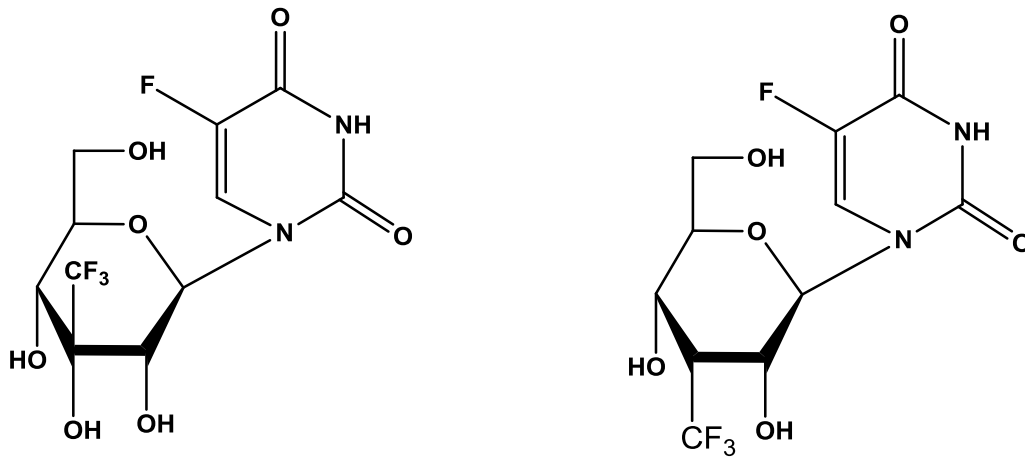




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΟΛΛΑΤΟΣ



Διπλωματική Εργασία

“3’C- ΤΡΙΦΘΟΡΟΜΕΘΥΛΟ ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ
ΩΣ ΝΕΟΙ ΠΙΘΑΝΟΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ”

Λάρισα 2012

Διπλωματική Εργασία

**“3´C- ΤΡΙΦΘΟΡΟΜΕΘΥΛΟ
ΓΛΥΚΟΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣΩΣ ΝΕΟΙ ΠΙΘΑΝΟΙ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ”**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Μαρκουλάτος Παναγιώτης — Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Κομιώτη Δημήτριο τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για τις εποικοδομητικές του υποδείξεις.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη διδάσκουσα κα. Μαντά Στυλιανή για την πολύτιμη βοήθεια της, καθώς επίσης και την υποψήφια διδάκτορα κα. Αθηνά Δημοπούλου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό και τα μέλη του εργαστηρίου για την υποδοχή και το κλίμα συνεργασίας που φρόντισαν να επικρατεί καθ' όλη τη διάρκεια.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Υδατάνθρακες	9
1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών : σχηματισμός ημιακετάλης	8
1.3 Νουκλεοζίτες.....	13
1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών	14
1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιαρκινικοί παράγοντες	17
1.6 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες.....	19
1.7 Τριφθορομέθυλο φουρανονουκλεοζίτες.....	21
1.8 Πυρανονουκλεοζίτες	23
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	28
2.1 Σκοπός	28
3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC:thinlayerchromatography).....	29
3.2 Χρωματογραφία στήλης.....	29
3.3 Ξήρανση διαλυτών	30
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων	30
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
4.1.11 Επισκόπηση της σύνθεσης της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-υδρόξυ -β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης.....	31
4.1.2 Μεθοδολογία σύνθεση	32
4.1.3 Σύνθεση της 1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπυροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζης (2)	33
4.1.4 Σύνθεση της 3-C- τριφθορομέθυλο -1,2:5,6-δι-Ο-ισοπυροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (3)	34
4.1.5 Σύνθεση της 3-C- τριφθορομέθυλο -3-υδροξυγλυκόζης (4)	35
4.1.6 Σύνθεση της 3-C- τριφθορομέθυλο -3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλογλυκοπυρανόζης (5).....	36
4.1.7 Σύνθεση της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-υδρόξυ-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-φθοροουρακίλης	37
4.1.8 Σύνθεση της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-υδρόξυ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-φθοροουρακίλης (7)35	38
4.2 Επισκόπηση της σύνθεσης της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-δεοξυ-β-D-αλλοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης	39
4.2.1 Μεθοδολογία Σύνθεσης	40
4.2.2 Σύνθεση της 3'-C-δεοξυ-1,2,5,6-Δις-Ο-ισοπυροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη	41
4.2.2 Σύνθεση της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-δεοξυ- αλλοφουρανόζη	42
4.2.3 Σύνθεση της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-δεοξυ-1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλο αλλοφουρανόζη	43
4.2.4 Σύνθεση της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-δεοξυ-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D- αλλοφουρανόζη)5-φθοροουρακίλης	44

4.2.5 Σύνθεση της 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο-3'-δεοξυ-β-D-αλλοφουρανόζη)5-φθοροουρακίλης	45
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR	46
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	50

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

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

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση του 3'-τριφθορομεθυλο πυρανονουκλεοζίτη της 5'-φθοροουρακίλης καθώς και του 3'-τριφθορομεθυλο-3'-δεοξυ φουρανονουκλεοζίτη της 5'-φθοροουρακίλης ως πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες. Αναλύονται οι συνθετικές οδοί που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή τους, η μέθοδος ταυτοποίησής τους καθώς και η βιολογική τους αποτίμηση.

ABSTRACT

In recent years, the research interest has turned to nucleosides and nucleoside analogues, mainly because of their therapeutic properties. It is recognized that many natural antibiotics with anticancer, antibacterial and antiviral action containing nucleosides consisting of monosaccharides with five or six-member ring connected to a ring-position hetero basis. This fact led to the synthesis of modified nucleosides of six-member ring, which is expected to play an important role in antiviral and anticancer therapy.

This diploma thesis describes the synthesis of novel nucleoside analogue, that of the 3'-CF₃ pyranonucleoside of FUracil and 3'-CF₃ 3'-deoxy furanonucleoside of FUracil as potential anticancer agents. Within, the synthetic route, structure identification and biological evaluation of the novel compounds are detailed.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Υδατάνθρακες

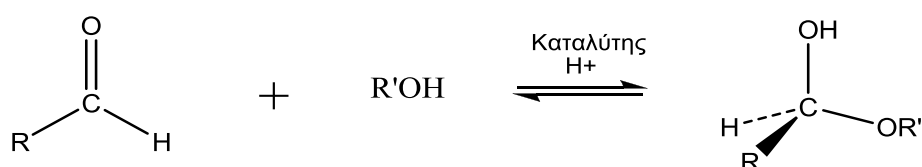
Οι υδατάνθρακες είναι πολυυδροξυαλδεΐδες, πολυυδροξυκετόνες, ή ενώσεις οι οποίες μπορούν να υδρολυθούν προς αυτές, με γενικό τύπο $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Ένας υδατάνθρακας ο οποίος δεν μπορεί να υδρολυθεί προς απλούστερες ενώσεις καλείται μονοσακχαρίτης, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Ένας υδατάνθρακας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

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

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

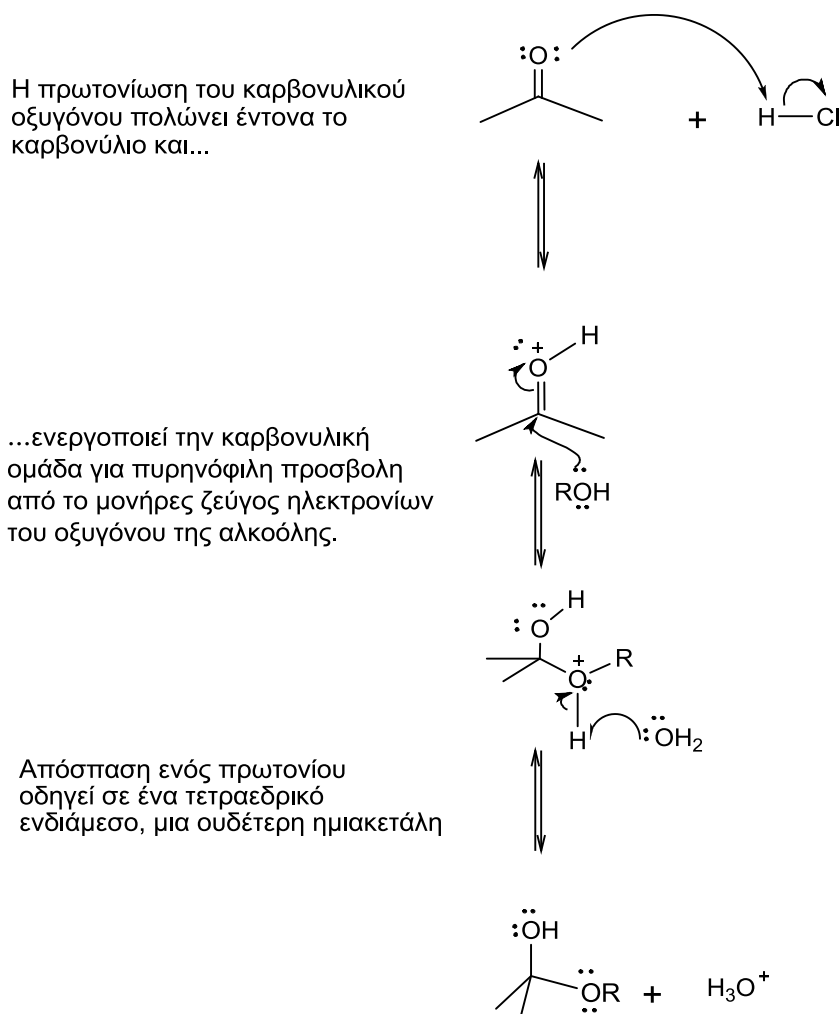
1.2.Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών : σχηματισμός ημιακετάλης

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

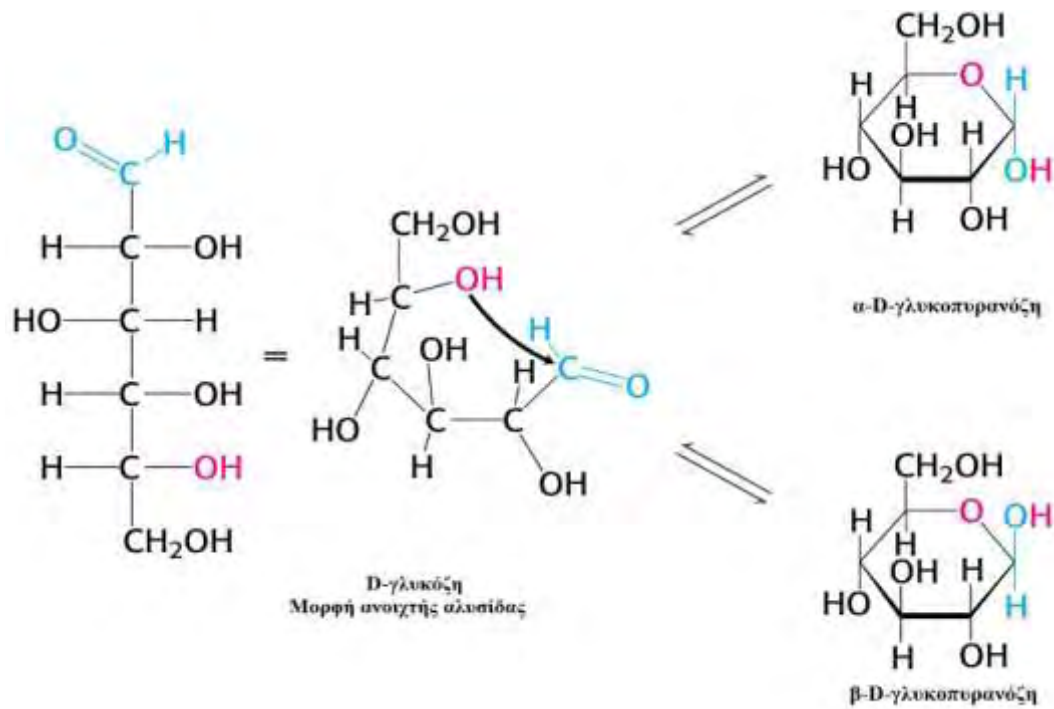


Σχήμα 1 : Σχηματισμός ημιακετάλης

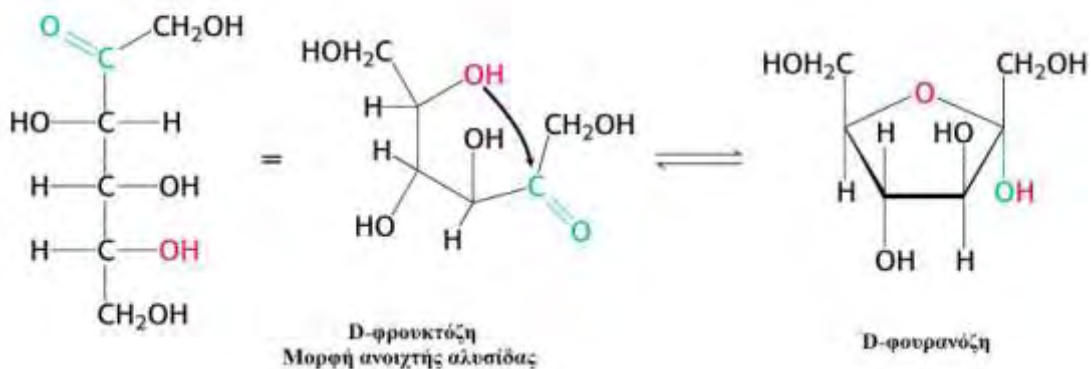
Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 1 (Mc Murry, 2000, p. 905):



Όταν η υδροξυλομάδα και το καρβονύλιο βρίσκονται στο ίδιο μόριο, μπορεί να λάβει χώρα ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη, που οδηγεί στο σχηματισμό μιας κυκλικής ημιακετάλης. Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές της κλειστής και ανοικτής αλυσίδας. Για παράδειγμα, η γλυκόζη σε υδατικό διάλυμα απαντά με τη δομή του εξαμελούς δακτυλίου της πυρανόζης, που οφείλεται στην ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη του $-OH$ του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C1 (σχήμα 2). Η φρουκτόζη, αντίθετα, απαντά κατά 80% στην πυρανοζική δομή και κατά 20% στη δομή του πενταμελούς δακτυλίου της φουρανόζης, που σχηματίζεται από την προσθήκη του $-OH$ του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C2 (σχήμα 3).



Σχήμα 2 : Σχηματισμός γλυκοπυρανόζης



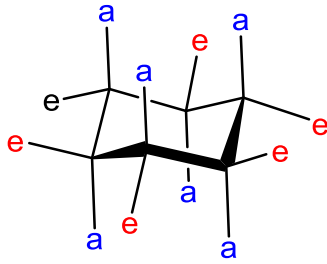
Σχήμα 3: Σχηματισμός φουρανόζης

Με την κυκλοποίηση της ανοικτής αλυσίδας, ένας μονοσακχαρίτης αποκτά τη δομή της φουρανόζης ή της πυρανόζης, όπου σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Τα δύο νέα διαστερομερή ονομάζονται ανωμερή και ο ημιακεταλικός άνθρακας ανωμερικόκέντρο (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(σχήμα 2). Στην περίπτωση της α-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «α» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση trans ως προς τον υποκαταστάτη –CH₂OH του C-5 (δηλαδή βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). Στην περίπτωση της β-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «β» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση cis ως προς τον υποκαταστάτη –CH₂OH του C-5 (δηλαδή βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου).

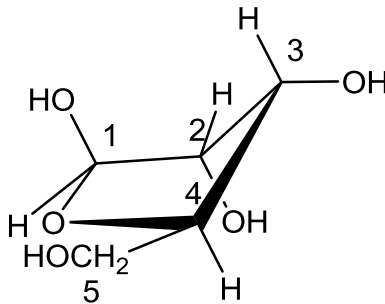
Στη φρουκτόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ίδια ονοματολογία για τα δυο της ανωμερή α και β. Η μόνη διαφορά είναι ότι αναφέρονται στο υδροξύλιο που είναι ενωμένο στον άνθρακα C-2, που είναι και ανωμερής.

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



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

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



Σχήμα 5:Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης

1.3.Νουκλεοζίτες

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

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

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

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

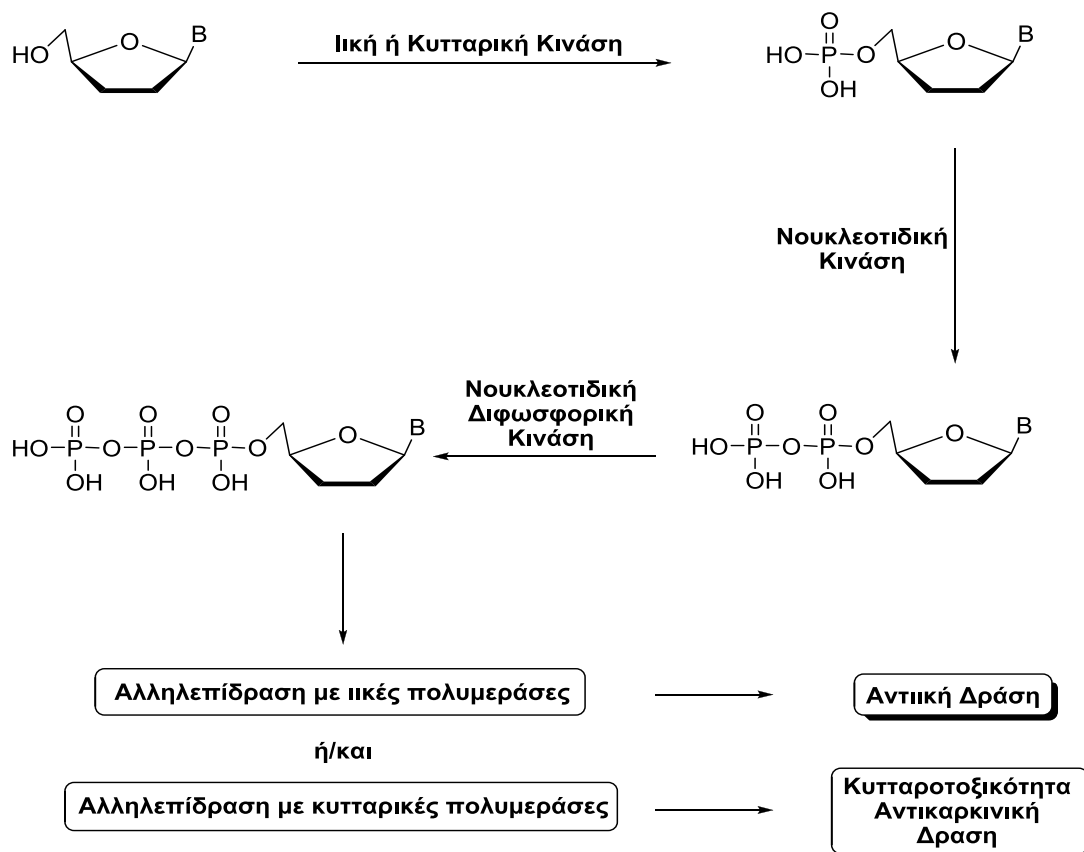
1.4. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Γενικά, ο τρόπος δράσης των φαρμάκων βασίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό στόχο, ο οποίος μπορεί να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη, όπως ένας υποδοχέας, ένας διάυλος ιόντων, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφορέας, είτε τα νουκλεϊνικά οξέα. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των νουκλεοζιτικών

αναλόγων που διαθέτουν αντιιική ή αντικαρκινική δράση, τα οποία λόγω της δυνατότητας μεταφοράς τους εντός των κυττάρων με παθητική διάχυση είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία πολλών ασθενειών (Zhou et al. 2004).

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών αποτελούν στην πραγματικότητα ανενεργά προφάρμακα, τα οποία ενδοκυτταρικά πρέπει να τροποποιηθούν ώστε να μπορέσουν να δράσουν. Η διαδικασία αυτή συνίσταται στη φωσφορυλίωσή τους από τις κυτταρικές ή ιικές κινάσες (Arner and Eriksson 1995). Αφού φωσφορυλιωθούν προς τις τριφωσφορικές τους δομές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA (σχήμα6).

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



Σχήμα 6: Φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιικές κινάσες

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

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

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

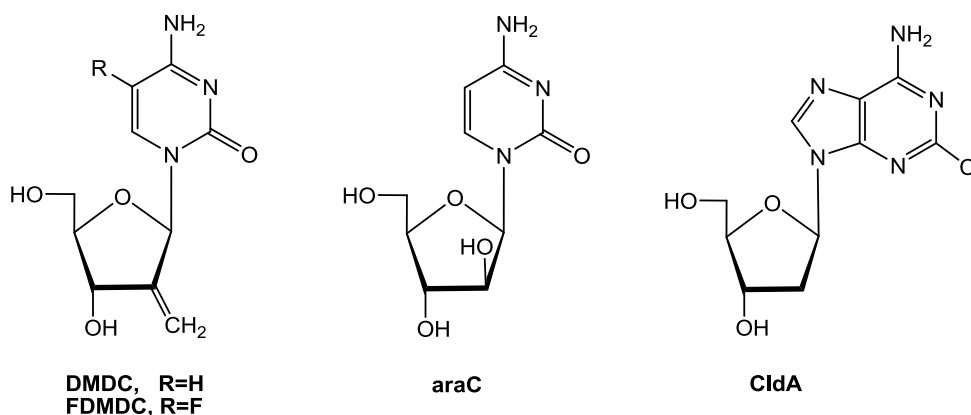
σύνθεση των πρωτεϊνών (Siev et al. 1969) και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης (Ahn et al. 2000).

1.5.Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

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

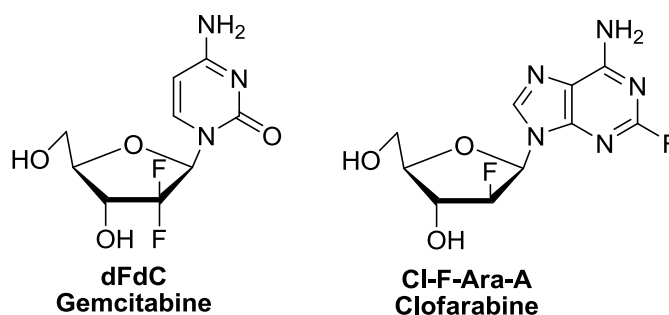
Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία διαθέτουν αυξημένη δραστηριότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα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

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



Σχήμα 7

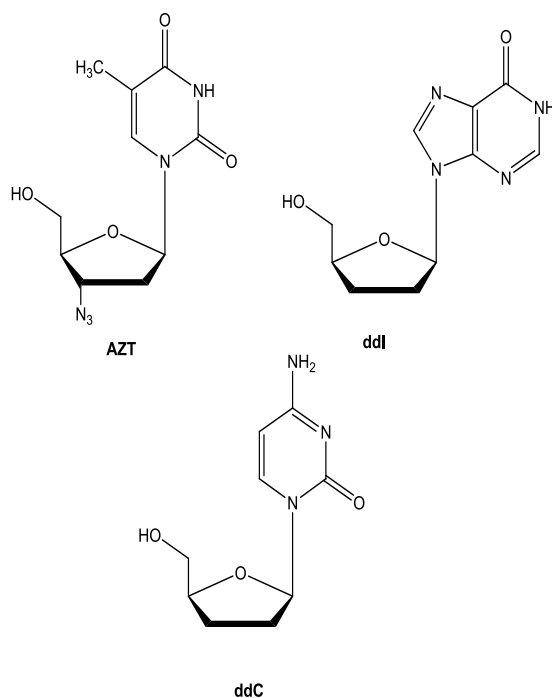
Ορόσημο στη μελέτη των φθορονουκλεοζιτών αποτελεί η ανακάλυψη της 2'-δεοξυ-2',2'-διφθοροκυτιδίνης [gemcitabine (γεμισαμπίνη), dFdC] (Plunkett *et. al.* 1995) (Σχήμα 8), η οποία αποτελεί σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα έναντι μεγάλου φάσματος κακοήθων όγκων, όπως αυτού του παγκρέατος. Η γεμισαμπίνη δρα αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA μέσω ανταγωνιστικής ενσωμάτωσης στη νεοσυντιθέμενη κάθε φορά αλυσίδα.



Σχήμα 8

1.6.Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες

Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα από τα νουκλεοζιτικά αυτά ανάλογα είναι το zidovudine (AZT), το didanosine (DDI) και το zalcitabine (DDC), τα οποία χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα εναντίον του HIV (σχήμα 8).

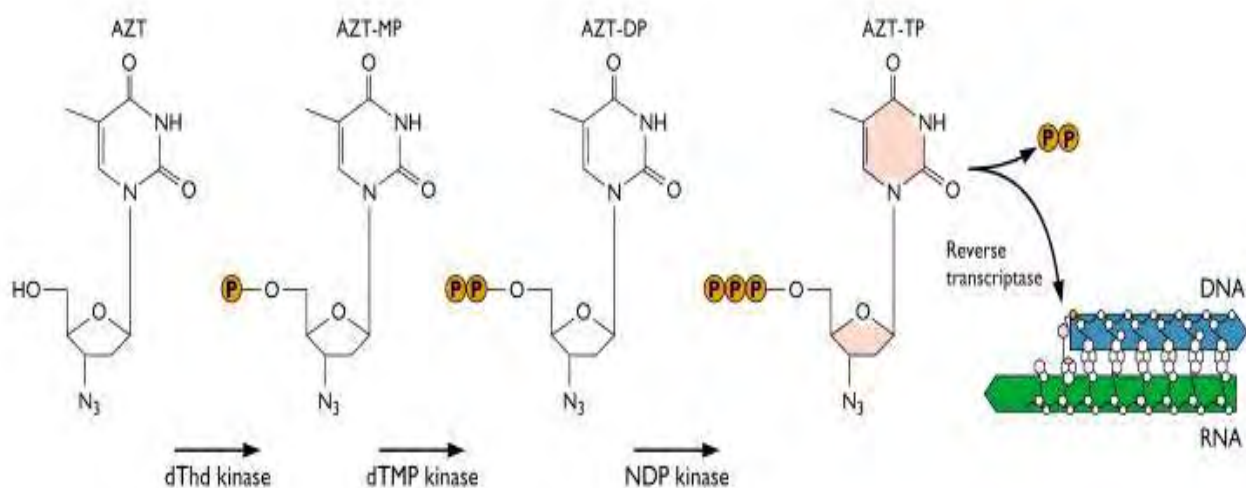


Σχήμα 8. Χημικές δομές των AZT, ddi, ddC

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.

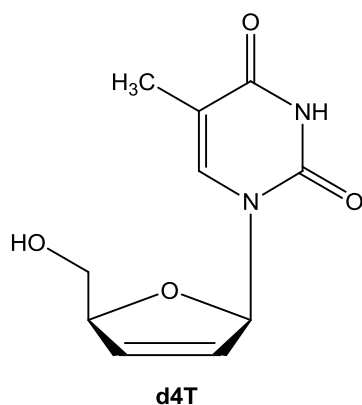
Το AZT (3'-αζιδο-2'-δεοξυθυμιδίνη) ήταν το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία του AIDS (www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrν/). Φωσφορυλιώνεται από τα κυτταρικά ένζυμα στην ενεργή του μορφή και δρα ως αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης τερματίζοντας την αλυσίδα

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



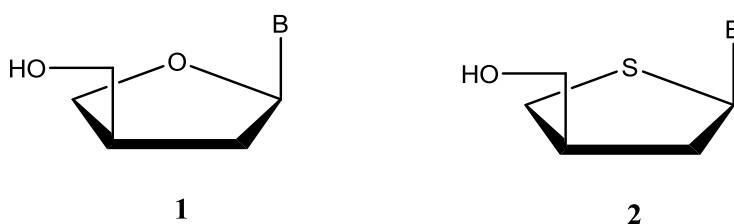
Σχήμα 9. Τερματισμός της αλυσίδας του ιικού DNA από το φωσφορυλιωμένο AZT

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 10.



Σχήμα 10. Χημική δομή της D4T

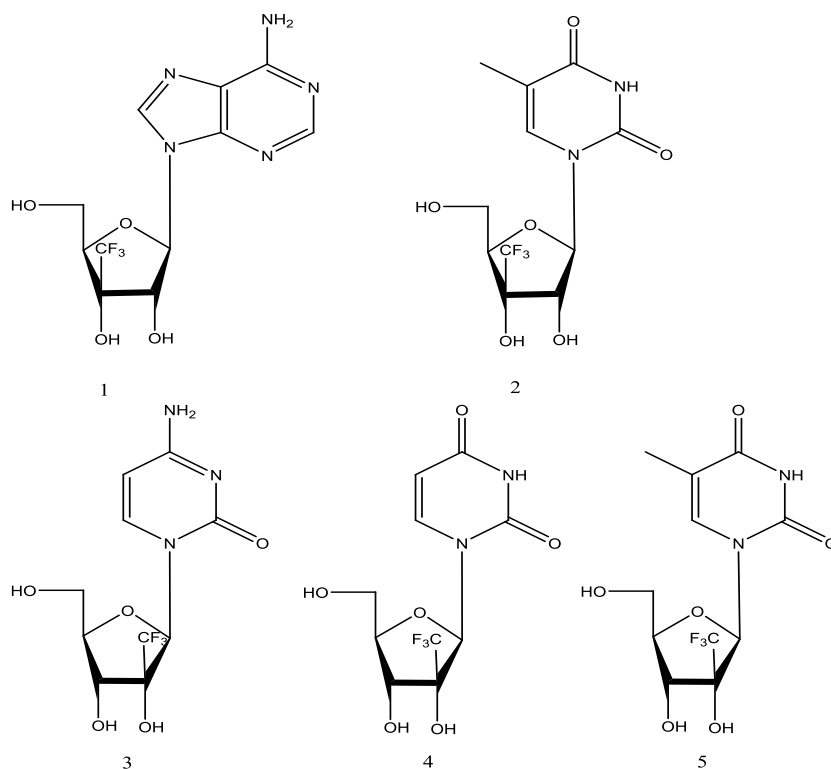
Στην κατηγορία των αντισυντακτικών ενώσεων συναντάμε και μη κλασικές κατηγορίες νουκλεοζιδίων. Μια χαρακτηριστική ομάδα είναι οι απιο- διδεοξυνουκλεοζίτες 1, όπου η 4'-υδροξυμεθυλο ομάδα έχει μετατοπιστεί στον C-3' (Moon et. al. 2002). Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν αντισυντακτική δράση,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



Σχήμα 11

1.7.Τριφθορομέθυλο φουρανονουκλεοζίτες

Τις τελευταίες δεκαετίες σημαντική ήταν η έρευνα για τους τριφθορομέθυλο νουκλεοζίτες, η οποία στηρίχτηκε στα όμοια επαγωγικά φαινόμενα της CF_3 ομάδας με το άτομο του F, σε συνδυασμό με το ότι η παρουσία της στερεικά απαιτητικής τριφθορομεθυλο ομάδας σε στρατηγικές θέσεις βιοενεργών ενώσεων προκαλεί συχνά μείωση του μεταβολισμού, αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας καθώς και αυξημένη λιποφιλικότητα (Carl R. Johnson* and Dilip R.Bhumralkar). Το 1995, ο Carl Johnson παρουσίασε τη σύνθεση και τη βιολογική αποτίμηση νέων 3'-τριφθορομέθυλο νουκλεοζιδίων 1,2, οι οποίοι εμφάνισαν σημαντική αντισυντακτική δράση έναντι διαφόρων DNA και RNAίων, σε αντίθεση με τους 2'-τριφθορομέθυλο νουκλεοζίτες 3-5, οι οποίοι δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτη αντισυντακτική δράση (Frederic Jeannot) (Σχήμα 12).



Σχήμα 12

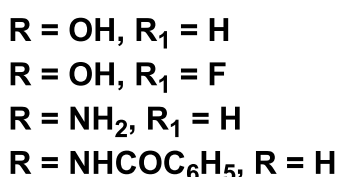
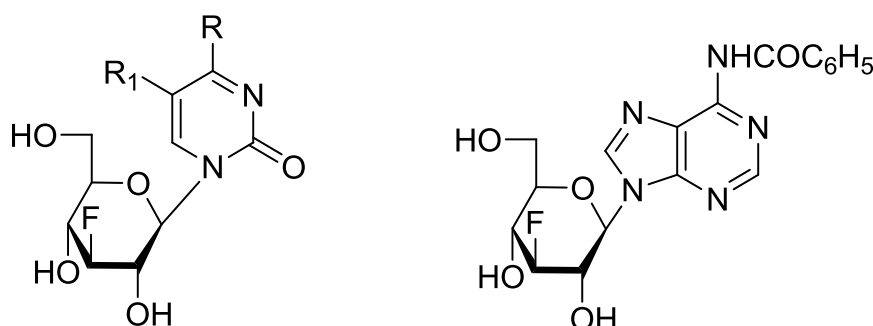
Μετά τα πρώτα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, όσον αφορά τους τριφθορομέθυλο φουρανονουκλεοζίτες, ο Lavaire συνέθεσε τους 2',3'-διδεοξυ-3'-C-τριφθορομεθυλο νουκλεοζίτες της ουρακίλης και της θυμίνης¹ (σχήμα 13), οι οποίοι όμως δεν εμφάνισαν αξιόλογη βιολογική δράση. Κατόπιν, ο Jeannot παρουσίασε νέους 2'3'-ακόρεστους 3'-τριφθορομέθυλο φουρανονουκλεοζίτες της αδενίνης και της κυτοσίνης (ενώσεις^{2, 3}, σχήμα 13), οι οποίοι εμφάνισαν μέτρια αντική δράση έναντι του HBV.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι η έρευνα για την ανακάλυψη αντιικών και αντικαρκινικών νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο είχε μείνει αρκετά βήματα πίσω σε σχέση με αυτή των βιολογικώς ενεργών νουκλεοζιτών με τροποποιημένους πενταμελείς δακτυλίους. Παρόλα αυτά, 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).

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

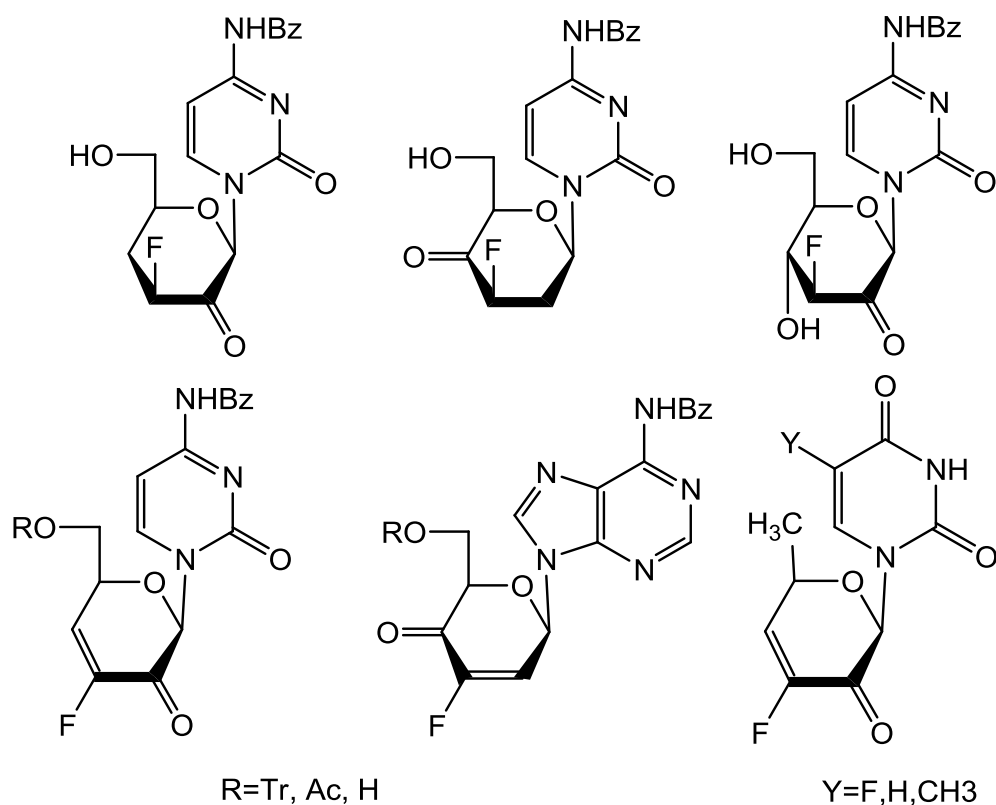
δεδομένου ότι είναι το πιο ηλεκτραρνητικό όλων των στοιχείων, μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη χημική δραστηριότητα.

Στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έχουν συντεθεί φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Manta et al. 2007), οι οποίοι εμφάνισαν ανασταλτική δράση έναντι της PARN, ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(Α) ουράς), καθώς και της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (σχήμα 14).



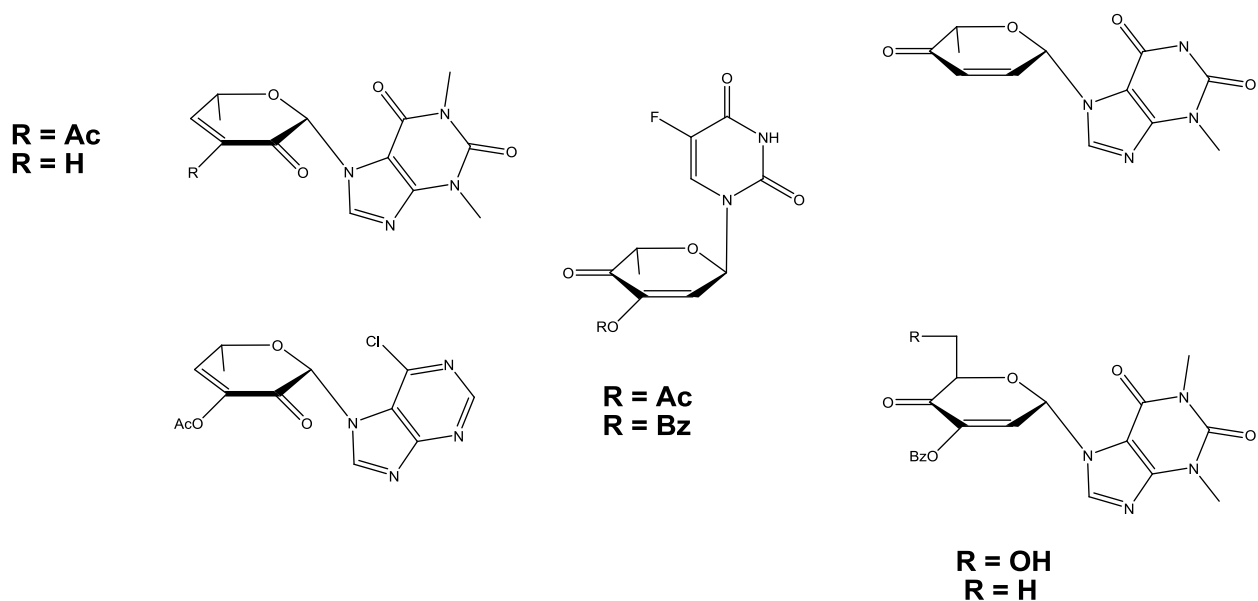
Σχήμα 14: Χημική δομή φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών

Επιπλέον έχουν αξιολογηθεί νέες σειρές νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο και πιο συγκεκριμένα οι φθοροκετο και ακόρεστοι φθοροκετο -πυρανονουκλεοζίτες. Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης εντεροϊού και αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Manta et al. 2007, Manta et al. 2008, Manta et al. 2009) (σχήμα 15).



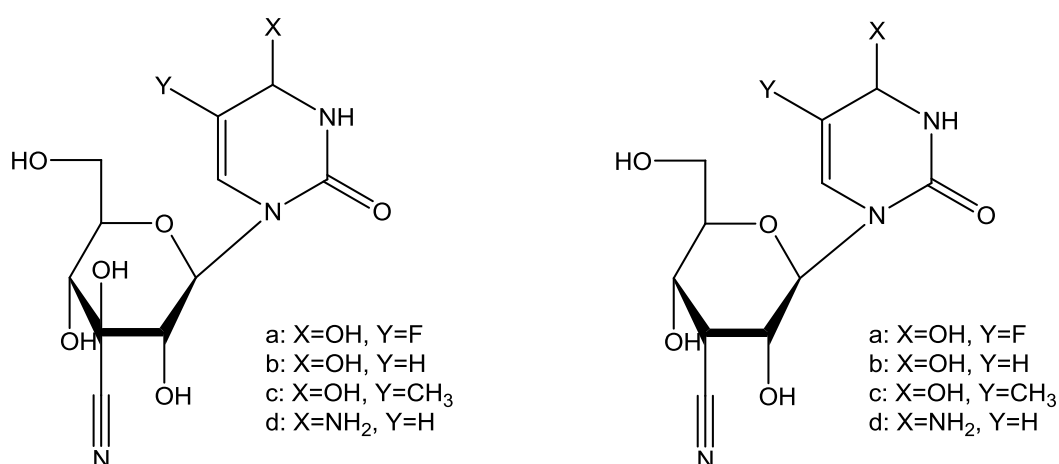
Σχήμα 15: Χημική δομή φθοροκέτο και ακόρεστων φθοροκέτο-πυρανοουκλεοζιτών

Επιπρόσθετα, ακόρεστα κετο-πυρανοουκλεοζιτικά ανάλογα παρουσίασαν, σε προηγούμενες μελέτες, σημαντική ανασταλτική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυττάρων *in vitro* αλλά και *in vivo* (Komiotis et al. 1991, Patterson et al. 1998, Komiotis et al. 2008). (σχήμα 16).



Σχήμα 16: Ακόρεστα κετο-πυρανονουκλεοζιτικά ανάλογα

Πρόσφατα μια νέα τάξη πυρανονουκλεοζιτών που έχει μελετηθεί είναι αυτή των 3'-κυανιδρινών και 3'-δεοξυ-κυανο πυρανονουκλεοζιτών (Kiritsis et al., 2011). Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες αξιολογήθηκαν για την αντιική τους δράση έναντι μιας πληθώρας DNA και RNA ιών, ενώ παρουσίασαν σημαντική κυτταροστατική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων λευχαιμίας (L1210), των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM), καθώς επίσης και κατά του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων τραχηλικών καρκινικών κυττάρων (HeLa) (σχήμα 17).



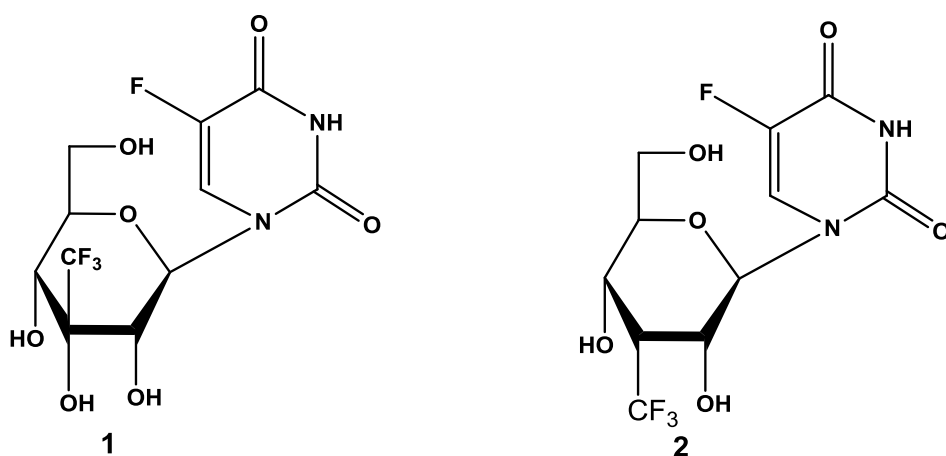
Σχήμα 17: 3' κύανο-νουκλεοζίτες

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός

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

Έχει διαπιστωθεί με βάση τη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία ότι οι φθόρο φούρανο νουκλεοζίτες αποτελούν μια αξιόλογη κατηγορία ενώσεων που έχει προσελκύσει σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι νέες τάξεις ασυνήθιστων φθοριωμένων πυρανονουκλεοζιτών αποτελούν εν δυνάμει αντι-εντεροϊικούς παράγοντες, θεραπευτικά μέσα για τον καρκίνο του παχέως εντέρου, καθώς και αποτελεσματικούς αναστολείς της ανάπτυξης καρκινικών όγκων. Βασιζόμενοι στα παραπάνω στοιχεία, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών στους οποίους η ηλεκτραρνητική τριφθορομεθυλοομάδα θα αντικαταστήσει το άτομο του φθορίου. Οι νέοι νουκλεοζίτες φέρουν την τριφθορομεθυλοομάδα στη 3'-θέση του σακχάρου και ως ετεροκυκλική βάση την φθοροουρακίλη (σχήμα 18). Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν ως αντικαρκινικοί παράγοντες.



Σχή

μα 18 : 1) 3'-CF₃-OH γλυκοπυρανόζης, 2) 3'-CF₃-δεοξυγλυκοπυρανόζης

3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC:Thin layer chromatography)

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

3.2 Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η πλειοψηφία των καθαρισμών οργανικών ουσιών πραγματοποιούνται μέσω της χρωματογραφίας μιας τεχνικής κατά την οποία το επιθυμητό προϊόν διαλύεται σε έναν οργανικό διαλύτη ή σύστημα διαλυτών σε συγκεκριμένη κάθε φορά αναλογία και στη συνέχεια αφήνεται να διαρρεύσει μέσω ενός κατακόρυφου γυάλινου σωλήνα ο οποίος είναι γεμάτος με προσροφητικό υλικό. Το προς διαχωρισμό μείγμα ονομάζεται κινητή φάση ενώ το προσροφητικό υλικό εντός του σωλήνα στατική. Επειδή οι διαφορετικές ενώσεις προσροφώνται στη στατική φάση σε διαφορετική έκταση, μετακινούνται διαμέσου αυτής με διαφορετικές ταχύτητες και για το λόγο αυτό, εξέρχονται από τη στήλη –εκκλούνται- από το άκρο της. Ο χρόνος έκλουσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα από την πολικότητά της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες προσροφώνται κατά κανόνα, εντονότερα και άρα μετακινούνται βραδύτερα μέσω της στατικής φάσης σε σχέση με τα περισσότερα άπολα.

Η χρωματογραφία στήλης πραγματοποιείται για τον καθαρισμό των προϊόντων και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merck grade).

3.3 Ξήρανση διαλυτών

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

Η ξήρανση του ακετονιτριλίου γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε. Η δε πυριδίνη αποστάχθηκε παρουσία υδροξειδίου του καλίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε.

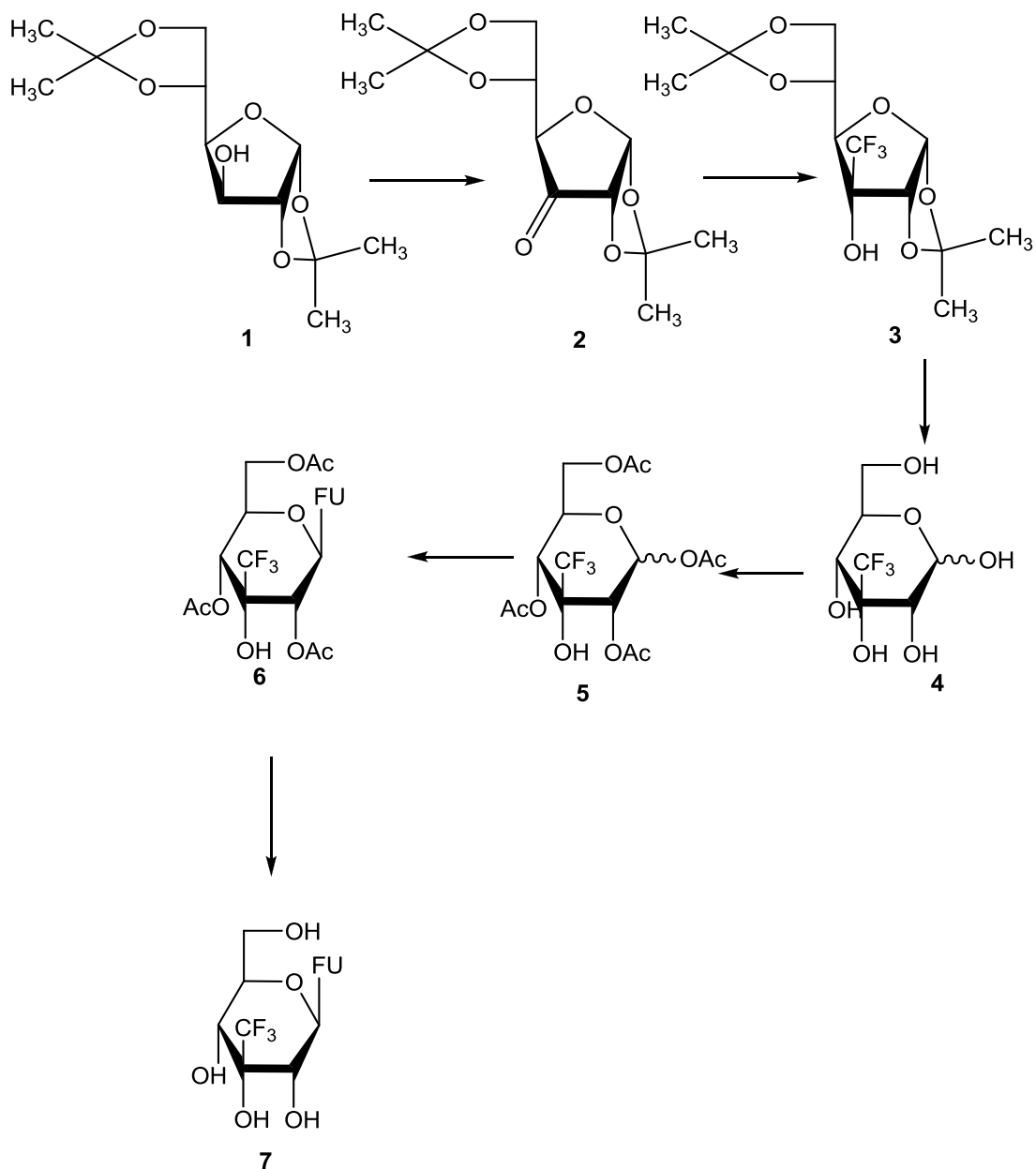
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί την πρώτη και χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική προσδιορισμού της δομής των μορίων καθώς παρέχει ένα χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ^1H -NMR καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο Bruker AVAMCE^{III} 300 και τα φάσματα ^{13}C -NMR καταγράφηκαν στα 75.5MHz στο ίδιο φωτόμετρο, χρησιμοποιώντας chloroform-d (CDCl_3), methanol-d₄ (CD_3OD). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για ^1H .

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1.1 Επισκόπηση της σύνθεσης της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-υδρόξυ -β-D-γλυκοπιρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (7)



4.1.2 Μεθοδολογία Σύνθεσης

Η πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-γλυκοφουρανόζη (DAG) (**1**), η οποία οξειδώνεται προς 1,2:5,6-Δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζη (**2**) χρησιμοποιώντας PDC παρουσία AC_2O σε διαλύτη CH_2Cl_2 . Η αντίδραση προχωράει ποσοτικά με απόδοση 89%.

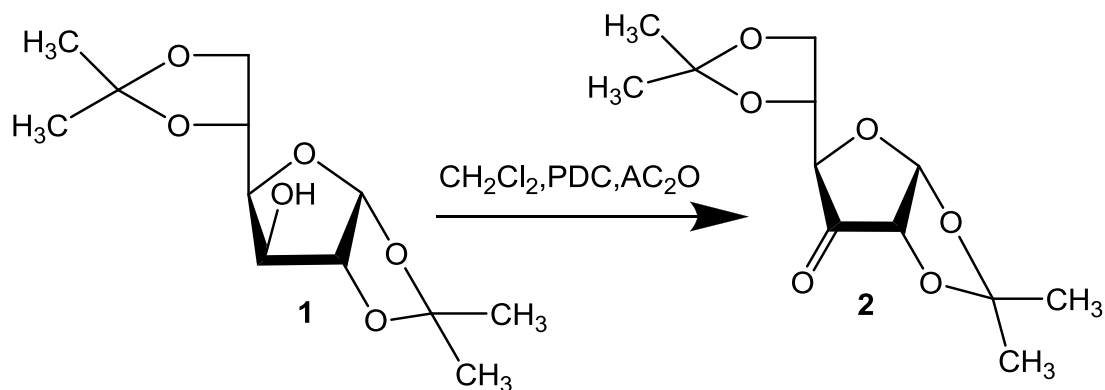
Η επόμενη αντίδραση είναι μία πυρηνόφιλη προσθήκη της τριφθορομέθυλο ομάδας στην κετονομάδα του αντιδραστήριου **2**. Λαμβάνουμε με αυτό τον τρόπο με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα την 3-C-τριφθορομέθυλο-1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (**3**) με αντιδραστήριο τριφθορομέθυλο τριμέθυλο πυρίτιο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

Η σύνθεση συνεχίζεται με την υδρόλυση του προϊόντος **3** με ένα θερμό υδατικό διάλυμα της ρητίνης Amberlite IR-120 (H^+), η οποία οδηγεί στην ένωση **4**, με απόδοση (81%). Στη συνέχεια, με ακετυλίωση του προϊόντος **4** παρουσία οξέικου ανυδρίτη (Ac_2O) σε πυριδίνη, λαμβάνεται το επιθυμητό σάκχαρο, 3-C-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρακίς-Ο-ακετυλογλυκοπυρανόζη (**5**), με απόδοση (64%).

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

Τέλος, η σύνθεση ολοκληρώνεται με την απακετυλίωση του προϊόντος **6** σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας το τελικό προϊόν 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο-3'-υδροξυ-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη (**7**), με απόδοση 92%.

4.1.3 Σύνθεση της 1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζης (2) (Elhalabi and Rice. 2004)

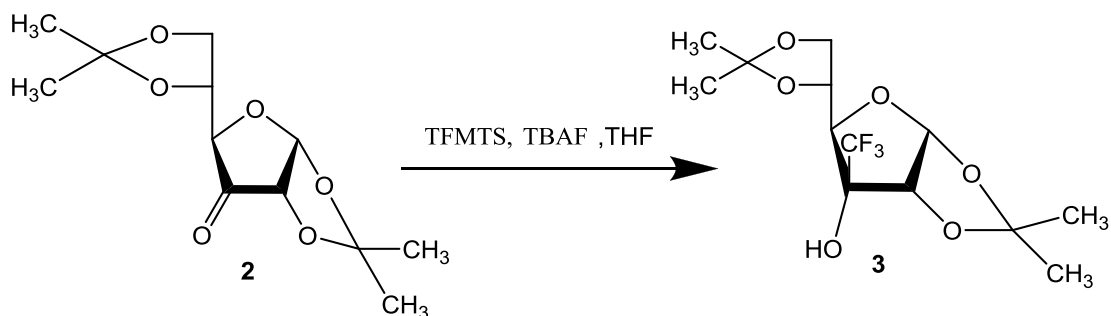


Η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2:5,6-δισ-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-γλυκοφουρανόζη (DAG) (1) (2.05g, 7.9 mmol) διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο (29 ml) και στη συνέχεια προστέθηκε Ac₂O (2.23ml, 23.7mmol). Στο προκύπτον μείγμα προστέθηκε PDC (3.56g, 9.48 mmol) και ακολούθησε θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα για 2 ώρες στους 50⁰C. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC (πίνακας 1). Μετά το πέρας της αντίδρασης στο μείγμα προστέθηκε οξικός αιθυλεστέρας (150 ml) και το προκύπτον παχύρρευστο διάλυμα μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel). Πραγματοποιήθηκε έκλουση με διάλυμα 40% οξικούαιθυλεστέρα σε εξάνιο και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα, που περιείχε Ac₂O αραιώθηκε με τολουόλιο και στη συνέχεια με απόσταξη εξατμίστηκε μέχρι ξηρού. Το επιθυμητό προϊόν 2 (1.75g) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρρευστου πρασινωπού ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

TLC (Διάλυμα E)	R _f =0.3
Απόδοση	95%

Πίνακας 1. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζης (**2**)

4.1.4 Σύνθεση της 3-C- τριφθορομέθυλο -1,2:5,6-δι-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (**3**) (Johnsonet. al. 1995)

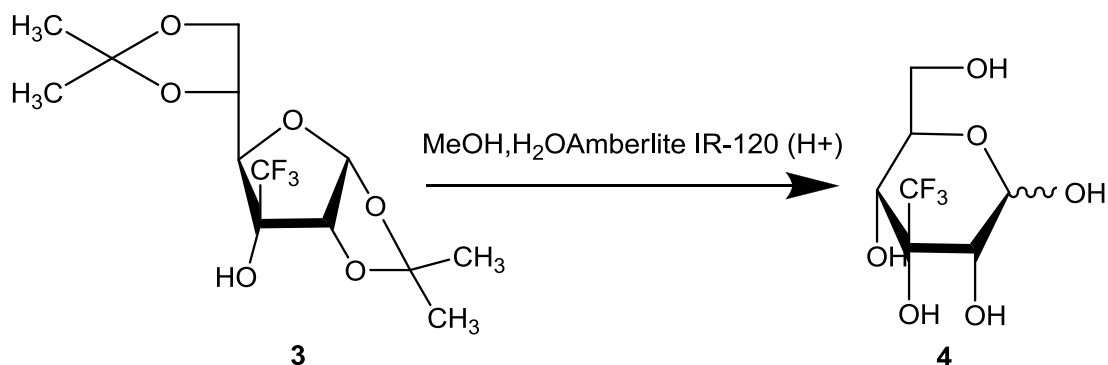


Σε διάλυμα που περιέχει το **2** (1g, 3.9 mmol) και τριφθορομέθυλ-τριμεθυλπυρίτιο (0.8 ml, 8 mmol) σε THF (10 ml) προστέθηκε στάγδην διάλυμα 1M TBAF σε THF (1.1 g, 8 mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 2 ώρες. Το διάλυμα συμπυκνώθηκε και το προϊόν μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel). Πραγματοποιήθηκε έκλουση με 20% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **3** (1.15 g) ελήφθη υπό τη μορφή λεύκου κρυστάλλου.

TLC (Διάλυμα E)	R _f =0.52
Απόδοση	90%

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

4.1.5 Σύνθεση της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυγλυκόζης (**4**) (Foster et. al. 1967, Tewson and Welsh, 1978)

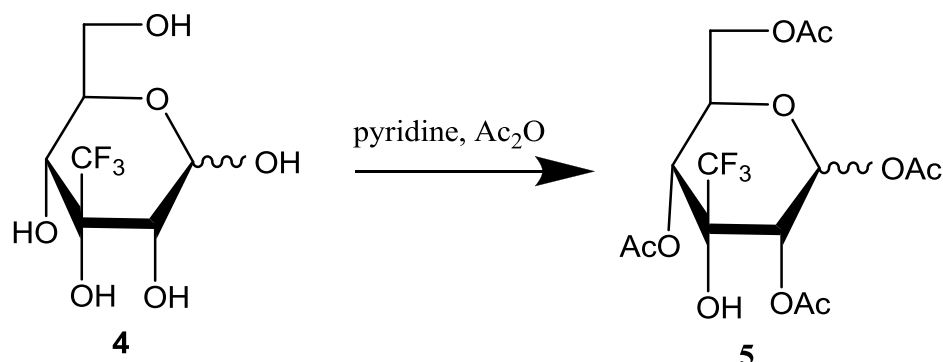


Ένα διάλυμα της ένωσης **3** (700mg, 2.13mmol) σε MeOH (3.31ml) και νερό (19ml) αναδεύτηκε στους 60-70 °C με ρητίνη Amberlite I R-120 (H⁺) (1.10mg). Μετά από 10 ώρες η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 3), το μείγμα διηθήθηκε και απομακρύνθηκαν οι διαλύτες από το διήθημα υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **4** (427mg) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

TLC (Διάλυμα A)	R _f =0.44
Απόδοση	81%

Πίνακας 3. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυγλυκόζης (**4**)

4.1.6 Σύνθεση της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοκυρανόζης (**5**) (Foster et. al. 1967, Tewson et al. 1978)

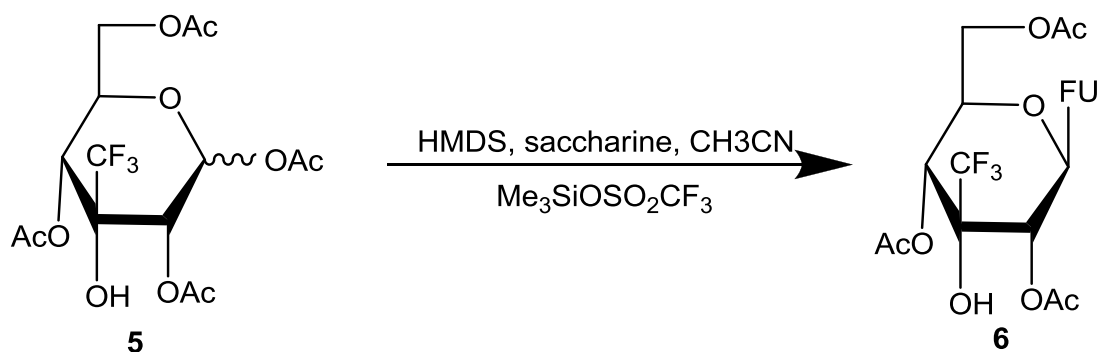


Σε ένα διάλυμα της ένωσης **4** (427mg, 1.72mmol) σε πυριδίνη (6.02ml) προστέθηκε Ac₂O (3.10ml). Το μείγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC πίνακας 4) το διάλυμα κρύωσε στους 0 °C και προστέθηκε μεθανόλη (0.7 ml) για να καταστείλει την αντίδραση. Η αντίδραση συμπυκνώνεται υπό κενό πολλές φορές με MeOH για να απομακρυνθεί η πυριδίνη. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 50% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο και το επιθυμητό προϊόν **5** (429 mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα B)	R _f =0.57
Απόδοση	64%

Πίνακας 4. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοκυρανόζης (**5**).

4.1.7 Σύνθεση της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-υδροξυ-2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (**6**)



Ένα διάλυμα της φθοροουρακίλης (200mg, 1.44 mmol), του HMDS (380 μl, 1.79mmol) και της σακχαρίνης (12.15mg, 0.066mmol) σε άνυδρο CH₃CN (10ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 1 ώρα στους 120 °C και αφότου το μείγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 3-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλογλυκοπυρανόζη (**5**) (429mg, 1.03mmol) καθώς και ο Me₃SiOSO₂CF₃ (0.26ml, 1.44mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες (TLC πίνακας 5) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 90°C. Στη συνέχεια το μείγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (90 ml) και εκχυλίστηκε μία φορά με νερό. Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na₂SO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% εξάνιο σε οξικό αιθυλεστέρα. Το επιθυμητό προϊόν **6** (352mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα Γ)	R _f =0.46
Απόδοση	82%

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

4.1.8 Σύνθεση της 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο-3'-υδροξύ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (**7**)

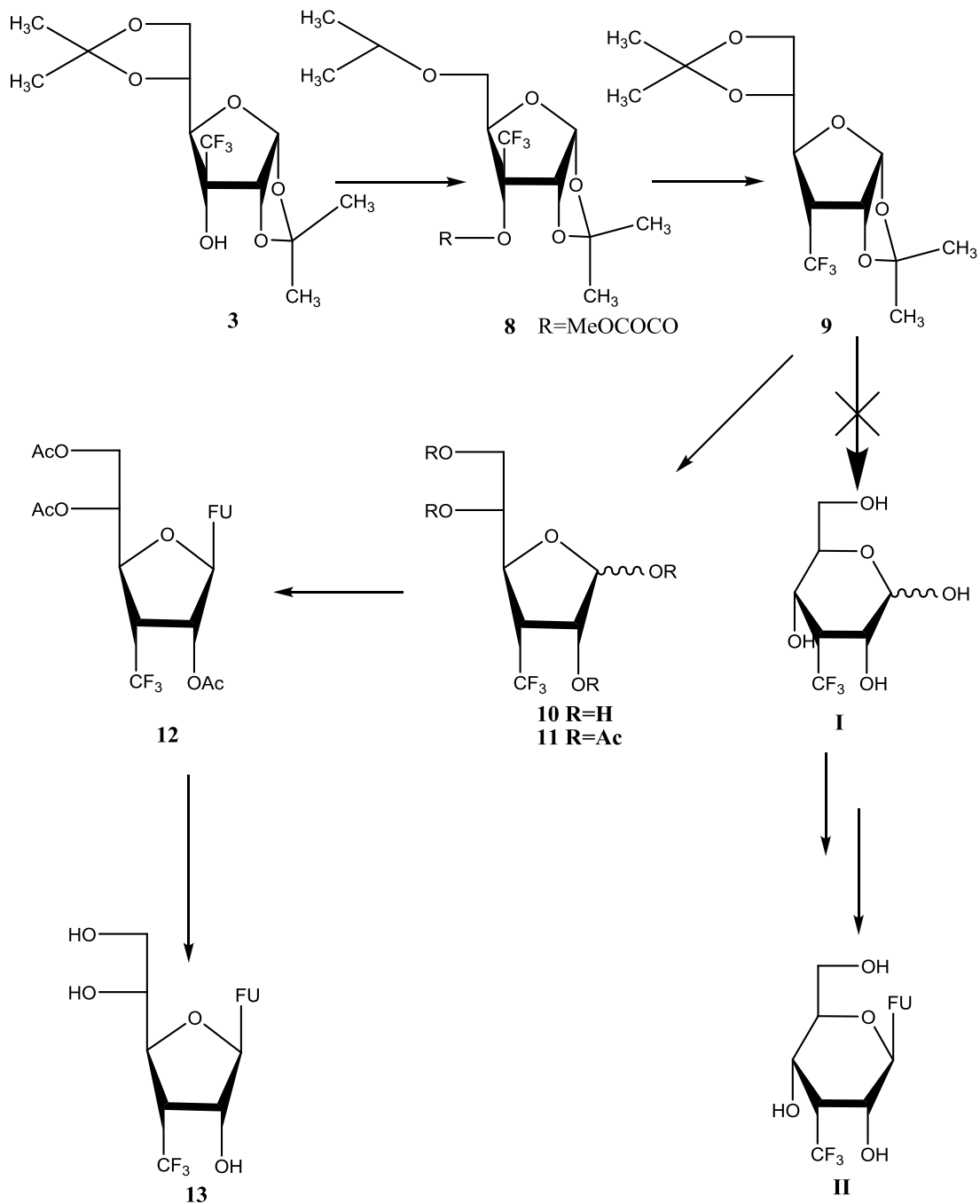


Σε διάλυμα της ένωσης **6** (352 mg, 0.72 mmol) και κορεσμένης με αέρια NH₃ μεθανόλης (30.25 ml) αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 ώρες. Το διάλυμα συμπυκνώνεται και μεταφέρεται σε χρωματογραφική στήλη και εκλούεται με οξικό αιθυλεστέρα και παίρνουμε το τελικό προϊόν 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο-3'-υδροξύ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (**7**) (299 mg).

TLC (Διάλυμα Γ)	R _f =0.50
Απόδοση	92%

Πίνακας 5. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο-3'-υδροξύ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (**7**)

4.2 Επισκόπηση της σύνθεσης της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-δεοξυ-β-D-αλλοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (**11**)



4.2.1 Μεθοδολογία Σύνθεσης

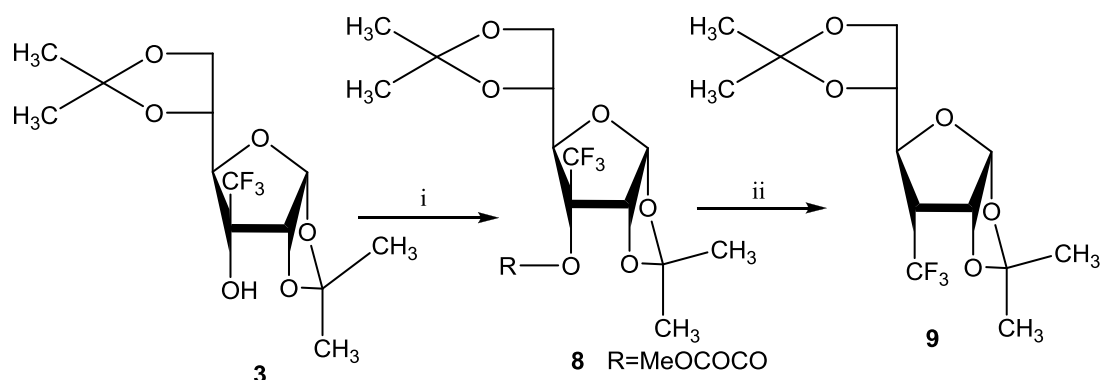
Επόμενο στόχο της παρούσης διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η σύνθεση της 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο-3'-δεοξυ-β-D-αλλοπυρανόζυλο)5-φθοροουρακίλης (**II**). Η μεθοδολογία που επρόκειτο να ακολουθηθεί απεικονίζεται στο παραπάνω Σχήμα.

Αρχικά σχηματίζεται ο μεθοξαλυλεστέρας (**8**) χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο MeOCOCOCOCl σε διαλύτη CH₂Cl₂, επί της ένωσης 3-C-τριφθορομεθυλο-1,2:5,6-δι-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (**3**) που έχει ήδη παρασκευαστεί. (Pawan K. Sharma and Vasu Nair, 2000). Στη συνέχεια, η αναγωγή του προϊόντος **8** λαμβάνει χώρα παρουσία του τριςτριμεθυλσιλιλσιλαν ([[(CH₃)₃Si]₃SiH), καθώς και του αζωδισοβουτυρονιτριλίου (AIBN) σε διαλύτη τολουόλιο στους 100 °C, προς το προϊόν **9**. Έχοντας ως στόχο τη σύνθεση της επιθυμητής αλλοπυρανόζης **I**, πραγματοποιούμε υδρόλυση του προϊόντος **9** με ένα θερμό υδατικό διάλυμα της ρητίνης Amberlite IR-120 (H⁺). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε αντίθεση με την προηγούμενη συνθετική πορεία, η υδρόλυση του δεοξυφουρανοσακχάρου **9**, οδήγησε στη λήψη του αλλοφουρανοσακχάρου **10**, με απόδοση (85%). Στη συνέχεια, με ακετυλίωση του προϊόντος **10** παρουσία οξικού ανυδρίτη (Ac₂O) σε πυριδίνη, λαμβάνεται το σάκχαρο, 3-C-τριφθορομέθυλο-3-δεοξυ-1,2,4,6-τετρακίς-O-ακετυλο αλλοφουρανοζυλο (**11**), με απόδοση 71%.

Ακολουθεί η σύζευξη του σακχάρου **11** με τη βάση 5-φθοροουρακίλη. Αρχικά, σιλιλιώνεται η βάση παρουσία του διαλύτη ακετονιτριλίου (MeCN), εξαμεθυλοδισιλαζανίου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης. Στη συνέχεια, προστίθεται στο σάκχαρο **11** και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα (Me₃SiOSO₂CF₃) και θέρμανση της αντίδρασης, λαμβάνοντας την 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο-3'-δεοξυ-2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-αλλοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη (**12**), σε απόδοση 82%.

Τέλος, η σύνθεση ολοκληρώνεται με την απακετυλίωση του προϊόντος **12** σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας το τελικό προϊόν 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο-3'-δεοξυ- αλλοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλη(**13**), με απόδοση 92%.

4.2.2 Σύνθεση της 3'-C-δεοξυ-1,2,5,6-Δις-O-ισοπροπυλιδανο-α-D-αλλοφουρανόζη (**9**) (Pawan K. Sharma and Vasu Nair, 2000)



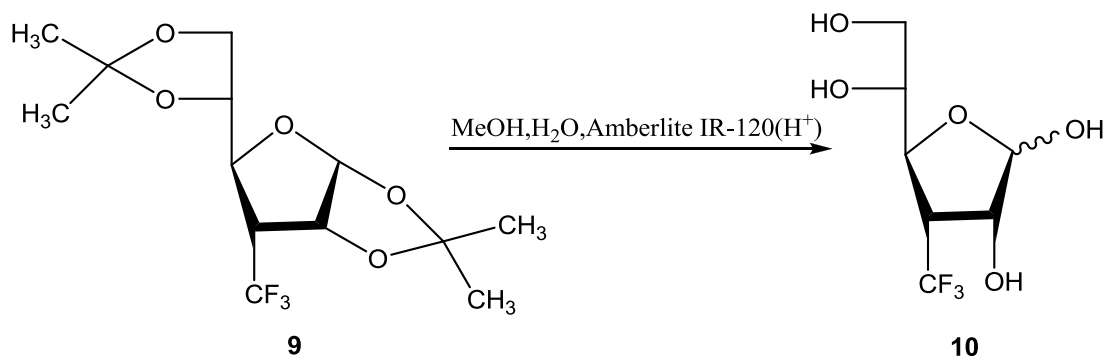
i) MeOCOCOCl, CH₂Cl₂, Pyridine, ii) [(CH₃)₃Si]₃SiH, toluene, AIBN

Σε διάλυμα που περιέχει το **3** (1g, 3.1mmol) και MeOCOCOCl (0.58ml, 6.2mmol) σε διαλύτη (0.8 ml, 8 mmol) σε CH₂Cl₂ (15.5ml). Το διάλυμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 ώρα, στη συνέχεια εκχυλίστηκε με NaHCO₃ και στη συνέχεια συμπυκνώθηκε, ως κίτρινο έλαιο **8**. Στο παραπάνω διάλυμα προστέθηκε τολουόλιο (22 ml), τρις τριμεθυλοσιλυλσιλαν ([(CH₃)₃Si]₃SiH) (1.33 ml, 4,34 mmol) και αζωδισοβουτυρονιτριλίου (AIBN) (2.17 mmol, 357 mg). Το διάλυμα συμπυκνώθηκε και το προϊόν μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel). Πραγματοποιήθηκε έκλουση με 5% οξικός αιθυλεστέρας σε διχλωρομεθάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **9** (504mg) ελήφθη υπό τη μορφή κίτρινο ελαίου.

TLC (Διάλυμα E)	R _f =0.7
Απόδοση	52%

Πίνακας6. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3'-C-δεοξυ-1,2,5,6-Δις-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (**9**)

4.2.2 Σύνθεση της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-δεοξυ-αλλοφουρανόζη (**10**) (Pawan K. Sharma and Vasu Nair, 2000)

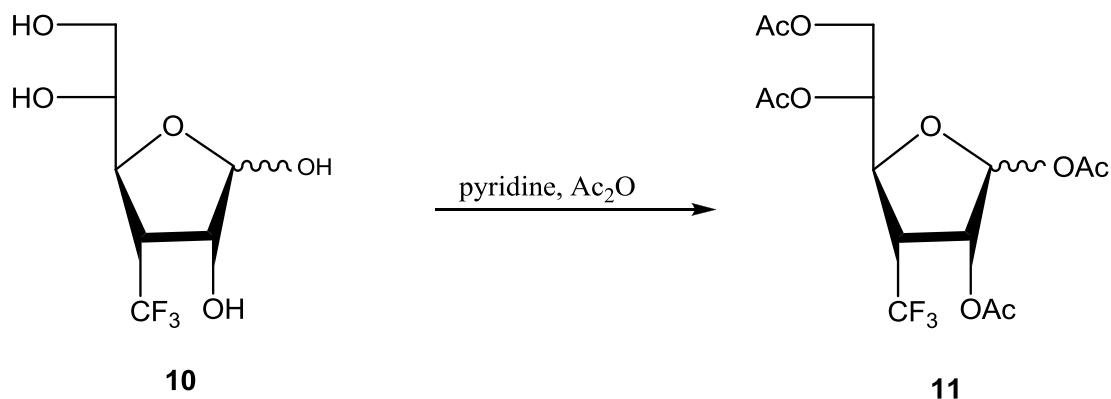


Ένα διάλυμα της ένωσης **9** (500mg, 1.6mmol) σε MeOH (2.5ml) και νερό (15ml) αναδεύτηκε στους 60-70 °C με ρητίνη Amberlite.IR-120 (H⁺) (832mg). Μετά από 10 ώρες η αντίδραση ελέγχεται με TLC (πίνακας 7), το μείγμα διηθήθηκε και απομακρύνθηκαν οι διαλύτες από το διήθημα υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **10** (316mg) ελήφθη υπό τη μορφή παχύρευστου ελαίου και χρησιμοποιήθηκε στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

TLC (Διάλυμα A)	R _f =0.38
Απόδοση	85%

Πίνακας7: Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-δεοξυ-αλλοφουρανόζη (**10**)

4.2.3 Σύνθεση της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-δεοξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλοαλλοφουρανόζη (**11**) (Foster et. al. 1967, Tewson et al. 1978)

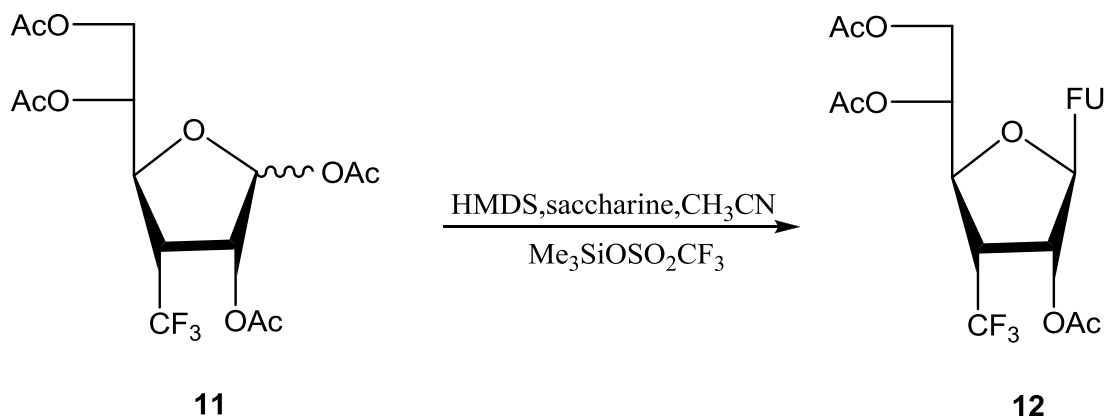


Σε ένα διάλυμα της ένωσης **10** (316mg, 1.36mmol) σε πυριδίνη (4,76ml) προστέθηκε Ac₂O (1.77ml). Το μείγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC πίνακας 4) το διάλυμα κρύωσε στους 0 °C και προστέθηκε μεθανόλη (0.7 ml) για να καταστείλει την αντίδραση. Η αντίδραση συμπυκνώνεται υπό κενό πολλές φορές με MeOH για να απομακρυνθεί η πυριδίνη. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικός αιθυλεστέρας σε εξάνιο και το επιθυμητό προϊόν **11** (390mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα B)	R _f =0.64
Απόδοση	71%

Πίνακας 8. Αποτελέσματα σύνθεσης της 3-C-τριφθορομέθυλο-3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλοαλλοφουρανόζη (**11**).

4.2.4 Σύνθεση της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-δεοξυ-2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-αλλοφουρανόζη)5-φθοροουρακίλης (**6**)

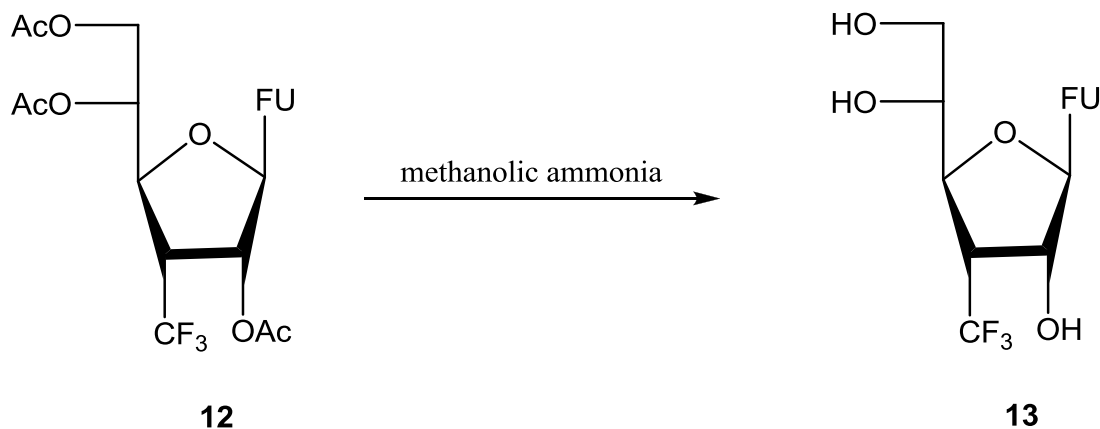


Ένα διάλυμα της φθοροουρακίλης (179mg, 1.37mmol), του HMDS (358 μl, 1.70mmol) και της σακχαρίνης (11.54mg, 0.063mmol) σε άνυδρο CH_3CN (6ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 1 ώρα στους 120°C και αφότου το μείγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 3-τριφθορομέθυλο-3-δεοξυ-1,2,4,6-τετρα-O-ακετυλοαλλοφουρανόζη (**11**) (390mg, 0.98mmol) καθώς και ο $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (0.25ml, 1.37mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες (TLC πίνακας 9) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα στους 90°C . Στη συνέχεια το μείγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 , αραιώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα (90 ml) και εκχυλίστηκε μία φορά με νερό. Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% εξάνιο σε οξικό αιθυλεστέρα. Το επιθυμητό προϊόν **12** (377mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκών κρυστάλλων.

TLC (Διάλυμα Γ)	$R_f=0.45$
Απόδοση	82%

Πίνακας 9. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-δεοξυ-2',4',6'-τρις-O-ακετυλο-β-D-αλλοφουρανόζη)5-φθοροουρακίλης (**12**)

4.2.5 Σύνθεσης 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-δεοξυ-β-D-αλλοφουρανόζη)5-φθοροουρακίλης (**13**)

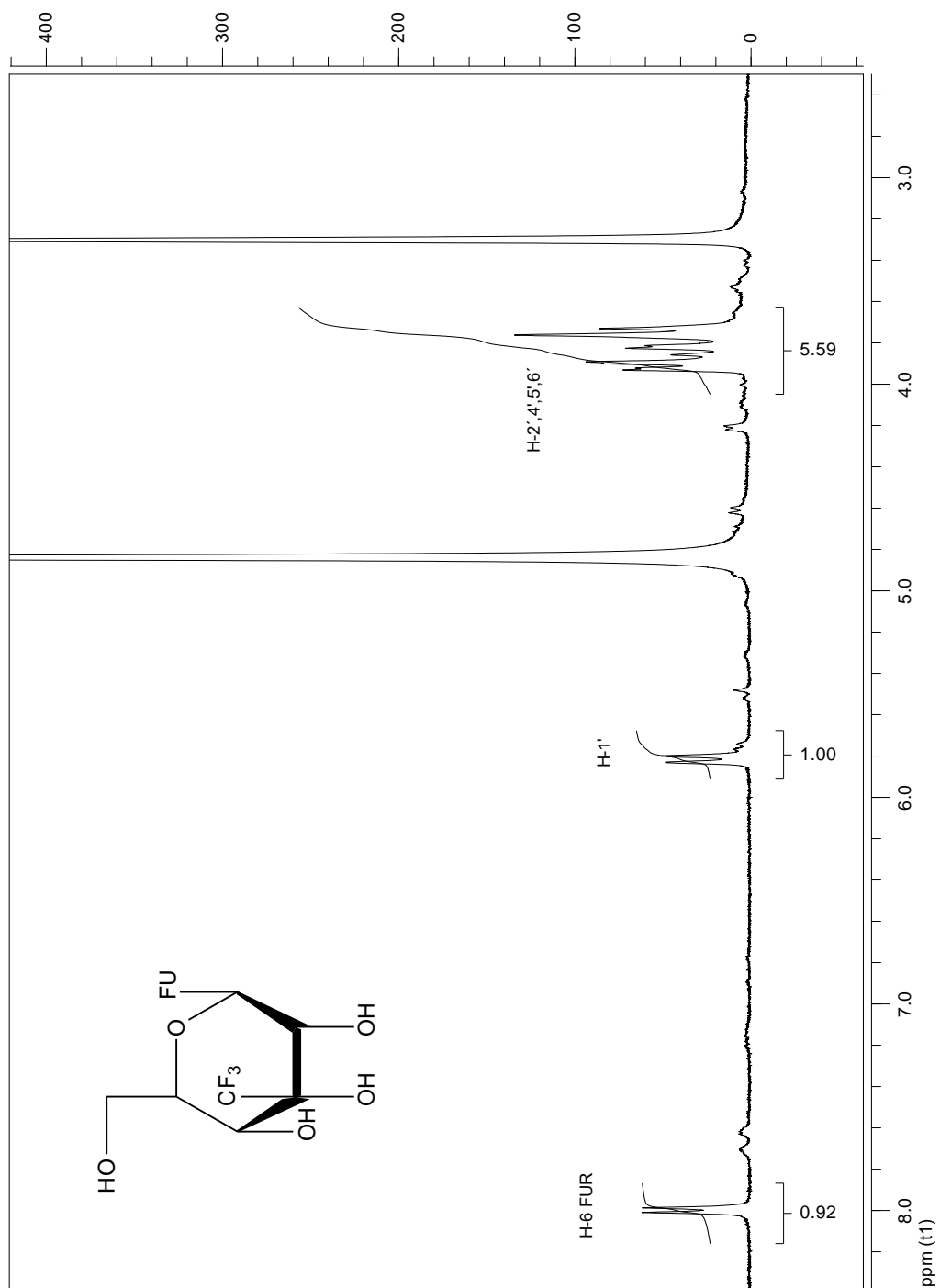


Σε διάλυμα της ένωσης **12** (352 mg, 0.75mmol) και κορεσμένης με αέρια NH₃μεθανόλης (31.35ml) αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10ώρες. Το διάλυμα συμπυκνώνεται και μεταφέρεται σε χρωματογραφική στήλη και εκλούεται με οξικό αιθυλεστέρα και παίρνουμε το τελικό προϊόν 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-δεοξυ-β-D-αλλοφουρανόζη)5-φθοροουρακίλης (**13**) (299 mg).

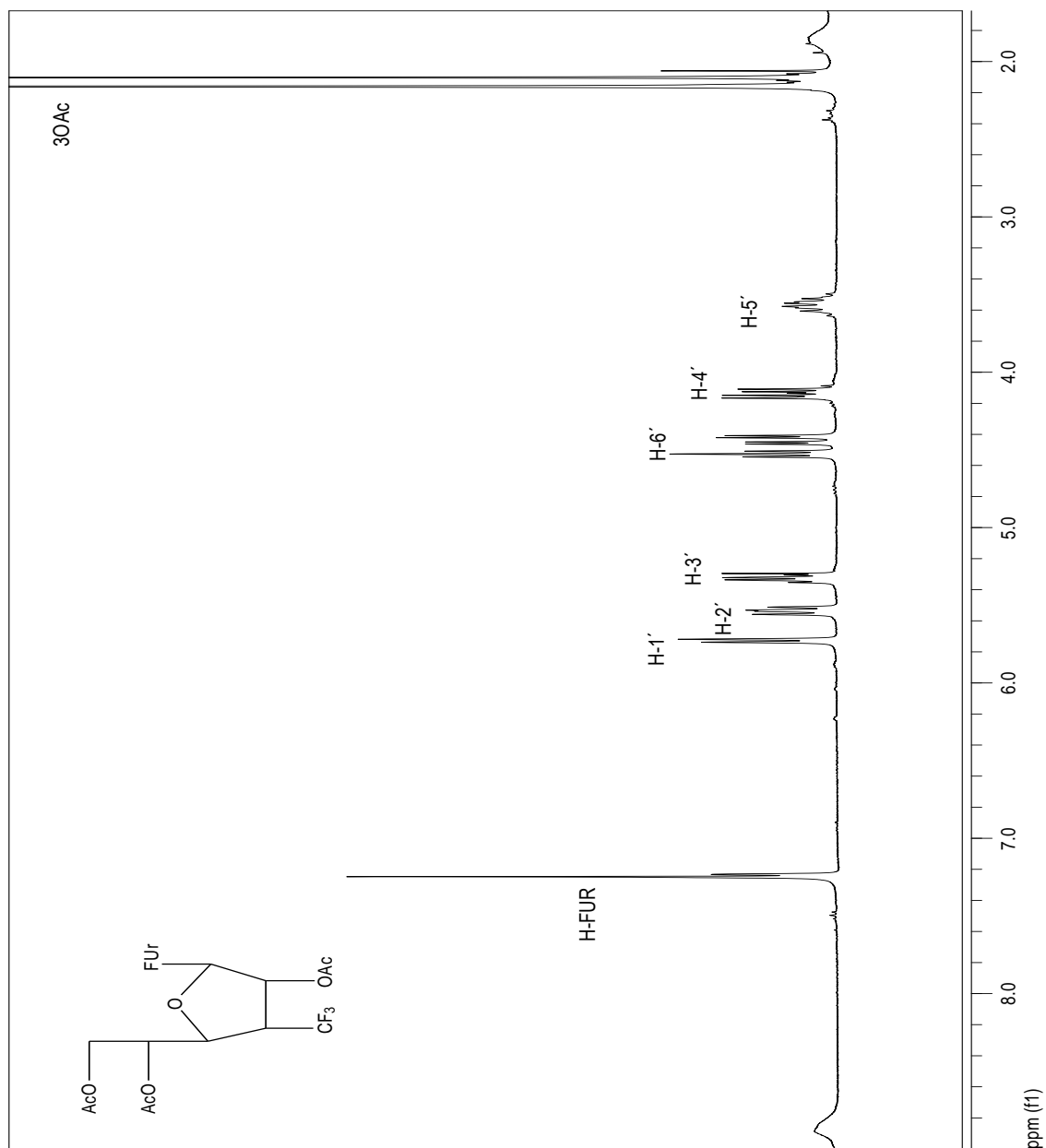
TLC (Διάλυμα Γ)	R _f =0.50
Απόδοση	92%

Πίνακας 10. Αποτελέσματα σύνθεσης της 1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-δεοξυ-β-D-αλλοφουρανόζη)5-φθοροουρακίλης (**13**)

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR



Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος 7



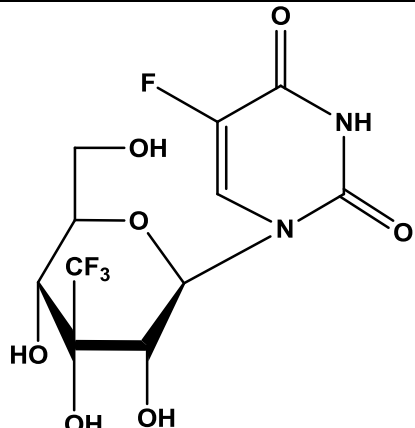
Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος **12**

6· ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη νουκλεοζιδικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προέκυψε από τις προσπάθειες των ερευνητών για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως κακοήθεις νεοπλασίες και οι ιικές μολύνσεις. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιδικών αναλόγων, τα οποία να παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και εκλεκτικότητα όσον αφορά στην δράση τους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης πυρανονουκλεοζιτών με πιθανή αντιική και αντικαρκινική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, εύκολη, έχοντας πραγματοποιήσει σύντομα βήματα. Οι τελικές αποδόσεις που πήραμε από τη σύνθεση των τελικών πυρανονουκλεοζιτών είναι ικανοποιητικές. Πιο συγκεκριμένα, σύνθεση 1,2:5,6-Δις-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-ριβοεξοφουρανοζο-3-ουλόζης (2) με απόδοση 95%, 3-C- τριφθορομέθυλο -1,2:5,6-δι-Ο-ισοπροπυλιδενο-α-D-αλλοφουρανόζη (3) με απόδοση 90%, 3-C- τριφθορομέθυλο -3-υδροξυγλυκόζης(4) με απόδοση 81%, 3-C- τριφθορομέθυλο -3-υδροξυ-1,2,4,6-τετρα-Ο-ακετυλογλυκοπυρανόζης (5) με απόδοση 64% ,1-(3'-C-τριφθορομέθυλο -3'-υδρόξυ-2',4',6'-τρις-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης(6) με απόδοση 82%,1-(3'-C- τριφθορομέθυλο -3'-υδρόξυ-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης(7)με απόδοση 92%. Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹HNMR.

Η ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (L1210, HeLa, CEM) από τον νεοσυντιθέμενο πυρανονουκλεοζίτη απεικονίζεται στον Πίνακα 6.

ΕΝΩΣΗ	IC ₅₀ ^a (μM)		
	L1210	CEM	HeLa
	38±6	>250	44±5
F-Uracil	0.49 ± 0.13	18 ± 5	0.54 ± 0.12

Πίνακας 11

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 11, ο νεοσυντιθέμενος τριφθορομέθυλο-γλυκοπυρανονουκλεοζίτης παρουσίασε ανασταλτική δράση έναντι του πολλαπλασιασμού των λευχαιμικών κυττάρων (L1210) και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου (HeLa), σε τιμές IC₅₀ 38 και 44 μM, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά έναντι της ανάπτυξης των ανθρώπινων T-λεμφοκυττάρων (CEM).

Βασιζόμενοι στην αυξημένη ανασταλτική δράση του παραπάνω νουκλεοζίτη, επιχειρήσαμε να συνθέσουμε τον αντιστοιχο 3'-CF₃-3'-δέοξυ νουκλεοζίτη στη πυρανονουκλεοζίτη. Το αποτέλεσμα είναι να πάρουμε την διαμόρφωση της φουρανόζης αντί εκείνης της πυρανόζης, όπως αποδεικνύεται από το H¹ NMR (*J*_{1,2} 5.7 Hz) της ακετυλιωμένης ένωσης **12**, καθώς και από την αντίδραση γειτονικών διολών με το υπεριοδικό νάτριο (NaIO₄) (Reichman *et. al.* 1975). Κατά τη συγκεκριμένη αντίδραση προκύπτει αποικοδόμηση κατά μία υδροξυμεθυλο ομάδα και ως εκ τούτου αποδεικνύεται η πενταμελής διαμόρφωση του σακχάρου. Η βιολογική αποτίμηση του 1-(3'-C-τριφθορομέθυλο -3'-δεοξυ -β-D-γλυκοφουρανοζυλο)5-φθοροουρακίλης (**13**), θα γίνει σε επόμενη φάση.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Morisson&Boyd Οργανική Χημεία, τόμος 3 Γραφείο Εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων 1331p 758.
2. McMurry J. Οργανική Χημεία, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 1245, 905.151
3. Stryer, Βιοχημεία, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 1995Zhou, W.;
4. Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.*2004, 47, 3399.
5. Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides*1992, 11, 903.
6. Robins, R. K.; Kini, G. D. "Wilman, D. E. V. Ed.; Chapman and Hall: New York, **1990**, p.299
7. MacCoss, M.; Robins, M. J. Wilman, D. E. V. Ed.; Chapman and Hall: New York, **1990**, p. 261
8. Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.***2004**, 47, 3399.
9. Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* 1995,67,155.
10. Lewin, B. *Genes* 2003, *VIII*, 6.
11. Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, 2005, 4, 4.
12. Lui, V. W. Y. W.; Lau, C. P. Y. P.; Cheung, C. S. F. S.; Ho, K.; Ng, M. H. L. H.; Cheng, S. H. H.; Hong, B.; Tsao, S.-W. W.; Tsang, C. M. M.; Lei, K. I. K. I.; Yamasaki, Y.; Mita, A.; Chan, A. T. *Biochemical pharmacology* 2010, 79, 1772.
13. Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* 2010.
14. Siev, M.; Weinberg, R.; Penman, S. *J. Cell Biol.* 1969, 41, 510.
15. Ahn, Y. J.; Park, S. J.; Lee, S. G.; Shin, S. C.; Choi D. H. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 2744.
16. Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 47, 365.

17. Pontikis, R.; Wolf, J.; Monneret, C.; Florent, J. –C. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 3523.
18. Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* 1991, 51, 2319.
19. Lin, T. S.; Luo, M. Z.; Liu, M. C.; Clarkatzenburg, R. H.; Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H.; Mancini, W. R.; Birnbaum, G. I.; Gabe, E.; Giziewicz, J. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 2607.
20. Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 1879.
21. Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, 95, 105.
22. Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* 2010.
23. Hiroyuki Hayakawa, Satoru Kohgo, Kenji Kitano, Noriyuki Ashida, Eiichi Kodama, Hiroaki Mitsuya and Hiroshi Ohru *Antiviral chemistry & chemotherapy* **2004**;15(4):169-87.
24. Brossette T., Emmanuel Klein, Christophe Creminon, Jacques Grassi, Charles Mioskowski and Lyk Lebeau; *Tetrahedron*, **2001**, 57, 8129-8143.
25. Moon H. R., Kim H. O., Lee S. K., Choi W. J., Chun M. W., Jeong L. S.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2002**, 10, 1499-1507.
26. Carl R. Johnson* and Dilip R. Bhumralkar, *NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES*, **1995**, 14(1&2), 185.
27. Nan-Sheng Li, Xiao-Qing Tang, and Joseph A. Piccirilli, *Organic Letters*, **2001**, 3, 1025.
28. Saenger, W. "Principles of Nucleic Acid Chemistry", Springer-Verlag, New York, **1984**.
29. Blackburn, G. M.; Gait, M. J. "Nucleic Acids in Chemistry and Biology", Oxford University Press, New York, **1996**.
30. Bloomfield, V. A.; Crothers, D. M.; Tinoco, I. *University Science Books*, Sausalito, California, **1999**.
31. Verheggen, I.; Van Aerschot, A.; Toppet, S.; Snoeck, R.; Janssen, G.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2033.

32. 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.
33. Maurinsh, Y.; Schraml, J.; De Winter, H.; Blaton, N.; Peeters, O.; Lescrinier, E.; Rozenski, J.; Van Aerschot, A.; De Clercq, E.; Busson, R.; Herdewijn, P. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2861.
34. Ostrowski, T.; Wroblowski, B.; Busson, R.; Rozenski, J.; De Clercq, E.; Bennet, M. S.; Champness, J. N.; Summers, W. C.; Sanderson, M. R.; Herdewijn, P. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4343.
35. Antonakis, K. "Hexopyranose nucleosides". In *Studies in Natural Products Chemistry, Stereoselective Synthesis (Part C)*; Elsevier, Amsterdam, **1989**, *4*, p. 241.
36. Haouz, A.; Vanheusden, V.; Munier-Lechman, H.; Froeyen, M.; Herdewijn, P.; Van Galenbergh, S.; Delarue, M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4963.
37. Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12757.
38. Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3154.
39. Lee, K.; Choi, Y.; Gullen, E.; Schlueter-Wirtz, S.; Shcinazi, R. F.; Cheng, Y. C.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1320.
40. Lee, K.; Choi, Y.; Gumina, G.; Zhou, W.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1313.
41. Chong, Y.; Choo, H.; Lee, S.; Choi, Y.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4888.
42. Kumar, P.; Ohkura, K.; Balzarini, J.; De Clerq, E.; Seki, K.; Wiebe, L. I. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2004**, *23*, 7.
43. Clark, J. L.; Mason, J. C.; Hollecker, L.; Stuyver, L. J.; Tharnish, P. M.;
44. McBrayer, T. R.; Otto, M. J.; Furman, A. P.; Schinazi, R. F.; Watanabe, K. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1712.
45. Herdewijn, P.; Van Aerschot, A.; Kerremans, L. *Nucleosides Nucleotides*
46. **1989**, *8*, 65.
47. Tsuchiya, T. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1990**, *48*, 91.

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

64. Kiritsis C, Manta S, Parmenopoulou V, Balzarini J, Komiotis D. *Eur J Med Chem.* 2011 Nov;46(11):5668-74.
65. Elhalabi, J.; Rice, K. G. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2004**, 23, 195.
66. Foster, A. B.; Hems, R.; Webber, J. M. *Carbohydr. Res.* **1967**, 5, 292.
67. Tewson, T. J.; Welsh, M. J. *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 1090.
68. Reichman, U.; Watanabe, K. A.; Fox, J. J. *Carbohydr. Res.* **1975**, **42**, 233.
69. Pawan K. Sharma and Vasu Nair, *NUCLEOSIDES, NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS*, 200019(4), 757