



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΚΟΡΕΣΤΑ ΦΘΟΡΟ-ΚΕΤΟΠΥΡΑΝΟ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΑ
ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ 3-ΦΘΟΡΟ-4-
ΚΕΤΟ-β-D-ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΖΥΛΟ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΗΣ N⁴-
ΒΕΝΖΟΥΛΟ ΚΥΤΟΣΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ N⁶-ΒΕΝΖΟΥΛΟ ΑΔΕΝΙΝΗΣ**

ΣΒΥΡΙΝΑΚΗ ΠΕΛΑΓΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2007

BB

7

7



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΑΚΟΡΕΣΤΑ ΦΘΟΡΟ-ΚΕΤΟΠΥΡΑΝΟ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΑ
ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ 3-ΦΘΟΡΟ-4-
ΚΕΤΟ-β-D-ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΖΥΛΟ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΗΣ N⁴-
ΒΕΝΖΟΥΛΟ ΚΥΤΟΣΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ N⁶-ΒΕΝΖΟΥΛΟ ΑΔΕΝΙΝΗΣ**

ΣΒΥΡΙΝΑΚΗ ΠΕΛΑΓΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2007



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

Αριθ. Εισ.: 6171/1
Ημερ. Εισ.: 02-06-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΣΒΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087226

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κομιώτης Δημήτρης – Επίκουρος Καθηγητής Οργανικής Χημείας
του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Μαρκουλάτος Παναγιώτης – Αναπληρωτής Καθηγητής Ιολογίας του
Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Κουρέτας Δημήτρης– Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας
Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Κομιώτη Δημήτρη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κομιώτη που μου έδειξε εμπιστοσύνη αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα και με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τις Υποψήφιες Διδάκτορες Μαντά Στέλλα, Τσουκαλά Ευαγγελία και Τζιουμάκη Νίκη για τη βοήθεια που μου προσέφεραν στο να προσαρμοστώ στο εργαστήριο καθώς και για το ενδιαφέρον, την ηθική υποστήριξη και την καθοδήγησή τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

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

Τα τροποποιημένα νουκλεοσίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιική και αντικαρκινική χημειοθεραπεία. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοσίδια συνδεδεμένα με ολιγοσακχαρίτες.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον δόθηκε στη μελέτη φθορονουκλεοσιδίων προκειμένου να βρεθούν νέα αντικαρκινικά, αντιικά, 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

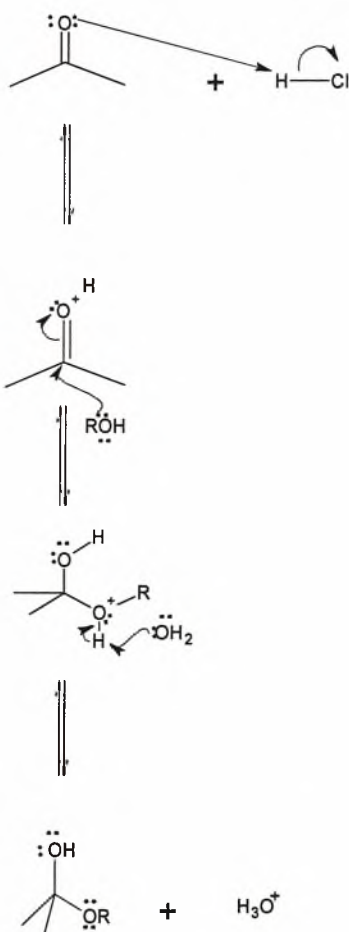
1	Εισαγωγή.....	8
1.1	Υδατάνθρακες.....	8
1.2	Νουκλεοσιδικά ανάλογα.....	12
1.2.1	Zidovudine ή azidothymidine.....	12
1.2.2	Lamivudine ή 3TC.....	14
1.2.3	DDI ή dideoxy inosine.....	14
1.2.4	DDC ή zalcitabine.....	15
1.2.5	Τριφθοριοθυμιδίνη.....	15
1.2.6	Αμινογλυκοσίδια.....	16
1.2.7	Κετονουκλεοσίδια.....	17
1.2.8	Φθορονουκλεοσίδια.....	18
1.3	Τρόπος δράσης νουκλεοσιδίων.....	19
2	Ειδικό Μέρος / Σκοπός – Στόχος.....	22
	Μεθοδολογία Σύνθεσης	24
3	Σύνθεση φθορονουκλεοσιδίων.....	27
3.1	Γενικές μέθοδοι.....	27
3.1.1	Χρωματογραφία χάρτου.....	27
3.1.2	Χρωματογραφία στήλης.....	27
3.1.3	Ξήρανση διαλυτών.....	27
3.1.4	Ταυτοποίηση ενώσεων.....	27
4	Πειραματική διαδικασία.....	29
4.1	Σύνθεση 1-(3-deoxy-3-fluoro-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N ⁴ -benzoyl cytosine.....	29
4.1.1	Σύνθεση 1-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N ⁴ -benzoyl cytosine.....	29
4.1.2	Σύνθεση 1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N ⁴ -benzoyl cytosine	30

4.1.3	Σύνθεση 1-(3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N ⁴ -benzoyl cytosine.....	31
4.1.4	Σύνθεση 1-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N ⁴ -benzoyl cytosine.....	32
4.1.5	Σύνθεση 1-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N ⁴ -benzoyl cytosine.....	33
4.1.6	Σύνθεση 1-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glucopyranosyl)-N ⁴ -benzoyl cytosine.....	34
4.1.7	Σύνθεση 1-(3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N ⁴ -benzoyl cytosine.....	35
4.1.8	Σύνθεση 1-(3-deoxy-3-fluoro-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N ⁴ -benzoyl cytosine.....	36
4.2	Σύνθεση 9-(3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N ⁶ -benzoyl adenine.....	37
4.2.1	Σύνθεση 9-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N ⁶ -benzoyl adenine.....	37
4.2.2	Σύνθεση 9-(3,4-dideoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N ⁶ -benzoyl adenine.....	38
4.2.3	Σύνθεση 9-(3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N ⁶ -benzoyl adenine.....	38
4.2.4	Σύνθεση 9-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N ⁶ -benzoyl adenine.....	39
4.2.5	Σύνθεση 9-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N ⁶ -benzoyl adenine.....	40
4.2.6	Σύνθεση 9-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glucopyranosyl)-N ⁶ -benzoyl adenine.....	41
4.2.7	Σύνθεση 9-(3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N ⁶ -benzoyl adenine.....	41
5	Ταυτοποίηση με ¹HNMR.....	43
6	Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	45
7	Βιβλιογραφία.....	47

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).



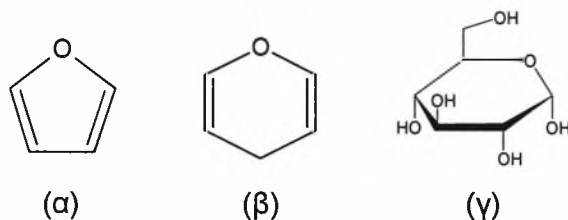
Η πρωτονίωση του καρβονυλικού οξυγόνου πολώνει έντονα το καρβονύλιο

... 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⁾

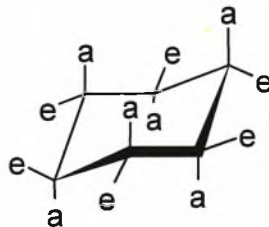
Η κετονική ομάδα στον C-2 του τύπου της ανοικτής αλυσίδας της φρουκτόζης είναι σε θέση να αντιδράσει με την υδροξυλική ομάδα του C-5 για να σχηματίσει μια ενδομοριακή ημιακετάλη. Ο πενταμελής δακτύλιος του σακχάρου καλείται φουρανόζη, λόγω της ομοιότητας του με το φουράνιο (εικόνα 2α).

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

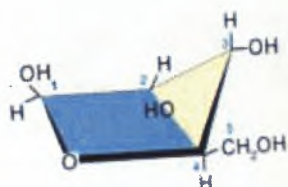
ανάκλιντρο, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι τάσεις, εφόσον όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνιάς.⁽¹⁰⁾



Εικόνα 3. Μορφή ανακλίντρος 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' ότι στην αξονική θέση. Η ενεργειακή διαφορά ανάμεσα στα αξονικά και ισημερινά διαμορφωμερή, 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).



Μορφή φακέλλου
της β-D-ριβόζης
(C_{3'} = μορφή ενδο)

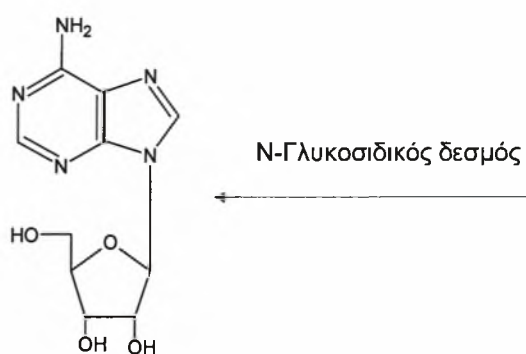
Εικόνα 4. Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης ⁽⁹⁾

Αυτή η διαμόρφωση καλείται μορφή φακέλου γιατί 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 αντιικούς παράγοντες και έδειξαν ότι τα σημαντικότερα αντιικά φάρμακα είναι τα νουκλεοσίδια και τα ανάλογα νουκλεοσιδίων. ⁽³⁾

Πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιική 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).



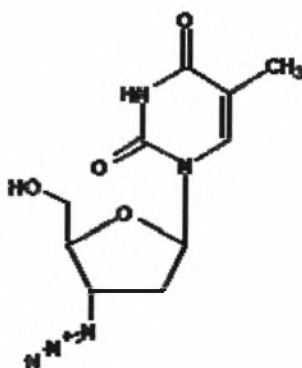
Εικόνα 5. Αδενοσίνη ⁽⁹⁾

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 αντικαρκινικά φάρμακα που συντέθηκαν και των οποίων έχει μελετηθεί η δράση.

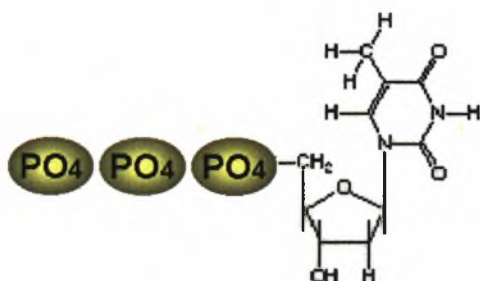
1.2.1 Zidovudine ή azidothymidine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine)

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⁾



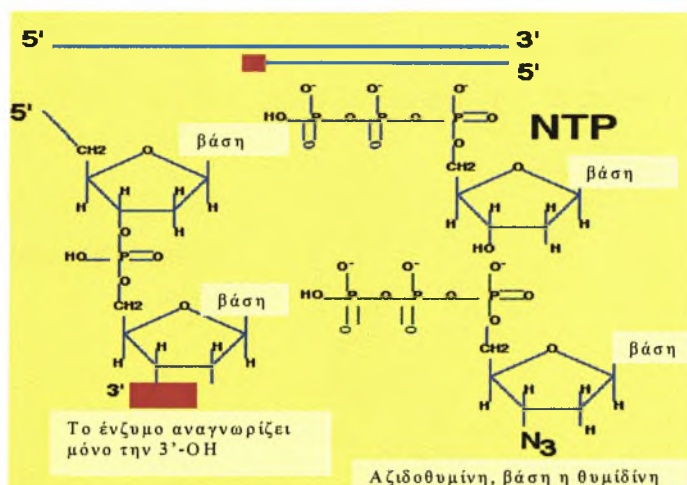
Εικόνα 6. AZT, 3'-Azido-2'-deoxythymidine⁽¹⁴⁾

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⁾

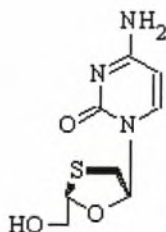
Ο τερματισμός της αλυσίδας του DNA, είναι αποτέλεσμα της απουσίας της ομάδας του 3'-υδροξυλίου στο ζιδονυδίνη, το οποίο καθιστά αδύνατη τη σύνδεση άλλων νουκλεοτιδίων. Μελέτες έδειξαν ότι ο τερματισμός των αλυσίδων αποτελεί τον παράγοντα της ανασταλτικής επίδρασης ^(15, 16) (εικόνα 8).



Εικόνα 8. Ανάλογα νουκλεοσιδίων στο τερματισμό αλυσίδων ⁽¹⁶⁾

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

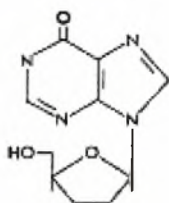
Το 3TC (εικόνα 9) είναι επίσης γνωστό ως lamivudine. Είναι ένα νουκλεοσιδικό παράγωγο και είναι ανασταλτικός παράγοντας του ενζύμου της αντίστροφης τρανσκριπτάσης, με την ίδια δράση όπως και το AZT.



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 dideoxy inosine

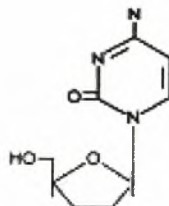


Εικόνα 10. DDI ⁽¹⁸⁾

Το DDI (εικόνα 10), αποτελεί ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο με αντιική δράση, αναστέλλοντας την αντιγραφή των ρετροϊών όπως του HIV, παρεμποδίζοντας τη δράση του ενζύμου της αντίστροφης τρανσκριπτάσης. ⁽¹⁸⁾

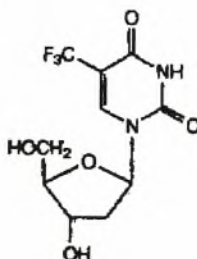
1.2.4 DDC ή zalcitabine

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' ό τι τα νουκλεοσιδικά ανάλογα με σάκχαρο μια εξόζη. Έτσι στράφηκε το ενδιαφέρον στη μελέτη της αντιικής 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 ανακλίντρου), 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 αντιική 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.

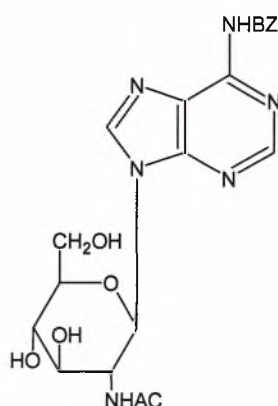
1.2.6 Αμινονουκλεοσίδια

Τα αμινονουκλεοσίδια αποτελούν μια τάξη νουκλεοσιδίων που περιέχει μια αμινο-ομάδα στο τμήμα του σακχάρου, η οποία αντικαθιστά μια υδροξυλική ομάδα. Είτε φυσικά είτε συνθετικά, τα 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⁾

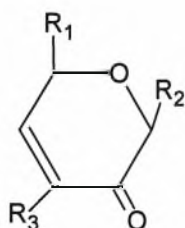
Στην εικόνα 13 φαίνεται το μόριο της 6-βενζυλαμινο-9-(2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-β-D-γλυκοπυρανοσυλ)-πουρίνης, το οποίο αποτελεί ανάλογο πουρινικών νουκλεοσιδίων και περιέχει 2-ακεταμιδο- ομάδα στο μόριο της εξοπυρανόζης.



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

1.2.7 Κετονουκλεοσίδια

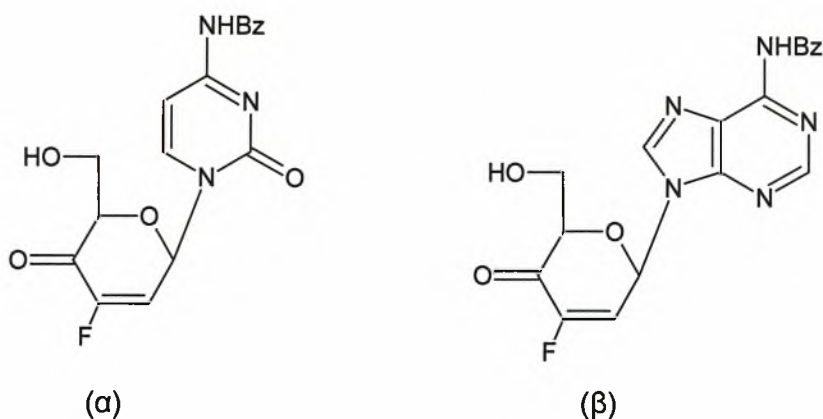
Μια άλλη ομάδα ανάλογων νουκλεοσιδίων είναι τα κετονουκλεοσίδια (εικόνα 14). Τα κετονουκλεοσίδια αποτελούν μια τάξη νουκλεοσιδίων που περιλαμβάνουν μια κετο-ομάδα στο μόριο του σακχάρου, ως αποτέλεσμα της οξείδωσης του ασύμμετρου ατόμου του άνθρακα. Τα κετονουκλεοσίδια, αποτελούν το κλειδί που μεσολαβεί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



Εικόνα 14. R1= CH₂OH, CH₃
 R2= πουρίνη ή πυριμιδίνη
 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 ή κυτοσίνη σαν ετεροκυκλική βάση και φθόριο στη θέση 3' του σακχάρου (εικόνα 15).



Εικόνα 17. (α) 1-(3-deoxy-3-fluoro-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁴-benzoyl cytosine

(β) 9-(3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁶-benzoyl adenine

Τα φθοριωμένα νουκλεοσίδια χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιοχημεία, την ιατρική χημεία, και τη φαρμακολογία. Τα φθοριωμένα νουκλεοσίδια υιοθετούνται ευρέως ως πειραματικοί αντιικοί 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 ηλεκτραρνητικότητα 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 αντιική 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 ιικές πολυμεράσες. Οι ιικές πολυμεράσες, συχνά είναι ειδικά διαμορφωμένες έτσι ώστε να αποτελούν στόχο για έναν ειδικό αντιικό παράγοντα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ενίσχυσε την παραγωγή των ειδικών αντιικών φαρμάκων. ^(5,6,7)

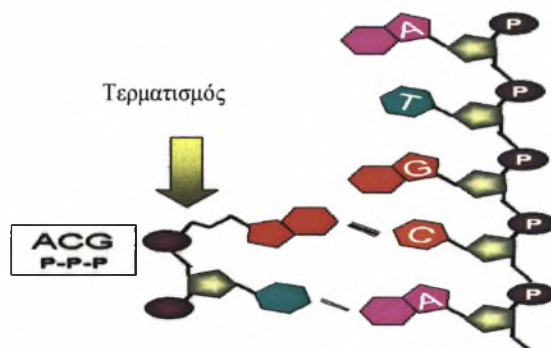
Τα φυσικά νουκλεοσίδια τροποποιούνται στα κύτταρα για να παραγάγουν τα νουκλεοτίδια, τα οποία χρησιμοποιούνται από τις πολυμεράσες ως βασικές δομικές μονάδες γενετικού υλικού DNA και RNA. Μιμούμενα το ρόλο των φυσικών νουκλεοσιδίων, τα αντιικά φάρμακα νουκλεοσιδίων, γενικά ενσωματώνονται στην αντιγραφή των ιικών γονιδιωμάτων από τις ιικές πολυμεράσες. Αυτό το γεγονός εξασθενίζει τη σύνθεση ή τη λειτουργία του ιικού 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 νουκλεϊνικών οξέων. Επειδή η αντιγραφή των νουκλεϊνικών οξέων είναι

κοινή για όλες τις μορφές ιών, τα ανάλογα νουκλεοσιδίων ενδεχομένως έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στην αντιική θεραπεία.

Επειδή οι φωσφορυλιωμένες ενώσεις ιονίζονται συνήθως στο σώμα λόγω του διαφορετικού pH στα διάφορα διαμερίσματα, δεν μεταφέρονται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Οι ενεργές μορφές των νουκλεοτιδίων αποτελούν τριφωσφορικά άλατα, με όλες τις αντικαταστάσεις φωσφορικών στην 5'-θέση από ειδικές ιικές-κινάσες που συχνά καταλύουν 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 ιικές πολυμεράσες μπορεί να είναι πολύ πιο ευαίσθητες στη δράση του φαρμάκου απ' ό τι 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 αντιικοί παράγοντες. ⁽¹⁾

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

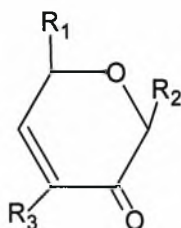
Στόχος – σκοπός μελέτης

Τα αντιβακτηριακά, αντιικά 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, αντιικών φαρμάκων με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα από τα μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενα.

Έρευνες των τελευταίων ετών έδειξαν ότι:

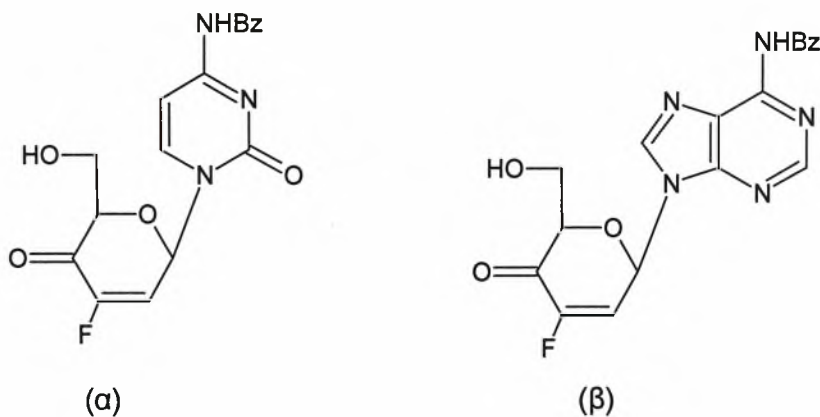
- ❖ Τα νουκλεοσίδια που έχουν ως ετεροκυκλική βάση αδενίνη ή κυτοσίνη, έχουν υψηλό θεραπευτικό δείκτη είναι αρκετά ευέλικτα μόρια, αλληλεπιδρούν με το RNA και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Π.χ. Η αδενοσίνη (νουκλεοσίδιο στο οποίο η ετεροκυκλική βάση είναι η αδενίνη), 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 αντιική δράση. Η αδενοσίνη, συνδέει τα εξωκυτταρικά συστατικά με τους ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς της αδενοσίνης.⁽²²⁾
- ❖ η ύπαρξη καρβονυλικής ομάδας στο τμήμα σακχάρου ενός τροποποιημένου νουκλεοσιδίου είναι απαραίτητη για την εκδήλωση αντικαρκινικής ή αντιικής δράσης, η δε επιπλέον παρουσία διπλού δεσμού συμβάλλει στην αύξηση αυτής.⁽²⁵⁾



❖ 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 νουκλεοσιδίων (εικόνα 17) η οποία θα έχει: α) αδενίνη ή κυτοσίνη σαν ετεροκυκλική βάση, β) φθόριο στη θέση 3' και γ) την κετο-ομάδα στη θέση 4' του σακχάρου.



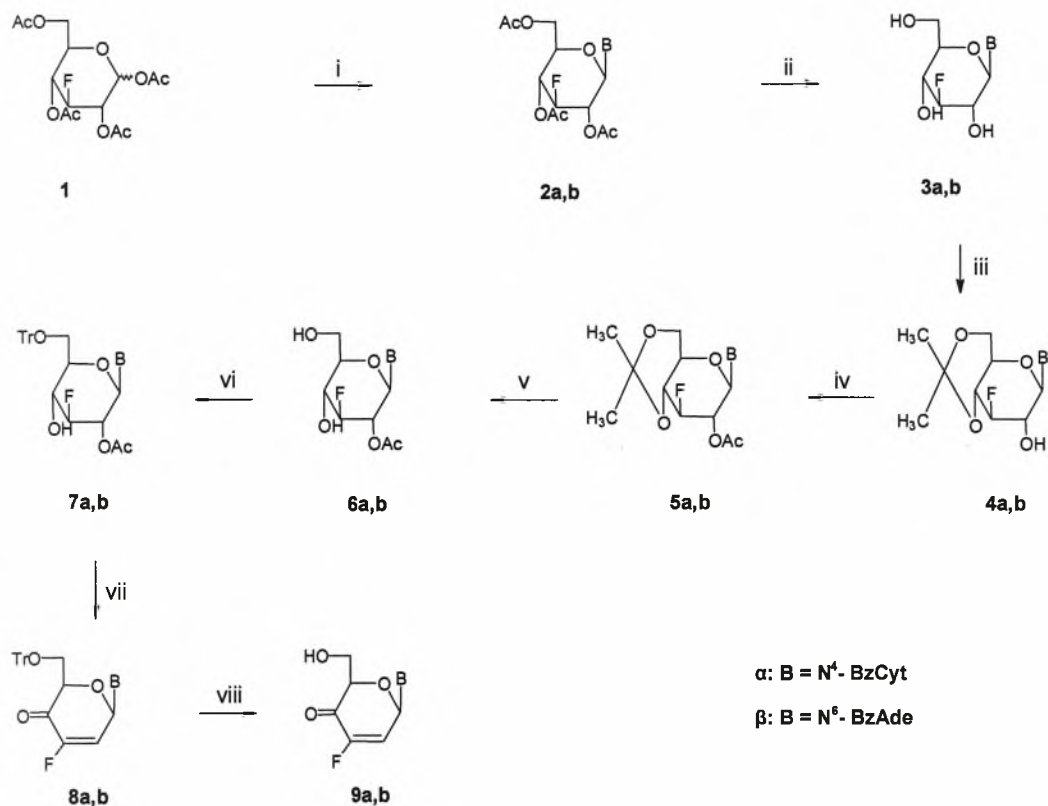
Εικόνα 17. (α) 1-(3-deoxy-3-fluoro-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁴-benzoyl cytosine

(β) 9-(3-deoxy-3-fluoro-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁶-benzoyl adenine

Μεθοδολογία Σύνθεσης

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση αυτή απεικονίζεται στο

Σχήμα 1:



Σχήμα 1. Αντιδραστήρια και συνθήκες: (i) Συλιλιωμένη βάση, CH₃CN, trimethylsilyl trifluoromethane-sulfonate ή χλωριούχος κασσίτερος (ii) EtOH, πυριδίνη, NaOH, 0 °C, 30 λεπτά, Amberlite IR-120 (H⁺) ρητίνη (iii) 2,2-διμεθοξυπροπάνιο, p-toluenesulfonic acid, DMF, 60 °C, 1 ώρα (iv) πυριδίνη, οξικός ανυδρίτης, 4 °C, 12 ώρες (v) 90% τριφθοροοξικό οξύ σε MeOH, 20 °C, 10 λεπτά (vi) πυριδίνη, triphenylmethyl chloride, 4-διμεθυλαμινοπυριδίνη, 60 °C, 12 ώρες (vii) PDC, οξικός ανυδρίτης, CH₂Cl₂/DMF, 90 °C, 100 λεπτά (viii) μυρμηκικό οξύ, διαιθυλικός αιθέρας, 20 °C, 10 λεπτά.

Τα αρχικά υλικά, 1-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (**2a**) και 9-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁶-benzoyl adenine (**2b**), λήφθηκαν από τη σύζευξη της ένωσης 1,2,4,6-tetra-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-glucopyranose (**1**) με τις συλλιωμένες βάσεις N⁴-βενζόυλο κυτοσίνη και N⁶-βενζόυλο αδενίνη, αντίστοιχα, παρουσία του trimethylsilyl trifluoromethane-sulfonate και του χλωριούχου κασσίτερου, σε διαλύτη CH₃CN (Σχήμα 1). Με τη σύζευξη αυτή λήφθηκαν μόνο τα β-ανωμερή νουκλεοσιδικά παράγωγα **2a** και **2b** με αποδόσεις 68 και 60% αντίστοιχα. Η β διαμόρφωση αυτών των νουκλεοσιδίων επιβεβαιώθηκε από τα ¹HNMR φάσματα τους.

Η εκλεκτική αποπροστασία των ενώσεων **2a** και **2b**, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας NaOH-αιθανόλη(EtOH)-πυριδίνη και έδωσε τα βενζυλιωμένα παράγωγα **3a** και **3b** με άριστη απόδοση (90 και 88%, αντίστοιχα). Όταν όμως τα β νουκλεοσίδια κατεργάστηκαν με μεθανολική αμμωνία, ή ανθρακικό κάλιο-μεθανόλη, ή γουανιδίνη, λήφθηκαν τα πλήρως απροστάτευτα νουκλεοσιδικά παράγωγα. Στη συνέχεια, η προσθήκη 2,2-διμεθοξυπροπανίου σε άνυδρη DMF, στις ενώσεις **3a** και **3b** έδωσε τα ισοπροπυλιδενικά παράγωγα **4a** και **4b**, με αποδόσεις 80 και 76%, αντίστοιχα.

Στα δύο νουκλεοσίδια η ακετυλίωση του ελεύθερου υδροξυλίου στην 2'-θέση του σακχάρου, παρουσία οξικού ανυδρίτη-πυριδίνης, έδωσε τα επιθυμητά ακετυλιωμένα παράγωγα **5a** και **5b** με πολύ καλές αποδόσεις (89 και 80%). Στη συνέχεια, η διάσπαση της ομάδας του ισοπροπυλιδενίου πραγματοποιήθηκε με κατεργασία τους με 90% τριφθοροοξικό οξύ σε μεθανόλη και προέκυψαν τα προϊόντα **6a** και **6b**. Προστατεύοντας εκλεκτικά το υδροξύλιο που είναι συνδεδεμένο στη θέση 6' του σακχάρου με μια ομάδα τριτυλίου, σχηματίστηκαν τα τριτυλιωμένα παράγωγα **7a** και **7b**, αντίστοιχα. Η οξειδωση αυτών των φθόρο ακετυλιωμένων πρόδρομων ενώσεων, πραγματοποιήθηκε με PDC-οξικό ανυδρίτη και έδωσε, μετά από μια αντίδραση β-αποβολής, τις επιθυμητές ακόρεστες καρβονυλικές ενώσεις 1-(3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁴-benzoyl cytosine (**8a**) and 9-(3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁶-benzoyl adenine (**8b**), με 50% απόδοση.

Τέλος, η αποτριτυλίωση του προϊόντος **8a** πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα μίγμα μυρμηκικού οξέος και διαιθυλικού αιθέρα, και

προέκυψε το αποπροστατευμένο ακόρεστο προϊόν 3'-φθορο-4'-κετο νουκλεοσίδιο της N⁴-βενζόυλο κυτοσίνης .

Διάφορες προσεγγίσεις πραγματοποιήθηκαν για να ληφθεί το επιθυμητό παράγωγο της N⁶-βενζόυλο αδερίνης **9b**. Η επεξεργασία της ένωσης **8b** με ένα μίγμα μυρμηκικού οξέος και διαιθυλικού αιθέρα, με μεθανολικό χλωριούχο υδρογόνο, με 70% οξικό οξύ στους 60 °C, με νάτριο-αμμωνία και τέλος με βρωμιούχο ψευδάργυρο σε διχλωρομεθάνιο, δεν έδωσε δυστυχώς το επιθυμητό απροστάτευτο παράγωγο της αδερίνης **9b** και μόνο η αδερίνη απομονώθηκε από το μίγμα της αντίδρασης.

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 Kieselgel 60F250). Γενικά, τα χρωματογραφήματα εμφανίζονται με ψεκασμό με διάλυμα θειϊκού οξέος 30%.⁽²⁴⁾

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 Α: Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 80/20

Διάλυμα Β: Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 90/10

Διάλυμα Γ: Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 70/30

Διάλυμα Δ: Οξικός Αιθυλεστέρας / Εξάνιο 60/40

Διάλυμα Ε: Οξικός Αιθυλεστέρας

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⁾ Επίσης χρησιμοποιείται άνυδρη πυριδίνη, άνυδρο CH_3CN , άνυδρο DMF και άνυδρο CH_2Cl_2 .

3.1.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ

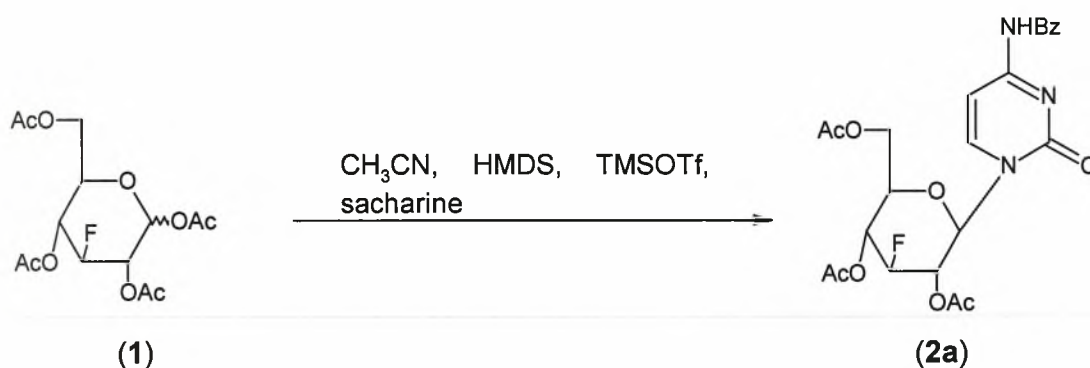
Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με Bruker 250 MHz. Το tetramethylsilan (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και η πολλαπλότητα των καμπύλων

φαίνεται με s (singlet), d (doublet), dt (doublet of triplets), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet). Οι συχνότητες J μετρήθηκαν σε MHz. ⁽²⁴⁾

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

4.1 Μεθοδολογία σύνθεσης 1-(3-deoxy-3-fluoro-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁴-benzoyl cytosine (9a)

4.1.1 Σύνθεση 1-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (2a)

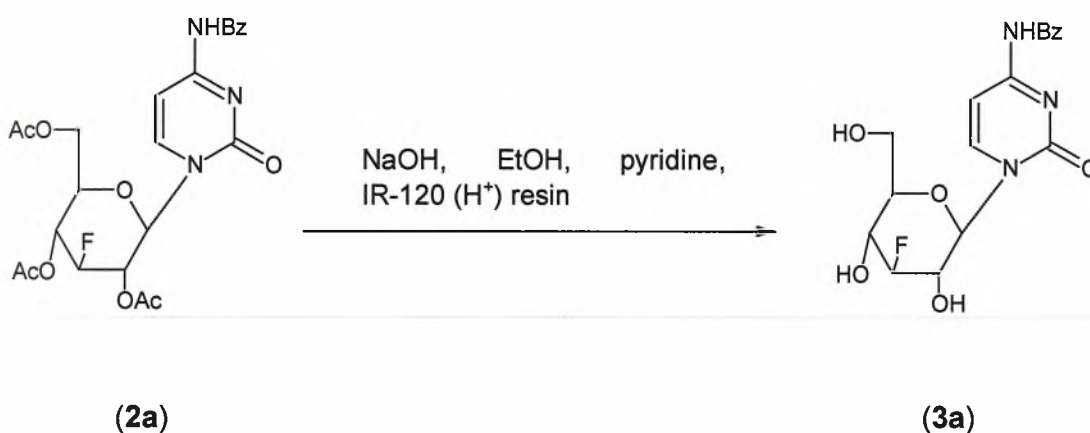


Ένα διάλυμα της N⁴-benzoyl cytosine (3.99 g, 18.55 mmol) , του hexamethyldisilazane (HMDS) (4.8 mL, 23mmol) και της σακχαρίνης (0.16 g, 0.85 mmol) αναδεύεται σε άνυδρο CH₃CN (69 mL) για 30min στους 120°C. Αφού το μίγμα γίνει διαυγες, προστίθεται τετραακετυλιωμένη 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose (1) (5.00 g, 14.27 mmol) και trimethylsilyl trifluoromethane-sulfonate (TMSOTf) (3.6 mL, 19.98 mmol) και το αφήνεται υπό ανάδευση στους 120°C για 5h. Στη συνέχεια ψύχεται και ουδετεροποιείται με υδατικό NaHCO₃. Ο έλεγχος της αντίδρασης γίνεται με TLC (πίνακας 1α). Ακολουθεί εκχύλιση. Η υδατική φάση πλένεται με CH₂Cl₂ και η οργανική φάση με νερό (3 X 20 mL). Στην οργανική φάση προστίθεται άνυδρο Na₂SO₄ για να απομακρυνθεί η υγρασία και τελικά το διάλυμα διηθείται και συμπυκνώνεται. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Α. Η ένωση συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται το προϊόν **2a** (4.90 g, 9.7 mmol) ως στερεό. Η σύνθεση του είχε απόδοση 68%. Η ταυτοποίηση της ένωσης έγινε μέσω του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹HNMR). (βλέπε σελ. 43)

TLC (Διάλυμα A)	R _f =0.35
Απόδοση	68%

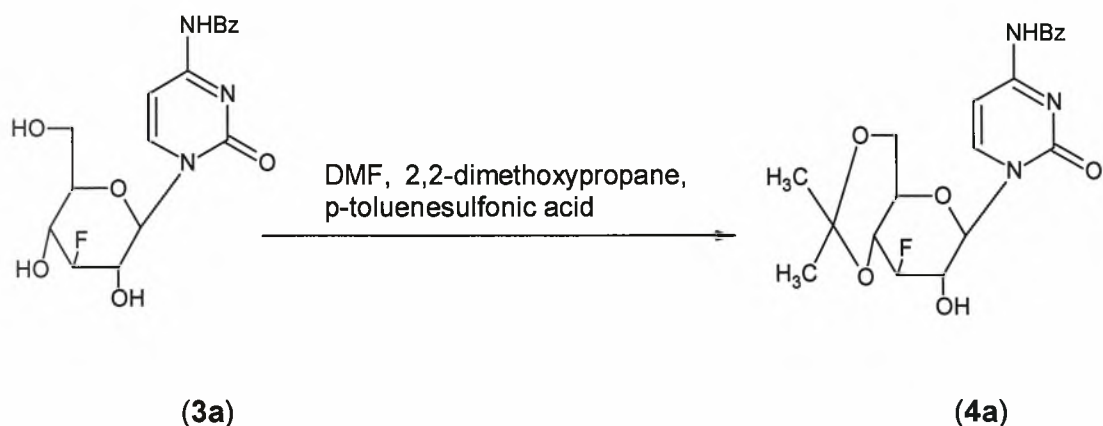
Πίνακας 1α. Αποτελέσματα σύνθεσης του 1-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (**2a**)

4.1.2 Σύνθεση 1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (**3a**)



Η ένωση 1-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glycopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (**2a**) διαλύεται σε pyridine (29.1 mL) και EtOH (97mL), προστίθεται 2M NaOH (19.4 mL) και αναδεύεται για 30min στους 0°C . Στη συνέχεια προστίθεται Amberlite IR – 120 (H⁺) (ρητίνη) για ουδετεροποίηση της βάσης. Το διάλυμα φιλτράρεται, η ρητίνη πλένεται με EtOH (100 mL) και πυριδίνη (100 mL) και το διάλυμα συμπυκνώνεται . Κατεργάζεται με diethyl ether (2 X 30 mL) και CH₂Cl₂ (2 X 30 mL). Το προϊόν **3a** λήφθηκε με απόδοση 90% (3.31 g, 8.73 mmol) με τη μορφή κίτρινου αφρού .

4.1.3 Σύνθεση 1-(3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (4a)

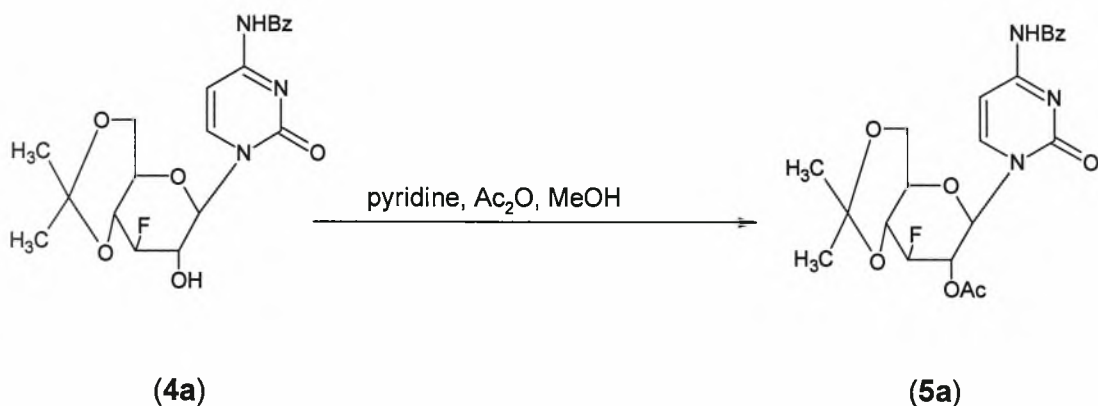


Σε ένα διάλυμα της ένωσης 1-(3,4-dideoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (3a) (3.31 g, 8.73 mmol), προστίθεται άνυδρη DMF (110.4 mL), 2,2-dimethoxypropane (34.92 mL) και p-toluenesulfonic acid (2.65 g, 13.97 mmol). Το μίγμα αναδεύεται στους 60°C για 1h. Στη συνέχεια προστίθεται triethylamine ώστε το pH να μην ξεπερνά το 7. Ο έλεγχος της αντίδρασης γίνεται με TLC (πίνακας 2α). Στη συνέχεια το μίγμα συμπυκνώνεται κάτω από συνθήκες μεγάλου κενού έτσι ώστε να εξατμιστεί όλος ο διαλύτης. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Β. Η ένωση συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται το προϊόν 4a (2.93 g, 6.99 mmol) ως κίτρινο λάδι. Η σύνθεση του 4a είχε απόδοση 80%.

TLC (Διάλυμα Β)	R _f =0.3
Απόδοση	80%

Πίνακας 2α. Αποτελέσματα σύνθεσης του 1-(3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (4a)

4.1.4 Σύνθεση 1-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (5a)



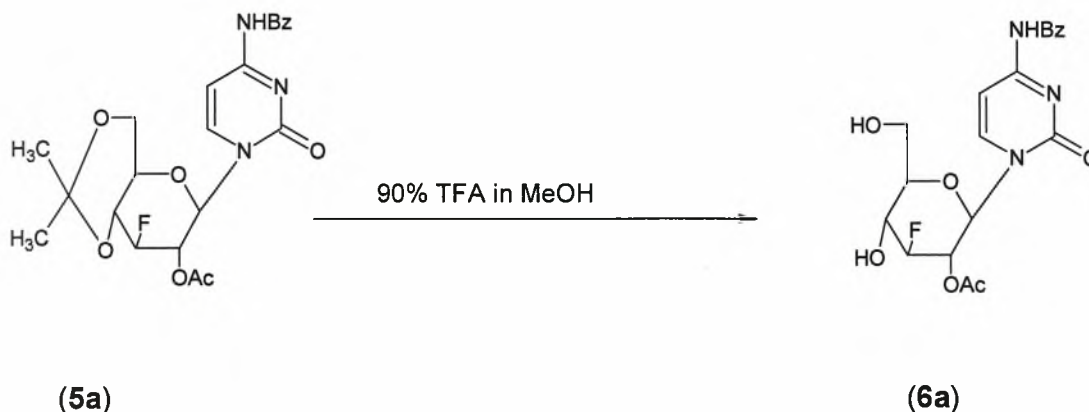
Η ένωση 1-(3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (**4a**) (2.93 g, 6.99 mmol) διαλύεται σε άνυδρη πυριδίνη (35 mL) και προστίθεται οξικός ανυδρίτης (Ac₂O) (0.59 mL, 6.29 mmol). Το μίγμα αναδεύεται για ένα βράδυ στους 4°C. Ο έλεγχος της αντίδρασης γίνεται με TLC (πίνακας 3a). Στη συνέχεια προστίθεται μεθανόλη (MeOH) (0.3 ml) στους 0°C για να σταματήσει την αντίδραση. Ακολουθεί συμπύκνωση κάτω από συνθήκες αυξημένου κενού έτσι ώστε να εξατμιστούν όλοι οι διαλύτες. Έπειτα πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Γ. Η ένωση συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται το προϊόν **5a** (2.87 g, 6.22 mmol).

Η σύνθεση του **5a** είχε απόδοση 89%.

TLC (Διάλυμα Γ)	R _f =0.4
Απόδοση	89%

Πίνακας 3a. Αποτελέσματα σύνθεσης του 1-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (**5a**)

4.1.5 Σύνθεση 1-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (6a)

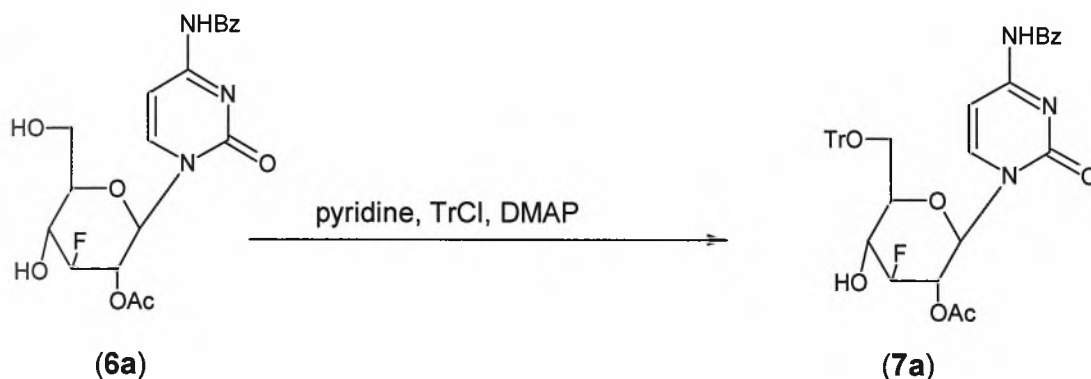


Η ένωση 1-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (**5a**) (2.87 g, 6.22 mmol) διαλύεται σε 90% τριφθοροοξικό οξύ (TFA) και μεθανόλη (31.1 mL). Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Ο έλεγχος της αντίδρασης γίνεται με TLC (πίνακας 4α). Στη συνέχεια συμπυκνώνεται κάτω από συνθήκες αυξημένου κενού στους 40°C έτσι ώστε να εξατμιστεί το τριφθοροοξικό οξύ. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα E. Η ένωση συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται το προϊόν **6a** (2.36 g, 5.6 mmol). Η σύνθεση του **6a** είχε απόδοση 90%.

TLC (Διάλυμα E)	R _f =0.12
Απόδοση	90%

Πίνακας 4α. Αποτελέσματα σύνθεσης του 1-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (**6a**)

4.1.6 Σύνθεση 1-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (7a)

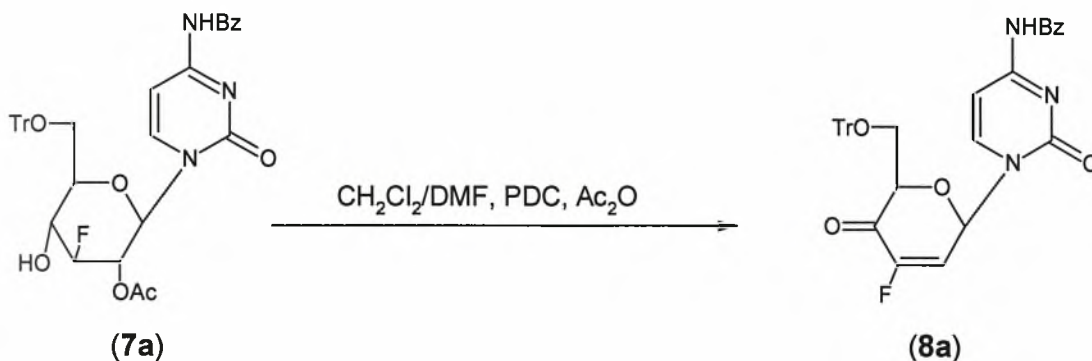


Το προϊόν 1-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (**6a**) (2.36 g, 5.6 mmol) διαλύεται σε άνυδρη πυριδίνη (28 mL). Στο διάλυμα προστίθεται triphenylmethyl chloride (TrCl) (1.87 g, 6.72 mmol) και 4-dimethylaminopyridine (DMAP) . Το μίγμα αναδεύεται για μια νύχτα στους 60°C. Ο έλεγχος της αντίδρασης γίνεται με TLC (πίνακας 5a). Στη συνέχεια συμπυκνώνεται κάτω από συνθήκες αυξημένου κενού έτσι ώστε να εξατμιστούν οι διαλύτες. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Γ . Η ένωση συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται το προϊόν **7a** (2.33 g, 3.36 mmol) με μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση του **7a** είχε απόδοση 60%.

TLC (Διάλυμα Γ)	R _f =0.37
Απόδοση	60%

Πίνακας 5a. Αποτελέσματα σύνθεσης του 1-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (**7a**)

4.1.7 Σύνθεση 1-(3-deoxy-3-fluoro –6-O-trityl-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁴-benzoyl cytosine (8a)

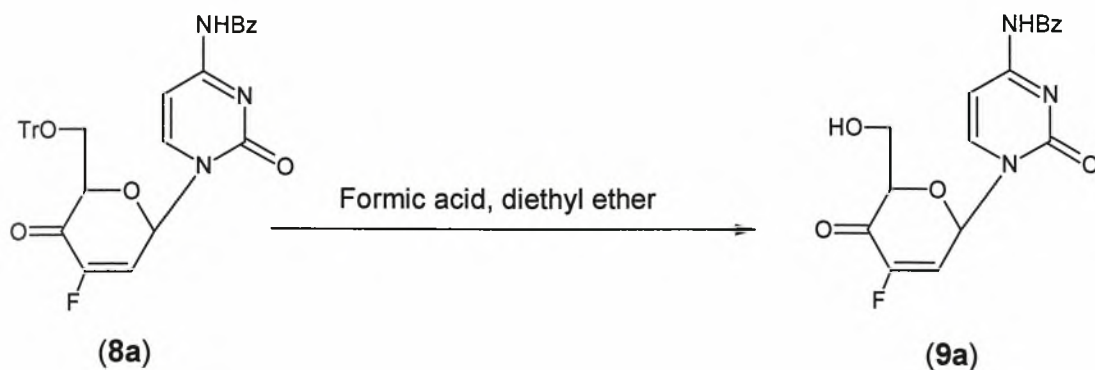


Ένα μίγμα του 1-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro–6-O-trityl-β-D-glucopyranosyl)-N⁴-benzoyl cytosine (7a) (2.36 g, 5.6 mmol) ,του PDC (1.9 g, 5.04 mmol) και του οξικού ανυδρίτη (Ac₂O) (3.17 mL , 33.60 mmol) θερμαίνεται υπό βρασμό στους 90°C σε άνυδρο CH₂Cl₂ (32 mL) και σε άνυδρη DMF (10 mL) για 100min. Ο έλεγχος της αντίδρασης γίνεται με TLC (πίνακας 6a). Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Γ . Η ένωση συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται το προϊόν 8a (1.51 g, 2.51 mmol) με μορφή λευκού αφρού. Η σύνθεση του 8a είχε απόδοση 75%.

TLC (Διάλυμα Γ)	R _f =0.39
Απόδοση	75%

Πίνακας 6a. Αποτελέσματα σύνθεσης του 1-(3-deoxy-3-fluoro –6-O-trityl-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁴-benzoyl cytosine (8a)

4.1.8 Σύνθεση 1-(3-deoxy-3-fluoro-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁴-benzoyl cytosine (9a)



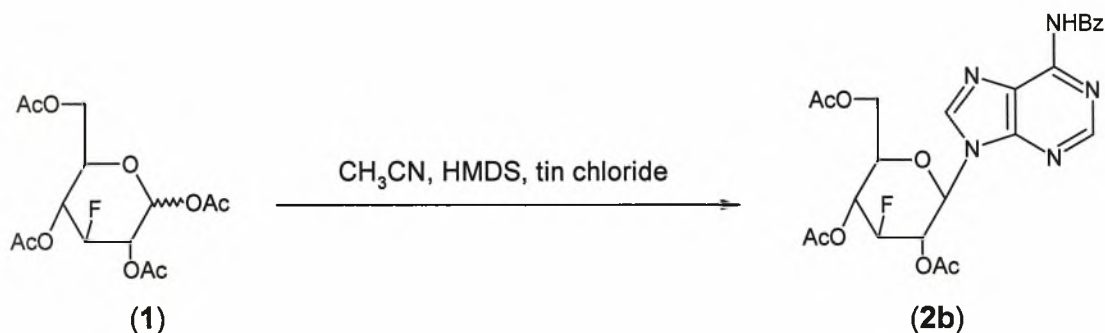
Το προϊόν 1-(3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D- glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁴-benzoyl cytosine (**8a**) (1.51 g, 2.51 mmol) διαλύεται σε ένα μίγμα από formic acid (10 mL) και diethyl ether (10 mL). Το διάλυμα αναδεύεται για 10min και στη συνέχεια διαλύεται σε τολουένιο και συναποσταζείται με τον ίδιο διαλύτη μερικές φορές για να αποφευχθεί η δημιουργία εστέρα. Στη συνέχεια το διάλυμα συμπυκνώνεται κάτω από συνθήκες αυξημένου κενού έτσι ώστε να εξατμιστούν οι διαλύτες και ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα E. Η ένωση συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται το προϊόν **9a** (0.45g). Η σύνθεση του **9a** είχε απόδοση 50%.

TLC	R _f =0.35
Απόδοση	50%

Πίνακας 7α. Αποτελέσματα σύνθεσης του 1-(3-deoxy-3-fluoro-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁴-benzoyl cytosine (**9a**)

4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης της 9-(3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl)-N⁶-benzoyl adenine (8b)

4.2.1 Σύνθεση 9-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁶-benzoyl adenine (2b)

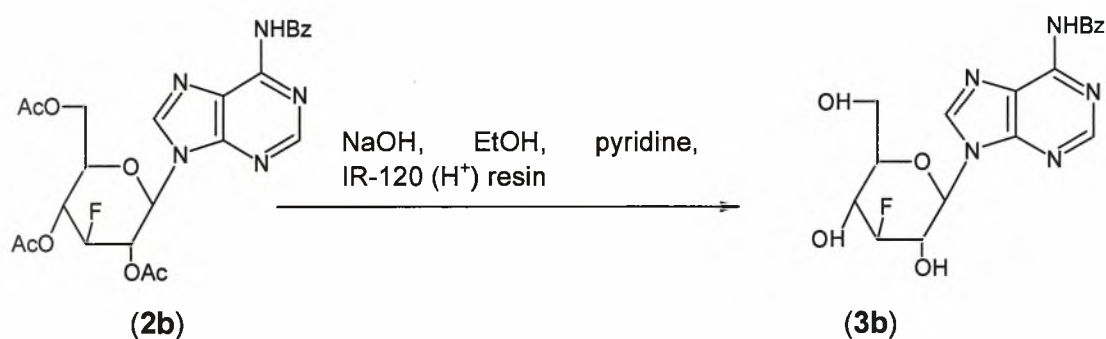


Ένα διάλυμα της N⁶-benzoyl adenine (4.44 g, 18.55 mmol), του HMDS (4.8 mL, 23mmol) και της σακχαρίνη (0.16 g, 0.85 mmol) αναδεύεται σε άνυδρο CH₃CN (69 mL) για 30min στους 120°C. Στο μίγμα αυτό προστίθεται τετραακετυλιωμένη 3-deoxy-3-fluoro-D-glucose (**1**) (5.00 g, 14.27 mmol) και tin chloride (2.35 mL, 19.98 mmol) και αφήνεται υπό ανάδευση στους 100°C για 5h. Στη συνέχεια ψύχεται και ουδετεροποιείται με υδατικό sodium bicarbonate (NaHCO₃). Ο έλεγχος της αντίδρασης γίνεται με TLC (πίνακας 1β). Στη συνέχεια ακολουθεί εκχύλιση. Η υδατική φάση πλένεται με CH₂Cl₂ και η οργανική φάση με νερό (3 X 20 mL). Στην οργανική φάση προστίθεται άνυδρο Na₂SO₄ για να απομακρυνθεί η υγρασία και τελικά το διάλυμα διηθείται και συμπυκνώνεται. Ακολουθεί χρωματογραφία στήλης με το Διάλυμα Α. Η ένωση συλλέγεται, συμπυκνώνεται και λαμβάνεται το προϊόν **2b** (4.53 g) ως στερεό. Η σύνθεση του **2b** είχε απόδοση 60%. Η ταυτοποίηση της ένωσης έγινε μέσω του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹HNMR). (βλέπε σελ. 44)

TLC (Διάλυμα A)	R _f =0.24
Απόδοση	60%

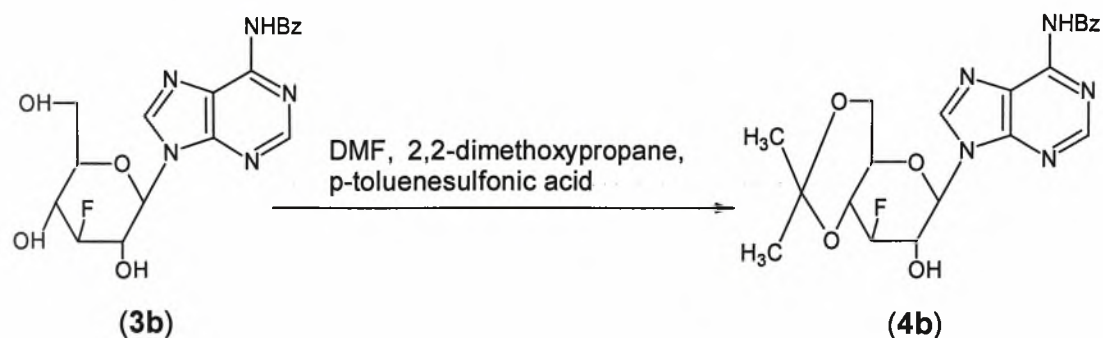
Πίνακας 1β. Αποτελέσματα σύνθεσης του 9-(2,4,6-tri-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁶-benzoyl adenine (**2b**)

4.2.2 Σύνθεση 9-(3,4-dideoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁶-benzoyl adenine (**3b**)



Το παράγωγο της αδενίνης **3b** συντίθεται από την ένωση **2b** με την ίδια ακριβώς διαδικασία που ακολουθείται για τη σύνθεση του προϊόντος **3a** και τελικά λαμβάνονται 3.04 g του **3b**. Η σύνθεση του **3b** είχε απόδοση 88%.

4.2.3 Σύνθεση 9-(3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N⁶-benzoyl adenine (**4b**)

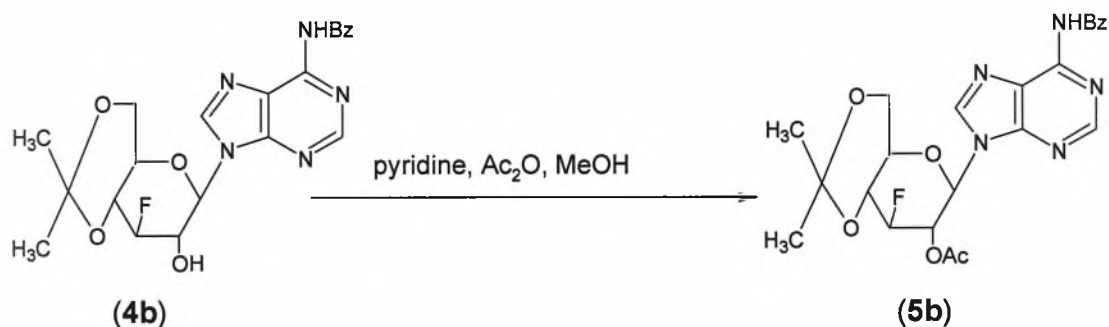


Το παράγωγο της αδενίνης **4b** συντίθεται από την ένωση **3b** με την ίδια ακριβώς διαδικασία που ακολουθείται για τη σύνθεση του προϊόντος **4a**. Στη χρωματογραφία που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό της ένωσης **4b** χρησιμοποιείται το Διάλυμα Ε και τελικά λαμβάνονται 2.54 g του **4b** με τη μορφή κίτρινου λαδιού. Η σύνθεση του **4b** είχε απόδοση 76%.

TLC (Δ/μα Ε)	R _f =0.43
Απόδοση	76%

Πίνακας 2β. Αποτελέσματα σύνθεσης του 9-(3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N⁶-benzoyl adenine (**4b**)

4.2.4 Σύνθεση 9-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-4,6-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N⁶-benzoyl adenine (**5b**)

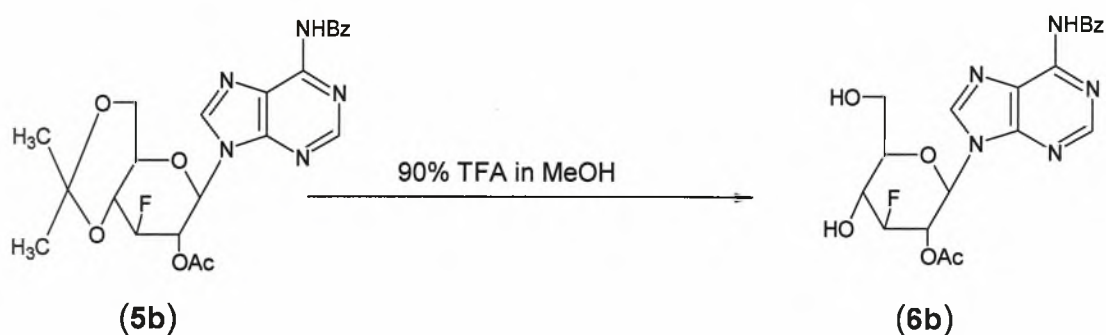


Το παράγωγο της αδενίνης **5b** συντίθεται από την ένωση **4b** με την ίδια ακριβώς διαδικασία που ακολουθείται για τη σύνθεση του προϊόντος **5a**. Στη χρωματογραφία που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό της ένωσης **5b** χρησιμοποιείται το Διάλυμα Δ και τελικά λαμβάνονται 2.22 g του **5b** με τη μορφή κίτρινου αφρού. Η σύνθεση του **5b** είχε απόδοση 80%.

TLC (Διάλυμα Δ)	R _f =0.2
Απόδοση	80%

Πίνακας 3β. Αποτελέσματα σύνθεσης του 1-(2-*O*-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-4,6-*O*-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N⁶-benzoyl cytosine (**5b**)

4.2.5 Σύνθεση 9-(2-*O*-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl)-N⁶-benzoyl adenine (**6b**)

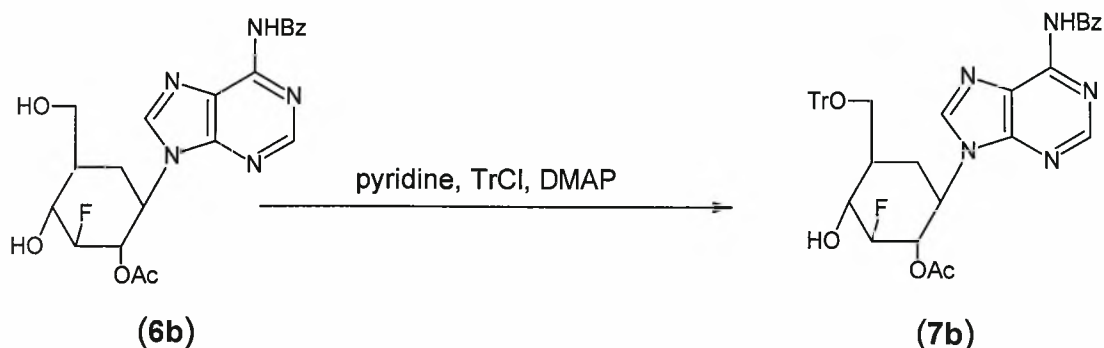


Το παράγωγο της αδενίνης **6b** συντίθεται από την ένωση **5b** με την ίδια ακριβώς διαδικασία που ακολουθείται για τη σύνθεση του προϊόντος **6a**. Στη χρωματογραφία που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό της ένωσης **6b** χρησιμοποιείται το Διάλυμα E και τελικά λαμβάνονται 1.83 g του **6b** με τη μορφή κίτρινου αφρού. Η σύνθεση του **6b** είχε απόδοση 90%.

TLC (Διάλυμα E)	R _f =0.12
Απόδοση	90%

Πίνακας 4β. Αποτελέσματα σύνθεσης του 1-(2-*O*-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-4,6-*O*-isopropylidene-β-D-glucopyranosyl)-N⁶-benzoyl cytosine (**6b**)

4.2.6 Σύνθεση 9-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glucopyranosyl)-N⁶-benzoyl adenine (7b)

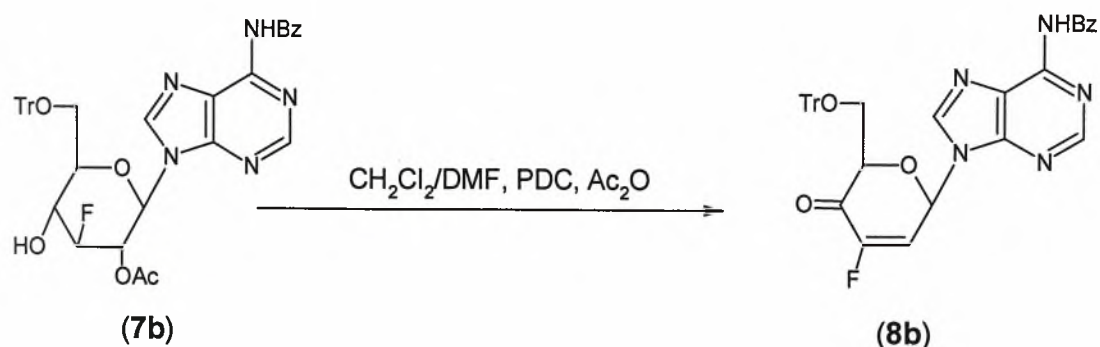


Το παράγωγο της αδενίνης **7b** συντίθεται από την ένωση **6b** με την ίδια ακριβώς διαδικασία που ακολουθείται για τη σύνθεση του προϊόντος **7a**. Στη χρωματογραφία που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό της ένωσης **7b** χρησιμοποιείται το Διάλυμα Γ και τελικά λαμβάνονται 1.75 g του **7b** με τη μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση του **7b** είχε απόδοση 62%.

TLC (Διάλυμα Γ)	R _f =0.43
Απόδοση	62%

Πίνακας 6β. Αποτελέσματα σύνθεσης του 9-(2-O-acetyl-3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glucopyranosyl)-N⁶-benzoyl adenine (**7b**)

4.2.7 Σύνθεση 9-(3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁶-benzoyl adenine (8b)

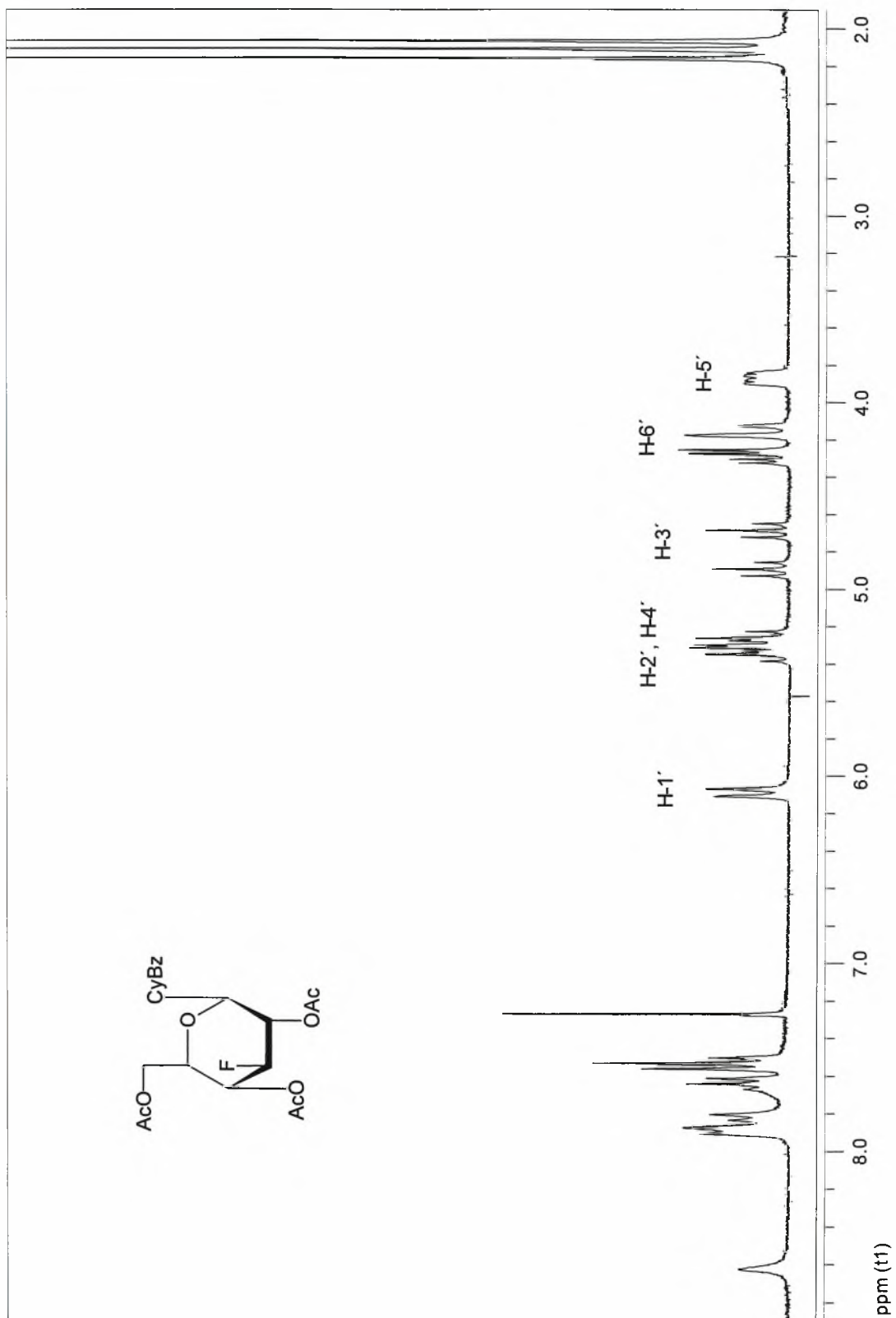


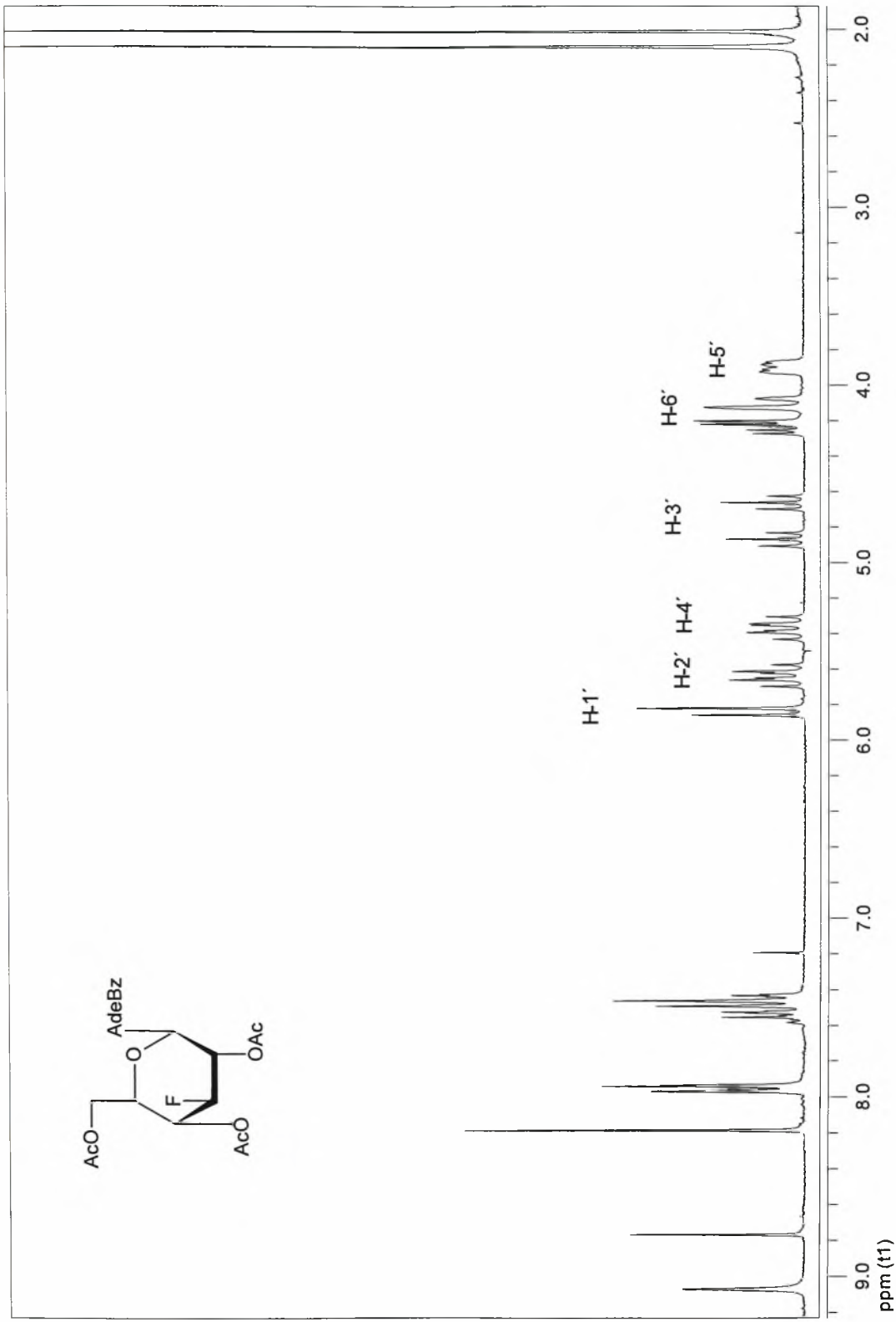
Το παράγωγο της αδερίνης **8b** συντίθεται από την ένωση **7b** με την ίδια ακριβώς διαδικασία που ακολουθείται για τη σύνθεση του προϊόντος **8a**. Στη χρωματογραφία που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό της ένωσης **8b** χρησιμοποιείται το Διάλυμα Γ και τελικά λαμβάνονται 0.8 g του **8b** με τη μορφή λευκού στερεού. Η σύνθεση του **8b** είχε απόδοση 50%.

TLC (Διάλυμα Γ)	R _f =0.38
Απόδοση	50%

Πίνακας 6β. Αποτελέσματα σύνθεσης του 9-(3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁶-benzoyl adenine (**8b**)

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR





6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης φθορονουκλεοσιδίων με πιθανή αντιική και αντικαρκινική δράση.

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

Η σύνθεση και αξιολόγηση της βιολογικής δράσης μιας νέας τάξης ακόρεστων νουκλεοσιδίων η οποία θα έχει: α) τη N⁶-βενζόουλο αδενίνη ή τη N4-βενζόουλο κυτοσίνη σαν ετεροκυκλική βάση, β) φθόριο στη θέση 3' του σακχάρου και γ) την κετο-ομάδα στη θέση 4'. Βρέθηκε ότι τα τροποποιημένα νουκλεοσίδια παίρνουν μέρος στην αντιμετώπιση και θεραπεία ασθενειών με τη δράση τους ως αντιικά και αντικαρκινικά φάρμακα.

Τα φθορονουκλεοσίδια χρησιμοποιούνται στη βιοχημεία, ιατρική χημεία και φαρμακολογία ως αντιικά 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 αντιικό 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 ιικής 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 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 νουκλεοσιδίων, 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 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)

Τα νέα μόρια **8a**, **8b** και **9a**, εξετάστηκαν για την κυτταροτοξική τους δράση σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές: καρκίνομα του κόλον (Caco-2), καρκίνομα του στήθους (MCF-7), μελάνωμα του δέρματος καθώς και φυσιολογικά ανθρώπινα εντερικά κύτταρα (H4, control κυτταρική σειρά).

Μεταξύ των εξεταζόμενων φθοριομένων κετοπυρανοσυλο νουκλεοσιδικών αναλόγων, η ένωση 1-(3-deoxy-3-fluoro-6-O-trityl-β-D-glycero-hex-2-enopyranosyl-4-ulose)-N⁴-benzoyl cytosine (**8a**) παρουσίασε την καλύτερη κυτταροτοξική δράση, ιδιαίτερα ενάντια στα κύτταρα μελανώματος του δέρματος (CC₅₀ = 3.3 μM). Το ίδιο ανάλογο της αδενίνης **8b**, εμφάνισε περίπου τρεις φορές χαμηλότερη κυτταροτοξική δράση ενάντια στα κύτταρα μελανώματος του δέρματος σε σύγκριση με το **8a** (CC₅₀=9.5 μM). Παρόλ' αυτά, ενάντια στις υπόλοιπες καρκινικές σειρές, τόσο η δραστηριότητα όσο και η επιλεκτικότητα αυτών των δύο μορίων ήταν συγκρίσιμες. Σε σύγκριση με την 5-φθοροοθρακίλη (**5FU**), η ένωση **8a** εμφανίστηκε 16 φορές πιο επιλεκτική στα κύτταρα MCF-7, 3 φορές πιο επιλεκτική στα κύτταρα μελανώματος του δέρματος και 2.5 φορές πιο επιλεκτική στα κύτταρα Caco-2.

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, I-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.phvspharm.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 proteines 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. *Carbohydr. 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

