

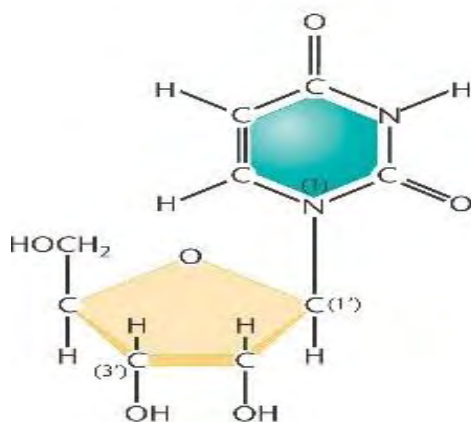


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΛΙΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

Διπλωματική Εργασία

**Νέοι C5 αρυλαλκινυλ -3'- δεόξυ-
ριβοφούρανουκλεοζίτες της ουρακίλης ως εν
δυνάμει αντιϊικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.**



ΛΑΡΙΣΑ 2017

Διπλωματική Εργασία

Νέοι C5αρυλαλκινυλ -3' - δεόξυ-ριβοφούρανοουκλεοζίτες της ουρακίλης ως εν δυνάμει αντιϊκοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.

New C5 arylalkynyl -3' - deoxy-ribofuranosyl nucleosides uracil as potential antiviral and antitumor agents.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Κομιώτης Δημήτριος :** Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων.
- **Μαρκουλάτος Παναγιώτης :** Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία.
- **Αμούτζιας Γρηγόριος:** Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Κομιώτη Δημήτριο, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε και για τις εποικοδομητικές του υποδείξεις.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κολλάτο Νικόλαο για την άψογη συνεργασία, υπομονή, βοήθεια και τις πολύτιμες υποδείξεις του κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Υδατάνθρακες	7
1.2 Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές: Σχηματισμός ημιακετάλης	8
1.3 Νουκλεοζίτες και ανάλογα τους	11
1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών	13
1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιικοί παράγοντες	15
1.6 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στο σάκχαρο και τη βάση	17
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
2.1 Σκοπός.....	22
3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	23
3.1 Χρωματογραφία Χάρτου (TLC: Thin Layer Chromatography).....	23
3.2 Χρωματογραφία στήλης	24
3.3 Ξήρανση διαλυτών	24
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων.....	25
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	26
4.1.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού της (7).....	26
4.1.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης.....	26
4.2.1 Σύνθεση της 5-O-βενζόυλο-1,2-O-ισοπυροϋλιδένιο-α-D-ξυλοφουρανόζης (2)	28
4.2.2 Σύνθεση της 1,2-O-ισοπυροϋλιδένιο-5-O-βενζόυλο-3-δεόξυ-α-D-ριβοφουρανόζης(3).....	29
4.2.3 Σύνθεση της 1,2-δι-O-ακέτυλ-5-O-βενζόυλο-3-C-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανόζης (4)	30
4.2.4 Σύνθεση της 1-(2'-O-ακέτυλ-5-O-βενζόυλο-3-C-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλης (5)	31
4.2.5 Σύνθεση της (6)	32
4.2.6 Σύνθεση της (7)	33
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H NMR	35
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	39

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ερευνητές δείχνουν ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια στους νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους, κυρίως λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντικαρκινική, αντιβακτηριδιακή και αντική δράση περιέχουν νουκλεοζίτες αποτελούμενους από μονοσακχαρίτες με πενταμελή ή εξαμελή δακτύλιο συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση. Τα παραπάνω οδήγησαν στην σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών με εξαμελή δακτύλιο, οι οποίοι αναμένεται να έχουν κύριο ρόλο στην αντική και αντικαρκινική θεραπεία.

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση καινούργιων νουκλεοζιτικών αναλόγων, των C5αρυλαλκινυλ -3'- δεόξυ-ριβοφούρανουκλεοζιτών της ουρακίλης. Αναλύεται η συνθετική οδός που ακολουθήθηκε για την παρασκευή τους καθώς και η μέθοδος ταυτοποίησής τους.

ABSTRACT

The researchers have shown interest in nucleosides and analogues in recent years, mainly due to their therapeutic properties. It has been found that many natural antibiotics with antitumor, anti-bacterial and antiviral activity contain nucleosides composed of five- or six-membered ring monosaccharides attached to a heterocyclic base. These have led to the synthesis of modified six-membered ring nucleosides, which are expected to play a major role in the antiviral and anticancer therapy.

In this dissertation, the synthesis of new nucleoside analogues, C5arylalkinyl -3- deoxy-ribofuranosyl nucleosides uracil. Analyzed the synthetic pathway followed for their preparation and the method for their identification.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες, ή αλλιώς και σάκχαρα, αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στη διατροφή όλων των ζωικών οργανισμών παρέχοντάς τους την απαιτούμενη ενέργεια επιβίωσης. Αποτελούν μια ομάδα οργανικών ουσιών με γενικό τύπο $(\text{CH}_2\text{O})_n$, δηλαδή αποτελούνται από υδρογόνο και οξυγόνο σε αναλογία 2:1. Οι σχετικές αναλογίες άνθρακα, υδρογόνου και οξυγόνου όπως φαίνονται από τον γενικό τους τύπο ισχύουν για τους μονοσακχαρίτες, ωστόσο για τους υπόλοιπους διαφέρουν. Ξεκινούν από απλούστερα σάκχαρα όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη και καταλήγουν μέχρι πιο σύνθετα μόρια: τους πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο και η κυτταρίνη. Βέβαια κάποιοι υδατάνθρακες μπορεί να είναι μικροί με μοριακά βάρη μικρότερα του 100 ενώ άλλοι μπορεί να είναι μεγάλα μακρομόρια με μοριακό βάρος πολλές εκατοντάδες ή χιλιάδες.

Τέσσερις κύριες κατηγορίες υδατανθράκων βιολογικού ενδιαφέροντος:

- Οι μονοσακχαρίτες, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, που αποτελούν τα μονομερή για την σύνθεση πολυπλοκότερων δομών.
- Οι δισακχαρίτες που αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες. Όπως είναι η λακτόζη, η μαλτόζη και η σακχαρόζη.
- Οι ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από 20-30 μονοσακχαρίτες.
- Οι πολυσακχαρίτες, όπως είναι το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη, που αποτελούνται από εκατοντάδες χιλιάδες μονομερή.

Οι μονοσακχαρίτες, οι απλούστεροι υδατάνθρακες, είναι αλδεύδες ή κετόνες με δύο ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Οι μικρότεροι

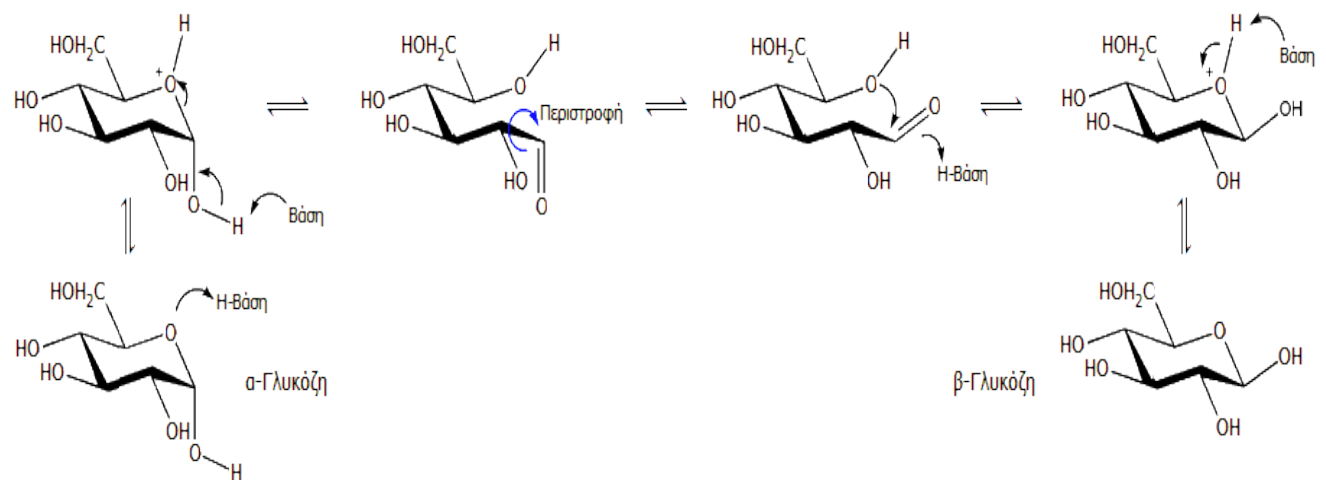
μονοσακχαρίτες με $n=3$ είναι η διυδροξυακετόνη και η D- ή L-γλυκεραλδεΐδη και αναφέρονται ως τριόζες. Απλοί μονοσακχαρίτες με τέσσερα, πέντε, έξι και επτά άτομα άνθρακα καλούνται τετρόζες, πεντόζες, εξόζες και επτόζες αντίστοιχα. (McMurry, John 2000).

1.2 Μονοσακχαρίτες ως κυκλικές δομές: Σχηματισμός ημιακετάλης

Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν με την μορφή ανοιχτής αλυσίδας και την κυκλοποιημένη τους μορφή. Τα σάκχαρα χωρίζονται αναλόγως με το μέγεθος της αλυσίδας του άνθρακα, παραδείγματος χάριν σε πεντόζες, αν έχουν πέντε μόρια άνθρακα, ή εξόζες αν έχουν έξι.

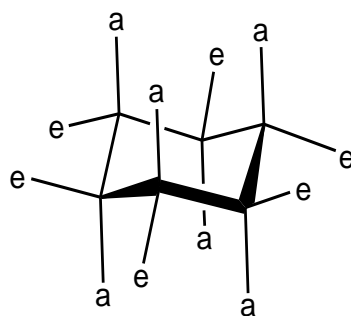
Τα σάκχαρα βρίσκονται σε κυκλική μορφή όταν μια καρβονυλική ομάδα του μορίου τους αντιδρά με μια ομάδα υδροξυλίου, προς δημιουργία ημιακετάλης. Η αντίδραση αυτή είναι μια ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη που οδηγεί στην δημιουργία πυρανοζών ή φουρανοζών. Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες χαρακτηρίζονται ως σταθερά μόρια, με αποτέλεσμα αρκετοί υδατάνθρακες να βρίσκονται σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοικτής και κλειστής αλυσίδας. Η κυκλοποίηση των σακχάρων μέσω ημιακετάλης είναι μεγάλης σημασίας γιατί κατ' αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα πρόσθετο στερεογονικό κέντρο στο μόριο και παρουσιάζεται το φαινόμενο της ανωμέρειας. Βέβαια στην περίπτωση της γλυκόζης ο άνθρακας C-1 είναι ανωμερής με αποτέλεσμα να μπορούν να σχηματιστούν δυο στερεοχημικές δομές : της α-D-γλυκοπυρανόζης και της β-D-γλυκοπυρανόζης (εικόνα 1). Αν ο υποκαταστάτης (υδροξύλιο σε

αυτή την περίπτωση) του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται σε θέση trans, κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου προς τον υποκαταστάτη στον άνθρακα C-5 τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως μορφής α. Αντίθετα ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται σε θέση cis, πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου, ως προς τον υποκαταστάτη του άνθρακα C-5 τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως μορφής β.



Εικόνα 1: Κυκλοποίηση μονοσακχαρίτη μέσω αντίδρασης ημιακετάλης.

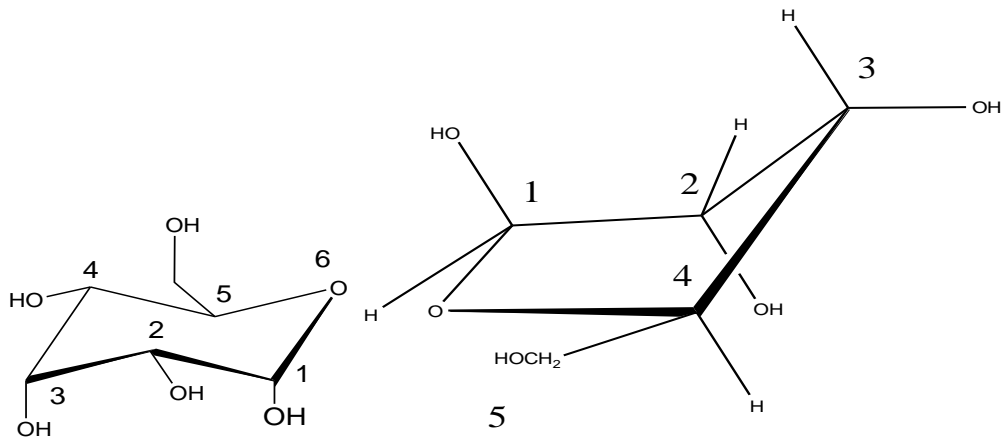
Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η στερεοδιάταξη του δακτυλίου εξαιτίας της συμπεριφοράς των υποκαταστατών του, όσον αφορά την διάταξή τους σε σχέση με το επίπεδο του δακτυλίου. Συγκεκριμένα διακρίνονται δυο είδη υποκαταστατών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί. Ως αξονικοί υποκαταστάτες χαρακτηρίζονται οι υποκαταστάτες που βρίσκονται παράλληλα στον άξονα του δακτυλίου, δηλαδή κάθετα στο επίπεδό του. Αντιθέτως, οι ισημερινοί υποκαταστάτες βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με τον δακτύλιο (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Αξονικοί (a) υποκαστές και ισημερινοί (e) υποκαταστάτες.

Τα παραπάνω παίζουν ρόλο στην χημική συμπεριφορά του μορίου. Ακόμη μπορούν να εμφανιστούν φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης μεταξύ αξονικών υποκαταστατών, εκτός υδρογόνου, αν αυτοί βρεθούν στην ίδια πλευρά του δακτυλίου. Η εμφάνιση σχετίζεται με την φύση του υποκαταστάτη όπως την ακτίνα VanderWaals του και την πυκνότητα του νέφους ηλεκτρονίων. Οι ισημερινοί υποκαταστάτες δεν παρουσιάζουν αυτό το φαινόμενο, γι' αυτό η υποκατάσταση στο ισημερινό επίπεδο είναι κατά κόρον σταθερότερη.

Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρείται είναι η αλληλεπίδραση αξονικών και ισημερινών υποκαταστατών, που προκαλεί τάση στο μόριο ικανή να το διαμορφώσει περαιτέρω στερεοχημικά. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται 1,3-διαξονική στερεοχημική τάση και εξαρτάται από το μέγεθος όπως επίσης και την φύση του εκάστοτε υποκαταστάτη. Ως αποτέλεσμα του παραπάνω οι φουρανόζες και οι πυρανόζες δεν είναι επίπεδες στον χώρο αλλά μπορούν να υιοθετήσουν διάφορες στερεοδιαμορφώσεις. Ο δακτύλιος της πυρανόζης λαμβάνει συχνότερα τη μορφή ανάκλιντρου (chair), ενώ ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να λάβει την μορφή του φακέλου (envelope) (Εικόνα 3) (McMurry, John 2000).

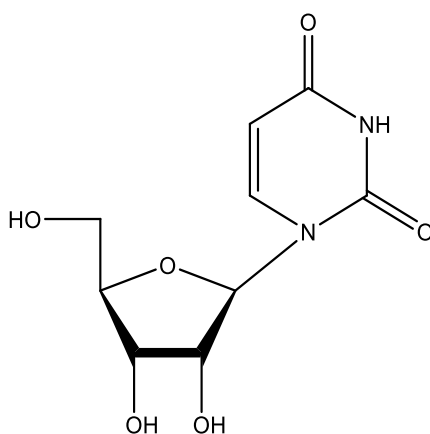


Εικόνα 3: Μορφές ανάκλιπτου και φακέλου.

1.3 Νουκλεοζίτες και ανάλογα τους

Οι νουκλεοζίτες είναι θεμελιώδη συστατικά των διαφόρων βιολογικών συστημάτων. Ο νουκλεοζίτης αποτελείται από μια πουρινική (αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδινική (θυμίνη, ουρακίλη, κυτοσίνη) βάση, και μια πεντόζη. Αναλόγως αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης. Η ένωση νουκλεοζίτη με φωσφορικό οξύ ονομάζεται νουκλεοτίδιο (ή εστέρα του νουκλεοζίτη) που πάλι αναλόγως τη φύση της πεντόζης είναι ριβονουκλεοτίδιο ή δεοξυριβονουκλεοτίδιο. Πολλά νουκλεοτίδια που ενώνονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς αποτελούν 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. Δημιουργείται δηλαδή στα νουκλεϊνικά οξέα ένα μόρφωμα που έχει σαν ραχοκοκαλιά μια αλληλουχία από φωσφορικά και ριβόζες που

επάνω τους είναι αγκιστρωμένες οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης. 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. (Γεωργάτσου, 1993). Στους νουκλεοζίτες η ετεροκυκλική βάση ενώνεται στη θέση 1' της πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό, κατά τον οποίο η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου (Page, 1997). Οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Ουριδίνη (U)

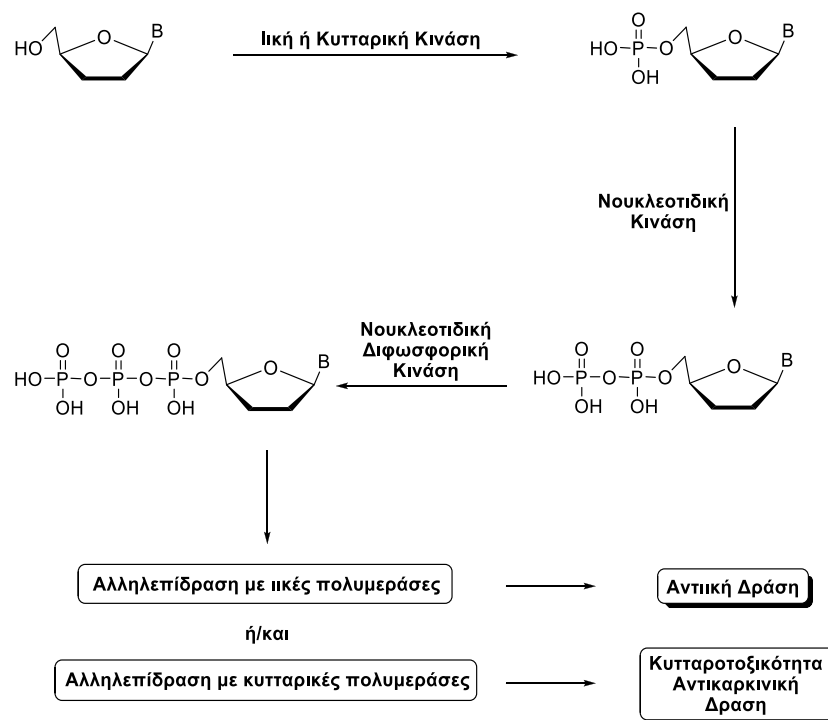
Η χημεία των νουκλεοζιτών αποτελεί ένα από τα κλασικά αλλά και πιο σημαντικά αντικείμενα στην οργανική σύνθεση. Μεγάλος αριθμός ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη, σύνθεση και βιολογική ταυτοποίηση νουκλεοζιτών και νουκλεοζιτικών αναλόγων. Έχει διαπιστωθεί ότι οι νουκλεοζίτες επιδεικνύουν σημαντική αντικαρκινική, αντιβακτηριακή και αντιική δράση (Hartmanetal. 2001). Έχει βρεθεί ακόμη ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιική και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. Κατά συνέπεια έχουν γίνει πολλές

τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών δραστηριοτήτων τους.

1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Ο τρόπος δράσης των φαρμάκων στηρίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό στόχο, που μπορεί να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη, όπως ένας υποδοχέας, ένας διάυλος ιόντων, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφορέας, είτε τα νουκλεϊνικά οξέα. Παρόμοιο είναι και στα νουκλεοζιτικά ανάλογα που έχουν αντιϊκή ή αντικαρκινική δράση, όπου λόγω της δυνατότητας που έχουν να μεταφέρονται εντός των κυττάρων με παθητική διάχυση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία πολλών ασθενειών (Zhou *et al.* 2004). Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών μπορούν να χαρακτηριστούν ως ανενεργά προφάρμακα, που ενδοκυτταρικά πρέπει να τροποποιηθούν για να μπορέσουν να είναι δραστικά. Αυτό γίνεται στη φωσφορυλίωσή τους από τις κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες (Arner and Eriksson 1995). Μετά τη φωσφορυλίωση τους προς τις τριφωσφορικές τους δομές από κυτταρικά ή ιϊκά ένζυμα, σταματούν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιϊκό διπλασιασμό, ή παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA. Η ενσωμάτωσή τους στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA όπου οδηγεί στην διακοπή της επιμήκυνσής της θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ένας κοινός μηχανισμός αντιϊκής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών. Οι κυτταρικές πολυμεράσες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με παράλληλη απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού

μεταξύ των νουκλεοτιδίων (Lewin 2003, Burnsetal. 2005). Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου



Εικόνα 5: Φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες.

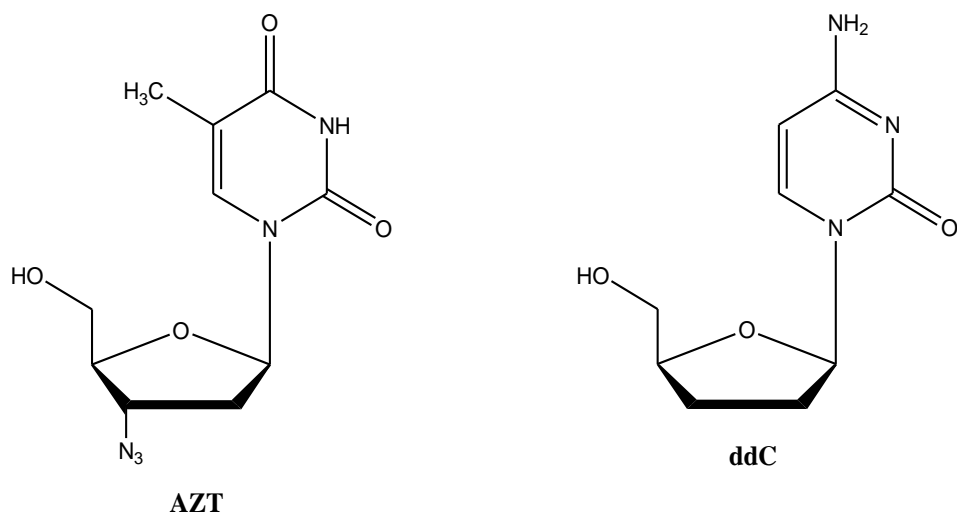
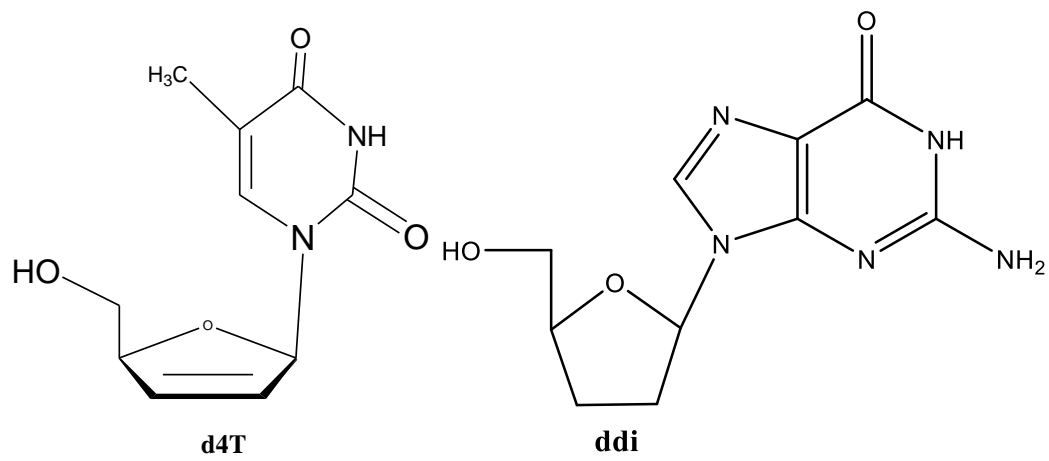
νουκλεοτιδίου ,και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας. Ένα μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων σε σχέση με τα κύτταρα που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιϊκή πολυμεράση, γι' αυτό όσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη είναι και η εκλεκτικότητά τους χαρακτηρίζοντας τους έτσι ως θεραπευτικούς παράγοντες.

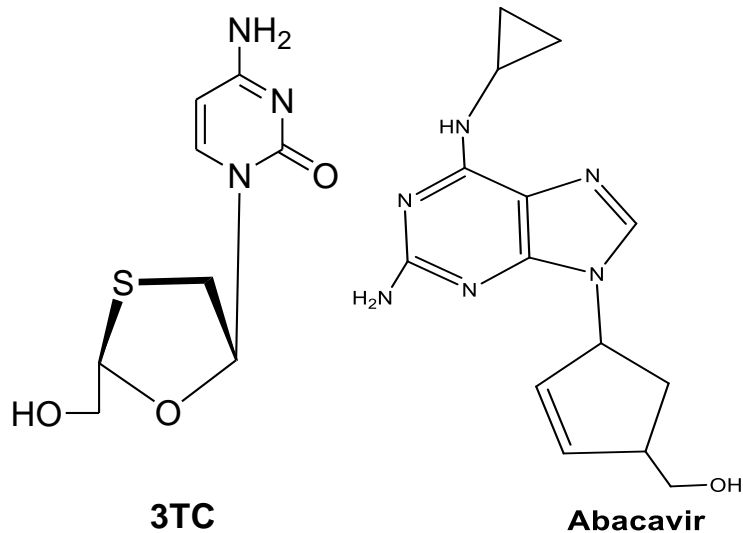
Βέβαια τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της καταστολής αντιαποπτωτικών γονιδίων (Lui *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).

Οι νουκλεοζίτες που δρουν ως αντιβιοτικά είτε καταστρέφουν συγκεκριμένα τμήματα των βακτηρίων, όπως τη μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμά τους, είτε επιδρούν στην σύνθεση των πρωτεϊνών (Sievetal. 1969) και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης (Ahn *et al.* 2000).

1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιϊικοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες μαζί με τα ανάλογά τους παρεμβαλλόμενα στην σύνθεση του DNA και του RNA είναι δυνατό να επηρεάσουν τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών και όχι μόνο τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων . Στην ιατρική πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται εναντίων ιών όπως το ιού που προκαλεί το AIDS (HIV), του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV), των ερπητοϊών (HSV 1-2), του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) και του ιού του έρπητα ζωστήρα (VZV). Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του HIV είναι τα ddC, AZT, ddI, d4T, abacavir και 3TC που δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού . Για τον ιό HBV έχει ήδη εγκριθεί στην Αμερική και χρησιμοποιείται το 3TC συνδιαστικά με ιντερφερόνη-α . Για τον CMV, τον HSV 1 και 2 και τον VZV χρησιμοποιούνται πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα , όπως βιδαραβίνη, ακυκλοβίρη, τριφλουριδίνη, γανσικλοβίρη, βαλακυκλοβίρη και άλλα (GuminaG. *et al.*, 2001).



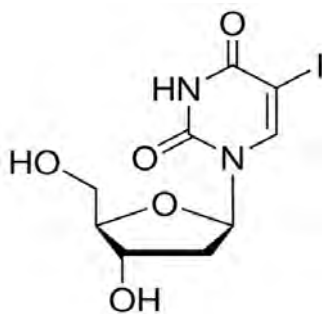


Εικόνα 6: Χημικές δομές των d4T, ddl, AZT, ddC , 3TC, Abacavir.

1.6 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στο σάκχαρο και τη βάση

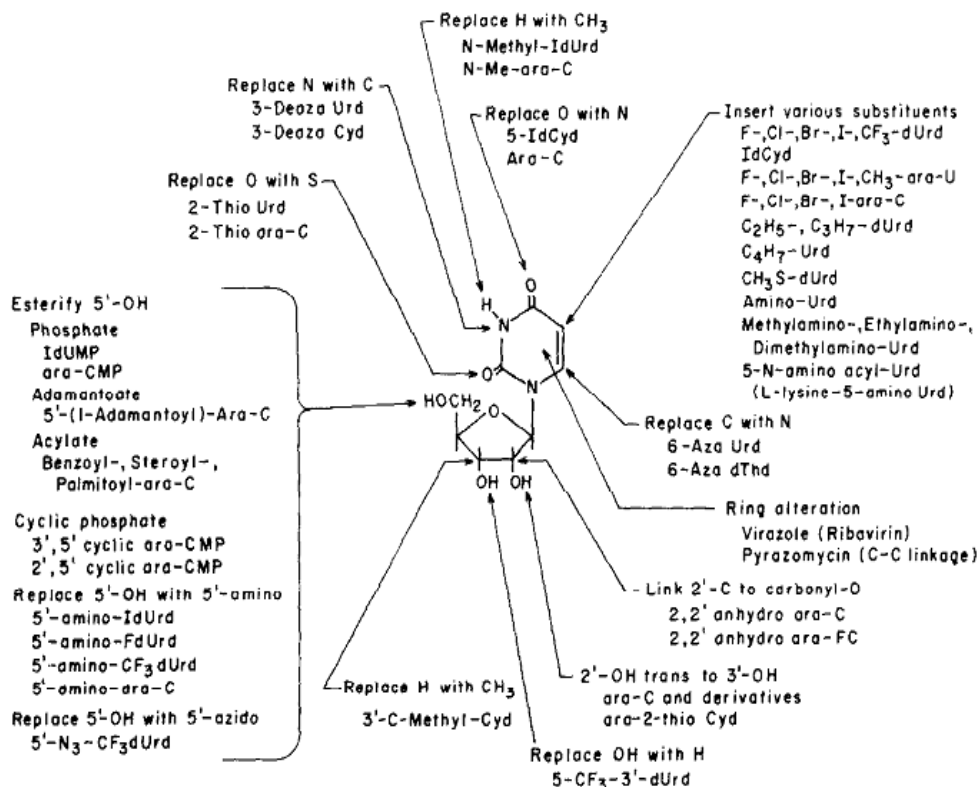
Ο πρώτος νουκλεοζίτης όπου χαρακτηρίστηκε κλινικά αποτελεσματικός και παράλληλα εγκρίθηκε ήταν η 5-ιώδο-2'-δεοξουριδίνη (εικόνα 7) στις αρχές του 1960, όπου η συγκεκριμένη σύνθεση ανήκε σε ένα αντικαρκινικό πρόγραμμα (W. H. Prusoff, 1959).

Εικόνα 7: Χημική δομή της 5-ιώδο-2'-δεοξουριδίνης



Οι Johnsons και John (T. B. Johnson and C. O. Johns, 1905-06) είχαν αναφέρει τη σύνθεση 5'-ιωδοπυριμιδινών το 1905. Το 1945, οι Hitchings*etal.* (G. H. Hitchings*etal.*, 1945) άρχισαν λεπτομερή μελέτη της βιολογικής δράσης διαφόρων παραγόντων της πουρίνης και της πυριμιδίνης. Παρ' όλα αυτά μία ομάδα (R. L. Thompson*etal.*, 1949) ανέλυσε την μέτρια αναστολή από την 5-βρωμουρακίλη, την 5-υδρόξουρακίλη και τη 2,4-διθιοθυμίνη της αντιγραφής του ιού της δαμαλίτιδας σε κυτταρική καλλιέργεια. Οι Visser*etal.* (Visser*etal.*, 1952) έδειξαν ότι διάφορα 5-υποκατεστημένα παράγωγα της ουριδίνης (5-χλώρο, 5-διάζο, 5-φορμαμιδο, 5-υδρόξυ και 5-άμινο) εμπόδισαν τον πολλαπλασιασμό του ιού της εγκεφαλίτιδας του ποντικού Theiler σε καλλιέργεια εγκεφάλου ποντικού.

Οι τύποι τροποποίησης που αποδίδουν νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση παρατηρείται στην εικόνα 8.



Εικόνα 8 : Τύποι τροποποίησης που αποδίδουν νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση.

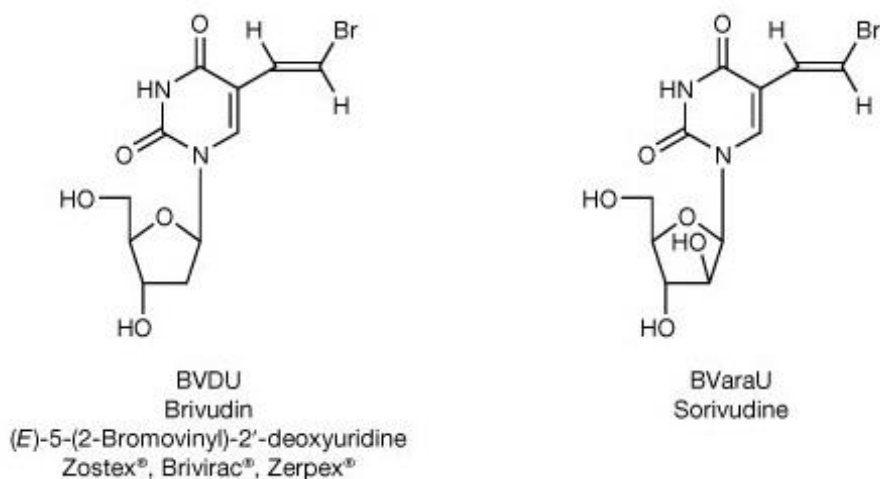
Τα ακόρεστα 5-υποκατεστημένα παράγωγα έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και ειδικά η 5-ΐωδο-2'-δεοξουριδίνη (IdUrd, IUdR, IDU, Ιδοξουριδίνη). Συγκεκριμένα το IdUrd μπορεί να αναπτυχθεί ως ένα νουκλεοτιδικό φάρμακο που θα είναι κλινικά αποτελεσματικό όταν γίνεται μία μόλυνση από έναν ιό. Ο μηχανισμός της αντιϊκής δράσης της IdUrd σχετίζεται με τις δυσμενείς βιολογικές επιπτώσεις της ενσωμάτωσης του αναλόγου της θυμιδίνης σε ιϊκό DNA (W. H. Prusoff and B. Goz., 1975, W. H. Prusoff and B. Goz., 1973). Η ενσωμάτωση της IdUrd στο DNA φυσιολογικών μη μολυσμένων κυττάρων, πιθανόν να προκαλεί τοξικότητα, η οποία έχει βρεθεί κατά τη διάρκεια είτε της τοπικής είτε της συστηματικής θεραπείας. Η συστηματική τοξικότητα είναι δόσοεξαρτώμενη και όταν εισάγεται καθημερινά στον άνθρωπο σε συγκέντρωση περίπου 100mg/kg για 5 ή 6 ημέρες, όμως μπορεί να

παρατηρηθεί στοματίτιδα, λευκοπενία και αλωπεκία (P. Calabresi *et al.*, 1961). Ωστόσο δημιουργούνται και άλλες ανησυχίες όπου ο άνθρωπος δύσκολα τις αξιολογεί, και περιλαμβάνουν την ικανότητα της IdUrd να:

- προκαλέσει τον σχηματισμό ιών σε καλλιέργεια κυττάρων
- αυξήσει το ρυθμό μετάλλαξης των βακτηρίων
- δημιουργήσει χρωμοσωμικές βλάβες
- επηρεάσει την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση (W. H. Prusoff and B. Goz, 1975).

Γι' αυτό, η IdUrd θα μπορούσε να είναι η πρώτη ένωση που παρουσιάζει ξεκάθαρα μια επιτυχημένη θεραπεία μιας καθιερωμένης λοίμωξης από ιό στον άνθρωπο. Το ενδιαφέρον για τους 5-υποκατεστημένους νουκλεοζίτες ως πιθανά αντιϊκά παράγωγα έχει αυξηθεί (Prusoff & Fischer, 1979) μετά τη σύνθεση της 5-ιωδο-2'-δεοξουριδίνης (IDU) από τον Prusoff (Prusoff, 1959). Μεταξύ αυτών, η BVDU [E-5- (2-βρωμοβινυλ) -2'-δεοξουριδίνη] χαρακτηρίζεται ένας από τους πιο ισχυρούς και εκλεκτικούς αναστολείς της αντιγραφής του ιού του έρπη, ιδιαίτερα του ιού απλού έρπη τύπου-1 (HSV-1) (De Clercq *et al.*, 1979). Μεγάλο μέρος του BVDU και σχετικών ενώσεων φαίνεται να οφείλεται στην ικανότητα της HSV-1 κινάσης της θυμιδίνης (TK) να δεχτεί τέτοια ανάλογα ως υποστρώματα, σε αντίθεση με την ανικανότητα του αντίστοιχου ενζύμου ξενιστή (Chen *et al.*, 1981). Ακόμη, η τριφωσφορική BVDU αναστέλλει την HSV-1 DNA πολυμεράση πιο αποτελεσματικά από ό,τι αναστέλλει τις κυτταρικές DNA πολυμεράσες (Allaudeen *et al.*, 1981).

Η IDU χαρακτηρίζεται ως ένας αντι-HSV παράγοντας για τη θεραπεία της ερπητικής κερατίτιδας από τους Kaufman*etal.* [6-9]. Η αποτελεσματικότητα της Ιδοξουριδίνης στη θεραπεία του απλού έρπη του επιθηλίου του κερατοειδούς στον άνθρωπο, μία ασθένεια που αποτελεί την κύρια αιτία τύφλωσης λόγω της μόλυνσης του κερατοειδούς στις ΗΠΑ, έχει αποδειχθεί και εγκριθεί από τον FDA. Επιπλέον μπορεί να χαρακτηριστεί ως το σημείο εκκίνησης για την σύνθεση διαφόρων νέων παραγώγων 5-υποκατεστημένων-2'-δεοξουριδίνης. Το σημαντικότερο παράγωγο αυτής της σειράς είναι η (*E*)-5-(2-βρωμοβίνυλο)-2'-δεοξουριδίνη (Brivudin/BDU), όπου φάνηκε πολύ καλός ειδικός αναστολέας του HSV-1, καθώς επίσης και του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα (VZV) [11,12]. Το ομόλογο του BVDU, η 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-*E*-5-(2-βρωμοβίνυλο)ουρακίλη (BVaraU), βρέθηκε ότι είναι εξίσου ισχυρή, αν όχι και περισσότερο από το BVDU, κατά του ιού VZV



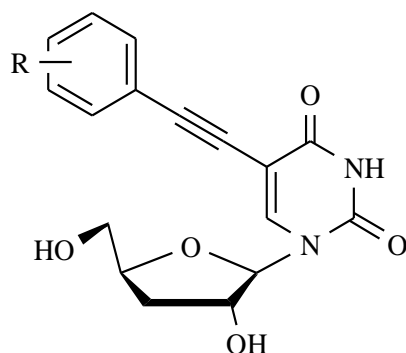
Εικόνα 9: Οι ενώσεις (*E*)-5-(2-βρωμοβίνυλο)-2'-δεοξουριδίνη και BVaraU, με ισχυρή δράση έναντι του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα.

Η BV-araU παρουσιάζει αντιϊκή δράση και έναντι εργαστηριακών στελεχών και απομονωμένων κλινικών προϊόντων όταν δοκιμάζεται σε διάφορους ανθρώπινους ινοβλάστες και σε κυτταρική σειρά ινοβλαστών πιθήκου (Haruhiko M. *etal.* 1991).

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός

Η αναζήτηση καινούριων θεραπευτικών ουσιών, με αυξημένη βιολογική δράση, μειωμένη τοξικότητα και λιγότερες παρενέργειες αλλά και η ραγδαία και συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας οδήγησε στην ανάγκη για μελέτη, σύνθεση και προώθηση στην αγορά, πληθώρας φαρμάκων που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο. Το ανάλογο αυτό στοχεύει στη κάλυψη της αυξανόμενης ανάγκης για φάρμακα με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και λιγότερα ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα από τα μέχρι τώρα κλινικά χρησιμοποιούμενα. Λεπτομερείς μετατροπές έχουν γίνει τόσο στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης όσο και στο τμήμα του σακχάρου για την εύρεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με καλύτερη βιολογική δράση. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, θεωρήθηκε ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα η δημιουργία μιας νέας τάξης φουρανονουκλεοζιτών με διαφορετικούς υποκαταστάτες στην ετεροκυκλική βάση της ιωδοουρακίλη .



Εικόνα 10: Τροποποιημένος στη βάση και στο σάκχαρο φουρανονουκλεοζίτης με υποκαταστάτες: R=2,4,5-CH₃ (a); 3,4,5-OMe (b)

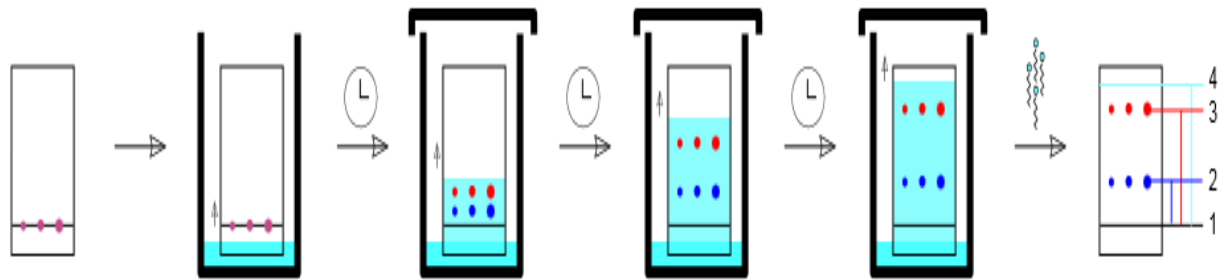
3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Χρωματογραφία Χάρτου (TLC: ThinLayerChromatography)

Οι αντιδράσεις ελέγχονται με χρωματογραφία χάρτου, με πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με silicagelF₂₅₄ (0.2 mm) της εταιρίας E.Merck. Γενικά, τα χρωματογραφήματα εμφανίζονται με ψεκασμό με διάλυμα θεικού οξέος 30%, ενώ άλλοτε οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων (TLC) είναι ορατές υπό λυχνία υπεριώδους (UV).

Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- Διάλυμα Α : οξικός αιθυλεστέρας / μεθανόλη 90/10
- Διάλυμα Β : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 70/30
- Διάλυμα Γ : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 60/40
- Διάλυμα Δ : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Ε : οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 40/60



$$R_f = \frac{\beta}{\alpha}$$

Εικόνα 11 : Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

3.2 Χρωματογραφία στήλης

Η χρωματογραφία στήλης, επιτεύχθηκε με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση σε silicagel 60 (230-400 mesh) της εταιρίας E. Merck και οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω:

- Διάλυμα Α: οξικός αιθυλεστέρας
- Διάλυμα Β: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 50/50
- Διάλυμα Γ: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 40/60
- Διάλυμα Δ: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 30/70



Εικόνα 12 : Χρωματογραφία στήλης.

3.3 Ξήρανση διαλυτών

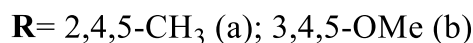
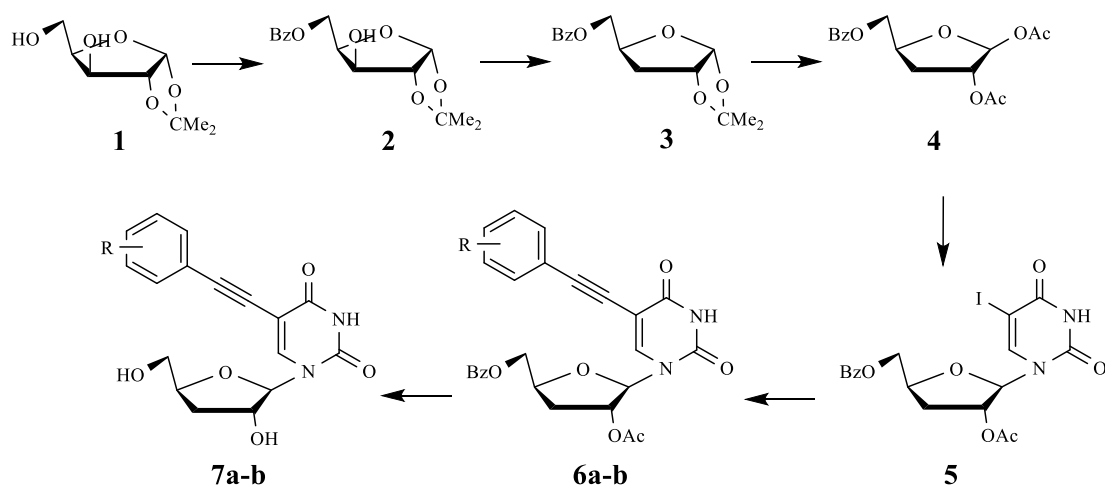
Χρησιμοποιούνται άνυδροι διαλύτες ακετονιτρίλιο (CH_3CN). Η ξήρανση του CH_3CN έγινε παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια έγινε απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA (molecularsieves).

3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (NuclearMagneticResonance). Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με Bruker 500 MHz. Το tetramethylsilan (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς και η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (double), m (multiple). Οι συχνότητες J μετρήθηκαν σε Hz.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1.1 Επισκόπηση της συνθετικής οδού της (7)



4.1.2 Μεθοδολογία της σύνθεσης

Η πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 5-*O*-υδρόξυ-1,2-*O*-ισοπροπυλιδένιο-α-*D*-ξυλοφουρανόζη (**1**), η οποία υπόκειται σε εκλεκτική βενζυλίωση της 5-υδρόξυ ομάδας, όπου διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂) παρουσία τριεθυλαμίνης και βενζολικού χλωριδίου, δίνει τη δευτεροταγή αλκοόλη 5-*O*-βενζόυλο-1,2-*O*-ισοπροπυλιδένιο-α-*D*-ξυλοφουρανόζη (**2**). Η αντίδραση προχωράει με καλή απόδοση 80%. Η ακριβώς επόμενη αντίδραση είναι μία αντίδραση αναγωγής της **2**, η οποία γίνεται σε δυο στάδια. Στο 1^ο στάδιο δημιουργείται ο μέθυλο-οξαλοξικός εστέρας με την παρουσία

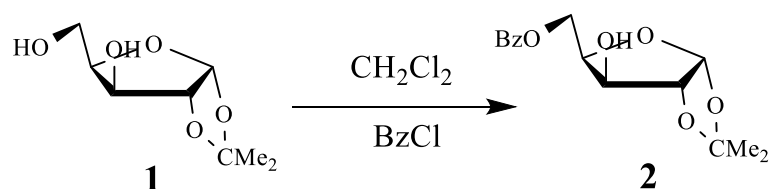
του μεθυλ-οξαλοξικού χλωρίου σε άνυδρο CH_2Cl_2 μετά , με αντίδραση αναγωγής παρουσία υδριδίου του τριβουτυλοκασιτέρου (tri-n-butyltinhydride) σε άνυδρο τολουόλιο παίρνουμε την 1,2-Ο-ισοπροπυλιδένιο-5-Ο-βενζόυλο-3-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανόζη (**3**). Η αντίδραση συνεχίζει με απόδοση 77%.

Η σύνθεση προχωράει με την υδρόλυση του προϊόντος **3** με TFA 90%. Στη συνέχεια, παρουσία οξικού ανυδρίτη (Ac_2O) σε πυριδίνη, γίνεται ακετυλίωση της ένωσης και λαμβάνουμε το επιθυμητό προϊόν 1,2-δι-Ο-ακέτυλ-5-Ο-βενζόυλο-3-Ο-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανόζη **4** με απόδοση 85%. Έπειτα γίνεται σύζευξη με αντίδραση Vorbrüggen [14-17]. Πραγματοποιείται η σύζευξη του σακχάρου **4** με τη βάση 5-ιωδοουρακίλη. Αρχικά , σιλυλιώνεται η βάση σε άνυδρο ακετονιτρίλιο (MeCN), παρουσία εξαμεθυλοδισιλαζανίου (HMDS) αλλά και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης στους 100°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, προστίθεται το σάκχαρο **4** και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορο-μεθανοσουλφονικού-τριμεθυλο-σιλυλεστέρα ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) στους 0°C λαμβάνοντας την επιθυμητή 1-(2'-Ο-ακέτυλ-5'-Ο-βενζόυλο-3'-Ο-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλη (**5**), σε απόδοση 85%. Εν συνεχεία , με αντίδραση Sonogashira [18,19] παίρνουμε τα προστατευμένα προϊόντα **6a-b**. Ένα τυπικό πείραμα Sonogashira είναι το παρακάτω :

Ο φούρανο-νουκλεοζίτης της 5-ιωδοουρακίλης (**5**) διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και με την προσθήκη του κατάλληλου αλκινίου, της τριαιθυλαμίνης (Et_3N), του ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκαταλύτης) και του τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$] (καταλύτης), πραγματοποιήθηκε η σύζευξη τους

υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων ισχύος 200W για 5 λεπτά στους 60°C, σε αποδόσεις 69-74%. Τέλος, η ολοκλήρωση της σύνθεσης γίνεται με την αποπροστασία των προϊόντων **6** σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας τους προστατευμένους νουκλεοζίτες **7a-b**, σε αποδόσεις 91-92%.

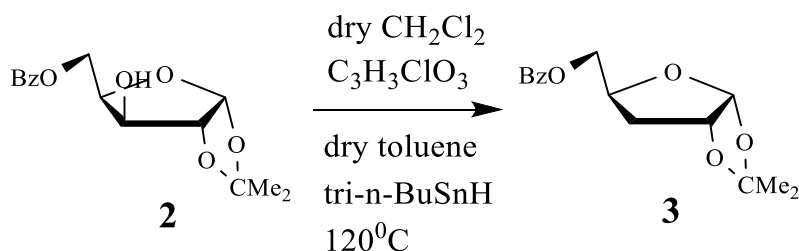
4.2.1. Σύνθεση της 5-Ο-βενζόυλο-1,2-Ο-ισοπροπυλιδένιο-α-D-ξυλοφουρανόζης (**2**)



Η ένωση, 5-Ο-υδρόξυ-1,2-Ο-ισοπροπυλιδένιο-α-D-ξυλοφουρανοζη (**1**) (2 gr, 10,5 mmol) που είναι εμπορικά διαθέσιμη διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο (20 ml) παρουσία χλωριούχου βενζολίου (1 eq), στους 0°C για 30 λεπτά. Στο μείγμα που προέκυψε προστέθηκε H₂O και ακολούθησε εκχύλιση με CH₂Cl₂. Έπειτα, αφού συλλέχθηκε η οργανική φάση, έγινε ξήρανση με άνυδρο Na₂SO₄, διήθηση και συμπύκνωση, το προκύπτον διάλυμα καθαρίστηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 30% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Κατόπιν, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το επιθυμητό προϊόν **2** (2,47 g) ελήφθη υπό τη μορφή ελαίου.

TLC (Διάλυμα A)	R _f = 0,2
Απόδοση	80%

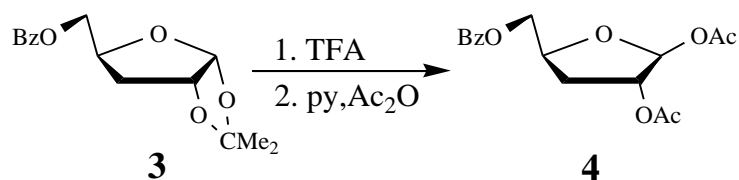
4.2.2. Σύνθεση της 1,2-Ο-ισοπροπυλιδένιο-5-Ο-βενζόυλο-3-δεόξυ-α-D-ριβοφουρανόζης(3)



Για τη δημιουργία της 1,2-Ο-ισοπροπυλιδένιο-5-Ο-βενζόυλο-3-δεόξυ-α-D-ριβοφουρανόζη, προστέθηκε η **(2)** (2 eq, 750 mg, 2,55mmol) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (10 ml) παρουσία μεθυλ-οξαλοξικού χλωρίου. Στη συνέχεια, έγινε εκχύλιση του διαλύματος με CH₂Cl₂ και κορεσμένο διάλυμα NaCl και πρώτα συλλέχθηκε η οργανική φάση και μετά έγινε ξήρανση με άνυδρο Na₂SO₄, διήθηση και τέλος συμπύκνωση. Έπειτα, στο μίγμα προστέθηκε υδρίδιο του τριβουτυλοκασιτέρου (tri-n-butyltinhydride) (2 eq, 783 mg, 2,55 mmol) και άνυδρο τολουόλιο (10 ml) για 1 ώρα. Το προϊόν μεταφέρθηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel) για καθαρισμό χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 20% οξικό αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **3** (545,5 mg) ελήφθη υπό τη μορφή ελαίου.

TLC (Διάλυμα Β)	R _f = 0,6
Απόδοση	77%

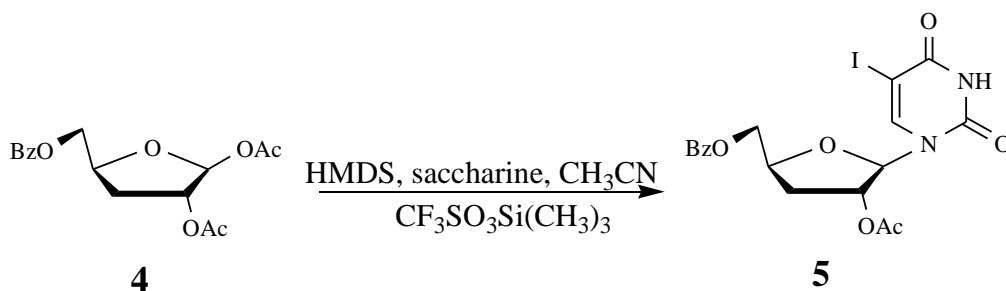
4.2.3. Σύνθεση της 1,2-δι-Ο-ακέτυλ-5-Ο-βενζόυλο-3-Ο-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανόζης (4).



Στην ένωση **3** (270 mg, 0,97 mmol) έγινε ανάδευση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με υδατικό διάλυμα τριφθοροοξικού οξέος (TFA) 90% έτσι ώστε να γίνει διάνοιξη του ισοπροπυλενιδίου. Στη συνέχεια ακολούθησε συμπύκνωση του διαλύματος. Αφού έγινε απομάκρυνση των διαλυτών υπό κενό, προστέθηκε πυριδίνη (1,6 ml) και οξικός ανυδρίτης (0,7 ml) με σκοπό να ακετυλιωθεί η ένωση και να ληφθεί η **4**. Εν συνεχεία το προϊόν συμπυκνώθηκε και καθαρίστηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης 20% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **4** (264,3mg) ελήφθη υπό τη μορφή άχρωμου ελαίου.

TLC (Διάλυμα Β)	R _f = 0,4
Απόδοση	85%

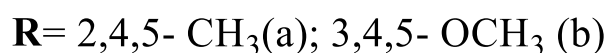
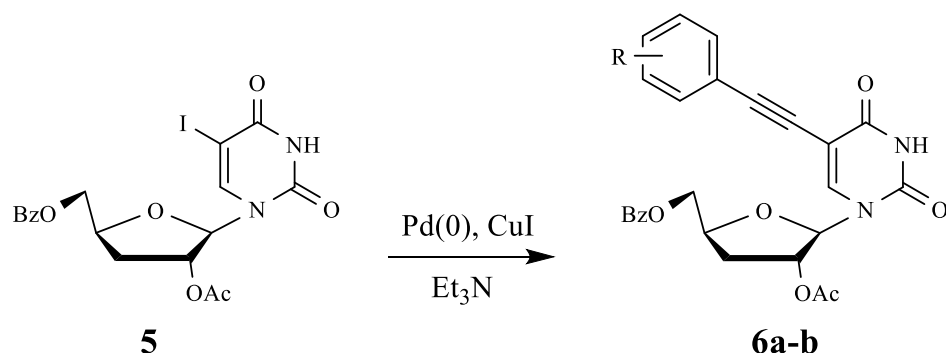
4.2.4. Σύνθεση της 1-(2'-O-ακέτυλ-5-O-βενζούλο-3-C-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλης (5).



Επόμενο στάδιο είναι η σύζευξη με 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 συλλιώση της βάσης ολοκληρώνεται όταν το μίγμα γίνει διαυγές. Από τη στιγμή που το μείγμα έγινε διαυγές, προστέθηκε η 1,2-δι-O-ακέτυλ-5-O-βενζούλο-3-C-δεόξυ-β-D-ριβοφουρανόζη (4) (250 mg, 0,78mmol) αλλά και ο καταλύτης $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (0,20 ml, 1,1 mmol). Η ολοκλήρωση της αντίδρασης έγινε μέσα σε 30 λεπτά με ψύξη στους 0 °C. Έπειτα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 . Στη συνέχεια, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Κατόπιν έγινε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **5** (331,7mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρού.

TLC (Διάλυμα Γ)	$R_f = 0,25$
Απόδοση	85%
$[\alpha]_D^{22}$	-2
λ_{max}	284 nm

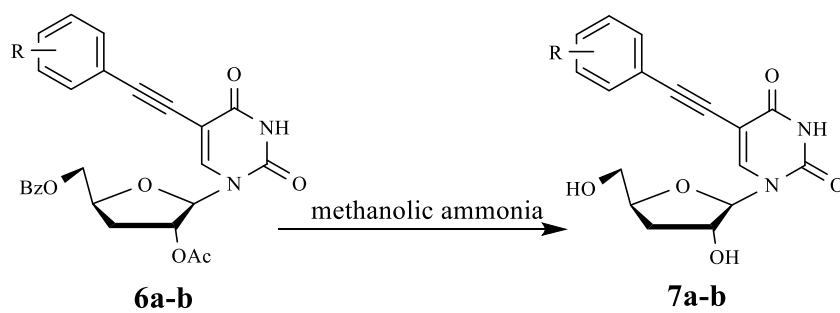
4.2.5. Σύνθεση της (6).



Για τη σύνθεση του **6** χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Sonogashira με μικροκύματα. Το *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και η 1-(2'-*O*-ακέτυλ-5'-*O*-βενζόυλο-3'-*C*-δεόξυ-β-*D*-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλη (**5**) διαλύονται σε 5 ml άνυδρου διαλύτη (0,41mmol, 206mg), 2 eq του κατάλληλου τελικού αλκινίου, τριφαινυλοφωσφορικό παλλάδιο [$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$] (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 έπειτα χρησιμοποιούνται τα μικροκύματα σε συνθήκες 200 Watt, για 5 λεπτά στους 60°C. Για την παραλαβή του προϊόντος γίνεται εκχύλιση του μίγματος της αντίδρασης με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 , παραλαβή της οργανικής φάσης, ξήρανση με άνυδρο Na_2SO_4 και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Στη συνέχεια έγινε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silicagel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Τα επιθυμητά προϊόντα **6a** (138 mg), **6b** (148 mg), ελήφθησαν υπό τη μορφή κίτρινου αφρού με απόδοση 69% και 71%.

	Προϊόν 6a	Προϊόν 6b
TLC (Διάλυμα Γ)	R _f = 0,22	R _f = 0,18
Απόδοση	69%	71%
[α] _D ²²	-22	+16
λ _{max}	292 nm	294 nm

4.2.6. Σύνθεση της (7).



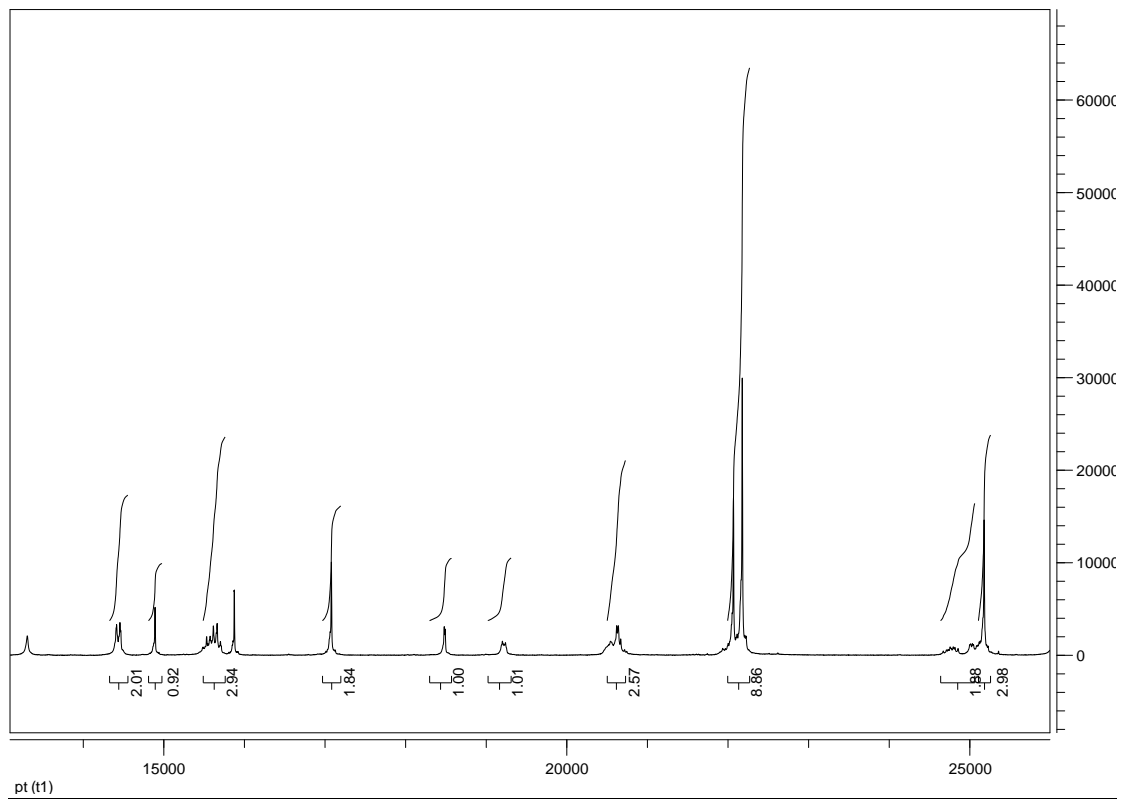
R= 2,4,5-CH₃ (a); 3,4,5-OCH₃(b)

Γίνεται ανάδευση του διαλύματος των προστατευμένων νουκλεοζιτών **6a**(100 mg, 0,2mmol), **6b** (100 mg, 0,2mmol) σε κορεσμένη μεθανολική

αμμωνία (262,5 ml) σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Έπειτα ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες καθαρίζονται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 10% μεθανόλης σε CH₂Cl₂, έτσι παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα **7a** (63,7mg), **7b** (66mg) αντίστοιχα, με μορφή κίτρινου ελαίου.

	Προϊόν 7a	Προϊόν 7b
TLC (Διάλυμα Δ)	R _f = 0,4	R _f =0,37
Απόδοση	92%	91%
[α] _D ²²	-4	+2
λ _{max}	292 nm	294nm

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR - Φάσμα ^1H NMR του προϊόντος 6b



6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όλες οι ερευνητικές μελέτες και προσπάθειες στοχεύουν στην ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα. Αυτή η ανάγκη γεννήθηκε για την καταπολέμηση ιικών μολύνσεων. Τα συγκεκριμένα ανάλογα πρέπει να παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και εκλεκτικότητα όσον αφορά στην δράση τους.

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας ομάδας φουρανονουκλεοζιτών με αντιϊκή δράση. Η διαδικασία του πειράματος ήταν σχετικά απλή, εύκολη, και ο αριθμός των βημάτων μικρός. Οι τελικές αποδόσεις που πήραμε από τη σύνθεση των τελικών φουρανονουκλεοζιτών είναι ικανοποιητικές. Ειδικά, σύνθεση 5-*O*-βενζουλο-1,2-*O*-ισοπροπυλιδενιο- α -*D*-ξυλοφουρανόζη (**2**) με απόδοση 80%, 1,2-*O*-ισοπροπυλιδένιο-5-*O*-βενζούλο-3-δεόξυ- α -*D*-ριβοφουρανόζη (**3**) με απόδοση 77%, 1,2-δι-*O*-ακέτυλ-5-*O*-βενζούλο-3-*C*-δεόξυ- β -*D*-ριβοφουρανόζη (**4**) με απόδοση 85%, 1-(2'-*O*-ακέτυλ-5'-*O*-βενζούλο-3'-*C*-δεόξυ- β -*D*-ριβοφουρανο)5-ιωδοουρακίλη (**5**) με απόδοση 85%, οι ενώσεις 6a-b με ανάλογα της (**6**) όπου R=2,4,5-CH₃ (a); 3,4,5-OCH₃ (b) με αποδόσεις 69%, 71% αντίστοιχα και τέλος, οι ενώσεις 7a-b με ανάλογα της (**7**) όπου R=2,4,5-CH₃ (a); 3,4,5-OCH₃ (b) με αποδόσεις 92%, 91% αντίστοιχα. Όλες οι καινούριες ενώσεις προσδιορίστηκαν από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹HNMR.

Στα νέα μόρια **6a-b** και **7a-b** πραγματοποιήθηκε μελέτη ως προς την αντιϊκή τους δράση έναντι του εντεροϊού Κοξάκι B4 (Coxsackie virus B4) και του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (Respiratory syncytial virus) της

σειράς HeLa. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζεται η ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού των ιικών κυτταρικών σειρών των νεοσυντιθέμενων φουρανονουκλεοζιτών. Τα αποτελέσματα των καινούριων ενώσεων συγκρίνονται με αυτά του αντιϊκού φαρμάκου Ριμπαβιρίνη.

Ένωση	Concentration unit	Minimum cytotoxic concentration ^a	EC ₅₀ ^b	
			Coxsackie virus B4	Respiratory syncytial virus
6a	μM	100	>100	>100
6b	μM	100	8.9	>100
7a	μM	>100	>100	>100
7b	μM	>100	>100	>100
Ribavirin	μM	>250	250	4.5

a: Η συγκέντρωση που απαιτείται για να προκαλέσει μικροσκοπικά ανιχνεύσιμη αλλαγή στη μορφολογία φυσιολογικών κυττάρων.

b: Η συγκέντρωση που απαιτείται για τη μείωση κυτταροπαθογένειας, που προκαλείται από ιούς, κατά 50%.

Ο προστατευόμενος νουκλεοζίτης **6b** είναι δραστικότερος σε σχέση με τον αποπροστατευόμενο. Απο τα αποτελέσματα του πίνακα μπορούμε να καταλάβουμε ότι :

- ✓ Ο **6b** έχει εξαιρετική δράση με ελάχιστη κυτταροτοξική συγκέντρωση στα 100 μM, , καθώς χρειάζονται 8,9 μM της ένωσης για την μείωση κατά 50% καλλιέργειας ιικών κυττάρων Coxsackie B4 .

- ✓ Ο προστατευμένος νουκλεοζίτης **6b** έχει καλύτερη δράση έναντι του αποπροστατευμένου, λόγω της λιποφιλικότητας που είναι αυξημένη. Αυτό συμβαίνει διότι εν γένει τα λιπόφιλα μόρια διαχέονται πιο γρήγορα και πιο εύκολα δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης ,γιατί είναι λιπόδης.
- ✓ Ο αποπροστατευμένος νουκλεοζίτης **7b** έχει λιγότερη δραστικότητα σε σχέση με τον **6b**, διότι υπάρχουν ελεύθερες υδροξυλομάδες στο μόριό του οδηγώντας έτσι σε μειωμένη λιποφιλικότητα.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- *Shigeta S, Yokota T, Iwabuchi T, et al. Comparative efficacy of antiherpes drugs against various strains of varicella-zoster virus. J Infect Dis 1983; 147: 576-584. Medline doi:10.1093/infdis/147.3.576*
- *De Clercq E, Descamps J, De Somer P, Barr PJ, Jones AS, Walker RT. (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. ProcNatlAcadSci U S A 1979; 76: 2947-2951. Medline doi:10.1073/pnas.76.6.2947*
- *De Clercq E, Degreef H, Wildiers J, et al. Oral (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in severe herpes zoster. BMJ 1980; 281: 1178 Medline doi:10.1136/bmj.281.6249.1178*
- *Erik De Clercq, Review: Selective anti-herpesvirus agents, Antiviral Chemistry & Chemotherapy 2013; 23:93-101*
- *Vorbrüggen H., Ruh-Pohlenz C., Handbook of Nucleoside Synthesis, 2001*
- *Vorbruggen, H.; Hofle, G. Nucleoside Syntheses, XXIII On the Mechanism of Nucleoside Synthesis. Chem. Ber., 1981, 114, 1256-1268*
- *Kiritsis C., Manta S., Papatotiriou I., Coutouli-Argyropoulou E., Trakossas S., Balzarini J. and Komiotis D., Synthesis and Biological Evaluation of 3'-C-Ethynyl and 3'-C -(1,4- disubstituted-1,2,3-triazolo) Double-Headed Pyranonucleosides, Medicinal Chemistry, 2012, 8, 000-000*
- *G Michael Blackburn, Michael J Gait, David Loakes, David M Williams, Nucleic Acids in Chemistry and Biology: Edition 3, RSC Publishing, 2006, p.82*
- *Majid M. Heravi, SodehSadjadi, Recent advances in the application of the Sonogashira method in the synthesis of heterocyclic compounds, Tetrahedron,2009, 65 (37), 7761-7775*

- *Jason Tierney, PelleLidström, Microwave Assisted Organic Synthesis, Blackwell Publishing CRC Press, 2005, 31-32*
- *Haruhiko MACHIDA, Makiko NISHITANI, Tatsuo SUZUTANI, and Kozaburo HAYASHI, Different Antiviral Potencies of BV-araU and Related Nucleoside Analogues against Herpes Simplex Virus Type 1 in Human Cell Lines and Vero Cells, Microbiol. Immunol, Vol. 35 (11), 963-973, 1991*
- *McMurry. Οργανική Χημεία, τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 1245, 905.*
- *Morisson & Boyd Οργανική Χημεία, τόμος III Γραφείο Εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων 1331, p. 758.*
- *Berg, J. M., TymoczkoJ. L., StryerL, Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2001 (p) 329-351.*
- *Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1997: 4, 26*
- *William H. Prusoff and David C. Ward,, Commentary, Nucleoside analogs with antiviral activity, Biochemical Pharmacology, 1976:25, 1233-1239*
- *Kaufman HE. Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5-iodo-2'-deoxyuridine. ProcSocExpBiol Med 1962; 109: 251-252. Medline doi:10.3181/00379727-109-27169*
- *Kaufman HE, Nesburn AB, Maloney ED. IDU therapy of herpes simplex. Arch Ophthalmol 1962; 67: 583-591. Medline doi:10.1001/archopht.1962.00960020583012*
- *Kaufman HE, Martola E-L, Dohlman C. Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in treatment of herpes simplex keratitis. Arch Ophthalmol1962; 68: 235-239. Medline doi:10.1001/archopht.1962.00960030239015*

- Kaufman HE, Heidelberger C. Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridine in herpes simplex keratitis. *Science* 1964; 145: 585-586. Medline doi:10.1126/science.145.3632.585
- P.E Came and L.A. Caliguiri, *Chemotherapy and Viral Infections*, Springer Science & Business Media, 2012, 98-100
- C McGuigan, A Brancale1, H Barucki, S Srinivasan, G Jones, R Pathirana, A Carangio, SBlewett, G Luoni , O Bidet, A Jukes, C Jarvis, G Andrei , R Snoeck, E De Clercq and J Balzarini, Review Furanopyrimidines as novel potent and selective anti-VZV agents, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, **2001**, 12, 77-89
- Bertina B. Wentworth and EE. Russel Alexander, Isolation of *Chlamydia trachomatis* by Use of 5-Iodo-2-Deoxyuridine-Treated Cells, *Applied Microbiology*, **1974**, 27(8), 912-916
- Komiotis D., Manta S., Tsoukala E. and Tzioumaki N., Antiviral Unsaturated Nucleosides, *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, **2008**, 7, 219-244
- Jason E. Hein and Valery V. Fokin. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. *Chem. Soc. Rev.*, 2010,39: 1302-1315
- <http://chemistry.tutorvista.com>. Chromatography Sept **2012**
- C.L.F. Meyers, D.J. Meyers. Thin-Layer Chromatography. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. **2008**, DOI: 10.1002/0471142700.nca03ds34
- Hayflick L., Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry*. 1997, 62: 1180-1190
- Hanahan D. and Folkman J., Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996, 86: 353-364

- Vander, M. D. Sherman, Ph. D. Luciano, Ph. D. M. Tsakoulos, *Φυσιολογία του ανθρώπου, μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού.*
- Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* **1995**, 67, 155.
- Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* **2000**, 20, 417.
- Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* **2000**, 39, 12757-12765.
- Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 3154-3163
- Lewin, B. *Genes* **2003**, VIII, 6.
- Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, **2005**, 4, 4.
- 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.
- Balatsos, N.A.A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis, D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* **2009**, 48, 6044-6051.
- Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 47, 365.
- Pontikis, R.; Wolf, J.; Monneret, C.; Florent, J. -C. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 3523.
- Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* **1991**, 51, 2319.
- 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.

- Fett, J. W., J. L. Bethune, et al. (1987). "Induction of angiogenesis by mixtures of two angiogenic proteins, angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorioallantoic membrane." *BiochemBiophys Res Commun* 146(3): 1122-1131.
- Leonidas, D. D., G. B. Chavali, et al. High-resolution crystal structures of ribonucleaseA complexed with adenylic and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors. *Protein Sci.* **2003**, 12(11): 2559-2574.
- Stimac, A; Kobe, J. An improved preparation of 2,3,5-tri-O-acyl- β -D-ribofuranosylazides by the Lewis acid-catalyzed reaction of β -D-ribofuranosyl acetates and trimethylsilylazide- An example of concomitant formation of the α anomer by trimethylsilyltriflate catalysis. *Carbohydrate Research*, 232: 359-365.
- Menzies, I.S. and Seakins, J.W.T. (1976) Paper and Thin Layer Chromatography. *Chromatography and electrophoretic Technics, Vol.1* (Smith, I. And Seakins, J.W.T. eds.), William Heinemann Medical books Ltd., 183.
- AN R. Van Rompay, AmeliNorda, Karin Lind En, Magnus Johansson, and Anna Karlsson. Phosphorylation of Uridine and Cytidine Nucleoside Analogs by Two Human Uridine-Cytidine Kinases. *MolPharmacol.* 2001, 59:1181–1186
- Jason M. Walsh, Penny J. Beuning. Synthetic Nucleotides as Probes of DNA Polymerase Specificity. *Journal of Nucleic Acids.* vol. 2012, Article ID 530963, 17 pages, **2012**. doi:10.1155/2012/530963
- Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43, 420-428.
- Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevsek, A.; Pamulapati, R.T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 2696.
- Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J.M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis D.; Leonidas, D. D. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, 18, 3413–3425.

- Fokin, V. V. *ACS Chem. Biol.*, **2007**, 2, 775–778.
- Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 1249–1262.
- Johnson, J. A.; Koberstein, J. T.; Finn M. G.; Turro, N. J. *Macromol. Rapid Commun.*, **2008**, 29, 1052–1072.
- Huisgen, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1963**, 2, 565–598.
- A. C. Tomé, in *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations*, ed. Storr, R. C.; Gilchrist, T. L. Thieme, Stuttgart, **2004**, vol. 13: *Five-Membered Heteroarenes with three or More Heteroatoms*, pp. 415–601;
- Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. J. *Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 15998–15999.
- Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin V. V.; Van der Eycken, E. *Org. Lett.*, **2004**, 6, 4223–4225.
- Seela, F.; Sirivolu, V. R. *Chem. Biodiversity*, **2006**, 3, 509–514.
- F. Seela, F.; Sirivolu, V. R. *Helv. Chim. Acta*, **2007**, 90, 535–552.
- Seela, F.; Sirivolu, V. R. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **2007**, 26, 597–601.
- Seela, F.; Sirivolu, V. R.; Chittepu, P. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 211–224.
- Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless K. B.; V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 210–216.
- Urien, M.; Erothu, H.; Cloutet, E.; Hiorns, R. C.; Vignau, L. ; Cramail, H. *Macromolecules*, **2008**, 41, 7033–7040.

