



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 2'-ΔΕΟΞΥ-2'-ΚΥΑΝΟ ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΗ ΤΗΣ  
ΟΥΡΑΚΙΛΗΣ ΩΣ ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ**

**ΜΑΡΜΕΛΟΥΔΗ ΝΑΝΑ**



**«ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 2'-ΔΕΟΞΥ-2'-ΚΥΑΝΟ  
ΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΗ ΤΗΣ ΟΥΡΑΚΙΛΗΣ ΩΣ ΕΝ  
ΔΥΝΑΜΕΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ»**

**“SYNTHESIS OF 2'-DEOXY-2'-CYANO  
PYRANONUCLEOSIDE OF URACIL AS POTENTIAL  
ANTICANCER AGENT”**

***Στους Δημήτρη, Λίτσα και Στέλιο.***

#### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

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

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

**Μαντά Στυλιανή** – Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

*Σεπτέμβριος 2013*

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Κομιώτη Δημήτριο τον οποίο και ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διδάσκουσα ΠΔ 407/80 του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Στυλιανή Μαντά, για την συνεργασία μας και για την καθημερινή της υποστήριξη καθ' όλη την περίοδο της παραμονής μου στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας. Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες, Παρμενοπούλου Βανέσα, Δημοπούλου Αθηνά για την άψογη συνεργασία, την υποστήριξη και τις υποδείξεις τους κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας και τον υποψήφιο διδάκτορα Κυρίτση Χρήστο που δέχτηκε την συνεργασία μας, η εργαστηριακή και επιστημονική του κατάρτιση καθώς και οι πολύτιμες συμβουλές του υπήρξαν καθοριστικοί παράγοντες για την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για το ευχάριστο και δημιουργικό κλίμα συνεργασίας εντός του εργαστηριακού χώρου.

Τέλος, ένα μεγαλύτερο ευχαριστώ θα το πω στους γονείς μου, Δημήτρη και Λίτσα, και στον αδερφό μου Στέλιο στους οποίους και αφιερώνω την πτυχιακή μου διατριβή. Στάθηκαν δίπλα μου και με υποστήριξαν καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου. Μου συμπαραστάθηκαν σε κάθε δυσκολία που συνάντησα, συμμεριζόμενοι το άγχος και την αγωνία μου. Δίχως την παρουσία τους θα ήταν αδύνατη η μέχρι τώρα πορεία μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	9
1. ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ.....	9
1.1 ΜΟΝΟΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ.....	9
1.2.1 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ ΦΟΥΡΑΝΟΖΗΣ ΚΑΙ ΠΥΡΑΝΟΖΗΣ.....	13
1.2.2 Η ΣΤΕΡΕΟΔΙΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΔΑΚΤΥΛΙΩΝ ΠΥΡΑΝΟΖΗΣ ΚΑΙ ΦΟΥΡΑΝΟΖΗΣ.....	16
1.3 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΙΤΙΚΩΝ ΔΕΣΜΩΝ.....	17
2. ΝΟΥΚΛΕΙΚΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ.....	20
3. ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΟΥΣ.....	24
3.1 ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΟ ΜΙΑ ΠΕΝΤΟΖΗ.....	24
3.2 ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΟ ΜΙΑ ΕΞΟΖΗ.....	26
3.3 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ.....	31
ΣΤΟΧΟΣ – ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	35
ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
1. ΥΛΙΚΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ.....	36
2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC).....	37
3. ΞΥΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ.....	38
4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	39
ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ.....	40
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ.....	41
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ $^1\text{H}$ NMR.....	52
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χημεία των νουκλεοζιτών αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό ερευνητικό τομέα για την ανακάλυψη φαρμάκων, καθώς πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι σημαντικά φάρμακα και χρησιμοποιούνται ευρέως στην θεραπεία του καρκίνου και των ιικών μολύνσεων. Συνεπώς, νουκλεοζίτες, οι οποίοι συχνά τροποποιούνται στο υδατανθρακικό τμήμα ή στη βάση, έγιναν το επίκεντρο για την ανάπτυξη νέων χημειοθεραπευτικών ενώσεων.

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, νουκλεοζιτικά ανάλογα στα οποία ο φουρανοζικός δακτύλιος έχει αντικατασταθεί από εξαμελή δακτύλιο έχουν προσελκύσει ιδιαίτερη προσοχή λόγω της βιολογικής τους δράσης. Η συγκεκριμένη εργασία παρουσιάζει τη σύνθεση ενός πρωτότυπου νουκλεοζιτικού αναλόγου, αυτού του 2'-δεοξυ-2'-κυανοπυρανονουκλεοζίτη της ουρακίλης. Εντός, η αναλύεται συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε και η ταυτοποίηση της νέας ένωσης. Ο νουκλεοζίτης-στόχος επίσης αποτιμήθηκε για την κυτταροστατική του δράση χρησιμοποιώντας αρκετές καρκινικές κυτταρικές σειρές.



## **ABSTRACT**

Nucleoside chemistry represents an important research area for drug discovery, as many nucleoside analogues are prominent drugs and have been widely applied to cancer and viral therapy. Thus, nucleosides, which are frequently altered in the carbohydrate or base moiety, became the focus for the development of novel chemotherapeutic agents.

During the last decade, nucleoside analogues in which the furanose ring has been replaced by a six-membered ring have attracted special attention by virtue of their biological action. This thesis describes the synthesis of a novel nucleoside analogue, that of the 2'-deoxy-2'-cyano pyranonucleoside of uracil. Within, the synthetic route and identification of the new compound are detailed. The target nucleoside was also evaluated for their cytostatic activity using several cancer cell lines.

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

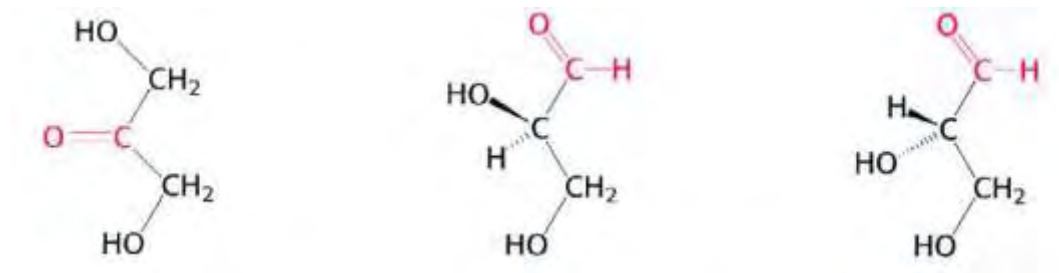
## 1. Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων που απαντώνται ευρέως στην φύση. Πρόκειται για ενυδατωμένος [άνθρακας](#), με γενικό τύπο  $C_n(H_2O)_n$ . Έχουν μεγάλη βιολογική σημασία καθώς αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στη διατροφή όλων των έμβιων οργανισμών, είναι καύσιμα που παρέχουν την απαιτούμενη ενέργεια για επιβίωση και ανάπτυξη. Αποτελέσουν μέσω αποθήκευσης της τροφής, δομικά στοιχεία των κυττάρων, και μέρος άλλων μακρομορίων, όπως γλυκοπρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα. Τέλος, κάποιοι από αυτούς χρησιμοποιούνται και ως φάρμακα.

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον προς τη χρήση φαρμάκων για την θεραπεία ασθενειών, τα οποία στη συντριπτική τους πλειοψηφία είναι ανάλογα φυσικών νουκλεοζιτών και 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. Στηριζόμενοι στην ισχυρή αντικαρκινική και αντιική δράση, που έχουν επιδείξει νουκλεοζίτες αποτελούμενοι από μονοσακχαρίτες με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο συνδεδεμένοι με κάποια ετεροκυκλική βάση, στην παρούσα πτυχιακή εργασία παρουσιάζουμε την συνθετική οδό που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του νουκλεοζίτη καθώς και η μέθοδος ταυτοποίησής του. Αναφερόμαστε στην σύνθεση του νουκλεοζιτικού αναλόγου 2'- δεόξυ – 2'- κύανο της ουρακίλης.

### 1.1 Μονοσακχαρίτες

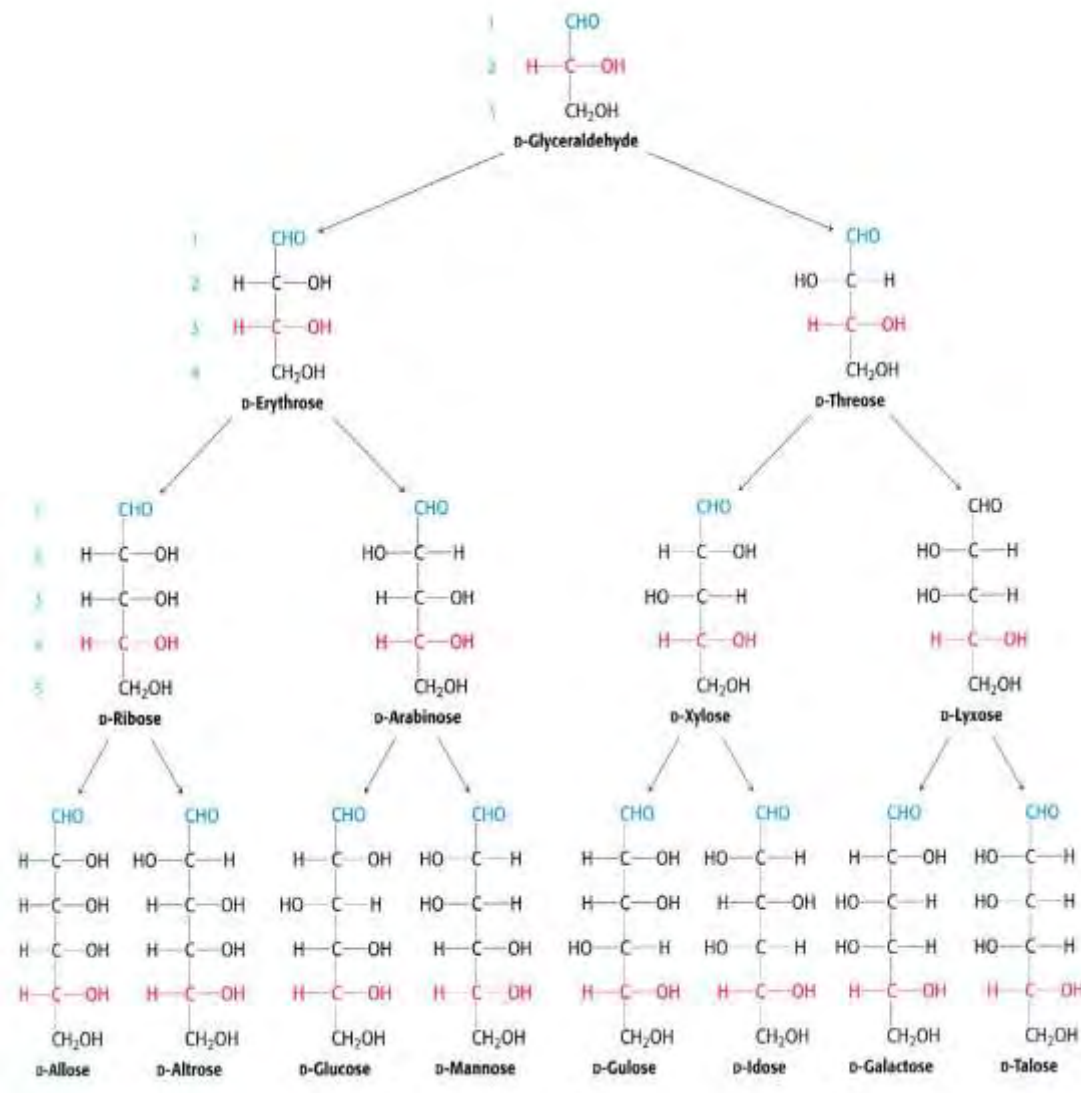
Οι μονοσακχαρίτες, οι απλούστεροι υδατάνθρακες, είναι αλδευδες ή κετόνες με δύο ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Ο εμπειρικός τύπος πολλών από αυτών είναι  $(C-H_2O)_n$ , κυριολεκτικά ένας ένυδρος άνθρακας. Οι μονοσακχαρίτες είναι σημαντικά καύσιμα μόρια καθώς επίσης και δομικές μονάδες των νουκλεϊκών οξέων. Οι μικρότεροι μονοσακχαρίτες, με  $n=3$ , είναι διυδροξυακετόνη και η D- και L- γλυκεραλδευδη.



Εικόνα 1. Διυδροξυκετόνη (κετόζη), D- γλυκεραλδεύδη και η L- γλυκεραλδευδη (αλδόζες)

Αναφέρονται ως τριόζες. Η διυδροξυακετόνη είναι μια κετόζη, διότι περιέχει μία κετονική ομάδα, ενώ η γλυκεραλδεύδη είναι μια αλδόζη, διότι περιέχει μία αλδευδική ομάδα. Η γλυκεραλδεύδη έχει ένα μόνο ασύμμετρο άτομο άνθρακα και έτσι υπάρχουν δύο στερεοισομερή αυτού του σακχάρου. Η D- γλυκεραλδεύδη και η L- γλυκεραλδευδη είναι εναντιομερή, ή είδωλα το ένα του άλλου.

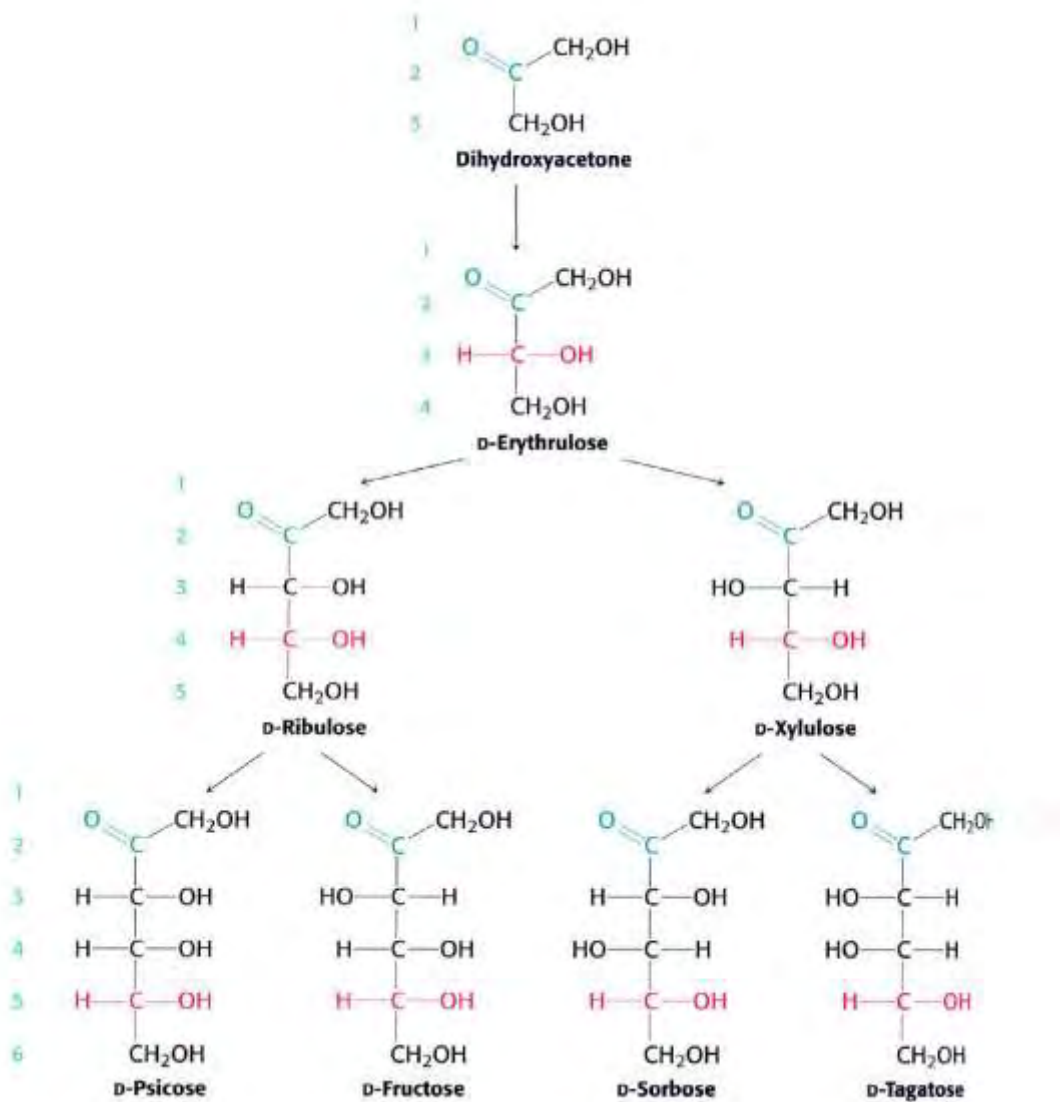
Απλοί μονοσακχαρίτες με τέσσερα, πέντε, έξι και επτά άτομα άνθρακα καλούντε τετρόζες, πεντόζες, εξόζες και επτόζες. Επειδή τα μόρια αυτά έχουν πολλαπλούς ασύμμετρους άνθρακες, υπάρχουν ως διαστερεοισομερή, ισομερή τα οποία δεν είναι είδωλα καθρέπτη το ένα του άλλου, καθώς επίσης και ως εναντιομερή. Σε σχέση με τους μονοσακχαρίτες αυτούς, τα σύμβολα D και L καθορίζουν την απόλυτη διαμόρφωση του πιο απομακρυσμένου από την αλδευδική ή κετονική ομάδα ασύμμετρου άνθρακα. Η εικόνα 2 δείχνει τα κοινά σάκχαρα D-αλδόζης.



Εικόνα 2 Οι D-αλδόζες περιέχουν τρία, τέσσερα, πέντε και έξι άτομα άνθρακά. Οι D-αλδόζες περιέχουν μια αλδευδική ομάδα και στο πιο απομακρυσμένο από την αλδευδική ομάδα ασύμμετρο κέντρο έχουν την απόλυτη διαμόρφωση της D-γλυκεραλδευδης. Οι αριθμοί δείχνουν τους πρότυπους αριθμούς για κάθε ομάδα άνθρακα.

Η D-ριβόζη, το υδατανθρακικό συστατικό του RNA, είναι μια αλδόζη με πέντε άτομα άνθρακα. Η D-γλυκόζη, D-μαννόζη και η D-γαλακτόζη είναι αλδόζες με έξι άτομα άνθρακα και είναι άφθονες στη φύση. Επισημαίνουμε ότι η D-γλυκόζη και η D-μαννόζη διαφέρουν μόνο στην διαμόρφωση του C-2. Τα σάκχαρα που διαφέρουν στην διαμόρφωση μόνο ενός ασύμμετρου κέντρου ονομάζονται επιμερή. Έτσι, η D-γλυκόζη και η D-μαννόζη είναι επιμερή στον C-2, η D-γλυκόζη και η D-γαλακτόζη είναι επιμερή στον C-4.

Η διυδροξυκετόνη είναι η απλούστερη κετόζη. Η στερεοχημική σχέση μεταξύ των D-κετοζών που περιέχουν έξι άτομα άνθρακα φαίνονται στην εικόνα 3.

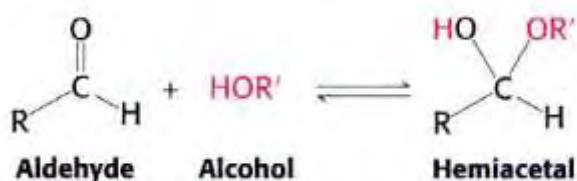


Εικόνα 3 D-κετόζες με τρία, τέσσερα, πέντε και έξι άτομα άνθρακα. Το πιο απομακρυσμένο από την κετονική ομάδα ασύμμετρο κέντρο, καθορίζει τον προσδιορισμό D.

Επισημαίνουμε ότι οι κετόζες έχουν ένα λιγότερο ασύμμετρο κέντρο από τις αλδόζες, με τον ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα. Η D-φρουκτόζη είναι η πιο άφθονη κετοεξόζη στη φύση. (Biochemistry, Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer)

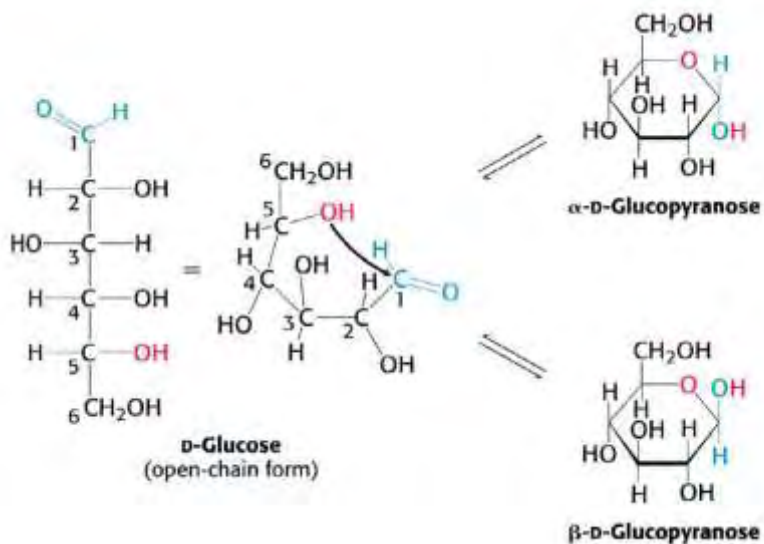
### 1.2.1 Σχηματισμός δακτυλίου φουρανόζης και πυρανόζης.

Οι επικρατέστεροι τύποι της ριβόζης, της γλυκόζης, της φρουκτόζης και πολλών άλλων σακχάρων σε διάλυμα δεν είναι η ανοιχτή αλυσίδα. Μάλλον, οι ανοιχτές αλυσίδες των ενώσεων αυτών κυκλοποιούνται σε δακτυλίους. Γενικά, μία αλδεύδη μπορεί να αντιδρά με μία αλκοόλη για να σχηματίσει μία ημιακετάλη.



Εικόνα 4

Για μια αλδοεξόζη όπως η γλυκόζη, η αλδευδική ομάδα C-1 του τύπου ανοιχτής αλυσίδας αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μια ενδομοριακή ακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται ονομάζεται πυρανόζη λόγω της ομοιότητας του με το πυράνιο.



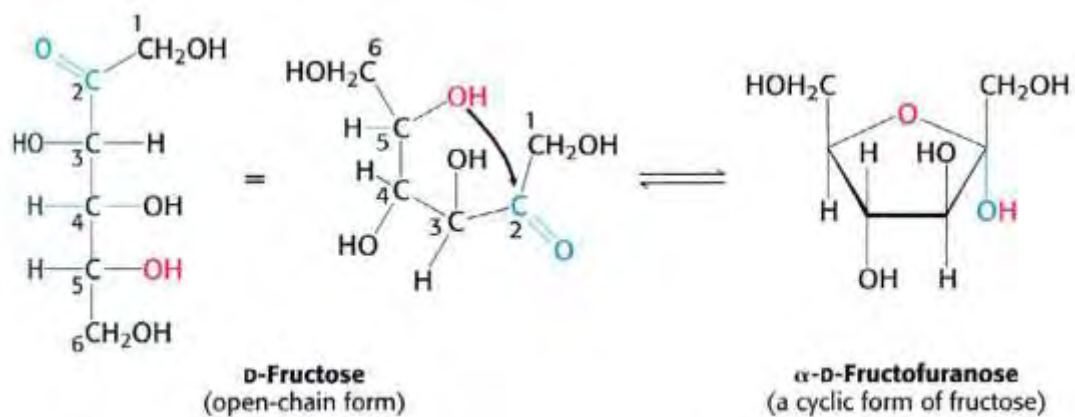
Εικόνα 5 Η μορφή της ανοιχτής αλυσίδας κυκλοποιείται όταν η υδροξυλική ομάδα του C-5 επιτίθεται στο άτομο οξυγόνου της αλδευδικής ομάδας του C-1 για να σχηματίσει μια ενδομοριακή ημιακετάλη. Μπορεί να προέλθουν δύο ανωμερείς μορφές που προσδιορίζονται με τα γράμματα α και β.

Παρομοίως μία κετόνη μπορεί να αντιδρά με μία αλκοόλη για να σχηματίσει μία ημικετάλη.

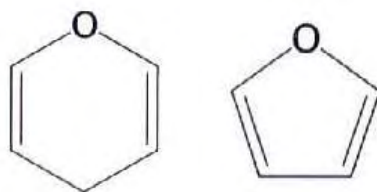


Εικόνα 6

Η κετονική ομάδα στον C-2 του τύπου ανοιχτής αλυσίδας μιας κετοεξόζης, όπως η φρουκτόζη, μπορεί να σχηματίσει μία ενδομοριακή ημικετάλη αντιδρώντας είτε με την υδροξυλική ομάδα του C-6 για να σχηματίσει μία εξαμελή κυκλική ημικετάλη είτε με την υδροξυλική ομάδα του C-5 για να σχηματίσει μια πενταμελή κυκλική ημικετάλη.



Εικόνα 7 Η μορφή της ανοιχτής αλυσίδας της φρουκτόζης κυκλοποιείται σε έναν πενταμελή δακτύλιο όταν η υδροξυλική ομάδα του C-5 επιτίθεται στην κετονική ομάδα του C-2 για να σχηματίσει μια ενδομοριακή ημικετάλη. Δύο ανωμερή είναι πιθανά, δείχνεται το α.

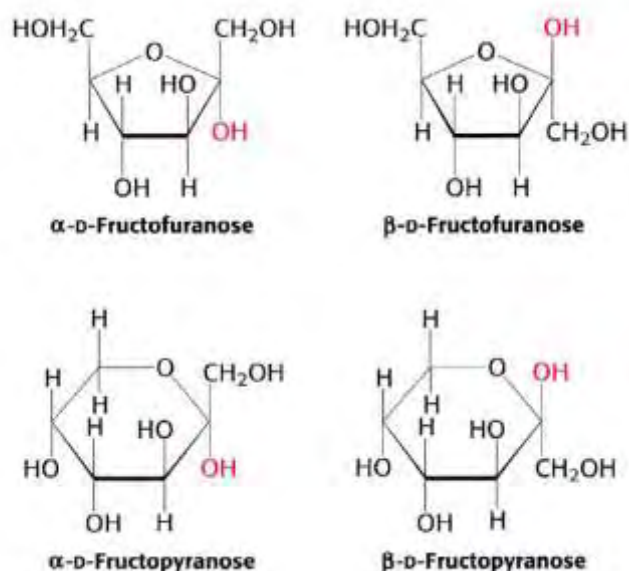


Εικόνα 8 Πυράνιο και Φουράνιο.

Ο πενταμελής αυτός δακτύλιος σακχάρου ονομάζεται φουρανόζη λόγω της ομοιοτητας της με το φουράνιο.

Όταν σχηματίζεται μια ημιακετάλη σχηματίζεται ένα πρόσθετο ασύμμετρο κέντρο. Στη γλυκόζη, ο καρβονυλικός άνθρακας C-1 στη μορφή ανοιχτής αλυσίδας, μετατρέπεται σε ένα ασύμμετρο κέντρο. Έτσι μπορούν να προκύψουν δύο μορφές : η α-D-Γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη (Εικόνα 5). Για τα D-σάκχαρα ο προσδιορισμός α σημαίνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου, ενώ β σημαίνει ότι βρίσκεται επάνω από το επίπεδο του δακτυλίου. Ο άνθρακας C-1 χαρακτηρίζεται ως ανωμερικό άτομο άνθρακα και οι μορφές α και β καλούνται ανωμερή.

Η ίδια ονοματολογία εφαρμόζεται και στον δακτύλιο φουρανόζης της φρουκτόζης, με την διαφορά ότι τα α και β αναφέρονται στις υδροξυλικές ομάδες που είναι ενωμένες στον άνθρακα C-2, που είναι και ανωμερές (Εικόνα 7). Η φρουκτόζη σχηματίζει δακτυλίους πυρανόζης και φουρανόζης. Η μορφή πυρανόζης επικρατεί όταν η φρουκτόζη είναι μόνη της στο διάλυμα, ενώ η μορφή φουρανόζης είναι η κυριότερη για τα περισσότερα παράγωγά της . Η φρουκτόζη μπορεί να σχηματίσει και τους πενταμελείς δακτυλίους της φουρανόζης και τους εξαμελείς δακτυλίους της πυρανόζης. Σε κάθε περίπτωση είναι πιθανά και τα δύο α- και β- ανωμερή (Εικόνα 9). Πεντόζες όπως η D-ριβόζη και η 2-δεόξυ-D-ριβόζη σχηματίζουν δακτυλίους φουρανόζης που τους συναντάμε στις δομές των μονάδων αυτών στο DNA και στο RNA. (Organic Chemistry, William H. Brown, Christopher S. Foote, Brent L. Iverson, Eric V. Anslyn, Bruce M. Novak)

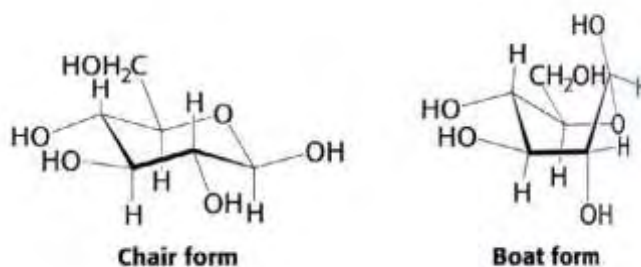


Εικόνα 9 Δομές δακτυλίου της φρουκτόζης. Η φρουκτόζη μπορεί να σχηματίσει και τους πενταμελείς δακτυλίους της φουρανόζης και τους εξαμελείς δακτυλίους της πυρανόζης. Σε κάθε περίπτωση, είναι πιθανά και τα δύο α και β ανωμερή.



### 1.2.2 Η στερεοδιάταξη των δακτυλίων Πυρανόζης και Φουρανόζης.

Ο εξαμελής δακτύλιος της πυρανόζης δεν είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα. Αντίθετα, οι δακτύλιοι της πυρανόζης υιοθετούν δύο τάξεις στερεοδιατάξεων, του ανάκλιντρου (chair) και του λουτήρα(boat), λόγω της ομοιότητας τους με τα αντικείμενα αυτά.



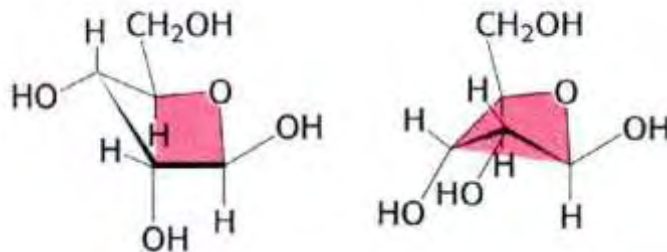
Εικόνα 10

Στη μορφή του ανάκλιντρου, οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου έχουν δύο προσανατολισμούς: αξονικό και ισημερινό. Οι αξονικοί δεσμοί είναι σχεδόν κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί δεσμοί είναι σχεδόν παράλληλοι προς το επίπεδο αυτό. Οι αξονικοί υποκαταστάτες παρεμποδίζουν στερεοχημικά (steric hindrance) ο ένας τον άλλον εάν προβάλλουν από την ίδια πλευρά του δακτυλίου. Αντίθετα υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για τους ισομερικούς υποκαταστάτες. Η μορφή του ανάκλιντρου της β-D-γλυκοπυρανόζης είναι η επικρατέστερη, γιατί όλες οι αξονικές θέσεις καταλαμβάνονται από άτομα υδρογόνου. Οι ογκωδέστερες ομάδες  $-OH$  και  $-CH_2OH$  περιβάλλουν στην περιφέρεια με μικρή στερεοχημική παρεμπόδιση. Η μορφή λουτήρα της γλυκόζης δεν ευνοείται διότι στερεοχημικά παρεμποδίζεται εντελώς.



Εικόνα 11.

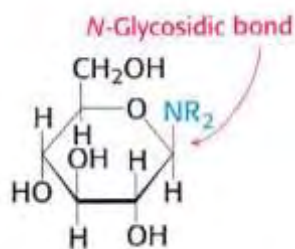
Οι δακτύλιοι φουρανόζης, όπως και πυρανόζης, δεν είναι επίπεδοι. Είναι δυνατόν να είναι πτυχωμένοι έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι σχεδόν στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο 0,5 Å μακριά από το επίπεδο. Αυτή η στρεωδιατάξη καλείται μορφή φακέλου διότι η δομή αυτή μοιάζει με ανοιχτό φάκελο με το πίσω μέρος ανασηκωμένο. Στην ομάδα της ριβόζης των περισσότερων βιομορίων, είτε ο C-2 είτε ο C-3 είναι εκτός επιπέδου στην ίδια πλευρά με τον C-5. Αυτές οι διαμορφώσεις καλούνται αντίστοιχα C2-ενδο και C3-ενδο. (Organic Chemistry, Mark Loudon)



Εικόνα 12 Στερεοδιατάξεις φακέλου της β-D-ριβόζης. Το μαρκάρισμα δείχνει τα τέσσερα άτομα τα οποία βρίσκονται κατά προσέγγιση στο ίδιο επίπεδο.

### 1.3 Σχηματισμός γλυκοζιτικών δεσμών

Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να τροποποιηθούν αντιδρώντας με αλκοόλες και αμίνες για να σχηματίσουν προϊόντα προσθήκης. Για παράδειγμα η γλυκόζη αντιδρά με μεθανόλη σε όξινο περιβάλλον: ο ανωμερής άνθρακας αντιδρά με το υδροξύλιο της μεθανόλης, για να σχηματίσει δύο προϊόντα, τον μέθυλο- $\alpha$ -D-γλυκοκυρανοζίτη και τον μέθυλο- $\beta$ -D-γλυκοκυρανοζίτη.



Εικόνα 13

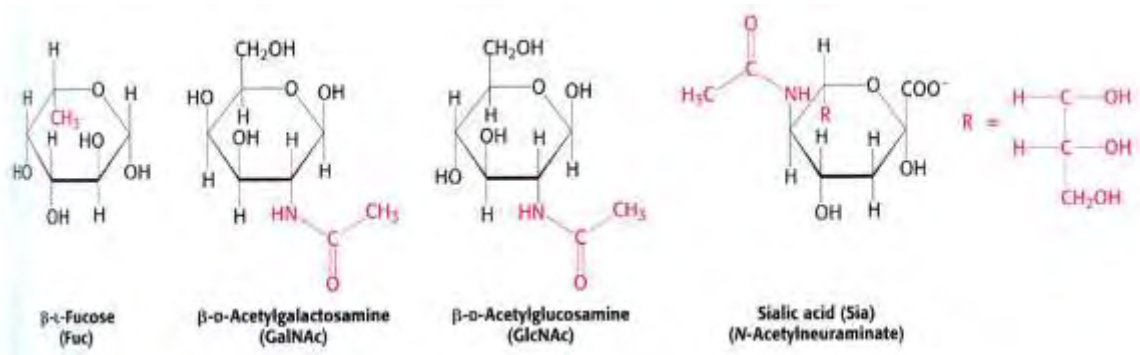
Αυτοί οι δύο γλυκοκυρανοζίτες διαφέρουν στην διαμόρφωση του ανωτερικού ατόμου άνθρακα.

Ο νέος δεσμός που σχηματίζεται μεταξύ του ανωτερικού ατόμου άνθρακα της γλυκόζης και του ατόμου του οξυγόνου του υδροξυλίου της μεθανόλης ονομάζεται γλυκοζιτικός δεσμός και πιο συγκεκριμένα, γλυκοζιτικός δεσμος O ή γλυκοζιτικός δεσμός μέσω οξυγόνου. Το ανωτερικό άτομο άνθρακα ενός σακχάρου μπορεί να ενωθεί με άτομο αζώτου μιας αμίνης και να σχηματίσει έναν γλυκοζιτικό δεσμό N ή αλλιώς γλυκοζιτικό δεσμό μέσω αζώτου.



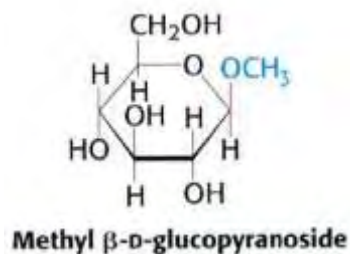
Εικόνα 14

Τέτοια προϊόντα αντιδράσεων είναι οι νουκλεοζίτες. Πρόκειται για προϊόντα προσθήκης μεταξύ σακχάρων όπως η ριβόζη και αμινών όπως η αδενίνη. Άλλα τροποποιημένα σάκχαρα βλέπουμε στην εικόνα 15.

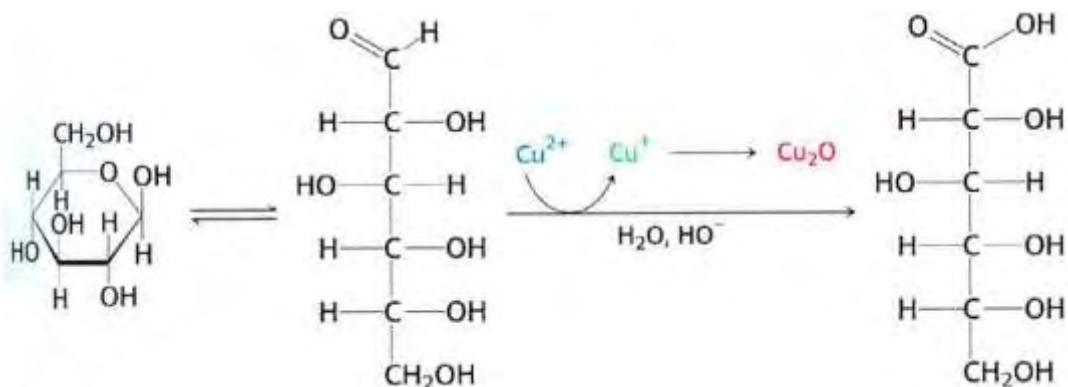


Εικόνα 15 Τροποποιημένοι μονοσακχαρίτες. Οι υδατάνθρακες μπορούν να τροποποιηθούν με την προσθήκη υποκαταστατών, διαφορετικών από τις υδροξυλικές ομάδες. Τέτοιοι τροποποιημένοι υδατάνθρακες εκφράζονται συχνά στις κυτταρικές επιφάνειες.

Ενώσεις όπως ο μέθυλο-γλυκοκυρανοζίτης παρουσιάζουν διαφορές στη δραστικότητα από εκείνη του γονικού μονοσακχαρίτη. Παραδείγματος χάριν, ατροποιοιήτη γλυκόζη αντιδρά με οξειδωτικούς παράγοντες όπως τα ιόντα χαλκού (Cu<sup>2+</sup>) διότι η μορφή της ανοιχτής αλυσίδας έχει μια ελεύθερη αλδευδική ομάδα όπου οξειδώνεται ευκολα.



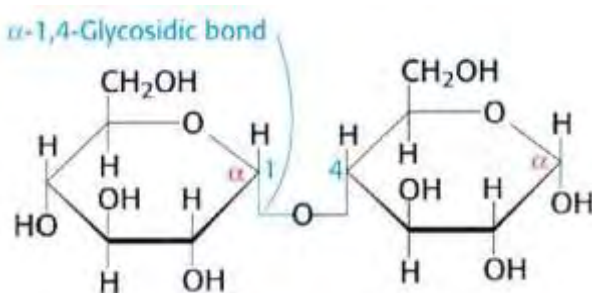
Εικόνα 16



Εικόνα 17

Γλυκοζίτες όπως ο μέθυλο-γλυκοκυρανοζίτης δεν αντιδρούν, διότι δεν μετατρέπονται εύκολα σε μία μορφή που περιλαμβάνει μια ελεύθερη αλδευδική ομάδα. Διαλύματα ιόντων χαλκού, γνωστά και ως Fehling, αποτελούν μια απλή διαδικασία για σάκχαρα όπως η γλυκόζη. Τα σάκχαρα που αντιδρούν ονομάζονται αναγωγικά σάκχαρα, ενώ εκείνα που δεν αντιδρούν καλούνται μη αναγωγικά σάκχαρα.

Επειδή τα σάκχαρα περιέχουν πολλές υδροξυλικές ομάδες, οι γλυκοζιτικοί δεσμοί μπορούν να ενώνουν τους μονοσακχαρίτες μεταξύ τους. Οι ολιγοσακχαρίτες σχηματίζονται με την σύνδεση δύο οι περισσότερων μονοσακχαριτών με γλυκοζιτικούς δεσμούς O. Για παράδειγμα, στη μαλτόζη ενώνονται δύο κατάλοιπα D-γλυκόζης με έναν γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ της α-ανωμερικής μορφής του C-1 στο ένα σάκχαρο και του υδροξυλικού οξέος στον C-4 του παρακείμενου σακχάρου. Ένας τέτοιος δεσμός ονομάζεται γλυκοζιτικός δεσμός α-1,4. Το γεγονός ότι οι μονοσακχαρίτες έχουν πολλές υδροξυλικές ομάδες σημαίνει ότι είναι πιθανοί ποικίλοι γλυκοζιτικοί δεσμοί. Η μεγάλη σειρά των δεσμών αυτών μαζί με τη μεγάλη ποικιλία των μονοσακχαριτών και τις πολλές ισομερείς μορφές τους καθιστά τους πολύπλοκους υδατάνθρακες μόρια πλούσια σε πληροφορίες. (Biochemistry, Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer)



Εικόνα 18

## 2.Νουκλειικά οξέα και νουκλεοτίδια.

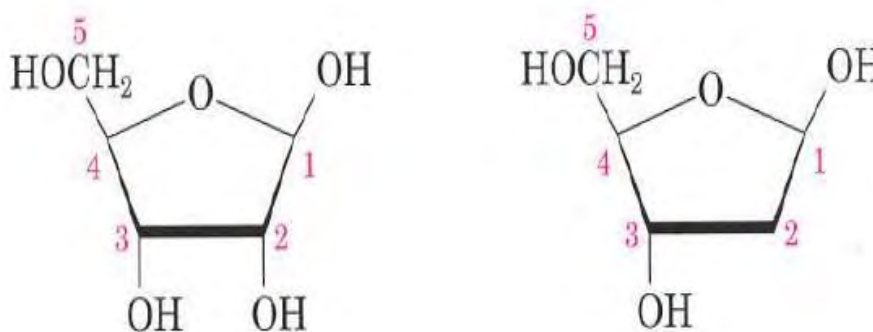
Τα νουκλειικά οξέα, δεοξυριβονουκλεικό οξύ (DNA) και ριβονουκλεικό οξύ (RNA), είναι τα μόρια φορείς της γενετικής πληροφορίας ενός κυττάρου. Στα μόρια των DNA βρίσκονται κωδικοποιημένες όλες οι πληροφορίες οι οποίες προσδιορίζουν τη φύση του κυττάρου, ελέγχουν την ανάπτυξη και την διαίρεση του και κατευθύνουν τη βιοσύνθεση των ενζύμων και των άλλων πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τις φυσιολογικές λειτουργίες του.

Τα νουκλεικά οξέα είναι βιοπολυμερή που απαρτίζονται από νουκλεοτίδια, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μακρές αλυσίδες. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από ένα νουκλεοζίτη συνδεδεμένο με μια φωσφορική ομάδα, ενώ κάθε νουκλεοζίτης αποτελείται από ένα σάκχαρο (αλδοπεντόζη) συνδεδεμένο με μια ετεροκυκλική βάση πουρίνης ή πυριδίνης



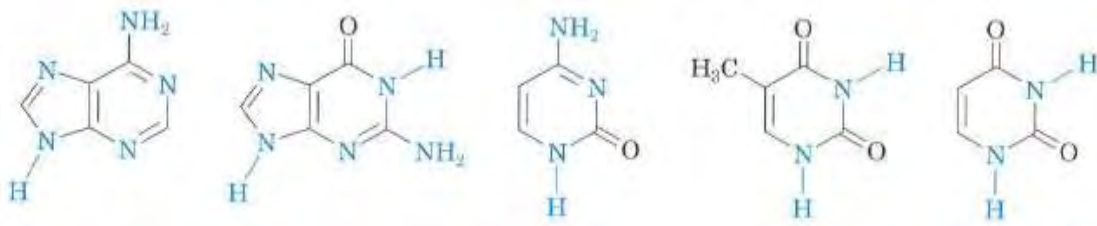
Εικόνα 19 Βήματα σχηματισμού νουκλεικού οξέος

Το σάκχαρο που συμμετέχει στο RNA είναι η ριβόζη, ενώ αυτό που συμμετέχει στο DNA είναι η 2'-δεοξυριβόζη. (Το πρόθεμα 2'-δεόξυ υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει άτομο οξυγόνου στη θέση 2' της ριβόζης. Οι αριθμοί που τονίζονται αναφέρονται σε θέσεις του σακχάρου του νουκλεοτιδίου, ενώ οι αριθμοί χωρίς τονισμό αναφέρονται σε θέσεις του ετεροκυκλικού δακτυλίου της βάσης.)



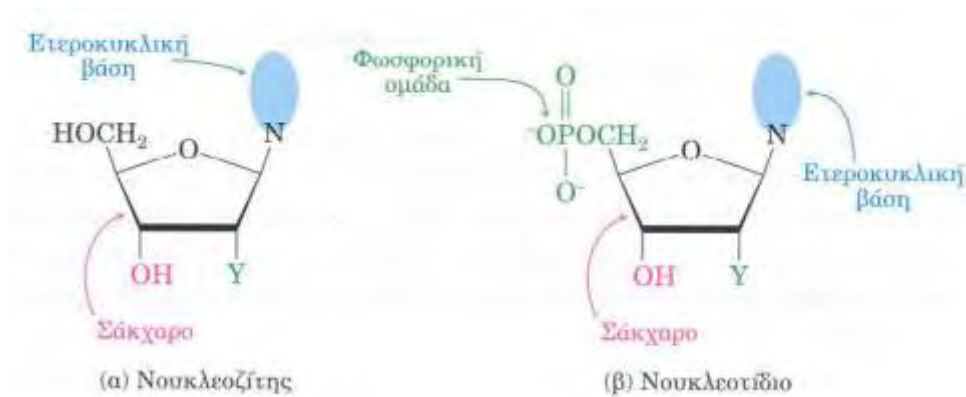
Εικόνα 20 Απεικόνιση της ριβόζης και της 2'-δεοξυριβόζης.

Στα δεοξυριβονουκλεοτίδια απαντούν τέσσερις διαφορετικές ετεροκυκλικές βάσεις. Οι δύο είναι υποκατεστημένες πουρίνες (αδενίνη και γουανίνη), ενώ οι άλλες δύο είναι υποκατεστημένες πυριδίνες (κυτοσίνη και θυμίνη). Η αδενίνη, η γουανίνη και η κυτοσίνη αποτελούν επίσης συστατικά των RNA, όμως η θυμίνη δεν απαντά σε αυτά και αντικαθίσταται από μια άλλη πυριμιδινική βάση που λέγεται ουρακίλη.

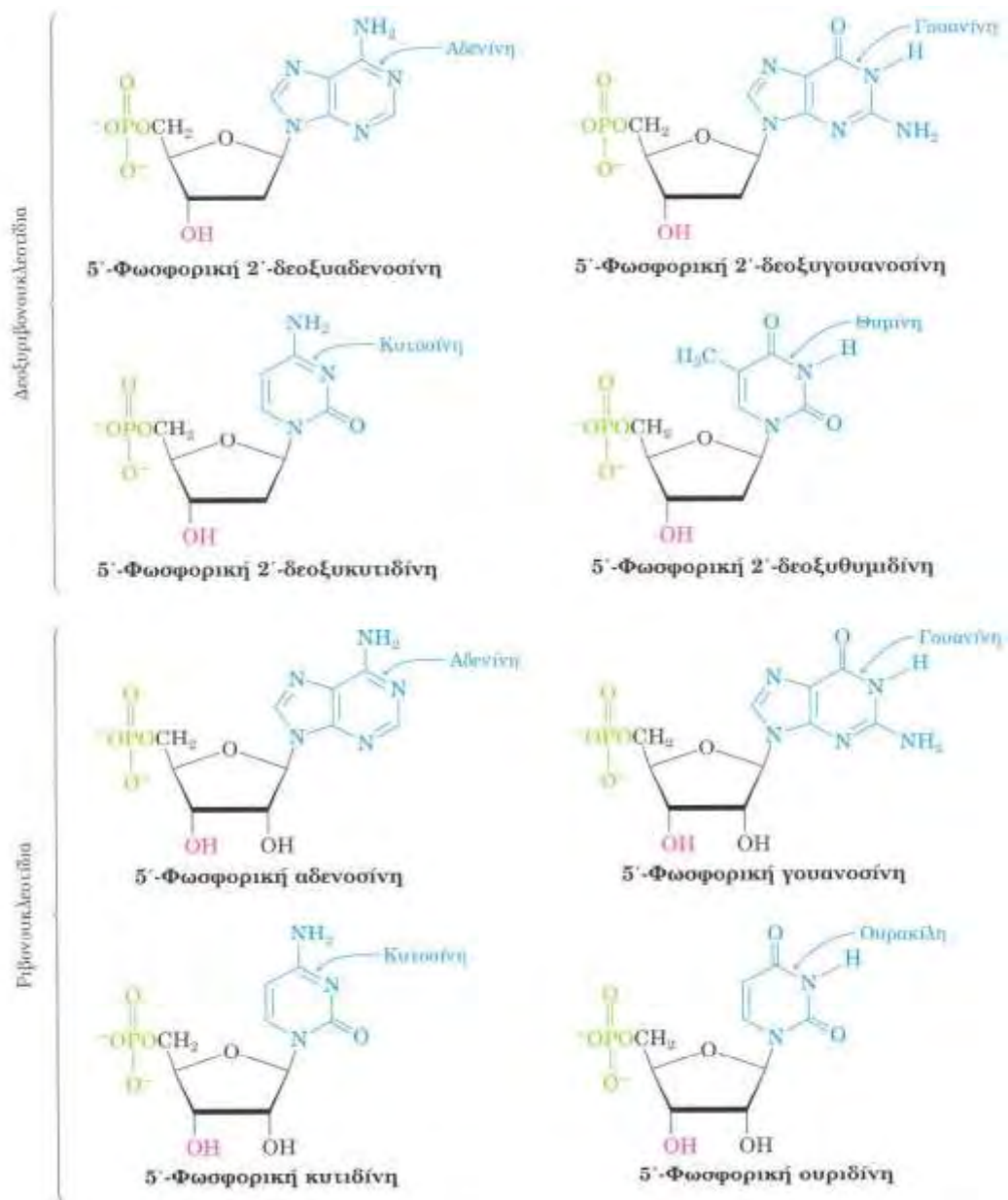


Εικόνα 21 Από τα αριστερά, αδενίνη (A), γουανίνη (G), κυτοσίνη (C), θυμίνη (T) και ουρακίλη (U).

Τόσο στο DNA όσο και στο RNA, οι ετεροκυκλικές αμίνες (οι βάσεις) ενώνονται με τον C1' του σακχάρου, ενώ η φωσφορική ομάδα ενώνεται μέσω εστερικού δεσμού C5' του σακχάρου. Έτσι οι νουκλεοζίτες και τα νουκλεοτίδια παρουσιάζουν την γενική δομή που φαίνεται στην εικόνα 36. Οι πλήρες δομές των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων και των τεσσάρων ριβονουκλεοτιδίων παρατίθενται στην εικόνα 37.



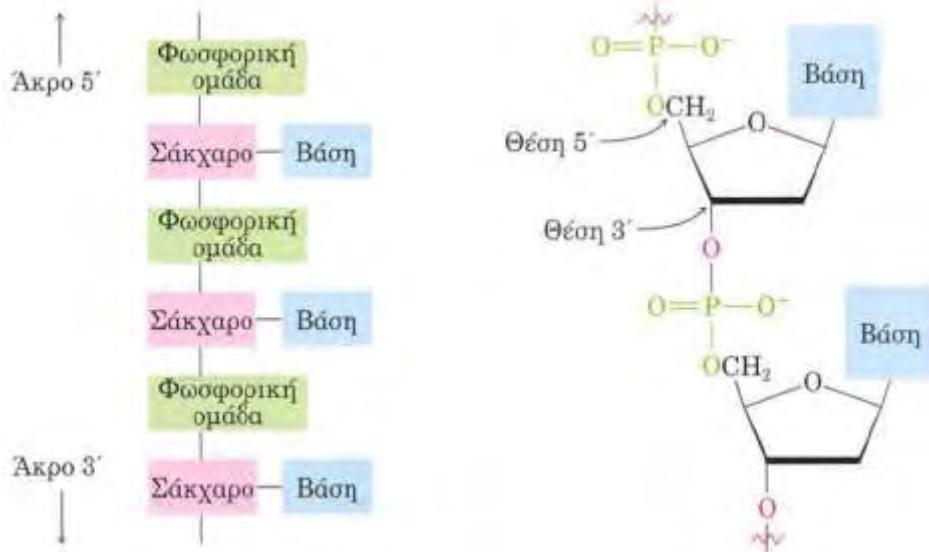
Εικόνα 22 (α) Ένας νουκλεοζίτης και (β) ένα νουκλεοτίδιο. Όταν  $Y=H$ , το σάκχαρο είναι η δεοξυριβόζη. Όταν  $Y=OH$ , το σάκχαρο είναι ριβόζη.



Εικόνα 23 Ονομασίες και δομές των τεσσάρων δεοξυριβονουκλεοτιδίων και των τεσσάρων ριβονουκλεοτιδίων.

Παρόλο που το DNA και το RNA είναι παρόμοια από χημική άποψη, έχουν διαφορετικό μέγεθος και διαφορετικούς βιολογικούς ρόλους μέσα στο κύτταρο. Τα μόρια των είναι τεράτια. Έχουν μοριακά βάρη που μπορεί να φθάσουν τα 150 δισεκατομμύρια, μήκος μέχρι 12 cm και απαντούν κυρίως στους πυρήνες των κυττάρων. Τα μόρια των RNA, αντίθετα, είναι πολύ μικρότερα (το μοριακό βάρος τους δεν υπερβαίνει τις 35.000) και απαντούν κυρίως έξω από τον πυρήνα του κυττάρου. (Organic Chemistry, John McMurry).





Εικόνα 24 Γενικευμένη δομή του DNA

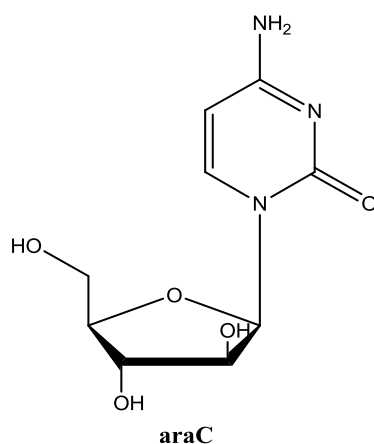
### 3.Νουκλεοζίτες και ανάλογά τους

Η χημεία των νουκλεοζιτών αποτελεί ένα από τα κλασικά αλλά και πιο σημαντικά αντικείμενα στην οργανική σύνθεση. Μεγάλος αριθμός ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη, σύνθεση και βιολογική ταυτοποίηση νουκλεοζιτών και νουκλεοζιτικών αναλόγων. Έχει διαπιστωθεί ότι οι νουκλεοζίτες επιδεικνύουν σημαντική αντικαρκινική, αντιβακτηριακή και αντικική δράση. Έχει βρεθεί επίσης ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντικική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. Συνεπώς έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών δραστηριοτήτων τους.

#### 3.1 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια πεντόζη

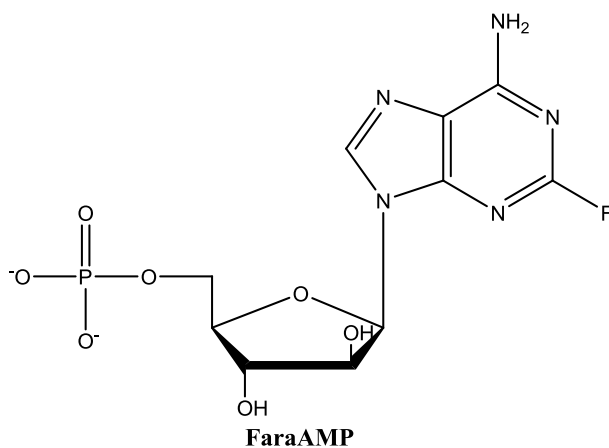
Ο σπουδαίος ρόλος των πεντοζών αναγνωρίστηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως κύριες δομικές μονάδες των νουκλεϊκών οξέων. Η πλειοψηφία των μέχρι τώρα ερευνητικών προσπαθειών για τη δημιουργία φαρμάκων με αντικική και αντικαρκινική δράση, αφορούν κυρίως στη χρήση αναλόγων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

Το Cytarabine (araC) (Εικόνα 44), το οποίο είναι το πρώτο πυραμιδικό νουκλεοζιτικό ανάλογο που χρησιμοποιήθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας



Εικόνα 25: Χημική δομή του araC

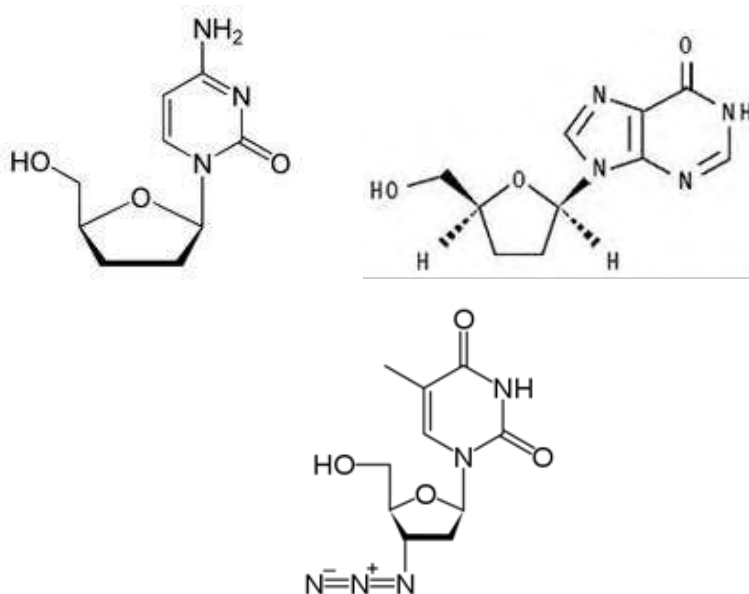
Η 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλαδενίνη (araA) είναι ένα από τα πρώτα πουργινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα, το οποίο απορρίφθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας λόγω της χαμηλής διαλυτότητας και της γρήγορης απαμίνωσής της από την απαμινάση της αδενοσίνης. Η προσθήκη ενός ατόμου φθορίου στο τμήμα της αδενίνης αύξησε την αντίσταση στην απαμινάση της αδενοσίνης και η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας βελτίωσε τη διαλυτότητα του αναλόγου, συνθέτοντας την 5'-μονοφωσφορική 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-2-φθοροαδενίνη (fludarabine), (FaraAMP) (Matsuda et al. 2004). Το συγκεκριμένο ανάλογο είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας κατά της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων (Εικόνα 45).



Εικόνα 26: Χημική δομή του FaraAMP

Επίσης, μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα φουρανο νουκλεοζιτών με εξαιρετική αντική δράση είναι οι εξής:

Τα Zalcitabine (DDC), didanosine (DDI), zidovudine (AZT), τα οποία λειτουργούν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης και χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα έναντι του HIV (Εικόνα 46). Πρόκειται για 2',3'-διδεοξυνουκλεοζίτες που προκύπτουν από την απομάκρυνση των υδροξυλομάδων από τις 2',3'- θέσεις του δακτυλίου της ριβόζης.



Εικόνα 27: Χημική δομή των DDC, DDI, AZT

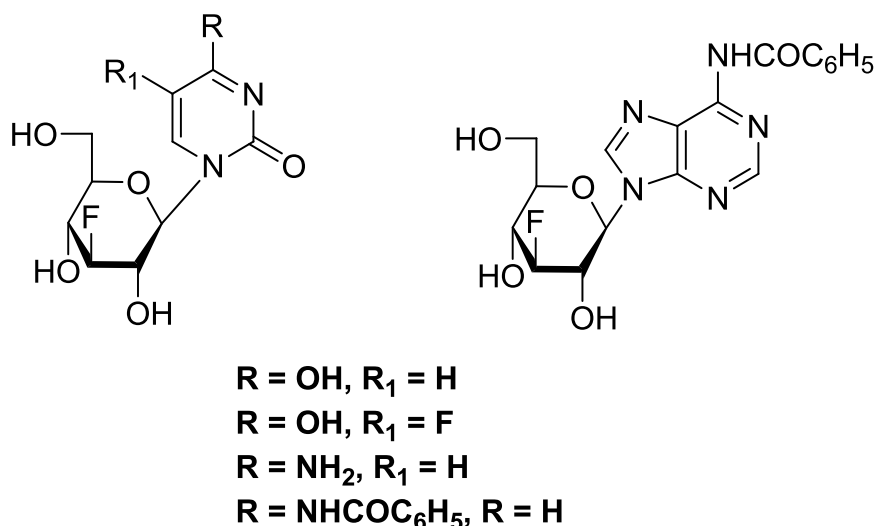
### 3.2 Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη

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.

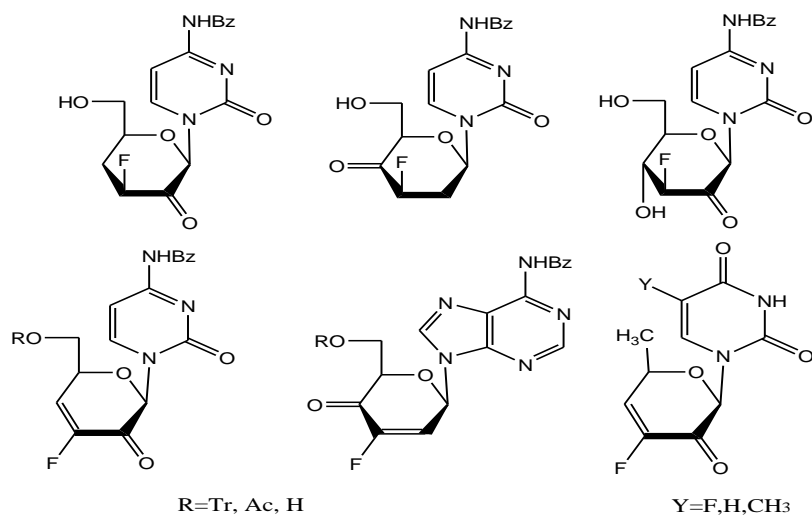
Έτσι λοιπόν, τα τελευταία χρόνια, συντέθηκαν νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους και ελέγχθηκαν για τις πιθανές αντιϊκές (Ostrowski et al. 1998), αντικαρκινικές (Malsen et al. 2004), αντιοξειδωτικές (Spanou et al. 2007) καθώς και αντιβιοτικές τους ιδιότητες (Haouz et 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 47)



Εικόνα 28: Χημική δομή φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών

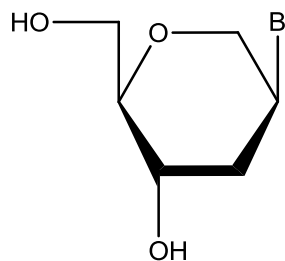
Επιπλέον έχουν αξιολογηθεί νέες σειρές νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο και πιο συγκεκριμένα οι φθοροκετο και ακόρεστοι φθοροκετο - πυρανονουκλεοζίτες. Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης εντεροϊού και αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Manta et al. 2007, Manta et al. 2008, Manta et al. 2009) (Εικόνα 48).



Εικόνα 29:Χημική δομή φθοροκέτο και ακόρεστων φθοροκέτο-πυρανονουκλεοζιτών

Άλλη μία σημαντική κατηγορία νουκλεοζιτών με τροποποιημένο εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είναι οι δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες, οι οποίοι παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες. 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 οι 6'-δεοξυ-κετονουκλεοζίτες παρουσίασαν αξιοσημείωτη αντικαρκινική δράση, και επιπλέον από την εμφάνιση αντιβιοτικών, τα οποία περιέχουν 6'-δεοξυπυρανόζες. Αξιοσημείωτη όμως, είναι και η αντική, καθώς και η αντιλευχαιμική δράση που εμφάνισαν ορισμένοι πουρινικοί και πυριμιδινικοί 2'-δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες. 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 (ένωση I, εικόνα 19) (Verheggen I. et al, 1993, Verheggen I. et al, 1995).

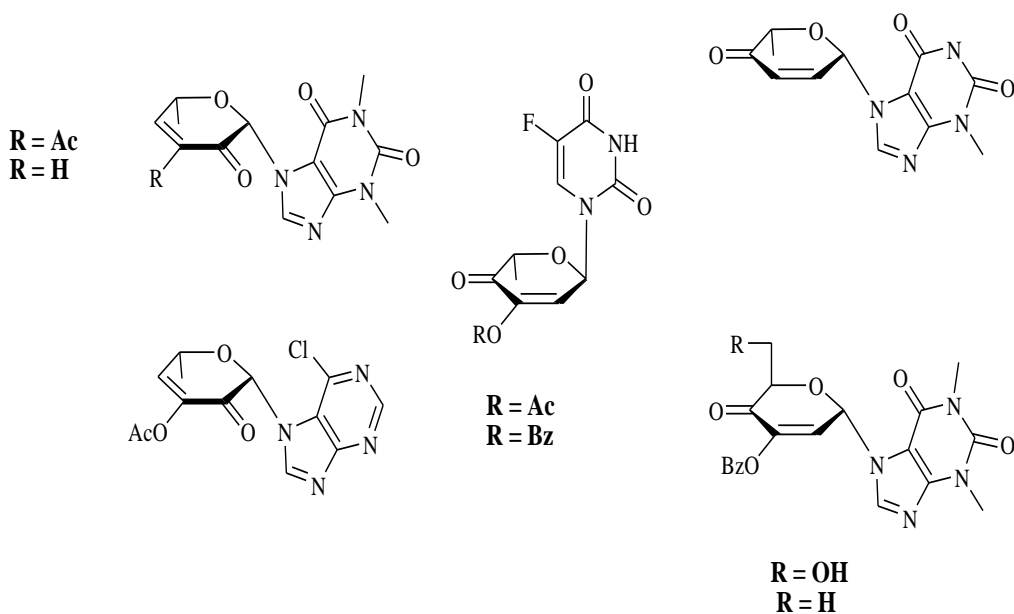


**I**

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

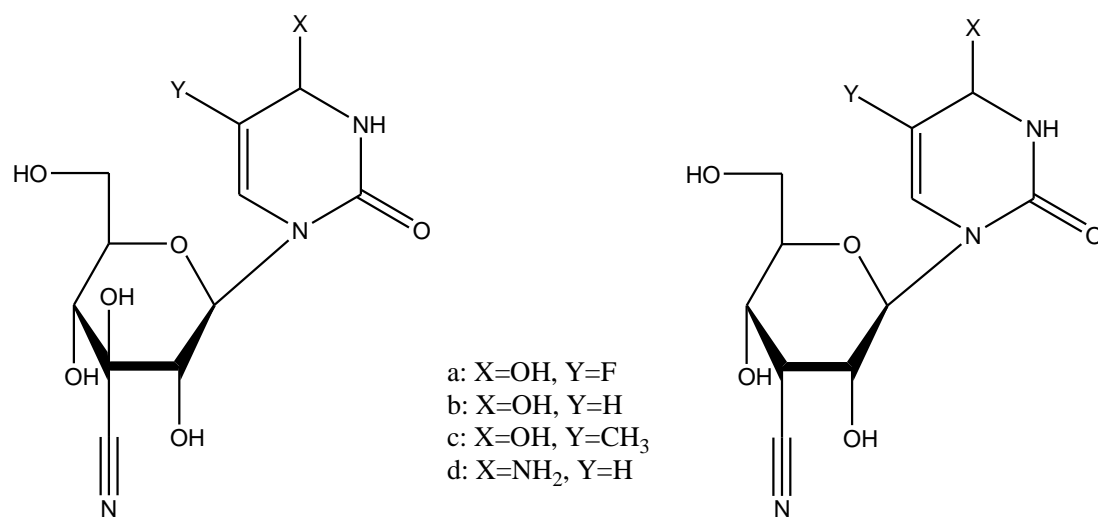
Εικόνα 30 : Δεοξυ-πυρανονουκλεοζίτες

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 31).



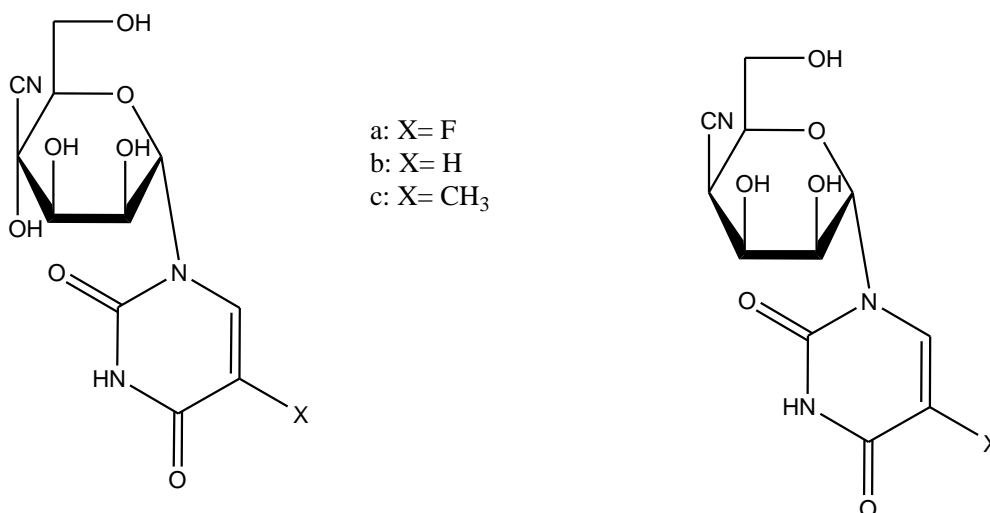
Εικόνα 31: Ακόρεστα κετο-πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα

Επίσης, τα τελευταία χρόνια ενδιαφέρον προέκυψε από μελέτες στην τάξη των 3'-κυανο- και 3'-δεοξυ-κυανο πυρανονουκλεοζιτών (Kiritsis et al., 2011) που παρουσίασαν σημαντική κυτταροστατική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων Τ-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και κατά του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa) (Εικόνα 32).



Εικόνα 32: 3' κύανο-νουκλεοζίτες

Τέλος ενδιαφέρον παρουσίασαν και μια νεα προσφατη τάξη των 4'κυανο- και 4'-δεοξυ-κυανο πυρανονουκλεοζιτών οι οποίες έδειξαν την ανασταλτική και κυτταροτοξική τους δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων Τ-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa).



Εικόνα 33: 4' κύανο-νουκλεοζίτες

### 3.3 Θεραπευτικός τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών

Η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά αλλά έχουν επίσης και τη δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Επιπρόσθετα λαμβάνει χώρα ενδοκυτταρική τροποποίησή τους με σκοπό την παραγωγή των νουκλεοτιδίων. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν τα νουκλεοτίδια ως βασικές δομικές μονάδες του γενετικού υλικού DNA και RNA. Με βάση την παραπάνω αναφορά για παθητική διάχυση, χρησιμοποιήθηκε η παρούσα ιδιότητα για την εφαρμογή των νουκλεοζιτικών αναλόγων, μορίων που αποτελούν χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοζιτών, ως αντικών και αντικαρκινικών παραγόντων για τη θεραπεία πολλών ασθενειών .

Τα φάρμακα, που ως δραστική ουσία έχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο, επιβάλλεται να αλληλεπιδράσουν με κάποιο μοριακό στόχο προκειμένου να είναι δραστικά. Ως μοριακοί στόχοι των νουκλεοζιτικών αναλόγων υπάγονται οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα . Οι πιο κοινοί τύποι πρωτεϊνών με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα φάρμακα είναι οι υποδοχείς, οι διάλυτοι ιόντων, τα ενζυμα και τα μόρια μεταφορείς. Ο βασικός λόγος που τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου και του AIDS, είναι ότι μπορούν να τροποποιηθούν δομικά, έτσι ώστε να παράγουν φαρμακολογικώς ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρώντας τις περισσότερες από τις μεταβολικές ιδιότητες των μητρικών ενώσεων, μπορούν να μεταφερθούν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν. Στη συνέχεια, μπορούν να παρέμβουν στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, έτσι ώστε να προωθήσουν είτε αντιπλλασιαστικές λειτουργίες, είτε την αντίσταση στην αντιγραφή



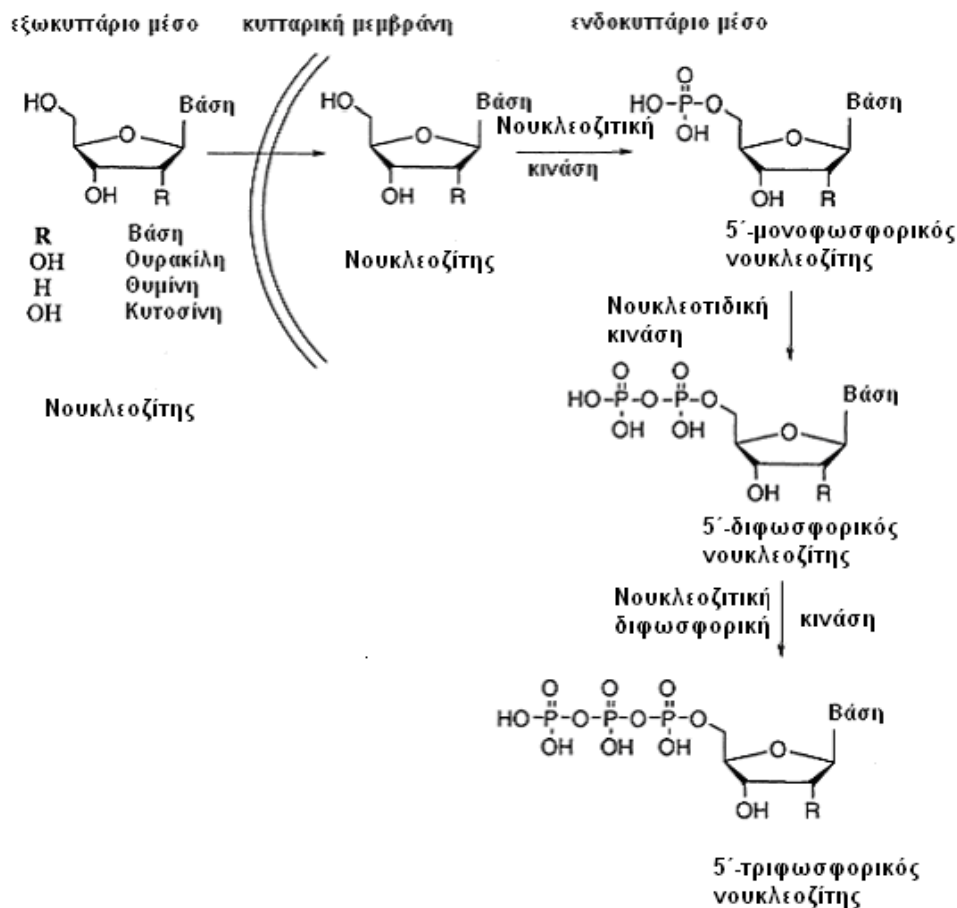
του ιού στα μολυσμένα κύτταρα. Τα αντικαρκινικά και τα αντιαυτά ανάλογα εμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό και την επισκευή του κυτταρικού DNA και τον αναδιπλασιασμό του ιικού γενώματος.

Τα θεραπευτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα, που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική τους δράση. Αν και τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, τα μη φωσφορυλιωμένα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες - μεταφορείς νουκλεοζιτών. Φωσφορυλιώνονται κατόπιν προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες.

Οι ιικές πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντιαυτό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντιαυτών φαρμάκων. Μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοζιτών, τα αντιαυτά φάρμακα νουκλεοζιτικών αναλόγων ενσωματώνονται στο ιικό γονιδίωμα από τις ιικές πολυμεράσες, κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του γενετικού υλικού. Αυτό το γεγονός εξασθενίζει τη σύνθεση ή τη λειτουργία του ιικού γονιδιώματος που προκύπτει και επομένως καταστέλλει την αντιγραφή του ιού. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα πιθανόν να είναι κατάλληλα για τη θεραπεία χρόνιων ιικών ασθενειών. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι ως φάρμακα έχουν γενικά υψηλή εκλεκτικότητα, εξαιρετική δραστική ικανότητα και μεγάλη διάρκεια δράσης. Επίσης τα ανάλογα των νουκλεοζιτών μπορούν να δράσουν και ως προφάρμακα, δεδομένου ότι πρέπει να φωσφορυλιωθούν στην 5' θέση του υδατάνθρακα από τις κυτταρικές κινάσες για να μπορέσουν να δράσουν κι αυτό είναι το «κλειδί» στην επιλεκτικότητά τους.

Η φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων στο κύτταρο, τα ενεργοποιεί και ανταγωνίζονται με τα φυσικά νουκλεοτιδία για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Επειδή η αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων είναι κοινή για όλες τις μορφές ιών, τα ανάλογα νουκλεοζιτών έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντιαυτή θεραπεία. Επειδή οι φωσφορυλιωμένες ενώσεις ιονίζονται συνήθως στο σώμα λόγω του διαφορετικού pH στα διάφορα διαμερίσματα, δεν μεταφέρονται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Οι ενεργές μορφές των νουκλεοτιδίων αποτελούν τριφωσφορικά άλατα, με όλες τις αντικαταστάσεις φωσφορικών στην 5'-θέση από ειδικές ιικές-κινάσες που συχνά

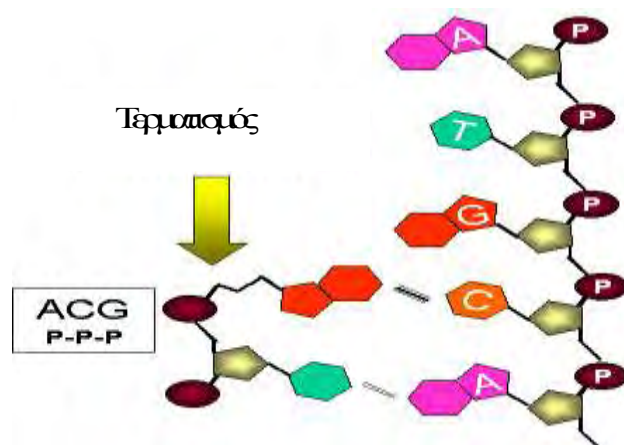
καταλύουν την πρώτη 5'-φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων, με την επόμενη φωσφορυλίωση από τις κυτταρικές κινάσες. Η πρώτη φωσφορυλίωση που οδηγεί στο σχηματισμό του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (MP) συνήθως καταλύεται από μία νουκλεοζιτική κινάση που κωδικοποιείται από το κύτταρο-ξενιστή ή τον ιό που μολύνει το κύτταρο-ξενιστή. Η μετατροπή των νουκλεοζιτών-MP προς τις αντίστοιχες 5'-διφωσφορικές και τριφωσφορικές δομές πραγματοποιείται από νουκλεοτιδικές κινάσες, καθώς και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντίστοιχα (Εικόνα 52). Συνεπώς, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι ιικές κινάσες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών. (Fundamentals of Molecular Virology, Nicholas H. Acheson)



Εικόνα 34 : Φωσφορυλίωση των αναλόγων νουκλεοζιτών

Αυτό μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση των αναλόγων φωσφορυλιωμένων νουκλεοτιδίων κυρίως στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί με ιό. Τα τμήματα των νουκλεϊκών οξέων διαμορφώνονται από τις κυτταρικές πολυμεράσες, οι οποίες συνδέουν το 5'-

νουκλεοτίδιο στην ομάδα 3'-υδροξυλίου ενός άλλου νουκλεοτιδίου. Σε αυτή την διαδικασία, απελευθερώνεται πυροφωσφορική ομάδα (PPi) και οι δύο ζάχαρες συνδέονται με φωσφοδιεστερική γέφυρα. Το σάκχαρο, είναι το τμήμα του νουκλεοζίτη που χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τις κινάσες και τις πολυμεράσες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την επιμήκυνση των αλυσίδων. Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας (Εικόνα 35).



Εικόνα 35: Τερματισμός αλυσίδας νουκλεϊκών οξέων

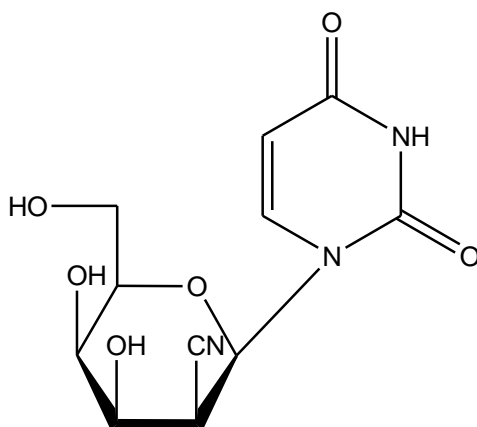
Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στον καρκίνο δεν έχει προσδιοριστεί. Πιο συγκεκριμένα οι ελεύθερες ρίζες σχετίζονται ιδιαίτερα με την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας. Όταν οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν φυσιολογικά κύτταρα προκαλείται βλάβη στο DNA, η οποία αποτελεί βασική προϋπόθεση για την έναρξη της καρκινογενετικής διαδικασίας. Ωστόσο, οι επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα διαφέρουν. Όταν οι ελεύθερες ρίζες παράγονται στα καρκινικά κύτταρα, φαίνεται να έχουν ευεργετική δράση καθώς προκαλούν την καταστροφή αυτών των κυττάρων με διάφορους μηχανισμούς. Έχει αποδειχθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες παίζουν ρόλο στη μείωση των τελομερών των κυττάρων, τα οποία στα καρκινικά κύτταρα διατηρούνται σε ένα συγκεκριμένο μέγεθος και συμβάλλουν στη διατήρηση του καρκινικού κυτταρικού φαινότυπου.

## ΣΤΟΧΟΣ-ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

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

Με βάση τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία έχει διαπιστωθεί ότι φουρανονουκλεοζίτες που φέρουν διακλαδωμένη κυανο αλυσίδα στο υδατανθρακικό τους τμήμα εμφανίζουν εξαιρετικό φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Κάποιες φορές μάλιστα η δράση τους είναι καλύτερη από τα ήδη χρησιμοποιούμενα φάρμακα.

Πρόσφατες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν από το εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, απέδειξαν ότι νέες τάξεις 3'-C-κυανο και 3'-δεοξυ-3'-C-κυανο καθώς και 4'-C-κυανο και 4'-δεοξυ-4'-C-κυανο πυρανονουκλεοζιτών αποτελούν εν δυνάμει αποτελεσματικούς αναστολείς της ανάπτυξης καρκινικών όγκων του τραχήλου της μήτρας όπως επίσης και των λεμφοκυττάρων. Βασιζόμενοι στα ανωτέρω και λαμβάνοντας υπόψη γενικότερα τις σημαντικές βιολογικές ιδιότητες που παρουσιάζουν οι δεοξυ πυρανονουκλεοζίτες, κρίθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών οι οποίοι θα διαθέτουν την ηλεκτραρνητική κυανο ομάδα αλλά και δεοξυ στην 2' θέση του σακχάρου, καθώς και ως ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη. Η δομή του μορίου που στόχευσε η συνθετική μας πορεία φαίνεται στην (εικόνα 36).



## ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 1. Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων.

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

- Ουρακίλη
- Hexamethyldisilazane (HMDS)
- Σακχαρίνη
- Ακετονιτρίλιο (CH<sub>3</sub>CN)
- 1,2,3,4,6 – πέντα – Ο – ακέτυλο – D – γαλακτοπυρανόζη
- Τριφθορομεθανοσουλφονικός τριμεθυλοσιλυλεστέρας (Me<sub>3</sub>SiOSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>)
- Ώξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO<sub>3</sub>)
- Dry sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>4</sub>)
- Μεθανολική Αμμωνία (NH<sub>3</sub>Met)
- Πυριδίνη
- Χλωρίδιο του tert-βουτυλο-διμεθυλο-σιλυλανίου (TBDMSCl)
- 4,4-Διμεθυλαμινοπυριδίνη (DMAP καταλυτικά)
- Άνυδρη Ακετόνη (Dry Aceton)
- 2,2-Διμεθοξυπροπάνιο [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]
- Ρ-τολουολοσουλφονικό οξύ (p-TsOH)

- Διχρωμική πυριδίνη (PDC)
- Οξικός ανυδρίτης (Ac<sub>2</sub>O)
- Κυανιούχο νάτριο (NaCN)
- Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH)
- Διαιθυλαιθέρα (DEE)
- Άνυδρου θειικό νάτριο (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Άνυδρο Τολουόλιο (Dry Tol)
- Azobisisobutyronitrile (AIBN)
- Tris(trimethylsilyl)silane
- Trifluoroacetic acid (TFA)

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

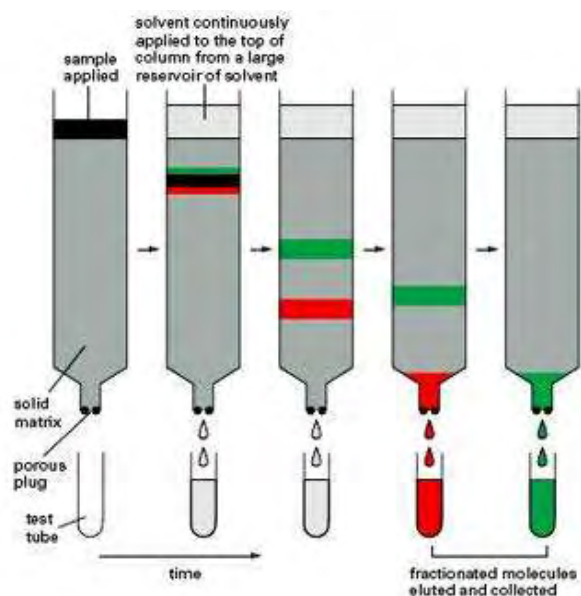
Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F24). Τα προϊόντα στα χρωματογραφήματα ανιχνεύονται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (θειικού οξέος) 30%, είτε μέσω UV ακτινοβολίας (254nm).

### Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Οι πλειοψηφία των καθαρισμών οργανικών ουσιών πραγματοποιούνται μέσω της χρωματογραφίας μιας τεχνικής κατά την οποία το επιθυμητό προϊόν διαλύεται σε έναν οργανικό διαλύτη ή σύστημα διαλυτών σε συγκεκριμένη κάθε φορά αναλογία και στη συνέχεια αφήνεται να διαρεύσει μέσω ενός κατακόρυφου γυάλινου σωλήνα ο οποίος είναι γεμάτος με προσροφητικό υλικό. Το προς διαχωρισμό μίγμα ονομάζεται κινητή φάση ενώ το προσροφητικό υλικό εντός του σωλήνα στατική. Επειδή οι

διαφορετικές ενώσεις προσροφώνται στη στατική φάση σε διαφορετική έκταση, μετακινούνται διαμέσου αυτής με διαφορετικές ταχύτητες και για το λόγο αυτό, εξέρχονται από τη στήλη –εκλύονται- από το άκρο της. Ο χρόνος έκλυσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα από την πολικότητά της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες προσροφώνται κατά κανόνα, εντονότερα και άρα μετακινούνται βραδύτερα μέσω της στατικής φάσης σε σχέση με τα περισσότερα άπολα.

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



Εικόνα 37

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).

### 3. Ξήρανση διαλυτών

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

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

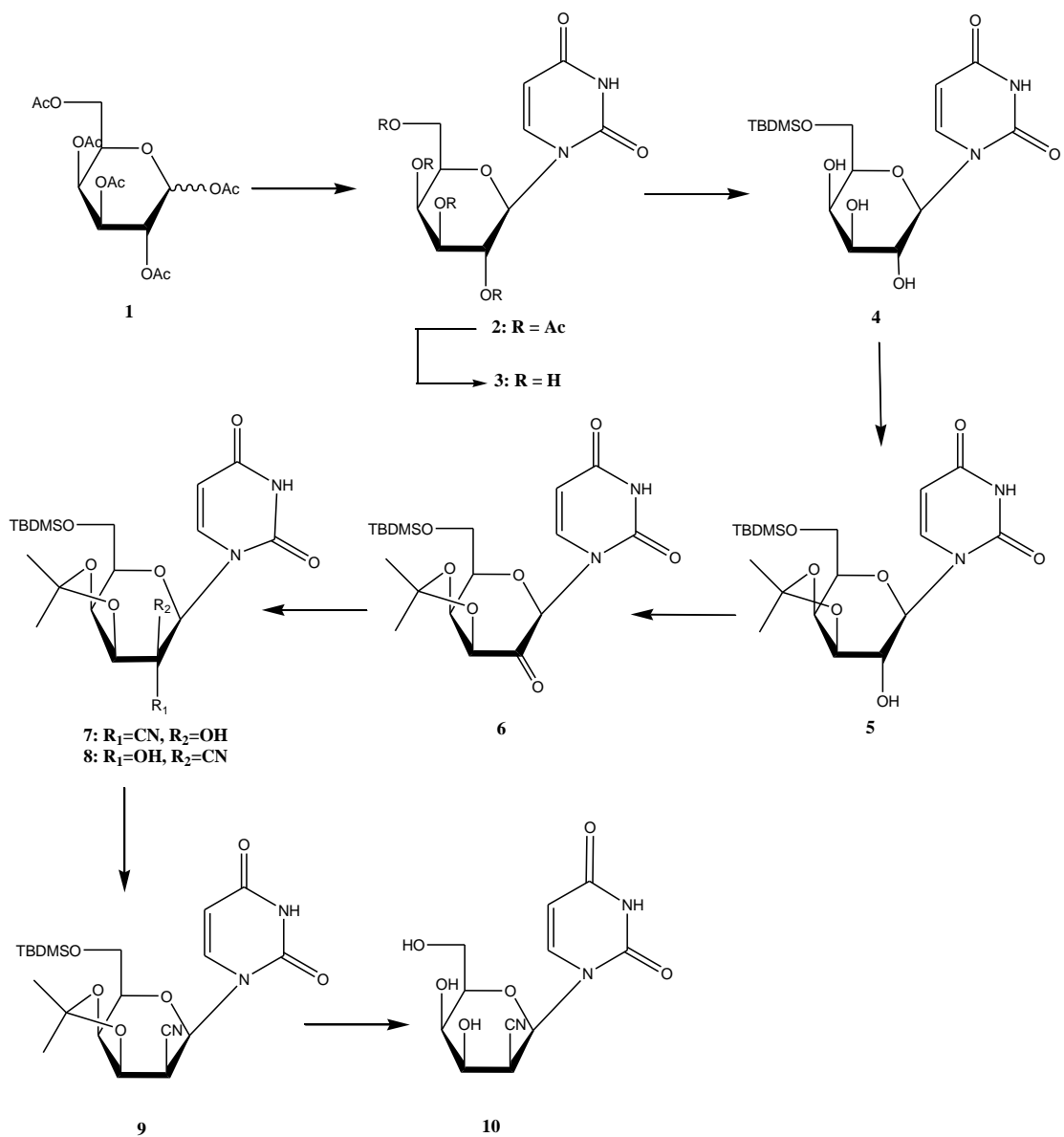
#### 4. Ταυτοποίηση ενώσεων

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

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα  $^1\text{H}$ -NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο Bruker AVAMCEIII 300 και τα φάσματα  $^{13}\text{C}$ -NMR καταγράφηκαν στα 75.5MHz στο ίδιο φωτόμετρο, χρησιμοποιώντας chloroform- $d$  ( $\text{CDCl}_3$ ), dimethylsulfoxite- $d_6$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για  $^1\text{H}$ .



## **Επισκόπηση της συνθετικής οδού**



## Μεθοδολογία της σύνθεσης

Εν αρχή για την σύνθεση των νουκλεοζιτών, το γλυκοζιτικό μέρος πρέπει να χρησιμοποιηθεί υπό τη μορφή του ακετυλιωμένου σακχάρου, στην προκειμένη περίπτωση συμβαίνει με την ακετυλιωμένη D-γαλακτόζη **1**. Επίσης, η βάση, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, πρέπει να ενεργοποιηθεί υπό τη μορφή άλατος ή συμπλόκου, όπου τα δραστικά υδρογόνα της ίδιας της βάσης αντικαθίστανται από τριμεθυλοσιλυλομάδες. Συνεπώς, αφού εξασφαλιστεί η διαθεσιμότητα του επιθυμητού ακετυλιωμένου σακχάρου **1**, ακολουθεί σιλυλίωση της ουρακίλης. Μελέτες που έλαβαν χώρα το 1974 από τους Niedballa και Vorbruggen (Niedballa and Vorbruggen, 1974), έδειξαν ότι οι σιλυλιωμένες ουρακίλες αντιδρούν εύκολα με τα ακυλιωμένα σάκχαρα, καθώς ενισχύεται ο πυρηνόφιλος χαρακτήρας τους, για να σχηματίσουν τους αντίστοιχους ακυλιωμένους νουκλεοζίτες σε πολύ καλές αποδόσεις. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, για να επιτευχθεί η συμπύκνωση της εμπορικά διαθέσιμης ουρακίλης με την ακετυλιωμένη γαλακτόζη, χρησιμοποιείται η σιλυλιωμένη ουρακίλη, η οποία προκύπτει μετά από αντίδραση με εξαμεθυλοδισιλαζάνιο (HMDS) σε διαλύτη ακετονιτρίλιο ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ). Η αντίδραση καταλύεται από τη σακχαρίνη και λαμβάνεται το παράγωγο δις-τριμεθυλοσιλυλο-ουρακίλη. Η επίδραση ενός όξινου καταλύτη Lewis στην ακετυλιωμένη γαλακτόζη οδηγεί στον σχηματισμό ενός κατιονικού ενδιάμεσου στον ανωμερικό άνθρακα του σακχάρου, το οποίο στη συνέχεια προσβάλεται από το πιο πυρηνόφιλο άζωτο της ενεργής πλέον σιλυλιωμένης ουρακίλης λαμβάνοντας την ένωση **2**.

Στη συνέχεια, η ένωση **2**, μέσω μίας εύκολης πειραματικής διαδικασίας, κατεργάζεται με μεθανολική αμμωνία (Neilson and Werstiuk 1971) για μία νύχτα, με αποτέλεσμα τη λήψη του πλήρως αποπροστατευμένου νουκλεοζίτη **3**.

Ακολουθεί η εκλεκτική προστασία του υδροξυλίου στη θέση 6' του σακχάρου του αποπροστατευμένου νουκλεοζίτη **3** που οδηγεί στην λήψη της ένωσης **4**. Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται με την επίδραση του τερτ-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλοχλωριδίου (TBDMCl) επί της ένωσης **3** παρουσία καταλυτικής ποσότητας 4,4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (DMAP) σε πυριδίνη με αποτέλεσμα τη λήψη της επιθυμητής ένωσης **4**.

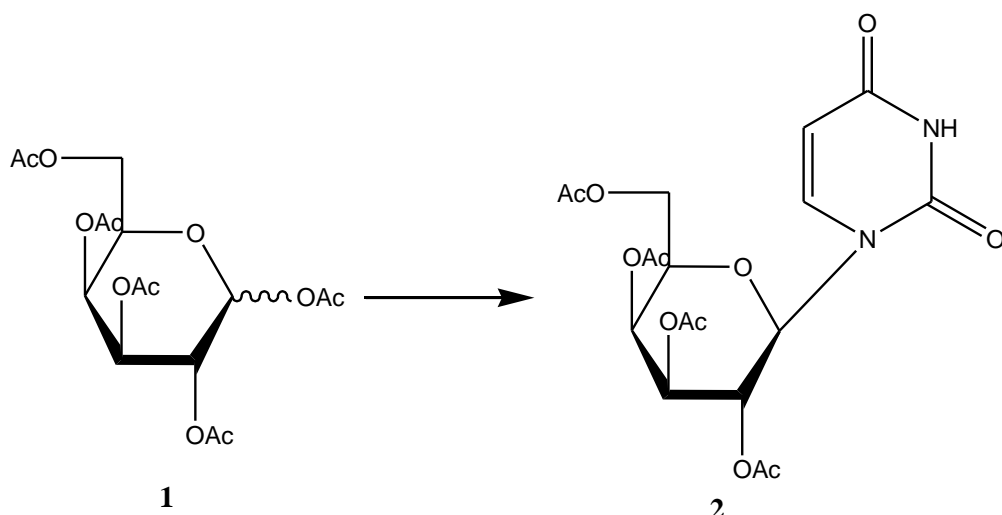
Έπειτα γίνεται η εκλεκτική προστασία των γειτονικών υδροξυλίων στις 3' και 4' θέσεις του σακχάρου που οδηγεί στη λήψη της ένωσης **5**. Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται με επίδραση του 2,2-διμεθοξυπροπανίου  $[(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2]$  επί της ένωσης **4** καθώς και του π-τολουολοσουλφονικού οξέος (*p*-TsOH) ως καταλύτη σε διάλυμα άνυδρης ακετόνης, οπότε αρχικά προστατεύονται τα υδροξύλια στις 3' και 4' θέσεις του σακχάρου (Vanheusden *et al.* 2004) με αποτέλεσμα τη λήψη της επιθυμητής ένωσης (**5**).

Για την παρασκευή του κορεσμένου 2'-κετοπυρανονουκλεοζίτη ένωση **6** ακολουθεί η οξείδωση του ελεύθερου υδροξυλίου στην 2' θέση του σακχάρου της ένωσης **5**, με επίδραση διχρωμικής πυριδίνης (PDC) και  $\text{Ac}_2\text{O}$  (Herscovici and Antonakis, 1980) σε διχλωρομεθάνιο, με αποτέλεσμα τη λήψη του κετονουκλεοζίτη **6**.

Η επόμενη αντίδραση περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσθήκη της κύανο ομάδας στην κετονομάδα του προϊόντος **6**, χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια του κυανικού και ανθρακικού νατρίου σε διάλυμα δύο φάσεων νερού και αιθυλαιθέρα. Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μείγματος ενώσεων **7** και **8**, οι οποίες διαχωρίζονται με χρωματογραφία στήλης.

Η επόμενη αντίδραση της συνθετικής πορείας είναι η φαινοξυθειοκαρβονυλίωση της κυανυδρίνης **7** ή **8**, η οποία πραγματοποιείται με επίδραση φαινοξυθειοκαρβονυλοχλωριδίου ( $\text{PhOC(S)Cl}$ ), παρουσία τριαιθυλαμίνης ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) και 4-διμεθυλαμινοπυριδίνης (DMAP) σε  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνεται το 3'-Ο-φαινοξυθειοκαρβονυλο παράγωγο, τα οποία χωρίς περαιτέρω απομόνωση ανάγονται παρουσία του *Tris(trimethylsilyl)silane*, καθώς και του αζωδισ-ισοβουτυρονιτριλίου (AIBN) σε διαλύτη τολουόλιο στους  $100^\circ\text{C}$ . Ο δεοξυ κυανονουκλεοζίτης **9** λαμβάνεται ύστερα από τη σχάση του δεσμού C2-O2 σε μία αλυσιδωτή αντίδραση ελευθέρων ριζών. Η αναγωγή επιτεύχθηκε στερεοεκλεκτικά και η απόσπαση του υδρογόνου από το *Tris(trimethylsilyl)silane* έγινε από την κάτω α όψη του δακτυλίου. Ο δεοξυ κυανονουκλεοζίτης **9** εν συνεχεία αποπροστατεύεται με την επίδραση τριφθοροξικού οξέος προς την τελική μας ένωση **10**. Η β-στερεοχημεία της κυανο ομάδας διαπιστώθηκε από τα δεδομένα του φάσματος NMR της ένωσης **10** ( $J_{1',2'} = 2.6 \text{ Hz}$ ), τα οποία αποκαλύπτουν μια αξονική/ισημερινή σχέση μεταξύ των H-1' και H-2', και άρα μια αξονικά προσανατολισμένη κυανο ομάδα.

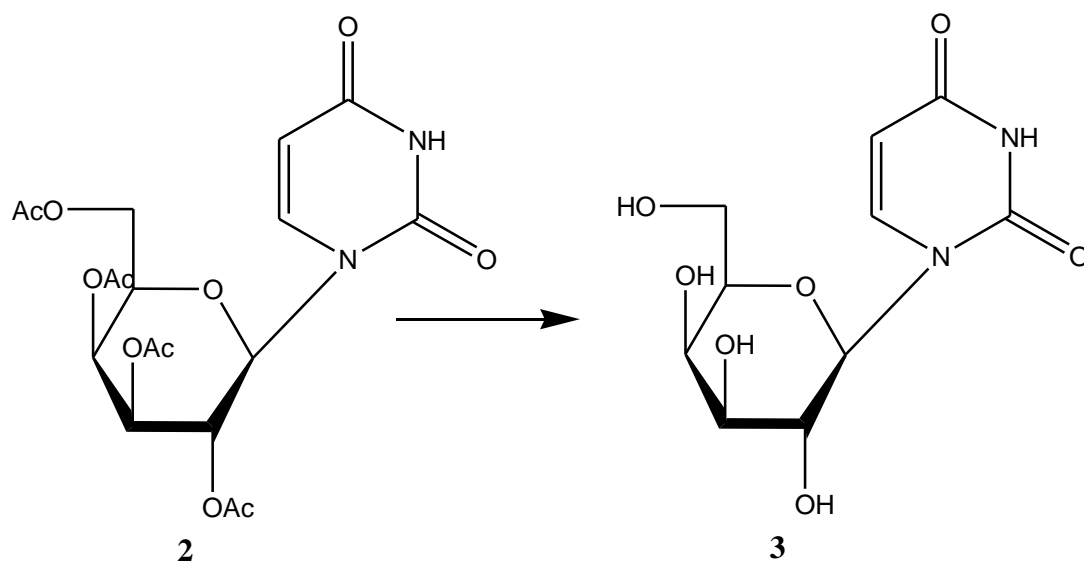
Σύνθεση της 1-(2',3',4',6'-πέντα-Ο-ακετυλο-α-D-γαλακτοπυρανόζυλο)ουρακίλης



Διάλυμα αποτελούμενο από ουρακίλη (816 mg, 7,28 mmol), HMDS (hexamethyldisilazane) (1,904 mL, 9,0 mmol) και σακχαρίνη (61 mg, 0,34 mmol) σε άνυδρο CH<sub>3</sub>CN (25,4 mL) θερμαίνεται με κάθετο ψυκτήρα για 20 λεπτά στους 120 °C και στη συνέχεια προστίθεται η 1,2,3,4,6-πεντα-Ο-ακετυλο-D-γαλακτοπυρανόζη (2) (2 g, 5,2 mmol) καθώς και ο Me<sub>3</sub>SiOSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (1,314 mL, 7,28 mmol). Ακολουθεί θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 80 °C για περίπου 2h (TLC), ψύξη του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη κορεσμένου διαλύματος όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO<sub>3</sub>) και εκχύλιση με EtOAc. Η οργανική φάση πλένεται με νερό (4 mL), ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα EtOAc/Hexane σε αναλογία 8:2. Το επιθυμητό προϊόν **2** παραλαμβάνεται ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο με απόδοση 81%(1,864 g).

<b>TLC (EtOAc/Hexane 8:2)</b>	R <sub>f</sub> = 0,23
<b>Απόδοση</b>	81%
<b>α<sub>D</sub></b>	+ 44.5 (c = 0.23)
<b>λ<sub>max</sub></b>	261 nm

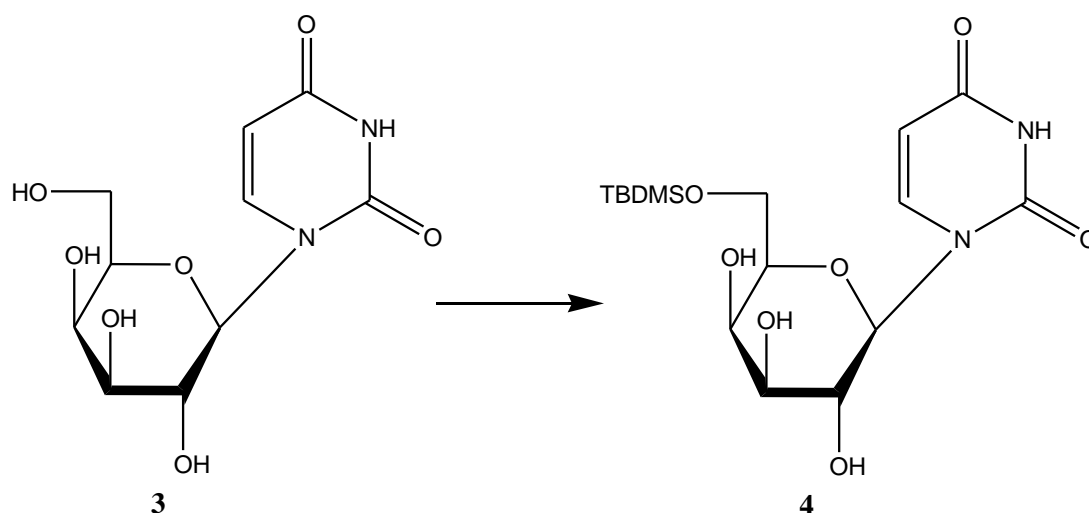
Σύνθεση της 1-(α-D-γαλακτοπυρανόζυλο)ουρακίλης



Διάλυμα της ένωσης **2** (1g, 2,26 mmol) σε μεθανολική αμμωνία (11 mL) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα EtOAc/MeOH 8:2 οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **3** με λευκή αφρώδη υφή και απόδοση 89%(551mg).

<b>TLC (EtOAc/MeOH 8:2)</b>	Rf = 0,13
<b>Απόδοση</b>	89%
<b><math>\alpha_D</math></b>	+ 35.7 (c = 0.15 μεθανόλη)
<b><math>\lambda_{max}</math></b>	260 nm

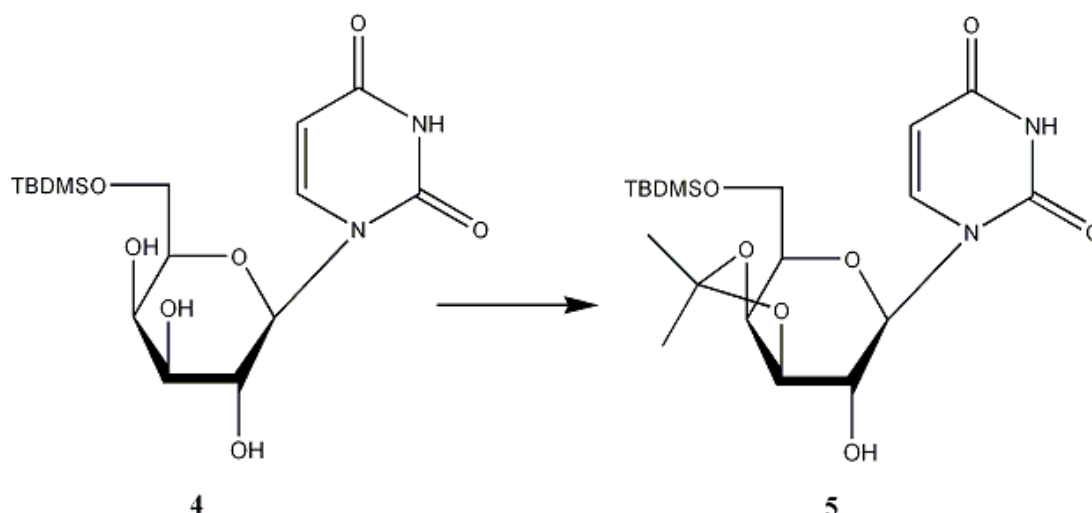
1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλη



Σε διάλυμα της (β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλης (**3**) (4.11 g, 15.0 mmol) σε πυριδίνη (75.0 mL) προστίθεται TBDMSCl (3.39 g, 22.5 mmol) και καταλυτική ποσότητα της DMAP. Το προκύπτον εναιώρημα αρχικά τοποθετήθηκε για 30 λεπτά σε παγόλουτρο και για 5h (TLC) σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται μεθανόλη και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη (9:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **4** (4.97 g, 85%) ως παχύρρευστο άχρωμο έλαιο.

<b>TLC (EtOAc/MeOH 8:2)</b>	R <sub>f</sub> = 0.52
<b>Απόδοση</b>	85%
<b>α<sub>D</sub></b>	+2° (c = 0.2 μεθανόλη)
<b>λ<sub>max</sub></b>	258 nm (ε 7286)

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-O-ισοπροπυλιδενο-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλη (5)

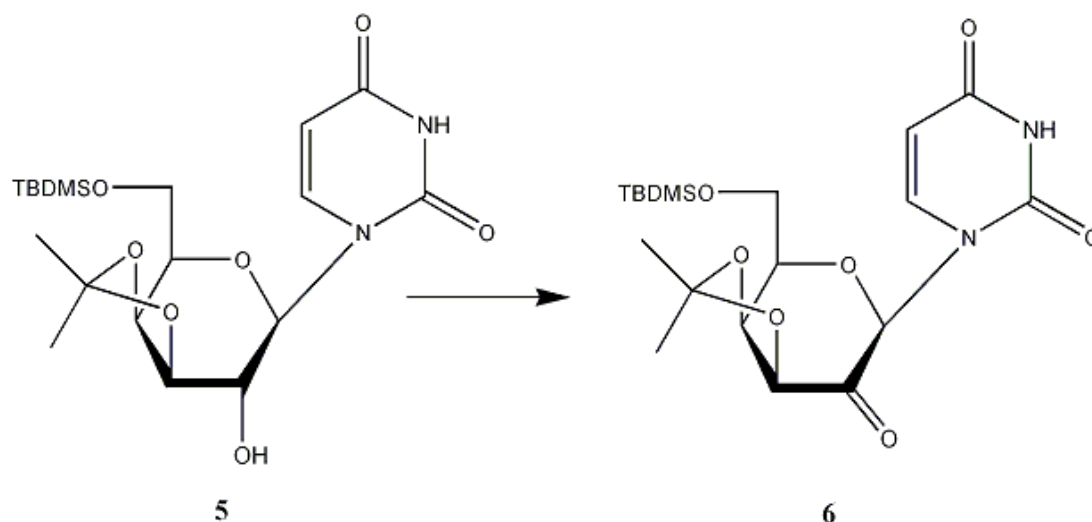


Σε ένα υπό ανάδευση διάλυμα του προϊόντος **4** (4.97 g, 12.8 mmol) σε άνυδρη ακετόνη (226.0 mL) και  $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{OCH}_3)_2$  (12.7 mL) προστίθεται *p*-TsOH (0.46 g, 2.4 mmol). Μετά από 3h ανάδευσης η αντίδραση ολοκληρώνεται (TLC) και το μίγμα εξουδετερώνεται με τριαιθυλαμίνη μέχρι ουδετέρου pH ( $\text{pH} \leq 7$ ). Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη (9.5:0.5), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **5** (4.72 g, 86%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

<b>TLC (EtOAc/Hexane 7:3)</b>	0.47
<b>Απόδοση</b>	86%
<b><math>\alpha_D</math></b>	+42° (c = 0.6 χλωροφόρμιο)
<b><math>\lambda_{\text{max}}</math></b>	259 nm ( $\epsilon$ 4831)
<b>Σ.Τ.</b>	205-207 °C

1-(6'-O-tert-Βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-O-ισοπροπυλιδενο-β-D-λυξο-εξωπυρανοζυλο-2'-υλοζο)ουρακίλη (6)

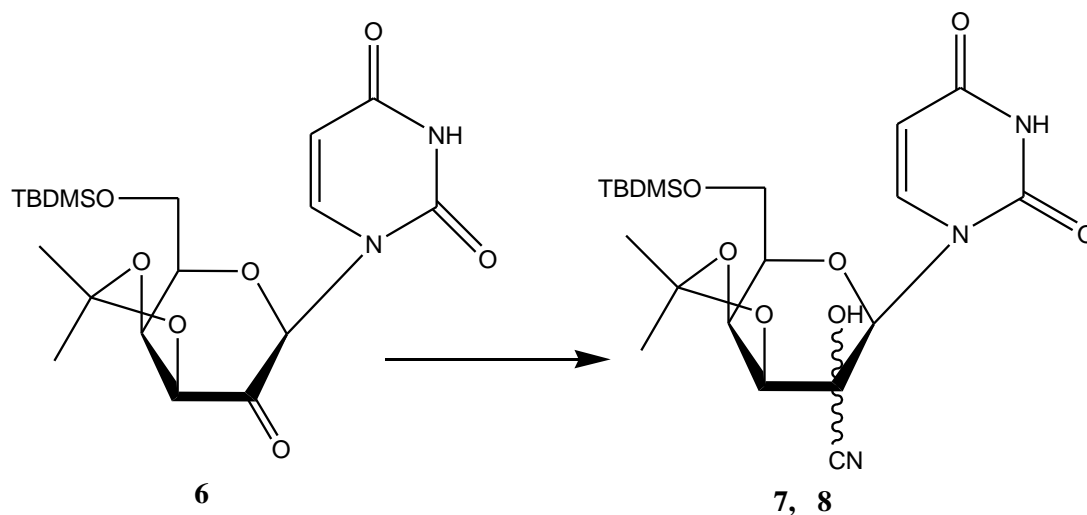




Σε διάλυμα της ένωσης **5** (4.72 g, 11.0 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (110.0 mL) προστίθεται PDC (4.93 g, 13.1 mmol) και Ac<sub>2</sub>O (3.1 mL, 32.7 mmol) και το προκύπτον εναιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 6h. Εν συνεχεία το μείγμα της αντίδρασης καθαρίζεται απευθείας με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το σύστημα οξικός αιθυλεστέρας / *n*-εξάνιο (1:1), οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **6** (3.75 g, 80%), υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

<b>TLC (EtOAc/Hexane 6:4)</b>	R <sub>f</sub> = 0.45
<b>Απόδοση</b>	80%
<b>α<sub>D</sub></b>	-80° (c = 1.0 χλωροφόρμιο)
<b>λ<sub>max</sub></b>	257 nm (ε 11296)
<b>Σ.Τ.</b>	153-155°C

Σύνθεση των 1-(6'-O-tert-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-O-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλη (7) και 1-(6'-O-tert-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-3',4'-O-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο)ουρακίλη (8)



Σε διάλυμα του κετοπυρανονουκλεοζίτη **6** (3.75 g, 8.8 mmol) σε διαιθυλαιθέρα (440.0 mL) και νερό (220.0 mL), προστίθενται, όξινο ανθρακικό νάτριο (1.48 g, 17.6 mmol) και κυανιούχο νάτριο (0.34 g, 8.8 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται έντονα σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 72h. Ακολουθεί διαχωρισμός των δυο φάσεων και η υδατική φάση εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα (2 x 400.0 mL). Οι οργανικές φάσεις ενώνονται και ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Εν συνεχεία, ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το προκύπτον έλαιο καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη (9.8: 0.2). Από τα πρώτα κλάσματα της στήλης παραλαμβάνεται το ταλοπυρανόζυλο παράγωγο **7** (1.12 g, 28%), με λευκή αφρώδη υφή.

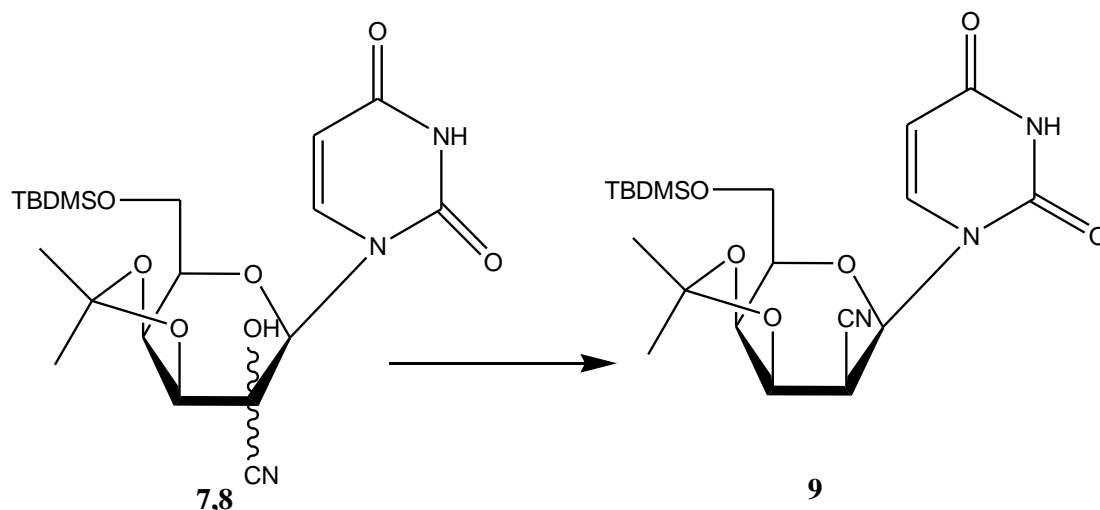
<b>TLC (<math>\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}</math> 9.5 : 0.5)</b>	Rf= 0.16
<b>Απόδοση</b>	28%
<b><math>\alpha_D</math></b>	-18° (c = 0.6 χλωροφόρμιο)

<b>λ<sub>max</sub></b>	259 nm (ε 9500)
------------------------	-----------------

Από τα επόμενα κλάσματα της στήλης παραλαμβάνεται το γαλακτοπυρανόζυλο παράγωγο **8** (2.08 g, 52%), με λευκή αφρώδη υφή.

<b>TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.5 : 0.5)</b>	R <sub>f</sub> = 0.12
<b>Απόδοση</b>	52%
<b>α<sub>D</sub></b>	+24° (c = 0.5 χλωροφόρμιο)
<b>λ<sub>max</sub></b>	258 nm (ε 3883)

Σύνθεση της 1-(6'-O-tert-βουτυλοδιμεθυλοσιλυλο-2'-δεοξυ-3',4'-O-ισοπροπυλιδενο-2'-C-κυανο-β-D-ταλοπυρανοζυλο)ουρακίλης (9)

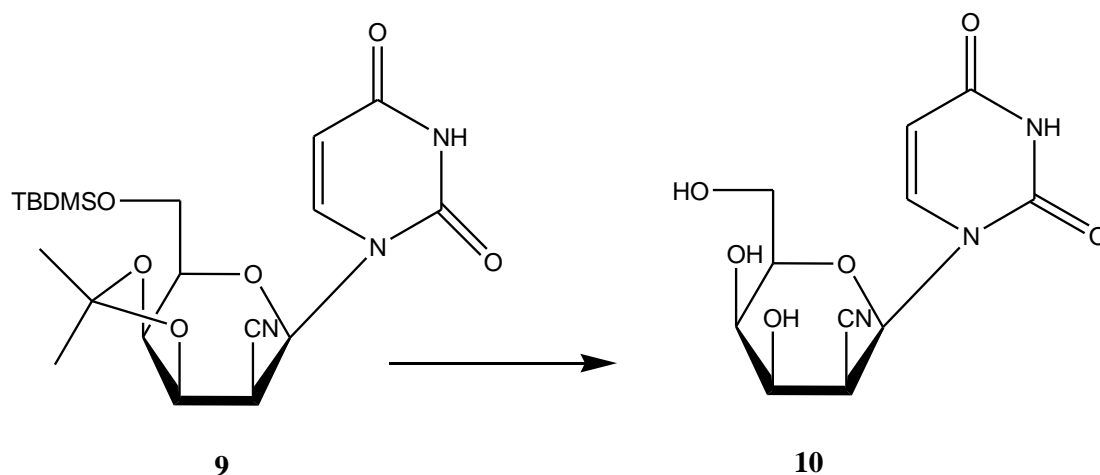


Σε διάλυμα της ένωσης **7** ή **8** (151 mg, 0,21 mmol) σε άνυδρο τολουόλιο (2,2 mL), και AIBN (5mg) προστίθεται *Tris(trimethylsilyl)silane* και το μείγμα της αντίδρασης θερμαίνεται στους 100 °C για μια ώρα. Στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνονται υπό κενό. Το προκύπτον προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα διχλωρομεθάνιο/ μεθανόλη 98/2, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν **10** (87mg) υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου.

<b>TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9.8 : 0.2)</b>	R <sub>f</sub> = 0,62
<b>Απόδοση</b>	73 %
<b>α<sub>D</sub></b>	+54° (c = 0.3 χλωροφόρμιο)

$\lambda_{\max}$	257 nm ( $\epsilon$ 4773)
------------------	---------------------------

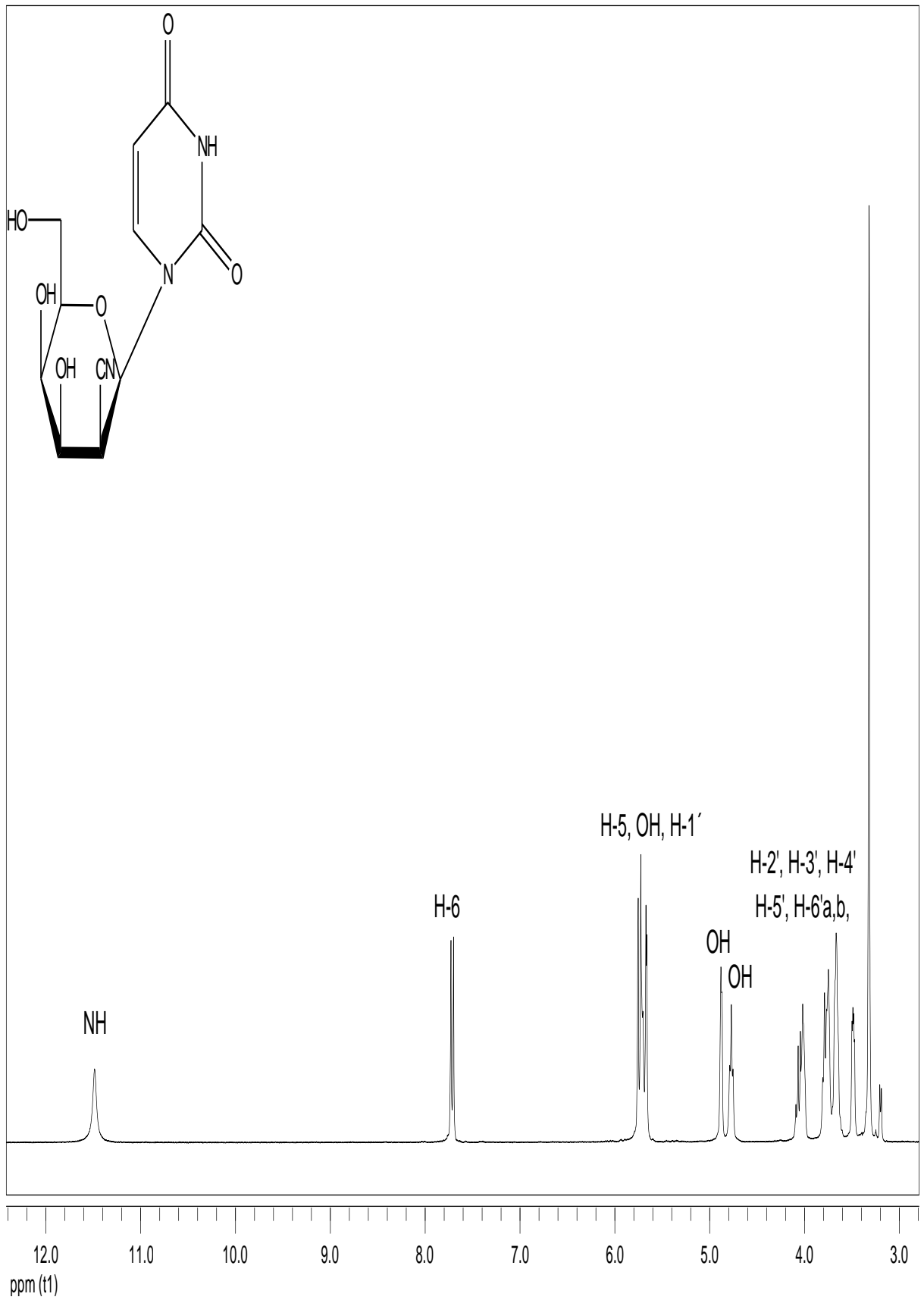
Σύνθεση της 1-(2'-Δεοξυ-2'-κυανο-ταλοπιρανοζυλο)ουρακίλης (10)



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

<b>TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9 : 1)</b>	R <sub>f</sub> = 0,2
<b>Απόδοση</b>	58%
<b><math>\alpha_D</math></b>	+ 6 ° (c = 0,20 μεθανόλη)
<b><math>\lambda_{\max}</math></b>	258 nm ( $\epsilon$ =6229)

## ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ $^1\text{H}$ NMR



## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ –ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βασιζόμενοι στην αντικαρκινική και αντική δράση που παρουσιάζουν οι πυρανονουκλεοζίτες με διακλαδωμένη αλυσίδα την κυανο ομάδα και λαμβάνοντας υπόψη τις σημαντικές βιολογικές ιδιότητες των δεοξυ νουκλεοζιτών, στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών που φέρουν τη χαρακτηριστική κυανο ομάδα και δεοξυ στη θέση 2' του σακχάρου και ετεροκυκλική βάση την ουρακίλη.

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 πολύ καλά ποσοστά απόδοσης. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο σχηματισμός του τελικού 2'-δεοξυ-2'-C-κυανο πυρανονουκλεοζίτη **10**, επιτεύχθηκε με απόλυτη στερεοεκλεκτικότητα δίνοντας ένα μόνο προϊόν από τις δυο σχηματιζόμενες κυανυδρίνες **7** και **8**. Όλες οι ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H NMR}$ .

Οι πρώτες αντικαρκινικές μελέτες της ένωσης 2'-δεοξυ-2'-C-κυανο πυρανονουκλεοζίτη της ουρακίλης, δεν έδειξαν κάποια σημαντική κυτταροστατική δράση (πίνακας 1), ενώ αναμένονται σύντομα τα αποτελέσματα από τις αντικές μελέτες.

Τέλος λόγω της δεδομένης εύκολης και λογικού κόστους συνθετικής πορείας του συγκεκριμένου κυανο-νουκλεοζιτικού αναλόγου, μελλοντικές μελέτες μπορούν να επεκταθούν προς τη σύνθεση του 2'-C-κυανο-2'-δεοξυ πυρανονουκλεοζίτη της 5-φθοροουρακίλης, καθώς πολλά πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα της συγκεκριμένης νουκλεοβάσης είναι γνωστό ότι δρουν ως προφάρμακα της 5-FU, παρουσιάζοντας αυξημένη κυτταροστατικότητα.



Ανασταλτική δράση ( $IC_{50}$ ,  $\mu M$ ) της ένωσης 10 έναντι του πολλαπλασιασμού των κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων Τ-λεμφοκυττάρων (CEM) και των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa).

Compound	$IC_{50}^*$ ( $\mu M$ )		
	L1210	CEM	HeLa
10	> 250	> 250	> 250
F-Uracil	$0.33 \pm 0.17$	$18 \pm 5$	$0.54 \pm 0.12$

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Organic Chemistry, John McMurry. 7<sup>th</sup> Edition, Thomson.
2. Biochemistry, Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer. 5<sup>th</sup> Edition, W.H. Freeman and Company, New York
3. Organic Chemistry, William H. Brown, Christopher S. Foote, Brent L. Iverson, Eric V. Anslyn, Bruce M. Novak. 6<sup>th</sup> Edition, Brooks/Cole Cengage Learning
4. Organic Chemistry, Mark Loudon. 5<sup>th</sup> Edition, Roberts and Company Publishers
5. Fundamentals of Molecular Virology, Nicholas H. Acheson. 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley & Sons, Inc.
6. Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 1879.
7. Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, 95, 105.
8. 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.
9. Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* 2010.
10. Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* 1995, 67, 155.
11. Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* 2000, 20, 417.
12. Balzarini, J. *Pharmacy World Sci.* 1993, 16, 113.
13. Chong, Y.; Choo, H.; Lee, S.; Choi, Y.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 4888.
14. Lewin, B. *Genes* 2003, VIII, 6.
15. Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, 2005, 4, 4.

16. Siev, M.; Weinberg, R.; Penman, S. *J. Cell Biol.* 1969, 41, 510.
17. Ahn, Y. J.; Park, S. J.; Lee, S. G.; Shin, S. C.; Choi D. H. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 2744.
18. O-Yang C., Wu H.Y., Fraser-Smith E.B., Walker K.A.M. *Tetrahedron Lett.* 1992, 1, 37-40.
19. Satoru Kohgo, Kohei Yamada, Kenji Kitano, Shinji Sakata, Hiroyuki Hayakawa, Daisuke Nameki, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka, Hiroaki Mitsuya, and Hiroshi Ohru, *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS*, Vol. 22, Nos. 5–8, pp. 887–889, 2003.
20. Motohiro Tanaka et al, 1992 Antitumor activity of CNDAC.
21. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 980.
22. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, 43, 420.
23. Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Panagiotopoulou, A.; Pelecanou, M.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2009a, 44, 4764.
24. Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevšek, A.; Pamulapati, R. T.; Cencič, A.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2009b, 44, 2696.
25. Balatsos, N. A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* 2009, 48, 6044.
26. Kiritsis C, Manta S, Parmenopoulou V, Balzarini J, Komiotis D. Branched-chain C-cyano pyranonucleosides: synthesis of 3'-C-cyano & 3'-C-cyano-3'-deoxy pyrimidine pyranonucleosides as novel cytotoxic agents. *Eur J Med Chem.* 2011 Nov;46(11):5668-74.
27. Niedballa U, Vorbrüggen H. A general synthesis of N-glycosides. I. Synthesis of pyrimidine nucleosides. *J Org Chem.* 1974 Dec 13;39(25):3654-60.

28. Neilson, T.; Werstiuk, E. S. *Can. J. Chem.* 1971, 49, 493.
29. Vanheusden V, Busson R, Herdewijn P, Van Calenbergh S. Synthesis and conformational analysis of 1-[2,4-dideoxy-4-C-hydroxymethyl-alpha-l-lyxopyranosyl]thymine. *J Org Chem.* 2004 Jun 25;69(13):4446-53.
30. Velázquez, S.; Jimeno, M.L.; [Camarasa, M.J.](#); [Balzarini, J.](#) *Tetrahedron*, **1994**, 50(37), 11013-11022.
31. Herscovici, J.; Antonakis, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 12, 561.