



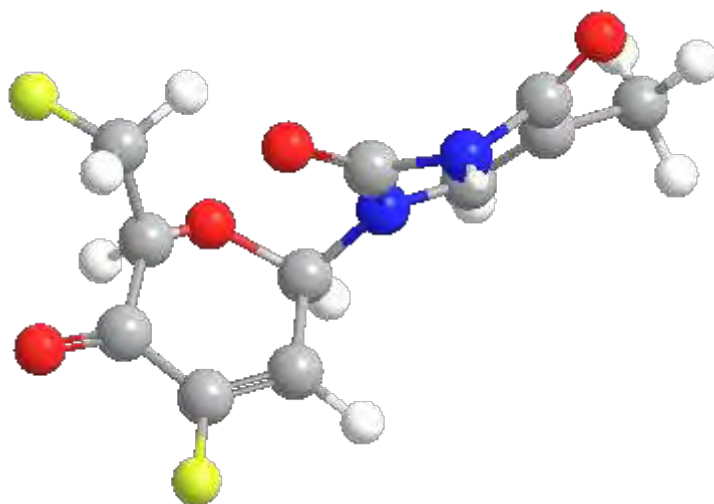
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας - Μοριακή Γενετική -
Διαγνωστικοί Δείκτες**

ΠΑΝΑΓΗ ΠΑΥΛΟΣ

Διπλωματική Εργασία

**Σύνθεση νέων διφθορο κετοακόρεστων νουκλεοζιτών
ως πιθανοί κυτταροστατικοί παράγοντες**



Λάρισα 2011

Διπλωματική Εργασία

Σύνθεση νέων διφθορο κετοακόρεστων νουκλεοζιτών ως
πιθανοί κυτταροστατικοί παράγοντες

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κομιώτης Δημήτριος — Αναπληρωτής Καθηγητής Οργανικής Χημείας του
Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαρκουλάτος Παναγιώτης –Καθηγητής Μικροβιολογίας του Τμήματος
Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζίφα Αιμιλία - Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας – Νευροβιολογίας του
Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Κομιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το ιδιαίτερα ενδιαφέρον αυτό θέμα, τις εποικοδομητικές και πολύτιμες υποδείξεις του και την αμέριστη συμπαράστασή του.

Επίσης εκφράζω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Μαρκουλάτο Παναγιώτη και Ζίφα Αιμιλία για την ευγενική συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Στην κα. Στυλιανή Μαντά-ΠΔ407 του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας εκφράζω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την ουσιαστική βοήθεια, συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχαν όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για το δημιουργικό, ευχάριστο και φιλικό κλίμα, με το οποίο με περιέβαλε.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντιιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες ανήκουν στην τάξη των νουκλεοζιδίων. Οι νουκλεοζίτες αποτελούνται από έναν μονοσακχαρίτη με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο, ενωμένο με μια ετεροκυκλική βάση. Λόγω αυτών τους των ιδιοτήτων, μεγάλο μέρος της έρευνας για ανάπτυξη φαρμάκων με παρόμοιες αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες εστιάζεται στα ανάλογα των νουκλεοζιδίων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση και η βιολογική αποτίμηση ενός καινούργιου νουκλεοζίτη, του διφθορο κετοακόρεστου πυρανονουκλεοζιτικού αναλόγου της θυμίνης. Αναλύεται η συνθετική οδός που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του καθώς και η μέθοδος ταυτοποίησής του.

ABSTRACT

Many naturally occurring antibiotics with antiviral and antineoplastic qualities belong to the nucleoside family. Nucleosides are comprised by a monosaccharide with a five membered or six membered ring joined with a heterocyclic base. Due to the qualities exhibited by nucleosides, a great deal of research is focused on the synthesis of nucleoside analogues that carry similar antiproliferative properties to the parent compounds.

This thesis describes the synthesis and biological evaluation of a novel nucleoside analogue, that of the ketounsaturated difluoro thymine. Within, the synthetic route and identification of the said compound are detailed.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή

1.1. Υδατάνθρακες

1.1.1. Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές :Σχηματισμός ημιακετάλης

1.1.2. Ανωμερή μονοσακχαριτών και διαμορφώσεις τους

1.2. Νουκλεοζίτες

1.2.1. Αντιικοί νουκλεοζίτες

1.2.2. Αντικαρκινικοί νουκλεοζίτες

1.2.3. Τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών

1.2.4. Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες

1.2.5. Φουρανονουκλεοζίτες

1.2.6. Πυρανονουκλεοζίτες

1.2.6.1. Φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες

1.2.6.2. Φθοριωμένοι ακόρεστοι κετοπυρανονουκλεοζίτες

2. Στόχοι της παρούσης διατριβής

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά

3.1.1. Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων

3.2. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.2.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography)

3.2.2. Χρωματογραφία στήλης

3.2.3. Ξήρανση διαλυτών

3.2.4. Ταυτοποίηση ενώσεων

3.3. Μέθοδοι

3.3.1. Επισκόπηση της συνθετικής οδού

3.3.2. Μεθοδολογία της σύνθεσης

3.3.3. Σύνθεση προϊόντων με βάση τη θυμίνη

3.3.3.1. Σύνθεση της 1-(3'-δεοξυ-3'-φθορο-2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- θυμίνη

3.3.3.2. Σύνθεση της 1-(3',4'-διδεοξυ-3'-φθορο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- θυμίνη

- 3.3.3.3. Σύνθεση της 1-(3'-δεοξυ-3'-φθορο-4',6'-Ο-ισοπροπυλιδενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- θυμίνη
- 3.3.3.4. Σύνθεση της 1-(2'-Ο-ακετυλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-4',6'-Ο-ισοπροπυλιδενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- θυμίνη
- 3.3.3.5. Σύνθεση της 1-(2'-Ο-ακετυλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- θυμίνη
- 3.3.3.6. Σύνθεση της 1-(2'-Ο-ακετυλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-6-φθορο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- θυμίνη
- 3.3.3.7. Σύνθεση της 9-(3'-δεοξυ-3'-φθορο-6-Ο-φθορο-β-D-γλυκεροεξ-ενολοπυρανοζυλο-4-ουλοζο)- θυμίνη

4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR

5. Αποτελέσματα – Συζήτηση

6. Βιβλιογραφία

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Νουκλεοζιτικά ανάλογα, μόρια τα οποία προκύπτουν από δομικές τροποποιήσεις των φυσικών νουκλεοζιτών που ανήκουν στη γενικότερη κατηγορία των β-N-γλυκοζιτών, έχουν διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο στη θεραπεία των ιογενών λοιμώξεων και του καρκίνου. Η συντριπτική πλειοψηφία των εγκεκριμένων φαρμάκων, από την Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA), για τη θεραπεία των ιογενών λοιμώξεων είναι νουκλεοζιτικά ανάλογα, συμπεριλαμβανομένων των Zidovudine, Didanosine, Zalcitabine, Lamivudine και Acyclovir (Σχήμα 1). Επί του παρόντος, μία σειρά φαρμάκων, που βρίσκονται στο στάδιο των κλινικών, για την θεραπεία λοιμώξεων από τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV), είναι νουκλεοζιτικά ανάλογα και εμπίπτουν στην κατηγορία των αναστολέων της πολυμεράσης. Όσον αφορά στη χημειοθεραπεία, οι νουκλεοζίτες ή ανάλογα νουκλεοβάσεων, ήταν οι πρώτοι που θεσπίστηκαν για τη θεραπεία του καρκίνου. Μερικά παραδείγματα εγκεκριμένων από την FDA αντικαρκινικών νουκλεοζιτών είναι η Cytarabine (λευχαιμία), η 5-φθοροουρακίλη (5-FU, καρκίνος δέρματος), και η Gemcitabine (dFdC, καρκίνος μαστού, παγκρέατος, πνευμόνων και ωοθηκών). Μεγάλος αριθμός των νουκλεοζιτικών αναλόγων δρουν ως αντιμεταβολίτες, ανταγωνίζονται τους φυσικούς νουκλεοζίτες και αλληλεπιδρούν με έναν μεγάλο αριθμό των ενδοκυττάριων στόχων με σκοπό την πρόκληση κυτταροτοξικότητας. Πολλοί από αυτούς είναι αναστολείς ενζύμων και στοχεύουν την αντίστροφη μεταγραφάση και άλλες πολυμεράσες, κινάσες και υδρολάσες, και χρησιμοποιούνται έναντι πολυάριθμων και διαφορετικών βακτηριακών λοιμώξεων, όπως η ελονοσία και η φυματίωση. Άλλοι ενσωματώνονται κατά την αντιγραφή ή την επιδιόρθωση του DNA, οδηγώντας έτσι στον τερματισμό της διαδικασίας σύνθεσής του. Τέλος, έρευνες βρίσκονται σε εξέλιξη με σκοπό την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των μορίων-μεταφορέων των νουκλεοζιτών και των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό τους.

1.1. Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων που απαντώνται ευρέως στην φύση και έχουν ως γενικό χημικό τύπο την μορφή $C_n(H_2O)_n$. Η βιολογική τους σημασία ως μόρια είναι μεγάλη, διότι μπορούν να αποτελέσουν δομικά στοιχεία των κυττάρων, πηγή ενέργειας, όπως επίσης και μέρος άλλων μακρομορίων, όπως γλυκοπρωτεΐνες, λιποπολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα.

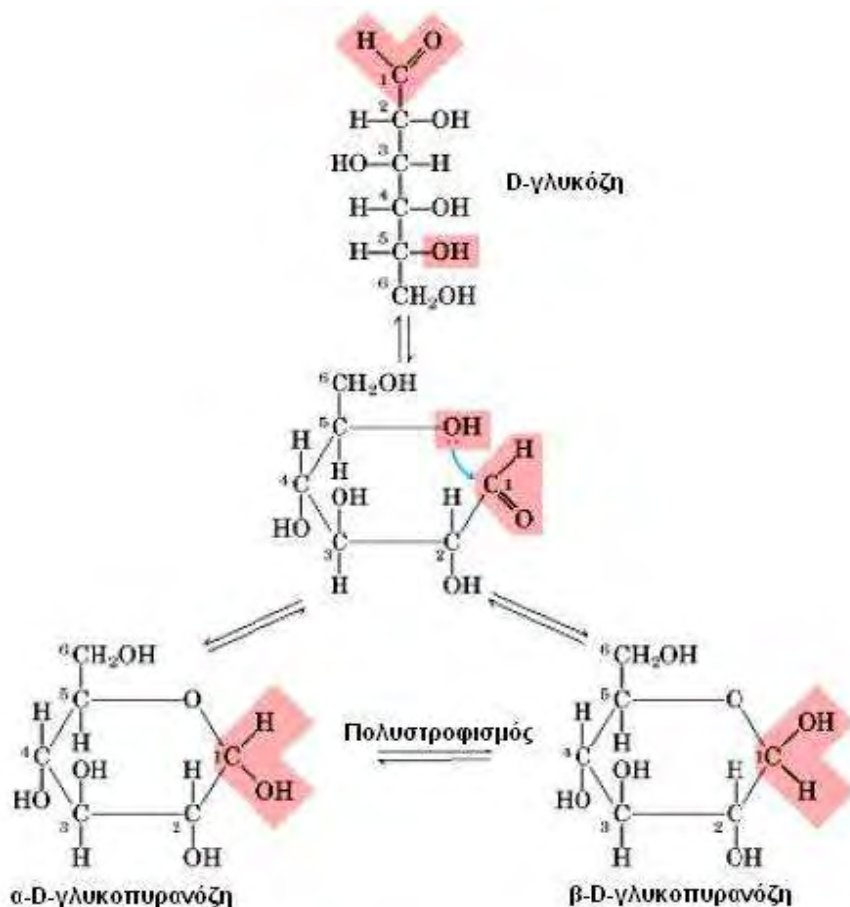
Ο όρος υδατάνθρακες αναφέρεται σε μια ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών, που ονομάζονται κοινώς σάκχαρα. Τα μικρότερα από άποψη μοριακού βάρους είναι οι μονοσακχαρίτες, ακολουθούν οι δισακχαρίτες, οι ολιγοσακχαρίτες και τέλος οι πολυσακχαρίτες με πολύ υψηλά μοριακά βάρη. Πιο αναλυτικά, οι παραπάνω κατηγορίες υδατανθράκων είναι οι εξής:

- Μονοσακχαρίτες: χαρακτηριστικές ενώσεις της κατηγορίας αυτής είναι η γλυκόζη, η μαλτόζη και η φρουκτόζη. Αποτελούν μονομερή για τη σύνθεση πολυπλοκότερων δομών που προκύπτουν από πολυμερισμό τους.
- Δισακχαρίτες: χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι η λακτόζη, η σουκρόζη και η μαλτόζη που αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες.
- Ολιγοσακχαρίτες όπως οι φρουκτολιγοσακχαρίτες. Αυτές οι ενώσεις αποτελούνται από 20-30 μονομερή μονοσακχαριτών.
- Πολυσακχαρίτες: χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη. Δημιουργούνται με πολυμερισμό μονοσακχαριτών και το κάθε μόριο πολυσακχαρίτη δύναται να αποτελείται από εκατοντάδες χιλιάδες μονομερή.

1.1.1. Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές :Σχηματισμός ημιακετάλης

Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν σε δύο μορφές. Την μορφή ανοικτής αλυσίδας και την κυκλοποιημένη τους μορφή. Από άποψη χημικής δομής τα σάκχαρα χωρίζονται αναλόγως με το μέγεθος της αλυσίδας του άνθρακα, παραδείγματος χάριν σε πεντόζες, αν έχουν πέντε μόρια άνθρακα, ή εξόζες αν έχουν έξι.

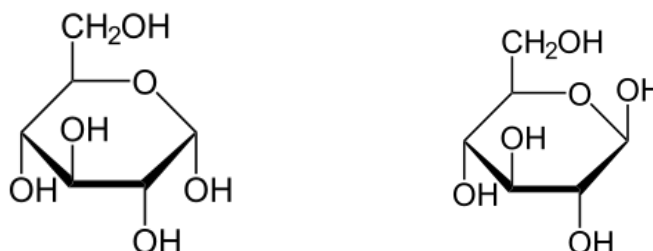
Τα σάκχαρα απαντώνται σε κυκλική μορφή όταν μια καρβονυλική ομάδα του μορίου τους αντιδρά με μια ομάδα υδροξυλίου, προς δημιουργία ημιακετάλης. Αυτή η αντίδραση είναι μια ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη που οδηγεί στην δημιουργία πυρανοζών ή φουρανοζών (Σχήμα 1) Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοικτής και κλειστής αλυσίδας.



Σχήμα 1: Κυκλοποίηση μονοσακχαρίτη μέσω αντίδρασης ημιακετάλης.

Δυο παραδείγματα αυτής της αντίδρασης είναι η δημιουργία πυρανόζης από την γλυκόζη και η δημιουργία φουρανόζης από την φρουκτόζη. Στην περίπτωση της γλυκόζης, η αλδεϋδική ομάδα του άνθρακα C-1 αντιδρά με το υδροξύλιο που βρίσκεται στην θέση C-5, σχηματίζοντας μια ενδομοριακή ημιακετάλη και στην συνέχεια παράγοντας τον εξαμελή δακτύλιο της πυρανόζης. Η περίπτωση της φουρανόζης είναι παρόμοια. Η κετονική ομάδα στον άνθρακα C-2 αντιδρά με το υδροξύλιο του άνθρακα C-5 που οδηγεί στον σχηματισμό μιας ενδομοριακής ημιακετάλης, έχοντας ως αποτέλεσμα την δημιουργία δακτυλίου φουρανόζης.

Η κυκλοποίηση των σακχάρων μέσω ημιακετάλης είναι μεγάλης σημασίας διότι με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα πρόσθετο στερεογονικό κέντρο στο μόριο και παρουσιάζεται το φαινόμενο της ανωμερείας. Στην περίπτωση της γλυκόζης ο άνθρακας C-1 είναι ανωμερής με αποτέλεσμα να μπορούν να σχηματιστούν δυο στερεοχημικές δομές: της α-D-γλυκοπυρανόζης και της β-D-γλυκοπυρανόζης (Σχήμα 2). Στην περίπτωση της φρουκτόζης, ο ανωμερής άνθρακας είναι ο C-2. Το α ή το β καταδεικνύει σε ποια θέση στον χώρο βρίσκεται η ύδροξυ ομάδα του ανωμερούς άνθρακα σε σχέση με τον υποκαταστάτη του C-5 άνθρακα. Αν ο υποκαταστάτης (υδροξύλιο σε αυτή την περίπτωση) του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται σε θέση trans, κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου προς τον υποκαταστάτη στον άνθρακα C-5 τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως μορφής α. Αν συμβαίνει το αντίθετο, δηλαδή ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται σε θέση cis, πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου, ως προς τον υποκαταστάτη του άνθρακα C-5 τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως μορφής β.

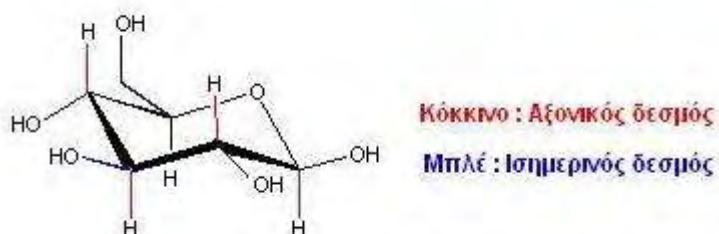


Σχήμα 2: Αριστερά α-D-γλυκοπυρανόζη, Δεξιά β-D-γλυκοπυρανόζη

Η στερεοδιάταξη του δακτυλίου παρουσιάζει επίσης ενδιαφέρον λόγω της συμπεριφοράς των υποκαταστατών του, όσον αφορά την διάταξή τους σε σχέση με το επίπεδο του δακτυλίου. Συγκεκριμένα διακρίνονται δυο είδη υποκαταστατών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί. Ως αξονικοί υποκαταστάτες ορίζονται οι υποκαταστάτες που βρίσκονται παράλληλα στον άξονα του δακτυλίου, δηλαδή κάθετα στο επίπεδό του. Αντιθέτως, οι ισημερινοί υποκαταστάτες βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με τον δακτύλιο (Σχήμα 3).

Τα παραπάνω έχουν επίπτωση στην χημική συμπεριφορά του μορίου. Δύναται να εμφανιστούν φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης μεταξύ αξονικών υποκαταστατών, εκτός υδρογόνου, αν αυτοί βρεθούν στην ίδια πλευρά του δακτυλίου. Το αν θα εμφανιστούν έχει σχέση με την φύση του υποκαταστάτη όπως την ακτίνα Van der Waals του και την πυκνότητα του νέφους ηλεκτρονίων. Οι ισημερινοί υποκαταστάτες δεν παρουσιάζουν αυτό το φαινόμενο, οπότε η υποκατάσταση στο ισημερινό επίπεδο είναι κατά κόρον σταθερότερη.

Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρείται είναι η αλληλεπίδραση αξονικών και ισημερινών υποκαταστατών, που προκαλεί τάση στο μόριο ικανή να το διαμορφώσει περαιτέρω στερεοχημικά. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται 1,3-διαξονική στερεοχημική τάση και εξαρτάται από το μέγεθος όπως επίσης και την φύση του εκάστοτε υποκαταστάτη. Ως αποτέλεσμα του παραπάνω οι φουρανόζες και οι πυρανόζες δεν είναι επίπεδες στον χώρο αλλά μπορούν να υιοθετήσουν διάφορες στερεοδιαμορφώσεις. Ο δακτύλιος της πυρανόζης μπορεί να λάβει τις μορφές chair, boat, half-chair, skew και envelope, ενώ ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να λάβει λιγότερες μορφές στερεοχημικών διαμορφώσεων, δηλαδή τις μορφές envelope και twist.



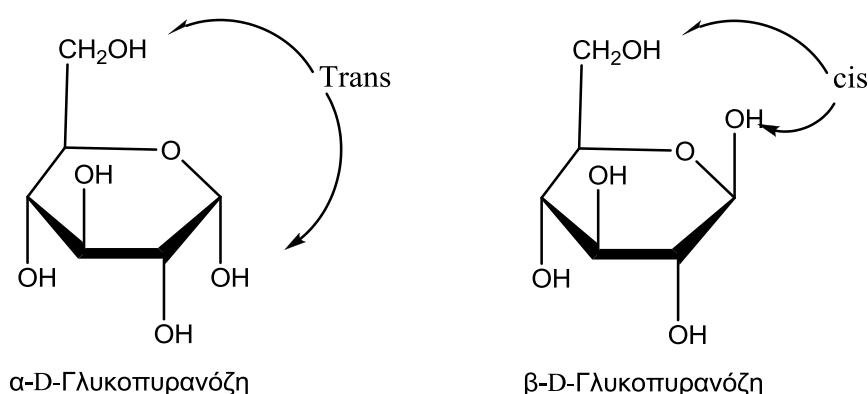
Σχήμα 3: Αξονικοί (κόκκινοι) υποκαταστάτες και ισημερινοί (μπλέ) υποκαταστάτες

1.1.2. Ανωμερή μονοσακχαριτών και διαμορφώσεις τους

Όταν η ανοικτή αλυσίδα ενός μονοσακχαρίτη υποστεί κυκλοποίηση, αποκτώντας τη δομή της φουρανόζης ή της πυρανόζης, σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Τα δύο νέα διαστερεομερή ονομάζονται **ανωμερή** και ο ημιακεταλικός άνθρακας **ανωμερικό κέντρο** (Mc Murry, 2000, p. 1249). Για παράδειγμα, στη γλυκόζη με την αντιστρεπτή της κυκλοποίηση προκύπτουν δύο δομές, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη.

Στην περίπτωση της α-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «α» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση trans ως προς τον υποκαταστάτη $\text{--CH}_2\text{OH}$ του C-5 (δηλαδή βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου).

Στην περίπτωση της β-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «β» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση cis ως προς τον υποκαταστάτη $\text{--CH}_2\text{OH}$ του C-5 (δηλαδή βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου) (Σχήμα 4).



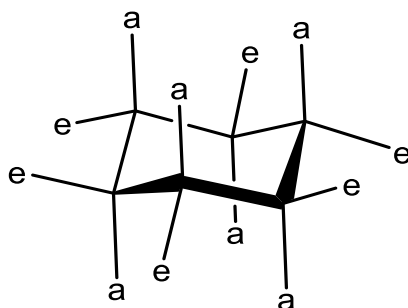
Σχήμα 4: Προβολές των ανωμερών της D-γλυκόζης

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

Οι προηγούμενες δομές (Haworth) αν και εύχρηστες δεν μας παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης. Ο συγκεκριμένος δακτύλιος δεν είναι δυνατόν να είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα.

Αντίθετα, οι δακτύλιοι της πυρανόζης μπορούν να υιοθετήσουν στερεοδιατάξεις ανάκλιντρου, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι τάσεις, εφόσον όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνιάς (Mc Murry, 2000, p. 151). Οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου είναι δύο ειδών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί (Σχήμα 5). Οι αξονικοί δεσμοί είναι σχεδόν κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί δεσμοί είναι σχεδόν παράλληλοι προς το επίπεδο αυτό. Οι αξονικοί υποκαταστάτες προβάλλουν πάνω και κάτω από το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί υποκαταστάτες διατάσσονται στην περιφέρεια. Οι αξονικοί υποκαταστάτες, εκτός του υδρογόνου, παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλο, αν ξεπροβάλουν από την ίδια πλευρά του δακτυλίου.

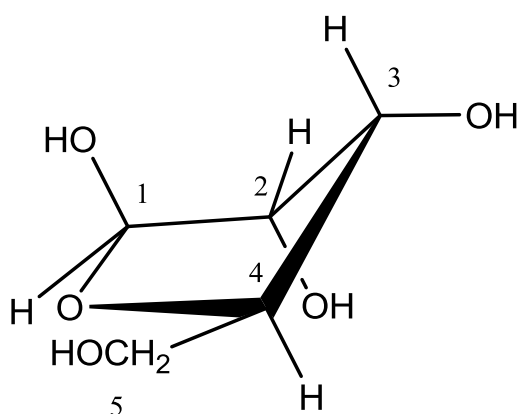
Αντίθετα, υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για τους ισημερινούς υποκαταστάτες. Έτσι, ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ότι στην αξονική θέση.



Σχήμα 5: Μορφή ανάκλιντρου μιας πυρανόζης (e = ισημερινός υποκαταστάτης, a = αξονικός υποκαταστάτης)

Κατά αναλογία ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να είναι πτυχωμένος, έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού (σχήμα 6). Αυτή η διαμόρφωση καλείται μορφή φακέλου. Οι δακτύλιοι της φουρανόζης είναι σε θέση να αλληλομετατρέπονται ταχύτατα σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις.

Είναι πολύ πιο ευέλικτοι από τους δακτυλίους της πυρανόζης, γεγονός που εξηγεί την επιλογή τους ως συστατικών του RNA και DNA (Stryer, 1997).

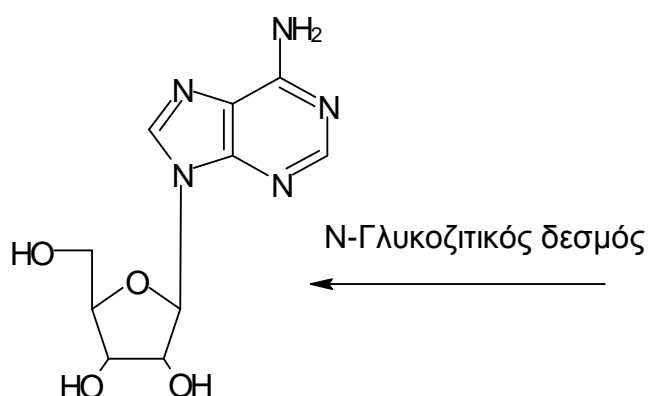


Σχήμα 6: Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης

1.2. Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες, οι οποίες προκύπτουν από την ένωση μιας εκ των βάσεων (θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, αδείνη, ουρακίλη) και ενός σακχάρου που μπορεί να είναι είτε ριβόζη είτε δεοξυριβόζη. Απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στην φύση διότι αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Μερικά παραδείγματα τέτοιων ριβονουκλεοζιτών είναι η γουανοσίνη, η κυτιδίνη, η θυμιδίνη και η αδενοσίνη.

Από άποψη χημικής δομής οι νουκλεοζίτες αποτελούνται από μια βάση, που είναι είτε μια πουρίνη είτε μια πυριμιδίνη, ενωμένη με τον C-1 μιας πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό (Berg J. M. *et al*, 2001). Στη φύση όπου απαντώνται N-γλυκοζιτικοί δεσμοί πάντα η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου, οπότε χαρακτηρίζονται ως νουκλεοζίτες β στερεοδιάταξης (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Η β-στερεοδιάταξη του N-γλυκοζιτικού δεσμού της αδενοσίνης

Οι νουκλεοζίτες και τα τροποποιημένα ανάλογά τους έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης μελέτης διότι επιδεικνύουν πολύ ενδιαφέρουσες αντικαρκινικές, αντιιικές, αντιοξειδωτικές και αντιυπεργλυκαιμικές ιδιότητες (Tsirkone G. *et al*, 2010; Balatsos N. A. *et al*, 2009; Tiwari N. *et al*, 2009)

Το ενδιαφέρον για την όσο το δυνατό καλύτερη κατανόηση της σχέσης δομής-δράσης των νουκλεοζιτών έχει ενταθεί με σκοπό την δημιουργία ισχυρότερων αναλόγων και επέκτασης της του φάσματος των πιθανών θεραπευτικών εφαρμογών τους.

1.2.1. Αντιικοί νουκλεοζίτες

Κατά την τελευταία δεκαετία, η θεραπεία των ιικών μολύνσεων προοδεύει σημαντικά, λόγω των προσπαθειών των χημικών και των φαρμακολόγων, της ραγδαίας ανάπτυξης της μοριακής ιολογίας, καθώς και της συσσωρευμένης γνώσης επί λεπτομερειακών μηχανισμών δράσης των αντιικών ενώσεων (Kinchington 1999, Painsil and Cheng 2009, Field and Hodge 2008, Komiotis *et al.* 2008).

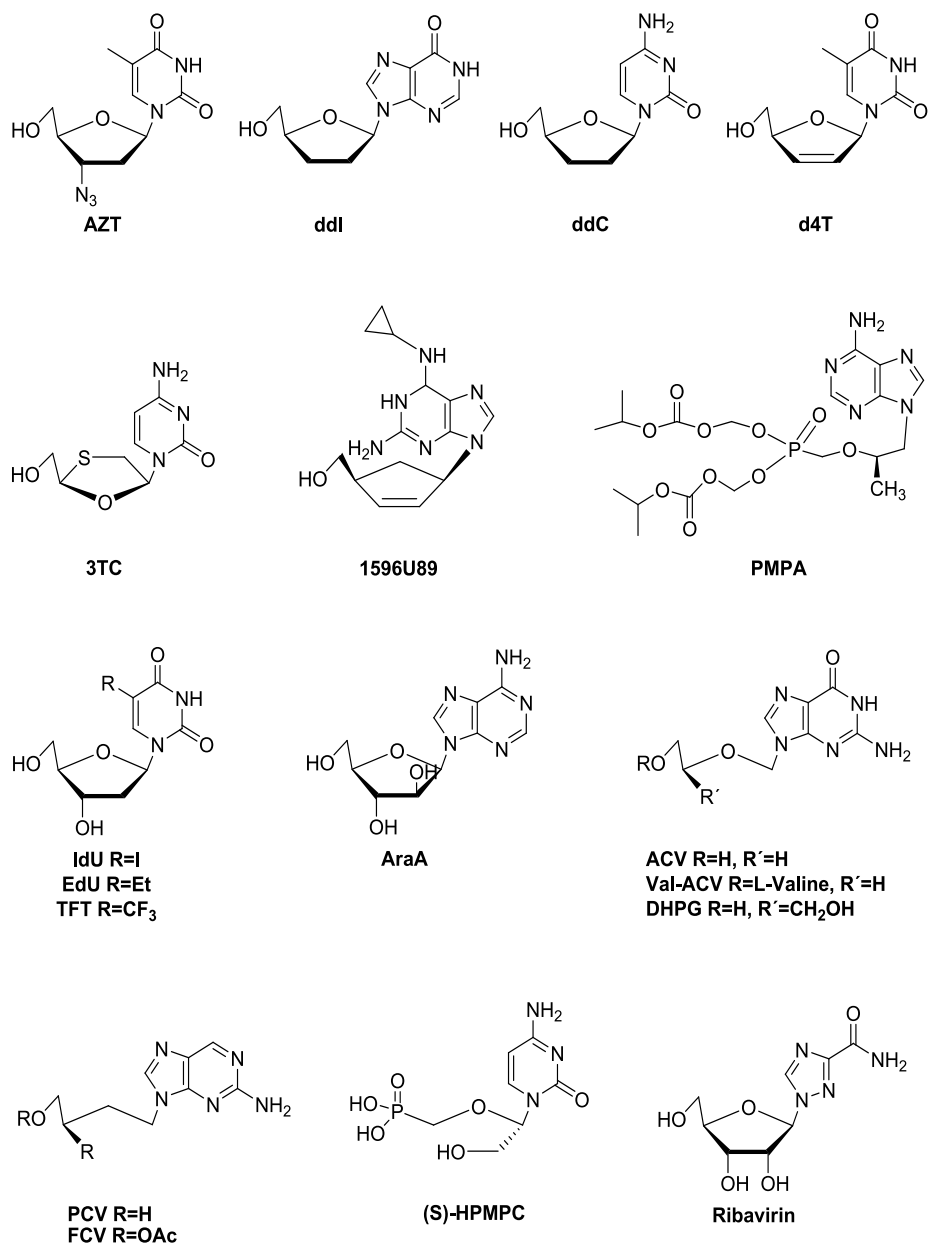
Τελευταία, εμφανίζεται μία έκρηξη νέων και αναδυόμενων ιικών ασθενειών, όπως αυτές που προκαλούνται από νέα στελέχη του ιού της ηπατίτιδας και του απλού έρπητα, του ιού του Έμπολα και του δυτικού Νείλου, ιοί, οι οποίοι είναι ικανοί να προκαλέσουν πανδημία. Ωστόσο, αν και ο εμβολιασμός αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την αντιμετώπιση των ιικών λοιμώξεων, η δυσκολία οργάνωσης συναφών προγραμμάτων εμβολιασμού καθιστά την αντιική χημειοθεραπεία μία πιο πρακτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση επιδημικών ιογενών λοιμώξεων.

Μεταξύ των πιο επιτυχημένων αντιικών παραγόντων, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αποτελούν θεμελιώδη λίθο στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τον ιό του απλού έρπητα (Herpes Simplex Virus), γνωστό από τα αρχικά του ξενόγλωσσου ονόματός του ως HSV και περιλαμβάνει τα υποείδη HSV₁ και HSV₂, τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (Human Cytomegalovirus) ή HCMV, τον ιό ερπηζωστήρα (varicella-zoster virus) ή VZV, τον ιό της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας τύπου 1 (HIV₁) και τον ιό της ηπατίτιδας B (HBV) και C (HCV).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι έχει ανακαλυφθεί μεγάλος αριθμός βιοδραστικών νουκλεοζιτών, πολλοί από τους οποίους χρησιμοποιούνται κλινικά για τη θεραπεία των μολύνσεων από τους HIV₁, HSV, αναπνευστικό συγκυτιακό ιό (RSV), HBV και HCV, ως συναγωνιστικοί αναστολείς των ιικών πολυμερασών, είτε της αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTIs) ή της DNA πολυμεράσης.

Ειδικότερα, μεταξύ των NRTIs, το Lamivudine [3TC, (-)-2',3'-διδεσοξυ-3'-θειακυτιδίνη] είναι το φάρμακο, το οποίο χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της μόλυνσης από τον ιό HBV και είναι ένα από αυτά που έχουν εγκριθεί από

τον FDA, ενώ το Zidovudine [AZT, (Retrovir), 3'-αζιδο-3'-δεσοξυθυμιδίνη] αποτελεί φάρμακο, το οποίο χορηγείται για τη θεραπεία των μολύνσεων από τον ιό HIV₁ (Σχήμα 8).



Σχήμα 8

Ακόμη, νουκλεοζιτικοί αναστολείς που αποτελούν εν χρήση αντιικά φάρμακα είναι οι Idoxuridine (IdU, 5-ιωδο-2'-δεσοξουριδίνη), Trifluridine (TFT, 2'-δεσοξυ-5-τριφθορομεθυλουριδίνη), acedurid (ασεδουρίδη, EdU),

Vidarabine [Ara-A, 9-(1β-D-αραβινοφουρανοζυλ)αδενίνη] κ.α., που χρησιμοποιούνται κατά των ερπητοϊών, τα φάρμακα Didanosine (ddI, 2',3'-διδεσοξυϊνόςίνη), Stavudine (d4T) κ.α. που χρησιμοποιούνται κατά του ιού του AIDS, καθώς και το φάρμακο Ribavirine [(Virazol), 1-(1β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1H-1,2,4-τριαζολο-3-καρβοξαμίδιο] που χρησιμοποιείται κατά των ιών της ηπατίτιδας, της γρίππης και του AIDS (Πίνακας 1, Σχήμα 8).

Πίνακας 1. Αντιικοί νουκλεοζίτες που χρησιμοποιούνται κλινικά

Γενική Ονομασία	Ακρώνυμο	Ιοί-Στόχοι	Μηχανισμός Δράσης
Αντί-HIV παράγοντες			
Zidovudine	AZT	HIV-1	<div> <div></div> <div>Αναστολείς της αντίστροφης Μεταγραφάσης Τερματισμός αλυσίδας</div> </div>
Didanosine	ddI	HIV-1	
Zalcitabine	ddC	HIV-1	
Stavudine	d4T	HIV-1	
Lamivudine	3TC	HIV-1	
Abacavir	1596U89	HIV-1	
Tenofovir disoproxil	PMPA	HIV-1	
Αντι-HBV παράγοντες			
Lamivudine	3TC	HBV	Αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης/Τερματισμός αλυσίδας
Αντι-Ερπητικοί παράγοντες			
Idoxuridine	IdU	HSV-1/2	<div> <div></div> <div>Αναστολείς DNA πολυμεράσης</div> </div>
Trifluridine	TFT	HSV-1/2	
Acedurid	EdU	HSV-1/2	
Vidarabine	AraA	HSV-1/2	
Acyclovir	ACV	HSV-1/2, VZV	Εκλεκτικός αναστολέας ιικής DNA πολυμεράσης
Valaciclovir	val-ACV	HSV-1/2, VZV	Προφάρμακο του acyclovir
Penciclovir	PCV	HSV-1/2, VZV	Εκλεκτικός αναστολέας ιικής DNA πολυμεράσης
Famciclovir	FCV	HSV-1/2,	Προφάρμακο του PCV

Ganciclovir Cidofovir	DHPG (S)-HPMPC	VZV HCMV HCMV	Εκλεκτικοί αναστολείς ιικής DNA πολυμεράσης
Virazole	Ribavirin	RSV,HCV	
			Αναστολέας ιικής RNA πολυμεράσης

Στην κατηγορία των συναγωνιστικών αναστολέων ανήκουν και ενώσεις που δεν είναι χημικώς νουκλεοζίτες και χαρακτηρίζονται ως συναγωνιστικοί μη νουκλεοζιτικοί αναστολείς. Πρόκειται κυρίως για παράγωγα της πουρίνης ή της πυριμιδίνης που, αν και δεν είναι γλυκοζίτες (δεν περιέχουν σάκχαρο), παρουσιάζουν δομική αναλογία με τους νουκλεοζίτες, όπως είναι π.χ. το φάρμακο Acyclovir [(zovirax), ACV, 9-γουανινομεθοξυαιθανόλη], το προφάρμακο Valaciclovir [(valtrex), Val-ACV] που είναι ο εστέρας του acyclovir με την L-βαλίνη, Ganciclovir [(Cymever), 2-(9-Γουανινομεθοξυμεθυλο)-1,3-προπανοδιόλη, DHPG], Famciclovir [FCV, διοξικός εστέρας της 2-[2-(2-αμινο-9-πουριν)αιθυλο]-1,3-προπανοδιόλης], penciclovir κ.α., τα οποία χρησιμοποιούνται κατά των ερπητοϊών. Ακόμη, νουκλεοζίτες, όπως οι και Cidofovir [(S)-HPMPC], (Gumina *et al.* 2001).

Παρά τα επιτεύγματα αυτά, είναι συνεχής η ανάγκη ανακάλυψης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων, προκειμένου να αντιμετωπιστούν προβλήματα, όπως η τοξικότητα, η μη μεταβολική σταθερότητα, και μεταξύ άλλων η εμφάνιση ανθεκτικών ιικών στελεχών και κατ' επέκταση νεοεμφανιζόμενων ιικών ασθενειών. Πολλές είναι οι μελέτες που έχουν δημοσιευθεί και αναφέρονται σε ιδιαίτερες τάξεις νουκλεοζιτών, σε θέματα που αφορούν τη χημεία τους, καθώς και στο φάσμα της αντιικής τους δράσης και των βιολογικών τους στόχων.

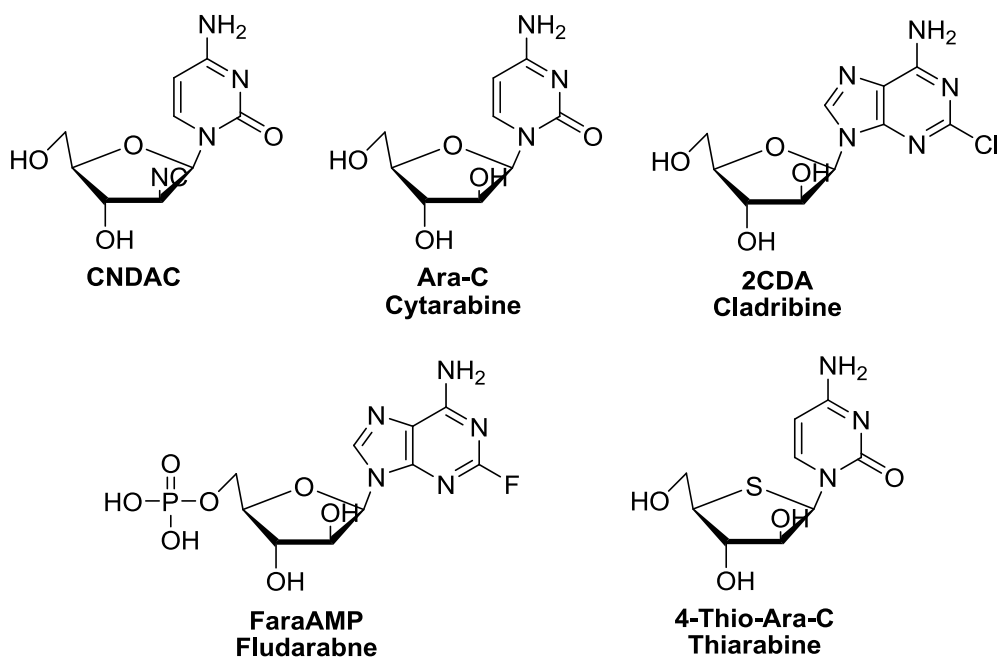
1.2.2. Αντικαρκινικοί νουκλεοζίτες

Αν και, η χημειοθεραπεία θεωρείται ως η πλέον κατάλληλη μέθοδος για τη θεραπεία των ιικών λοιμώξεων, στην περίπτωση αντιμετώπισης του

καρκίνου συνιστάται ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς της μέσω της εύρεσης νέων αντικαρκινικών ουσιών, οι οποίες διαθέτουν αυξημένη δραστηριότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα νέων αντικαρκινικών ουσιών, οι οποίες έχουν μελετηθεί εντατικά, είναι οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους.

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν μελετηθεί ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (Plunkett and Gandhi 2001, Elion 1989, Robins and Kini 1990), ενώ ένας μεγάλος αριθμός αναλόγων φυσικών νουκλεοζιτών χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων. Μελέτες έδειξαν ότι οι νουκλεοζίτες απαρτίζουν μια σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών μέσων, τα οποία επηρεάζουν τη σύνθεση του DNA με διάφορους τρόπους.

Για αυτό και δεν είναι τυχαίο το γεγονός ότι, νουκλεοζιτικά ανάλογα, όπως η Cytarabine (Matsuda and Sasaki 2004) (Σχήμα 2), 1-(2'-C-κυανο-2'-δεοξυ-β-D-αραβινο-πεντοφουρανοζυλο)κυτοσίνη (CNDAC) (Matsuda *et al.* 1991b, Azuma *et al.* 1993, Tanaka *et al.* 1992, Azuma *et al.* 1995, Matsuda and Azuma 1995), Cladribine (2-χλωρο-2'-δεοξυαδενοσίνη, 2CDA) και Fludarabine (5'-μονοφωσφορική 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-2-φθοροαδενίνη, FaraAMP) (Matsuda and Sasaki 2004) (Σχήμα 9), έχουν μελετηθεί ως προς τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες και είναι αποτελεσματικές ενώσεις όχι μόνο κατά της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων, αλλά και κατά κακοήθων όγκων.



Σχήμα 9

Ακόμη ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο, που έχει εγκριθεί για την θεραπεία της αιματολογικής κακοήθειας, της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και πιθανόν και άλλων μορφών καρκίνου, όπως η οξεία μυελογενής λευχαιμία είναι το Clofarabine [2-χλωρο-(2'-δεοξυ-φθορο-β-D-αραβινοφουρανοζυλο)αδενίνης] (Faderl *et al.* 2002, Parker *et al.* 2004, Faderl *et al.* 2005, Pui *et al.* 2005, Secrist 2005).

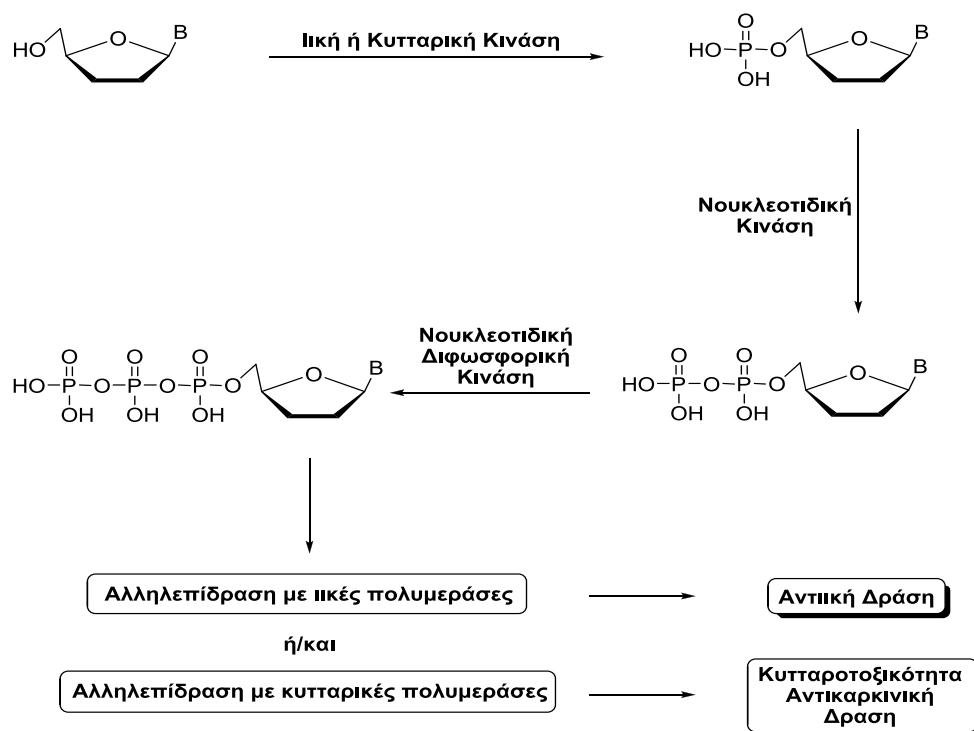
Τέλος, η ένωση 1-(4'-θείο-β-D-αραβινοφουρανοζυλο)κυτοσίνη (Thiarabine, 4'-thio-araC) (Tiwari *et al.* 2000, Waud *et al.* 2003, Someya *et al.* 2003, Secrist 2005), μετά το πρώτο στάδιο μελετών, βρέθηκε ότι είναι δραστική έναντι κακοήθων όγκων, συμπεριλαμβανομένων του παχέος εντέρου, των πνευμόνων, του παγκρέατος, του νεφρού, του προστάτη καθώς και του μαστού.

1.2.3. Τρόπος δράσης των νουκλεοζιτών

Γενικότερα, ο τρόπος δράσης των φαρμάκων έγκειται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό 'στόχο', ο οποίος μπορεί να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη, όπως ένας υποδοχέας, ένας δίαυλος ιόντων, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφορέας, είτε τα νουκλεϊνικά οξέα. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων που διαθέτουν αντιική ή/και αντικαρκινική δράση, τα οποία λόγω της δυνατότητας μεταφοράς τους εντός των κυττάρων με παθητική διάχυση είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία πολλών ασθενειών.

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

Ειδικότερα, οι νουκλεοζίτες μπορούν να αναστείλουν τη δράση βασικών ενζύμων στο μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων ή/και μπορούν να ενσωματωθούν στα πρόσφατα συντεθειμένα νουκλεϊνικά οξέα προκαλώντας τον τερματισμό των διαδικασιών σύνθεσής τους ή την παραγωγή μη λειτουργικών βιομορίων.



Σχήμα 10

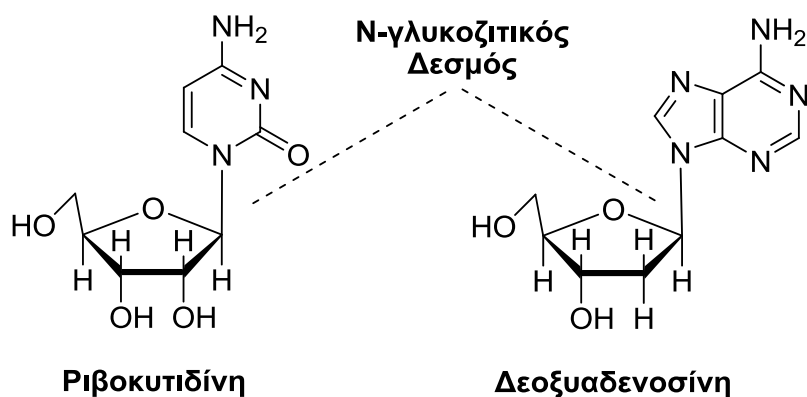
Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η εκλεκτικότητα ανάμεσα στην αντιική και την κυτταροτοξική δράση των νουκλεοζιτών εξαρτάται από την εξειδίκευση του υποστρώματος των NTPs ως προς τις ιικές και κυτταρικές πολυμεράσες (Challand and Young 1997). Αντίθετα, η αποτελεσματικότητα των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών εξαρτάται από την ενεργοποίηση της δράσης του φαρμάκου από το ιικό ένζυμο ή/και από το γεγονός ότι οι ιικές πολυμεράσες μπορεί να είναι πολύ πιο ευαίσθητες στη δράση του φαρμάκου από ότι τα αντίστοιχα ένζυμα του κυτάρου ξενιστή. Επιπλέον, το ιικό ένζυμο δεν διαθέτει κάποια εξειδίκευση στη σύνδεσή του με το υπάρχον υπόστρωμα, εν αντιθέσει με το ένζυμο του κυτάρου ξενιστή. Οπότε, το ιικό ένζυμο μπορεί να δρα και σε φάρμακα της τάξης των νουκλεοζιτών αναλόγων (διαφορετικό υπόστρωμα) και να τα φωσφορυλιώνει, ενώ το ένζυμο του κυτάρου ξενιστή θα τα αφήνει ανεπηρέαστα, εφόσον δεν είναι εφικτή η σύνδεση ενζύμου-υποστρώματος. Ωστόσο, ένας μεγάλος αριθμός νουκλεοζιτών έχει ανακαλυφθεί, οι οποίοι ασκούν την αντιική τους δράση μέσω αναστολής και άλλων ενζύμων, όπως είναι η αφυδρογονάση της μονοφωσφορικής ινοσίνης (Margolis *et al.* 1999).

1.2.4. Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες

Η τροποποίηση του τμήματος του σακχάρου στη δομή ενός νουκλεοζίτη έχει οδηγήσει στην παρασκευή αναλόγων νουκλεοζιτών με σημαντική αντιική και αντικαρκινική δράση. Αν και, η φωσφορυλίωση των συνθετικών αυτών νουκλεοζιτών αποτελεί κοινό σημείο στον τρόπο δράσης τους (Verheggen *et al.* 1995), οι τροποποιήσεις που πραγματοποιούνται στοχεύουν στην καλύτερη λειτουργία τους ως υποστρώματα των DNA πολυμερασών, όπως προκύπτει από μελέτες σχέσεων δομής-δράσης (Vastmans *et al.* 2000). Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο κύριος παράγων για την αναγνώρισή τους από τις πολυμεράσες και την ενσωμάτωσή τους στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα είναι το τμήμα του σακχάρου. Δύο από τις σημαντικότερες κατηγορίες τροποποιημένων νουκλεοζιτών, ως προς το τμήμα του σακχάρου, που έχουν μελετηθεί κυρίως για τη βιολογική τους δραστηριότητα, είναι οι φουρανο- και οι πυρανονουκλεοζίτες.

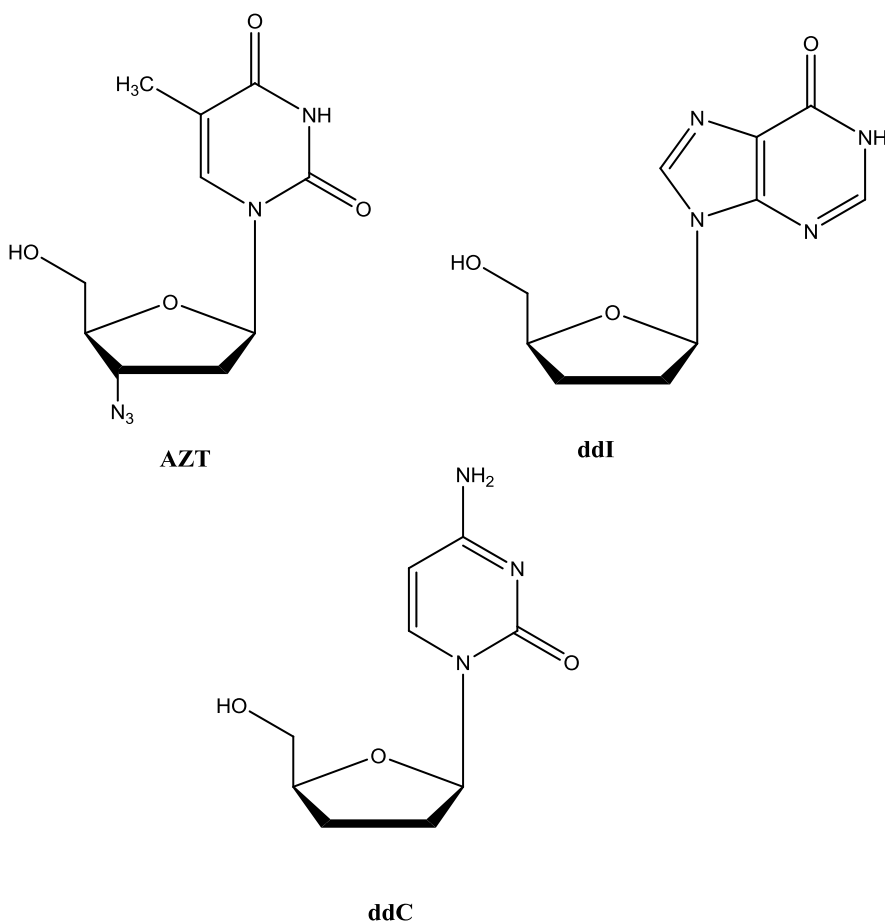
1.2.5. Φουρανονουκλεοζίτες

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα με στόχο τη δημιουργία φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, αφορούν κυρίως στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη με β -απεικόνιση, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τις σχετικές δομές που παρατίθενται στα σχήματα 8 και 9. Έτσι, ένας μεγάλος αριθμός φουρανονουκλεοζιτών και παραγώγων τους έχουν συντεθεί λόγω του ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν ως βιολογικά δραστικά μόρια. Η σπουδαιότητα των πεντοζών αναγνωρίστηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως συστατικά των νουκλεϊνικών οξέων. Όλοι οι νουκλεοζίτες στο DNA και RNA αποτελούνται από ένα *D*-πεντοφουρανοζικό σάκχαρο συνδεδεμένο με μία ετεροκυκλική νουκλεοβάση (πουρίνη ή πυριμιδίνη), μέσω ενός β -*N*-γλυκοζιτικού δεσμού (Saenger 1984, Blackburn and Gait 1996, Bloomfield *et al.* 1999).



Σχήμα 11

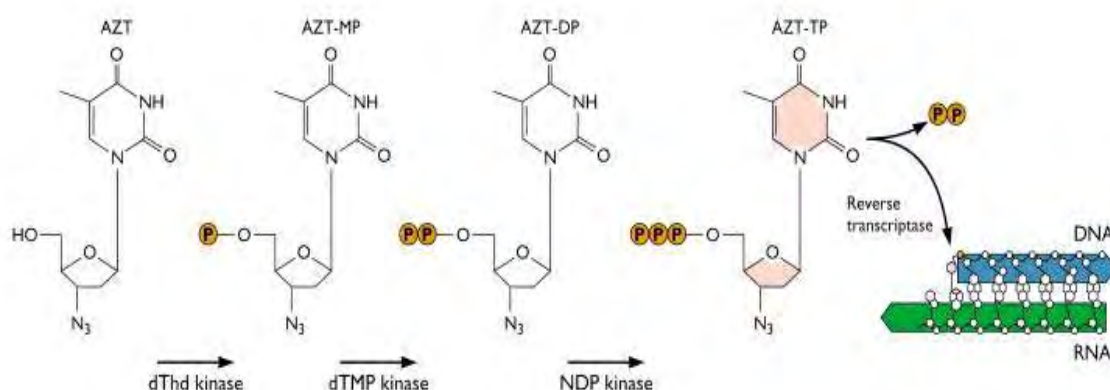
Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα από τα νουκλεοζιδικά αυτά ανάλογα είναι το zidovudine (**AZT**), το didanosine (**DDI**) και το zalcitabine (**DDC**), τα οποία χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα εναντίον του HIV. Οι χημικές τους δομές φαίνονται στο παρακάτω σχήμα 12:



Σχήμα 12: Χημικές δομές των AZT, ddI, ddC

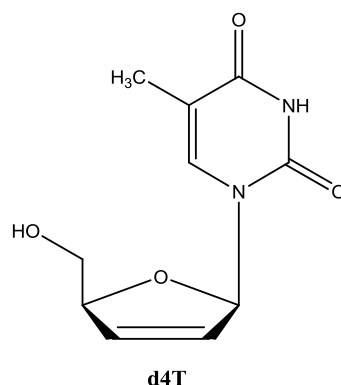
Πρόκειται για 2',3'-διδεοξυνουκλεοζίτες που προκύπτουν από την απομάκρυνση των υδροξυλομάδων από τις 2',3'- θέσεις του δακτυλίου της ριβόζης. Δρουν σαν αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Hiroguki et al. 2004). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το ένζυμο που χρησιμοποιεί ο ιός για να συνθέσει το νέο DNA με μήτρα το ιικό RNA. Το ένζυμο αυτό συνθέτει μια αλυσίδα DNA συμπληρωματική με το RNA. Τα συγκεκριμένα ανάλογα νουκλεοζιτών αναστέλλουν τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή του ιικού DNA.

Το AZT (3'-αζιδο-2'-δεοξυθυμιδίνη) ήταν το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία του AIDS (www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-hiv/). Φωσφορυλιώνεται από τα κυτταρικά ένζυμα στην ενεργή του μορφή και δρα ως αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης τερματίζοντας την αλυσίδα μόλις συνδεθεί στο DNA (σχήμα 13). Επειδή έχει την αζιδο ομάδα αντί για την υδροξυλομάδα, η επόμενη βάση δεν μπορεί να ενωθεί και η σύνθεση της αλυσίδας σταματά.



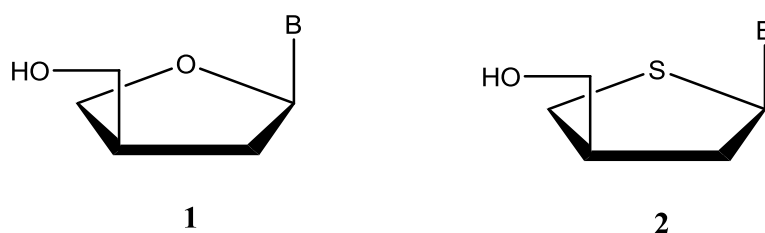
Σχήμα 13: Τερματισμός της αλυσίδας του ιικού DNA από το φωσφορυλιωμένο AZT

Το συνθετικό ενδιαφέρον στράφηκε επίσης στους 2',3'-ακόρεστους νουκλεοζίτες, όπου η 3'-δεοξυ-2',3'-διδεϋδροθυμιδίνη (d4T) δρα επίσης σαν αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης στην θεραπεία κατά του AIDS (Brossette et al. 2001). Η χημική δομή του d4T απεικονίζεται στο σχήμα 14 της επόμενης σελίδας:



Σχήμα 14: Χημική δομή της D4T

Στην κατηγορία των αντιικών ενώσεων συναντάμε και μη κλασσικές κατηγορίες νουκλεοζιτών. Μια χαρακτηριστική ομάδα είναι οι απιο-διδεοξυνουκλεοζίτες **1**, όπου η 4'-υδροξυμεθυλο ομάδα έχει μετατοπιστεί στον C-3' (Moon et al. 2002). Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν αντιική δράση, ενώ αντικαθιστώντας την θέση του οξυγόνου με ένα άτομο θείου, έχουμε τους αντίστοιχους θειο- απιο- διδεοξυνουκλεοζίτες **2** (σχήμα 15).



Σχήμα 15

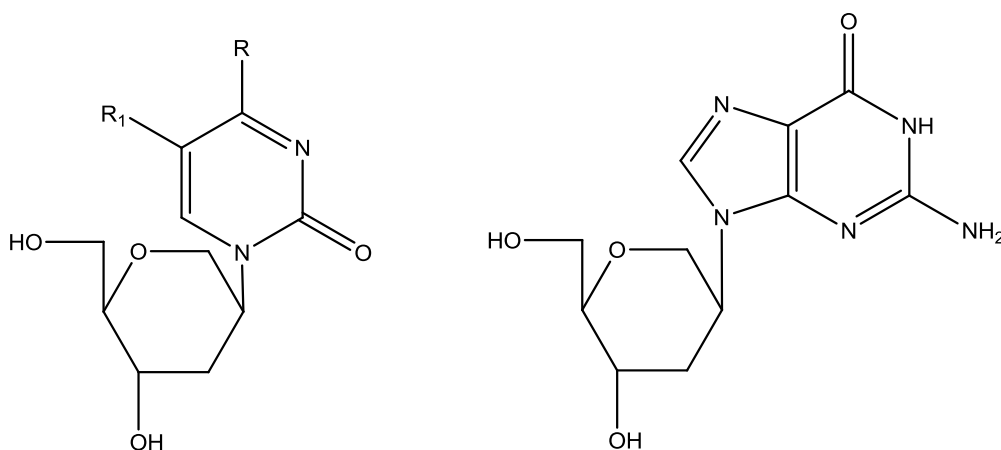
1.2.6. Πυρανονουκλεοζίτες

Παρόλο το μεγάλο αριθμό φουρανονουκλεοζιτών και παραγώγων αυτών που έχουν συντεθεί λόγω του ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν ως βιολογικά δραστικά μόρια, ορισμένα προβλήματα προέκυψαν από τη χρήση τους. Ο ανεπαρκής μεταβολισμός προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, η χημική ή ενζυματική απενεργοποίησή τους, η τοξικότητα, η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και όγκων και τέλος ο μικρός χρόνος ημιζωής και κατά συνέπεια χρόνος δράσης τους, έστρεψαν το ενδιαφέρον των επιστημόνων

στη μελέτη της αντικαρκινικής και αντιικής δράσης νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων, που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη.

Τις τελευταίες δεκαετίες, νουκλεοζίτες με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές αντιικές (Verheggen *et al.* 1993, Verheggen *et al.* 1995, Maurinsh *et al.* 1997, Ostrowski *et al.* 1998), αντικαρκινικές (Antonakis 1989) και αντιβιοτικές τους ιδιότητες (Haouz *et al.* 2003), καθώς και ως δομικές μονάδες στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων (Vastmans *et al.* 2000, Vastmans *et al.* 2001).

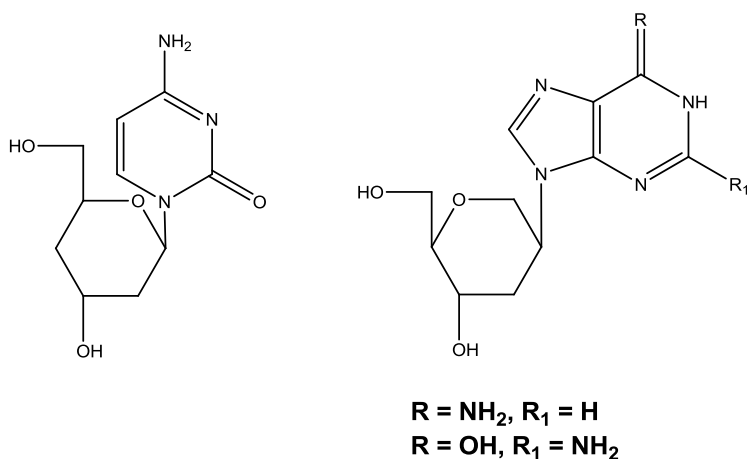
Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ανάλογα πυρανονουκλεοζιτών, τους 1,5-ανυδροεπιτολο-νουκλεοζίτες (ενώσεις **VII**, Σχήμα 16), διαπιστώθηκε ότι, τα ανάλογα της 5-ιωδοουρακίλης και 5-αιθυλοουρακίλης εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα για το ένζυμο της κινάσης της θυμιδίνης και αποτελούν αναστολείς του ιού HSV-1 και HSV-2, ενώ τα ανάλογα της κυτοσίνης και της γουανίνης είναι δραστικά έναντι και άλλων ερπητοϊών, όπως του ιού VZV και του ιού HCMV (Verheggen *et al.* 1993, Verheggen *et al.* 1995).



R = OH, R₁ = I
R = OH, R₁ = CH₂CH₃
R = NH₂, R₁ = H

VII
Σχήμα 16

Αξιοσημείωτη είναι όμως και η αντιική, αντικαρκινική καθώς και η αντιλευχαιμική δράση που εμφάνισαν ορισμένοι πουρινικοί και πυριμιδινικοί 2'-δεοξυπυρανονουκλεοζίτες (Langen and Etzold 1966, Nord *et al.* 1987). Μία ακόμη διαπίστωση που αυξάνει το ενδιαφέρον για τους συγκεκριμένους νουκλεοζίτες, αποτελεί το γεγονός ότι ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία περιέχουν διδεοξυ-β-D-ερυθρο-εξοπυρανονουκλεοζίτες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (Augustyns *et al.* 1994), ενώ οι 2',4'-διδεοξυ-β-D-ερυθρο-εξοπυρανονουκλεοζίτες (ενώσεις **VIII**, Σχήμα 17) αποδείχθηκαν χρήσιμες δομικές μονάδες για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων (Augustyns *et al.* 1992, Augustyns *et al.* 1993).



VIII

Σχήμα 17

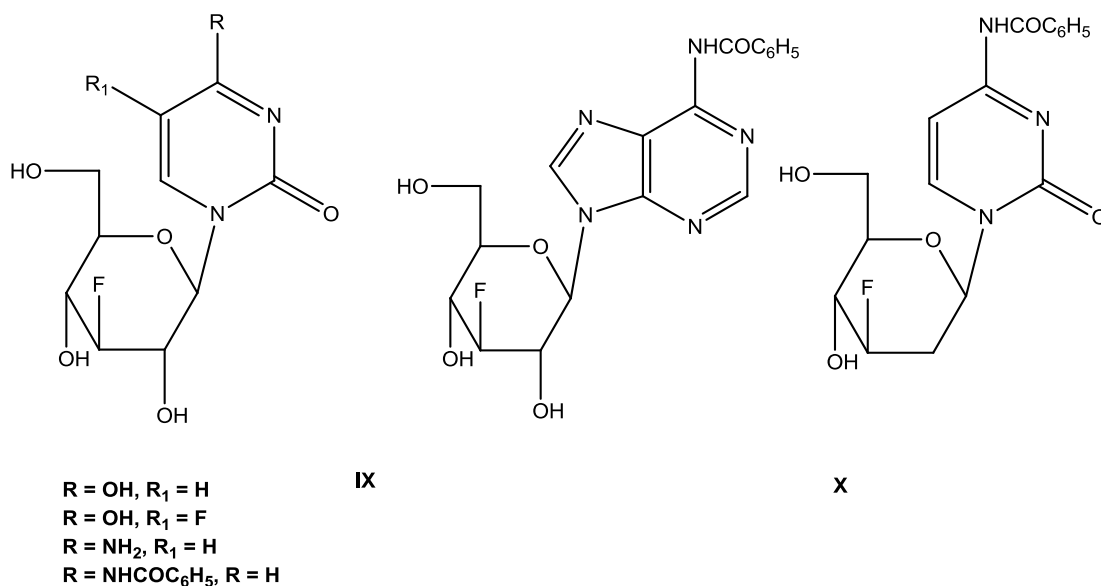
Λαμβάνοντας υπόψη τις βιολογικές ιδιότητες νουκλεοζιτών με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους, καθώς και τη σημαντική αύξηση της δράσης τους εξαιτίας της παρουσίας υποκαταστατών, όπως το φθόριο, σημαντικές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί στα πλαίσια της σύνθεσης νέων τροποποιημένων νουκλεοζιτών, ως θεραπευτικών παραγόντων, που φέρουν ως σάκχαρο μία εξόζη. Η αναζήτηση αυτή οδήγησε στην σύνθεση νέων γενεών πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων. Δύο πρωτότυπες τάξεις της νέας αυτής γενιάς πυρανονουκλεοζιτών είναι οι φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες καθώς και οι κετοακόρεστοι φθοροπυρανονουκλεοζίτες.

1.2.6.1. Φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η εισαγωγή ενός φθορίου είτε στο τμήμα του σακχάρου είτε στη νουκλεοβάση των φουρανονουκλεοζιτών, οδηγεί σε ενώσεις, οι οποίες διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα αντιικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων (Herdewijn *et al.* 1989, Tsuchiya 1990, Ternansky *et al.* 1993, Pankiewicz 2000). Ωστόσο, νέοι φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες έχουν συντεθεί και μελετηθεί τόσο για τις βιολογικές τους ιδιότητες ως αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες όσο και για τη δράση τους σε μοριακό επίπεδο.

Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε μια νέα σειρά φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων της N^4 -βενζοϋλοκυτοσίνης και της N^6 -βενζοϋλοαδενίνης (ενώσεις **IX**, Σχήμα 18), αξιολογήθηκε να είναι η δράση τους σε μοριακό επίπεδο. Οι συγκεκριμένες μελέτες εστίαστηκαν στην επίδραση, της νέας αυτής σειράς πυρανονουκλεοζιτών, στην αποικοδόμηση της πολυαδευλικής ουράς (πολύ(A) ουρά). Ένα ένζυμο-κλειδί σε αυτήν τη διεργασία της βράχυνσης είναι η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση, PARN. Μετά από πρόσφατες αναφορές (Balatsos *et al.* 2008), ότι τα νουκλεοτίδια πουρινών αναστέλλουν το συγκεκριμένο ένζυμο, πραγματοποιήθηκαν μελέτες με τις οποίες εξετάστηκε αν τα τροποποιημένα νουκλεοζιτικά ανάλογα της N^4 -βενζοϋλοκυτοσίνης και της N^6 -βενζοϋλοαδενίνης μπορούν να ρυθμίσουν την PARN.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν απέδειξαν ότι οι φθοριωμένοι νουκλεοζίτες της N^4 -βενζοϋλοκυτοσίνης και N^6 -βενζοϋλοαδενίνης (ενώσεις **IX**, Σχήμα 18), μείωσαν αποτελεσματικά τη δραστηριότητα της PARN, δείχνοντας έτσι ότι αυτή μπορεί να ελεγχθεί από φυσικά νουκλεοτίδια *in vitro*, πιθανόν μέσω ενός απλού μηχανισμού ρύθμισης της αποικοδόμησης της πολυ(A) ουράς. Επιπλέον, τα ανάλογα νουκλεοζιτών που εξετάστηκαν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπες ενώσεις για την ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν την PARN (Balatsos *et al.* 2009).

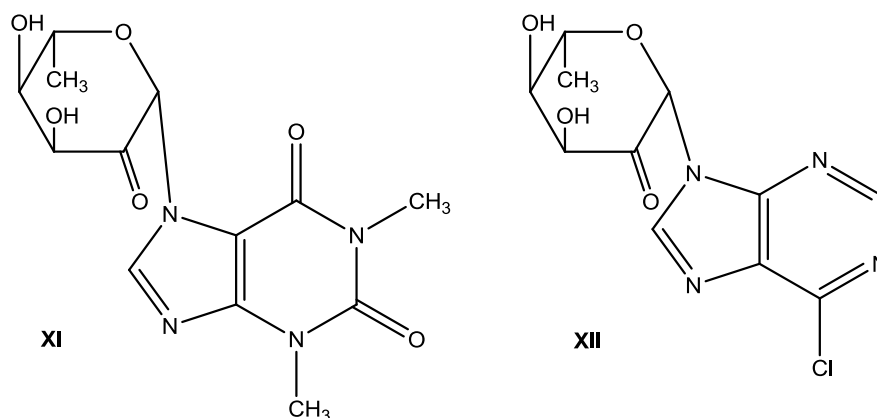


Σχήμα 18

Ακόμη, φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες έχουν αξιολογηθεί και ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP), ένζυμο με κεντρικό ρόλο στον καταβολισμό του γλυκογόνου και υπεύθυνο για την παραγωγή γλυκόζης στο αίμα (γλυκογενόλυση). Η λεπτομερής ανάλυση των παραγόντων που καθορίζουν τη σύνδεση μικρομοριακών ενώσεων (αναστολέων) στη GP σε μοριακό επίπεδο, παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου της ενζυμικής τους δράσης ή και της ανεπιθύμητης αποικοδόμησης γλυκογόνου, στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, όπου η υπεργλυκαιμία αποτελεί σοβαρό ιατρικό πρόβλημα. Συγκεκριμένα, φθοριωμένοι πυριμιδινικοί γλυκοπυρανονουκλεοζίτες (ενώσεις **IX**, Σχήμα 18) καθώς και ένα φθοριωμένο δεοξυ-πυρανονουκλεοζιτικό ανάλογο της N^4 -βενζοϋλοκυτοσίνης (ένωση **X**, Σχήμα 18) αποδείχθηκαν ανταγωνιστικοί αναστολείς της φωσφορυλάσης του μυϊκού γλυκογόνου (GPb) (Tsirkone *et al.* 2010).

1.2.6.2. Φθοριωμένοι ακόρεστοι κετοπυρανονουκλεοζίτες

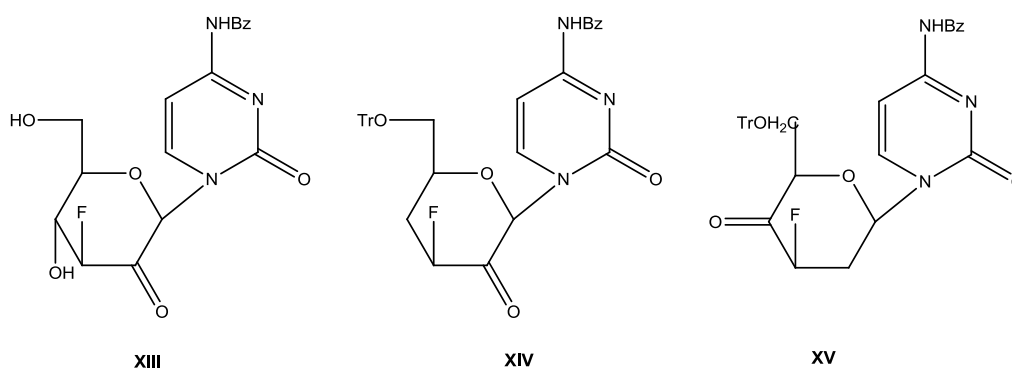
Παρόλο που τα κετο-παράγωγα των πεντονουκλεοζιτών, στις περισσότερες των περιπτώσεων, αποδείχθηκαν ασταθή, τα κετο-παράγωγα των νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο έδωσαν το έναυσμα για τη μελέτη μιας νέας και ενδιαφέρουσας χημείας (Antonakis and Leclercq 1970, Antonakis and Leclercq 1971). Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι κετο-πυρανονουκλεοζίτες αποτελούν συνθόνες σε συνθετικές και βιοσυνθετικές διαδικασίες και επιπλέον ένας σημαντικός αριθμός αυτών εμφανίζει ενδιαφέρουσα αντικαρκινική και αντιική δράση (Cook and Moffatt 1967, Antonakis 1975, Antonakis 1984, Komiotis *et al.* 1991, Khan *et al.* 2002). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της τάξης των νουκλεοζιτών, αποτελούν οι ενώσεις, 7-(6'-δεοξυ-β-D-λυξο-εξοπυρανοζυλο-2'-ουλοζο)θεοφυλλίνη (**XI**, Σχήμα 19) (Antonakis and Arvor 1971, Antonakis 1972) και 9-(6'-δεοξυ-β-L-λυξο-εξοπυρανοζυλο-2'-ουλοζο)-6-χλωροπυρίνη (**XII**) (Antonakis and Bessodes 1973), οι οποίες βρέθηκε ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων KB, όπως επίσης και την ανάπτυξη της λευχαιμίας L1210 στα ποντίκια.



Σχήμα 19

Τελευταία, αξιοποιώντας τη διαθεσιμότητα αυτών των μορίων, η οποία αποδείχθηκε καθοριστική για τη βιολογική έρευνα, έχει πραγματοποιηθεί η σύνθεση μιας νέας ιδιαίτερης τάξης τροποποιημένων κετονουκλεοζιτικών αναλόγων που φέρουν ως σάκχαρο μία εξόζη, των φθοριωμένων κετονουκλεοζιτών. Από τις βιολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα

νέα μόρια, αποδείχθηκε ότι τα 2'-κετο και 4'-κετονουκλεοζιτικά ανάλογα (ενώσεις **XIII-XV**, Σχήμα 20) (Manta *et al.* 2007, Manta *et al.* 2009) διαθέτουν ενδιαφέρουσες, αντιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι οι φθοριωμένοι 2'- και 4'-κετονουκλεοζίτες της N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνης μπορούν να θεωρηθούν ελπιδοφόροι για την ανάπτυξη αντι-εντεροϊικών φαρμάκων. Ακόμη, τόσο οι φθοριωμένοι 2'-κετονουκλεοζίτες της N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνης (ενώσεις **XIII**, **XIV**), όσο και ο 4'-κετονουκλεοζίτης της ίδιας νουκλεοβάσης (ένωση **XV**), αποδείχθηκαν ότι αποτελούν εν δυνάμει αντι-αδενοκαρκινικούς παράγοντες, ενώ παρουσίασαν αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών και ειδικότερα έναντι των ανθρώπινων γαστρικών καρκινικών κυττάρων (AGS).

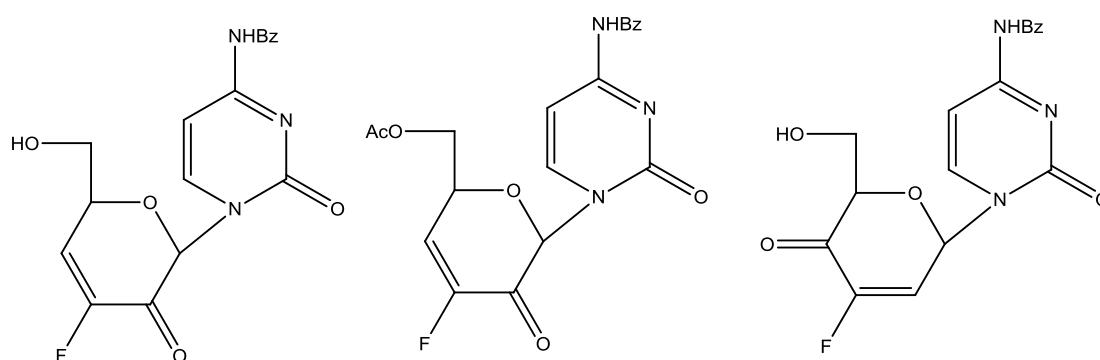


Tr = Τριτύλιο, Bz = Βενζοϋλομάδα

Σχήμα 20

Μία ακόμη ασυνήθιστη κατηγορία νουκλεοζιτών με τροποποιημένο εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο, που αυξάνει το ενδιαφέρον για τους συγκεκριμένους νουκλεοζίτες, είναι οι ακόρεστοι κετονουκλεοζίτες, οι οποίοι διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικών και αντιικών ιδιοτήτων (Komiotis *et al.* 1991, Ollapaly *et al.* 1999). Τα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα, στα οποία ο δακτύλιος του σακχάρου περιλαμβάνει ένα διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα σε α,β-θέση ως προς την κετονομάδα, έχουν αξιολογηθεί για την αντινεοπλασματική δραστηριότητα και τα ανοσοκατασταλτικά τους χαρακτηριστικά (Paterson *et al.* 1998). Λαμβάνοντας υπόψη τις ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες των κετοακόρεστων νουκλεοζιτών, καθώς και των φθοριωμένων κετονουκλεοζιτών, μία ακόμη ιδιαίτερη σειρά

φθοριωμένων αναλόγων ακόρεστων κετονουκλεοζιτών έχει μελετηθεί. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι τα νέα φθοριωμένα ακόρεστα 2'-κετο- και 4'-κετονουκλεοζιτικά ανάλογα (Manta *et al.* 2007, Manta *et al.* 2008) παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης εντεροϊού και αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπως των κυττάρων μελανώματος του δέρματος. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα των νουκλεοζιτικών αυτών αναλόγων, είναι οι φθοριωμένοι ακόρεστοι 2'-κετονουκλεοζίτες της N⁴-βενζοϋλοκυτοσίνης **XVI**, **XVII** και ο φθοριωμένος ακόρεστος 4'-κετονουκλεοζίτης της ίδιας βάσης **XVIII** (Σχήμα 21).



Bz = Βενζοϋλομάδα, Ac = Ακετύλιο, Tr = Τριτύλιο

Σχήμα 21

Από τα βιολογικά αποτελέσματα που προέκυψαν αποδείχθηκε ότι η ύπαρξη πρωτοταγούς ελεύθερου υδροξυλίου δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνιση αντιικής και αντικαρκινικής δράσης. Αντίθετα, οι ενώσεις που φέρουν πρωτοταγή προστατευτική ομάδα αποδείχθηκαν ότι είναι πιο αποτελεσματικοί αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες. Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης αυτών των ενώσεων δεν είναι σαφής, φαίνεται ότι παρεμποδίζουν τη σύνθεση του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών (Antonakis 1975) και ότι αντιδρούν με τις πρωτεϊνικές ομάδες σουλφυδρυλίου (Halmos *et al.* 1983). Μία άλλη σημαντική παράμετρος που συνεισφέρει στη βιολογική σπουδαιότητα των ανωτέρω μορίων αποτελεί η ύπαρξη του διπλού δεσμού στο τμήμα του σακχάρου, ο οποίος προκαλεί ακαμψία στο δακτύλιο, όμοια με αυτή ενός φουρανονουκλεοζίτη, με αποτέλεσμα να μπορούν να θεωρηθούν

ως (βιο)ισοστερή των φυσικών νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων (Herdewijn and De Clercq 2001).

2. Στόχοι της παρούσης διατριβής

Τα φάρμακα, τα οποία ως δραστική ουσία περιέχουν κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο αποτελούν ελπιδοφόρα προϋπόθεση για την αντιμετώπιση ακόμα και θανατηφόρων ασθενειών που ταλανίζουν την ανθρωπότητα. Συνεπώς, με επιτακτική την ανάγκη για την εύρεση νέων αντιικών και αντικαρκινικών μέσων και με βάση τις σημαντικές φαρμακευτικές ιδιότητες των πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, στόχο της παρούσας εργασίας αποτελεί η σύνθεση και η βιολογική αποτίμηση νέων τάξεων φθορονουκλεοζιτών, με τροποποιημένους εξαμελείς υδατανθρακικούς δακτυλίους.

Ειδικότερα, λαμβάνοντας υπόψη ότι:

- α) η εισαγωγή φθορίου στο σάκχαρο ενός φουρανονουκλεοζίτη έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της βιολογικής του δράσης
 - β) η ύπαρξη πρωτοταγούς ελεύθερου υδροξυλίου δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εμφάνιση αντιικής και αντικαρκινικής δράσης
 - γ) τα φθορο κετο και δεοξυ-πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες,
- τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν στην παρούσα διατριβή αφορούν στην περιγραφή μιας σειράς αντιδράσεων, οι οποίες οδηγούν στη σύνθεση νέων διφθορο κετοακόρεστων νουκλεοζιτικών αναλόγων. Ειδικότερα θα πραγματοποιηθεί η σύνθεση του 3',6'-διφθορο-4'-κετοακόρεστου πυρανονουκλεοζιτικού αναλόγου που φέρει ως ετεροκυκλική βάση την θυμίνη, διπλό δεσμό στις 2',3'-θέσεις και κετονομάδα στην 4'-θέση του σακχάρου.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιδικών αναλόγων

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

- Οξικός ανυδρίτης (Ac_2O) (Aldrich, Γερμανία)
- Πυριδίνη (Panreac, Ισπανία)
- Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH) (Merck, Γερμανία)
- Hexamethyldisilazane (HMDS) (Aldrich, Γερμανία)
- Trimethylsilyltrifluoromethane ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Υδρίδιο του ασβεστίου (CaH) (Fluca, Γερμανία)
- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN) (Merck, Γερμανία)
- Πεντοξειδίο του φωσφόρου (P_2O_5) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bicarbonate (NaHCO_3) (Merck, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bisulfate (NaHSO_4) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) (Merck, Γερμανία)

3.2 ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.2.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : thin layer chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε μέσω της χρωματογραφικής μεθόδου TLC, όπου χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₅₄) πάχους 0.2 mm . Τα χρωματογραφήματα εμφανίζονται με ψεκασμό με διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 30%, ενώ άλλοτε οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων (TLC) είναι ορατές υπό λυχνία υπεριώδους (UV).

Η χρωματογραφία διεκπεραιώθηκε χρησιμοποιώντας τα παρακάτω συστήματα διαλυτών :

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 70/30
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Γ : οξικός αιθυλεστέρας

3.2.2 Χρωματογραφία στήλης

Για τον καθαρισμό των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης με εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography), η οποία στήλη πληρώθηκε με silica gel (230-400 mesh) της εταιρίας E. Merck. Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής :

- Διάλυμα Α: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 60/40
- Διάλυμα Β: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 70/30

3.2.3 Ξήρανση διαλυτών

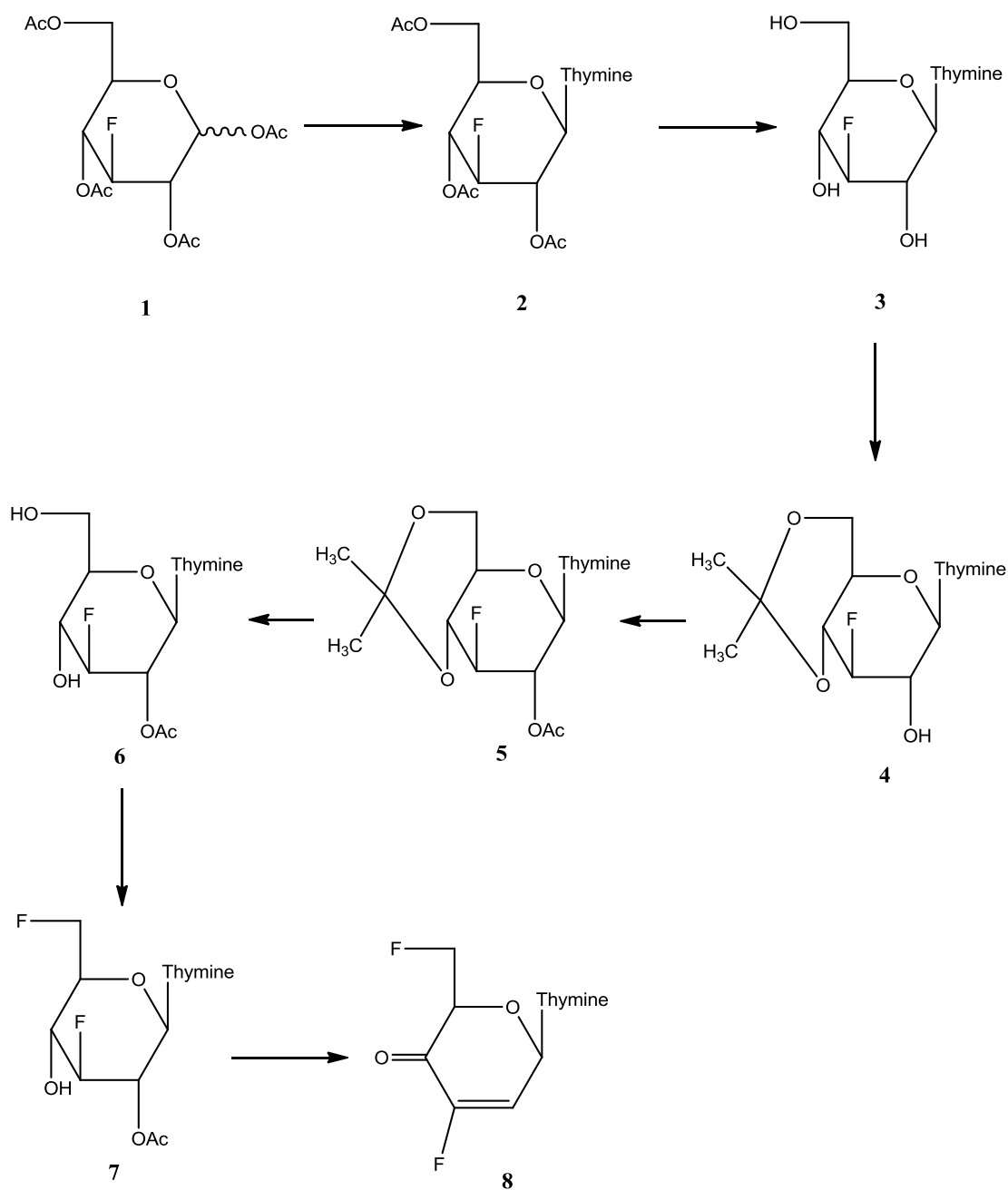
Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων , απαιτείται η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο . Η ξήρανση του ακετονιτρίλιου γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves).

3.2.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με το φωτόμετρο Bruker 300 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς. Η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (doublet), dd (doublet doublet), dtr (doublet triplet), m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

3.3 Μέθοδοι

3.3.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού



Σχήμα 22: Επισκόπηση της σύνθεσης διφθορο κετοακόρεστων νουκλεοζιτικών αναλόγων με βάση την θυμίνη

3.3.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης

Το πρώτο βήμα της συνθετικής πορείας περιλαμβάνει τη σύνθεση του νουκλεοζίτη **2** μέσω αντίδρασης της διαθέσιμης στο εργαστήριο 3-δεοξυ-3-φθορο-1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλογλυκοπυρανόζης (**1**) και της θυμίνης. Η συνθετική αυτή διαδικασία περιλαμβάνει την σιλλιλίωση της βάσης με HMDS και την προσθήκη αυτής στην πυρανόζη παρουσία καταλύτη $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$.

Στην συνέχεια η ένωση **2** απακετυλιώνεται με κορεσμένο διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας για να ληφθεί η πλήρως αποπροστατευμένη ένωση **3** υπό τη μορφή λευκού στερεού.

Εκλεκτική προστασία των ελεύθερων υδροξυλίων των θέσεων 3' και 4' της ένωσης **3**, χρησιμοποιώντας 2,2-διμεθοξυπροπάνιο σε ακετόνη, οδήγησε στην ένωση **4**.

Το επόμενο βήμα που ακολουθεί είναι η επιλεκτική ακετυλίωση του ελεύθερου υδροξυλίου της θέσεως 2' της ένωσης **4**, η οποία πραγματοποιήθηκε σε πυριδίνη παρουσία Ac_2O , από όπου ελήφθη η ένωση **5** υπό τη μορφή λευκού στερεού.

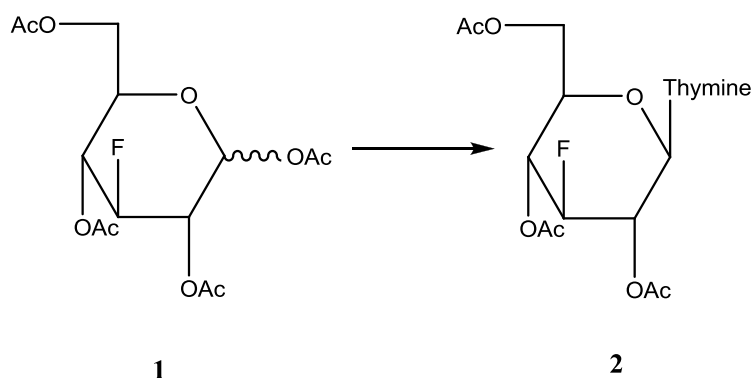
Ακολουθεί η διάνοιξη του ακετονιδίου της ένωσης **5** όπου έδωσε την ένωση **6**.

Έπειτα, το πρωτοταγές υδροξύλιο της ένωσης **6** αντικαθίσταται εκλεκτικά με φθόριο, με προσθήκη DAST (diethylaminosulfur trifluoride) παρουσία CH_2Cl_2 , με αποτέλεσμα τη λήψη της ένωσης **7**.

Τελευταίο στάδιο αποτελεί η οξείδωση της φθοριωμένης ακετυλιωμένης ένωσης **7**, η οποία πραγματοποιείται παρουσία PDC, Ac_2O και CH_2Cl_2 (Herscovici and Antonakis 1979), οπότε παράγεται, μετά από μια αντίδραση β-απόσπασης, η διφθορο κετοακόρεστη ένωση **8**.

3.3.3 Σύνθεση προϊόντων με βάση τη θυμίνη

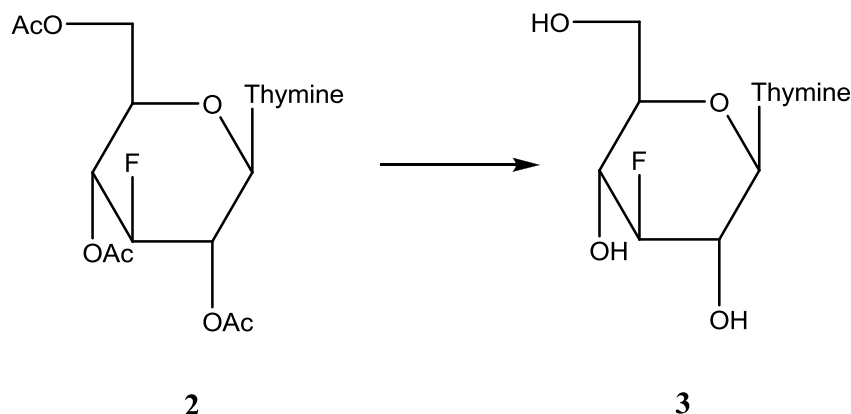
3.3.3.1. Σύνθεση της 1-(3'-δεοξυ-3'-φθορο-2',4',6'-τρεις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)- θυμίνη (2)



Ένα διάλυμα της θυμίνης (3.14 mg, 2.8 mmol), του HMDS (0.74 mL, 3.472 mmol) και της σακχαρίνης (24 mg, 0.1288 mmol) σε άνυδρο CH₃CN (10 mL) θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα στους 120 °C υπό άζωτο. Όταν το μίγμα έγινε διαυγές, προστέθηκαν η 3-δεοξυ-3-φθορο-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοκυρανόζη (**1**) (700 mg, 2 mmol) και Me₃SiOSO₂CF₃ (2.8 mmol, 0.51 mL). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 1 ώρα με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 105 °C. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, εκχυλίστηκε, έγινε καθαρισμός με νερό και sodium sulfate, και μετά από διήθηση συμπυκνώθηκε. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος αφού πρώτα διαλύθηκε σε CH₂Cl₂, MeOH, EtOAc σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα A. Το επιθυμητό προϊόν **2** (746 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC με διαλύτη A.

TLC (Σύστημα A)	R _f = 0,35
Απόδοση	66 %

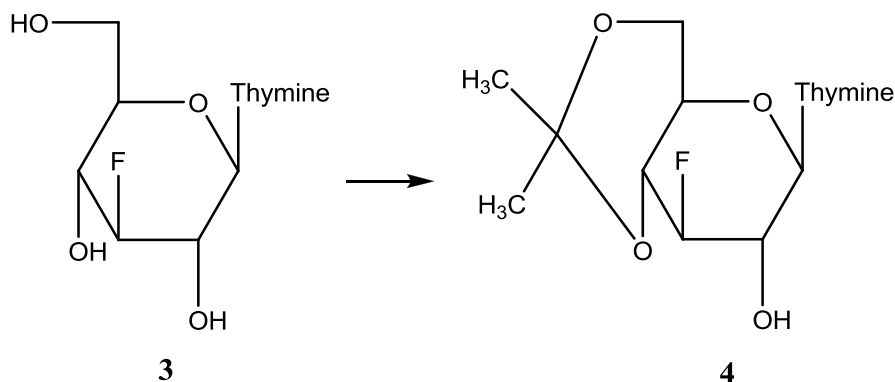
3.3.3.2. Σύνθεση της 1-(3',4'-διδεοξυ-3'-φθορο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-θυμίνη (3)



Η ένωση **2** (746 mg, 1.85 mmol) που ελήφθη από την προηγούμενη διαδικασία, προστέθηκε σε 77.5 mL κορεσμένου διαλύματος στους 0 °C, αμμωνίας/MeOH. Το διάλυμα αναδεύτηκε ολόκληρη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώθηκε υπό μειωμένη πίεση. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC με διαλύτη B. Το επιθυμητό προϊόν **3** (511 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού και χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

TLC (Σύστημα B)	$R_f = 0,28$
Απόδοση	98 %

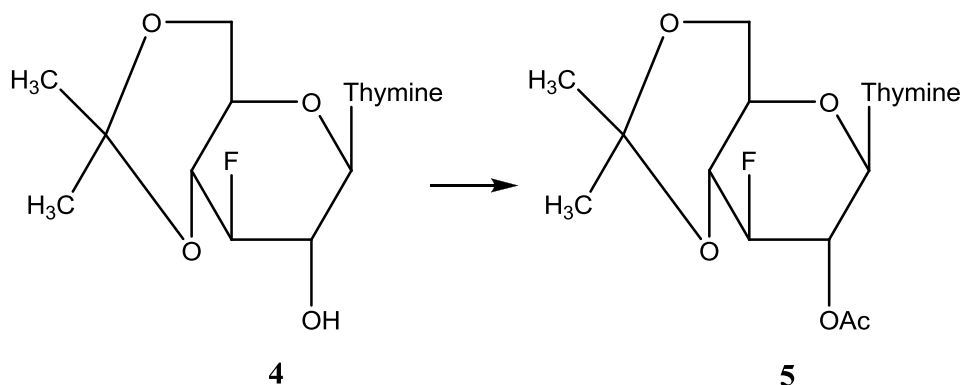
3.3.3.3 Σύνθεση της 1-(3'-δεοξυ-3'-φθορο-4',6'-Ο-ισοπροπυλιδενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- θυμίνη (4)



Σε ένα υπό ανάδευση διάλυμα της ένωσης **3** (511 mg, 1,85 mmol) με άνυδρη ακετόνη (37.86 mL) και DMP (7.72 mL) προστέθηκε p-TsOH (423 mg, 2,2 mmol). Μετά από 3 ώρες το μίγμα της αντίδρασης εξουδετερώθηκε με τριαιθυλαμίνη. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC σε EtOAc . Στη συνέχεια από το μίγμα απομακρύνθηκαν οι διαλύτες υπό υψηλό κενό και ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα A. Το επιθυμητό προϊόν **4** (871 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού.

TLC (Σύστημα Γ)	R _f = 0,34
Απόδοση	67 %

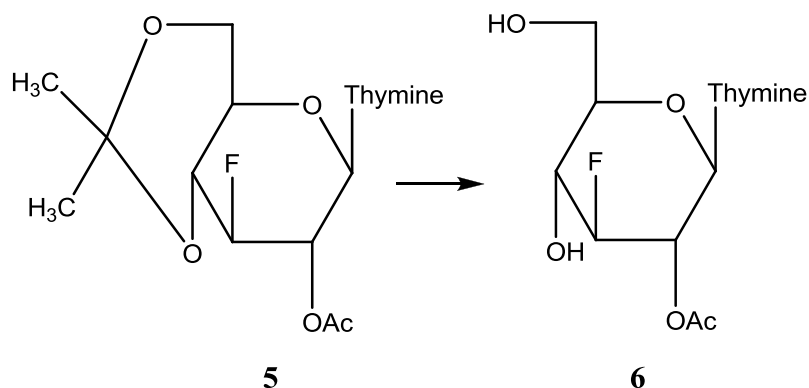
3.3.3.4 Σύνθεση της 1-(2'-O-ακετυλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-4',6'-O-ισοπροπυλιδενο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- θυμίνη (5)



Σε ένα διάλυμα της ένωσης **4** (871 mg, 2.75 mmol) σε pyridine (13.75 mL) προστέθηκε Ac_2O (1.56 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC - Διάλυμα Α) το διάλυμα κρύωσε στους 0 °C και προστέθηκε μεθανόλη (1.5 mL) για να καταστείλει την αντίδραση. Οι διαλύτες απομακρύνθηκαν υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε EtOAc, toluene, hexane. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Β. Το επιθυμητό προϊόν **5** (689.77 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού.

TLC (Σύστημα Α)	$R_f = 0,27$
Απόδοση	70 %

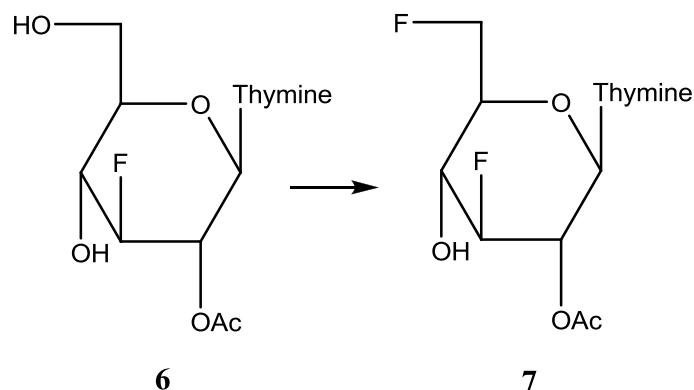
3.3.3.5 Σύνθεση της 1-(2'-Ο-ακετυλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- θυμίνη (6)



Η ένωση **5** (689.77 mg, 1.925 mmol) που ελήφθη από την προηγούμενη διαδικασία, διαλύθηκε σε ένα μίγμα TFA (8.66 mL) και MeOH (0.96 mL). Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 8 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, διαλύθηκε σε toI, έπειτα σε MeOH και στη συνέχεια συμπυκνώθηκε υπό κενό μέχρις ξηρού. Ακολούθησε ο καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Α. Το επιθυμητό προϊόν **6** (53 mg) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου λαδιού. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC χρησιμοποιώντας το διάλυμα Γ.

TLC (Σύστημα Γ)	$R_f = 0,29$
Απόδοση	88 %

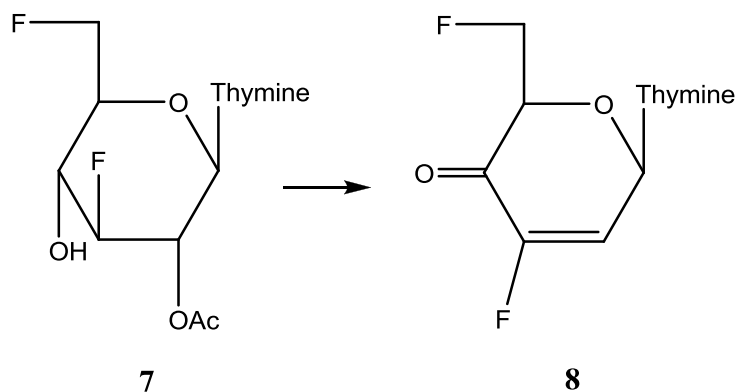
3.3.3.6 Σύνθεση της 1-(2'-O-ακετυλο-3',6'-διδεοξυ-3',6'-διφθορο)-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- θυμίνη (7)



Η ένωση **6** (53 mg, 0,17 mmol) που ελήφθη από την προηγούμενη διαδικασία, διαλύθηκε σε ένα μίγμα DAST (44,6 mL) και MeOH (0.85 mL) στους -20 °C. Το διάλυμα αφέθηκε στην αρχή στους 0 °C και υπό ανάδευση overnight σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ο καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Α. Το επιθυμητό προϊόν **7** (38 mg) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου λαδιού. Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC χρησιμοποιώντας το διάλυμα Α.

TLC (Σύστημα Α)	R _f = 0,23
Απόδοση	70 %

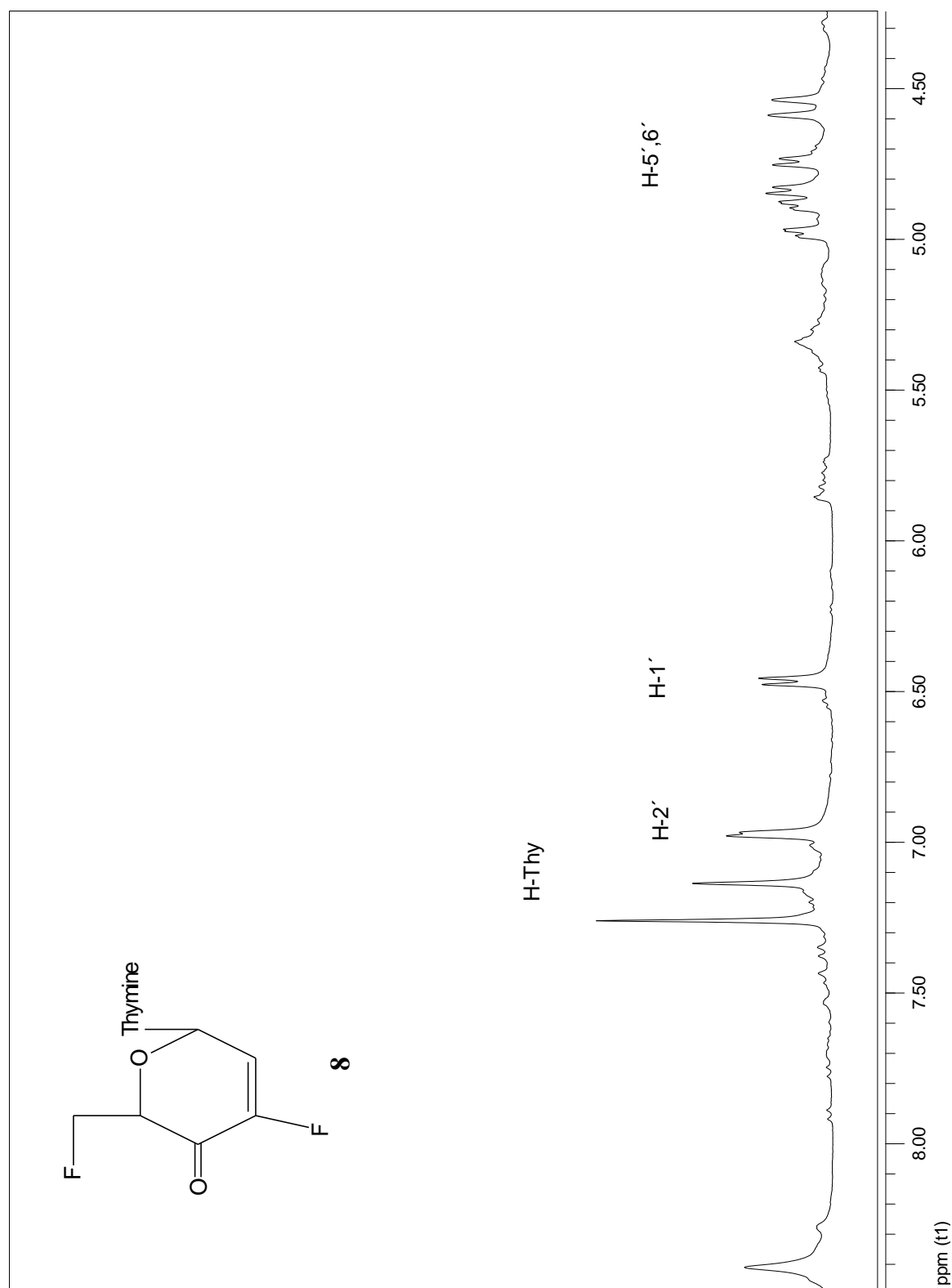
3.3.3.7 Σύνθεση της 1-(2,6-διδεοξυ-3',6'-διφθορο -β-D-γλυκερο-εξ-2 ενοπυρανοζο-4-ουλοζη)- θυμίνη (8)



Το προϊόν **7** (38 mg, 0,12 mmol) αρχικά διαλύεται σε ποσότητα ξηρού CH₂Cl₂ (0,2 ml). PDC (26,6 mg) διαλύεται σε ξεχωριστή φιάλη σε ποσότητα Ac₂O (16.7 μl) στους 32 °C. Το διάλυμα του προϊόντος **8** προστίθεται στο διάλυμα του PDC και ακολουθεί ανάδευση. Μετά το πέρας της αντίδρασης ο τελικός καθαρισμός γίνεται με χρωματογραφία στήλης με διαλύτη έκλουσης το διαλύτη A, και δίνει το τελικό προϊόν **8** (25 mg). Ο έλεγχος της αντίδρασης έγινε με TLC χρησιμοποιώντας το διάλυμα Δ.

TLC (Σύστημα Δ)	R _f = 0,32
Απόδοση	75 %

4.ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR



Σχήμα 22: Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος **8**

5. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία επιτεύχθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης νουκλεοζιτών με πιθανή αντιική και αντικαρκινική δράση. Στηριζόμενοι στο μεγάλο ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι φθορο πυρανονουκλεοζίτες και λαμβάνοντας υπόψη τις σημαντικές βιολογικές ιδιότητες των κετο και δεοξυ-πυρανονουκλεοζιτικών αναλόγων, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών που φέρουν δύο άτομα φθορίου στο τμήμα του σακχάρου, κετονομάδα στην 4'-θέση του σακχάρου, διπλό δεσμό στις 2',3'-θέσεις του σακχάρου και ετεροκυκλική βάση την θυμίνη.

Παρατηρήθηκε ότι με μια σχετικά εύκολη πειραματική διαδικασία με μικρά και σύντομα βήματα, είναι δυνατή η σύνθεση του. Συγκεκριμένα κατά την πρώτη συνθετική πορεία του νουκλεοζίτη που φέρει την θυμίνη ως ετεροκυκλική βάση, η σύνθεση της 1-(2'-Ο-ακετυλο-3'-δεοξυ-3'-φθορο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- θυμίνη (6) είχε απόδοση 88 %, 1-(2'-Ο-ακετυλο-3',6'-διδεοξυ-3',6'-διφθορο)-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)- θυμίνη είχε απόδοση 70 % και τέλος η σύνθεσης της 1-(2,6-διδεοξυ-3',6'-διφθορο -β-D-γλυκερο-εξ-2-ενοπυρανοζο-4-ουλοζη)- θυμίνη (8) είχε απόδοση 75 %.

Η τελική ένωση **8** χαρακτηρίζεται από αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H NMR. Στο φάσμα ^1H NMR του επιθυμητού νουκλεοζίτη **8** εμφανίζεται το σήμα του πρωτονίου H-2' στα 7.10 ppm με σταθερά σύζευξης $J_{2',F} = 5.8\text{Hz}$, καθώς και το σήμα του πρωτονίου H-1' με σταθερά σύζευξης $J_{1',F} = 10.3\text{Hz}$, αντίστοιχα. Λογικό είναι, ότι το σήμα του πρωτονίου H-4' έχει εξαφανιστεί, ενώ διακρίνονται ως πολλαπλές κορυφές τα πρωτόνια στις 5',6'-θέσεις του σακχάρου.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Antonakis, K. "Hexopyranose nucleosides". In *Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C)*; Elsevier, Amsterdam, 1989, 4, p. 241.
- Antonakis, K. "Ketonucleosides". In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Tipson, R. S. and Horton, D. (Eds), Academic Press, New York, 1984, 42, p. 227.
- Antonakis, K. *Carbohydr. Res.* 1972, 24, 229.
- Antonakis, K. *Chimia* 1975, 29, 59.
- Antonakis, K.; Arvor, M. J. *C.R. Acad. Sci.* 1971, 272-c, 1982.
- Antonakis, K.; Bessodes, M. *Carbohydr. Res.* 1973, 30, 192.
- Antonakis, K.; Leclercq, F. *C. R. Acad. Sci., Ser. C* 1970, 271, 1197.
- Antonakis, K.; Leclercq, F. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1971, 2142.
- Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* 1995, 67, 155.
- Augustyns, K.; Rozenski, J.; Van Aerschot, A.; Busson, R.; Claes, P.; Herdewijn, P. *Tetrahedron* 1994, 50, 1189.
- Augustyns, K.; Rozenski, J.; Van Aerschot, A.; Janssen, G.; Herdewijn, P. *J. Org. Chem.* 1993, 58, 2977.
- Augustyns, K.; Vandendriessche, F.; Van Aerschot, A.; Busson, R.; Urbanke, C.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 4711.
- Azuma, A.; Hanaoka, K.; Kurihara, A.; Kobayashi, T.; Miyaushi, S.; Kamo, N.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 3391.
- Azuma, A.; Nakajima, Y.; Nishizono, N.; Minakawa, N.; Suzuki, M.; Hanaoka, K.; Kobayashi, T.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* 1993, 36, 4183.
- Challand, R.; Young, R. J. *Antiviral Chemotherapy* Mann, J. Ed.; UK, 1997.
- Chong, Y.; Gumina, G.; Mathew, J. S.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* 2003 45, 3245.
- Faderl, S.; Gandhi, V.; Kantarjian, H.; Plunkett, W. *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.* 2002, 2002, 37.
- Faderl, S.; Gandhi, V.; Keating, M. J.; Jeha, S.; Plunkett, W.; Kantarjian, H. *Cancer* 2005, 103, 1001.
- Gumina, G.; Chong, Y.; Choo, H.; Song, G.-H.; Chu, C.K. *Curr. Top. Med. Chem.* 2002, 2, 1065.
- Gumina, G.; Song, G. Y.; Chu, C. K. *FEMS Microbiology Letters* 2001, 202, 9.
- Gunaga, P.; Moon, R. H.; Choi J. W.; Shin H. D.; Park G. J.; Jeong, S. L. *Curr. Med. Chem.* 2004, 11, 2585.
- Halmos, T.; Cardon, A.; Antonakis, K. *Chem. -Biol. Interactions* 1983, 46, 11.
- Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 4963.
- Herdewijn, P.; De Clercq, E., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001, 11, 1591.
- Herscovici, J.; Antonakis, K. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1979, 12, 561.
- Jeong, L. S.; Jin, D. Z.; Kim, H. O.; Shin, D. H.; Moon, H. R.; Hyung, R.; Gunaga, P.; Chun, M. W.; Kim, Y.-C.; Melman, N.; Gao, Z.-G.; Jacobson, K. A. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 3775.
- Kinchington, D. J. *Chin. Pathol.* 1999, 52, 89.

Komiotis, D.; Manta S.; Tsoukala E.; Tzioumaki N. *Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents* 2008, 7, 219

Langen, P.; Etzold, G. *Mol. Pharmacol.* 1966, 2, 89.

Leclercq, F.; Antonakis, K. *Carbohydr. Res.* 1989, 193, 307.

Lee, K.; Choi, Y.; Gumina, G.; Zhou, W.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 1313.

Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 980.

Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2008, 43, 420.

Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevsek, A.; Pamulapati, R.T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 2696.

Margolis, D.; Heredia, A.; Gaywee, J.; Oldach, D.; Drusano, G.; Redfield, R. *J. Acquir. Imm. Def. Syndr.* 1999, 21, 362.

Matsuda, A.; Nakajima, Y.; Azuma, A.; Tanaka, M.; Sasaki, T. *J. Med. Chem.* 1991b, 34, 2917.

Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, 95, 105.

Matsuda, A.; Takenuki, K.; Sasaki, T.; Ueda, T. *J. Med. Chem.* 1991a, 34, 812.

Matthes, E.; Scholz, D.; Sydow, G.; Von Janta-Lipinski, M.; Rosenthal, H. A.; Langen, P. *Z. Klin. Med.* 1990, 45, 1255.

McMurry, John Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, (2000) : 151- 152, 905

Miura, S.; Yoshimura, Y.; Endo, M.; Machida, H.; Matsuda, A.; Tanaka, M.; Sasaki, T. *Cancer Lett.* 1998, 129, 103.

Paterson, J.; Uriel, C.; Egron, M. J.; Herscovici, J.; Antonakis, K.; Alaoui, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998, 42, 779.

Plunkett W.; Gandhi V. Purine and pyrimidine nucleoside analogues, in: G. Giaccone, R. Schilsky, P. Sondel (Eds.), *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers*, Elsevier Science B. V., 2001, pp. 21-45.

Plunkett, W.; Huang, P.; Xu, Y. Z.; Heinemann, V.; Grunewald, R.; Gandhi, V. *Semin. Oncol.* 1995, 22, 3-10 (suppl 11) and references cited therein.

Saenger, W. "Principles of Nucleic Acid Chemistry", Springer-Verlag, New York, 1984.

Someya, H.; Shaddix, S. C.; Tiwari, K. N.; Secrist, J. A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003, 304, 1314.

Tanaka, M.; Matsuda, A.; Terao, T.; Sasaki, T. *Cancer Lett.* 1992, 64, 67.

Tiwari, K. N.; Shortnacy-Fowler, A. T.; Cappellacci, L.; Parker, W. B.; Waud, W. R.; Montgomery, J. A.; Secrist, J. A. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 2000, 19, 2005.

Tiwari, K. N.; Shortnacy-Fowler, A. T.; Parker, W. B.; Waud, W. R.; Secrist, J. A. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* 2009, 28, 657–677.

Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J. M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis D.; Leonidas, D. D. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2010, 18, 3413–3425.

Tzioumaki, N.; Tsoukala, E.; Manta, S.; Agelis, G.; Balzarini, J.; Komiotis, D. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2009, 342, 353.

Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 3154.

Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* 2000, 39, 12757.

Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* 1993, 36, 2033.

Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Van Meervelt, L.; Rozenski, J.; Wiebe, L.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Balzarini, J.; Claes, P.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 826.

Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* 1991, 51, 2319.

Yoshimura, Y.; Kitano, K.; Yamada, K.; Satoh, H.; Watanabe, M.; Miura, S.; Sakata, S.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Org. Chem.* 1997, 62, 3140.

Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 3399.