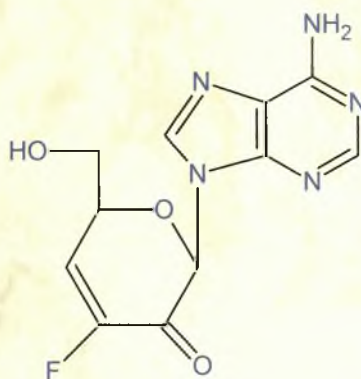


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΤΑΞΗΣ
ΦΘΟΡΟΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΑΝΤΙ-ΙΚΗ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ**



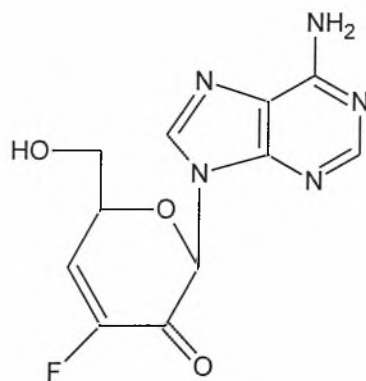
ΜΑΝΩΛΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΤΑΞΗΣ
ΦΘΟΡΟΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΑΝΤΙ-ΙΚΗ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ**



ΜΑΝΩΛΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4654/1
Ημερ. Εισ.: 2-11-2005
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2005
ΜΑΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

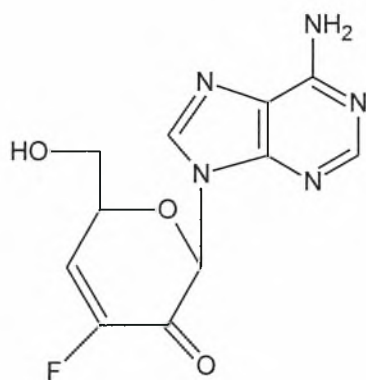


004000087869

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΤΑΞΗΣ
ΦΘΟΡΟΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΑΝΤΙ-ΙΚΗ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ**



ΜΑΝΩΛΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΚΟΜΙΩΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ - ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΑΓΓΕΛΗΣ ΓΙΩΡΓΟΣ – ΠΔ 407

ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ - ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Στη μετάφραση χρησιμοποιήθηκαν οι όροι και οι ονομασίες όπως έχουν αποδοθεί σε σχετικά πανεπιστημιακά βιβλία.

Ευχαριστώ θερμά τον επίκουρο καθηγητή κ. Κομιώτη Δημήτρη για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου, τον Π.Δ 407 κ. Αγγελή Γιώργο, τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, καθώς επίσης και την υποψήφια διδάκτωρ κα. Μαντά Στέλλα για το ενδιαφέρον και την καθοδήγησή τους σε όλο το διάστημα της εργασίας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι υδατάνθρακες αποτελούν μια από τις τέσσερις κύριες κατηγορίες βιομορίων και απαντούν σε κάθε ζωντανό οργανισμό. Οι υδατάνθρακες είναι αλδεϋδικές ή 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.

Τα τροποποιημένα νουκλεοσίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντική και αντικαρκινική χημειοθεραπεία. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοσίδια συνδεδεμένα με ολιγοσακχαρίτες, όπως είναι τα αμινονουκλεοσίδια και τα κετονουκλεοσίδια.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον δόθηκε στη μελέτη φθορονουκλεοσιδίων προκειμένου να βρεθούν νέα αντικαρκινικά, αντικά, ή αντι-HIV φάρμακα με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα έναντι των έως τώρα χρησιμοποιούμενων ενώσεων. Η προσθήκη φθορίου στο μόριο του σακχάρου αποδείχθηκε να είναι μια καλή μέθοδος ενίσχυσης της βιολογικής δράσης.

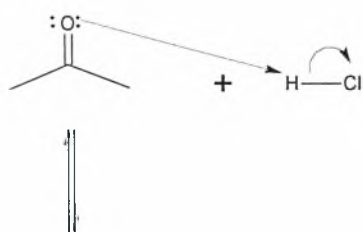
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	Εισαγωγή.....	7
1.1	Υδατάνθρακες.....	7
1.2	Νουκλεοσιδικά ανάλογα.....	11
1.2.1	Zidovudine ή azidothymidine.....	11
1.2.2	Lamivudine ή 3TC.....	12
1.2.3	DDI ή didanosine.....	13
1.2.4	DDC ή zalcitabine.....	13
1.2.5	Τριφθοριοθυμιδίνη.....	14
1.2.6	Αμινογλυκοσίδια.....	15
1.2.7	Κετονουκλεοσίδια.....	16
1.2.8	Φθορονουκλεοσίδια.....	17
1.3	Τρόπος δράσης νουκλεοσιδίων.....	18
2	Ειδικό Μέρος / Σκοπός – Στόχος.....	21
3	Σύνθεση φθορονουκλεοσιδίων.....	25
3.1	Γενικές μέθοδοι.....	25
3.1.1	Χρωματογραφία χάρτου.....	25
3.1.2	Χρωματογραφία στήλης.....	25
3.1.3	Ξήρανση διαλυτών.....	25
3.1.4	Ταυτοποίηση ενώσεων.....	25
4	Πειραματική διαδικασία.....	26
4.1	Σύνθεση 3'-deoxy-3'-fluoro-D-glucose (β).....	26
4.2	Σύνθεση 3'-fluoro-1',2',4',6'-tetra-O-acetyl-glucopyranose (γ).....	27
4.3	Σύνθεση 1'-N ⁶ -benzoyladenine-3'-fluoro-2',4',6'-tri-O-acetyl-glucopyranose (δ).....	27
5	Ταυτοποίηση με NMR.....	29
6	Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	30
7	Βιβλιογραφία.....	33

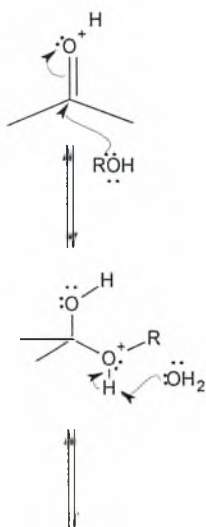
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι αλδεϋδικές ή κετονικές ενώσεις με πολλαπλές υδροξυλικές ομάδες. Τα σάκχαρα με πέντε άτομα άνθρακα καλούνται πεντόζες και με έξι άτομα άνθρακα καλούνται εξόζες. Ο επικρατέστερος τύπος γλυκόζης και φρουκτόζης (αποτελούνται από έξι άτομα άνθρακα) σε διάλυμα δεν είναι η ανοικτή αλυσίδα. Οι ανοικτές αλυσίδες των ενώσεων αυτών κυκλοποιούνται σε δακτύλιους. Γενικά, μια καρβονυλική ένωση αντιδρά με μια αλκοόλη για να σχηματίσει μια ημιακετάλη (εικόνα 1).



Η πρωτονυλίωση του καρβονυλικού οξυγόνου πολώνει έντονα το καρβονύλιο και ...

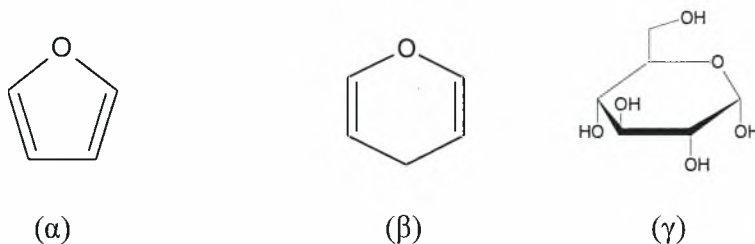


... Ενεργοποιεί την καρβονυλική ομάδα για πυρηνόφιλη προσβολή από το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου της αλκοόλης

Απόσπαση ενός πρωτονίου οδηγεί σε ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, μια ουδέτερη ημιακετάλη

Εικόνα 1. Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης ⁽¹⁰⁾

Στη γλυκόζη για παράδειγμα, η C-1 αλδεϋδική ομάδα του τύπου ανοικτής αλυσίδας της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο του C-5 για να σχηματίσει μια ενδομοριακή ημιακετάλη. Ο εξαμελής δακτύλιος του σακχάρου που παράγεται, καλείται πυρανόζη, λόγω της ομοιότητάς του με το πυράνιο (εικόνα 2β).



Εικόνα 2. (α) Φουράνιο, (β) Πυράνιο (γ) γλυκόζη ⁽⁹⁾

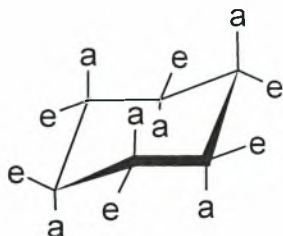
Η κετονική ομάδα στον C-2 του τύπου της ανοικτής αλυσίδας της φρουκτόζης είναι σε θέση να αντιδράσει με την υδροξυλική ομάδα του C-5 για να σχηματίσει μια ενδομοριακή ημιακετάλη. Ο πενταμελής δακτύλιος του σακχάρου καλείται φουρανόζη, λόγω της ομοιότητας του με το φουράνιο (εικόνα 2α).

Κατά την κυκλοποίηση της γλυκόζης δημιουργείται ένα πρόσθετο ασύμμετρο κέντρο. Ο άνθρακας C-1, ο καρβονυλικός άνθρακας στην ανοικτή αλυσίδα, μετατρέπεται σε ένα ασύμμετρο κέντρο στο δακτύλιο. Μπορεί να προκύψουν δύο δομές. Η α -D-γλυκοπυρανόζη και η β -D-γλυκοπυρανόζη. Ο χαρακτηρισμός α σημαίνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου, ενώ β σημαίνει ότι βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου. Ο άνθρακας C-1 καλείται ανωμερής και έτσι οι μορφές α και β καλούνται ανωμερείς.

Η ίδια ονοματολογία εφαρμόζεται και στον φουρανοζικό δακτύλιο της φρουκτόζης, με τη διαφορά ότι τα α και β αναφέρονται στο υδροξύλιο που είναι ενωμένο στον άνθρακα C-2, που είναι ανωμερής. Η φρουκτόζη είναι δυνατόν να δημιουργήσει και δακτυλίους πυρανόζης.

Ο εξαμελής δακτύλιος της πυρανόζης 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

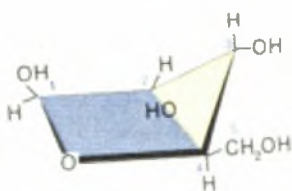
διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνιάς.⁽¹⁰⁾



Εικόνα 3. Μορφή ανάκλιντρου μιας πυρανόζης
(e= ισημερινός υποκαταστάτης, a= αξονικός υποκαταστάτης)⁽¹⁰⁾

Οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου είναι δύο ειδών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί (εικόνα 3). 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 ξεπροβάλλουν από την ίδια πλευρά του δακτυλίου. Αντίθετα, υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για τους ισημερινούς υποκαταστάτες. Έτσι, ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ό τι στην αξονική θέση. Η ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στα αξονικά και ισημερινά διαμορφομερή, οφείλεται στη στερεοχημική τάση που προκαλείται από τις λεγόμενες 1,3-διαξονικές αλληλεπιδράσεις.

Οι δακτύλιοι φουρανόζης, όπως και της πυρανόζης, δεν είναι επίπεδοι. Μπορούν να είναι πτυχωμένοι έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού (εικόνα 4).



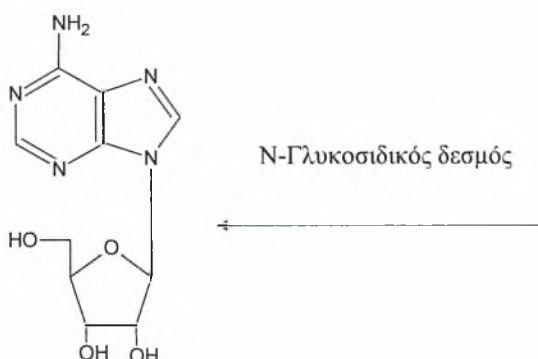
Εικόνα 4. Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης⁽⁹⁾

Αυτή η διαμόρφωση καλείται μορφή φακέλου γιατί η δομή αυτή μοιάζει με ανοιχτό φάκελο με το πίσω μέρος ανασηκωμένο. 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. ⁽¹⁰⁾

Την περίοδο αυτή, οι έρευνες εστιάζονται κυρίως στο σχεδιασμό, τη σύνθεση και την αξιολόγηση μικρών μορίων ως πιθανούς αντικαρκινικούς, αντιβακτηριακούς και αντιαρθρικούς παράγοντες και έδειξαν ότι τα σημαντικότερα αντιαρθρικά φάρμακα είναι τα νουκλεοσίδια και τα ανάλογα νουκλεοσιδίων. ⁽³⁾

Πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιαρθρική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοσίδια συνδεδεμένα με ολιγοσακχαρίτες.

Τα σάκχαρα ενώνονται με τις αμίνες με γλυκοσιδικούς δεσμούς. Ο ανωμερής άνθρακας ενός σακχάρου είναι σε θέση να ενωθεί με το άζωτο μιας αμίνης με ένα *N*-γλυκοσιδικό δεσμό. Το νουκλεοσίδιο, αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης ενωμένη στη θέση 1' μιας πεντόζης με β-*N*-γλυκοσιδικό δεσμό. ⁽²⁾ Ο αποφασιστικής σημασίας παρόμοιος τρόπος γλυκοσιδικής σύνδεσης είναι προφανής σε πολλά βασικά μακρομόρια, όπως νουκλεοτίδια, RNA και DNA. Οι *N*-γλυκοσιδικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β ⁽⁹⁾ (εικόνα 5).



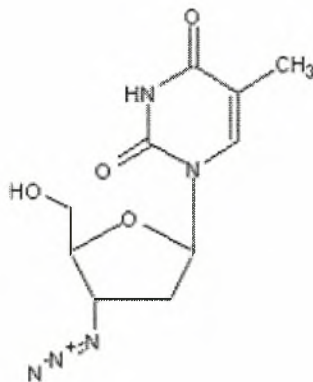
Εικόνα 5. Αδενοσίνη ⁽⁹⁾

1.2 Νουκλεοσιδικά ανάλογα

Οι έρευνες που έγιναν μέχρι σήμερα στη δημιουργία φαρμάκων με αντική και αντικαρκινική δράση, αφορούσαν τη χρήση ανάλογων νουκλεοσιδίων που είχαν για σάκχαρο μια πεντόζη. Ακολούθως, παρατίθενται μερικά από τα αντικά φάρμακα που συντέθηκαν και των οποίων έχει μελετηθεί η δράση.

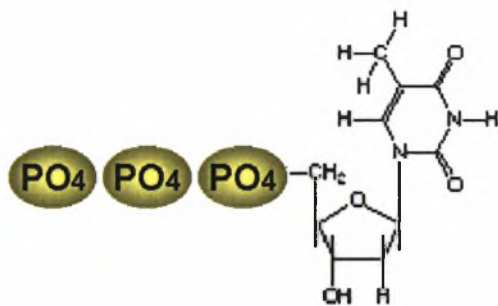
1.2.1 Zidovudine ή azidothymidine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine)

Το Zidovudine (εικόνα 6), αποτελεί ένα στοματικό και ενέσιμο φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία των μολύνσεων με τον ιό της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1). Πρωτοσυντέθηκε από τον Jerome Horowitz το 1964. Ανήκει σε μια κατηγορία φαρμάκων που αποκαλείται αντίστροφοι ανασταλτικοί παράγοντες της τρανσκριπτάσης, που περιλαμβάνει επίσης τα zalcitabine (Hivid), stavudine (Zerit), didanosine (Videx), και lamivudine (Epivir). ⁽¹⁴⁾



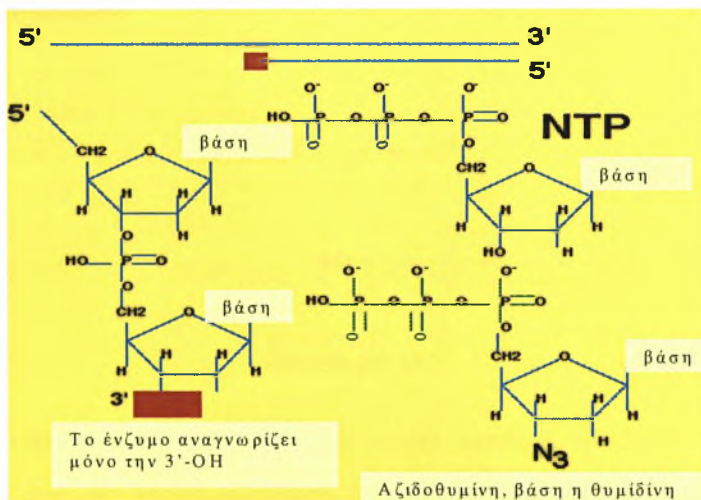
Εικόνα 6. AZT, 3'-Azido-2'-deoxythymidine ⁽¹⁴⁾

Η αντίστροφη τρανσκριπτάση, είναι το ένζυμο που χρησιμοποιεί ο ιός για να συνθέσει το νέο DNA. Το Zidovudine εμποδίζει τη δράση της αντίστροφης τρανσκριπτάσης, την παραγωγή του DNA και κατά συνέπεια και των νέων ιών. Τα κυτταρικά ένζυμα μετατρέπουν το zidovudine στην ενεργή του μορφή, 5'-τριφωσφορικού άλατος (εικόνα 7).



Εικόνα 7. Στη θυμιδίνη προστίθενται τρία φωσφορικά οξέα. Το ένα προστίθεται από το ιικό ένζυμο και τα υπόλοιπα δύο από τα κυτταρικά ένζυμα. ⁽¹⁵⁾

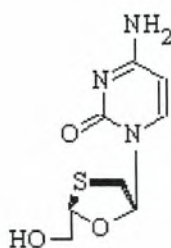
Ο τερματισμός της αλυσίδας του DNA, είναι αποτέλεσμα της απουσίας της ομάδας του 3'-υδροξυλίου στο zidovudine, το οποίο καθιστά αδύνατη τη σύνδεση άλλων νουκλεοτιδίων. Μελέτες έδειξαν ότι ο τερματισμός των αλυσίδων αποτελεί τον παράγοντα της ανασταλτικής επίδρασης ^(15, 16) (εικόνα 8).



Εικόνα 8. Ανάλογα νουκλεοτιδίων στο τερματισμό αλυσίδων ⁽¹⁶⁾

1.2.2 Lamivudine ή 3TC (2'-3'-dideoxy-3'-thiacytidine)

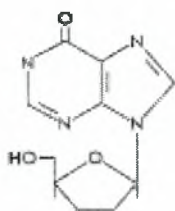
Το 3TC (εικόνα 9) είναι επίσης γνωστό ως lamivudine. Είναι ένα νουκλεοσιδικό παράγωγο και είναι ανασταλτικός παράγοντας του ενζύμου της αντίστροφης τρανσκριπτάσης, με την ίδια δράση όπως και το AZT.



Εικόνα 9. 3TC, 2'-3'-dideoxy-3'-thiacytidine ⁽¹⁷⁾

Στην αναζήτηση νέων και αποτελεσματικών φαρμάκων στην κατηγορία των νουκλεοσιδίων, πρόσφατα οι έρευνες εστίασαν στα L-ανάλογα, που χαρακτηρίζονται από αντίθετη διαμόρφωση σε σχέση με τα φυσικά D-νουκλεοσίδια. Το ενδιαφέρον για τα L-νουκλεοσίδια αυξήθηκε από την ανακάλυψη του 3TC. Το 3TC χρησιμοποιείται στη θεραπεία του AIDS και της ηπατίτιδας Β. ⁽¹⁷⁾

1.2.3 DDI ή didanosine

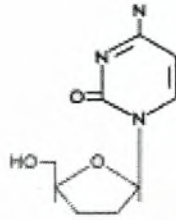


Εικόνα 10. DDI ⁽¹⁸⁾

Το DDI (εικόνα 10), αποτελεί ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο με αντική δράση, αναστέλλοντας την αντιγραφή των ρετροϊών όπως του HIV, παρεμποδίζοντας τη δράση του ενζύμου της αντίστροφης τρανσκριπτάσης. ⁽¹⁹⁾

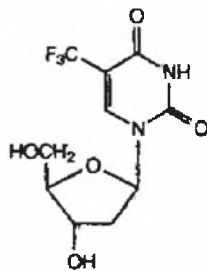
1.2.4 DDC ή zalcitabine

Το DDC ή διδεοξυκυτιδίνη (εικόνα 11), έχει παρόμοια δράση με το AZT και αποτελεί νουκλεοσιδικό ανάλογο που δρα ενάντια στον HIV. ⁽¹⁹⁾



Εικόνα 11. DDC ⁽¹⁹⁾

1.2.5 Τριφθοριοθυμιδίνη



Εικόνα 12. Τριφθοριοθυμιδίνη ⁽¹⁹⁾

Η τριφθοριοθυμιδίνη (εικόνα 12), ενσωματώνεται στο ιικό και το κυτταρικό DNA, σχηματίζοντας ένα παραποιημένο DNA. Η τριφθοριοθυμιδίνη, είναι ένα φθοριωμένο ανάλογο θυμιδίνης. Ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση από κυτταρικά ένζυμα, σχηματίζοντας ένα τριφωσφορυλιωμένο παράγωγο. 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 μεταλλαξιογόνος και τερατογόνος. ⁽¹⁹⁾

Η χρήση των νουκλεοσιδικών ανάλογων με σάκχαρο μια πεντόζη, έδειξε ότι έχουν μικρό χρόνο ημιζωής και ότι η δράση τους είναι λιγότερο αποτελεσματική απ' ότι τα νουκλεοσιδικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη. Έτσι στράφηκε το ενδιαφέρον στη μελέτη της αντικής δράσης των νουκλεοσιδίων που έχουν για σάκχαρο μια εξόζη.

Έρευνες έδειξαν ότι το μόριο του εξαμελούς δακτυλίου έχει μεγαλύτερη σταθερότητα λόγω της απουσίας τάσεων όπως εξηγείται και παραπάνω (διαμόρφωση ανάκλιντρου), έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής και κατά συνέπεια και χρόνο δράσης. Η

ικανότητά του μορίου να διαμορφώνεται με τέτοιο τρόπο ώστε τα τέσσερα άτομα άνθρακα να βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο μετά από κατάλληλη τροποποίηση του μορίου του σακχάρου (δεοξυ-, αμινοδεοξυ-, ακόρεστο-, κετο-, διακλάδωση-αλυσίδας), τα προσομοιάζει με τις πεντόζες, τα μετατρέπει σε ευέλικτα μόρια και κάνει έτσι εφικτή τη χρήση τους ως συστατικά των RNA και DNA. Ο συνδυασμός των τροποποιήσεων στο μόριο του σακχάρου, έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση αποτελεσματικών φαρμάκων ανάλογων νουκλεοσιδίων με αντική δράση.⁽²⁰⁾

Το ενδιαφέρον σε αυτή τη τάξη των νουκλεοσιδίων αυξήθηκε σημαντικά τα τελευταία χρόνια, ειδικά μετά την απομόνωση και το χαρακτηρισμό των φυσικών νουκλεοσιδικών αντιβιοτικών που ήδη υπάρχουν και περιλαμβάνουν 4-αμινοεξοπυρανόζες και την ανακάλυψη των αξιοσημείωτων χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων των κετονουκλεοσιδίων. In vivo μελέτες επιβεβαίωσαν τη σημαντικότητα των ακόρεστων σε σχέση με τα κορεσμένα κετονουκλεοσίδια στην αναστολή κυτταρικών όγκων. Επιπλέον, δόθηκε έμφαση στη χρήση των νουκλεοσιδικών ανάλογων εξοπυρανόζων ως χημικούς και βιοσυνθετικούς προαγωγείς των φυσικών αντιβιοτικών και άλλων βιολογικών μορίων.⁽²⁰⁾

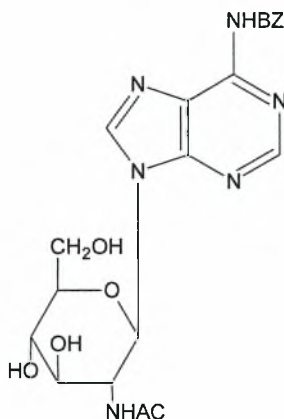
Παρακάτω γίνεται αναφορά σε **νουκλεοσιδικά ανάλογα με σάκχαρο εξόζη**.

1.2.6 Αμινονουκλεοσίδια

Τα αμινονουκλεοσίδια αποτελούν μια τάξη νουκλεοσιδίων που περιέχει μια αμινοομάδα στο τμήμα του σακχάρου, η οποία αντικαθιστά μια υδροξυλική ομάδα. Είτε φυσικά είτε συνθετικά νουκλεοσίδια αμινο-εξοπυρανοζών παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της χημείας και βιοχημείας των νουκλεοσιδίων, για το λόγο ότι αναγνωρίζονται ως δομικά συστατικά πολλών υποστρωμάτων.

Χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση μυκητοβακτηριακών μολύνσεων καθώς και λοιμώξεων από Gram(+) και Gram(-) βακτήρια. Τα θετικώς φορτισμένα αμινονουκλεοσίδια έλκονται από τον αρνητικά φορτισμένο σκελετό του RNA. Οι αλληλεπιδράσεις αμινονουκλεοσιδίων - RNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Επομένως, τα αμινονουκλεοσίδια αναμένεται να έχουν υψηλότερο θεραπευτικό δείκτη, λιγότερες παρενέργειες και τοξικότητα.⁽²⁰⁾

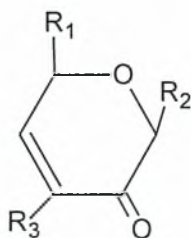
Στην εικόνα 13 φαίνεται το μόριο της 6-βενζυλαμινο-9-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-β-D-γλυκοκυρανοσυλ)-πουρίνης, το οποίο αποτελεί ανάλογο πουρινικών νουκλεοσιδίων και περιέχει 2-ακεταμιδο- ομάδα στο μόριο της εξοπυρανόζης.



Εικόνα 13. 6-βενζυλαμινο-9-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-β-D-γλυκοκυρανοσυλ)πουρίνη ⁽²⁰⁾

1.2.7 Κετονουκλεοσίδια

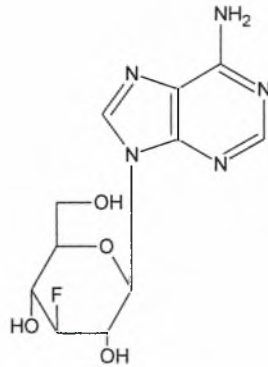
Μια άλλη ομάδα ανάλογων νουκλεοσιδίων είναι τα κετονουκλεοσίδια. (εικόνα 14). Τα κετονουκλεοσίδια αποτελούν μια τάξη νουκλεοσιδίων που περιλαμβάνουν μια κετο-ομάδα στο μόριο του σακχάρου, ως αποτέλεσμα της οξείδωσης του ασύμμετρου ατόμου του άνθρακα. Τα κετονουκλεοσίδια, αποτελούν το κλειδί που μεσολαβεί σε συνθετικές και βιοσυνθετικές διαδικασίες, πολλές από τις οποίες έχουν ως αποτέλεσμα αντιογκογονική δράση. ⁽²⁰⁾



Εικόνα 14. R1= πουρίνη ή πυριμιδίνη
R2= CH₂OH, CH₃
R3= COOCH₃, COOC₆H₅, CH₃SO₃,
C₆H₅SO₃, Cl, Br, H ⁽²⁰⁾

1.2.8 Φθορονουκλεοσίδια

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί η σύνθεση και αξιολόγηση της βιολογικής δράσης μιας νέας σειράς τροποποιημένων νουκλεοσιδίων η οποία θα έχει αδενίνη σαν ετεροκυκλική βάση και φθόριο στη θέση 3' του σακχάρου (εικόνα 15).



Εικόνα 15. 1'-N⁶-βενζουλαδενίνη-3'-φθοριο-γλυκόζη ⁽²⁰⁾

Τα φθοριωμένα νουκλεοσίδια χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιοχημεία, την ιατρική χημεία, και τη φαρμακολογία. Τα φθοριωμένα νουκλεοσίδια υιοθετούνται ευρέως ως πειραματικοί αντικοί και αντιογκογονικοί παράγοντες. ⁽²¹⁾

Η ικανότητα αντικατάστασης του υδρογόνου με το φθόριο αλλάζει ελάχιστα τη λειτουργία του νουκλεοσιδίου, παράλληλα προσδίδει σταθερότητα στο μόριο, αυξάνει την ηλεκτοαρνητικότητα του, το λιπόφιλο χαρακτήρα του και κατά συνέπεια την αποτελεσματικότητά του ως φάρμακο.

1.3 Τρόπος δράσης νουκλεοσιδίων

Η σύνθεση των νουκλεοσιδίων συνήθως πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά. Μπορούν επίσης να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση. Αυτό επιτρέπει στα ανάλογα νουκλεοσιδίων με αντική ή και αντικαρκινική δράση να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. ⁽⁴⁾

Προκειμένου να προκαλέσει κάποια δράση το φάρμακο πρέπει πρώτα να αλληλεπιδράσει με ένα μοριακό στόχο. Ο 'στόχος' για τα περισσότερα φάρμακα είναι μια πρωτεΐνη, ή τα νουκλεϊκά οξέα. ⁽¹⁾

Οι πιο κοινοί τύποι πρωτεϊνών με τους οποίους αλληλεπιδρούν τα φάρμακα είναι οι υποδοχείς, οι διάυλοι ιόντων, τα ένζυμα και τα μόρια μεταφορείς.

Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα αποτελούν μικρά μόρια που αποτελούν σύνθετες ενώσεις, χημικά τροποποιημένες εκδόσεις των φυσικών νουκλεοσιδίων και που στοχεύουν αποτελεσματικά τις ικές πολυμεράσες. Οι ικές πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντικό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντικών φαρμάκων. ^(5,6,7)

Τα φυσικά νουκλεοσιδία τροποποιούνται στα κύτταρα για να παραγάγουν τα νουκλεοτίδια, τα οποία χρησιμοποιούνται από τις πολυμεράσες ως βασικές δομικές μονάδες γενετικού υλικού DNA και RNA. Μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοσιδίων, τα αντικά φάρμακα νουκλεοσιδίων, γενικά ενσωματώνονται στην αντιγραφή των ικών γονιδιωμάτων από τις ικές πολυμεράσες. Αυτό το γεγονός εξασθενίζει τη σύνθεση ή τη λειτουργία του ικού γονιδιώματος που προκύπτει και επομένως καταστέλλει την αντιγραφή του ιού. ⁽⁶⁾

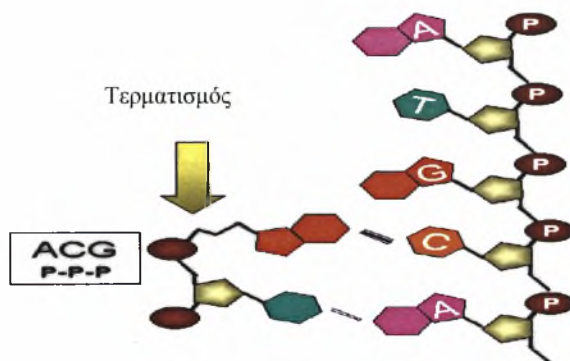
Τα ανάλογα νουκλεοσιδίων στην πραγματικότητα είναι προφάρμακα, δεδομένου ότι πρέπει να φωσφορυλιωθούν στην 5'-θέση του υδατάνθρακα από τις κυτταρικές κινάσες για να μπορέσουν να δράσουν και αυτό είναι και το 'κλειδί' στην επιλεκτικότητά τους.

⁽⁸⁾ Η φωσφορυλίωσή των ανάλογων νουκλεοσιδίων στο κύτταρο, τα ενεργοποιεί και ανταγωνίζονται με τα φυσικά νουκλεοτίδια για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Επειδή η αντιγραφή των νουκλεϊκών οξέων είναι κοινή για όλες τις μορφές ιών, τα ανάλογα νουκλεοσιδίων ενδεχομένως έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντική θεραπεία.

Επειδή οι φωσφορυλιωμένες ενώσεις ιονίζονται συνήθως στο σώμα λόγω του διαφορετικού pH στα διάφορα διαμερίσματα, δεν μεταφέρονται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Οι ενεργές μορφές των νουκλεοσιδίων αποτελούν τριφωσφορικά άλατα, με όλες τις αντικαταστάσεις φωσφορικών στην 5'-θέση από

ειδικές ικές-κινάσες που συχνά καταλύουν τη πρώτη 5'-φωσφορυλίωση των ανάλογων νουκλεοσιδίων, με την επόμενη φωσφορυλίωση από τις κυτταρικές κινάσες. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στη συσσώρευση των ανάλογων φωσφορυλιωμένων νουκλεοτιδίων κυρίως στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί με ιό. Τα τμήματα των νουκλεϊνικών οξέων διαμορφώνονται από τις κυτταρικές πολυμεράσες, οι οποίες συνδέουν το 5'-νουκλεοτίδιο στην ομάδα 3'-υδροξυλίου ενός άλλου νουκλεοτιδίου. Σε αυτή την διαδικασία, απελευθερώνεται πυροφωσφορική ομάδα (PPi), και οι δύο ζάχαρες συνδέονται με φωσφοδιεστερική γέφυρα. ^(9,10,11)

Το σάκχαρο, είναι η μερίδα του νουκλεοσιδίου που χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τις κινάσες και τις πολυμεράσες που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση των νουκλεοτιδίων και την επιμήκυνση των αλυσίδων. Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας (εικόνα 16).



Εικόνα 16. Τερματισμός αλυσίδας ⁽¹⁶⁾

Τα ανάλογα νουκλεοσιδίων αναμένονται να είναι αποτελεσματικά ενάντια στις περισσότερες, εάν όχι σε όλες οι μορφές ιών. ⁽¹⁰⁾ Η ειδικότητά τους έγκειται στο ότι ο ιός μπορεί με το ένζυμο του να ενεργοποιήσει τη δράση του φαρμάκου ή/και στο ότι οι ικές πολυμεράσες μπορεί να είναι πολύ πιο ευαίσθητες στη δράση του φαρμάκου απ' ότι στα αντίστοιχα ένζυμα του κυττάρου ξενιστή. ⁽¹²⁾

Επιπλέον, το ένζυμο του ιού δεν απαιτεί ειδική σύνδεση με το υπάρχον υπόστρωμα, σε αντίθεση με το ένζυμο του κυττάρου ξενιστή. Αυτό σημαίνει ότι το ένζυμο του ιού μπορεί να δρα και σε φάρμακα ανάλογων νουκλεοσιδίων (διαφορετικό υπόστρωμα) και

να τα φωσφορυλιώνει, ενώ το κύτταρο ξενιστή θα τα αφήνει ανεπηρέαστα εφόσον δεν είναι εφικτή η σύνδεση ενζύμου-υποστρώματος.^(12,13)

Οι ιοί μπορούν να αντιμετωπιστούν εκλεκτικά με φάρμακα νουκλεοσιδίων και ανάλογων νουκλεοσιδίων και η εκλεκτική αναστολή τους, γίνεται (α) με την αναστολή ειδικών σταδίων της πορείας αναπαραγωγής του ιού, όπως η προσκόλληση του ιού σε κάποιο κυτταρικό υποδοχέα, η διείσδυση του στο κύτταρο, η αποβολή του περιβλήματος και η απελευθέρωση και (β) με την κατά προτίμηση αναστολή κάποιων σταδίων τα οποία είναι κοινά με το κύτταρο του ξενιστή και περιλαμβάνουν τη μεταγραφή και τη μετάφραση.⁽¹⁾

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

Το πιο κοινό αποτέλεσμα των ενεργειών αυτών είναι ο κυτταρικός θάνατος, ο οποίος μπορεί να είναι επιθυμητός όσον αφορά τη θεραπεία του καρκίνου και των αυτοάνοσων ασθενειών. Επιπλέον, οι ενώσεις που μπορούν να στοχεύσουν επιλεκτικά στα βακτηριακά ή στα προερχόμενα από ιό ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιβακτηριακοί ή αντικοί παράγοντες.⁽¹⁾

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

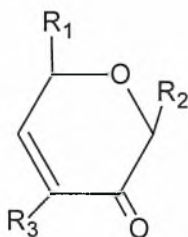
Στόχος – σκοπός μελέτης

Τα αντιβακτηριακά, αντικαρκινικά και αντιογκογονικά φάρμακα περιλαμβάνονται μεταξύ των πιο σημαντικών θεραπευτικών ανακαλύψεων του εικοστού αιώνα και έχουν αλλάξει δραστικά τη θεραπευτική αγωγή πολλών ασθενειών, μειώνοντας τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση και μελέτη τροποποιημένων νουκλεοσιδίων και συγκεκριμένα φθορονουκλεοσιδίων για την εύρεση νέων αντικαρκινικών, αντικαρκινικών φαρμάκων με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα από τα μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενα.

Έρευνες των τελευταίων ετών έδειξαν ότι:

- ✓ η ύπαρξη καρβονυλικής ομάδας στο τμήμα σακχάρου ενός τροποποιημένου νουκλεοσιδίου είναι απαραίτητη για την εκδήλωση αντικαρκινικής ή αντικαρκινικής δράσης, η δε επιπλέον παρουσία διπλού δεσμού συμβάλλει στην αύξηση αυτής.⁽²⁵⁾

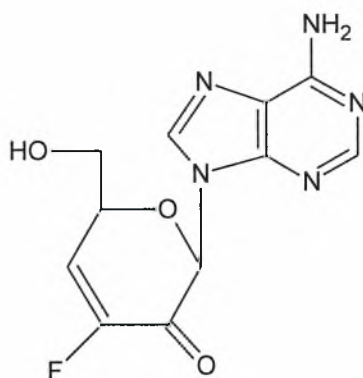


- ✓ Τα αμινονουκλεοσίδια έχουν υψηλό θεραπευτικό δείκτη είναι αρκετά ευέλικτα μόρια, αλληλεπιδρούν με το RNA και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Π.χ. Η αδενοσίνη (νουκλεοσίδιο στο οποίο η ετεροκυκλική βάση είναι η αδενίνη), αποτελεί το αρχικό φυσικό υπόστρωμα των αρμόδιων μεμβρανικών μεταφορέων λήψης και απελευθέρωσης από τα κύτταρα των ενδογενών νουκλεοσιδίων και των ανάλογων νουκλεοσιδίων με αντικαρκινική και αντικαρκινική δράση. Η αδενοσίνη, συνδέει τα εξωκυτταρικά συστατικά με τους ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς της αδενοσίνης.⁽²²⁾
- ✓ Η εισαγωγή ενός ατόμου φθορίου στο σάκχαρο των νουκλεοσιδίων μεταβάλλει με διάφορους τρόπους τη βιολογική δραστηριότητα των διάφορων

κυττάρων και ενζύμων, συμπεριλαμβανομένου των κινασών, DNA πολυμερασών, ριβονουκλεοτιδίων, αναγωγασών. ⁽²³⁾ Η αντικατάσταση του υδρογόνου με φθόριο έχει ερευνηθεί εκτενώς στη βιοχημεία φαρμάκων και έχει διαπιστωθεί ότι ενισχύει τη βιολογική δραστηριότητα και αυξάνει την χημική ή μεταβολική σταθερότητα καθότι:

- Έχει μικρή Wan der Waals ακτίνα (1.35 Å) που μοιάζει πολύ με την ακτίνα του υδρογόνου (1.20 Å).
- Η μεγάλη ηλεκτροαρνητικότητά του ενισχύει τις ιδιότητες του μορίου.
- Η αυξημένη σταθερότητα και η μεγαλύτερη ισχύς του δεσμού άνθρακα-φθορίου αναστέλλει τον μεταβολισμό με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημιζωής του μορίου.
- Αυξάνει το λιπόφιλο χαρακτήρα του μορίου διευκολύνοντας έτσι τη διαπερατότητα της διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. ^(26,27)

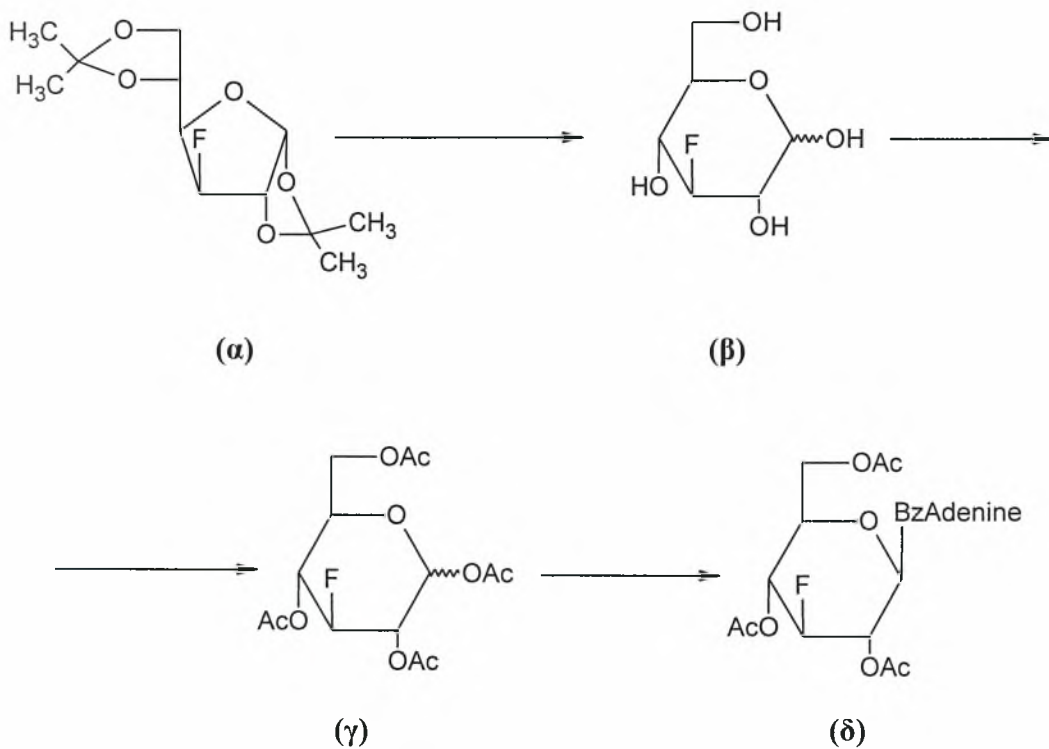
Βασιζόμενοι στα ανωτέρω στοιχεία, θεωρήθηκε πολύ σημαντική η σύνθεση μιας νέας τάξης ακόρεστων φθοροκετονουκλεοσιδίων (εικόνα 17) η οποία θα έχει αδενίνη σαν ετεροκυκλική βάση, καρβονύλιο στη θέση 2', φθόριο στη θέση 3' του σακχάρου και διπλό δεσμό στη θέση 3',4'.



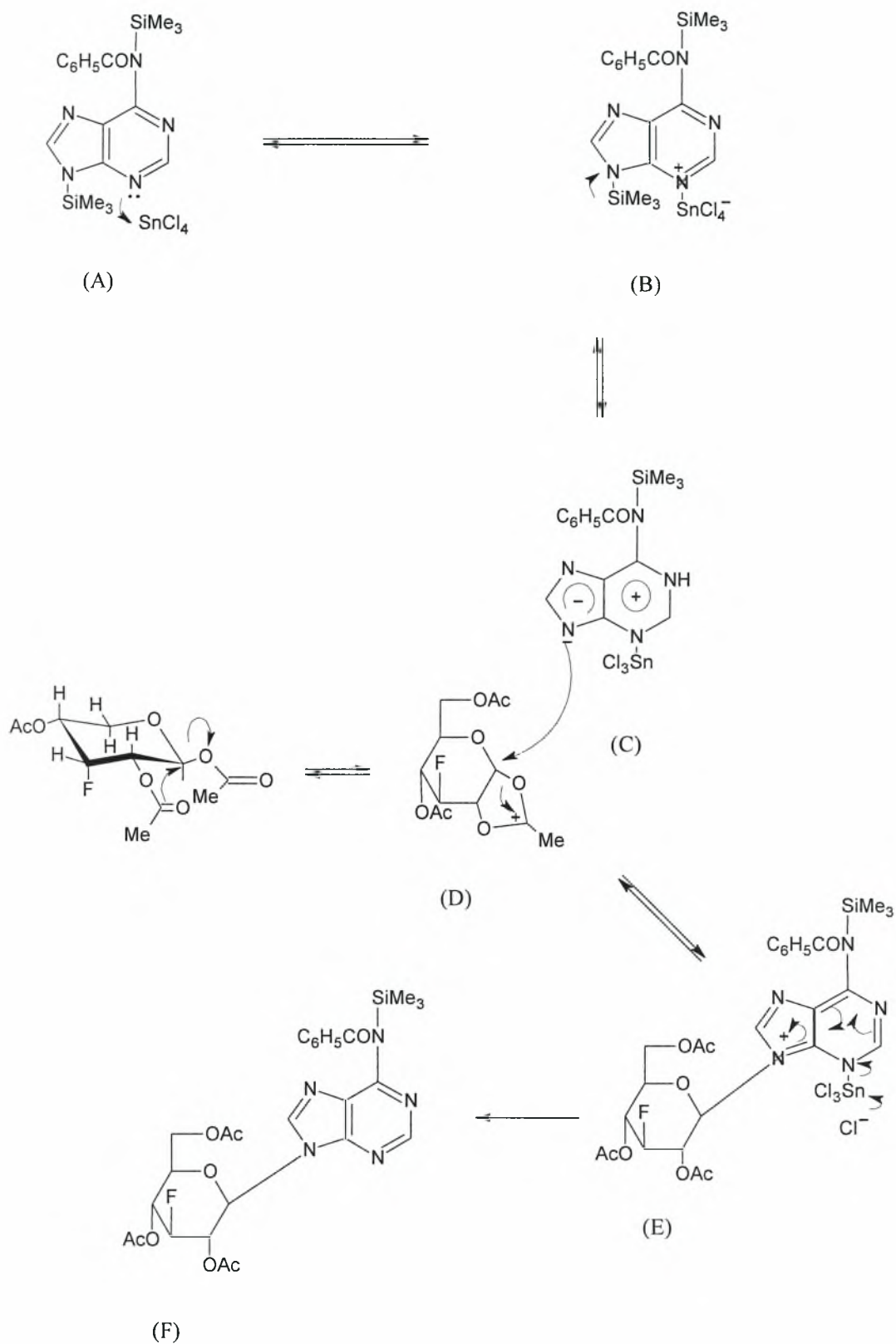
Εικόνα 17. 5'-φθοριο-1'-(6'-Ο-ακετυλο-3',4'-δι-δεοξυ-2'-φθοριο-β-D-γλυκερο-εξ-3'-ενο-2'-πυρανοσυλ)ουρακίλη

Μεθοδολογία σύνθεσης

Ξεκινώντας με την ένωση 1',2':5',6'-Di-O-isopropylidene 3'-fluoro- α -D-glucopyranose (**α**) και προσθέτοντας αιθανόλη, απιονισμένο νερό και Amberlite IR – 120 (H^+) με τα οποία σπάει ο κύκλος και από πεντόζη μετατρέπεται σε εξόζη, γίνεται η σύνθεση της 3'-deoxy-3'-fluoro-D-glucose (**β**). Στη συνέχεια η ένωση (**β**) ακετυλιώνεται παρουσία pyridine και AC_2O και η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη $MeOH$ που διασπά τον οξικό ανυδρίτη δίνοντας έτσι την ένωση 3'-fluoro-1',2',4',6'-tetra-O-acetyl-glucopyranose (**γ**). Ακολουθεί σύζευξη της (**γ**) με τη βάση Αδενίνη παρουσία του διαλύτη CH_3CN , των hexamethyldisilazane και chlorotrimethylsilan η δράση των οποίων έγκειται στη σιλιλίωση της βάσης και $SnCl_4$ δίνοντας τελικά το φθορονουκλεοσίδιο 1'-N⁶-benzoyladenine-3'-fluoro-2',4',6'-tri-O-acetyl- glucopyranose (**δ**) όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Στην ένωση (**γ**), το ακετύλιο στη θέση 1' είναι ανωμερές, βρίσκεται είτε ως α - είτε ως β - ανωμερές. Ο σχηματισμός με τον οποίο επικρατεί το β -ανωμερές φαίνεται στην εικόνα 18.



Εικόνα 18. Μηχανισμός σύνθεσης νουκλεοσιδίου ⁽²⁴⁾

3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΘΟΡΟΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ

3.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΧΑΡΤΟΥ (TLC: Thin Layer Chromatography)

Οι αντιδράσεις ελέγχονται με χρωματογραφία χάρτου, με πλάκες Silica gel (Merk Kieseil 60F250). Γενικά, τα χρωματογραφήματα εμφανίζονται με ψεκασμό με διάλυμα θειϊκού οξέος 30%. ⁽²⁴⁾ Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

Διάλυμα Α: Οξικός Αιθυλεστέρας / Μεθανόλη 90/10

Διάλυμα Β: Εξάνιο / Οξικός Αιθυλεστέρας 60/40

Διάλυμα Γ: Εξάνιο / Μεθανόλη 80/20

3.1.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Η χρωματογραφία στήλης, επιτεύχθηκε με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση σε silica gel (Merck grade 9385, 60Å) (flash chromatography) και οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω: ⁽²⁴⁾

Διάλυμα Δ: Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 70/30

Διάλυμα Ε: Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 80/20

3.1.3 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Χρησιμοποιείται άνυδρος διαλύτης ακετονιτρίλιο (CH_3CN).

Η ξήρανση του CH_3CN 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). ⁽²⁴⁾

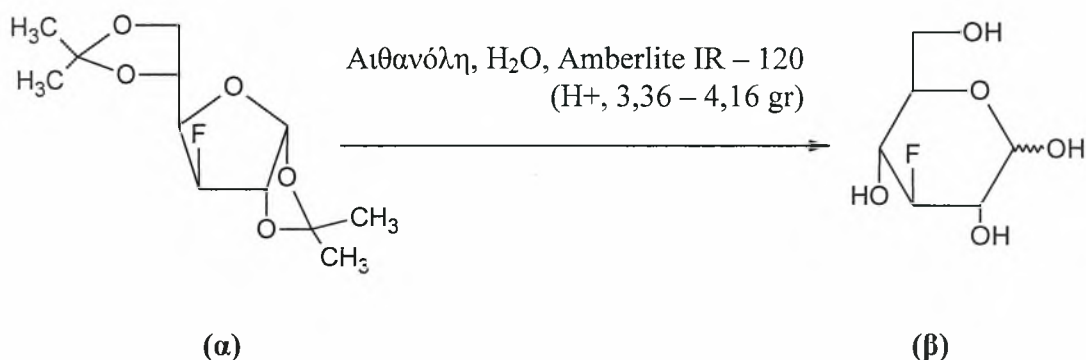
3.1.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με Bruker 250 MHz. Το 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 MHz. ⁽²⁴⁾

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η ένωση 1',2':5',6'-Di-O-isopropylidene 3'-fluoro- α -D-glucofuranose (**α**) υπάρχει και η σύνθεσή της είναι γνωστή. Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η ένωση (**α**) την οποία έχει συνθέσει η κ. Μαντά.

4.1 Σύνθεση 3'-deoxy-3'-fluoro-D-glucose (**β**) ⁽³²⁾

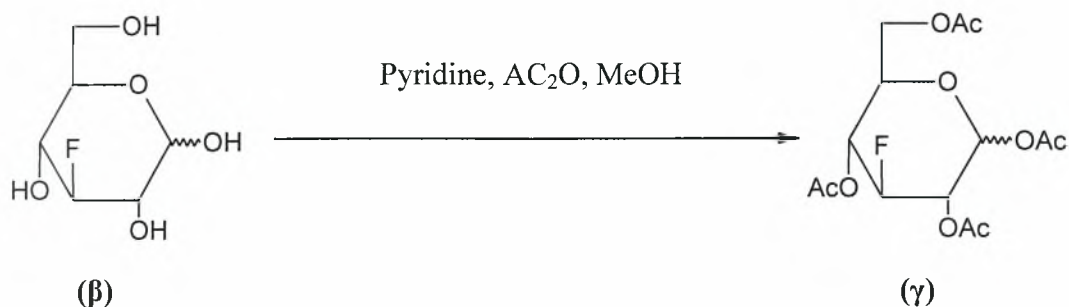


Ένα διάλυμα της ένωσης 1',2':5',6'-Di-O-isopropylidene 3'-fluoro- α -D-glucofuranose (**α**) (2,1 gr, 8 mmole) με αιθανόλη (12,63 ml) και απιονισμένο νερό (71,52ml), αναδεύεται στους 60 – 70 °C με Amberlite IR – 120 (H⁺, 3,36 – 4,16 gr) για ένα βράδυ. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 1). Το διάλυμα φιλτράρεται, συγκεντρώνεται και λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν 3'-deoxy-3'-fluoro-D-glucose (1,4 gr, 7,7 mmole,). Η σύνθεση του (**β**) είχε απόδοση 96%.

TLC (Διάλυμα A)	Rf = 0,3
Απόδοση	96%

Πίνακας 1. Αποτελέσματα σύνθεσης του 3'-deoxy-3'-fluoro-D-glucose

4.2 Σύνθεση 3'-fluoro-1',2',4',6'-tetra-O-acetyl-glucopyranose (γ) ⁽²⁴⁾

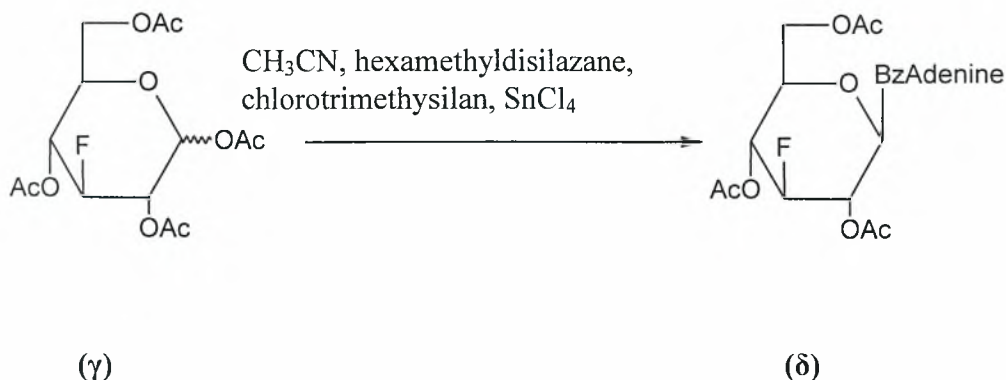


Ένα διάλυμα του 3'-deoxy-3'-fluoro-D-glucose (β) (1,4 gr, 7,7 mmole) με pyridine (27 ml) και AC₂O (13.5 ml), αναδεύεται για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 2). Στη συνέχεια προστίθεται MeOH (6,7 ml) στους 0°C για να σταματήσει η αντίδραση. Ακολουθεί συμπύκνωση και εκχύλιση με NaHSO₄·H₂O, NaHCO₃ και H₂O. Στην οργανική φάση προστίθεται anhydrous NaSO₄. Έπειτα, διηθείται, συμπυκνώνεται και κρυσταλλώνεται με AcOEt / Hex. Το διάλυμα φιλτράρεται, συγκεντρώνεται και δίνει το 3'-fluoro-1',2',4',6'-tetra-O-acetyl-glucopyranose (γ) (2,56gr, 7,32 mmole). Η σύνθεση του (γ) είχε απόδοση 95%.

TLC (Διάλυμα Β)	Rf = 0,5
Απόδοση	95%

Πίνακας 2. Αποτελέσματα σύνθεσης του 3'-fluoro-1',2',4',6'-tetra-O-acetyl-glucopyranose

4.3 Σύνθεση 1'-N⁶-benzoyladenine-3'-fluoro-2',4',6'-tri-O-acetyl-glucopyranose (δ) ⁽²⁴⁾

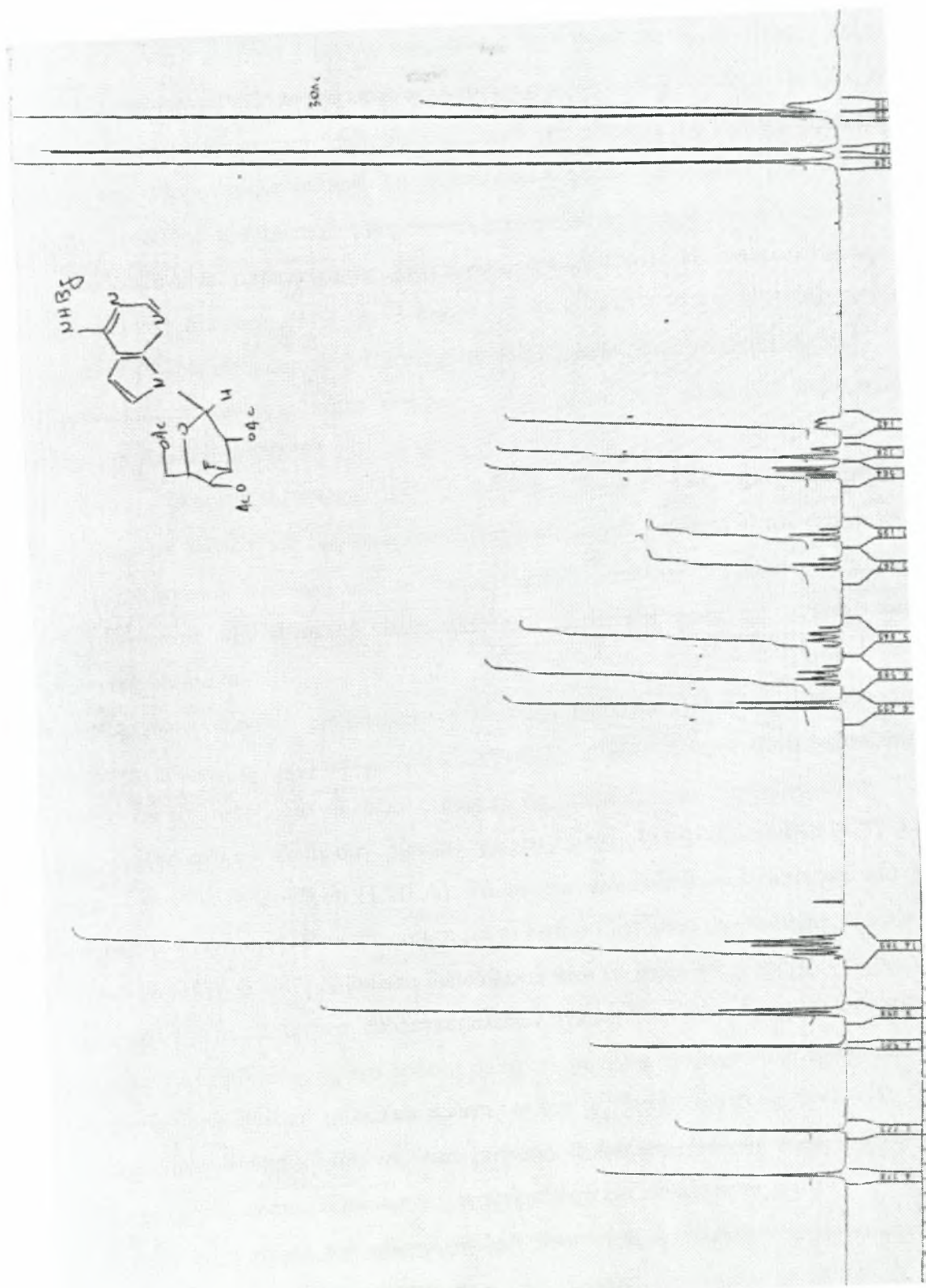


Ένα διάλυμα της N⁶-benzoyl adenine (2,27 gr, 9,5 mmole), του hexamethyldisilazane (3,8 mmole, 0,8ml), του chlorotrimethylsilan (3,8 mmole, 0,48ml) και του CH₃CN (92,5ml) αναδεύεται για 45 λεπτά και αφότου γίνει διαυγές προστίθεται η 3'-fluoro-1',2',4',6'-tetra-O-acetyl-glucopyranose (**γ**) (2,56gr, 7,32 mmole), και το SnCl₄ (10,23 mmole, 1,2 ml). Η αντίδραση ολοκληρώνεται στις δύο ώρες, στους 110°C. Ο έλεγχος της αντίδρασης γίνεται με TLC (πίνακας 3). Στη συνέχεια γίνεται εκχύλιση. Η υδατική φάση πλένεται με AcOEt και η οργανική με NaHCO₃ και H₂O. Στην οργανική φάση προστίθεται anhydrous NaSO₄ και το διάλυμα διηθείται και συμπυκνώνεται. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Δ και το Διάλυμα Ε. Η ένωση συλλέγεται, συμπυκνώνεται και κρυσταλλώνεται με EtOH. Το διάλυμα φιλτράρεται, διηθείται, συμπυκνώνεται και δίνει τη 1'-N⁶-benzoyladenine-3'-fluoro-2',4',6'-tri-O-acetyl-glucopyranose (**δ**) (2,05 gr, 5,85 mmole). Η σύνθεση του (**δ**) είχε απόδοση 80%. Η ταυτοποίηση της ένωσης έγινε μέσω του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). (βλέπε σελ. 31)

TLC (Διάλυμα Γ)	Rf = 0,58
Απόδοση	80%

Πίνακας 3. Αποτελέσματα σύνθεσης του 1'-N⁶-benzoyladenine-3'-fluoro-2',4',6'-tri-O-acetyl-glucopyranose

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ NMR



6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης φθορονουκλεοσιδίων με πιθανή αντική και αντικαρκινική δράση. Παρατηρήθηκε ότι με μια σχετικά εύκολη πειραματική διαδικασία με μικρά και σύντομα βήματα, είναι δυνατή η σύνθεση των φθορονουκλεοσιδίων. Το μόριο (γλυκόζη) που χρησιμοποιείται για την έναρξη της σύνθεσης του τελικού φθορονουκλεοσιδίου είναι χαμηλού κόστους και οι τελικές αποδόσεις είναι αρκετά καλές. Συγκεκριμένα, η σύνθεση του 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose (β) είχε απόδοση 96%, του 3-fluoro-1,2,4,6-tetra-O-acetyl-glucopyranose (γ) 95% και του 1-N⁶-benzoyladenine-3-fluoro-2,4,6-tri-O-acetyl- glucopyranose (δ) 80 %.

Η ταυτοποίηση των παραπάνω ενώσεων έγινε μέσω του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Η σύνθεση και αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των τροποποιημένων νουκλεοσιδίων με αδενίνη για ετεροκυκλική βάση και φθόριο στη θέση 3' του σακχάρου είναι πολύ σημαντική. Βρέθηκε ότι τα τροποποιημένα νουκλεοσίδια παίρνουν μέρος στην αντιμετώπιση και θεραπεία ασθενειών με τη δράση τους ως αντικά και αντικαρκινικά φάρμακα.

Τα φθορονουκλεοσίδια χρησιμοποιούνται στη βιοχημεία, ιατρική χημεία και φαρμακολογία ως αντικά και αντιογκογονικά φάρμακα. Η ικανότητα αντικατάστασης του υδρογόνου με το φθόριο αλλάζει ελάχιστα τη λειτουργία του νουκλεοσιδίου. Το μέγεθος των δύο ατόμων είναι συγκρίσιμο, έχει μικρή Wan der Waals ακτίνα (1.35 Å) όμοια με την ακτίνα 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 νουκλεοσιδίων.

Ένα πετυχημένο αντικό 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.

Το γεγονός ότι η χρήση των φθορονουκλεοσιδίων είναι η καλύτερη, προκύπτει από τα εξής γεγονότα: (α) ενεργοποιούνται μόνο από κύτταρα μολυσμένα με ιό και (β) η ενεργοποιημένη μορφή του φαρμάκου καθίσταται ακόμα πιο ειδική ως αποτέλεσμα της

ικής DNA πολυμεράσης που είναι περισσότερο ευαίσθητη στο φάρμακο απ' ό τι στο ένζυμο του κυττάρου ξενιστή.

Τα φθορονουκλεοσίδια φωσφορυλιώνονται από την κινάση των κυττάρων σε μια ενεργό μορφή και έπειτα εμποδίζουν τη σύνθεση DNA του ιού αναστέλλοντας ανταγωνιστικά την πολυμεράση (δεσμεύονται στην ενεργό περιοχή του ενζύμου) και προκαλούν το τερματισμό της αλυσίδας.^(26, 27,28)

Η ανακάλυψη των αντικών φαρμάκων έφερε εις πέρας τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Ωστόσο, η χρήση τους μπορεί να έχει δυσμενή αποτελέσματα. Ένα μεγάλο μέρος της τοξικότητας των ανάλογων νουκλεοσιδίων, συσχετίζεται άμεσα με το βαθμό στον οποίο οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για τις ανθρώπινες κινάσες και πολυμεράσες. Μερικοί από τους πρώτους αντικούς παράγοντες χαρακτηρίστηκαν από ακραία φαινόμενα εμφάνισης τοξικότητας, και χρησιμοποιούνται αυτήν την περίοδο μόνο τοπικά. Τα περισσότερα νουκλεοσίδια που χρησιμοποιούνται, παρουσιάζουν ήπια συμπτώματα όπως ναυτία, διάρροια, ίλιγγο, υπνηλία. Υπάρχει μια πιθανότητα τα ανάλογα νουκλεοσιδίων 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.^(29,30,31)

Στα νέα φθορονουκλεοσίδια πρέπει να γίνουν περαιτέρω βιολογικές μελέτες για τον προσδιορισμό της αντιβακτηριακής, αντιμυκητιακής και αντικής τους δράσης. Θα πρέπει επίσης να εξεταστούν για τη δυνατότητα να παρακινήσουν ανοσοαπάντηση με παρακολούθηση της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων, των μακροφάγων και έκκρισης των κυτοκινών.

Η Σλοβένικη ομάδα, θα ασχοληθεί με τον προσδιορισμό της βιολογικής δραστηριότητας των νέων φθορονουκλεοσιδίων και συγκεκριμένα:

(α) Θα προσδιορίσει την πιθανή αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση χρησιμοποιώντας μια μέθοδο δίσκων, προσδιορίζοντας την ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης έναντι σε επιλεγμένα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτηρίδια, για την παρακολούθηση της τοξικής επίδρασης στην εντερική μικροχλωρίδα. Μεταξύ των μυκήτων θα χρησιμοποιηθεί και το παθογόνο *C.albicans* σαν ο πιο κοινός δευτερογενής παράγοντας μόλυνσης ασθενών με AIDS.

Στις μελέτες αντικών, αντιπολλαπλασιαστικών και ανοσορυθμιστικών δραστηριοτήτων *in vitro* θα χρησιμοποιηθούν κυτταρικά μοντέλα, όπως ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, κυτταρικές σειρές χοίρων καθώς και πρωτογενείς καλλιέργειες περιφερειακών λευκοκυττάρων του αίματος (PBL), για να ικανοποιηθούν δύο βασικές

απαιτήσεις: 1) διαθεσιμότητα και εύκολο πειραματικό και υψηλής ευαισθησίας χειρισμό
2) διατήρηση των χαρακτηριστικών των ιστών και ορθή ερμηνεία των αποτελεσμάτων για την *in vivo* κατάσταση.

(β) Θα εξεταστούν για τη δυνατότητα τους να παρακινήσουν την άνοσο απάντηση από την παρακολούθηση της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και έκκρισης κυτοκινών. Η δυνατότητα ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού των μακροφάγων θα μετρηθεί από την παραγωγή ελεύθερων ριζών (ROS), τη φαγοκυτταρική δραστηριότητα.

(γ) Η πιθανή αντικαρκινική δραστηριότητα θα μετρηθεί ως αντιπολλαπλασιαστική και κυτταροτοξική δραστηριότητα σε κύτταρα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (HeLa) και καρκίνου του εντέρου (Caco), καθώς και σε λεμφοβλαστοειδής σειρές κυττάρων. Η έκφραση των εξειδικευμένων κυτταρικών δεικτών θα υπολογιστεί με κυτταρομετρία ροής.

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 το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS).

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 μιας νέας τάξης φθορονουκλεοσιδίων είναι πιθανόν να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων εξειδικευμένων θεραπευτικών ενώσεων.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

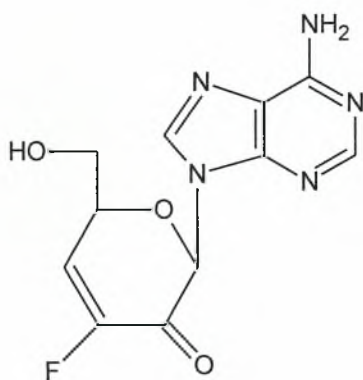
1. Vander, M.D.Sherman, Ph.D.Luciano, Ph.D.M.Tsakoulos, Φυσιολογία του ανθρώπου, μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού
2. Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, 1997 : 4, 26
3. M. C. T. Hartman, J. K. Coward, J. Am. Chem. Soc., 2001, 124, 10036
4. Wen Zhou, Giuseppe Gumina, Youhoon Chong, Jianing Wang, Raymond F. Schinazi, and Chung K. Chu, Synthesis, Structure-Activity Relationships, and Drug Resistance of -D-3'-Fluoro-2',3'-Unsaturated Nucleosides as Anti-HIV Agents, Med. Chem., 2004, 47 (13), 3399 –3408.
5. <http://www.hafreeclinics.org/drugs/index.html>
6. http://www.idenix.com/science/sci_nucleosides.html
7. http://www.mpcfaculty.net/ron_rinehart/30B/NA24/basetabl.htm
8. 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 Jul 17;46(15):3245-56.
9. Lubert Stryer, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997 : 347-354.
10. John McMurry, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2000 :151-152, 905
11. John M.Clark, Jr and Robert L. Switzer, Πειραματική βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 1992
12. Benjamin Lewin, Genes VIII : 6-8.
13. Christopher J. Burns, Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Hepatitis C Virus (HCV), Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents, Vol. 4, No. 2, 2005
14. <http://www.answers.com/topic/zidovudine-1>
15. <http://www.answers.com/topic/zidovudine?hl=zidovudine>
16. <http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/chemo.htm>
17. <http://www.answers.com/topic/lamivudine>
18. <http://www.answers.com/topic/ddi>
19. <http://www.answers.com/topic/ddc>
20. K. Antonakis, Hexopyranose nucleosides, Elsevier, Studies in Natural Products Chemistry, Volume 4, Stereoselective Synthesis (Part C), 221, 249

21. Christophe Thibaudeau, Janez Plavec, and Jyoti Chattopadhyaya, A New Generalized Karplus-Type Equation Relating Vicinal Proton-Fluorine Coupling Constants to H-C-C-F Torsion Angles, *J. Org. Chem.* 1998, 63, 4967-498
22. www.physpharm.fmd.uwo.ca/people/info.ihtml?ID...
23. www.kcom.edu/.../Website/Lects/Interfer.htm
24. Dimitri Komiotis, Doctorat, A l' universite de Paris VII, Chimie Organique, synthese chimique et etude de substances cytotoxiques dirigees specifiquement contre les cellules cancreuses. Conjugaison avec des proteins specifiques, 1988 : 99-102
25. Κομιώτης Δημήτριος, Βιβλιογραφικό σημείωμα και συνοπτική ανάλυση εργασιών, 2002 : 13, 15
26. Kyeong Lee, Yongseok Choi, Elizabeth Gullen, Susan Schlueter-Wirtz, Raymond F. Schinazi, Yung-Chi Cheng, and Chung K. Chu, Synthesis and Anti-HIV and Anti-HBV Activities of 2'-Fluoro-2',3'-unsaturated L-Nucleosides, *J. Med. Chem.*, 1999, 42 (7), 1320 -1328.
27. Marie-José Ergon, Françoise Leclercq, Kostas Antonakis, M. Idriss Bennani-Baiti and Charles Frayssinet, Synthesis and antineoplastic properties of 3?-deoxy-3?-fluoroketonucleoside derivatives. Correlations between structure and biological activity, *Carbohydrate Research*, 1993, Volume 248 , Pages 143-150.
28. Joseph A. Martin, David J. Bushnell, et al. *J. Med. Chem.*, 1990, 33, 2137-2145.
29. T. Tsuchiya, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1990, 48, 91.
30. A. Van Aerschot, P. Herdewijn, et al. *J. Med. Chem.*, 1989, 32, 1743.
31. P. Herdewijn, R. Pauels, et al. *J. Med. Chem.*, 1987, 30, 2131.
32. *Carbohyd. Res.*, 5 (1967) 292-301
33. J.Milecki et al, *Tetrahedron*, 55 (1999) 6603-6622
34. *J. Org. Chem*, Vol.43, No. 6,1978
35. Victor E. Marquez, Christofer K-H. Tseng, et al. *J. Med. Chem.* 1990, 33, 978-985
36. Redjem Lakaf, Doctorat de chimie organique, L' universite de Paris VII, Nucleosides biologiquement actifs: cetonucleosides insatures de l' adenine et de l' hypoxanthine, : 26
37. Marie-Jose Ergon, Dimitri Komiotis et al., New short route to ansaturated fluoroketonucleosides: case of 5-fluoro-1-(6-O-acetyl-3,4-di-deoxy-3-fluoro-b-D-dlycero-hex-3-eno-pyranos-2-ulosyl)uracil

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΤΑΞΗΣ
ΦΘΟΡΟΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΩΝ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ ΑΝΤΙ-ΙΚΗ ΚΑΙ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ**



ΜΑΝΩΛΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2005