



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

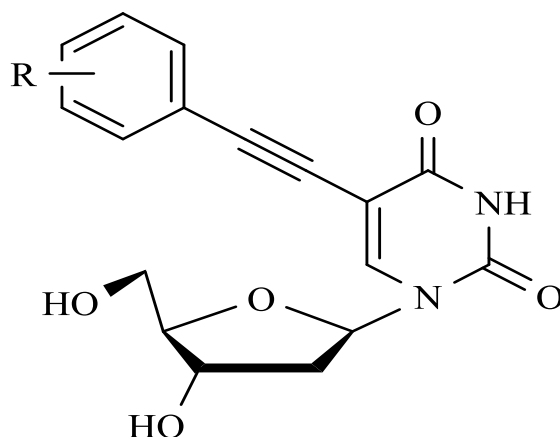
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΑΝΔΡΕΑ ΠΕΛΑΓΙΑ

Διπλωματική Εργασία

**Νέοι C5-άρυλ υποκατεστημένοι 2-δέοξυ-φουρανουκλεοζίτες ως εν
δυνάμει κυτταροτοξικοί και αντιϊικοί παράγοντες.**



ΛΑΡΙΣΑ, 2018

Διπλωματική Εργασία

"Νέοι C5- άρυλ υποκατεστημένοι 2-δέοξυ-φουρανουκλεοζίτες ως εν δυνάμει κυτταροτοξικοί και αντιϊικοί παράγοντες."

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κομιώτης 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.

Αμούτζιας Γρηγόριος— Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή 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 εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κολλάτο Νικόλαο για την άψογη συνεργασία, υπομονή, βοήθεια και τις πολύτιμες υποδείξεις του κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων στο εργαστήριο Βιο-οργανικής Χημείας.

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Υδατάνθρακες.....	8
1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών : σχηματισμός ημιακετάλης.....	8
1.3 Νουκλεοζίτες.....	13
1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών.....	14
1.5 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.....	17
1.6 Νουκλεοζίτες ως αντιαπνευστικοί παράγοντες.....	19
1.7 Συμπεράσματα.....	21
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
2.1 Σκοπός.....	22
3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (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 Μεθοδολογία της σύνθεσης.....	26
4.2 Σύνθεση της 1-(3',5'-δι-Ο-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη) -5-ιοδοουρακίλης(2).....	27
4.3 Σύνθεση των (3).....	28
4.4 Σύνθεση των (4).....	29
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ 1H NMR - Φάσμα 1H NMR του προϊόντος 3α	30
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	32
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	34

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υδατάνθρακες απαντούν σε κάθε ζωντανό οργανισμό 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 άλλοι χρησιμοποιούνται ως φάρμακα.

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

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση νέων τροποποιημένων στη βάση και στο σάκχαρο φουρανονουκλεοζιτών, ως νέοι αντιϊκοί παράγοντες. Αναλύονται οι συνθετικές οδοί που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή τους, η μέθοδος και τα αποτελέσματα ταυτοποίησής τους, καθώς και η βιολογική τους αποτίμηση.

ABSTRACT

Carbohydrates found in every living organism and refer to a broad category of poly-hydroxylated aldehydes and ketones, which are commonly known as sugars. Modified carbohydrates are part of the cells' outer layer, others are found in DNA molecules carrying genetic information, while others are used as medicines.

A large number of nucleoside analogs act as antimetabolites, natural nucleosides compete and interact with intracellular targets. Others incorporated during replication or repair of DNA, leading to the termination of the composition process while others function as polymerase inhibitors.

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

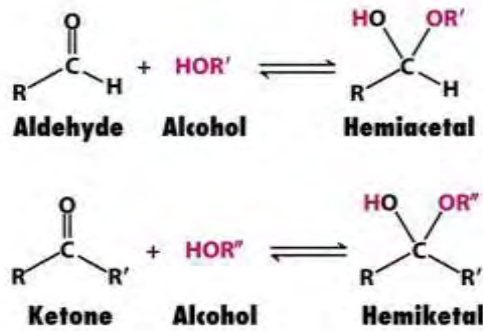
Πρέπει να αναφέρουμε ότι δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός μεταξύ ενός μεγάλου ολιγοσακχαρίτη και ενός μικρού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτη, αφού αυτοί οι όροι στην πραγματικότητα χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν ενώσεις, των οποίων το μοριακό βάρος παρουσιάζει ένα ευρύ πεδίο τιμών.

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

1.2.Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών : σχηματισμός ημιακετάλης

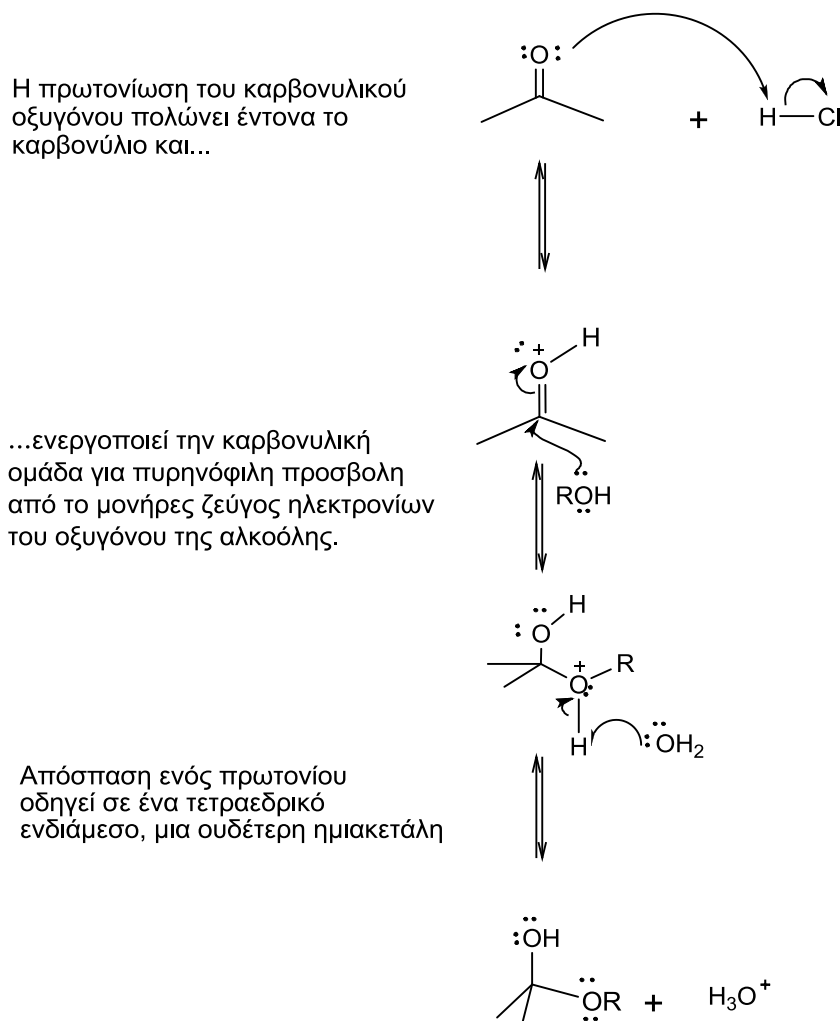
Μια ημιακετάλη σχηματίζεται κατά την προσθήκη του πυρηνόφιλου μορίου της αλκοόλης στην καρβονυλική ομάδα, αυτή είναι και τα δύο, ένας αιθέρας και μία αλκοόλη. Οι ημιακετάλες είναι ασταθείς ενώσεις(Morisson&Boyd, 1991, p. 758).

Hemiacetal formation



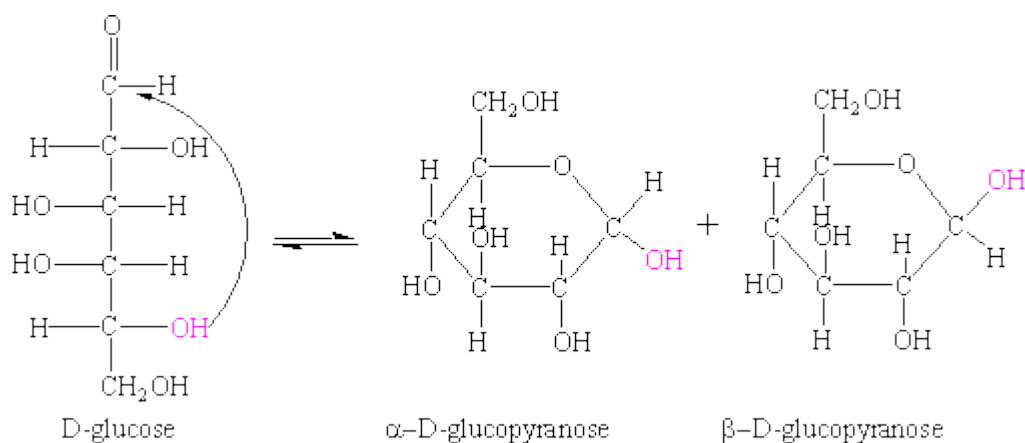
Σχήμα 1 : Σχηματισμός ημιακετάλης

Ο μηχανισμός της αντίδρασης φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 2 (McMurry, 2000, p. 905):

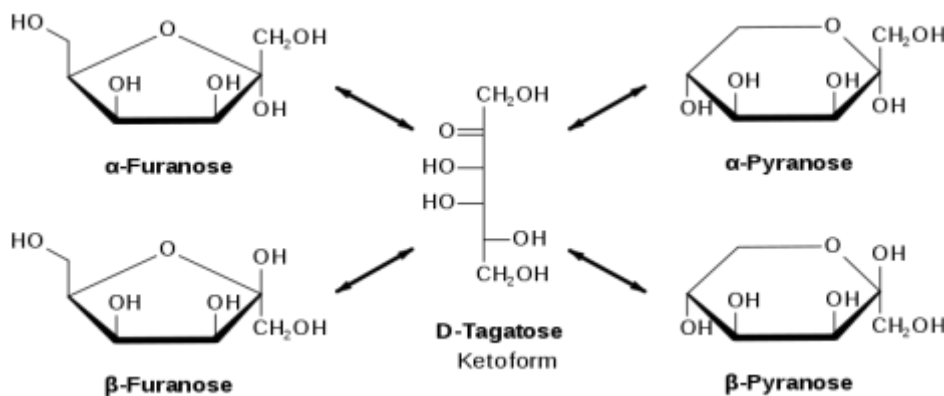


Σχήμα 2: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού ημιακετάλης

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



Σχήμα 3 : Σχηματισμός γλυκοπυρανόζης



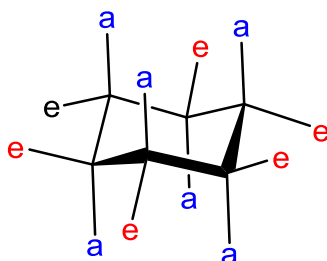
Σχήμα 4: Σχηματισμός φουρανόζης

Με την κυκλοποίηση της ανοικτής αλυσίδας, ένας μονοσακχαρίτης αποκτά τη δομή της φουρανόζης ή της πυρανόζης, όπου σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Τα δύο νέα διαστερομερή ονομάζονται ανωμερή και ο ημιακεταλικός άνθρακας ανωμερικό κέντρο (McMurry, 2000, p. 1249). Για παράδειγμα, στη γλυκόζη με την αντιστρεπτή της κυκλοποίηση προκύπτουν δύο δομές, η α-D-γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη (σχήμα 3). Στην περίπτωση της α-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «α» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση trans ως προς τον υποκαταστάτη –CH₂OH του C-5 (δηλαδή βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου). Στην περίπτωση της β-D-γλυκοπυρανόζης, ο χαρακτηρισμός «β» υποδηλώνει ότι το υδροξύλιο που συνδέεται στον C-1 βρίσκεται σε θέση cis ως προς τον υποκαταστάτη –CH₂OH του C-5 (δηλαδή βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου).

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

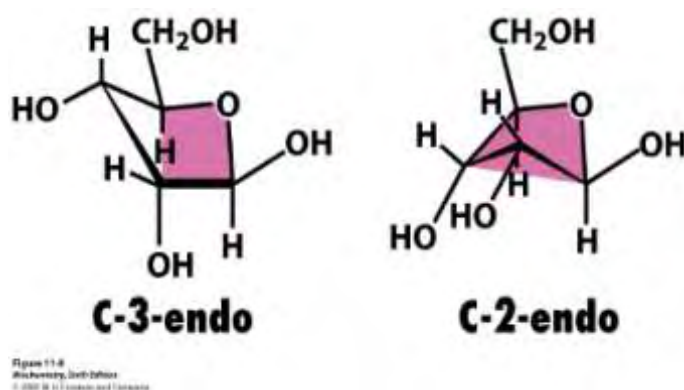
Οι προηγούμενες δομές (Haworth) αν και εύχρηστες δεν μας παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης. Ο συγκεκριμένος δακτύλιος δεν είναι δυνατόν να είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα. Αντίθετα, οι δακτύλιοι της πυρανόζης μπορούν να υιοθετήσουν στερεοδιατάξεις ανάκλιντρου, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι τάσεις, εφόσον όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνιάς (McMurry, 2000, p. 151). Οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου είναι δύο ειδών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί (σχήμα 5). Οι αξονικοί δεσμοί είναι σχεδόν κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί δεσμοί είναι σχεδόν παράλληλοι προς το επίπεδο αυτό. Οι αξονικοί υποκαταστάτες προβάλλουν πάνω και κάτω από το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί υποκαταστάτες διατάσσονται στην περιφέρεια. Οι αξονικοί υποκαταστάτες, εκτός του υδρογόνου, παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλο, αν ξεπροβάλουν από την ίδια

πλευρά του δακτυλίου. Αντίθετα, υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για τους ισημερινούς υποκαταστάτες. Έτσι, ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ό τι στην αξονική θέση.



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

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



Σχήμα 6: Μορφή φακέλου της β-D-ριβόζης

1.3.Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς της φύσης, καθώς αποτελούν δομικά στοιχεία του DNA και του RNA. Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης δεσμευμένης σε ένα σάκχαρο. Οι τέσσερις νουκλεοζιτικές μονάδες του DNA λέγονται δεοξαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυθυμιδίνη και δεοξυκυτιδίνη. Αναλόγως αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, τότε γίνεται λόγος για ριβονουκλεοζίτη και δεοξυριβονουκλεοζίτη αντίστοιχα. Σε ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο το άτομο C-1 της δεοξυριβόζης δεσμεύεται στο N-1 μιας πυριμιδίνης ή στο N-9 μιας πουρίνης. Η διαμόρφωση αυτού του νουκλεοζιτικού δεσμού είναι μορφής β, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Stryer, 1995).

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, λόγω των αντικαρκινικών, αντιϊικών, αντιβακτηριδιακών, καθώς και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους (Zhou *et al.* 2004, Perigaud *et al.* 1992, Robin *et al.* 1990, MacCosset *et al.* 1990). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να πραγματοποιηθούν πολλές τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα της βάσης όσο και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών, με σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων.

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

βιοσύνθεση των ενζύμων και των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τις φυσιολογικές λειτουργίες του.

1.4. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

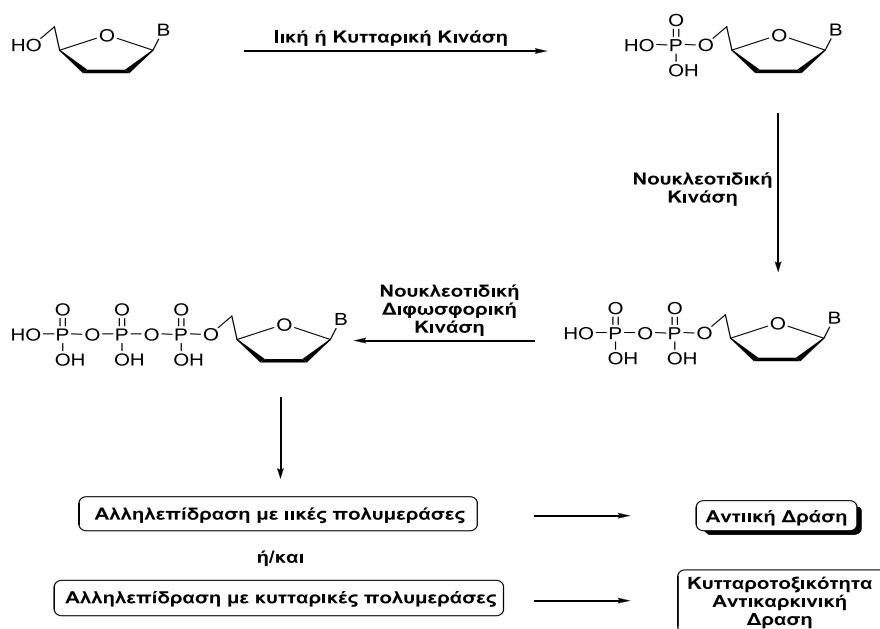
Η σύνθεση των φυσικών νουκλεοζιτών πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά και υπάρχει και η δυνατότητα να εισέλθουν στα κύτταρα με παθητική διάχυση, όπως επίσης και μέσω πρωτεϊνών μεταφορέων νουκλεοζιτών, ιδιότητες τις οποίες εκμεταλλευόμαστε στην χρήση νουκλεοζιτικών αναλόγων ως αντικαρκινικά και αντιικά φάρμακα.

Όλες οι φαρμακευτικές ουσίες ασκούν την δράση τους αλληλεπιδρώντας με κάποιο μοριακό στόχο με το να μεταβάλλουν την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και κατ' επέκταση του οργανισμού. Έτσι πρώτα από όλα το φάρμακο πρέπει να μπορεί να έρθει σε επαφή με το μοριακό του στόχο. Οι μοριακοί στόχοι των φαρμάκων ποικίλουν και μπορεί να είναι υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων, διάλυτοι ιόντων, μόρια μεταφορείς, ένζυμα, πυρηνικοί υποδοχείς και πολλοί άλλοι. Σε μια περίπτωση που ο μοριακός στόχος του φαρμάκου είναι ενδοκυτταρικός, το φάρμακο πρέπει πρώτα να μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου ώστε να είναι δραστικό. Ένα ακόμα σημαντικό κριτήριο επιλογής ενός φαρμακευτικού μορίου είναι η εκλεκτικότητά του όσον αφορά τον μοριακό στόχο, η ικανότητα δηλαδή να αλληλεπιδρά κυρίως με τον μοριακό στόχο του οποίου την λειτουργία θέλουμε να τροποποιήσουμε και με όσο το δυνατόν μικρότερη αλληλεπίδραση με άλλα μόρια του κυττάρου ώστε να αποφευχθεί πιθανή παρεμβολή σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου και η πιθανή τοξικότητα που μπορεί να προκύψει από αυτές.

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών αποτελούν στην πραγματικότητα ανενεργά προφάρμακα, τα οποία ενδοκυτταρικά πρέπει να τροποποιηθούν ώστε να μπορέσουν να δράσουν διατηρώντας τα χαρακτηριστικά των φυσικών αρχικών μορίων, αλλά θα πρέπει να είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε, όταν εισέλθουν στο κύτταρο και μεταβολιστούν, να είναι ικανά να παρέμβουν στην σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και να ασκήσουν κυτταροστατική

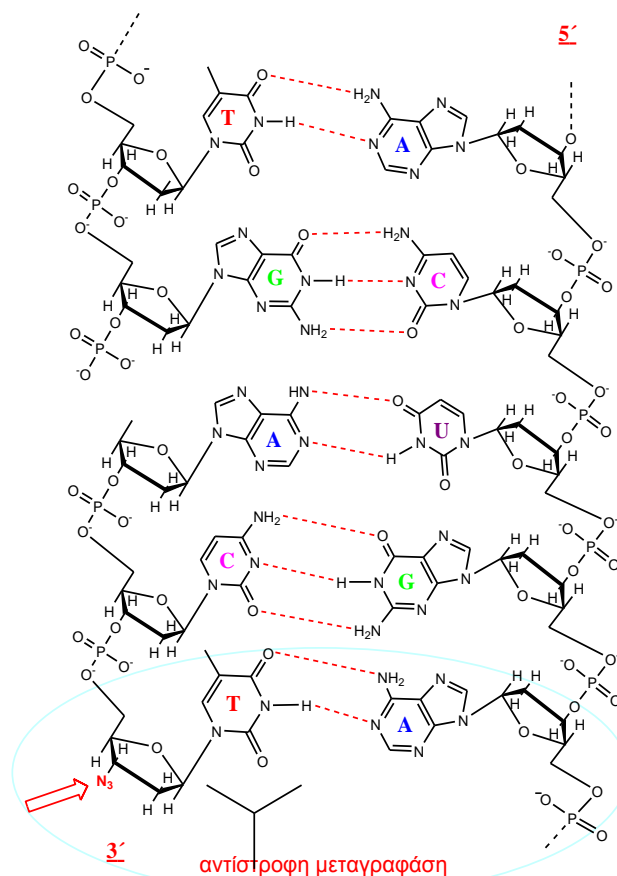
και αντιική δράση. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται χάρη στη φωσφορυλίωσή τους από κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες.

Αφού ολοκληρωθεί η φωσφορυλίωση τους προς τις τριφωσφορικές τους δομές από κυτταρικά ή ιϊκά ένζυμα, εμποδίζουν οι δομές αυτές άμεσα ή έμμεσα τον κυτταρικό ή ιϊκό διπλασιασμό, ή ακόμη και τον αναδιπλασιασμό του DNA. Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωσή τους στο ιϊκό γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει διακοπή της αντιγραφής του ιϊκού γονιδιώματος, καθιστώντας το μη λειτουργικό και κατά συνέπεια καταστέλωντας την αντιγραφή του ιού και την περαιτέρω παραγωγή ιϊκών σωματιδίων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του γονιδιώματος του ιού είναι συντηρημένος σε πολλά είδη ιών, τα νουκλεοζιδικά ανάλογα μπορούν να παρουσιάσουν δράση έναντι μεγάλου φάσματος ιών. Αξίζει να σημειωθεί πως μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιδικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιδικού αναλόγου με την ιϊκή πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητα τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.



Σχήμα 7:Φωσφορυλίωση νουκλεοζιδικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες

→ Ένας κοινός μηχανισμός αντιϊικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιδίων είναι η ενσωμάτωσή τους στην επιμήκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της. Οι κυτταρικές πολυμεράσες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου και ταυτόχρονα απελευθερώνεται μια πυροφωσφορική ομάδα και δημιουργείται φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ των νουκλεοτιδίων. Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, τότε δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου και έτσι παρεμποδίζεται και τερματίζει η επιμήκυνση της αλυσίδας. Μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιϊκή πολυμεράση.



Σχήμα 8

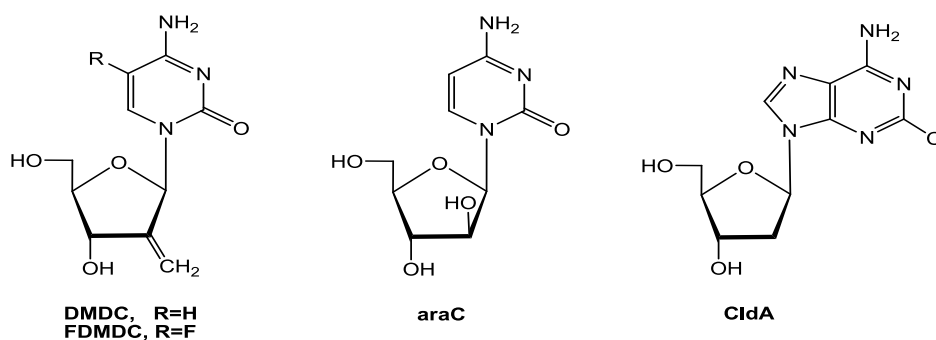
Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών, οι οποίοι δρουν ως αντιβιοτικά, βασίζεται είτε στο ότι καταστρέφουν συγκεκριμένα τμήματα των βακτηρίων (όπως τη μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμά τους) είτε στο ότι επιδρούν στην σύνθεση των πρωτεϊνών και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης.

1.5.Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

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

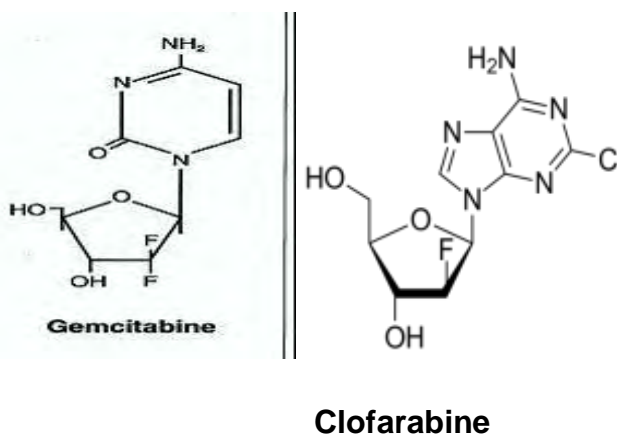
Τα τελευταία χρόνια τα περισσότερα ερευνητικά προγράμματα εστιάζουν στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία χαρακτηρίζονται από αυξημένη δραστικότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες χρησιμοποιούνται ευρέως στην φαρμακευτική αντιμετώπιση πολλών μορφών νεοπλασιών, η οποία στοχεύει στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊνικών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC), 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πεντοφουρανοζυλο)5-φθοροκυτοσίνη (FDMDC), 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC) και 2-χλωρο-2'-

δεσοξαδενοσίνη (CldA) (σχήμα 9) έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών, όπως διάφοροι τύποι λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Coryetal. 1994, Pontikiset al.1995, Yamagamieta. 1991, Linetal.1991, Bakeretal. 1991, MatsudaandSasaki 2004). Νεότερες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Luietal. 2010, Bhatetal. 2010).



Σχήμα 9

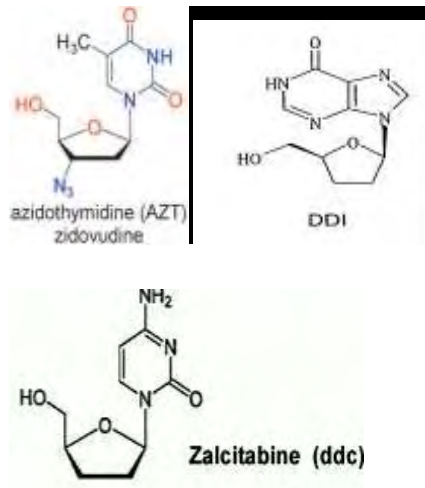
Ορόσημο στη μελέτη των φθορονουκλεοζιτών αποτελεί η ανακάλυψη της 2'-δεοξυ-2',2'-διφθοροκυτιδίνης [gemcitabine (γεμισιταμπίνη), dFdC] (Plunkettetal.1995) (Σχήμα 10), η οποία αποτελεί σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα κακοήθων όγκων, όπως είναι του παγκρέατος. Η γεμισιταμπίνη δρα ως ανασταλτικός παράγοντας στη σύνθεση του DNA, μέσω ανταγωνιστικής ενσωμάτωσης στη νεοσυντιθέμενη κάθε φορά αλυσίδα.



Σχήμα 10

1.6.Νουκλεοζίτες ως αντιϊικοί παράγοντες

Τα πιο σημαντικά παραδείγματα από τα νουκλεοζιτικά αυτά ανάλογα είναι το zidovudine (AZT), το didanosine (DDI) και το zalcitabine (DDC), τα οποία χρησιμοποιούνται κλινικά, ως φάρμακα ενάντια στον ιό HIV (σχήμα 11).

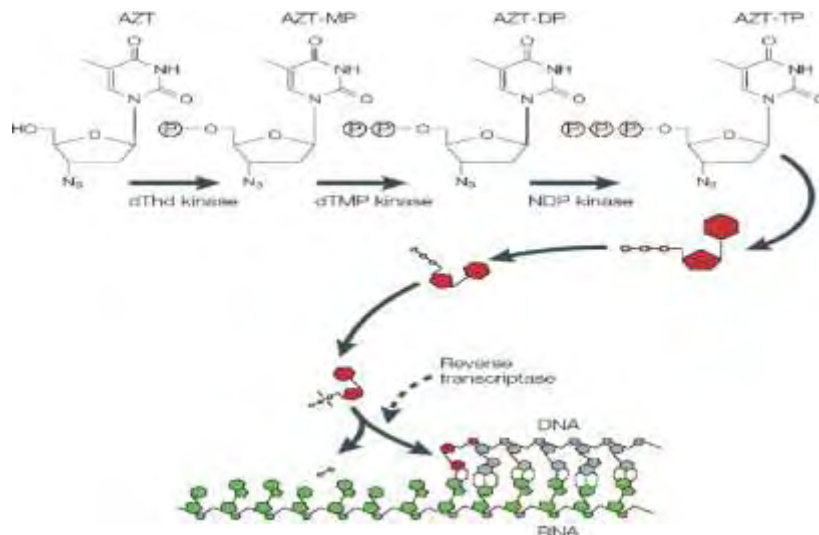


Σχήμα 11. Χημικές δομές των AZT, ddi, ddC

Πρόκειται για 2',3'-διδεοξυνουκλεοζίτες που προκύπτουν από την απομάκρυνση των υδροξυλομάδων από τις 2',3'-θέσεις του δακτυλίου της ριβόζης. Έχουν ανασταλτική δράση απέναντι στην αντίστροφη μεταγραφάση (Hiroyukietal. 2004). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το ένζυμο που χρησιμοποιεί ο ιός για να συνθέσει το νέο DNA με μήτρα το ιικό RNA. Αυτό το ένζυμο συνθέτει μια αλυσίδα DNA συμπληρωματική με το RNA, ενώ ταυτόχρονα τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αναστέλλουν τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή του ιικού DNA.

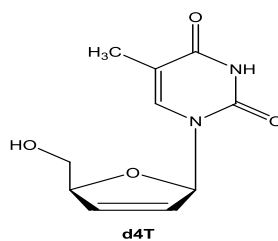
Το AZT (3'-αζιδο-2'-δεοξυθυμιδίνη) ήταν το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία του AIDS (www.virology.ws/2009/12/08/azt-inhibits-xmrv/).

Φωσφορυλιώνεται από τα κυτταρικά ένζυμα στην ενεργή του μορφή και δρα ως αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης τερματίζοντας την αλυσίδα όταν αυτή συνδεθεί στο DNA (σχήμα 12). Επειδή έχει την αζιδο- ομάδα αντί για την υδροξυλομάδα, η επόμενη βάση δεν μπορεί να ενωθεί και η σύνθεση της αλυσίδας σταματά.



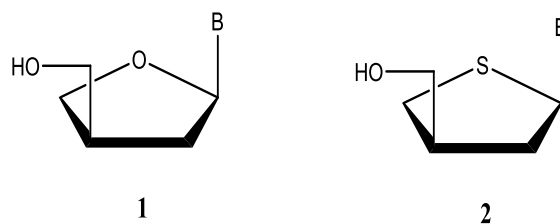
Σχήμα 12. Τερματισμός της αλυσίδας του ιικού DNA από το φωσφορυλιωμένο AZT

Το συνθετικό ενδιαφέρον στράφηκε επίσης στους 2',3'-ακόρεστους νουκλεοζίτες, όπου η 3'-δεοξυ-2',3'-διδεϋδροθυμιδίνη (d4T) δρα επίσης σαν αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης στην θεραπεία κατά του AIDS (Brossetteetal. 2001). Η χημική δομή του d4T απεικονίζεται στο σχήμα 13.



Σχήμα 13. Χημική δομή της D4T

Πρέπει να αναφερθεί ότι στην κατηγορία των αντιικών ενώσεων συναντάμε και μη κλασικές κατηγορίες νουκλεοζιτών. Μια τέτοια ομάδα είναι οι απιο-διδεοξυνουκλεοζίτες 1, όπου η 4'-υδροξυμεθυλο ομάδα έχει μετατοπιστεί στον C-3' (Moonetal. 2002). Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν αντιική δράση, ενώ αντικαθιστώντας την θέση του οξυγόνου με ένα άτομο θείου, σχηματίζονται αντίστοιχα οιθιο- απιο- διδεοξυνουκλεοζίτες 2 (σχήμα 14).



Σχήμα 14

1.7 Συμπεράσματα

Το συμπέρασμα είναι ότι υπάρχει ανάγκη για αντιϊικά παράγωγα με σημαντικά μικρότερη τοξικότητα. Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά τέτοιων αντιϊκών φαρμάκων πρέπει να είναι τα εξής: 1) ευκολία παρασκευής (χαμηλό κόστος), 2) καλή διαλυτότητα στην τιμή του φυσιολογικού pH ή κοντά σε αυτή, 3) χημική σταθερότητα σε διάλυμα και σε θέρμανση, 4) μεταβολική σταθερότητα στο κυκλοφορικό σύστημα, 5) επαρκή μη πολικότητα ώστε να αποφευχθούν προβλήματα στην μεταφορά των κυττάρων, 6) απουσία ανοσοκαταστολής, 7) μη ενεργοποίηση του ιού, 8) μη τερατογόνος δράση και, 9) μη μεταλλαξιγένεση ή καρκινογένεση.

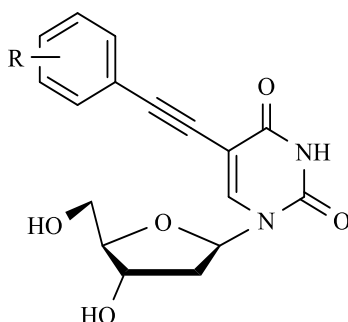
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός

Η ανάγκη για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών ουσιών, με αυξημένη βιολογική δράση, μειωμένη τοξικότητα και όσο τον δυνατόν λιγότερες παρενέργειες καθώς και η ραγδαία και συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας και της τεχνολογίας, επέτρεψαν τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά, μεγάλης ποικιλίας φαρμάκων, που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο. Αντικείμενο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση νέων τροποποιημένων νουκλεοζιτών ως εν δυνάμει αντιϊικοί παράγοντες.

Εκτεταμένες 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. Όπως ήδη αναφέραμε από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία έτη, νέες τάξεις φούρανο-νουκλεοζιτών με τροποποιημένη βάση, όπως οι C5-υποκατεστημένοι νουκλεοζίτες πυριμιδίνης έχουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιϊκές και αντικαρκινικές.

Στηριζόμενοι στα παραπάνω στοιχεία, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης φουρανονουκλεοζιτών με διαφορετικούς υποκαταστάτες όπου και με ετεροκυκλική βάση την ιωδοουρακίλη (σχήμα 15). Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν ως αντιϊικοί παράγοντες.



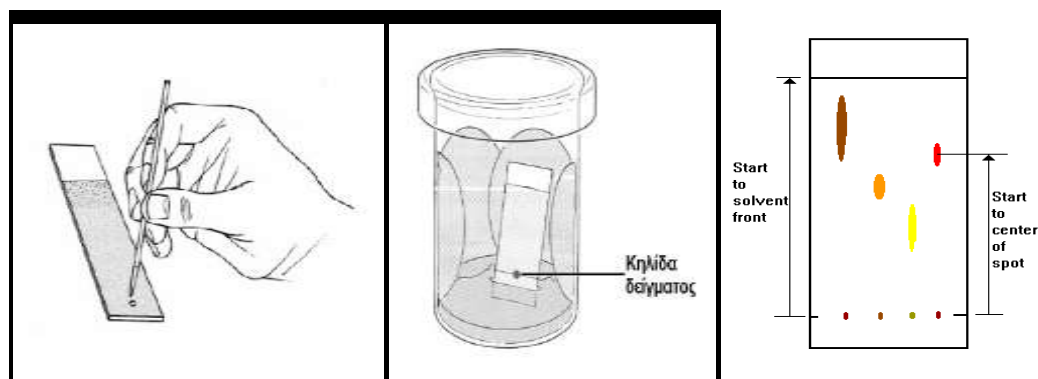
Σχήμα 15: Τροποποιημένος στη βάση και στο σάκχαρο φουρανονουκλεοζίτης με υποκαταστάτες: R=2,4-CH₃ (a), 2,4,5-CH₃ (b)

3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC:Thin layer chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου λεπτής στιβάδας TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel 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 την απόσταση που διένυσε κάθε μόριο στη στατική φάση, πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης R_f , που ορίζεται από το λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση προς την απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη (Εικόνα 1). Η τιμή R_f 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_2SO_4 (θειϊκού οξέος) 30%.



Εικόνα 1:Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

3.2 Χρωματογραφία στήλης

Όταν μια χημική ένωση απομονώνεται, η ένωση-στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η πλειοψηφία των καθαρισμών οργανικών ουσιών πραγματοποιούνται μέσω της χρωματογραφίας, μιας τεχνικής κατά την οποία το επιθυμητό προϊόν διαλύεται σε έναν οργανικό διαλύτη ή σύστημα διαλυτών σε συγκεκριμένη κάθε φορά αναλογία και στη συνέχεια αφήνεται να διαρρεύσει μέσω ενός κατακόρυφου γυάλινου σωλήνα ο οποίος είναι γεμάτος με προσροφητικό υλικό. Το προς διαχωρισμό μείγμα ονομάζεται κινητή φάση ενώ το προσροφητικό υλικό εντός του σωλήνα στατική.

Επειδή οι διαφορετικές ενώσεις προσροφώνται στη στατική φάση σε διαφορετική έκταση, μετακινούνται διαμέσου αυτής με διαφορετικές ταχύτητες και για το λόγο αυτό, εξέρχονται από τη στήλη –εκκλούνται- από το άκρο της. Ο χρόνος έκλουσης μιας ουσίας επηρεάζεται άμεσα από την πολικότητά της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες προσροφώνται κατά κανόνα, εντονότερα και άρα μετακινούνται βραδύτερα μέσω της στατικής φάσης σε σχέση με τα περισσότερα άπολα.

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

3.3 Ξήρανση διαλυτών

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

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

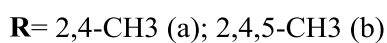
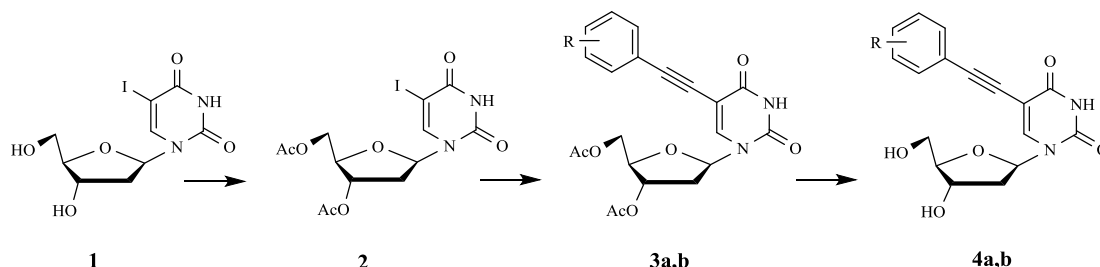
αποθηκεύτηκε. Η δε πυριδίνη αποστάχθηκε παρουσία υδροξειδίου του καλίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε.

3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

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

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

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

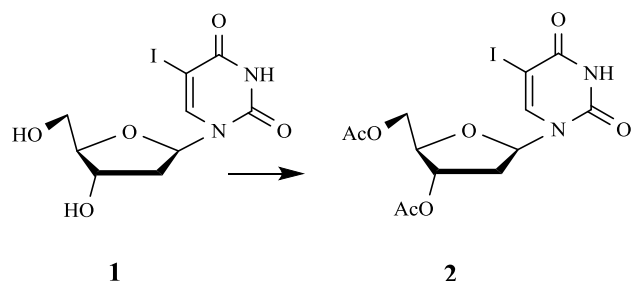


4.1 Μεθοδολογία της σύνθεσης

Η πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη ένωση, 2'-δέοξυ- 5 ιοδοουριδίνη (**1**), η οποία υπόκειται σε προστασία των υδροξυλίων παρουσία οξικού ανυδρίτη (Ac₂O) σε πυριδίνη, γίνεται ακετυλίωση της ένωσης και λαμβάνουμε την 3',5'-δι-Ο-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη της 5-ιοδοουρακίλης **2** με απόδοση 85%. Εν συνεχεία, με αντίδραση Sonogashira [18,19] παίρνουμε τα προστατευμένα προϊόντα **3a,b**. Ένα τυπικό πείραμα Sonogashira είναι το παρακάτω :

Ο φούρανο-νουκλεοζίτης της 5-ιωδοουρακίλης (**2**) διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και με την προσθήκη του κατάλληλου αλκινίου, της τριαιθυλαμίνης (Et₃N), του ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκαταλύτης) και του τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)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 **3** σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας τους νουκλεοζίτες **4a-b**, σε αποδόσεις 91-92%.

4.2 Σύνθεση της 1-(3',5'-δι-O-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη) -5-ιωδοουρακίλης (2)

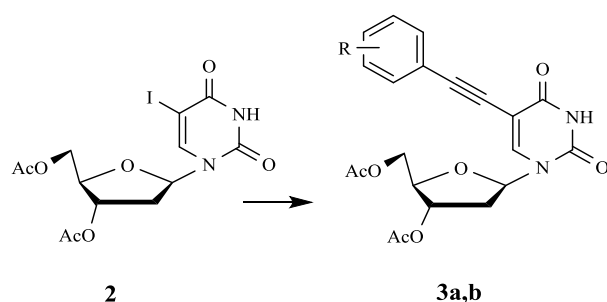


Η ένωση **1** διαλύθηκε σε πυριδίνη (1,6 ml) και προστέθηκε οξικός ανυδρίτης (0,7 ml) με σκοπό να ακετυλιωθεί η ένωση και να ληφθεί η **4**. Εν συνεχεία το προϊόν συμπυκνώθηκε και καθαρίστηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης 20% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν **2** (264,3mg) ελήφθη υπό τη μορφή άχρωμου ελαίου.

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

Πίνακας 1

4.3 Σύνθεση των (3).

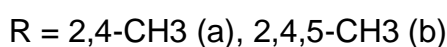
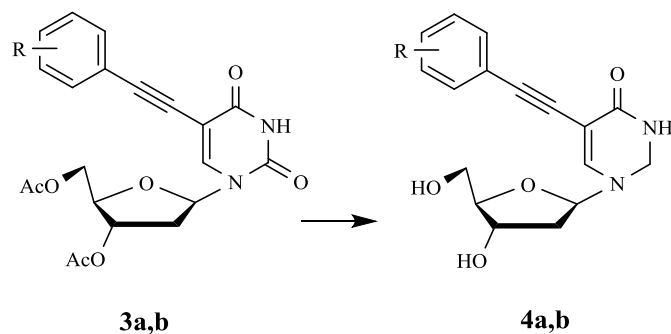


R = 2,4-CH₃ (a), 2,4,5-CH₃ (b)

Για τη σύνθεση του 3 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Sonogashira με μικροκύματα. Η 1-(3',5'-δι-O-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη) -5-ιοδοουρακίλης (2) (0,41 mmol, 206mg) διαλύονται σε 5 ml άνυδρου διαλύτη N,N-διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF), 2 eq του κατάλληλου τελικού αλκινίου, τριφαινυλοφωσφορικό παλλάδιο [Pd(PPh₃)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 NaHCO₃, παραλαβή της οργανικής φάσης, ξήρανση με άνυδρο Na₂SO₄ και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Στη συνέχεια έγινε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Τα επιθυμητά προϊόντα 3a (138 mg), 3b (148 mg), ελήφθησαν υπό τη μορφή κίτρινου αφρού με απόδοση 69% και 71%.

	Προϊόν 3a	Προϊόν 3b
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

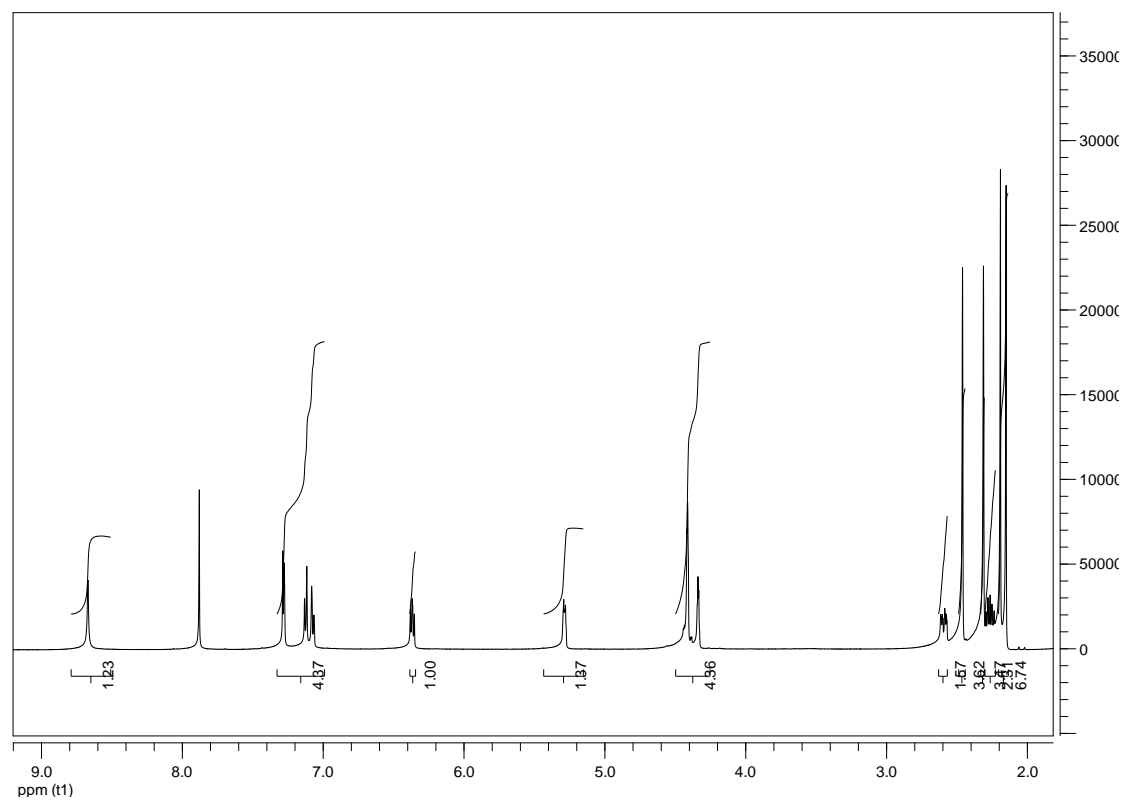
4.4 Σύνθεση των (4)



Γίνεται ανάδευση του διαλύματος των προστατευμένων νουκλεοζιτών 3a (100 mg, 0,2mmol), 3b (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 4a (63,7mg), 4b (66 mg) αντίστοιχα, με μορφή κίτρινου ελαίου.

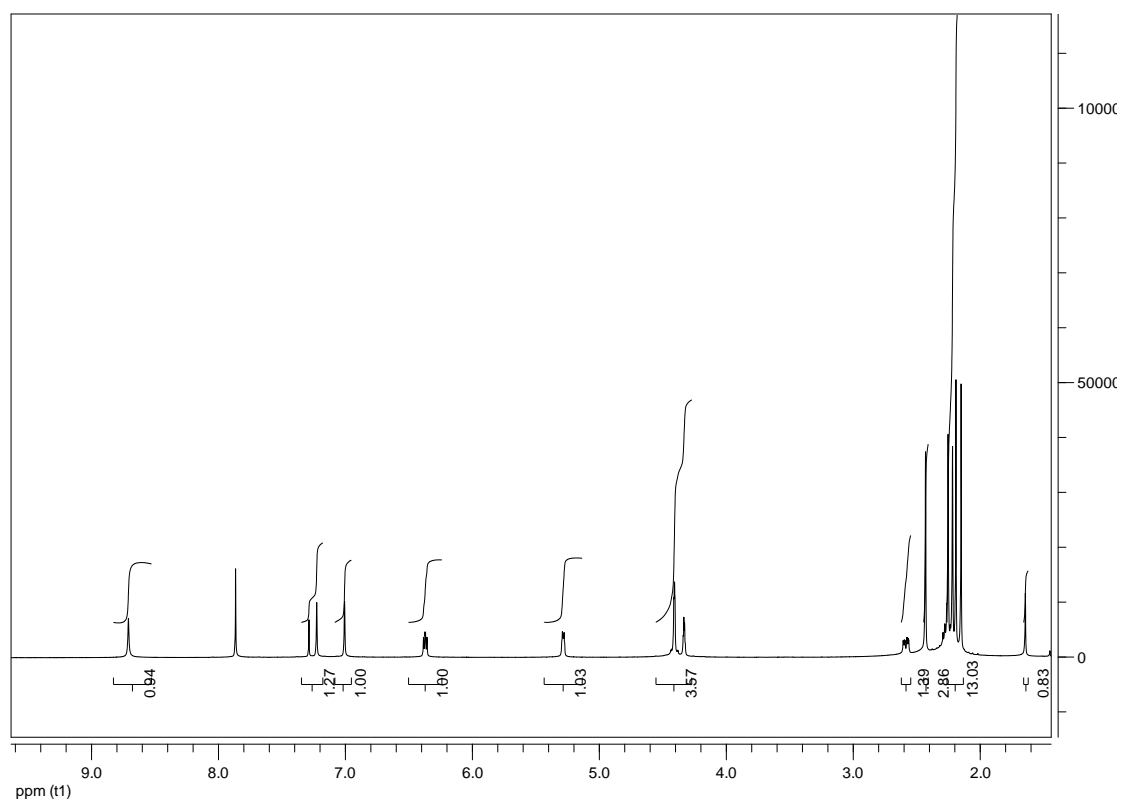
	Προϊόν 4a	Προϊόν 4b
TLC (Διάλυμα Δ)	R _f = 0,4	R _f =0,37
Απόδοση	92%	91%
[α] _D ²²	-4	+2
λ _{max}	292 nm	294nm

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ^1H NMR - Φάσμα ^1H NMR του προϊόντος 3α



Διάγραμμα 1

Φάσμα 1H NMR του προϊόντος 3b



Διάγραμμα 2

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προήλθε από τις προσπάθειες των ερευνητών να αντιμετωπίσουν χρόνιες νόσους, όπως κακοήθεις νεοπλασίες και ιικές μολύνσεις. Κύριος σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων, που παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα (κύτταρα του αναπνευστικού) αλλά και εκλεκτικότητα όσον αφορά τη δράση τους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας καινούργιας τάξης φουρανονουκλεοζιτών, με τροποποίηση στο τμήμα της βάσης και η οποία τάξη πιθανόν παρουσιάζει αντικαρκινική και αντιϊκή δράση. Η εκτέλεση του πειράματος ήταν αρκετά απλή, σύντομη και με κατανοητά βήματα. Τα αποτελέσματα των αποδόσεων από την σύνθεση των τελικών φουρανονουκλεοζιτών ήταν πολύ ικανοποιητικά. Πιο αναλυτικά, σύνθεση της 1-(3',5'-δι-Ο-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζη) -5-ιοδοουρακίλης(2) με απόδοση 85%, σύνθεση των **3a** και **3b** με απόδοση 69% και 71% αντίστοιχα και τέλος σύνθεση των **4a** και **4b** με απόδοση 92% και 91% αντίστοιχα. Πρέπει να αναφέρουμε ότι όλες οι ενώσεις προσδιορίστηκαν από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού, μαγνητικού συντονισμού (¹HNMR).

Τα νέα μόρια **3a**, **3b**, **4a**, **4b** μελετήθηκαν για την κυτταροτοξική και αντιϊκή δράση τους έναντι του ιού **Coxsackie B4** καθώς και του αναπνευστικού συγκυτιακού ιού (**Respiratory syncytial virus**) της σειράς HeLa. Η ικανότητα για τη μείωση της κυτταροπαθογένειας, που προκαλείται από ιούς, κατά 50% απεικονίζεται στον Πίνακα 2. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τις νέες ενώσεις συγκρίνονται με τα αποτελέσματα του αντιϊκού φαρμάκου **Ribavirin**.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 4, οι νεοσυντιθέμενοι φουρανονουκλεοζίτες **3a**, **3b**, **4a** και **4b** παρουσίασαν μείωση της κυτταροπαθογενειας των κυττάρων HeLa που προκαλείται από τους ιούς **Coxsackie B4** και αναπνευστικού συγκυτιακού ιού. Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά έναντι της δράσης της Ριμπαριβίνης.

Ένωση	Concentration unit	Minimum cytotoxic concentration ^a	EC ₅₀ ^b	
			Coxsackie virus B4	Respiratory syncytialvirus
3a	μM	100	62	>100
3b	μM	100	74	>100
4a	μM	>100	>100	>100
4b	μM	>100	>100	>100
Ribavirin	μM	>250	250	4.5

Πίνακας 4. Κυτταροτοξική και αντιϊκή δράση των ενώσεων 3a-3b, 4a-4b

Παρατηρούμε ότι οι προστατευμένοι νουκλεοζίτες **3a** και **3b**, δρουν καλύτερα σε σχέση με τους αποπροστατευμένους, καθώς παρουσιάζουν αυξημένη λιποφιλικότητα. Αυτό συμβαίνει γιατί τα λιπόφιλα μόρια διαχέονται πιο εύκολα και γρήγορα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, η οποία είναι λιπώδης. Αντίστοιχα, οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες (**4a** και **4b**), είναι λιγότερο δραστικοί σε σχέση με τους **3a** και **3b**, καθώς διαθέτουν στο μόριό τους ελεύθερες υδροξυλομάδες, πράγμα που τους καθιστά λιγότερο λιποφιλικούς.

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4, την καλύτερη δράση από όλους τους νεοσυντιθέμενους φουρανονουκλεοζίτες, παρουσιάζει ο **3a**.

Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι η δράση του μορίου **3a**, με ελάχιστη κυτταροτοξική συγκέντρωση 100 μM, είναι εξαιρετική αφού απαιτούνται μόλις 62 μM της ένωσης για την μείωση κατά 50% της κυτταροπαθογένειας των κυττάρων HeLa που προκαλούνται από τον ιό **Coxsackie B4** καλύτερη από το ευρέως χρησιμοποιούμενο φάρμακο Ριμπαβαριν, όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. McMurry J. Οργανική Χημεία, τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 1245, 905.
2. Morisson&Boyd Οργανική Χημεία, τόμος III Γραφείο Εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων 1331, p. 758.
3. Berg, J. M., Tymoczko J. L., Stryer L., Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, **2001** (p) 329-351.
4. Page, Curtis, Sutter, Walker, Hoffman, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 1997: 4, 26
5. William H. Prusoff and David C. Ward., Commentary, Nucleoside analogs with antiviral activity, *Biochemical Pharmacology*, 1976:25, 1233-1239
6. Kaufman HE. Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 109: 251-252. Medline doi:10.3181/00379727-109-27169
7. Kaufman HE, Nesburn AB, Maloney ED. IDU therapy of herpes simplex. *Arch Ophthalmol* 1962; 67: 583-591. Medline doi:10.1001/archopht.1962.00960020583012
8. Kaufman HE, Martola E-L, Dohlman C. Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in treatment of herpes simplex keratitis. *Arch Ophthalmol* 1962; 68: 235-239. Medline doi:10.1001/archopht.1962.00960030239015
9. 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
10. 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
11. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 2947-2951. Medline doi:10.1073/pnas.76.6.2947
12. G Michael Blackburn, Michael J Gait, David Loakes, David M Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology: Edition 3*, RSC Publishing, **2006**, p.82

13. 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
14. Jason Tierney, PelleLidström, Microwave Assisted Organic Synthesis, Blackwell Publishing CRC Press, **2005**, 31-32
15. 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
16. P.E Came and L.A. Caliguiri, *Chemotherapy and Viral Infections*, Springer Science & Business Media, 2012, 98-100
17. 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
18. Komiotis D., Manta S., Tsoukala E. and Tzioumaki N., Antiviral Unsaturated Nucleosides, *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, **2008**, 7, 219-244
19. Morris J. Robins and Philip J. Barr, Nucleic Acid Related Compounds. 39. Efficient Conversion of 5-Iodo to 5-Alkynyl and Derived 5-Substituted Uracil Bases and Nucleosides5-Alkynyl and Derived 5-Substituted Uracil Bases and Nucleosides, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 1854-1862
20. Vander, M. D. Sherman, Ph. D. Luciano, Ph. D. M. Tsakoulos, Φυσιολογία του ανθρώπου, μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού.
21. Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* **1995**, 67, 155.
22. Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* **2000**, 20, 417.
23. Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* 2000, 39, 12757-12765.
24. Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 3154-3163
25. Lewin, B. *Genes* **2003**, VIII, 6.
26. Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, **2005**, 4, 4.

27. 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.
28. 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.
29. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 420-428.
30. Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevsek, A.; Pamulapati, R.T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2696.
31. Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakos, 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.
32. Fokin, V. V. *ACS Chem. Biol.*, **2007**, *2*, 775–778.
33. Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 1249–1262.
34. Johnson, J. A.; Koberstein, J. T.; Finn, M. G.; Turro, N. *J. Macromol. Rapid Commun.*, **2008**, *29*, 1052–1072.
35. Huisgen, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565–598.
36. 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;
37. 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.
38. Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin, V. V.; Van der Eycken, E. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 4223–4225.
39. 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.
40. Urien, M.; Erothu, H.; Cloutet, E.; Hiorns, R. C.; Vignau, L.; Cramail, H. *Macromolecules*, **2008**, *41*, 7033–7040.
41. Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 365.

42. 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.
43. 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.
44. 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 anomer by trimethylsilyltriflate catalysis. *Carbohydrate Research*, 232: 359-365.
45. Menzies, I.S. and Seakins, J.W.T. (1976) Paper and Thin Layer Chromatography. Chromatography and electrophoretic Techniques, Vol.1 (Smith, I. And Seakins, J.W.T. eds.), *William Heinemann Medical books Ltd.*, 183.
46. AN R. Van Rompay, Ameli Norda, 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
47. 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
48. 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
49. <http://chemistry.tutorvista.com>. Chromatography Sept **2012**
50. C.L.F. Meyers, D.J. Meyers. Thin- Layer Chromatography. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry.* **2008**, DOI: 10.1002/0471142700.nca03ds34
51. Hayflick L., Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry.* 1997, 62: 1180-1190
52. Hanahan D. and Folkman J., Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996, 86: 353-364.
53. Fuentes, J.; Angulo, M.; Pradera, M. A. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2577

54. Kiritsis C, Manta S, Parmenopoulou V, Balzarini J, Komiotis D. *Eur J Med Chem.* 2011 Nov;46(11):5668-74.
55. Elhalabi, J.; Rice, K. G. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2004**, 23, 195.
56. Tewson, T. J.; Welsh, M. J. *J. Org. Chem.*, **1978**, 43, 1090.
57. **Reichman, U.; Watanabe, K. A.; Fox, J. J. *Carbohydr. Res.* 1975, 42, 233.**
58. Pankiewicz, K.W. *Carbohydr. Res.* **2000**, 327, 87.
59. VanAerschot, A.; Herdewijn, P.; Balzarini, J.; Pawels, R.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1743.
60. Nair, NUCLEOSIDES Pawan K. Sharma and Vasu, NUCLEOTIDES & NUCLEIC ACIDS, 200019(4), 757

