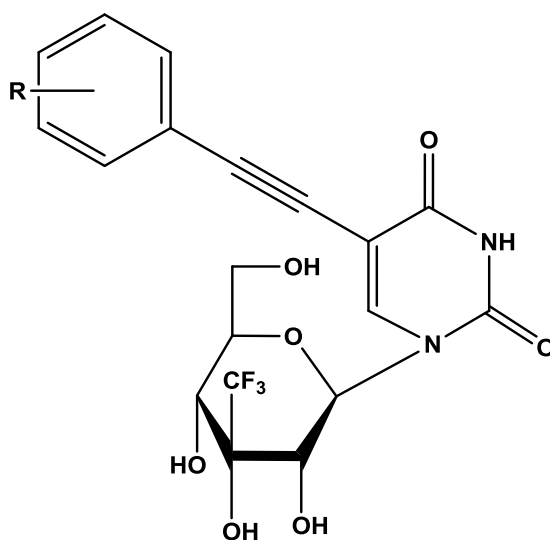




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Βασίλης Λιόλιος



Διπλωματική εργασία

«Σύνθεση και βιολογική αποτίμηση ,τροποποιημένων στην βάση της ουρακίλης, νέων 3'-τριφθορομέθυλο-πυρανονουκλεοζιτών»

Λάρισα 2019

Διπλωματική εργασία

«Σύνθεση και βιολογική αποτίμηση ,τροποποιημένων στην βάση της ουρακίλης, νέων 3´-τριφθορομέθυλο-πυρανονουκλεοζιτών»

“Synthesis and biological evaluation, modified on uracil’s base, of new 3´-trifluoromethyl pyranonucleosides”

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

Χρήστος Μήτσος — Ε.ΔΙ.Π

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας με επιβλέποντα τον κ.Κομιώτη Δημήτριο τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για τις επιστημονικές του υποδείξεις.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέων τον υποψήφιο διδάκτορα κ.Νικόλαο Κολλάτο για την αμέριστη συμπαράσταση, την κατανόηση της δικής μου απειρίας, την κατεύθυνση και την βοήθεια για την περάτωση της εργασίας αυτής.

Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω την συμφοιτήτρια κ.Βαρβάρα Καρέτσου για την πολύτιμη παρουσία της στον χώρο του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό και τα μέλη του εργαστηρίου για το κλίμα συνεργασίας και καλής διάθεσης που επικρατούσε καθ'όλη την διάρκεια.

Περιεχόμενα	
<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	7
<u>ABSTRACT</u>	8
<u>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	9
1.1 Υδατάνθρακες	9
1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης	9
1.3 Νουκλεοζίτες	13
1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών	14
1.5 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες	17
1.6 Νουκλεοζίτες ως αντιιικοί παράγοντες	19
1.7 Νουκλεοζιδικά ανάλογα με τροποποίηση στο σάκχαρο και τη	
Βάση	21
1.8 5-ΐωδο-2ΐ-δεοξουριδίνη (IdUrd, IUdR, IDU, ιωδοξουριδίνη)	22
1.9 Τριφθορομέθυλο φουρανονουκλεοζίτες	25
1.10 Πύρανονουκλεοζίτες	26
<u>2.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	31
2.1 Σκοπός	31
<u>3.ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	32
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC: thin layer chromatography)	32
3.2 Χρωματογραφία στήλης	32
3.3 Ξήρανση διαλυτών	33
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων	33

<u>4.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	35
4.1.1 Επισκόπηση της σύνθεσης των 6a,b αναλόγων	35
4.1.2 Μεθοδολογία σύνθεσης	36
4.1.3 Σύνθεση της 3-C-τριφθορομέθυλο-1,2,5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζης	37
4.1.4 Σύνθεση της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-υδρόξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζης	38
4.1.5 Σύνθεση της 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο-3'-υδρόξυ-2',4',6'-τρεις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-ιωδοουρακίλης	39
4.1.6 Σύνθεση των 5a,b	40
4.2 Σύνθεση των 6a,b	41
<u>5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ 1H NMR</u>	42
<u>6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	44
<u>7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	47

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υδατάνθρακες βρίσκονται σε κάθε ζωντανό οργανισμό και αναφέρονται σε μια ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών, που ονομάζονται κοινώς σάκχαρα. Τροποποιημένοι υδατάνθρακες αποτελούν μέρος του περιβλήματος των κυττάρων, άλλοι απαντούν στα μόρια του DNA που μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες, ενώ άλλοι χρησιμοποιούνται ως φάρμακα.

Οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες αποτελούν ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο καθώς εμφανίζουν σημαντική αντικαρκινική, αντιική και αντιβιοτική δράση. Μια σημαντική κατηγορία αυτών είναι οι νουκλεοζίτες που φέρουν δομικές τροποποιήσεις στο τμήμα του σακχάρου. Πολλές τέτοιες ενώσεις έχουν συντεθεί και έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές βιολογικές τους ιδιότητες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση C5-τροποποιημένων στη βάση της ουρακίλης 3'-τριφθορομεθυλοπυρανονουκλεοζιτών ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες. Αναλύονται οι συνθετικές οδοί που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή τους, η μέθοδος ταυτοποίησής τους καθώς και η βιολογική τους αποτίμηση.

ABSTRACT

Carbohydrates are found in every living organism and refer to a broad class of polyhydroxylated aldehydes and ketones, commonly called sugars. Modified carbohydrates are part of the cell envelope, others are found in DNA molecules carrying genetic information, while others are used as drugs.

Modified nucleosides are an important research field as they exhibit significant anticancer, antiviral and antibiotic activity. An important category of these are nucleosides that carry structural modifications to the sugar moiety. Many compounds like these have been synthesized and evaluated for their potential biological properties.

This diploma thesis describes the synthesis of C5-modified uracil-based 3'-trifluoromethyl pyranonucleosides as potential anticancer agents. The synthetic pathways followed for their preparation, their identification method as well as their biological evaluation are analyzed.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Υδατάνθρακες

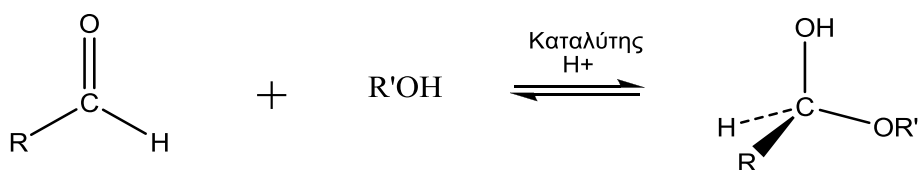
Οι υδατάνθρακες είναι πολυ-υδροξυαλδεΐδες, πολυ-υδροξυκετόνες, ή ενώσεις οι οποίες μπορούν να υδρολυθούν προς αυτές, με γενικό τύπο $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Ένας υδατάνθρακας ο οποίος δεν μπορεί να υδρολυθεί προς απλούστερες ενώσεις καλείται μονοσακχαρίτης, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Ένας υδατάνθρακας ο οποίος μπορεί να υδρολυθεί προς δύο μόρια μονοσακχαρίτη καλείται δισακχαρίτης, όπως το καλαμοσάκχαρο (σακχαρόζη), η λακτόζη και η μαλτόζη ενώ ένας υδατάνθρακας ο οποίος μπορεί να υδρολυθεί προς πολλά μόρια μονοσακχαρίτη καλείται πολυσακχαρίτης, όπως η κυτταρίνη, το άμυλο, και το γλυκογόνο (McMurry, 2000, p1245).

Θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ ενός μεγάλου ολιγοσακχαρίτη και ενός μικρού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτη, αφού αυτοί οι όροι στην πραγματικότητα χρησιμοποιούνται απλά για να περιγράψουν ενώσεις, των οποίων το μοριακό βάρος παρουσιάζει ένα ευρύ πεδίο τιμών.

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

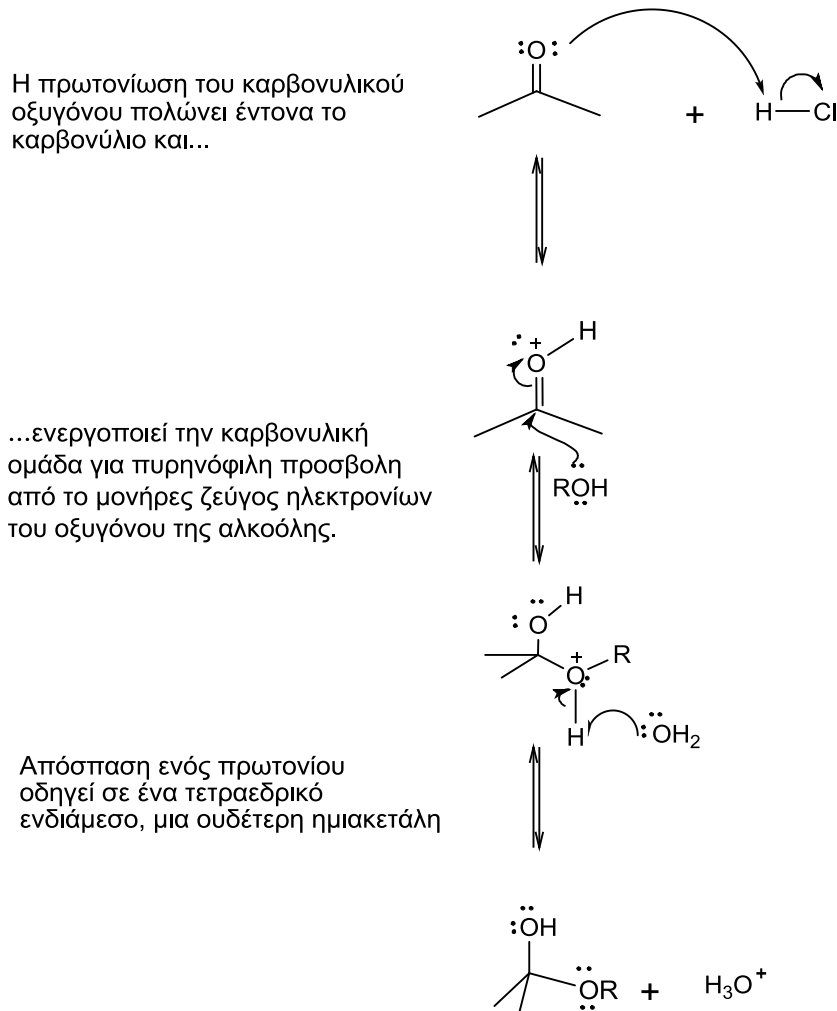
1.2.Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών : σχηματισμός ημιακετάλης

Μια ημιακετάλη σχηματίζεται κατά την προσθήκη του πυρηνόφιλου μορίου της αλκοόλης στην καρβονυλική ομάδα, αυτή είναι και τα δύο, ένας αιθέρας και μία αλκοόλη. Οι ημιακετάλες είναι ασταθείς ενώσεις. (Morisson & Boyd, 1991, p. 758).



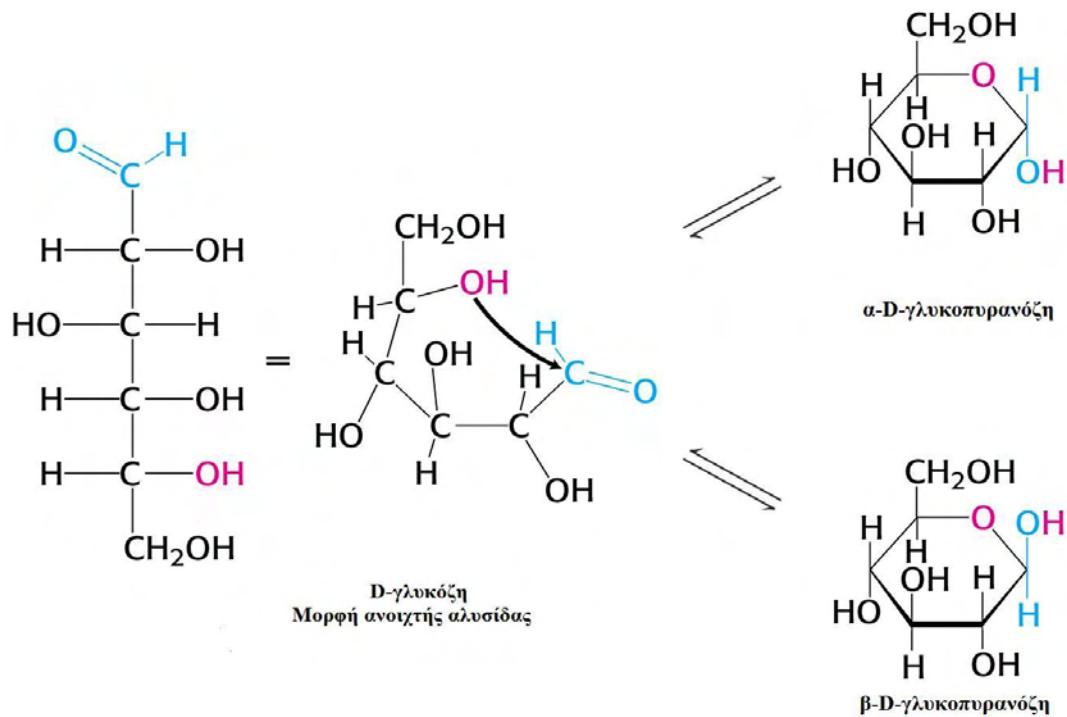
Σχήμα 1 : Σχηματισμός ημιακετάλης

Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 1 (McMurry, 2000, p. 905) :

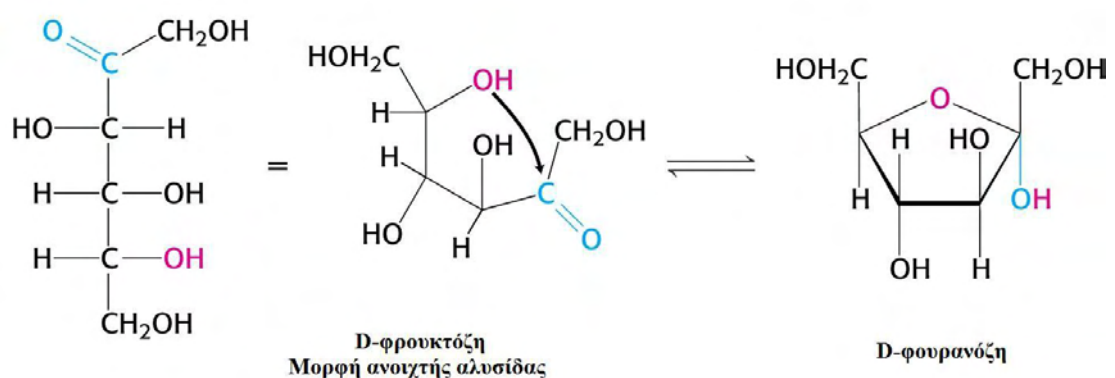


Όταν η υδροξυλομάδα και το καρβονύλιο βρίσκονται στο ίδιο μόριο, μπορεί να λάβει χώρα ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη, που οδηγεί στο σχηματισμό μιας κυκλικής ημιακετάλης. Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές της κλειστής και ανοικτής αλυσίδας. Για παράδειγμα, η γλυκόζη σε υδατικό διάλυμα απαντά με τη δομή του εξαμελούς δακτυλίου της πυρανόζης, που οφείλεται στην ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη του $-OH$ του $C5$ στον καρβονυλικό άνθρακα $C1$ (σχήμα 2). Η φρουκτόζη, αντίθετα, απαντά κατά 80% στην πυρανοζική δομή και κατά 20% στη δομή του πενταμελούς δακτυλίου της φουρανόζης, που

σχηματίζεται από την προσθήκη του –OH του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C2 (σχήμα 3).



Σχήμα 2 : Σχηματισμός γλυκοπυρανόζης



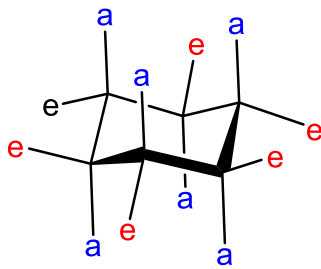
Σχήμα 3: Σχηματισμός φουρανόζης

Με την κυκλοποίηση της ανοικτής αλυσίδας, ένας μονοσακχαρίτης αποκτά τη δομή της φουρανόζης ή της πυρανόζης, όπου σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Τα δύο νέα

διαστερεομερή ονομάζονται ανωμερή και ο ημιακεταλικός άνθρακας ανωμερικόκέντρο (McMurry, 2000, p. 1249) . Για παράδειγμα, στη γλυκόζη με την αντιστρεπτή της κυκλοποίηση προκύπτουν δύο δομές, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη (σχήμα 2). Στην περίπτωση της α-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «α» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση trans ως προς τον υποκαταστάτη –CH₂OH του C-5 (δηλαδή βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). Στην περίπτωση της β-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «β» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση cis ως προς τον υποκαταστάτη –CH₂OH του C-5 (δηλαδή βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου).

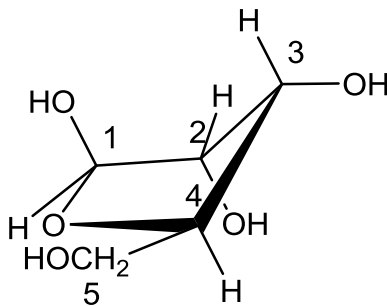
Στη φρουκτόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ίδια ονοματολογία για τα δυο της ανωμερή α και β. Η μόνη διαφορά είναι ότι αναφέρονται στο υδροξύλιο που είναι ενωμένο στον άνθρακα C-2, που είναι και ανωμερής.

Οι προηγούμενες δομές (Haworth) αν και εύχρηστες δεν μας παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης. Ο συγκεκριμένος δακτύλιος δεν είναι δυνατόν να είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα. Αντίθετα, οι δακτύλιοι της πυρανόζης μπορούν να υιοθετήσουν στερεοδιατάξεις ανάκλιντρου, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι τάσεις, εφόσον όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνιάς (McMurry, 2000, p. 151). Οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου είναι δύο ειδών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί (σχήμα 4). 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 προβάλλουν πάνω και κάτω από το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί υποκαταστάτες διατάσσονται στην περιφέρεια. Οι αξονικοί υποκαταστάτες, εκτός του υδρογόνου, παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλο, αν ξεπροβάλουν από την ίδια πλευρά του δακτυλίου. Αντίθετα, υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για τους ισημερινούς υποκαταστάτες. Έτσι, ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ότι στην αξονική θέση.



Σχήμα 4: Μορφή ανάκλιντρου μιας πυρανόζης (e = ισημερινός υποκαταστάτης, a = αξονικός υποκαταστάτης)

Κατά αναλογία ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να είναι πτυχωμένος, έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού (σχήμα 5). Αυτή η διαμόρφωση καλείται μορφή φακέλου. Οι δακτύλιοι της φουρανόζης είναι σε θέση να αλληλομετατρέπονται ταχύτατα σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις. Είναι πολύ πιο ευέλικτοι από τους δακτυλίους της πυρανόζης, γεγονός που εξηγεί την επιλογή τους ως συστατικών του RNA και DNA (Stryer, 1995).



Σχήμα 5: Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης

1.3.Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς της φύσης, καθώς αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης δεσμευμένης σε ένα σάκχαρο. Οι τέσσερις νουκλεοζιτικές μονάδες του DNA λέγονται δεοξαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυθυμιδίνη και δεοξυκυτιδίνη. Αν η

πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, τότε γίνεται λόγος για ριβονουκλεοζίτη και δεοξυριβονουκλεοζίτη αντίστοιχα. Σε ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο το άτομο C-1 της δεοξυριβόζης δεσμεύεται στο N-1 μιας πυριμιδίνης ή στο N-9 μιας πουρίνης. Η διαμόρφωση αυτού του νουκλεοζιτικού δεσμού είναι μορφής β, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Stryer, 1995).

Ανάλογα φυσικών νουκλεοζιτών έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των αντικαρκινικών, αντιικών, αντιβακτηριδιακών, καθώς και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους (Zhou *et al.* 2004, Perigaud *et al.* 1992, Robins *et al.* 1990, MacCoss *et al.* 1990). Ως εκ τούτου έχουν πραγματοποιηθεί πολλές τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα της βάσης όσο και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί ενδελεχώς το φάσμα των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων.

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη με β-απεικόνιση. Τα νουκλεοτίδια, δηλαδή οι φωσφορυλιωμένες αλδοπεντόζες, ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας μακρές αλυσίδες, οι οποίες απαρτίζουν τα νουκλειϊκά οξέα, δηλαδή το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA). Τα νουκλειϊκά οξέα ανακαλύφθηκαν στα μέσα του 19^{ου} αιώνα από τον Friedrich Miescher. Εντούτοις, μεσολάβησαν σχεδόν εκατό χρόνια μέχρι να γίνει γνωστό ότι στα μόρια του DNA βρίσκονται κωδικοποιημένες όλες οι πληροφορίες, οι οποίες προσδιορίζουν τη φύση του κυττάρου, ελέγχουν την ανάπτυξη και την διαίρεσή του και κατευθύνουν τη βιοσύνθεση των ενζύμων και των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τις φυσιολογικές λειτουργίες του.

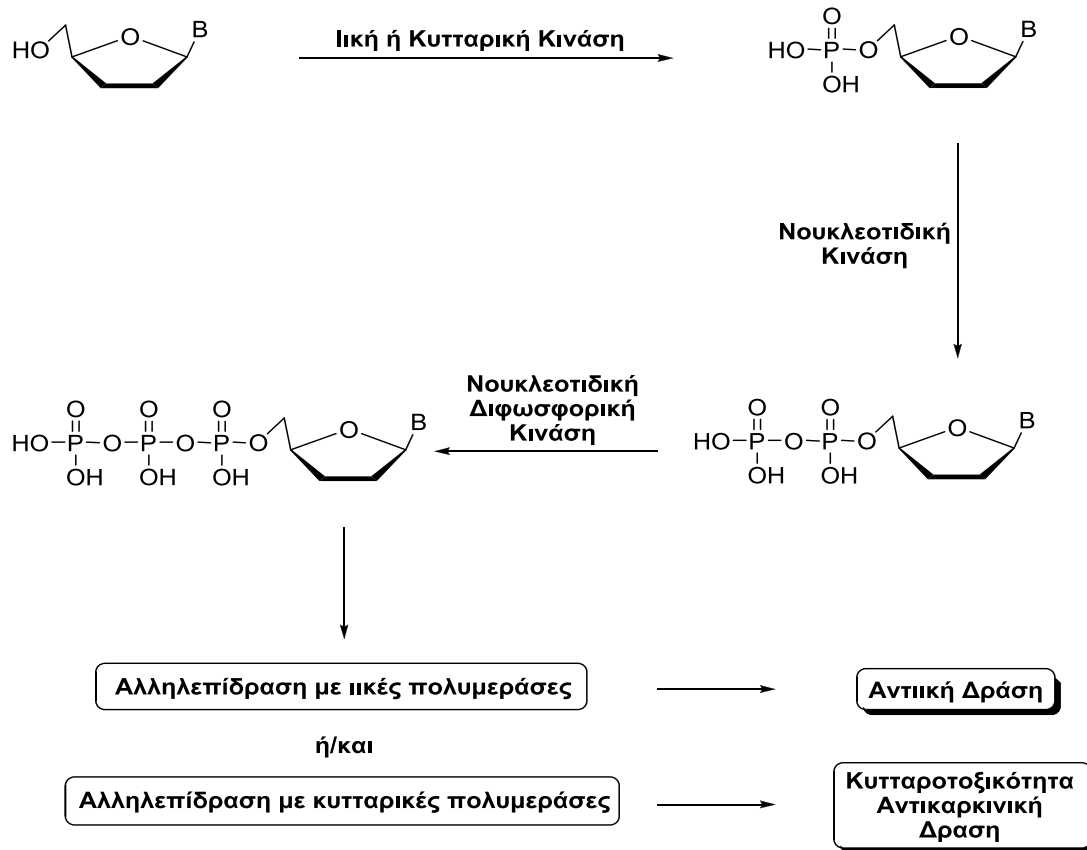
1.4. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Γενικά, ο τρόπος δράσης των φαρμάκων βασίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό στόχο, ο οποίος μπορεί να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη, όπως ένας υποδοχέας, ένας δίαυλος ιόντων, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφοράς,

είτε τα νουκλεϊνικά οξέα. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων που διαθέτουν αντιιική ή αντικαρκινική δράση, τα οποία λόγω της δυνατότητας μεταφοράς τους εντός των κυττάρων με παθητική διάχυση είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία πολλών ασθενειών (Zhou *et al.* 2004).

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών αποτελούν στην πραγματικότητα ανενεργά προφάρμακα, τα οποία ενδοκυτταρικά πρέπει να τροποποιηθούν ώστε να μπορέσουν να δράσουν. Η διαδικασία αυτή συνίσταται στη φωσφορυλίωσή τους από τις κυτταρικές ή ιικές κινάσες (Arner and Eriksson 1995) . Αφού φωσφορυλιωθούν προς τις τριφωσφορικές τους δομές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA (σχήμα 6).

Ένας κοινός μηχανισμός αντιιικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωσή τους στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της. Οι κυτταρικές πολυμεράσες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με ταυτόχρονη απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων (Lewin 2003, Burns *et al.* 2005) . Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου



Σχήμα 6: Φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιικές κινάσες

νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας. Μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιική πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητά τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

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

Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών, οι οποίοι δρουν ως αντιβιοτικά βασίζεται είτε στο ότι καταστρέφουν συγκεκριμένα τμήματα των βακτηρίων, όπως τη μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμά τους, είτε στο ότι επιδρούν στην

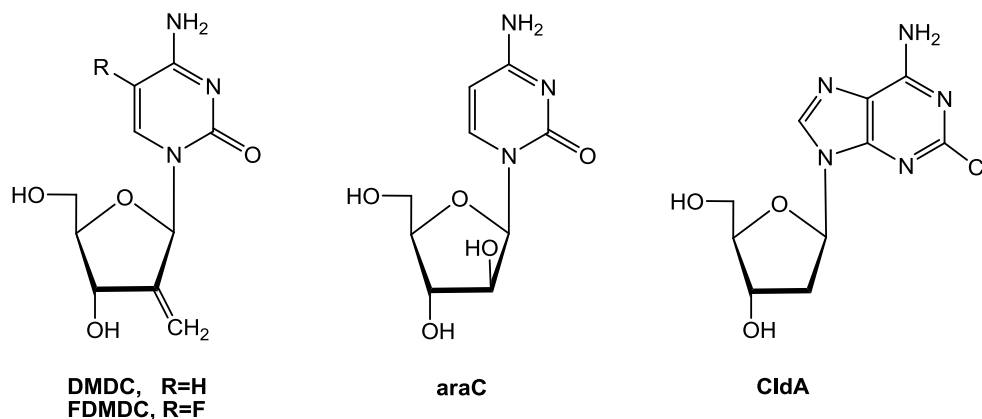
σύνθεση των πρωτεϊνών (Siev et al. 1969) και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης (Ahn et al. 2000).

1.5.Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

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

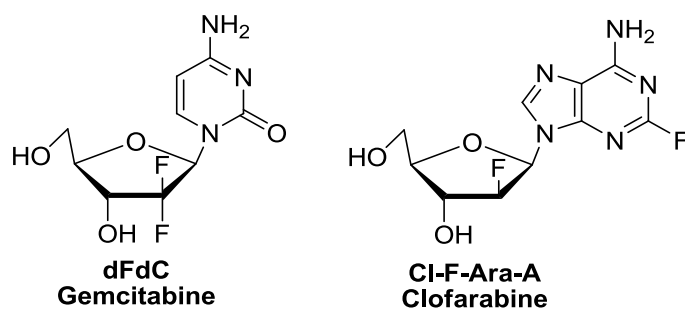
Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία διαθέτουν αυξημένη δραστηριότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην φαρμακευτική αντιμετώπιση μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών που στοχεύει στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊνικών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πενταφουρανοζυλο-κυτοσίνη (DMDC), 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πεντοφουρανοζυλο-5-φθοροκυτοσίνη (FDMDC), 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC) και 2-χλωρο-2'-δεσοξαδενοσίνη (CIdA) (σχήμα 7) έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών, όπως διάφοροι τύποι λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Cory *et al.* 1994, Pontikis *et al.* 1995, Yamagami *et al.* 1991, Lin *et al.*

1991, Baker *et al.* 1991, Matsuda and Sasaki 2004). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).



Σχήμα 7

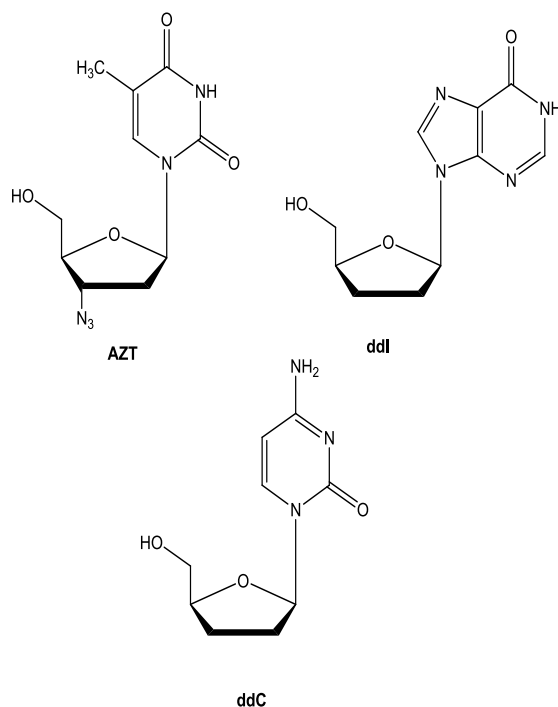
Ορόσημο στη μελέτη των φθορονουκλεοζιτών αποτελεί η ανακάλυψη της 2'-δεοξυ-2',2'-διφθοροκυτιδίνης [gemcitabine (γεμισιταμπίνη), dFdC] (Σχήμα 8), η οποία αποτελεί σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα έναντι μεγάλου φάσματος κακοήθων όγκων, όπως αυτού του παγκρέατος. Η γεμισιταμπίνη δρα αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA μέσω ανταγωνιστικής ενσωμάτωσης στη νεοσυντιθέμενη κάθε φορά αλυσίδα.



Σχήμα 8

1.6.Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες

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 εναντίον του HIV (σχήμα 9).

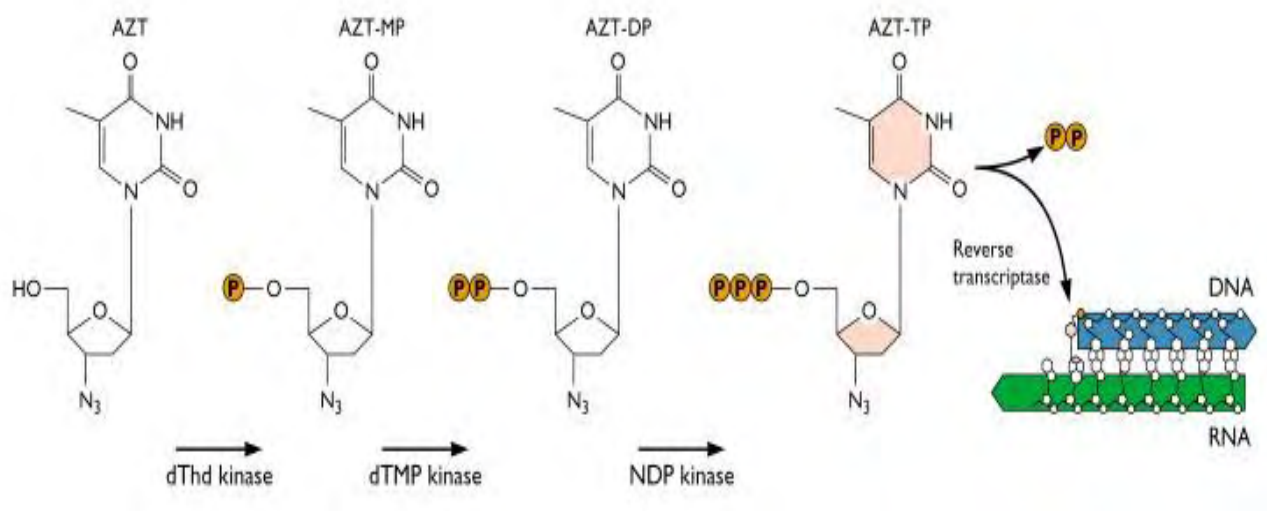


Σχήμα 9. Χημικές δομές των AZT, ddl, ddC

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 (Hiroyuki et al. 2004). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το ένζυμο που χρησιμοποιεί ο ιός για να συνθέσει το νέο DNA με μήτρα το ιικό 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 ιικού DNA.

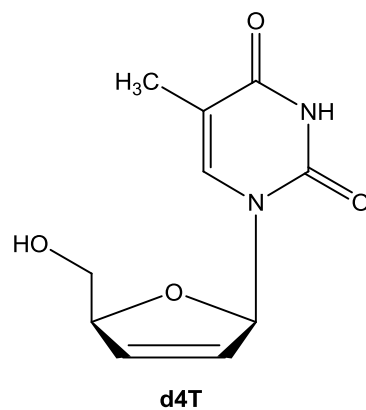
Το AZT (3'-αζιδο-2'-δεοξυθυμιδίνη) ήταν το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία του AIDS (www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrv/). Φωσφορυλιώνεται από τα κυτταρικά ένζυμα στην ενεργή του μορφή και δρα ως αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης τερματίζοντας την αλυσίδα

μόλις συνδεθεί στο DNA (σχήμα 9). Επειδή έχει την αζιδο ομάδα αντί για την υδροξυλομάδα, η επόμενη βάση δεν μπορεί να ενωθεί και η σύνθεση της αλυσίδας σταματά.



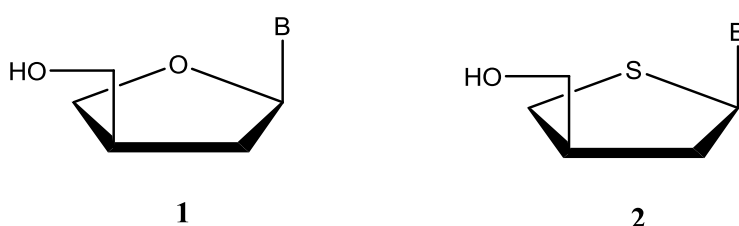
Σχήμα 10. Τερματισμός της αλυσίδας του ιικού DNA από το φωσφορυλιωμένο AZT

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 στο σχήμα 11.



Σχήμα 11. Χημική δομή της D4T

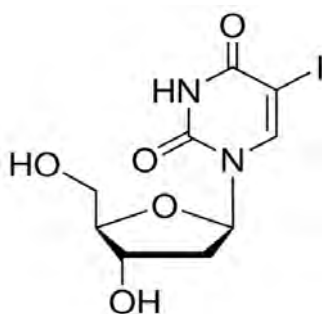
Στην κατηγορία των αντιικών ενώσεων συναντάμε και μη κλασικές κατηγορίες νουκλεοζιτών. Μια χαρακτηριστική ομάδα είναι οι απιο- διδεοξυνουκλεοζίτες 1, όπου η 4'-υδροξυμεθυλο ομάδα έχει μετατοπιστεί στον C-3' (Moon et al. 2002). Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν αντιική δράση, ενώ αντικαθιστώντας την θέση του οξυγόνου με ένα άτομο θείου, έχουμε τους αντίστοιχους θειο- απιο- διδεοξυνουκλεοζίτες 2 (σχήμα 11).



Σχήμα 11

1.7 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στο σάκχαρο και τη βάση

Ο πρώτος κλινικά αποτελεσματικός νουκλεοζίτης που εγκρίθηκε ήταν η 5-ίωδο-2'-δεοξουριδίνη (Σχήμα 12) στις αρχές του 1960, του οποίου η σύνθεση ήταν μέρος ενός αντικαρκινικού προγράμματος (W. H. Prusoff, 1959).

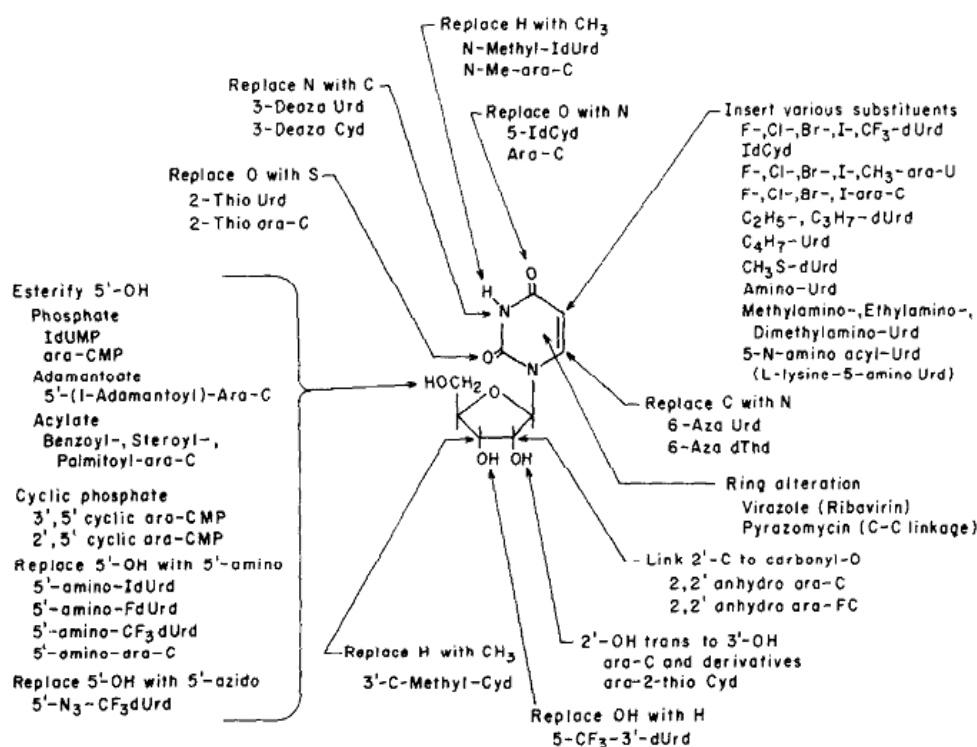


Σχήμα 12: Χημική δομή της 5-ίωδο-2'-δεοξουριδίνης

Οι Johnsons και John (T. B. Johnson and C. O. Johns, 1905-06) είχαν αναφέρει τη σύνθεση 5'-ιωδοπυριμιδινών το 1905. Το 1945, οι Hitchings *et al.* (G. H. Hitchings *et al.*, 1945) ξεκίνησαν συστηματική μελέτη της βιολογικής

δράσης διαφόρων παραγόντων της πουρίνης και της πυριμιδίνης. Σύντομα, μία ομάδα (R. L. Thompson *et al.*, 1991) τεκμηρίωσε την μέτρια αναστολή από την 5-βρωμοουρακίλη, την 5-υδρόξουρακίλη και τη 2,4-διθιοθυμίνη της αντιγραφής του ιού της δαμαλίτιδας σε κυτταρική καλλιέργεια. Οι Visser *et al.* (Visser *et al.*, 1952) ανέφεραν ότι διάφορα 5-υποκατεστημένα παράγωγα της ουριδίνης (5-χλώρο, 5-δίαζο, 5-φορμαμιδο, 5-υδρόξυ και 5-άμινο) ανέστηλαν τον πολλαπλασιασμό του ιού της εγκεφαλίτιδας του ποντικού Theiler σε καλλιέργεια εγκεφάλου ποντικού.

Ένα παράδειγμα που αναπαριστά όλους τους τύπους τροποποίησης που αποδίδει νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση φαίνεται στο Σχήμα 13.



Σχήμα 13: Τύποι τροποποίησης που αποδίδουν νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση.

1.8 5-ΐωδο-2΄-δεοξουριδίνη (IdUrd, IUdR, IDU, Ιωδοξουριδίνη)

Οι χημικές, βιοχημικές και κλινικές δοκιμές της IdUrd έχουν ήδη αναφερθεί στο παρελθόν (W. H. Prusoff and B. Goz., 1975, W. H. Prusoff and B. Goz., 1973). Η σημαντικότητα του IdUrd έγκειται στο ότι μπορεί να αναπτυχθεί ένα

νουκλεοτιδικό φάρμακο το οποίο θα είναι κλινικά αποτελεσματικό όταν γίνεται μία μόλυνση από έναν ιό. Η IDU είχε περιγραφεί ως ένας αντι-HSV παράγοντας για τη θεραπεία της ερπητικής κερατίτιδας από τους Kaufman *et al.* Η αποτελεσματικότητα της Ιωδοξουριδίνης στη θεραπεία του απλού έρπη του επιθηλίου του κερατοειδούς στον άνθρωπο, μία ασθένεια που αποτελεί την κύρια αιτία τύφλωσης λόγω της μόλυνσης του κερατοειδούς στις ΗΠΑ, έχει αποδειχθεί και εγκριθεί από τον FDA. Ο Juel-Jensen (B. E. Juel-Jensen, 1964, B. E. Juel-Jensen, 1965), έχει ήδη αναλύσει την κλινική χρησιμότητα της Ιωδοξουριδίνης και πολλών άλλων αντιϊκών παραγόντων στον άνθρωπο.

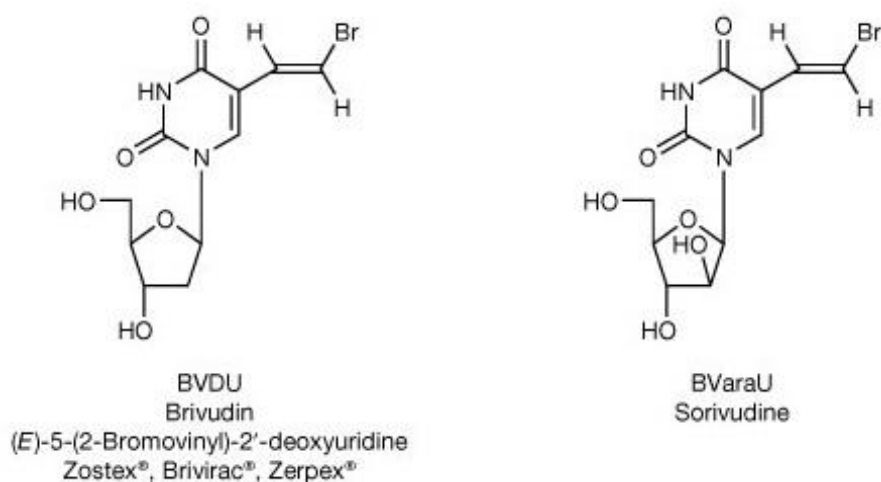
Ο μηχανισμός της αντιϊκής δράσης της IdUrd σχετίζεται με τις δυσμενείς βιολογικές επιπτώσεις της ενσωμάτωσης του αναλόγου της θυμιδίνης σε ιϊκό DNA (W. H. Prusoff and B. Goz., 1975, W. H. Prusoff and B. Goz., 1973). Η ενσωμάτωση της IdUrd στο DNA φυσιολογικών μη μολυσμένων κυττάρων, ενδεχομένως είναι υπεύθυνη για την τοξικότητα που έχει βρεθεί κατά τη διάρκεια είτε της τοπικής είτε της συστηματικής θεραπείας. Η συστηματική τοξικότητα είναι δόσοεξαρτώμενη και όταν εισάγεται καθημερινά στον άνθρωπο σε συγκέντρωση περίπου 100mg/kg για 5 ή 6 ημέρες, μπορεί να παρατηρηθεί στοματίτιδα, λευκοπενία και αλωπεκία.

Μαζί με αυτά τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα, υπάρχουν και άλλες ανησυχίες των οποίων η σημασία για τον άνθρωπο είναι δύσκολο να αξιολογηθεί, και περιλαμβάνουν την ικανότητα της IdUrd: 1] να επάγει τον σχηματισμό ιών σε καλλιέργεια κυττάρων, 2] να αυξήσει το ρυθμό μετάλλαξης των βακτηρίων, 3] να δημιουργήσει χρωμοσωμικές βλάβες και, 4] να επηρεάσει την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση (W. H. Prusoff and B. Goz, 1975).

Έτσι, η IdUrd φαίνεται να είναι η πρώτη ένωση που παρουσιάζει ξεκάθαρα μια επιτυχημένη θεραπεία μιας καθιερωμένης λοίμωξης από ιό στον άνθρωπο.

Μετά τη σύνθεση της 5-ιωδο-2'-δεοξουριδίνης (IDU) από τον Prusoff (Prusoff, 1959), το ενδιαφέρον για τους 5-υποκατεστημένους νουκλεοζίτες ως πιθανά αντιϊκά παράγωγα έχει αυξηθεί (Prusoff & Fischer, 1979). Τα ακόρεστα 5-υποκατεστημένα παράγωγα έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μεταξύ αυτών, η BVDU [E-5- (2-βρωμοβινυλ) -2'-δεοξουριδίνη] έχει αναδειχθεί ένας από τους πιο ισχυρούς και εκλεκτικούς αναστολείς της αντιγραφής του ιού του

έρπη, ιδιαίτερα του ιού απλού έρπη τύπου-1 (HSV-1) (De Clercq *et al.*, 1979). Μεγάλο μέρος του BVDU και σχετικών ενώσεων φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητα της HSV-1 κινάσης της θυμιδίνης (TK) να δεχτεί τέτοια ανάλογα ως υποστρώματα, σε αντίθεση με την ανικανότητα του αντίστοιχου ενζύμου ξενιστή (Cheng *et al.*, 1981). Επιπλέον, η τριφωσφορική BVDU αναστέλλει την HSV-1 DNA πολυμεράση πιο αποτελεσματικά από ό,τι αναστέλλει τις κυτταρικές DNA πολυμεράσες. Η περίπτωση της IDU αποτελεί ένα παράδειγμα σύνθεσης παραγώγων με τροποποίηση στην βάση. Η IDU μπορεί να θεωρηθεί ως το σημείο εκκίνησης για την σύνθεση διαφόρων νέων παραγώγων 5-υποκατεστημένων-2'-δεοξουριδίνης. Το πιο σημαντικό παράγωγο αυτής της σειράς είναι η (*E*)-5-(2-βρωμοβίνυλο)-2'-δεοξουριδίνη (Brivudin/BDU), το οποίο αποδείχτηκε πολύ καλός ειδικός αναστολέας του HSV-1, καθώς επίσης και του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα (VZV). Αργότερα, το ομόλογο του BVDU, η 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-*E*-5-(2-βρωμοβίνυλο)ουρακίλη (BVaraU), βρέθηκε ότι είναι εξίσου ισχυρή, αν όχι και περισσότερο από το BVDU, κατά του ιού VZV.

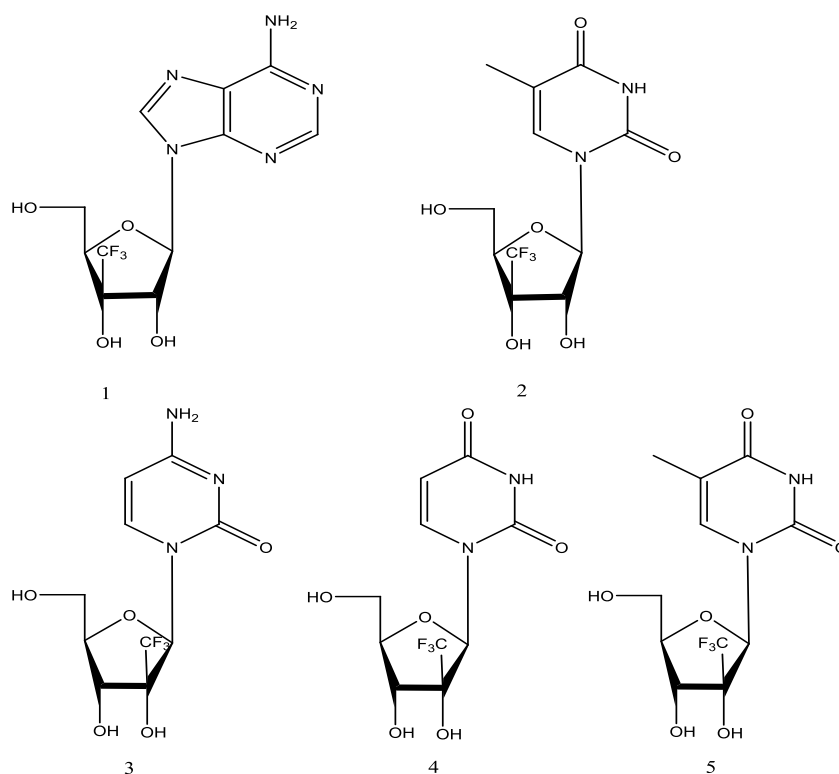


Σχήμα 14: Οι ενώσεις (*E*)-5-(2-βρωμοβίνυλο)-2'-δεοξουριδίνη και BVaraU, με ισχυρή δράση έναντι του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα.

Η BV-araU εμφανίζει αντιϊκή δράση και έναντι εργαστηριακών στελεχών και απομονωμένων κλινικών προϊόντων όταν δοκιμάζεται σε διάφορους ανθρώπινους ινοβλάστες και σε κυτταρική σειρά ινοβλαστών πιθήκου (Haruhiko M. *et al.* 1991).

1.9. Τριφθορομέθυλο φουρανονουκλεοζίτες

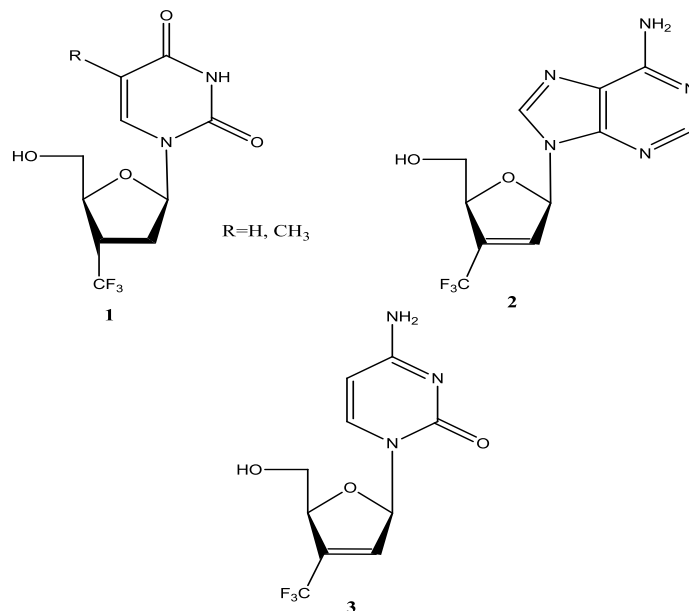
Τις τελευταίες δεκαετίες σημαντική ήταν η έρευνα για τους τριφθορομέθυλο νουκλεοζίτες, η οποία στηρίχτηκε στα όμοια επαγωγικά φαινόμενα της CF_3 ομάδας με το άτομο του F, σε συνδυασμό με το ότι η παρουσία της στερικώς απαιτητικής τριφθορομεθυλο ομάδας σε στρατηγικές θέσεις βιοενεργών ενώσεων προκαλεί συχνά μείωση του μεταβολισμού, αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας καθώς και αυξημένη λιποφιλικότητα (Carl R. Johnson* and Dilip R. Bhumralkar). Το 1995, ο Carl Johnson παρουσίασε τη σύνθεση και τη βιολογική αποτίμηση νέων 3'-τριφθορομέθυλο νουκλεοζιτών **1,2**, οι οποίοι εμφάνισαν σημαντική αντιϊική δράση έναντι διαφόρων DNA και RNA ιών, σε αντίθεση με τους 2'-τριφθορομέθυλο νουκλεοζίτες **3-5**, οι οποίοι δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτη αντιϊκή δράση Frederic Jeannot (Σχήμα 15).



Σχήμα 15

Μετά τα πρώτα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, όσον αφορά τους τριφθορομέθυλο φουρανονουκλεοζίτες, ο Lavaire συνέθεσε τους 2',3'-διδεοξυ-3'-C-τριφθορομεθυλο νουκλεοζίτες της ουρακίλης και της θυμίνης **1** (σχήμα

13), οι οποίοι όμως δεν εμφάνισαν αξιόλογη βιολογική δράση. Κατόπιν, ο Jeannot παρουσίασε νέους 2'3'-ακόρεστους 3'-τριφθορομέθυλο φουρανονουκλεοζίτες της αδενίνης και της κυτοσίνης (ενώσεις 2, 3, σχήμα 16), οι οποίοι εμφάνισαν μέτρια αντιική δράση έναντι του HBV.



Σχήμα 16

1.10. Πυρανονουκλεοζίτες

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη και φέρουν τη β-απεικόνιση, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τις σχετικές δομές στα σχήματα 1 και 2. Η σπουδαιότητα των πεντοζών αναγνωρίστηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως συστατικά των νουκλεϊκών οξέων. Όλοι οι νουκλεοζίτες στο DNA και RNA αποτελούνται από ένα D-πεντοφουρανοζικό σάκχαρο συνδεδεμένο με μία ετεροκυκλική νουκλεοβάση (πουρίνη ή πυριμιδίνη), μέσω ενός β-N-γλυκοσιδικού δεσμού (Saenger 1984, Blackburn and Gait 1996, Bloomfield *et al.* 1999). 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

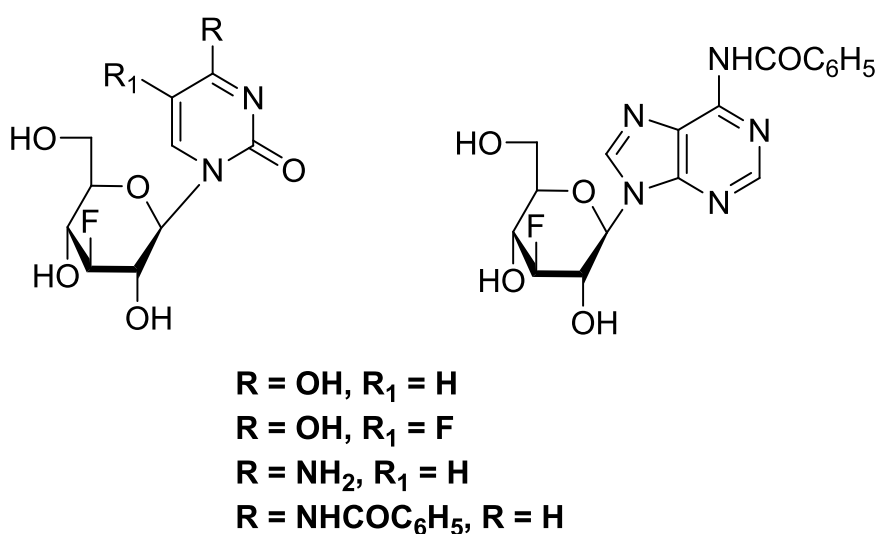
τους, έστρεψαν το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντιικής δράσης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων και ειδικότερα αυτών που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη (www.cf.ac.uk/phrmy/ChemEd/presentations.html).

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η έρευνα για την ανακάλυψη αντιικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είχε μείνει αρκετά βήματα πίσω σε σχέση με αυτή των βιολογικών ενεργών νουκλεοζιτών με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίου. Παρόλα αυτά, νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίου έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντιικές (Verheggen *et al.* 1993, Verheggen *et al.* 1995, Maurinsh *et al.* 1997, Ostrowski *et al.* 1998), αντικαρκινικές (Antonakis 1989) και αντιβιοτικές τους ιδιότητες (Haouz *et al.* 2003), καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων (Vastmans *et al.* 2000, Vastmans *et al.* 2001).

Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη μελέτη φθορονουκλεοζιτών προκειμένου να βρεθούν νέα αντικαρκινικά, αντιικά, ή αντι-HIV φάρμακα με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες σε σχέση με τα έως τώρα χρησιμοποιούμενα σε κλινικό επίπεδο (Lee *et al.* 1999, Lee *et al.* 2002, Chong *et al.* 2002, Kumar *et al.* 2004, Clark *et al.* 2006). Η εισαγωγή ενός φθορίου είτε στο τμήμα του σακχάρου είτε στη νουκλεοβάση των φουρανουκλεοζιτών, οδηγεί σε ενώσεις, οι οποίες διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα αντιικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων (Herdewijn *et al.* 1989, Tsuchiya 1990, Ternansky *et al.* 1993, Pankiewicz 2000). Ειδικότερα, η παρουσία ενός φθορίου στο μόριο του σακχάρου των νουκλεοζιτών με πενταμελή υδατανθρακικό δακτύλιο, αποδείχθηκε ότι είναι μια αποτελεσματική μέθοδος αύξησης της δράσης τους (Van Aerschot 1989, Matthes *et al.* 1990, Daluge *et al.* 1994, Fuentes *et al.* 2002). Φαίνεται ότι η παρουσία φθορίου αυξάνει το λιπόφιλο χαρακτήρα του μορίου διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Morton *et al.* 1969, Blandin *et al.* 1974, Lipnick and Fissekis 1980, VanAerschot *et al.* 1989). Η αντικατάσταση ενός υδρογόνου από ένα φθόριο σε ένα βιολογικά ενεργό μόριο δεν αναμένεται να προκαλέσει στερεοχημικές μεταβολές όσον αφορά στον τρόπο

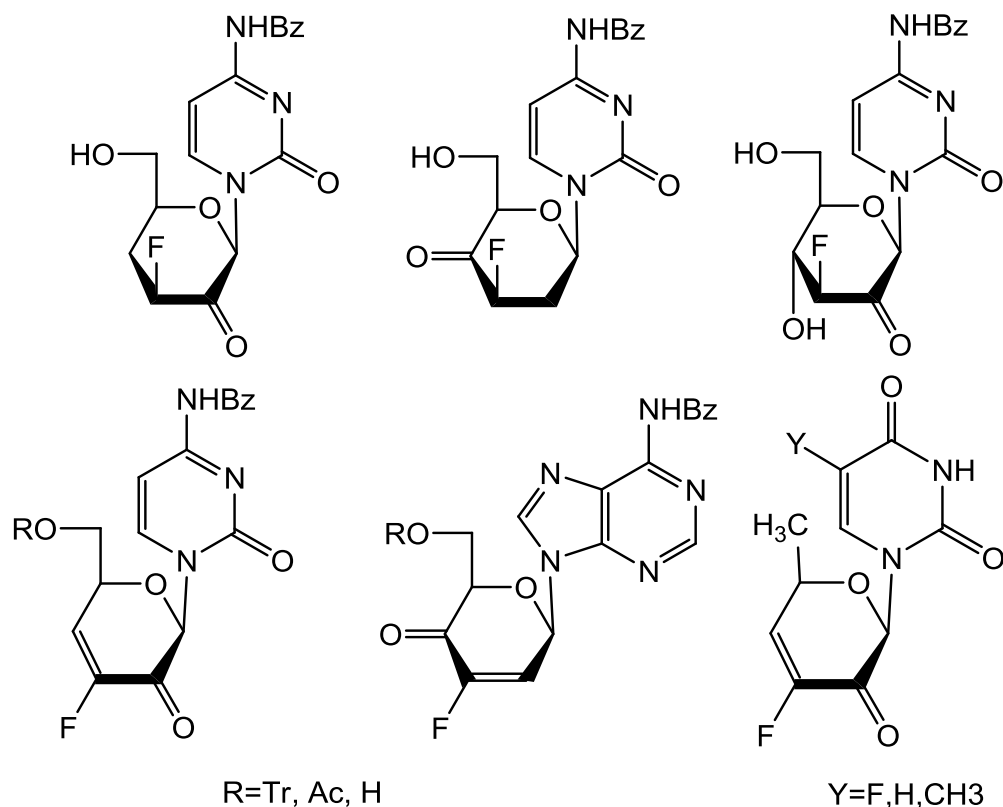
σύνδεσης του μορίου έναντι διαφόρων υποδοχέων και ενζύμων. Αντίθετα, η μεγάλη ισχύς του δεσμού C-F, σε σχέση με αυτή του δεσμού C-H, παρεμποδίζει το μεταβολισμό με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημιζωής του μορίου. Επιπλέον, η ικανότητα έλξης ηλεκτρονίων από το φθόριο, δεδομένου ότι είναι το πιο ηλεκτραρνητικό όλων των στοιχείων, μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη χημική δραστηριότητα.

Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έχουν συντεθεί φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Manta *et al.* 2007), οι οποίοι εμφάνισαν ανασταλτική δράση έναντι της PARN, ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(A) ουράς), καθώς και της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (σχήμα 17).



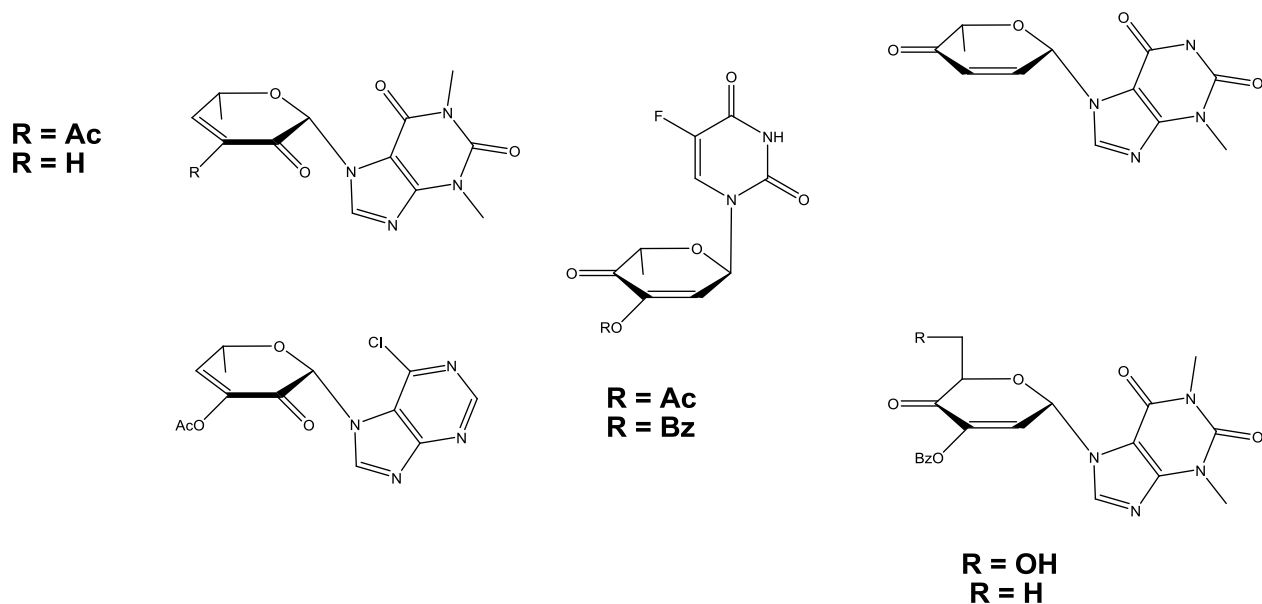
Σχήμα 17: Χημική δομή φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών

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) (σχήμα 18).



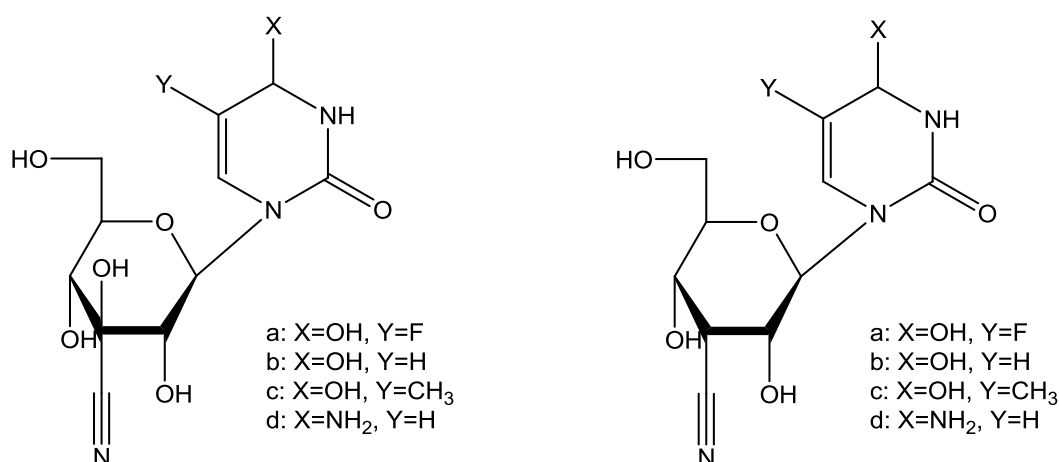
Σχήμα 18: Χημική δομή φθοροκέτο και ακόρεστων φθοροκέτο-πυρανουκλεοζιτών

Επιπρόσθετα, ακόρεστα κετο-πυρανουκλεοζιτικά 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). (σχήμα 19).



Σχήμα 19: Ακόρεστα κετο-πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα

Πρόσφατα μια νέα τάξη πυρανονουκλεοζιτών που έχει μελετηθεί είναι αυτή των 3'-κυανιδρινών και 3'-δεοξυ-κυανο πυρανονουκλεοζιτών (Kiritsis *et al.*, 2011). Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες αξιολογήθηκαν για την αντιική τους δράση έναντι μιας πληθώρας DNA και RNA ιών, ενώ παρουσίασαν σημαντική κυτταροστατική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και κατά του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa) (σχήμα 20).



Σχήμα 20: 3' κύανο-νουκλεοζίτες

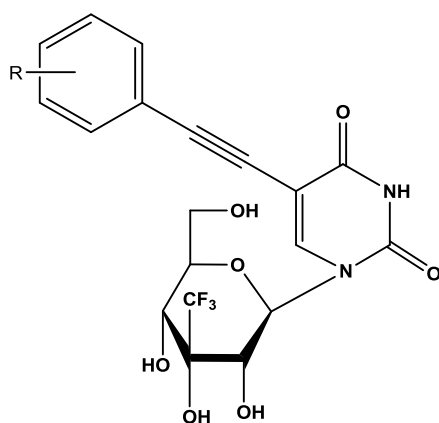
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός

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

Έχει διαπιστωθεί με βάση τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία ότι οι φθόρο φούρανο νουκλεοζίτες αποτελούν μια αξιόλογη κατηγορία ενώσεων που έχει προσελκύσει σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι νέες τάξεις ασυνήθιστων φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών αποτελούν εν δυνάμει αντι-εντεροϊικούς παράγοντες, θεραπευτικά μέσα για τον καρκίνο του παχέως εντέρου, καθώς και αποτελεσματικούς αναστολείς της ανάπτυξης καρκινικών όγκων. Μεταξύ των τροποποιήσεων των νουκλεϊκών βάσεων που πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν, η εισαγωγή μιας ομάδας αλκυλυλίου υπήρξε μια ιδιαίτερα ελπιδοφόρα υποκατάσταση προς την ανάπτυξη παραγώγων φαρμακευτικού ενδιαφέροντος.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω στοιχεία, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών στους οποίους η ηλεκτραρνητική τριφθορομεθυλοομάδα θα προστεθεί στην 3΄θέση της γλυκόζης. Οι νέοι νουκλεοζίτες φέρουν την τριφθορομεθυλοομάδα στη 3΄-θέση του σακχάρου και αλογονοφαίνυλ- αλκυλυλ υποκαταστάτες στη θέση 5 της ουρακίλης (Σχήμα 18). Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν ως αντικαρκινικοί παράγοντες.



R = Fluoro (a), Chloro (b)

Σχήμα 21: Παράδειγμα 3'-τριφθορομεθυλο-πυρανονουκλοζίτη

3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC:Thin layer chromatography)

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

3.2 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 –εκκλούνται- 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 silica gel (240-400, Merckgrade).

3.3 Ξήρανση διαλυτών

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

Η ξήρανση του ακετονιτριλίου γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 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.

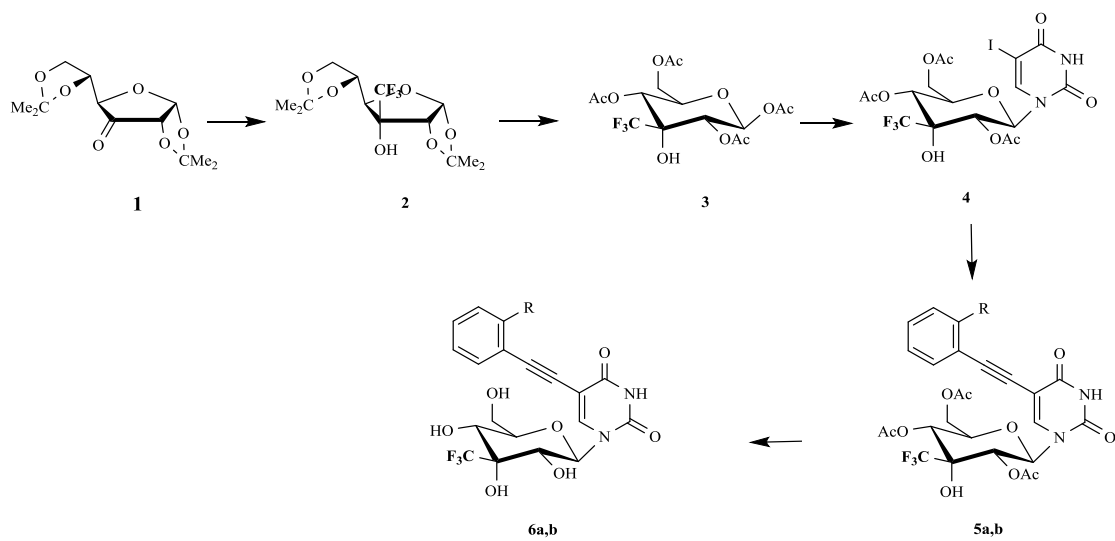
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

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 ^1H -NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο BrukerAVANCE^{III} 300 και τα φάσματα ^{13}C -NMR καταγράφηκαν στα 75.5MHz στο ίδιο φωτόμετρο, χρησιμοποιώντας chloroform-d (CDCl_3), methanol-d₄ (CD_3OD). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^1H .

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1.1 Επισκόπηση της σύνθεσης των 6α,β αναλόγων



R = Fluoro (a); Chloro (b)

4.1.2 Μεθοδολογία Σύνθεσης

Η πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2,5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-γλυκοφουρανόζη (DAG) η οποία οξειδώνεται προς 1,2,5,6-Δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη (**1**) χρησιμοποιώντας διχρωμική πυριδίνη (PDC) παρουσία Ac_2O σε διαλύτη CH_2Cl_2 . Η αντίδραση προχωράει ποσοτικά με απόδοση 89%.

Η επόμενη αντίδραση είναι μία πυρηνόφιλη προσθήκη της τριφθορομέθυλο ομάδας στην κετονομάδα του αντιδραστήριου **1**. Λαμβάνουμε με αυτό τον τρόπο με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα την 3-C-τριφθορομέθυλο-1,2,5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (**2**) με αντιδραστήριο τριφθορομέθυλο τριμέθυλο πυρίτιο (TFMTS), παρουσία τετραβουτυλο αμμώνιο φθοριδίου (TBAF) σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF), με απόδοση 90%.

Η σύνθεση συνεχίζεται με την υδρόλυση του προϊόντος **2** με ένα θερμό υδατικό διάλυμα της ρητίνης AmberliteIR-120 (H^+), μετά το πέρας της αντίδρασης γίνεται εξάτμιση των διαλυτών και ακολουθεί ακετυλίωση του προϊόντος παρουσία οξέικου ανυδρίτη (Ac_2O) σε πυριδίνη, λαμβάνεται το επιθυμητό σάκχαρο, 3-C-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρακισ-Ο-ακετυλογλυκοπυρανόζη (**3**), με απόδοση (64%).

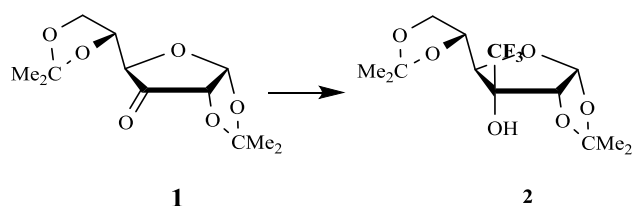
Ακολουθεί η σύζευξη του σακχάρου **3** με τη βάση 5-ιωδοουρακίλη. Αρχικά, σιλυλιώνεται η βάση παρουσία του διαλύτη ακετονιτριλίου ($MeCN$), εξαμεθυλοδισιλαζανίου ($HMDS$) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης. Στη συνέχεια, προστίθεται στο σάκχαρο **3** και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα ($Me_3SiOSO_2CF_3$) και θέρμανση της αντίδρασης, λαμβάνοντας την επιθυμητή 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο-3'-υδροξυ-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-ιωδοουρακίλη (**4**), σε απόδοση 82%.

Στη συνέχεια, με αντίδραση Sonogashira (Majid M. *et al.* 2009, Jason T. *et al.* 2005) παίρνουμε τα προστατευμένα προϊόντα **5a**, **5b**. Ένα τυπικό πείραμα Sonogashira είναι το ακόλουθο. Ο τριφθορομέθυλο πυρανονουκλεοζίτης της 5-ιωδοουρακίλης (**4**) διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και με την προσθήκη του κατάλληλου αλκινίου, της τριαιθυλαμίνης

(Et₃N), του ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκатаλύτης) και του τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄] (καταλύτης), πραγματοποιήθηκε η σύζευξη τους υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων ισχύος 200W για 5 λεπτά στους 60°C, σε αποδόσεις 69-74%

Τέλος, η σύνθεση ολοκληρώνεται με την απακευλίωση των προϊόντων **5a,b** σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας τα τελικά προϊόντα **6a,b**

4.1.3 Σύνθεση της 3-C- τριφθορομέθυλο -1,2,5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (**2**) (Johnson *et. al.* 1995)

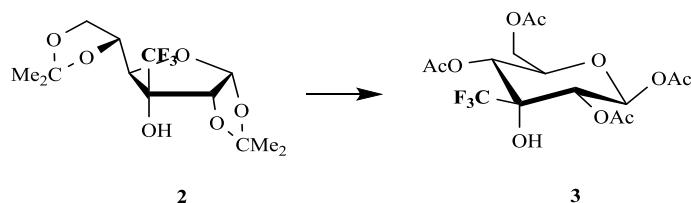


Σε διάλυμα που περιέχει το **1** (1g, 3.9 mmol) και τριφθορομέθυλ-τριμεθυλπυρίτιο (0.8 ml, 8 mmol) σε THF (10 ml) προστέθηκε στάγδην διάλυμα 1M TBAF σε THF (1.1 g, 8 mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες. Το διάλυμα συμπυκνώθηκε και το προϊόν μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel). Πραγματοποιήθηκε έκλουση με 20% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **2** (1.15 g) ελήφθη υπό τη μορφή λεύκου κρυστάλλου.

TLC	R _f =0.52
Απόδοση	90%

Πίνακας 1. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C- τριφθορομέθυλο -1,2,5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (**2**)

4.1.4 Σύνθεση της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζης (3) (Foster *et. al.* 1967, Tewson *et al.* 1978)

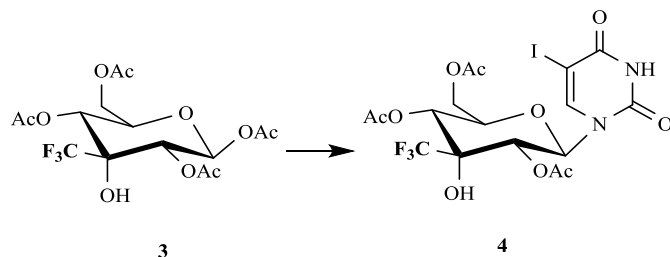


Ένα διάλυμα της ένωσης **2** (700mg, 2.13mmol) σε MeOH (3.31ml) και νερό (19ml) αναδεύτηκε στους 60-70 °C με ρητίνη AmberliteIR-120 (H⁺) (1.10mg). Μετά από 10 ώρες η αντίδραση ελέγχεται με TLC, το μείγμα διηθήθηκε και απομακρύνθηκαν οι διαλύτες από το διήθημα υπό κενό. Στη συνέχεια το προϊόν (427mg, 1.72mmol) διαλύθηκε σε πυριδίνη (6.02ml) και προστέθηκε Ac₂O (3.10ml). Το μείγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης το διάλυμα κρύωσε στους 0°C και προστέθηκε μεθανόλη (0.7 ml) για να καταστείλει την αντίδραση. Η αντίδραση συμπυκνώνεται υπό κενό πολλές φορές με MeOH για να απομακρυνθεί η πυριδίνη. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 50% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο και το επιθυμητό προϊόν **3** (429 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC	R _f =0.57
Απόδοση	64%

Πίνακας 2. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C- τριφθορομέθυλο -3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζης (**3**).

4.1.5 Σύνθεση της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-υδροξυ-2',4',6'-τρεις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)5-ιωδοουρακίλης (4)

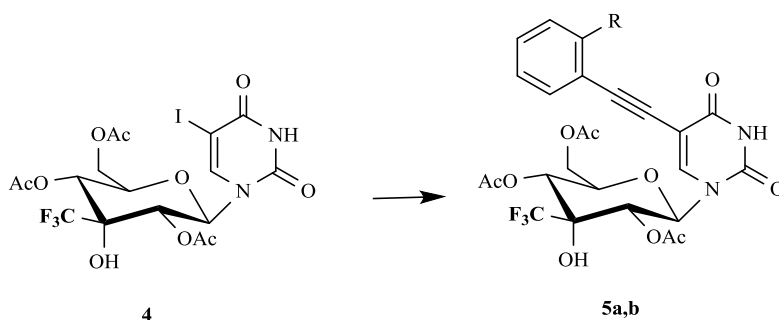


Ένα διάλυμα της ιωδοουρακίλης (200mg, 1.44mmol), του HMDS (380 μl, 1.79 mmol) και της σακχαρίνης (12.15mg, 0.066mmol) σε άνυδρο CH₃CN (10 ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 1 ώρα στους 120 °C και αφότου το μείγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 3-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοκυρανόζη (**3**) (429mg, 1.03 mmol) καθώς και ο Me₃SiOSO₂CF₃ (0.26ml, 1.44 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 90°C. Στη συνέχεια το μείγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (90 ml) και εκχυλίστηκε μία φορά με νερό. Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% εξάνιο σε οξικό αιθυλεστέρα. Το επιθυμητό προϊόν **4** (352mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC	R _f =0.46
Απόδοση	82%

Πίνακας 3. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-υδροξυ-2',4',6'-τρεις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)5-ιωδοουρακίλης (**4**)

4.1.6 Σύνθεση των 5a,b

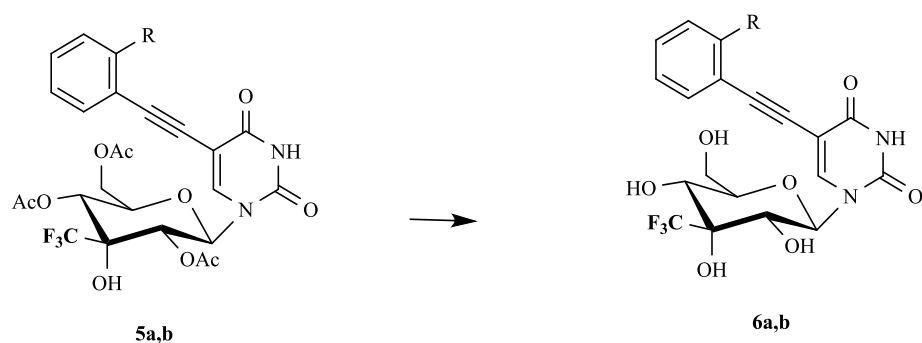


Η σύνθεση των **5a,b** επιτεύχθηκε με τη μέθοδο Sonogashira με χρήση μικροκυμάτων: Το *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και η 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο -3'-υδρόξυ-2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-ιωδοουρακίλης (**4**) διαλύονται σε 5 ml άνυδρου διαλύτη (0,41mmol, 206mg), 2 eq του κατάλληλου τελικού αλκινίου, τριφαινυλοφωσφορικό παλλάδιο [Pd(PPh₃)₄] (0,1 eq, 323,6 mg, 0,28mmol), ιωδιούχο χαλκό (0,1 eq, 53,7 mg, 0,28 mmol), τριαιθυλαμίνη (3 eq, 1,2ml), και εν συνεχεία γίνεται χρήση μικροκυμάτων σε συνθήκες 200 Watt, για 5 λεπτά στους 60°C. Η επεξεργασία που ακολουθείται για την παραλαβή του προϊόντος περιλαμβάνει εκχύλιση του μίγματος της αντίδρασης με οξικό αιθυλεστέρα και NaHCO₃, παραλαβή της οργανικής φάσης, ξήρανση με άνυδρο Na₂SO₄ και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Τα επιθυμητά προϊόντα **5a** (138 mg), **5b** (148 mg), ελήφθησαν υπό τη μορφή κίτρινου αφρού με απόδοση 69% και 71% αντίστοιχα.

TLC	R _f =0.50
Απόδοση	92%

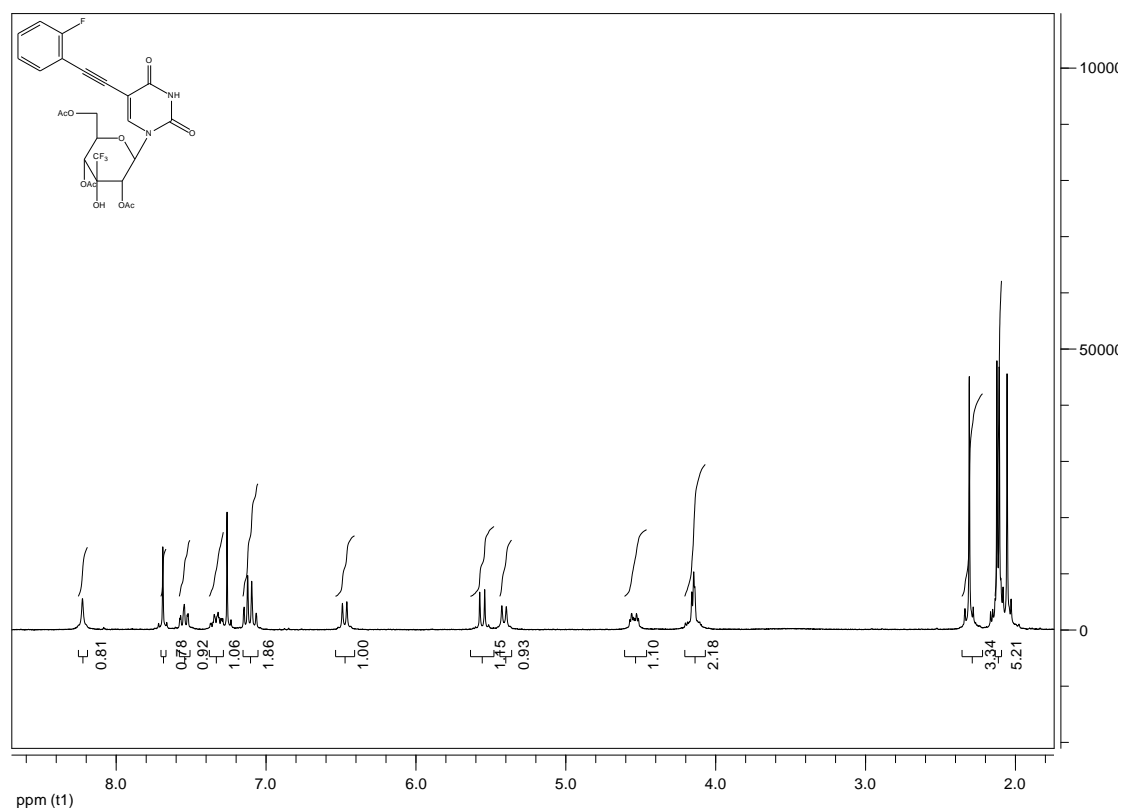
Πίνακας 4. Αποτελέσματα σύνθεσης των **5a,b**

4.2 Επισκόπηση της σύνθεσης των 6a,b

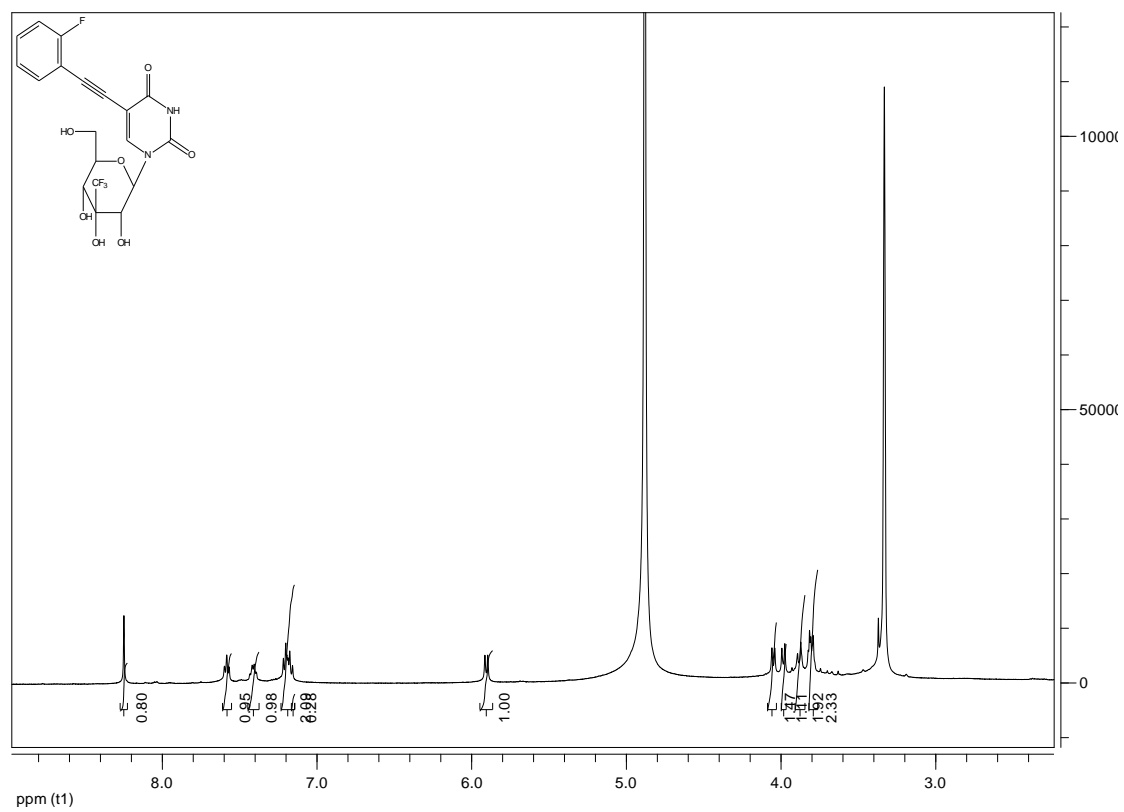


Διάλυμα των προστατευμένων νουκλεοζιτών **5a** (100 mg, 0,2mmol) και **5b** (100 mg, 0,2mmol) και σε κορεσμένη μεθανολική αμμωνία (262,5 ml) αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες καθαρίζονται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 10% μεθανόλης σε CH_2Cl_2 , οπότε παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα **6a** (63,7mg) και **6b** (66mg) και, αντίστοιχα, με μορφή κίτρινου ελαίου.

5.ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR



Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος **5a**



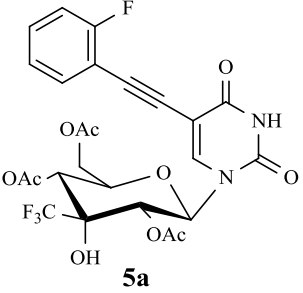
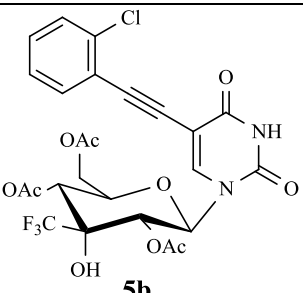
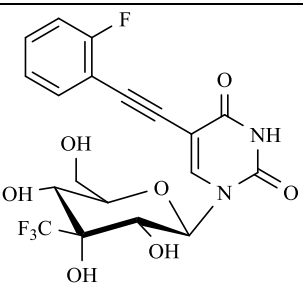
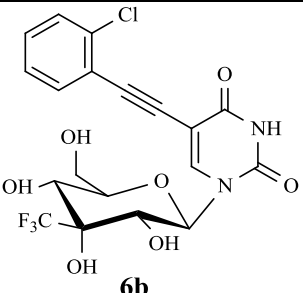
Φάσμα $^1\text{H NMR}$ του τελικού προϊόντος **6a**

6· ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προέκυψε από τις προσπάθειες των ερευνητών για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως οι κακοήθεις νεοπλασίες και οι ιικές 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 πυρανονουκλεοζιτών με πιθανή αντιική και αντικαρκινική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, εύκολη, έχοντας πραγματοποιήσει σύντομα βήματα. Οι τελικές αποδόσεις που πήραμε από τη σύνθεση των τελικών πυρανονουκλεοζιτών είναι ικανοποιητικές. Πιο συγκεκριμένα, σύνθεση 1,2,5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδανο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόξης **(1)** με απόδοση 89%, 3-C- τριφθορομέθυλο -1,2,5,6-δι-Ο-ισοπροπυλιδανο-α-D-αλλοφουρανόζη **(2)** με απόδοση 90%, 3-C- τριφθορομέθυλο -3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλογλυκοπυρανόξης **(3)** με απόδοση 64% ,1-(3'-C-τριφθορομέθυλο -3'-υδρόξυ-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-ιωδοουρακίλης **(4)** με απόδοση 82%. Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹HNMR.

Η ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (L1210, HeLa, CEM) από τον νεοσυντιθέμενο πυρανονουκλεοζίτη απεικονίζεται στον Πίνακα 5.

ΕΝΩΣΗ	IC ₅₀ ^a (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
 <p>5a</p>	118 ± 6	64 ± 3	76 ± 3
 <p>5b</p>	91 ± 13	100 ± 8	≥ 250
 <p>6a</p>	> 250	> 250	> 250
 <p>6b</p>	> 250	> 250	> 250
F-Uracil	0.49 ± 0.13	18 ± 5	0.54 ± 0.12

Πίνακας 5

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 5, οι νεοσυντιθέμενοι τριφθορομέθυλο-γλυκοπυρανονουκλεοζίτες δεν παρουσίασαν ανασταλτική δράση έναντι του

πολλαπλασιασμού των λευχαιμικών κυττάρων (L1210), των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου (HeLa) και των ανθρώπινων Τ-λεμφοκυττάρων (CEM). Ωστόσο παρατηρούμε διαφορά στις τιμές IC₅₀ μεταξύ των αναλόγων **5a,b** και **6a,b**. Ενδεχομένως η παρουσία της ακετυλομάδας να προσδίδει στα νεοσυντιθέμενα ανάλογα μεγαλύτερη λιποφιλικότητα και ,κατά συνέπεια, μεγαλύτερη δυνατότητα μετακίνησης δια μέσου της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων-στόχων. Ακόμη, οι υδροξυλομάδες των **6a,b** είναι πιθανό να αποτελούν στόχους για ενδοκυτταρικά ένζυμα, που αντιδρούν με τα μόρια και είτε αλλάζουν την στερεοδιάταξή τους και την εκλεκτικότητά τους, είτε τα καταστρέφουν εντελώς.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Morisson&Boyd Οργανική Χημεία, τόμος 3 Γραφείο Εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων **1991**, σελ 758.
2. McMurryJ. Οργανική Χημεία, τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης **2000**, σελ. 151,905,1245,1249.
3. Stryer, Βιοχημεία, τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης **1995**.Zhou, W.;
4. Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.***2004**, 47, 3399.
5. Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* **1992**, 11, 903.
6. Robins, R. K.; Kini, G. D. "Wilman, D. E. V. Ed.; Chapman and Hall: New York, **1990**, p.299
7. MacCoss, M.; Robins, M. J. Wilman, D. E. V. Ed.; Chapman and Hall: New York, **1990**, p. 261
8. Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.***2004**, 47, 3399.
9. Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* **1995**,67,155.
10. Lewin, B. *Genes* **2003**, VIII, 6.
11. Burns, C. J. *Curr. Med. Chem- Anti-Infective Agents*, **2005**, 4, 4.
12. 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.
13. Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* **2010**.
14. Siev, M.; Weinberg, R.; Penman, S. *J. Cell Biol.* **1969**, 41, 510.

15. Ahn, Y. J.; Park, S. J.; Lee, S. G.; Shin, S. C.; Choi D. H. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 2744.
16. Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 47, 365.
17. Pontikis, R.; Wolf, J.; Monneret, C.; Florent, J. –C. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3523.
18. Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* **1991**, 51, 2319.
19. Lin, T. S.; Luo, M. Z.; Liu, M. C.; Clarkatzenburg, R. H.; Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H.; Mancini, W. R.; Birnbaum, G. I.; Gabe, E.; Giziewicz, J. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2607.
20. Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1879.
21. Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* **2004**, 95, 105.
22. Hiroyuki Hayakawa, Satoru Kohgo, Kenji Kitano, Noriyuki Ashida, Eiichi Kodama, Hiroaki Mitsuya and Hiroshi Ohru *Antiviral chemistry & chemotherapy* **2004**;15(4):169-87.
23. Brossette T., Emmanuel Klein, Christophe Creminon, Jacques Grassi, Charles Mioskowski and Lyk Lebeau; *Tetrahedron*, **2001**, 57, 8129-8143.
24. Moon H. R., Kim H. O., Lee S. K., Choi W. J., Chun M. W., Jeong L. S.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2002**, 10, 1499-1507.
25. Carl R. Johnson* and Dilip R. Bhumralkar, *NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES*, **1995**, 14(1&2), 185.
26. Nan-Sheng Li, Xiao-Qing Tang, and Joseph A. Piccirilli, *Organic Letters*, **2001**, 3, 1025.
27. Saenger, W. "Principles of Nucleic Acid Chemistry", Springer-Verlag, New York, **1984**.
28. Blackburn, G. M.; Gait, M. J. "Nucleic Acids in Chemistry and Biology", Oxford University Press, New York, **1996**.
29. Bloomfield, V. A.; Crothers, D. M.; Tinoco, I. University Science Books, Sausalito, California, **1999**.
30. Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2033.

31. 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.
32. Maurinsh, Y.; Schraml, J.; De Winter, H.; Blaton, N.; Peeters, O.; Lescrinier, E.; Rozenski, J.; Van Aerschot, A.; De Clercq, E.; Busson, R.; Herdewijn, P. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2861.
33. Ostrowski, T.; Wroblowski, B.; Busson, R.; Rozenski, J.; De Clercq, E.; Bennet, M. S.; Champness, J. N.; Summers, W. C.; Sanderson, M. R.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4343.
34. Antonakis, K. "Hexopyranose nucleosides". In *Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C)*; Elsevier, Amsterdam, **1989**, *4*, p. 241.
35. Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4963.
36. Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12757.
37. Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3154.
38. Lee, K.; Choi, Y.; Gullen, E.; Schlueter-Wirtz, S.; Shcinazi, R. F.; Cheng, Y. C.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1320.
39. Lee, K.; Choi, Y.; Gumina, G.; Zhou, W.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1313.
40. Chong, Y.; Choo, H.; Lee, S.; Choi, Y.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4888.
41. Kumar, P.; Ohkura, K.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Seki, K.; Wiebe, L. I. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2004**, *23*, 7.
42. Clark, J. L.; Mason, J. C.; Hollecker, L.; Stuyver, L. J.; Tharnish, P. M.; McBrayer, T. R.; Otto, M. J.; Furman, A. P.; Schinazi, R. F.; Watanabe, K. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1712.
43. Herdewijn, P.; Van Aerschot, A.; Kerremans, L. *Nucleosides Nucleotides* **1989**, *8*, 65.
44. Tsuchiya, T. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *48*, 91.

45. Ternansky, R. J.; Hertel, L. W. Filler, R.; Kobayashi, Y.; Yagupolski, L.M. (Eds), Elsevier, Amsterdam, **1993**, p. 23.
46. Pankiewicz, K.W. *Carbohydr. Res.* **2000**, 327, 87.
47. VanAerschot, A.; Herdewijn, P.; Balzarini, J.; Pawels, R.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1743.
48. Matthes, E.; Scholz, D.; Sydow, G.; Von Janta-Lipinski, M.; Rosenthal, H. A.; Langen, P. *Z. Klin. Med.* **1990**, 45, 1255.
49. Daluge, S. M.; Purifoy, D. J.; Savina, P. M.; St. Clair, M. H.; Parry, N. R.; Dev, I. K.; Novak, P.; Ayers, K. M.; Reardon, J. E.; Roberts, G. B.; Fyfe, J. A.; Blum, M. R.; Averett, D. R.; Dornsife, R. E.; Domin, B. A.; Ferone, R.; Lewis, D. A.; Krenitsky, T. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38, 1590.
50. Fuentes, J.; Angulo, M.; Pradera, M. A. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2577.
51. Morton, G. O; Lancaster, J. E.; Van Lear, G. E.; Fulmor, W.; Meyer, W. E. *J. Amer. Chem. Soc.* **1969**, 91, 1535.
52. Blandin, M.; Son, T. D.; Catlin, J. C.; Guschlbauer, W. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, 361, 249.
53. Lipnick, R. L.; Fissekis, J. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, 608, 96.
54. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 980.
55. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.*, **2007**, doi:10.1016/j.ejmech.2007.04.001.
56. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 420.
57. Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Panagiotopoulou, A.; Pelecanou, M.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 4764.
58. Komiotis, D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. *Nucleosides Nucleotides* **1991**, 10, 431.
59. Patterson, J.; Uriel, C.; Egron, M.J.; Herscovici, J.; Antonakis, K.; Alaoui-Jamali, M.A. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1998**, 42, 779
60. Komiotis, D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents* **2008**, 7, 219.

61. Kiritsis C, Manta S, Parmenopoulou V, Balzarini J, Komiotis D. Eur J Med Chem. **2011** Nov;46(11):5668-74.
62. William H. Prusoff and David C. Ward, Commentary, Nucleoside analogs with antiviral activity, *Biochemical Pharmacology* **1976**:25, 1233-1239
63. Kaufman HE. Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5-iodo-2'-deoxyuridine. Proc Soc Exp Biol Med **1962**; 109: 251-252
64. Kaufman HE, Nesburn AB, Maloney ED. IDU therapy of herpes simplex. Arch Ophthalmol **1962**; 67: 583-591
65. Kaufman HE, Martola E-L, Dohlman C. Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in treatment of herpes simplex keratitis. Arch Ophthalmol **1962**; 68: 235-239.
66. Kaufman HE, Heidelberger C. Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine in herpes simplex keratitis. Science **1964**; 145: 585-586.
67. De Clercq E, Descamps J, De Somer P, Barr PJ, Jones AS, Walker RT. (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. Proc Natl Acad Sci U S A **1979**; 76: 2947-2951
68. Majid M. Heravi, Sodeh Sadjadi, Recent advances in the application of the Sonogashira method in the synthesis of heterocyclic compounds, *Tetrahedron*, **2009**, 65 (37), 7761–7775
69. Haruhiko Machida, Makiko Nishitani, Tatsuo Suzutani, and Kozaburo Hayashi, Different Antiviral Potencies of BV-araU and Related Nucleoside Analogues against Herpes Simplex Virus Type 1 in Human Cell Lines and Vero Cells, *Microbiol. Immunol*, **1991** Vol. 35 (11), 963-973
70. Jason Tierney, Pelle Lidström, *Microwave Assisted Organic Synthesis*, Blackwell Publishing CRC Press, **2005**, 31-32
71. Foster, A. B.; Hems, R.; Webber, J. M. *Carbohydr. Res.* **1967**, 5, 292
72. Tewson, T. J.; Welsh, M. J. *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 1090
73. Thompson, E.D., J.L. Seymour, M.J. Aardema, R.A. LeBoeuf, B.L.B. Evans and D.B. Cody (**1991**) Lack of genotoxicity of cross-linked

acrylate polymers in 4 short-term genotoxicity assays, *Environ. Mol. Mutagen.*, 18, 184-199.

74. Juel-Jensen, B. E. and MacCallum, F. O. (**1964**). Treatment of herpes simplex lesions of the face with idoxuridine: Results of a double-blind controlled trial. *Brit. Med. J.*, II, 987.
75. Juel-Jensen, B. E. and MacCallum, F. O. (**1965**). Herpes simplex lesions of the face treated with idoxuridine applied by spray gun: Results of a double-blind controlled trial. *Brit. Med. J.*, I, 901.