

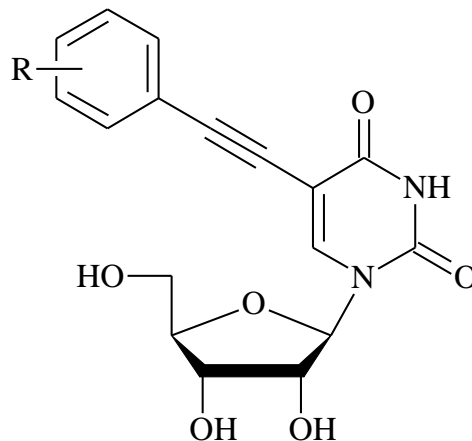


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***C5 αλογόνο φαίνυλο ριβοφουρανουκλεοζίτες της ουρακίλης ως εν δυνάμει κυτταροτοξικοί και αντιικοί παράγοντες***

***C5 halogen phenyl ribofurano nucleosides of uracil as potential cytotoxic and antiviral agents***



ΜΑΡΙΑ ΓΕΩΡΓΙΟΥ  
ΛΑΡΙΣΑ 2017

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

---

**Κομιώτης Δημήτριος:** Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων

**Μαρκουλάτος Παναγιώτης** -Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Τζουμάκι Νίκη**- Διδάκτωρας Οργανικής Χημείας

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Κομιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ως προς την διεκπεραίωση του πειράματός μου στο εργαστήριο καθώς και για τις εποικοδομητικές υποδείξεις του.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και για τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Νικόλαο Κολλάτο για την υποστήριξη και τη βοήθεια του καθώς η εμπειρία του και οι πολύτιμες συμβουλές του αποτέλεσαν εφόδια για την ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να αναφερθώ σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοοργανικής για την υποδοχή και το κλίμα συνεργασίας που φρόντισαν να επικρατεί και την οικογένειά μου που με στήριζε από απόσταση κυρίως στον ψυχολογικό τομέα.

## Περιεχόμενα

---

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ .....	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
ABSTRACT .....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Υδατάνθρακες.....	7
1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης .....	9
1.3 Νουκλεοζίτες .....	12
1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών .....	13
1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιϊκοί παράγοντες .....	16
1.6 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.....	20
1.7 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στο σάκχαρο και τη βάση .....	22
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	26
3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ .....	27
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC : Thin layer chromatography) .....	27
3.2 Χρωματογραφία στήλης.....	28
3.3 Ξήρανση διαλυτών .....	29
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων .....	29
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	30
4.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού .....	30
4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης.....	30
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ <sup>1</sup> H NMR.....	35
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	40

## 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.

Μεγάλος αριθμός νουκλεοζιτικών αναλόγων δρουν ως αντιμεταβολίτες, ανταγωνίζονται τους φυσικούς νουκλεοζίτες και αλληλεπιδρούν με ενδοκυττάριους στόχους. Άλλοι πάλι ενσωματώνονται κατά την αντιγραφή ή την επιδιόρθωση του DNA, οδηγώντας έτσι στον τερματισμό της διαδικασίας σύνθεσής του ενώ άλλοι λειτουργούν ως αναστολείς της πολυμεράσης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η συνθετική πορεία νέων φουρανονουκλεοζιτών, με τροποποίηση στη βάση, ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί και αντιικοί παράγοντες. Αναλύονται οι συνθετικές οδοί που ακολουθήθηκαν, οι μέθοδοι που πραγματοποιήθηκαν 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.

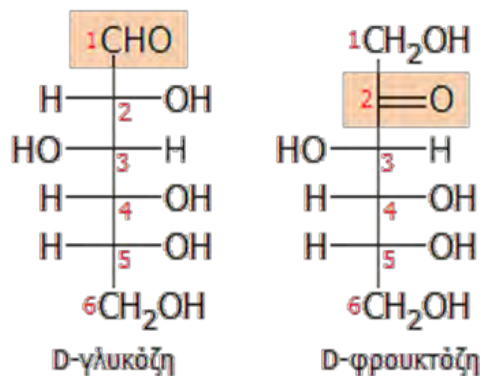
# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1 Υδατάνθρακες

---

Οι υδατάνθρακες είναι πολύ-υδροξυαλδεΐδες, πολύ-υδροξυκετόνες, ή ενώσεις οι οποίες μπορούν να υδρολυθούν προς αυτές, εμφανίζοντας γενικό τύπο  $(CH_2O)_n$ . Ένας υδατάνθρακας ο οποίος δεν μπορεί να υδρολυθεί προς απλούστερες ενώσεις καλείται μονοσακχαρίτης, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να ταξινομηθούν επιπλέον σε αλδόζες και κετόζες. Η κατάληξη -οζη χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει υδατάνθρακα, ενώ τα προθέματα αλδο- και κετο-, προσδιορίζουν τη φύση της καρβονυλικής ομάδας στην άκυκλη μορφή τους (αλδεΐδη ή κετόνη). Ένας υδατάνθρακας ο οποίος μπορεί να υδρολυθεί προς δύο μόρια μονοσακχαρίτη καλείται δισακχαρίτης, όπως η σακχαρόζη και η λακτόζη, ενώ αυτός που μπορεί να υδρολυθεί προς πολλά μόρια μονοσακχαρίτη καλείται πολυσακχαρίτης, όπως η κυτταρίνη, το άμυλο και το γλυκογόνο.



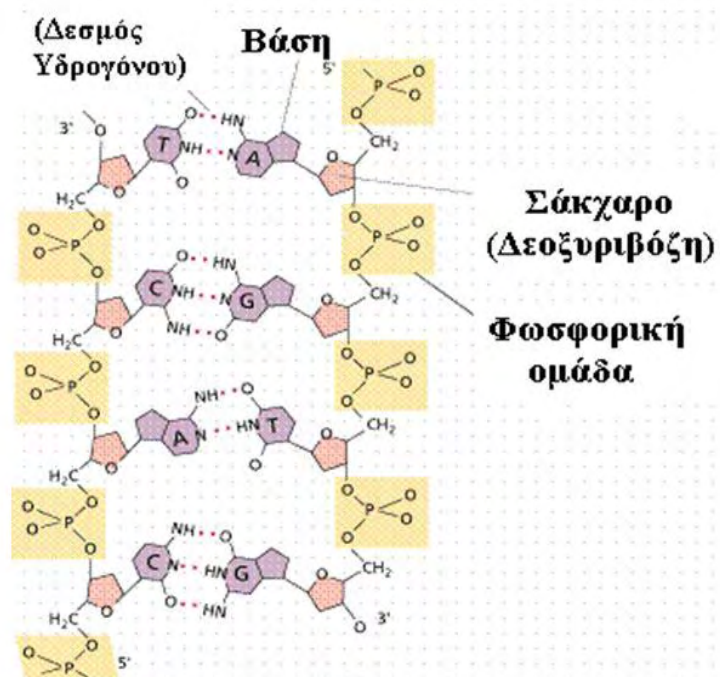
**Εικόνα 1:** D- γλυκόζη και D- φρουκτόζη

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

Μαζί με τις πρωτεΐνες και τα λίπη, οι υδατάνθρακες αποτελούν βασικά συστατικά στους ζωντανούς οργανισμούς, με μεγάλη βιολογική και ενεργειακή

σημασία, και δομικά στοιχεία των κυττάρων και άλλων μακρομορίων, όπως οι γλυκοπρωτεΐνες, οι λιποπολυσακχαρίτες και τα νουκλεϊκά οξέα.

## DNA (Διπλή έλικα)



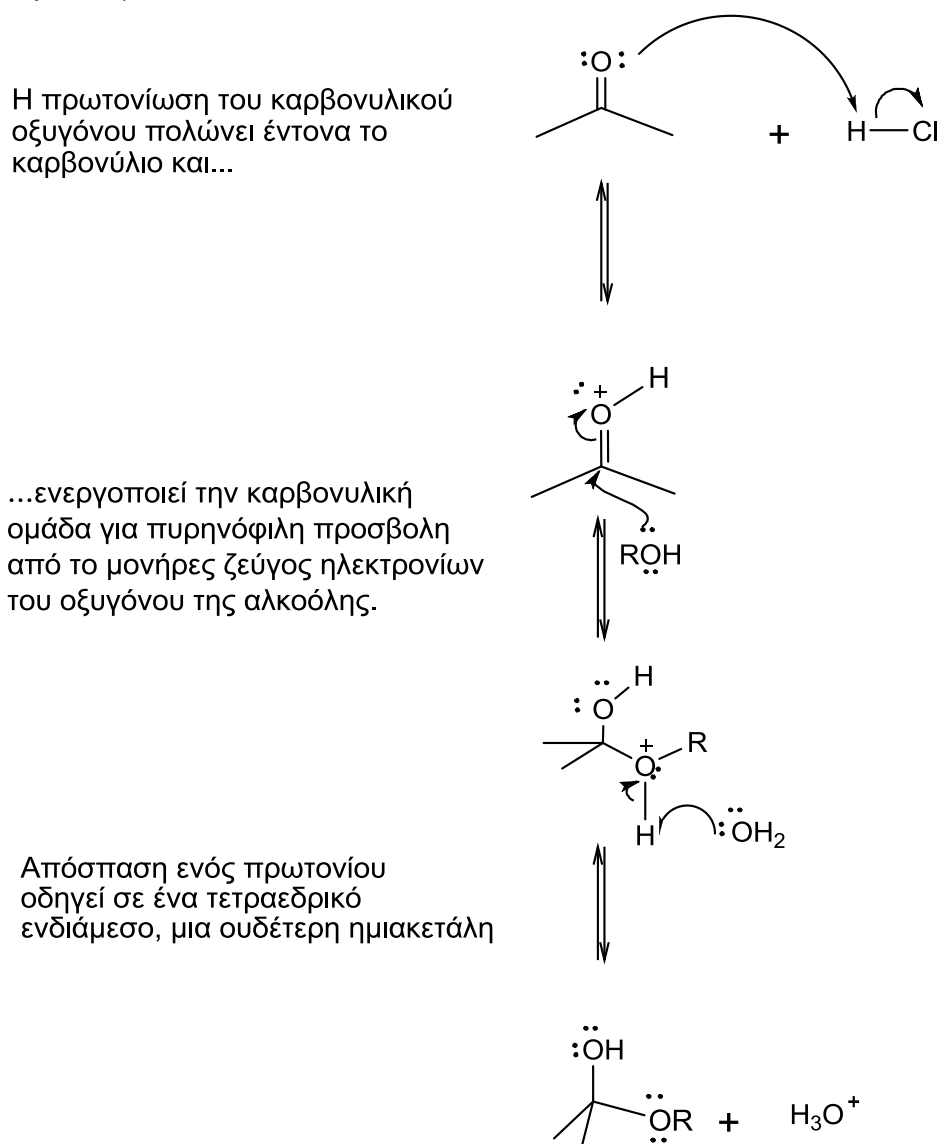
Εικόνα 2: Διπλή έλικα DNA



## 1.2 Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης

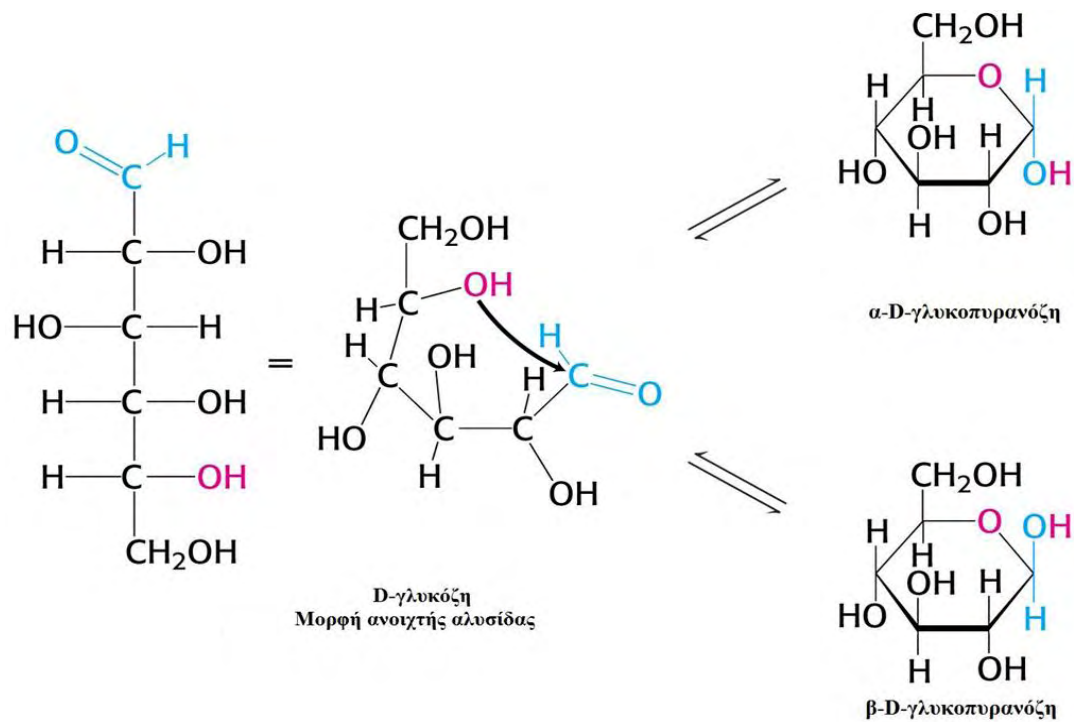
Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να υπάρξουν σε δυο μορφές. Στη μορφή της ανοιχτής αλυσίδας και την κυκλοποιημένη τους μορφή. Η πρώτη μπορεί να κυκλοποιηθεί όταν μια καρβονυλική ομάδα του μορίου τους αντιδράσει με μια ομάδα υδροξυλίου, προς δημιουργία ημιακετάλης.

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

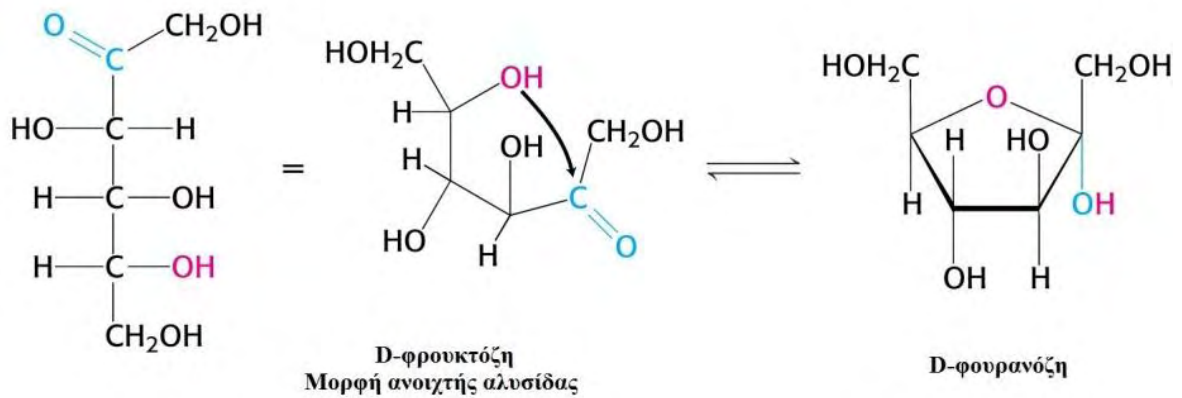


**Σχήμα 1:** Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού ημιακετάλης

Οι πενταμελείς και εξαμελείς ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα σε δομές ανοικτής και κλειστής αλυσίδας. Για παράδειγμα, η γλυκόζη σε υδατικό διάλυμα απαντά με τη δομή του εξαμελούς δακτυλίου της πυρανόζης, που οφείλεται στην ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη του -OH του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C1 (εικόνα 3). Η φρουκτόζη, αντίθετα, απαντά με τη δομή του πενταμελούς δακτυλίου της φουρανόζης, που σχηματίζεται από την προσθήκη του -OH του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C2 (εικόνα 4).



**Εικόνα 3:** Σχηματισμός γλυκοπυρανόζης

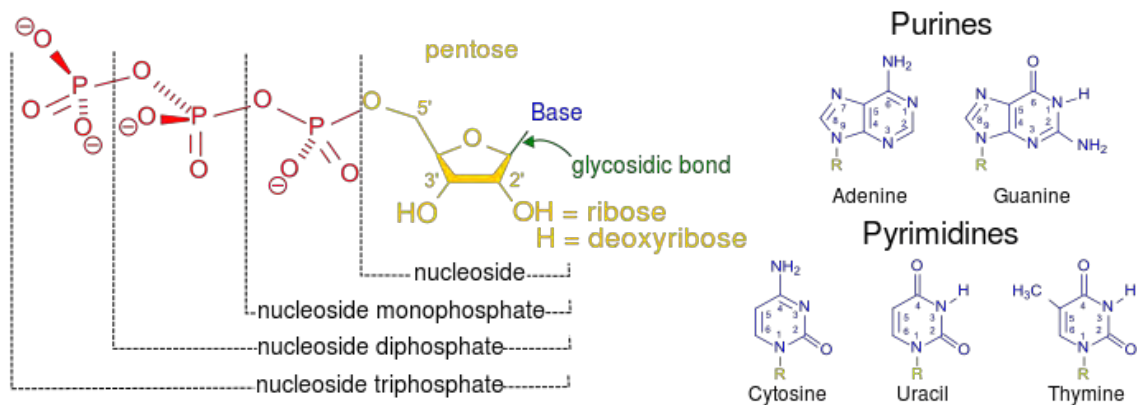


**Εικόνα 4:** Σχηματισμός φουρανόζης

Με την κυκλοποίηση της ανοιχτής 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).

### 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 (αδενίνη, γουανίνη) ή πυριμιδίνης (θυμίνη, κυτοσίνη, ουρακίλη) δεσμευμένης σε ένα σάκχαρο. Αναλόγως αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης αντίστοιχα. Η ύπαρξη ενός ή περισσοτέρων μορίων φωσφορικού ομάδων στο C-5 του σακχάρου το μετατρέπει σε νουκλεοτίδιο το οποίο πάλι αναλόγως τη φύση της πεντόζης καλείται ριβονουκλεοτίδιο ή δεοξυριβονουκλεοτίδιο. Σε ένα δεοξυριβονουκλεοτίδιο το άτομο C-1 της δεοξυριβόζης δεσμεύεται στο N-1 μιας πουριμιδίνης 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).



Εικόνα 5

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των ιδιοτήτων τους που τα καθιστούν αντικαρκινικούς, αντιβακτηριδιακούς, αντιικούς παράγοντες, καθώς και ως αντιοξειδωτικά (Zhou *et al.* 2004, Perigaud *et al.* 1992, Robins *et al.* 1990, MacCoss *et al.* 1990). Ως εκ τούτου έχουν πραγματοποιηθεί πολλές τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα της βάσης όσο και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διερευνηθεί ενδελεχώς το φάσμα των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων.

## 1.4 Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

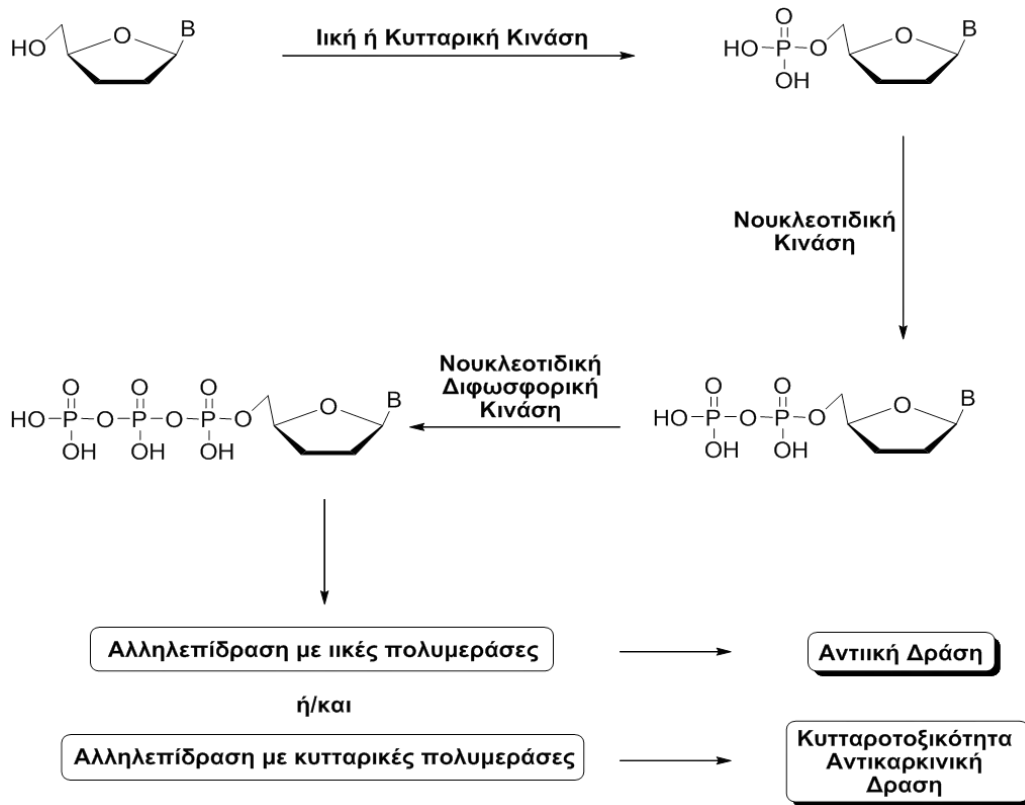
---

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 εκμεταλλεόμαστε στην χρήση νουκλεοζιτικών αναλόγων ως αντικαρκινικών και αντιικών φαρμάκων.

Όλες οι φαρμακευτικές ουσίες ασκούν την δράση τους αλληλεπιδρώντας με κάποιο μοριακό στόχο με το να αλλάζουν την φυσιολογία της λειτουργίας των κυττάρων και κατ' επέκταση του οργανισμού. Έτσι πρώτα από όλα το φάρμακο πρέπει να μπορεί να έρθει σε επαφή με το μοριακό στόχο του. Οι μοριακοί στόχοι των φαρμάκων ποικίλουν και μπορεί να είναι υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων, δίαυλοι 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 σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε, όταν εισέλθουν στο κύτταρο και μεταβολιστούν, να μπορούν να παρέμβουν στην σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και έτσι να ασκήσουν κυτταροστατική και αντιική δράση. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται χάρη στη φωσφορυλίωσή τους από κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες (Arner and Eriksson 1995). Με την ολοκλήρωση της φωσφορυλίωσης τους προς τις τριφωσφορικές τους δομές από κυτταρικά ή ιϊκά ένζυμα, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιϊκό διπλασιασμό, ή παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA. Συγκεκριμένα, η ενσωμάτωσή τους στο ιϊκό γονιδίωμα μπορεί να προκαλέσει διακοπή της αντιγραφής του ιϊκού γονιδιώματος, να το καταστήσει μη λειτουργικό και κατά συνέπεια να καταστείλει την αντιγραφή του ιού και την περαιτέρω παραγωγή ιϊκών σωματιδίων. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του γονιδιώματος του ιού είναι συντηρημένος σε πολλά είδη ιών, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να παρουσιάσουν δράση έναντι μεγάλου

φάσματος ιών. Αξίζει να σημειωθεί πως μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιική πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητα τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.



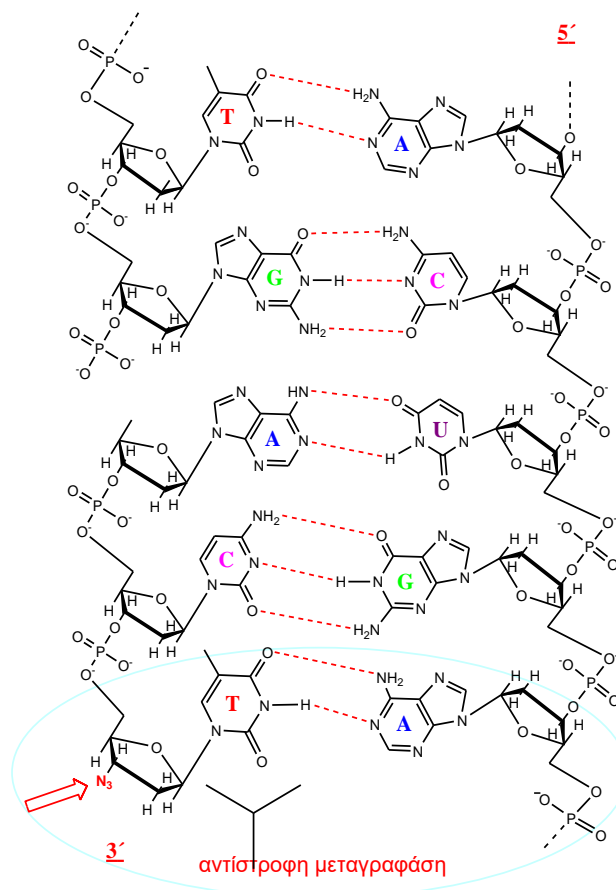
**Εικόνα 5:** Φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιικές κινάσες

Ένας κοινός μηχανισμός αντιιικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωσή τους στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της. Οι κυτταρικές πολυμεράσες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου και ταυτόχρονα απελευθερώνεται μια πυροφωσφορική ομάδα και δημιουργείται φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ των νουκλεοτιδίων (Lewin 2003, Burns *et al.* 2005). 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 τερματίζεται 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, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητά τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

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

Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών, οι οποίοι δρουν ως αντιβιοτικά βασίζεται είτε στο ότι καταστρέφουν συγκεκριμένα τμήματα των βακτηρίων, όπως τη μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμά τους, είτε στο ότι επιδρούν στην σύνθεση των πρωτεϊνών (Siev *et al.* 1969) και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής μεμβράνης (Ahn *et al.* 2000).



Σχήμα 2

## 1.5 Νουκλεοζίτες ως αντιϊικοί παράγοντες

---

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρεμβάλλονται στην σύνθεση του DNA και του RNA και μπορούν να επηρεάσουν εκτός από την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων και τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιϊικών φαρμάκων (Komiotis D. *et al*, 2008, Zhou W. *et al*, 2004, Perigaund C. *et al*, 1993). Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, στηρίζεται στην ικανότητά αλληλεπίδρασης με τις ιϊκές πολυμεράσες. Οι αντιϊικοί νουκλεοζίτες αποτελούν θεμελιώδη λίθο στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από:

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

Μερικά χαρακτηριστικά νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα κατά του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) είναι το Zidovudine (AZT) 3'-αζιδο-3'-δεσοξυθυμιδίνη, το Didanosine (DDI) 2'-3'-διδεοξυιουσιδίνη, το Zalcitabine (DDC) 2'-3'-διδεοξυκυτιδίνη και το 2'-3'-διδεοξυ-3'-θειοκυτιδίνη 3TC, που δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού (εικόνα 6,7,8).

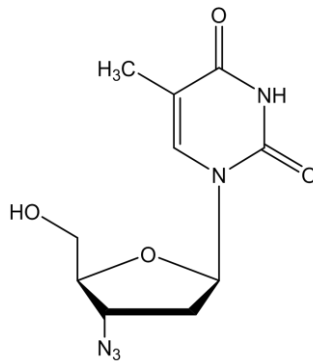
### 1.5.1 Zidovudine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine)

Το Zidovudine ή AZT. Το AZT (3'-αζιδο-2'-δεοξυθυμιδίνη) ήταν το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία του AIDS<sup>1</sup>. Είναι ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης δηλαδή του ενζύμου που χρησιμοποιούν οι ιοί και συγκεκριμένα οι ρετροϊοί για να συνθέσουν DNA και να πολλαπλασιαστούν. Συνεπώς αποτελεί έναν τύπο αντιρετροϊκού φαρμάκου. Είναι ανάλογο της θυμιδίνης και χορηγείται για την θεραπεία του AIDS δηλαδή της μόλυνσης από τον ιό της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1).

---

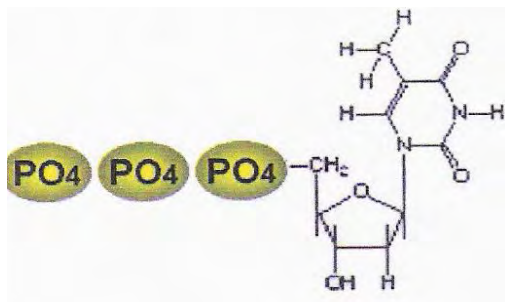
1





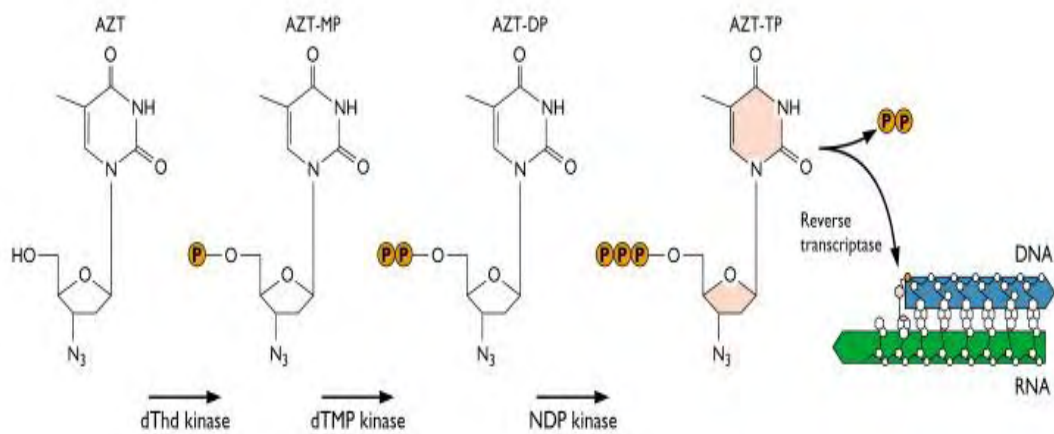
**Εικόνα 6:** Χημική δομή AZT

Πρόκειται για 2',3'-διδεοξυνουκλεοζίτες που προκύπτουν από την απομάκρυνση των υδροξυλομάδων από τις 2',3'-θέσεις του δακτυλίου της ριβόζης. Δρουν σαν αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (Hiroyuki et al. 2004). Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το ένζυμο που χρησιμοποιεί ο ιός για να συνθέσει το νέο DNA με μήτρα το ιϊκό RNA. Το ένζυμο αυτό συνθέτει μια αλυσίδα DNA συμπληρωματική με το RNA. Τα συγκεκριμένα ανάλογα νουκλεοζιτών αναστέλλουν τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή του ιϊκού DNA. Τα κυτταρικά ένζυμα μετατρέπουν το Zidovudine σε ενεργή μορφή 5'-τριφωσφορικού άλατος (Σχήμα 10).



**Σχήμα 10:** Στη θυμιδίνη προστίθενται τρεις φωσφορικές ομάδες. Η πρώτη φωσφορυλίωση γίνεται από το ιϊκό ένζυμο και οι υπόλοιπες από τα κυτταρικά ένζυμα.

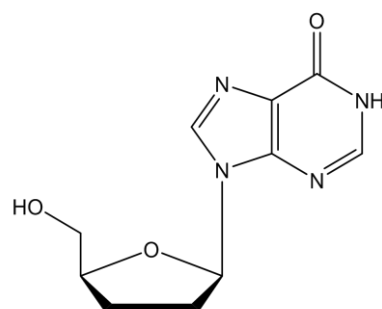
Έτσι, φωσφορυλιώνεται από τα κυτταρικά ένζυμα στην ενεργή του μορφή και δρα ως αναστολέας της αντίστροφης τρανσκριπτάσης τερματίζοντας την αλυσίδα μόλις συνδεθεί στο DNA (σχήμα 11). Επειδή έχει την αζιδο-ομάδα αντί για την υδροξυλομάδα, η επόμενη βάση δεν μπορεί να ενωθεί και η σύνθεση της αλυσίδας σταματά.



**Σχήμα 11:** Τερματισμός της αλυσίδας του ιϊκού DNA από το φωσφορυλιωμένο AZT

### 1.5.2 DDI ή Didanosine

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

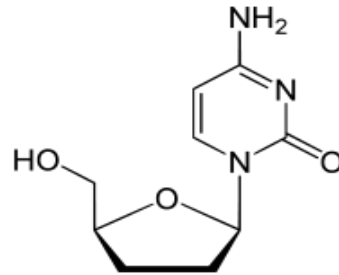


ddi

**Εικόνα 7:** Χημική δομή ddi

### 1.5.3 DDC ή Zalcitabine

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



**Εικόνα 8:** Χημικές δομές ddC

## 1.6 Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

---

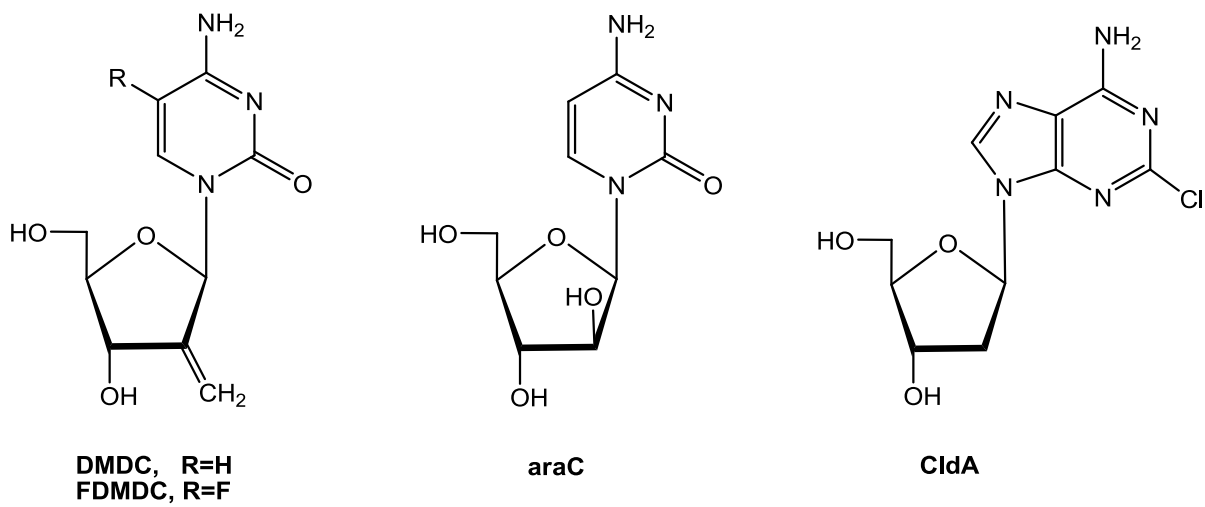
Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σ' έναν υγιή οργανισμό πραγματοποιείται πάντα κάτω από αυστηρές ρυθμίσεις, που επιτρέπουν στα κύτταρα να αυξηθούν, να διαφοροποιηθούν και να λειτουργήσουν αρμονικά. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις ρυθμίσεις αυτές, περιλαμβάνουν ένα σύστημα χημικών μηνυμάτων μέσω διαμεσολάβησης, για παράδειγμα ορμονών και συγκεκριμένων μεμβρανικών υποδοχέων. Όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε καλλιέργεια, σταματούν την διαίρεσή τους εφόσον έρθουν σ' επαφή το ένα με το άλλο. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται, η μιτωτική διαίρεση ορισμένων κυττάρων συνεχίζεται ανεξέλεγκτα χωρίς να υπακούει σε περιοριστικούς κανόνες και κάνει τα κύτταρα να χάσουν τη διαφοροποιημένη μορφή τους και να περάσουν σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση με αποτέλεσμα να δημιουργούνται όγκοι και καρκινώματα.

Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη νέων φαρμάκων χημειοθεραπείας, τα οποία διαθέτουν αυξημένη δραστηριότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Νέες αντικαρκινικές ουσίες, οι οποίες έχουν μελετηθεί εντατικά, είναι οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους. Οι νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά πολλών μορφών νεοπλασιών που στοχεύουν στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων.

Συγκεκριμένα, οι

- 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC),
- 1-(2'-δεσοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πεντοφουρανοζυλο)5-φθοροκυτοσίνη (FDMDC),
- 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC) και
- 2-χλωρο-2'-δεσοξυαδενοσίνη (CldA) (εικόνα 9)

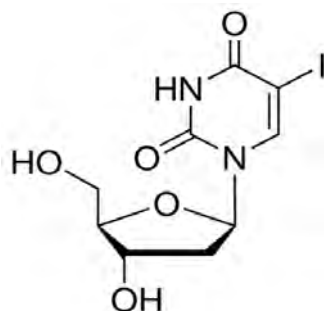
έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών, όπως διάφοροι τύποι λεμφωμάτων και λευχαιμίας. Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες.



**Εικόνα 9:** Χημικές δομές των DMDC, FDMDC, araC, CldA

## 1.7 Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στη βάση

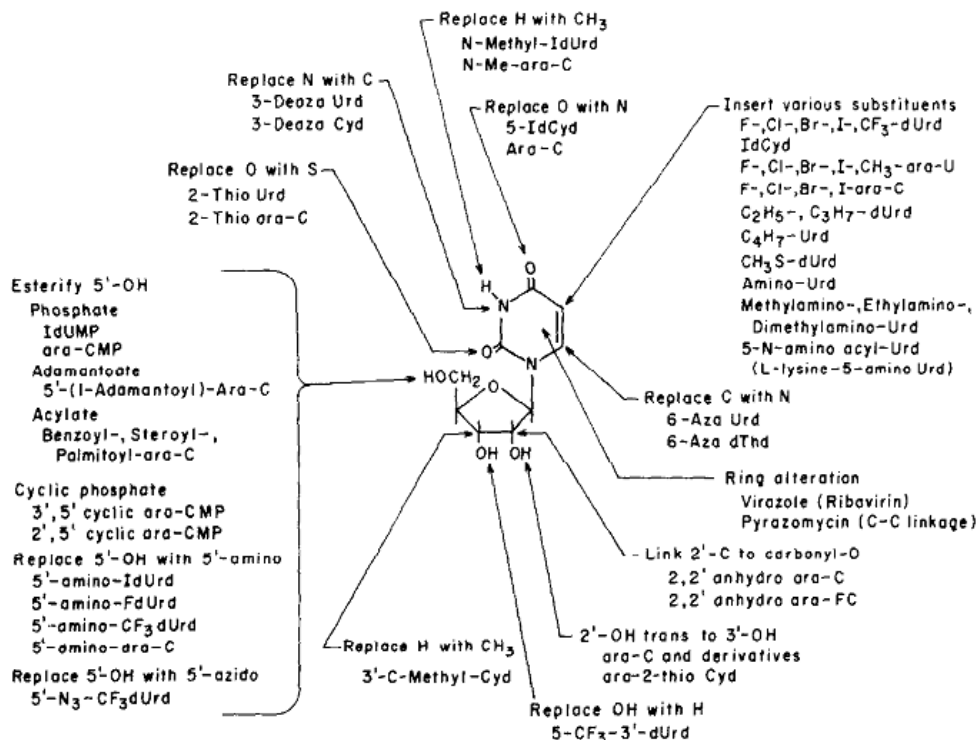
Ο πρώτος κλινικά αποτελεσματικός νουκλεοζίτης που εγκρίθηκε ήταν η 5-ιώδο-2'-δεοξουριδίνη στις αρχές του 1960, του οποίου η σύνθεση ήταν μέρος ενός αντικαρκινικού προγράμματος (W. H. Prusoff, 1959).



**Εικόνα 10:** 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 ξεκίνησαν συστηματική μελέτη της βιολογικής δράσης διαφόρων παραγόντων της πουρίνης και της πυριμιδίνης. Σύντομα, μία άλλη ομάδα τεκμηρίωσε την μέτρια αναστολή από την 5-βρωμοουρακίλη, την 5-υδρόξουρακίλη και τη 2,4-διθιοθυμίνη της αντιγραφής του ιού της δαμαλίτιδας σε κυτταρική καλλιέργεια. Οι Visser et al. ανέφεραν ότι διάφορα 5-υποκατεστημένα παράγωγα της ουριδίνης (5-χλώρο, 5-διάζο, 5-φορμαμιδο, 5-υδρόξυ και 5-άμινο) ανέστηλαν τον πολλαπλασιασμό του ιού της εγκεφαλίτιδας του ποντικού Theiler σε καλλιέργεια εγκεφάλου ποντικού.

Ένα παράδειγμα που αναπαριστά όλους τους τύπους τροποποίησης που αποδίδει νουκλεοζίτες με αντίική δράση φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



**Σχήμα 3:** Τύποι τροποποίησης που αποδίδουν νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση.

### 5-ΐωδο-2΄-δεοξουριδίνη (IdUrd, IUdR, IDU, Ιδοξουριδίνη)

Οι χημικές, βιοχημικές και κλινικές δοκιμές της IdUrd έχουν ήδη αναφερθεί στο παρελθόν (W. H. Prusoff and B. Goz., 1975, W. H. Prusoff and B. Goz., 1973). Η σημαντικότητα του IdUrd έγκειται στο ότι μπορεί να αναπτυχθεί ένα νουκλεοτιδικό φάρμακο το οποίο θα είναι κλινικά αποτελεσματικό όταν γίνεται μία μόλυνση από έναν ιό. Η IDU είχε περιγραφεί ως ένας αντι-HSV παράγοντας για τη θεραπεία της ερπητικής κερατίτιδας. 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. Ο Juel-Jensen (B. E. Juel-Jensen, 1974, B. E. Juel-Jensen, 1973), έχει ήδη αναλύσει την κλινική χρησιμότητα της Ιδοξουριδίνης και πολλών άλλων αντιϊκών παραγόντων στον άνθρωπο.

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, ενδεχομένως είναι υπεύθυνη για την τοξικότητα που 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, μπορεί να παρατηρηθεί στοματίτιδα, λευκοπενία και αλωπεκία (P. Calabresi *et al.*, 1961).

Μαζί με αυτά τα ανεπιθύμητα αποτελέσματα, υπάρχουν και άλλες ανησυχίες των οποίων η σημασία για τον άνθρωπο είναι δύσκολο να αξιολογηθεί, και περιλαμβάνουν την ικανότητα της IdUrd να:

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

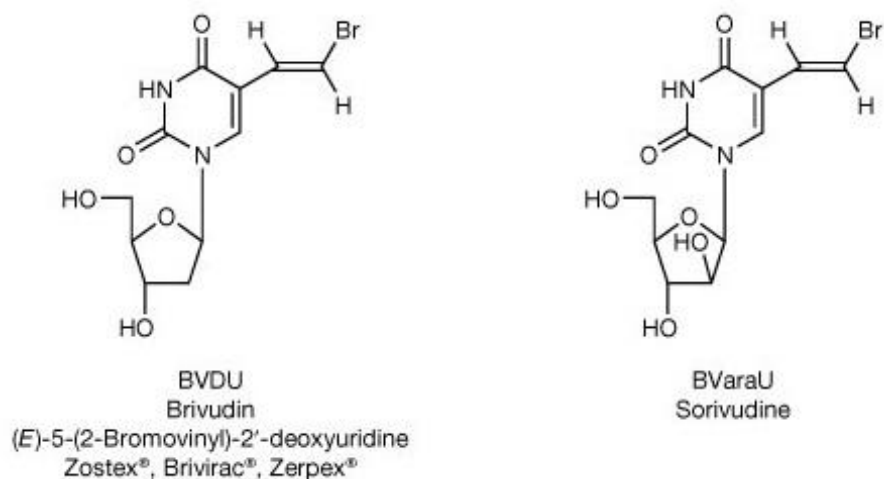
Έτσι, η IdUrd φαίνεται να είναι η πρώτη ένωση που παρουσιάζει ξεκάθαρα μια επιτυχημένη θεραπεία μιας καθιερωμένης λοίμωξης από ιό στον άνθρωπο.

Μετά τη σύνθεση της 5-ιωδο-2'-δεοξουριδίνης (IDU) από τον Prusoff (Prusoff, 1959), το ενδιαφέρον για τους 5-υποκατεστημένους νουκλεοζίτες ως πιθανά αντιϊκά παράγωγα έχει αυξηθεί (Prusoff & Fischer, 1979). Τα ακόρεστα 5-υποκατεστημένα παράγωγα έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μεταξύ αυτών, η BVDU [E-5-(2-βρωμοβινυλ)-2'-δεοξουριδίνη] έχει αναδειχθεί 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 (Cheng *et al.*, 1981). Επιπλέον, η τριφωσφορική BVDU αναστέλλει την HSV-1 DNA πολυμεράση πιο αποτελεσματικά από ό,τι αναστέλλει τις κυτταρικές DNA πολυμεράσες (Allaudeen *et al.*, 1981).

### Παραδειγμα με τροποποιηση στη βαση

Η IDU μπορεί να θεωρηθεί ως το σημείο εκκίνησης για την σύνθεση διάφορων νέων παραγώγων 5-υποκατεστημένων-2'-δεοξουριδίνης. Το πιο σημαντικό παράγωγο αυτής της σειράς είναι η (E)-5-(2-βρωμοβινυλο)-2'-δεοξουριδίνη (Brivudin/BDU), το οποίο αποδείχτηκε πολύ καλός ειδικός αναστολέας του HSV-1, καθώς επίσης και του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα (VZV). Αργότερα, το ομόλογο του BVDU, η 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-E-5-(2-βρωμοβινυλο)ουρακίλη (BVaraU), βρέθηκε ότι είναι εξίσου ισχυρή, αν όχι και περισσότερο από το BVDU, κατά του ιού VZV.





**Εικόνα 11:** Οι ενώσεις (E)-5-(2-βρωμοβίνυλο)-2'-δεοξουριδίνη και BVaraU, με ισχυρή δράση έναντι του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα.

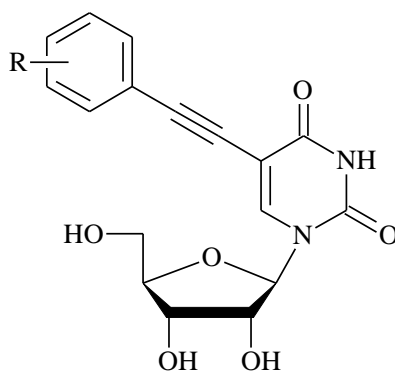
Η BV-araU εμφανίζει αντίική δράση και έναντι εργαστηριακών στελεχών και απομονωμένων κλινικών προϊόντων όταν δοκιμάζεται σε διάφορους ανθρώπινους ινοβλάστες και σε κυτταρική σειρά ινοβλαστών πιθήκου (Haguhiko M. *et al.* 1991).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

---

Η ανάγκη για την εύρεση νέων θεραπευτικών ουσιών, με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες παρενέργειες καθώς και η ραγδαία και συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά, πληθώρας φαρμάκων που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση νέων τροποποιημένων νουκλεοζιτών ως εν δυνάμει αντιϊικοί παράγοντες. Έτσι πραγματοποιήθηκαν μετατροπές στο τμήμα της βάσης για την εύρεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με καλύτερη βιολογική δράση. Όπως ήδη αναφέραμε από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία έτη, νέες τάξεις φουρανο-νουκλεοζιτών με τροποποιημένη βάση, έχουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιϊκές και αντικαρκινικές.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω στοιχεία, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση μιας νέας τάξης φουρανονουκλεοζιτών με υποκατάσταση στην ετεροκυκλική βάση της ουρακίλης. Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν τόσο ως αντιϊικοί όσο και ως κυτταροτοικοί παράγοντες.



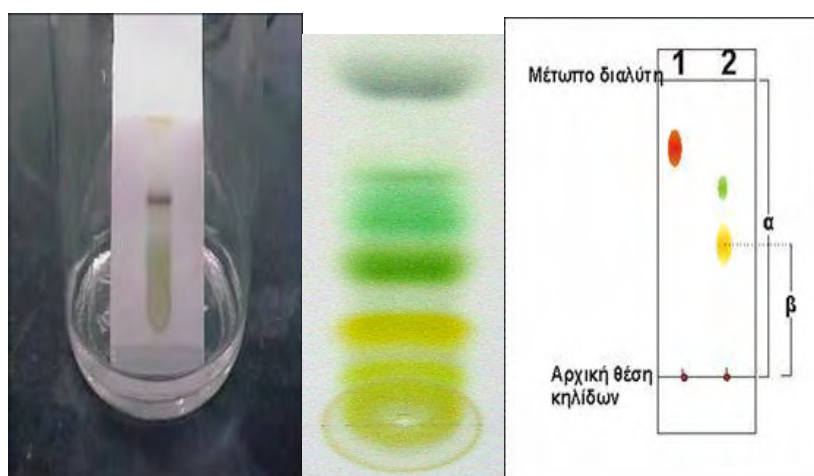
**Σχήμα 4:** Τροποποιημένος στη βάση φουρανονουκλεοζίτης με υποκαταστάτες:  
R= 2-Cl (a), 2- F (b)

### 3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

#### 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 (Merck Kieselgel 60F<sub>24</sub>) πάχους 0.2mm.

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



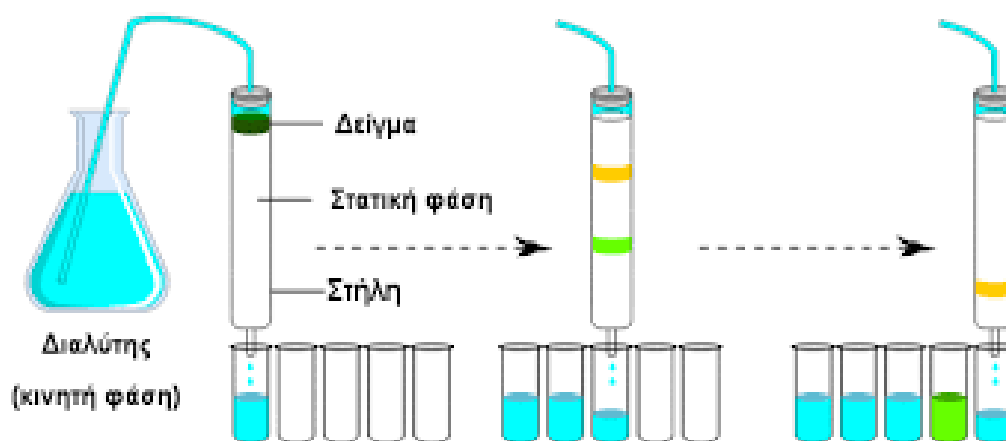
**Εικόνα 12:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

### 3.2 Χρωματογραφία στήλης

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

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

Στη χρωματογραφία στήλης η στατική φάση τοποθετείται σε μια στήλη κατασκευασμένη από αδρανές υλικό ( ύαλος, πηκτική πυριτίδας, ανοξειδωτος χάλυβας). Το δείγμα τοποθετείται στην αρχή (κορυφή) της στήλης και η κινητή φάση διέρχεται εξαναγκασμένα μέσω της στατικής φάσης με την εφαρμογή πίεσης σε αυτήν ή λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από την συγγένεια των συστατικών ως προς την στατική φάση (εικόνα 11).



**Εικόνα 13:** Χρωματογραφία στήλης

### 3.3 Ξήρανση διαλυτών

---

Ορισμένες από τις αντιδράσεις που περιγράφονται, επιβάλλουν την χρήση άνυδρων διαλυτών όπως ακετονιτρίλιο  $\text{CH}_3\text{CN}$  και *N,N*-διμέθυλοφορμαμίδιο DMF. Η ξήρανση του  $\text{CH}_3\text{CN}$  γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το DMF φυλάσσεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å.

### 3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

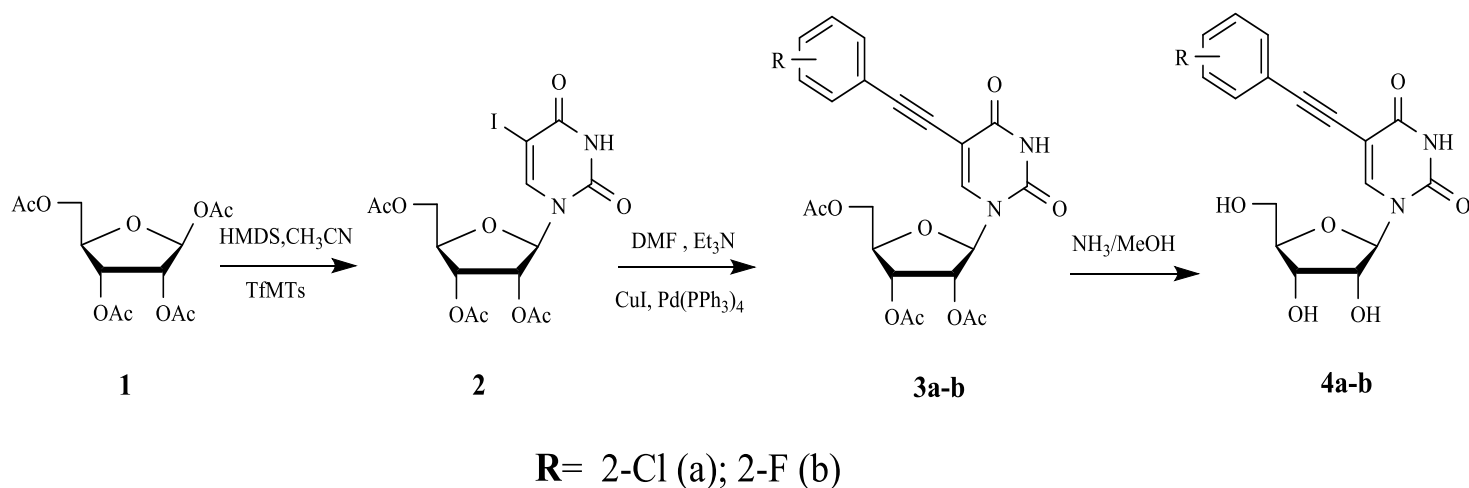
---

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR μετρήθηκαν με το φωτόμετρο Bruker 300 MHz χρησιμοποιώντας δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ) και διμεθυλοσουλφοξείδιο ( $\text{DMSO}-d_6$ ). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς. Η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (doublet), dd (doublet doublet), dtr (doublet triplet), m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός NMR, είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν το φαινόμενο NMR, άλλοι, οι λιγότεροι όχι. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι πυρήνες έχουν μαγνητικές ιδιότητες, όπως αυτές αντανakλώνται στην ιδιότητα του σπίν. Στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη, για την μελέτη των χημικών, φυσικών και βιολογικών ιδιοτήτων της.

## 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.1 Επισκόπηση συνθετικής οδού



### 4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης

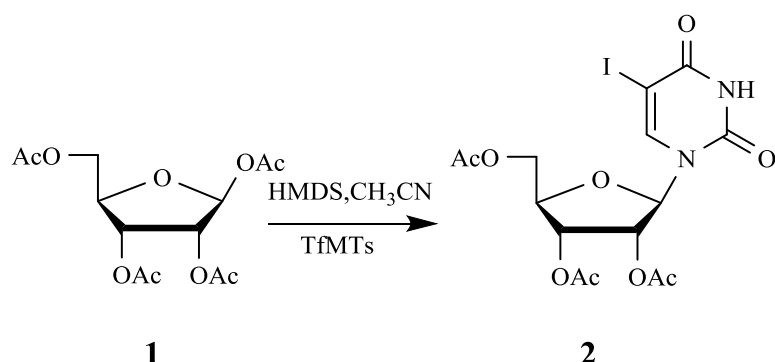
Η πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη ένωση 1,2,3,5- τετρα- O- ακετυλ- b- D- ριβοφουρανόζη (**1**), η οποία υπόκειται σε αντίδραση Vorbrüggen. Αρχικά, σιλυλιώνεται η βάση σε άνυδρο ακετονιτριλίο (MeCN), παρουσία εξαμεθυλοδισιλαζανίου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης στους 100°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, προστίθεται το σάκχαρο **1** και η σύζευξη επιτυγχάνεται με την προσθήκη του τριφθορο-μεθανοσουλφονικού-τριμεθυλο-σιλυλεστέρα (Me<sub>3</sub>SiOSO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) στους 0°C λαμβάνοντας την επιθυμητή 1(2', 3', 5' - τρι- O- ακετυλ- b- D- ριβοφουρανο) 5- ιωδοουρακίλη (**2**), σε απόδοση 85%.

Στη συνέχεια, με αντίδραση Sonogashira παίρνουμε τα προστατευμένα προϊόντα **3a-b**. Ένα τυπικό πείραμα Sonogashira είναι το ακόλουθο. Ο φούρανο-νουκλεοζίτης της 5-ιωδοουρακίλης (**2**) διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και με την προσθήκη του κατάλληλου αλκινίου, της τριαιθυλαμίνης (Et<sub>3</sub>N), του ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκαταλύτης) και του τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] (καταλύτης), πραγματοποιήθηκε η σύζευξη τους υπό την

ακτινοβολία μικροκυμάτων ισχύος 200W για 5 λεπτά στους 60°C, σε αποδόσεις 69-74%

Τέλος, η σύνθεση ολοκληρώνεται με την αποπροστασία των προϊόντων **3a-b** σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας τους τελικούς νουκλεοζίτες **4a-b**, σε αποδόσεις 91-92%.

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



##### Αντίδραση Vorbrüggen.

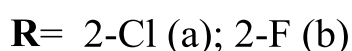
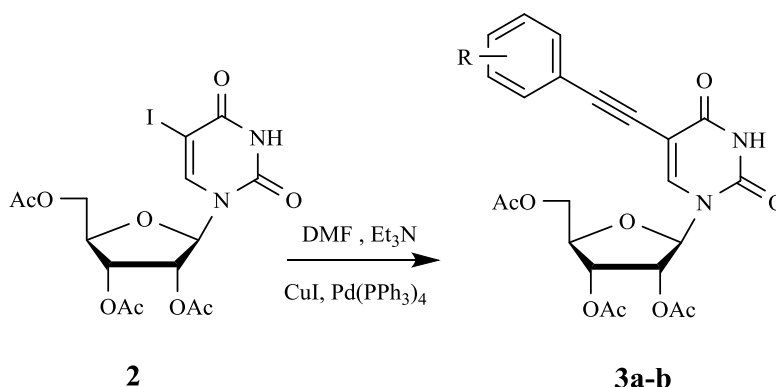
Ένα διάλυμα της 5-ιωδοουρακίλης (1,2 eq, 0,94mmol, 222,75 mg), του HMDS (1,4 eq, 253μL, 1,1 mmol) και της σακχαρίνης (0,046 eq, 7,3mg, 0,04mmol) σε άνυδρο ακετονιτρίλιο (0,24 mmol, 1,6 ml), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για μία ώρα στους 100 °C. Η ολοκλήρωση της συλλιώσης της βάσης γίνεται αντιληπτή όταν το μίγμα γίνει διαυγές. Αφότου το μείγμα έγινε διαυγές, προστέθηκε η 1,2,3,5- τετρα- O- ακετυλ- b- D- ριβοφουρανόζη (1) (250 mg, 0,78mmol) καθώς και ο καταλύτης  $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$  (0,20 ml, 1,1 mmol). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 30 λεπτά με ψύξη στους 0 °C.

Στη συνέχεια έγινε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο διάλυμα  $\text{NaHCO}_3$ . Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν 2 (331,7mg) ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρού.

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



#### 4.2.2 Σύνθεση της (3a-b)

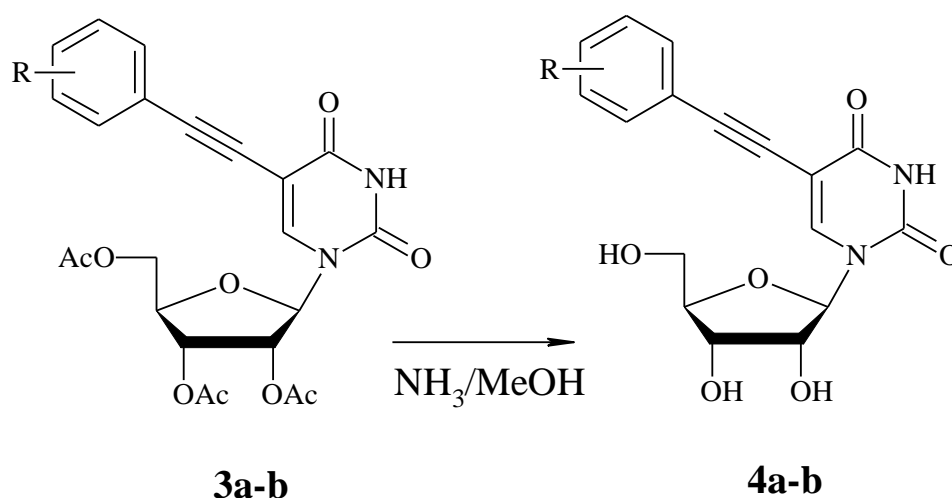


Η σύνθεση του 3 επιτεύχθηκε με τη μέθοδο Sonogashira με χρήση μικροκυμάτων:

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

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

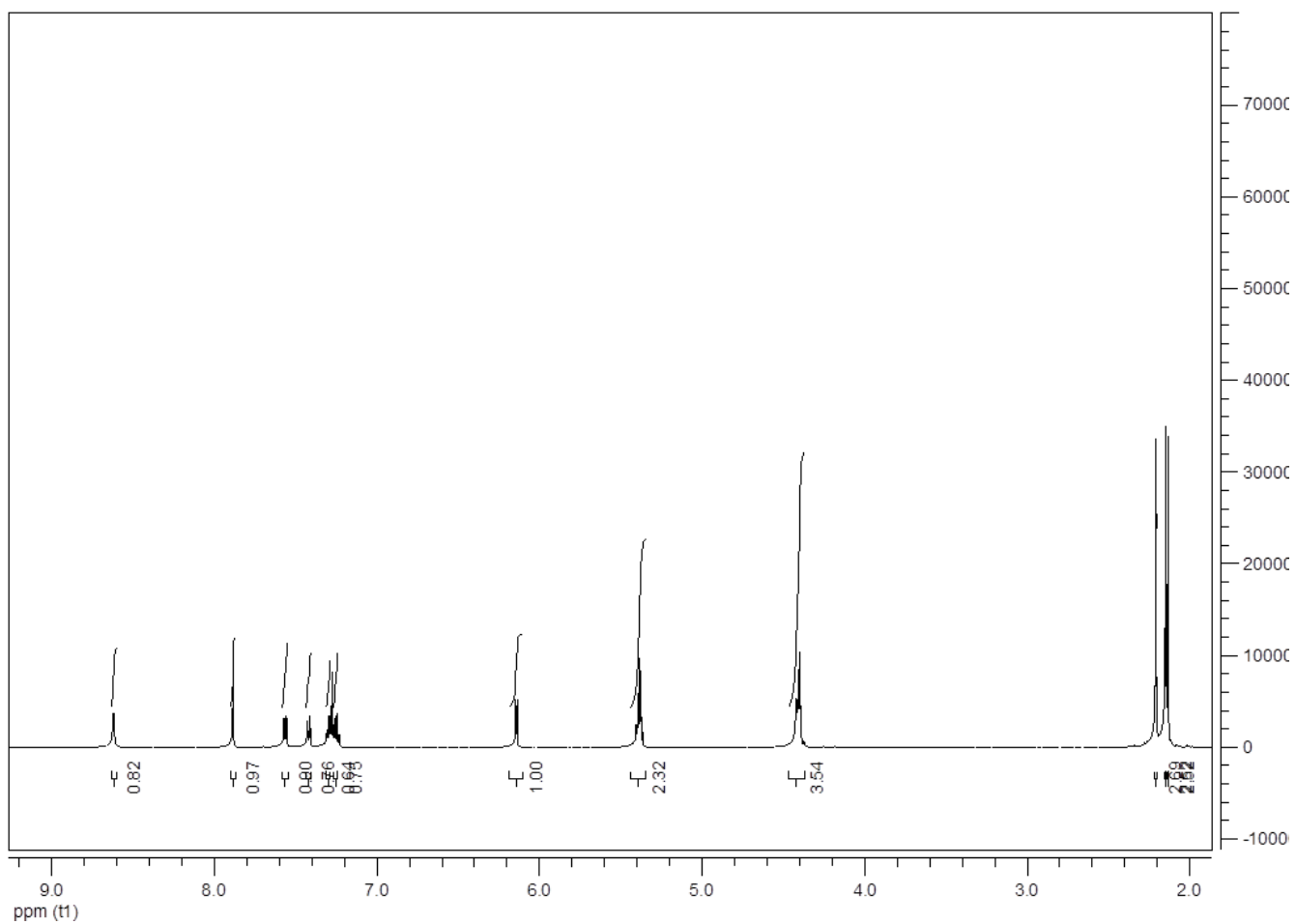
### 4.2.3 Σύνθεση της (4a-b)



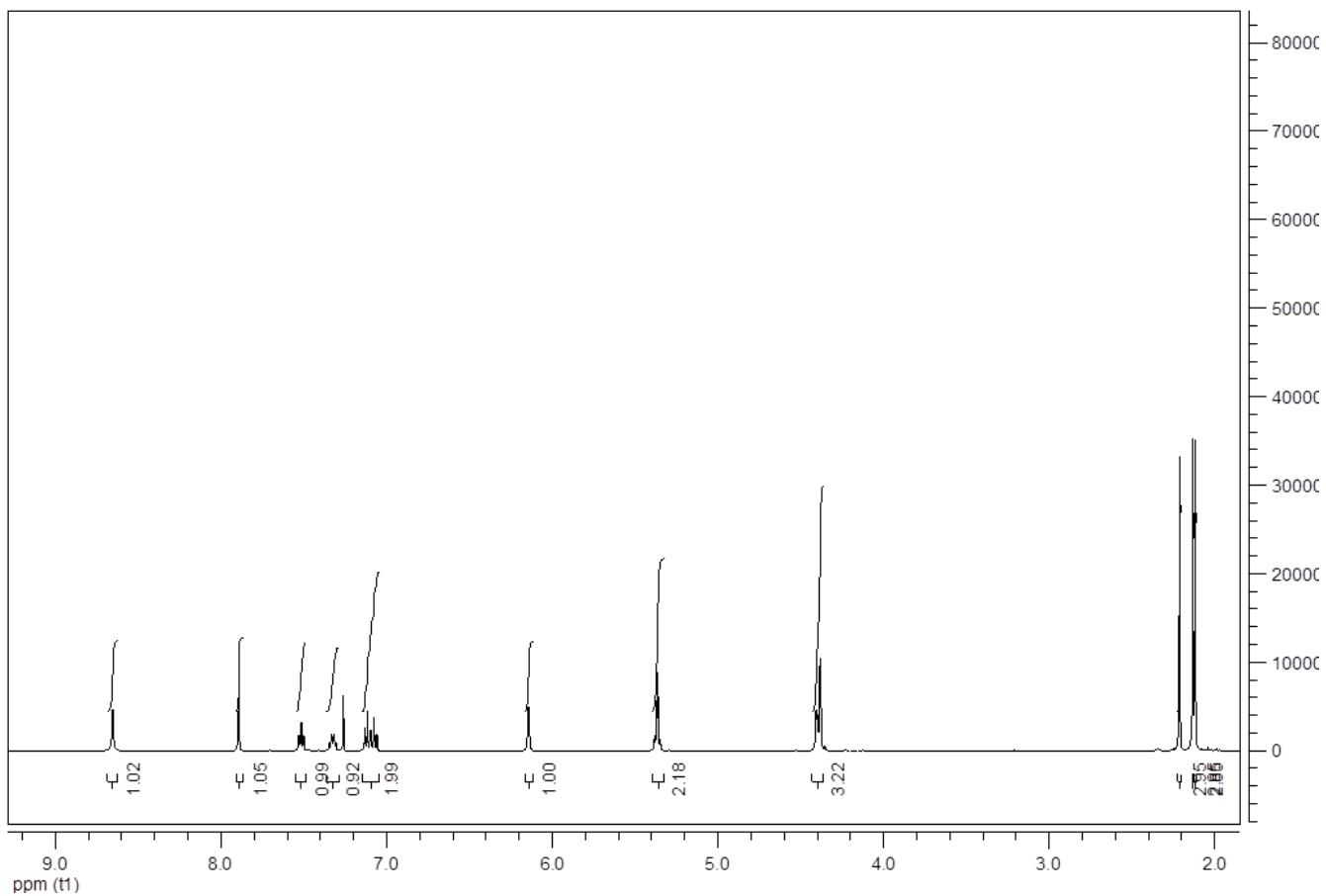
Διάλυμα των προστατευμένων νουκλεοζιτών **3a** (100 mg, 0,2mmol), **3b** (100 mg, 0,2mmol) σε κορεσμένη μεθανολική αμμωνία (262,5 ml) αναδεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες καθαρίζονται με χρωματογραφία στήλης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

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

## 5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ $^1\text{H}$ NMR



Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR προϊόντος 3a



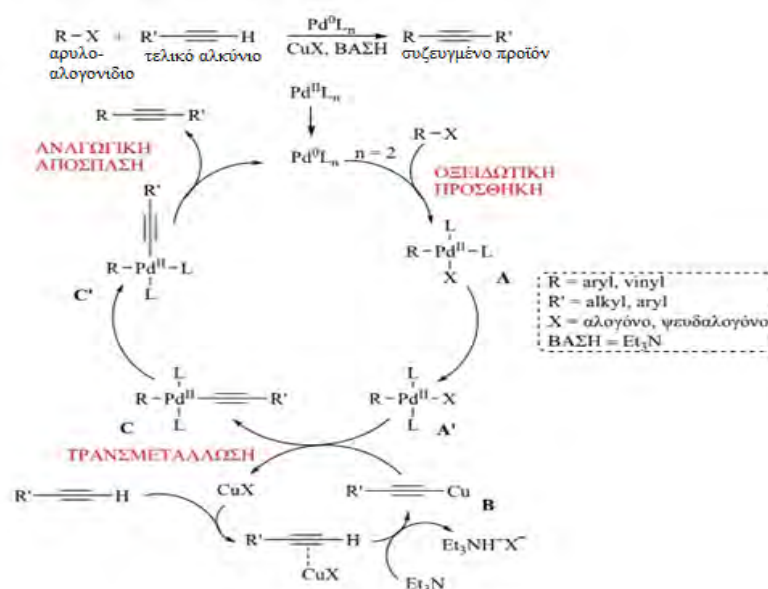
Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR προϊόντος 3b

## 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

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

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

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



Σχήμα: Ο μηχανισμός της σύζευξης Sonogashira

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

1. Προσφέρει ομοιόμορφη θέρμανση σε όλο το μίγμα της αντίδρασης.

2. Αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα της αντίδρασης.
3. Ελαττώνει τον σχηματισμό παραπροϊόντων.
4. Παρέχει αυξημένες αποδόσεις.

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

Τα νέα μόρια **3a-b** και **4a-b** μελετήθηκαν ως προς την κυτταροτοξική τους δράση έναντι των κυτταρικών σειρών L1210, CEM και HeLa. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Ένωση	IC50* (μM)	
	L1210	CEM
3a	162 ± 23	100 ± 8
3b	> 250	132 ± 3
4a	> 250	≥250
4b	≥250	≥250

**Πίνακας 1:** Κυτταροτοξική δράση των ενώσεων 3a-b, 4a-b

Παρατηρούμε ότι οι προστατευμένοι νουκλεοζίτες **3a-b** έχουν καλύτερη δράση έναντι των αποπροστατευμένων, λόγω αυξημένης λιποφιλικότητας. Αυτό οφείλεται στο ότι, εν γένει τα λιπόφιλα μόρια διαχέονται πιο εύκολα και γρήγορα δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης, επειδή είναι λιπώδης. Αντίθετα, οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες **4a-b** είναι λιγότερο δραστικοί σε σχέση με τους **3a-b**, καθώς έχουν ελεύθερες υδροξυλομάδες στο μόριό τους και άρα, μειωμένη λιποφιλικότητα.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, η ένωση **3a** με υποκαταστάτη ένα χλώριο στην θέση 2, εμφανίζει την καλύτερη κυτταροτοξική δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων CEM.

\*Η μισή μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC<sub>50</sub>) αποτελεί μέτρο της αποτελεσματικότητας μιας ουσίας στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας.

Αυτό το ποσοτικό μέτρο δείχνει πόσο ένα συγκεκριμένο φάρμακο ή άλλη ουσία είναι απαραίτητο για να αναστέλλει κατά το ήμισυ τη δεδομένη βιολογική

διαδικασία. Χρησιμοποιείται συνήθως ως μέτρο ισχύος φαρμάκου ανταγωνιστή στη φαρμακολογική έρευνα. Σύμφωνα με τον FDA , η IC<sub>50</sub> αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση ενός φαρμάκου που απαιτείται για 50% αναστολή in vitro .

## 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. 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
13. Erik De Clercq, Review: Selective anti-herpesvirus agents, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 2013; 23:93-101
14. Vorbrüggen H., Ruh-Pohlenz C., *Handbook of Nucleoside Synthesis*, **2001**
15. Vorbruggen, H.; Hofle, G. Nucleoside Syntheses, XXIII On the Mechanism of Nucleoside Synthesis. *Chem. Ber.*, **1981**, 114, 1256- 1268
16. G Michael Blackburn, Michael J Gait, David Loakes, David M Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology: Edition 3*, RSC Publishing, **2006**, p.82
17. Majid M. Heravi, Sodeh Sadjadi, Recent advances in the application of the Sonogashira method in the synthesis of heterocyclic compounds, *Tetrahedron*, **2009**, 65 (37), 7761–7775
18. Jason Tierney, Pelle Lidström, *Microwave Assisted Organic Synthesis*, Blackwell Publishing CRC Press, **2005**, 31-32
19. 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
20. P.E Came and L.A. Caliguri, *Chemotherapy and Viral Infections*, Springer Science & Business Media, 2012, 98-100
21. C McGuigan, A Brancale1, H Barucki, S Srinivasan, G Jones, R Pathirana, A Carangio, S Blewett, G Luoni , O Bidet, A Jukes, C Jarvis, G Andrei , R Snoeck, E De Clercq and J Balzarini, *Review* Furano pyrimidines as novel potent and selective anti-VZV agents, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, **2001**, 12, 77–89
22. 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

23. Komiotis D., Manta S., Tsoukala E. and Tzioumaki N., Antiviral Unsaturated Nucleosides, *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, **2008**, 7, 219-244
24. 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 Nucleosides 5-Alkynyl and Derived 5-Substituted Uracil Bases and Nucleosides, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 1854-1862
25. Vander, M. D. Sherman, Ph. D. Luciano, Ph. D. M. Tsakoulos, Φυσιολογία του ανθρώπου, μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού.
26. Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* **1995**, 67, 155.
27. Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* **2000**, 20, 417.
28. Vastmans, K.; Pochet, S.; Peys, A.; Kerremans, L.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Marliere, P.; Herdewijn, P. *Biochemistry* 2000, 39, 12757-12765.
29. Vastmans, K.; Froeyen, M.; Kerremans, L.; Pochet, S.; Herdewijn, P. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 3154-3163
30. Lewin, B. *Genes* **2003**, VIII, 6.
31. Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, **2005**, 4, 4.
32. 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.
33. 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.
34. Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43, 420-428.
35. Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevsek, A.; Pamulapati, R.T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 2696.
36. 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.

37. Fokin, V. V. *ACS Chem. Biol.*, **2007**, *2*, 775–778.
38. Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 1249–1262.
39. Johnson, J. A.; Koberstein, J. T.; Finn M. G.; Turro, N. J. *Macromol. Rapid Commun.*, **2008**, *29*, 1052–1072.
40. Huisgen, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565–598.
41. 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 Heterocycles with three or More Heteroatoms, pp. 415–601;
42. 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.
43. Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin V. V.; Van der Eycken, E. *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 4223–4225.
44. 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.
45. Urien, M.; Erothu, H.; Cloutet, E.; Hiorns, R. C.; Vignau, L. ; Cramail, H. *Macromolecules*, **2008**, *41*, 7033–7040.
46. Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 365.
47. 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." *Biochem Biophys Res Commun* 146(3): 1122-1131.
48. Leonidas, D. D., G. B. Chavali, *et al.*. High-resolution crystal structures of ribonuclease A complexed with adenylic and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors. *Protein Sci.* **2003**, *12*(11): 2559-2574.
49. Stimac, A; Kobe, J. An improved preparation of 2,3,5-tri-O-acyl- $\beta$ -D-ribofuranosylazides by the Lewis acid-catalyzed reaction of  $\beta$ -D-ribofuranosyl acetates and trimethyl silyl azide- An example of concomitant formation of the  $\alpha$ anomer by trimethyl silyl triflate catalysis. *Carbohydrate Research*, *232*: 359-365.

50. 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.

51. AN R. Van Rompay, Ameli Norda, Karin Lind En, Magnus Johansson, and Anna Karlsson. Phosphorylation of Uridine and