



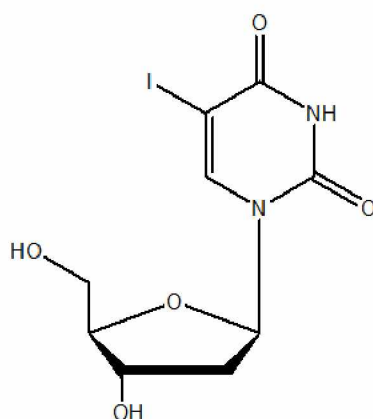
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΡΑ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τροποποιημένοι στη βάση νουκλεοζίτες ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες.
Σύνθεση, φασματοσκοπικός προσδιορισμός και βιολογική αποτίμηση.



ΛΑΡΙΣΑ 2020

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τροποποιημένοι στη βάση νουκλεοζίτες ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Σύνθεση, φασματοσκοπικός προσδιορισμός και βιολογική αποτίμηση.

Base-modified nucleosides as chemotherapeutical agents. Composition, spectroscopic definition and biological evaluation.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοοργανικής 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.

Ιδιαίτερος θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Κολλάτο Νικόλαο για την άψογη συνεργασία μας, τη βοήθεια, την υποστήριξη και την υπομονή του, καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές του, χάρη στις οποίες έγινε δυνατή η διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Μήτσο Χρήστο για τις πολύτιμες συμβουλές του, αλλά και το χρόνο που διέθεσε για την εισαγωγή μου στο πνεύμα του εργαστηρίου της βιοοργανικής χημείας.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη συμβασιούχο διδάσκοντα του εργαστηρίου, Δρ. Τζιουμάκη Νίκη, για τη βοήθειά της, τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις της κατά τη συγγραφή της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1. Υδατάνθρακες	7
1.2. Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης	7
1.3. Νουκλεοζίτες	10
1.4. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών.....	13
1.5. Νουκλεοζίτες ως αντιϊικοί παράγοντες.....	14
1.5.1. Zidovudine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine).....	16
1.5.2. DDI ή Didanosine.....	17
1.5.3. DDC ή Zalcitabine.....	18
1.6. Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες.....	18
1.7. Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στη βάση	19
5-ΐωδο-2ΐ-δεοξουριδίνη (IdUrd, IUdR, IDU, Ιδοξουριδίνη).....	20
Παράδειγμα με τροποποίηση στη βάση του νουκλεοζίτη	22
1.8. Συμπεράσματα.....	23
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	24
2.1. Σκοπός.....	24
3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	25
3.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC:Thin Layer Chromatography)	25
3.2. Χρωματογραφία στήλης.....	26
3.3. Ξήρανση διαλυτών.....	27
3.4. Ταυτοποίηση ενώσεων	28
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	28
4.1. Επισκόπηση της σύνθεσης	28
4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης	28
4.2.1Ακετυλίωση της 5-ΐωδο-2ΐ-δεοξουριδίνης	29
4.2.2 Σύνθεση των 3, 4, 5	30
4.2.3 Σύνθεση των 6, 7, 8	30
5.ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹ HNMR.....	32
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	32
7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	34

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με τον όρο νουκλεοζίτες αναφερόμαστε στα παράγωγα σύζευξης μιας αζωτούχου βάσης με ένα σάκχαρο. Αποτελούν βασικά συστατικά των ζωντανών οργανισμών, καθώς απαντούν στα μόρια του DNA και του RNA που μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες, ενώ στην τριφωσφορική μορφή τους αποτελούν πηγή ενέργειας ή φωσφορικών ομάδων σε κυτταρικές διεργασίες. Επιπλέον κάποιοι χρησιμοποιούνται ως φάρμακα.

Ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο αποτελούν οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες και συγκεκριμένα αυτοί με τροποποιήσεις είτε στο τμήμα της βάσης είτε σε αυτό του σακχάρου, με σκοπό την αξιολόγησή τους για πιθανή αντιϊκή, αντιβιοτική και αντικαρκινική δράση.

Η παρούσα διπλωματική εργασία, έχει ως θέμα την περιγραφή της συνθετικής πορείας νέων φουρανουκλεοζιτών, με τροποποίηση στη βάση, με απώτερο σκοπό τον έλεγχο της βιολογικής τους δράσης ως αντιϊκοί και αντικαρκινικοί παράγοντες. Αναλύονται οι συνθετικές οδοί που ακολουθήθηκαν, οι μέθοδοι που πραγματοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα ταυτοποίησής τους, καθώς και η βιολογική τους αποτίμηση.

ABSTRACT

By the term nucleosides we refer to the products of the coupling of a nitrogenous base with a sugar. They are key ingredients of living organisms as they are part of DNA and RNA molecules which carry genetic information, whereas in their triphosphate form are energy or phosphate group sources in cellular functions. Moreover some of them are used as drugs.

Modified nucleosides, specifically those having structural modifications either on the base or the sugar segment, are an important research field in order to evaluate their potential antiviral, antibiotic and anticancer activity.

This diploma thesis' subject is to describe the synthetic pathways of new base modified furanonucleosides, aiming to test their biological action as antiviral and anticancer agents. The synthetic pathways that were followed, the methods that were 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 πολυϋδροξυ-αλδεΐδες, πολυϋδροξυ-κετόνες ή ενώσεις που μπορούν να υδρολυθούν προς πολυϋδροξυκαρβονυλικές ενώσεις. Έχουν κατά κανόνα το γενικό τύπο $C_n(H_2O)_m$, δηλαδή n άτομα άνθρακα και m μόρια νερού, τύπος απ' τον οποίο πήραν το όνομα υδατάνθρακες. Οι υδατάνθρακες που δε μπορούν να υδρολυθούν προς απλούστερες ενώσεις, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, λέγονται μονοσακχαρίτες. Οι υδατάνθρακες που μπορούν να υδρολυθούν προς δύο μόρια μονοσακχαριτών, όπως η σακχαρόζη, η λακτόζη και η μαλτόζη, λέγονται δισακχαρίτες, ενώ αυτοί που μπορούν να υδρολυθούν προς πολλά μόρια μονοσακχαριτών λέγονται πολυσακχαρίτες και τέτοιοι είναι το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη.

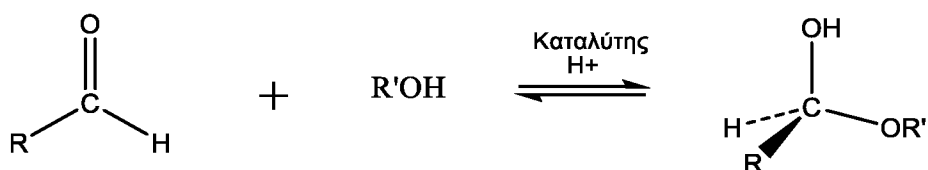
Οι μονοσακχαρίτες ή απλά σάκχαρα, χαρακτηρίζονται ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα του μορίου τους, που μπορεί να είναι τρία ή περισσότερα, ως τριόζες, τετρόζες, πεντόζες, εξόζες κλπ, με τις πεντόζες και τις εξόζες να είναι οι σπουδαιότεροι μονοσακχαρίτες. Όσον αφορά τους πολυσακχαρίτες, δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός ενός μεγάλου ολιγοσακχαρίτη κι ενός πολυσακχαρίτη με μικρό μοριακό βάρος καθώς οι ενώσεις που περιγράφονται μ' αυτούς τους όρους, παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος τιμών.

Έχουν πολύ μεγάλη βιολογική σημασία, καθώς αποτελούν πηγή ενέργειας, δομικά στοιχεία των κυττάρων και άλλων μακρομορίων όπως οι γλυκοπρωτεΐνες, οι λιποπολυσακχαρίτες και τα νουκλειικά οξέα (ανάγοντες μονοσακχαρίτες, ριβόζη και δεοξυριβόζη).

1.2. Κυκλικές δομές μονοσακχαριτών: σχηματισμός ημιακετάλης

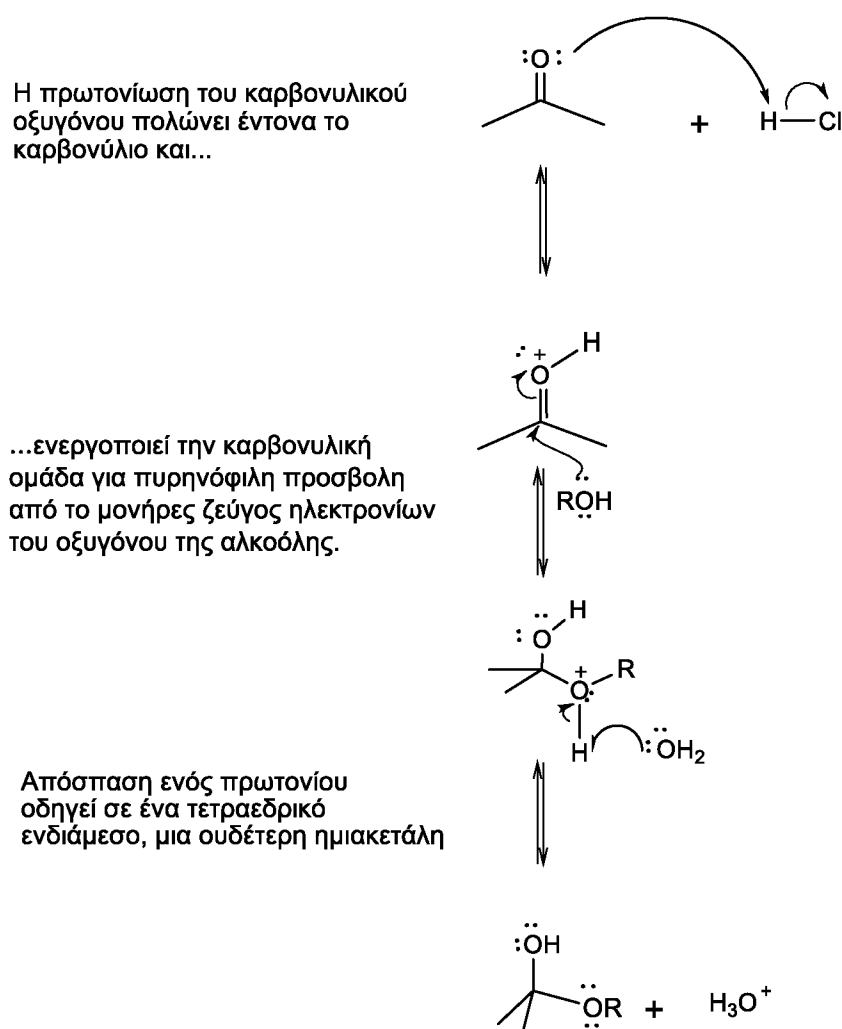
Όταν μια αλδεΐδη αντιδρά με ένα μόριο αλκοόλης, δίνει μία ημιακετάλη, ενώ όταν αντιδρά με ένα δεύτερο μόριο αλκοόλης, δίνει μια ακετάλη. Οι ημιακετάλες είναι ασταθείς ενώσεις (Morisson&Boyd, 1991, p. 758), ενώ οι

περισσότερες ημιακετάλες διασπώνται αυθόρμητα προς αλδεΐδη και αλκοόλη, οπότε σπάνια απομονώνονται.



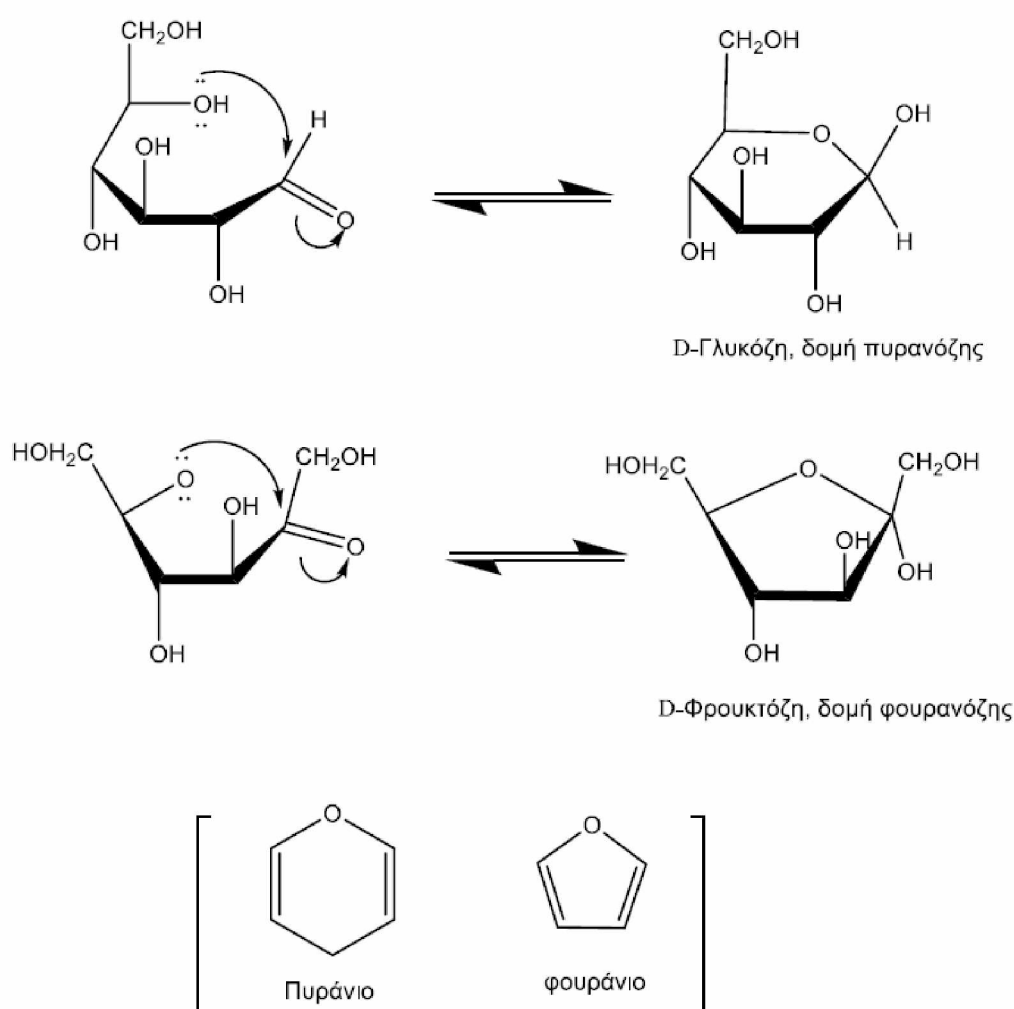
Σχήμα 1: Σχηματισμός ημιακετάλης

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



Σχήμα 2: Μηχανισμός αντίδρασης σχηματισμού ημιακετάλης

Αν η αλδεϋδομάδα και η υδροξυλομάδα ανήκουν στο ίδιο μόριο, προκύπτει μια κυκλική ημιακετάλη. Οι κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερές αν καταλήγουν σε πεντα- ή εξαμελείς δακτυλίους, γι' αυτό και πολλοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα σε δομές ανοικτής και κλειστής αλυσίδας. Η γλυκόζη, για παράδειγμα, σε υδατικό διάλυμα απαντάται με τη δομή του εξαμελούς δακτυλίου της πυρανόζης, που οφείλεται στην ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη του $-OH$ του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C1. Η φρουκτόζη, αντίθετα, απαντά με τη δομή του πενταμελούς δακτυλίου της φουρανόζης, που σχηματίζεται από την προσθήκη του $-OH$ του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C2.



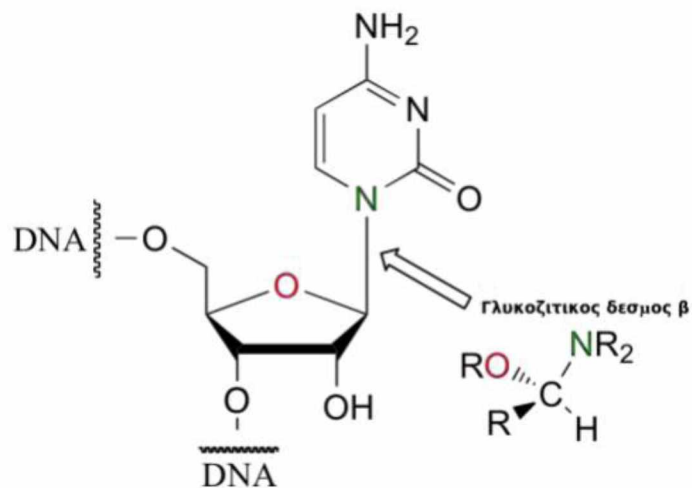
Εικόνα 1: Κυκλικές δομές πυρανόζης και φουρανόζης

Έτσι, η δομή της πυρανόζης ή της φουρανόζης αποκτάται καθώς κυκλοποιείται η ανοιχτή αλυσίδα ενός μονοσακχαρίτη κι έτσι προκύπτει ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Τα δύο νέα διαστερομερή ονομάζονται ανωμερή και ο ημιακεταλικός άνθρακας, ανωμερικό κέντρο. (McMurry 2000, p. 1249)

Οι δακτύλιοι της φουρανόζης είναι πιο ευέλικτοι απ' αυτούς της πυρανόζης, γι' αυτό και επιλέγονται ως συστατικά του RNA και του DNA. (Stryer 1995)

1.3. Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς της φύσης καθώς αποτελούν δομικά και πρόδρομα στοιχεία του DNA και του RNA. Νουκλεοζίτης ονομάζεται μια μονάδα που αποτελείται από μια βάση δεσμευμένη σε ένα σάκχαρο πεντόζη. Η βάση μπορεί να είναι μία πουρίνη (αδενίνη, γουανίνη) ή μία πυριμιδίνη (κυτοσίνη, θυμίνη, ουρακίλη). Οι τέσσερις νουκλεοζιτικές μονάδες του DNA λέγονται δεοξαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυθυμιδίνη και δεοξυκυτιδίνη. Αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, τότε πρόκειται για ριβονουκλεοζίτη και δεοξυριβονουκλεοζίτη αντίστοιχα. Η σύνδεση ενός ή περισσότερων φωσφορικών ομάδων στο C-5 του σακχάρου μετατρέπει τον νουκλεοζίτη σε νουκλεοτίδιο το οποίο πάλι αναλόγως της φύσης της πεντόζης καλείται ριβονουκλεοτίδιο ή δεοξυριβονουκλεοτίδιο. Στα ριβονουκλεοτίδια το άτομο C-1 της δεοξυριβόζης δεσμεύεται στο N-1 μιας πυριμιδίνης ή στο N-9 μιας πουρίνης. Σε όλα τα φυσικά μακρομόρια η διαμόρφωση αυτού του νουκλεοτιδικού δεσμού είναι μορφής β, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου (Stryer 1997, Page *et al.* 1997). (Σχήμα 3)

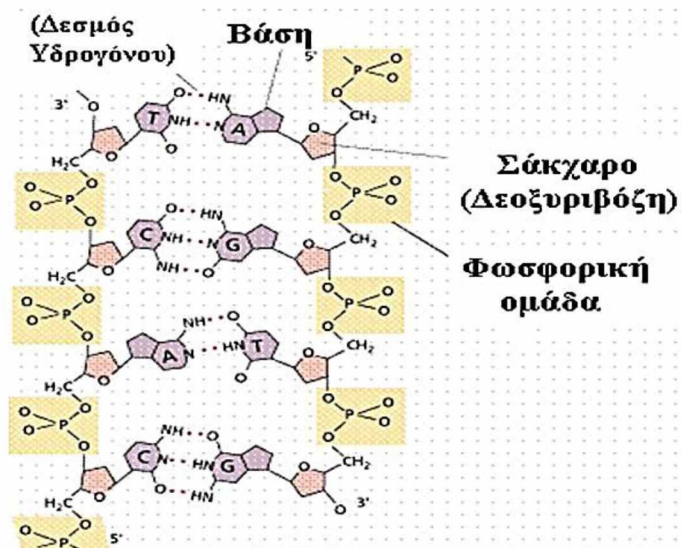


Σχήμα 3: Ο N- γλυκοζιτικός δεσμός β σε ένα νουκλεοζίτη

Με τη σύνδεση των νουκλεοτιδίων με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, σχηματίζονται οι δομικές μονάδες των νουκλεϊνικών οξέων. Η φωσφορική ομάδα στην 5' θέση του δεύτερου νουκλεοτιδίου εστεροποιείται με την ελεύθερη υδροξυλομάδα στην 3' θέση ενός άλλου νουκλεοτιδίου, κ.ο.κ. Έτσι δημιουργούνται δινουκλεοτίδια, τρινουκλεοτίδια, τετρανουκλεοτίδια, ολιγονουκλεοτίδια και τέλος πολυνουκλεοτίδια. Όταν το νουκλεϊκό οξύ περιέχει D-ριβόζη ως υδατάνθρακα, ονομάζεται ριβονουκλεϊνικό οξύ, ενώ αν περιέχει D-2-δεοξυριβόζη ονομάζεται δεοξυριβονουκλεονικό οξύ, τα γνωστά RNA και DNA (Γεωργάτσος 1993).

DNA

(Διπλή έλικα)



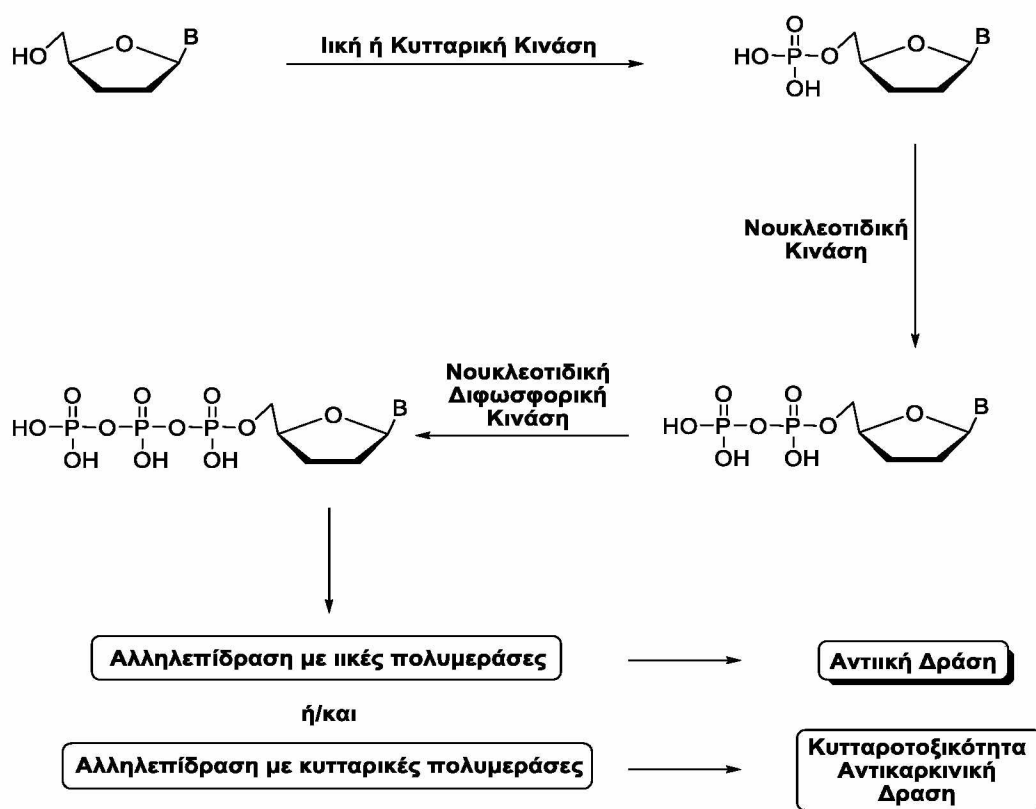
Εικόνα 2: Οι δεσμοί στην διπλή έλικα DNA

Ανάλογα φυσικών νουκλεοζιτών έχουν παρουσιάσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω των αντικαρκινικών, αντιϊικών, αντιβακτηριδιακών, καθώς και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους (Zhou *et al.* 2004, Perigaud *et al.* 1992, Robins *et al.* 1990, MacCoss *et al.* 1990), κι αυτές τους οι ιδιότητες τα κατέστησαν αντικείμενο πολλών ερευνητικών προγραμμάτων (Hartman and Coward 2002). Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά φυσικά αντιβιοτικά με σημαντική αντιϊκή και αντικαρκινική δράση περιέχουν στη δομή τους νουκλεοζίτες συνδεδεμένους με ολιγοσακχαρίτες. (Κυρίτσης 2010). Ως εκ τούτου έχουν πραγματοποιηθεί πολλές τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα της βάσης όσο και του σακχάρου των φυσικών νουκλεοζιτών με απώτερο σκοπό να διευρυνθεί ενδελεχώς το φάσμα των θεραπευτικών τους ιδιοτήτων.

1.4. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών

Γενικά τα φάρμακα δρουν με ένα πολύ συγκεκριμένο τρόπο, που βασίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό στόχο, ο οποίος μπορεί να είναι κάποια πρωτεΐνη, όπως ένας υποδοχέας, ένας δίαυλος ιόντων, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφορέας, ή νουκλεϊνικά οξέα. Τον ίδιο τρόπο δράσης έχουν και τα νουκλεοζιτικά ανάλογα με αντιϊκή ή αντικαρκινική δράση, τα οποία εξαιτίας της δυνατότητας μεταφοράς τους εντός των κυττάρων με παθητική διάχυση είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία αρκετών ασθενειών (Zhou *et al.* 2004).

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών στην πραγματικότητα αποτελούν ανενεργά προφάρμακα, τα οποία ενδοκυτταρικά πρέπει να τροποποιηθούν για να πραγματοποιηθεί η δράση τους. Η διαδικασία αυτή συνίσταται στη φωσφορυλίωσή τους από τις κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες (Arner and Eriksson 1995). Αφού φωσφορυλιωθούν 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 (σχήμα 4).



Σχήμα 4: Φωσφορυλίωση νουκλεοζιτικών αναλόγων από κυτταρικές ή ιϊκές κινάσες

Ένας κοινός μηχανισμός αντιϊικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωσή τους στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της. Οι κυτταρικές πολυμεράσες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με ταυτόχρονη απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των νουκλεοτιδίων (Lewin 2003, Burns *et al.* 2005). Εάν ένα ανάλογο νουκλεοτιδίων δεν έχει μια ομάδα 3'-υδροξυλίου, δεν μπορεί να ενωθεί με τη 5'-φωσφορική ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου, και αυτό παρεμποδίζει αποτελεσματικά την επιμήκυνση της αλυσίδας. Μέρος της εκλεκτικότητας των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των κυττάρων που είναι μολυσμένα με τον ιό, οφείλεται στην συγγένεια του νουκλεοζιτικού αναλόγου με την ιϊκή πολυμεράση, οπότε όσο μεγαλύτερη η συγγένεια, τόσο μεγαλύτερη η εκλεκτικότητά τους ως θεραπευτικοί παράγοντες.

Εκτός από τους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν, 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).

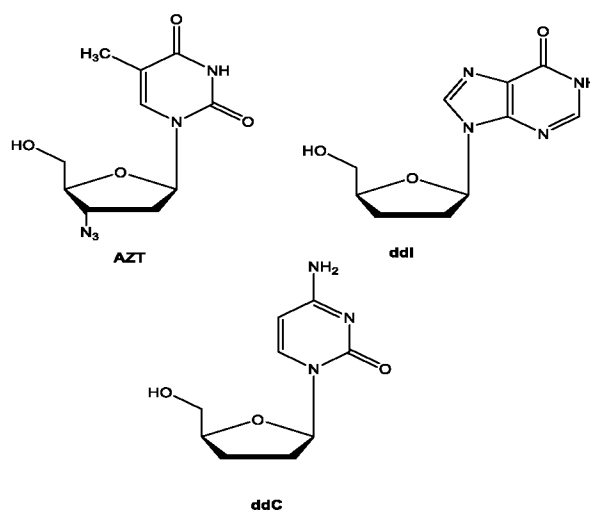
Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτών, οι οποίοι δρουν ως αντιβιοτικά βασίζεται είτε στο ότι καταστρέφουν συγκεκριμένα τμήματα των βακτηρίων, όπως τη μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμά τους, είτε στο ότι επιδρούν στην σύνθεση των πρωτεϊνών (Siev *et al.* 1969) και στη μεταφορά ιόντων μέσω της πλασματικής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

1.5. Νουκλεοζίτες ως 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. Με αυτόν τον τρόπο παρέχουν ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιϊικών φαρμάκων (Komiotis D. *et al.*, 2008, Zhou W. *et al.*, 2004, Perigaud 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 βάση στη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τον ιό του απλού έρπητα (HSV), τον ανθρωπινό κυτταρομεγαλιό (HCMV), τον ιό του έρπητα ζωστήρα (VZV), τον ιό της ανθρωπίνης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV) και τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) και C (HCV).

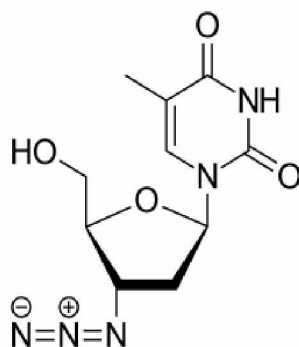
Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα από τα νουκλεοζιτικά αυτά ανάλογα είναι το zidovudine (AZT), το didanosine (DDI) και το zalcitabine (DDC), τα οποία χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα εναντίον του HIV (σχήμα 5). Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως τα νουκλεοσιδικά αυτά ανάλογα διαθέτουν ως σάκχαρο μία πεντόζη (Λαζαρίδη 2016).



Σχήμα 5: Χημικές δομές των AZT, ddi, ddc

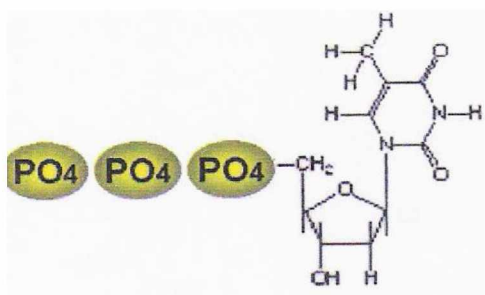
1.5.1. Zidovudine (AZT: 3'-Azido-2'-deoxythymidine)

Το Zidovudine ή AZT (3'-αζιδο-2'-δεοξυθυμιδίνη) ήταν το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία του AIDS. 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. 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). (Αλεξούλη 2019)



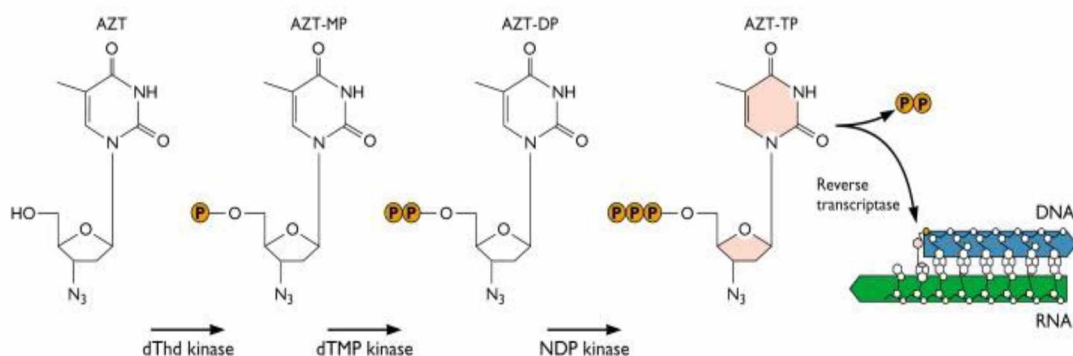
Σχήμα 6: Η χημική δομή του AZT

Πρόκειται για 2',3'-διδεοξυνουκλεοζίτες που προκύπτουν από την απομάκρυνση των υδροξυλομάδων από τις 2',3'-θέσεις του δακτυλίου της ριβόζης. Δρουν σαν αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης η οποία 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 (Παπανικολάου κ.ά.2015). Τα συγκεκριμένα ανάλογα νουκλεοζιτών αναστέλλουν τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή του ιϊκού DNA. Τα κυτταρικά ένζυμα μετατρέπουν το Zidovudine σε ενεργή μορφή 5'-τριφωσφορικού άλατος (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Στη θυμιδίνη προστίθενται τρεις φωσφορικές ομάδες. Η πρώτη φωσφορυλίωση γίνεται από το ιϊκό ένζυμο και οι υπόλοιπες από τα κυτταρικά ένζυμα.

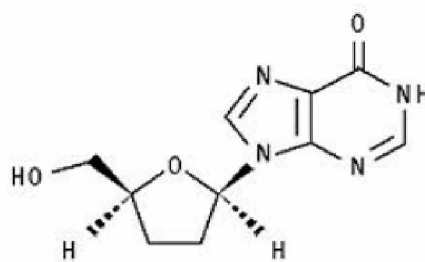
Έτσι, φωσφορυλιώνεται από τα κυτταρικά ένζυμα στην ενεργή του μορφή και δρα ως αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης τερματίζοντας την αλυσίδα μόλις συνδεθεί στο DNA (σχήμα 8). Επειδή έχει την αζιδο-ομάδα αντί για την υδροξυλομάδα, η επόμενη βάση δεν μπορεί να ενωθεί και η σύνθεση της αλυσίδας σταματά.



Σχήμα 8: Τερματισμός της αλυσίδας του ιϊκούDNA από το φωσφορυλιωμένο AZT

1.5.2. DDI ή *Didanosine*

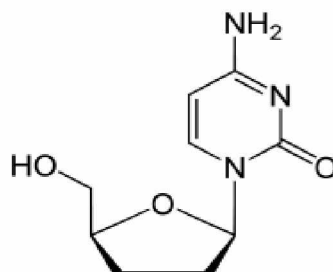
Το DDI είναι ένα συνθετικό πουρινικό νουκλεοσιδικό ανάλογο δραστικό ενάντια στον ιό της ανθρώπινης επίκτητης ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1). Η δράση του είναι παρόμοια με τη δράση του AZT στο να παρεμποδίζει την λειτουργία της ιϊκής αντίστροφης μεταγραφάσης.



Σχήμα 9: Η χημική δομή του 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.

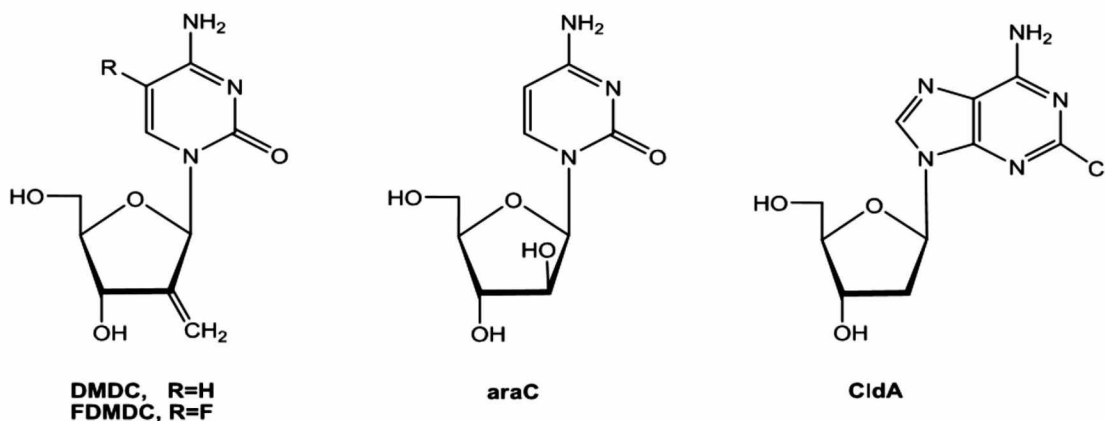


Σχήμα 10: Η χημική δομή του DDC

1.6. Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες

Σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει, οι νουκλεοζίτες αποτελούν μία σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών μέσων, καθώς επηρεάζουν τη σύνθεση του DNA με διάφορους τρόπους. Ένας μεγάλος αριθμός αναλόγων φυσικών νουκλεοζιτών χρησιμοποιείται ήδη για τη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου, ενώ τα νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμεύουν ως δυνητικά αντικαρκινικοί παράγοντες (Plunkett and Gandhi 2001, Elion 1989, Denny and Wilman 1990).

Πιο συγκεκριμένα για τη φαρμακευτική αντιμετώπιση πολλών νεοπλασιών χρησιμοποιούνται νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες οι οποίοι στοχεύουν στην παρεμπόδιση σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Οι 1-(2'-δεοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC), 1-(2'-δεοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθροπεντοφουρανοζυλο)-5-φθοροκυτοσίνη (FDMDC), 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (araC) και 2-χλωρο-2'-δεσοξυαδενοσίνη (CldA) έδειξαν άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών, όπως διάφοροι τύποι λεμφωμάτων και λευχαιμίας (Cory *et al.* 1994, Pontikis *et al.* 1995, Yamagami *et al.* 1991, Lin *et al.* 1991, Baker *et al.* 1991, Matsuda and Sasaki 2004).

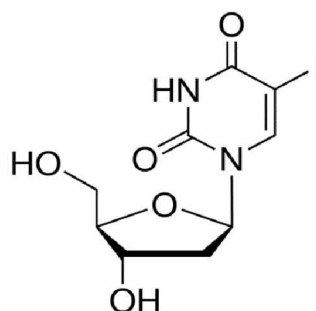


Σχήμα 11: Χημικές δομές των νουκλεοζιτικών αντιμεταβολιτών DMDC, FDMDC, araC και CldA.

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

1.7. Νουκλεοσιδικά ανάλογα με τροποποίηση στη βάση

Ο πρώτος κλινικά αποτελεσματικός νουκλεοζίτης που εγκρίθηκε ήταν η 5-ιώδο-2'-δεοξουριδίνη (Σχήμα 12) στις αρχές του 1960, του οποίου η σύνθεση ήταν μέρος ενός αντικαρκινικού προγράμματος (W. H. Prusoff, 1959).

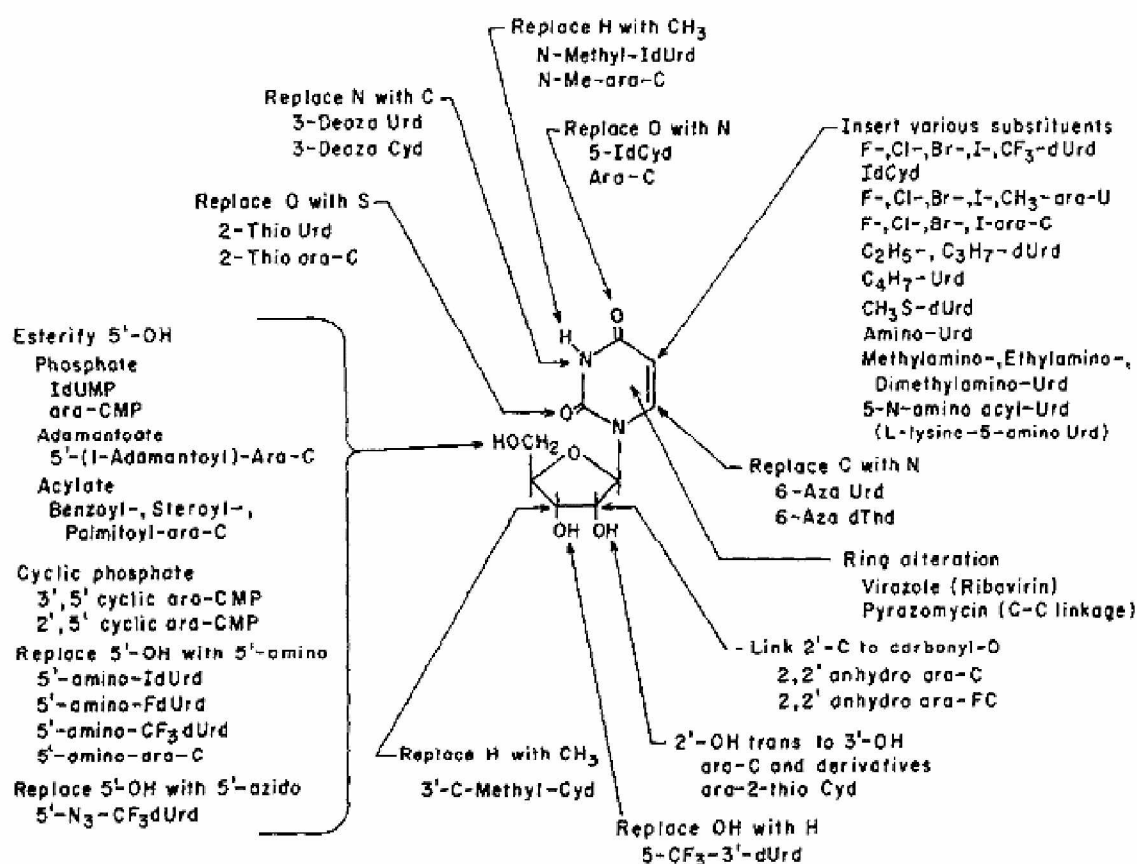


Σχήμα 12: Χημική δομή της 5-ιώδο-2'-δεοξουριδίνης

Ήδη από το 1905 είχε αναφερθεί η σύνθεση 5'-ιωδοπυριμιδινών (Johnson and Johns, 1905-06). Το 1945, οι Hitchings *et al* (G. H. Hitchings *et al.*, 1945) ξεκίνησαν συστηματική μελέτη της βιολογικής δράσης διαφόρων παραγόντων, κυρίως της πουρίνης και της πυριμιδίνης. Τελικά το 1949 (R. L. Thompson *et al.*, 1949) τεκμηριώθηκε η μέτρια αναστολή της αντιγραφής του ιού της

δαμαλίτιδας σε κυτταρική καλλιέργεια, από την 5-βρωμουρακίλη, την 5-υδροξουρακίλη και τη 2,4-διθειοθυμίνη. Επίσης βρέθηκε ότι (Visser *et al.*, 1952) διάφορα 5-υποκατεστημένα παράγωγα της ουριδίνης (5-χλώρο, 5-δίαζο, 5-φορμαμιδο, 5-υδρόξυ και 5-άμινο) ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό του ιού της εγκεφαλίτιδας του ποντικού Theiler σε καλλιέργεια εγκεφάλου ποντικού.

Ένα παράδειγμα που αναπαριστά όλους τους τύπους τροποποίησης που αποδίδουν νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση φαίνεται στο Σχήμα 13.



Σχήμα 13: Τύποι τροποποίησης που αποδίδουν νουκλεοζίτες με αντιϊκή δράση.

5-Ίωδο-2'-δεοξουριδίνη (IdUrd, IUdR, IDU, Ιδοξουριδίνη)

Οι χημικές, βιοχημικές και κλινικές δοκιμές της IdUrd (Σχήμα 12) έχουν ήδη αναφερθεί στο παρελθόν (W. H. Prusoff and B. Goz., 1975, W. H. Prusoff and B. Goz., 1973). Η σημαντικότητα της IdUrd έγκειται στο ότι χάρη σ' αυτή μπορεί να αναπτυχθεί ένα νουκλεοτιδικό φάρμακο με αντιϊκές ικανότητες. Η IDU είχε περιγραφεί ως ένας αντι-HSV παράγοντας για τη θεραπεία της

ερπητικής κερατίτιδας από τους Kaufman *et al.* [6-9]. Η αποτελεσματικότητα της Ιδοξουριδίνης στη θεραπεία του απλού έρπητα 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) να αυξάνει το ρυθμό μετάλλαξης των βακτηρίων, 3) να δημιουργεί χρωμοσωμικές βλάβες και, 4) να επηρεάζει την εμβρυϊκή ανάπτυξη και διαφοροποίηση (W. H. Prusoff and B. Goz, 1975).

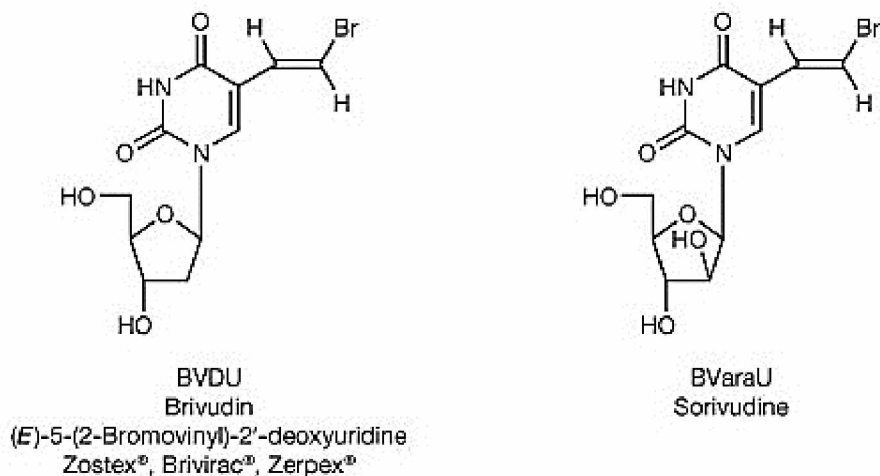
Παρά τις παρενέργειες, η IdUrd δείχνει να είναι η πρώτη ένωση που παρουσιάζει επιτυχημένη θεραπεία μιας καθιερωμένης λοίμωξης από ιό στον άνθρωπο.

Μετά τη σύνθεση της 5-ιωδο-2'-δεοξουριδίνης (IDU) (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 έρπητα, ιδιαίτερα του ιού απλού έρπητα 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).

Παράδειγμα με τροποποίηση στη βάση του νουκλεοζίτη

Η IDU μπορεί να θεωρηθεί ως το σημείο εκκίνησης για την σύνθεση διαφόρων νέων παραγώγων 5-υποκατεστημένων-2'-δεοξουριδίνης. Το πιο σημαντικό παράγωγο αυτής της σειράς είναι η (*E*)-5-(2-βρωμοβίνυλο)-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-βρωμοβίνυλο)ουρακίλη (BVaraU), βρέθηκε ότι είναι εξίσου ισχυρή, αν όχι και περισσότερο από το BVDU, κατά του ιού VZV.



Σχήμα 14: Οι ενώσεις (*E*)-5-(2-βρωμοβίνυλο)-2'-δεοξουριδίνη και BVaraU, με ισχυρή δράση έναντι του ιού ανεμοβλογιάς-ζωστήρα.

Η BVaraU εμφανίζει αντιϊκή δράση και έναντι εργαστηριακών στελεχών και απομονωμένων κλινικών προϊόντων όταν δοκιμάζεται σε διάφορους ανθρώπινους ινοβλάστες και σε κυτταρική σειρά ινοβλαστών πιθήκου (Haruhiko M. *et al.* 1991).

1.8. Συμπεράσματα

Το συμπέρασμα είναι ότι υπάρχει ανάγκη για αντιϊικά παράγωγα με σημαντικά μικρότερη τοξικότητα. Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά τέτοιων αντιϊικών φαρμάκων πρέπει να είναι: 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, 7) όχι ανοσοκαταστολή, 8) μη ενεργοποίηση του ιού, 9) μη τερατογόνος δράση και, 10) μη μεταλλαξιγένεση ή καρκινογένεση.

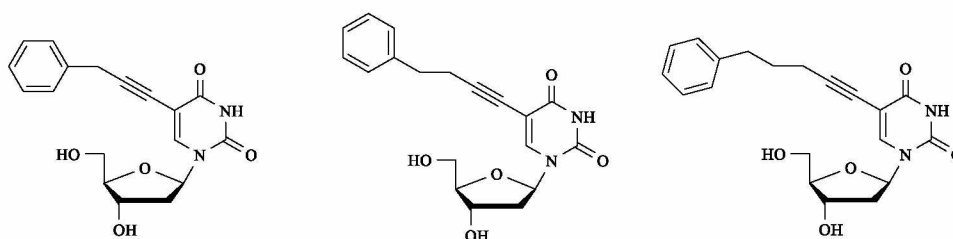
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Σκοπός

Με τη ραγδαία ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας που υπάρχει στις μέρες μας, έχουν επενδυθεί χρήματα και χρόνος στη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά, πληθώρας φαρμάκων που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο. Η επιστήμη καλείται να καλύψει τις ανάγκες που υπάρχουν για την εύρεση νέων θεραπευτικών ουσιών, με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες παρενέργειες. Αντικείμενο της εργασίας λοιπόν είναι η σύνθεση νέων τροποποιημένων νουκλεοζιτών ως εν δυνάμει αντιϊικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες. Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες σε νέες τάξεις φουρανουκλεοζιτών με τροποποιημένη βάση, οι οποίες έχουν δώσει ενδιαφέροντα αποτελέσματα σχετικά με τη βιολογική δράση των φουρανουκλεοζιτών ως αντιϊικών και αντικαρκινικών παραγόντων.

Οι C5-υποκατεστημένες 2'-δεοξουριδίνες έχουν παρουσιάσει σημαντικές αντιϊικές (DeClercq *et al.*, 1983, Efanega *et al.*, 1985), αντικαρκινικές (Vincent *et al.*, 1985) και αντιμικροβιακές (Rai *et al.*, 2005) ιδιότητες. Συγκεκριμένα, η 5-αιθυνο-2'-δεοξουριδίνη, έχει ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του μαστού MCF-7 με IC_{50} $0.4 \pm 0.3 \mu M$ και MDA-MB-231 με IC_{50} $4.4 \pm 0.4 \mu M$. Η 4-(μεθυλοφαινυλο)αιθυνο-2'-δεοξουριδίνη έδειξε υψηλή ανασταλτική δράση έναντι των MCF-7 με IC_{50} $0.9 \pm 0.2 \mu M$ συγκρίσιμη με αυτήν της σισπλατίνης (Cisplatin) (Meneni *et al.*, 2007), ενώ η 5-δωδεκυνο-2'-δεοξουριδίνη και η 5-τετραδεκυνο-2'-δεοξουριδίνη επέδειξαν ισχυρή αντιμικροβιακή ικανότητα έναντι των *M. Bovis* και *M. avium* (Rai *et al.*, 2005).

Με βάση τα παραπάνω, αποφασίσαμε να σύνθεσουμε νέους C5 τροποποιημένους 2'-δεοξουριβοφουρανουκλεοζίτες της ουρακίλης.



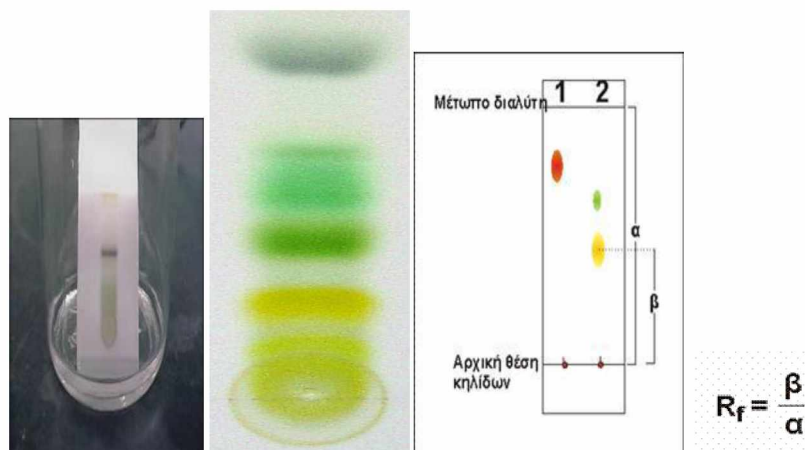
3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC:Thin Layer Chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Πρόκειται, για πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F₂₄) 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. Στη συνέχεια, ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να φθάσει λίγα χιλιοστά πριν το ύψος της πλάκας. Έπειτα, 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 την χημική συγγένεια που έχουν με την Silica gel και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση την απόσταση που έχει διανύσει το κάθε μόριο στη στατική φάση πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης R_f. Ο συντελεστής R_f, ορίζεται από το λόγο: απόσταση που διανύθηκε από την ένωση (β) προς την απόσταση που διανύθηκε από το διαλύτη (α). 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 H₂SO₄ (θειϊκού οξέος) 30%.

Μια χρωματογραφία λεπτής στιβάδας απεικονίζεται στο Σχήμα 15.



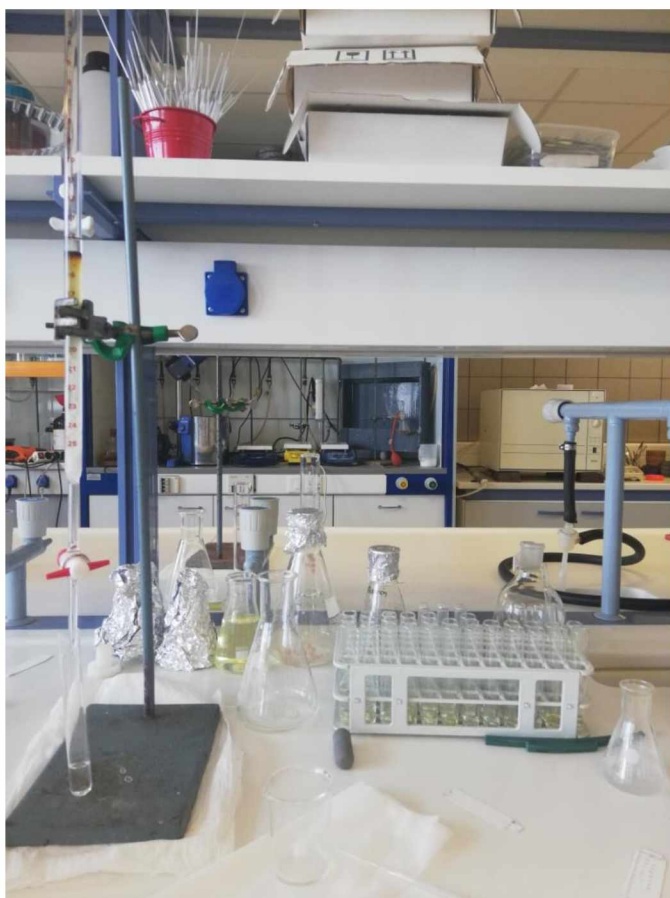
Σχήμα 15: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

3.2. Χρωματογραφία στήλης

Κατά την απομόνωση μιας χημικής ένωσης, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαριστεί από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό της, είναι η χρωματογραφία στήλης και επιτυγχάνεται με τη διοχέτευση της κινητής φάσης με τη βοήθεια 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 κινητή φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών. Οι πολικές ουσίες προσροφώνται 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, πηκτή πυριτίας, ανοξειδωτος χάλυβας). Το δείγμα τοποθετείται στην αρχή (κορυφή) της στήλης και η κινητή φάση διέρχεται εξαναγκασμένα μέσω της στατικής φάσης με την εφαρμογή πίεσης σε αυτήν ή λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από την συγγένεια των συστατικών ως προς την στατική φάση.



Εικόνα 3: Χρωματογραφία στήλης

3.3. Ξήρανση διαλυτών

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

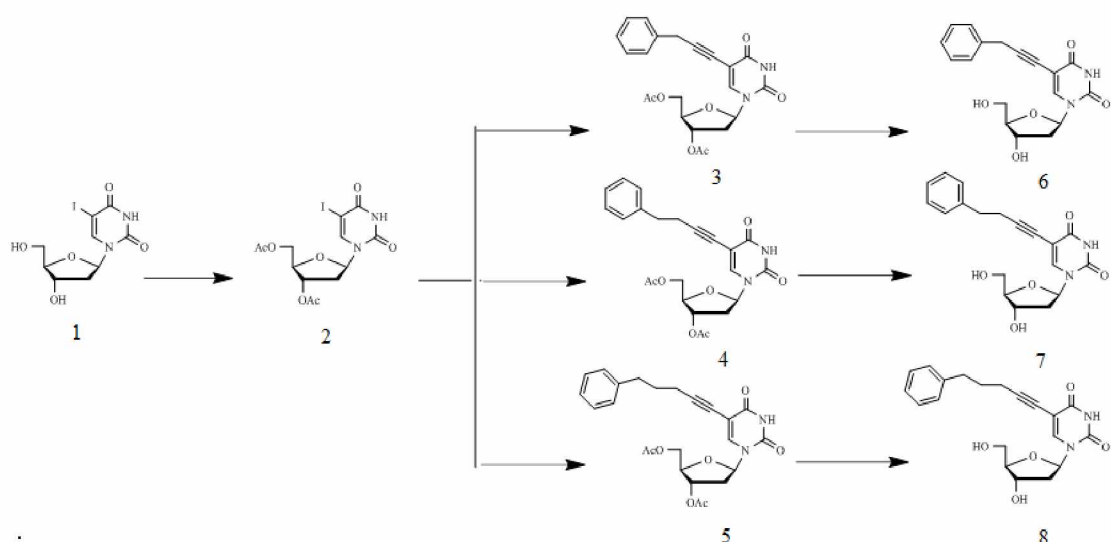
Η ξήρανση του ακετονιτριλίου και του τολουολίου γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε. Η ξήρανση της μεθανόλης γίνεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου για μία ώρα.

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.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1. Επισκόπηση της σύνθεσης



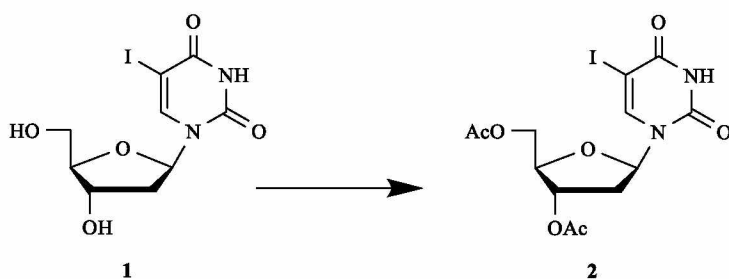
4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης

Η πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη 2'-δεοξυ-5-ιωδοουριδίνη **1** η οποία αρχικά ακετυλιώνεται παρουσία οξικού ανυδρίτη (Ac₂O) για να προκύψει το προστατευμένο προϊόν **2**. Στη συνέχεια με αντίδραση Sonogashira παίρνουμε τα προστατευμένα προϊόντα **3**, **4**, **5**, όπου ο φούρανουκλεοζίτης 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) (συγκатаλύτης) και του τετράκις(τριφαινυλοφωσφίνο) παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄]

(καταλύτης), πραγματοποιήθηκε η σύζευξή τους υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων ισχύος 200W για 5 λεπτά στους 60°C, σε αποδόσεις 69-74%

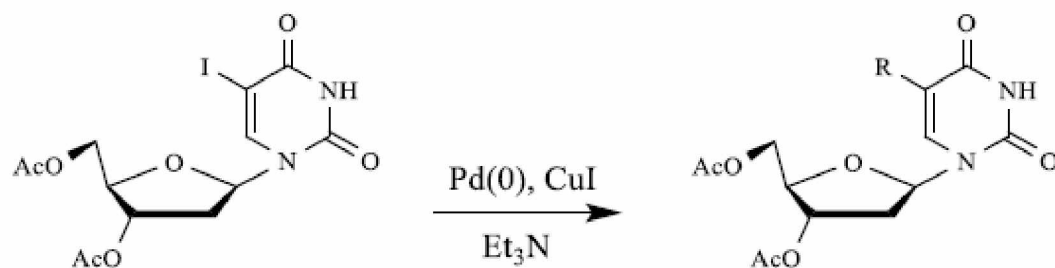
Τέλος, η σύνθεση ολοκληρώνεται με την αποπροστασία των προϊόντων **3**, **4**, **5** σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, παίρνοντας τους προστατευμένους νουκλεοζίτες **6**, **7**, **8** σε αποδόσεις 91-92%.

4.2.1 Ακετυλίωση της 5-ιώδο-2'-δεοξουριδίνης



Το πρώτο βήμα της συνθετικής μας πορείας είναι η ακετυλίωση της εμπορικά διαθέσιμης 2'-δεοξουριδίνης (200mg, 0,56 mmol) σε πυριδίνη (1ml) με ανάδευση με οξικό ανυδρίτη (0,5ml). Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται μεθανόλη (0,24ml) σε πάγο και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Ακολουθεί εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, έκπλυση διαδοχικά με όξινο θειικό νάτριο, όξινο ανθρακικό νάτριο και νερό, ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο Na₂SO₄, διήθηση και συμπύκνωση υπό κενό με αποτέλεσμα τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος **2** (198 mg) με απόδοση 89%.

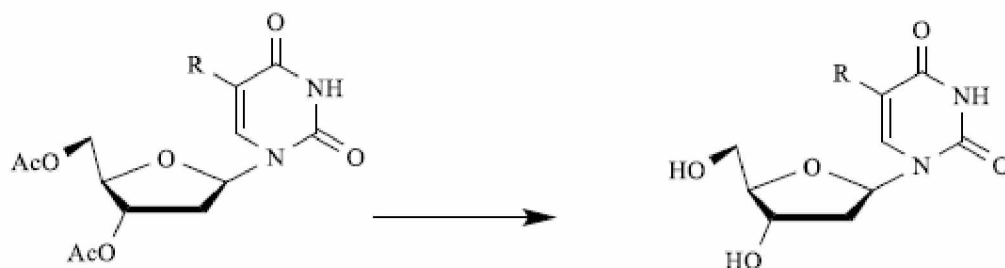
4.2.2 Σύνθεση των 3, 4, 5



R : 3-phenyl prop-1-ynyl (**3**), 3-phenyl but-1-ynyl (**4**), 3-phenyl pent-1-ynyl (**5**)

Για τη σύνθεση των **3**, **4**, **5** ακολουθήθηκε η μέθοδος Sonogashira με χρήση μικροκυμάτων. Συγκεκριμένα στο διάλυμα της ακετυλιωμένης 2'-δεοξυιωδοουριδίνης (**2**) (50mg, 0,114 mmol) σε άνυδρο *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) 5ml προστίθενται 0,342 mmol του κατάλληλου αλκινίου, τετράκις(τριφαινυλοφωσφίνο) παλλάδιο [Pd(PPh₃)₄] (13mg, 0,011 mmol), ιωδιούχος χαλκός (2 mg, 0,011mmol), τριαιθυλαμίνη (0,342 mmol, 0,047ml) και στη συνέχεια γίνεται χρήση μικροκυμάτων σε ισχύ 200 Watt για 30 λεπτά στους 60°C. Για την παραλαβή του προϊόντος, έγινε εκχύλιση του μίγματος της αντίδρασης με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο Na₂SO₄ και συμπύκνωση υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) με διαλύτη έκλουσης διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Τα επιθυμητά προϊόντα **3** (33,54 mg, 0,078 mmol, 69%), **4** (37,15 mg, 0,084 mmol, 74%) και **5** (37,82 mg, 0,083 mmol, 73%) ανακρυσταλλώθηκαν με οξικό αιθυλεστέρα και εξάνιο.

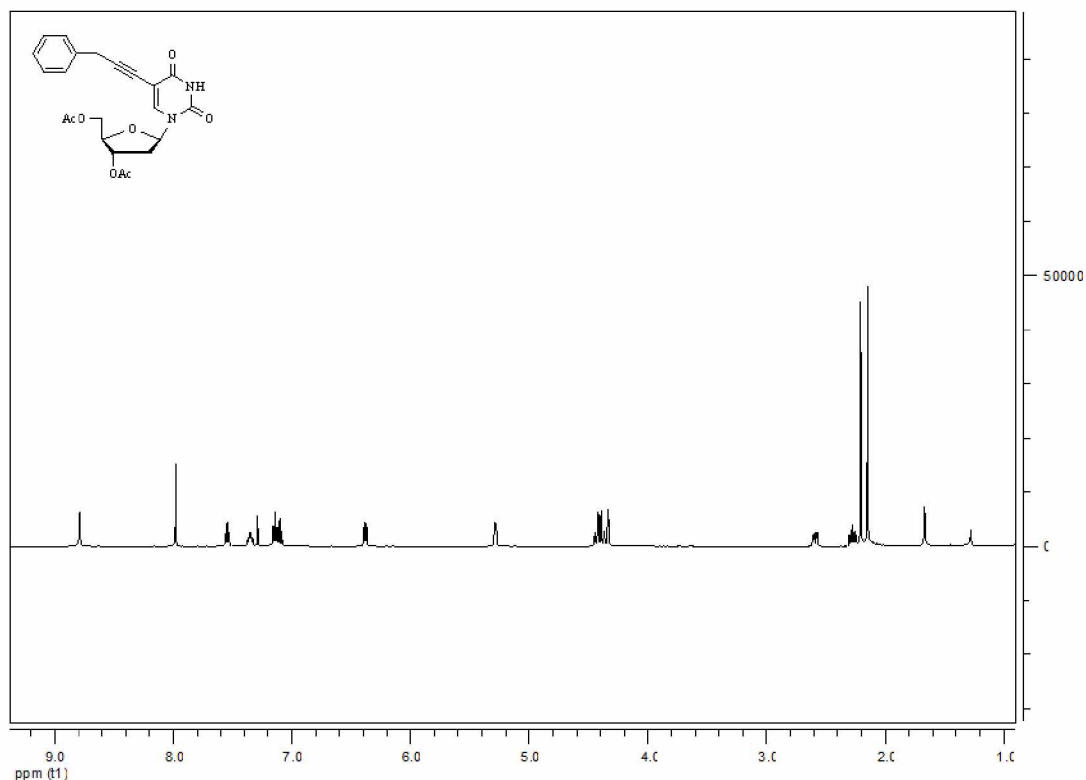
4.2.3 Σύνθεση των 6, 7, 8



R : 3-phenyl prop-1-ynyl (**6**), 3-phenyl but-1-ynyl (**7**), 3-phenyl pent-1-ynyl (**8**)

Διάλυμα των προστατευμένων νουκλεοζιτών **3** (30 mg, 0,07 mmol), **4** (30 mg, 0,068 mmol) ή **5** (30 mg, 0,066 mmol) σε κορεσμένη μεθανολική αμμωνία (262,5 ml) αναδεύεται 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 CH₂Cl₂, οπότε παραλαμβάνονται τα επιθυμητά προϊόντα **6** (21,8 mg), **7** (22,3 mg) και **8** (22,4 mg), αντίστοιχα.

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ¹H-NMR



6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη και σύνθεση νέων αντιϊκών και αντικαρκινικών παραγόντων, με αυξημένη δραστικότητα, μειωμένη τοξικότητα σε υγιή κύτταρα και επιλεκτικότητα στη δράση τους. Όλη αυτή η ερευνητική τάση οδήγησε και στην ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων με αυτές τις ιδιότητες, με σκοπό τη χρήση τους ως φάρμακα.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης φουρανονουκλεοζιτών με τροποποίηση στο τμήμα της βάσης με σκοπό τον έλεγχο τους για πιθανή αντικαρκινική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν απλή, γρήγορη και με καλές αποδόσεις στις αντιδράσεις κάθε βήματος. Όλες οι νέες ενώσεις προσδιορίστηκαν από στοιχειώδεις αναλύσεις και αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹H-NMR.

Τα νέα μόρια **6**, **7**, **8** μελετήθηκαν ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι διαφόρων μορφών καρκίνου. Συγκεκριμένα έναντι του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (Capan-1), της χρόνιας μυελοειδούς λευχαιμίας (Hap-1), του καρκινώματος του παχέως εντέρου (HCT-116), του καρκινώματος των πνευμόνων (NCI-H460), της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (DND-41), της οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας (HL-60), της χρόνιας μυελοειδούς λευχαιμίας (K-562) και του μη-Hodgkin λεμφώματος (Z-138). Η ικανότητα αναστολής των καρκινικών κυττάρων φαίνεται παρακάτω στον πίνακα 1.

	ΕΝΩΣΗ	6	7	8
	CONCENTRATION UNIT	μM	μM	μM
IC ₅₀	Capan-1	>100	>100	>100
	Hap-1	50,9	>100	>100
	HCT-116	31,1	>100	>100
	NCI-H460	54,1	>100	>100
	DND-41	32,6	>100	>100
	HL-60	65,6	>100	>100
	K-562	83,5	>100	>100
	Z-138	43,2	>100	>100

Πίνακας 1:Κυτταροτοξική δράση των **6,7,8**.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, ο νεοσυντιθέμενος νουκλεοζίτης **6** παρουσιάζει ανασταλτική δράση έναντι όλων των εξεταζόμενων μορφών καρκίνου, πλην του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος (Capan-1), όπου δεν παρουσίασε κάποια δράση. Οι νουκλεοζίτες **7** και **8** δεν παρουσίασαν καμία κυτταροτοξική ή αντιική δράση.

7.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allaudeen H.S., Kozarich J.W., Bertino J.R. and DeClercq E. (1981). On the mechanism of selective inhibition of herpesvirus replication by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(5): 2698–2702.
- Arnér E.S.J. and Eriksson S. (1995). Mammalian Deoxyribonucleoside Kinases. *Pharmacology & Therapeutics* 67 (2): 155–86.
- Baker C.H., Banzon J., Bollinger J.M., Stubbe J., Samano V., Robins M.J., Lippert B., Jarvi E. and Resvick R. (1991.) 2'-Deoxy-2'-Methylenecytidine and 2'-Deoxy-2',2'-Difluorocytidine 5'-Diphosphates: Potent Mechanism-Based Inhibitors of Ribonucleotide Reductase. *Journal of Medicinal Chemistry* 34 (6): 1879–84.
- Berg, J. M., Tymoczko J. L., Stryer L., Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2001 (p) 329-351
- Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, 2005, 4, 4.
- Calabresi P., Cardoso S.S., Finch S.C., Kligerman M.M., Von Essen C.F., Chu M.Y. and Welch A.D. (1961). Initial Clinical Studies with 5-Iodo-2'-deoxyuridine. *American Association for Cancer Research*.
- Cory, A.H., Samano V., Robins M.J., and Cory J.G. (1994). 2'-Deoxy-2'-Methylene Derivatives of Adenosine, Guanosine, Tubercidin, Cytidine and Uridine as Inhibitors of L1210 Cell Growth in Culture. *Biochemical Pharmacology* 47 (2): 365–71.
- De Clercq E. (2013). Selective Anti-Herpesvirus Agents. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 23(3): 93–101.
- De Clercq E., Degreef H., Wildiers J., De Jonge G., Drochmans A., Descamps J. and De Somer P. (1980). Oral (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in severe herpes zoster. *The British Medical Journal* 281: 1178.
- De Clercq, E.; Descamps, J.; Balzarini, J.; Giziewicz, J.; Barr, P. J.; Robins, M. J. J. (1983) *Med. Chem. Nucleic acid related compounds*. 40. Synthesis and biological activities of 5-alkynyluracil nucleosides. 26, 661-666.
- De Clercq E., Descamps J., De Somer P., Barr P.J., Jones A.S. and Walker R.T. (1979). (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(6): 2947–2951.
- Denny W.A. and Wilman D.E.V. (1990). *The Chemistry of Antitumour Agents*. 1st ed. Springer Netherlands.
- Efangea S.M.N., Cheng Y.C., Bardos T.J. (1985). Synthesis and biological activities of 2-Pyrimidinone Nucleosides. III.1,2 5-Alkynyl-2-Pyrimidinone 2'-Deoxyribosides *Nucleos. Nucleot.*, 4, 545-564.
- Elion G. (1989). The Purine Path to Chemotherapy. *Science* 244 (4900): 41–47.
- Hartman, M. C. T., and Coward J.K. (2002). Synthesis of 5-Fluoro N - Acetylglucosamine Glycosides and Pyrophosphates via Epoxide Fluoridolysis:

Versatile Reagents for the Study of Glycoconjugate Biochemistry. *Journal of the American Chemical Society* 124 (34): 10036–53.

Haruhiko M., Makiko N., Tatsuo S., and Kozaburo H. (1991). 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Meneni S., Ott I., Sergeant C.D., Sniady A., Gust R., and Dembinski R., (2007) 5-Alkynyl-2'-deoxyuridines: Chromatography-free synthesis and cytotoxicity evaluation against human breast cancer cells *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 3082-3088.

Morisson & Boyd Οργανική Χημεία, τόμος ΙΙΙ Γραφείο Εκτυπώσεων Πανεπιστημίου Ιωαννίνων 1991, p. 758.

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

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

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

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

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

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

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

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

Vincent P, Beaucourt J.P., Pichat L., Balzarini J., De Clercq E. (1985). Syntheses, Activites Biologique set Etude Conformation nelle D'Alcynyl-5 Desoxy-2' Uridines *Nucleos. Nucleot.*, 4, 429-445.

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

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

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

Αλεξούλη Τ. (2019). Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Σύνθεση, φασματικός προσδιορισμός και βιολογική αποτίμηση. Αντικαρκινική και αντιδιαβητική δράση: Σχεδιασμός και σύνθεση. Λάρισα.

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

Δημοπούλου Α. (2017). Τροποποιημένοι στη βάση πυρανονουκλεοζίτες με πιθανή αντιϊκή, αντικαρκινική και αντιδιαβητική δράση: σχεδιασμός και σύνθεση. Λάρισα.

Κυρίτσης Χ. (2010). Σύνθεση νέων αιθινυλο και κυανονουκλεοζιτών ως πιθανοί αντιϊκοί και αντικαρκινικοί παράγοντες. Λάρισα.

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

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