



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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

ΚΟΝΤΟΠΟΥΛΟΥ ΦΙΛΙΤΣΑ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Σύνθεση, ανάλυση και αποτίμηση νέων τροποποιημένων στη βάση
πυρανονουκλεοζιτών ως πιθανοί αντικοί και κυτταροτοξικοί παράγοντες»**

ΛΑΡΙΣΑ 2016

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Σύνθεση, ανάλυση και αποτίμηση νέων τροποποιημένων στη βάση
πυρανονουκλεοζιτών ως πιθανοί αντιικοί και κυτταροτοξικοί παράγοντες»**

**«Synthesis, analysis and evaluation of new modified based pyranonucleosides
as potential antiviral and cytotoxic agents»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Κομιώτης Δημήτριος -Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Μπαλατσός Νικόλαος- Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Μαρκουλάτος Παναγιώτης- Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Κομιώτη Δημήτριο τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για τις εποικοδομητικές του υποδείξεις.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κ. Μαντά Στυλιανή για την πολύτιμη βοήθεια της.

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT	8
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Υδατάνθρακες.....	9
1.2 Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές-σχηματισμός ημιακετάλης.....	9
1.3 Νουκλεοζίτες και ανάλογά τους.....	13
1.4 Θεραπευτικός τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών.....	14
1.4.1 Αντικα νουκλεοζιτικά ανάλογα.....	16
1.4.2 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα.....	18
1.4.3 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με διακλάδωση την αιθύνυλο ομάδα.....	20
1.4.4 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με υποκαταστάτες μεθύλια....	24
1.4.5 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη.....	25
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2.1 Στόχος-Σκοπός μελέτης.....	30
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
3.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων.....	32
3.2 Γενική μεθοδολογία.....	33
3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC:Thin layer chromatography.....	33
3.2.2Χρωματογραφία στήλης.....	34

3.2.2 Ξήρανση διαλυτών.....	35
-----------------------------	----

3.2.3 Ταυτοποίηση ενώσεων.....	35
--------------------------------	----

4.ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού.....	36
---	----

4.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης.....	36
-----------------------------------	----

4.2.1 Σύνθεση της 1-(2,3,4,6-τετράκισ-Ο-ακέτυλο-β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5-[(2,5-διμεθυλο-φαινυλο)αιθυνυλο] ουρακίλης.....	38
--	----

4.2.1.1 Σύνθεση της 1-(β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5-[(2,5-διμεθυλο-φαινυλο)αιθυνυλο]ουρακίλης.....	39
--	----

4.2.1.2 Σύνθεση της 1-(2,3,4,6-τετράκισ-Ο-ακέτυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-5-[(2,5-διμεθυλο-φαινυλο)αιθυλο]-ουρακίλης.....	40
--	----

4.2.1.3 Σύνθεση της 1-(β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5-[(2,5-διμεθυλο-φαινυλο)αιθυλο]ουρακίλης.....	42
--	----

4.2.2 Σύνθεση της 1-(2,3,4,6-τετράκισ-Ο-ακέτυλο-β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5-[(2,4,5-τριμεθυλο-φαινυλο)αιθυνυλο] ουρακίλης.....	43
---	----

4.2.2.1 Σύνθεση της 1-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-5-[(2,4,5-τριμεθυλο-φαινυλο)αιθυνυλο]ουρακίλης.....	45
---	----

4.2.2.2 Σύνθεση της 1-(2,3,4,6-τετράκισ-Ο-ακέτυλο-β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5-[(2,4,5-τριμεθυλο-φαινυλο)αιθυλο] ουρακίλης.....	46
---	----

4.2.2.3 Σύνθεση της 1-(β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5-[(2,4,5-τριμεθυλο-φαινυλο)αιθυλο]ουρακίλης.....	47
---	----

4.2.3	Σύνθεση της 1-(2,3,4,6-τετρακис-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-[(3,4,5-τριμεθοξυ-φαινυλο)αιθυνο]ουρακίλης.....	49
4.2.3.1	Σύνθεση της 1-(β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-5-[(3,4,5-τριμεθοξυ-φαινυλο)αιθυνο]ουρακίλης.....	50
4.2.3.2	Σύνθεση της 1-(2,3,4,6-τετρακис-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-[(3,4,5-τριμεθοξυ-φαινυλο)αιθυνο]ουρακίλης.....	52
4.2.3.3	Σύνθεση της 1-(β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-5-[(3,4,5-τριμεθοξυ-φαινυλο)αιθυνο]ουρακίλης.....	53
5.	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹ H NMR.....	54
6.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	56
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στους νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους κυρίως λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντικαρκινική, αντιβακτηριδιακή και αντική δράση περιέχουν νουκλεοζίτες αποτελούμενους από μονοσακχαρίτες με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση. Μια πολύ ενδιαφέρουσα κατηγορία αυτών είναι οι νουκλεοζίτες που φέρουν δομικές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης. Πολλές τέτοιες ενώσεις έχουν συντεθεί και αξιολογηθεί για τις πιθανές βιολογικές τους ιδιότητες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση νέων τροποποιημένων στη βάση πυρανονουκλεοζιτών. Αναλύονται οι συνθετικές οδοί που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή τους, η μέθοδος ταυτοποίησής τους καθώς και η βιολογική τους αποτίμηση.

ABSTRACT

In recent years, the research interest has turned to nucleosides and nucleoside analogues mainly due to 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. A very interesting category are the nucleosides bearing structural modifications to the base moiety. Many compounds have been synthesized and assessed for their possible biological properties.

The dissertation describes the synthesis identification and biological evaluation of a novel class of base modified pyranonucleosides.

1.Εισαγωγή

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.

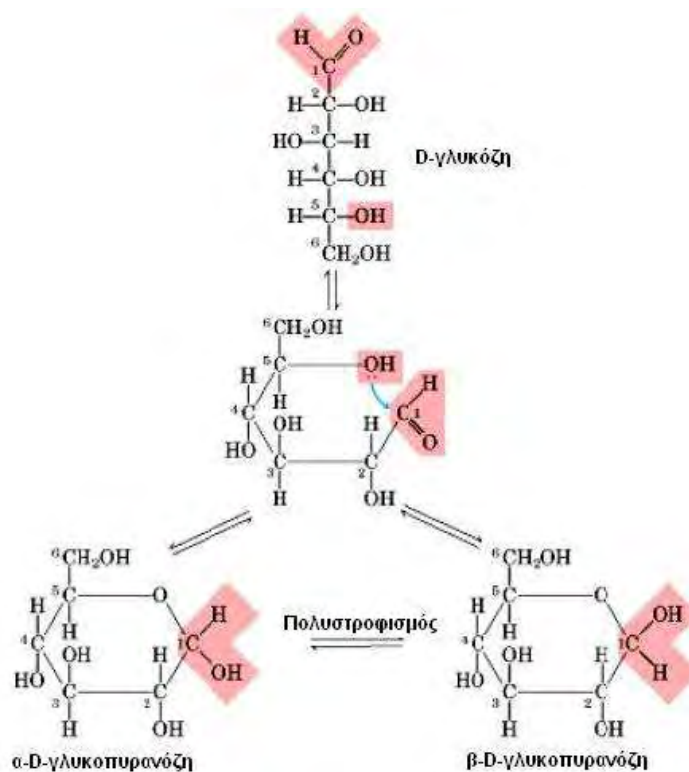
Οι μονοσακχαρίτες, οι απλούστεροι υδατάνθρακες, είναι αλδεύδες ή κετόνες με δύο ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Οι μικρότεροι μονοσακχαρίτες με $n=3$ είναι η διυδροξυακετόνη και η D- ή L-γλυκεραλδεΐδη και αναφέρονται ως τριόζες. Απλοί μονοσακχαρίτες με τέσσερα, πέντε, έξι και επτά άτομα άνθρακα καλούνται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

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

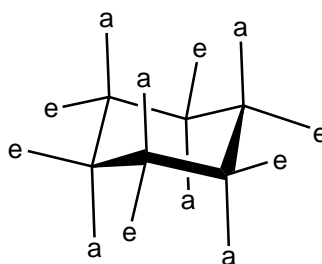
χωρίζονται αναλόγως με το μέγεθος της αλυσίδας του άνθρακα, παραδείγματος χάριν σε πεντόζες, αν έχουν πέντε μόρια άνθρακα, ή εξόζες αν έχουν έξι.

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.



Εικόνα 1: Κυκλοποίηση μονοσακχαρίτη μέσω αντίδρασης ημιακετάλης.

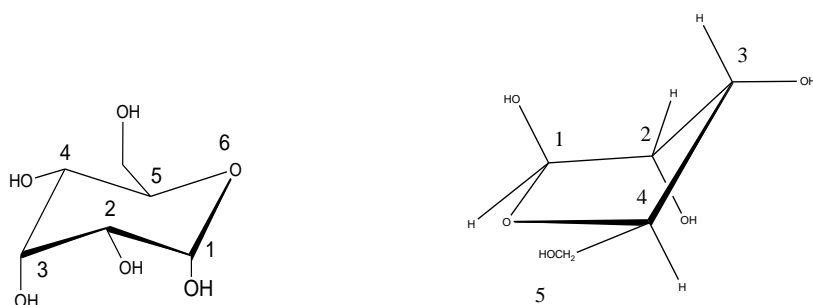
Η στερεοδιάταξη του δακτυλίου παρουσιάζει επίσης ενδιαφέρον λόγω της συμπεριφοράς των υποκαταστατών του, όσον αφορά την διάταξή τους σε σχέση με το επίπεδο του δακτυλίου. Συγκεκριμένα διακρίνονται δυο είδη υποκαταστατών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί. Ως αξονικοί υποκαταστάτες ορίζονται οι υποκαταστάτες 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) υποκαταστάτες και ισημερινοί (e) υποκαταστάτες.

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).



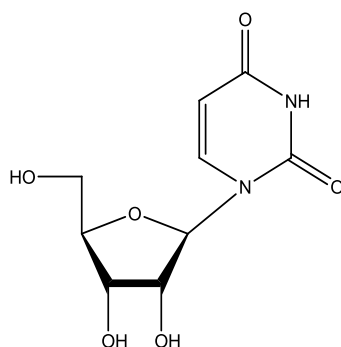
Εικόνα 3: Μορφές ανάκλιντρου και φακέλου.

1.3 Νουκλεοζίτες και ανάλογά τους

Οι νουκλεοζίτες αποτελούν θεμελιώδη συστατικά των διαφόρων βιολογικών συστημάτων. Απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στη φύση διότι αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των νουκλεοτιδίων, των βασικών δομικών μονάδων του γενετικού υλικού, καθώς επίσης και το υπόστρωμα των πολυμερασών για τη σύνθεση DNA και RNA. Έχει βρεθεί ότι οι νουκλεοζίτες επιδεικνύουν σημαντική αντικαρκινική, αντιβακτηριδιακή και αντιϊκή δράση (Zhou W. et al, 2004; Perigaud C. et al, 1992). Ιδίως τις τελευταίες δυο δεκαετίες η σύνθεση και η μελέτη των νουκλεοζιτών έχει ανέλθει κατακόρυφα με στόχο τη θεραπεία του ιού HIV (Verheggen I. et al, 1993), του έρπητα (Zhou W. et al, 2004; De Clercq E, 2002) και της ηπατίτιδας (Brady RC, et al, 2004).

Ο νουκλεοζίτης αποτελείται από μια πουρινική (αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδινική (θυμίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη) βάση ενωμένη με μια πεντόζη. Αναλόγως αν η πεντόζη είναι η ριβόζη ή η δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης. Η ένωση νουκλεοζίτη με φωσφορικό οξύ ονομάζεται νουκλεοτίδιο (ή εστέρας του νουκλεοζίτη) το οποίο πάλι αναλόγως τη φύση της πεντόζης καλείται ριβονουκλεοτίδιο ή δεοξυριβονουκλεοτίδιο. Πολλά νουκλεοτίδια που ενώνονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς αποτελούν τις δομικές μονάδες των νουκλεϊκών οξέων. Η φωσφορική ομάδα στην 5' θέση ενός νουκλεοτιδίου εστερεοποιείται με την ελεύθερη υδροξυλομάδα στην 3' θέση του επόμενου νουκλεοτιδίου, κ.ο.κ. Μ'αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται δινουκλεοτίδια, τρινουκλεοτίδια, τετρανουκλεοτίδια, ολιγονουκλεοτίδια και τέλος, πολυνουκλεοτίδια. Δημιουργείται στα νουκλεϊνικά οξέα ένα μόρφωμα που έχει ως ραχοκοκαλιά μια αλληλουχία από φωσφορικά και ριβόζες που επάνω τους είναι αγκιστρωμένες οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης. Ανάλογα αν το νουκλεϊκό οξύ περιέχει D-ριβόζη ως υδατάνθρακα, ονομάζεται ριβονουκλεϊνικό οξύ, ενώ αν περιέχει D-2-δεοξυριβόζη ονομάζεται δεοξυριβονουκλεονικό οξύ, τα γνωστά RNA και DNA, αντίστοιχα (Γεωργιάτσου, 1993).

Στους νουκλεοζίτες η ετεροκυκλική βάση ενώνεται στη θέση 1' της πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό, κατά τον οποίο η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου. Οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β (εικόνα 4).



Εικόνα 4. Ουριδίνη(U)

Η χημεία των νουκλεοζιτών αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά αντικείμενα στην οργανική σύνθεση. Μεγάλος αριθμός ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη, σύνθεση και βιολογική ταυτοποίηση νουκλεοζιτών και νουκλεοζιτικών αναλόγων. Επίσης, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιϊκή και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες, έχουν γίνει τροποποιήσεις δομής τόσο στο τμήμα της βάσης όσο και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών δραστηριοτήτων τους.

1.4 Θεραπευτικός τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών.

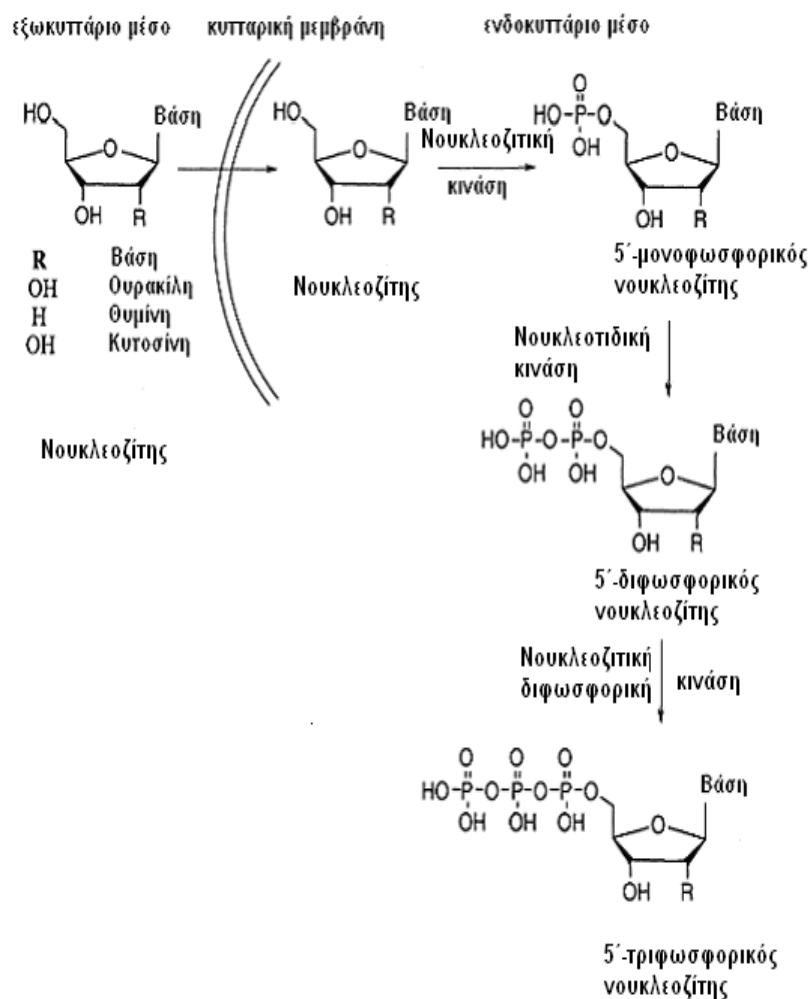
Τα αντιϊκά φάρμακα σχεδιάζονται με βάση τις διαδικασίες κύκλου ζωής ενός ιού (Clercq et al. 2002). Οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν την προσρόφηση του ιού στο κύτταρο, την συγχώνευσή του σε αυτό, την σύνθεσή του ιϊκού DNA και RNA και τέλος τις λειτουργίες των ενζύμων του ιού. Σκοπός των αντιϊκών φαρμάκων είναι η ανασταλτική τους δράση σε μία ή και περισσότερες από τις παραπάνω διαδικασίες του κύκλου ζωής του ιού, συνήθως στη σύνθεση του ιϊκού DNA και RNA.

Ο κύριος λόγος που τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται ευρέως στην αντιμετώπιση του καρκίνου και του AIDS, είναι η δυνατότητα τους να τροποποιούνται δομικά, ώστε να προκύπτουν φαρμακολογικά ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Παρεμβαίνουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και προωθούν είτε αντιπολλαπλασιαστικές

λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή του ιού στα μολυσμένα κύτταρα (Pastor-Anglada et al. 1998)

Τα αντικαρκινικά και αντιϊικά νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση (Arner and Eriksson, 1995). Τα μη φωσφορυλιωμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες-μεταφορείς νουκλεοζιτών, διαπερνώντας την κυτταρική μεμβράνη. Φωσφορυλιώνονται στη συνέχεια προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιϊκά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιϊκό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA.

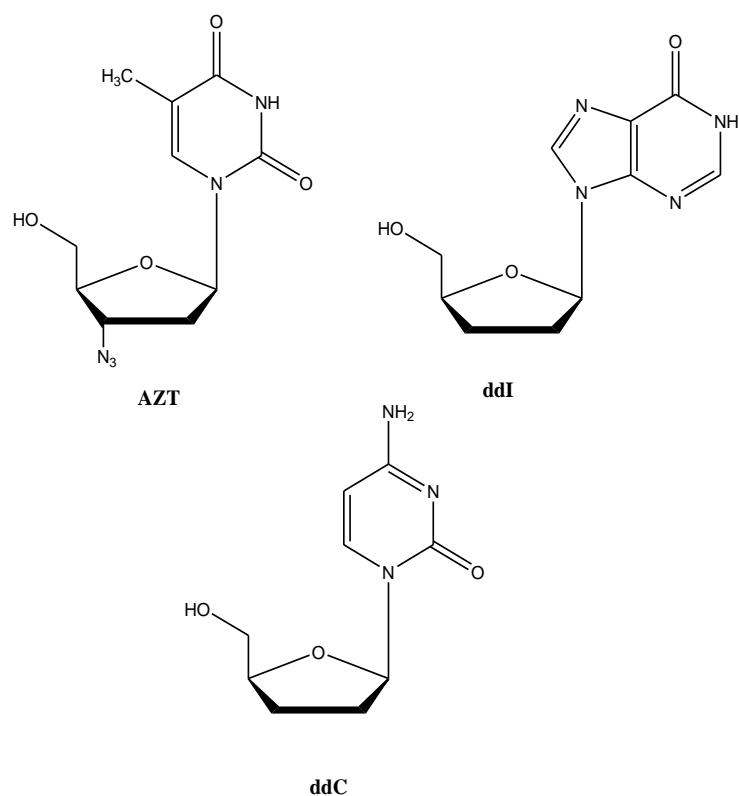
Για να επιτευχθεί η πρώτη φωσφορυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (MP) συνήθως καταλύεται από μία νουκλεοζιτική κινάση. Η συγκεκριμένη κινάση κωδικοποιείται από το κύτταρο-ξενιστή ή τον ιό που μολύνει το κύτταρο-ξενιστή (Balzarini 1993, Wagner et al. 2000). Οι μονοφωσφορικοί νουκλεοζίτες (MP) μετατρέπονται προς τις αντίστοιχες 5'-διφωσφορικές και τριφωσφορικές δομές τους καταλυόμενοι από νουκλεοτιδικές κινάσες, καθώς και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντίστοιχα (εικόνα 5). Συνεπώς, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι ιϊκές κινάσες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών.



Εικόνα 5. Τροποποίηση των νουκλεοζιτικών αναλόγων προς την ενεργή τους μορφή μέσω ενδοκυτταρικής φωσφορυλίωσης

1.4.1 Αντικα νουκλεοζιτικά ανάλογα

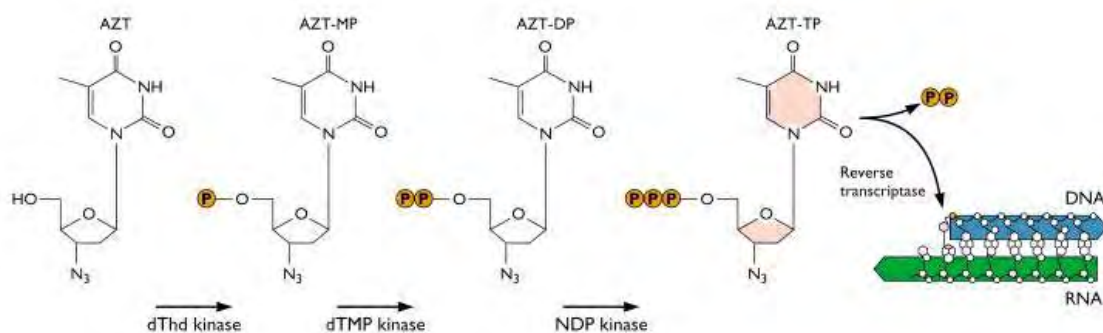
Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα από τα νουκλεοζιτικά αυτά ανάλογα είναι το zidovudine (**AZT**), το didanosine (**DDI**) και το zalcitabine (**DDC**), τα οποία χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα έναντι του HIV. Οι χημικές τους δομές φαίνονται παρακάτω (εικόνα 6)



Εικόνα 6. Χημικές δομές των **AZT**, **ddI**, **ddC**

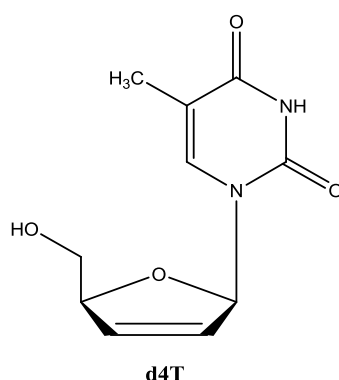
Πρόκειται για 2',3'-διδεοξυνουκλεοζίτες που προκύπτουν από την απομάκρυνση των υδροξυλομάδων από τις 2',3'- θέσεις του δακτυλίου της ριβόζης. Δρουν σαν αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Hiroguki et al. 2004). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το ένζυμο που χρησιμοποιεί ο ιός για να συνθέσει το νέο DNA με μήτρα το ιϊκό RNA. Το ένζυμο αυτό συνθέτει μια αλυσίδα DNA συμπληρωματική με το RNA. Τα συγκεκριμένα ανάλογα νουκλεοζιτών αναστέλλουν τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή του ιϊκού DNA.

Το AZT (3'-αζιδο-2'-δεοξυθυμιδίνη) ήταν το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία του AIDS (www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrn) Φωσφορυλιώνεται από τα κυτταρικά ένζυμα στην ενεργή του μορφή και δρα ως αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης τερματίζοντας την αλυσίδα μόλις συνδεθεί στο DNA (εικόνα 7). Επειδή έχει την αζιδο ομάδα αντί για την υδροξυλομάδα, η επόμενη βάση δεν μπορεί να ενωθεί και η σύνθεση της αλυσίδας τερματίζεται.



Εικόνα 7. Τερματισμός της αλυσίδας του ιικού DNA από το φωσφορυλιωμένο AZT

Το συνθετικό ενδιαφέρον στράφηκε επίσης στους 2',3'-ακόρεστους νουκλεοζίτες, όπου η 3'-δεοξυ-2',3'-διδεϋδροθυμιδίνη (d4T) δρα επίσης σαν αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης στην θεραπεία κατά του AIDS (Brossette et al. 2001). Η χημική δομή του d4T απεικονίζεται στην (εικόνα 8) της επόμενης σελίδας :



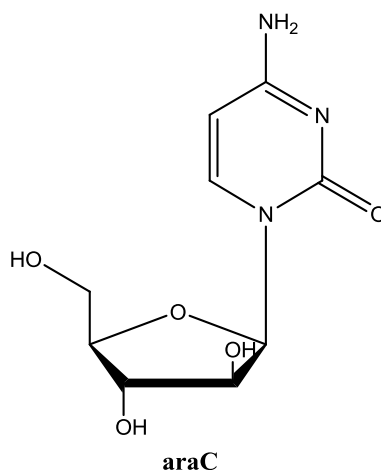
Εικόνα 8. Χημική δομή της **D4T**

1.4.2 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα

Πυριμιδινικά αλλά και πουρινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται ήδη σαν αντιμεταβολίτες έναντι του καρκίνου. Οι αντιμεταβολίτες είναι μια οικογένεια

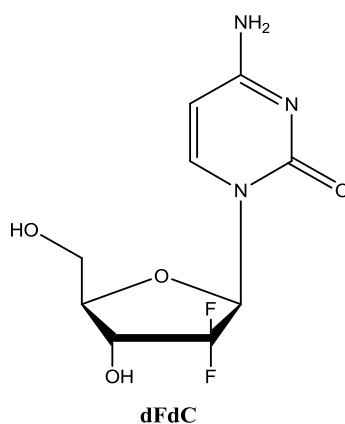
φαρμάκων που επηρεάζουν την ανάπτυξη του DNA και του RNA των καρκινικών κυττάρων.

Ένα από τα πρώτα πυριμιδινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιήθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας ήταν το cytarabine (araC ή 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη) (εικόνα 9) (Ellison et al. 1967).



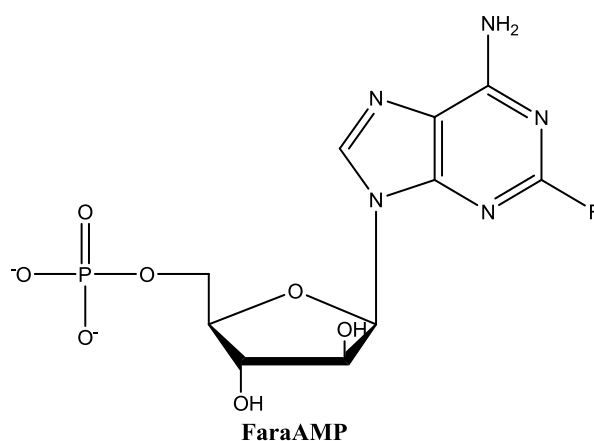
Εικόνα 9. Χημική δομή του **araC**

Η γεμισιταμπίνη (gemcitabine ή dFdC) είναι ένα ακόμη πυριμιδινικό ανάλογο που παρουσιάζει αντικαρκινική δράση (Plunkett et al. 1995). Είναι ανάλογο του cytarabine, το οποίο έχει τροποποιηθεί στην 2' θέση του δακτυλίου της ριβόζης με υποκατάσταση από 2 άτομα φθορίου (εικόνα 10)



Εικόνα 10. Χημική δομή του **gemcitabine (dFdC)**

Ένα από τα πρώτα πουρινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα η 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλαδενίνη (araA) απορρίφθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας λόγω της χαμηλής διαλυτότητας και της γρήγορης απαμίνωσής της από την απαμινάση της αδενοσίνης. Η προσθήκη ενός ατόμου φθορίου στο τμήμα της αδενίνης αύξησε την αντίσταση στην απαμινάση της αδενοσίνης και η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας βελτίωσε τη διαλυτότητα του αναλόγου, συνθέτοντας την 5'-μονοφωσφορική 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-2-φθοροαδενίνη (fludarabine), (FaraAMP) (Matsuda et al. 2004). Το fludarabine είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας κατά της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων (εικόνα 11).

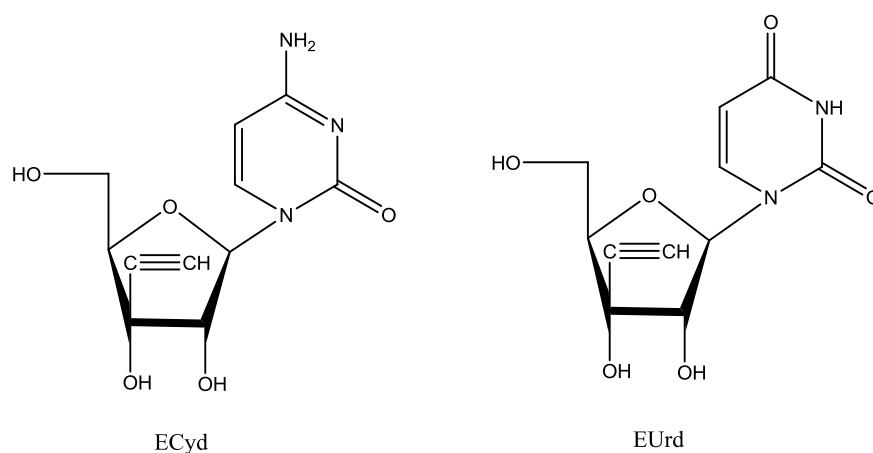


Εικόνα 11. Χημική δομή του **fludarabine**

1.4.3 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με διακλάδωση την αιθύνυλο ομάδα

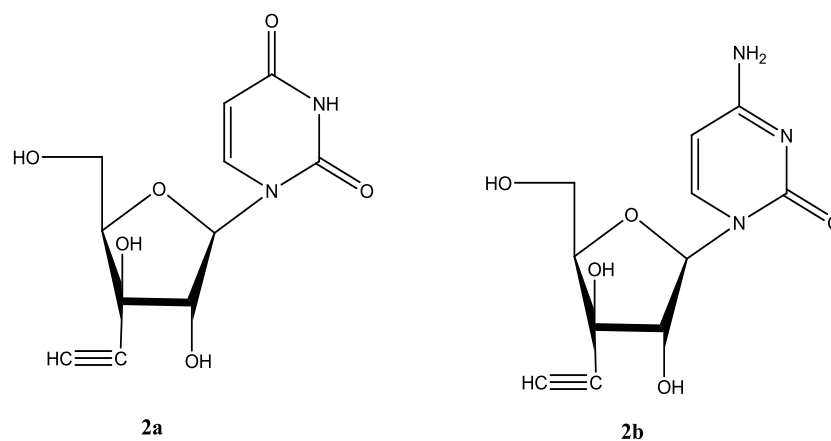
Σε μια μελέτη το 1996 του Hideshi Hattori διαπιστώθηκε ότι οι νουκλεοζίτες της ουρακίλης και της κυτοσίνης (εικόνα 12) που φέρουν αιθύνυλο ομάδα ως διακλαδισμένη αλυσίδα στο τμήμα του σακχάρου εμφανίζουν εξαιρετικές αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι ECyd και EUrd δοκιμάστηκαν *in vitro* σε 36 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η ECyd ήταν αποτελεσματική σε 22 κυτταρικές σειρές, ενώ αντίστοιχα η EUrd σε 12. Και οι δύο νουκλεοζίτες είχαν παρόμοιο φάσμα παρεμποδιστικής λειτουργίας και συνεπώς παρόμοιο μηχανισμό αντικαρκινικής δράσης. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ECyd και EUrd έχουν πιο ισχυρή αντικαρκινική λειτουργία ενάντια σε καρκινικούς όγκους απ' ό,τι κάποιες άλλες ουσίες που συχνά χρησιμοποιούνται κλινικά (Matsuda et al. 1996). Μάλιστα η EUrd παρουσίασε επίσης

σημαντική αντικαρκινική λειτουργία ενάντια σε ανθρώπινους όγκους, που εισήχθησαν σε ποντίκια σαν ξενομοσχεύματα.



Εικόνα 12 . Χημικές δομές της ECyd και EUrd

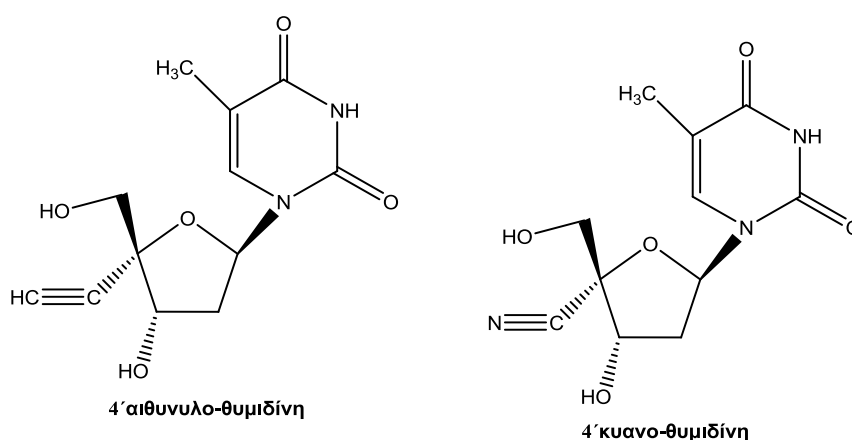
Μελετήθηκε επιπλέον η σχέση μεταξύ δομής και λειτουργίας των ECyd και EUrd (Hideshi et al. 1998). Συντέθηκαν οι 1-(3'-C-αιθυνυλο-β-D-ξυλο-πεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη και ουρακίλη, οι οποίες είναι 3' επιμερή των ECyd και EUrd (εικόνα 13). Η βιολογική δράση αυτών των ξυλο παραγώγων ήταν σημαντικά μικρότερη, παρόλο που είχαν τόσο την αιθυνυλο ομάδα όσο και το υδροξύλιο στην 3'-θέση του σακχάρου. Αποδεικνύεται δηλαδή ότι η παρουσία μιας 2',3'- cis διόλης στην ECyd και EUrd με μια ριβο-διαμόρφωση ήταν απαραίτητη για την κυτταροτοξικότητά τους.



Εικόνα 13. 3' επιμερή των ECyd και EUrd

Όσον αφορά το μεταβολισμό της, η ECyd φωσφορυλιώνεται στα κύτταρα προς το μονοφωσφορικό, διφωσφορικό και τελικά τριφωσφορικό της παράγωγο (Makoto et al. 2003). Το πρώτο βήμα από την ECyd στην ECMP καταλύεται από την ουριδινική/κυτιδινική κινάση. Το τριφωσφορικό παράγωγο της κυτιδίνης (ECTP) είναι ένας ενεργός μεταβολίτης της ECyd και παρεμποδίζει την RNA πολυμεράση I, II και III χωρίς εκλεκτικότητα προκαλώντας παρεμπόδιση της σύνθεσης του RNA. Η ECyd κατανέμεται σε μεγάλο ποσοστό σε καρκινικούς ιστούς (in vivo), στους οποίους η ενεργοποίηση της ουριδινικής/κυτιδινικής κινάσης είναι υψηλότερη από τους κανονικούς ιστούς. Αυτά τα δεδομένα θα μπορούσαν να εξηγήσουν την υψηλή ενεργοποίηση και τη χαμηλή τοξικότητα της ECyd ενάντια σε διάφορους τύπους καρκίνου.

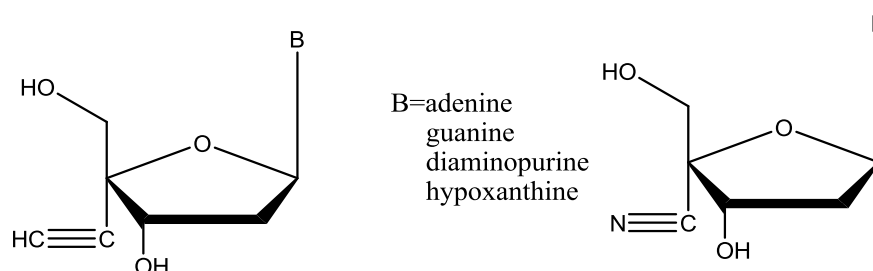
Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον προέκυψε και από την ανακάλυψη της ισχυρής αντι- HIV δράσης των 4'-κυανο και 4'-αιθυνολο αναλόγων της θυμιδίνης (εικόνα 14) (O-Yang et al. 1992 και Kodama et al. 2001).



Εικόνα 14 . Δομή 4'- υποκατεστημένων νουκλεοζιτών της θυμίνης

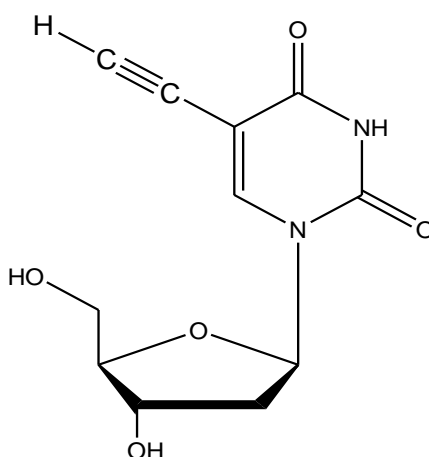
Οι πουρανο 2'-δεοξυ νουκλεοζίτες που διαθέτουν μια αιθυνολο ή κυανο ομάδα στον 4' άνθρακα του σακχάρου, εμφανίζουν επίσης πολύ ισχυρή αντι- HIV δράση, παραμένοντας ενεργοί απέναντι σε ανθεκτικά στελέχη του HIV (Satoru et al. 2003). Μάλιστα, επειδή τα 4-C-κυανο σάκχαρα έχουν χαμηλή δραστηριότητα στις αντιδράσεις τους με τις βάσεις, προτιμάται να παρασκευάζονται τροποποιώντας ήδη τους

αντίστοιχους νουκλεοζίτες στην 4' θέση. Η δομή των νουκλεοζιτών απεικονίζεται στην εικόνα 15.



Εικόνα 15. Δομές των αιθυνυλο και κυανο πουρανο 2'-δεοξυ νουκλεοζιτών

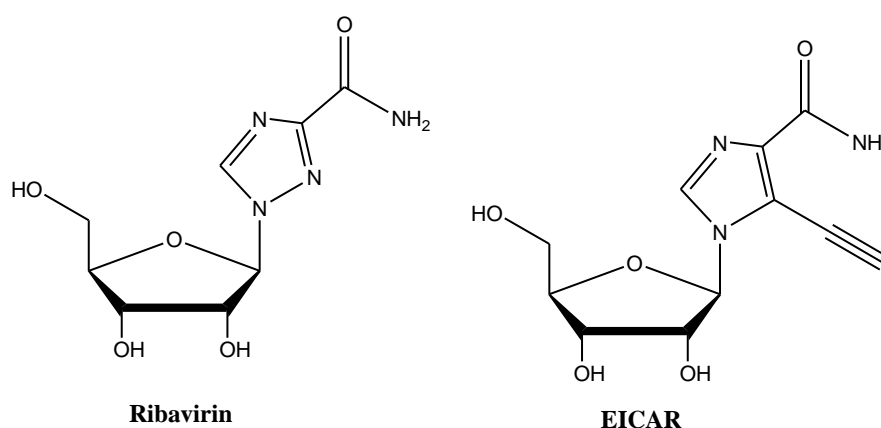
Η παρουσία της αιθυνυλο ομάδας στην ετεροκυκλική βάση οδήγησε επίσης σε νουκλεοζίτες με έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Η 5-αιθυνυλο-2'-δεοξυ ουριδίνη (εικόνα 16) παρουσίασε αυξημένη δράση έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών του ανθρώπινου μαστού MCF-7 και MDA-MB-231, ξεπερνώντας την αντίστοιχη της 5-φθορο ουρακίλης (Srinivasarao et al. 2007).



Εικόνα 16. Χημική δομή της 5-αιθυνυλο-2'-δεοξυ ουριδίνης

Επιπλέον, το 5-αιθυνυλο-1-β-D-ριβοφουρανοζυλο-1^H-ιμιδαζολο-4 καρβοξαμίδιο (EICAR) που επίσης φέρει την αιθυνυλο ομάδα στην ετεροκυκλική βάση παρουσιάζει

εξαιρετικές αντιϊκές ιδιότητες. Συγκεκριμένα η αντιϊκή του λειτουργία είναι από 10 έως 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του ribavirin (Minakawa et al. 1999), του μόνου διαθέσιμου φαρμάκου που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C σε συνδυασμό με το interferon-α (De Clercq et al. 2002). Επιπλέον της αντιϊκής του δράσης, το EICAR επιδεικνύει αντικαρκινική λειτουργία και εμποδίζει την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών κυττάρων in vitro (Minakawa et al. 1991). Στην παρακάτω (εικόνα 17) απεικονίζονται οι δομές των Ribavirin και EICAR.

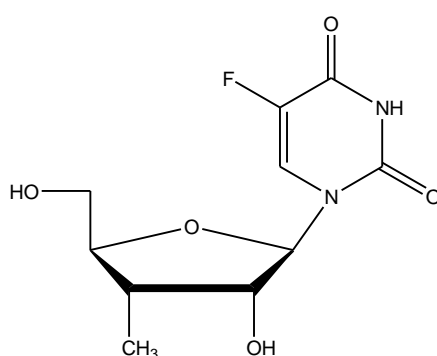


Εικόνα 17. Χημικές δομές του **Ribavirin** και **EICAR**

1.4.4. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με υποκατάστες μεθύλια

Έχει διαπιστωθεί από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα ότι νουκλεοζιτικά ανάλογα που φέρουν υποκαταστάτες μέθυλο-ομάδες εμφανίζουν σημαντική δράση. Αυτό αποτέλεσε ένα άκρως σημαντικό σημείο εκκίνησης για να προσελκύσει ακόμα περισσότερο το επιστημονικό ενδιαφέρον για εύρεση νέων βιολογικά ενεργών νουκλεοζιτών με διακλάδωση μεθύλια τόσο στο τμήμα του σακχάρου όσο και στο τμήμα της βάσης. Γενικά μια μεθυλο-ομάδα είναι μια πολύ σταθερή ομάδα στα περισσότερα μόρια και όταν ενωθεί με χημικά ή βιολογικά

δραστικές λειτουργικές ομάδες σχηματίζονται νέα αποτελεσματικά μόρια. Στο εργαστήριο Βιο-οργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας συντέθηκαν υποκατεστημένοι νουκλεοζίτες με διακλάδωση μεθυλο-ομάδα (N.Kollatos et al. 2015) οι οποίοι έχουν εμφανίσει αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση. Πιο συγκεκριμένα η 1(3'-Deoxy-3'-C-methyl-β-D-ribofuranosyl)5-fluorouracil(εικόνα18)επέδειξε εξαιρετική ανασταλτική δράση έναντι κυττάρων λευχαιμίας ποντικού (L1210), ανθρώπινου λεμφώματος (CEM) καθώς και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa) .



Εικόνα 18. 1(3'-Deoxy-3'-C-methyl-β-D-ribofuranosyl)5-fluorouracil

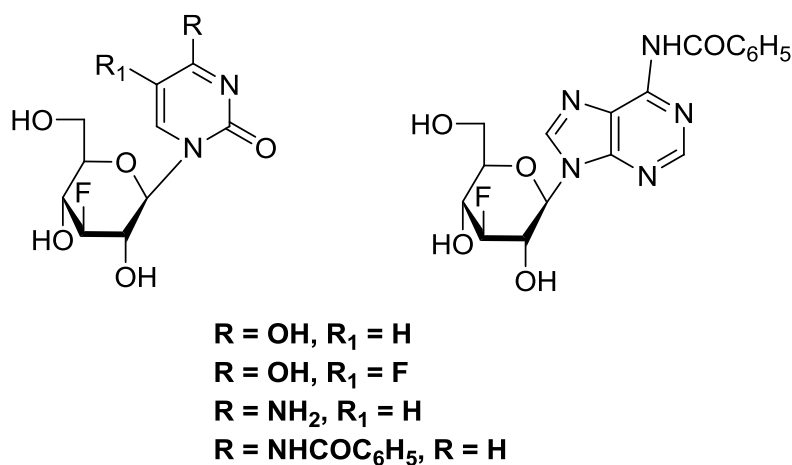
1.4.5 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη

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(A) ουράς) (εικόνα 19). 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).

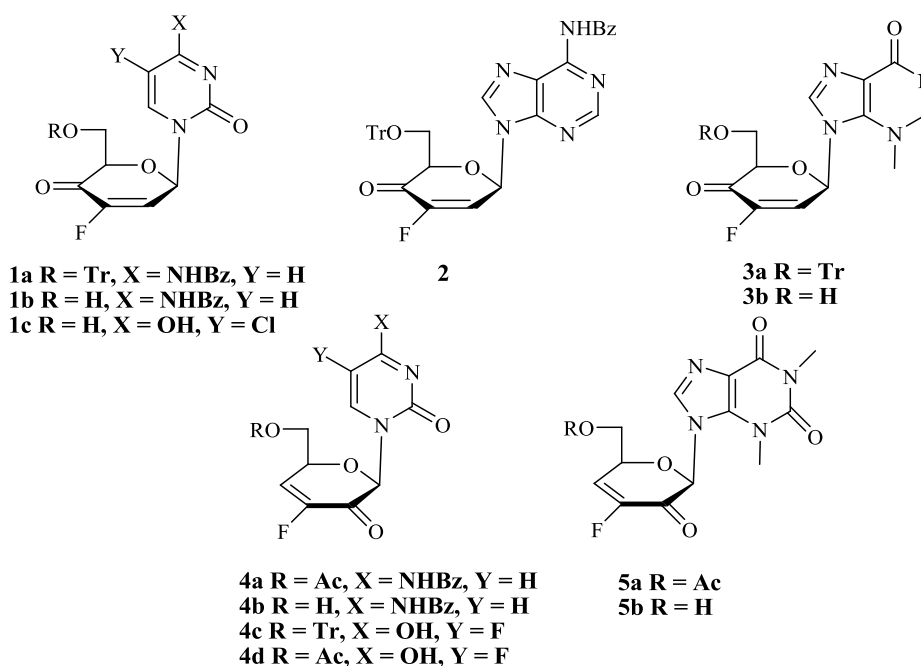


Εικόνα 19

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).

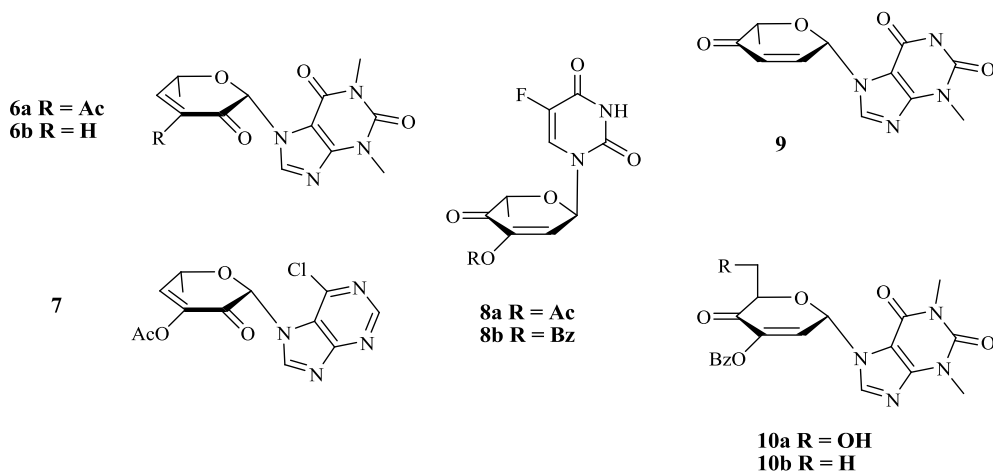
Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφτεί νέες σειρές βιολογικά ενεργών ακόρεστων νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο. Οι ακόρεστοι φθορο κετοπυρανονουκλεοζίτες, οι οποίοι συντέθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (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 αντικές και τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες (ενώσεις **1-5**, εικόνα 20). Αξιοσημείωτη είναι η αντική δράση εναντι του εντεροϊού (rotavirus), που επέδειξαν οι ενώσεις **1a,b**, **2** και **4a,b**.



Εικόνα 20

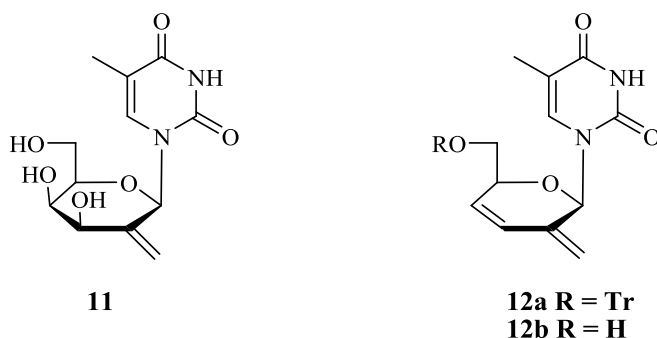
Επιπρόσθετα, ακόρεστα κετοπυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα παρουσίασαν, σε προηγούμενες μελέτες, σημαντική ανασταλτική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών

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 21).



Εικόνα 21

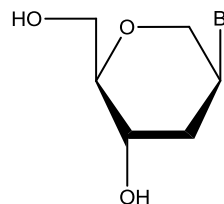
Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας συντέθηκε επίσης μια νέα ενδιαφέρουσα σειρά εξομεθυλενικών και ακόρεστων εξομεθυλενικών πυρανονουκλεοζιτών (Agelis et al. 2007), οι οποίοι επίσης παρουσίασαν σημαντική αντική δράση έναντι του εντεροϊού (ενώσεις **11** και **12a**, εικόνα 22).



Εικόνα 22

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 φυσιικές 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 αντική, 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 αντική 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 23) (Verheggen I. et al, 1993, Verheggen I. et al, 1995).



13

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

Εικόνα 23. Δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες

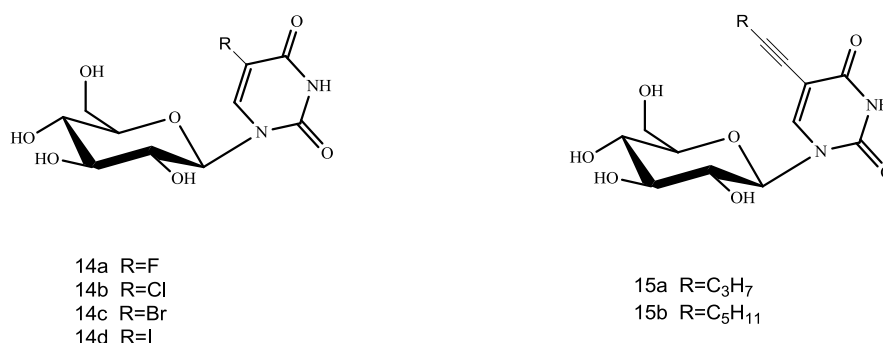
2.Ειδικό Μέρος

2.1 Στόχος –Σκοπός μελέτης

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση τροποποιημένων πυρανονουκλεοζιτών στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης, με σκοπό την εύρεση νέων αντικαρκινικών και αντιϊκών παραγόντων. Οι νέοι νουκλεοζίτες στοχεύουν στο να καλύψουν την όλο και αυξανόμενη ανάγκη για φάρμακα με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και αυξημένη αποτελεσματικότητα και σταθερότητα.

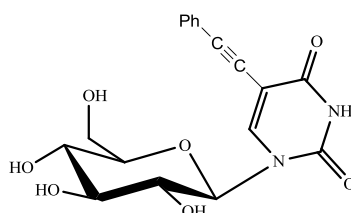
Νουκλεοζιτικά ανάλογα, ως πιθανοί αναστολείς μεταβολισμού νουκλεϊνικών οξέων, παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη θεραπεία των ασθενών με καρκίνο και καταστροφικές ιογενείς λοιμώξεις. Εκτεταμένες μετατροπές έχουν γίνει τόσο στην ετεροκυκλική βάση όσο και στο τμήμα του σακχάρου για την αναζήτηση αποτελεσματικών και επιλεκτικών παραγώγων με βελτιωμένη βιολογική δράση.

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον μας για τους τροποποιημένους νουκλεοζίτες, μας οδήγησε στη σύνθεση πυρανονουκλεοζιτών με τροποποιημένο σάκχαρο, των οποίων η δράση αποδείχτηκε αντιοξειδωτική και κυτταροτοξική έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων. Σχεδόν ταυτόχρονα, δώσαμε ιδιαίτερη προσοχή στους νουκλεοζίτες με τροποποιημένη βάση, καθώς ήταν γνωστό ότι οι C5-υποκατεστημένοι νουκλεοζίτες πυριμιδίνης έχουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες, όπως αντικές και αντικαρκινικές. Στο εργαστήριο Βιο-οργανικής χημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έχει ήδη πραγματοποιηθεί η σύνθεση των C5-αλογονο και C5-αλκυνυλογλυκοπυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης (ενώσεις 14 και 15, αντίστοιχα, εικόνα 24), οι οποίοι έχουν εμφανίσει αξιοσημείωτες κυτταροτοξικές ιδιότητες και επιπλέον έχουν αποδειχθεί ισχυροί αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου



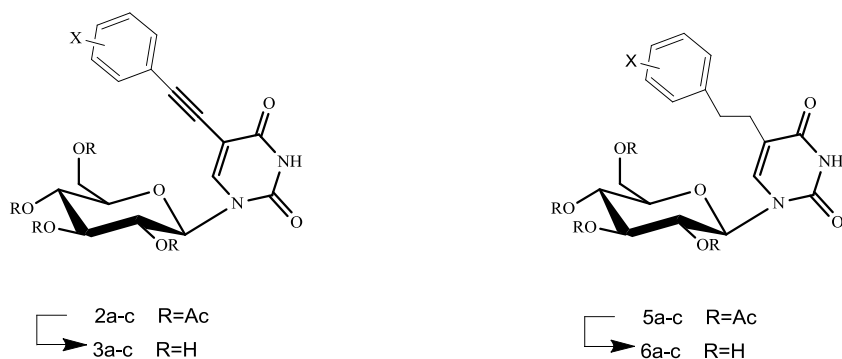
Εικόνα 24

Το πιο αποτελεσματικό ανάλογο έναντι της ανάπτυξης τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών (L1210, CEM, HeLa) αποδείχθηκε ο νουκλεοζίτης που φέρει φαινολικό δακτύλιο στην 5-θέση της ουρακίλης, παρουσιάζοντας $IC_{50} \approx 5-6 \mu M$ (εικόνα 25).



Εικόνα 25

Βασιζόμενοι στην αξιοσημείωτη δράση του ανωτέρω πυρανονουκλεοζίτη και ως συνέχεια του μακροπρόθεσμου ενδιαφέροντός μας στους τροποποιημένους στην ετεροκυκλική βάση πυρανονουκλεοζίτες, θεωρήσαμε ενδιαφέρουσα την εισαγωγή διαφόρων υποκαταστατών στο φαινολικό δακτύλιο καθώς και την μερική και πλήρη αναγωγή των τριπλών δεσμών αυτών των τροποποιημένων πυρανονουκλεοζιτών με στόχο τη δημιουργία νέων αποτελεσματικότερων παραγόντων. Στην παρούσα εργασία αναφέρουμε τη σύζευξη διαφόρων υποκαταστατών με το φαινολικό δακτύλιο των πυρανονουκλεοζιτών της 5I-ουρακίλης. Η σύζευξη αυτή, γνωστή ως αντίδραση Sonogashira, επιτεύχθηκε με μια αποτελεσματική και εξαιρετικά ταχεία και υψηλής απόδοσης μεθοδολογία υποβοηθούμενη από μικροκύματα. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή μεθυλομάδων στο φαινολικό δακτύλιο. Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η μερική και πλήρης αναγωγή του τριπλού δεσμού των μορίων αυτών. Επιπλέον μελετήθηκε η κυτταροτοξική δράση των νεοσυντιθέμενων ενώσεων τόσο των ακετυλιωμένων όσο και των αντίστοιχων αποπροστατευμένων



όπου X= α)2,5-CH₃

β)2,4,5-CH₃

γ) 3,4,5-OCH₃

Εικόνα 26

3.Υλικά και μέθοδοι

3.1 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 (Ac₂O) (Aldrich, Γερμανία)
- Πυριδίνη (Panreac, Ισπανία)
- Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH) (Merck, Γερμανία)
- Hexamethyldisilazane (HMDS) (Aldrich, Γερμανία)
- Trimethylsilyltrifluoromethane (Me₃SiOSO₂CF₃) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Υδρίδιο του ασβεστίου (CaH) (Fluca, Γερμανία)
- Ακετονιτρίλιο (CH₃CN) (Merck, Γερμανία)
- Πεντοξείδιο του φωσφόρου (P₂O₅) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bicarbonate (NaHCO₃) (Merck, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bisulfate (NaHSO₄) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδροθειικό νάτριο (Na₂SO₄) (Merck, Γερμανία)

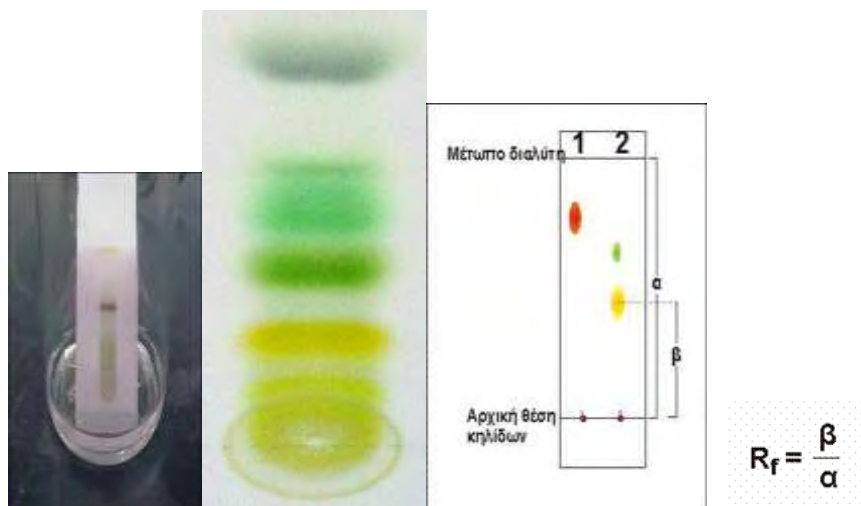
3.2 Γενική μεθοδολογία

3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC:Thin layer chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου λεπτής στιβάδας TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₄) πάχους 0.2mm.

Το διάλυμα του υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς θαλάμου στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Ακολούθως ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Ύστερα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε μορίου στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης R_f, που ορίζεται από το λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη (α). Η τιμή R_f ενός συγκεκριμένου μορίου χρησιμεύει για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254nm ή 356nm) ή μετά από ψεκασμό με διάλυμα H₂SO₄ (θειϊκού οξέος) 30%.

Μια χρωματογραφία λεπτής στιβάδας απεικονίζεται παρακάτω:



3.2.2 Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η πλειοψηφία των καθαρισμών οργανικών ουσιών πραγματοποιούνται μέσω της χρωματογραφίας μιας τεχνικής κατά την οποία το επιθυμητό προϊόν διαλύεται σε έναν οργανικό διαλύτη ή σύστημα διαλυτών σε συγκεκριμένη κάθε φορά αναλογία και στη συνέχεια αφήνεται να διαρρεύσει μέσω ενός κατακόρυφου γυάλινου σωλήνα ο οποίος είναι γεμάτος με προσροφητικό υλικό. Το προς διαχωρισμό μείγμα ονομάζεται κινητή φάση ενώ το προσροφητικό υλικό εντός του σωλήνα στατική. Επειδή οι διαφορετικές ενώσεις προσροφώνται στη στατική φάση σε διαφορετική έκταση, μετακινούνται διαμέσου αυτής με διαφορετικές ταχύτητες και για το λόγο αυτό, εξέρχονται από τη στήλη –εκλύονται- από το άκρο της. Ο χρόνος έκλουσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα από την πολικότητά της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες προσροφώνται κατά κανόνα, εντονότερα και άρα μετακινούνται βραδύτερα μέσω της στατικής φάσης σε σχέση με τα περισσότερα άπολα.

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

Η χρωματογραφία διεκπεραιώθηκε χρησιμοποιώντας τα παρακάτω συστήματα διαλυτών :

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας/ εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας 100

3.2.3 Ξήρανση διαλυτών

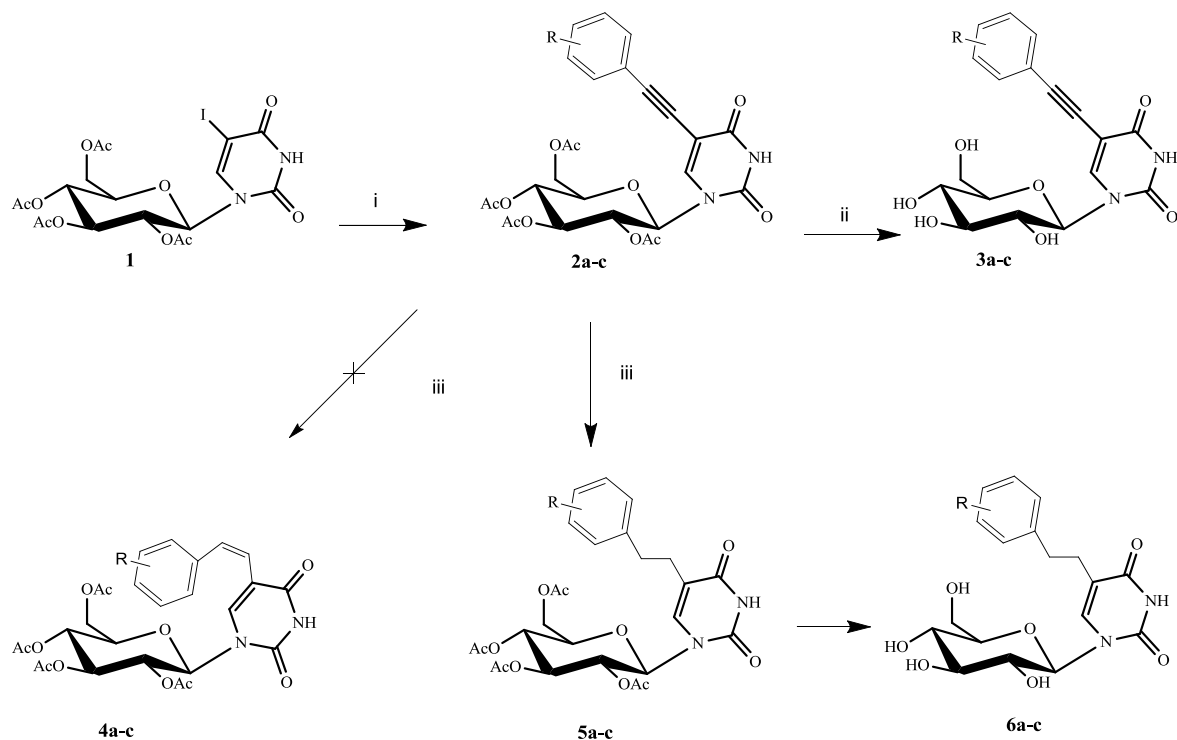
Ορισμένες από τις αντιδράσεις που περιγράφονται, επιβάλλουν την χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο CH_3CN και Ν,N-διμέθυλοφορμαμίδιο DMF. Η ξήρανση του CH_3CN γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA (molecular sieves). Το DMF φυλάσσεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA .

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 ^1H 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 ^1H . 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.

4. Μέθοδοι

4.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού



όπου R: a) 2,5-(CH₃)
b) 2,4,5 -(CH₃)
c) 3,4,5 -(OCH₃)

Εικόνα 27. Επισκόπηση της σύνθεσης των C5-υποκατεστημένων-πυρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης

4.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης

Η πορεία της σύνθεσης ξεκίνησε με τη σύζευξη του εμπορικά διαθέσιμου νουκλεοζίτη 1(2,3,4,6-τετράκις-Ο-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-ιωδοουρακίλη(**1**) με διάφορους υποκαταστάτες. Στη σύζευξη αυτή γνωστή ως αντίδραση Sonogashira ο νουκλεοζίτης (**1**) διαλύεται σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), προστίθεται το κατάλληλο αλκύνιο, τριαιθυλαμίνη (Et₃N), ιωδιούχος χαλκός (CuI) (συγκатаλύτης) και τετράκις τριφαινυλοφωσφορικό παλλάδιο [Pd(PPh₃)₄] (καταλύτης)

και πραγματοποιείται η σύζευξή υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων σε συνθήκες 60°C, 5min, 200Watt, 250 PSI προς σχηματισμό των 1(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζυλο) αλκυνυλο-νουκλεοζιτών (**2**).

Μετά ακολούθησε η αποπροστασία των νουκλεοζιτών (**2**) χρησιμοποιώντας διαλύτη MeOH και μεθοξείδιο του νατρίου (MeONa) υπό συνεχή ανάδευση για 2 ώρες, εξουδετέρωση με όξινη ρητίνη μέχρις ότου pH≈7 και διήθηση. Τα τελικά προϊόντα είναι οι πλήρως αποπροστατευμένοι 1-(β-D-γλυκοπυρανόζυλο) αιθύνυλο-νουκλεοζίτες(**3**).

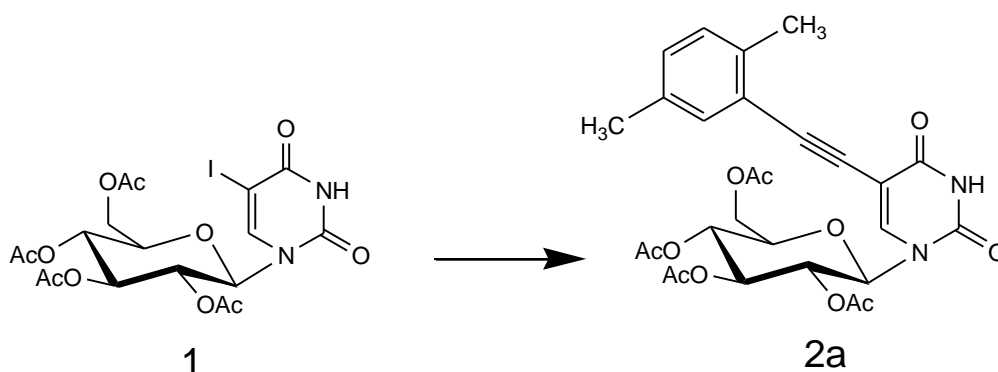
Με στόχο την περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης δομής-βιολογικής δράσης, επόμενο στόχο αποτέλεσε η σύνθεση των cis-νουκλεοζιτών (**4**) μέσω μερικής υδρογόνωσης των C5-υποκατεστημένων γλυκοπυρανονουκλεοζιτών (**2**). Η αντίδραση επιχειρήθηκε αρχικά χρησιμοποιώντας διχλωριούχο νικέλιο (NiCl₂ 6H₂O) σε άνυδρη μεθανόλη (MeOH) και βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH₄) στους -78°C για 30 min. Δυστυχώς, η συγκεκριμένη αντίδραση ήταν ανεπιτυχής, αφού λήφθηκε μίγμα τριών αδιαχώριστων ενώσεων (cis νουκλεοζίτης, πλήρως υδρογονωμένος και αντιδρών). Το ίδιο αποτέλεσμα λήφθηκε και είτε όταν αυξήθηκε ο χρόνος της αντίδρασης είτε όταν η αντίδραση επιχειρήθηκε με P-2 καταλύτη νικέλιο (Tetrahedron 68 (2012) 6329-6337) ή NaBH₄/Ni(OAc)₂ 4H₂O σε μικτό διαλύτη (THF/MeOH 1:1) (Tetrahedron 64 (2008) 4347-4353) ή σκόνη Zn, AcOH σε μικτό διαλύτη (THF/MeOH 10:1) (Tetrahedron Letters 46 (2005) 5613-5615) ή Zn(Cu/Ag)/TMSCl και τριαιθυλσιλάνιο (Et₃SiH) (tetrahedron 69 (2013) 3872-3877) ή καταλύτη Lindlar με κινολίνη σε ακετόνη (Robins, M. J.; Barr, P. J. J. Org. Chem. 1983, 48, 1854-1862)

Λόγω των παραπάνω δυσκολιών λήψης και απομόνωσης των cis νουκλεοζιτών (**4**) αποφασίστηκε η πλήρης υδρογόνωση των 1(2',3',4',6'-τετράκίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-αλκύνυλο νουκλεοζιτών (**2**) παρουσία καταλύτη Pd/C με συνεχή ανάδευση και ταυτόχρονη παροχή αέριου υδρογόνου (↑H₂) για 48 ώρες.

Στη συνέχεια ακολούθησε η αποπροστασία αυτών των νουκλεοζιτών(**5**) με την προσθήκη διαλύτη μεθανόλη (MeOH) και μεθοξειδίου του νατρίου(MeONa) υπό συνεχή ανάδευση για 2 ώρες, εξουδετέρωση με όξινη ρητίνη μέχρις ότου pH≈7 και διήθηση. Τα τελικά προϊόντα είναι οι πλήρως υδρογονωμένοι 1-(β-D-γλυκοπυρανόζυλο) νουκλεοζίτες(**6**).

Τέλος όλοι οι C5-υποκατεστημένοι πυρανονουκλεοζίτες τόσο οι απακετυλιωμένοι όσο και οι μη-απακετυλιωμένοι προσδιορίστηκαν με NMR και φασματοσκοπία UV

4.2.1. Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακέτυλο-β-D γλυκοκυρανόζυλο) –5-[(2',5'-διμέθυλο-φαινυλο) αιθύνυλο]ουρακίλης (2a)

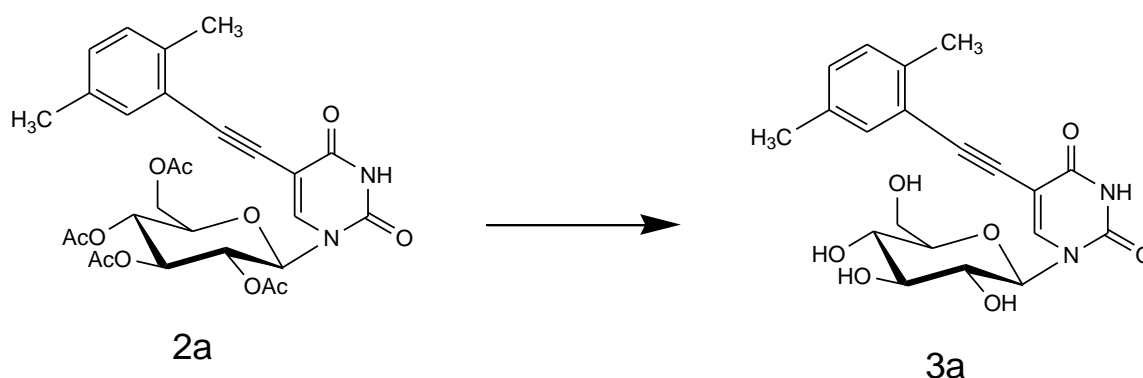


Σε σωληνάκι microwave διαλύονται σε 0,3ml άνυδρου διαλύτη DMF, 100mg του **(1)** και με την προσθήκη (3eq) 1-αιθύνυλο-2',5'-διμέθυλο βενζολίου, (0,1eq) τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου $[Pd(PPh_3)_4]$, (0,1eq) ιωδιούχου χαλκού (CuI), (2eq) τριαιθυλαμίνης (Et_3N) ακτινοβολούνται σε συνθήκες 50°C, 5min, 200Watt, 250PSI. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 2). Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Α. Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος με ικανοποιητική απόδοση 78%. Ο ανωτέρω πυρανονουκλεοζίτης ταυτοποιήθηκε με NMR δίνοντας τα παρακάτω αποτελέσματα: 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.60 (br s, 1H, NH), 7.61 (s, 1H, H-6), 7.32 (s, 1H, ArH), 7.10 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, ArH), 7.05 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, ArH), 5.89 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 9.5$ Hz, H-1'), 5.41 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-3'), 5.22-5.15 (m, 2H, H-2', H-4'), 4.30 (dd, 1H, $J_{5'-6a'} = 5.1$ Hz, $J_{6a'-6b'} = 12.7$ Hz, H-6a'), 4.16 (dd, 1H, $J_{5'-6b'} = 1.8$ Hz, H-6b'), 3.97-3.93 (m, 1H, H-5'), 2.47, 2.30 (2s, 6H, 2 x CH_3), 2.11, 2.06, 2.03, 2.02 (4s, 12H, 4OAc);

Πίνακας 2. Αποτελέσματα της σύνθεσης της 1(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακέτυλο-β-D-γλυκοκυρανόζυλο-5-[(2',5'-διμέθυλο-φαινυλο)αιθύνυλο]ουρακίλης (**2a**)

	Προϊόν
TLC	R _f =0,24
Απόδοση	78%
[α _D] ²²	- 22° (c 0.40, CHCl ₃)
λ _{max}	315nm

4.2.1.1 Σύνθεση της 1-(β-D γλυκοπυρανόζυλο) -5-[(2',5'-διμέθυλο-φαίνυλο) αίθυνυλο] ουρακίλης



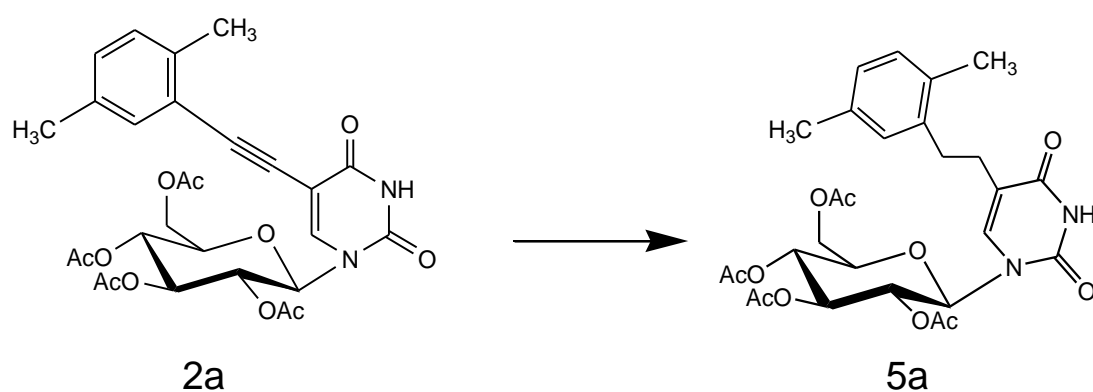
Σε σφαιρική φιάλη των 50ml διαλύονται σε 8,3ml άνυδρου διαλύτη μεθανόλη, η **(2a)** (0,12mmol) και με την προσθήκη 1,2ml μεθοξειδίου του νατρίου(NaOMe) (1,6M) αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 2 ώρες. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC(πίνακας 3).Εφόσον ολοκληρωθεί η απακετυλίωση κόβουμε την αντίδραση προσθέτοντας όξινη ρητίνη μέχρις ότου το pH≈7.Στη συνέχεια ακολουθεί διήθηση και συμπύκνωση υπό κενό. Η πορεία συνεχίζεται με τον καθαρισμό του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας(silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Β.Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη με την μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος σε ικανοποιητική απόδοση 62%.Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση του προϊόντος με NMR

δίνοντας τα εξής αποτελέσματα: ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 8.05 (s, 1H, H-6), 7.28 (s, 1H, ArH), 7.11 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, ArH), 7.06 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, ArH), 5.89 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 9.2$ Hz, H-1'), 3.87 (d, 1H, $J_{6a'-6b'} = 12.0$ Hz, H-6a'), 3.77 (dd, 1H, $J_{5'-6b'} = 3.5$ Hz, $J_{6a'-6b'} = 12.2$ Hz, H-6b'), 3.61 (t, 1H, $J = 8.7$ Hz, H-3'), 3.54-3.47 (m, 3H, H-2', H-4', H-5'), 2.42, 2.28 (2s, 6H, 2 x CH_3).

Πίνακας 3. Αποτελέσματα της σύνθεσης της 1-(β-D-γλυκοκυρανόζυλο-5-[(2',5'-διμέθυλο-φαινυλο)αιθύλυλο]ουρακίλης(**3a**)

	Προϊόν
TLC	$R_f=0,16$
Απόδοση	62%
$[\alpha_D]^{22}$	$+2^\circ$ (c 0.35, MeOH)
λ_{\max}	311nm

4.2.1.2 Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-τετρακis-O-ακέτυλο-β-D γλυκοκυρανόζυλο) -5-[(2',5'-διμέθυλο-φαινυλο) αίθυλο] ουρακίλης (**5a**)

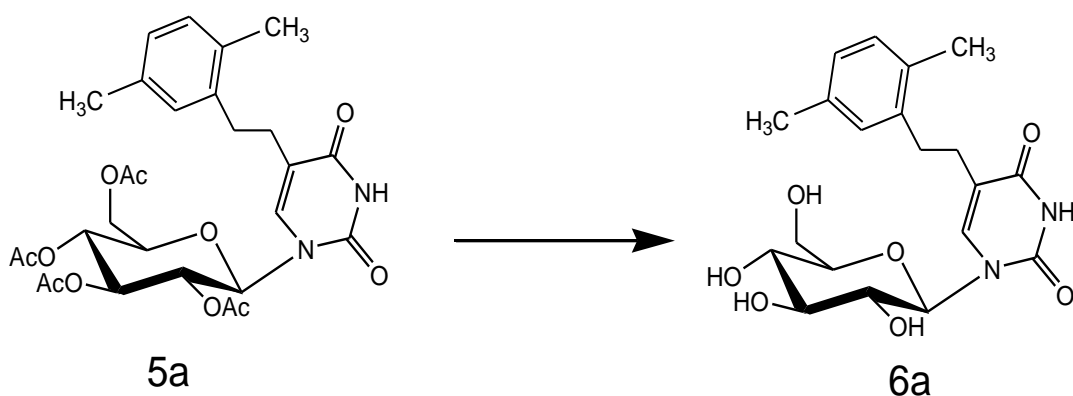


Σε σφαιρική φιάλη των 50ml διαλύονται σε 15ml διαλύτη άνυδρη μεθανόλη, η **(2a)** (0,15mmol) και με την προσθήκη 50mg καταλύτη Pd/C τοποθετείται για υδρογόνωση για 48 ώρες με συνεχή ανάδευση. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC(πίνακας 4). Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Α. Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος με ικανοποιητική απόδοση 44%. Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση του προϊόντος με NMR δίνοντας τα εξής αποτελέσματα: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.12 (br s, 1H, NH), 7.04 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, ArH), 6.99 (s, 1H, H-6), 6.93 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, ArH), 5.83 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 9.5$ Hz, H-1'), 5.38 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-3'), 5.16-5.07 (m, 2H, H-2', H-4'), 4.25 (dd, 1H, $J_{5'-6a'} = 5.2$ Hz, $J_{6a'-6b'} = 12.7$ Hz, H-6a'), 4.11 (dd, 1H, $J_{5'-6b'} = 1.9$ Hz, H-6b'), 3.92-3.89 (m, 1H, H-5'), 2.81-2.77 (m, 2H, CH_2), 2.62-2.54 (m, 2H, CH_2), 2.32, 2.29 (2s, 6H, 2 x CH_3), 2.10, 2.06, 2.02, 2.00 (4s, 12H, 4OAc).

Πίνακας 4. Αποτελέσματα της σύνθεσης της 1(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακέτυλο-β-D-γλυκοκυρανόζυλο-5-[(2',5'-διμέθυλο-φαινυλο)αίθυλο] ουρακίλης (**5a**)

	Προϊόν
TLC	$R_f=0,24$
Απόδοση	44%
$[\alpha_D]^{22}$	- 22° (c 0.40, CHCl_3)
λ_{\max}	315nm

4.2.1.3 Σύνθεση της 1-(β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-5-[(2',5' διμέθυλο - φαίνυλο)αιθυλο]ουρακίλης (6a)

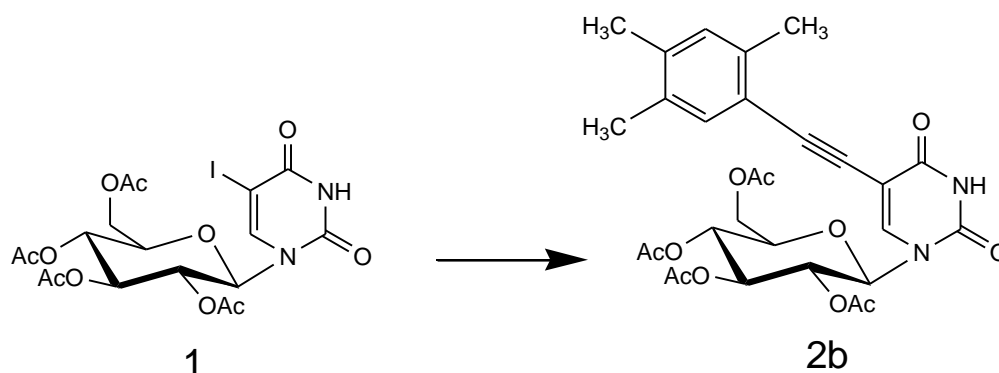


Σε σφαιρική φιάλη των 50ml διαλύονται σε 4ml άνυδρου διαλύτη μεθανόλη, η **(5a)** (0,056mmol) και με την προσθήκη 0,56ml μεθοξειδίου του νατρίου (NaOMe) (1,6M) αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 2 ώρες. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 5). Εφόσον ολοκληρωθεί η απακετυλίωση κόβουμε την αντίδραση προσθέτοντας όξινη ρητίνη μέχρις ότου το pH ≈ 7. Στη συνέχεια ακολουθεί διήθηση και συμπύκνωση υπό κενό. Η πορεία συνεχίζεται με τον καθαρισμό του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Β. Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη με την μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος σε ικανοποιητική απόδοση 87%. Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση του προϊόντος με NMR δίνοντας τα εξής αποτελέσματα: ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 7.45 (s, 1H, H-6), 7.00 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz, ArH), 6.89 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz, ArH), 5.51 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 8.3$ Hz, H-1'), 3.85 (d, 1H, $J_{6a'-6b'} = 11.9$ Hz, H-6b'), 3.73 (dd, 1H, $J_{5'-6a'} = 4.3$ Hz, H-6a'), 3.50-3.41 (m, 4H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 2.77 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz, CH_2), 2.53 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz, CH_2), 2.29, 2.26 (2s, 6H, 2 x CH_3).

Πίνακας 5. Αποτελέσματα της σύνθεσης της 1(β-D-γλυκοπυρανόζυλο)-5[(2',5'-διμέθυλο-φαίνυλο)αιθυλο]ουρακίλης (**6a**)

	Προϊόν
TLC	R _f =0,16
Απόδοση	87%
[α _D] ²²	+ 2° (c 0.35, MeOH)
λ _{max}	311nm

4.2.2 Σύνθεση της 1(2',3',4',6' –τετρακис-O-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζυλο) –5-[(2',4',5' τριμέθυλο- φαίνυλο) αιθύνυλο] ουρακίλης (**2b**)



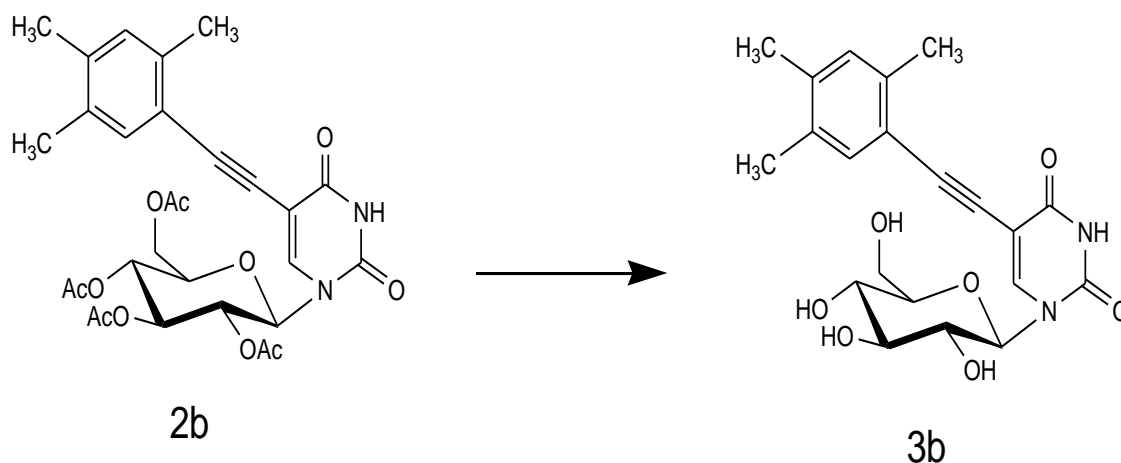
Σε σωληνάκι microwave διαλύονται σε 0,3ml άνυδρου διαλύτη DMF, 100mg του (**1**) και με την προσθήκη (3eq) 1-αιθύνυλο-2',4',5'-τριμέθυλο βενζολίου, (0,1eq) τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄], (0,1eq) ιωδιούχου χαλκού(CuI),(2eq) τριαιθυλαμίνης(Et₃N) ακτινοβολούνται σε συνθήκες 60°C,5min,200Watt,250PSI.Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 6). Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica

gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Α. Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος με ικανοποιητική απόδοση 90%. Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση του προϊόντος με NMR δίνοντας τα εξής αποτελέσματα: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.55 (br s, 1H, NH), 7.59 (s, 1H, H-6), 7.27 (s, 1H, ArH), 7.00 (s, 1H, ArH), 5.88 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 9.4$ Hz, H-1'), 5.41 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz, H-3'), 5.22-5.15 (m, 2H, H-2', H-4'), 4.30 (dd, 1H, $J_{5'-6a'} = 5.1$ Hz, $J_{6a'-6b'} = 12.7$ Hz, H-6a'), 4.16 (dd, 1H, $J_{5'-6b'} = 1.8$ Hz, H-6b'), 3.96-3.93 (m, 1H, H-5'), 2.44, 2.23, 2.20 (3s, 9H, 3 x CH_3), 2.11, 2.06, 2.02, 2.01 (4s, 12H, 4OAc).

Πίνακας 6. Αποτελέσματα της σύνθεσης της 1(2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-5-[(2',4',5'-τριμεθυλο-φαίνυλο)αιθύνηλο]ουρακίλης (2b)

	Προϊόν
TLC	$R_f=0.19$
Απόδοση	90%
$[\alpha_D]^{22}$	- 30° (c 0.40, CHCl_3)
λ_{max}	320nm

4.2.2.1 Σύνθεση της 1-(β-D-γλυκοκυρανόζυλο) –5-[(2',4',5'- τριμέθυλο- φαίνυλο) αίθυνυλο] ουρακίλης (3b)

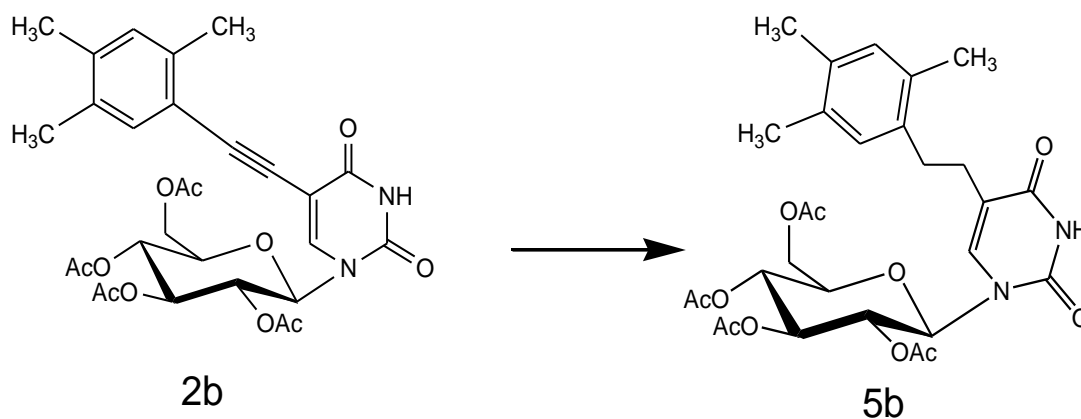


Σε σφαιρική φιάλη των 50ml διαλύονται σε 8,3ml άνυδρου διαλύτη μεθανόλη, η **(2b)**(0,12mmol) και με την προσθήκη 1,2ml μεθοξειδίου του νατρίου(NaOMe)(1,6M) αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 2 ώρες. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC(πίνακας 7).Εφόσον ολοκληρωθεί η απακετυλίωση κόβουμε την αντίδραση προσθέτοντας όξινη ρητίνη μέχρις ότου το pH≈7.Στη συνέχεια ακολουθεί διήθηση και συμπύκνωση υπό κενό. Η πορεία συνεχίζεται με τον καθαρισμό του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας(silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Β.Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη με την μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος σε ικανοποιητική απόδοση 62%.Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση του προϊόντος με NMR δίνοντας τα εξής αποτελέσματα: ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 8.02 (s, 1H, H-6), 7.22 (s, 1H, ArH), 7.00 (s, 1H, ArH), 5.58 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 9.2$ Hz, H-1'), 3.88-3.74 (m, 2H, H-6a', H-6b'), 3.61 (t, 1H, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 3.55-3.48 (m, 3H, H-2', H-4', H-5'), 2.39, 2.23, 2.20 (3s, 9H, 3 x CH_3).

Πίνακας 7. Αποτελέσματα της σύνθεσης της 1(β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5[(2',4',5'-τριμέθυλο-φαίνυλο)αιθύλυο]ουρακίλης (**3b**)

	Προϊόν
TLC	R _f =0,16
Απόδοση	62%
[α _D] ²²	- 2° (c 0.35, MeOH)
λ _{max}	313nm

4.2.2.2 Σύνθεση της 1(2',3',4',6' –τετρακίς-O-ακέτυλο-β-D-γλυκοκυρανόζυλο) – 5-[(2',4',5'- τριμέθυλο- φαίνυλο) αίθυλο] ουρακίλης (5b)



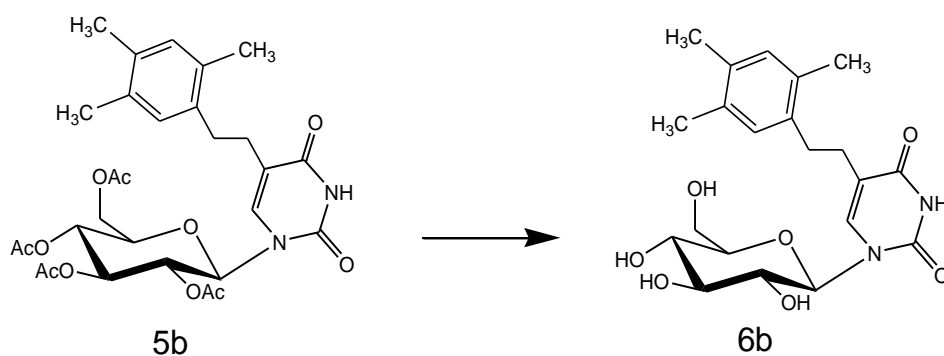
Σε σφαιρική φιάλη των 50ml διαλύονται σε 21ml διαλύτη άνυδρη μεθανόλη, η (**2b**)(0,15mmol) και με την προσθήκη 52mg καταλύτη Pd/C τοποθετείται για υδρογόνωση για 48 ώρες με συνεχή ανάδευση. Η αντίδραση ελέγχθηκε με

TLC(πίνακας 8).Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα A. Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος με ικανοποιητική απόδοση 43%. Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση του προϊόντος με NMR δίνοντας τα εξής αποτελέσματα: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.24 (br s, 1H, NH), 7.10 (s, 1H, H-6), 6.45 (s, 2H, ArH), 5.84 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 9.5$ Hz, H-1'), 5.38 (t, 1H, $J = 9.4$ Hz, H-3'), 5.19-5.11 (m, 2H, H-2', H-4'), 4.28 (dd, 1H, $J_{5'-6a'} = 5.1$ Hz, $J_{6a'-6b'} = 12.6$ Hz, H-6a'), 4.14 (d, 1H, H-6b'), 2.81-2.77 (m, 2H, CH_2), 2.66-2.3(m, 2H, CH_2), 2.30, 2.21, 2.20 (3s, 9H, 3 x CH_3), 2.10, 2.06, 2.03, 2.00 (4s, 12H, 4OAc).

Πίνακας 8. Αποτελέσματα της σύνθεσης της 1(2',3',4',6'-τετρακίς-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-5-[(2',4',5'-τριμεθυλο-φαινυλο)αιθυλο]ουρακίλης (**5b**)

	Προϊόν
TLC	$R_f=0,19$
Απόδοση	43%
$[\alpha_D]^{22}$	- 30° (c 0.40, CHCl_3)
λ_{max}	320nm

4.2.2.3 Σύνθεση της 1-(β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5-[(2',4',5' –τριμέθυλο-φαινυλο) αίθυλο] ουρακίλης (**6b**)

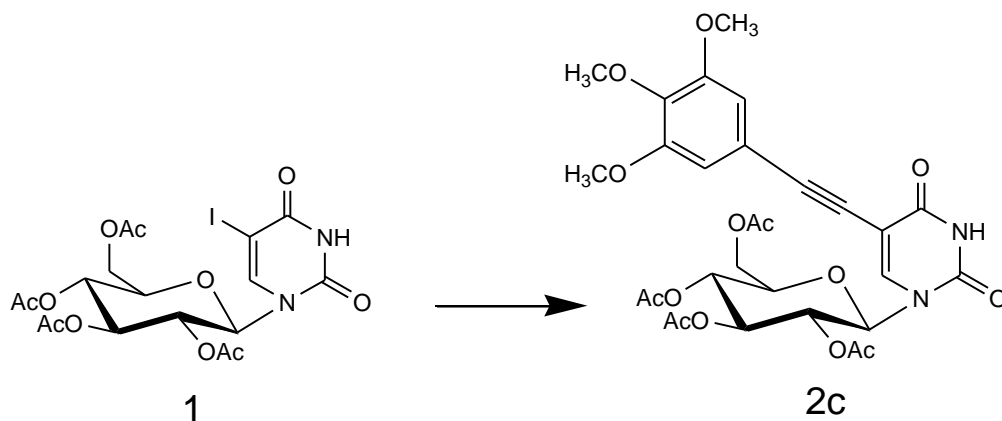


Σε σφαιρική φιάλη των 50ml διαλύονται σε 8ml άνυδρου διαλύτη μεθανόλη, η **(5b)** (0,12mmol) και με την προσθήκη 1,2ml μεθοξειδίου του νατρίου(NaOMe)(1,6M) αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 2 ώρες. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC(πίνακας 9).Εφόσον ολοκληρωθεί η απακετυλίωση κόβουμε την αντίδραση προσθέτοντας όξινη ρητίνη μέχρις ότου το pH≈7.Στη συνέχεια ακολουθεί διήθηση και συμπύκνωση υπό κενό. Η πορεία συνεχίζεται με τον καθαρισμό του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας(silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα B.Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη με την μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος σε ικανοποιητική απόδοση 89%. Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση του προϊόντος με NMR δίνοντας τα εξής αποτελέσματα: ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 7.41 (s, 1H, H-6), 6.91 (s, 1H, ArH), 6.88 (s, 1H, ArH), 5.51 (d, 1H, *J*_{1'-2'} = 8.5 Hz, H-1'), 3.85 (d, 1H, *J*_{6a'-6b'} = 11.8 Hz, H-6b'), 3.72 (dd, 1H, *J*_{5'-6a'} = 4.6 Hz, H-6a'), 3.50-3.38 (m, 4H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 2.74 (t, 2H, *J* = 7.9 Hz, CH₂), 2.53 (dd, 2H, *J* = 6.8 Hz, *J* = 14.5 Hz, CH₂), 2.25, 2.19, 2.18 (3s, 9H, 3 x CH₃).

Πίνακας 9. Αποτελέσματα της σύνθεσης της 1(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-(2',4',5'-τριμεθυλο-φαινυλο)αιθυλο-ουρακίλης (**6b**)

	Προϊόν
TLC	R _f =0,16
Απόδοση	89%
[α _D] ²²	- 2° (c 0.35, MeOH)
λ _{max}	313nm

4.2.3 Σύνθεση της 1(2',3',4',6' –τετρακis-O-ακέτυλο-β-D-γλυκοπυρανόζυλο) –5-[(3',4',5' -τριμέθοξυ- φαίνυλο) αιθύνυλο] ουρακίλης (2c)

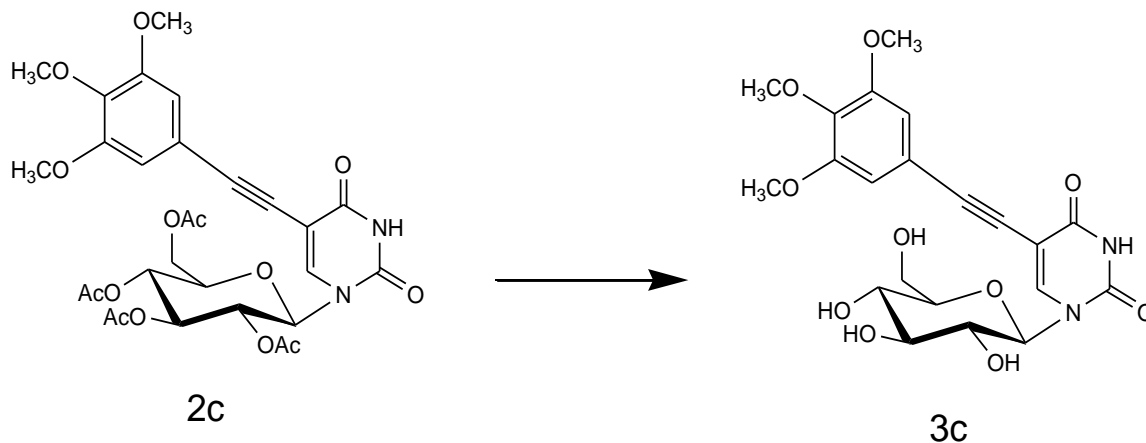


Σε σωληνάκι microwave διαλύονται σε 0,3ml άνυδρου διαλύτη DMF, 100mg του **(1)** και με την προσθήκη (3eq) 1-αιθύνυλο-3,4,5-τριμέθοξυ βενζολίου, (0,1eq) τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄], (0,1eq) ιωδιούχου χαλκού(CuI), (2eq) τριαιθυλαμίνης (Et₃N) ακτινοβολούνται σε συνθήκες 50°C,5min,200Watt,250PSI. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 10). Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Α. Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος με ικανοποιητική απόδοση 61%. Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση του προϊόντος με NMR δίνοντας τα εξής αποτελέσματα: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.35 (br s, 1H, NH), 7.63 (s, 1H, H-6), 6.78 (s, 2H, ArH), 5.87 (d, 1H, J_{1'-2'} = 9.4 Hz, H-1'), 5.40 (t, 1H, J = 9.4 Hz, H-3'), 5.21-5.13 (m, 2H, H-2', H-4'), 4.31 (dd, 1H, J_{5'-6a'} = 5.3 Hz, J_{6a'-6b'} = 12.7 Hz, H-6a'), 4.15 (dd, 1H, J_{5'-6b'} = 1.4 Hz, H-6b'), 3.96-3.92 (m, 1H, H-5'), 3.87 (s, 9H, 3 x OCH₃), 2.11, 2.06, 2.02 (3s, 12H, 4OAc).

Πίνακας 10. Αποτελέσματα της σύνθεσης της 1(2',3',4',6'-τετρακис-Ο-ακέτυλο-β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5-[(3',4',5'-τριμέθοξυ -φαινυλο)αιθυνυλο]ουρακίλης (**2c**)

	Προϊόν
TLC	R _f =0,18
Απόδοση	61%
[α _D] ²²	- 12° (c 0.20, CHCl ₃)
λ _{max}	319nm

4.2.3.1 Σύνθεση της 1-(β-D-γλυκοκυρανόζυλο) -5-[(3',4',5' -τριμέθοξυ- φαίνυλο) αιθυνυλο] ουρακίλης(**3c**)



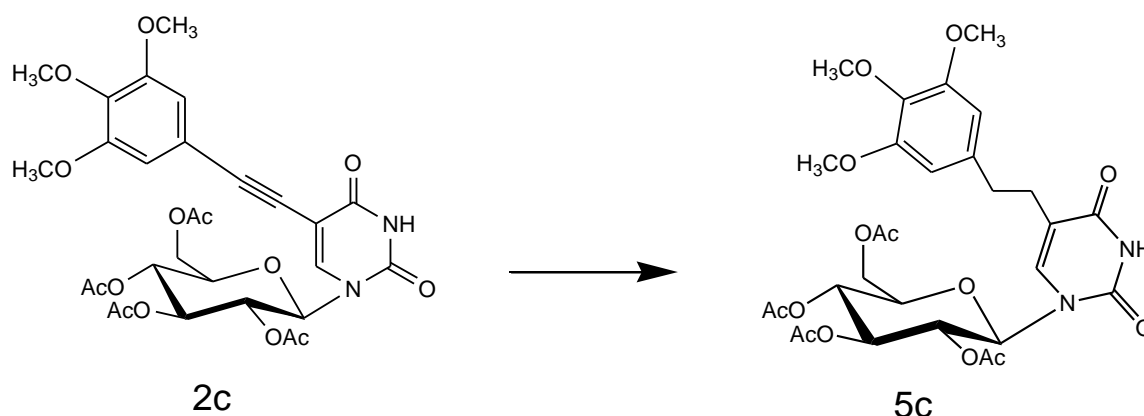
Σε σφαιρική φιάλη των 50ml διαλύονται σε 8,3ml άνυδρου διαλύτη μεθανόλη, η (**2a**)(0,12mmol) και με την προσθήκη 1,2ml μεθοξειδίου του νατρίου(NaOMe)(1,6M) αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 2 ώρες. Η αντίδραση

ελέγχεται με TLC (πίνακας 11). Εφόσον ολοκληρωθεί η απακετυλίωση κόβουμε την αντίδραση προσθέτοντας όξινη ρητίνη μέχρις ότου το pH≈7. Στη συνέχεια ακολουθεί διήθηση και συμπύκνωση υπό κενό. Η πορεία συνεχίζεται με τον καθαρισμό του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας(silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Β.Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη με την μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος σε ικανοποιητική απόδοση 62%.Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση του προϊόντος με NMR δίνοντας τα εξής αποτελέσματα: ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 8.08 (s, 1H, H-6), 6.86 (s, 2H, ArH), 5.58 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 9.0$ Hz, H-1'), 3.87 (d, 1H, $J = 11.5$ Hz, H-6b'), 3.84, 3.78 (2s, 9H, 3x OCH_3), 3.76 (dd, 1H, $J_{5'-6a'} = 4.3$ Hz, $J_{6a'-6b'} = 12.1$ Hz, H-6a'), 3.59 (t, 1H, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 3.54-3.45 (m, 3H, H-2', H-4', H-5').

Πίνακας 11. Αποτελέσματα της σύνθεσης της 1-(β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5-[(3',4',5'-τριμέθοxy-φαινυλο)αιθυνυλο]ουρακίλης (**3c**)

	Προϊόν
TLC	$R_f=0,16$
Απόδοση	62%
$[\alpha_D]^{22}$	- 8° (c 0.40, MeOH)
λ_{\max}	319nm

4.2.3.2 Σύνθεση της 1(2',3',4',6' -τετρακίς-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανόζυλο) – 5-[(3',4',5' -τριμέθοξυ- φαίνυλο) αιθύλο] ουρακίλης (5c)

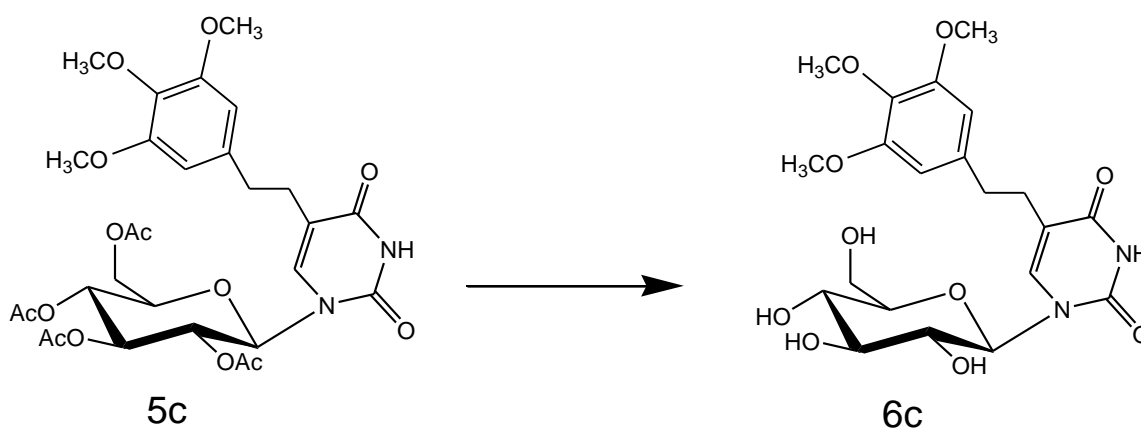


Σε σφαιρική φιάλη των 50ml διαλύονται σε 15ml διαλύτη άνυδρη μεθανόλη, η **(2c)** (0,11mmol) και με την προσθήκη 37mg καταλύτη Pd/C τοποθετείται για υδρογόνωση για 48 ώρες με συνεχή ανάδευση. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 12). Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Α. Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος με ικανοποιητική απόδοση 73%. Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση του προϊόντος με NMR δίνοντας τα εξής αποτελέσματα: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.27 (br s, 1H, NH), 7.10 (s, 1H, H-6), 7.10 (s, 2H, ArH), 5.84 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 9.5$ Hz, H-1'), 5.38 (t, 1H, H-2'), 5.19-5.11(m, 2H, H-3', H-4'), 4.28 (dd, 1H, $J_{5'-6a'} = 5.1$ Hz, $J_{6a'-6b'} = 12.6$ Hz, H-6a'), 4.12 (d, 1H, H-6b'), 3.93-3.90 (m, 1H, H-5'), 3.86, 3.82 (s, 9H, 3 x OCH_3), 2.81-2.77 (m, 2H, CH_2), 2.66-2.63 (m, 2H, CH_2), 2.10, 2.06, 2.02, 2.00 (4s, 12H, 4OAc).

Πίνακας 9. Αποτελέσματα της σύνθεσης της 1(2',3',4',6'-τετρακίς-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5-[(3',4',5'-τριμεθοξυ-φαινυλο)αιθυλο]ουρακίλης (**5c**)

	Προϊόν
TLC	R _f =0.18
Απόδοση	73%
[α _D] ²²	- 12° (c 0.20, CHCl ₃)
λ _{max}	319nm

4.2.3.3 Σύνθεση της 1-(β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5- [(3',4',5'- τριμέθοξυ-φαινυλο) αιθυλο] ουρακίλης (6c)



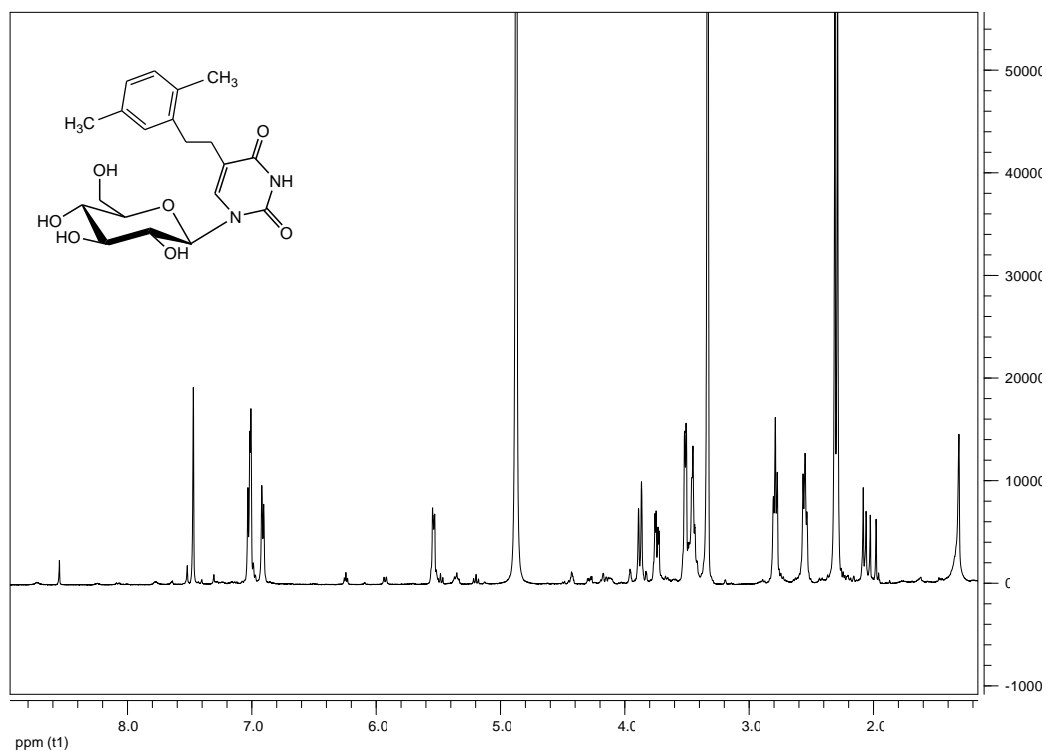
Σε σφαιρική φιάλη των 50ml διαλύονται σε 5ml άνυδρου διαλύτη μεθανόλη, η **(5c)** (0,068mmol) και με την προσθήκη 0,7ml μεθοξειδίου του νατρίου(NaOMe) (1,6M) αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για 2 ώρες. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 10). Εφόσον ολοκληρωθεί η απακετυλίωση κόβουμε την αντίδραση προσθέτοντας όξινη ρητίνη μέχρις ότου το pH≈7. Στη συνέχεια ακολουθεί διήθηση και συμπύκνωση υπό κενό. Η πορεία συνεχίζεται με τον καθαρισμό του υπολείμματος σε στήλη

χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Β. Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη με την μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος σε ικανοποιητική απόδοση 81%. Στη συνέχεια έγινε ταυτοποίηση του προϊόντος με NMR δίνοντας τα εξής αποτελέσματα: ^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 7.65 (dd, 1H, $J = 7.3$ Hz, $J = 12.4$ Hz, ArH), 7.56 (dd, 1H, $J = 3.1$ Hz, ArH), 7.42 (s, 1H, H-6), 5.50 (d, 1H, $J_{1'-2'} = 8.9$ Hz, H-1'), 3.85 (dd, 1H, $J_{5'-6b'} = 1.6$ Hz, $J_{6a'-6b'} = 12.2$ Hz, H-6b'), 3.81, 3.73 (2s, 9H, 3x OCH_3), 3.71 (dd, 1H, $J_{5'-6a'} = 1.6$ Hz, H-6a'), 3.48-3.38 (m, 4H, H-2', H-3', H-4', H-5'), 2.79-2.71 (m, 2H, CH_2), 2.65-2.53 (m, 2H, CH_2).

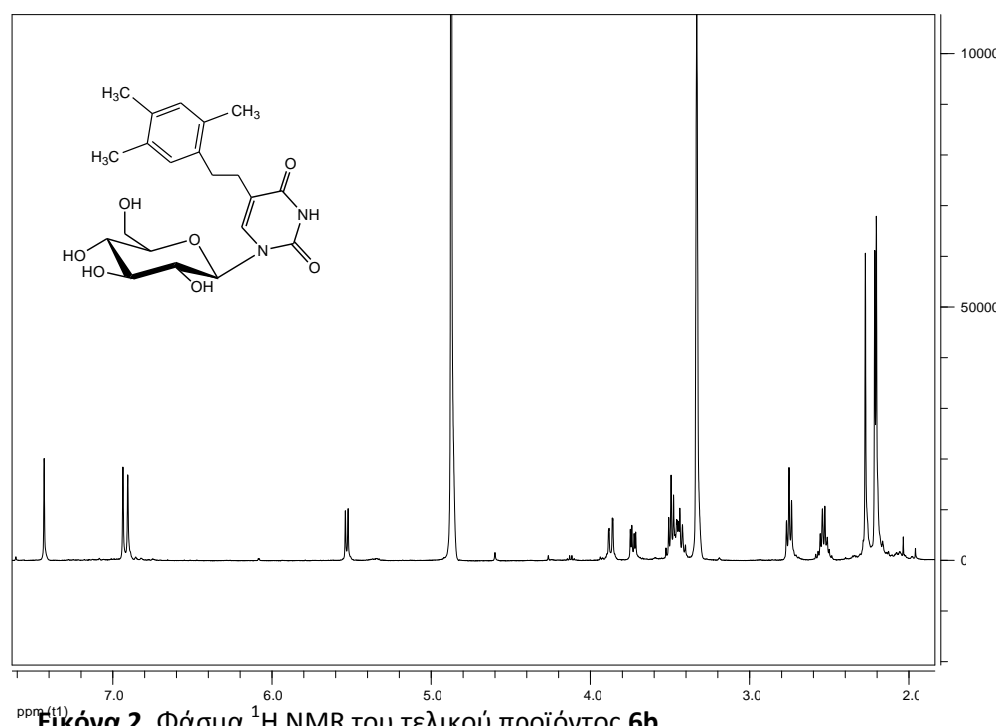
Πίνακας 10. Αποτελέσματα της σύνθεσης της 1(β-D-γλυκοκυρανόζυλο)-5-(3',4',5'-τριμέθοξυ-φαινυλο)αιθυλο ουρακίλης (**6c**)

	Προϊόν
TLC	$R_f=0,16$
Απόδοση	81%
$[\alpha_D]^{22}$	- 8° (c 0.40, MeOH)
λ_{\max}	319nm

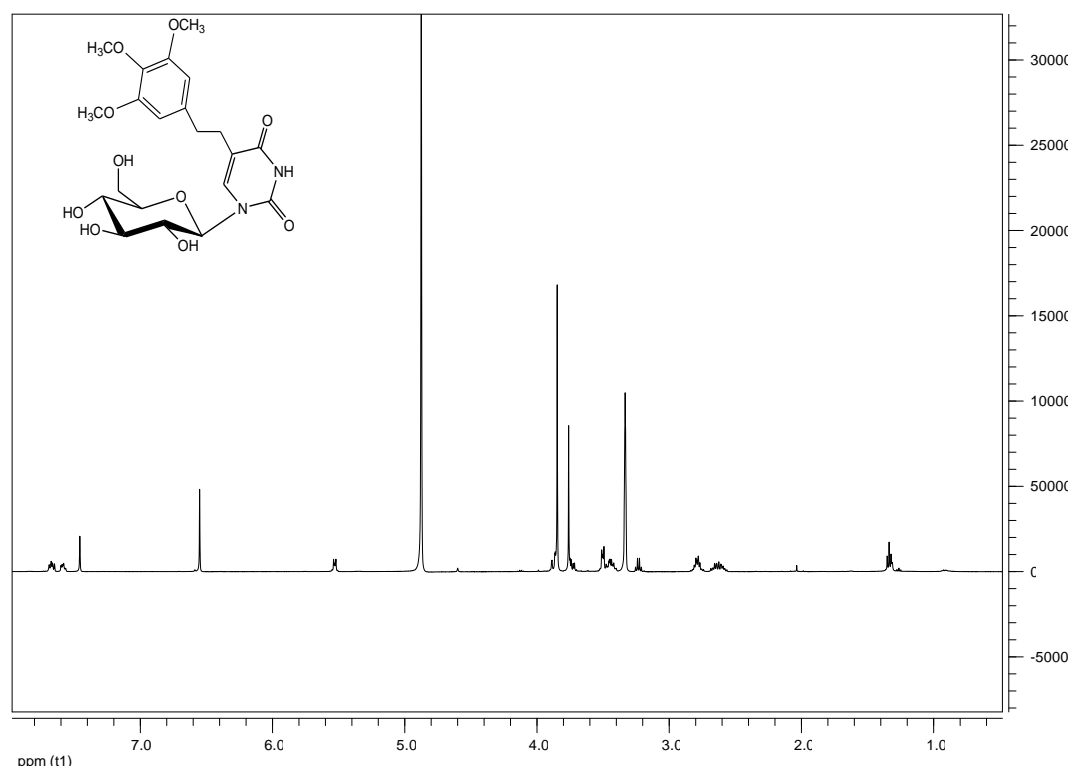
5. Ταυτοποίηση με ^1H NMR



Εικόνα 1. Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος **6a**



Εικόνα 2. Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος **6b**



Εικόνα 3. Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος **6c**

6.Αποτελέσματα -Συζήτηση

Η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προέκυψε από τις προσπάθειες των ερευνητών για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως κακοήθεις νεοπλασίες και ιϊκές μολύνσεις. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων, τα οποία να παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και εκλεκτικότητα όσον αφορά στην δράση τους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης νουκλεοζιτικών αναλόγων και συγκεκριμένα γλυκοπυρανονουκλεοζιτών με τροποποίηση στο τμήμα της βάσης με πιθανή κυτταροτοξική δράση.

Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H NMR.

Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC_{50} , η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%.

Compounds	IC_{50} (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
2a	23 ± 1	21 ± 3	21 ± 2
3a	> 250	> 250	> 250
2b	21 ± 0	18 ± 8	35 ± 15
3b	> 250	> 250	> 250
2c	107 ± 16	99 ± 28	152 ± 88
3c	> 250	> 250	> 250

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα η 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-[(2',5'-διμεθυλο-φαινυλο)αιθυνο]ουρακίλη **2a** καθώς και η 1-(2',3',4',6'-τετρακίς-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-5-[2',4',5'-τριμεθυλο-φαινυλο)αιθυνο]ουρακίλη **2b** εμφάνισαν καλή ανασταλτική δράση έναντι κυττάρων λευχαιμίας ποντικού (L1210), ανθρώπινου λεμφώματος (CEM) καθώς και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa).

Όσον αφορά τη βιολογική αποτίμηση των πλήρως υδρογονωμένων γλυκοπυρανονουκλεοζιτών τόσο των ακετυλιωμένων όσο και των απακετυλιωμένων βρίσκεται σε εξέλιξη και τα αποτελέσματα αναμένονται να δοθούν προσεχώς.

7 .Βιβλιογραφία

1. 1.Mc Murry John,Οργανική χημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης(2000)
2. Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. J. Med. Chem. 2004, 47, 3399
3. . Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. Nucleosides Nucleotides 1992, 11, 903

4. Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. J. *Med. Chem.* 1993, 36, 2033
5. De Clercq, E. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2002, 2, 163
6. Γεωργιάτσου, Βιοχημεία, Εκδόσεις Γιαχούδη Γιαπούλη, 1993
7. Pastor-Anglada, M.; Felipe, A.; Casado, J. *TIPS* 1998, 19, 424
8. Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* 1995, 67, 155
9. Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* 2000, 20, 41
10. Hiroyuki Hayakawa, Satoru Kohgo, Kenji Kitano, Noriyuki Ashida, Eiichi Kodama, Hiroaki Mitsuya and Hiroshi Ohrai *Antiviral chemistry & chemotherapy* 2004;15(4):169-87
11. www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrv/
12. Brossette T., Emmanuel Klein, Christophe Creminon, Jacques Grassi, Charles Mioskowski and Lyk Lebeau; *Tetrahedron*, 2001, 57, 8129-8143
13. Ellison RR, Carey RW and Holland JF. *Clin. Pharmacol. Ther.* , 1967 8, 800–809
14. Plunkett, W.; Huang, P.; Xu, Y. Z.; Heinemann, V.; Grunewald, R.; Gandhi, V. *Semin. Oncol.* 1995, 22, 3-10 (suppl 11) and references cited therein
15. Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, 95, 105.
16. Matsuda A, Hattori H, Tanaka M, Sasaki T. *Biomed Chem Lett*, 1996, 6: 1887
17. Hideshi Hattori, Eisuke Nozawa, Tomoharu Iino, Yuichi Yoshimura, Satoshi Shuto, Yuji Shimamoto, Makoto Nomura,, Masakazu Fukushima, Motohiro Tanaka, Takuma Sasaki, and Akira Matsuda. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 2892
18. Makoto Nomura, Satoshi Shutoa and Akira Matsudaa, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11 (2003) 2453–2461
19. O-Yang, C.; Wu, H.Y.; Fraser-Smith, E.B.; Walker, K.A.M., *Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 37
20. Kodama, E.; Kohgo, S.; Kitano, K.; Machida, H.; Gatanda, H.; Shigeta, S.; Matsuoka, M.; Ohrai, H.; Mitsuya, H., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 1539
21. Satoru Kohgo, Kohei Yamada, Kenji Kitano, Shinji Sakata, Hiroyuki Hayakawa, Daisuke Nameki, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Hiroaki Mitsuya, and Hiroshi Ohrai, *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS*, Vol. 22, Nos. 5–8, pp. 887–889, 2003

22. Srinivasarao Meneni, Ingo Ott, Craig D. Sergeant, Adam Sniady, Ronald Gustb, and Roman Dembinski. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (2007) 3082–3088
23. Minakawa N., Matsuda A. Mechanism-based design of inosine 5-monophosphate dehydrogenase inhibitors: synthesis and biological activities of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives. *Curr Med Chem.* 1999, 6, 615-28.
24. Minakawa N., Takeda T., Sasaki T., Matsuda A., Ueda T. Synthesis and antitumor activity of 5-ethynyl-1-beta-D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide (EICAR) and its derivatives. *J Med Chem.* 1991, 34, 778-86
25. Nikolaos Kollatos, Stella Manta, Athina Dimopoulou, Vanessa Parmenopoulou, Virginia V Triantakoustanti, Tahsin Kellici, Thomas Mavromoustakos, Dominique Schols, Dimitri Komiotis , *Carbohydrate research* 407 ,2015(170-178)
26. .Manta, S.; Agelis, G.; Botic,´, T.; Cencic, A.; Komiotis D. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2007, 15, 980–987
27. Balatsos, N. A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* 2009, 48, 6044–6051
28. 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.
29. Leclercq, F.; Egron, M.J.; Antonakis, K. *Carbohydr. Res.*, 1992, 228, 95.
30. Khan, A.R.; Mulligan, K.X.; Ollapally, P. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2001, 20, 759.
31. Ollapally, A. P.; Dorange, I. B.; Whitaker, T. L. *Nucleosides & Nucleotides* 1999, 18, 703.
32. Egron, M.J.; Dorange, I.B.; Antonakis, K.; Herscovici, J.; Ollapally, A.P. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2002, 21, 327.
33. Komiotis, D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides Nucleotides* 1991, 10, 431
34. 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

35. Komiotis, D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents* 2008, 7, 219.
36. Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 5548
37. Antonakis, K. "Hexopyranose nucleosides". In *Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C)*; Elsevier, Amsterdam, **1989**, 4, p. 241
38. Suhadolnik, R. J. *Nucleoside Antibiotics*, Wiley-Interscience, New York, 1970.
39. Antonakis, K.; Chouroulinkov, I. *Biochem. Pharmacol.* **1974**, 23, 2095
40. Suhadolnik, R. J. *Nucleosides as biological Probes*, Wiley and Sons, New York, 1979
41. Langen, P.; Etzold, G. *Mol. Pharmacol.* 1966, 2, 89
42. Nord, D. L.; Dalley, N. K.; Mc Kernan, P. A.; Robins, R. K. *J. Med. Chem.* 1987, 30, 1044.
43. 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
44. Spyros P. Nikas*, Marsha D'Souza, Alexandros Makriyannis*, *Tetrahedron* 68(2012) p.6329-6337
45. Cheng, C. F.; Lai, Z. C.; Lee, Y. J. *Tetrahedron* (2008), 64, p.4347–4353
46. Don Kaufman, Erin Johnson, Michael D. Mosher, *Tetrahedron*(2005) 46, p.5613-5
47. Yasser M.A. Mohamed, Trond Vidar Hansen, *Tetrahedron* 69(2013), p.3872-3877
48. Robins, M. J.; Barr, P. J. *J. Org. Chem.* (1983), 48, 1854-1862