



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

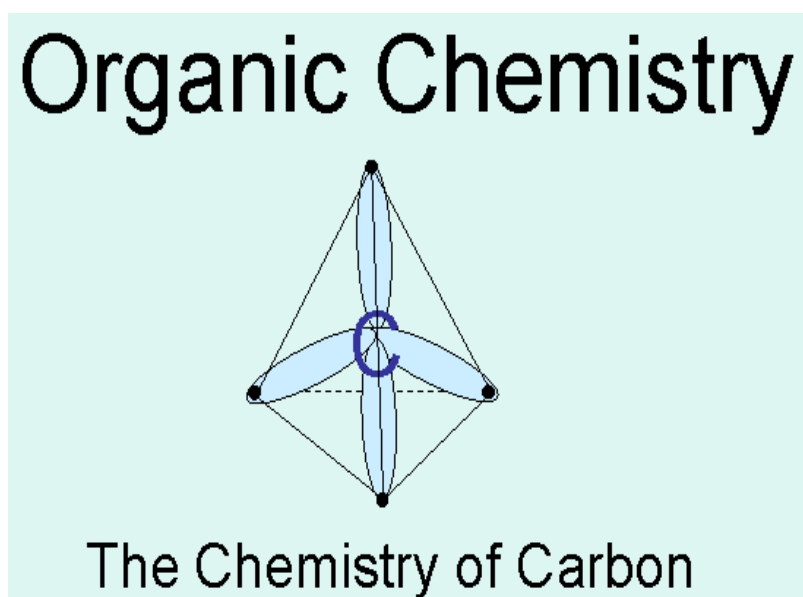
**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας - Μοριακή Γενετική -
Διαγνωστικοί Δείκτες**

ΠΑΡΜΕΝΟΠΟΥΛΟΥ ΒΑΝΕΣΑ

Διπλωματική Εργασία

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



ΛΑΡΙΣΑ 2012

Διπλωματική Εργασία

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ 4'-ΚΥΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΙ
ΑΝΤΙΙΚΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Κομιώτη Δημήτριο τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω προσωπικά για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε, όλο αυτό το διάστημα και τις εποικοδομητικές του υποδείξεις.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη διδάσκουσα κα. Μαντά Στυλιανή για όλα τα εφόδια που μου μεταβίβασε και χρειάστηκαν ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κυρίτση Χρήστο για την υποστήριξη και τις υποδείξεις κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας.

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	σελ.7
2. ABSTRACT.....	σελ.8
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
i. Υδατάνθρακες.....	σελ.9
ii. Υδατάνθρακες και σχηματισμός ημιακετάλης.....	σελ. 10
iii. Βάσεις.....	σελ. 15
iv. Νουκλεοζίτες και αναλογά τους.....	σελ. 17
v. Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες.....	σελ. 18
vi. Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.....	σελ.20
vii. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών.....	σελ.21
viii. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια πεντόζη.....	σελ.25
ix. Κύανο- φούρανο-νουκλεοζίτες	σελ.26
x. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη.....	σελ.27
4. ΣΚΟΠΟΣ.....	σελ.30
5. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	
i. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	σελ.31
ii. Χρωματογραφία στήλης.....	σελ.31
iii. Ξήρανση διαλυτών.....	σελ.33
iv. Ταυτοποίηση ενώσεων.....	σελ.33
6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
i. Επισκόπηση συνθετικής οδού.....	σελ.34
ii. Μεθοδολογία σύνθεσης.....	σελ.35
iii. Σύνθεση της 1,2,3,4,6-Πεντα-Ο-ακετυλο-D-μαννοπυρανόζης.....	σελ.38
iv. Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-Τετρα-Ο-ακετυλο-α-D- μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης.....	σελ.39
v. Σύνθεση της 1-(α-D-Μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης.....	σελ.40
vi. Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-Ισοπρωπιλιδενό-α-D- μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης.....	σελ.40

vii. Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-Ισοπροπυλιδανο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-μαννοπιρανοζυλ)ουρακίλης.....σελ. 41	σελ. 41
viii. Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-Ισοπροπυλιδανο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-λυξο-εξωπιρανοζυλο-4'-ουλοζ)ουρακίλης.....σελ. 42	σελ. 42
ix. Σύνθεση της 1-(4'κυανο-2',3'-Ο-Ισοπροπυλιδανο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-μαννοπιρανοζυλ)ουρακίλης.....σελ. 43	σελ. 43
x. Σύνθεση της 1-(4'κυανο-α-D-μαννοπιρανοζυλ)ουρακίλης.....σελ. 44	σελ. 44
7. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H-NMR.....σελ. 45	σελ. 45
8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ. 45	σελ. 45
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ. 47	σελ. 47

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια εξαιτίας των θεραπευτικών ιδιοτήτων που διαφαίνεται να έχουν οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί ολοένα και περισσότερο στη μελέτη και σύνθεσή τους. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά, με αντικαρκινική και αντιική δράση, περιέχουν νουκλεοζίτες αποτελούμενους από μονοσακχαρίτες με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση. Αυτό το γεγονός ώθησε στην σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών με εξαμελή δακτύλιο, οι οποίοι αναμένεται να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην αντιική και αντικαρκινική θεραπεία.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η συνθετική πορεία ενός νέου νουκλεοζιτικού αναλόγου με εν δυνάμει νέες αντιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, του 4'-κυανοπυρανονουκλεοζίτη της ουρακίλης.

ABSTRACT

In recent years, the research interest has turned to the study and synthesis of nucleosides and nucleoside analogues, mainly because of their therapeutic potential. It is well known that many natural antibiotics with anticancer and antiviral action contain nucleosides consisting of monosaccharides with a five or six-member ring with a heterocyclic basis connected to a ring-position. This fact led to the synthesis of modified nucleosides of six-member ring, which is expected to play an important role in antiviral and anticancer therapy.

This thesis describes the synthesis of a nucleoside analogue with potential novel antiviral and anticancer properties, that of the 4'-cyano-pyranonucleoside of uracil.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Έχει αποδειχτεί ότι οι νουκλεοζίτες, αποτελούμενοι από ολιγοσακχαρίτες (φουρανόζη, πυρανόζη) συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση, υπάρχουν σε πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντικαρκινική, αντιική αλλά και αντιδιαβητική δράση. Αυτό το γεγονός έθεσε τα θεμέλια για τη σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιδίων οι οποίοι αναμενόταν να συμβάλλουν καθοριστικά στην αντιική, αντικαρκινική και αντιδιαβητική θεραπεία. Οι κλινικές έρευνες που ακολούθησαν επιβεβαίωσαν την υπόθεση αυτή με αποτέλεσμα να ξεκινήσει η χρήση τροποποιημένων νουκλεοζιδίων στην αντιική και αντικαρκινική χημειοθεραπεία.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι νουκλεοζίτες με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο (πύρανο), καθώς πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα εμφάνισαν σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων και κριθήκαν αποτελεσματικά στην αναστολή της μόλυνσης από εντεροϊό. Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιείται η σύνθεση και αξιολόγηση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιδίων, των 4'-κύανο νουκλεοζιδίων.

i. Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες αποτελούν μια από τις τέσσερις κύριες κατηγορίες βιομορίων (λιπιδίων, νουκλεϊκά οξέα και αμινοξέα) που συναντώνται σε κάθε ζωντανό οργανισμό και πρόκειται για μια ομάδα οργανικών ουσιών με γενικό χημικό τύπο $C_n(H_2O)_n$. Ειδικότερα, οι υδατάνθρακες αποτελούν μια ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων αλδεϋδών (δηλαδή μια ομάδα ατόμων που περιέχει ένα καρβονύλιο ($>C=O$) και ένα 1 άτομο υδρογόνου, συνολικά $-CH=O$ ή πιο συνοπτικά $-CHO$) και κετονών (κατηγορία οργανικών ενώσεων που περιέχουν τη χαρακτηριστική ομάδα καρβονύλιο ($C=O$) στην αλυσίδα τους. Η ίδια χαρακτηριστική ομάδα υπάρχει και στις αλδεϋδες, η διαφορά όμως είναι ότι στις κετόνες η ομάδα βρίσκεται μέσα στην αλυσίδα του μορίου, ενώ στις αλδεϋδες στο άκρο της) που ονομάζονται σάκχαρα. Τα μοριακά βάρη αυτών των μορίων ποικίλουν και σύμφωνα με αυτά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις κατηγορίες:

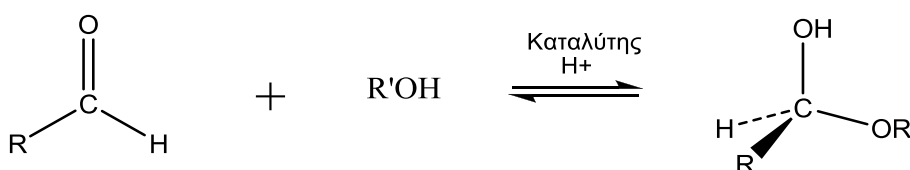
- *Μονοσακχαρίτες*, με κύριους αντιπροσώπους τη γλυκόζη και φρουκτόζη. Τα μόρια αυτά είναι τα μονομερή για τη σύνθεση πολυπλοκότερων δομών.
- *Δισακχαρίτες*, με κύριους αντιπροσώπους τη σουκρόζη, λακτόζη και μαλτόζη. Αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες.
- *Ολιγοσακχαρίτες*, με κύριους αντιπροσώπους τις μαλτοδεξτρίνες και τους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες. Αποτελούνται από 20-30 μονοσακχαρίτες.

- *Πολυσακχαρίτες*, με κύριους αντιπροσώπους το άμυλο, το γλυκογόνο και την κυτταρίνη. Τα μόρια αυτά αποτελούνται από εκατοντάδες χιλιάδες υπομονάδες γλυκόζης.

Η βιολογική τους σημασία είναι τεράστια αφού αποτελούν πηγή ενέργειας, δομικά στοιχεία των κυττάρων και άλλων μακρομορίων όπως οι γλυκοπρωτεΐνες, οι λιποπολυσακχαρίτες και τα νουκλειικά οξέα (ανάγοντες μονοσακχαρίτες, ριβόζη και δεοξυριβόζη).

ii. Υδατάνθρακες και Σχηματισμός Ημιακετάλης

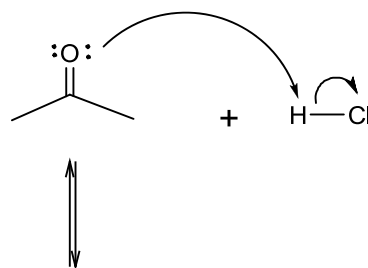
Είναι γνωστό ότι οι αλκοόλες (οποιαδήποτε οργανική ένωση που περιέχει ένα ή περισσότερα υδροξύλια (-OH), συνδεδεμένα με άτομο άνθρακα και εφόσον το υδροξύλιο είναι η κύρια χαρακτηριστική ομάδα της ένωσης) πραγματοποιούν μια γρήγορη και αντιστρεπτή πυρηνόφιλη προσθήκη (**Εικόνα 1**) με κετόνες ή αλδεΐδες προς σχηματισμό ημιακεταλών με γενικό τύπο RCH(OH)OR₁ (Mc Murry, 2000, p. 1245).



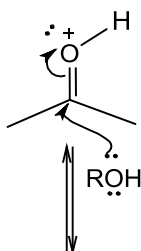
Εικόνα 1: Πυρηνόφιλη Προσθήκη

Ο μηχανισμός της αντίδρασης περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα (Mc Murry, 2000, p. 905).

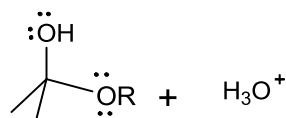
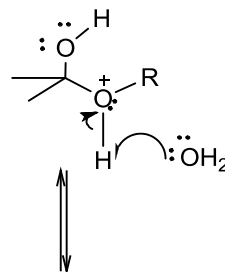
Η πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου πολώνει έντονα το καρβονύλιο και...



...ενεργοποιεί την καρβονυλική ομάδα για πυρηνόφιλη προσβολή από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου της αλκοόλης.



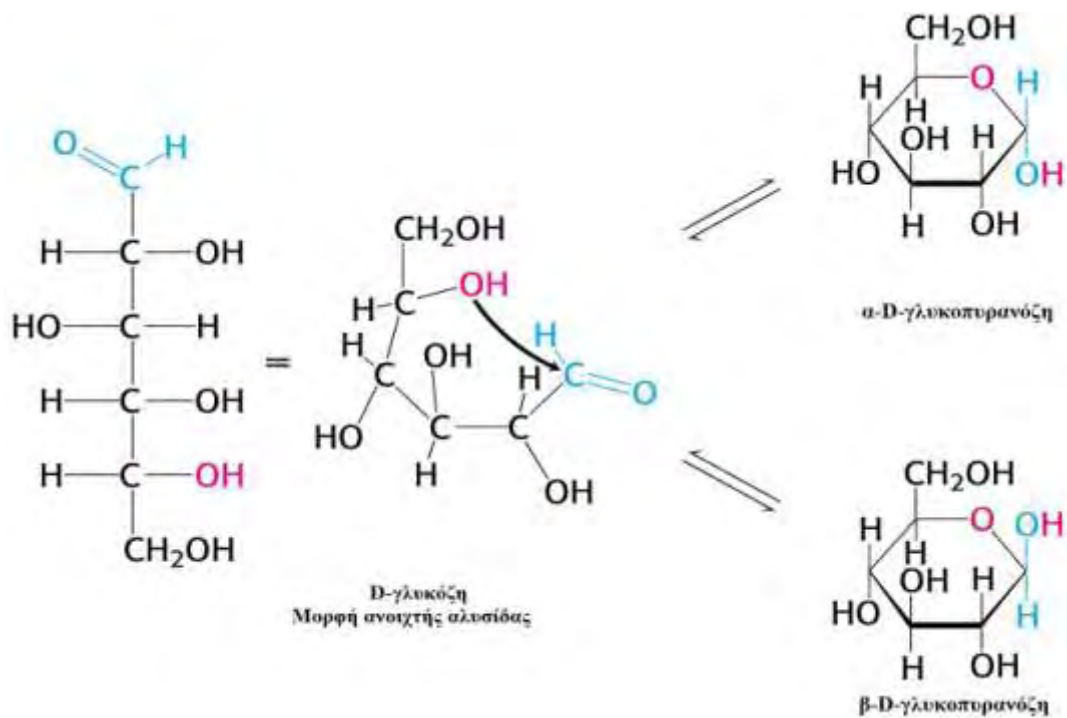
Απόσπαση ενός πρωτονίου οδηγεί σε ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, μια ουδέτερη ημιακετάλη



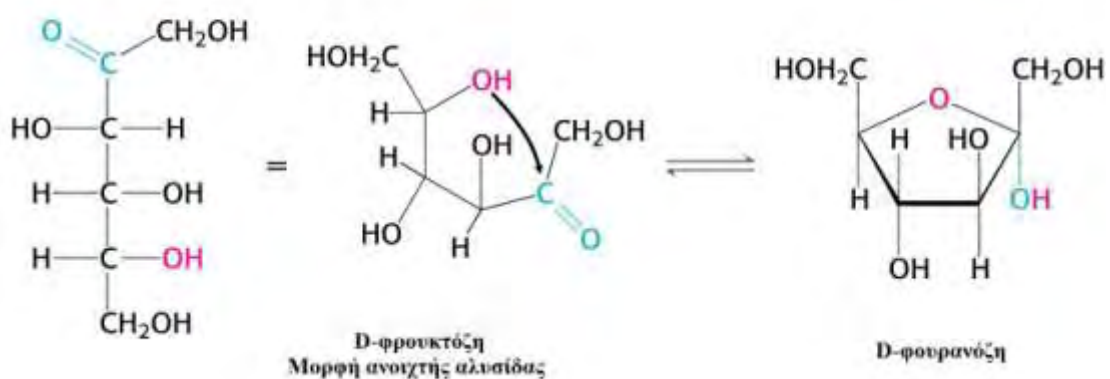
Δεδομένου ότι οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν σε δύο μορφές: τη μορφή ανοιχτής αλυσίδας και την κυκλοποιημένη μορφή εφόσον η υδροξυλομάδα και το καρβονύλιο βρίσκονται στο ίδιο μόριο μπορεί να πραγματοποιηθεί η πυρηνόφιλη προσθήκη προς σχηματισμό κυκλικής ημιακετάλης.

Αυτή η ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη καταλήγει στη δημιουργία φουρανοζών (πενταμελείς δακτύλιοι) ή πυρανοζών (εξαμελείς δακτύλιοι). Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό και αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοιχτής και κλειστής αλυσίδας. Αναλυτικότερα, στην περίπτωση της πυρανόζης η αλδεϋδική ομάδα του άνθρακα C-1 της γλυκόζης

αντιδρά με το υδροξύλιο που βρίσκεται στη θέση C-5, σχηματίζοντας αρχικά μια ενδομοριακή ημιακετάλη και στη συνέχεια το επιθυμητό μόριο (**Εικόνα 2**). Ενώ στην περίπτωση της φουρανόζης, η κετονική ομάδα του άνθρακα C-2 αντιδρά με το υδροξύλιο του άνθρακα C-5 προς σχηματισμό τους πενταμελούς δακτυλίου της φουρανόζης (**Εικόνα 3**).

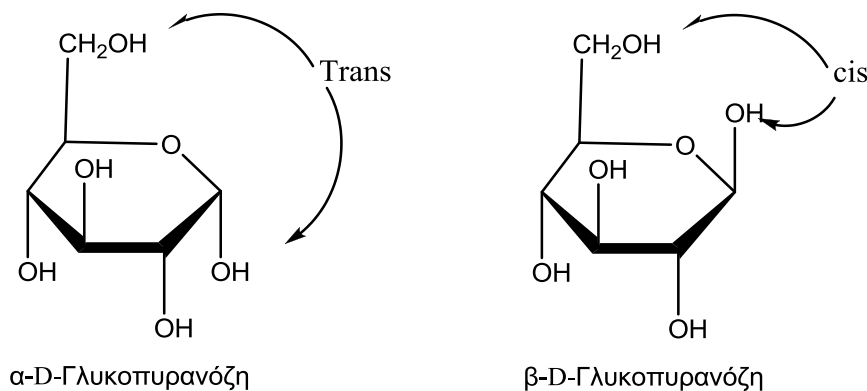


Εικόνα 2: Σχηματισμός γλυκοπυρανόζης



Εικόνα 3: Σχηματισμός φουρανόζης

Με την κυκλοποίηση των σακχάρων σε ημιακετάλη σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο (άνθρακας με τέσσερις διαφορετικούς υποκαταστάτες) στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα και παρουσιάζεται το φαινόμενο της ανωμέρειας(η στερεοχημική ισομέρεια δηλαδή μεταξύ α- και β- ισομερών εφόσον βέβαια η υπόλοιπη στερεοχημική τους δομή είναι ίδια, σελ 178 νικολαΐδης). Στην περίπτωση της γλυκόζης, ο άνθρακας στη θέση C-1 είναι ανωμερής και σχηματίζονται έτσι δύο στερεοχημικές δομές: η α-D- γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη (**Εικόνα 4**). Οι χαρακτηρισμοί α- και β- αναφέρονται στη θέση στον χώρο όπου βρίσκεται η υδροξυλομάδα του ανωμερούς άνθρακα σε σχέση με τον υποκαταστάτη του C-5. Όταν ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου ως προς τον υποκαταστάτη του άνθρακα στη θέση C-5 (θέση trans), τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως ανωμερές α. Όταν ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με τον υποκαταστάτη του άνθρακα C-5, τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως ανωμερές β. Στην περίπτωση της φουρανόζης, ο ανωμερής άνθρακας είναι ο C-2.



Εικόνα 4: Ανωμερή της D-γλυκόζης

Οι δομές αυτές (Haworth) δεν παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης. Ο συγκεκριμένος δακτύλιος δεν είναι δυνατό να είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα.

Οι δακτύλιοι της πυρανόζης μπορούν να υιοθετήσουν στερεοδιατάξεις ανακλίντρου, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι τάσεις, αφού όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες

μεταξύ των γειτονικών ατόμων άνθρακα μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνίας (Mc Murry, 2000, p. 151).

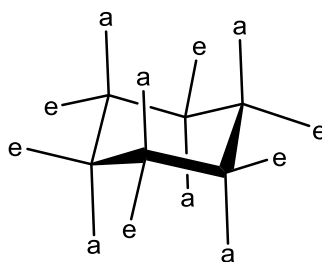
Όσον αφορά τους υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου αυτοί είναι δύο ειδών: αξονικοί και ισημερινοί (**Εικόνα 5**). Οι αξονικοί δεσμοί έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- είναι σχεδόν κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου
- οι υποκαταστάτες προβάλλουν πάνω και κάτω από το μέσο επίπεδο του δακτυλίου
- οι υποκαταστάτες, εκτός του υδρογόνου, παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλον με την προϋπόθεση ότι βρίσκονται στην ίδια πλευρά του δακτυλίου.

Ενώ, οι ισημερινοί δεσμοί έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

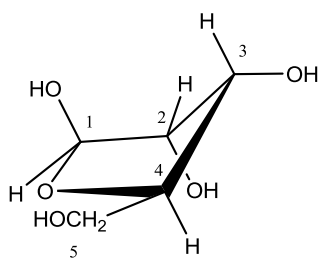
- είναι σχεδόν παράλληλοι προς το επίπεδο του δακτυλίου
- οι υποκαταστάτες διατάσσονται στην περιφέρεια
- οι υποκαταστάτες δεν παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλον, καθώς υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ότι στην αξονική θέση.



Εικόνα 5: Μορφή ανακλίντρου μιας πυρανόζης (e = ισημερινός υποκαταστάτης, a = αξονικός υποκαταστάτης)

Κατά αναλογία ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να είναι πτυχωμένος, έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού (**Εικόνα 6**). Αυτή η διαμόρφωση καλείται μορφή φακέλου. Οι δακτύλιοι της φουρανόζης είναι σε θέση να αλληλομετατρέπονται ταχύτατα σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις. Είναι πολύ πιο ευέλικτοι από τους δακτυλίους της πυρανόζης, γεγονός που εξηγεί την επιλογή τους ως συστατικών του RNA και DNA (Stryer, 2001).

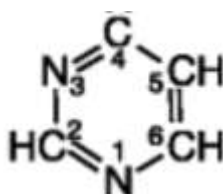


Εικόνα 6: Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης

iii. **Βάσεις**

Ετεροκυκλικές χαρακτηρίζονται οι κυκλικές ενώσεις που περιέχουν σαν κρίκους του δακτυλίου, εκτός από άτομα άνθρακα κι άλλα τουλάχιστον δισθενή στοιχεία όπως π.χ. Ο, Ν ή S. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αρωματικές ετεροκυκλικές ενώσεις, δηλαδή οι ακόρεστες, επίπεδες, πλήρως συζυγιακές ετεροκυκλικές ενώσεις των οποίων ο αριθμός των π ηλεκτρονίων των πολλαπλών δεσμών τους μαζί με τον αριθμό των μονήρων ηλεκτρονικών ζευγών των ετεροατόμων τους, που συμμετέχουν στη συζυγία του δακτυλίου ικανοποιούν τον κανόνα του Huckel σύμφωνα με τον οποίο αρωματικό είναι ένα ακόρεστο, κυκλικό, επίπεδο, πλήρως συζυγιακό σύστημα, όταν περιέχει $4n+2$ π ηλεκτρόνια, όπου $n=0,1,2,3,\dots$ (Δ.Ν. Νικολαΐδης, Οργανική Χημεία, τόμος 2, σελ. 148)

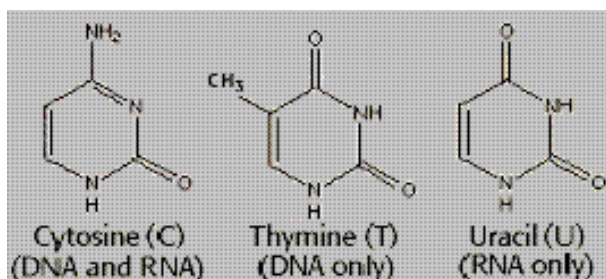
Υπάρχουν τόσο πενταμελείς όσο και εξαμελείς ετεροκυκλικές ενώσεις χαρακτηριστικό των οποίων είναι η αρωματικότητα. Από τις αντίστοιχες εξαμελείς ενδιαφέρον παρουσιάζει η 1,3-διαζίνη ή πυριμιδίνη (**Εικόνα 7**). Παράγωγα της πυριμιδίνης είναι οι ουρακίλη, θυμίνη (υδροξυ-πυριμιδίνες), η κυτοσίνη και το βαρβιτουρικό οξύ.



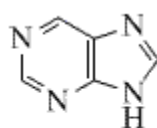
Πυριμιδίνη

Εικόνα 7: Δομή της 1,3-διαζίνης ή πυριμιδίνης

Παράγωγα της πυριμιδίνης είναι οι ουρακίλη, θυμίνη (υδροξυ-πυριμιδίνες), η κυτοσίνη και το βαρβιτουρικό οξύ. Όπως ήδη έχουμε αναφέρει βάσεις ουρακίλη, θυμίνη και κυτοσίνη απαντώνται τόσο στο RNA όσο και το DNA όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα:

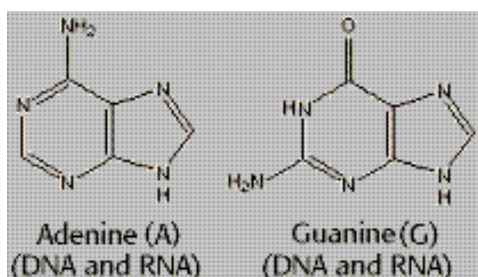


Από τη συμπύκνωση της πυριμιδίνης και του ιμιδαζολίου προκύπτει η πουρίνη ή ιμιδαζολο [4,5-d] πυριμιδίνη με δομή που φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα:



purine

Μεγαλύτερο ενδιαφέρον όμως παρουσιάζουν τα παράγωγα της πουρίνης, υποξανθίνη, ξανθίνη, αδενίνη και γουανίνη που αποτελούν τις πουρινικές βάσεις του DNA (**Εικόνα 8**).

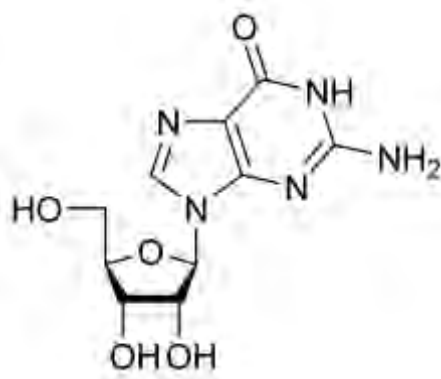


Εικόνα 8: Δομή των αδενίνη και γουανίνη, δύο από τις βάσεις του DNA

iv. Νουκλεοζίτες και ανάλογα τους

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς της φύσης, καθώς αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Πρόκειται για γλυκοσυλαμίνες που προκύπτουν από την ένωση μιας βάσης, πουρίνης

(αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδίνης (θυμίνη, κυτοσίνη, ουρακίλη), με τον άνθρακα C-1 μιας πεντόζης (σάκχαρο με 5 άτομα άνθρακα στην αλυσίδα του) μέσω β-N-γλυκοζιτικού δεσμού (Stryer, 2001). Αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, τότε αναφερόμαστε σε ριβονουκλεοζίτη που είναι δομικό στοιχείο του RNA ή δεοξυριβονουκλεοζίτη που είναι δομικό στοιχείο του DNA αντίστοιχα. Τα μόρια αυτά έχουν β στερεοδιάταξη, γιατί η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου (**Εικόνα 9**).

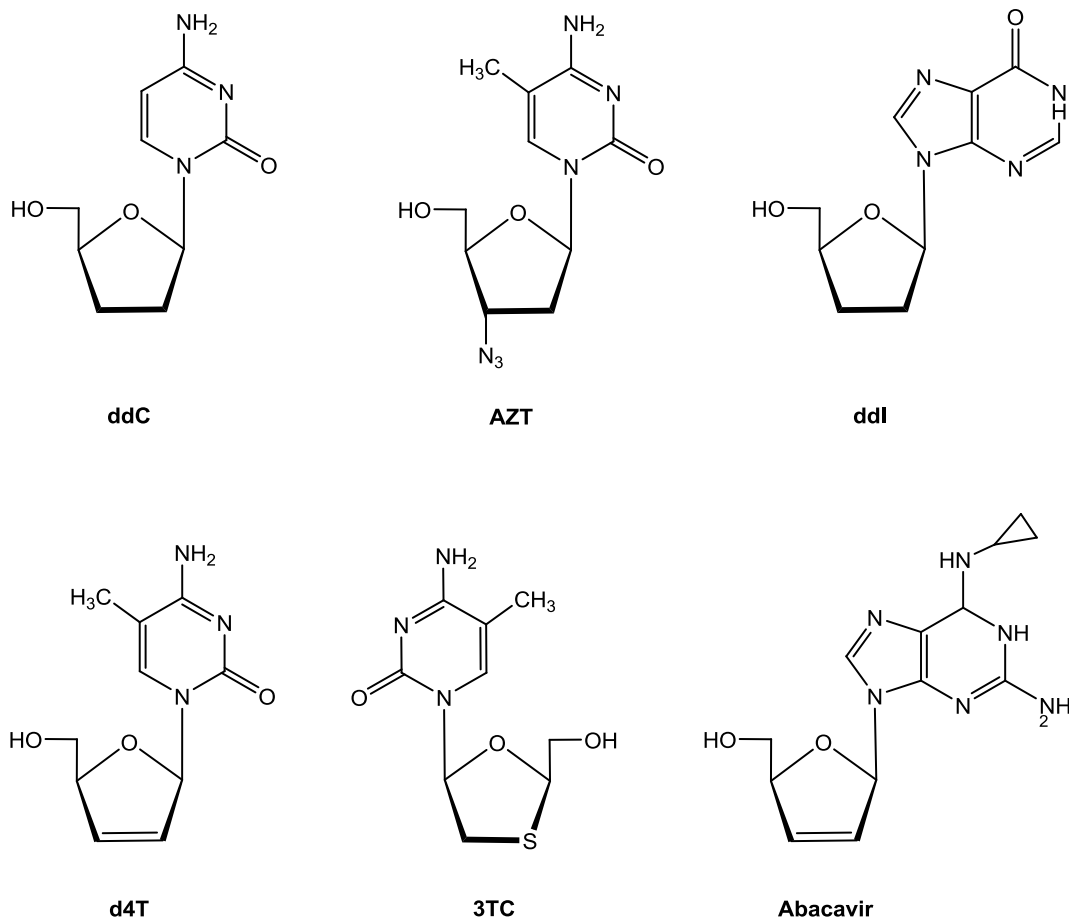


Εικόνα 9: β- στερεοδιάταξη του N-γλυκοσιζιτικού δεσμού της γουανοσίνης

Έχει διαπιστωθεί ότι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες καθώς και τα τροποποιημένα ανάλογά τους επιδεικνύουν σημαντική αντικαρκινική, αντιβακτηριακή, αντιική δράση και κυτταροτοξική δράση. Επιπλέον, πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. Άξιο δε λόγου είναι και το γεγονός ότι ανάλογα νουκλεοσιδίων ήταν μεταξύ των πρώτων ενώσεων με φαρμακολογικό ενδιαφέρον για τη θεραπεία του καρκίνου (Galmarini et al. 2002). Γι' αυτό και ένα σεβαστό κομμάτι της έρευνας έχει επικεντρωθεί στην κατανόηση της σχέσης δομής-δράσης των νουκλεοζιτών καθώς και στην τροποποίησή τους, είτε σε επίπεδο σακχάρου είτε σε επίπεδο βάσης, με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών δραστηριοτήτων τους.

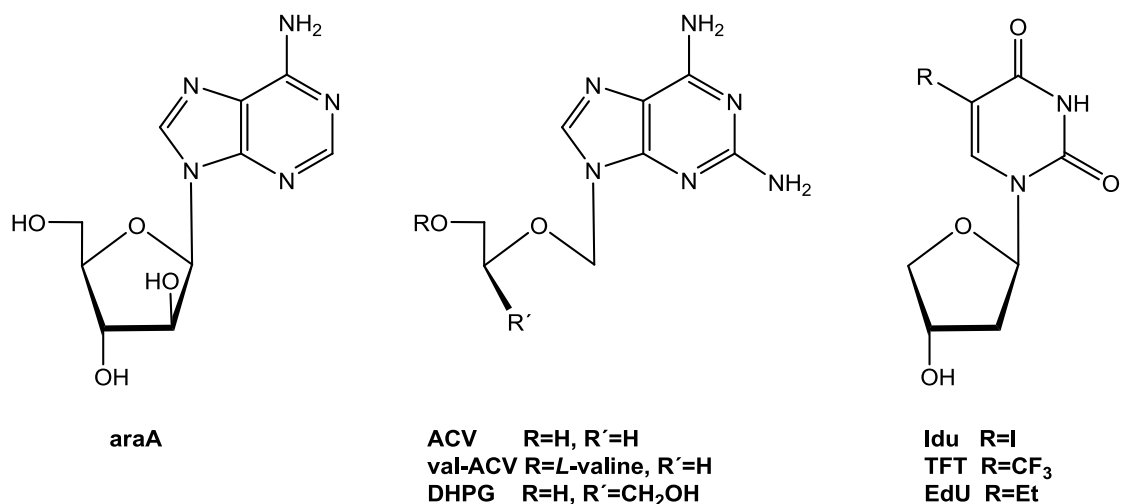
v. Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους, παρεμβαλλόμενοι στη σύνθεση του DNA και του RNA, μπορούν να επηρεάσουν εκτός από τη σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων των καρκινικών κυττάρων, τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων (Zhou *et al.* 2004; Perigaund *et al.* 1992). Ιδίως τις τελευταίες δύο δεκαετίες η σύνθεση και η μελέτη των νουκλεοζιτών έχει ανέλθει κατακόρυφα με στόχο τη θεραπεία του AIDS (HIV) (Verheggen *et al.* 1993), του ιού έρπητα ζωστήρα (VZV) (Zhou *et al.* 2004; De Clercq *et al.* 2002a) και της ηπατίτιδας Β (HBV) (Brady *et al.* 2001). Στην περίπτωση του HIV, έξι από τα δεκαπέντε θεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι νουκλεοζιτικά ανάλογα, όπως τα Zalcitabine (ddC), Zidovudine (AZT), Didanosine (ddl), Stavudine (d4T), Abacavir και Lamivudine (3TC) (**Εικόνα 10**). Τα συγκεκριμένα ανάλογα δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού. Στην Αμερική, για τη θεραπεία του ιού HBV, έχει ήδη εγκριθεί και χρησιμοποιείται το 3TC σε συνδυασμό με το Interferone-α.



Εικόνα 10

Για τη θεραπεία του CMV, του HSV 1 και 2 και του VZV χρησιμοποιείται πλήθος νουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως Vidarabine (araA), Acyclovir (ACV), Idoxuridine (Idu), Trifluridine (TFT), Acedurid (EdU), Ganciclovir (DHPG) και Valaciclovir (val-ACV) (Gumina *et al.* 2001) (**Εικόνα 11**), τα οποία δρουν ως αναστολείς της DNA πολυμεράσης.



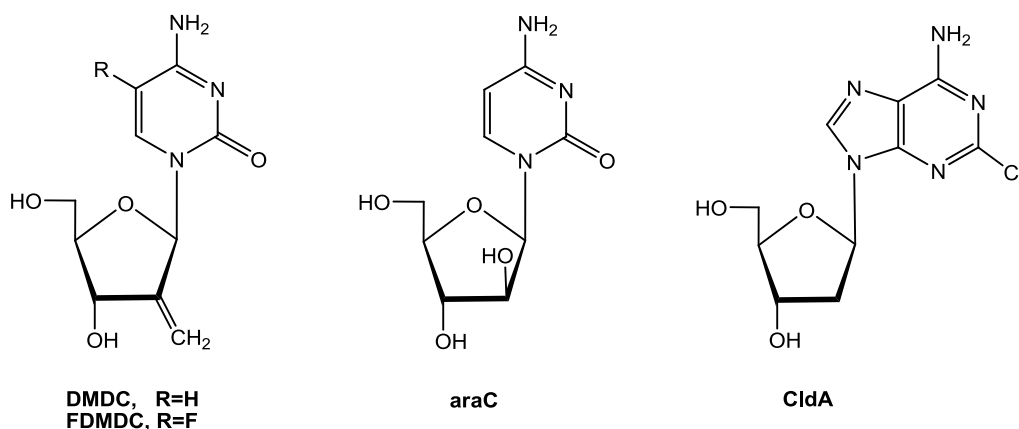
Εικόνα 11

vi. Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σ' έναν υγιή οργανισμό υπόκειται πάντα σε αυστηρές ρυθμίσεις, που επιτρέπουν στα κύτταρα να αυξηθούν, να διαφοροποιηθούν και να λειτουργήσουν αρμονικά μέσα στον οργανισμό. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις ρυθμίσεις αυτές, αν και οι περισσότεροι παραμένουν ακατανόητοι, περιλαμβάνουν ένα σύστημα χημικών μηνυμάτων με τη διαμεσολάβηση, για παράδειγμα, ορμονών και συγκεκριμένων μεμβρανικών υποδοχέων. Τα κύτταρα σε καλλιέργεια, σταματούν την διαίρεσή τους όταν έρθουν σ' επαφή το ένα με το άλλο. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται και η μιτωτική διαίρεση ορισμένων κυττάρων συνεχίζεται άναρχα, χωρίς να υπακούει σε περιοριστικούς κανόνες. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία όγκων ή καρκινωμάτων. Τα κύτταρα χάνουν τη διαφοροποιημένη μορφή τους και περνούν σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μπορεί να είναι περιορισμένος (καλοήθεις όγκοι), ή έντονος με μεταστάσεις σε άλλους ιστούς (κακοήθεις όγκοι), οι οποίοι θεραπεύονται κυρίως με χημειοθεραπεία.

Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία διαθέτουν αυξημένη δραστηριότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το

σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύει στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊνικών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC), 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πεντοφουρανοζυλο)5-φθοροκυτοσίνη (FDMDC), 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC) και 2-χλωρο-2'-δεσοξυαδενοσίνη (CldA) (**Εικόνα 12**) έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών, όπως διάφοροι τύποι λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Cory *et al.* 1994, Pontikis *et al.* 1995, Yamagami *et al.* 1991, Lin *et al.* 1991, Baker *et al.* 1991, Matsuda and Sasaki 2004). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).



Εικόνα 12

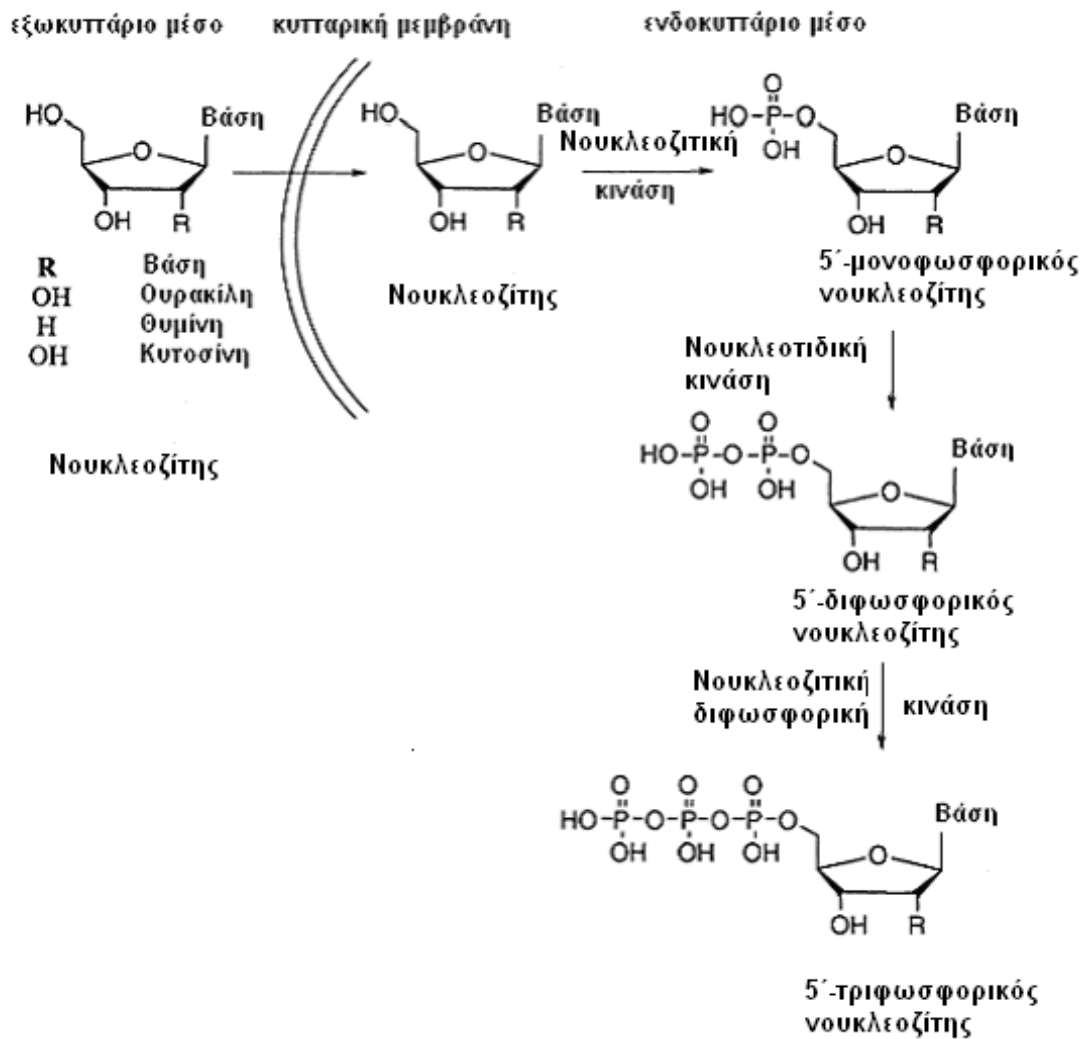
vii. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Όπως είναι γνωστό, η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά, αλλά έχουν και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επιπλέον, πραγματοποιείται ενδοκυτταρική τροποποίησή τους με σκοπό την παραγωγή των νουκλεοτιδίων και οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν τα νουκλεοτίδια ως βασικές δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA.

Βασιζόμενοι στην παθητική διάχυση, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα, μόρια που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, χρησιμοποιήθηκαν ως αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες για τη θεραπεία πληθώρας ασθενειών (Zhou *et al.* 2004).

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών, συνήθως δρουν ως προφάρμακα, δηλαδή είναι ανενεργά στην μορφή που χορηγούνται και πρέπει, για να ασκήσουν την θεραπευτική τους δράση, να μεταβολιστούν προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους (Arner and Eriksson, 1995). Οι φωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών δεν μπορούν να διαπεράσουν με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη λόγω φορτίου, όπως επίσης και όταν δημιουργηθούν μέσα στο κύτταρο η μετακίνησή τους προς γειτονικά κύτταρα είναι δύσκολη λόγω του διαφορετικού pH που υπάρχει στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα.

Η φωσφορυλίωση αρχίζει με την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στην 5'-θέση του σακχάρου, η οποία καταλύεται από ειδικές ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες, προς τη δημιουργία ενός μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (Wagner *et al.* 2000, Balzarini 1993). Οι μετέπειτα φωσφορυλίώσεις προς τις διφωσφορικές και τριφωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών καταλύονται από νουκλεοδιτικές κινάσες και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντιστοίχως. Η φωσφορυλίωση από ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες όπως επίσης και η χαμηλή ικανότητα διαπερατότητας των φωσφορυλιωμένων νουκλεοζιτών οδηγούν στην συσσώρευση των φαρμακολογικά ενεργών μορφών τους, στα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό. Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, εντοπίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Μιμούμενα τους φυσικούς νουκλεοζίτες, τα αντιικά ανάλογά τους μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τις πολυμεράσες και να ενσωματωθούν στο ιικό γονιδίωμα.

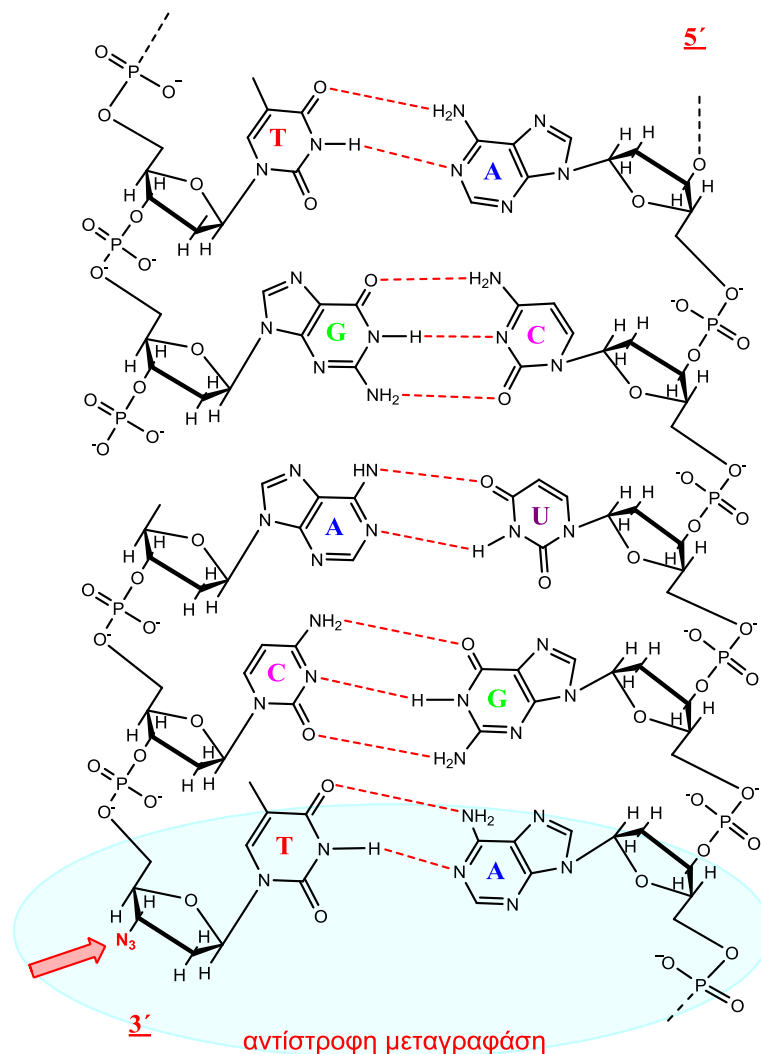


Σχήμα 1: Τροποποίηση των νουκλεοζιτικών αναλόγων προς την ενεργή τους μορφή μέσω ενδοκυτταρικής φωσφορυλίωσης.

Η ενσωμάτωσή τους στο ιικό γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει διακοπή της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, να το καταστήσει μη λειτουργικό και κατά συνέπεια να καταστείλει την αντιγραφή του ιού και την περαιτέρω παραγωγή ισωματιδίων. 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 *et al.* 2002). Αξίζει να σημειωθεί πως μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιική

πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητα τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

Ένας κοινός μηχανισμός αντιικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωση των νουκλεοζιτών στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της (**Σχήμα 2**). Η ένωση των νουκλεοτιδίων καταλύεται από κυτταρικές πολυμεράσες οι οποίες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των σακχάρων (Lewin 2003, Burns *et al.* 2005).



Σχήμα 2

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

Το σάκχαρο, είναι το τμήμα του νουκλεοζίτη που χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τις κινάσες και τις πολυμεράσες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την επιμήκυνση των αλυσίδων. Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας. Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών, οι οποίοι δρουν ως αντιβιοτικά βασίζεται είτε στο ότι καταστρέφουν συγκεκριμένα τμήματα των βακτηρίων, όπως τη μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμά τους, είτε στο ότι επιδρούν στην σύνθεση των πρωτεϊνών (Siev *et al.* 1969) και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης (Ahn *et al.* 2000).

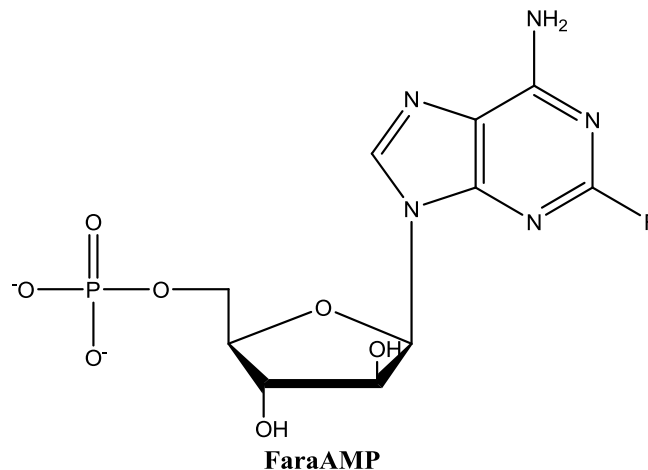
viii. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια πεντόζη

Ο ρόλος των πεντοζών επισημάνθηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως κύριες δομικές μονάδες των νουκλεϊκών οξέων. Η πλειοψηφία των μέχρι τώρα ερευνητικών προσπαθειών για τη δημιουργία φαρμάκων με αντιαρκική και αντικαρκινική δράση, επικεντρώθηκε στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη.

Χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας με σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες αποτελούν οι εξής:

- Το Cytarabine (araC) (**Εικόνα 12**), το οποίο είναι το πρώτο πυραμιδινικό νουκλεοζιτικό ανάλογο που χρησιμοποιήθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας
- Η 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλαδερίνη (araA) είναι ένα από τα πρώτα πουρινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα, το οποίο απορρίφθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας λόγω της χαμηλής διαλυτότητας και της γρήγορης απαμίνωσής της από την απαμινάση της αδενοσίνης. Η

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



Εικόνα 11: Χημική δομή του FaraAMP

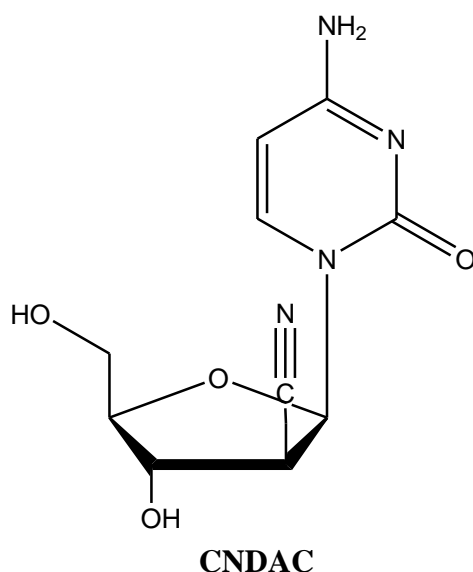
Επίσης, μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα φουρανο νουκλεοζιτών με εξαιρετική αντιική δράση είναι:

- Τα Zalcitabine (DDC), didanosine (DDI), zidovudine (AZT), τα οποία λειτουργούν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης και χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα έναντι του HIV (**Εικόνα 10**). Πρόκειται για 2',3'-διδεοξυνουκλεοζίτες που προκύπτουν από την απομάκρυνση των υδροξυλομάδων από τις 2',3'- θέσεις του δακτυλίου της ριβόζης.

ix. Κύανο- φούρανο-νουκλεοζίτες

Στο πεδίο έρευνας των φούρανο-νουκλεοζιτών μελετήθηκε από νωρίς η εισαγωγή της κύανο ομάδα σε διάφορες θέσεις του σακχάρου για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων (O-Yang et al. 1992, Satoru et al.

2003). Η κύανο ομάδα εμφανίζει ελάχιστες στερεοχημικές παρεμποδίσεις εξαιτίας του μικρού της μεγέθους καθώς και υψηλή ηλεκτραρνητικότητα, γεγονός που μπορεί και να προσδώσει ιδιαίτερες χημικές ιδιότητες στο μόριο και να αλλάξει τη βιολογική του δραστηριότητα. Ορόσημο στη μελέτη των κύανο φούρανουκλεοζιτών αποτελεί η ανακάλυψη του CNDAC (2-C-κυανο-2-δεοξυ-1-β-D-αραβινοφουρανοσυλπιτοσίνη) (Motohiro Tanaka et al. 1992), το οποίο αποτελεί σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα έναντι μεγάλου φάσματος κακοήθων όγκων, όπως αυτού του πνεύμονα και του στομάχου.

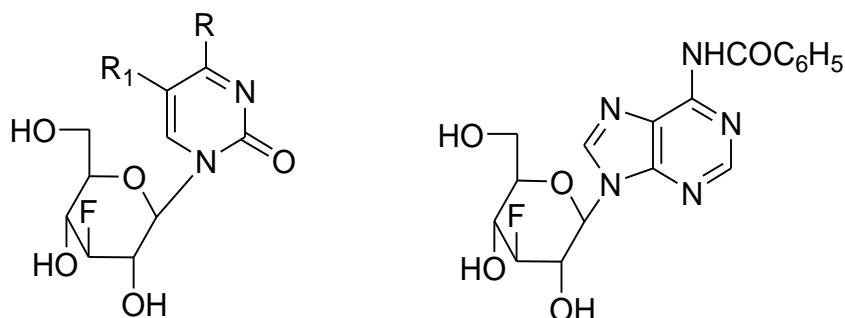


x. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη

Μια άλλη σημαντική κατηγορία νουκλεοζιτών αποτελούν τα νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο. Οι συγκεκριμένες ενώσεις έχουν εμφανίσει έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον κυρίως λόγω της αντιικής, αντικαρκινικής καθώς και αντιδιαβητικής τους δράσης.

Στο εργαστήριο της Βιο-Οργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έχουν συντεθεί φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Manta et al. 2007), οι οποίοι μειώνουν αποτελεσματικά τη δραστηριότητα της PARN, ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(A) ουράς) (**Εικόνα 12**). Τα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να χρησιμοποιηθούν

ως πρότυπες ενώσεις για την ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν την PARN (Balatsos *et al.* 2009).

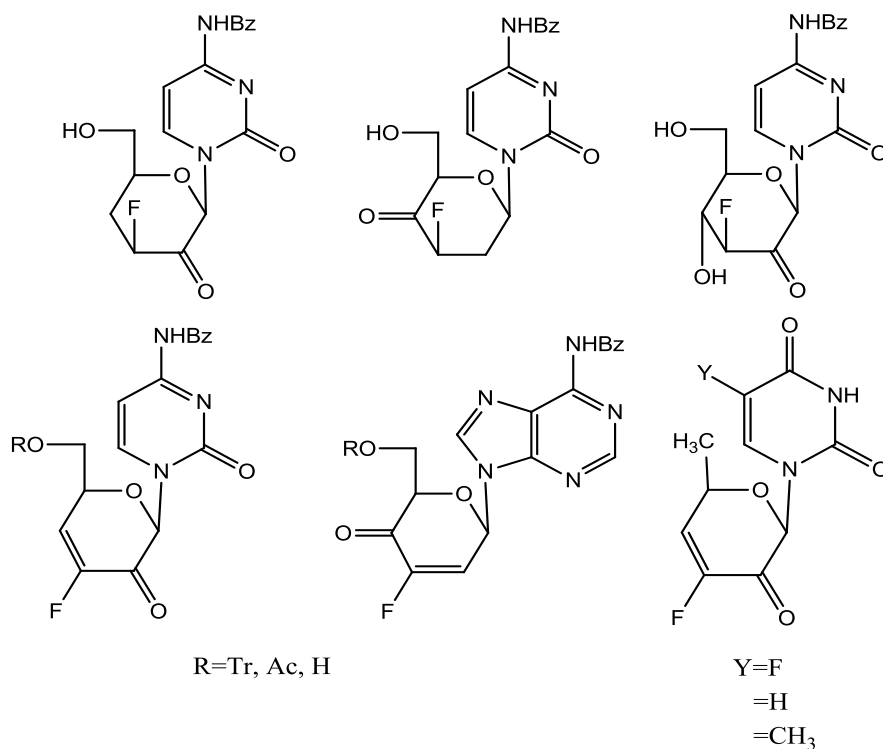


R = OH, R₁ = H
R = OH, R₁ = F
R = NH₂, R₁ = H
R = NHCOC₆H₅, R₁ = H

Νέες

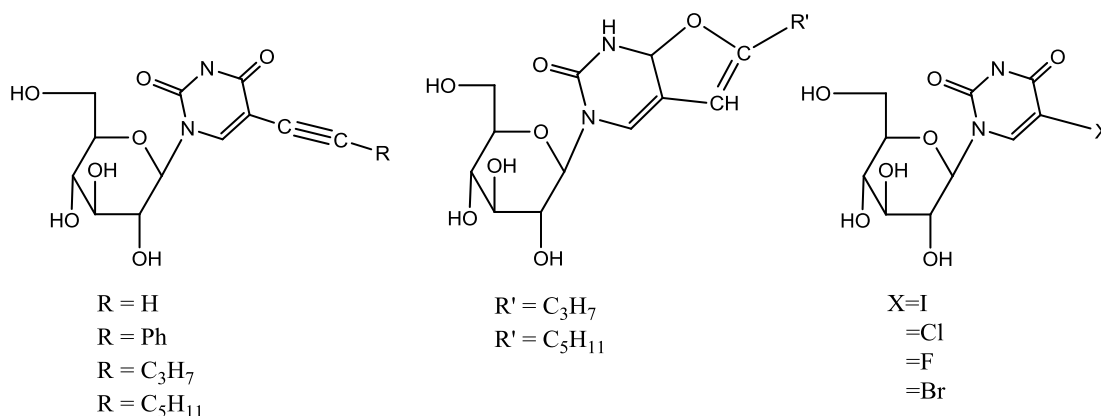
Εικόνα 12: Χημική δομή φθορο- πυρανονουκλεοζιτών

Νέες σειρές νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο που επίσης έχουν μελετηθεί αποτελούν οι φθορο κετο και ακόρεστοι φθορο κετο πυρανονουκλεοζίτες. Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης εντεροϊού και αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Manta *et al.* 2007, Manta *et al.* 2008, Manta *et al.* 2009) (**Εικόνα 14**).

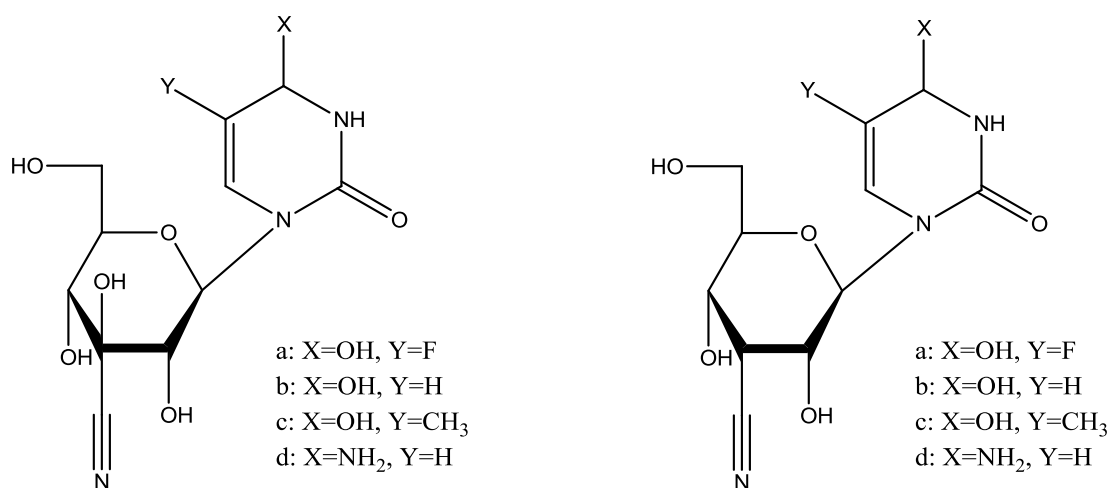


Εικόνα 14: Χημική δομή φθορο κετο και ακόρεστων φθορο
κετοπυρανονουκλεοζιτών

Εκτός των διαφόρων υποκαταστάσεων στο τμήμα του σακχάρου, μελετήθηκε και η τροποποίηση των πυρανονουκλεοζιτών στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης. Διάφοροι 5-αλογονο και 5-αλκυνολο πυριμίδινο πυρανονουκλεοζίτες εμφάνισαν σημαντική δράση ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ένα ένζυμο το οποίο παίζει κύριο ρόλο στη μεταβολική πορεία της γλυκογονόλυσης (Tsirkone et al. 2010). Οι συγκεκριμένες ενώσεις που πρόσφατα συντέθηκαν στο εργαστήριο Βιο-οργανικής του τμήματος μας παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα:



Ομοίως, έχουν συντεθεί κύανο νουκλεοζίτες, με την κύανο ομάδα στην 3' θέση τους σακχάρου (Kiritsis et al., 2011) των οποίων η αντιική δράση έχει αξιολογηθεί έναντι μιας πληθώρας DNA και RNA ιών, ενώ παρουσίασαν σημαντική κυτταροστατική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και κατά του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa) (εικόνα 14).

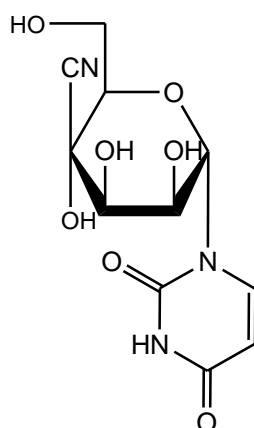


Εικόνα 14: Κύανο-νουκλεοζίτες με την κύανο ομάδα στην 3' θέση τους σακχάρου.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους αποτελούν μια αξιόλογη βάση για την ανάπτυξη ενώσεων με αυξημένη βιολογική δράση, μειωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες σε σχέση με τις μέχρι πρότινος χρησιμοποιούμενες ενώσεις. Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση νέων τροποποιημένων νουκλεοζιτών ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί και αντιικοί παράγοντες.

Έχει διαπιστωθεί με βάση τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία ότι οι κύανο φούρανο νουκλεοζίτες αποτελούν μια αξιόλογη κατηγορία ενώσεων που έχει προσελκύσει σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Όπως επίσης ήδη αναφέραμε, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη εμφανίζουν σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες, γεγονός που καθιστά τη σύνθεση και τη βιολογική τους μελέτη εξαιρετικά ενδιαφέρουσες. Βασιζόμενοι στα παραπάνω στοιχεία και λαμβάνοντας υπόψη τα ελπιδοφόρα βιολογικά αποτελέσματα των κυανοπυρανοουκλεοζιτών στη 3' θέση του σακχάρου, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανοουκλεοζιτών οι οποίοι θα φέρουν την υποσχόμενη κύανο ομάδα στην 4' θέση του σακχάρου (**εικόνα 15**).



Εικόνα 15: Χημική δομή των 4'-κύανο-πυρανονουκλεοζιτών με ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη

Τέλος, θεωρήθηκε σκόπιμη η μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας των νεοσυντιθέμενων ενώσεων καθώς και της δράσης τους ως φάρμακα (τα πειράματα θα πραγματοποιηθούν στο Βέλγιο, στο Rega Institute for Medical Research).

3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

i. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC: Thin layer chromatography)

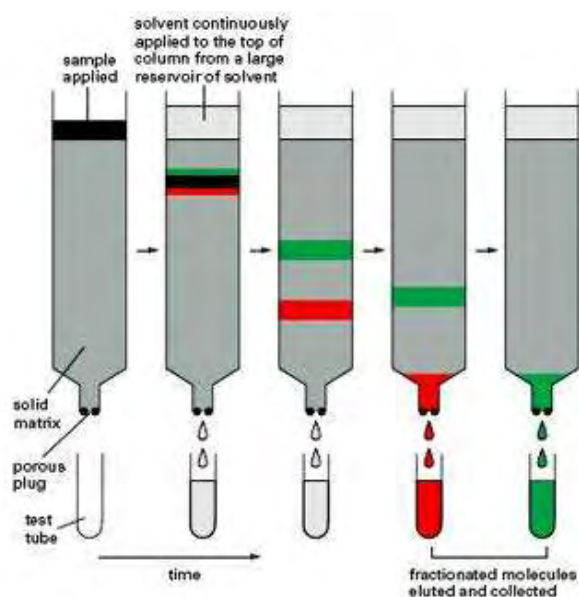
Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₄). Τα προϊόντα στα χρωματογραφήματα ανιχνεύονται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα H₂SO₄ (θειϊκού οξέος) 30%, είτε μέσω UV ακτινοβολίας (254nm).

ii. Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Οι πλειοψηφία των καθαρισμών οργανικών ουσιών πραγματοποιούνται μέσω της χρωματογραφίας μιας τεχνικής κατά την οποία το επιθυμητό προϊόν διαλύεται σε έναν οργανικό διαλύτη ή σύστημα διαλυτών σε συγκεκριμένη κάθε φορά αναλογία και στη

συνέχεια αφήνεται να διαρεύσει μέσω ενός κατακόρυφου γυάλινου σωλήνα ο οποίος είναι γεμάτος με προσροφητικό υλικό. Το προς διαχωρισμό μίγμα ονομάζεται κινητή φάση ενώ το προσροφητικό υλικό εντός του σωλήνα στατική. Επειδή οι διαφορετικές ενώσεις προσροφώνται στη στατική φάση σε διαφορετική έκταση, μετακινούνται διαμέσου αυτής με διαφορετικές ταχύτητες και για το λόγο αυτό, εξέρχονται από τη στήλη –εκλούνται- από το άκρο της. Ο χρόνος έκλουσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα από την πολικότητά της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες προσροφώνται κατά κανόνα, εντονότερα και άρα μετακινούνται βραδύτερα μέσω της στατικής φάσης σε σχέση με τα περισσότερα άπολα.

Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της κοινά χρησιμοποιούμενης χρωματογραφίας ανάλογα με τις ανάγκες που προκύπτουν και το προϊόν που επιθυμούμε να διαχωριστεί. Η υγρή χρωματογραφία ή χρωματογραφία στήλης είναι ίσως η συχνότερα χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική μέθοδος.



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

iii. Ξήρανση διαλυτών

Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων, απαιτείται η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο, ακετόνη, πυριδίνη, διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη.

Η ξήρανση του ακετονιτριλίου και της μεθανόλης γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε. Η δε πυριδίνη αποστάχθηκε παρουσία υδροξειδίου του καλίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε.

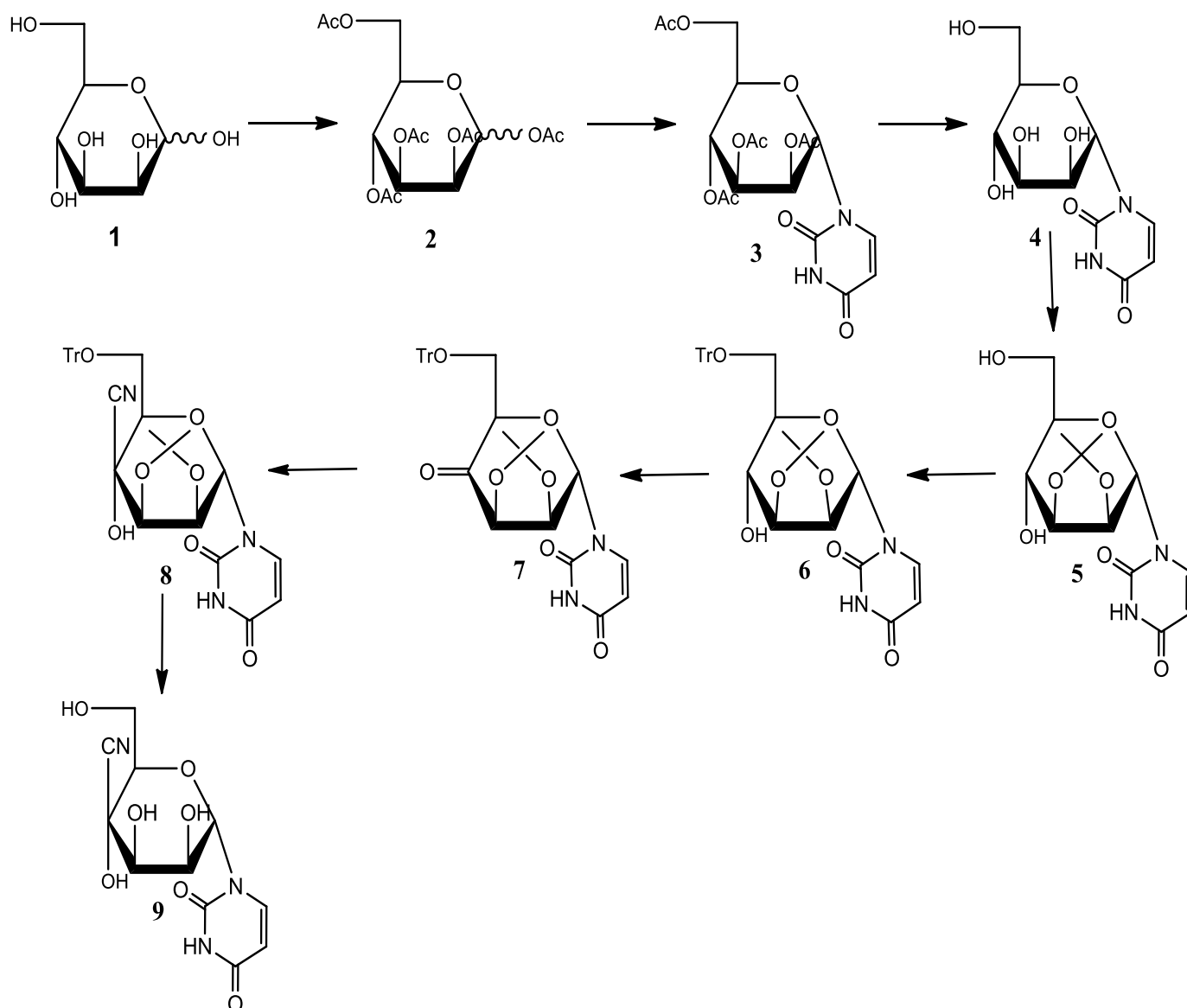
iv. Ταυτοποίηση ενώσεων

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί την πρώτη και χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική προσδιορισμού της δομής των μορίων καθώς παρέχει ένα χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H -NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο Bruker AVAMCE^{III} 300 και τα φάσματα ^{13}C -NMR καταγράφηκαν στα 75.5MHz στο ίδιο φωτόμετρο, χρησιμοποιώντας chloroform-d (CDCl_3), methanol- d_4 (CD_3OD). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^1H .

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ι. Επισκόπηση συνθετικής οδού

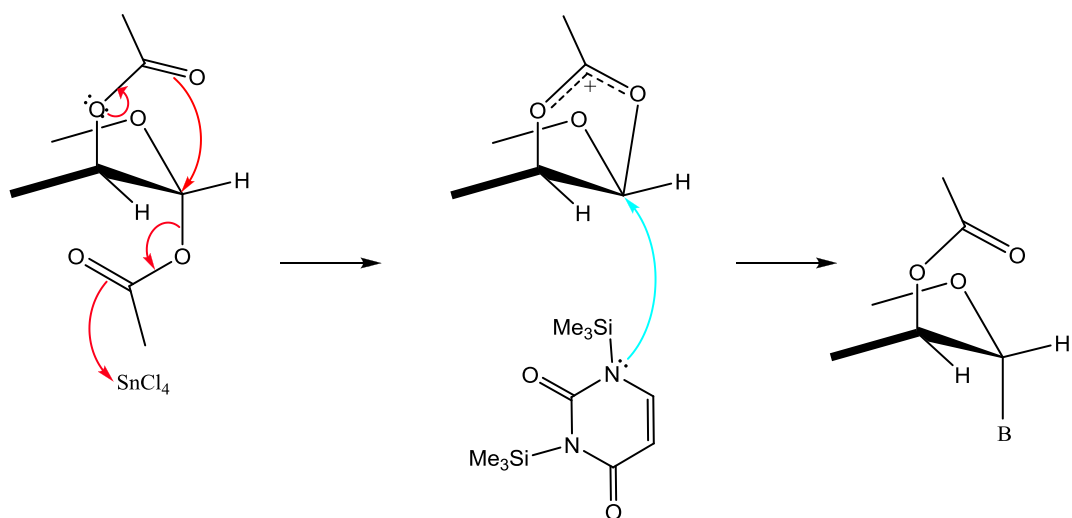


ii. Μεθοδολογία σύνθεσης

Αφετηρία για τη σύνθεση των νέων 4'-κύανο πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων της μαννόζης, αποτελεί η ακετυλιωμένη μαννόζη **2**, η οποία λαμβάνεται έπειτα από αντίδραση της εμπορικά διαθέσιμης *D*-μαννόζης (**1**) με οξικό ανυδρίτη (Ac_2O) σε πυριδίνη.

Για να επιτευχθεί η σύνθεση των νουκλεοζιτών, το γλυκοζιτικό μέρος πρέπει να χρησιμοποιείται πάντα υπό τη μορφή του ακετυλιωμένου σακχάρου, γεγονός που ισχύει και στην προκειμένη περίπτωση. Από την άλλη πλευρά, η βάση, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, πρέπει να ενεργοποιηθεί υπό τη μορφή άλατος ή συμπλόκου, όπου τα δραστικά υδρογόνα της ίδιας της βάσης αντικαθίστανται από τριμεθυλοσιλυλομάδες. Συνεπώς, αφού εξασφαλιστεί η διαθεσιμότητα του επιθυμητού ακετυλιωμένου σακχάρου **2**, ακολουθεί σιλυλίωση της ουρακίλης. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το 1974 από τους Niedballa και Vorbruggen (Niedballa and Vorbruggen, 1974), απέδειξαν ότι οι σιλυλιωμένες ουρακίλες αντιδρούν εύκολα με τα ακυλιωμένα σάκχαρα, καθώς ενισχύεται ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας τους, για να σχηματίσουν τους αντίστοιχους ακυλιωμένους νουκλεοζίτες σε πολύ καλές αποδόσεις. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, για να επιτευχθεί η συμπύκνωση της εμπορικά διαθέσιμης ουρακίλης με την ακετυλιωμένη μαννόζη, χρησιμοποιείται η σιλυλιωμένη ουρακίλη, η οποία προκύπτει μετά από αντίδραση με εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο (CH_3CN). Η αντίδραση καταλύεται από τη σακχαρίνη και λαμβάνεται το παράγωγο δις-τριμεθυλοσιλυλο-ουρακίλη. Η επίδραση ενός όξινου καταλύτη Lewis στην ακετυλιωμένη μαννόζη οδηγεί στον σχηματισμό ενός κατιονικού ενδιάμεσου στον ανωμερικό άνθρακα του σακχάρου, το οποίο στη συνέχεια προσβάλεται από το πιο πυρηνόφιλο άζωτο της ενεργής πλέον σιλυλιωμένης ουρακίλης (**Σχήμα 3**).

Η διαμεσολάβηση του συγκεκριμένου καρβωνιόντος υποχρεώνει την βάση να προσβάλλει το κατιόν από την αντίθετη πλευρά, με αποτέλεσμα τον αποκλειστικό σχηματισμό ενός από τα δύο ανωμερή. Τέλος, πολύ σημαντικός είναι και ο ρόλος του υποκαταστάτη στον άνθρακα C-2', ο οποίος προσανατολίζει την πορεία προσβολής της βάσης σε θέση *trans* ως προς το 2'-OAc.



Σχήμα 3

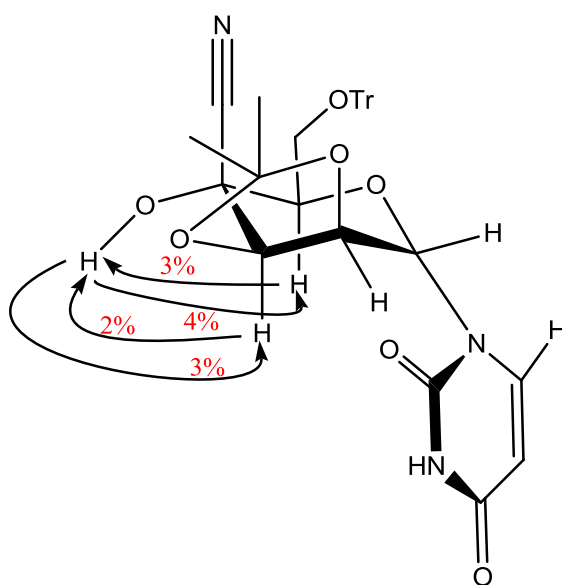
Στη συνέχεια, η ένωση **3**, μέσω μίας εύκολης πειραματικής διαδικασίας, κατεργάζεται με μεθανολική αμμωνία (Neilson and Werstiuk 1971) για μία νύχτα, με αποτέλεσμα τη λήψη του πλήρως αποπροστατευμένου νουκλεοζίτη **4**.

Ακολουθεί η εκλεκτική προστασία των γειτονικών υδροξυλίων στις 2' και 3' θέσεις του σακχάρου που οδηγεί στη λήψη της ένωσης **5**. Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται με επίδραση του 2,2-διμεθοξυπροπανίου [(CH₃)₂C(OCH₃)₂] επί της ένωσης **4** καθώς και του π-τολουολοσουλφονικού οξέος (*p*-TsOH) ως καταλύτη, οπότε αρχικά προστατεύονται τα υδροξύλια στις 2',3' και 4',6' θέσεις του σακχάρου (Vanheusden *et al.* 2004) και έπειτα από πολύωρη υδρόλυση διασπάται το ένα ακετονίδιο, με αποτέλεσμα τη λήψη της επιθυμητής ένωσης (**5**).

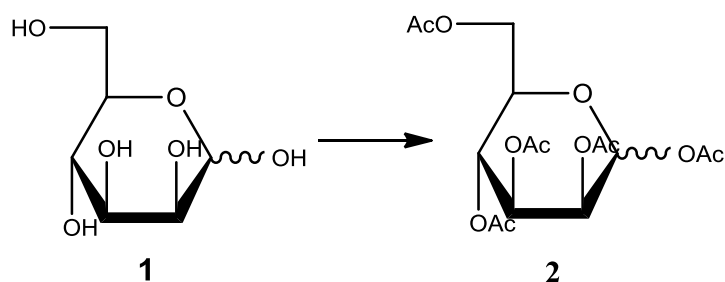
Για την παρασκευή του κορεσμένου 4'-κετοπυρανονουκλεοζίτη το πρώτο βήμα της σύνθεσης περιλαμβάνει την εκλεκτική τριτυλίωση του πρωτοταγούς υδροξυλίου του προϊόντος **5**, η οποία λαμβάνει χώρα μέσω κατεργασίας με τριφαινυλομεθυλοχλωρίδιο (TrCl) σε πυριδίνη, παρουσία καταλυτικής ποσότητας 4,4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (DMAP), οπότε το μερικώς προστατευμένο νουκλεοζιτικό ανάλογο **6** λαμβάνεται σε πολύ καλή απόδοση.

Στη συνέχεια, ακολουθεί η οξείδωση του ελεύθερου υδροξυλίου στην 4' θέση του σακχάρου της τριτυλιωμένης ένωσης **6**, με επίδραση διχρωμικής πυριδίνης (PDC) και Ac_2O (Herscovici and Antonakis, 1980) σε διχλωρομεθάνιο, με αποτέλεσμα τη λήψη του κετονουκλεοζίτη **7**. Η επόμενη αντίδραση περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσθήκη της κύανο ομάδας στην κετονομάδα του προϊόντος **7**, χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια του κυανικού και ανθρακικού νατρίου σε διάλυμα δύο φάσεων νερού και αιθυλαιθέρα (**ένωση 8**). Τέλος ακολουθεί πλήρης αποπροστασία του κύανο πύρανουκλεοζίτη **8** με τετραφθοροοξικό οξύ και άνυδρη μεθανόλη ώστε να ληφθεί το τελικό προϊόν (**ένωση 9**).

Η προτεινόμενη β-στεreoχημεία της κύανο ομάδας στηρίχθηκε με μετρήσεις NOE που έγιναν στο προϊόν **8**. Όπως απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα η αύξησης της έντασης του υδροξυλίου κατά 3% και 2% με την ακτινοβολήση των 5'-H κ 3'-H αντίστοιχα, αποδεικνύει ότι το υδροξύλιο βρίσκεται στην κάτω πλευρά του δακτυλίου. Ομοίως κορεσμός της ελεύθερης υδροξυλομάδας οδηγεί στην αύξηση των εντάσεων των 5'-H κ 3'-H κατά 4% και 3% αντίστοιχα.



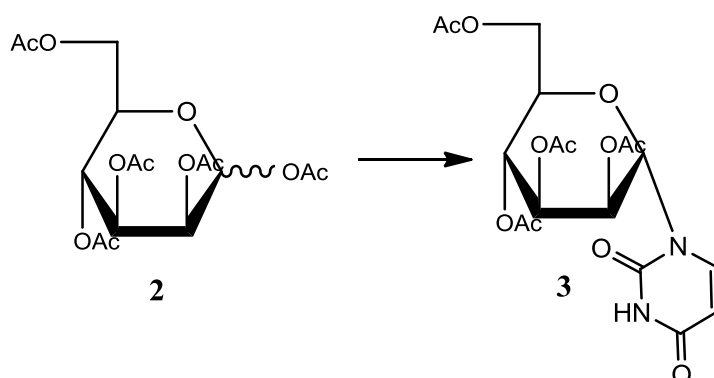
iii. Σύνθεση της 1,2,3,4,6-Πεντα-Ο-ακετυλο-D-μαννοπυρανόζης



Σε διάλυμα της *D*-μαννόζης (**1**) (500 mg, 2,775 mmol) σε πυριδίνη (9,7 mL) προστίθεται οξικός ανυδρίτης (Ac₂O, 4,9 mL) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) το διάλυμα ψύχεται στους 0 °C, και προστίθεται μεθανόλη (4 mL). Στη συνέχεια, οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο και εκχυλίζεται αρχικά με κορεσμένο διάλυμα δισουλφιδίου του Νατρίου (NaHSO₄, sodiumbisulfite) και στη συνέχεια με κορεσμένο διάλυμα διττανθρακικού νατρίου (NaHCO₃, sodium bicarbonate). Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου (Na₂SO₄, sodiumsulfate) και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **2** παραλαμβάνεται ως παχύρρευστο υποκίτρινο έλαιο με απόδοση 99% και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

TLC (EtOAc/Hexane 5:5)	R _f = 0,55
Απόδοση	99%

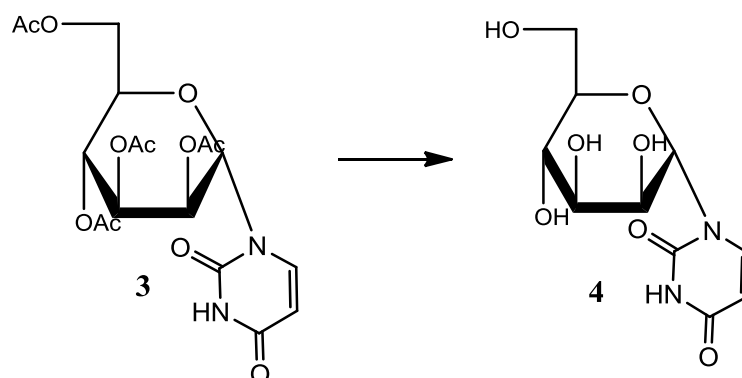
iv. Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-Τετρα-Ο-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης



Διάλυμα αποτελούμενο από ουρακίλη (408 mg, 3,64 mmol), HMDS (hexamethyldisilazane) (952 μ L, 4,5 mmol) και σακχαρίνη (30,6 mg, 0,17 mmol) σε άνυδρο CH_3CN (12,7 mL) θερμαίνεται με κάθετο ψυκτήρα για 20 λεπτά στους 120 $^\circ\text{C}$ και στη συνέχεια προστίθεται η 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλο-*D*-μαννοπυρανόζη (**2**) (1 g, 2,6 mmol) καθώς και ο $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (657 μ L, 3,64 mmol). Ακολουθεί θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 80 $^\circ\text{C}$ για περίπου 2h (TLC), ψύξη του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη κορεσμένου διαλύματος όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO_3) και εκχύλιση με EtOAc. Η οργανική φάση πλένεται με νερό (4 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα EtOAc/Hexane σε αναλογία 8:2. Το επιθυμητό προϊόν **3** παραλαμβάνεται ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο με απόδοση 62%.

TLC (EtOAc/Hexane 8:2)	Rf = 0,23
Απόδοση	62%
α_D	+ 45.5 (c = 0.23)
λ_{max}	261 nm

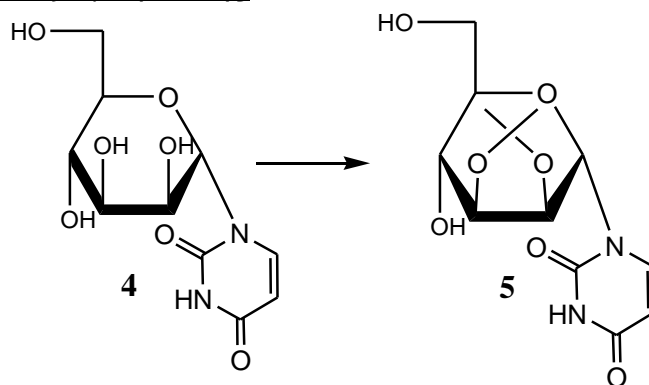
v. Σύνθεση της 1-(α -D-Μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης



Διάλυμα της ένωσης **3** (1 g, 2,26 mmol) σε μεθανολική αμμωνία (11 mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα EtOAc/MeoD 8:2 οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4** με λευκή αφρώδη υφή και απόδοση 98%.

TLC (EtOAc/MeoD 8:2)	R _f = 0,13
Απόδοση	98%
α_D	+ 34.7 (c = 0.15)
λ_{max}	260 nm

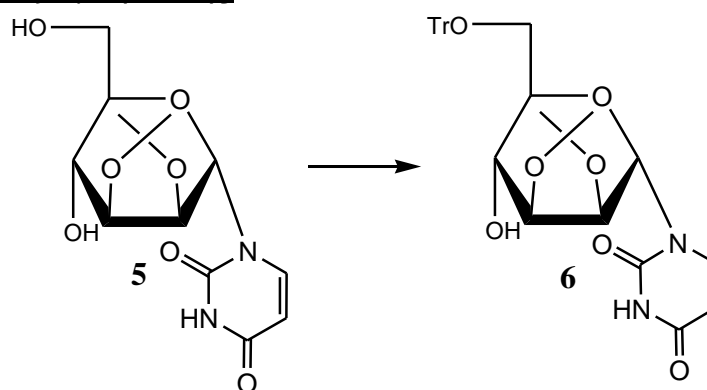
vi. Σύνθεση της 1-(2',3'-O-Ισοπροπυλιδενο- α -D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης



Σε διάλυμα του προϊόντος **4** (607 mg, 2,21 mmol) με άνυδρη ακετόνη (4,5 mL) προστίθεται $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$ (4,5 mL) και *p*-TsOH (86,5 mg, 0,45 mmol) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται νερό (9 mL) και το μίγμα αναδεύεται για περίπου 16h (TLC). Στη συνέχεια προστίθεται τριαιθυλαμίνη μέχρι ουδέτερου pH ($\text{pH} \leq 7$) και οι διαλύτες απομακρύνονται υπό υψηλό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης EtOAc, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5** με λευκή αφρώδη υφή και απόδοση 55%.

TLC (EtOAc)	$R_f = 0,2$
Απόδοση	55 %
α_D	+ 25.8 ($c = 0.28$)
λ_{max}	260nm

vii. Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενό-6'-Ο-τριτυλο- α -D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης

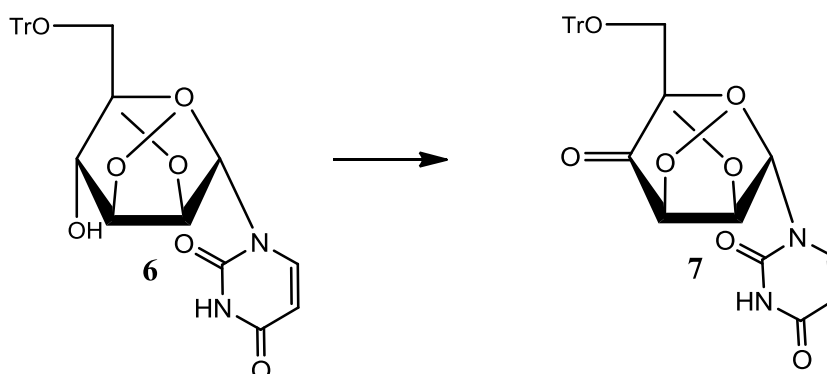


Σε διάλυμα της ένωσης **5** (679 mg, 1,22 mmol) σε άνυδρη πυριδίνη (6 mL), προστίθεται TrCl (446 mg, 1,6 mmol) και καταλυτική ποσότητα DMAP (5 mg, 0,044 mmol) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4h. Ακολουθεί προσθήκη μεθανόλης (5 mL) και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο

καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα EtOAc/Hexane σε αναλογία 7:3, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **6** υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων και απόδοση 52%.

TLC (EtOAc/Hexane 7:3)	R _f = 0.57
Απόδοση	52%
α_D	+ 18.2 (c = 0.1)
λ_{max}	260 nm ε = 2324

viii. Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδανο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-4'-ουλοζ)ουρακίλης

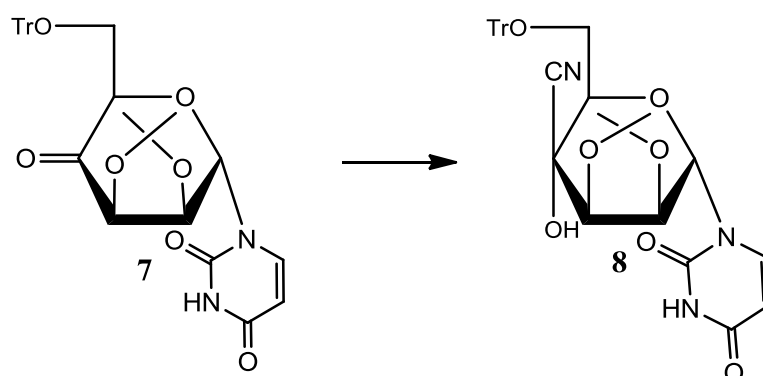


Σε διάλυμα της ένωσης **6** (348mg, 0,63 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (6 mL) προστίθεται PDC (Pyridiniumchloromate, 281 mg, 0,75 mmol) και Ac₂O (οξικός ανυδρίτης, 175 μL) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4h. Στη συνέχεια προστίθεται EtOAc (3 mL) και το προκύπτον παχύρρευστο έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα EtOAc/Hexane σε αναλογία 8:2, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **7** υπό τη μορφή λευκών

κρυστάλλων και απόδοση 61%. Στον κατωτέρω πίνακα παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά προϊόντος **7** ως εξής:

TLC (EtOAc/Hexane 8:2)	R _f = 0,58
Απόδοση	61%
α_D	+ 4.5 (c = 0.15)
λ_{max}	260 nm ε=7858

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

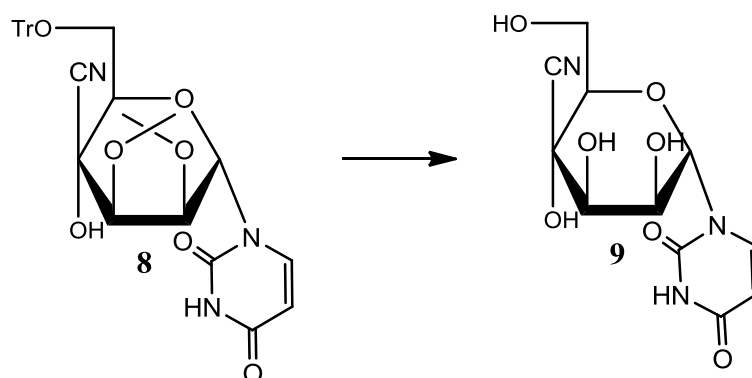


Η ένωση **7** (210 mg, 0,38 mmol) διαλύθηκε σε αιθυλεθέρα (3 ml) και στη συνέχεια προστέθηκε νερό (1,5 ml), ώστε να σχηματιστούν δύο φάσεις. Κατόπιν προστέθηκε NaHCO₃ (0,47 mmol, 76,6 mg) και NaCN (1,47 mmol, 23 mg). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε με έντονη ανάδευση για 48 ώρες. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC. Η οργανική φάση διαχωρίστηκε και η υδατική φάση πλύθηκε δυο φορές με οξικό αιθυλεστέρα (3 ml). Οι οργανικές φάσεις ενώθηκαν, ξηράθηκαν με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες έκλουσης διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη σε αναλογία 9,8:0,2.

Τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος φαίνονται παρακάτω:

TLC (CH₂Cl₂/MeOH 9,8:0,2)	R _f = 0,48
Απόδοση	35%
α_D	+ 3.0 (c = 0.20)
λ_{max}	258 nm ε=2157

χ. Σύνθεση της 1-(4'κυανο-α-D-μαννοπυρανοζυλ)ουρακίλης

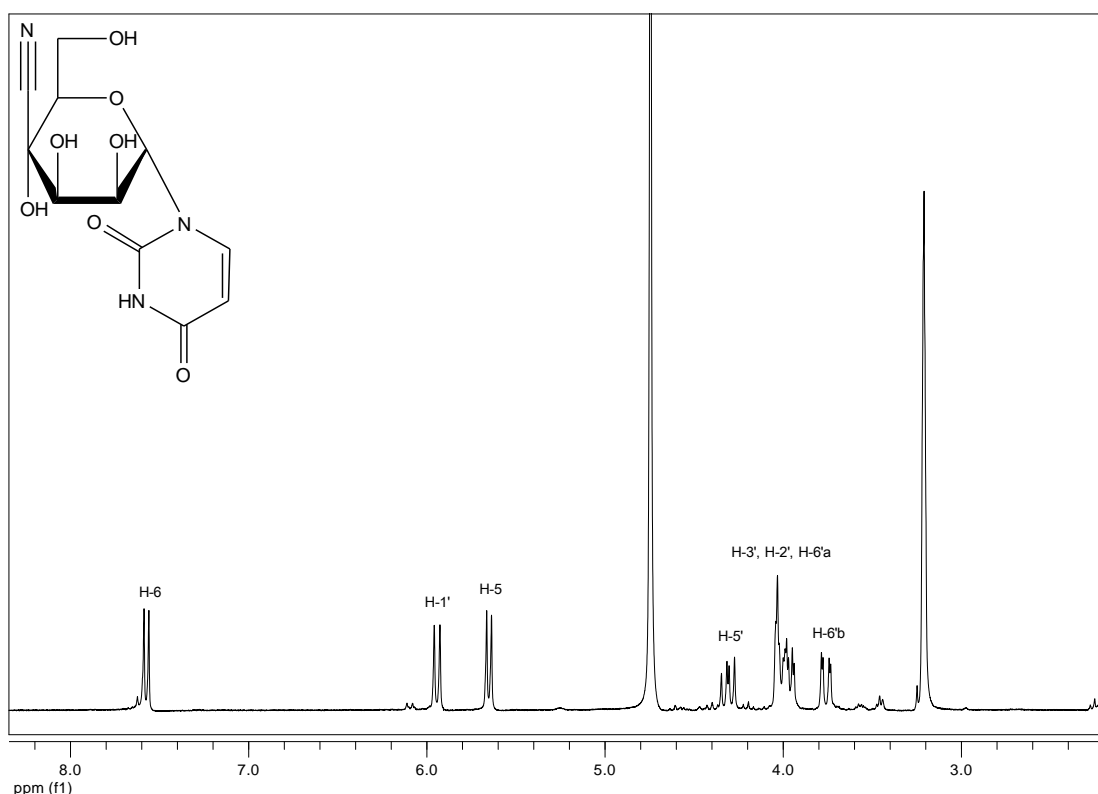


Σε διάλυμα από την ένωση **8** (77,35 mg, 0,133 mmol) προστέθηκαν άνυδρη μεθανόλη (0,07 mL) και TFA (0,63 mL) και το προκύπτον εναιώρημα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και ήπια ανάδευση για 8 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη μεθανόλης (5 mL) και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Για την απομόνωση της ένωσης ενδιαφέροντος (**9**) χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης το σύστημα CH₂Cl₂/MeOH σε αναλογία 9:1 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα δε της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται ως εξής:

TLC (CH ₂ Cl ₂ /MeOH, 9:1)	R _f = 0,4
Απόδοση	48%
α _D	+ 4.0 (c = 0.20)
λ _{max}	262 nm ε=2896

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR

Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹H NMR. Ενδεικτικά αναφέρεται το φάσμα της ένωσης **9**. Στα παρακάτω διαγράμματα διαφαίνονται τα πρωτόνια τόσο του σακχάρου όσο και της βάσης που συνδέεται στο τμήμα του σακχάρου.



6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής επετεύχθη η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών ως πιθανοί αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες. Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε ήταν σχετικά απλή, αποτελεσματική και με αυξημένα ποσοστά απόδοσης για κάθε τάξη ενώσεων. Με τις μετρήσεις NOE που πραγματοποιήθηκαν καταφέραμε να αποδείξουμε την προτεινόμενη β-στερεοχημεία τόσο για την κύριο ομάδα όσο και για το υδροξύλιο στο προϊόν **8** γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για την περαιτέρω πορεία των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν και αναμένεται να πραγματοποιηθούν.

Τα τελικά προϊόντα εστάλησαν ώστε να εκτιμηθεί η αντιική και κυτταροτοξική τους δράση έναντι μιας πληθώρας τόσο DNA όσο και RNA ιών. Οι αναλύσεις δεν έχουν ολοκληρωθεί ακόμα για το λόγο αυτό και τα αποτελέσματα δε μας έχουν γνωστοποιηθεί ακόμα. Για την εκτίμηση της κυτταροστατικής δράσης πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η παράμετρος IC₅₀, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%.

Με βάση τα αποτελέσματα των αναλύσεων, οι νέες ενώσεις θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγοί για τη σύνθεση ανάλογων ενώσεων με βελτιωμένες κυτταροστατικές, αντιϊκές και αντικαρκινικές ιδιότητες εφόσον υποστούν περαιτέρω τροποποιήσεις είτε στο τμήμα του σακχάρου είτε στο τμήμα της βάσης.

Βιβλιογραφία:

1. Mc Murry J. Οργανική Χημεία, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 1245, 905.
2. Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L., Βιοχημεία 1997/2001, τόμος ,σελ.
3. Δ.Ν. Νικολαΐδης, Οργανική Χημεία, τόμος 2, σελ. 42, 148.
4. Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2002 Jul;3(7):415-24. Review.
5. Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 3399.
6. Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* 1992, 11, 903.
7. Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* 1993, 36, 2033.
8. De Clercq, E. *Biochim Biophys Acta.* 2002a, 1587, 258.
9. Gumina, G.; Song, G. Y.; Chu, C. K. *FEMS Microbiology Letters* 2001, 202, 9.
10. Brady, R. C.; Bernstein, D. I. *Antiviral Res.* 2001, 61, 73.
11. Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 47, 365.
12. Pontikis, R.; Wolf, J.; Monneret, C.; Florent, J. –C. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 3523.
13. Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* 1991, 51, 2319.
14. 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.
15. Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 1879.
16. Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, 95, 105.

17. 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.
18. Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* 2010.
19. Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* 1995, 67, 155.
20. Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* 2000, 20, 417.
21. Balzarini, J. *Pharmacy World Sci.* 1993, 16, 113.
22. Chong, Y.; Choo, H.; Lee, S.; Choi, Y.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 4888.
23. Lewin, B. *Genes* 2003, VIII, 6.
24. Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, 2005, 4, 4.
25. Siev, M.; Weinberg, R.; Penman, S. *J. Cell Biol.* 1969, 41, 510.
26. Ahn, Y. J.; Park, S. J.; Lee, S. G.; Shin, S. C.; Choi D. H. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 2744.
27. O-Yang C., Wu H.Y., Fraser-Smith E.B., Walker K.A.M. *Tetrahedron Lett.* 1992, 1, 37-40.
28. Satoru Kohgo, Kohei Yamada, Kenji Kitano, Shinji Sakata, Hiroyuki Hayakawa, Daisuke Nameki, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Hiroaki Mitsuya, and Hiroshi Ohrei, *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS*, Vol. 22, Nos. 5–8, pp. 887–889, 2003.
29. Motohiro Tanaka et al, 1992 Antitumor activity of CNDAC.
30. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 980.
31. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, 43, 420.
32. Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Panagiotopoulou, A.; Pelecanou, M.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2009a, 44, 4764.

33. Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevšek, A.; Pamulapati, R. T.; Cencič, A.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2009b, **44**, 2696.
34. Balatsos, N. A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis, D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* 2009, **48**, 6044.
35. Kiritsis, C.; Manta, S.; Parmenopoulou, V.; Balzarini, J.; Komiotis, D. Branched-chain C-cyano pyranonucleosides: synthesis of 3'-C-cyano & 3'-C-cyano-3'-deoxy pyrimidine pyranonucleosides as novel cytotoxic agents. *Eur J Med Chem.* 2011 Nov;46(11):5668-74.
36. Niedballa, U.; Vorbrüggen, H. A general synthesis of N-glycosides. I. Synthesis of pyrimidine nucleosides. *J Org Chem.* 1974 Dec 13;39(25):3654-60.
37. Neilson, T.; Werstiuk, E. S. *Can. J. Chem.* 1971, **49**, 493.
38. Vanheusden, V.; Busson, R.; Herdewijn, P.; Van Calenbergh, S. Synthesis and conformational analysis of 1-[2,4-dideoxy-4-C-hydroxymethyl- α -L-lyxopyranosyl]thymine. *J Org Chem.* 2004 Jun 25;69(13):4446-53.
39. Herscovici, J.; Antonakis, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, **12**, 561.
- .