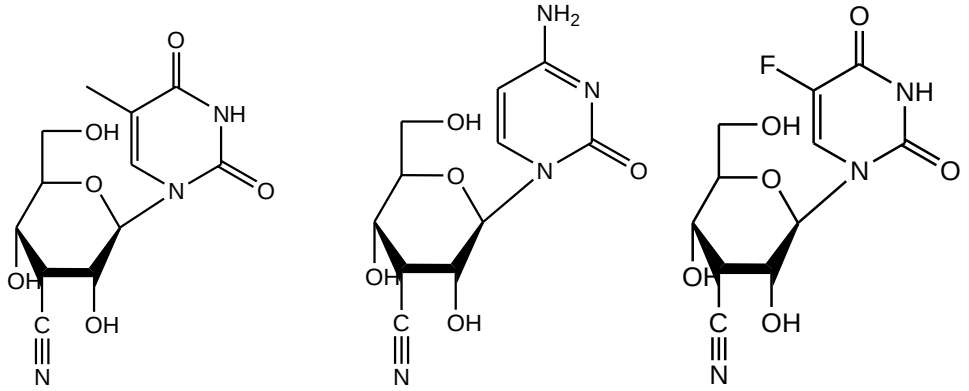
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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

ΑΘΗΝΑ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΥ



Διπλωματική Εργασία

‘‘ΚΥΑΝΟ ΔΕΟΞΥ ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ ΩΣ ΝΕΟΙ ΠΙΘΑΝΟΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ’’

Λάρισα 2012

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

Διπλωματική Εργασία

‘‘Κυανο δεοξυ πυρανονουκλεοζίτες ως νέοι πιθανοί αντικαρκινικοί και αντιικοί παράγοντες’’

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

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

Μπαλατσός Νικόλαος— Λέκτορας Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

Στην κα. Στυλιανή Μαντά-ΠΔ407/80 του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας εκφράζω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την ουσιαστική βοήθεια, συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κυρίτση Χρήστο που με βοήθησε να ξεπεράσω τις δυσκολίες που συνάντησα στην εκπόνηση του πειραματικού μέρους αλλά και κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσης εργασίας. Επίσης ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου οργανικής χημείας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και τη φιλική τους διάθεση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **6**

ABSTRACT **7**

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ **8**

1.1 Υδατάνθρακες 8
1.2 Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές: Σχηματισμός ημιακετάλης 9
1.3 Νουκλεοζίτες 12
1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών 13
1.5 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα 15
1.6 Αντιικά νουκλεοζιτικά ανάλογα 16
1.7 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με διακλάδωση την κυανο ομάδα 18
1.8 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη 20
1.9 Δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες 24

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **25**

2.1 Στόχος – σκοπός μελέτης 25

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ **27**

3.1 Υλικά 27
3.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων 27

3.2 ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ **28**

3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : thin layer chromatography) 28
3.2.2 Χρωματογραφία στήλης 28
3.2.3 Ξήρανση διαλυτών 29
3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων 29

3.3 Μέθοδοι **30**

3.3.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού 30
3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης 31
3.3.3 Σύνθεση της 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλ-3-C-κυανο-D-γλυκοπυρανόζης. 34
3.3.3.1 Σύνθεση της 3-C-κυανο-1,2:5,6-δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-γλυκοφουρανόζης (2) 34
3.3.3.2 Σύνθεση της 3-C-κυανο-3-*O*-φαινοξυθειοκαρβονυλο-1,2:5,6-δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (3) 35
3.3.3.3 Σύνθεση της 3-δεοξυ-3-C-κυανο-1,2:5,6-δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (4) 36
3.3.3.4 Σύνθεση της 3-C-κυανο-3-δεοξυ-α-D-αλλοπυρανόζης 37
3.3.3.5 Σύνθεση της 1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-3-C-κυανο-3-δεοξυ-D-αλλοπυρανόζης (6) 38
3.3.3.6.1 Σύνθεση της 1-(2΄,4΄,6΄-τρι-Ο-ακετυλο-3΄-C-κυανο-3΄-δεοξυ -β-D-αλλοπυρανοζυλο) 5φθόρο-ουρακίλης (7a) 39

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.3.3.6.2 Σύνθεση της 1-(2΄,4΄,6΄-τρι-Ο-ακετυλο-3΄-C-κυανο-3΄-δεοξυ-β-D-αλλοπυρανοζυλο) θυμίνης (7b). 40
3.3.3.6.3 Σύνθεση της 1-(2΄,4΄,6΄-τρι-Ο-ακετυλο-3΄-C-κυανο-3΄-δεοξυ-β-D-αλλοπυρανοζυλο) βενζοϋλοκυτοσίνης (7c). 41
3.3.3.7.1 Σύνθεση της 1-(3΄-C-κυανο-3΄-δεοξυ-β-D-αλλοπυρανοζυλο)5-φθορο-ουρακίλης (8a). 42
3.3.3.7.2 Σύνθεση της 1-(3΄-C-κυανο-3΄-δεοξυ-β-D-αλλοπυρανοζυλο) θυμίνης (8b). 43
3.3.3.7.3 Σύνθεση της 1-(3΄-C-κυανο-3΄-δεοξυ-β-D-αλλοπυρανοζυλο) κυτοσίνης (8c). 44

4.ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^{1}Η NMR 45

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ 48

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 50

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια έχει στραφεί στους νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους, κυρίως λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντικαρκινική, αντιβακτηριδιακή 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 σύνθεση καινούργιων νουκλεοζιτικών αναλόγων, των 3΄-δεοξυ-3΄-κυανο πυρανονουκλεοζιτών της θυμίνης , κυτοσίνης και φθορο-ουρακίλης. Αναλύεται η συνθετική οδός που ακολουθήθηκε για την παρασκευή τους καθώς και η μέθοδος ταυτοποίησής τους.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

ABSTRACT

In recent years, the research interest has turned to nucleosides and nucleoside analogues, mainly because of their therapeutic properties. It is recognized that many natural antibiotics with anticancer, antibacterial and antiviral action containing nucleosides consisting of monosaccharides with five or six-member ring connected to a ring-position hetero basis. 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 diploma thesis describes the synthesis of a novel nucleoside analogue, that of the 3´-deoxy-3´-cyano pyranonucleoside of Thymine, Cytosine and FUracil. Within, the synthetic route and identification of the novel compound are detailed.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες, λεγόμενοι και σάκχαρα, αποτελούν σημαντικές συνιστώσες στη διατροφή όλων των ζωικών οργανισμών παρέχοντάς τους την απαιτούμενη ενέργεια επιβίωσης. Αποτελούν μια ομάδα οργανικών ουσιών με γενικό τύπο $(CH_2O)n$, δηλ. αποτελούνται από υδρογόνο και οξυγόνο σε αναλογία 2:1. Οι σχετικές αναλογίες άνθρακα, υδρογόνου και οξυγόνου όπως υπαγορεύονται από τον γενικό τους τύπο ισχύουν για τους μονοσακχαρίτες, ενώ για τους υπόλοιπους είναι κάπως διαφορετικές. Αρχίζουν από απλά σάκχαρα όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη και φθάνουν μέχρι σύνθετα μόρια που λέγονται πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο και η κυτταρίνη. Ως εκ τούτων κάποιοι υδατάνθρακες μπορεί να είναι μικροί με μοριακά βάρη μικρότερα του 100 ενώ άλλοι μπορεί να είναι μεγάλα μακρομόρια με μοριακό βάρος πολλές εκατοντάδες ή χιλιάδες.

Υπάρχουν τέσσερις κύριες κατηγορίες υδατανθράκων βιολογικού ενδιαφέροντος:

- Οι μονοσακχαρίτες, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, που αποτελούν τα μονομερή για την σύνθεση πολυπλοκότερων δομών.
- Οι δισακχαρίτες που αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες. Τέτοιοι είναι η λακτόζη, η μαλτόζη και η σακχαρόζη.
- Οι ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από 20-30 μονοσακχαρίτες.
- Οι πολυσακχαρίτες, όπως είναι το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη, που αποτελούνται από εκατοντάδες χιλιάδες μονομερή.

Οι μονοσακχαρίτες, οι απλούστεροι υδατάνθρακες, είναι αλδεύδες ή κετόνες με δύο ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Οι μικρότεροι μονοσακχαρίτες με n=3 είναι η διυδροξυακετόνη και η D- ή L-γλυκεραλδεϋδη και αναφέρονται ως τριόζες. Απλοί μονοσακχαρίτες με τέσσερα, πέντε, έξι και επτά άτομα άνθρακα καλούνται τετρόζες, πεντόζες, εξόζες και επτόζες αντίστοιχα. (McMurry, John 2000).

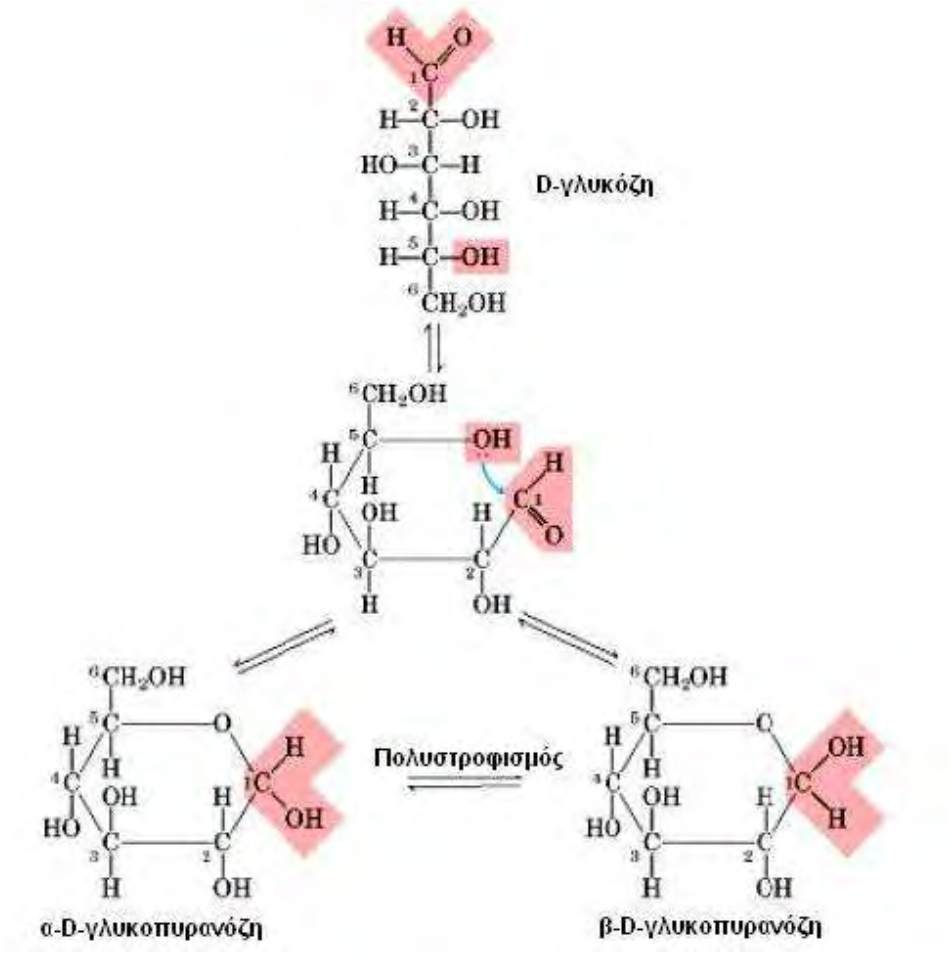
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

1.2 Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές: Σχηματισμός ημιακετάλης

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

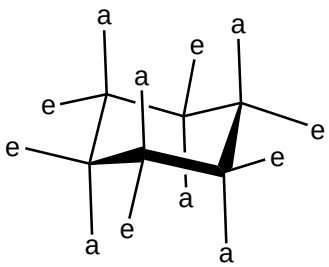
Τα σάκχαρα απαντώνται σε κυκλική μορφή όταν μια καρβονυλική ομάδα του μορίου τους αντιδρά με μια ομάδα υδροξυλίου, προς δημιουργία ημιακετάλης. Αυτή η αντίδραση είναι μια ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη που οδηγεί στην δημιουργία πυρανοζών ή φουρανοζών. Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοικτής και κλειστής αλυσίδας. Η κυκλοποίηση των σακχάρων μέσω ημιακετάλης είναι μεγάλης σημασίας διότι με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα πρόσθετο στερεογονικό κέντρο στο μόριο και παρουσιάζεται το φαινόμενο της ανωμέρειας. Στην περίπτωση της γλυκόζης ο άνθρακας C-1 είναι ανωμερής με αποτέλεσμα να μπορούν να σχηματιστούν δυο στερεοχημικές δομές : της α-D-γλυκοπυρανόζης και της β-D-γλυκοπυρανόζης (εικόνα 1). Αν ο υποκαταστάτης (υδροξύλιο σε αυτή την περίπτωση) του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται σε θέση trans, κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου προς τον υποκαταστάτη στον άνθρακα C-5 τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως μορφής α. Αν συμβαίνει το αντίθετο, δηλαδή ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται σε θέση cis, πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου, ως προς τον υποκαταστάτη του άνθρακα C-5 τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως μορφής β.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235



Εικόνα 1: Κυκλοποίηση μονοσαχκαρίτη μέσω αντίδρασης ημιακετάλης.

Η στερεοδιάταξη του δακτυλίου παρουσιάζει επίσης ενδιαφέρον λόγω της συμπεριφοράς των υποκαταστατών του, όσον αφορά την διάταξή τους σε σχέση με το επίπεδο του δακτυλίου. Συγκεκριμένα διακρίνονται δυο είδη υποκαταστατών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί. Ως αξονικοί υποκαταστάτες ορίζονται οι υποκαταστάτες που βρίσκονται παράλληλα στον άξονα του δακτυλίου, δηλαδή κάθετα στο επίπεδό του. Αντιθέτως, οι ισημερινοί υποκαταστάτες βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με τον δακτύλιο (Εικόνα 2).

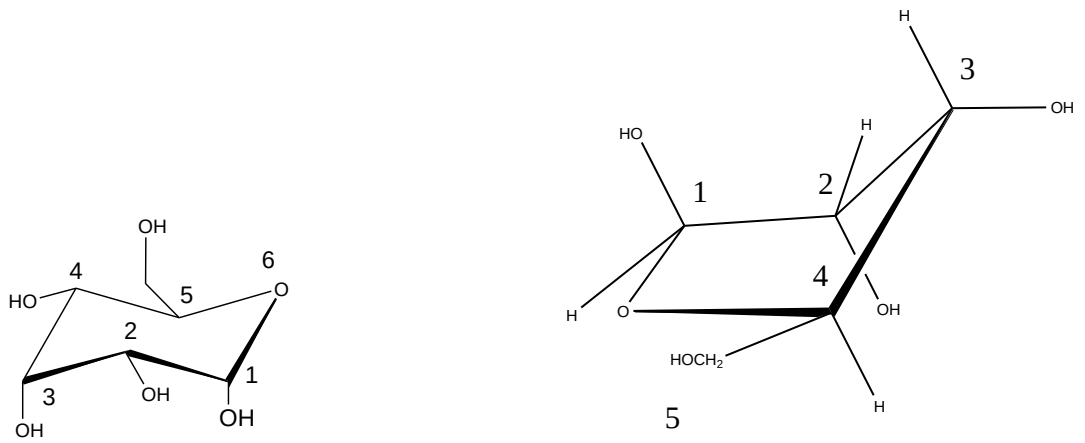


Εικόνα 2: Αξονικοί (a) υποκαστάτες και ισημερινοί (e) υποκαταστάτες.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

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

Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρείται είναι η αλληλεπίδραση αξονικών και ισημερινών υποκαταστατών, που προκαλεί τάση στο μόριο ικανή να το διαμορφώσει περαιτέρω στερεοχημικά. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται 1,3-διαξονική στερεοχημική τάση και εξαρτάται από το μέγεθος όπως επίσης και την φύση του εκάστοτε υποκαταστάτη. Ως αποτέλεσμα του παραπάνω οι φουρανόζες και οι πυρανόζες δεν είναι επίπεδες στον χώρο αλλά μπορούν να υιοθετήσουν διάφορες στερεοδιαμορφώσεις. Ο δακτύλιος της πυρανόζης λαμβάνει συχνότερα τη μορφή ανάκλιντρου (chair), ενώ ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να λάβει την μορφή του φακέλου (envelope) (Εικόνα 3) (McMurry, John 2000).



Εικόνα 3: Μορφές ανάκλιντρου και φακέλου.

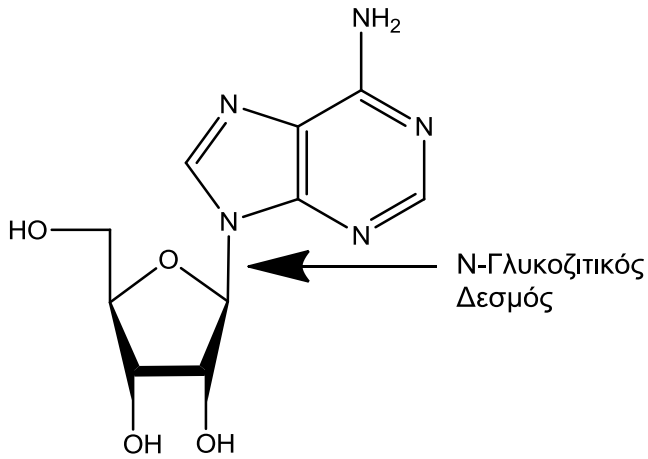
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

1.3 Νουκλεοζίτες

Τα τελευταία χρόνια πλήθος από ερευνητικά προγράμματα εστιάζονται στη μελέτη, σύνθεση και βιολογική αποτίμηση νουκλεοζιτών και νουκλεοζιτικών αναλόγων. Έχει βρεθεί ότι οι νουκλεοζίτες επιδεικνύουν σημαντική αντικαρκινική, αντιβακτηριακή και αντιική δράση (Zhou W. et al, 2004; Perigaud C.et al, 1992; Robins RK. et al, 1990; MacCoss M. et al, 1990). Ιδίως τις τελευταίες δύο δεκαετίες η σύνθεση και η μελέτη των νουκλεοζιτών έχει ανέλθει κατακόρυφα με στόχο τη θεραπεία του AIDS (Verheggen I. et al, 1993), του έρπητα (Zhou W. et al, 2004; De Clercq E, 2002) και της ηπατίτιδας (Brady RC. et al, 2004). Συνεπώς έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους.

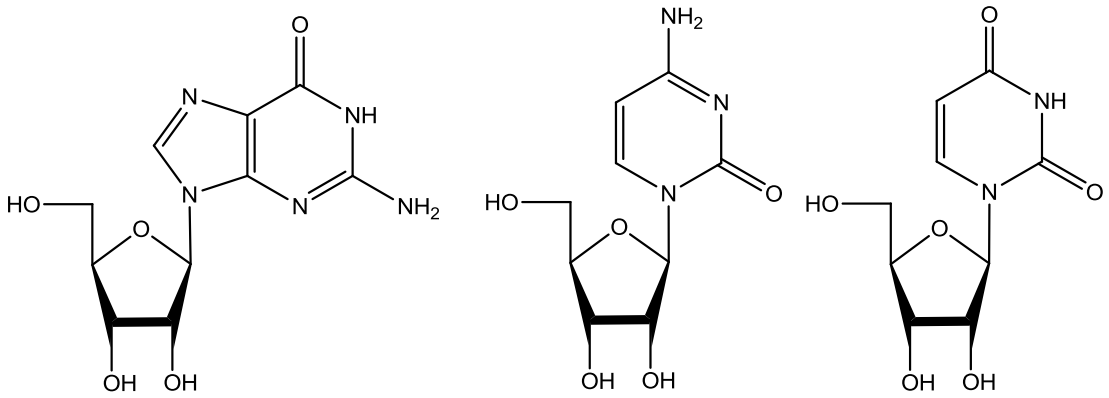
Ο νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης ενωμένη στη θέση 1 μιας πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό (Berg JM. et al, 2001). Ο ανωμερής άνθρακας ενός σακχάρου είναι σε θέση να ενωθεί με το άζωτο μιας αμίνης με ένα N-γλυκοζιτικό δεσμό. Ο συγκεκριμένος τρόπος γλυκοζιτικής σύνθεσης είναι συνήθης σε πολλά βασικά μακρομόρια, όπως νουκλεοτίδια, RNA και DNA. Οι N- γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Berg JM. et al, 2001) (Εικόνα 4).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235



Εικόνα 4 : Αδενοσίνη

Άλλα παραδείγματα ριβονουκλεοζιτών αποτελούν η γουανοσίνη, η κυτιδίνη και η ουριδίνη. (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Νουκλεοζίτες (γουανοσίνη, κυτιδίνη, ουριδίνη).

1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Είναι γεγονός ότι οι φυσικοί νουκλεοζίτες συντίθενται εντός των κυττάρων, αλλά είναι δυνατόν βέβαια, να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επίσης πραγματοποιείται ενδοκυτταρική τροποποίησή τους με σκοπό την παραγωγή των νουκλεοζιτών. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

τους νουκλεοζίτες ως βασικές δομικές μονάδες γενετικού υλικού DNA και RNA.

Με βάση την παραπάνω αναφορά για παθητική διάχυση, χρησιμοποιήθηκε η παρούσα ιδιότητα για την εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων, μορίων που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, ως αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες για τη θεραπεία πληθώρας ασθενειών (Zhou W. et al, 2004).

Τα φάρμακα, που ως δραστική ουσία έχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο, επιβάλλεται να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μοριακό στόχο προκειμένου να είναι δραστικά. Στην κατηγορία των μοριακών στόχων των νουκλεοζιτικών αναλόγων υπάγονται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα (Vender M. et al, 2001).

Ο βασικός λόγος που τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου και του AIDS, είναι ότι μπορούν να τροποποιηθούν δομικά, έτσι ώστε να παράγουν φαρμακολογικώς ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Στη συνέχεια, μπορούν να παρέμβουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, έτσι ώστε να προωθήσουν είτε αντιπολλαπλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα (Pastor-Anglada M. et al, 1998).

Τα αντικαρκινικά και τα αντιικά ανάλογα εμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό και την επισκευή του κυτταρικού DNA και τον αναδιπλασιασμό του ιικού γενώματος. Αυτά τα θεραπευτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση (Arner ESJ. et al, 1995). Αν και τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, τα μη φωσφορυλιωμένα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες – μεταφορείς νουκλεοζιτών. Φωσφορυλιώνονται κατόπιν προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA.

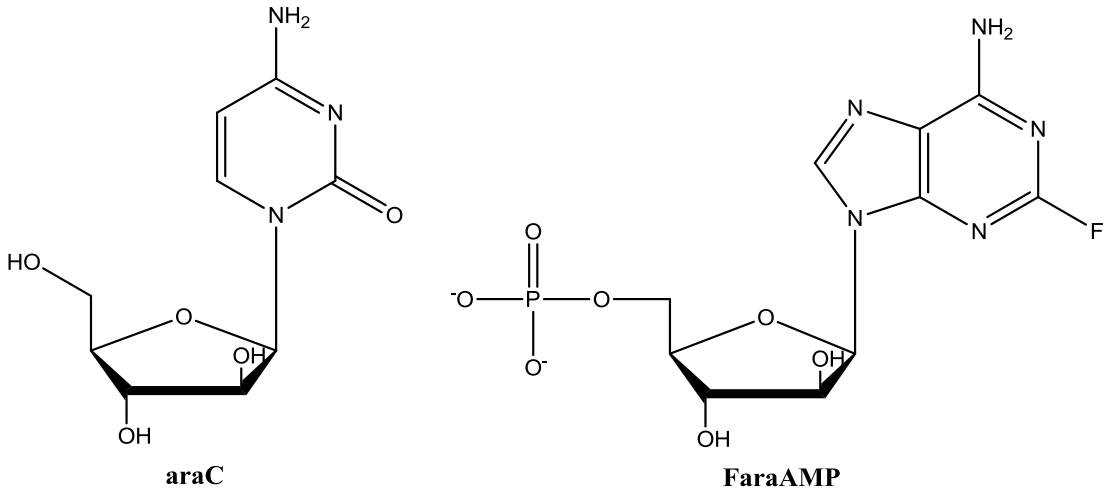
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Οι ιικές πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντιικό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντιικών φαρμάκων. Μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοζιτών, τα αντιικά φάρμακα νουκλεοζιτών ενσωματώνονται στο ιικό γονιδίωμα από τις ιικές πολυμεράσες, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του γενετικού υλικού. Αυτό το γεγονός εξασθενίζει τη σύνθεση ή τη λειτουργία του ιικού γονιδιώματος που προκύπτει και επομένως καταστέλλει την αντιγραφή του ιού. Ως εκ τούτου είναι κατάλληλα για τη θεραπεία χρόνιων ιικών ασθενειών. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ως φάρμακα έχουν γενικά υψηλή εκλεκτικότητα, εξαίρετη δραστική ικανότητα και μεγάλη διάρκεια δράσης.

1.5 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα

Η αναγνώριση των αντικαρκινικών και κυτταροστατικών ιδιοτήτων των νουκλεοζιτών και των αναλόγων τους, αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Matsuda A. *et al*, 2004; Cory A. H. *et al*, 1994; Manta S. et al, 2010). Ήδη, οι αντιμεταβολίτες που ορισμένοι από αυτούς ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεοζιτών, χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην ιατρική ως πρώτης γραμμής φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύει στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Τέτοιοι αντιμεταβολίτες, όπως το cytarabine (araC ή 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη) και το fludarabine (FaraAMP ή 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-2-φθοροαδενίνη) –των οποίων οι χημικές τους δομές παρουσιάζονται στην **εικόνα 6** έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών όπως διαφόρους τύπους λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Ellison et al. 1967, Matsuda et al. 2004). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui V. *et al*, 2010; Bhat U. G.).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235



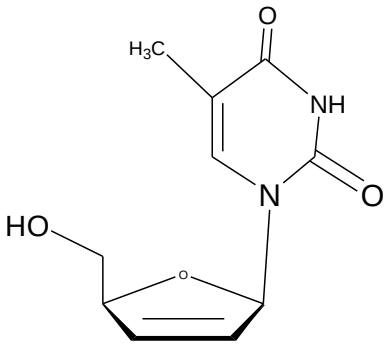
Εικόνα 6. Χημική δομή του araC και του FaraAMP

1.6 Αντιικά νουκλεοζιτικά ανάλογα

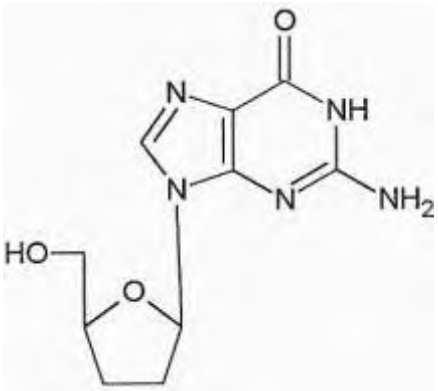
Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρεμβαλλόμενα στην σύνθεση του DNA και του RNA μπορούν να επηρεάσουν εκτός από την σύνθεση νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων και τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων (Komiotis D. *et al*, 2008; Zhou W. *et al*, 2004; Perigaund C. *et al*, 1992). Ήδη πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στην ιατρική έναντι ιών όπως το ιού που προκαλεί το AIDS (HIV), του ιού της ηπατίτιδας B (HBV), των ερπητοϊών (HSV 1-2), του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) και του ιού του έρπητα ζωστήρα (VZV). Στην περίπτωση του HIV ανάμεσα στα νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά είναι τα ddC, AZT, ddI, d4T, abacavir και 3TC που δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού (εικόνα 7). Για τον ιό HBV έχει ήδη εγκριθεί στην Αμερική και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

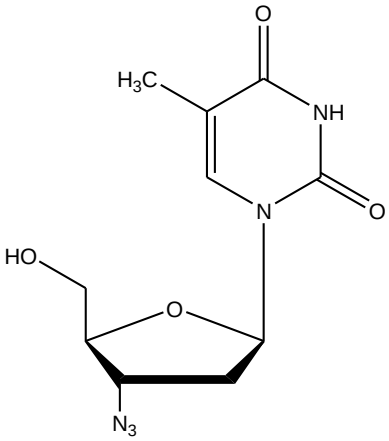
χρησιμοποιείται το 3TC σε συνδιασμό με ιντερφερόνη-α. Για τον CMV, τον HSV 1 και 2 και τον VZV χρησιμοποιείται πλήθος νουκλεοζιτικών αναλόγων, όπως βιδαραβίνη, ακυκλοβίρη, ιδοξουριδίνη τριφλουριδίνη, ασεδουρίδη, γανσικλοβίρη, βαλακυκλοβίρη και άλλα (Gumina G. *et al*, 2001).



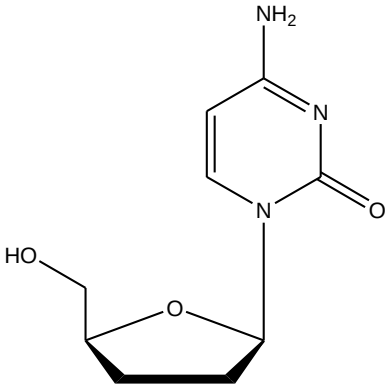
d4T



ddI

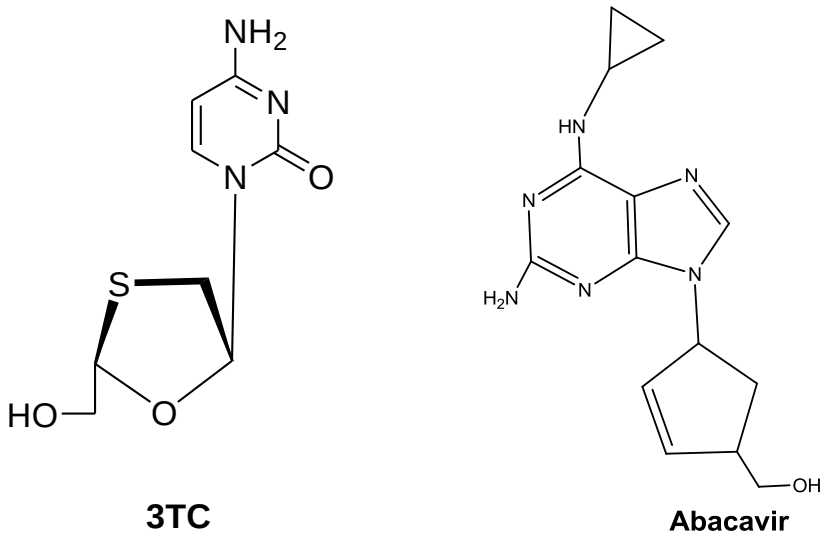


AZT



ddC

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

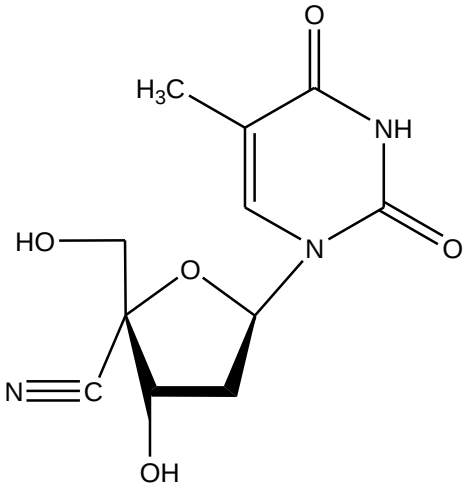


Εικόνα 7. Χημικές δομές των d4T, ddI, AZT, ddC , 3TC, Abacavir.

1.7 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με διακλάδωση την κυανο ομάδα

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών πολλοί νουκλεοζίτες με διακλαδισμένη αλυσίδα έχουν προσελκύσει επιστημονικό ενδιαφέρον λόγω των εν δυνάμει αντικαρκινικών ή των αντιικών τους ιδιοτήτων. Η σύνδεση της κυανο ομάδας στο τμήμα της φουρανόζης ενός νουκλεοζίτη αποτελεί ένα ενδιαφέρον πεδίο μελέτης κυρίως λόγω του ισχυρού ηλεκτραρνητικού της χαρακτήρα και συνεπώς της διαφορετικής χημικής συμπεριφοράς που προσδίδει η χαρακτηριστική αυτή ομάδα στο μόριο. Διάφοροι κυανο-φουρανονουκλεοζίτες έχουν αναφερθεί σαν ενδιαφέροντες αντιϊικοί παράγοντες, όπως το 4΄-κυανο αναλόγο της θυμιδίνης (Εικόνα 8) που παρουσιάζει ισχυρή αντι- HIV δράση (O-Yang et al. 1992).

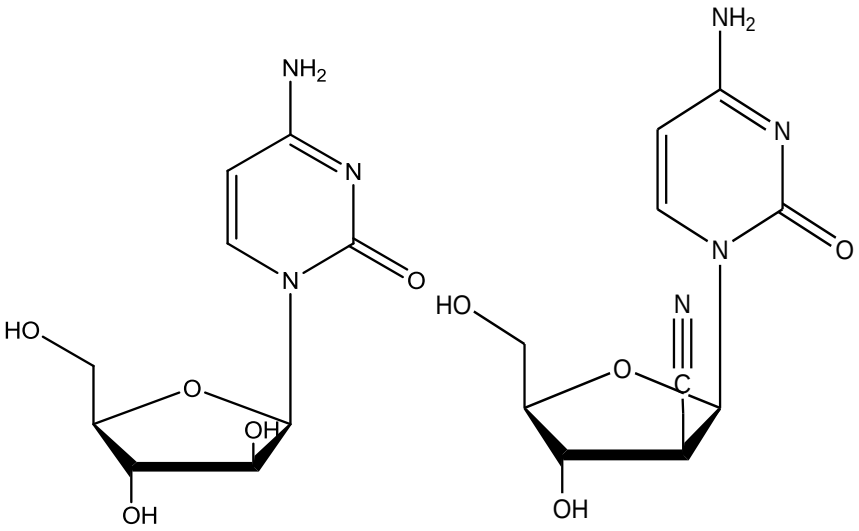
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235



4΄κυανο-θυμιδίνη

Εικόνα 8. Δομή 4΄- κυανο νουκλεοζίτη της θυμίνης

Χαρακτηριστικό επίσης παράδειγμα αυτής της κατηγορίας ενώσεων αποτελεί το CNDAC (2΄-C-κυανο-2΄-δεοξυ-1-β-D-αραβινοφουρανοσυλοκυτοσίνη), που προέκυψε με αντικατάσταση της 2΄ υδροξυλομάδας του γνωστού αντιμεταβολίτη Ara-C από την κύανο ομάδα προκύπτοντας έτσι ένα νέο δραστικό ανάλογο με καινούργιο μηχανισμό αντικαρκινικής δράσης (εικόνα 9).



araC **CNDAC**

Εικόνα 9. Χημική δομή του araC και CNDAC.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

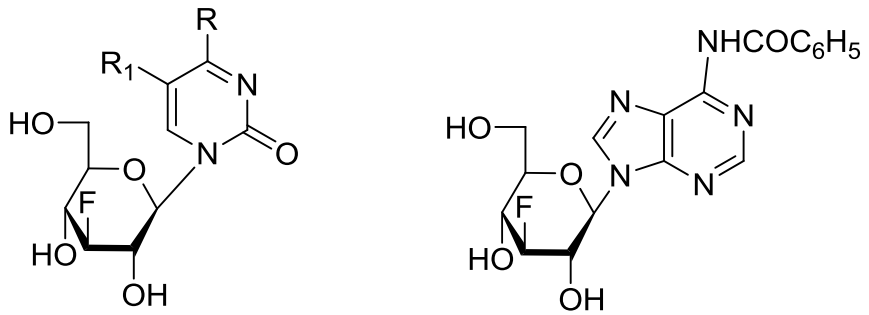
1.8 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη

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

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

Στο εργαστήριο της Βιο-Οργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έχουν συντεθεί φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Manta et al. 2007), οι οποίοι μειώνουν αποτελεσματικά τη δραστικότητα της PARN, ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(Α) ουράς) (Εικόνα 10). 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).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235



R = OH, R_1 = H
R = OH, R_1 = F
R = NH_2, R_1 = H
R = $NHCOC_6H_5$, R = H

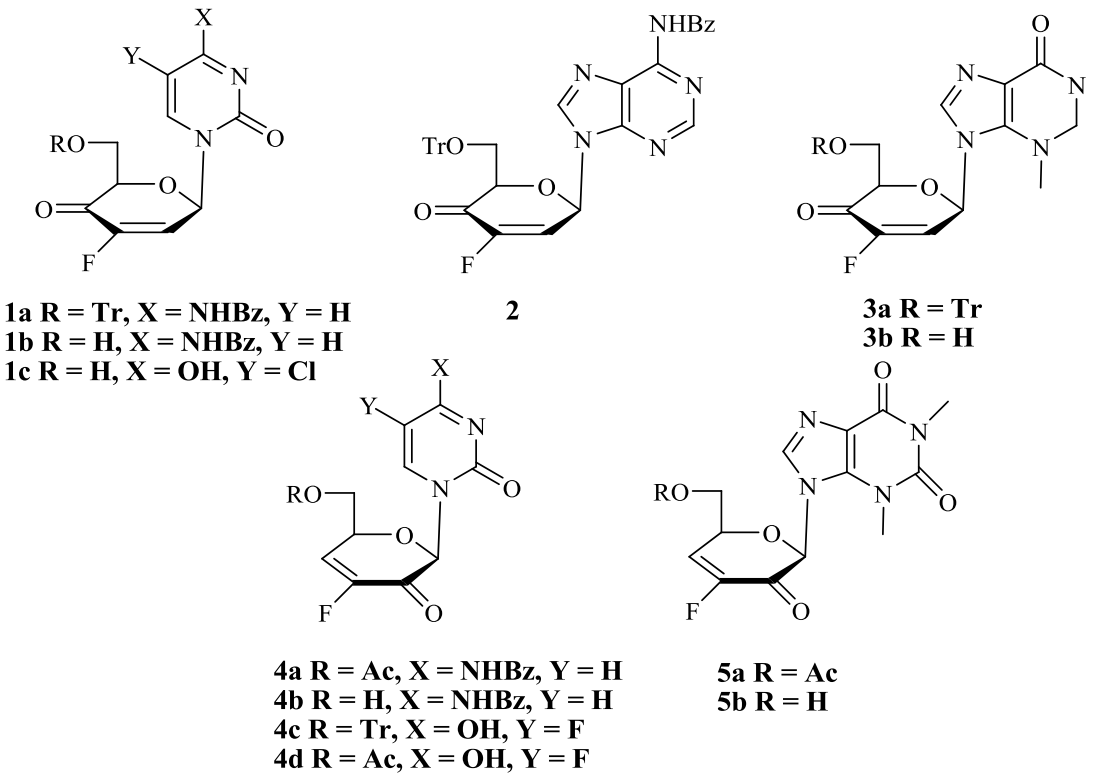
Εικόνα 10

Ακόμη, φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες έχουν αξιολογηθεί και ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP), ένζυμο με κεντρικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου και υπεύθυνο για την παραγωγή γλυκόζης στο αίμα (γλυκογενόλυση). Η λεπτομερής ανάλυση των παραγόντων που καθορίζουν τη σύνδεση μικρομοριακών ενώσεων (αναστολέων) στη GP σε μοριακό επίπεδο, παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της ενζυμικής τους δράσης ή και της ανεπιθύμητης αποικοδόμησης γλυκογόνου, στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, όπου η υπεργλυκαιμία αποτελεί σοβαρό ιατρικό πρόβλημα. Συγκεκριμένα, φθοριωμένοι πυριμιδινικοί γλυκοπυρανονουκλεοζίτες καθώς και ένα φθοριωμένο δεοξυ-πυρανονουκλεοζιτικό ανάλογο της N^4-βενζοϋλοκυτοσίνης αποδείχθηκαν ανταγωνιστικοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του μυϊκού γλυκογόνου (GPb) (Tsirkone *et al*. 2010).

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφτεί νέες σειρές βιολογικά ενεργών ακόρεστων νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο. Οι ακόρεστοι φθορο κετοπυρανονουκλεοζίτες, οι οποίοι συντέθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Manta et al. 2007) καθώς και άλλοι ανάλογοι πυρανονουκλεοζίτες (Leclercq et al. 1992, Khan et al. 2001, Ollapally et al 1999, Egron et al. 2002) έχουν αξιολογηθεί για τις αντιικές και τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες (ενώσεις **1-5**, εικόνα 11). Αξιοσημείωτη είναι η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

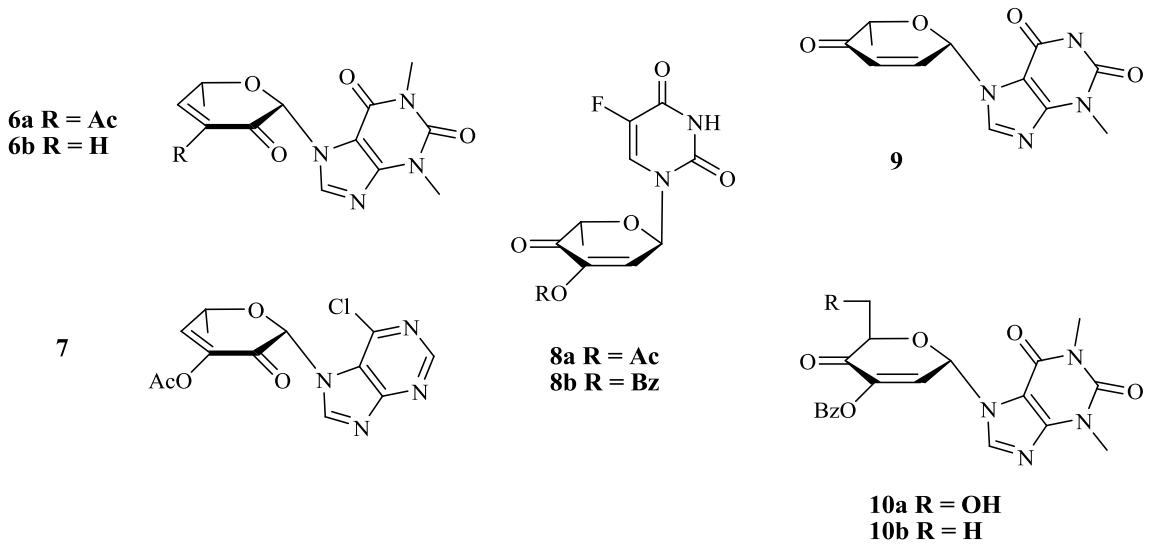
αντιική δράση εναντι του εντεροϊού (rotavirus), που επέδειξαν οι ενώσεις **1a,b**, **2** και **4a,b**.



Εικόνα 11.

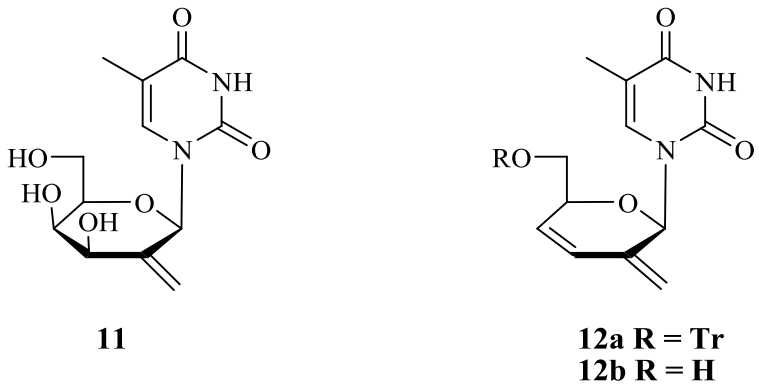
Επιπρόσθετα, ακόρεστα κετοπυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα παρουσίασαν, σε προηγούμενες μελέτες, σημαντική ανασταλτική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων *in vitro* αλλά και *in vivo* (Komiotis et al. 1991, Patterson et al. 1998, Komiotis et al. 2008). Η χημική δομή των συγκεκριμένων ενώσεων **6-10** φαίνεται στην εικόνα 12.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235



Εικόνα 12

Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας συντέθηκε επίσης μια νέα ενδιαφέρουσα σειρά εξομεθυλενικών και ακόρεστων εξομεθυλενικών πυρανονουκλεοζιτών (Agelis et al. 2007), οι οποίοι επίσης παρουσίασαν σημαντική αντιική δράση έναντι του εντεροϊού (ενώσεις **11** και **12α**, εικόνα 3).

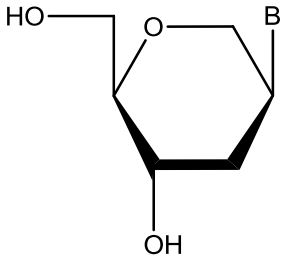


Εικόνα 13

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

1.9 Δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες

Άλλη μία σημαντική κατηγορία νουκλεοζιτών με τροποποιημένο εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είναι οι δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες, οι οποίοι παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες (Antonakis K. et al, 1989). Με τον όρο δεοξυνουκλεοζίτες υποδηλώνεται η αντικατάσταση ενός υδροξυλίου από ένα υδρογόνο σε οποιαδήποτε θέση του σακχάρου, το οποίο ενώνεται απευθείας με την αζωτούχο βάση. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε σε αυτήν την τάξη των νουκλεοζιτών από τη στιγμή που αντιβιοτικά, τα οποία περιέχουν 6΄-δεοξυπυρανόζες έχουν απομονωθεί από διάφορες φυσικές πηγές και επιπλέον λόγω της εμφάνισης της αντικαρκινικής δράσης των 6΄-δεοξυ-κετονουκλεοζιτών (Suhadolnik R et al, 1970, Antonakis K. et al, 1974, Suhadolnik R. et al, 1979). Αξιοσημείωτη, όμως, είναι και η αντιική, καθώς και η αντιλευχαιμική δράση που εμφάνισαν ορισμένοι πουρινικοί και πυριμιδινικοί 2΄-δεοξυπυρανονουκλεοζίτες (Langen P. et al, 1966, Nord D. et al, 1987). Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί και η αντιική δράση των 1,5-ανυδροεξιτολο-νουκλεοζιτών έναντι του ιού του απλού έρπητα τύπου 1 και τύπου 2, του κυτταρομεγαλοϊού καθώς και του ιού έρπητα ζωστήρα (Ενώσεις 13, εικόνα 14) (Verheggen I. et al, 1993, Verheggen I. et al, 1995).



13

a=αδενίνη
b=5-ιοδοουρακίλη
c=κυτοσίνη
d=θυμίνη
e=γουανίνη

Εικόνα 14 : Δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες

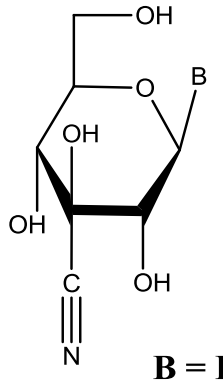
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Στόχος – σκοπός μελέτης

Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών με σκοπό την εύρεση νέων αντικαρκινικών και αντιικών παραγόντων. Οι νέοι νουκλεοζίτες στοχεύουν στο να καλύψουν την όλο και αυξανόμενη ανάγκη για φάρμακα με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα από τα μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενα.

Όπως ήδη αναφέραμε από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία έτη νέες τάξεις ασυνήθιστων φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών αποτελούν εν δυνάμει αντι-εντεροιικούς παράγοντες, ενώ παρουσίασαν αποτελεσματικότητα στην αναστολή διάφορων καρκινικών όγκων. Βασιζόμενοι στις αξιόλογες βιολογικές ιδιότητες των ανωτέρω ενώσεων, αποφασίσαμε να διευρύνουμε τις μελέτες μας προς τη σύνθεση νέων μορίων, στα οποία μία ηλεκτραρνητική κυανο ομάδα θα αντικαταστήσει το άτομο του φθορίου. Μάλιστα, πολύ πρόσφατα αποτελέσματα που αφορούν στη σύνθεση και στη βιολογική αποτίμηση των 3΄-κυανο γλυκοπυρανονουκλεοζιτών (Εικόνα 15) απέδειξαν ότι τα συγκεκριμένα μόρια διαθέτουν αξιοσημείωτες κυτταροτοξικές ιδιότητες.

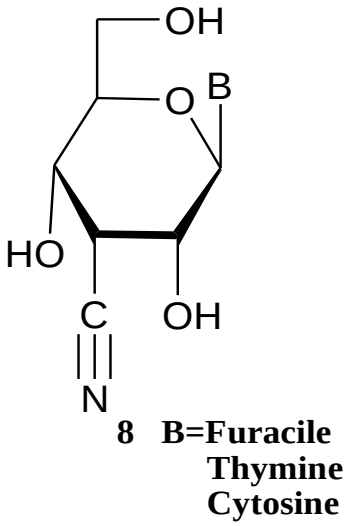


B = Furacile
B = Thymine
B = Cytosine

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

Εικόνα 15. 3΄-C-κυανο-β-D-γλυκοπυρανονουκλεοζίτες της 5-φθοροουρακίλης, της θυμίνης και της κυτοσίνης.

Βασιζόμενοι στα ανωτέρω και λαμβάνοντας υπόψην τις σημαντικές βιολογικές ιδιότητες που παρουσιάζουν οι δεοξυ πυρανονουκλεοζίτες, κρίθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης δεοξυ κυανο πυρανονουκλεοζιτών. Οι νέοι νουκλεοζίτες φέρουν κυανο αλλά και δεοξυ στη 3΄-θέση του σακχάρου και ως ετεροκυκλικές βάσεις την 5-φθοροουρακίλη, την θυμίνη και την κυτοσίνη. Η δομή του μορίου που στόχευσε η συνθετική μας πορεία φαίνεται στην εικόνα 16.



Εικόνα 16.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων

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

- Οξικός ανυδρίτης (Ac_2O) (Aldrich, Γερμανία)
- Πυριδίνη (Panreac, Ισπανία)
- Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH) (Merck, Γερμανία)
- Hexamethyldisilizane (HMDS) (Aldrich, Γερμανία)
- Trimethylsilyltrifluoromethane ($Me_3SiOSO_2CF_3$) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Υδρίδιο του ασβεστίου (CaH) (Fluca, Γερμανία)
- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN) (Merck, Γερμανία)
- Πεντοξείδιο του φωσφόρου (P_2O_5) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) (Merck, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bisulfate ($NaHSO_4$) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) (Merck, Γερμανία)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.2 ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : thin layer chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε μέσω της χρωματογραφικής μεθόδου TLC, όπου χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieseilel $60F_{254}$) πάχους 0.2 mm . Τα χρωματογραφήματα εμφανίζονται με ψεκασμό με διάλυμα θειικού οξέος (H_2SO_4) 30%, ενώ άλλοτε οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων (TLC) είναι ορατές υπό λυχνία υπεριώδους (UV).

Η χρωματογραφία διεκπεραιώθηκε χρησιμοποιώντας τα παρακάτω συστήματα διαλυτών :

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 30/70
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Γ : διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Δ : διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 70/30

3.2.2 Χρωματογραφία στήλης

Για τον καθαρισμό των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography), η οποία στήλη πληρώθηκε με silica gel (230-400 mesh) της εταιρίας E. Merck. Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής :

- Διάλυμα Α: οξικός αιθυλεστέρας/ εξάνιο 30/70
- Διάλυμα Β: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 40/60
- Διάλυμα Γ: διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Δ: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 50/50

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.2.3 Ξήρανση διαλυτών

Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων , απαιτείται η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο και τολουόλιο . Η ξήρανση του ακετονιτριλίου και του τολουολίου 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).

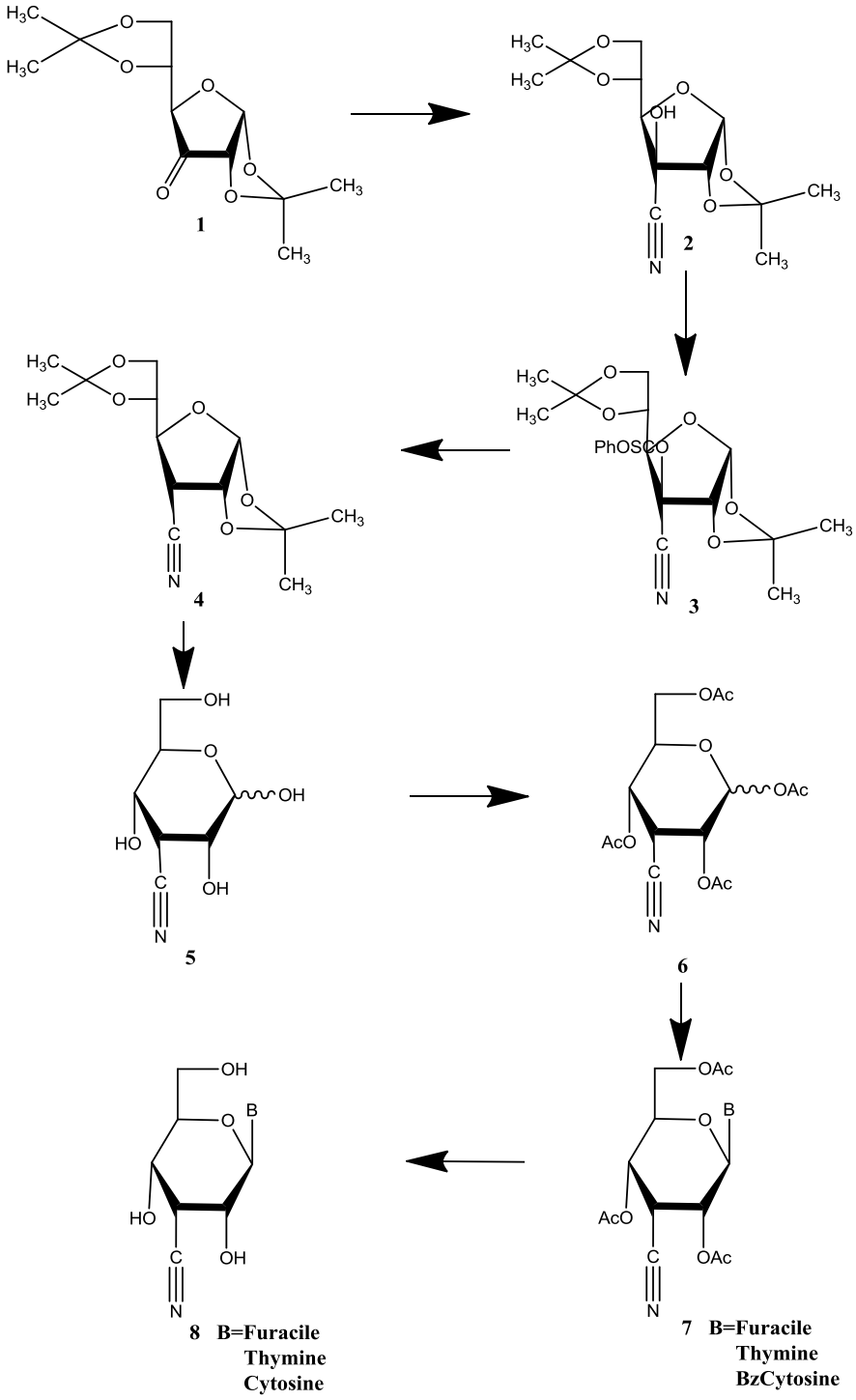
3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^{1}H NMR μετρήθηκαν με το φωτόμετρο Bruker 300 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ($CDCl_3$) και δευτεριωμένη μεθανόλη (MEOD). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^{1}H. Η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (doublet), dd (doublet doublet), dtr (doublet triplet), m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.3 Μέθοδοι

3.3.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού

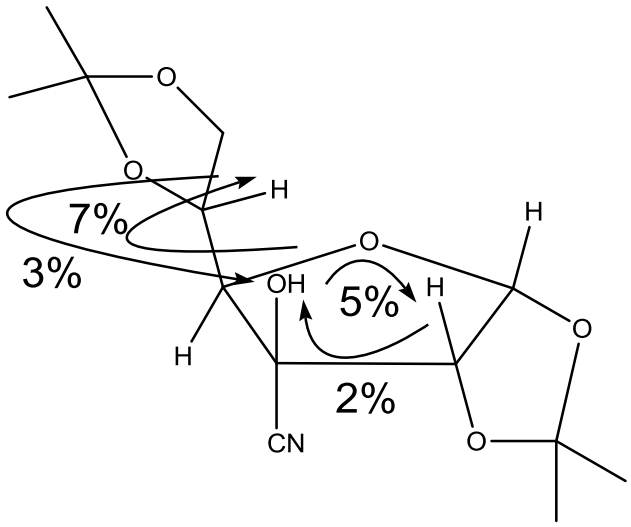


Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

Εικόνα 17: Επισκόπηση της σύνθεσης των δεοξυ κυανο νουκλεοζιτικών αναλόγων με βάσεις την 5-φθοροουρακίλη, τη θυμίνη και την κυτοσίνη.

3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης

Η πρώτη αντίδραση αυτής της πορείας περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσθήκη της κυανο ομάδας στην κετονομάδα του προϊόντος **1**, χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια NaCN, $NaHCO_3$ σε διάλυμα δύο φάσεων H_2O και Et_2O. Λαμβάνουμε με αυτό τον τρόπο με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα την 3-C-Κυανο-1,2:5,6-δις-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-γλυκοφουρανόζη **2** , με απόδοση 97%. Η προτεινόμενη α-στερεοχημεία της κύανο ομάδας στηρίχθηκε σε μετρήσεις NOE που έγιναν στο προϊόν **2**. Όπως απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα η αύξηση της έντασης του υδροξυλίου κατά 3% και 2% με την ακτινοβόληση των 5-H και 2-H αντίστοιχα, αποδεικνύει ότι το υδροξύλιο βρίσκεται στην πάνω πλευρά του δακτυλίου. Ομοίως κορεσμός της ελεύθερης υδροξυλομάδας οδηγεί στην αύξηση των εντάσεων των 5-H και 3-H κατά 7% και 5% αντίστοιχα.

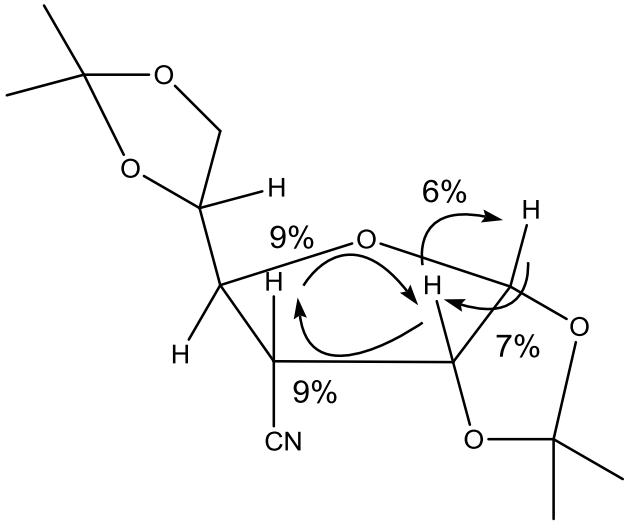


2

Η επόμενη αντίδραση της συνθετικής πορείας είναι η φαινοξυθειοκαρβονυλίωση του παραγώγου **2** , η οποία πραγματοποιείται με επίδραση φαινοξυθειοκαρβονυλοχλωριδίου (PhOC(S)Cl), παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et_3N) και 4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (DMAP) σε CH_3CN . Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνεται το 3΄-*O*-φαινοξυθειοκαρβονυλο παράγωγο **3**.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

Στη συνέχεια, το προϊόν **3** χωρίς περαιτέρω απομόνωση ανάγεται παρουσία του υδριδίου του τριβουτυλοκασσιτέρου (Bu_3SnH), καθώς και του αζωδις-ισοβουτυρονιτριλίου (AIBN) σε διαλύτη τολουόλιο στους 100 ^{0}C. Η 3-Δεοξυ-3-C-κυανο-1,2:5,6-δις-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-γλυκοφουρανόζη **4** λαμβάνεται σε 76% απόδοση, ύστερα από τη σχάση του δεσμού C^3-O^3 σε μία αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών. Η αναγωγή επιτεύχθηκε στερεοεκλεκτικά και η απόσπαση του υδρογόνου από το Bu_3SnH έγινε από την πάνω β όψη του δακτυλίου. Η α–στερεοχημεία της κυανο ομάδας διαπιστώθηκε με μετρήσεις NOE που έγιναν στο προϊόν **4** (εικόνα 18)**.** Οι αμοιβαίες αυξήσεις της έντασης που παρατηρούνται μεταξύ του 2-H και των 1-H και H-3, δείχνουν ότι τα τρία αυτά πρωτόνια βρίσκονται στην πάνω β όψη του φουρανικού δακτυλίου.



4

Εικόνα 18. NOE μετρήσεις της ένωσης **4**.

Η συνθετική πορεία συνεχίζεται με την υδρόλυση του προϊόντος **4** με ένα θερμό υδατικό διάλυμα της ρητίνης Amberlite IR-120 (H^+), η οποία οδηγεί στην ένωση **5**, σε απόδοση 92%. Στη συνέχεια, με ακετυλίωση του προϊόντος **5** παρουσία Ac_2O σε πυριδίνη, λαμβάνεται το επιθυμητό σάκχαρο, 3-Δεοξυ-3-C-κυανο-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζη **6** αρκετά καλή απόδοση (89%).

Ακολουθεί η σύζευξη του σακχάρου **6** με τη βάση θυμίνη , κυτοσίνη και φθορο-ουρακίλη. Σιλυλιώνεται πρώτα η βάση παρουσία του διαλύτη ακετονιτριλίου (CH_3CN), εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) καθώς και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

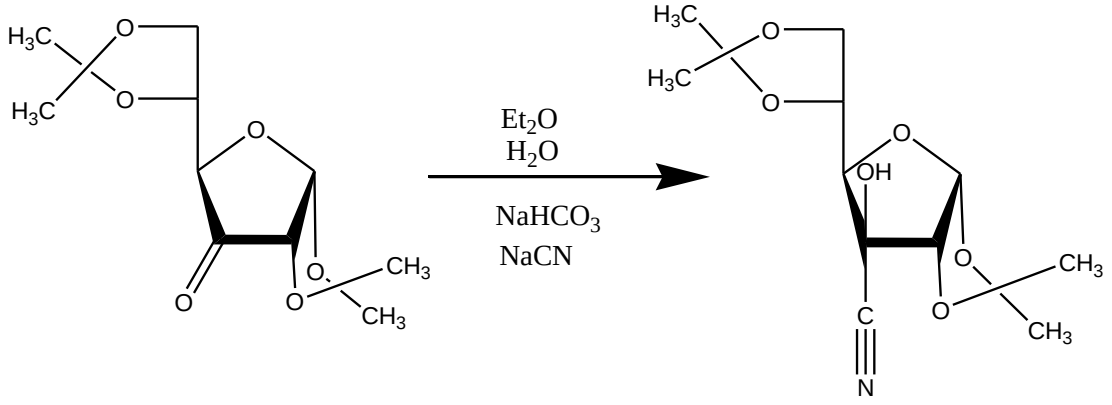
καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης. Αφού σιλυλιωθεί η βάση, προστίθεται το σάκχαρο **6** και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα ($Me_3SiOSO_2CF_3$) και θέρμανση της αντίδρασης, λαμβάνοντας την επιθυμητή ένωση 1-(3΄-Δεοξυ-3΄-C-κυανο-2΄,4΄,6΄-τρις-O-ακετυλο-β-D-πυρανοζυλο) με τη βάση **7** , με ικανοποιητική απόδοση (68%, 59%, 64%).

Τέλος ακολουθεί η απακετυλίωση των δεοξυ-κυανο πυρανονουκλεοζίτων της φθορο-ουρακίλης, θυμίνης και κυτοσίνης **8**. Τα αντιδρώντα διαλύονται σε διάλυμα οξικού οξέος:πυριδίνης (AcOH:pyridine) και ακολουθεί προσθήκη ένυδρης υδραζίνης. Στη συνέχεια απομονώνονται τα τελικά προϊόντα με ικανοποιητικές αποδόσεις (65%, 71% και 55% αντίστοιχα). Προσπάθειες πλήρης αποπροστασίας με μεθανολική αμμωνία, με τις επακόλουθες βασικές συνθήκες οδήγησε σε πολύπλοκα μείγματα που περιείχαν προϊόντα β-απόσπασης, πιθανόν λόγω του όξινου υδρογόνου H-3΄ και της παρουσίας δυο αποχωρούντων ομάδων (OAc) στις 2΄- και 4΄- θέσεις του πυρανικού δακτυλίου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.3.3 Σύνθεση της 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλ-3-C-κυανο-D-γλυκοπυρανόζης.

3.3.3.1 Σύνθεση της 3-C-κυανο-1,2:5,6-δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-γλυκοφουρανόζης (2)



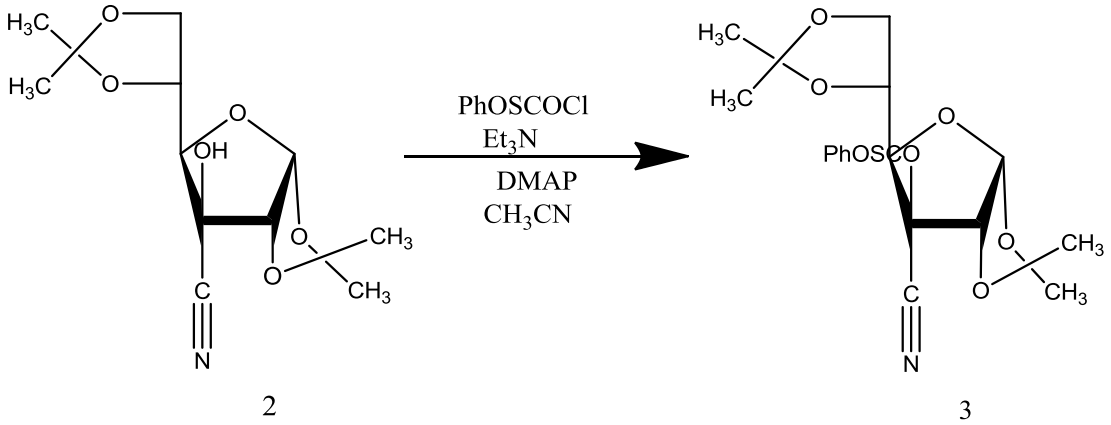
Η 1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη **(1)** (4g, 15.5 mmoles) διαλύθηκε σε αιθυλεθέρα (124ml) και στη συνέχεια προστέθηκε νερό (62ml), ώστε να σχηματιστούν δύο φάσεις. Κατόπιν προστέθηκε $NaHCO_3$ (15.5mmol, 2.6g) και NaCN (7.75mmol, 0.76g). Το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε με έντονη ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου . Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 1). Η οργανική φάση διαχωρίστηκε και η υδατική φάση πλύθηκε δυο φορές με οξικό αιθυλεστέρα (2χ 124 ml). Οι οργανικές φάσεις ενώθηκαν, ξηράθηκαν με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Α. Το επιθυμητό προϊόν **(2)** (4.28g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Σημείο Τήξεως 98-100 ^{0}C.

TLC (Διάλυμα Α)	R_f = 0.40
Απόδοση	97%
$[a]_D^{22}$	+46 c = 0.5

Πίνακας 1. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-κυανο-1,2:5,6-δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (**2**)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

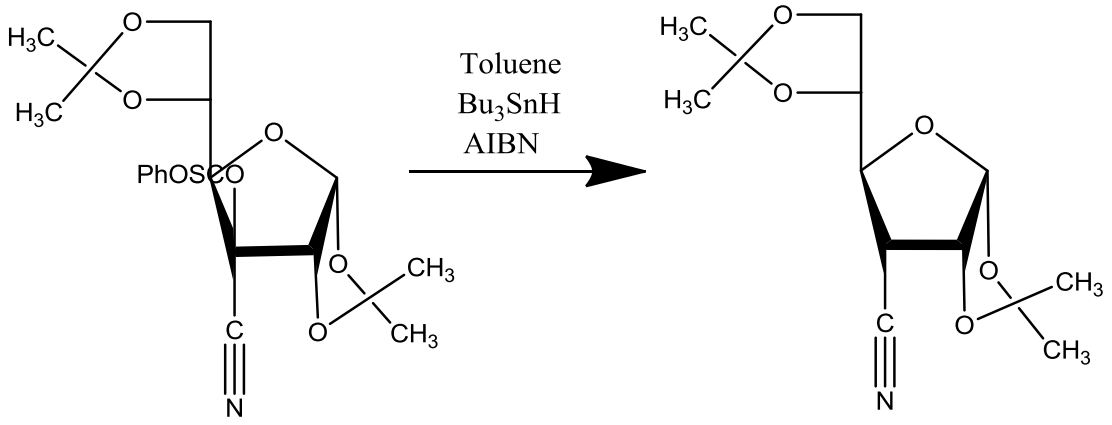
3.3.3.2 Σύνθεση της 3-C-κυανο-3-*O*-φαινοξυθειοκαρβονυλο-1,2:5,6-δις-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (3)



Η 3-C-κυανο-1,2:5,6-δις-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη **(2)** (2g, 7.01 mmol) διαλύθηκε σε άνυδρο CH_3CN (73.68 mL). Στο διάλυμα προστέθηκε Et_3N (1.47ml, 10,69 mmol) και DMAP (0.37g, 3.03 mmol) και τέλος PhOC(S)Cl (1.39 ml, 10.33 mmol) σε παγόλουτρο για μία ώρα. Το μίγμα αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (500 mL) και εκχυλίστηκε τρείς φορές με νερό (3 x 150 mL). Κατόπιν η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα **(3)** συμπυκνώνεται δυο φορές με άνυδρο τολουόλιο και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω απομόνωση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.3.3.3 Σύνθεση της 3-δεοξυ-3-C-κυανο-1,2:5,6-δις-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης (4)



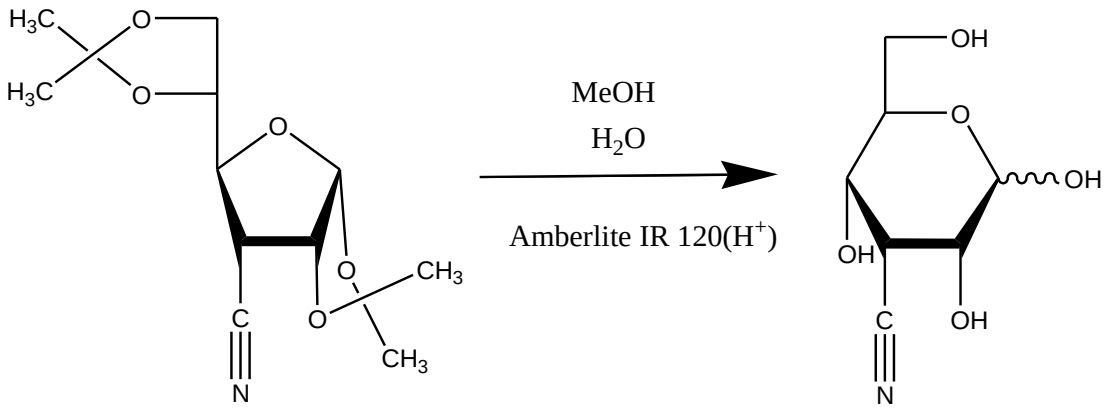
Η 3-C-κυανο-3-*O*-φαινοξυθειοκαρβονυλο-1,2:5,6-δις-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη **(3)** 7.01 mmol διαλύθηκε σε τολουόλιο (73.68 mL) και το μίγμα απαερώθηκε με άζωτο για 30 λεπτά. Στο διάλυμα προστέθηκε Bu_3SnH (2.93 mL, 11.06 mmol) καθώς και AIBN (182 mg, 1.1 mmol). Το προκύπτον μίγμα θερμάνθηκε στους 100 ^{0}C για 45 λεπτά. Στη συνέχεια αφέθηκε να κρυώσει, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό και ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα A. Το επιθυμητό προϊόν **(4)** (1.43 g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Σημείο Τήξεως 104-106 ^{0}C.

TLC (Διάλυμα A)	R_f = 0.44
Απόδοση	76%
$[a]_D^{22}$	+16 c = 0.5

Πίνακας 2. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-δεοξυ-1,2:5,6-δις-O-ισοπροπυλιδενο-3-C-κυανο -α-D -αλλοφουρανόζης **(4)**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.3.3.4 Σύνθεση της 3-C-κυανο-3-δεοξυ-α-D-αλλοπυρανόζης.



4 5

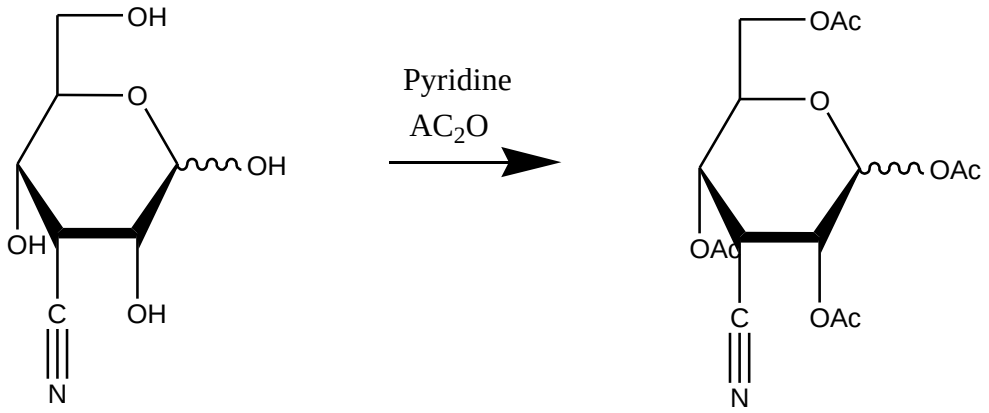
Η 3-δεοξυ-1,2:5,6-δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-3-C-κυανο-α-D-αλλοφουρανόζη **(4)** (1.43g, 5.31 mmol) διαλύθηκε σε MeOH (10.9 ml) και νερό (62.2 ml) αναδεύτηκε στους 60-70 ^{0}C με ρητίνη Amberlite IR-120 (H^{+}) (2.700g). Μετά από 10 ώρες η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 3), το μίγμα διηθήθηκε και απομακρύνθηκαν οι διαλύτες από το διήθημα υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **(5)** (924 mg) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

TLC (Διάλυμα Α)	R_f = 0.17
Απόδοση	92%
$[a]_D^{22}$	+6 c = 0.5

Πίνακας 3. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-κυανο-3-δεοξυ-α-D-αλλοπυρανόζης **(5)**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.3.3.5 Σύνθεση της 1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-3-C-κυανο-3-δεοξυ-D-αλλοπυρανόζης (6)



5 6

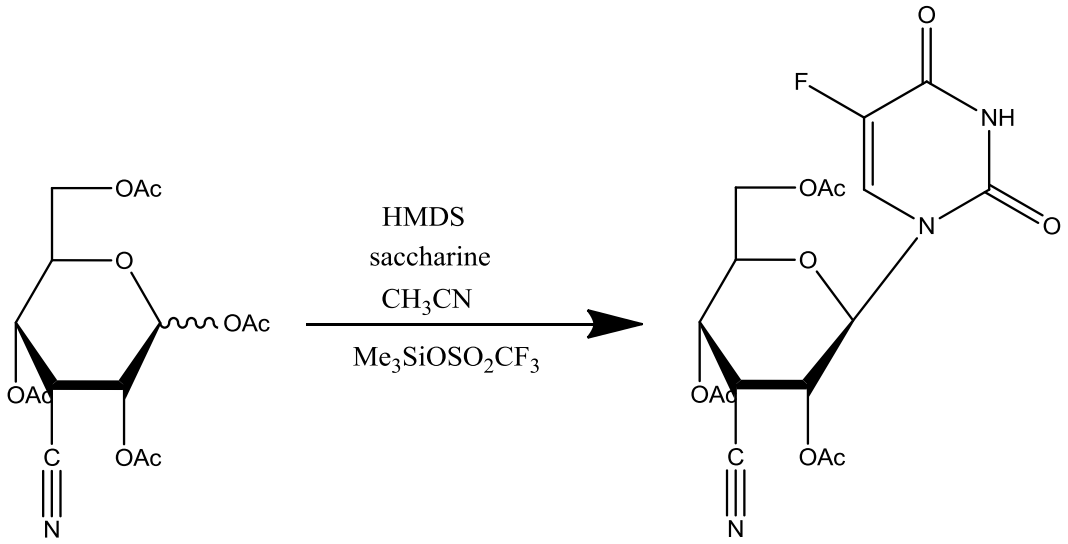
Σε ένα διάλυμα της 3-C-κυανο-3-Δεοξυ-α-D-αλλοπυρανόζης **(5)** (924 mg, 4.89 mmol) σε πυριδίνη (17.12 ml) προστέθηκε Ac_2O (8.8 ml). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC πίνακας 4) το διάλυμα κρύωσε στους 0 ^{0}C και προστέθηκε μεθανόλη (5 ml). Η αντίδραση συμπυκνώνεται υπό κενό και ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος με εκχύλιση, αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα, πλύθηκε με κορεσμένο όξινο θειικό νάτριο, με όξινο ανθρακικό νάτριο και νερό. Στην οργανική φάση προστέθηκε άνυδρο θειικό νάτριο, διηθήθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό για να δώσει το επιθυμητό προϊόν **(6)** υπό μορφή παχύρευστου λαδιού (1.56 g).

TLC (Διάλυμα Α)	R_f = 0.41
Απόδοση	89%
$[a]_D^{22}$	-2 c = 0.5

Πίνακας 4. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-3-C-κυανο-3-δεοξυ- D- αλλοπυρανόζης (6).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.3.3.6.1 Σύνθεση της 1-(2΄,4΄,6΄-τρι-Ο-ακετυλο-3΄-C-κυανο-3΄-δεοξυ -β-D-αλλοπυρανοζυλο) 5φθόρο-ουρακίλης (7a).



6 7a

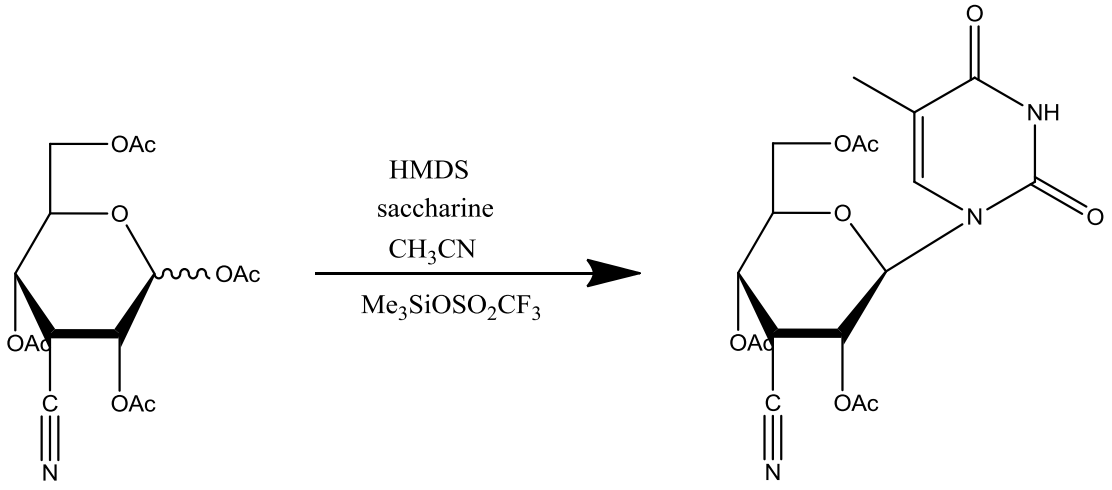
Ένα διάλυμα της 5 φθόρο-ουρακίλης (126mg, 0.97mmol), του HMDS (254μl, 1.20mmol) και της σακχαρίνης (8mg, 0.045mmol) σε άνυδρο CH_3CN (3.5ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 30 λεπτά στους 90 ^{0}C και αφότου το μίγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-3-C-κυανο-3-δεοξυ-D-αλλοπυρανόζης **(6)** (0.25g, 0.69mmol) καθώς και $Me_3SiOSO_2CF_3$ (152μl, 0.84mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 4 ώρες (TLC πίνακας 5) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα $NaHCO_3$, αραιώθηκε με CH_2Cl_2 (200ml). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Β. Το επιθυμητό προϊόν **(7a)** (0.19g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Σημείο Τήξεως 108-110 ^{0}C.

TLC(Διάλυμα Β)	R_f = O.33
Απόδοση	64 %
$[a]_D^{22}$	-2 c = 0.5
λmax	263nm

Πίνακας 5. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2΄,4΄,6΄-τρι-Ο-ακετυλο-3΄- C-κυανο -3΄-δεοξυ -β-D-αλλοπυρανοζυλο) 5φθόρο-ουρακίλης (7a).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.3.3.6.2 Σύνθεση της 1-(2΄,4΄,6΄-τρι-Ο-ακετυλο-3΄-C-κυανο-3΄-δεοξυ-β-D-αλλοπυρανοζυλο) θυμίνης (7b).



6 7b

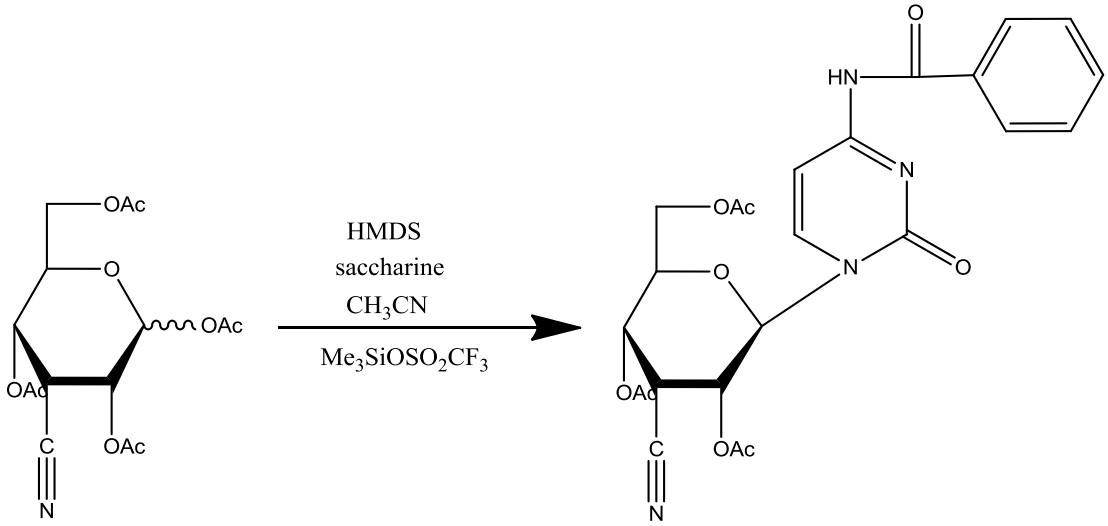
Το προϊόν 7b συντέθηκε από το προϊόν 6 με την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω με το προϊόν 7a. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Δ. Το επιθυμητό προϊόν **(7b)** (0.19g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Σημείο Τήξεως 106-108 ^{0}C.

TLC(Διάλυμα Β)	R_f = O.25
Απόδοση	68%
$[a]_D^{22}$	-4 c = 0.5
λmax	261 nm

Πίνακας 6. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2΄,4΄,6΄-τρι-Ο-ακετυλο-3΄- C-κυανο -3΄-δεοξυ -β-D-αλλοπυρανοζυλο) θυμίνης (7b).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.3.3.6.3 Σύνθεση της 1-(2΄,4΄,6΄-τρι-Ο-ακετυλο-3΄-C-κυανο-3΄-δεοξυ-β-D-αλλοπυρανοζυλο) βενζοϋλοκυτοσίνης (7c).



6 7c

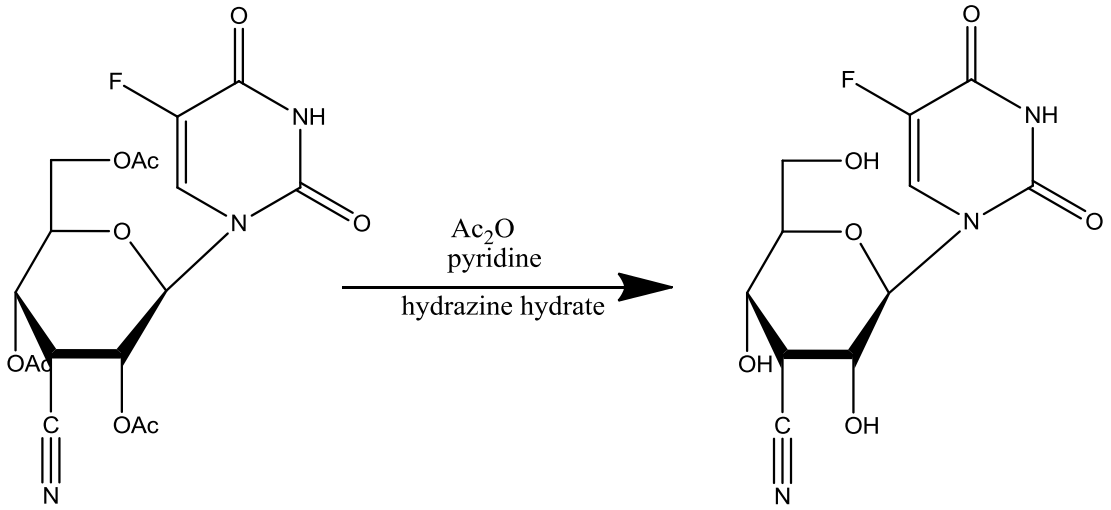
Το προϊόν 7c συντέθηκε από το προϊόν 6 με την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω με το προϊόν 7a. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Δ. Το επιθυμητό προϊόν **(7c)** (0.21g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Σημείο Τήξεως 203-205 ^{0}C.

TLC(Διάλυμα Β)	R_f = Ο.23
Απόδοση	59%
$[a]_D^{22}$	+2 c = 0.5
λmax	264 nm

Πίνακας 7. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(2΄,4΄,6΄-τρι-Ο-ακετυλο-3΄- C-κυανο -3΄-δεοξυ -β-D-αλλοπυρανοζυλο) βενζολ-κυτοσίνης (7c).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.3.3.7.1 Σύνθεση της 1-(3΄-C-κυανο-3΄-δεοξυ-β-D-αλλοπυρανοζυλο)5-φθορο-ουρακίλης (8a).



7a 8a

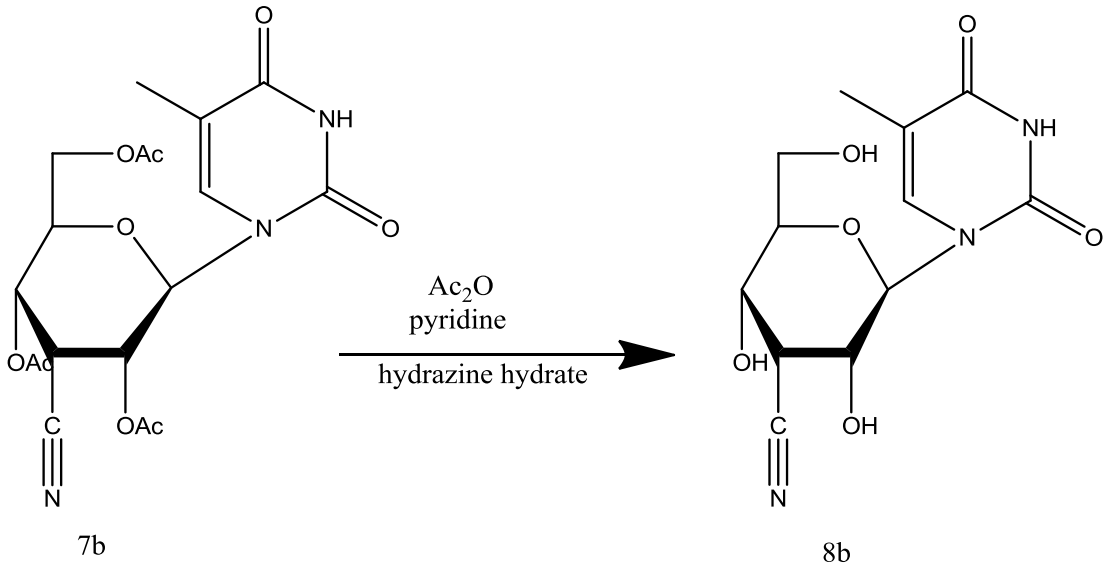
Σ' ένα διάλυμα του προϊόντος (7a) (0.19 g, 0.44 mmol) σε AcOH-pyridine (2.2ml, 1:4 v/v), προστέθηκε 85% ένυδρη υδραζίνη (0.31ml, 5.28mmol) σε θερμοκρασία δωματίου και αφέθηκε υπό ανάδευση για 16 ώρες. Έπειτα προστέθηκε ακετόνη (1.1ml) και συνεχίστηκε η ανάδευση για 30 λεπτά ακόμη. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης συμπυκνώθηκε υπό κενό μέχρι να απομακρυνθεί ο διαλύτης. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Γ. Το επιθυμητό προϊόν **(8a)** (86mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού.

TLC(Διάλυμα Γ)	R_f = O.26
Απόδοση	65%
$[a]_D^{22}$	-8 c = 0.5
λmax	263 nm

Πίνακας 8. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3΄-C-κυανο-3΄-δεοξυ-β-D-αλλοπυρανοζυλο) 5φθόρο-ουρακίλης (8a).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.3.3.7.2 Σύνθεση της 1-(3΄-C-κυανο-3΄-δεοξυ-β-D-αλλοπυρανοζυλο) θυμίνης (8b).



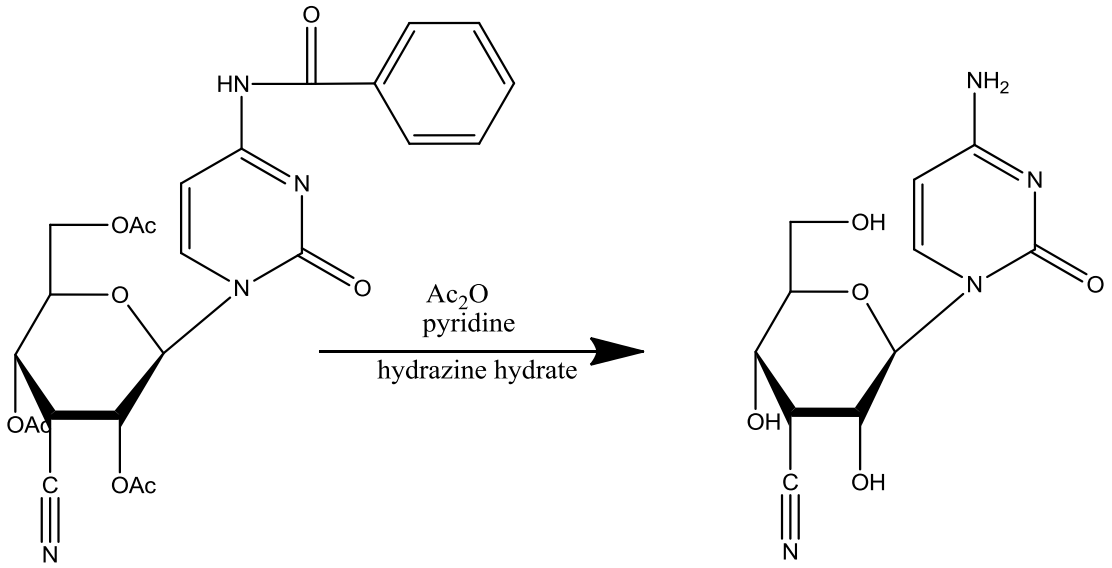
Το προϊόν 8b συντέθηκε από το προϊόν 7b με την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω με το προϊόν 8a. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Γ. Το επιθυμητό προϊόν **(8b)** (99mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού.

TLC(Διάλυμα Γ)	R_f = O.20
Απόδοση	71%
$[a]_D^{22}$	-16 c = 0.5
λmax	262 nm

Πίνακας 9. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3΄- C-κυανο -3΄-δεοξυ -β-D-αλλοπυρανοζυλο) θυμίνης (8b).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

3.3.3.7.3 Σύνθεση της 1-(3΄-C-κυανο-3΄-δεοξυ-β-D-αλλοπυρανοζυλο) κυτοσίνης (8c).



7c 8c

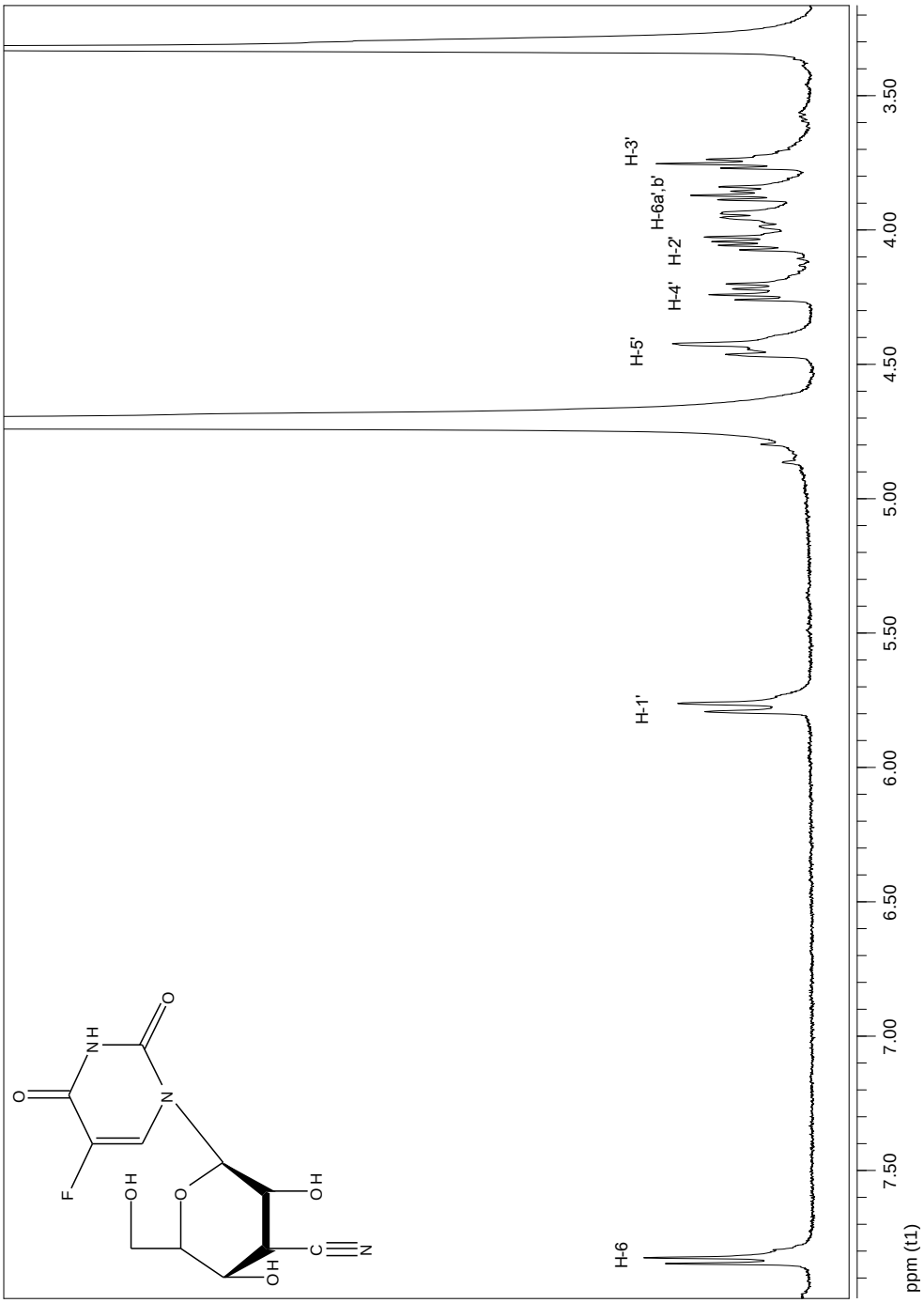
Το προϊόν 8c συντέθηκε από το προϊόν 7c με την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω με το προϊόν 8a. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Γ. Το επιθυμητό προϊόν **(8c)** (33mg) ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού πορτοκαλί χρώματος.

TLC(Διάλυμα Δ)	R_f = O.25
Απόδοση	55%
$[a]_D^{22}$	-6 c = 0.5
λmax	266nm

Πίνακας 10. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3΄- C-Κυανο -3΄-Δεοξυ -β-D-αλλοπυρανοζυλο) κυτοσίνης (8c).

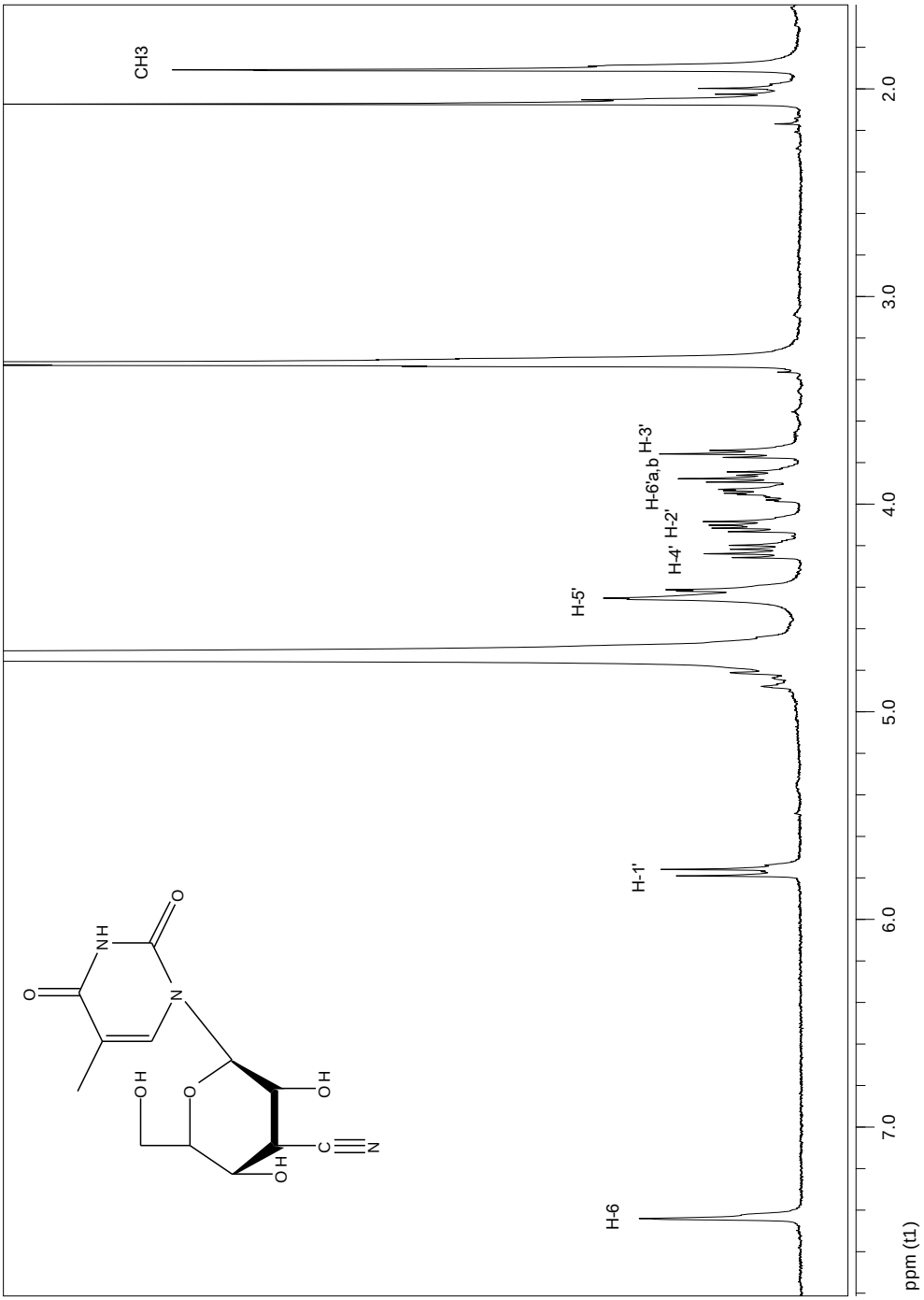
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

4.ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^{1}Η NMR



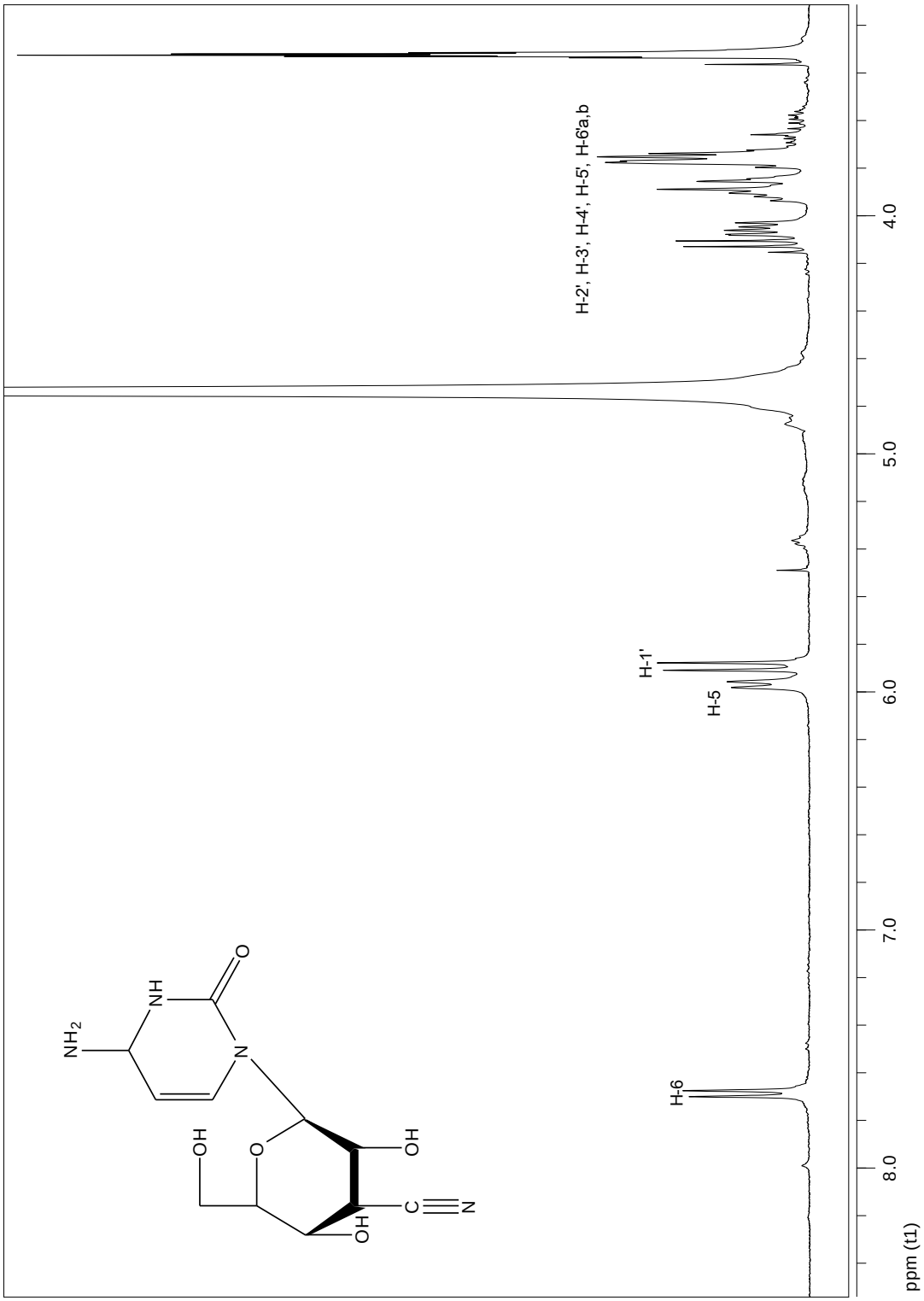
Εικόνα 19: Φάσμα ^{1}Η NMR του τελικού προϊόντος 8a

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235



Εικόνα 20 : Φάσμα ^{1}H NMR του τελικού προϊόντος 8b

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235



Εικόνα 21: Φάσμα ^{1}H NMR του τελικού προϊόντος 8c

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στηριζόμενοι σε προηγούμενες μελέτες των φουρανονουκλεοζιτών με διακλαδώμενη αλυσίδα την κυανο ομάδα καθώς και των βιολογικά υποσχόμενων δεοξυ πυρανονουκλεοζιτών στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση τριών νέων 3΄κυανο- 3΄δεοξυ πυρανονουκλεοζιτών που φέρουν ως βάσεις την ουρακίλη, την θυμίνη και την κυτοσίνη **8a-c** αντίστοιχα. Πέραν της συνθέσεως, τα νουκλεοζιτικά αυτά ανάλογά αποτιμήθηκαν όσον αφορά στις κυτταροστατικές και αντιικές τους ιδιότητες.

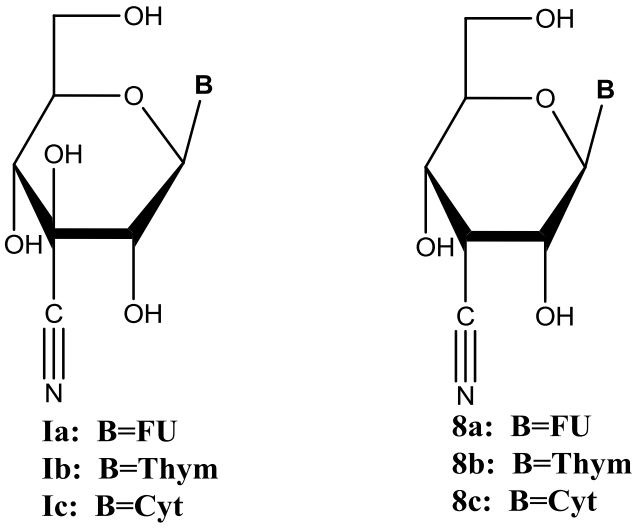
Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε ήταν σχετικά απλή, γρήγορη και ιδιαίτερα αποτελεσματική καθώς οι αντιδράσεις αυτές οδήγησαν στη σύνθεση μορίων με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα, όπως αποδείχτηκε με τα πειράματα NOE αλλά και με υψηλά ποσοστά απόδοσης. Γενικότερα, η συνολική απόδοση για τη σύνθεση της 1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο-3-C-κυανο-3-δεοξυ-D-αλλοπυρανόζης (**6**) από την 1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη **(1)** είναι 60%. Οι ακετυλιωμένοι πυρανονουκλεοζίτες **7a-c** σχηματίστηκαν με ικανοποιητικές αποδόσεις από 59% έως 68%. Τέλος, οι αποπροστατευμένοι κυανο πυρανονουκλεοζίτες **8a-c** της 5-φθορο-ουρακίλης, της θυμίνης και της κυτοσίνης είχαν αποδόσεις 65%, 71% 55% αντίστοιχα. Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^{1}H NMR.

Τα τελικά προϊόντα **8a-c** εκτιμήθηκαν για την αντιική τους δράση έναντι μιας πληθώρας τόσο DNA όσο και RNA ιών. Τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά, αφού βρέθηκαν να μην έχουν δράση σε υψηλές συγκέντρωσεις και επιπλέον κανένα από τα μόρια δεν εμφάνισε αξιόλογη κυτταροτοτοξική και κυτταροστατική δράση έναντι κυττάρων λευχαιμίας ποντικού (L1210), ανθρώπινου λεμφώματος (CEM) καθώς και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Για την εκτίμηση της κυτταροστατικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC_{50}, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%.

Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται οι τιμές των 3΄-δεοξυ-3΄-κυανο αλλοπυρανονουκλεοζιτών **8a-c** καθώς και των αντίστοιχων 3΄-κυανο-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

γλυκοπυρανονουκλεοζιτών **Ia-c** που συντέθηκαν προηγουμένως στο εργαστήριο Βιοργανικής Χημείας του τμήματος μας (Σχήμα 1).



Σχήμα 1

Compound	IC_{50}[a] (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
Ia	1.9 ± 0.0	32 ± 9.6	4.5 ± 1.2
Ib	539 ± 85	> 500	> 500
Ic	147 ± 14	> 500	377 ± 0
8a	550 ± 10	> 500	819 ± 44
8b	> 750	> 750	> 750
8c	> 750	> 750	> 750
F-Uracil	0.49 ± 0.13	18 ± 5	0.54 ± 0.12

Όπως προκύπτει από τον πίνακα οι νέοι 3΄-κυανο-3΄-δεοξυ-αλλοπυρανονουκλεοζίτες εμφάνισαν συνολικά χαμηλότερη κυτταροστατικότητα σε σχέση με τους αντίστοιχους ήδη συντεθειμένους 3΄-κυανο-γλυκοπυρανονουκλεοζίτες. Συνεπώς, φαίνεται ότι η ύπαρξη του υδροξυλίου στη 3΄ θέση του σακχάρου είναι σημαντική για την αυξημένη κυτταροστατική δράση σε μόρια τέτοιου τύπου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✓ Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. Bioorg. Med. Chem. **2007**, *15*, 5548.
- ✓ Antonakis, K.; Chouroulinkov, I. Biochem. Pharmacol. **1974**, 23, 2095
- ✓ Antonakis, K. “Hexopyranose nucleosides”. In Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C); Elsevier, Amsterdam, **1989**, 4, p. 241.
- ✓ Arner, E. S. J.; Eriksson, S. Pharmacol. Ther. **1995**, 67, 155.
- ✓ Balatsos, N. A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis D.; Stathopoulos, C. Biochemistry 2009, 48, 6044–6051
- ✓ Berg, J. M.; Tymockzko J. L., Stryer L. (2001). Βιοχημεία (Τόμος Ι) Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (p) 329-351.
- ✓ Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. Molecular cancer therapeutics 2010
- ✓ Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. Biochem. Pharmacol. 1994, 47, 365.
- ✓ De Clercq, E. Biochim Biophys Acta. 2002, 1587, 258.
- ✓ Ellison RR, Carey RW and Holland JF. Clin. Pharmacol. Ther. , 1967 8, 800–809.
- ✓ Egron, M.J.; Dorange, I.B.; Antonakis, K.; Herscovici, J.; Ollapally, A.P. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2002, 21, 327.
- ✓ Gumina, G.; Song, G. Y.; Chu, C. K. FEMS Microbiology Letters 2001, 202, 9.
- ✓ Khan, A.R.; Mulligan, K.X.; Ollapally, P. Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, 2001, 20, 759.
- ✓ Komiotis, D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. Nucleosides Nucleotides 1991, 10, 431.
- ✓ Komiotis, D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents 2008, 7, 219.
- ✓ Langen, P.; Etzold, G. Mol. Pharmacol. 1966, 2, 89.
- ✓ Leclercq, F.; Egron, M.J.; Antonakis, K. Carbohydr. Res., 1992, 228, 95.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

- Lui, V. W. Y. W.; Lau, C. P. Y. P.; Cheung, C. S. F. S.; Ho, K.; Ng, M. H. L. H.; Cheng, S. H. H.; Hong, B.; Tsao, S.-W. W.; Tsang, C. M. M.; Lei, K. I. K. I.; Yamasaki, Y.; Mita, A.; Chan, A. T. Biochemical pharmacology 2010, 79, 1772–1780.
- MacCoss, M.; Robins, M. J. “Anticancer Pyrimidines, Pyrimidine Nucleosides and Prodrugs”. In the chemistry of Antitumor Agents; Wilman, D. E. V. Ed.; Chapman and Hall: New York, 1990, p. 261.
- McMurry, John Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, (2000) : 151- 156,1235-1237,1245-1247.
- Manta, S.; Agelis, G.; Botic,´, T.; Cencic, A.; Komiotis D. Bioorganic & medicinal chemistry 2007, 15, 980–987
- Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Kiritsis, C.; Balzarini, J.; Komiotis D. Bioorganic chemistry 2010, 38, 48–55.
- Matsuda, A.; Sasaki, T. Cancer Sci. 2004, 95, 105.
- Nord, D. L.; Dalley, N. K.; Mc Kernan, P. A.; Robins, R. K. J. Med. Chem. 1987, 30, 1044.
- Ollapally, A. P.; Dorange, I. B.; Whitaker, T. L. Nucleosides & Nucleotides 1999, 18, 703.
- O-Yang, C.; Wu, H.Y.; Fraser-Smith, E.B.; Walker, K.A.M. Synthesis of 4’-C-cyanothymidine and analogs as potent inhibitors of HIV. Tetrahedron Lett. 1992, 33, 37.
- Pastor-Anglada, M.; Felipe, A.; Casado, J. TiPS 1998, 19, 424.
- Patterson, J.; Uriel, C.; Egron, M.J.; Herscovici, J.; Antonakis, K.; Alaoui-Jamali, M.A. Antimicrob. Agents Chemother., 1998, 42, 779 and references cited therein
- Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. Nucleosides Nucleotides 1992, 11, 903.
- Robins, R. K.; Kini, G. D. “Purines and Purine Nucleoside Analogues as Antitumor Agents”. In The Chemistry of Antitumor Agents; Wilman, D. E. V. Ed. Chapman and Hall: New York, 1990, p.299.
- Suhadolnik, R. J. Nucleoside Antibiotics, Wiley-Interscience, New York, 1970.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235

- ✓ Suhadolnik, R. J. Nucleosides as biological Probes, Wiley and Sons, New York, 1979.
- ✓ Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J. M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis D.; Leonidas, D. D. Bioorganic & medicinal chemistry 2010, 18, 3413–3425.
- ✓ Vender, M. D.; Sherman, P. D.; Luciano, P. D.; Tsakoulos, D. M.; Φυσιολογία του ανθρώπου: μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού. Εκδόσεις Πασχαλίδης (8η εκδοση) 2001.

- ✓ Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. J. Med. Chem. 1993, 36, 2033.
- ✓ Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Van Meervelt, L.; Rozenski, J.; Wiebe, L.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Claes, P.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. J. Med. Chem. 1995, 38, 826.
- ✓ Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. J. Med. Chem. 2004, 47, 3399.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
19/04/2024 16:30:29 EEST - 18.119.213.235