

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 4-ΚΕΤΟΑΚΟΡΕΣΤΟΥ-3-ΦΘΟΡΟ-5-ΘΕΙΟ-
ΞΥΛΟΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΤΗΣ
ΘΥΜΙΝΗΣ**

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑΔΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 4-ΚΕΤΟΑΚΟΡΕΣΤΟΥ-3-ΦΘΟΡΟ-5-ΘΕΙΟ-
ΞΥΛΟΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΤΗΣ
ΘΥΜΙΝΗΣ**

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑΔΟΥ ΙΩΑΝΝΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Λεωνίδας Δημήτριος — Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Κομιώτη Δημητρίου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Κομιώτη για τη εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα αλλά και για τις εποικοδομητικές και πολύτιμες υποδείξεις του και την αμέριστη συμπαράστασή του.

Ιδιαίτερος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Ευαγγελία Τσουκαλά για την καθημερινή της υποστήριξη καθ' όλη την περίοδο της παραμονής μου στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας. Η εργαστηριακή και επιστημονική της κατάρτιση, οι πολύτιμες συμβουλές της και η γενικότερη αρωγή της υπήρξαν καθοριστικοί παράγοντες για την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την ένθερμη υποδοχή τους αλλά και για το ευχάριστο και δημιουργικό κλίμα συνεργασίας εντός του εργαστηριακού χώρου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι υδατάνθρακες είναι αλδεϋδικές ή και κετονικές ενώσεις με πολλαπλές υδροξυλικές ομάδες. Αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό της οργανικής ύλης επάνω στη γη λόγω των πολλαπλών ρόλων τους σε κάθε μορφή ζωής. Τροποποιημένοι υδατάνθρακες απαντούν στα μόρια του DNA που μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες, άλλοι συνιστούν μέρος του περιβλήματος των κυττάρων, ενώ άλλοι χρησιμοποιούνται ως φάρμακα.

Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντιική και αντικαρκινική δράση περιέχουν νουκλεοζίτες αποτελούμενους από ολιγοσακχαρίτες συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μεγάλο μέρος της έρευνας σχετικά με την ανακάλυψη φαρμάκων με αντιικές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες να εστιάζεται στα ανάλογα των νουκλεοζιτών.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση του 4-κετοακόρεστου-3-φθορο-5-θειο-ξυλοπυρανονουκλεοζιτικού παραγώγου της θυμίνης. Αναλύεται η συνθετική οδός που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του καθώς και η μέθοδος ταυτοποίησής του.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| 1. Εισαγωγή..... | 6 |
| 1.1. Υδατάνθρακες | 6 |
| 1.2. Υδατάνθρακες και σχηματισμός ημιακετάλης..... | 7 |
| 1.3. Νουκλεοζίτες..... | 9 |
| 1.4. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών..... | 10 |
| 1.5. Νουκλεοζιτικά ανάλογα..... | 12 |
| 1.5.1. Zidovudine azidothymidine | 13 |
| 1.5.2. DDI ή didanosine | 14 |
| 1.5.3. DDC ή zalcitabine | 15 |
| 1.5.4. Τριφθοριοθυμιδίνη..... | 15 |
| 1.6. Τροποποιημένα νουκλεοζιτικά ανάλογα | 16 |
| 1.6.1. Τροποποιημένα νουκλεοζιτικά ανάλογα με πενταμελή δακτύλιο | 16 |
| 1.6.2. Τροποποιημένα νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξαμελή δακτύλιο | 18 |
| 2. Ειδικό μέρος..... | 20 |
| 2.1. Στόχος-σκοπός μελέτης | 20 |
| 2.2. Μεθοδολογία σύνθεσης..... | 22 |
| 3. Σύνθεση κετο-φθορο-θειο-ξυλοπυρανονουκλεοζιτικού αναλόγου θυμίνης | 24 |
| 3.1. Γενικές μέθοδοι..... | 24 |
| 3.1.1. Χρωματογραφία χάρτου..... | 24 |
| 3.1.2. Χρωματογραφία στήλης..... | 24 |
| 3.1.3. Ξήρανση διαλυτών..... | 24 |
| 3.1.4. Ταυτοποίηση ενώσεων..... | 25 |
| 4. Πειραματική διαδικασία | 25 |
| 5. Ταυτοποίηση με H^1 NMR..... | 30 |
| 6. Αποτελέσματα-Συζήτηση | 31 |
| 7. Βιβλιογραφία..... | 34 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι μια από τις τέσσερις κύριες κατηγορίες βιομορίων και υπάρχουν σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Αποτελούν μια ομάδα οργανικών ενώσεων που απαντώνται ευρέως στην φύση και έχουν ως γενικό χημικό τύπο την μορφή $C_n(H_2O)_n$. Η βιολογική σημασία αυτών των μορίων είναι μεγάλη, διότι μπορούν να αποτελέσουν δομικά στοιχεία των κυττάρων, πηγή ενέργειας, όπως επίσης και μέρος άλλων μακρομορίων, όπως γλυκοπρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα.

Κάποιοι υδατάνθρακες μπορεί να είναι μικροί με μοριακά βάρη μικρότερα του 100 ενώ άλλοι μπορεί να είναι μεγάλα μακρομόρια με μοριακό βάρος πολλές εκατοντάδες ή χιλιάδες. Οι δομικές μονάδες όλων των υδατανθράκων είναι σάκχαρα και οι υδατάνθρακες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάσει του αριθμού μορίων σακχάρων που συνδέονται σε ένα μόριο τους. Ο παρακάτω πίνακας δείχνει τους κύριους τύπους διαιτητικών υδατανθράκων.

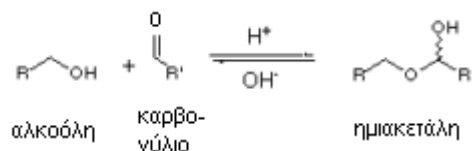
| ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΩΝ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ | |
|---|--|
| Μονοσακχαρίτες | Γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη |
| Δισακχαρίτες | σουκρόζη, λακτόζη, μαλτόζη |
| Πολυόλες | ισομαλτιτόλη, σορβιτόλη, μαλτιτόλη |
| Ολιγοσακχαρίτες | μαλτοδεξτρίνες, φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες |
| Πολυσακχαρίτες | Άμυλο: Αμυλόζη, αμυλοπηκτίνη |
| Πολυσακχαρίτες | Μη αμυλούχοι: Κυτταρίνη, πηκτίνες, υδροκολλοειδή |

Οι μονοσακχαρίτες, οι απλούστεροι υδατάνθρακες, είναι αλδεύδες ή κετόνες με δύο ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Απλοί μονοσακχαρίτες με τέσσερα, πέντε, έξι και επτά άτομα άνθρακα καλούνται τετρόζες, πεντόζες, εξόζες και επτόζες αντίστοιχα.

1.2 Υδατάνθρακες και Σχηματισμός Ημιακετάλης

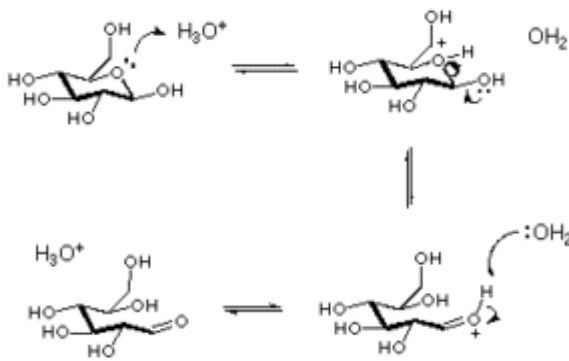
Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν σε δύο μορφές. Την μορφή ανοιχτής αλυσίδας και την κυκλοποιημένη τους μορφή. Ο επικρατέστερος τύπος γλυκόζης και φρουκτόζης (που αποτελούνται από έξι άτομα άνθρακα) σε διάλυμα δεν είναι η ανοικτή αλυσίδα, επειδή οι ανοικτές αλυσίδες των ενώσεων αυτών κυκλοποιούνται σε δακτύλιους ⁽¹⁾. Γενικά, μια καρβονυλική ένωση αντιδρά με μια αλκοόλη για να σχηματίσει μια ημιακετάλη (εικόνα 1).

Σχηματισμός Ημιακετάλης



Η αντίδραση μιας καρβονυλικής ένωσης με μια αλκοόλη έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας ημιακετάλης.

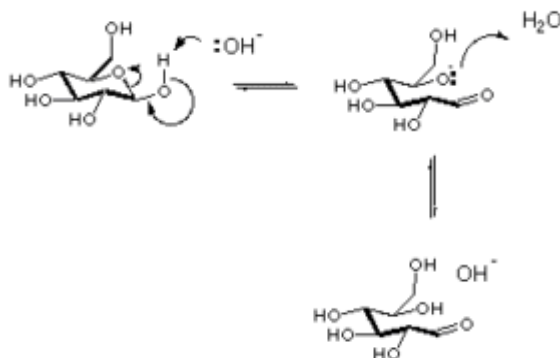
Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης καταλυόμενος από οξύ



Η αντίδραση του σχηματισμού ημιακετάλης είναι μια αμφίδρομη αντίδραση η οποία καταλύεται παρουσία και οξέος (H_3O^+) και βάσης (OH^-).

Ο μηχανισμός σχηματισμού της ημιακετάλης περιλαμβάνει:

Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης καταλυόμενος από βάση



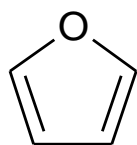
A) Πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου η οποία πολώνει έντονα το καρβονύλιο.

B) Ενεργοποίηση της καρβονυλικής ομάδας για πυρηνόφιλη προσβολή από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου των H_3O^+ ή OH^- .

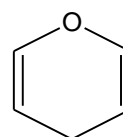
Γ) Απόσπαση ενός πρωτονίου οδηγεί στον σχηματισμό μιας ουδέτερης ημιακετάλης.

Εικόνα 1. Μηχανισμός σχηματισμού Ημιακετάλης

Δυο παραδείγματα αυτής της αντίδρασης είναι η δημιουργία πυρανόζης από την γλυκόζη και η δημιουργία φουρανόζης από την φρουκτόζη. Στην περίπτωση της γλυκόζης, η αλδεϋδική ομάδα του άνθρακα C-1 αντιδρά με το υδροξύλιο που βρίσκεται στην θέση C-5, σχηματίζοντας μια ενδομοριακή ημιακετάλη και στην συνέχεια παράγοντας τον εξαμελή δακτύλιο της πυρανόζης. Στη φρουκτόζη η κετονική ομάδα στον C-2 του τύπου της ανοικτής αλυσίδας είναι σε θέση να αντιδράσει με την υδροξυλική ομάδα του C-5 για να σχηματιστεί μια ενδομοριακή ημιακετάλη. Ο πενταμελής δακτύλιος του σακχάρου καλείται φουρανόζη, λόγω της ομοιότητας του με το φουράνιο (εικόνα 2).



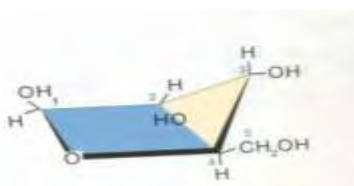
Εικόνα 2. (α) φουράνιο ⁽²⁾



(β) Πυράνιο

Η κυκλοποίηση των σακχάρων μέσω ημιακετάλης είναι μεγάλης σημασίας διότι με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα πρόσθετο στερεογονικό κέντρο στο μόριο και παρουσιάζεται το φαινόμενο της ανωμερείας. Στην περίπτωση της γλυκόζης ο άνθρακας C-1 είναι ανωμερής με αποτέλεσμα να μπορούν να σχηματιστούν δυο στερεοχημικές δομές : η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη .Στην περίπτωση της φρουκτόζης, ο ανωμερής άνθρακας είναι ο C-2. Έτσι, μπορούν να σχηματιστούν δυο δομές η α-D-φρουκτοφουρανόζη και η β-D- φρουκτοφουρανόζη. Ο χαρακτηρισμός α σημαίνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον άνθρακα C-2 βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου, ενώ β σημαίνει ότι βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του.

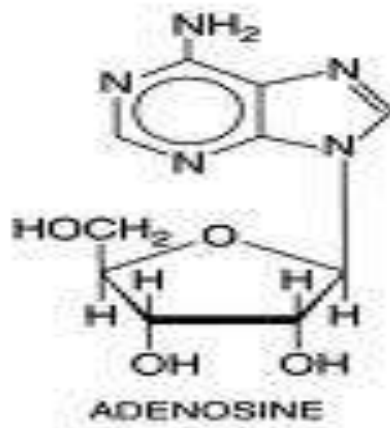
Οι δακτύλιοι της πυρανόζης και της φουρανόζης δεν είναι επίπεδοι στο χώρο αλλά μπορούν να αποκτήσουν διάφορες στερεοδιαμορφώσεις. Μπορούν να είναι πτυχωμένοι έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού (εικόνα 3).



Εικόνα 3. Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης ⁽²⁾

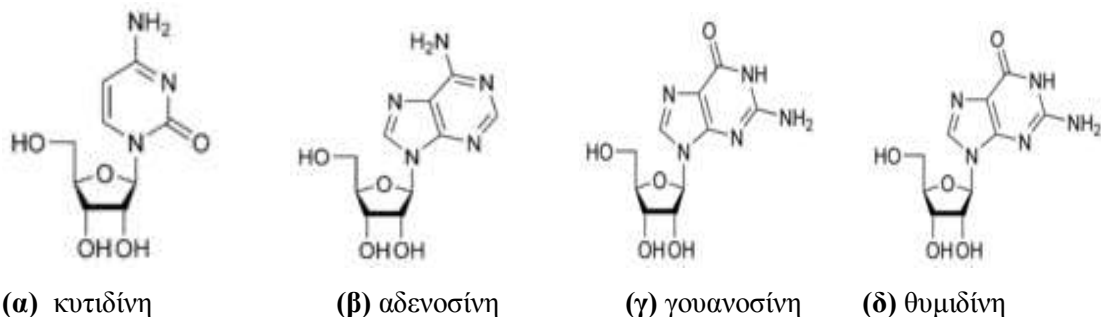
1.3 Νουκλεοζίτες

Είναι οι γλυκοζίτες των πουργινικών βάσεων με ριβόζη ή δεσοξυ-ριβόζη. Δηλαδή, οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες, οι οποίες προκύπτουν από την ένωση μιας εκ των βάσεων (θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, αδερίνη, ουρακίλη) και ενός σακχάρου που μπορεί να είναι είτε ριβόζη είτε δεσοξυριβόζη. Σε κάθε νουκλεοζίτη η αζωτούχος βάση συνδέεται με τον 1' άνθρακα της πεντόζης μέσω ενός N-γλυκοζιτικού δεσμού (εικόνα 4)⁽³⁾.



Εικόνα 4: Η β-στερεοδιάταξη του N-γλυκοζιτικού δεσμού της αδενοσίνης ⁽²⁾

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στην φύση διότι αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Μερικά παραδείγματα τέτοιων ριβονουκλεοζιτών είναι η αδενοσίνη, η γουανοσίνη, η κυτιδίνη και η θυμιδίνη (εικόνα 5). Οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β ⁽²⁾.



Εικόνα 5. Ριβονουκλεοζίτες

1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Οι φυσικοί νουκλεοζίτες συντίθενται εντός των κυττάρων αλλά είναι δυνατόν, να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Η παραπάνω ιδιότητα επιτρέπει το σχεδιασμό και τη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα διατηρούν χαρακτηριστικά των φυσικών μορίων αλλά είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε, όταν εισέλθουν στο κύτταρο και μεταβολιστούν να μπορούν να παρέμβουν στην σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και έτσι να ασκήσουν κυτταροστατική, αντιική ή και αντιδιαβητική δράση ⁽⁴⁾.

Η αναγνώριση των αντικαρκινικών, των αντιικών και των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των νουκλεοζιτών αποτελεί αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν ως αντιικοί παράγοντες επηρεάζοντας τους μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών.

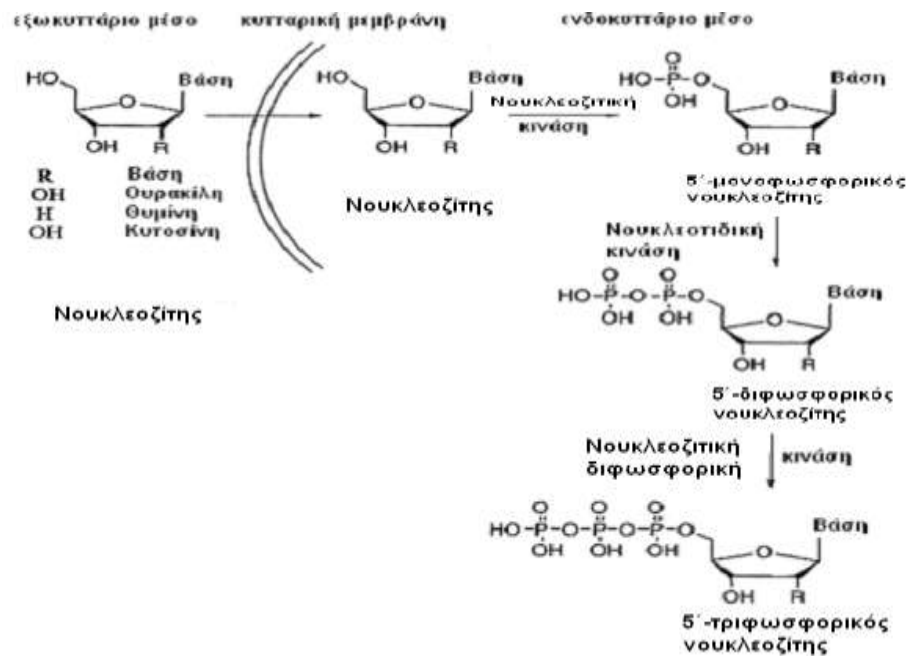
Όλες οι φαρμακευτικές ουσίες ασκούν την δράση τους αλληλεπιδρώντας με κάποιο μοριακό στόχο. Πρώτα από όλα το φάρμακο πρέπει να μπορεί να έρθει σε επαφή με το μοριακό στόχο του. Οι μοριακοί στόχοι των φαρμάκων ποικίλουν, δηλαδή μπορεί να είναι υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων, μόρια μεταφορείς, διάλυτοι ιόντων, ένζυμα, πυρηνικοί υποδοχείς και άλλοι πολλοί ⁽⁵⁾. Σε περίπτωση που ο μοριακός στόχος του φαρμάκου είναι ενδοκυτταρικός πρέπει το φάρμακο να μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου για να είναι δραστικό.

Τα ανάλογα νουκλεοζιτών αποτελούν προφάρμακα. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να τροποποιηθούν ενδοκυτταρικά έτσι ώστε να μπορέσουν να δράσουν. Η τροποποίηση που υφίστανται είναι η φωσφορυλίωση της 5'-θέσης του σακχάρου από ειδικές κυτταρικές κινάσες. Η φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτών τους μετατρέπει σε νουκλεοτίδια, τα οποία είναι μοριακοί δομικοί λίθοι του DNA και του RNA ⁽⁶⁾.

Τα φωσφορυλιωμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη σε αντίθεση με τα μη φωσφορυλιωμένα τα οποία εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες-μεταφορείς νουκλεοζιτών. Έπειτα φωσφορυλιώνονται προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και αφού γίνουν ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό πολλαπλασιασμό, ή

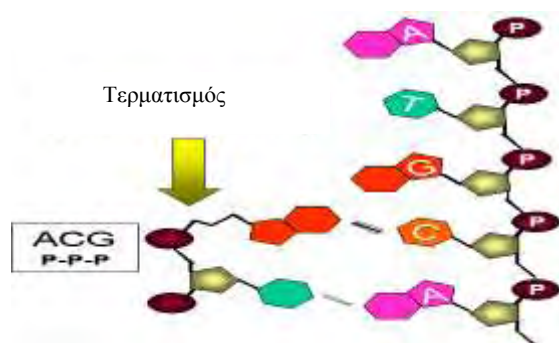
προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA.

Η πρώτη 5'- φωσφορυλίωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων καταλύεται από μία νουκλεοζιτική κινάση που κωδικοποιείται από το κύτταρο-ξενιστή ή τον ιό που μολύνει το κύτταρο-ξενιστή. Η μετατροπή του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη προς τις αντίστοιχες 5'-διφωσφορικές και τριφωσφορικές δομές πραγματοποιείται από νουκλεοτιδικές κινάσες και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντίστοιχα (εικόνα 6). Επομένως, τόσο οι κυτταρικές όσο και οι ιικές κινάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό και την αντιγραφή των κυττάρων και των ιών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση των φωσφορυλιωμένων νουκλεοτιδίων ανάλογων κυρίως στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό. Τα τμήματα των νουκλεϊκών οξέων διαμορφώνονται από τις κυτταρικές πολυμεράσες, οι οποίες συνδέουν το 5'-P- νουκλεοτίδιο στην 3'-υδροξυλομάδα ενός άλλου νουκλεοτιδίου. Κατά τη διαδικασία αυτή απελευθερώνεται μια πυροφωσφορική ομάδα (PPi), έτσι τα δυο σάκχαρα συνδέονται με φωσφοδιεστερική γέφυρα. ⁽⁷⁾



Εικόνα 6. Τροποποίηση των νουκλεοζιτικών αναλόγων προς την ενεργή τους μορφή μέσω ενδοκυτταρικής φωσφορυλίωσης.

Το σάκχαρο χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τις κινάσες και τις πολυμεράσες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την επιμήκυνση των αλυσίδων. Εάν ένα νουκλεοτιδικό ανάλογο δεν έχει μια 3'-υδροξυλομάδα, δεν μπορεί να ενωθεί με την 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της επιμήκυνσης της αλυσίδας (εικόνα 7).



Εικόνα 7. Τερματισμός αλυσίδας

Οι νουκλεοζίτες μπορούν να ενεργήσουν με διαφορετικούς μηχανισμούς: μπορούν να αναστείλουν τη δράση βασικών ενζύμων στο μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων ή/και μπορούν να ενσωματωθούν στα πρόσφατα συντεθειμένα νουκλεϊκά οξέα προκαλώντας τον τερματισμό των αλυσίδων ή την παραγωγή μη λειτουργικών βιομορίων.

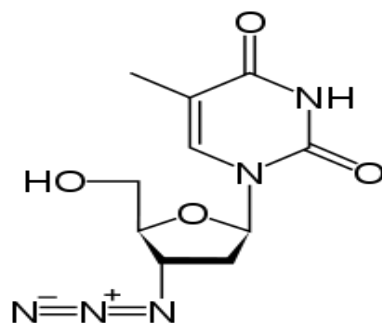
Το πιο κοινό αποτέλεσμα των παραπάνω ενεργειών είναι ο κυτταρικός θάνατος, ο οποίος μπορεί να είναι επιθυμητός όσον αφορά τη θεραπεία του καρκίνου και των αυτοάνοσων νοσημάτων. Επιπλέον, οι ενώσεις που μπορούν να στοχεύσουν επιλεκτικά στα βακτηριακά ή στα προερχόμενα από ιό ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιβακτηριακοί ή αντιϊκοί παράγοντες.

1.5 Νουκλεοζιτικά Ανάλογα

Μερικά από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι τα εξής: το Zidovudine azidothymidine (AZT), το Didanosine (DDI), το Zalcitabine (DDC) και η τριφθοριοθυμιδίνη. Αυτά τα νουκλεοζιτικά ανάλογα διαθέτουν για σάκχαρο μία πεντόζη.

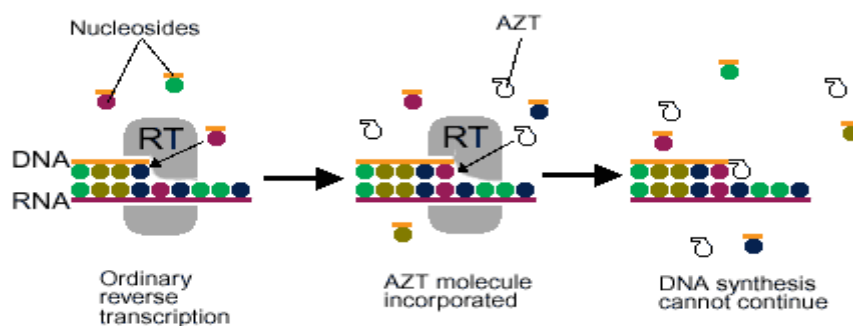
1.5.1 Zidovudine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine)

Το Zidovudine ή AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine (εικόνα 8) αποτελεί ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο που είναι παρεμποδιστής της αντίστροφης μεταγραφάσης. Είναι ανάλογο της θυμιδίνης και χορηγείται για την θεραπεία του AIDS δηλαδή της μόλυνσης από τον ιό της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1. Το AZT μάλιστα χορηγείται είτε από το στόμα είτε σε ενέσιμη

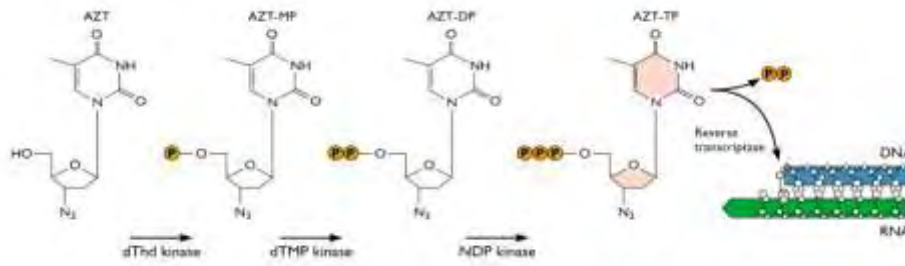


Εικόνα 8. Η χημική δομή του AZT ⁽⁸⁾

μορφή. Το φάρμακο αυτό αναστέλλοντας την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού, εμποδίζει την σύνθεση RNA και κατ' επέκταση DNA και τον πολλαπλασιασμό των ιών (Εικόνα 9). Τα κυτταρικά ένζυμα μετατρέπουν το Zidovudine σε ενεργή μορφή 5'-τριφωσφορικού άλατος (εικόνα 10 και 11).

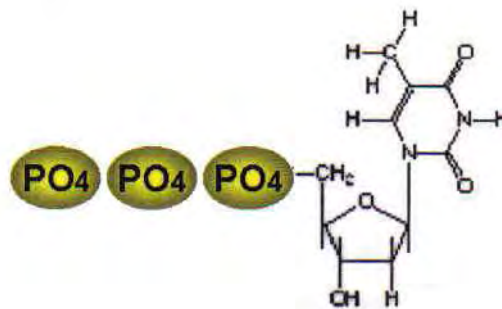


Εικόνα 9. Τρόπος δράσης του AZT



Εικόνα 10. Απουσία του 3'-υδροξυλίου στο zidovudine με αποτέλεσμα τον τερματισμό της αλυσίδας του DNA

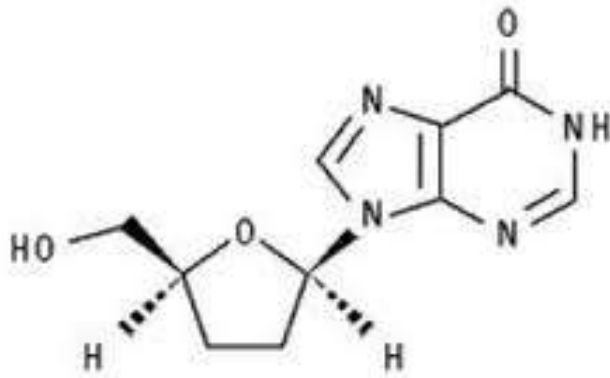
Ο τερματισμός της αλυσίδας του DNA, είναι αποτέλεσμα της απουσίας της ομάδας του 3'-υδροξυλίου στο zidovudine, το οποίο καθιστά αδύνατη τη σύνδεση άλλων νουκλεοτιδίων.



Εικόνα 11. Ενεργή μορφή του AZT. Στη θυμιδίνη προστίθενται τρία φωσφορικά οξέα. Το ένα προστίθεται από το ικό ένζυμο και τα υπόλοιπα δύο από τα κυτταρικά ένζυμα.⁽⁹⁾

1.5.2 DDI ή Didanosine

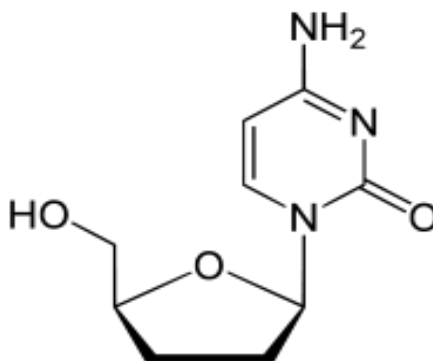
Το DDI (εικόνα 12) αποτελεί ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο με αντική δράση, αναστέλλοντας την αντιγραφή των ρετροϊών όπως του HIV. Η δράση του είναι ανάλογη του AZT, δηλαδή παρεμποδίζει τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης.⁽¹⁰⁾



Εικόνα 12. Χημική δομή του DDI ⁽¹⁰⁾

1.5.3 DDC ή zalcitabine

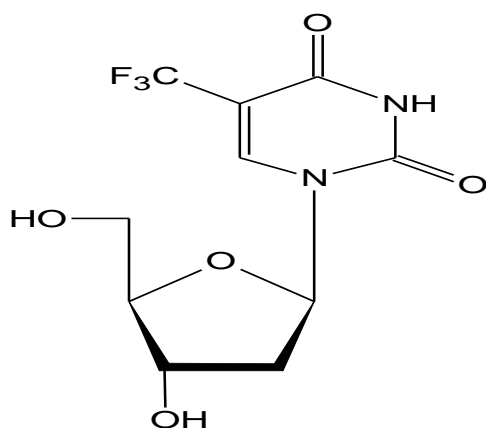
Το DDC ή διδεοξυκυτιδίνη (εικόνα 13) έχει παρόμοια δράση με το AZT και αποτελεί νουκλεοζιτικό ανάλογο που δρα ενάντια στον HIV. Δηλαδή χρησιμοποιείται ως αντιρετροϊκό φάρμακο. ⁽¹¹⁾



Εικόνα 13. Χημική δομή του DDC ⁽¹¹⁾

1.5.4 Τριφθοριοθυμιδίνη

Η τριφθοριοθυμιδίνη (εικόνα 14) είναι ένα φθοριωμένο ανάλογο θυμιδίνης, το οποίο ενεργοποιείται από κυτταρικά ένζυμα ύστερα από φωσφορλίωση σχηματίζοντας ένα τριφωσφορλιωμένο παράγωγο.



Εικόνα 14. Χημική δομή Τριφθοριοθυμιδίνης ⁽¹¹⁾

Το ενεργοποιημένο παράγωγο αναστέλλει τον ιό απλού έρπητα (HSV : Herpes Simplex Virus). Προκαλεί αναστολή της θυμιδικής συνθετάσης και της ιικής (και κυτταρικής) DNA πολυμεράσης και ενσωματώνεται στο DNA του ιού και του κυττάρου, προκαλώντας διαταραχή στη δομή του DNA. Προκλινικές μελέτες δείχνουν πως είναι μεταλλαξιγόνος ⁽¹¹⁾.

1.6 Τροποποιημένα νουκλεοζιτικά ανάλογα

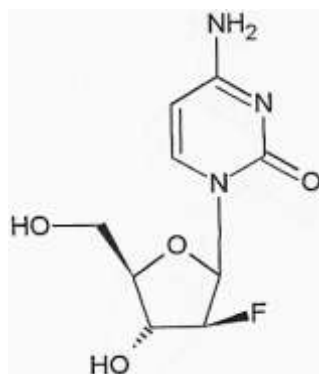
Πολλές έρευνες σχετικά με την ανάπτυξη φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, επικεντρώθηκαν στη χρήση τροποποιημένων νουκλεοζιτικών αναλόγων. Πρόκειται για μόρια τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στα πεδία δράσης της βιοχημείας, ιατρικής και της φαρμακολογίας.

1.6.1 Τροποποιημένα νουκλεοζιτικά ανάλογα με πενταμελή δακτύλιο

Φθοροφουρανόζες-φθορονουκλεοζίτες

Οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντική και αντικαρκινική χημειοθεραπεία. Μάλιστα προκύπτουν από την εισαγωγή ενός φθορίου στο τμήμα του πενταμελούς υδατανθρακικού σκελετού του σακχάρου ⁽¹²⁾. Η παρουσία του φθορίου προσδίδει σταθερότητα στο μόριο, αυξάνει την ηλεκτραρνητικότητα του, το λιπόφιλο χαρακτήρα του διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η αποτελεσματικότητά του ως φάρμακο.

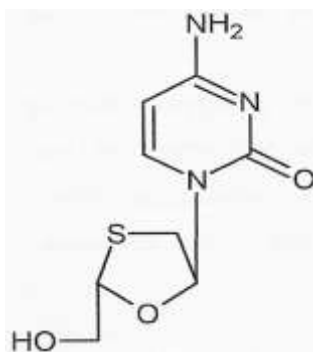
Πρόσφατα, φθοριωμένοι νουκλεοζίτες βρέθηκαν να είναι αποτελεσματικοί σε περιπτώσεις λευχαιμίας αλλά και καρκινωμάτων, όπως το καρκίνωμα του κόλον καθώς και του ήπατος. Ανάλογο παράδειγμα αποτελεί η ένωση 1-(2'-δεοξυ-2'-φθορο-β-D-αραβινοφουρανόζυλο) νουκλεοζίτης της κυτοσίνης (FAC) (εικόνα 15) η οποία διαπιστώθηκε ότι έχει ανασταλτική δράση σε μια σειρά κυττάρων λευχαιμίας καθώς και σε μια σειρά κυττάρων καρκινώματος του παχέος εντέρου ⁽¹³⁾ .



Εικόνα 15 1-(2'-δεοξυ-2'-φθορο-β-D-αραβινοφουρανόζυλ) κυτοσίνη, FAC ⁽¹³⁾

Θειοφουρανόζες-θειονουκλεοζίτες

Οι θειονουκλεοζίτες αποτελούν μια νέα και σημαντική κατηγορία αντιαϊκών και αντικαρκινικών παραγόντων. Σήμερα, ένας 4-θειονουκλεοζίτης, η 3TC (Lamivudine ⁽¹⁴⁾) είναι ένα αντί-HIV φάρμακο όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) ως ανασταλτικός παράγοντας του ενζύμου της αντίστροφης τρανσκριπτάσης, με την ίδια δράση όπως και το AZT. Επειδή η 3TC έχει την L-διαμόρφωση της πεντοφουρανόζης, ποικίλα ανάλογα πεντοφουρανόζης έχουν συντεθεί και εξεταστεί για αντιαϊκές και άλλες βιολογικές ιδιότητες.



Εικόνα 16 3TC, 2'-3'-dideoxy-3'-thiacytidine

Προηγούμενες έρευνες έδειξαν ότι ανάμεσα σε ποικίλους 5'-αλκυλοθειονουκλεοζίτες, η 5'-αιθυλο-5'-δεοξυθυμιδίνη είναι ένας μη ανταγωνιστικός αναστολέας της κυτταροπλασματικής κινάσης της θυμιδίνης (C-TK), του απαραίτητου “προάγγελου” στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ενδιαφέρουσα όμως είναι και η δράση του αναλόγου αυτού σε L1210 κύτταρα λευχαιμίας.

1.6.2 Τροποποιημένα νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξαμελή δακτύλιο (πυρανονουκλεοζίτες)

Οι έρευνες έχουν στραφεί στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντικής δράσης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη (πυρανονουκλεοζίτες).

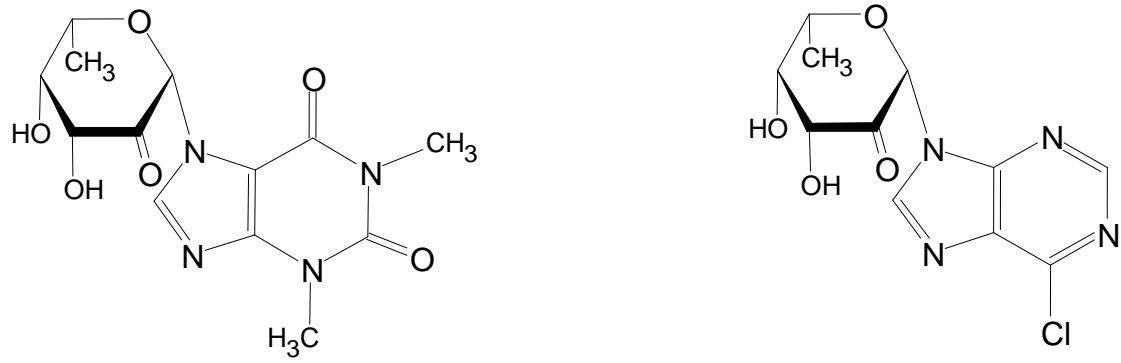
Το ενδιαφέρον των επιστημόνων στράφηκε προς τους πυρανονουκλεοζίτες επειδή μελέτες έδειξαν ότι το μόριο του εξαμελούς δακτυλίου έχει μεγαλύτερη σταθερότητα λόγω της απουσίας τάσεων και έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής δηλαδή μεγαλύτερο χρόνο δράσης ^(15,16).

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η έρευνα για την ανακάλυψη αντικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών αναλόγων με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είχε μείνει αρκετά βήματα πίσω σε σχέση με αυτή των βιολογικών ενεργών νουκλεοζιτών με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίους. Παρόλα αυτά, νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντικές, αντικαρκινικές και αντιβιοτικές τους ιδιότητες.

Κετοπυρανονουκλεοζίτες

Αποτελούν μια κατηγορία νουκλεοζιτών με τροποποιημένο εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο οι οποίοι διαθέτουν ευρύ φάσμα αντικαρκινικών και αντικών ιδιοτήτων. Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες φέρουν στο σάκχαρό τους μια κετονομάδα, ως αποτέλεσμα της οξειδωσης ενός ασύμμετρου ατόμου άνθρακα. Τα συγκεκριμένα μόρια έχουν το πλεονέκτημα ότι οδηγούν σε σύνθετους νουκλεοζίτες μεγάλου βιολογικού ενδιαφέροντος. Οι κετοπυρανονουκλεοζίτες παρουσιάζουν

επίσης και συνθετικό ενδιαφέρον γιατί με πυρηνόφιλη προσθήκη, μπορούν να προστεθούν αμινοομάδες στο σάκχαρό τους ή διακλαδισμένες αλυσίδες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα κετοπυρανονουκλεοζιτών αποτελούν οι παρακάτω ενώσεις (εικόνα 17).



Εικόνα 17. Κετοπυρανονουκλεοζίτες

2.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Στόχος-σκοπός μελέτης

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση και η μελέτη τροποποιημένων νουκλεοζιτών της θυμίνης με σκοπό την εύρεση νέων αντικαρκινικών, αντιικών φαρμάκων με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα από τα μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενα.

Έρευνες των τελευταίων ετών έχουν δείξει ότι:

- Η εισαγωγή ενός ατόμου φθορίου στο σάκχαρο των νουκλεοζιτών μεταβάλλει με διάφορους τρόπους τη βιολογική δραστηριότητα των διαφόρων κυττάρων και ενζύμων. Η αντικατάσταση του υδρογόνου με φθόριο ενισχύει τη βιολογική δραστηριότητα και αυξάνει τη χημική ή μεταβολική σταθερότητα για τους εξής λόγους:
 - Έχει μικρή Wan der Waals ακτίνα (1.35 Å) που μοιάζει πολύ με την ακτίνα του υδρογόνου (1.20 Å).
 - Η αυξημένη σταθερότητα και η μεγαλύτερη ισχύς του δεσμού άνθρακα-φθορίου αναστέλλει τον μεταβολισμό με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημιζωής του μορίου.
 - Η μεγάλη ηλεκτραρνητικότητα του, ενισχύει τις ιδιότητες του μορίου.
 - Αυξάνει το λιπόφιλο χαρακτήρα του μορίου διευκολύνοντας έτσι τη διαπερατότητά του διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.
- Τα κετοπυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στους κετοακόμεστους νουκλεοζίτες, που συντέθηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ^(17,18,19,20), έδειξαν ότι η ύπαρξη ενός πρωτοταγούς ελεύθερου υδροξυλίου στο σάκχαρο του νουκλεοζίτη δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνιση αντικαρκινικής και αντιικής δράσης. Αντίθετα, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που φέρουν μία προστατευτική ομάδα στην 6'-θέση του σακχάρου, εμφανίστηκαν να είναι πιο αποτελεσματικοί αντικαρκινικοί και αντιικοί παράγοντες.

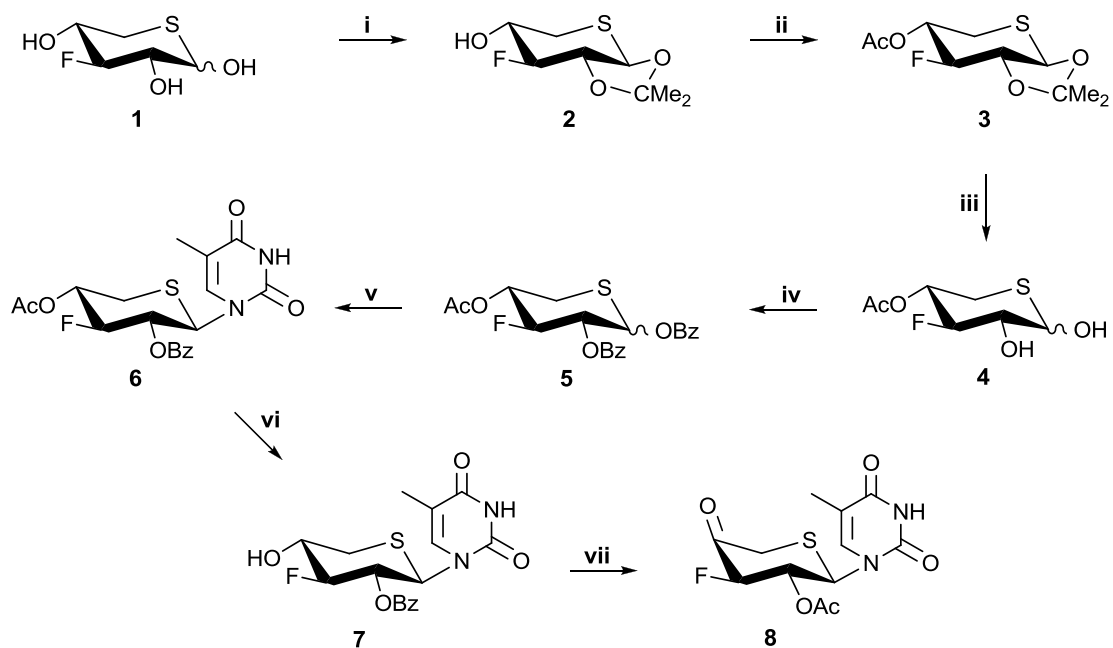
➤ Η εισαγωγή ενός ατόμου θείου στον δακτύλιο του σακχάρου ενός νουκλεοζίτη αλλάζει σημαντικά τη διαμόρφωση του μορίου, τη χημική του δραστηριότητα, τον μοριακό εντοπισμό του από πρωτεΐνες καθώς και τη μεταβολική του σταθερότητα. Η αντικατάσταση του οξυγόνου με θείο έχει διαπιστωθεί ότι προσδίδει ιδιαίτερες χημικές ιδιότητες στο μόριο και αλλάζει τη βιολογική δραστηριότητα για τους εξής λόγους:

- Είναι μεγαλύτερο σαν άτομο από το οξυγόνο και πιο πολώσιμο.
- Ο δεσμός άνθρακα-θείου είναι πιο μακρύτες [C-S 1.82 Å (0.182 nm) C-O 1.43 Å (0.143 nm)], πιο ασθενής καθώς και λιγότερο πολικός από αυτόν του άνθρακα-οξυγόνου.
- Η γωνία C-S-C (95-100 °) είναι πιο έντονη από αυτή του C-O-C.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω στοιχεία, θεωρήθηκε σημαντική η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών συνδυάζοντας έτσι τη δράση των δύο ατόμων του φθορίου, του θείου αλλά και της κετονομάδας. Συγκεκριμένα, η τάξη των νέων αυτών νουκλεοζιτών που θα έχει ως σάκχαρο εξαμελή δακτύλιο, θα φέρει ως ετεροκυκλική βάση την θυμίνη, φθόριο στη θέση 3', θείο στη θέση 5' εντός του δακτυλίου του σακχάρου και κετονομάδα στη θέση 4' του σακχάρου.

2.2. Μεθοδολογία σύνθεσης

Το πρώτο βήμα της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει την σύνθεση της 1,2-O-ισοπροπυλιδενο-3-δεοξυ-3-φθορο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζης (**2**) από την 5-φθορο-5-ξυλοπυρανόζη (**1**) με την προσθήκη 2,2-διμεθοξυπροπανίου, DMF και p-TsOH. Η ένωση 3-φθορο-5-θειο-ξυλοπυρανόζη (**1**) έχει ήδη συντεθεί στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας από την υποψήφια διδάκτορα Ευαγγελία Τσουκαλά. Στη συνέχεια στην ένωση **2** προστίθεται άνυδρη πυριδίνη και οξικός ανυδρίτης (Ac_2O) με αποτέλεσμα τη σύνθεση της 1,2-O-ισοπροπυλιδενο-4-ακετυλο-3-δεοξυ-3-φθορο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζης (**3**). Το προϊόν **3** κατεργάζεται έπειτα με διάλυμα τριφθοροξικού οξέος (TFA) σε μεθανόλη. Εν συνεχεία, η μεθανόλη απομακρύνεται υπό υψηλό κενό ώστε να απομακρυνθούν και τα τελευταία ίχνη TFA. Έτσι λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν 3-δεοξυ-3-φθορο-4-O-ακετυλο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζη (**4**) υπό τη μορφή κίτρινου παχύρρευστου ελαίου. Έπειτα σε διάλυμα της ένωσης **4** σε άνυδη πυριδίνη προστίθεται BzCl με αποτέλεσμα τη σύνθεση της 1,2-δι-O-βενζουλο-4-O-ακετυλο-3-δεοξυ-3-φθορο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζης (**5**). Στη συνέχεια πραγματοποιείται σύζευξη της σιλυλιωμένης θυμίνης με την 1,2-δι-O-βενζουλο-4-O-ακετυλο-3-δεοξυ-3-φθορο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζη (**5**) παρουσία χλωριούχου κασσίτερου. Έτσι παράγεται η 1-(2'-O-βενζουλο-4'-O-ακετυλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-5'-θειο-D-ξυλοπυρανοζυλο)θυμίνη (**6**) σε μορφή λευκού αφρώδους στερεού. Το προϊόν **6** διαλύεται σε EtOH-πυριδίνη ενώ προστίθεται και NaOH. Το προϊόν που λαμβάνεται είναι η 1-(2'-O-βενζουλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-5'-θειο-D-ξυλοπυρανοζυλο)θυμίνη (**7**). Μίγμα από την ένωση **7**, PDC και Ac_2O σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο θερμαίνεται με κάθετο ψυκτήρα με αποτέλεσμα την παραγωγή του νουκλεοζίτη 1-(2'-O-ακετυλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-β-D-ξυλοπυρανοζυλο-4'-ουλοζο)θυμίνης, το οποίο έχει τη μορφή αφρώδους στερεού.



Σχήμα 1. (i) 2,2-διμεθοξυπροπανίου/ *p*-TsOH/ DMF; (ii) Ac₂O/ πυριδίνη; (iii) 90% TFA (iv) BzCl/ πυριδίνη; (v) Συλιλιωμένη θυμίνη, CH₃CN, χλωριούχος κασσίτερος; (vi) NaOH/ EtOH-πυριδίνη; (vii) PDC/ Ac₂O/ CH₂Cl₂.

3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ 4-ΚΕΤΟΑΚΟΡΕΣΤΟΥ-3-ΦΘΟΡΟ-5-ΘΕΙΟ-ΕΥΛΟΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΤΗΣ ΘΥΜΙΝΗΣ

3.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΟΥ (TLC: Thin Layer Chromatography)

Οι αντιδράσεις ελέγχονται με χρωματογραφία χάρτου, με πλάκες Silica gel (Merck Kieseilel 60F250). Γενικά, τα χρωματογραφήματα εμφανίζονται με ψεκασμό με διάλυμα H₂SO₄ (θεικού οξέος) 30%. Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής :

- Διάλυμα Α: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 60 / 40
- Διάλυμα Β: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 40 / 60
- Διάλυμα Γ: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 70 / 30

3.1.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Η χρωματογραφία στήλης, επιτεύχθηκε με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση σε silica gel (Merck grade) (flash chromatography) και οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω:

Διάλυμα Α: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 60 / 40

Διάλυμα Β: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 40 / 60

Διάλυμα Γ: Οξικός αιθυλεστέρας / Εξάνιο 70 / 30

3.1.3 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

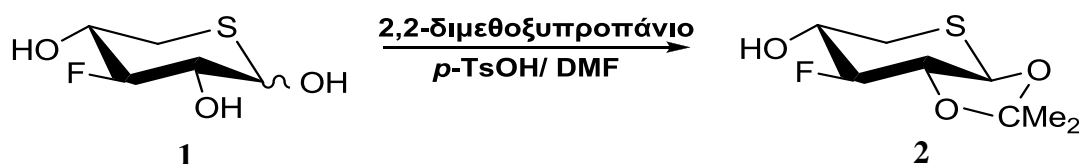
Χρησιμοποιούνται άνυδροι διαλύτες ακετονιτρίλιο (CH₃CN), πυριδίνη, DMSO, *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και τετραϋδροφουράνιο (THF). Η ξήρανση του CH₃CN γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με reflux overnight. Στη συνέχεια γίνεται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το DMF φυλάσσεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å, καθώς και η πυριδίνη σε σφαιρίδια KOH (pellets).

3.1.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ

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

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

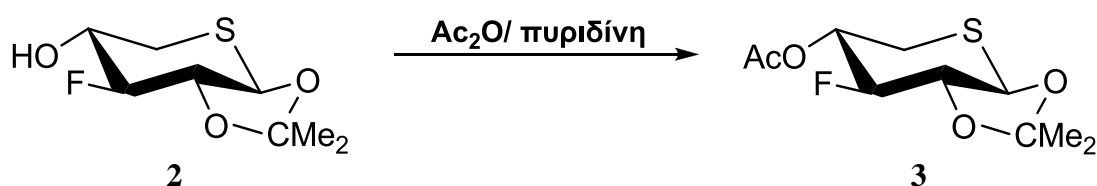
Σύνθεση της 1,2-*O*-ισοπροπυλιδενο-3-δεοξυ-3-φθορο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζης (2)



1.31 g του προϊόντος **1** (7.79 mmol) διαλύθηκαν σε ένα μίγμα αποτελούμενο από 31.15 mL 2,2-διμεθοξυπροπανίου και 98.5 mL άνυδρο DMF. Σε αυτό το διάλυμα προστέθηκε *p*-TsOH (29 mg, 1.56 mmol) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για μία νύχτα. Το μίγμα της αντίδρασης εξουδετερώθηκε με τριαιθυλαμίνη έτσι ώστε το pH να μην υπερβεί το 7. Στη συνέχεια από το μίγμα απομακρύνθηκαν οι χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα οξικός αιθυλεστέρας-εξάνιο (60:40) και το επιθυμητό προϊόν **2** (1.13 g) ελήφθη υπό τη μορφή κίτρινου παχύρευστου ελαίου.

Απόδοση = 70%, $R_F=0,35$

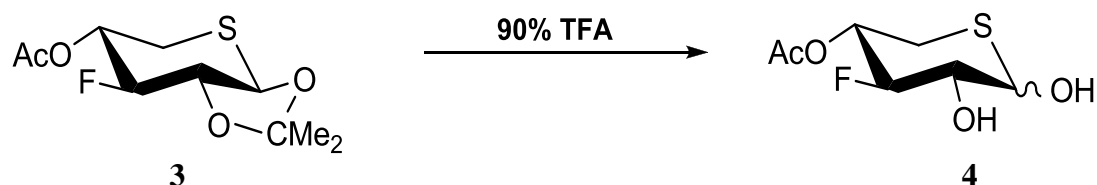
Σύνθεση της 1,2-*O*-ισοπροπυλιδενο-4-*O*-ακετυλο-3-δεοξυ-3-φθορο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζης (3)



Σε διάλυμα της ένωσης **2** (1,13 g, 5,45 mmol) σε άνυδρη πυριδίνη (27 mL) προστέθηκε Ac₂O (0,46 mL, 4,9 mmol) και το προκύπτον μίγμα αφέθηκε υπό συνεχή ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκε μεθανόλη (0,2 mL) για να ανακόψει την αντίδραση και οι διαλύτες απομακρύνθηκαν υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα οξικός αιθυλεστέρας-εξάνιο (40:60) και το επιθυμητό προϊόν **3** (1,21 g) ελήφθη υπό τη μορφή κίτρινου παχύρευστου ελαίου.

Απόδοση = 89%, R_F=0,30

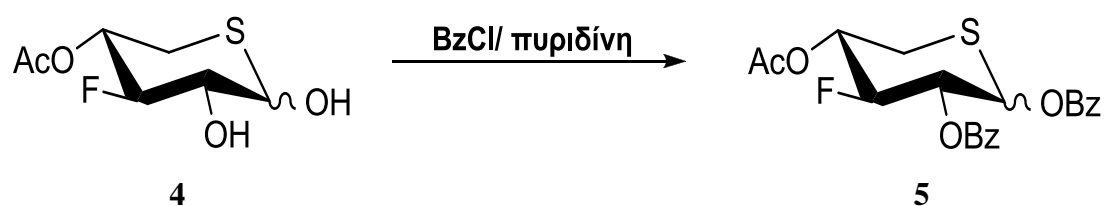
Σύνθεση της 3-δεοξυ-3-φθορο-4-Ο-ακετυλο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζης (**4**)



Το προϊόν **3** (1,21 g, 4,85 mmol), που λήφθηκε από την προηγούμενη αντίδραση, διαλύθηκε σε 24,2 mL 90% TFA σε μεθανόλη. Το διάλυμα αναδεύτηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια απομακρύνθηκε η μεθανόλη υπό υψηλό κενό ώστε να απομακρυνθούν και τα ίχνη του TFA. Έπειτα ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα οξικός αιθυλεστέρας-εξάνιο (70:30) και το επιθυμητό προϊόν **4** (0,92 g) ελήφθη υπό τη μορφή κίτρινου παχύρευστου ελαίου.

Απόδοση = 90%, R_F=0,20

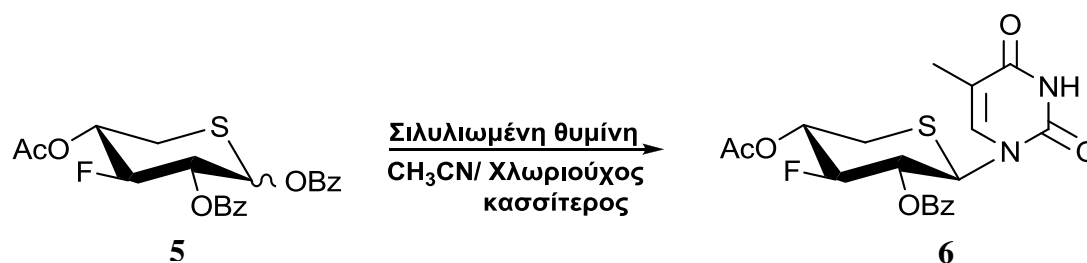
Σύνθεση της 1,2-δι-Ο-βενζοΐλο-4-Ο-ακετυλο-3-δεοξυ-3-φθορο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζης (**5**)



Σε διάλυμα της ένωσης **4** (0,92 g, 4,36 mmol) σε άνυδρη πυριδίνη (16 mL), προστέθηκε BzCl (1,27 mL, 10,9 mmol). Το μίγμα αφέθηκε υπό συνεχή ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια απομακρύνθηκε ο διαλύτης υπό κενό. Ο καθαρισμός του υπολείμματος που ακολούθησε, πραγματοποιήθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα οξικός αιθυλεστέρας-εξάνιο (40:60) και το επιθυμητό προϊόν **5** (1,51 g) ελήφθη υπό τη μορφή κίτρινου παχύρευστου ελαίου.

Απόδοση = 83%, $R_F=0,35$

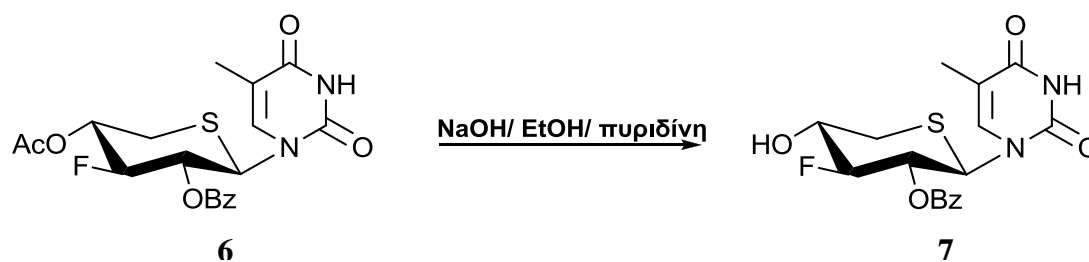
Σύνθεση της 1'-(2'-O-βενζοϋλο-4'-O-ακετυλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-5'-θειο-D-ξυλοπυρανόζυλο)θυμίνης (6**)**



Ένα διάλυμα της θυμίνης (0,63 g, 5,05 mmol), του HMDS (1,5 mL, 6,26 mmol) και της σακχαρίνης (0,04 g, 0,23 mmol) σε άνυδρο CH_3CN (18 mL), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 30 λεπτά και αφότου το μίγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 1,2-δι-O-βενζοϋλο-4-O-ακετυλο-3-δεοξυ-3-φθορο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζη (**5**) (1,51 g, 3,61 mmol) καθώς και ο χλωριούχος κασσίτερος (0,59 mL, 5,05 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες (TLC) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 110°C . Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 , αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (500 mL) και εκχυλίστηκε μία φορά με νερό (1 x 10 mL). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα οξικός αιθυλεστέρας-εξάνιο (60:40). Το επιθυμητό προϊόν **6** (1,04 g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού.

Απόδοση = 68%, $R_F=0,30$

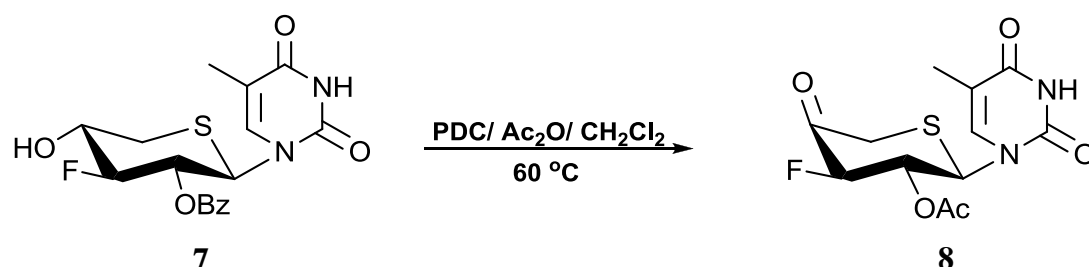
Σύνθεση της 1-(2'-*O*-βενζοΐλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-5'-θειο-*D*-ξυλοπυρανόζυλο)θυμίνης (7)



Το προϊόν **6** (1,04 g, 2,46 mmol) διαλύθηκε σε EtOH-πυριδίνη (25 + 7,4 mL), NaOH 2M (4,9 mL) προστέθηκε και το μίγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά στους 0 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε ρητίνη Amberlite IR-120 (H⁺) για να εξουδετερώσει τη βάση. Το διάλυμα διηθήθηκε, η ρητίνη πλύθηκε με EtOH και πυριδίνη (50 + 50 mL) και από το διήθημα απομακρύνθηκαν οι διαλύτες υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα κατεργάστηκε με διχλωρομεθάνιο (2 x 15 mL) και διηθήθηκε. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα οξικός αιθυλεστέρας-εξάνιο (70:30). Το επιθυμητό προϊόν **7** (0,54 g) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού.

Απόδοση = 58%, R_F=0,30

Σύνθεση της 1-(2'-*O*-ακετυλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-*β*-*D*-ξυλοπυρανόζυλο-4'-ουλοζο)θυμίνης (8)

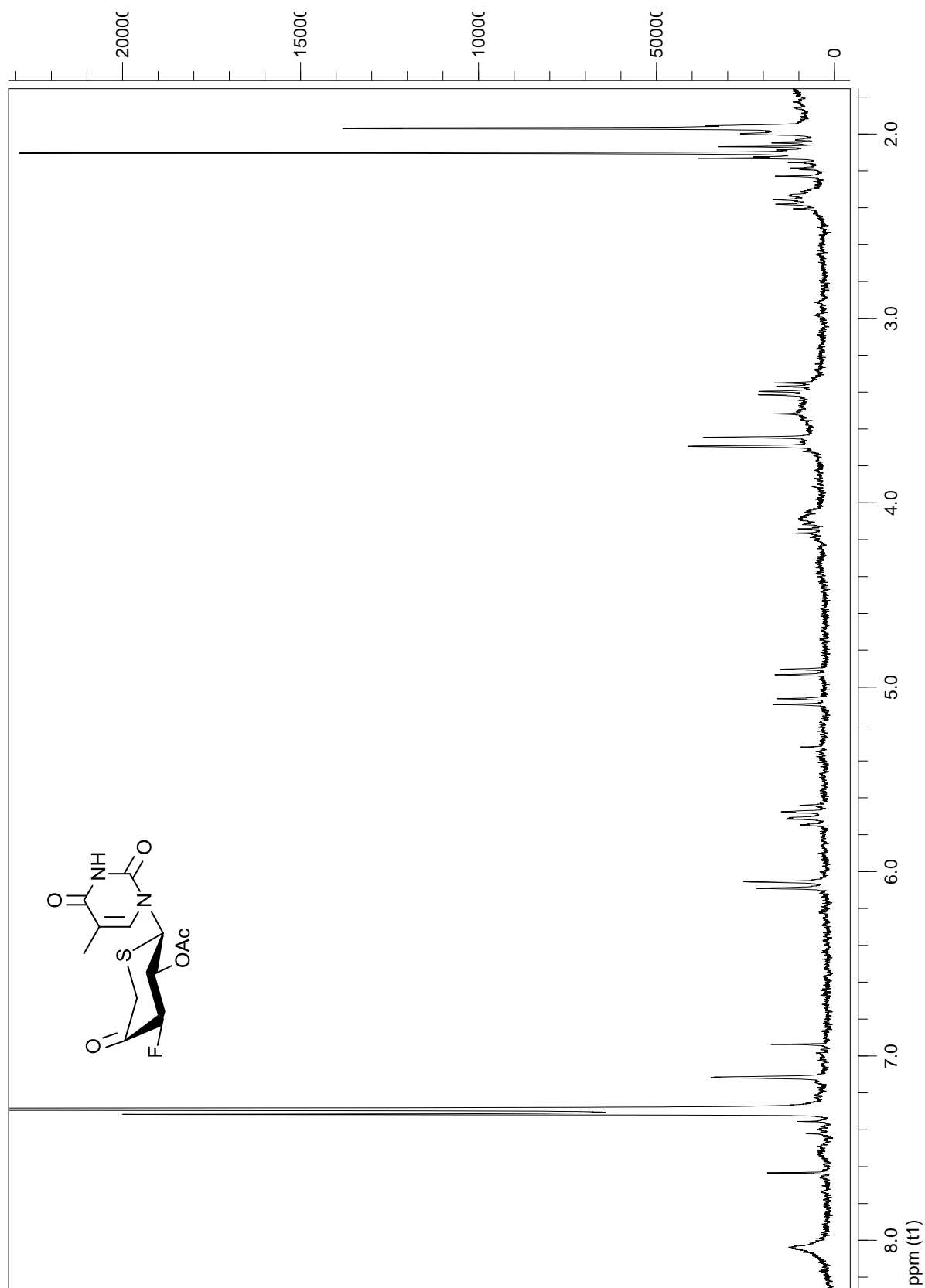


Ένα μίγμα αποτελούμενο από την ένωση **7** (0,54 g, 1,42 mmol), από PDC (0,80 g, 2,13 mmol) και από Ac₂O (0,67 mL, 7,1 mmol) σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα στους 60 °C για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της αντίδρασης στο μίγμα προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας (1.6 mL) και το προκύπτον παχύρρευστο διάλυμα μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel).

Πραγματοποιήθηκε έκλουση με οξικό αιθυλεστέρα και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα που περιείχε Ac_2O αραιώθηκε με τολουόλιο και στη συνέχεια με απόσταξη εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα οξικός αιθυλεστέρας-εξάνιο (60:40) και το επιθυμητό προϊόν **8** (0,22 g) ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού.

Απόδοση = 50%, $R_F=0,25$

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ H^1 NMR



6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης φθορο-θειο-κετονουκλεοζιτών με πιθανή αντιική και αντικαρκινική δράση. Παρατηρήθηκε ότι με μια σχετικά εύκολη πειραματική διαδικασία με μικρά και σύντομα βήματα, είναι δυνατή η σύνθεση του φθορο-θειο-κετονουκλεοζιτικού αναλόγου της θυμίνης. Οι τελικές αποδόσεις της σύνθεσης του τελικού φθορο-θειο-κετονουκλεοζίτη είναι αρκετά καλές. Συγκεκριμένα, η σύνθεση της 1,2-*O*-ισοπροπυλιδενο-3-δεοξυ-3-φθορο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζης (**2**) είχε απόδοση 70%, της 1,2-*O*-ισοπροπυλιδενο-4-*O*-ακετυλο-3-δεοξυ-3-φθορο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζης (**3**) είχε απόδοση 89%, της 3-δεοξυ-3-φθορο-4-*O*-ακετυλο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζης (**4**) είχε απόδοση 90%, της 1,2-δι-*O*-βενζοϋλο-4-*O*-ακετυλο-3-δεοξυ-3-φθορο-5-θειο-D-ξυλοπυρανόζης (**5**) είχε απόδοση 83%, της 1'-(2'-*O*-βενζοϋλο-4'-*O*-ακετυλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-5'-θειο-D-ξυλοπυρανόζυλο)θυμίνης (**6**) είχε απόδοση 68%, της 1-(2'-*O*-βενζοϋλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-5'-θειο-D-ξυλοπυρανόζυλο)θυμίνης (**7**) είχε απόδοση 68% και της 1-(2'-*O*-ακετυλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-β-*D*-ξυλοπυρανοζυλο-4'-ουλοζο)θυμίνης (**8**) είχε απόδοση 50%.

Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού H^1 NMR. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός όλες οι ενδιάμεσες ενώσεις δεν εμφανίζουν ισχυρή απορρόφηση στο φάσμα υπερύθρου (IR) στα 1697 cm^{-1} (S-acetyl group). Η απουσία της χαρακτηριστικής αυτής κορυφής αποδεικνύει την συνεχή ύπαρξη δακτυλίου εξόζης.

Η σύνθεση και η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των τροποποιημένων νουκλεοζιτών με θυμίνη για ετεροκυκλική βάση, φθόριο στη θέση 3' του σακχάρου, θείο στη θέση 5' και κετονομάδα στη θέση 4' του σακχάρου είναι σημαντική. Στους νέους φθορο-θειο-κετονουκλεοζίτες πρέπει να γίνουν εντατικές βιολογικές μελέτες για τον προσδιορισμό της πιθανής αντιικής και αντιογκογονικής τους δράσης. Θα πρέπει επίσης να εξεταστούν για τη δυνατότητά τους να παρακινήσουν ανοσοαπάντηση με παρακολούθηση της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων, των μακροφάγων και της έκκρισης των κυτοκινών.

Η ικανότητα αντικατάστασης του υδρογόνου με το φθόριο αλλάζει ελάχιστα τη λειτουργία του νουκλεοζίτη. Το μέγεθος των δύο ατόμων είναι συγκρίσιμο, έχει μικρή Wan der Waals ακτίνα (1.35 Å) όμοια με την ακτίνα του υδρογόνου (1.20 Å), το φθόριο είναι πιο ηλεκτραρνητικό και η σταθερότητα του δεσμού C-F σε σύγκριση με το δεσμό C-H είναι μεγαλύτερη. Αυξάνει το λιπόφιλο χαρακτήρα του μορίου και διευκολύνει έτσι τη διέλευση από τις κυτταρικές μεμβράνες και την αντιμετώπιση ενδοεγκεφαλικών όγκων. Επιπλέον, έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής και έτσι μεγαλύτερο χρόνο δράσης σε σχέση με άλλα ανάλογα νουκλεοζιτών.

Η εισαγωγή του θείου τόσο στον δακτύλιο του σακχάρου όσο και ως υποκαταστάτης κάποιου άνθρακα του δακτυλίου αυξάνει σημαντικά την δραστηριότητα των νουκλεοζιτών. Όπως και το φθόριο, έτσι και το θείο μεταβάλλει τη βιολογική δραστηριότητα ενζύμων των κυττάρων, όπως κινασών και DNA πολυμερασών, μειώνοντας το βαθμό στον οποίο οι νουκλεοζίτες αυτοί χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για τις ανθρώπινες κινάσες και πολυμεράσες.

Η εισαγωγή μίας κετονομάδας στο τμήμα του σακχάρου, ως αποτέλεσμα της οξειδωσης ενός ασύμμετρου ατόμου άνθρακα, οδήγησε σε μία ενδιαφέρουσα τάξη πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων την οποία αποτελούν οι κετο-πυρανονουκλεοζίτες. Παρόλο που τα κετο-παράγωγα των πεντονουκλεοζιτών, στις περισσότερες των περιπτώσεων, αποδείχθηκαν ασταθή, τα κετο-παράγωγα των νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο έδωσαν το έναυσμα για τη μελέτη μιας νέας και ενδιαφέρουσας χημείας. Η διαθεσιμότητα αυτών των μορίων ήταν καθοριστική για τη βιολογική έρευνα, αφού άνοιξε νέους ορίζοντες προς τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των αντιβιοτικών, δεδομένου ότι όπως προαναφέρθηκε, οι κετο-πυρανονουκλεοζίτες αποτελούν απαραίτητα ενδιάμεσα στη βιοσύνθεση πολλών φυσικών νουκλεοζιτικών αντιβιοτικών προϊόντων (Antonakis 1989). Επιπλέον, τα συγκεκριμένα μόρια εμφανίζουν το πλεονέκτημα ότι οδηγούν σε σύνθετους νουκλεοζίτες μεγάλου βιολογικού ενδιαφέροντος. Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί ότι οι κετο-πυρανονουκλεοζίτες αποτελούν συνθόνες σε συνθετικές και βιοσυνθετικές διαδικασίες και επιπλέον ένας σημαντικός αριθμός αυτών εμφανίζει ενδιαφέρουσα αντικαρκινική και αντιακή δράση.

Ένα πετυχημένο αντιβιοτικό φάρμακο πρέπει να δρα με τέτοιο τρόπο με τον οποίο να καταστέλλει την αντιγραφή του ιού στο κύτταρο. Επιπλέον, να μην είναι τοξικό ή καρκινογόνο, να μην προκαλεί αλλεργίες, τερατογένεση και μεταλλάξεις.

Η ανακάλυψη των αντιικών φαρμάκων έφερε εις πέρας τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Ωστόσο, η χρήση τους μπορεί να έχει δυσμενή αποτελέσματα. Ένα μεγάλο μέρος της τοξικότητας των ανάλογων νουκλεοζιτών, συσχετίζεται άμεσα με το βαθμό στον οποίο οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για τις ανθρώπινες κινάσες και πολυμεράσες. Μερικοί από τους πρώτους αντιικούς παράγοντες χαρακτηρίστηκαν από ακραία φαινόμενα εμφάνισης τοξικότητας, και χρησιμοποιούνται αυτή την περίοδο μόνο τοπικά. Οι περισσότεροι νουκλεοζίτες που χρησιμοποιούνται, παρουσιάζουν ήπια συμπτώματα όπως ναυτία, διάρροια, ίλιγγο, υπνηλία. Υπάρχει μια πιθανότητα τα ανάλογα νουκλεοζιτών να μπορούν να ενσωματωθούν στο ανθρώπινο DNA, ή να εξασθενίσουν τη φυσιολογική αντιγραφή του DNA, γι' αυτό πολλές από αυτές τις ενώσεις είναι πιθανό να προκαλέσουν καρκινογόνα αποτελέσματα.

Τα φάρμακα βελτιώνουν την ποιότητα ζωής εκατομμυρίων ανθρώπων και προλαμβάνουν την ασθένεια στην παγκόσμια κλίμακα. Υπολογίζεται ότι τα φάρμακα έχουν προσθέσει 3-5 χρόνια στο μέσο όριο του προσδόκιμου ορίου επιβίωσης και έχουν επιφέρει την επανάσταση στη θεραπεία πολλών διαφορετικών νόσων. Όμως, οι σύγχρονοι φαρμακολόγοι αντιμετωπίζουν την επίκτητη ανάγκη εύρεσης νέων φαρμάκων για τη θεραπεία ασθενειών που θέτουν σε μεγάλο κίνδυνο την υγεία, όπως ο καρκίνος.

Επιπλέον, αν και υπάρχουν αποτελεσματικά θεραπευτικά μέσα για ορισμένους μολυσματικούς οργανισμούς, η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών είναι διαρκής. Επομένως, είναι και διαρκής η ανάγκη για την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων φαρμάκων έναντι των λοιμώξεων.

Η σύνθεση και βιολογική αποτίμηση αυτής της νέας τάξης φθορο-θειο-κετονουκλεοζιτών είναι πιθανόν να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων εξειδικευμένων θεραπευτικών ενώσεων.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. John McMurry, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2000 : 151-152, 905.
2. Lubert Stryer, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997:347-354.
3. Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1997: 4, 26.
4. Vander, M. D. Sherman, Ph. D. Luciano, Ph. D. M. Tsakoulos, Φυσιολογία του ανθρώπου, μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού.
5. Chong Y., Gumina G., Mathew JS., Schinazi RF, Chu CK, 1-2,3-Didehydro-2,3-dideoxy-3-fluoronucleosides: synthesis, anti- HIV activity, chemical and enzymatic stability, and mechanism of resistance, *Med. Chem.*, **2003**, 46 (15), 3245-56.
6. Benjamin Lewin, Genes VIII:6- 8
7. Christopher J. Burns, Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Hepatitis C Virus (HCV), *Cur. Med. Chem. Anti-Infective Agents*, **2005**, 4 (2).
8. <http://www.pathmicro.med.sc.edu/lecture/chemo.html>
9. <http://www.answers.com/topic/ddi>
10. Thibaudeau C., Plavec J., Chattopadhyaya J., A New Generalized Karplus-Type Equation Relating Vicinal Proton- Fluorine Coupling Constants to H-C-C-F Torsion Angles, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 4967-4982.
11. Miura, S. ; Yosimura, Y. ; Endo, M. ; Machida, H. ; Matsuda, A. ; Tanaka, M. ; Sasaki, Antitumor activity of a novel orally effective nucleoside, 1-(2-deoxy-2-fluoro-4-thio-β-D-arabino5-FUranosyl)cytosine, *Cancer Lett.* **1998**, 129, 103-110.
12. Tsoukala, E.; Manta, S.; Tzioumaki, N.; Agelis, G.; Komiotis, D. *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 1099-1103.
13. <http://www.answers.com/topic/lamivudine>
14. Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* **2000**, 39, 12757-12765.
15. 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, 4343-4353.

16. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 980-987.
17. Manta, S.; Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Panagiotopoulou, A.; Pelecanou, M.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4764–4771.
18. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 420-428.
19. Tsoukala, E.; Agelis, G.; Dolinsek, J.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3241-3247.
20. Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Kiritsis, C.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *38*, 48-55.