



Τμήμα  
Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Department  
of Biochemistry &  
Biotechnology  
University of Thessaly



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

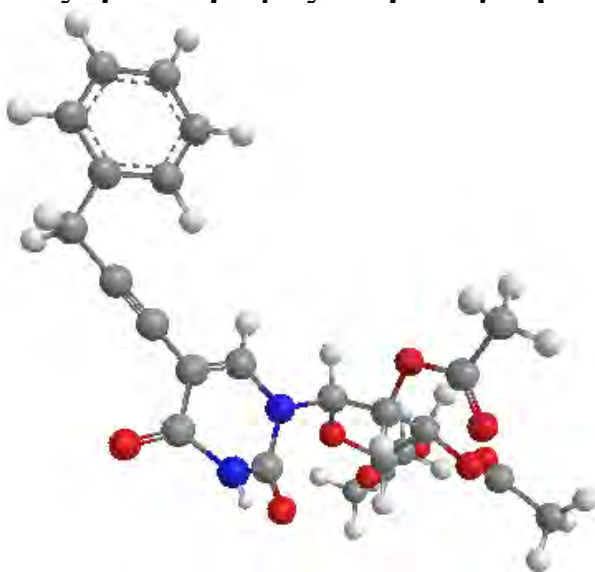
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας

**ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ**

**ΑΛΕΞΟΥΛΗ ΤΑΝΙΑ**

Διπλωματική Εργασία

**Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Σύνθεση,  
φασματικός προσδιορισμός και βιολογική αποτίμηση.**



ΛΑΡΙΣΑ 2019

## Διπλωματική Εργασία

Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Σύνθεση, φασματικός προσδιορισμός και βιολογική αποτίμηση.

Modified nucleosides as chemotherapeutic agents. Synthesis, spectral determination and biological evaluation.

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Κοιωτής Δημήτριος** — Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

**Μήτσος Χρήστος** — Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π) στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η μεταπτυχιακή διπλωματική διατριβή μου εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Επιβλέπων καθηγητής ήταν ο κ. Κομιώτης Δημήτριος τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε στην ανάθεση του πειράματος και για τις εποικοδομητικές του υποδείξεις.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κολλάτο Νικόλαο για την συνεργασία, υποστήριξη και βοήθειά του καθώς η εμπειρία του και οι πολύτιμες συμβουλές του αποτέλεσαν εφόδια για την διεξαγωγή του πειράματός μου.

Τέλος, θα ήθελα να αναφερθώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου οργανικής χημείας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας, την φιλική τους διάθεση και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

## Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	6
ABSTRACT .....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
1.1 Υδατάνθρακες .....	8
1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης.....	9
1.3 Νουκλεοζίτες.....	11
1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών.....	13
1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιϊκοί παράγοντες .....	15
1.5.1 Zidovudine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine).....	16
1.5.2 DDI ή Didanosine.....	18
1.5.3 DDC ή Zalcitabine.....	18
1.6 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες .....	18
1.7 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στη βάση .....	19
2. ΣΚΟΠΟΣ .....	23
3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ .....	24
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography).....	24
3.2 Χρωματογραφία στήλης.....	25
3.3 Ξήρανση διαλυτών .....	26
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων.....	26
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	27
4.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού.....	27
4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης.....	27
4.2.1 Σύνθεση της 1(2', 3', 5' - τρι- O- ακετυλ- b- D- ριβοφουρανο) 5- ιωδοουρακίλη (2)	28
4.2.2 Σύνθεση των 3, 5, 7.....	29

4.2.3 Σύνθεση των 4, 6, 8. ....	30
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ $^1\text{H}$ NMR .....	32
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	35
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	37

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υδατάνθρακες αποτελούν βασικά συστατικά στους ζωντανούς οργανισμούς, με μεγάλη βιολογική και ενεργειακή σημασία, και αναφέρονται σε μια ευρεία κατηγορία πολύ-υδροξυλιωμένων 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 κάποιοι χρησιμοποιούνται ως φάρμακα.

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

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η συνθετική πορεία νέων φουρανονουκλεοζιτών, με τροποποίηση στη βάση, ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί και αντιϊκοί παράγοντες. Αναλύονται οι συνθετικές οδοί που ακολουθήθηκαν, οι μέθοδοι που πραγματοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα ταυτοποίησής τους, καθώς και η βιολογική τους αποτίμηση.

## **ABSTRACT**

Carbohydrates are key ingredients in living organisms, have great biological and energy importance and refer to a wide range of poly-hydroxylated aldehydes and ketones, commonly called sugars. Modified carbohydrates are part of the cells' outer layer, others are found in DNA molecules carrying genetic information, while some are used as drugs.

Modified nucleosides, and more specifically the class of those having structural modifications to the sugar segment, are an important research field as they exhibit significant anticancer, antiviral and antibiotic activity. Many such compounds have been synthesized and evaluated for their potential biological properties.

In this diploma thesis, is described the synthesis of new, base modified furanonucleosides, as potential anti-cancer and antiviral agents. The synthetic pathways that followed, the methods that performed and the results of their identification, as well as their biological evaluation, are analyzed in that work.

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι αλδεϋδικές ή κετονικές ενώσεις με πολλαπλές υδροξυλικές ομάδες που αποτελούν μια ομάδα οργανικών ουσιών με γενικό τύπο  $C_n(H_2O)_n$ . Οι βιολογικής σημασίας υδατάνθρακες, που ονομάζονται και σάκχαρα ή ακόμα και γλυκίδια, αρχίζουν από τους μονοσακχαρίτες (π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη) οι οποίοι είναι σχετικά μικροί και φθάνουν μέχρι σύνθετα μόρια που λέγονται πολυσακχαρίτες (π.χ. άμυλο, κυτταρίνη) που είναι πραγματικά μακρομόρια με μοριακό βάρος πολλές εκατοντάδες ή χιλιάδες  $g \cdot mol^{-1}$ .

Οι υδατάνθρακες βιολογικού ενδιαφέροντος μπορούν να χωριστούν σε 4 κατηγορίες:

- Μονοσακχαρίτες που είναι τα μονομερή για τη σύνθεση πολυπλοκότερων δομών και δεν μπορούν να υδρολυθούν σε απλούστερες ενώσεις (π.χ. γλυκόζη, φρουκτόζη)
- Δισακχαρίτες που είναι ο υδατάνθρακας ο οποίος μπορεί να υδρολυθεί προς δύο μόρια μονοσακχαρίτη (π.χ. σακχαρόζη, λακτόζη)
- Ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από 2-10 μονοσακχαρίτες
- Πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από εκατοντάδες χιλιάδες υπομονάδες γλυκόζης (π.χ. άμυλο, γλυκογόνο, κυτταρίνη)

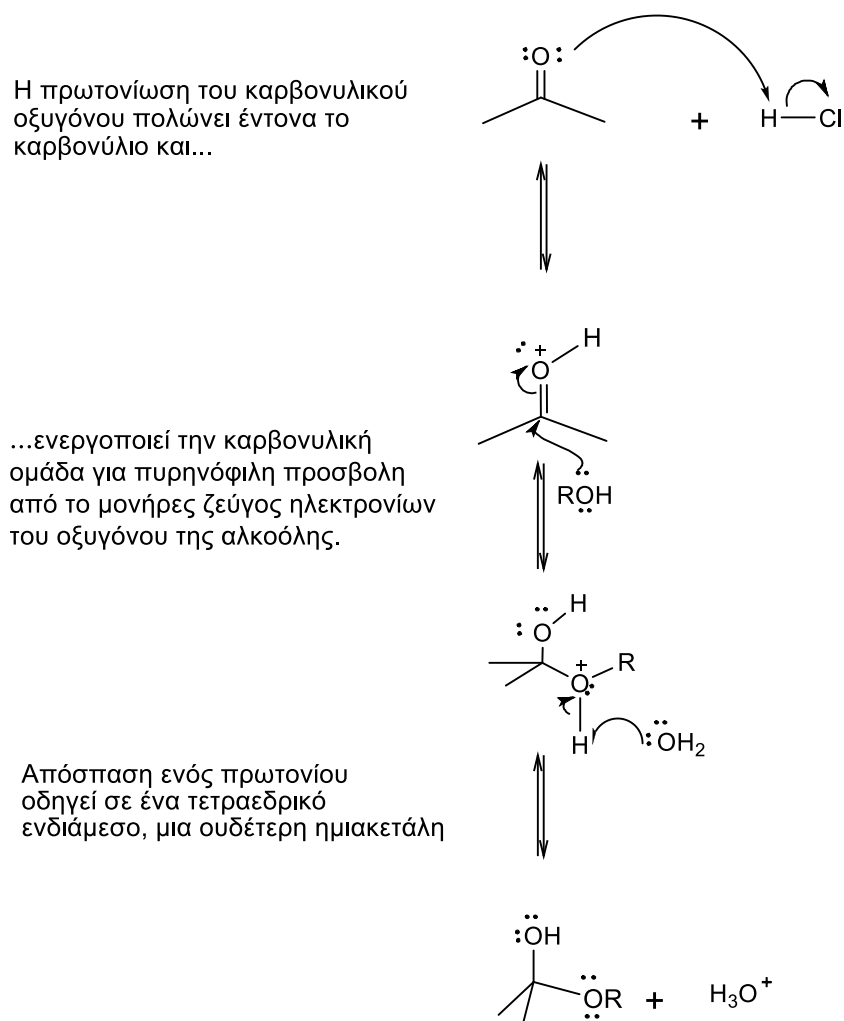
Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ ενός μεγάλου ολιγοσακχαρίτη και ενός μικρού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτη, αφού αυτοί οι όροι στην πραγματικότητα χρησιμοποιούνται απλά για να περιγράψουν ενώσεις, των οποίων το μοριακό βάρος παρουσιάζει ένα ευρύ πεδίο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

Μαζί με τις πρωτεΐνες και τα λίπη, οι υδατάνθρακες αποτελούν βασικά συστατικά στους ζωντανούς οργανισμούς, με μεγάλη βιολογική και ενεργειακή σημασία, και δομικά στοιχεία των κυττάρων και άλλων μακρομορίων, όπως οι γλυκοπρωτεΐνες, οι λιποπολυσακχαρίτες και τα νουκλεϊκά οξέα (ανάγοντες μονοσακχαρίτες, ριβόζη και δεοξυριβόζη) (Cooper 2000).



## 1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης

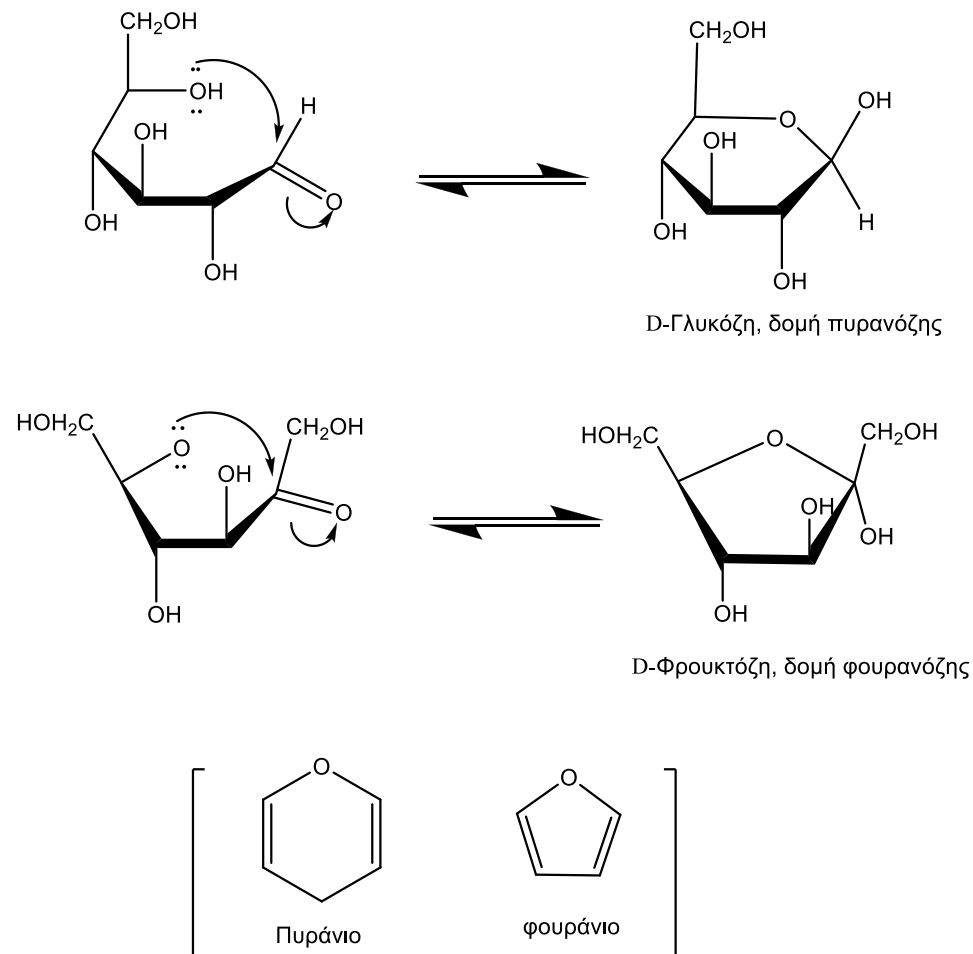
Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν σε 2 μορφές την ανοικτή (ανοικτή αλυσίδα) και την κυκλοποιημένη μορφή. Η ανοικτή μορφή μπορεί να κυκλοποιηθεί όταν η υδροξυλομάδα και το καρβονύλιο, που βρίσκονται στο ίδιο μόριο, αντιδρούν μέσω ενδομοριακής αντίδρασης πυρηνόφιλης προσθήκης σχηματίζοντας κυκλική ημιακετάλη (Mc Murry 2000, p. 1245). Ο Mc Murry περιέγραψε τον μηχανισμό σχηματισμού της ημιακετάλης (Mc Murry 2000, p. 905).



**Σχήμα 1:** Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης (από Mc Murry 2000).

Οι πενταμελείς και εξαμελείς ημιακετάλες αποτελούν ιδιαίτερα σταθερά μόρια και γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα σε δομές ανοικτής και κλειστής 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. Η φρουκτόζη, αντίθετα, απαντά με τη δομή του πενταμελούς δακτυλίου της φουρανόζης, που σχηματίζεται από την προσθήκη του -OH του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C2.



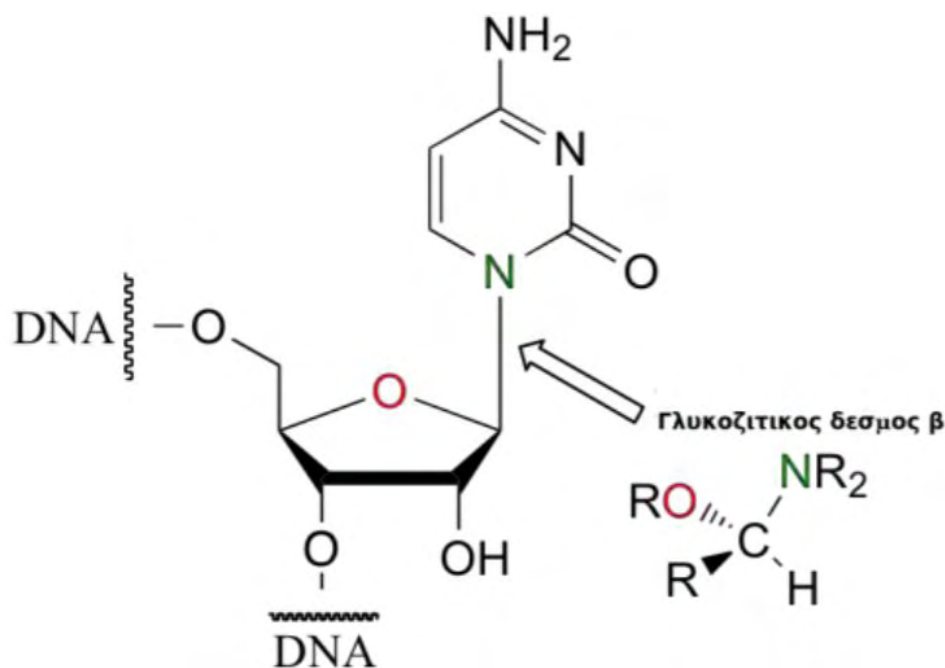
**Εικόνα 1:** Κυκλικές δομές πυρανόζης και φουρανόζης

Με άλλα λόγια λοιπόν ένας μονοσακχαρίτης με τη βοήθεια της κυκλοποίησης της ανοικτής αλυσίδας αποκτά τη δομή της φουρανόζης ή της πυρανόζης κι έτσι προκύπτει ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Τα δύο νέα διαστερομερή ονομάζονται ανωμερή και ο ημιακεταλικός άνθρακας ανωμερικό κέντρο (McMurry 2000, p. 1249).

Μετά από μία σύγκριση των δακτυλίων της φουρανόζης με αυτούς της πυρανόζης, οι πρώτοι είναι πολύ πιο ευέλικτοι από τους δεύτερους, γεγονός που εξηγεί την επιλογή των δακτυλίων φουρανόζης ως συστατικά του RNA και DNA (Stryer 1995).

### 1.3 Νουκλεοζίτες

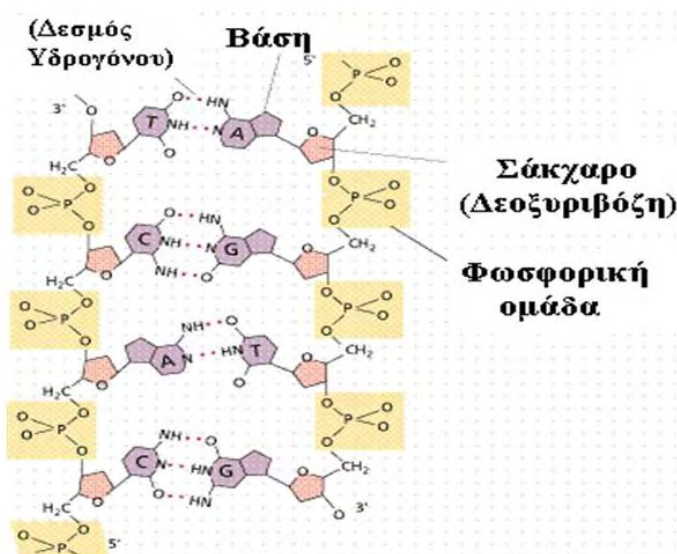
Οι νουκλεοζίτες αποτελούν θεμελιώδη συστατικά των διαφόρων βιολογικών συστημάτων καθώς είναι τα δομικά και πρόδρομα στοιχεία του DNA και του RNA. Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης (αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδίνης (θυμίνη, κυτοσίνη, ουρακίλη) δεσμευμένη στο σάκχαρο πεντόζη. Αναλόγως αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης αντίστοιχα. Η σύνδεση ενός ή περισσότερων φωσφορικών ομάδων στο C-5 του σακχάρου μετατρέπει τον νουκλεοζίτη σε νουκλεοτίδιο το οποίο πάλι αναλόγως τη φύση της πεντόζης καλείται ριβονουκλεοτίδιο ή δεοξυριβονουκλεοτίδιο. 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 σε όλα τα φυσικά μακρομόρια είναι μορφής β, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Stryer 1997, Page et al. 1997).



**Εικόνα 2:** Ο N- γλυκοζιτικός δεσμός β σε ένα νουκλεοζίτη (από [http://chemwiki.ucdavis.edu/Organic\\_Chemistry/Organic\\_Chemistry\\_With\\_a\\_Biological\\_Emphasis/Chapter\\_11%3A\\_Nucleophilic\\_carbonyl\\_addition\\_reactions/Section\\_11.5%3A\\_Nglycosidic\\_bonds](http://chemwiki.ucdavis.edu/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_With_a_Biological_Emphasis/Chapter_11%3A_Nucleophilic_carbonyl_addition_reactions/Section_11.5%3A_Nglycosidic_bonds)).

Όταν τα νουκλεοτίδια ενώνονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς σχηματίζουν τις δομικές μονάδες των νουκλεϊνικών οξέων. Η φωσφορική ομάδα στην 5' θέση του δεύτερου νουκλεοτιδίου εστεροποιείται με την ελεύθερη υδροξυλομάδα στην 3' θέση ενός άλλου νουκλεοτιδίου, κ.ο.κ. Μ' αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται δινουκλεοτίδια, τρινουκλεοτίδια, τετρανουκλεοτίδια, ολιγονουκλεοτίδια και τέλος πολυνουκλεοτίδια. Ανάλογα αν το νουκλεϊκό οξύ περιέχει D-ριβόζη ως υδατάνθρακα, ονομάζεται ριβονουκλεϊνικό οξύ, ενώ αν περιέχει D-2-δεοξυριβόζη ονομάζεται δεοξυριβονουκλεονικό οξύ, τα γνωστά RNA και DNA (Γεωργάτσος 1993).

## DNA (Διπλή έλικα)



**Εικόνα 3:** Οι δεσμοί στην διπλή έλικα DNA (από <https://slideplayer.gr/slide/11478852>).

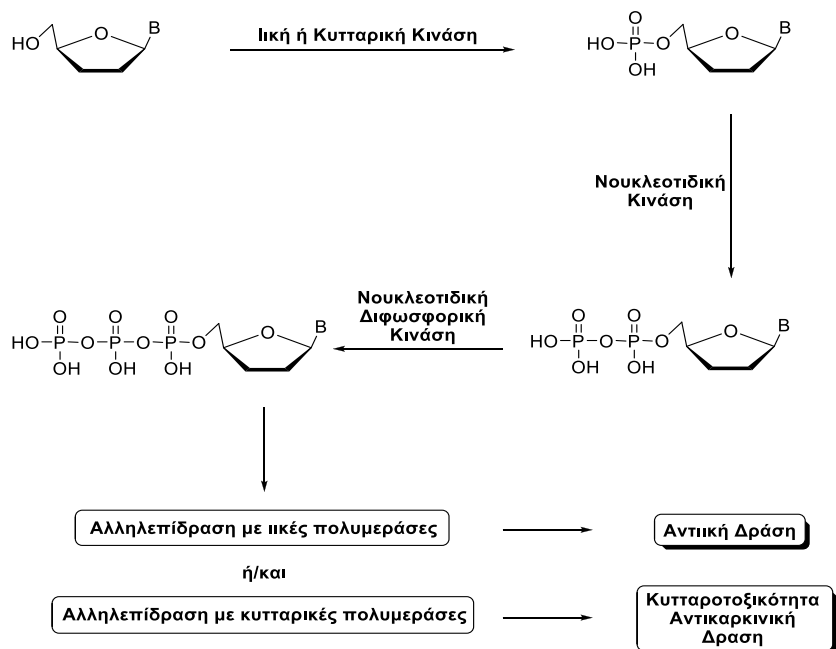
Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των ιδιοτήτων τους που τα καθιστούν αντικαρκινικούς, αντιβακτηριακούς, αντικούς παράγοντες, καθώς και ως αντιοξειδωτικά (Zhou et al. 2004, Perigaud et al. 1992, Denny and Wilman 1990). 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 νουκλεοζίτες και τα ανάλογα αυτών έχουν επιλεγθεί για την πραγματοποίηση ερευνητικών προγραμμάτων λόγω του μεγάλου βιολογικού ενδιαφέροντος τους καθώς επιδεικνύουν σημαντική αντικαρκινική, αντιβακτηριακή και αντιϊκή δράση (Hartman and Coward 2002). Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντικρκινική και αντιβακτηριακή δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. (Κυρίτσης 2010). Συνεπώς λόγω του ερευνητικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζουν οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών δραστηριοτήτων τους.

#### 1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Σαν μια πιο γενική αρχή, ο τρόπος δράσης των φαρμάκων βασίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό στόχο, για παράδειγμα μια πρωτεΐνη, ένας υποδοχέας, ένας διάυλος ιόντων, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφορέας, είτε τα νουκλεϊνικά οξέα. Ο ίδιος τρόπος δράσης λοιπόν ισχύει και στα νουκλεοζιτικά ανάλογα που διαθέτουν αντιϊκή 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).

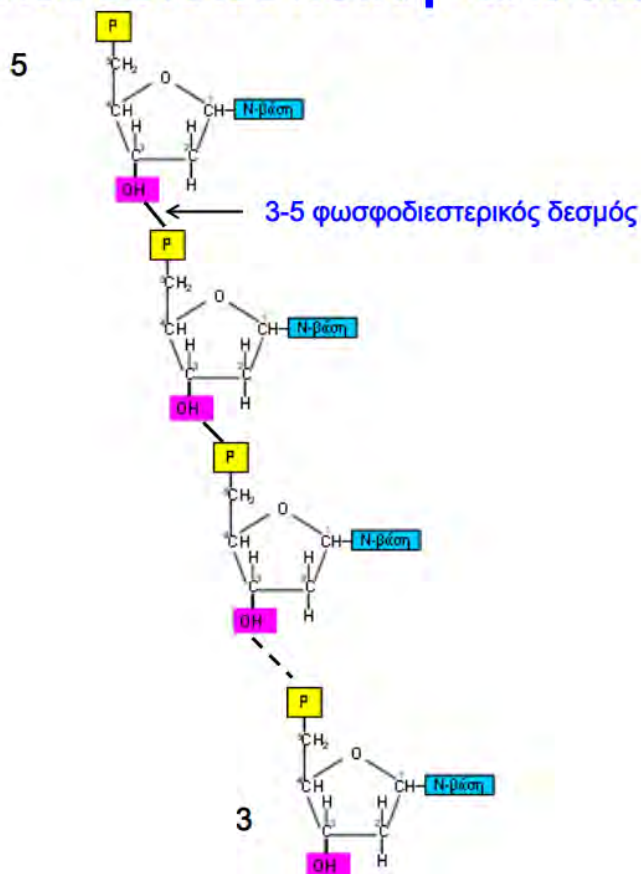
Στην πραγματικότητα τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αποτελούν ανενεργά προφάρμακα που εξαρτώνται από την ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση από κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες (σχήμα 2) για τη φαρμακολογική τους δράση (Amer and Eriksson 1995). Τα μη φωσφορυλιωμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες-μεταφορείς νουκλεοζιτών, διαπερνώντας την κυτταρική μεμβράνη, φωσφορυλιώνονται προς τις τριφωσφορικές τους μορφές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, και όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA. Πιο συγκεκριμένα η ενσωμάτωσή τους στο ιικό γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει διακοπή της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, να το καταστήσει μη λειτουργικό κι έτσι να καταστείλει την αντιγραφή του ιού και την περαιτέρω παραγωγή ιικών σωματιδίων.



**Σχήμα 2:** Φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιικές κινάσες (από Λαζαρίδη, 2016 σελ. 13).

Ένας κοινός μηχανισμός αντιϊκής και αντικαρκινικής δράσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων είναι η ενσωμάτωσή τους στην επιμηκνόμενη αλυσίδα του DNA προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο 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 2 νουκλεοτιδίων (Lewin 2003). Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας. Επίσης ένα ποσοστό της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων με τα επιμολυσμένα από ιό κύτταρα οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιική πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητα τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

# ΠΟΛΥΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ



**Εικόνα 4:** 3'-5' φωσφοδιεστερικός δεσμός ανάμεσα στα νουκλεοτίδια (από <https://slideplayer.gr/slide/2357137/>).

Όσον αφορά την αντικαρκινική δράση τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της καταστολής αντιαποπτωτικών γονιδίων (Lui *et al.* 2010).

## 1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιϊικοί παράγοντες

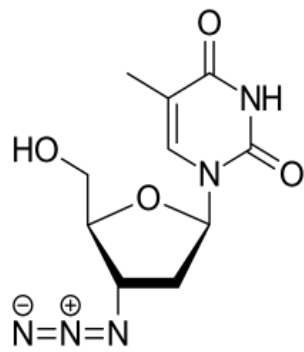
Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρεμβάλλονται στην σύνθεση του DNA και του RNA και μπορούν να επηρεάσουν τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών, παρέχοντας έτσι ένα ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιϊικών φαρμάκων (Komiotis *et al.* 2008, Zhou *et al.* 2004, Perigaund *et al.* 1993). Όπως ειπώθηκε και παραπάνω η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών στηρίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασής τους με τις ιϊκές πολυμεράσες. Οι αντιϊικοί νουκλεοζίτες αποτελούν κρίσιμο παράγοντα στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από:

- τον ιό του απλού έρπητα (HSV),
- τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (HCMV),
- τον ιό του έρπη ζωστήρα (VZV),
- τον ιό της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV) και
- τον ιό της ηπατίτιδας B (HBV) και C (HCV).

Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα από τα αντικά νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι το zidovudine (AZT), το didanosine (DDI) και το zalcitabine (DDC) που χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα εναντίον του HIV και δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού.

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

Το AZT (3'-αζιδο-2'-δεοξυθυμιδίνη) ήταν το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία του AIDS ([www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrn/](http://www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrn/)). Είναι ένας αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης δηλαδή του ενζύμου που χρησιμοποιούν οι ιοί και συγκεκριμένα οι ρετροϊοί για να συνθέσουν DNA και να πολλαπλασιαστούν κι έτσι αποτελεί έναν τύπο αντιρετροϊκού φαρμάκου. Είναι ανάλογο της θυμιδίνης και χορηγείται για την θεραπεία του AIDS, δηλαδή της μόλυνσης από τον ιό της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1) (Λαζαρίδη,

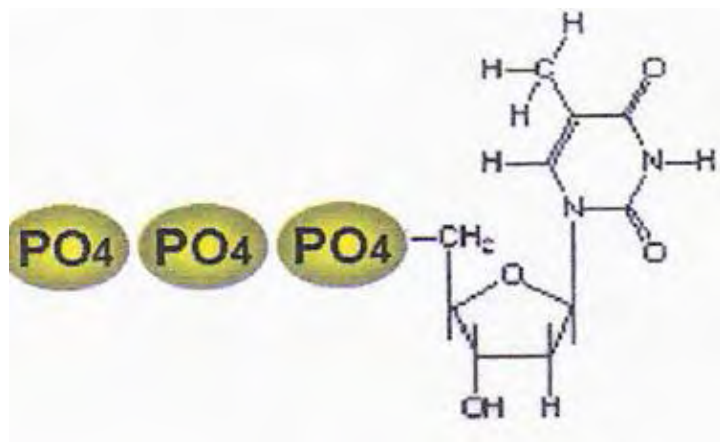


**Εικόνα 5:** Χημική δομή του 2016).

AZT

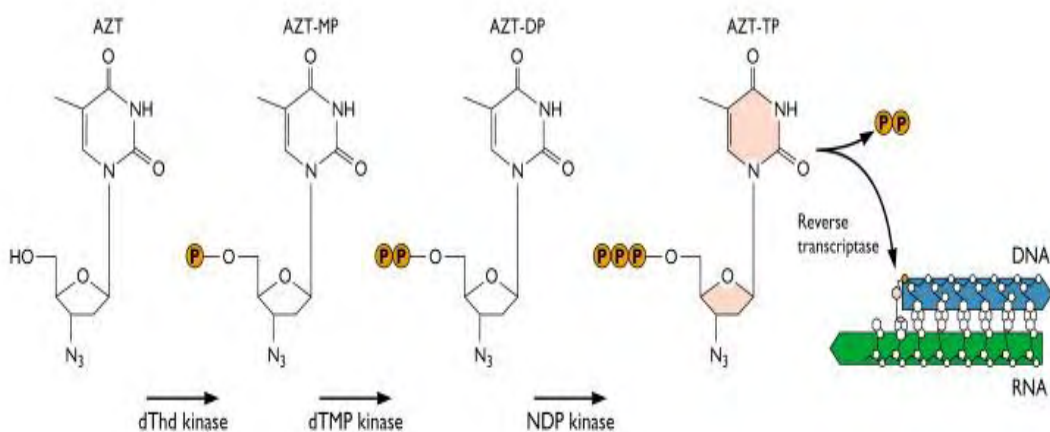
Πρόκειται για 2',3'-διδεοξυνουκλεοζίτες που προκύπτουν από την απομάκρυνση των υδροξυλομάδων από τις 2',3'-θέσεις του δακτυλίου της ριβόζης. Δρουν σαν αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η αντίστροφη μεταγραφάση (ή αντίστροφη τρανσκριπτάση) είναι το ένζυμο το οποίο στη φύση βρίσκεται σε RNA-ιούς (ρετροϊούς) όπως ο ιός HIV. Το ένζυμο μετατρέπει το γενετικό υλικό του ιού από τη μορφή του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA, έτσι ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων ξενιστών (Παπανικολάου κ.ά. 2015). Τα συγκεκριμένα ανάλογα νουκλεοζιτών αναστέλλουν τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή του ιϊκού DNA. Τα κυτταρικά ένζυμα μετατρέπουν το Zidovudine σε ενεργή μορφή 5'-τριφωσφορικού άλατος (Σχήμα 3).





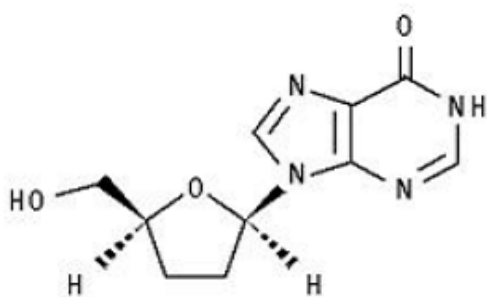
**Εικόνα 6:** Τριπλή φωσφορυλίωση Zidovudine από το ιϊκό ένζυμο (η πρώτη) και από τα κυτταρικά ένζυμα (από Λαζαρίδη 2016).

Επομένως το AZT φωσφορυλιώνεται από τα κυτταρικά ένζυμα στην ενεργή του μορφή και δρα ως αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης τερματίζοντας την διότι έχει την αζιδο-ομάδα αντί για την υδροξυλομάδα κι έτσι η επόμενη βάση δεν μπορεί να ενωθεί και η σύνθεση της αλυσίδας του ιϊκού DNA σταματά όπως φαίνεται και στο σχήμα 4.



**Σχήμα 4:** Τερματισμός της αλυσίδας του ιϊκού DNA από το φωσφορυλιωμένο AZT (από <http://www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrv/>).

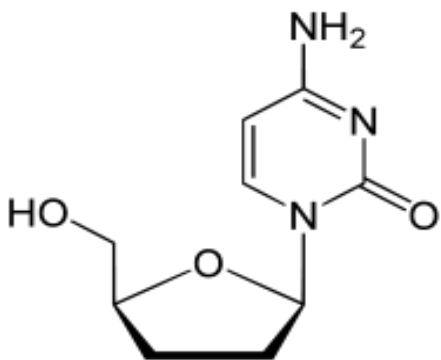
### 1.5.2 DDI ή Didanosine



Το DDI είναι ένα συνθετικό πουρινικό νουκλεοσιδικό ανάλογο δραστικό ενάντια στον ιό της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1). Η δράση του είναι ανάλογη του AZT δηλαδή παρεμποδίζει την λειτουργία της ιϊκής αντίστροφης μεταγραφάσης.

**Εικόνα 7:** Χημική δομή του DDI (από <https://www.medicinenet.com/didanosine/article/htm>).

### 1.5.3 DDC ή Zalcitabine



Το DDC ή αλλιώς διδεοξυκυτιδίνη έχει παρόμοια δράση με το AZT και το DDI δηλαδή χρησιμοποιείται ως αντιρετροϊκό φάρμακο.

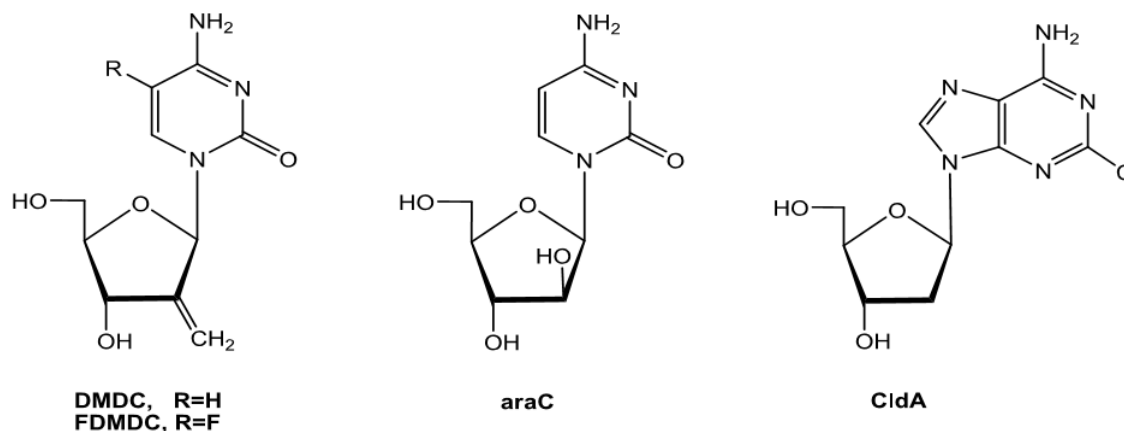
**Εικόνα 8:** Χημική δομή του DDC

## 1.6 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι γνωστό πως χρησιμεύουν ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (Plunkett and Gandhi 2001, Elion 1989, Denny and Wilman 1990), ενώ ένας μεγάλος αριθμός αναλόγων φυσικών νουκλεοζιτών χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων. Μελέτες έχουν δείξει επίσης ότι οι νουκλεοζίτες αποτελούν μια σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών μέσων καθώς επηρεάζουν τη σύνθεση του DNA με διάφορους τρόπους.

Πιο συγκεκριμένα για τη φαρμακευτική αντιμετώπιση πολλών νεοπλασιών χρησιμοποιούνται νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες οι οποίοι στοχεύουν στην παρεμπόδιση σύνθεσης νουκλεϊκών

οξέων των καρκινικών κυττάρων. Οι 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC), 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθροπεντοφουρανοζυλο)5-φθοροκυτοσίνη (FDMDC), 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC) και 2-χλωρο-2'-δεσοξαδενοσίνη (CldA) έδειξαν 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).

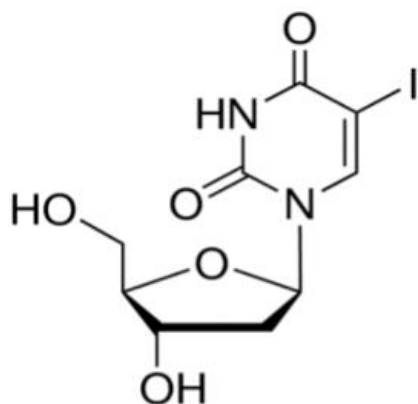


**Εικόνα 9:** Χημικές δομές των νουκλεοζιτικών αντιμεταβολιτών DMDC, FDMDC, araC και CldA.

Τέλος, κάποιες έρευνες έχουν δείξει ότι ορισμένοι νουκλεοζίτες μπορούν και ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Lui et al. 2010).

### 1.7 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στη βάση

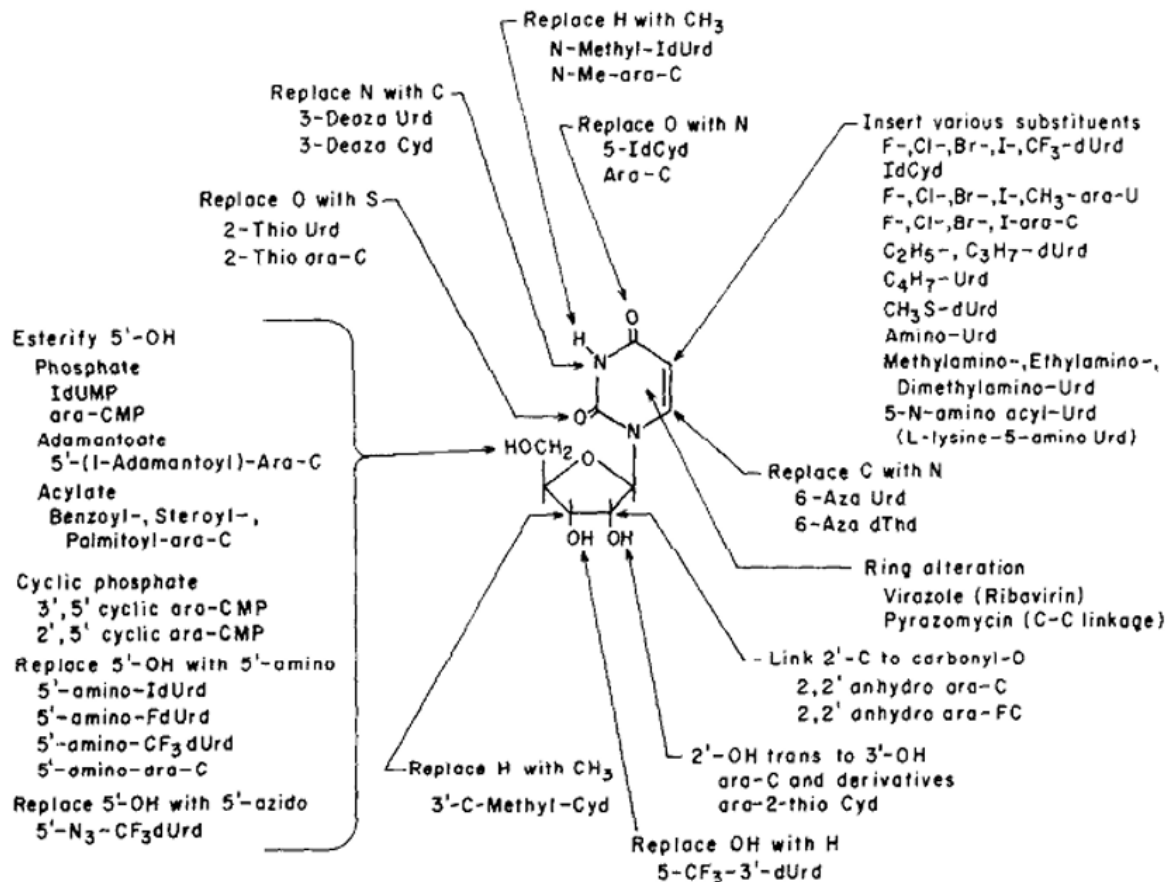
Ο πρώτος κλινικά αποτελεσματικός νουκλεοζίτης που εγκρίθηκε ήταν η 5-ιωδο-2'-δεοξουριδίνη στις αρχές του 1960, του οποίου η σύνθεση ήταν μέρος ενός αντικαρκινικού προγράμματος (Prusoff 1959).



**Εικόνα 10:** Χημική δομή της 5-ίωδο-2'-δεοξουριδίνης.

Το 1905 μία ομάδα είχε αναφέρει τη σύνθεση 5'-ιωδοπυριμιδινών (Johnson and Johns, 1905-06) ενώ οι Hitchings et al. (Hitchings et al. 1945) ξεκίνησαν συστηματική μελέτη της βιολογικής δράσης διαφόρων παραγόντων της πουρίνης και της πυριμιδίνης το 1945. Σύντομα τεκμηριώθηκε και η μέτρια αναστολή από την 5-βρωμοουρακίλη, την 5-υδρόξουρακίλη και τη 2,4-διθιοθυμίνη της αντιγραφής του ιού της δαμαλίτιδας σε κυτταρική καλλιέργεια (Thompson *et al.* 1949). Τέλος, οι Visser et al. ανέφεραν ότι διάφορα 5-υποκατεστημένα παράγωγα της ουριδίνης (5-χλώρο, 5δίαζο, 5-φορμαμιδο, 5-υδρόξυ και 5-άμινο) ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό του ιού της εγκεφαλίτιδας του ποντικού Theiler σε καλλιέργεια εγκεφάλου ποντικού (Visser *et al.*, 1952).

Οι διάφορες περιπτώσεις τροποποίησης νουκλεοζιτών που μπορούν να μετατραπούν σε νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση παρατίθενται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 5: Τύποι τροποποίησης που αποδίδουν νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση.

### **5-Ίοδο-2'-δεοξουριδίνη (IdUrd, IUdR, IDU, Ιδοξουριδίνη)**

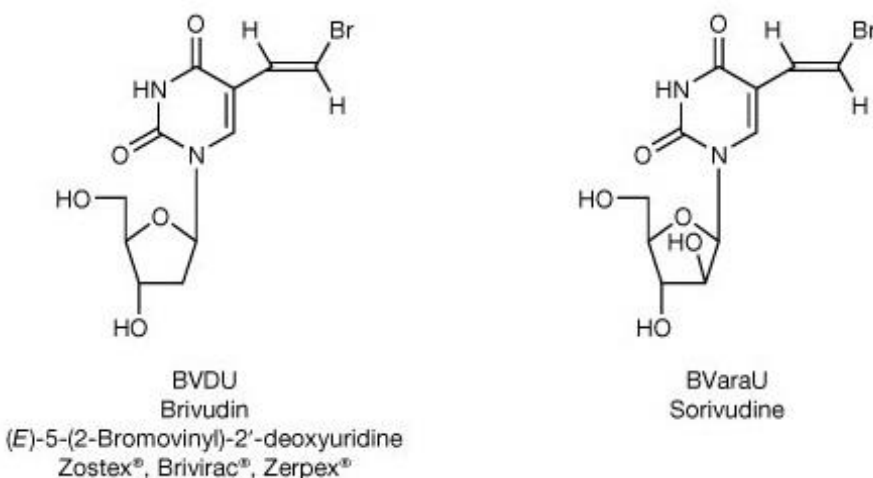
Η σημαντικότητα του IdUrd έγκειται στο γεγονός ότι μπορεί να αναπτυχθεί ένα νουκλεοτιδικό φάρμακο το οποίο θα είναι κλινικά αποτελεσματικό όταν γίνεται μία μόλυνση από έναν ιό. Η IDU είχε περιγραφεί ως ένας αντι-HSV παράγοντας για τη θεραπεία της ερπητικής κερατίτιδας (Kaufman et al. 1962). Επίσης έχει ήδη εξεταστεί η κλινική χρησιμότητα της Ιδοξουριδίνης και πολλών άλλων αντιϊκών παραγόντων στον άνθρωπο (Juel-Jensen et al. 1973, Juel-Jensen 1974).

Ο μηχανισμός της αντιϊκής δράσης της IdUrd σχετίζεται με τις δυσμενείς βιολογικές επιπτώσεις της ενσωμάτωσης του αναλόγου της θυμιδίνης σε ιικό DNA (Prusoff and Goz. 1973, Price et al. 1975). Η ενσωμάτωση της IdUrd στο DNA φυσιολογικών μη μολυσμένων κυττάρων φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την συστηματική τοξικότητα η οποία είναι δόσοεξαρτώμενη και όταν εισάγεται καθημερινά στον άνθρωπο σε συγκέντρωση περίπου 100mg/kg για 5 ή 6 ημέρες, μπορεί να παρατηρηθεί στοματίτιδα, λευκοπενία και αλωπεκία (Calabresi et al. 1961).

Μετά τη σύνθεση της 5-ιωδο-2'-δεοξουριδίνης (IDU) το ενδιαφέρον για τους 5-υποκατεστημένους νουκλεοζίτες ως πιθανά αντιικά παράγωγα έχει (Saenger et al. 1979). Μεταξύ αυτών, η BVDU [E-5- (2-βρωμοβινυλ) -2'-δεοξουριδίνη] αποτελεί έναν πολύ ισχυρό και εκλεκτικό αναστολέα της αντιγραφής του ιού του έρπη, ιδιαίτερα του ιού απλού έρπη τύπου-1 (HSV-1) (De Clercq et al. 1979 Τέλος, η τριφωσφορική BVDU αναστέλλει την HSV-1 DNA πολυμεράση πιο αποτελεσματικά από ό,τι αναστέλλει τις κυτταρικές DNA πολυμεράσες (Allaudeen et al. 1981).

### ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΑΣΗΣ ΤΟΥ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΗ

Η IDU αποτελεί θεμελιώδη λίθο για τη σύνθεση νέων παραγώγων 5-υποκατεστημένων-2'-δεοξουριδίνης. Το πιο σημαντικό είναι η (E)-5-(2-βρωμοβινυλο)-2'-δεοξουριδίνη (Brivudin/BDU), η οποία αποτελεί πολύ καλό ειδικό αναστολέα του HSV-1, καθώς επίσης και του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα (VZV) (De Clercq et al. 1979,1980,2013) . Αργότερα το ομόλογο του BVDU, η 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-E-5-(2-βρωμοβινυλο)ουρακίλη (BVaraU) αποδείχθηκε ότι έχει εξίσου ισχυρή δράση αν όχι και μεγαλύτερη από το BVDU, κατά του ιού VZV (Shigeta et al. 1983).

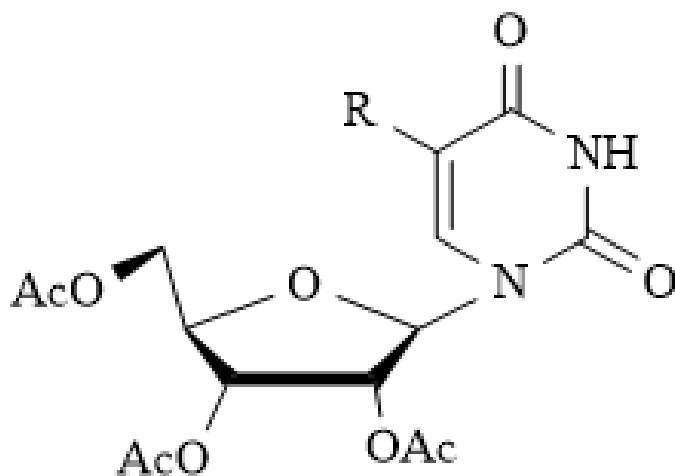


**Εικόνα 11:** Χημική δομή των ενώσεων (E)-5-(2-βρωμοβινυλο)-2'-δεοξουριδίνη και BVaraU.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγκειται στο γεγονός ότι λόγω της μεγάλης ανάγκης για δημιουργία νέων θεραπευτικών ουσιών, με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες παρενέργειες καθώς και λόγω της ραγδαίας ανάπτυξης της φαρμακευτικής χημείας δόθηκε χώρος και χρόνος για τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά πληθώρας φαρμάκων που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο. Αντικείμενο της εργασίας λοιπόν είναι η σύνθεση νέων τροποποιημένων νουκλεοζιτών ως εν δυνάμει αντιϊικοί παράγοντες. Έτσι πραγματοποιήθηκαν μετατροπές στο τμήμα της βάσης για την εύρεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων διότι όπως ήδη αναφέρθηκε από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία έτη, νέες τάξεις φουρανονουκλεοζιτών με τροποποιημένη βάση, έχουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιϊκές και αντικαρκινικές.

Βασιζόμενοι λοιπόν στα ήδη υπάρχοντα και ενδιαφέροντα στοιχεία, θεωρήσαμε σημαντική την σύνθεση μιας νέας τάξης φουρανονουκλεοζιτών με υποκατάσταση στην ετεροκυκλική βάση της ουρακίλης. Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν τόσο ως αντιϊκοί όσο και ως αντικαρκινικοί παράγοντες.



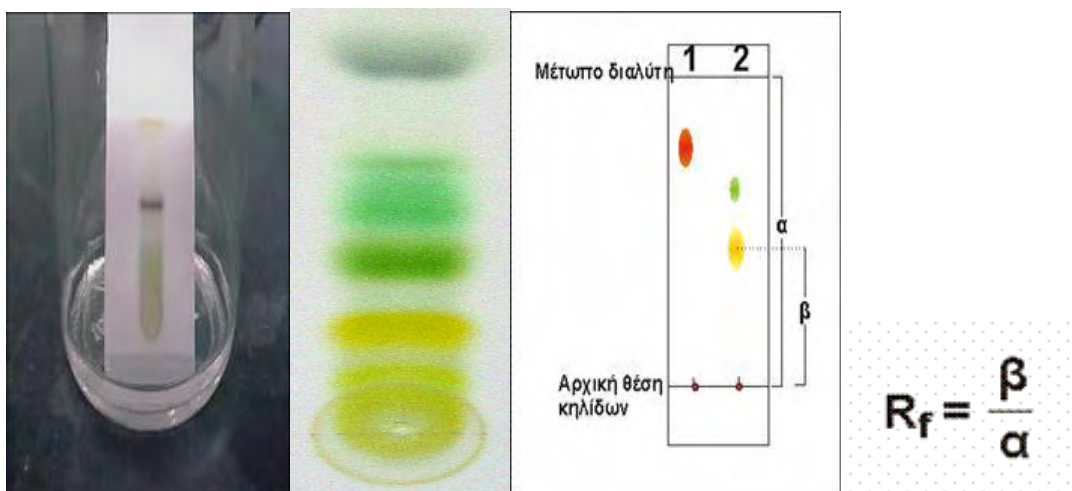
**Εικόνα 12:** Τροποποιημένος στα βάση φουρανονουκλεοζίτης.

### 3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

#### 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 Kieseilel 60F<sub>24</sub>) πάχους 0,2mm.

Το διάλυμα του υπό εξέταση δείγματος τοποθετείται υπό τη μορφή κηλίδας στην αρχή της πλάκας σε απόσταση περίπου 2 cm. Στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται όρθια εντός αεροστεγούς θαλάμου στον οποίο έχει ήδη εισαχθεί κατάλληλο σύστημα διαλυτών σε ύψος κάτω από αυτό της κηλίδας. Ακολούθως ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα εκατοστά πριν το τέλος της πλάκας. Ύστερα, η πλάκα αποσύρεται και στεγνώνεται με ρεύμα αέρα. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση τη διανυθείσα απόσταση κάθε μορίου στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης R<sub>f</sub>, που ορίζεται από το λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη (α). Η τιμή R<sub>f</sub> ενός συγκεκριμένου μορίου χρησιμεύει για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254nm ή 356nm) ή μετά από ψεκασμό με διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (θειϊκού οξέος) 30%.



Εικόνα 13: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

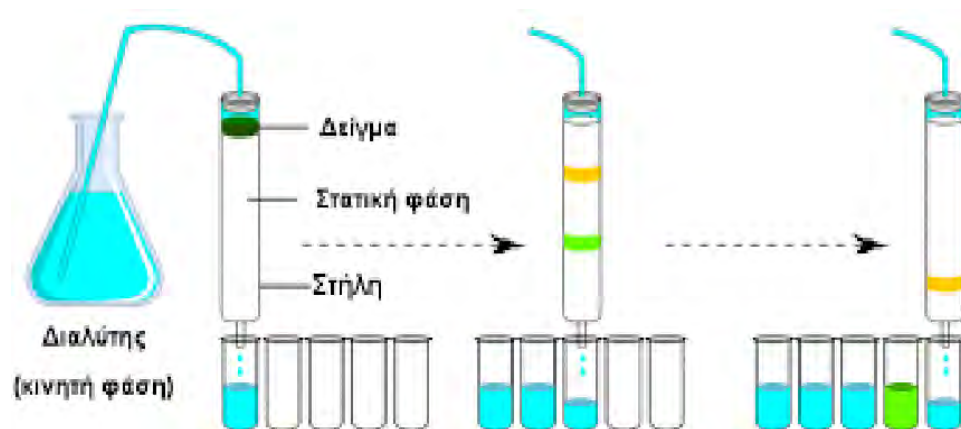


### 3.2 Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για αυτό τον λόγο είναι η χρωματογραφία στήλης και επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merck grade).

Η χρωματογραφία στήλης είναι μια τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην προσρόφηση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μια ακίνητη φάση, συνήθως silica gel και την έκλουσή τους με μια ακίνητη φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών. Οι πολικές ουσίες προσροφούνται και κολλούν στην αφετηρία, κορυφή, της στήλης και χρειάζονται πιο πολικό διαλύτη για να προχωρήσουν. Οι άπολες ουσίες συνήθως προχωρούν ή κατεβαίνουν πιο εύκολα ακόμη και με διαλύτες χαμηλής πολικότητας. Για την έκλυση των ουσιών από το silica gel χρειάζεται να γίνει έκλυση της στήλης με διάφορους διαλύτες αρχίζοντας από τους λιγότερο πολικούς και καταλήγοντας στους περισσότερο πολικούς.

Στη χρωματογραφία στήλης η στατική φάση τοποθετείται σε μια στήλη κατασκευασμένη από αδρανές υλικό ( ύαλος, πηκτική πυριτίας, ανοξειδωτος χάλυβας). Το δείγμα τοποθετείται στην αρχή (κορυφή) της στήλης και η κινητή φάση διέρχεται εξαναγκασμένα μέσω της στατικής φάσης με την εφαρμογή πίεσης σε αυτήν ή λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από την συγγένεια των συστατικών ως προς την στατική φάση.



Εικόνα 14: Χρωματογραφία στήλης (από <http://hdl.handle.net/11419/4109>).

### 3.3 Ξήρανση διαλυτών

Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων, απαιτείται η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως είναι το ακετονιτρίλιο, το διχλωρομεθάνιο, το τολουόλιο, η μεθανόλη και το DMF.

Η ξήρανση του ακετονιτρίλιου και του τολουολίου 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 ξήρανση της μεθανόλης γίνεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου για μία ώρα. Τέλος, το DMF φυλάσσεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å.

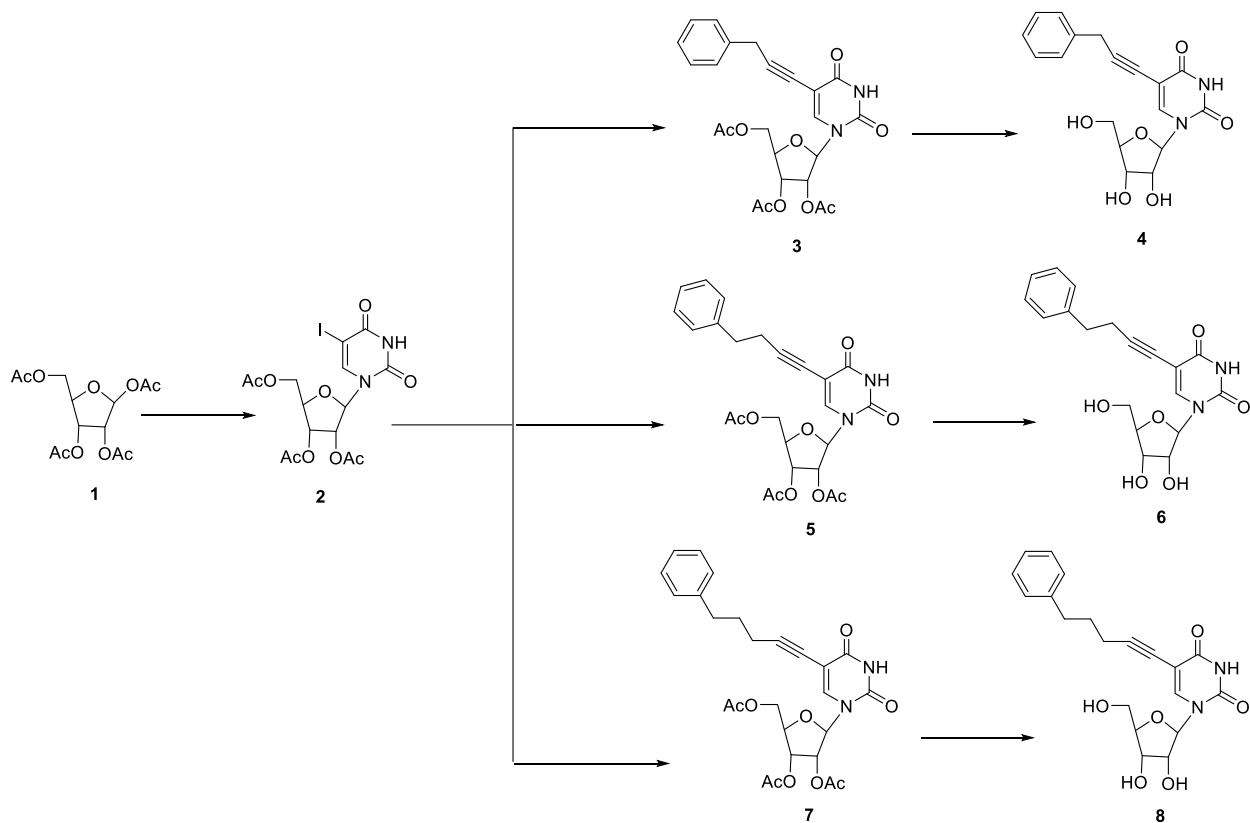
### 3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

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  $^1\text{H-NMR}$  καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο Bruker AVAMCEIII 300, χρησιμοποιώντας  $\text{chloroform-d}$  ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\text{methanol-d}_4$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για  $^1\text{H}$ .

## 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού



### 4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης

Η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 1,2,3,5-Τέτρα-*O*-ακέτυλ-β-*D*-ριβοφουρανοζη (**1**), συζεύγεται με την 5-ιωδοουρακίλη, με αντίδραση Vorbrüggen. Αρχικά, σιλυλιώνεται η βάση σε άνυδρο ακετονιτρίλιο (MeCN), παρουσία εξαμεθυλοδισιλαζανίου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης στους 100°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, προστίθεται το σάκχαρο **1** και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορο-μεθανοσουλφονικού-τριμεθυλοσιλυλεστέρα (Me<sub>3</sub>SiOSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) στους 0°C λαμβάνοντας την επιθυμητή 1-(2',3',5-*O*'-τρι-ακέτυλ-β-*D*-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλη (**2**), σε απόδοση 85%.

Στη συνέχεια, με αντίδραση Sonogashira παίρνουμε τα προστατευμένα προϊόντα **3**, **5**, **7** (Tierney et al. 2005, Majid et al. 2006). Ένα τυπικό πείραμα Sonogashira είναι το ακόλουθο. Ο φουρανουκλεοζίτης της 5-ιωδοουρακίλης (**2**) διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και με την προσθήκη του κατάλληλου αλκινίου, της τριαιθυλαμίνης (Et<sub>3</sub>N), του ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκαταλύτης) και του τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] (καταλύτης), πραγματοποιήθηκε η σύζευξη τους υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων ισχύος 200W για 5 λεπτά στους 60°C, σε αποδόσεις 69-74%

Τέλος, η σύνθεση ολοκληρώνεται με την αποπροστασία των προϊόντων **6** σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας τους προστατευμένους νουκλεοζίτες **4**, **6**, **8**, σε αποδόσεις 91-92%.

#### 4.2.1 Σύνθεση της 1(2', 3', 5' -τρι- *O*-ακετυλ-β-*D*-ριβοφουρανο) 5-ιωδοουρακίλη (**2**)

##### Αντίδραση Vorbrüggen.

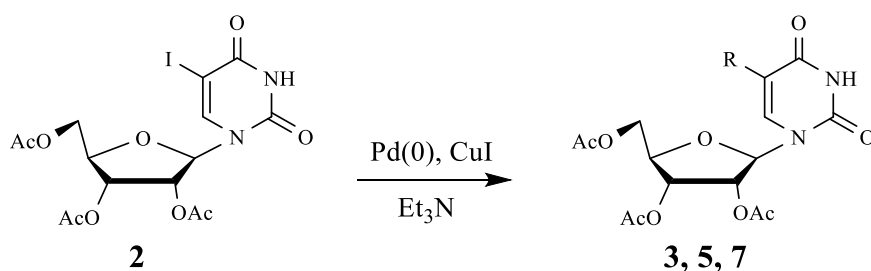
Ένα διάλυμα της 5-ιωδοουρακίλης (1,2 eq, 0,94mmol, 222,75 mg), του HMDS (1,4 eq, 253μL, 1,1 mmol) και της σακχαρίνης (0,046 eq, 7,3mg, 0,04mmol) σε άνυδρο ακετονιτρίλιο (0,24 mmol, 1,6 ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για μία ώρα στους 100 °C. Η ολοκλήρωση της συλλίωσης της βάσης γίνεται αντιληπτή όταν το μίγμα γίνει διαυγές. Αφότου το μείγμα έγινε διαυγές, προστέθηκε η 1,2,3,5-Τέτρα-*O*-ακέτυλ-β-*D*-ριβοφουρανοζη (**1**) (250 mg, 0,78mmol) καθώς και ο καταλύτης Me<sub>3</sub>SiOSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> (0,20 ml, 1,1 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 30 λεπτά με ψύξη στους 0 °C.

Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο διάλυμα NaHCO<sub>3</sub>. Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **2** (331,7mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρού.

<b>TLC (Διάλυμα Α )</b>	$R_f = 0,25$
<b>Απόδοση</b>	85%
$[\alpha]_D^{22}$	-2
$\lambda_{max}$	284 nm

\*Διάλυμα Α: οξικός αιθυλεστέρας/ εξάνιο 60/40

#### 4.2.2 Σύνθεση των 3, 5, 7.



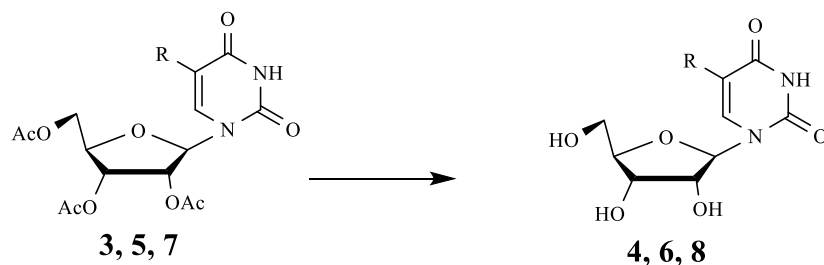
**R=** phenyl propyne (3), phenyl butyne (5), phenyl pentyne (7)

Η σύνθεση των **3**, **5**, **7** επιτεύχθηκε με τη μέθοδο Sonogashira με χρήση μικροκυμάτων: Το *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF) και η 1-(2',3',5-τρι-*O*-ακέτυλ - $\beta$ -*D*-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλη (**2**) διαλύονται σε 5 ml άνυδρου διαλύτη (0,41 mmol, 206mg), 2 eq του κατάλληλου τελικού αλκινίου, τριφαινυλοφωσφορικό παλλάδιο [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] (0,1 eq, 323,6 mg, 0,28mmol), ιωδιούχο χαλκό (0,1 eq, 53,7 mg, 0,28 mmol), τριαιθυλαμίνη (3 eq, 1,2ml), και εν συνεχεία γίνεται χρήση μικροκυμάτων σε συνθήκες 200 Watt, για 5 λεπτά στους 60°C. Η επεξεργασία που ακολουθείται για την παραλαβή του προϊόντος περιλαμβάνει εκχύλιση του μίγματος της αντίδρασης με οξικό αιθυλεστέρα και NaHCO<sub>3</sub>, παραλαβή της οργανικής φάσης, ξήρανση με άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Τα επιθυμητά προϊόντα **3** (138 mg), **5** (148 mg), **7** (151 mg) ελήφθησαν υπό τη μορφή κίτρινου αφρού με απόδοση 69%, 71% και 74% αντίστοιχα.

	Προϊόν 3	Προϊόν 5	Προϊόν 7
TLC (Διάλυμα Β)	R <sub>f</sub> = 0,22	R <sub>f</sub> = 0,18	R <sub>f</sub> = 0,4
Απόδοση	69%	71%	74%
[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup>	-22	+16	+4
λ <sub>max</sub>	292 nm	294 nm	293 nm

\*Διάλυμα Β: διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη 99/1

#### 4.2.3 Σύνθεση των 4, 6, 8.



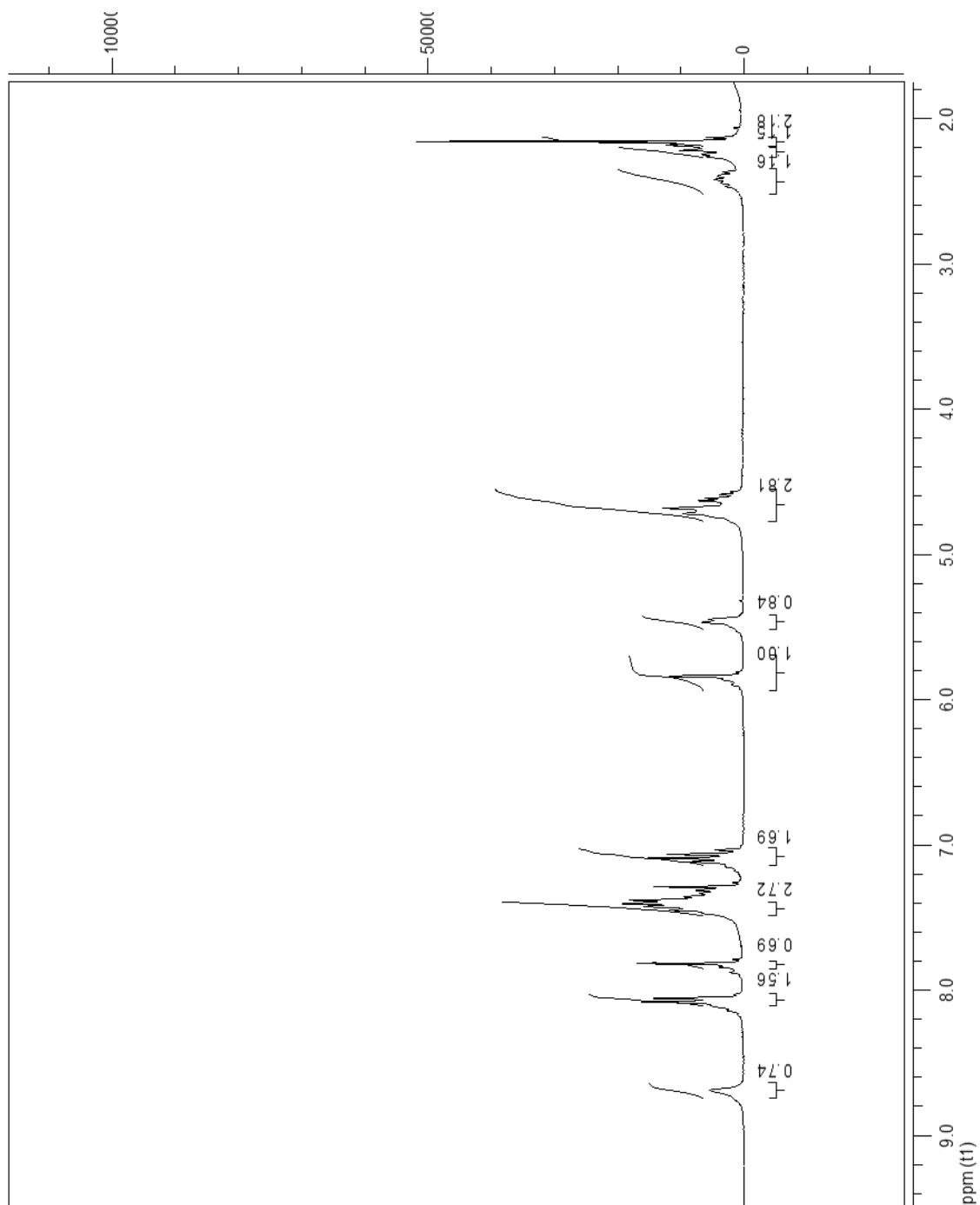
**R**= phenyl propyne (3), phenyl butyne (5), phenyl pentyne (7)

Διάλυμα των προστατευμένων νουκλεοζιτών **3** (100 mg, 0,2mmol), **5** (100 mg, 0,2mmol) και **7** (100 mg, 0,2mmol) σε κορεσμένη μεθανολική αμμωνία (262,5 ml) αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες καθαρίζονται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 10% μεθανόλης σε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, οπότε παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα **4** (63,7mg), **6** (66mg) και **8** (65,6mg), αντίστοιχα, με μορφή κίτρινου ελαίου.

	<b>Προϊόν 4</b>	<b>Προϊόν 6</b>	<b>Προϊόν 8</b>
<b>TLC (Διάλυμα Γ)</b>	R <sub>f</sub> = 0,4	R <sub>f</sub> =0,37	R <sub>f</sub> = 0,38
<b>Απόδοση</b>	92%	91%	92%
<b>[α]<sub>D</sub><sup>22</sup></b>	-4	+2	+1
<b>λ<sub>max</sub></b>	292 nm	294nm	293 nm

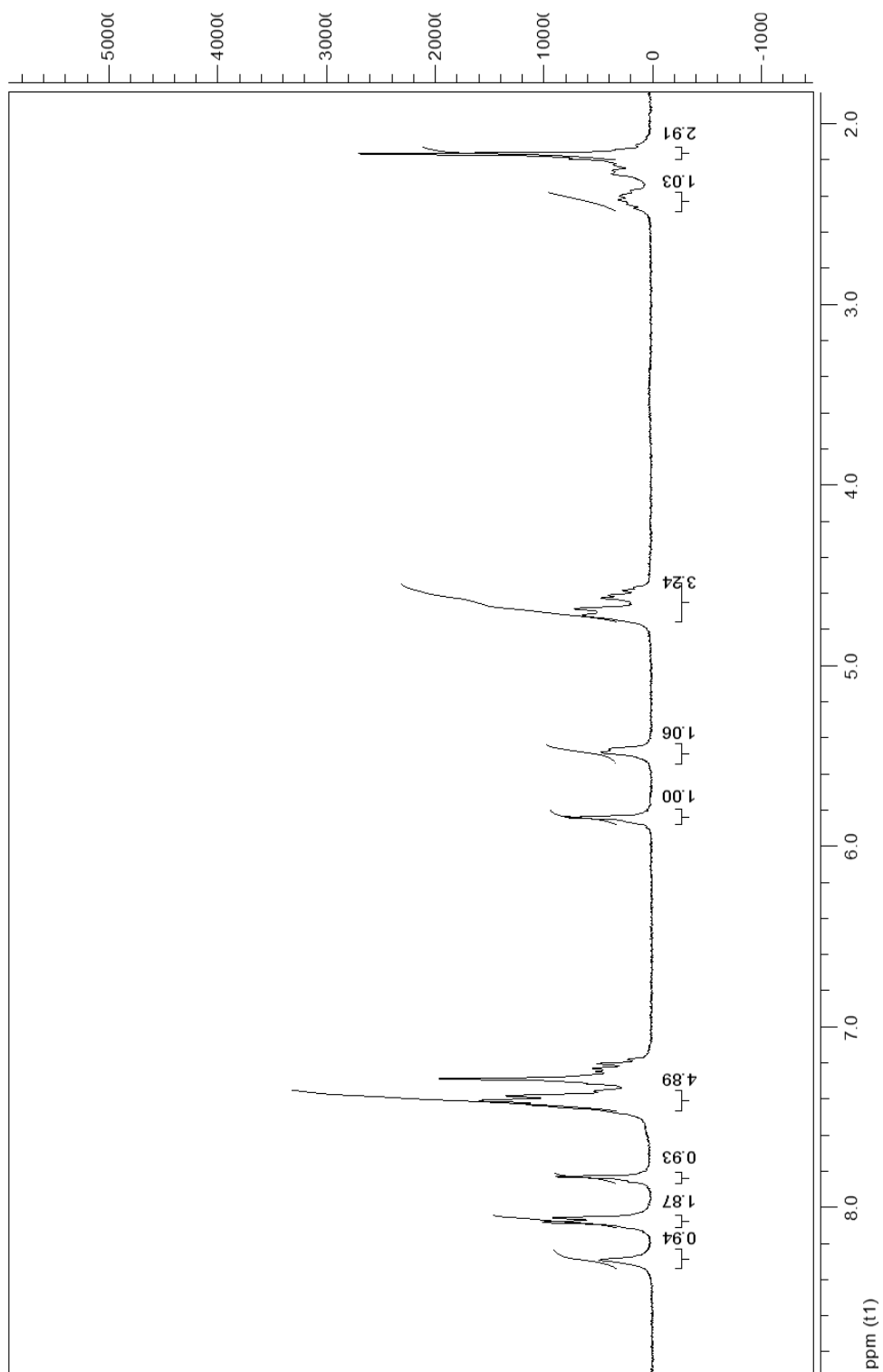
\*Διάλυμα Γ: διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη 90/10

## 5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ $^1\text{H}$ NMR

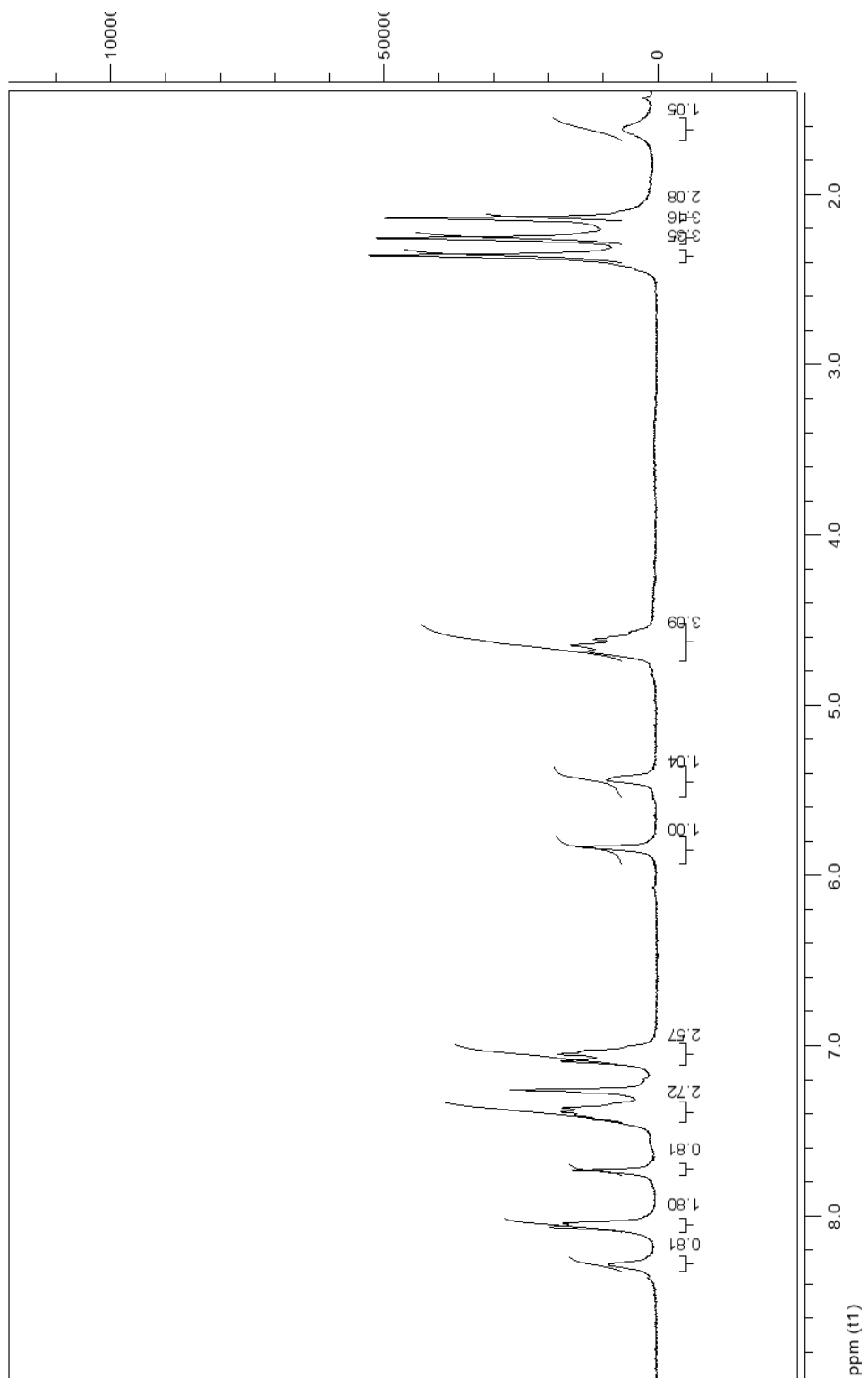


Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του προϊόντος 4





**Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του προϊόντος 6**



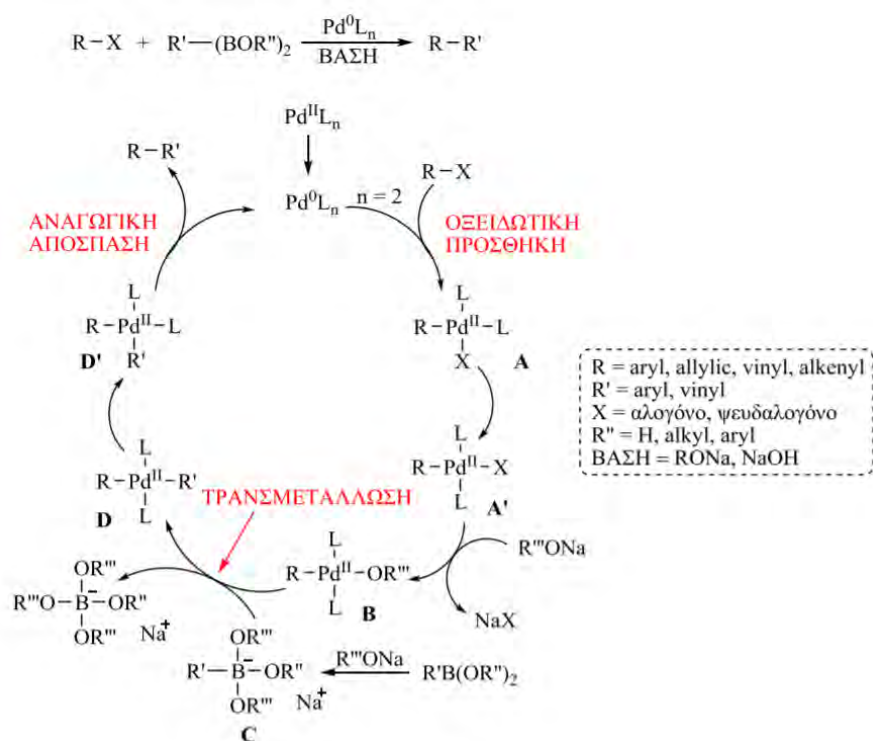
**Φάσμα <sup>1</sup>H NMR του προϊόντος 8**

## 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

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

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης φουρανονουκλεοζιτών με τροποποίηση στο τμήμα της βάσης με πιθανή αντικαρκινική και αντικική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, ταχεία, έχοντας πραγματοποιήσει σύντομα βήματα.

Η αντίδραση Sonogashira είναι μια αντίδραση διασταυρούμενης σύζευξης που χρησιμοποιείται στην οργανική σύνθεση για να σχηματίσει δεσμούς μεταξύ ανθράκων. Πραγματοποιείται μεταξύ ενός τελικού αλκυνίου και ενός αλογονοπαραγώγου (άρυλο- ή βίνυλο-) με την επίδραση ενός οργανοπαλλαδιακού καταλύτη, ενός συγκαταλύτη του Cu και μιας βάσης και χωρίζεται στα παρακάτω 3 στάδια:



Σχήμα 6: Μηχανισμός της σύζευξης Sonogashira (από Κούπης κ.ά. 2015).

Επιτεύχθηκε με την χρήση μικροκυμάτων, η οποία αποτελεί “πράσινη” τεχνική και υπερέχει σε σχέση με τη συμβατική θέρμανση στα εξής βασικά σημεία:

1. Προσφέρει ομοιόμορφη θέρμανση σε όλο το μίγμα της αντίδρασης.
2. Αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα της αντίδρασης.
3. Ελαττώνει τον σχηματισμό παραπροϊόντων.
4. Παρέχει αυξημένες αποδόσεις.

Οι τελικές αποδόσεις που πήραμε από τη σύνθεση των τελικών φουρανονουκλεοζιτών είναι αρκετά καλές. Όλες οι νέες ενώσεις προσδιορίστηκαν από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H NMR}$ .

Τα νέα μόρια 3,5,7 και 4,6,8 έχουν σταλεί στο εργαστήριο του Βελγίου για μελέτη ως προς την κυτταροτοξική τους δράση έναντι κυτταρικών σειρών αλλά μέχρι στιγμής αναμένουμε τα αποτελέσματα.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γεωργάτσος Ι.Γ. (1993). Βιοχημεία. Αθήνα: Εκδόσεις Γιαχούδη Γιαπούλη.

Κυρίτσης Χ. (2010). Σύνθεση νέων αιθουλο και κυανο νουκλεοζιτών ως πιθανοί αντιϊικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες. Λάρισα.

Λαζαρίδη Μ.Α. (2016). Νέοι τροποποιημένοι στο σάκχαρο και στη βάση φουρανονουκλεοζίτες ως εν δυνάμει αντιϊικοί παράγοντες. Σύνθεση και ταυτοποίηση με τεχνικές ενόργανης ανάλυσης-φασματοσκοπία. Λάρισα.

Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ. και Κατσαρέλη, Ε. (2015). Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. [Κεφάλαιο Συγγράμματος]. Στο: Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., Κατσίλα, Θ., Τσαρουχά, Χ., Τζέτη, Μ., Λιλάκος, Κ. και Δούκισσας, Λ. (2015). Εργαστηριακές ασκήσεις γενετικής του ανθρώπου. Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. κεφ 7.

Allaudeen H.S., Kozarich J.W., Bertino J.R. and De Clercq E. (1981). On the mechanism of selective inhibition of herpesvirus replication by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(5): 2698–2702.

Arnér E.S.J. and Eriksson S. (1995). Mammalian Deoxyribonucleoside Kinases. *Pharmacology & Therapeutics* 67 (2): 155–86.

Baker C.H., Banzon J., Bollinger J.M., Stubbe J., Samano V., Robins M.J., Lippert B., Jarvi E. and Resvick R. (1991.) 2'-Deoxy-2'-Methylenecytidine and 2'-Deoxy-2',2'-Difluorocytidine 5'-Diphosphates: Potent Mechanism-Based Inhibitors of Ribonucleotide Reductase. *Journal of Medicinal Chemistry* 34 (6): 1879–84.

Calabresi P., Cardoso S.S., Finch S.C., Kligerman M.M., Von Essen C.F., Chu M.Y. and Welch A.D. (1961). Initial Clinical Studies with 5-Iodo-2'-deoxyuridine. *American Association for Cancer Research*.

Cooper G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach* (2nd edition). Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Cory, A.H., Samano V., Robins M.J., and Cory J.G. (1994). 2'-Deoxy-2'-Methylene Derivatives of Adenosine, Guanosine, Tubercidin, Cytidine and Uridine as Inhibitors of L1210 Cell Growth in Culture. *Biochemical Pharmacology* 47 (2): 365–71.

De Clercq E. (2013). Selective Anti-Herpesvirus Agents. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 23(3): 93–101.

De Clercq E., Descamps J., De Somer P., Barr P.J., Jones A.S. and Walker R.T. (1979). (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(6): 2947–2951.

De Clercq E., Degreef H., Wildiers J., De Jonge G., Drochmans A., Descamps J. and De Somer P. (1980). Oral (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in severe herpes zoster. *The British Medical Journal* 281: 1178.

Denny W.A. and Wilman D.E.V. (1990). *The Chemistry of Antitumour Agents*. 1st ed. Springer Netherlands.

Elion G. (1989). The Purine Path to Chemotherapy. *Science* 244 (4900): 41–47.

Hartman, M. C. T., and Coward J.K. (2002). Synthesis of 5-Fluoro N -Acetylglucosamine Glycosides and Pyrophosphates via Epoxide Fluoridolysis: Versatile Reagents for the Study of Glycoconjugate Biochemistry. *Journal of the American Chemical Society* 124 (34): 10036–53.

Heravi M.M. and Sadjadi S. (2006). Recent advances in the application of the Sonogashira method in the synthesis of heterocyclic compounds. *Tetrahedron* 65 (37): 7761–7775.

Hitchings G.H., Falco E.A. and Sherwood M.B. (1945). The effects of pyrimidines on the growth of *Lactobacillus casei*. *Science* 102 (2645): 251–52.

Juel-Jensen B.E. (1973). Herpes Simplex and Zoster. *British Medical Journal* (1): 406-410.

Juel-Jensen B.E., MacCallum F.O. and Davies H. (1974). Idoxuridine in herpes zoster. *The British Medical Journal*.

Kaufman H.E. (1962). Clinical Cure of Herpes Simplex Keratitis by 5-Iodo-2'-Deoxyuridine. *Experimental Biology and Medicine* 109 (2): 251–52.

Kaufman, H.E., Martola E.L. and Dohlman C. (1962). Use of 5-Iodo-2'-Deoxyuridine (IDU) in Treatment of Herpes Simplex Keratitis. *Archives of Ophthalmology* 68(2), 235–239.

Kaufman H.E., Nesburn A.B. and Maloney E.D. (1962). Comparison of specific antiviral agents in herpes simplex keratitis. *Archives of Ophthalmology* 67 (8): 583-591.

Kaufman, H.E. and Heidelberger C. (1964). Therapeutic Antiviral Action of 5-Trifluoromethyl-2'-deoxyuridine in Herpes Simplex Keratitis. *Science* 145(3632): 585–586.

Komiotis D., Manta S., Tsoukala E. and Tzioumaki N. (2008). Antiviral Unsaturated Nucleosides. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry* 7 (4): 219-244.

Lewin B. (2003). *Genes VII*. Southern Africa: Oxford University Press.

Lin T.S., Zhu L.Y., Xu S.P., Divo A.A. and Sartorelli A.C. (1991). Synthesis and Antimalarial Activity of 2-Aziridinyl- and 2,3-Bis(Aziridinyl)-1,4-Naphthoquinonyl Sulfonate and Acylate Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 34 (5): 1634–39.

Lui V.W.Y., Lau C.P.Y., Cheung C.S.F, Ho K., Heung Ling Ng M., Cheng S.H., Hong B., Tsao S.W., Tsang C.M., Lei K., Yamasaki Y., Mita A. and Chan A.T.C. (2010). An RNA-Directed Nucleoside Anti-Metabolite, 1-(3-C-Ethynyl-Beta-d-Ribo-Pentofuranosyl)Cytosine (ECyd), Elicits Antitumor Effect via TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) Downregulation. *Biochemical Pharmacology* 79 (12): 1772–80.

Matsuda A. and Sasaki T. (2004). Antitumor Activity of Sugar-Modified Cytosine Nucleosides. *Cancer Science* 95 (2): 105–11.

McMurry J. (2000). *Οργανική Χημεία, τόμος Ι*. Αθήνα: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. σελ. 1249,1245, 905.

Page C., Curtis M., Sutter M., Walker M., Hoffman B.B. (1997). *Φαρμακολογία*. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης.

Périgaud, C., Gosselin G., and Imbach J.L. (1992). Nucleoside Analogues as Chemotherapeutic Agents: A Review. *Nucleosides and Nucleotides* 11 (2–4): 903–45.

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

Pontikis R., Wolf J., Monneret C., and Florent J.C. (1995). A New Route to 2'-C-Methylene Nucleoside Analogs, Inhibitors of Ribonucleotide Reductase. *Tetrahedron Letters* 36 (20): 3523–26.

Price C.C., Sartorelli A.C., and Johns M.D. (1975). Antineoplastic and Immunosuppressive Agents: Part II. Springer Berlin Heidelberg: *Handbuch Der Experimentellen Pharmakologie / Handbook of Experimental Pharmacology* 38 / 2.

Prusoff W.H. (1959). Synthesis and Biological Activities of Iododeoxyuridine, an Analog of Thymidine. *Biochimica et Biophysica Acta* 32 (1): 295–96.

Prusoff W.H. and Goz B. (1973). Potential mechanisms of action of antiviral agents. *Fedn. Proc. Fedn Am. Socs Exp. Biol* 32 (6): 1679–87.

Saenger W., Walker R.T., De Clercq E. and Eckstein F. (1979). *Nucleoside Analogues: Chemistry, Biology, and Medical Applications*. 1st ed. Springer US: NATO Advanced Study Institutes Series 26.

Shigeta S., Yokota T., Iwabuchi T., Baba M., Konno K., Ogata M. and De Clercq E. (1983). Comparative Efficacy of Antiberpes Drugs Against Various Strains of Varicella-Zoster Virus. *Journal of Infectious Diseases*, 147(3): 576–584.

Stryer L. (1995). *Βιοχημεία*. Αθήνα: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Thompson R.L., Wilkin M.L., Hitchings G.H. and Russell P.B. (1949). The Virostatic and Virucidal Action of -Haloacylamides on Vaccinia Virus in Vitro. *Experimental Biology and Medicine* 72 (1): 169–71.

Tierney J. and Lidström P. (2005). *Microwave Assisted Organic Synthesis*. Harlow UK: Blackwell Publishing CRC Press. p: 31-32.



Visser D.W., Lagerborg D.L. and Pearson H.E. (1952). Inhibition of Mouse Encephalomyelitis Virus, in Vitro, by Certain Nucleoprotein Derivatives. *Experimental Biology and Medicine* 79 (4): 571–73.

Vorbrüggen H. and Höfle G. (1981). Nucleoside Syntheses, XXIII(1) On the Mechanism of Nucleoside Synthesis. *Chemische Berichte*, 114(4): 1256–1268.

Vorbrüggen H. and Ruh-Pohlentz C. (2001). *Handbook of Nucleoside Synthesis*. New York: John Wiley & Sons Inc.

Yamagami K., Fujii A., Arita M., Okumoto T., Sakata S., Matsuda A., Ueda T. and Sasaki T. (1991). Antitumor Activity of 2'-Deoxy-2'-methylidenecytidine, a New 2'-Deoxycytidine Derivative. *Cancer Research* (51): 2319-2323.

Zhou W., Gumina G., Chong Y., Wang J, Schinazi R.F. and Chu C.K. (2004). Synthesis, Structure–Activity Relationships, and Drug Resistance of  $\beta$ - D -3'-Fluoro-2',3'-Unsaturated Nucleosides as Anti-HIV Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (13): 3399–3408.

Ιστοσελίδες

<https://www.medicinenet.com/didanosine/article/htm>

[www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrv/](http://www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrv/)