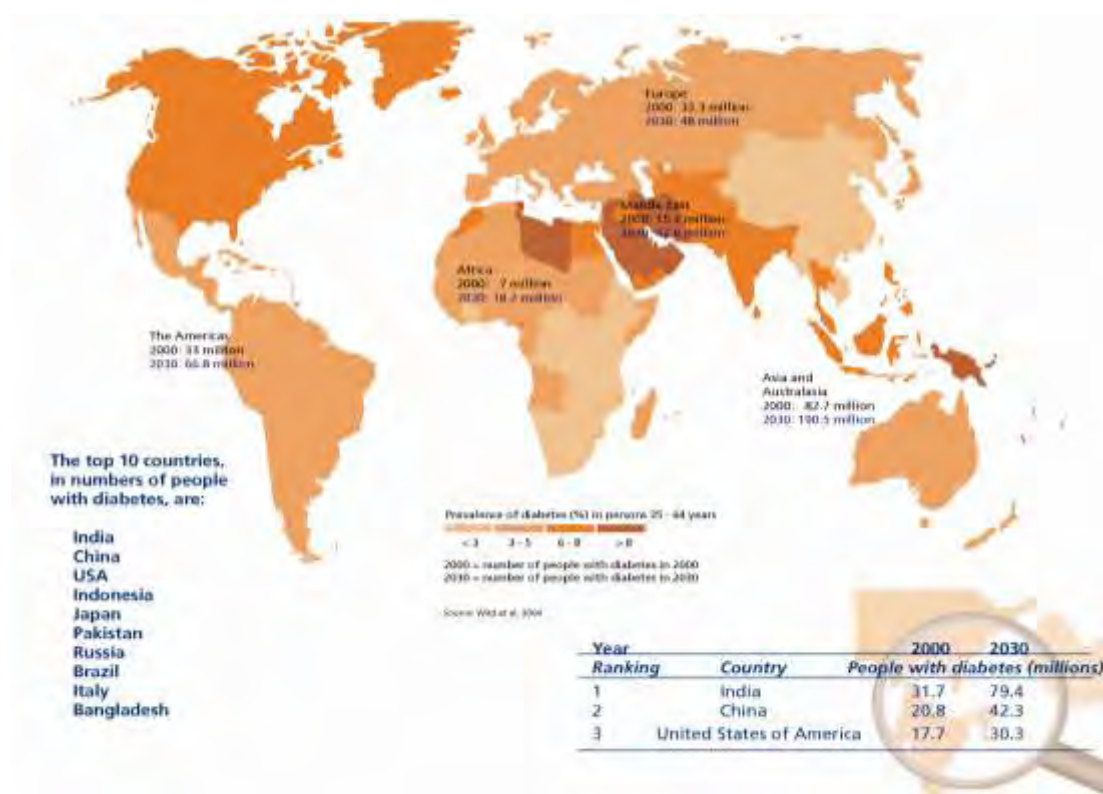
### **ΓΛΥΚΟΖΙΤΙΚΑ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΩΣ ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

Η γλυκόζη που αποτελεί κύρια πηγή ενέργειας, παρέχεται στον οργανισμό με τη μορφή υδατανθράκων από την τροφή αλλά παράγεται και ενδογενώς κατά τη γλυκογονόλυση (Marshall W., 2000). Ο οργανισμός προσπαθεί με κάθε τρόπο να διατηρήσει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα σταθερά γι' αυτό και το γλυκογόνο λειτουργεί ως αποθηκευτικός χώρος με ελεγχόμενο καταβολισμό. Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου ρυθμίζεται από ορμονικά διεγερόμενους καταρράκτες όπου εμπλέκονται η ινσουλίνη και η γλυκαγόνη (Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, 2006). Η



ινσουλίνη παράγεται όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης, προάγει δηλαδή την απομάκρυνση της γλυκόζης από το αίμα και την αποταμίευσή της στη μορφή γλυκογόνου. Το αντίθετο συμβαίνει με τη γλυκαγόνη. Φαίνεται λοιπόν πως αυτές οι δύο ορμόνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοιοστασία της γλυκόζης.

Στις μέρες μας, είναι πολύ διαδεδομένες οι διαταραχές μεταβολισμού των υδατανθράκων με πιο κύρια το σακχαρώδη διαβήτη. Ο διαβήτης μπορεί να εμφανιστεί σε άτομα με γενετική προδιάθεση ωστόσο δεν θεωρείται ούτε κληρονομικός, ούτε μεταδοτικός αν και στις περισσότερες περιπτώσεις το γενετικό υπόβαθρο μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο. Άλλοι παράγοντες προδιάθεσης είναι το γήρας, η παχυσαρκία, η έλλειψη άσκησης καθώς και οι σύγχρονες διατροφικές συνήθειες και ο αγχώδης τρόπος ζωής.



Εικόνα 1

Οι πρώτες δέκα χώρες σε αριθμό ασθενών με διαβήτη είναι οι εξής: Ινδία, Κίνα, ΗΠΑ, Ινδονησία, Ιαπωνία, Πακιστάν, Ρωσία, Βραζιλία, Ιταλία και

Μπαγκλαντές. Στις χώρες αυτές ένας στους τέσσερις θανάτους σε άτομα ηλικίας 35 με 64 χρόνων, οφείλεται στο σακχαρώδη διαβήτη (World Health Organization-WHO, [http://www.who.int/diabetes/BOOKLET\\_HTML/en/print.html](http://www.who.int/diabetes/BOOKLET_HTML/en/print.html)) (Εικόνα 1). Η υπεργλυκαιμία αυτή οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ σε συνδυασμό με τη μειωμένη απομάκρυνση της από το αίμα.

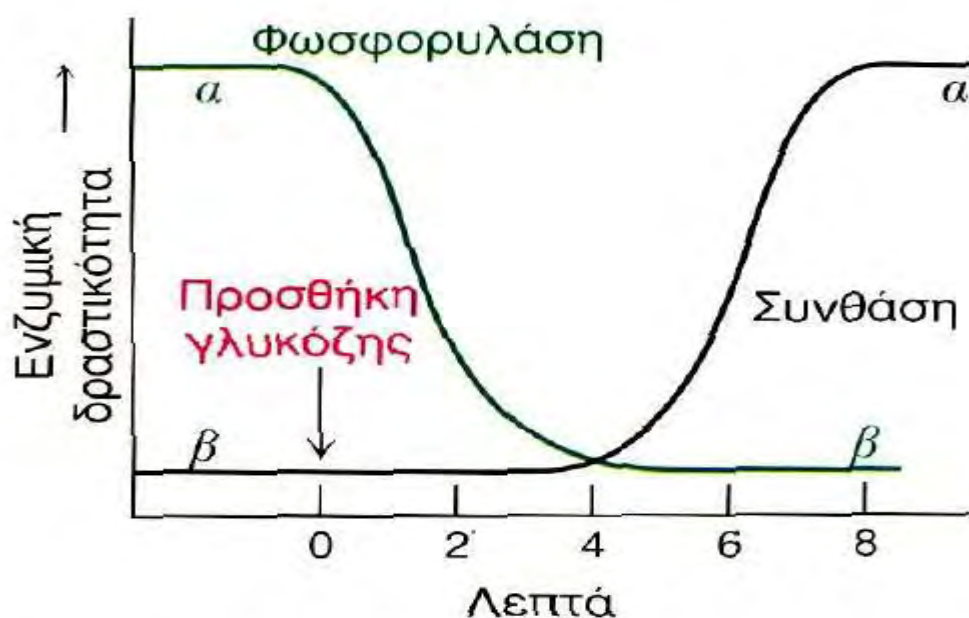
Υπάρχουν δύο τύποι διαβήτη. Στο διαβήτη τύπου I έχουμε καταστροφή παγκρεατικών κυττάρων και ουσιαστικά καμία έκκριση ινσουλίνης. Στο διαβήτη τύπου II, η ινσουλίνη η οποία παράγεται από το πάγκρεας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τον οργανισμό με αποτέλεσμα να μην χρησιμοποιείται το σάκχαρο σαν κύρια πηγή ενέργειας. Συνεπώς, η επιβίωση του ατόμου δεν εξαρτάται –σε αντίθεση με το διαβήτη τύπου I - από την εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης, γι' αυτό και ο διαβήτης τύπου II ονομάζεται και "**μη ινσουλινοεξαρτώμενος**" (NIDDM: Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus). Στο διαβήτη τύπου II δηλαδή, είτε η ποσότητα της ινσουλίνης που εκκρίνεται είναι ανεπαρκής για να αποφευχθεί η υπεργλυκαιμία είτε παρατηρείται έλλειψη ευαισθησίας στη δράση ινσουλίνης. (Marshall W., 2000)

Ο διαβήτης τύπου II έχει εκτιμηθεί πως επηρεάζει πάνω από το 5% του ενήλικου πληθυσμού στις δυτικές κοινωνίες. Γενικότερα, οι διαβήτες είναι η κύρια αιτία της τύφλωσης και νεφρικής ανεπάρκειας και είναι γνωστό ότι αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, οδηγώντας σε καρδιακή προσβολή, έμφραγμα και ακρωτηριασμό των κάτω άκρων ( Somsak *et al*, 2008 ). Περίπου το 90% των διαβητικών είναι τύπου II. Οι προσπάθειες για την αντιμετώπιση του έχουν επικεντρωθεί σε αγωγές που περιλαμβάνουν δίαιτα, άσκηση, υπογλυκαιμικά φάρμακα και αν αυτά αποτύχουν, σε χορήγηση ινσουλίνης. Οι προσεγγίσεις αυτές δεν είναι πάντοτε ικανοποιητικές, επομένως, υπάρχει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον για την ανακάλυψη νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων με σκοπό τον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο με αποτέλεσμα την ελάττωση της συχνότητας εμφάνισης των επιπλοκών της νόσου.

Η ανακάλυψη αντιδιαβητικών φαρμάκων αποτελεί ένα από τους κύριους στόχους των ερευνητικών τμημάτων πολλών μεγάλων φαρμακοβιομηχανιών (AstraZeneca, Aventis Pharma, Pfizer, Novo Nordisk A/S, κ.ά.). Οι υπάρχουσες θεραπείες είναι ατελείς ή προκαλούν σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Η διεθνής ερευνητική προσπάθεια εστιάζεται σε αντιγονοειδικές ή γενικότερα εξειδικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις με ενδεχομένως ριζικά αποτελέσματα. Βάσει αυτού, η

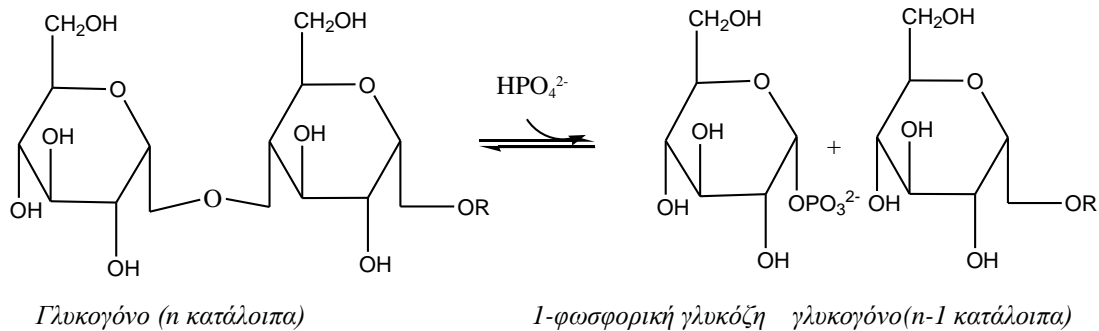
συγκεκριμένη μελέτη στοχεύει στη σύνθεση νέων τροποποιημένων γλυκοπυρανόζυλο νουκλεοζιτών ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP), η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου, μελετάται εντατικά.



**Εικόνα 21.21** Η γλυκόζη του αίματος ρυθμίζει τον μεταβολισμό του γλυκογόνου στο ήπαρ. Η έγχυση γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος οδηγεί στην απενεργοποίηση της φωσφορυλάσης και ακολούθως στην ενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου στο ήπαρ. [Κατά W. Stalmans, H. De Wulf, L. Hue και H.-G. Hers. *Eur. J. Biochem.* 41(1974):127.]

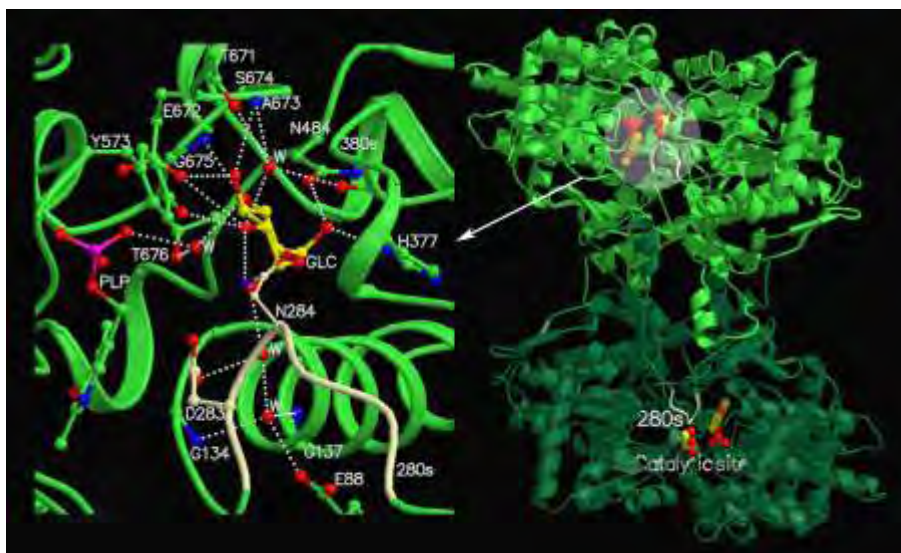
Πρόκειται για ένα ένζυμο που καταλύει το πρώτο στάδιο της ενδοκυτταρικής αποικοδόμησης του γλυκογόνου προς 1-φωσφορική γλυκόζη (Glc-1-P), η οποία χρησιμοποιείται μέσω της γλυκόλυσης για την παραγωγή ενέργειας και στο ήπαρ μετατρέπεται προς γλυκόζη (Oikonomakos and Somsak, 2008).



**Εικόνα 12:** Η φωσφορυλάση διασπά το υπόστρωμά της με την προσθήκη του ορθοφωσφορικού (Pi).

Η GP είναι μία αλλοστερική πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται στους μύες και το ήπαρ και υπάρχει σε δύο μορφές, την GPb (ανενεργός, T-διαμόρφωση) και την GPa (ενεργός, R-διαμόρφωση). Στον ήρεμο μυ, υπάρχει ως GPb, η οποία ενεργοποιείται είτε με AMP είτε με φωσφορυλίωση προς GPa με τη δράση της κινάσης της φωσφορυλάσης (PhK), ενώ στο ήπαρ δεν είναι ευαίσθητη σε ρύθμιση από AMP διότι το ήπαρ δεν υφίσταται εντυπωσιακές αλλαγές στο ενεργειακό φορτίο. Η αναστολή της ενζυμικής δράσης της GP από τη γλυκόζη έχει φυσιολογική σημασία στο ήπαρ. Η γλυκόζη, ο φυσιολογικός ρυθμιστικός παράγοντας του μεταβολισμού του γλυκογόνου, προκαλεί αδρανοποίηση της GP και δρα συνεργιστικά με την ινσουλίνη, με αποτέλεσμα την ελάττωση της αποικοδόμησης και την παράλληλη αύξηση της σύνθεσης γλυκογόνου (που επιτυγχάνεται με τη δράση της γλυκογονικής συνθάσης, GS) (Οικονομάκος, 2002). Έτσι ενώσεις με ισχυρότερη ανασταλτική δράση (συγκριτικά με τη δράση της γλυκόζης) δύνανται να μετατοπίζουν την ισορροπία αποικοδόμησης ↔ σύνθεσης γλυκογόνου προς την κατεύθυνση της σύνθεσης, παρουσιάζοντας ενδεχομένως κλινικό ενδιαφέρον για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2.

Η GP, λόγω του κεντρικού ρόλου που κατέχει, μεταξύ άλλων ενζύμων στο μεταβολισμό του γλυκογόνου χρησιμοποιείται ως μοριακός στόχος για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Ειδικότερα, η τρισδιάστατη δομή της μυϊκής φωσφορυλάσης από κουνέλι (RMGPb, MW 97,444 Da, 842 αμινοξέα) που έχει προσδιορισθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X<sup>19</sup>, μελετήθηκε εκτενώς. Τα επί μέρους κέντρα σύνδεσης του ενζύμου τα οποία χρησιμοποιούνται ως «στόχος» για το σχεδιασμό εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων παρουσιάζονται στο **Εικόνα 13**.



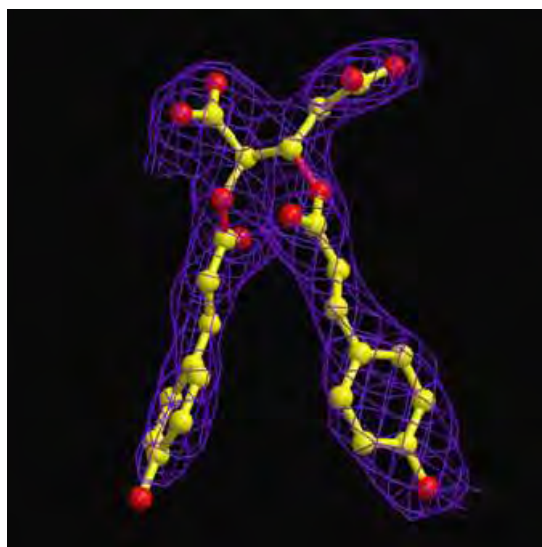
**Εικόνα 13:** Σχηματική απεικόνιση του τρόπου σύνδεσης της γλυκόζης στο καταλυτικό κέντρο της RMGPb. Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με διακεκομμένες γραμμές. Υποδεικνύεται η θέση του βρόχου 280s με υποκίτρινο χρώμα.

Η γνώση της τρισδιάστατης δομής της  $\alpha$ -D γλυκόζης ως συμπλόκου με την RMGPb βοήθησε στη λεπτομερή καταγραφή των αλληλεπιδράσεων αυτής με τα αμινοξέα στην περιοχή του καταλυτικού κέντρου και ειδικότερα με την πλευρική αλυσίδα των Asn284 και Asp283. Τα αμινοξέα αυτά προέρχονται από τον εύκαμπτο βρόχο 280, ο οποίος παρεμποδίζει τη σύνδεση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο.

Η γλυκόζη αποτέλεσε πρόδρομο ένωση για το σχεδιασμό νέων αναστολέων, αναλόγων αυτής οι οποίοι μελετήθηκαν με βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μεθόδους. Τα τελευταία 6 έτη, μελέτες κατευθυνόμενου (από την 3D) σχεδιασμού, κινητικές και κρυσταλλογραφικές αναλύσεις έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη πληθώρας (>100 ενώσεων) παραγώγων του  $\alpha$ - και  $\beta$ -ανυδρο-γλυκο-επτονικού οξέος, της 1-δεσοξυ-1-θειο- $\beta$ -D-γλυκόζης, της  $\beta$ -D-γλυκοκυρανοζυλαμίνης και της σπιρουδαντοΐνης με αυξημένη χημική συγγένεια (συγκριτικά με την  $\alpha$ -D-γλυκόζη) προς τη GPb (Kontou et al. 2000, Tiraidis al. 2007, Zographos et al. 2007, Zographos et al. 1997). Σε νεώτερη μελέτη, η ένωση (-)(S)-3-isopropyl 4-(2-chlorophenyl)-1,4 dihydro-1-ethyl-2-methyl-pyridine-3,5,6-tricarboxylate (W1807), της οποίας η σύνθεση έγινε στα εργαστήρια της Bayer AG βρέθηκε ως ο πλέον ισχυρός (μέχρι σήμερα) αναστολέας της GPb (με σταθερά αναστολής,  $K_i = 1.6 \mu\text{M}$ , δηλαδή 106 φορές μικρότερη της αντίστοιχης  $K_i$  για την  $\alpha$ -D-γλυκόζη). Η κρυσταλλογραφική ανάλυση του συμπλόκου GPb-W1807, σε ευκρίνεια  $2.3 \text{ \AA}$  (Zographos et al, 1997) και

του συμπλόκου GP $\alpha$ - $\alpha$ -D-γλυκόζη-W1807, σε ευκρίνεια 2.1 Å (Oikonomakos *et al*, 1999) αποκάλυψε ότι η W1807 συνδέεται στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου (κέντρο σύνδεσης του AMP). Πρόσφατες μελέτες, στην κατεύθυνση ταυτοποίησης ενώσεων με ενδεχόμενο κλινικό ενδιαφέρον στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο διαβήτη τύπου II, οδήγησαν στην ανακάλυψη μιας νέας τάξης αναστολέων της γλυκογονικής φωσφορυλάσης (Hoover *et al*, 1998; Martin *et al*, 1998). Η ένωση 5-chloro-1H-indole-2-carboxylic acid [1-(4-fluorobenzyl)-2-(4-hydroxyriperidin-1-yl)-2-oxoethyl]amide (CP320626) είναι ισχυρός αναστολέας της ανθρώπινης ηπατικής φωσφορυλάσης  $\alpha$  (IC<sub>50</sub>=1  $\mu$ M), δρα συνεργιστικά με τη γλυκόζη (IC<sub>50</sub>=0.13  $\mu$ M) και προκαλεί ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης σε διαβητικά ob/ob ποντίκια (χωρίς να μεταβάλλονται τα επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος) (Oikonomakos and Somsak, 2008).

Η κρυσταλλογραφική ανάλυση του συμπλόκου GP $\beta$ -CP320626 (Oikonomakos *et al*, 2000) αποκάλυψε ένα νέο αλλοστερικό κέντρο σύνδεσης, που βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς (**Εικόνα 14**), στη μεσοεπιφάνεια μεταξύ των υπομονάδων. Το νέο κέντρο σύνδεσης απέχει > 30 Å από το καταλυτικό κέντρο, όμως, η σύνδεση της ένωσης CP320626 προκαλεί σταθεροποίηση της ανενεργούς T-διαμόρφωσης (ή επάγει την ανενεργό T-διαμόρφωση).



**Εικόνα 14:** Η δομή της ένωσης FR258900 και η ηλεκτρονιακής της πυκνότητα όπως παρατηρήθηκε κατά τη σύνδεση της στην GP $\beta$ .

Επίσης, η φλαβοπιριδόλη (L86-8276), ισχυρός αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) και εν δυνάμει αντικαρκινικό φάρμακο (κλινική φάση II), βρέθηκε να αναστέλλει τη GP και να προκαλεί συσσώρευση γλυκογόνου σε A549 NSCLC κύτταρα (Kaiser et al. 2001). Οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων GPb-φλαβοπιριδόλης (1.76 Å) και GPα-α-D-γλυκόζη-φλαβοπιριδόλης (2.23 Å) έδειξαν ότι η φλαβοπιριδόλη συνδέεται στο κέντρο αναστολής, το οποίο, στην T-διαμόρφωση, σχηματίζεται από δυο υδρόφοβα αμινοξέα, Phe285 (από το βρόχο 280s) και Tyr613 (από την αρχή της α19 έλικας) (Oikonomakos *et al.* 2000).

Σε προκαταρκτικά κινητικά και κρυσταλλογραφικά πειράματα έχουν ταυτοποιηθεί 12 γλυκοπυρανονουκλεοζιτικά παράγωγα, τα οποία προκαλούν σημαντική αναστολή της ενζυμικής δράσης της GP (Tsirkone *et al.*, 2010). Επιπλέον, νουκλεοζίτες που φέρουν αλκύνυλο υποκαταστάτες στην ετεροκυκλική βάση, εμφάνισαν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

Η κατανόηση του μηχανισμού δράσης των ενώσεων που βρέθηκαν ως πιθανοί υποψήφιοι υπογλυκαιμικών φαρμάκων, καθώς επίσης και ο σχεδιασμός νουκλεοζιτικών δομικών αναλόγων αυξημένης συγγένειας και εξειδίκευσης προς τη φωσφορυλάση, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη φαρμάκων για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου II.

## **ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η σύνθεση νέων β-D-γλυκοπυρανόζυλο νουκλεοζιτών, αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ως εν δυνάμει υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

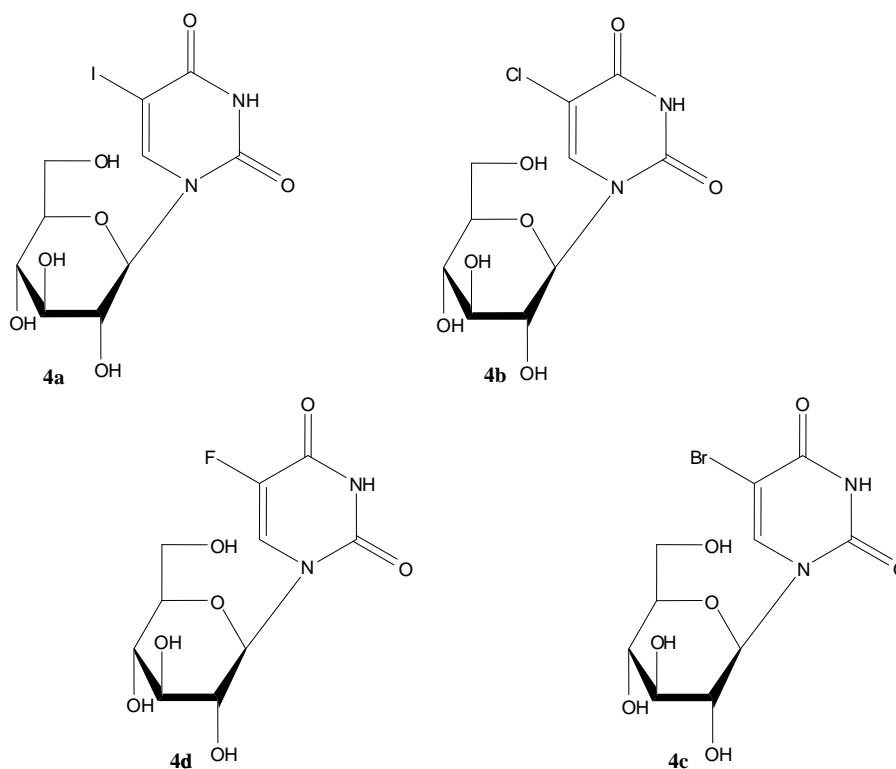
Οι νουκλεοζίτες μαζί με τα ανάλογά τους αποτελούν το θεμελιώδη λίθο για την ανάπτυξη ενώσεων με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες σε σχέση με τις μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενες. Η ραγδαία ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη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

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

Λαμβάνοντας υπόψη μελέτες που υποδεικνύουν ότι νουκλεοζιτικά ανάλογα, όπως οι 1-(3'-δεοξυ-3'-φθορο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο) πυριμιδινικοί νουκλεοζίτες καθώς και οι νουκλεοζίτες που φέρουν αλκύνυλο υποκαταστάτες στην ετεροκυκλική βάση, εμφάνισαν αξιοσημείωτη ανασταλτική δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, στόχο της παρούσης εργασίας αποτελεί η σύνθεση νέων ισχυρότερων αναστολέων, αλογονωμένων στη βάση πυρανονουκλεοζιτών, ως εν δυνάμει αντιδιαβητικά φάρμακα.

Ειδικότερα, η τροποποίηση, γίνεται στην βάση που συνδέεται με τον δακτύλιο και συγκεκριμένα στη 5 θέση της ουρακίλης, όπου εισάγεται το ιώδιο, το φθόριο, το χλώριο, και τέλος το βρώμιο. Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων των νέων νουκλεοζιτικών παραγώγων καταδεικνύει- όπως αναφέρεται και στα συμπεράσματα της παρούσης εργασίας- τη δυνατότητα αξιοποίησής τους ως θεραπευτικά μέσα για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου II .

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



Εικόνα 15: Νέοι πυρανονουκλεοζιτικοί αναστολείς ( 4a, 4b, 4c, 4d)



## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

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

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F<sub>254</sub>) ώστε να ελεγχθεί η αντίδραση. Η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα θειικού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 30% είτε υπό λυχνία υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας (254 nm).

Τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω :

- Διάλυμα Α : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 30/70
- Διάλυμα Β : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 50/50
- Διάλυμα Γ : Μεθανόλη/Οξικός Αιθυλεστέρας 10/90

#### ***Χρωματογραφία στήλης***

Η χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων και επιτυγχάνεται με υπό πίεση αέρα (flash chromatography), σε silica gel (240-400, Merck grade).

Ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι:

- Διάλυμα Α : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 30/70
- Διάλυμα Β : Εξάνιο/Οξικός Αιθυλεστέρας 50/50
- Διάλυμα Γ : Μεθανόλη/Οξικός Αιθυλεστέρας 10/90

### ***Ξήρανση διαλυτών***

Ορισμένες από τις αντιδράσεις που περιγράφονται, επιβάλλουν την χρήση άνυδρων διαλυτών όπως  $\text{CH}_3\text{CN}$  και *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Η ξήρανση τους 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).

### ***Ταυτοποίηση ενώσεων***

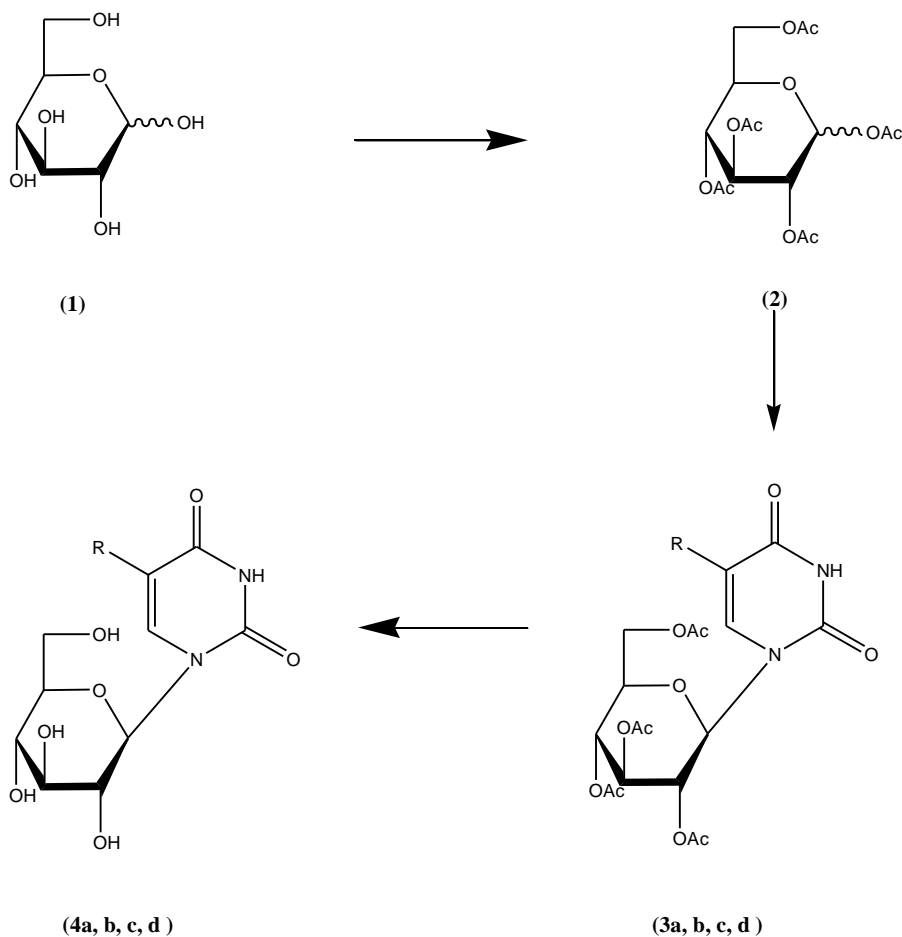
Μετά τη σύνθεση των ενώσεων γίνεται ταυτοποίηση με τη χρήση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR λήφθηκαν με Bruker 500 MHz, χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ) ή σε δευτεριωμένη μεθανόλη ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Το tetramethylsilan (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

Οι μετρήσεις της γωνίας στροφής πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του πολωσίμετρου Autopol I. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ( $22\text{ }^\circ\text{C}$ ). Τα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας καταγράφηκαν με φασματοφωτόμετρο τύπου PG Instruments Ltd.

Τα σημεία τήξης καταγράφηκαν χωρίς διόρθωση σε όργανο Mel-Temp Apparatus και μόνο για τα μη υγροσκοπικά στερεά.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### Επισκόπηση συνθετικής οδού



Όπου: **a**: R = I, **b**: R = Cl, **c**: R = Br, **d**: R = F

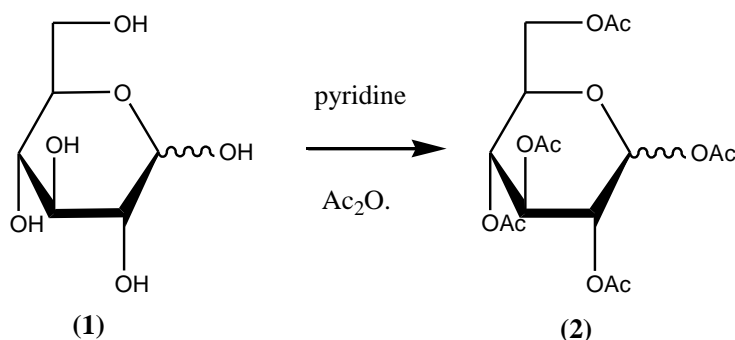
### Μεθοδολογία σύνθεσης

Η πορεία της σύνθεσης ξεκίνησε με την ακετυλίωση της D-γλυκόζης (1), η οποία πραγματοποιήθηκε σε πυριδίνη παρουσία  $\text{Ac}_2\text{O}$ , με αποτέλεσμα τη λήψη της 1,2,3,4,6-πεντα-O-ακετυλο-D-γλυκοπυρανόζης (2). Στη συνέχεια, αφού έγινε η συλλιλίωση της 5-ιωδοουρακίλης, της 5-χλωρουρακίλης, της 5-βρωμοουρακίλης και της 5-φθορουρακίλης πραγματοποιήθηκε η σύζευξη αυτών των βάσεων με την πυρανόζη 2 παρουσία καταλύτη  $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$  ή  $\text{SnCl}_4$  και διαλύτη  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Έτσι

λήφθηκαν οι προστατευμένοι νουκλεοζίτες 1-(2,3,4,6-τετρα-*O*-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-αλογονοουρακίλης **3a-d**. Το αμέσως επόμενο βήμα της πορείας αυτής είναι η απακετυλίωση των ενώσεων **3a-d** με κορεσμένο διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας, η οποία οδήγησε στην σύνθεση των αποπροστατευμένων ενώσεων 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-αλογονοουρακίλης **4a**.

### ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ:

#### **ΣΥΝΘΕΣΗ 1,2,3,4,6-πεντα-*O*-ακετυλο-D-γλυκοπυρανόζης**

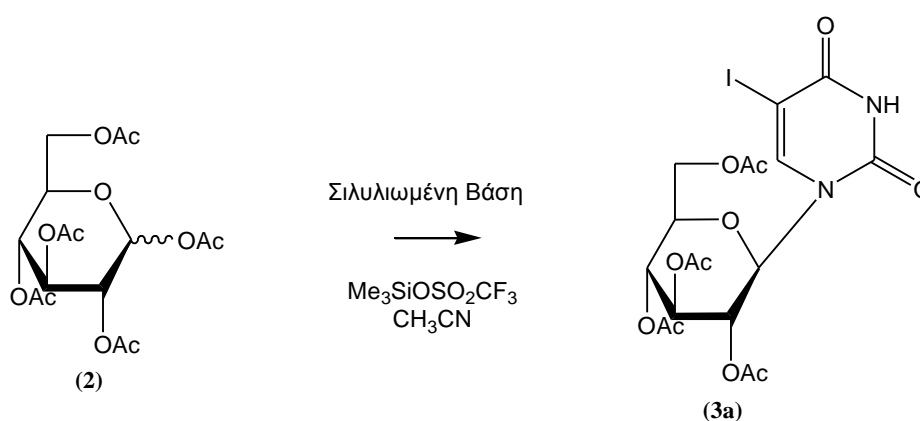


Σε ένα διάλυμα της ένωσης D-γλυκόζης (**1**) (5g, 27.7 mmol) σε πυριδίνη (96.9 ml) προστέθηκε Ac<sub>2</sub>O (49.9 ml). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα. Μετά την πιστοποίηση του TLC προστέθηκε μεθανόλη (1.5 ml) στο μίγμα, όταν αυτό βρισκόταν σε πάγο (0 °C) για την εξουδετέρωση του Ac<sub>2</sub>O. Έτσι η αντίδραση ολοκληρώθηκε. Οι διαλύτες απομακρύνθηκαν υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε EtOAc και εκχυλίστηκε αρχικά με κορεσμένο διάλυμα NaHSO<sub>4</sub> και στη συνέχεια με κορεσμένο διάλυμα NaHCO<sub>3</sub>. Η οργανική φάση ξηράνθηκε με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, διηθήθηκε και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα A. Το επιθυμητό προϊόν (**2**) (4.5g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 85%.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (2):

TLC (Σύστημα A)	$R_f = 0,37$
Απόδοση	85%
$\alpha_D$	+13.00 $c = 0,11$

**ΣΥΝΘΕΣΗ:** 1-(2,3,6-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη (3a)

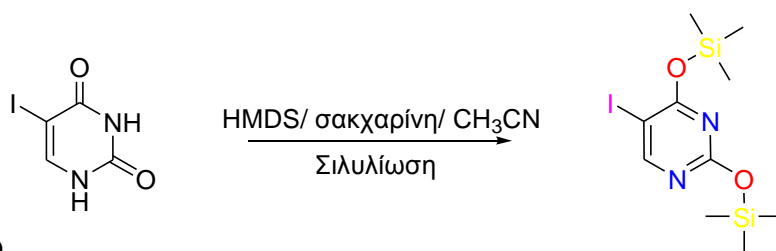


Ac = Ακετύλιο

Ένα διάλυμα που περιείχε 5-ιωδοουρακίλη (7.82g, 32.9mmol), εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) (8.6mL) και σακχαρίνη (277.1mg) σε άνυδρο διαλύτη ακετονιτρίλιο ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (115.03mL), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα στους 120 °C και αναδεύτηκε υπό άζωτο. Όταν το μίγμα έγινε διαυγές, γεγονός που υποδεικνύει πως έγινε η σιλυλίωση της βάσης - οι σιλυλιωμένες βάσεις αντιδρούν εύκολα με τα ακυλιωμένα σάκχαρα για να σχηματίσουν ακυλιωμένους νουκλεοζίτες σε πολύ καλές αποδόσεις -, προστέθηκαν η D-γλυκοπυρανόζη (2) (9.17g, 23.5mmol) και ο καταλύτης  $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$  (5.9mL).

(Οι σιλυλιωμένες βάσεις, προκύπτουν από αντίδραση με εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ). Η συγκεκριμένη αντίδραση καταλύεται

από τη σακχαρίνη και έτσι λαμβάνονται το παράγωγο της δις(τριμεθυλοσιλυλο)-5-ιωδοουρακίλης. (Σχήμα 29).



Σχήμα 29

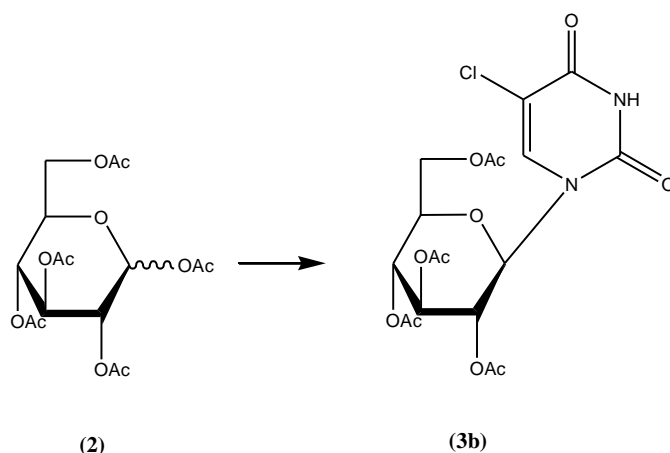
Η σιλυλίωση των βάσεων κρίνεται απαραίτητη γιατί μετατρέπει αυτές τις πολικές ετεροκυκλικές ενώσεις σε περισσότερο λιπόφιλα μόρια, με αποτέλεσμα να είναι διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες. Επίσης, με τη συγκεκριμένη προστασία ενισχύεται και ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας τους).

Έπειτα από μία ώρα, ύστερα από έλεγχο της αντίδρασης με TLC, η αντίδραση ολοκληρώθηκε με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 55 °C. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφού κρύωσε, 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 Β. Το επιθυμητό προϊόν (**3a**) (9.08g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 68%.

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

TLC (Σύστημα Β)	R <sub>f</sub> = 0,27
Απόδοση	68%
Σημείο τήξεως	90°C
α <sub>D</sub>	-3.00    c = 0,11
λ <sub>max</sub>	282nm    ε = 16.238

**ΣΥΝΘΕΣΗ: 1-(2,3,6-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζύλο)-5-χλωροουρακίλη (3b)**

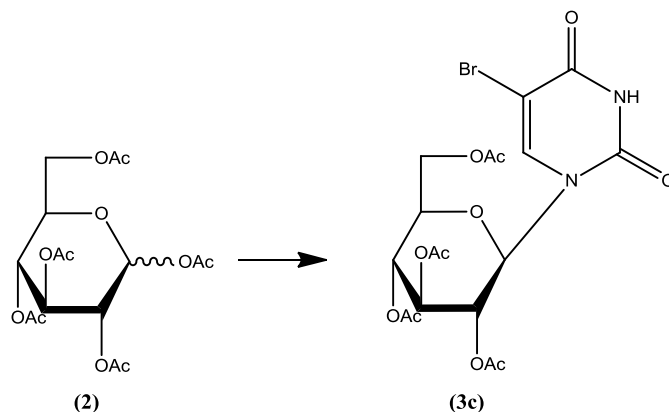


Το προστατευμένο ανάλογο της 5-χλωροουρακίλης **3b** συντέθηκε από το σάκχαρο **2** με την ίδια πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για το ανάλογο **3a**. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Β. Το επιθυμητό προϊόν (**3b**) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 75 %.

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

TLC (Σύστημα Β)	$R_f = 0,35$
Απόδοση	68%
$\alpha_D$	-1.00 $c = 0,2777$
$\lambda_{max}$	275nm $\epsilon = 6299$

**ΣΥΝΘΕΣΗ: 1-(2,3,4,6-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-βρωμοουρακίλη(3c)**



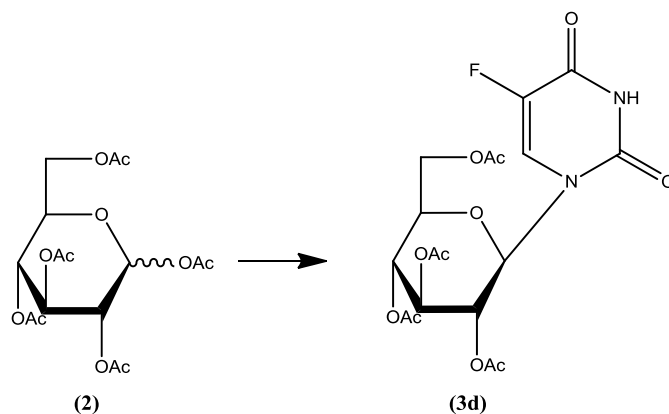
Το προστατευμένο ανάλογο της 5-βρωμοουρακίλης **3c** συντέθηκε από το σάκχαρο **3** με την ίδια πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για το ανάλογο **3a**. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Β. Το επιθυμητό προϊόν (**3c**) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 78 %.

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

TLC (Σύστημα Β)	$R_f = 0,37$
Απόδοση	78%
$\alpha_D$	-1.00 $c=0,11$
$\lambda_{max}$	275nm $\epsilon=7551$



**ΣΥΝΘΕΣΗ: 1-(2,3,4,6-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-5-φθοροουρακίλη(3d)**

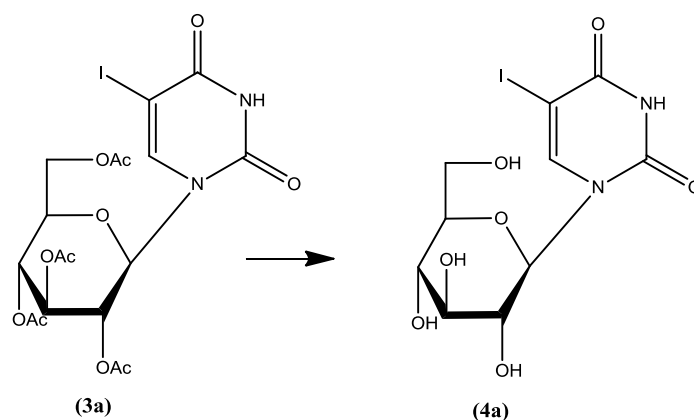


Το προστατευμένο ανάλογο της 5-φθοροουρακίλης **3d** συντέθηκε από το σάκχαρο **3** με την ίδια πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για το ανάλογο **3a**. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Β. Το επιθυμητό προϊόν (**3d**) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 79 %.

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

TLC (Σύστημα Β)	$R_f = 0,32$
Απόδοση	79%
$\alpha_D$	-2.00 $c = 0,11$
Σημείο τήξεως	120°C
$\lambda_{max}$	256nm $\epsilon = 5933$

**ΣΥΝΘΕΣΗ: 1-(β-D-γλυκοπυρανοζύλο)-5-ιωδο ουρακίλης (4a)**

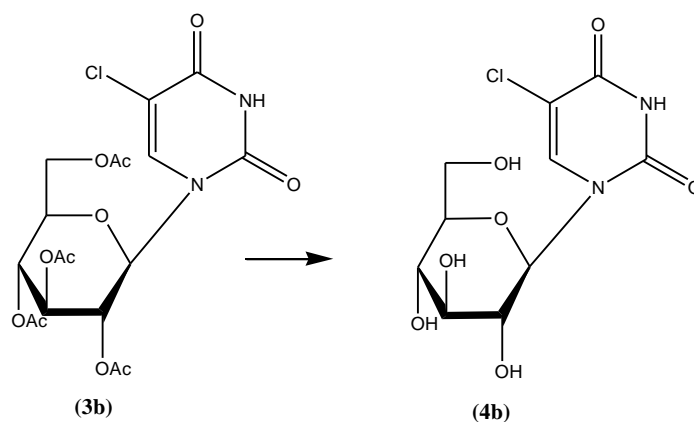


Έγινε κορεσμός διαλύματος MeOH 890.6mL με αέρια αμμωνία σε πάγο (0 °C) και στη συνέχεια προστέθηκε στο διάλυμα της ένωσης **(3a)** (9.08g, 15.98mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε ολόκληρη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώθηκε υπό μειωμένη πίεση. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC με διαλύτη EtOAc (πίνακας 4). Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Γ. Το επιθυμητό προϊόν **(4a)** (4.6g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 72 %

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος **(4a)**:

TLC (ΣΥΣΤΗΜΑ Γ)	$R_f = 0,2$
Απόδοση	72%
$\alpha_D$	+2.00 $C = 0,11$
$\lambda_{max}$	282nm $\epsilon = 15.950$

**ΣΥΝΘΕΣΗ: 1-(β-D-γλυκοπυρανοζύλο)-5-χλωρο ουρακίλης (4b).**

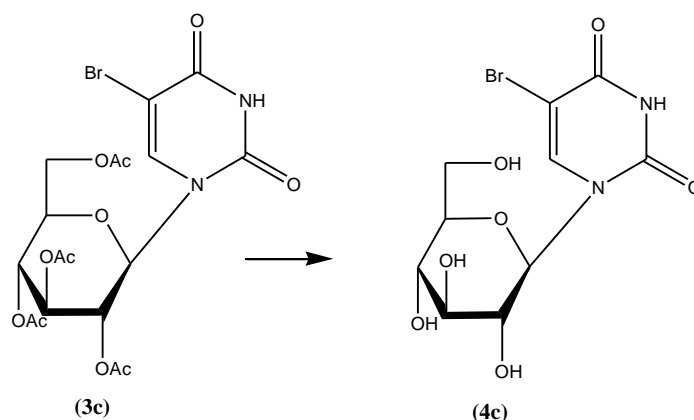


Το παράγωγο **4b** συντίθεται από την ένωση *1-(2,3,6-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζύλο)-5-χλωρο ουρακίλη (3b)* ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **4a**. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Γ. Το επιθυμητό προϊόν (**4b**) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 75 %.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**4b**):

TLC (ΣΥΣΤΗΜΑ Γ)	$R_f = 0,4$
Απόδοση	75%
$\alpha_D$	+1.00 $C = 0,2777$
$\lambda_{max}$	274nm $\epsilon = 7220$

**ΣΥΝΘΕΣΗ: 1-(β-D-γλυκοπυρανοζύλο)-5-βρωμο ουρακίλης (4c).**

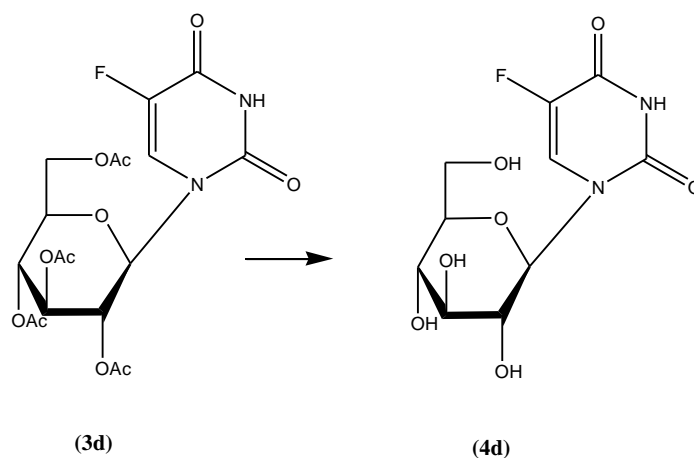


Το παράγωγο **4c** συντίθεται από την ένωση **1-(2,3,6-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζύλο)-5-βρωμο ουρακίλη (3c)** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **4a**. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Γ. Το επιθυμητό προϊόν (**4c**) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 85 %.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**4c**):

TLC (ΣΥΣΤΗΜΑ Γ)	$R_f = 0,4$
Απόδοση	85%
$\alpha_D$	$-2.00 \text{ C} = 0,1111$
$\lambda_{\max}$	276nm $\epsilon=7220$

**ΣΥΝΘΕΣΗ: 1-(β-D-γλυκοπυρανοζύλο)-5-φθορο ουρακίλης (4d).**



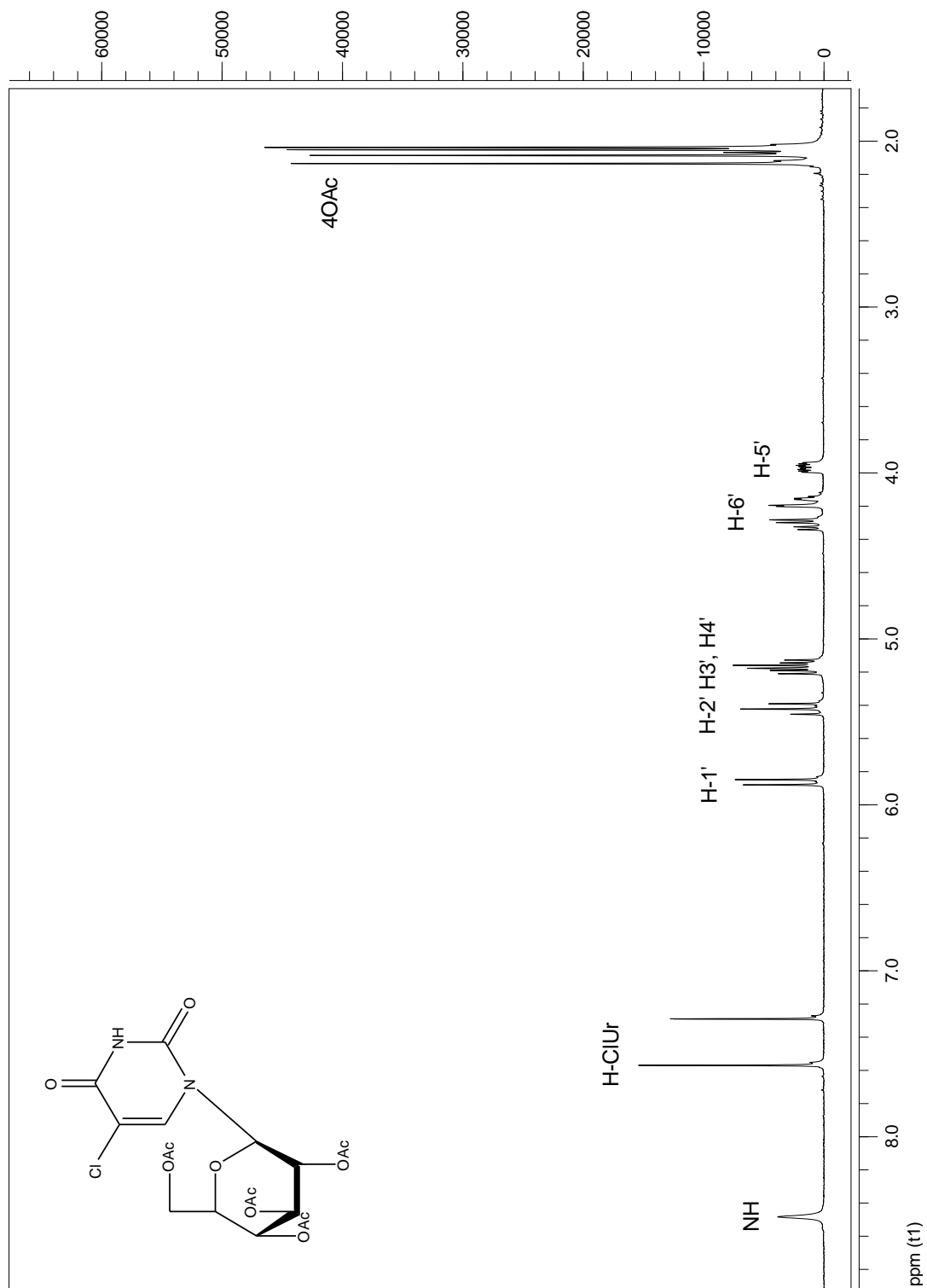
Το παράγωγο **4d** συντίθεται από την ένωση **1-(2,3,6-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζύλο)-5-φθορο ουρακίλη (3d)** ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του προϊόντος **4a**. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Γ. Το επιθυμητό προϊόν (**4d**) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση αυτή είχε απόδοση 82 %.

Συνοπτικά αποτελέσματα της σύνθεσης και χαρακτηριστικά του προϊόντος (**4d**):

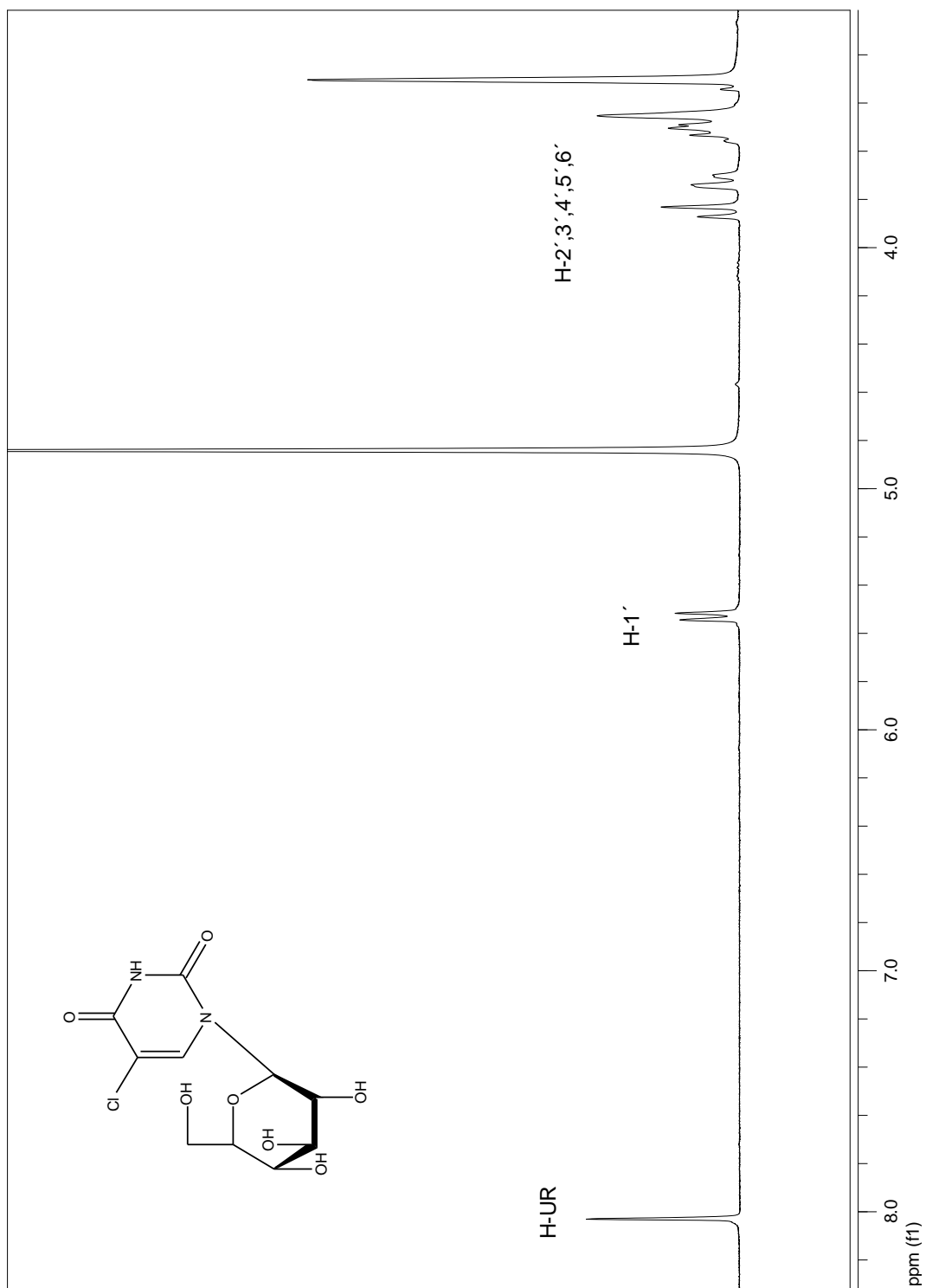
TLC (ΣΥΣΤΗΜΑ Γ)	$R_f = 0,4$
Απόδοση	82%
$\alpha_D$	-2.00 $C = 0,11$
$\lambda_{max}$	265nm $\epsilon = 4608$

### *Ταυτοποίηση ενώσεων με $^1\text{H NMR}$ :*

Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H NMR}$ . Ενδεικτικά αναφέρεται το φάσμα της ένωσης 1-(2,3,4,6-τετρα-*O*-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-χλωροουρακίλης (**3b**) καθώς επίσης και της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-χλωροουρακίλης (**4b**). Στα παρακάτω διαγράμματα διαφαίνονται τόσο τα πρωτόνια του σακχάρου όσο και τα πρωτόνια της ετεροκυκλικής βάσης.



**Εικόνα 16:**  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης (**3b**)



**Εικόνα 17:**  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης (**5b**)



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

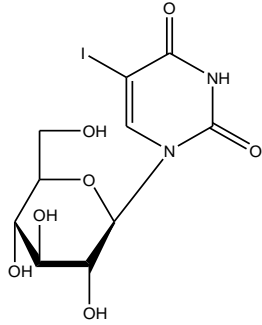
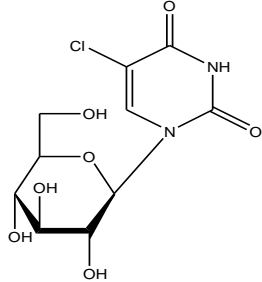
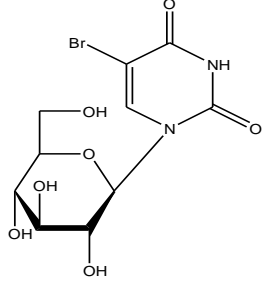
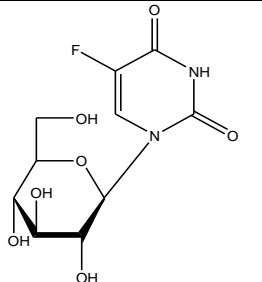
Οι ερευνητικές προσπάθειες για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως ιικές μολύνσεις, κακοήθειες νεοπλασίες, και υπεργλυκαιμικές νόσοι έχουν στραφεί στην ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα. Κύριος στόχος των ερευνητικών προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων, τα οποία να παρουσιάζουν 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 μιας νέας τάξης γλυκοπυρανονουκλεοζιτών με πιθανή αντιδιαβητική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, με σύντομα βήματα. Οι τελικές αποδόσεις της σύνθεσης του τελικών ενώσεων των γλυκοπυρανονουκλεοζιτών είναι αρκετά καλές. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδο ουρακίλης (**4a**) είχε απόδοση 72%, της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-χλωρο- ουρακίλης (**4b**) είχε απόδοση 75%, της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-βρωμο- ουρακίλης (**4c**) είχε απόδοση 85%, και τέλος της 1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-φθορο- ουρακίλης (**4d**) είχε απόδοση 82% .

Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H NMR}$ .

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν κινητικά πειράματα για τον προσδιορισμό της ανασταλτικής δράσης των νέων C-5-αλογονο πυριμιδινονουκλεοζιτών έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Τα κινητικά πειράματα έδειξαν ότι αυτές οι ενώσεις αποτελούν αναστολείς του ενζύμου με τιμές  $K_i$  που κυμαίνονται μεταξύ 1.02  $\mu\text{M}$  και 17  $\mu\text{M}$ . (**ΠΙΝΑΚΑΣ 1**)

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1**

ΠΡΟΪΟΝ	Ki
 <p style="text-align: center;">↔</p>	<p><b>Ki = 12.79±1.65 μM</b></p> <p>1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδο σουρακίλη (<b>4a</b>)</p>
 <p style="text-align: center;">↔</p>	<p><b>Ki = 1.02± 0.15 μM</b></p> <p>1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5- χλωρο- σουρακίλη (<b>4b</b>)</p>
 <p style="text-align: center;">↔</p>	<p><b>Ki = 3.27± 0.44 μM</b></p> <p>1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5- βρωμο- σουρακίλη (<b>4d</b>)</p>
 <p style="text-align: center;">↔</p>	<p><b>Ki = 1.94±0.09 μM</b></p> <p>1-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5- φθορο- σουρακίλη (<b>4d</b>)</p>

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ενεργότητας της GP ύστερα από την αλληλεπίδρασή της με τους παραπάνω αναστολείς και παρατηρώντας την τιμή  $K_i$  μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για την ανασταλτική δράση των ενώσεων. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή  $K_i$ , τόσο μεγαλύτερη είναι η ενζυμική δραστηριότητα, δηλαδή τόσο λιγότερη ανασταλτική δράση έχουν οι ενώσεις μας.

Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα πως η δραστηριότητα των αναστολέων που μελετήθηκαν, εξαρτάται από τον υποκαταστάτη που προστίθεται στη θέση 5 της ουρακίλης. Καλύτερο αναστολέα αποτελεί η ένωση **4b** που φέρει χλώριο ως υποκαταστάτη στη θέση 5 της ετεροκυκλικής βάσης ( $K_i$ : 1.02  $\mu$ M). Οι ενώσεις που φέρουν ως υποκαταστάτες φθόριο, χλώριο ή βρώμιο στην 5-θέση της ετεροκυκλικής βάσης, παρουσιάζουν ανασταλτική δράση της ίδιας τάξης μεγέθους ( $K_i$ : 1.02-3.27  $\mu$ M). Όταν ως υποκαταστάτης χρησιμοποιείται το ιώδιο, η ανασταλτική δράση των νουκλεοζιτών μειώνεται κατά περίπου 10 φορές ( $K_i$ : 12.97  $\mu$ M).

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agelis G., Tzioumaki N., Tselios T., Botic T., Cencic A., Komiotis D. Eur. J. Med. Chem. 2008, p.43, 1366
- Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botic, T.; Cencic, A.; Komiotis D. Bioorg. Med. Chem. 2007, p.15, 5448
- Berg, J. M., Tymoczko J. L., Stryer L, Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2001 (p) 329-351
- Berg, J. M., Tymoczko J. L., Stryer L, Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2006 p.649, 651
- Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. Molecular cancer therapeutics 2010
- Halliwell, B. Free Radicals and other reactive species in disease. Encyclopaedia of life sciences 2001
- Hoover, D.J., Lefkowitz-Snow, S., Burgess-Henry, J.L., Martin, W.H., Armento, S.J., Stock, I.A., McPherson, R.K., Genereux, P.E., Gibbs, E.M., and Treadway, J.L., Indole-2-carboxamide inhibitors of human liver glycogen phosphorylase. 1998. J. Med. Chem. 41: p. 2934-2938.
- Komiotis, D.; Manta S.; Tsoukala E.; Tzioumaki N. Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents 2008, p.7, 219
- Kontou, M., Leonidas, D.D., Vatzaki, E.H., Tsantili, P., Mamalaki, A., Oikonomakos, N.G., Acharya, K.R., and Tzartos, S.J., The crystal structure of the Fab fragment of a rat monoclonal antibody against the main immunogenic region of the human muscle acetylcholine receptor. 2000. Eur. J. Biochem. 267: p. 2389-2397.
- Lui V.W.Y.W., Lau C.P.Y.P., Cheung C.S.F.S., HO K., Ng M.H.L.H., Cheng S.H.H., HOng B., Tsao S.-W.W., Tsang C.M.M., Lei K.I.K.I., Yamasaki Y., Mita A., Chan A.T. Biochemical pharmacology 2010, p.79, 1772–1780.
- Manta, S., Tsoukala, E., Tzioumaki, N., Kiritsis, C., Balzarini J., Komiotis, D. Bioorg. Chem. 38, (2010), 48-55.
- Manta, S., Tsoukala, E., Goropevšek, A., Pamulapati, R., Cencič, A., Balzarini, J., Komiotis, D. Eur. J. Med. Chem. 44, (2009), 2696-2704.

- Manta, S., Tzioumaki, N., Tsoukala, E., Panagiotopoulou, A., Pelecanou, M., Balzarini J., Komiotis. D. *Eur. J. Med. Chem.* 44, (2009), 4764–4771.
- Marshall W., *Clinical biochemistry*, 2000, p.217-220
- Martin, W.H., Hoover, D.J., Armento, S.J., Stock, I.A., McPherson, R.K., Danley, D.E., Stevenson, R.W., Barrett, E.J., and Treadway, J.L., Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: p. 1776-1781.
- Matsuda, A.; Azuma, A. *Nucleosides Nucleotides* 1995, p.14, 461
- Matsuda, A.; Nakajima, Y.; Azuma, A.; Tanaka, M.; Sasaki, T. *J. Med. Chem.* 1991b, p.34, 2917
- Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, p.95, 105
- McMurry John, *Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 2000, p.1245-1247
- McMurry John, *Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 2000, p.151- 152
- Oikonomakos, N. G.; Somsak, L., *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2008, 9 (4), p.379-395
- Oikonomakos, N.G., Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. 2002. *Curr Protein Pept Sci* 3(6): p.561-86
- Oikonomakos, N.G., Skamnaki, V.T., Tsitsanou, K.E., Gavalas, N.G., and Johnson, L.N., A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. 2000. *Structure* 8: p. 575-584
- Oikonomakos, N.G., Tsitsanou, K.E., Zographos, S.E., Skamnaki, V.T., Goldmann, S., and Bischoff, H., Allosteric inhibition of glycogen phosphorylase a by the potential antidiabetic drug 3-isopropyl-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-1-ethyl-2-methyl-pyridine-3,5,6-tricarboxylate. 1999. *Protein Sci.* 8: p. 1930-1945
- Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *Int. J. Mol. Sci.* 2007, p.8, 695
- Stryer Lubert, *Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*, 1997, p.347-354

- Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, 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., *Curr. Med. Chem.* 2008, 15 (28), p.2933-2983
- Tanaka, M.; Matsuda, A.; Terao, T.; Sasaki, T. *Cancer Lett.* 1992, p.64, 67
- Tiraidis, C., Alexacou, K.M., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Gimisis, T., and Oikonomakos, N.G., FR258900, a potential anti-hyperglycemic drug, binds at the allosteric site of glycogen phosphorylase. 2007. *Protein Sci* 16(8): p. 1773-82.
- 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. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 3423–3425.
- W. Stalmas, H.De Wulf, L.Hue & H,- 6 Hers, *Eur. J.Biochem* 41 (1974): 127
- Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. J. *Med. Chem.* 2004, 47, 3399
- Zographos, S.E. Leonidas, D.D., Lazoura, E., Dossi, K., Konarev, P.V., Kikhney, A.G., Svergun, D.I., Schmoll, D., Defossa, E., and Oikonomakos, N.G. Experimental evidence for the existence of an intermediate form of glucokinase, which accounts for the sigmoidal kinetic behaviour of the enzyme. EMBL, Hamburg Outstation, Annual Report 2007, Part II, pp. 371-372
- Zographos, S.E., Oikonomakos, N.G., Tsitsanou, K.E., Leonidas, D.D., Chrysina, E.D., Skamnaki, V.T., Bischoff, H., Goldmann, S., Watson, K.A., and Johnson, L.N., The structure of glycogen phosphorylase b with an alkyldihydropyridine-dicarboxylic acid compound, a novel and potent inhibitor. 1997. *Structure* 5(11): p. 1413-25