

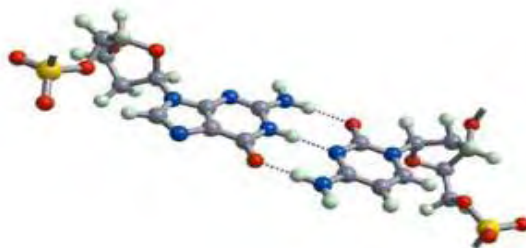


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ- ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

**«4'-ΚΥΑΝΟ ΚΑΙ 4'-ΔΕΟΞΥ-ΚΥΑΝΟ ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ
ΩΣ ΝΕΟΙ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ»**



ΚΑΖΑΛΗ ΘΩΜΑΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«4'-Κυανο και 4'-δεοξυ-κυανο πυρανουκλεοζίτες ως νέοι
κυτταροτοξικοί παράγοντες: σύνθεση και βιολογική αποτίμηση»

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

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

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Δημητρίου Κομιώτη.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κομιώτη, για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την εκπόνησή της.

Τις θερμές ευχαριστίες μου οφείλω στη διδάσκουσα κα. Στυλιανή Μαντά για τη συνεχή παρακολούθηση και υποστήριξή της. Επίσης θα ήθελα να εκφράσω στον υποψήφιο διδάκτορα Χρήστο Κυρίτη, την εκτίμησή μου καθώς και ιδιαίτερες ευχαριστίες για την άψογη συνεργασία μας καθ' όλη την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Η εμπειρία του με βοήθησε ουσιαστικά στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους.

Τέλος, δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την θερμή υποδοχή τους και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται ολοένα και περισσότερο η χρήση φαρμάκων για την θεραπεία ασθενειών, τα οποία στη συντριπτική τους πλειοψηφία είναι ανάλογα φυσικών νουκλεοζιτών. Οι ενώσεις αυτές έχει αποδειχθεί πως εμφανίζουν σημαντική αντικαρκινική, αντιική καθώς και αντιβιοτική δράση. Το γεγονός αυτό οδήγησε στη σύνθεση νέων τροποποιημένων νουκλεοζιτών, οι οποίοι αναμένεται να διαδραματίσουν καθοριστικό ρόλο σε πολλές θεραπευτικές αγωγές. Μια σημαντική κατηγορία αυτών των ενώσεων είναι οι νουκλεοζίτες που φέρουν δομικές τροποποιήσεις στο τμήμα του σακχάρου. Πολλά ανάλογα παράγωγα έχουν συντεθεί και έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές βιολογικές τους ιδιότητες. Στόχος λοιπόν της παρούσας έρευνας αποτελεί η σύνθεση νέων τροποποιημένων 4' κυανοπυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων καθώς και η βιολογική αποτίμηση τους.

ABSTRACT

In recent years is growing the use of drugs to treat diseases, which in majority are known as natural nucleoside analogues. These compounds have shown to exhibit significant anticancer, antiviral and antibiotic action. This fact led to the synthesis of new modified nucleosides which are expected to play a key role in many treatments. An important class of these compounds is nucleosides with marked structural variations in the sugar moiety. Many analogous derivatives have been synthesized and evaluated for their potential biological properties. Thus, aim of this research is the synthesis and biological evaluation of new 4' cyano pyranonucleoside analogues.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατάνθρακες-Σάκχαρα.....	9
1.2 Σημασία εναντιομέρειας.....	10
1.3 Απεικόνιση μονοσακχαριτών.....	12
1.4 Νουκλεοζίτες.....	15
1.5 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών.....	17
1.6 Νουκλεοζίτες με αντιική δράση.....	19
1.7 Νουκλεοζίτες με αντικαρκινική δράση.....	21
1.8 Κύανο φουρανονουκλεοζίτες.....	22
1.9 Πυρανονουκλεοζίτες.....	23
1.10 Στόχος-σκοπός μελέτης.....	28

2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων.....	29
2.2 Χρωματογραφία χάρτου/λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography).....	30
2.3 Χρωματογραφία στήλης.....	30
2.4 Ξήρανση διαλυτών.....	31
2.5 Ταυτοποίηση ενώσεων.....	31

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού.....	32
3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης.....	33
3.3 Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-κυανο-ταλοπυρανοζυλο) 5- φθοροουρακίλης.....	36
3.3.1 Σύνθεση της 1,2,3,4,6-πεντα-O-ακετυλο-D-μαννοπυρανόζη (2).....	36
3.3.2 Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (3α).....	37
3.3.3 Σύνθεση της 1-(α-D-μαννοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης (4α).....	38
3.3.4 Σύνθεση της 1-(2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-μαννοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης (5α).....	39
3.3.5 Σύνθεση της 1-(2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-6'-O-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης (6α).....	40
3.3.6 Σύνθεση της 1-(2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-6'-O-τριτυλο-α-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-4'-ουλοζο) 5-φθοροουρακίλης (7α).....	41
3.3.7 Σύνθεση της 1-(4'-κυανο-2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-6'-O-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (8α).....	42

3.3.8	Σύνθεση της 1-(4'-κυανο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης(9α).....	43
3.3.9	Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-Ο-τριτυλο-4'-Ο-φαινοξυθειοκαρβονυλο-α-Dμαννοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (10α).....	44
3.3.10	Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-ταλοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης (11α).....	45
3.3.11	Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-κυανοταλοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης (12α).....	46
3.4	Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-κυανο-ταλοπυρανόζυλο) θυμίνης.....	47
3.4.1	Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)θυμίνης(3b)	47
3.4.2	Σύνθεση της 1-(α-D-μαννοπυρανοζυλο)θυμίνης(4b).....	48
3.4.3	Σύνθεση της 1(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-μαννοπυρανοζυλο) θυμίνης(5b).....	49
3.4.4	Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)θυμίνης (6b).....	50
3.4.5	Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-λυσό-εξωπυρανοζυλο-4'-ουλοζο) θυμίνης (7b).....	51
3.4.6	Σύνθεση της 1-(4'-κυανο-2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο) θυμίνης (8b).....	52
3.4.7	Σύνθεση της 1-(4'-κυανο-α-D-μαννοπυρανοζυλ) θυμίνης (9b).....	53
3.4.8	Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-Ο-τριτυλο-4'-Ο-φαινοξυθειοκαρβονυλο-α-Dμαννοπυρανοζυλο)θυμίνης (10b).....	54
3.4.9	Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-ταλοπυρανοζυλο) θυμίνης (11b).....	55
3.4.10	Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-κυανοταλοπυρανοζυλο) θυμίνης (12b).....	56
4.	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR	57
5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

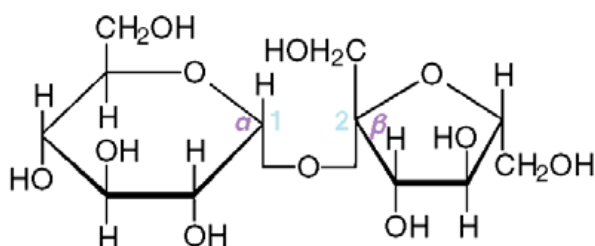
1.1 Υδατάνθρακες-Σάκχαρα

Οι υδατάνθρακες ή σάκχαρα επιτελούν σπουδαίο βιολογικό ρόλο εφόσον αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας όλων των ζωντανών οργανισμών. Επιπλέον είναι δομικά συστατικά των κυττάρων στους φυτικούς οργανισμούς καθώς προσφέρουν εξωτερική προστασία όπως η κυτταρίνη που αποτελεί το στήριγμα ολόκληρου του φυτικού βασιλείου. Οι υδατάνθρακες αποτελούν συστατικά σύνθετων μορίων όπως οι γλυκοπρωτεΐνες, τα γλυκολιπίδια και τα νουκλειικά οξέα τα οποία συμμετέχουν σε ζωτικές λειτουργίες των οργανισμών.

Από χημική άποψη οι υδατάνθρακες είναι πολύ-υδροξυλιωμένα παράγωγα των αλδευδών ή κετονών με γενικό μοριακό τύπο $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες υδατανθράκων που διακρίνονται με βάση το μέγεθος τους σε μονοσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. (Mc Murry J. 2000)

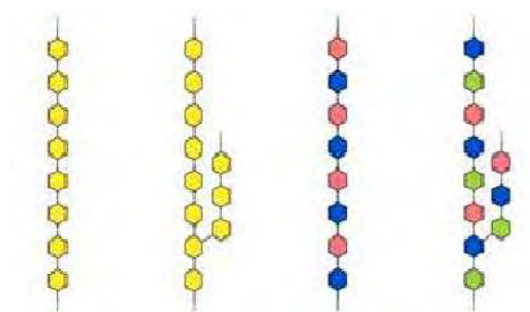
Οι μονοσακχαρίτες αποτελούνται από μια πολύ-υδροξυλιωμένη αλδευδική ή κετονική ομάδα. Στη φύση ο πιο άφθονος μονοσακχαρίτης είναι η D- γλυκόζη ή δεξτρόζη η οποία έχει έξι άτομα άνθρακα. Αν η καρβονυλομάδα βρίσκεται στο άκρο της αλυσίδας ο μονοσακχαρίτης είναι μια αλδόζη, ενώ αν βρίσκεται σε οποιαδήποτε άλλη θέση ο μονοσακχαρίτης είναι μια κετόζη.

Οι ολιγοσακχαρίτες αποτελούνται από βραχείες αλυσίδες μονοσακχαριτών οι οποίοι συνδέονται με γλυκοζιτικούς δεσμούς. Πιο άφθονοι είναι οι δισακχαρίτες όπως για παράδειγμα η σακχαρόζη η οποία αποτελείται από ισομοριακό μίγμα D-γλυκόζης και D-φρουκτόζης. **(Εικόνα 1)**



Εικόνα1. Σακχαρόζη : α-D- γλυκοπυρανόζυλο(1-2)-β-D- φρουκτοφουρανόζη

Οι πολυσακχαρίτες είναι υδατανθρακικά πολυμερή που περιέχουν πάνω από 20 μονοσακχαρίτες όπως για παράδειγμα η κυτταρίνη η οποία αποτελείται από γραμμικές αλυσίδες. Αντίθετα το γλυκογόνο αποτελείται από διακλαδισμένες αλυσίδες (**Εικόνα 2**). Τόσο το γλυκογόνο όσο και η κυτταρίνη περιέχουν μονάδες D-γλυκόζης αλλά διαφέρουν ως προς τον τύπο του γλυκοζιτικού δεσμού και ως εκ τούτου έχουν διαφορετικές ιδιότητες καθώς και βιολογικούς ρόλους. (Lehninger 2007)



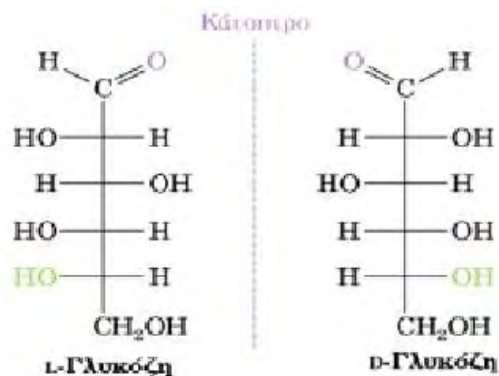
Εικόνα 2: Ομοπολυσακχαρίτες και ετεροπολυσακχαρίτες

1.2 Σημασία εναντιομέρειας

Οι περισσότεροι μονοσακχαρίτες έχουν πάνω από δυο ασύμμετρα άτομα άνθρακα, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται με διάφορες στερεοϊσομερείς μορφές οι οποίες αποδίδονται με τις προβολές Fisher. Στις προβολές αυτές τα ασύμμετρα άτομα άνθρακα τοποθετούνται σε κατακόρυφη σειρά ώστε η καρβονυλική ομάδα να βρίσκεται στην κορυφή της προβολής. Η διάταξη του υδροξυλίου του πιο απομακρυσμένου από την καρβονυλική ομάδα ασύμμετρου ατόμου άνθρακα, καθορίζει το είδος της εναντιομέρειας του σακχάρου D ή L. (**Εικόνα 3**)

Το φαινόμενο της εναντιομέρειας παίζει καθοριστικό ρόλο στη συμπεριφορά του μορίου. Οι εναντιομερείς μορφές (οπτικοί αντίποδες) έχουν τις ίδιες φυσικές ιδιότητες, αλλά διαφέρουν ως προς τη φορά στροφής του πολωμένου φωτός. Ο αντίποδας που στρέφει το πολωμένο φως προς τα δεξιά συμβολίζεται με (+) ενώ ο αντίποδας που στρέφει το πολωμένο φως προς τα αριστερά συμβολίζεται με (-). Στη

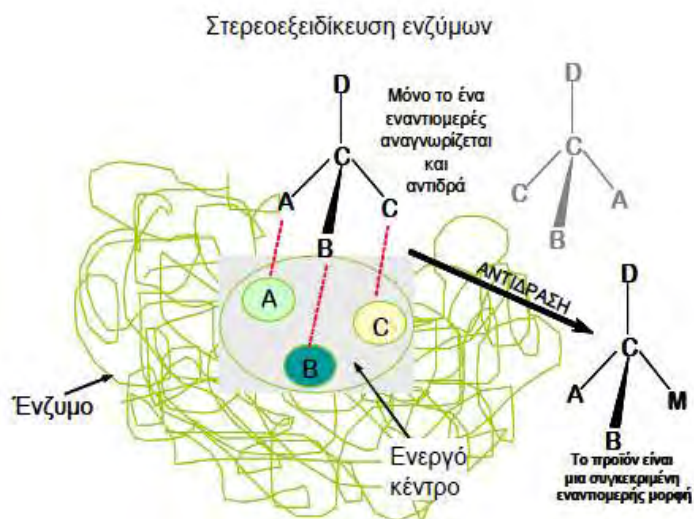
φύση συνήθως υπάρχει μια από τις δυο εναντιομερείς μορφές μιας ένωσης. Έτσι τα αμινοξέα υπάρχουν κυρίως στην L μορφή, ενώ τα σάκχαρα είναι βασικά D διαμόρφωσης. Αυτό το γεγονός αποδίδεται στο ότι η σύνθεση των οργανικών μορίων



Εικόνα 3: L και D απεικόνιση της γλυκόζης

στους ζωντανούς οργανισμούς καταλύονται από ένζυμα τα οποία παρουσιάζουν υψηλή στερεοεξειδίκευση. Αυτό σημαίνει ότι μόνο μια από τις δυο εναντιομερείς μορφές μια ουσίας μπορεί να αναγνωριστεί και να αντιδράσει με το ένζυμο. Επιπλέον το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης είναι ένα από τα δυο εναντιομερή. (Εικόνα 4)

Επίσης, η βιολογική δραστηριότητα ενός μορίου στον οργανισμό εξαρτάται από τη δομή D ή L αυτού. Αυτό ερμηνεύεται από το γεγονός ότι για να ασκήσει τη βιολογική του δράση το μόριο θα πρέπει να διαθέτει την κατάλληλη τρισδιάστατη διαμόρφωση προκειμένου να αναγνωριστεί από τον υποδοχέα του οργανισμού.

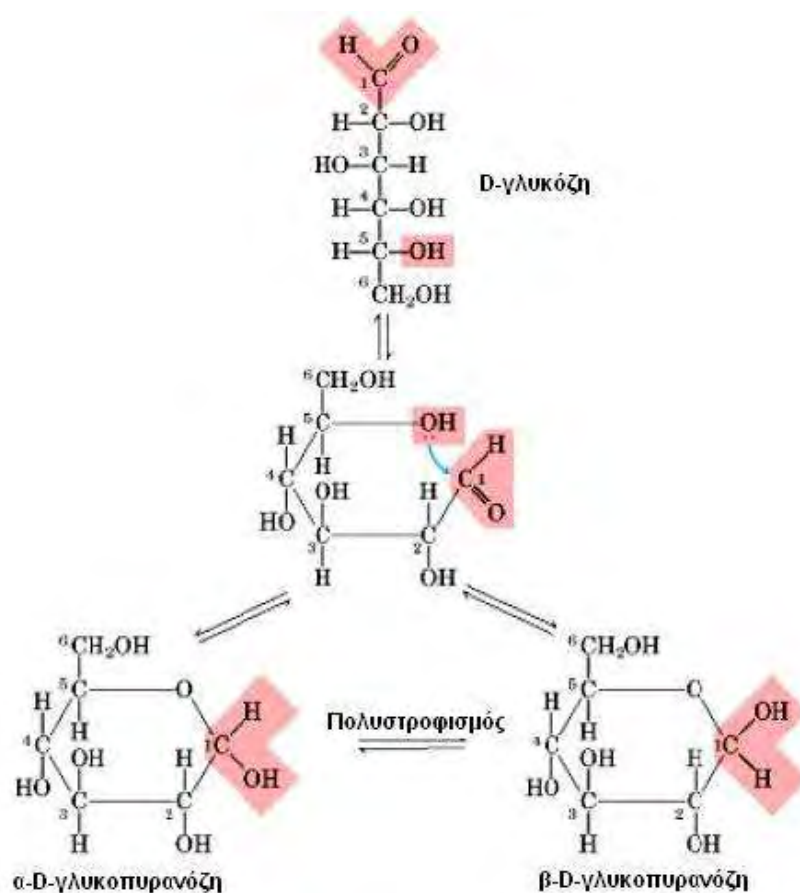


Εικόνα 4: Στερεοεξειδίκευση ενζύμων

1.3 Απεικόνιση μονοσακχαριτών

Οι πεντόζες και οι εξόζες έχουν την ιδιότητα να κυκλοποιούνται σε υδατικά διαλύματα. Στα σάκχαρα αυτά αντιδρά το αλδευδικό ή το κετονικό καρβονύλιο με το υδροξύλιο του τελευταίου ασύμμετρου ατόμου άνθρακα με αποτέλεσμα να δημιουργούνται ετεροκυκλικοί δακτύλιοι που ονομάζονται ημιακετάλες. Κατά την κυκλοποίηση υπάρχει δυνατότητα σχηματισμού δυο ανωμερών (διαστερεομερή).

Για την αναπαράσταση αυτών των μορφών χρησιμοποιούνται οι προβολές Haworth. Η μορφή στην οποία το υδροξύλιο του ανωμερικού άνθρακα βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου ονομάζεται α-, ενώ στη β- μορφή το υδροξύλιο βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου. Οι τρεις μορφές βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους και αλληλομετατρέπονται σε υδατικό διάλυμα με μια διεργασία που καλείται πολυστροφισμός. (Εικόνα 5)

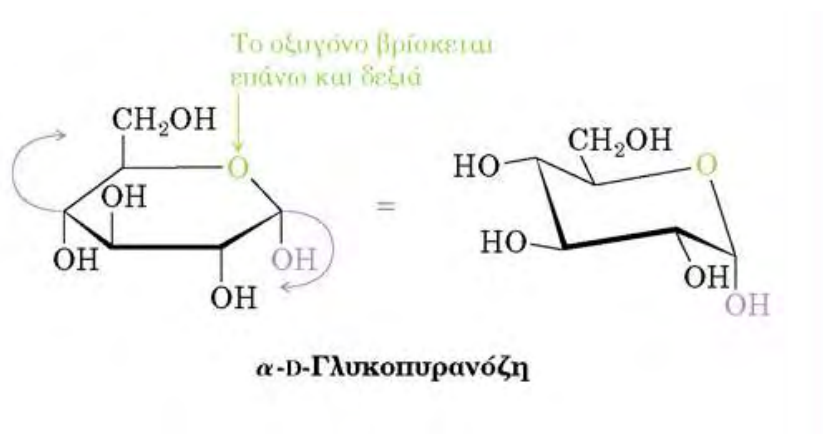


Εικόνα 5: Σχηματισμός ανωμερών της D-γλυκόζης(α-D και β-D- γλυκοκυρανόζη)

Για το σχεδιασμό μιας προβολής κατά Haworth πρέπει να λάβουμε υπόψη τα παρακάτω:

- Ο ημιακεταλικός δακτύλιος σχεδιάζεται με επίπεδη μορφή, στην οποία το άτομο του ημιακεταλικού οξυγόνου τοποθετείται πίσω όπως βλέπουμε το δακτύλιο να τέμνει το επίπεδο της σελίδας.
- Η ακραία ομάδα $-CH_2OH$ κατευθύνεται προς τα πάνω στα D σάκχαρα ενώ στα L σάκχαρα τοποθετείται προς τα κάτω.
- Τα $-OH$ τα οποία κατευθύνονται προς δεξιά σε μια προβολή κατά Fisher, τοποθετούνται προς τα κάτω σε μια προβολή κατά Haworth. Αντίθετα τα $-OH$ που βρίσκονται αριστερά στην προβολή Fisher, κατευθύνονται προς τα πάνω στην προβολή Haworth.

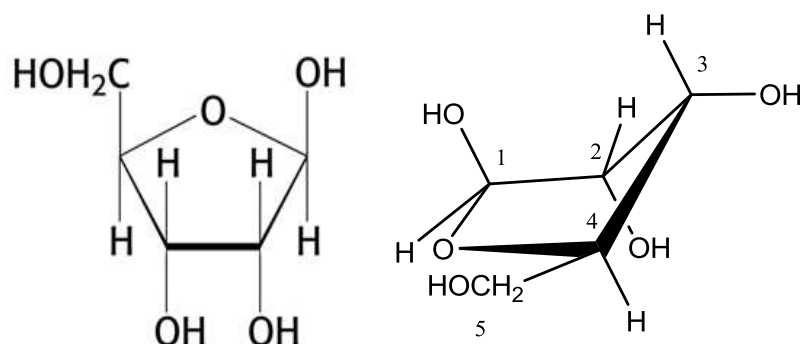
Ο εξαμελής δακτύλιος που προκύπτει κατά την κυκλοποίηση των αλδοεξοζών, μοιάζει με το δακτύλιο του πυρανίου και οι αντίστοιχοι υδατάνθρακες ονομάζονται πυρανόζες. Η προβολή Haworth δεν αποδίδει την πραγματική τρισδιάστατη δομή των δακτυλίων της πυρανόζης η οποία αποδίδεται με τη μορφή ανάκλιτρου (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6: α-D- γλυκοπυρανόζη, δομή Haworth και δομή ανάκλιτρου

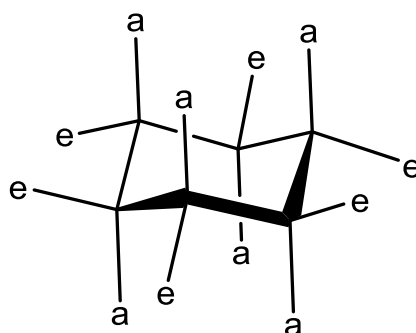
Κατά την κυκλοποίηση των αλδοπεντοζών προκύπτει πενταμελής δακτύλιος ο οποίος μοιάζει με το φουράνιο και τα αντίστοιχα σάκχαρα ονομάζονται φουρανόζες. Ο πενταμελής δακτύλιος της φουρανόζης δεν είναι επίπεδος. Οι δακτύλιοι

φουρανόζης μπορούν να είναι πτυχωμένοι έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού. Αυτή η διαμόρφωση καλείται μορφή φακέλου γιατί μοιάζει με ανοιχτό φάκελο με το πίσω μέρος ανασηκωμένο. (Εικόνα 7)



Εικόνα 7: β-D- ριβοφουρανόζη, δομή Haworth και δομή φακέλου

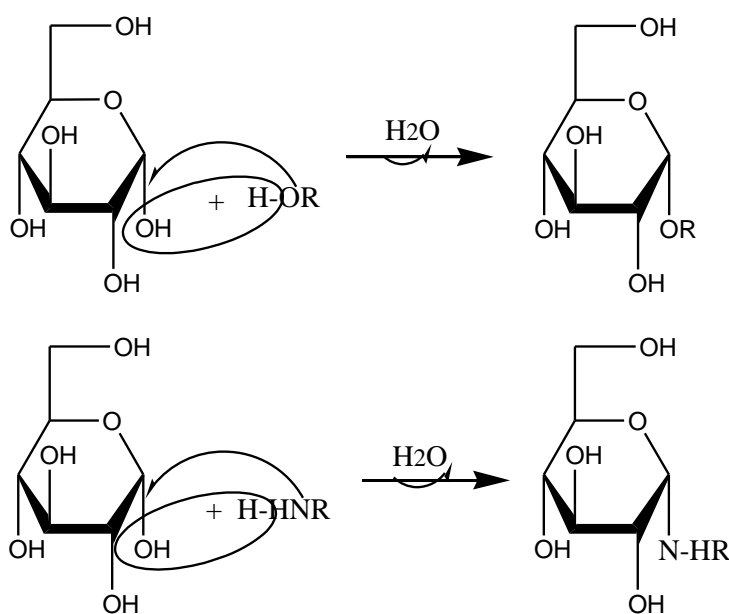
Γενικά στη διαμόρφωση ανάκλιντρου οι δεσμοί είτε είναι αξονικοί, κατακόρυφοι από το επίπεδο του δακτυλίου, είτε ισημερινοί, με μικρή κλίση προς το επίπεδο του δακτυλίου (**Εικόνα 8**). Για να μετατραπεί μια προβολή Haworth σε ανάκλιντρο, θα πρέπει η δεξιά πλευρά του μορίου να στραφεί προς τα κάτω και η αριστερή προς τα πάνω. Επιπλέον τα OH που είναι προς τα κάτω τοποθετούνται σε θέσεις κάτω από το επίπεδο του ανάκλιντρου, ενώ τα OH που είναι προς τα πάνω τοποθετούνται σε θέσεις πάνω από το επίπεδο του ανάκλιντρου. Τέλος η ογκώδης υδροξυμέθυλομάδα τοποθετείται σε ισημερινή θέση, ενώ κατά κανόνα ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ότι στην αξονική θέση.



Εικόνα 8: Μορφή ανάκλιντρου πυρανόζης (e: ισημερινός υποκαταστάτης, a: αξονικός υποκαταστάτης)

1.4 Νουκλεοζίτες

Οι γλυκοζίτες προκύπτουν από την αντίδραση του ανωμερή άνθρακα του σακχάρου με το υδροξύλιο μιας άλλης ένωσης. Ο δεσμός που αναπτύσσεται μεταξύ του άνθρακα αυτού και του οξυγόνου της άλλης ένωσης ονομάζεται Ο-γλυκοζιτικός δεσμός. Ο ανωμερής άνθρακας μπορεί επίσης να συνδεθεί με το άζωτο μιας αμίνης με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός Ν-γλυκοζιτικού δεσμού. **(Εικόνα 9)**

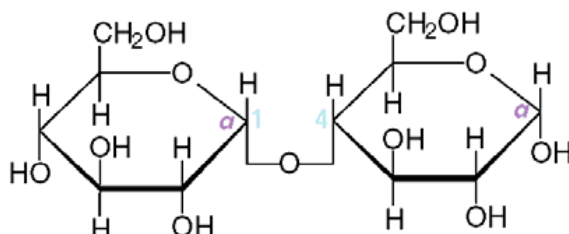


Εικόνα 9: Σχηματισμός Ο- και Ν- γλυκοζιτικού δεσμού

Για το χαρακτηρισμό του γλυκοζιτικού δεσμού είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της θέσης των υδροξυλομάδων που συμμετέχουν στο δεσμό καθώς και το είδος της ανωμέρειας του σακχάρου. Για παράδειγμα η μαλτόζη αποτελείται από δυο μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα με (1-4) γλυκοζιτικό δεσμό. **(Εικόνα 10)**

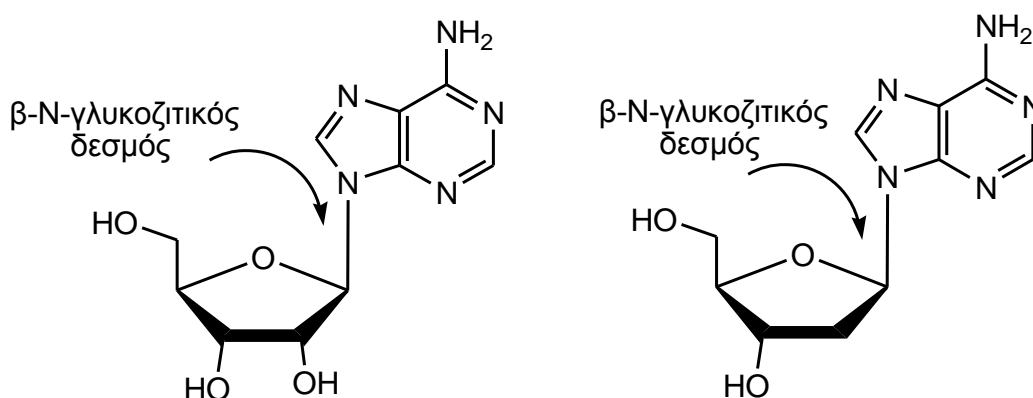
Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στην φύση διότι αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Πιο συγκεκριμένα, ο νουκλεοζίτης προκύπτει από την ένωση μιας πουρινικής (αδενίνη, γουανίνη) ή

πυριμιδικής (θυμίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη) βάσης με τον C-1 μιας πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό .



Εικόνα 10: Μαλτόζη: α-D- γλυκοπυρανόζυλο(1-4)-α-D- γλυκοπυρανόζη

Αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης ονομάζεται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης αντίστοιχα και χαρακτηρίζεται ως β στερεοδιάταξης γιατί η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου. (Berg J.M. et al, 2001). Οι τέσσερις μονάδες νουκλεοζιτών στο RNA ονομάζονται αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη και ουριδίνη, ενώ στο DNA ονομάζονται δεοξαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυκυτιδίνη και θυμιδίνη. (**Εικόνα 11**).



Εικόνα 11: Αδενοσίνη και 2'-δεοξαδενοσίνη αντίστοιχα

Σχετικά με τις ιδιότητές τους, ορισμένοι νουκλεοζίτες έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν αντικαρκινικές και κυτταροστατικές ιδιότητες γι αυτό και αποτελούν

αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Komiotis *et al*, 2008). Επίσης, έχει διαπιστωθεί και η ικανότητα τους να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών (Lui V. *et al*, 2010; Bhat U. G. *et al*, 2010). Επιπλέον, επηρεάζουν τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς του πολλαπλασιασμού των ιών και για το λόγο αυτό παρέχουν ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων. Τέλος, ορισμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν επιδείξει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Spanou C. *et al*, 2007), καθώς μπορούν να επιβραδύνουν ή να αποτρέψουν την οξειδωση ενός υποστρώματος ενώ βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το υπόστρωμα. Ανήκουν δηλαδή στην κατηγορία των αντιοξειδωτικών ουσιών (Halliwell B. 2001).

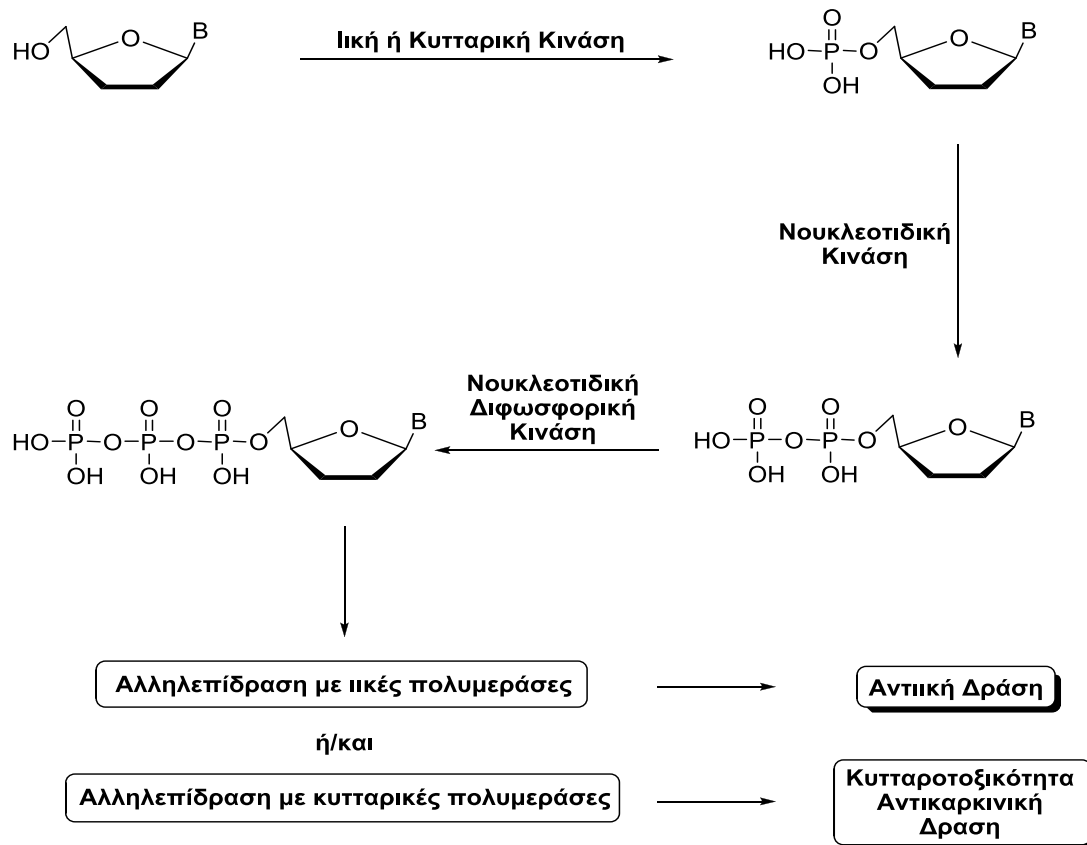
1.5 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Γενικά, ο τρόπος δράσης των φαρμάκων βασίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό στόχο, ο οποίος μπορεί να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη, όπως ένας υποδοχέας, ένας δίαυλος ιόντων, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφορέας, είτε τα νουκλεϊνικά οξέα. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων που διαθέτουν αντιική ή αντικαρκινική δράση, τα οποία λόγω της δυνατότητας μεταφοράς τους εντός των κυττάρων με παθητική διάχυση είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία πολλών ασθενειών (Zhou *et al*. 2004).

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών αποτελούν στην πραγματικότητα ανενεργά προφάρμακα, τα οποία ενδοκυτταρικά πρέπει να τροποποιηθούν ώστε να μπορέσουν να δράσουν. Η διαδικασία αυτή συνίσταται στη φωσφορυλίωσή τους από τις κυτταρικές ή ιικές κινάσες (Arner and Eriksson 1995). Αφού φωσφορυλιωθούν προς τις τριφωσφορικές τους δομές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA (**Εικόνα 12**).

Ένας κοινός μηχανισμός αντιικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωσή τους στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της. Οι κυτταρικές πολυμεράσες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του

επόμενου νουκλεοτιδίου με ταυτόχρονη απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων (Lewin 2003, Burns et al. 2005). Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου

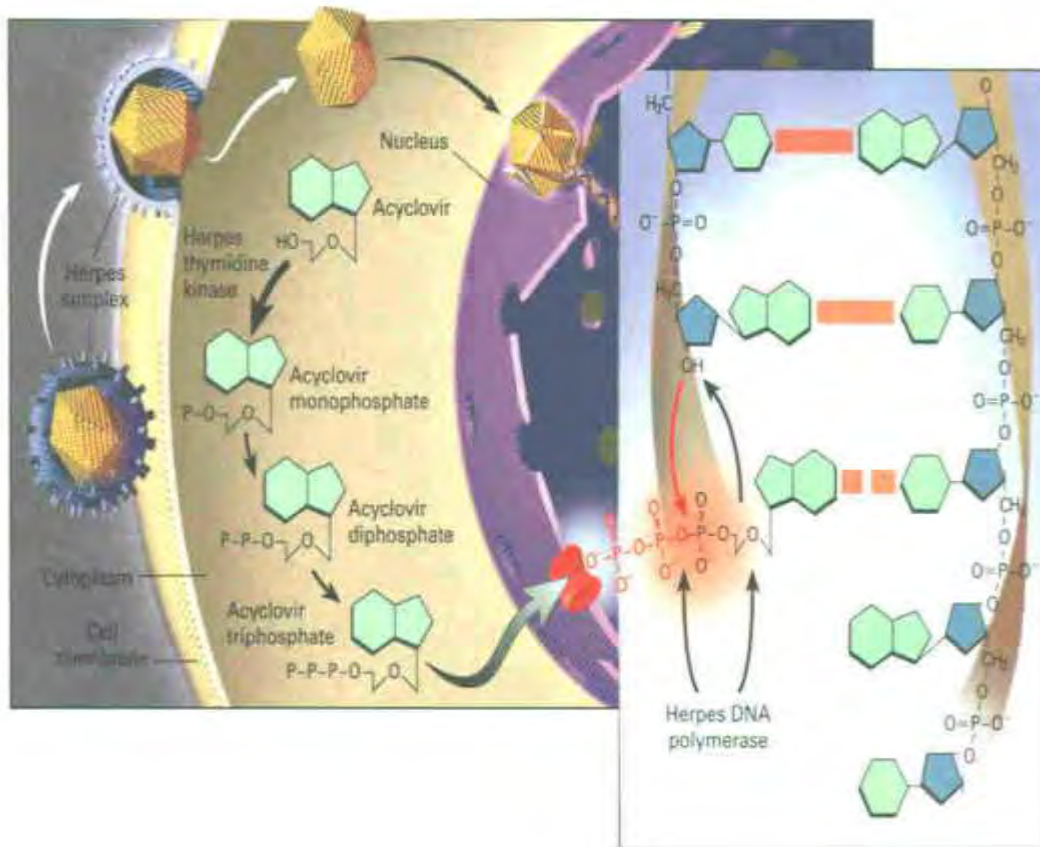


Εικόνα 12: Φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιικές κινάσες

νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας. (Εικόνα 13). 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 εκλεκτικότητά τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

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).

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 (Sien et al. 1969) και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης (Ahn et al. 2000).

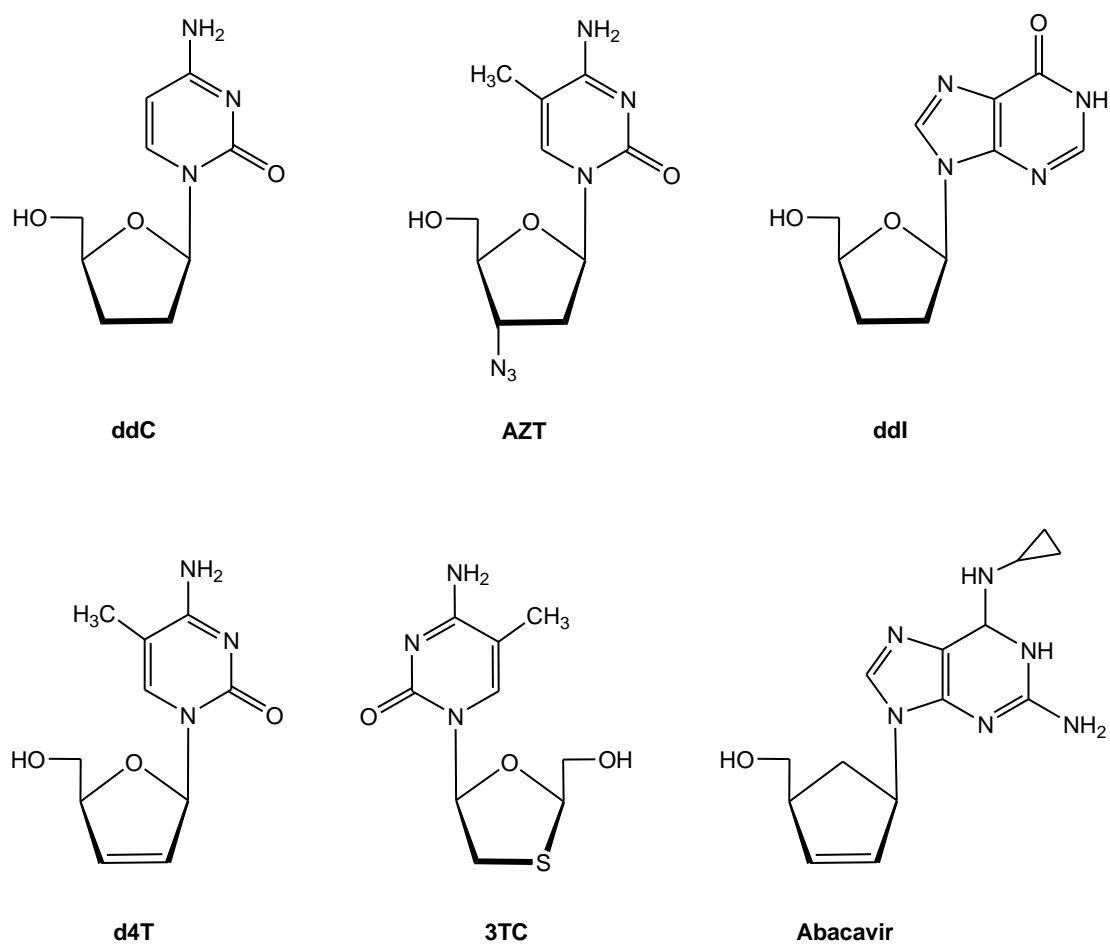


Εικόνα 13: Φωσφορυλίωση νουκλεοζίτη (Acyclovir) και ενσωμάτωσή του στο DNA του κυττάρου

1.6 Νουκλεοζίτες με αντιική δράση

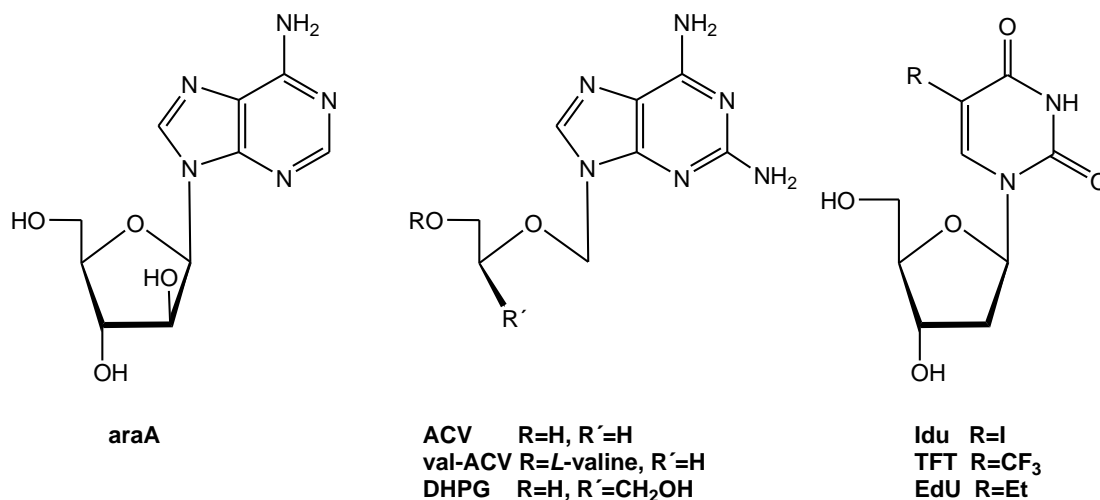
Όπως προαναφέρθηκε, οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους, παρεμβαλλόμενοι στη σύνθεση του DNA και του RNA, μπορούν να επηρεάσουν τη σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων των καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον 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), Lamivudine (3TC) και Abacavir και (Εικόνα 14). 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 14: Νουκλεοζιτικά ανάλογα για τη θεραπεία του HIV

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

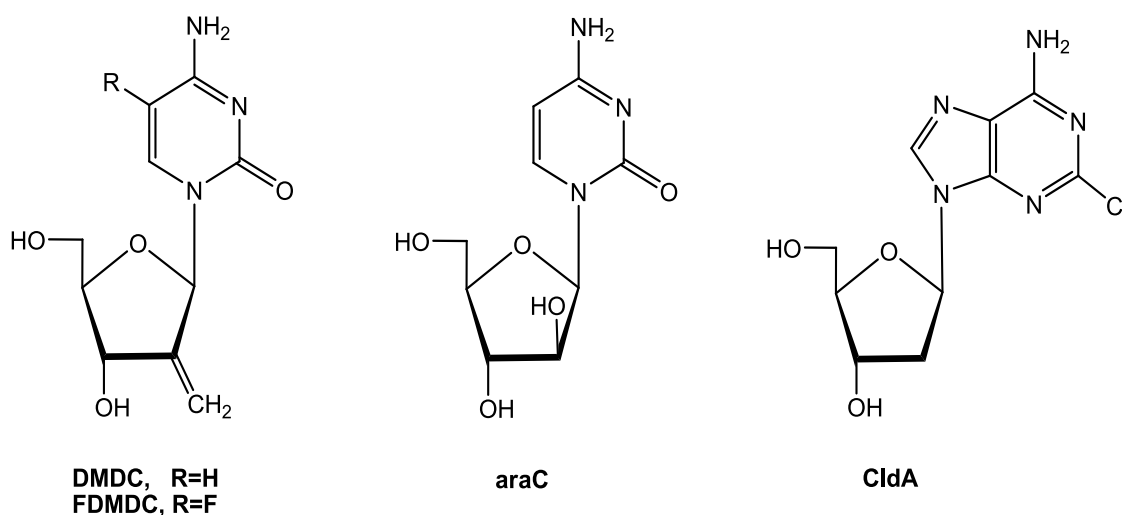


Εικόνα 15: Νουκλεοζιτικά ανάλογα για τη θεραπεία του CMV

1.7 Νουκλεοζίτες με αντικαρκινική δράση

Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία διαθέτουν αφενός αυξημένη δραστηριότητα, αφετέρου μειωμένη τοξικότητα. Παρουσιάζουν δε, 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'-δεσοξαδενοσίνη (CldA) (Εικόνα 16) 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

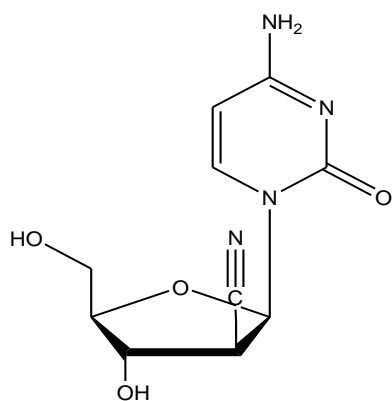
Sasaki 2004). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).



Εικόνα 16: Νουκλεοζιτικά ανάλογα με κυτταροστατικές ιδιότητες

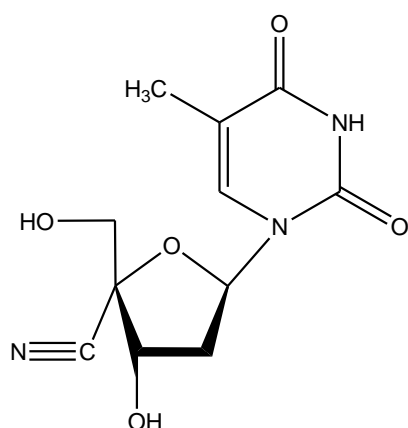
1.8 Κυανο-φουρανονουκλεοζίτες

Γενικά η κυανο ομάδα εμφανίζει ελάχιστες στερεοχημικές παρεμποδίσεις εξαιτίας του μικρού της μεγέθους καθώς και υψηλή ηλεκτραρνητικότητα, γεγονός που μπορεί να προσδώσει ιδιαίτερες χημικές ιδιότητες στο μόριο και να αλλάξει τη βιολογική του δραστηριότητα. Ως εκ τούτου στο πεδίο έρευνας των φούρανο-νουκλεοζιτών μελετήθηκε η εισαγωγή της κυανο ομάδα σε διάφορες θέσεις του σακχάρου για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών παραγόντων (O-Yang *et al.* 1992, Satoru *et al.* 2003). Ορόσημο στη μελέτη των κυανοφουρανονουκλεοζιτών αποτελεί η ανακάλυψη του **CNDAC (Εικόνα 17)** (2'-C-κυανο-2'-δεοξυ-1-β-D-αραβινοφουρανοσυλοκυτοσίνη) (Motohiro Tanaka *et al.* 1992), το οποίο αποτελεί σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα έναντι μεγάλου φάσματος κακοήθων όγκων, όπως αυτού του πνεύμονα και του στομάχου.



Εικόνα 17: Χημική δομή του CNDA

Επιπλέον, διάφοροι κυανοφουρανονουκλεοζίτες έχουν αναφερθεί σαν ενδιαφέροντες αντιικοί παράγοντες, όπως το 4'-κυανο ανάλογο της θυμιδίνης (**Εικόνα 18**) που παρουσιάζει ισχυρή αντι- HIV δράση (O-Yang et al. 1992).



Εικόνα 18: Χημική δομή της 4'-κυανο θυμιδίνης

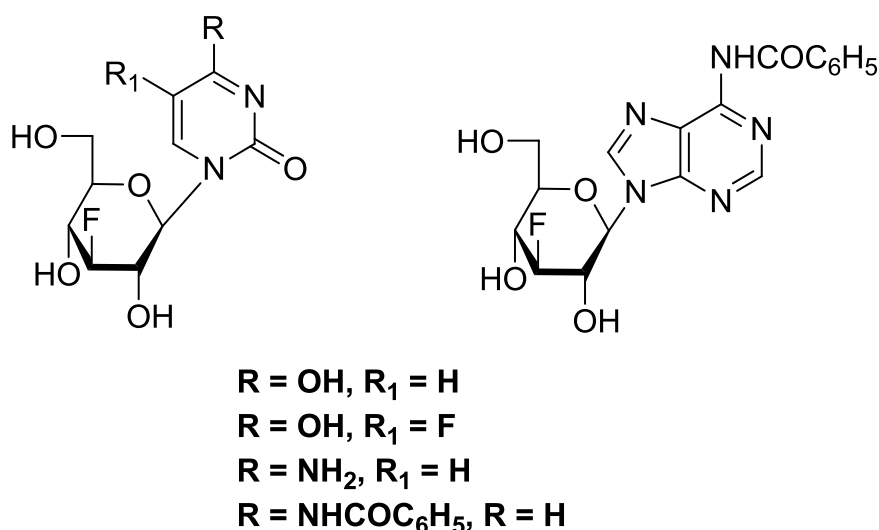
1.9 Πυρανονουκλεοζίτες

Όπως προαναφέρθηκε, οι φουρανονουκλεοζίτες γενικά παρουσίασαν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, ωστόσο εμφάνισαν περιορισμένη δράση καθώς υφίστανται, σχετικά εύκολα, χημική ή ενζυμική απενεργοποίηση. Επιπλέον, δεν μεταβολίζονται επαρκώς προς τις ενεργές τριφωσφορικές τους δομές, έχουν μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, παρουσιάζουν αυξημένη τοξικότητα ενώ ακόμη ευθύνονται για την εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιικών στελεχών και κακοηθών όγκων. Ως εκ τούτου,

το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε προς μια άλλη κατηγορία νουκλεοζιτών, αυτή των πυρανονουκλεοζιτών η οποία θεωρήθηκε πιο ελπιδοφόρα.

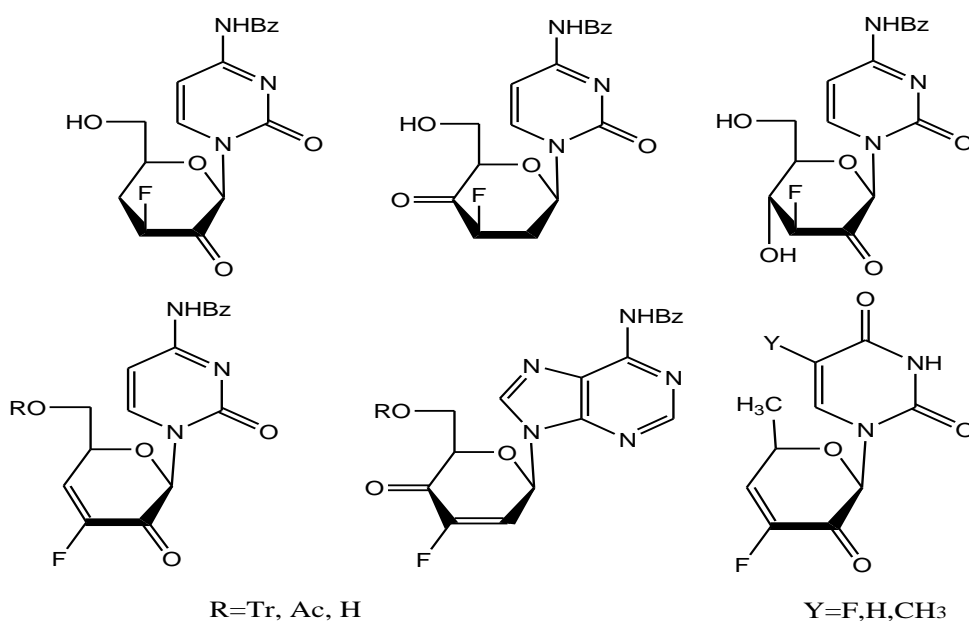
Έτσι λοιπόν, τα τελευταία χρόνια, συντέθηκαν νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους και ελέγχθηκαν για τις πιθανές αντιυικές (Ostrowski et al. 1998), αντικαρκινικές (Malsen et al. 2004), αντιοξειδωτικές (Spanou et al. 2007) καθώς και αντιβιοτικές τους ιδιότητες (Haouz et al. 2003). Μάλιστα νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη εμφάνισαν σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως αντίσταση στην υδρόλυση, καθώς το σπάσιμο του γλυκοζιτικού δεσμού είναι ένα συνηθισμένο μονοπάτι αποικοδόμησης των νουκλεοζιτικών, ιδιαίτερα των 2',3'-διδεοξυνουκλεοζιτών. Τα πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα διαθέτουν λοιπόν αυξημένη σταθερότητα, μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής, άρα και εν δυνάμει περισσότερο χρόνο δράσης.

Στο εργαστήριο 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 19**).



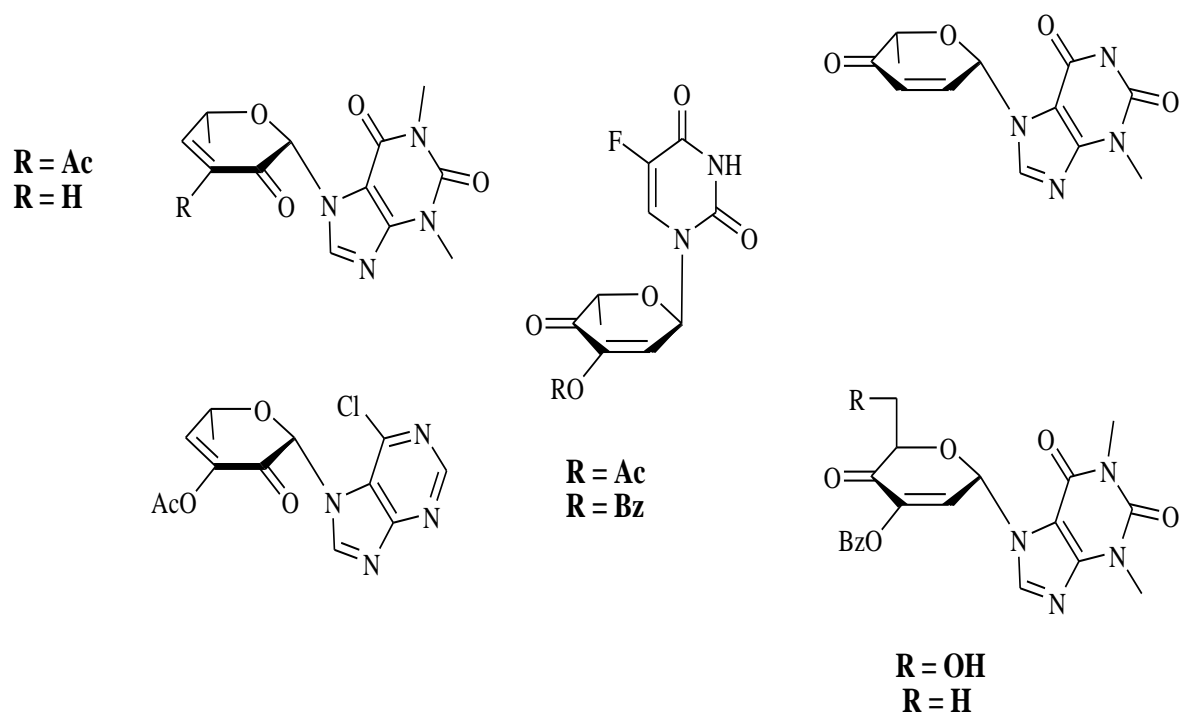
Εικόνα 19: Χημική δομή φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών

Επιπλέον έχουν αξιολογηθεί νέες σειρές νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο και πιο συγκεκριμένα οι φθοροκετο και ακόρεστοι φθοροκετο -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 20)**.



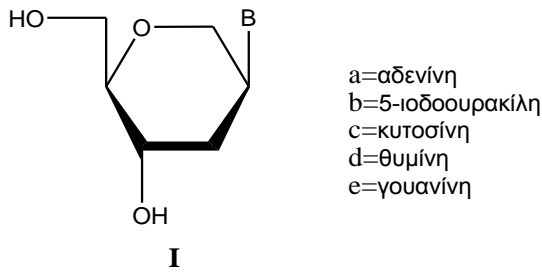
Εικόνα 20: Χημική δομή φθοροκέτο και ακόρεστων φθοροκέτο-πυρανονουκλεοζιτών

Επιπρόσθετα, ακόρεστα κετο-πυρανονουκλεοζιτικά 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). **(Εικόνα 21)**.



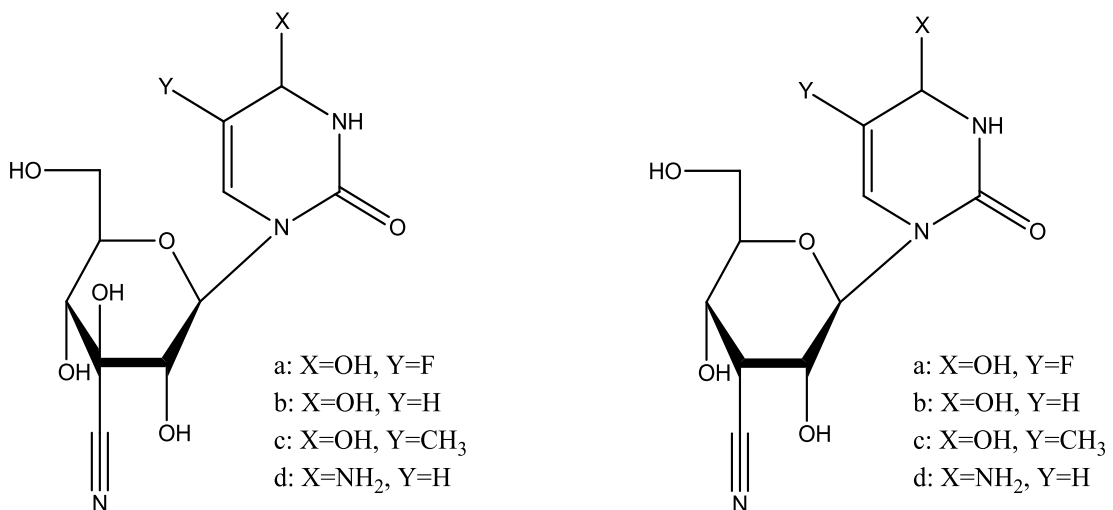
Εικόνα 21: Ακόρεστα κετο-πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα

Μία ακόμη σημαντική κατηγορία πυρανονουκλεοζιτών και ειδικότερα με τροποποιημένο εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο, είναι οι δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες. 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. Αυτή η κατηγορία νουκλεοζιτικών αναλόγων αποδείχθηκε ότι παρουσιάζει ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα οι 6'-δεοξυ-κετονουκλεοζίτες παρουσίασαν υψηλή αντικαρκινική δράση καθώς και αντιβιοτικές ιδιότητες. Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως ορισμένοι πουρινικοί και πυριμιδινικοί 2'-δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες εμφανίζουν σπουδαία αντική, καθώς και η αντιλευχαιμική δράση. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί και η αντική δράση των 1,5-ανδροεξιτολο-νουκλεοζιτών έναντι του ιού του απλού έρπητα τύπου 1 και τύπου 2, του κυτταρομεγαλοϊού καθώς και του ιού έρπητα ζωστήρα (**Εικόνα 22**) (Verheggen I. et al, 1993, Verheggen I. et al, 1995).



Εικόνα 22 : Χημική δομή δέοξυ-πυρανονουκλεοζιτών

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσίασε πρόσφατα μια νέα τάξη 3'-κυανο- και 3'-δεοξυ-κυανο πυρανονουκλεοζιτών (Kiritsis et al., 2011). Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες αξιολογήθηκαν για την αντιική τους δράση 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 23**).



Εικόνα 23: 3' κύανο-νουκλεοζίτες

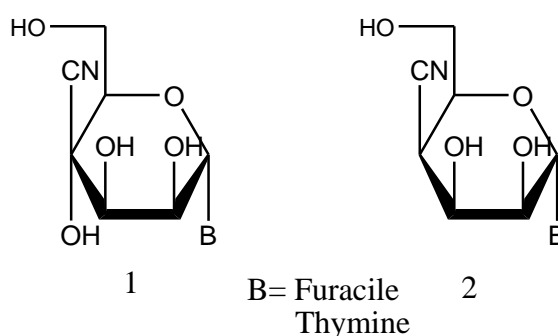
1.10 Στόχος -σκοπός μελέτης

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, οι νουκλεοζίτες αποτελούμενοι από μονοσακχαρίτες με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο συνδεδεμένοι με κάποια ετεροκυκλική βάση παρουσιάζουν ισχυρή βιολογική δράση. Κατά συνέπεια, σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η σύνθεση και η μελέτη τροποποιημένων νουκλεοζιτών με σκοπό την εύρεση νέων αντικαρκινικών, αντικών φαρμάκων με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα από τα μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενα.

Πιο συγκεκριμένα, με βάση τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία έχει διαπιστωθεί ότι οι φουρανονουκλεοζίτες που φέρουν διακλαδισμένη κυανο αλυσίδα στο υδατανθρακικό τους τμήμα εμφανίζουν εξαιρετικό φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Κάποιες φορές μάλιστα η δράση τους είναι καλύτερη από τα φάρμακα που μέχρι πρότινος χρησιμοποιούνταν.

Επιπλέον πρόσφατες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, απέδειξαν ότι νέες τάξεις 3'-C-κυανο και 3'-δεοξυ-κυανο πυρανονουκλεοζιτών αποτελούν εν δυνάμει αποτελεσματικούς αναστολείς της ανάπτυξης καρκινικών όγκων του τραχήλου της μήτρας όπως επίσης και των λεμφοκυττάρων. Ως εκ τούτου, αποφασίστηκε να διευρυνθούν οι μελέτες μας προς τη σύνθεση νέων μορίων, στα οποία η ηλεκτραρνητική κυανο ομάδα εισάγεται στην 4' θέση αντί της 3'.

Συνοψίζοντας τα ανωτέρω κρίθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης 4-υδροξυ -κυανο και 4-δεοξυ- κυανο πυρανονουκλεοζιτών με ετεροκυκλικές βάσεις την 5-φθοροουρακίλη και τη θυμίνη. **(Εικόνα 24)**



Εικόνα 24:Χημική δομή των μορίων που συντέθηκαν

2. ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων

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

- Οξικός ανυδρίτης (Ac_2O)
- Πυριδίνη
- Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH)
- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN)
- 2,2-Διμεθοξυπροπάνιο [$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$]
- 4,4-Διμεθυλαμινοπυριδίνη (DMAP καταλυτικά)
- Τριαιθυλαμίνη (Et_3N)
- Άνυδρο N,N-Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)
- Διχρωμική πυριδίνη (PDC)
- Διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3)
- Αιθέρας (Et_2O)
- Κυανιούχο νάτριο (NaCN)
- Άνυδρο Τολουόλιο (Dry Tol)
- Αζοδισισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN)
- Τριβούτυλο υδρίδιο του κασσιτέρου (Bu_3SnH)
- Τριφθοροξικό οξύ (TFA)
- Τριφθορομεθανοσουλφονικός τριμεθυλοσιλυλεστέρας($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$)
- Ρ-τολουολοσουλφονικό οξύ(p-TsOH)

2.2 Χρωματογραφία χάρτου/λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων πραγματοποιείται με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Πρόκειται για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieseilel 60F24). Τα προϊόντα στα χρωματογραφήματα ανιχνεύονται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα H_2SO_4 (θεικού οξέος) 30%, είτε μέσω UV ακτινοβολίας (254nm). Τα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 80/20
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 80/20
- Διάλυμα Γ : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Δ : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 40/60
- Διάλυμα Ε: οξικός αιθυλεστέρας
- Διάλυμα ΣΤ: διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Ζ: διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 98/2
- Διάλυμα Η: διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 95/5

2.3 Χρωματογραφία στήλης

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). Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- Διάλυμα Α: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Β: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 80/20
- Διάλυμα Γ: διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Δ: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 70/30
- Διάλυμα Ε: διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 98/2

2.4 Ξήρανση διαλυτών

Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων, απαιτείται η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο (CH_3CN), μεθανόλη (MeOH), διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και πυριδίνη.

Η ξήρανση του ακετονιτριλίου 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 3\AA (molecular sieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάζει παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4\AA , όπου και αποθηκεύεται. Το N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο φυλάσσεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA , καθώς και η πυριδίνη σε σφαιρίδια KOH (pellets).

2.5 Ταυτοποίηση ενώσεων

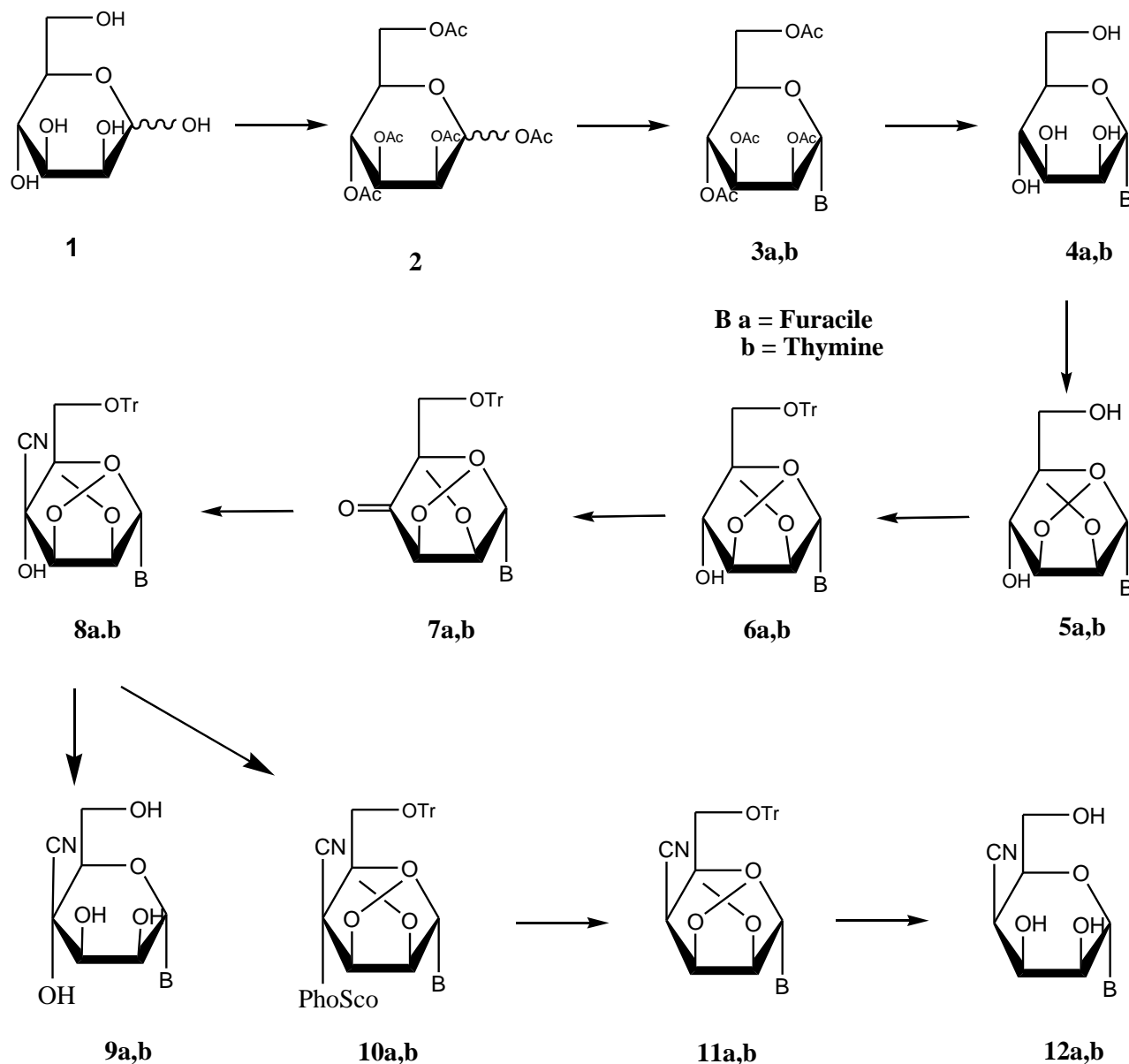
Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με Bruker 250 MHz. Το tetramethylsilane (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (double), t (triple), q (quadruple), m (multiple). Οι συχνότητες J μετρήθηκαν σε Hz.

Επιπλέον οι αποστάσεις μεταξύ των πυρήνων ^1H υπολογίστηκαν βάσει του πυρηνικού φαινομένου Overhauser (Nuclear Overhauser Effect) το οποίο οφείλεται στην διπολική αλληλεπίδραση (διαμέσω του χώρου) μεταξύ δυο διαφορετικών πυρήνων και η έντασή του είναι αντιστρόφως ανάλογη με την έκτη δύναμη της απόστασής τους.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού

Η συνολική πορεία των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται προκειμένου να παρασκευαστούν τα τέσσερα προϊόντα **9a,b** και **12a,b**, περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα. (Εικόνα 25)



Εικόνα 25: Συνθετική πορεία των αντιδράσεων

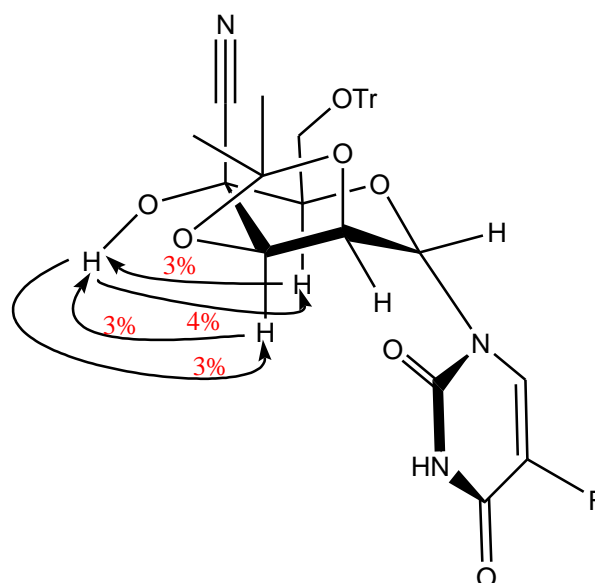
3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης

Η πρώτη αντίδραση αυτής της πορείας περιλαμβάνει την ακετυλίωση της D-μαννόζης **1** χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια πυριδίνη και οξικό ανυδρίτη Ac₂O. Λαμβάνουμε με τον τρόπο αυτό την 1,2,3,4,6 πεντα-O-ακετυλο-D-μαννοπυρανόζη **2**. Αφού εξασφαλιστεί η διαθεσιμότητα του επιθυμητού ακετυλιωμένου σακχάρου **2**, ακολουθεί σιλυλίωση της 5-φθοροουρακίλης. Για να επιτευχθεί η συμπύκνωση της εμπορικά διαθέσιμης βάσης με την ακετυλιωμένη μαννόζη, χρησιμοποιείται η σιλυλιωμένη φθοροουρακίλη, η οποία προκύπτει μετά από αντίδραση με εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο (CH₃CN). Η αντίδραση καταλύεται από τη σακχαρίνη. Η σιλυλιωμένη φθοροουρακίλη αντιδρά με την ακετυλιωμένη μαννόζη παρουσία του καταλύτη τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα (Me₃SiOSO₂CF₃) και λαμβάνουμε την 1-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλ)5-φθοροουρακίλη **3a**.

Στη συνέχεια, η ένωση **3a**, μέσω μίας εύκολης πειραματικής διαδικασίας, κατεργάζεται με μεθανολική αμμωνία για μία νύχτα, με αποτέλεσμα τη λήψη του πλήρως αποπροστατευμένου νουκλεοζίτη **4a**. Ακολουθεί η εκλεκτική προστασία των γειτονικών υδροξυλίων στις 2' και 3' θέσεις του σακχάρου, η οποία οδηγεί στη λήψη της ένωσης **5a**. Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται με επίδραση του 2,2-διμεθοξυπροπανίου [(CH₃)₂C(OCH₃)₂] επί της ένωσης **4a** καθώς και του π-τολουολοσουλφονικού οξέος (*p*-TsOH) ως καταλύτη.

Για την παρασκευή του κορεσμένου 4'-κετοπυρανονουκλεοζίτη το πρώτο βήμα της σύνθεσης περιλαμβάνει την εκλεκτική τριτυλίωση του πρωτοταγούς υδροξυλίου του προϊόντος **5a**, η οποία λαμβάνει χώρα μέσω κατεργασίας με τριφαινυλομεθυλοχλωρίδιο (TrCl) σε πυριδίνη, παρουσία καταλυτικής ποσότητας 4,4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (DMAP). Στη συνέχεια, ακολουθεί η οξείδωση του ελεύθερου υδροξυλίου στην 4' θέση του σακχάρου της τριτυλιωμένης ένωσης **6a**, με επίδραση διχρωμικής πυριδίνης (PDC) και Ac₂O σε διχλωρομεθάνιο, με αποτέλεσμα τη λήψη του κετονουκλεοζίτη **7a**.

Η επόμενη αντίδραση περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσθήκη της κυανο ομάδας στην κετονομάδα του προϊόντος **7a**, χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια του κυανικού και ανθρακικού νατρίου σε διάλυμα δύο φάσεων νερού και αιθυλαιθέρα οπότε προκύπτει η ένωση **8a**. Η προτεινόμενη β-στεreoχημεία της κυανο ομάδας στηρίχθηκε με μετρήσεις NOE που έγιναν στο προϊόν **8a** (Εικόνα 26). Όπως απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα η αύξησης της έντασης του υδροξυλίου κατά 3% 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.



Εικόνα 26 :Μετρήσεις NOE της ένωσης **8a**

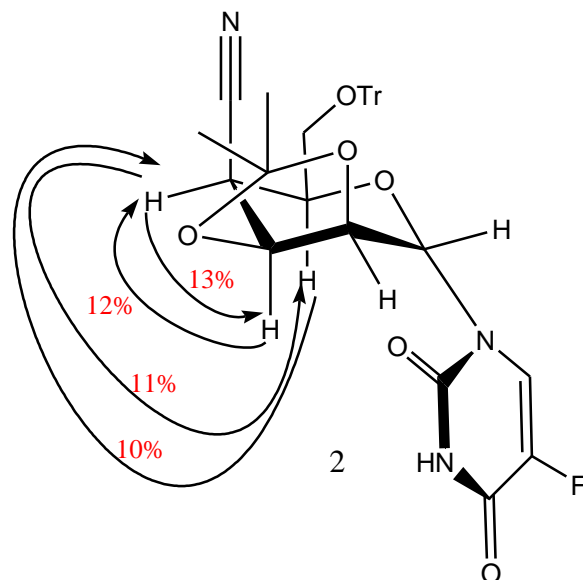
Σε διάλυμα από την ένωση **8a** προστίθεται άνυδρη μεθανόλη και TFA και το προκύπτον εναιώρημα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και ήπια ανάδευση για λίγα λεπτά. Έπειτα προστίθεται μεθανόλη και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό και τελικά απομονώνεται το τελικό προϊόν **9a**.

Η επόμενη αντίδραση για το σχηματισμό του αντίστοιχου 4'-δεοξυ-κυανονουκλεοζίτη είναι η φαινοξυθειοκαρβονυλίωση της ένωσης **8a**, η οποία πραγματοποιείται με επίδραση φαινοξυθειοκαρβονυλοχλωριδίου (PhOC(S)Cl), παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et₃N) και 4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (DMAP) σε CH₃CN. Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνεται το 3'-O-φαινοξυθειοκαρβονυλο παράγωγο **10a**.

Στη συνέχεια, το προϊόν **10a** χωρίς περαιτέρω απομόνωση ανάγεται παρουσία του υδριδίου του τριβουτυλοκασσιτέρου (Bu₃SnH), καθώς και του αζωδισ-ισοβουτυρονιτριλίου (AIBN) σε διαλύτη τολουόλιο στους 100 °C. Ο 4'-δεοξυκυανονουκλεοζίτης **11a** λαμβάνεται ύστερα από τη σχάση του δεσμού C4-O4 σε μία αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών. Η αναγωγή επιτεύχθηκε στερεοεκλεκτικά και η απόσπαση του υδρογόνου από το Bu₃SnH έγινε από την κάτω α όψη του δακτυλίου. Η β-στεreoχημεία της κυανο ομάδας διαπιστώθηκε με μετρήσεις NOE που έγιναν στο προϊόν **11a** (**Εικόνα 27**). Οι αμοιβαίες αυξήσεις της έντασης που παρατηρούνται μεταξύ του H-3' και των H-4' και H-5', δείχνουν ότι τα τρία αυτά πρωτόνια βρίσκονται στην κάτω α όψη του πυρανικού δακτυλίου.

Τέλος σε διάλυμα από την ένωση **11a** προστίθενται άνυδρη μεθανόλη και TFA και το προκύπτον εναιώρημα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και ήπια ανάδευση για 8 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη μεθανόλης και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό και τελικά παρασκευάζεται το επιθυμητό προϊόν **12a**.

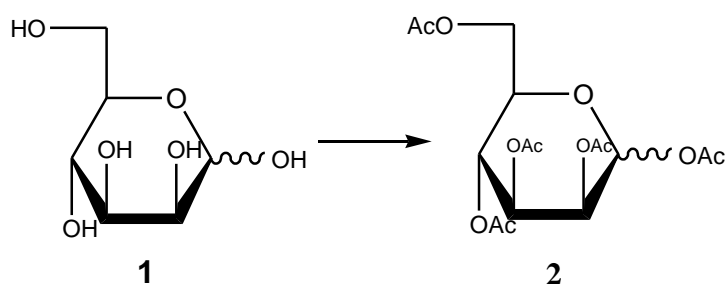
Τα προϊόντα **9b** και **12b**, όπως αποδίδονται στην εικόνα 25, προκύπτουν ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία η οποία περιγράφηκε παραπάνω για την παρασκευή των προϊόντων **9a** και **12a**.



Εικόνα 27 :Μετρήσεις NOE της ένωσης 11a

3.3 Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-κυανο-ταλοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης

3.3.1 Σύνθεση της 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλο-D-μαννοπυρανόζη(2)

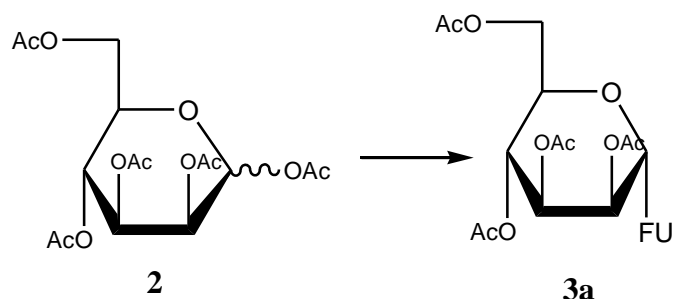


Σε διάλυμα της D-μαννόζης (1) (2000 mg ή 11,1 mmoles) σε πυριδίνη (38,85 mL) προστίθεται Ac₂O (19,98mL, mmol) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) το διάλυμα ψύχεται στους 0 0C, και προστίθεται μεθανόλη (7mL). Στη συνέχεια, οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό με MeOH και τολουόλιο, το υπόλειμμα καθαρίζεται σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα A. Το επιθυμητό προϊόν **2** (4,541 g) λαμβάνεται υπό τη μορφή λαδιού. Τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

TLC (Διάλυμα A)	R _f = 0,54
Απόδοση	99%

Πίνακας 1

3.3.2 Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης (3a)

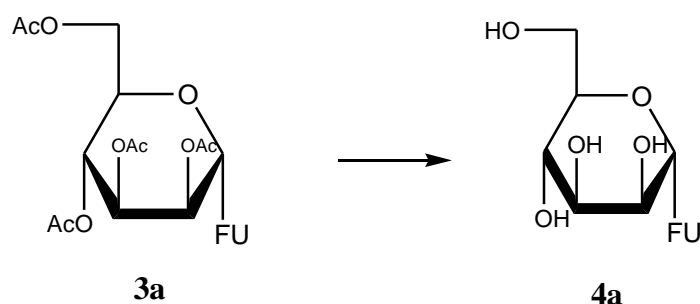


Διάλυμα αποτελούμενο από βάση (1,56g, 13,92mmol), εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) (3,64 mL, 17,26 mmol) και σακχαρίνη (117mg, 0,64 mmol) σε άνυδρο διαλύτη ακετονιτρίλιο (CH₃CN) (63 ml) θερμαίνεται με κάθετο ψυκτήρα για 40 λεπτά στους 120° C υπό την επίδραση αζώτου και στην συνέχεια προστίθεται η 1,2,3,4,6-πεντα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανόζη (2) (4,541 g, 11,6 mmol) καθώς και ο Me₃SiOSO₂CF₃ (2,93 mL, 16,24 mmol). Ακολουθεί θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 90° C για περίπου 2,5h (TLC), ψύξη του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NaHCO₃, και εκχύλιση με EtOAc. Η οργανική φάση πλένεται με νερό (4 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα B, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **3a** (3,752g) ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο. Τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης καθώς και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

TLC (Διάλυμα B)	Rf = 0,34
Απόδοση	82%
αD	+ 49.5 (c = 0,23)
λmax	260 nm

Πίνακας 2

3.3.3 Σύνθεση της 1-(α -D-μαννοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης (4a)

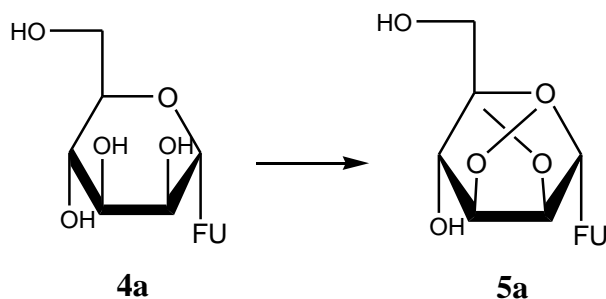


Διάλυμα της ένωσης 3 (750mg, 1,69 mmol) σε μεθανολική αμμωνία (κορεσμένη στους 0° C, 10ml) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα EtOAc/MeOH 8:2 οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4a** με λευκή αφρώδη υφή και απόδοση 98%. Τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης καθώς και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

TLC (Διάλυμα B)	Rf = 0,23
Απόδοση	98%
α_D	+ 36.7 (c = 0,15)
λ_{max}	260 nm

Πίνακας 3.

3.3.4 Σύνθεση της 1-(2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-μαννοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης (5a)

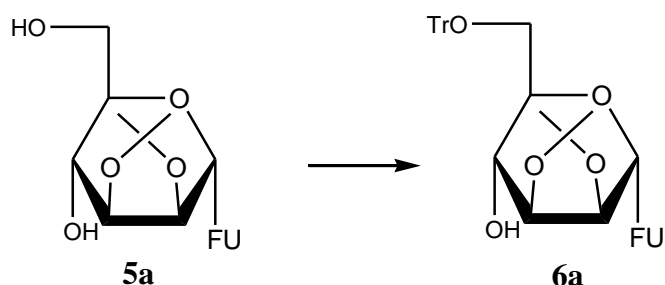


Σε διάλυμα του προϊόντος 4 (845mg, 3,08mmol) με άνυδρη ακετόνη (6,16 mL) προστίθεται $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$ (6,16 mL) και p-TsOH (0,12 g, 0,64 mmol) ως καταλύτης οπότε αρχικά προστατεύονται τα υδροξύλια στις 2',3' και 4',6' θέσεις του σακχάρου και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Έπειτα από προσθήκη νερού (12,32 ml) διασπάται το ένα ακετονίδιο, με αποτέλεσμα τη λήψη της επιθυμητής ένωσης 5 και το μίγμα αναδεύεται για περίπου 16h (TLC). Στη συνέχεια προστίθεται τριαιθυλαμίνη μέχρι ουδετέρου 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 το σύστημα Γ, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5a** (833mg) με λευκή αφρώδη υφή. Τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης καθώς και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

TLC (Διάλυμα ΣΤ)	Rf = 0,2
Απόδοση	60 %
α_D	+ 26.2 (c = 0,28)
λ_{max}	260nm

Πίνακας 4.

3.3.5 Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης (6a)

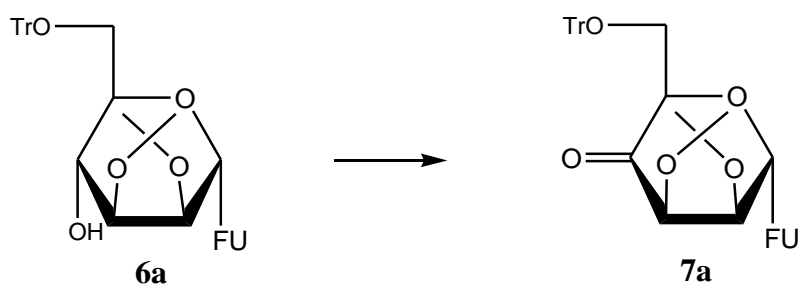


Σε διάλυμα της ένωσης 5 (933 mg, 2,97 mmol) σε DMF (7,43 mL), και τριαιθυλαμίνη (Et₃N)(1,317 μl, 9,5 mmol) προστίθεται TrCl (1,33 g, 4,75 mmol) και καταλυτική ποσότητα DMAP και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3h. Ακολουθεί προσθήκη μεθανόλης (7 mL) και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Δ, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **6a** (815 mg) υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης καθώς και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

TLC (Διάλυμα E)	R _f = 0.62
Απόδοση	54%
α _D	+ 17.5 (c = 0.1)
λ _{max}	260 nm ε = 2324

Πίνακας 5 .

3.3.6 Σύνθεση της 1-(2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-6'-O-τριτυλο-α-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-4'-ουλοζο) 5-φθοροουρακίλης (7a)

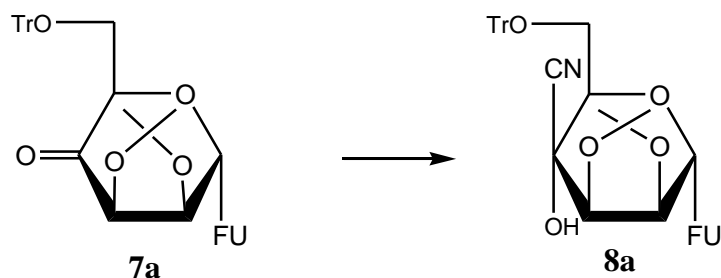


Σε διάλυμα της ένωσης 6 (1000mg, 1,79mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (18mL) προστίθεται PDC (803mg, 2,13 mmol) και Ac₂O (500mL, 5,03mmol) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3h. Στη συνέχεια προστίθεται EtOAc (5 mL) και το προκύπτον παχύρρευστο έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα B, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **7a** (516mg) υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων. Τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης καθώς και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

TLC (Διάλυμα B)	R _f = 0,56
Απόδοση	63%
αD	+ 4.8 (c = 0,15)
λ _{max}	260 nm ε=7858

Πίνακας 6.

3.3.7 Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (8a)

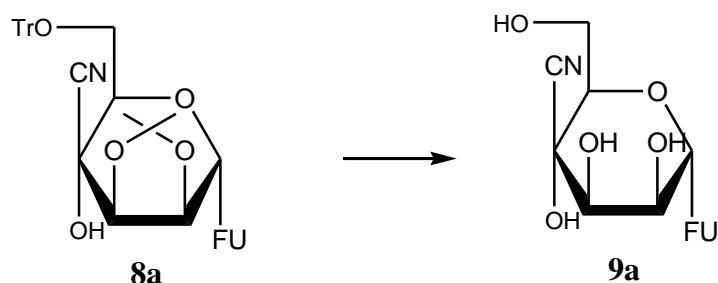


Η ένωση 7 (516 mg, 0,93 mmol) διαλύεται σε αιθέρα (8mL) και στη συνέχεια προστίθεται νερό (4 ml), ώστε να σχηματιστούν δύο φάσεις. Κατόπιν προστίθεται NaCN(48mg, 0,98mmol) και NaHCO₃ (165mg, 1,96mmol) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 h. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC. Η οργανική φάση διαχωρίζεται και η υδατική φάση πλένεται δυο φορές με EtOAc (3 ml). Οι οργανικές φάσεις ενώνονται, ξηραίνονται με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Ακολουθεί καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) κατά την οποία χρησιμοποιείται ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα E. Τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης καθώς και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος **8a** παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

TLC (Διάλυμα Z)	R _f = 0,56
Απόδοση	63%
α _D	+ 4.8 (c = 0,15)
λ _{max}	260 nm ε=6225

Πίνακας 7.

3.3.8 Σύνθεση της 1-(4'-κυανο-α-D-μαννοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης(9a)

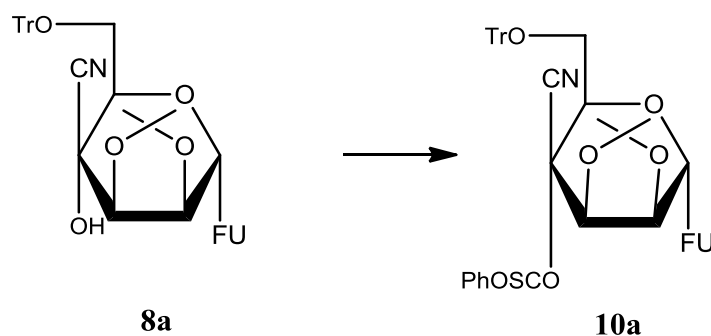


Σε διάλυμα από την ένωση 8 (77,35 mg, 0,133 mmol) προστίθεται άνυδρη μεθανόλη (0,07 mL) και TFA (0,63 mL) και το προκύπτον εναιώρημα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και ήπια ανάδευση για 8 λεπτά. Έπειτα προστίθεται μεθανόλη (5 mL) και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Για την απομόνωση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

TLC (Διάλυμα ΣΤ)	R _f = 0,32
Απόδοση	51%
α _D	+ 4.5 (c = 0.20)
λ _{max}	262 nm ε=2896

Πίνακας 8

3.3.9 Σύνθεση της 1-(2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-O-τριτυλο-4'-O-φαινοξυθειοκαρβονυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (**10a**)

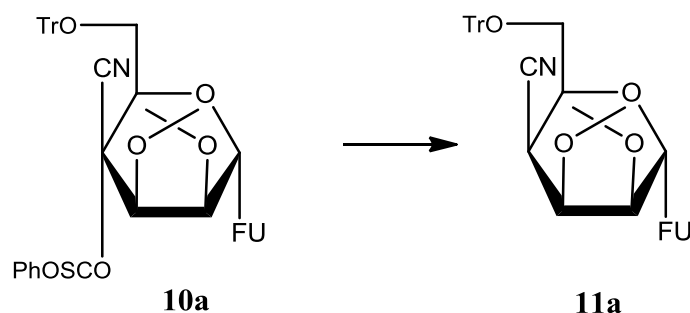


Σε διάλυμα της ένωσης **8a** (150mg, 0,62mmol) σε CH₃CN(2,74mL), προστίθεται DMAP(14mg) και Et₃N(110μL, 0,78mmol). Στο προκύπτον εναιώρημα προστίθεται και phenyl chlorothionocarbonate(104μL, 0,76mmol) και αναδεύεται στους 0° C για 1h. Το μίγμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα (250 mL) και εκχυλίζεται τρεις φορές με νερό (3 x 50 mL). Κατόπιν η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το υπόλειμμα συμπυκνώνεται δυο φορές με άνυδρο τολουόλιο και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω απομόνωση. Το R_f του προϊόντος **10a** παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

TLC(Διάλυμα ΣΤ)	R _f = 0.55
Απόδοση	61%

Πίνακας 9.

3.3.10 Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-O-τριτυλο-α-D-ταλοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης (11a)

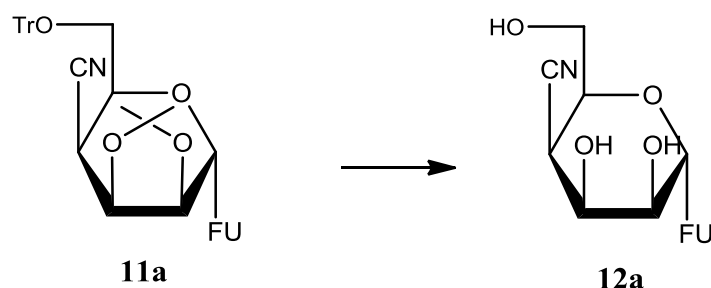


Σε διάλυμα της ένωσης **10a** (151 mg, 0,21 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (2,2 mL), και AIBN (5mg) προστίθεται Bn_3SnM (88mL, 0,33 mmol) και το προκύπτον εναιώρημα θερμαίνεται στους 100°C . Στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Το προκύπτον προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα E, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **11a** (87mg) υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου. Τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης καθώς και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

TLC (Διάλυμα Z)	Rf = 0,65
Απόδοση	71 %

Πίνακας 10.

3.3.11 Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-κυανοταλοπυρανοζυλο) 5-φθοροουρακίλης (**12a**)



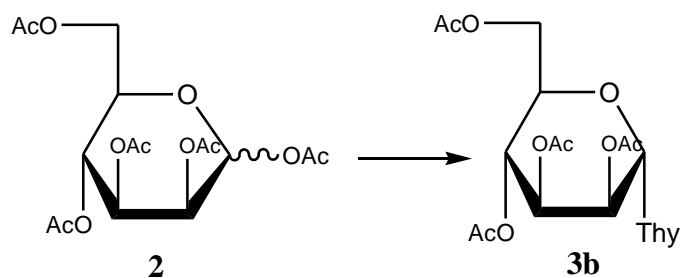
Σε διάλυμα από την ένωση **10** (70 mg, 0,12 mmol) προστίθενται άνυδρη μεθανόλη (0,07 mL) και TFA (0,63 mL) και το προκύπτον εναιώρημα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου και ήπια ανάδευση για 8 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη μεθανόλης (5 mL) και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Για την απομόνωση της ένωσης ενδιαφέροντος **12a** χρησιμοποιείται χρωματογραφία στήλης με διαλύτες έκλουσης το σύστημα ΣΤ σε αναλογία 9:1 αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται ως εξής:

TLC (Διάλυμα ΣΤ)	R _f = 0,25
Απόδοση	60%
α _D	+ 23.0 (c = 0,50)
λ _{max}	260 nm ε=4396

Πίνακας 11

3.4 Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-κυανο-ταλοπυρανοζυλο) θυμίνης

3.4.1 Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο) θυμίνης(3b)

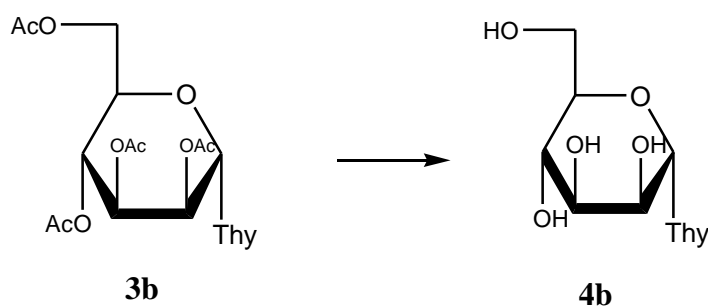


Η σύνθεση του προϊόντος **3b** πραγματοποιήθηκε με την ίδια πειραματική διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε για την παρασκευή του προϊόντος **3a**. Τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης καθώς και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

TLC (Διάλυμα Β)	Rf = 0,25
Απόδοση	80%
α_D	+ 47,6 (c = 0,23)
λ_{max}	260 nm

Πίνακας 12

3.4.2 Σύνθεση της 1-(α -D-μαννοπυρανοζυλο) θυμίνης(4b)

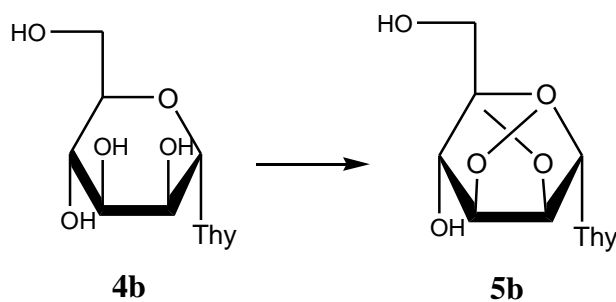


Η σύνθεση του προϊόντος **4b** πραγματοποιήθηκε με την ίδια πειραματική διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε για την παρασκευή του προϊόντος **4a**. Τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης καθώς και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

TLC (Διάλυμα Β)	Rf = 0,25
Απόδοση	97%
α D	+ 35.7 (c = 0,15)
λ_{\max}	260 nm

Πίνακας 13

3.4.3 Σύνθεση της 1-(2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-μαννοπυρανοζύλο)θυμίνης (5b)

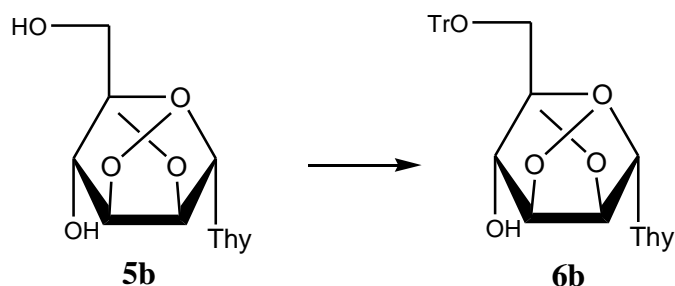


Για την παρασκευή του προϊόντος **5b** ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία η οποία πραγματοποιήθηκε για το προϊόν **5a**. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν καθώς και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος.

TLC (Διάλυμα ΣΤ)	R _f = 0,25
Απόδοση	62 %
α _D	+ 26.8 (c = 0,28)
λ _{max}	260nm

Πίνακας 14

3.4.4 Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο) θυμίνης (6b)

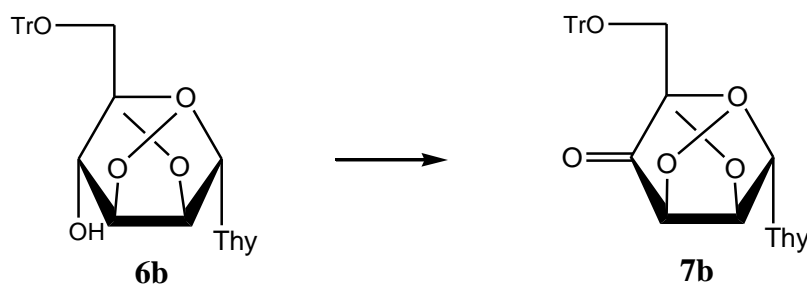


Προκειμένου να παρασκευαστεί το προϊόν **6b** ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία η οποία πραγματοποιήθηκε για το προϊόν **6a**. Τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης καθώς και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

TLC (Διάλυμα E)	Rf = 0.6
Απόδοση	55%
α_D	+ 18.2 (c = 0.1)
λ_{max}	260 nm $\epsilon = 2324$

Πίνακας 15

3.4.5 Σύνθεση της 1-(2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-6'-O-τριτυλο-α-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-4'-ουλοζο) θυμίνης (7b)

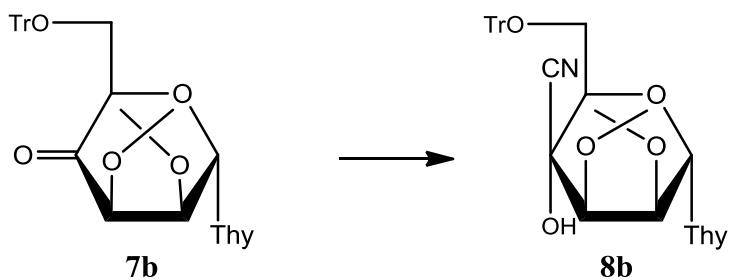


Η σύνθεση του προϊόντος **7b** πραγματοποιήθηκε με την ίδια πειραματική διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε για την παρασκευή του προϊόντος **7a**. Τα αποτελέσματα της παραπάνω αντίδρασης καθώς και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

TLC (Διάλυμα Β)	Rf = 0,5
Απόδοση	65%
αD	+ 4.2 (c = 0,15)
λmax	260 nm ε=7858

Πίνακας 16

3.4.6 Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-Ο-τριτυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο) θυμίνης (8b)

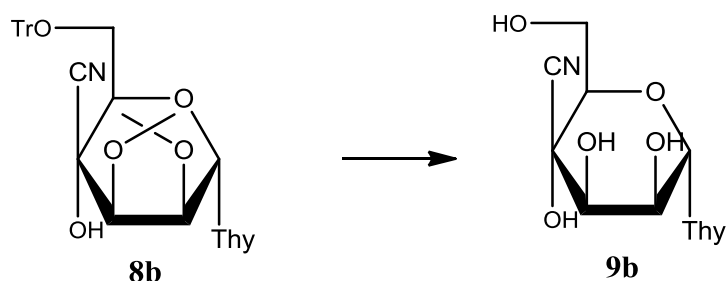


Για την παρασκευή του προϊόντος **8b** ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία η οποία πραγματοποιήθηκε για το προϊόν **8a**. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν καθώς και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος.

TLC (Διάλυμα Z)	R _f = 0,55
Απόδοση	54%
α _D	+ 5.1 (c = 0,15)
λ _{max}	260 nm ε=6225

Πίνακας 17

3.4.7 Σύνθεση της 1-(4'-κυανο-α-D-μαννοπυρανοζυλ) θυμίνης (9b)

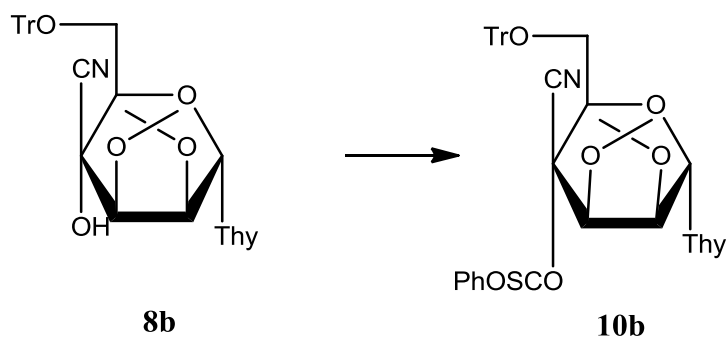


Προκειμένου να παρασκευαστεί το προϊόν **9b** ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία η οποία πραγματοποιήθηκε για το προϊόν **9a**. Τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται ως εξής:

TLC (Διάλυμα ΣΤ)	R _f = 0,35
Απόδοση	50%
α _D	+ 4.4 (c = 0.20)
λ _{max}	262 nm ε=2896

Πίνακας 18

3.4.8 Σύνθεση της 1-(2',3'-Ο-ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-Ο-τριτυλο-4'-Ο-φαινοξυθειοκαρβονυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)θυμίνης (10b)

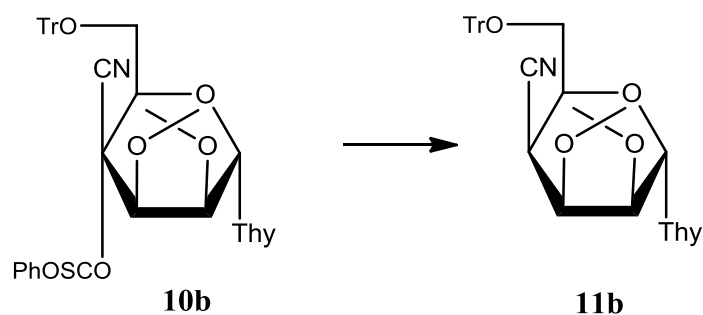


Η σύνθεση του προϊόντος **10b** πραγματοποιήθηκε με την ίδια πειραματική διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε για την παρασκευή του προϊόντος **10a**. Το Rf του προϊόντος παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

TLC (Διάλυμα Η)	Rf = 0.45
Απόδοση	65%

Πίνακας 19

3.4.9 Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-2',3'-O-ισοπροπυλιδενο-4'-κυανο-6'-O-τριτυλο-α-D-ταλοπυρανοζυλο) θυμίνης (11b)

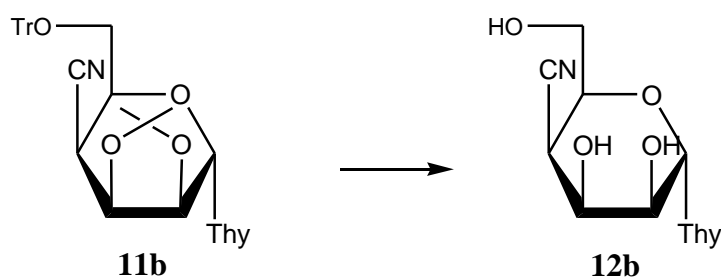


Η σύνθεση του προϊόντος **11b** πραγματοποιήθηκε με την ίδια πειραματική διαδικασία η οποία ακολουθήθηκε για την παρασκευή του προϊόντος **11a**. Τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται ως εξής:

TLC (Διάλυμα ΣΤ)	Rf = 0,6
Απόδοση	70 %

Πίνακας 20

3.4.10 Σύνθεση της 1-(4'-δεοξυ-4'-κυανοταλοπυρανοζυλο) θυμίνης (12b)



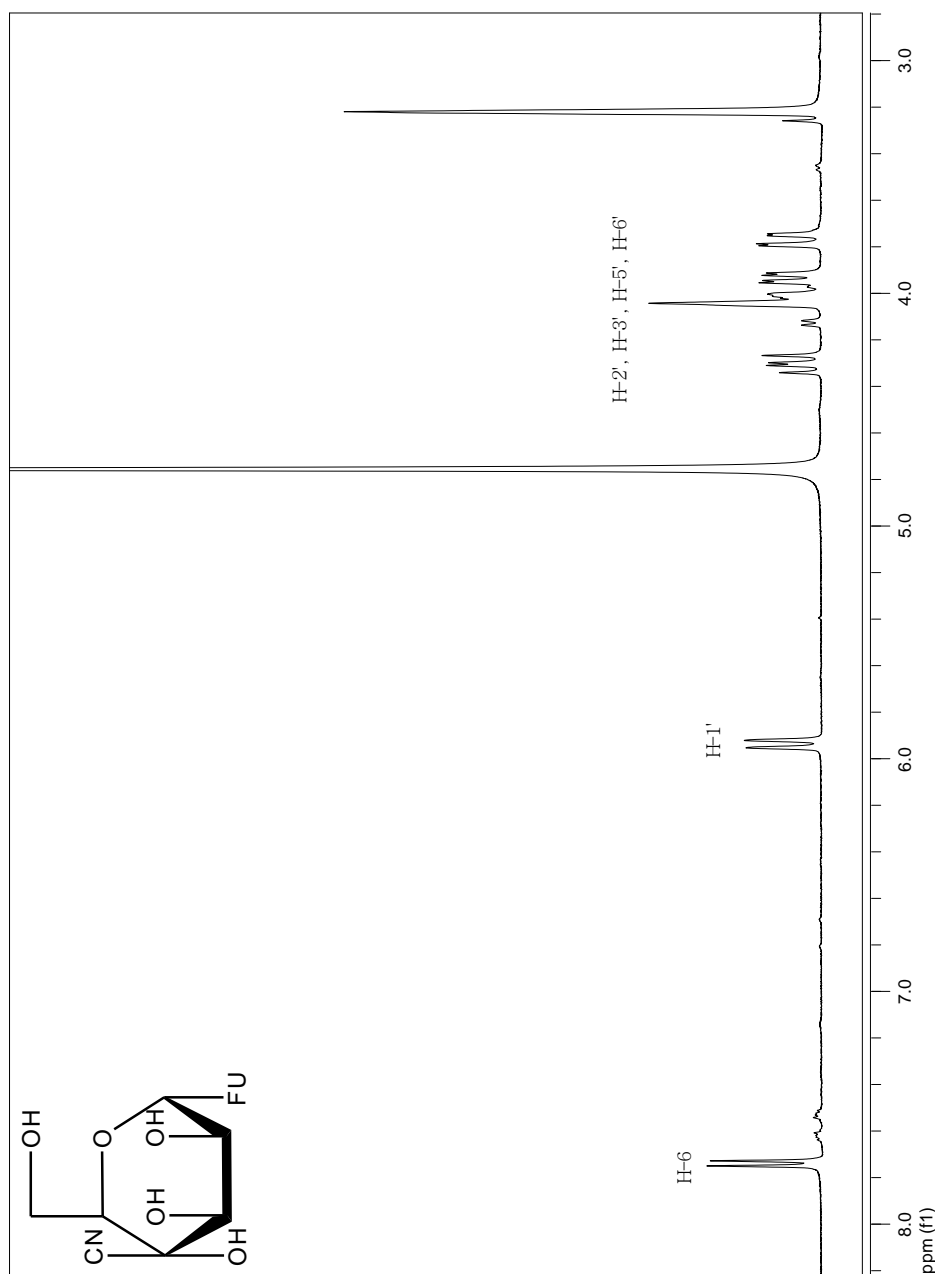
Προκειμένου να παρασκευαστεί το προϊόν **12b** ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία η οποία πραγματοποιήθηκε για το προϊόν **12a**. Τα αποτελέσματα της σύνθεσης και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος παρουσιάζονται ως εξής:

TLC (Διάλυμα ΣΤ)	Rf = 0,2
Απόδοση	62%
α_D	+ 23.5 (c = 0,50)
λ_{max}	260 nm $\epsilon=4396$

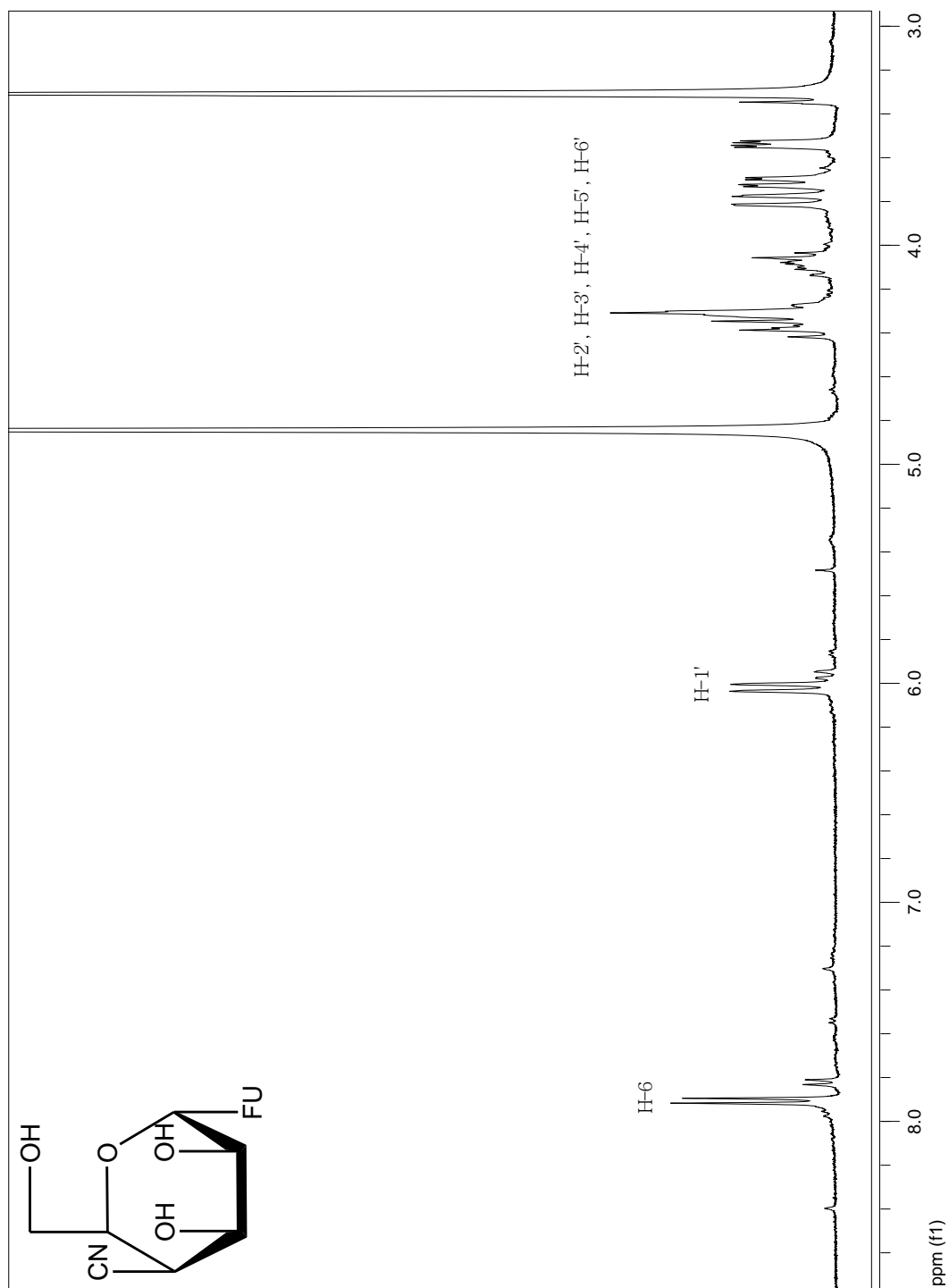
Πίνακας 21

4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR

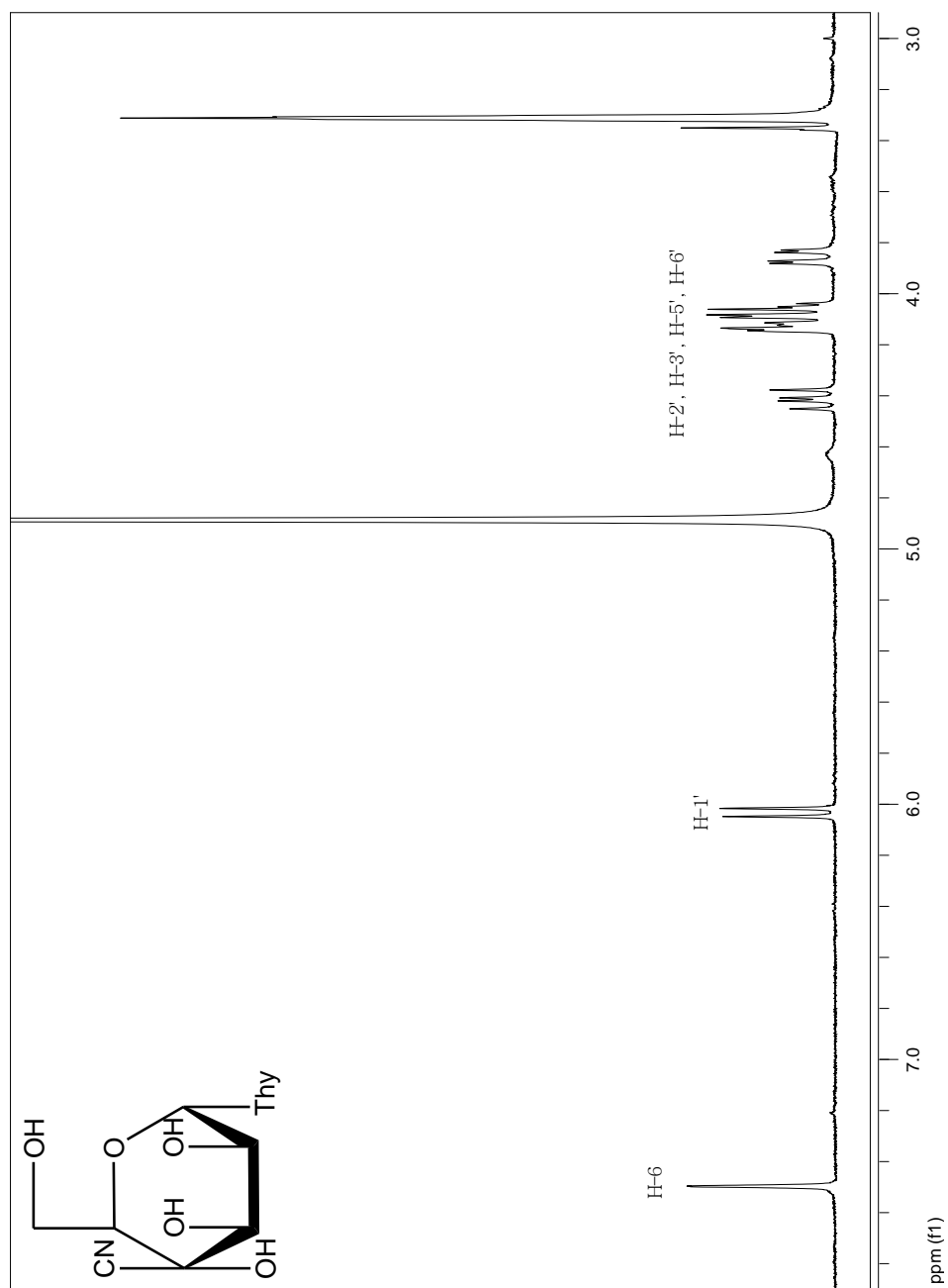
Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού. Αναφέρονται παρακάτω τα ^1H NMR των τελικών προϊόντων **9a,b** και **12a,b**.



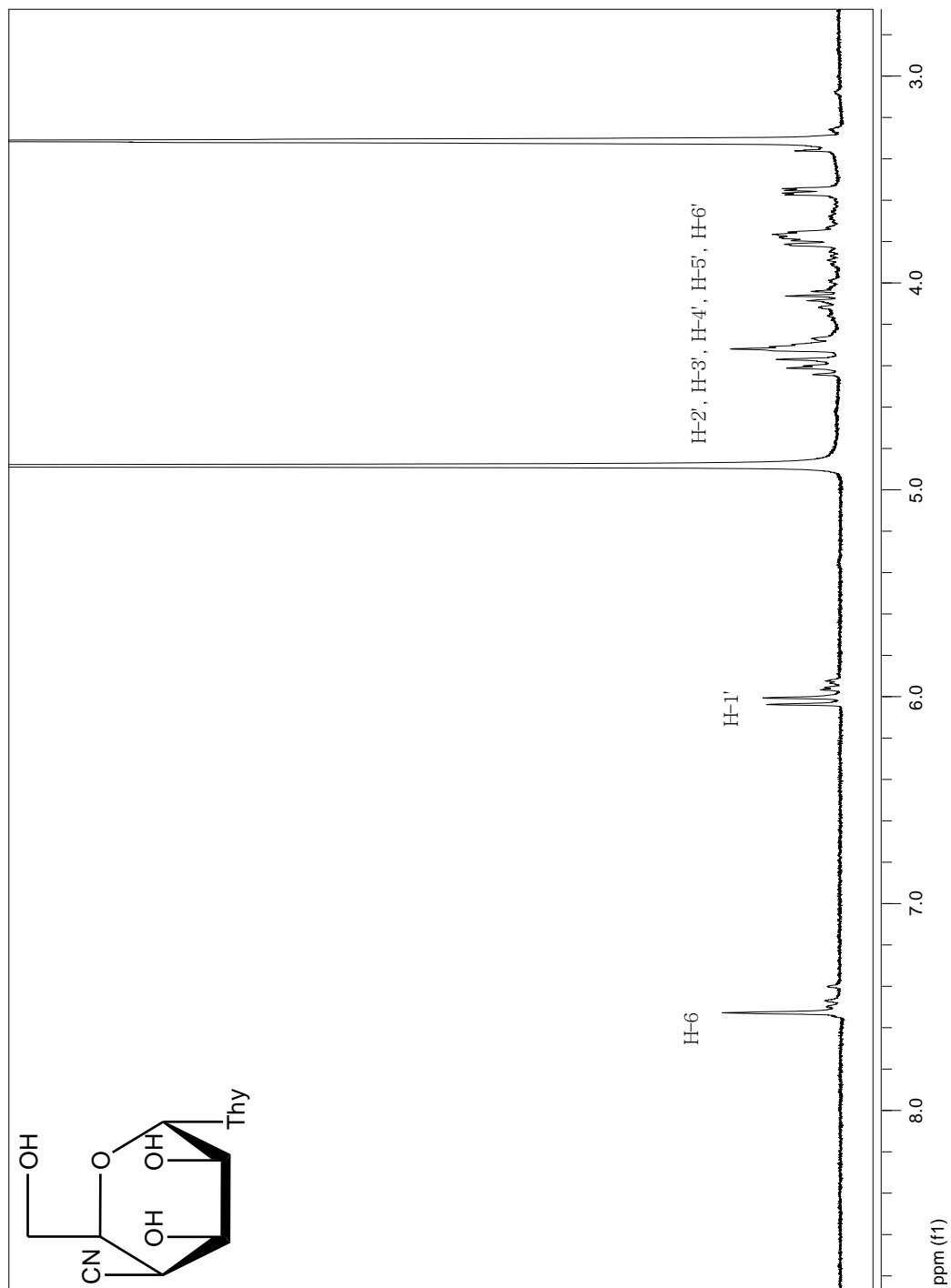
Σχήμα1: Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος **9a**



Σχήμα 2: Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος **12a**



Σχήμα 3: Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος **9b**



Σχήμα 4: Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος **12b**

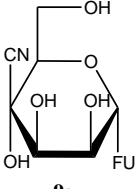
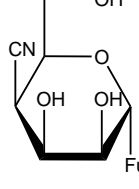
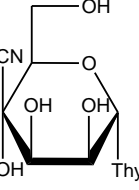
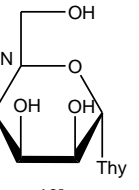
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βασιζόμενοι στις σημαντικές βιολογικές ιδιότητες που παρουσιάζουν οι 3' κυανο πυρανονουκλεοζίτες, η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία περιγράφει τη σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών οι οποίοι φέρουν τη χαρακτηριστική κύανο ομάδα στη θέση 4' του σακχάρου με ετεροκυκλικές βάσεις τη 5-φθοροουρακίλη και τη θυμίνη. Πέραν της συνθέσεως, τα νουκλεοζιτικά αυτά ανάλογα αποτιμήθηκαν όσον αφορά στις κυτταροστατικές και αντιϊκές τους ιδιότητες.

Η συνθετική πορεία των αντιδράσεων που περιγράφηκαν στο πειραματικό μέρος ήταν η πιο απλή και αποτελεσματική από τις πειραματικές μεθόδους που δοκιμάστηκαν, εφόσον οδήγησαν στη σύνθεση μορίων με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα όπως αποδείχτηκε με τα πειράματα πυρηνικού φαινομένου Overhauser (NOE) αλλά και με τα ποσοστά απόδοσης. Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με στοιχειώδεις αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H NMR}$.

Τα νέα κυανο πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα **9a,b** και **12a,b** μελετήθηκαν ως προς την αντιϊκή και αντικαρκινική τους δράση. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Ιολογίας και Χημειοθεραπείας, του Τμήματος Μικροβιολογίας και Ανοσολογίας του Ινστιτούτου Rega, στο Πανεπιστήμιο της Λουβένης, στο Βέλγιο.

Οι νέες ενώσεις εξετάστηκαν για την πιθανή ανασταλτική τους δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa). Για την εκτίμηση της κυτταροστατικής τους δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC 50, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%. **(Πίνακας 22)**

Προϊόν	IC ₅₀ (μM)						
	L1210	CEM	HeLa	Προϊόν	L1210	CEM	HeLa
 9a	3.0 ± 0.9	57 ± 7	3.2 ± 0.0	 12a	4.1 ± 0.6	18 ± 6	2.6 ± 0.9
 9b	> 500	> 500	433 ± 94	 12b	262 ± 12	332 ± 64	188 ± 4
5-FU	0.49±0.13	18±5	0.54±0.12				

Πίνακας 22. Ανασταλτική δράση (IC₅₀, μM) των ενώσεων **9a,b** και **12a,b** έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM) και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa).

Από τις τιμές IC₅₀ του παραπάνω πίνακα, χαρακτηριστική είναι η αυξημένη κυτταροτοξική δράση που εμφάνισε ο 4' κυανο νουκλεοζίτης της 5-φθοροουρακίλης **9a** καθώς και ο αντίστοιχος 4' δεοξυ- 4'κυανο νουκλεοζίτης με την ίδια ετεροκυκλική βάση **12a**. Τέλος, οι νέοι πυρανονουκλεοζίτες **9a,b** και **12a,b** δεν παρουσίασαν αντιαυτική δράση έναντι μίας σειράς DNA και RNA ιών, όταν δοκιμάστηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις.

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahn et al. 2000).
- Arner and Eriksson 1995
- Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J. J. Med. Chem. 1991, 34, 1879.
- Balzarini, J. Pharmacy World Sci. 1993, 16, 113.
- Berg M.J., Tymoczko L.J., Stryer L., Βιοχημεία 1997/2001, τόμος I, II
- Brady, R. C.; Bernstein, D. I. Antiviral Res. 2001, 61, 73.
- Burns, C. J. Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents, 2005, 4, 4.
- 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. Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry 2008, 7, 219.
- 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; 46(11): 5668-74.
- Lehninger Αρχές Βιοχημείας, 2007
- 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.
- Malsen, H. J.; Hughes, D.; Hursthouse, M.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Simons, C. J. Med. Chem. 2004, 47, 5482.
- Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. Bioorg. Med. Chem. 2007, 15, 980.

- Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, 43, 420.
- Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Panagiotopoulou, A.; Pelecanou, M.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2009a, 44, 4764.
- Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, 95, 105.
- Mc Murry J. *Οργανική Χημεία, τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης*
- Ostrowski, T.; Wroblowski, B.; Busson, R.; Rozenski, J.; De Clercq, E.; Bennet, M. S.; Champness, J. N.; Summers, W. C.; Sanderson, M. R.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 4343.
- O-Yang C., Wu H.Y., Fraser-Smith E.B., Walker K.A.M. *Tetrahedron Lett.* 1992, 1, 37-40.
- 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
- Siev et al. 1969)
- Spanou, C.; Manta, S.; Komiotis D.; Dervishi, A.; Kouretas, D. *Int. J. Mol. Sci.* 2007, 8, 695.
- Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 3154.
- Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* 1991, 51, 2319.
- Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. J. *Med. Chem.* 2004, 47, 3399.