



ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
www.med.duth.gr



Πανεπιστήμιο Κρήτης
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Κλινική Φαρμακολογία και Θεραπευτική»

Διπλωματική εργασία

ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΑΜΙΔΟΞΙΜΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

Ευτυχία Αγγέλου

Επιβλέπων: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χημείας Οργανικών Ενώσεων
Κωνσταντίνα Φυλακτακίδου

Εργαστήριο Οργανικής Βιολογικής Χημείας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων
Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, ΔΠΘ

Σύνθεση νέων παραγώγων αμιδοξιμών και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

Σκοπός της εργασίας:

Σύνθεσης αμιδοξιμικών παραγώγων με σκοπό την μελέτη της βιολογικής τους δράσης.

Οι αμιδοξίμες είναι ενώσεις με μια υδροξυμίμο και μια αμινο ομάδα συνδεδεμένες με το ίδιο άτομο άνθρακα (Eloy, *et al.* 1962)

Τα τελευταία χρόνια αναθέρμανση του ενδιαφέροντος των επιστημόνων για:

- πολλές αμιδοξίμες και
- Ο-υποκατεστημένα παράγωγα

Αιτία:

- εμφανίζουν σημαντική βιολογική δράση (Fylaktakidou, *et al.* 2008)
- τεχνολογικές εφαρμογές σαν πολυμερή και σαν ενώσεις συναρμογής
- ευέλικτες ομάδες σύνθεσης (Hyatt, 1981; Dimsdale, 1981)

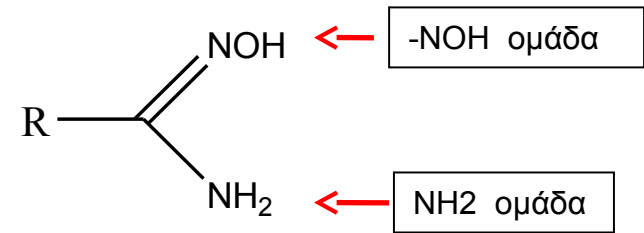
Το όνομα αμιδοξίμη προτάθηκε από τον **Tiemann** (Tiemann 1884)

Ο Tiemann απέδειξε τη δομή της αμιδοξίμης, δείχνοντας την ταυτόχρονη παρουσία ομάδων NH₂ και NOH.

Εδώ και πολλά χρόνια μελετάται η χημεία αυτών των ενώσεων και οι ιδιότητες τους.

Φορμαμιδοξίμη

- σύνθεση της (Lossen, *et al.* 1889)
- μελέτη της δράσης της
- προκλήθηκε ενδιαφέρον
- έντονη μελέτη αυτής ομάδας ενώσεων
- παράχθηκε πληθώρα πληροφοριών σχετικά με την «χημεία των αμιδοξιμών».



Αμιδοξίμες =

Ευέλικτες ομάδες σύνθεσης ως **συνθόνες**

Σύνθεση νέων παραγώγων αμιδοξιμών και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

Γιατί ;

Τα τελευταία χρόνια αναθέρμανση του ενδιαφέροντος των επιστημόνων για:

- πολλές **αμιδοξίμες** και
- **Ο-υποκατεστημένα παράγωγα**



Αιτία:

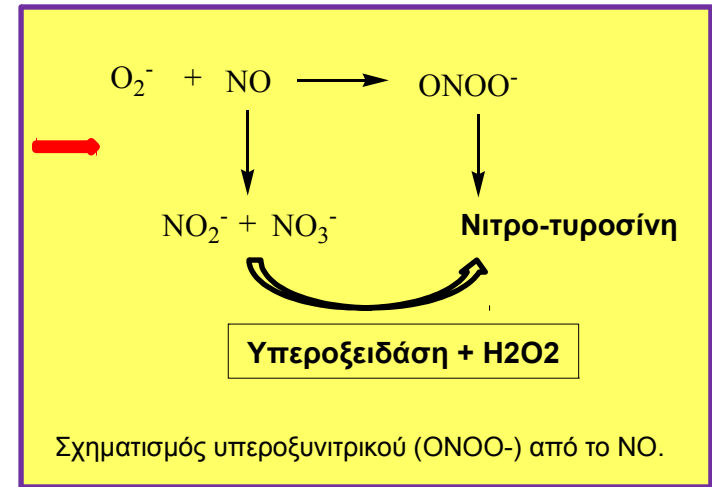
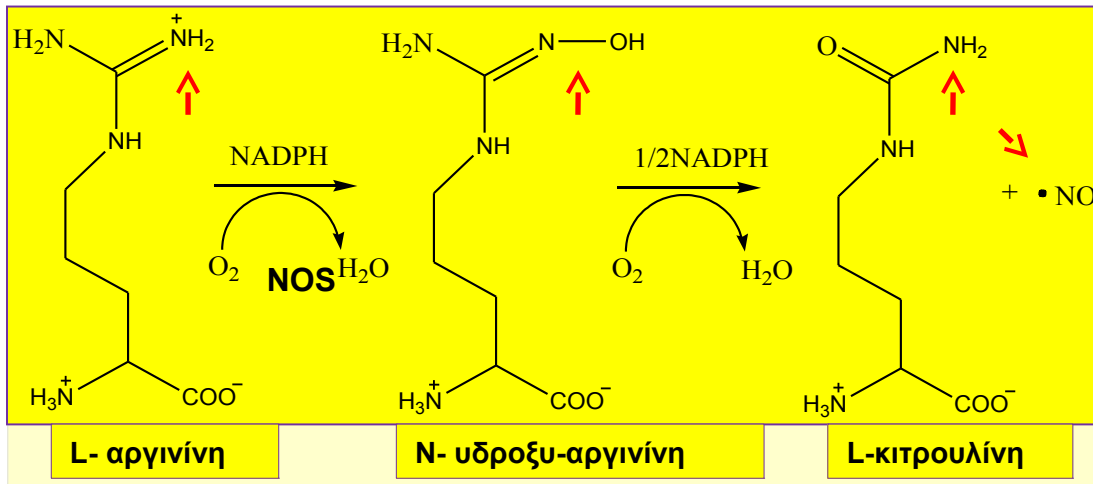
- εμφανίζουν σημαντική βιολογική δράση
- τεχνολογικές εφαρμογές σαν πολυμερή και σαν ενώσεις συναρμογής

Βιολογική δράση:

- ❖ Εμπλέκονται στην **παραγωγή NO** από την «Συνθάση του νιτρικού οξειδίου» (**NOS**, Nitric oxide Synthase) (Marletta, *et al.* 1998)
- ❖ **Αναγωγή** των *N*-υδροξυλιωμένων αμιδοξιμών από ενζυμικά συστήματα (**NADH ρεδοουκτάση, κυτόχρωμα b5, P450**) (Clement, *et al.* 2002)
- ❖ Οι αμιδοξίμες και τα παράγωγα τους ως **προφάρμακα**
(Ximelagatran => Melagatran, Sibrafiban => Ro44-3888) (Ho, SJ, *et al.* 2006; Clement, *et al.* 2003; Gustafsson, *et al.* 2003; Modi, *et al.* 1999)
- ❖ **Αναστολείς ενζύμων:**
α-θρομβίνη, υποδοχέας IIb/IIIa των αιμοπεταλίων, παράγοντας πήξης αίματος fXa, PfDH-fr, Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (Uchida, *et al.* 2008; Rastelli *et al.* 2003)
- ❖ Η **αντικαρκινική δράση** των αμιδοξιμικών παραγώγων: λευχαιμία, καρκίνος του προστάτη, Lewis καρκίνος των πνευμόνων (Flora, *et al.* 1978; Poplavskaya *et al.* 1980)
- ❖ Η **αντι-ϊική δράση** των αμιδοξιμικών παραγώγων: ιός HCV (Kozlov, *et al.* 2013)
- ❖ Η **αντι-παρασιτική δράση** των αμιδοξιμικών παραγώγων: Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Trypanosoma brucei, Leishmania spp, Pneumocystis carinii. (Rastelli *et al.* 2003; Steck, *et al.* 1982; Wang, *et al.* 2006)

Βιολογική δράση:

❖ Εμπλέκονται στην παραγωγή **NO** από την «Συνθάση του νιτρικού οξειδίου» (**NOS**, Nitric oxide Synthase)

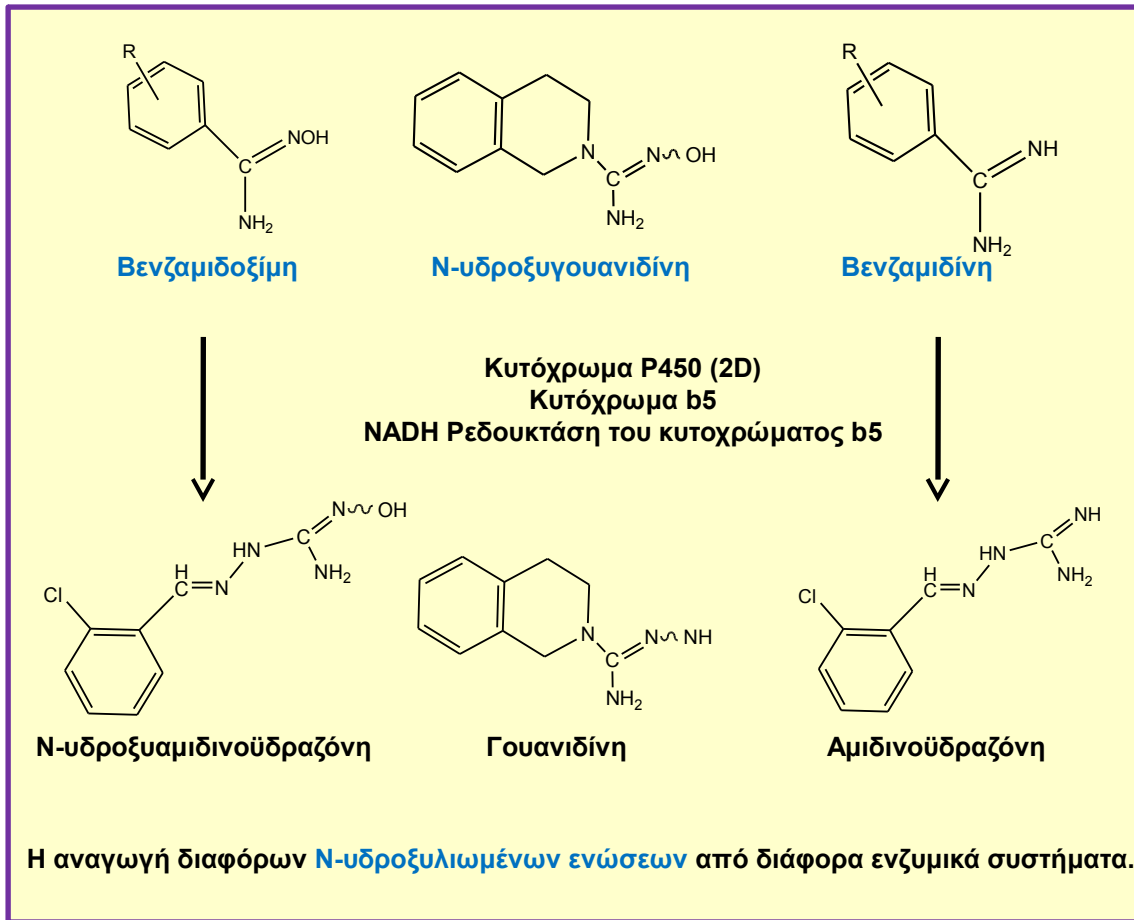


- Οξείδωση της **L-αργινίνης** με **O₂** από την **NOS**.
- Αντίδραση εξαρτώμενη από **NADPH**,
- Ενδιάμεσο προϊόν: **N-υδροξυ-L-αργινίνη** (L-NHA)
- Τελικό προϊόν: **L-κιτρουλίνη**.
- Οξείδωση πέντε ηλεκτρονίων που συμβαίνει αποκλειστικά στο μόριο του αζώτου από όπου προκύπτει το παραγόμενο NO.
- Ενδιάμεσο **L-NHA = οξίμη** σταθερά προσδεμένη στο μόριο του ενζύμου

- Το **NO** παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση
- Το **NO** αντιδρά του με ανιόντα υπεροξειδίου (**O₂-**)
- Σχηματίζεται υπεροξυνιτρικό (**ONOO-**) = δραστικό οξειδωτικό μόριο
- Το **ONOO-** = περισσότερο τοξικό από το NO και το (**O₂-**).
- Το **NO** και μόρια που λειτουργούν ως **δότες NO**, έχουν εφαρμοστεί ως θεραπευτικά μέσα για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων που οφείλονται σε έλλειψη του **NO**.
- Οι **δότες NO** στα **θηλαστικά** μετατρέπονται σε NO ταχύτατα, συνήθως μη ειδικά και έχοντας σύντομο χρόνο ημιζωής.

Βιολογική δράση:

❖ Αναγωγή των N-υδροξυλιωμένων ενώσεων-αμιδοξιών από ενζυμικά συστήματα (**NADH ρεδουκτάση, κυτόχρωμα b5, P450**)



Υδροξυλαμίνη και αμιδοξίμες



μεταβολίζονται από τον
ανθρώπινο οργανισμό

NADH ρεδουκτάση + σύμπλοκο των b5R/cytb5

Μεταβολίτες της **υδροξυλαμίνης**



τοξικότητα φαρμακευτικών ουσιών

Αμιδοξίμικά παράγωγα + Υδροξυλιωμένες αμίνες

Προφάρμακα



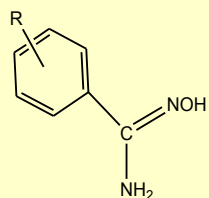
ενεργοποίηση μετά από αναγωγή

Αμιδίνες

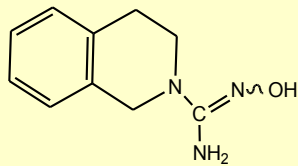
➤ Η αναγωγή των υδροξυλαμινών / αμιδοξιμών
= σημαντικό θέμα φαρμακολογικής μελέτης.

Βιολογική δράση:

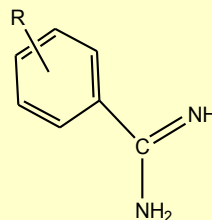
- ❖ Αναγωγή των N-υδροξυλιωμένων ενώσεων-αμιδοξίμων από ενζυμικά συστήματα (**NADH ρεδοκτάση, κυτόχρωμα b5, P450**)



Βενζαμιδοξίμη

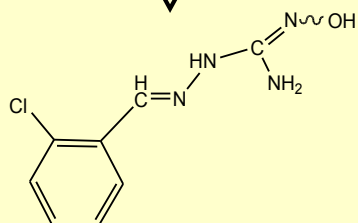


N-υδροξυγουανιδίνη

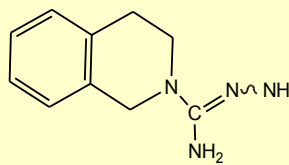


Βενζαμιδίνη

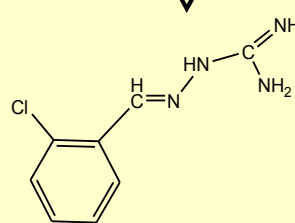
Κυτόχρωμα P450 (2D)
Κυτόχρωμα b5
NADH Ρεδοκτάση του κυτοχρώματος b5



N-υδροξυαμιδινοϋδραζόνη



Γουανιδίνη



Αμιδινοϋδραζόνη

Η αναγωγή διαφόρων **N-υδροξυλιωμένων ενώσεων** από διάφορα ενζυμικά συστήματα.

Αμιδίνες = μόρια με ισχυρή βασικότητα

Οι αμιδίνες ενσωματώνονται σε ενεργά μόρια διότι μετά από πρωτονίωση σχηματίζουν **κατιόντα**.

Τα κατιόντα αλληλεπιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες καρβοξυλικές ομάδες των μορίων στόχων

Οι αμιδίνες: υφίστανται πρωτονίωση => σταθερότερο κατιόν => **πολύ υδρόφιλα** => **δεν απορροφούνται** από τον γαστρεντερικό σωλήνα

Αποτέλεσμα:

Αμιδίνες = **ακατάλληλες** ως φάρμακα για χορήγηση **δια στόματος/γαστρεντερικού**

N-υδροξυλιωμένα παράγωγα = λιγότερο βασικά

Υπό φυσιολογικές συνθήκες **δεν πρωτονιώνονται**. **Απορροφούνται** από τη γαστρεντερική

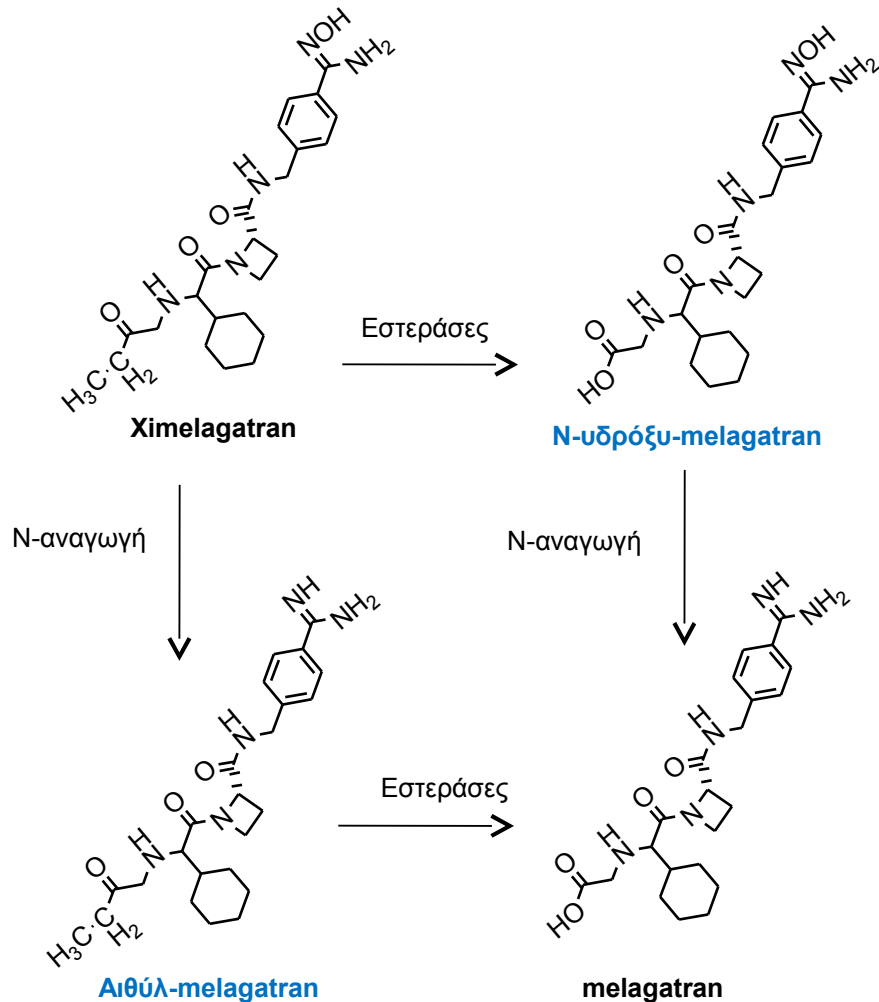
Ανάγονται προς σχηματισμό των δραστικών ενώσεων
Αμιδοξίμες => Αμιδίνες
N-υδροξυαμιδίνες => Γουανιδίνες
N-υδροξυαμιδινοϋδραζόνες => Αμιδινοϋδραζόνες

Αποτέλεσμα:

N-υδροξυλιωμένα παράγωγα = **κατάλληλα** ως φάρμακα για χορήγηση **δια στόματος/γαστρεντερικού** => **βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα**.

Βιολογική δράση:

- ❖ Οι αμιδοξίμες και τα παράγωγά τους ως **προφάρμακα**



Τα στάδια ενεργοποίησης του **Melagatran**

Melagatran = Αναστολέας

- ❖ α-θρομβίνης
 - ❖ Ενεργοποίηση αιμοπεταλιακών υποδοχέων από θρομβίνη
 - ❖ Ενεργοποίηση πρωτεΐνης C.
- AstraZeneca** => **Exanta™**



Melagatran => όχι καλή βιοδιαθεσιμότητα

- Καρβοξυλικό οξύ + δευτερεύουσα αμίνη + ομάδα αμιδίνης
- Φορτισμένο μόριο σε φυσιολογικές τιμές pH
- Δυσκολία απορρόφησης από τον γαστρεντερικό σωλήνα.

Ximelagatran = προφάρμακο του **Melagatran**

Ximelagatran => βελτίωση απορρόφησης του **Melagatran**
αιθυλική ομάδα εστέρα + ομάδα **N-υδροξυαμιδίνης**

Πρωτονίωση των αμιδινών => κατιόντα ιδιαίτερα σταθερά

Η δράση του **Ximelagatran** ως προφάρμακο βασίζεται σε δύο βασικές ομάδες => **διπλό προφάρμακο**

Ενζυμική μετατροπή σε **Melagatran** μέσω δύο ενδιάμεσων:

- αναγωγή της υδροξυλικής ομάδας => αιθυλ-melagatran
- υδρόλυση του αιθυλεστέρα => υδροξυλο-melagatran

Melagatran/Ximelagatran Versus Enoxaparin for the Prevention of Venous Thromboembolic Events (EXTEND)

This study has been terminated.

(Melagatran/ximelagatran was withdrawn from the market and clinical development in February 2006 in the interest of patient safety.)

Sponsor:
AstraZeneca

Information provided by:
AstraZeneca

ClinicalTrials.gov Identifier:
NCT00206089

First received: September 13, 2005
Last updated: November 11, 2010
Last verified: November 2010
[History of Changes](#)

Melagatran/Ximelagatran Versus Enoxaparin for the Prevention of Venous Thromboembolic Events (EXTEND)

This study has been terminated.

(Melagatran/ximelagatran was withdrawn from the market and clinical development in February 2006 in the interest of patient safety.)

Sponsor:
AstraZeneca

Information provided by:
AstraZeneca

[Full Text View](#) | [Tabular View](#) | [No Study Results Posted](#) | [Disclaimer](#) | [How to Read a Study Record](#)

Tracking Information

First Received Date <small>ICMJE</small>	September 13, 2005
Last Updated Date	November 11, 2010
Start Date <small>ICMJE</small>	September 2005
Primary Completion Date	August 2006 (final data collection date for primary outcome measure)
Current Primary Outcome Measures <small>ICMJE</small> (submitted: September 13, 2005)	Non-inferiority for the prevention of VTE or VTE related death
Original Primary Outcome Measures <small>ICMJE</small>	Same as current
Change History	Complete list of historical versions of study NCT00206089 on ClinicalTrials.gov Archive Site
Current Secondary Outcome Measures <small>ICMJE</small> (submitted: September 13, 2005)	<ul style="list-style-type: none">Superiority regarding major bleeding or the percentage of patients requiring donor blood transfusion.Safety

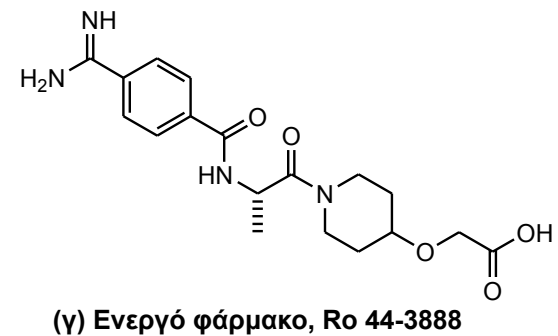
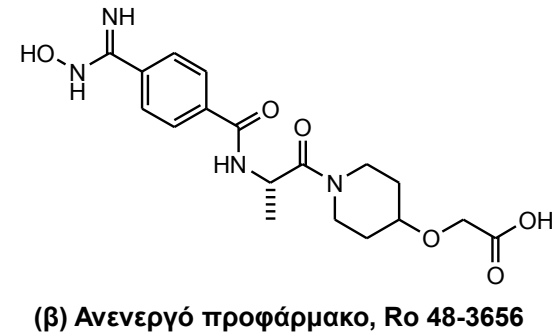
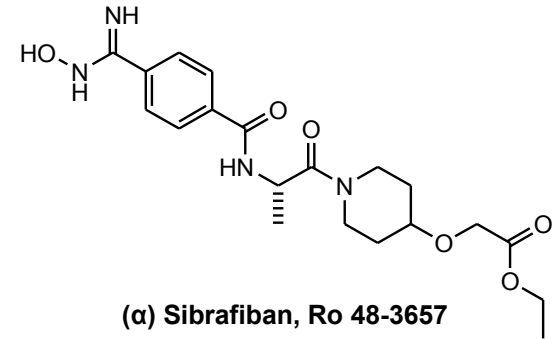
Βιολογική δράση:

❖ Οι αμιδοξίμες και τα παράγωγα τους ως **προφάρμακα**

Sibrafiban = Xubic



- Ανταγωνιστής του lib/IIIa υποδοχέα
- Εταιρεία : Roche Switzerland
- Ανώτερο επίπεδο ανάπτυξης: Φάση III (παγκοσμίως)
- 1999: Η Roche ανακοινώνει πως το Sibrafiban δεν έδειξε καλύτερα αποτελέσματα από τα ήδη υπάρχοντα (Aspirin) ισχαιμικά επεισόδια, ασθενείς με στεφανιαίο σύνδρομο.
- 1999: τερματισμός της ανάπτυξης



Τα τρία στάδια τροποποίησης του **Sibrafiban**

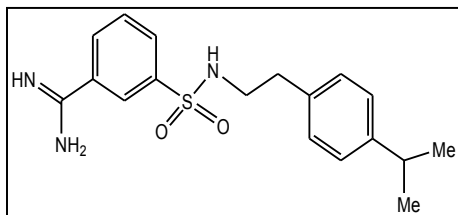
Βιολογική δράση:

❖ Αμιδοξίμες ως αναστολείς ενζύμων

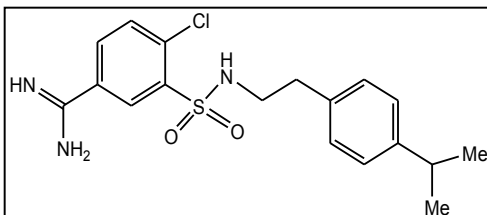
- ✓ **Ximelagatran** = αναστολέας της α-θρομβίνης
- ✓ **Sibrfiban** = αναστολέας του GP lib/IIIa υποδοχέα αιμοπεταλίων

➤ Παράγοντας πήξης του αίματος fXa

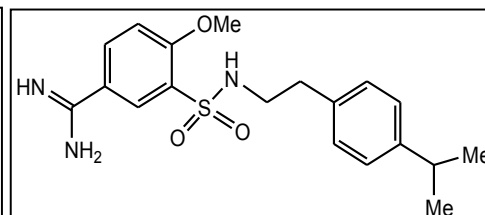
Αμιδίνες => πιθανοί αναστολείς του fXa



α



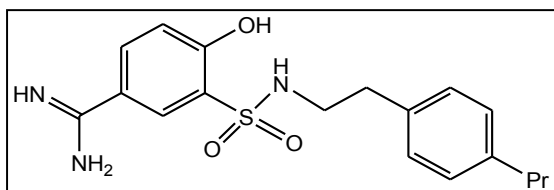
β



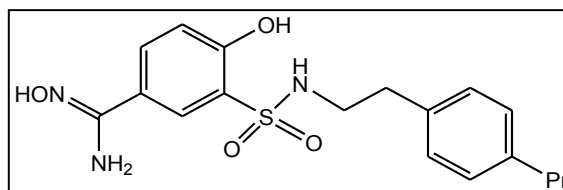
γ



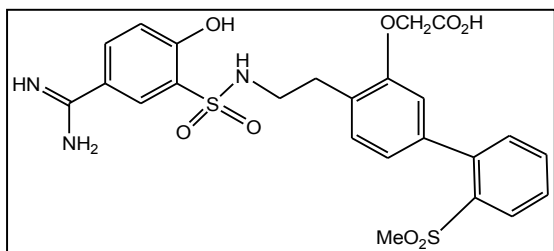
Αμιδίνες (γ ,ε) και αμιδοξίμες (δ , ζ) => πιθανοί αναστολείς του fXa



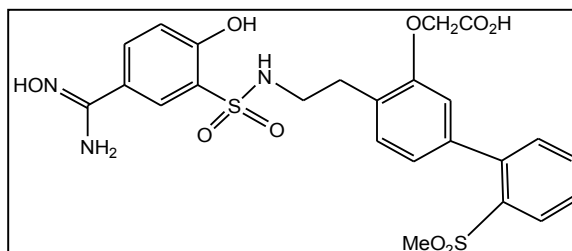
δ



ε



ζ



η

(γ) + (ε)

- ισχυρή αντι-fXa δραστηριότητα
- εκλεκτικότητα έναντι θρομβίνης και τρυψίνης

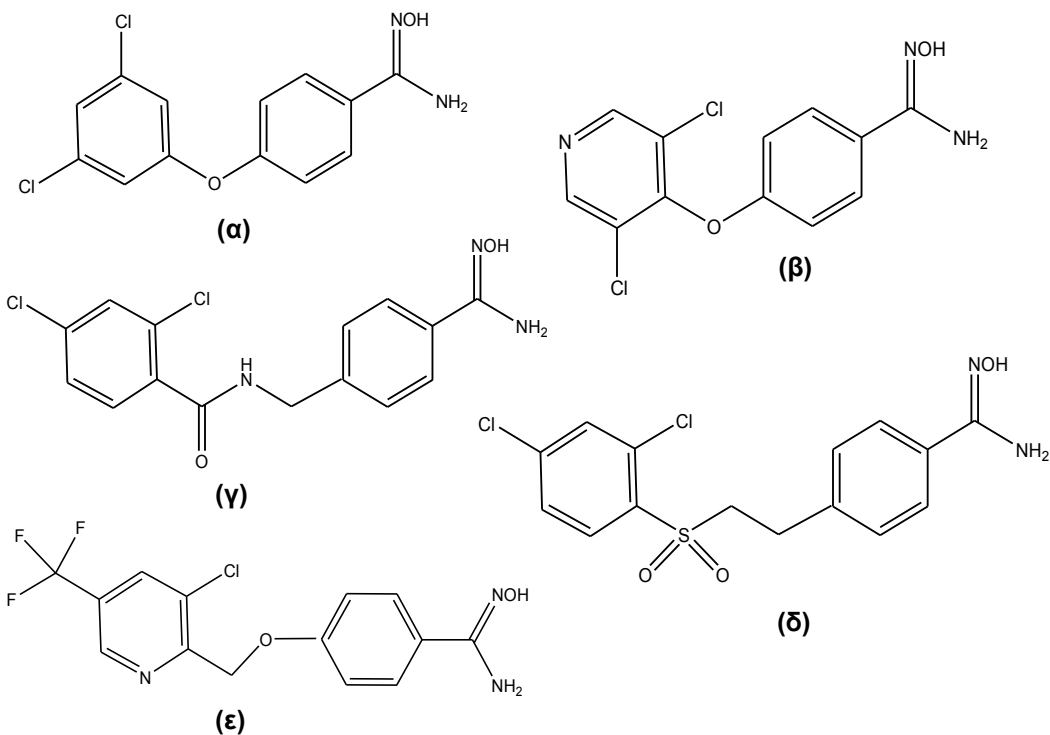
(ζ)

- ισχυρή αντι-fXa δραστηριότητα
- εκλεκτικότητα έναντι θρομβίνης και τρυψίνης
- καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα όλων
- επιλέχθηκε για κλινική ανάπτυξη (KFA-1982)
- ως διπλό προφάρμακο =>
- => ένωση αμιδοξίμης/κ-βουτυλεστέρα

Βιολογική δράση:

❖ Αμιδοξίμες ως **αναστολείς ενζύμων**

παράγωγα *N*-υδροξυαμιδίνης = αμιδοξίμες



- ✓ **Ximelagatran** = αναστολέας της α-θρομβίνης
- ✓ **Sibfiban** = αναστολέας του GP lib/IIIa υποδοχέα αιμοπεταλίων
- ✓ Παράγοντας πήξης του αίματος fXa

➤ PfDH-fr, Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase

- Σχεδιασμός και αξιολόγηση **de novo**
- Ενώσεις – αναστολείς της πρωτεΐνης **PfDH-FR**
- PfDHFR = Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase

παράσιτο Plasmodium Falciparum malaria

- συχνές μεταλλάξεις => ανθεκτική PfDHFR

Αποτέλεσμα:

Δραστηκότητα έναντι: **DHFR mut** και **DHFR wt**

- τιμές **Ki** για **DHFR mut** = τιμές **Ki** για **DHFR wt**

για DHFR mut

- τιμές **Ki (α – ε)** << τιμές **Ki (Cyc, γνωστοί προσδέτες)**

(α): έδειξε την καλύτερη συμπεριφορά

Κριτήρια σχεδιασμού υποψήφιων αναστολέων

- 2 ομάδες ως δότες δεσμών υδρογόνου
- 1 ομάδα δότη δεσμού υδρογόνου και 1 άζωτο να προκαλεί πρωτονίωση
- Αλληλεπίδραση με την περιοχή D54 της DHFR
- Mw των ενώσεων < 400 g/mol .

Βιολογική δράση:

❖ Αμιδοξίμες με **αντικαρκινική δράση**

❖ Υδροξουρία και **φορμαμιδοξίμη** => δομικές ομοιότητες

❖ Η υδροξουρία **αναστέλλει την σύνθεση του DNA**

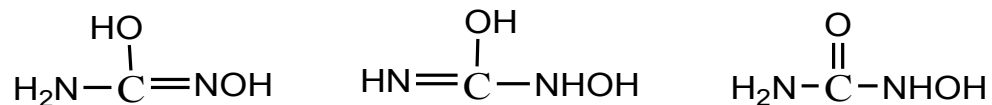
➤ Σύνθεση αμιδοξιμικών παραγώγων

➤ Κυτταροτοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων

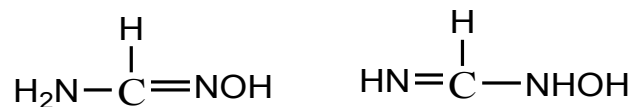
Καρκινικά συστήματα μελέτης:

- L1210 λευχαιμία
- P388 λευχαιμία
- Lewis καρκίνομα πνευμόνων

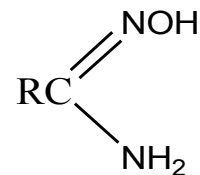
(Flora , *et al.* 1978)



(α) Ταυτομερείς δομές υδροξουρίας



(β) Ταυτομερείς δομές φορμαμιδοξίμης



(γ) Δομή της αμιδοξίμης

Βιολογική δράση:

- ❖ Αμιδοξίμες με **αντι-ιική δράση**
- ❖ Αμιδοξίμες με **αντι-παρασιτική δράση**

- Βενζοϋδροξαμικά παράγωγα τύπου
(α)
- Ο ρόλος υδροξαμικών ομάδων έναντι
του HCV

(β) + (δ) => ανιχνεύσιμη αντι-ιική
δραστικότητα.

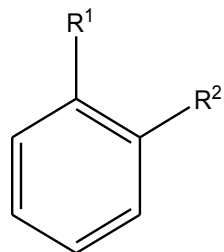
(Kozlov , et al. 2013)

Αμιδοξίμες και παράγωγα τους με δράση
έναντι :

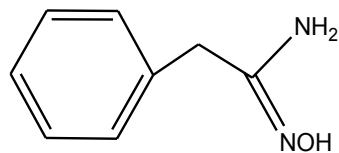
- *Trypanosoma brucei rhodesiense*,
- *Trypanosoma brucei gambiense*
(Steck, et al., 1982)

- *Plasmodium vivax*,
- *P. falciparum*,
- *Trypanosoma brucei*,
- *Leishmania spp.*,
- *Pneumocystis carinii*

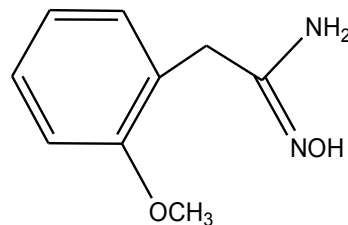
Μελετήθηκαν εργαστηριακά ως πιθανά
προφάρμακα
(Wang et al., 2006).



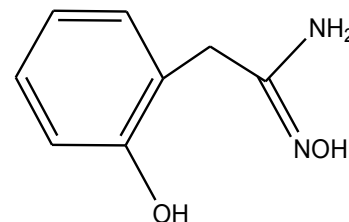
(α)



(β)



(γ)



(δ)

Σύνθεση νέων παραγώγων αμιδοξιμών και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

Βιολογική δράση αμιδοξιμών ως τώρα => βιβλιογραφικά δεδομένα => πολλές εφαρμογές

Ως τώρα δεν έχει μελετηθεί το αν είναι ικανές να προσδένονται στο DNA. Αν ναι τότε:

- Ποια η πιθανή δράση τους στο DNA.
- Ποια η περιοχή πρόσδεσης/αλληλεπίδρασης.
- Ποιος ο μηχανισμός δράσης.

*** Υποψία ικανότητας πρόσδεσης λόγω των: υδροξυουρία , φορμαμιδοξίμη, πενταμιδίνη ; ; ;

Προσπάθεια μελέτης νέων ιδιοτήτων των αμιδοξιμών και παραγώγων τους

Ανάπτυξη νέων εφαρμογών των αμιδοξιμών και παραγώγων τους

Σύνθεση νέων παραγώγων αμιδοξιμών και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

Πρόσφατες μελέτες

Οργανικές ενώσεις με νέες ιδιότητες:

- ικανότητα πρόσδεσης στο DNA/RNA.
- Ικανότητα διάσπασης του DNA, πρόκληση θραύσης.
- Ενεργοποίηση με ορατό/υπεριώδες φως.

Χρησιμότητα τέτοιων ενώσεων:

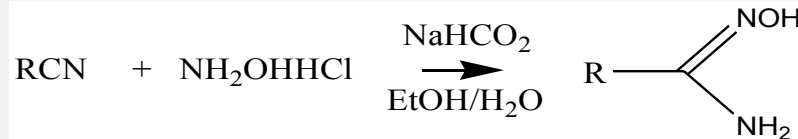
- Αντιδραστήρια της βιοτεχνολογίας, μοριακής βιολογίας, βιοχημείας => ομοίως με περιοριστικά ένζυμα, νουκλεάσες, κλπ
- Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες => πρόσδεση και διάσπαση του DNA καρκινικών κυττάρων => κυτταροτοξικότητα
- Αντι-ιικοί παράγοντες => ικανότητα (εκλεκτικής;;;) πρόσδεσης στο DNA/RNA ιών
- Εφαρμογές στη διάγνωση => εντοπισμός και υπόδειξη γονιδιακών στόχων, π.χ γενετικών μεταλλάξεων

Απαραίτητη πρυπόθεση:

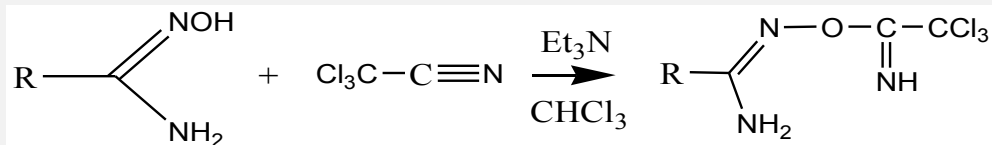
- Δομή και μέγεθος ενώσεων κατάλληλη ώστε να προσδένονται στο DNA
- Ενώσεις με ομάδες => χημικές αντιδράσεις με το DNA => ώστε να προκαλούν διάσπαση στο DNA

Σύνθεση νέων παραγώγων αμιδοξίμων και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

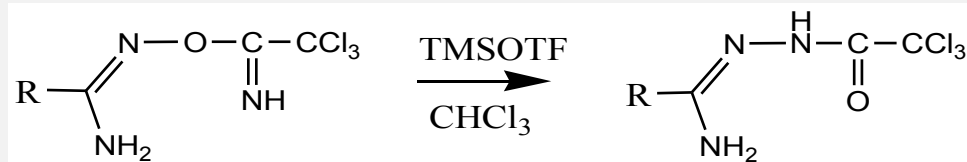
Οργανική Σύνθεση



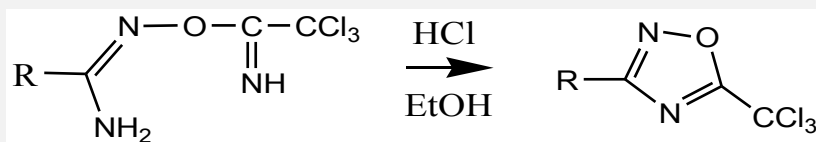
A) Παρασκευή αμιδοξίμων από νιτρίλια



B) Οι αμιδοξίμες υφίστανται O-ακυλίωση και σχηματίζουν τριχλωροακετιμίδια

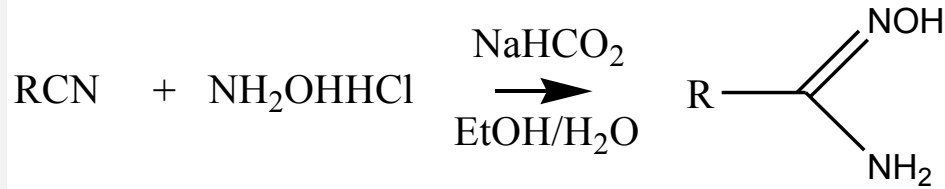


Γ) Τα τριχλωροακετιμίδια μετατρέπονται σε αμιδραζόνες



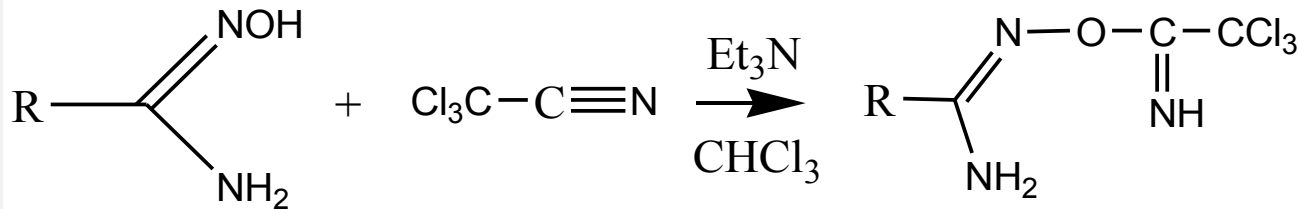
Δ) Σχηματισμός οξαδιαζολίου από την O-ακυλιωμένη αμιδοξίμη

Σύνθεση νέων παραγώγων αμιδοξιδίων και μελέτη της βιολογικής τους δράσης
 Οργανική Σύνθεση



A) Παρασκευή αμιδοξιδίων από νιτρίλια

A) Παρασκευή αμιδοξιδίων από ακετονιτρίλια.
 Αντίδραση νιτρίλιων με υδροχλωρική υδροξυλαμίνη, σύμφωνα με γνωστούς μηχανισμούς αντιδράσεων ([Eloyet et al. 1962](#)).



B) Αμιδοξίδες υφίστανται O-ακυλίωση και σχηματίζουν τριχλωροακετιμίδια

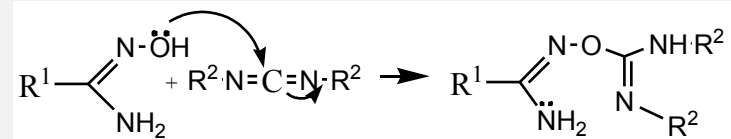
O-ακυλο-αμιδοξίδες = τριχλωροακετιμίδια

Αντίδραση με τριχλωροακετονιτρίλιο ($\text{C}_2\text{Cl}_3\text{N}$), παρουσία τριαιθυλαμίνης Et_3N .

Et_3N => διευκολύνει την πυρηνόφιλη προσβολή του ατόμου του οξυγόνου της NOH ομάδας.

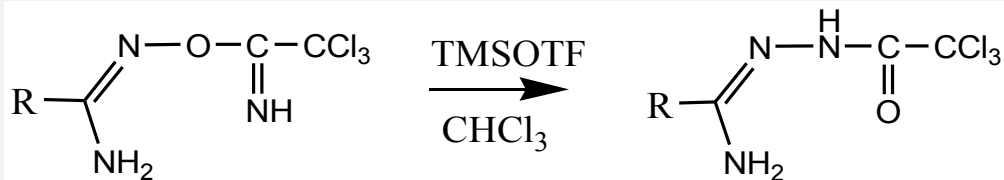
Συνθήκες: κενό αέρος, χαμηλή θερμοκρασία αρχικά 0oC, έπειτα 25oC

([Ispikoudi et al., 2010](#); [Hébert et al., 1999](#); [Sureshbabu et al., 2008](#)).



Σύνθεση νέων παραγώγων αμιδοξιμών και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

Οργανική Σύνθεση



Γ) Τα τριχλωροακετιμίδια μετατρέπονται σε **αμιδραζόνες**

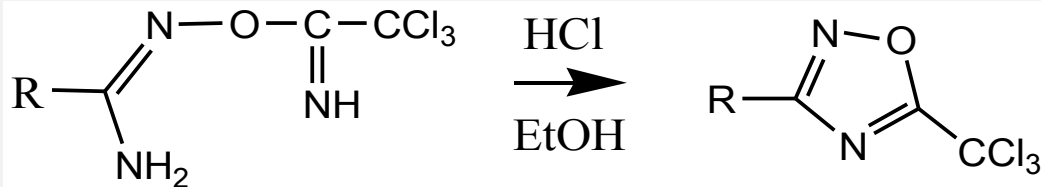
Σχηματισμός τριχλωροακετιμιδίων από **O-ακυλο-αμιδοξίμες**.

Απαιτείται προσθήκη trimethylsilyl-sulfur-trifluoride (**TMSOTf**)

TMSOTf => επάγει την αναδιάταξη του αρχικού μορίου.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν είναι απόλυτα κατανοητός

(Larsen *et al.*, 2008).



Δ) Σχηματισμός **1,2,4-οξαδιαζολίου** από την **O-ακυλο-αμιδοξίμη**

Η αντίδραση βασίζεται στην

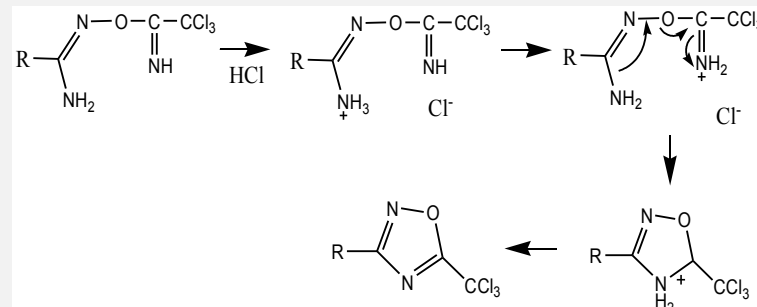
Θέρμανση της O-ακυλο-αμιδοξίμης => **κυκλοποίηση του μορίου**.

Απαιτείται προσθήκη υδροχλωρικού **HCl** και **EtOH**, παρουσία **βάσης**.

(Ooi, *et al.* 1980)

Patent WO2005/121121

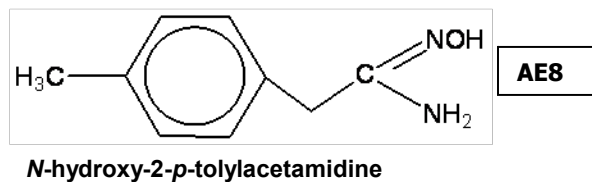
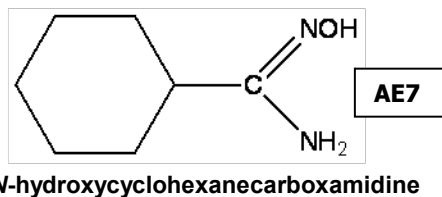
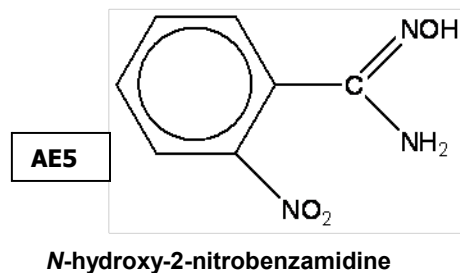
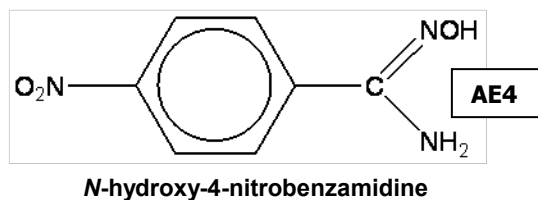
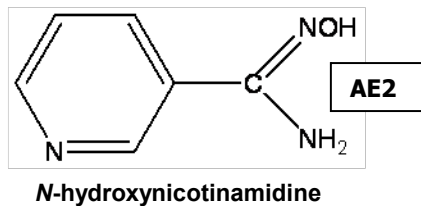
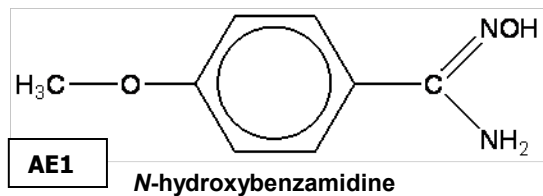
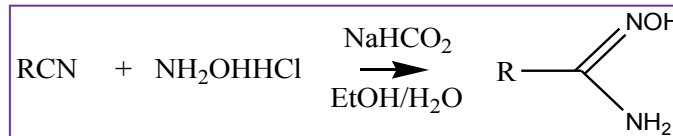
ARENA PHARMACEUTICALS, INC. 454294265; 2005



Σύνθεση νέων παραγώγων αμιδοξιμών και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

Οργανική Σύνθεση

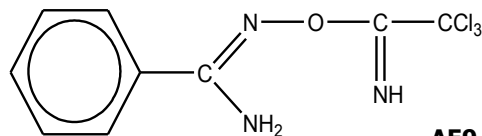
A. Σύνθεση Αμιδοξιμών



Σύνθεση νέων παραγώγων αμιδοξιμών και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

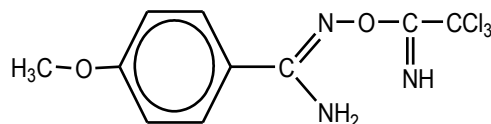
Οργανική Σύνθεση

B. Σύνθεση O-ακυλο-αμιδοξιμών.



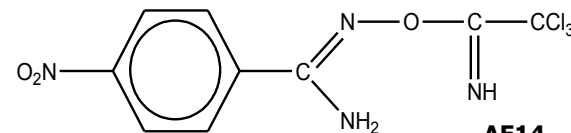
AE9

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)benzamide



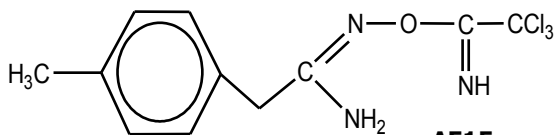
AE13

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)-4-methoxybenzamide



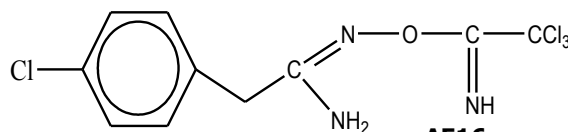
AE14

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)-4-nitrobenzamide



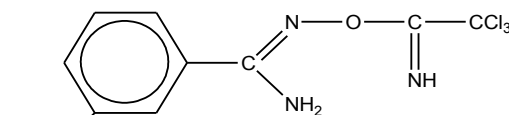
AE15

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)-2-*p*-tolylacetamide



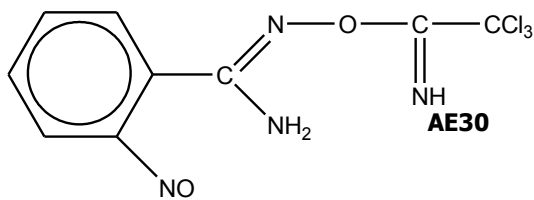
AE16

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)-2-(4-chlorophenyl)acetamide



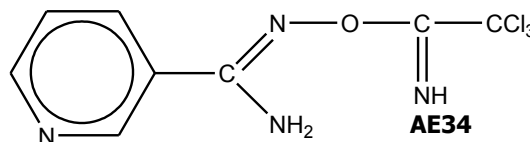
AE29

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)-3-nitrobenzamide



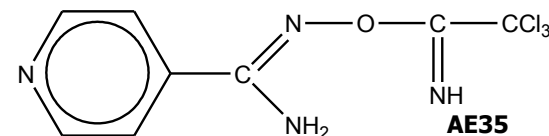
AE30

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)-2-nitrobenzamide



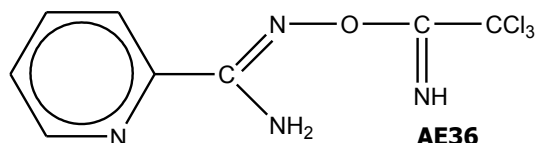
AE34

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)nicotinamide



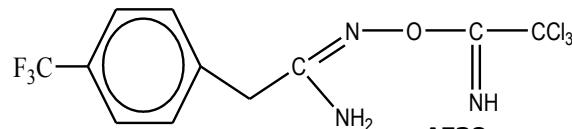
AE35

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)isonicotinamide



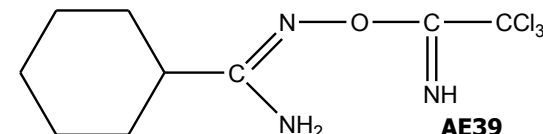
AE36

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)picolinamide



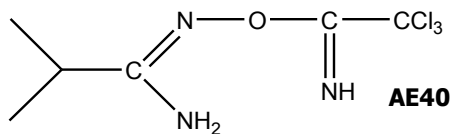
AE38

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)acetamide



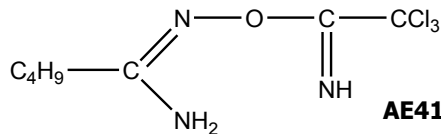
AE39

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)-cyclohexancarboamide



AE40

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)isobutyramide



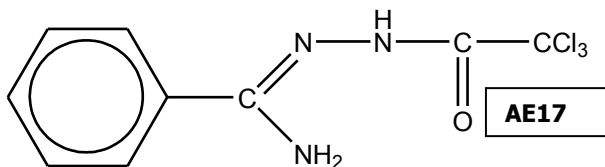
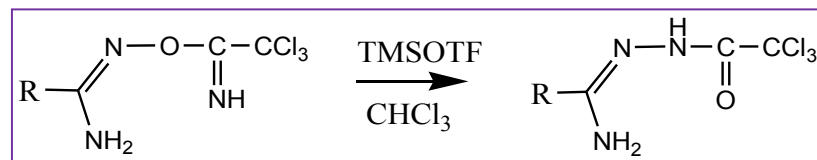
AE41

N-(2,2,2-trichloroacetoxy)pentamidinamide

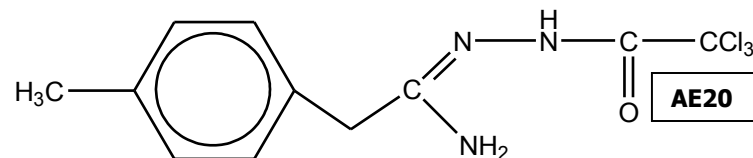
Σύνθεση νέων παραγώγων αμιδοξιμών και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

Οργανική Σύνθεση

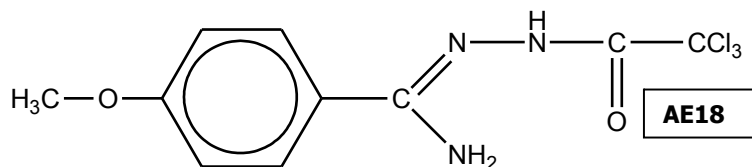
Γ. Σύνθεση αμιδραζονών



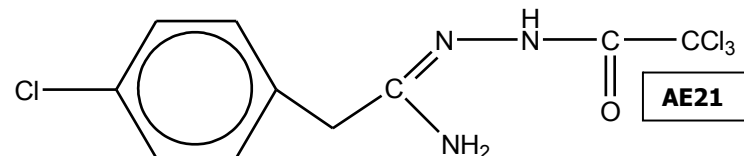
N-(1-amino-2-phenylethylidene)-2,2,2-trichloroacetohydrazide



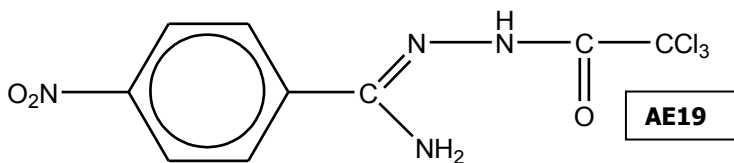
N-(1-amino-2-p-tolylethylidene)-2,2,2-trichloroacetohydrazide



N-(amino(4-methoxyphenyl)methylene)-2,2,2-trichloroacetohydrazide



N-(1-amino-2-(4-chlorophenyl)ethylidene)-2,2,2-trichloroacetohydrazide

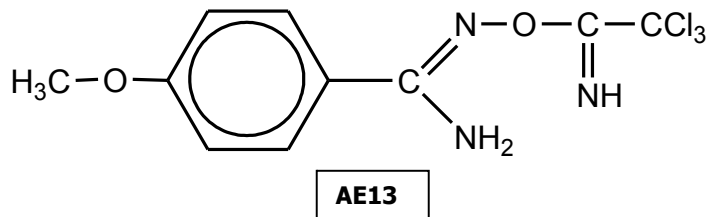
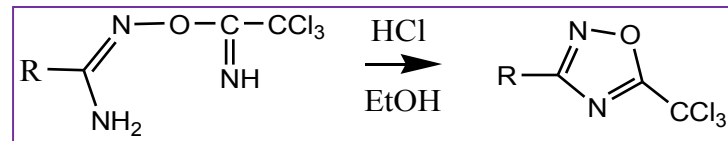


N-(amino(4-nitrophenyl)methylene)-2,2,2-trichloroacetohydrazide

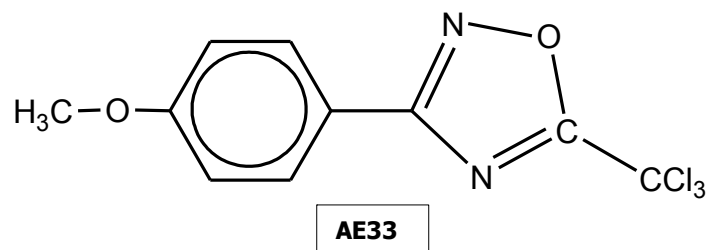
Σύνθεση νέων παραγώγων αμιδοξίμων και μελέτη της βιολογικής τους δράσης

Οργανική Σύνθεση

Δ) Σχηματισμός 1,2,4-οξαδιαζολίου από την *O*-ακυλο-αμιδοξίμη



N-(2,2,2-trichloroacetoxy)-4-methoxybenzamidine



5-(trichloromethyl)-3-(4-methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazole

Αμιδοξίμικά παράγωγα - Φωτοχημική δράση στο DNA

Διαδικασία

Πλασμιδιακό DNA **pBluescriptKS**.

Η ένωση αναμειγνύεται με το DNA.

Το μίγμα ένωση-DNA τοποθετείται σε φιαλίδιο.

Τοποθετείται σε επιφάνεια από όπου εκτίθεται σε

ακτινοβολία.

Ακτινοβολία: **312nm, 90W**.

- Επιθυμητές συνθήκες:
τέτοιες ώστε να προκαλείται θραύση του DNA
MONO από την ένωση, με ταυτόχρονη ακτινοβόληση.

Ladder 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



γραμμικό DNA,
nicked

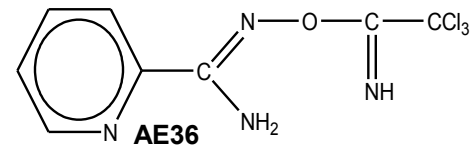
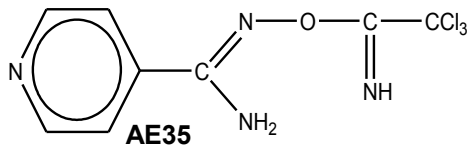
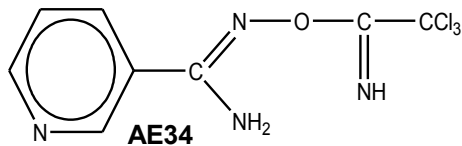
- 1) DNA ladder
- 2) DNA only, pH 5.0
- 3) DNA only, pH 6.0
- 4) DNA only, pH 7.0
- 5) DNA only, pH 5.0 + UV
- 6) DNA, pH 5.0 + AE34 + UV
- 7) DNA, pH 5.0 + AE35 + UV
- 8) DNA, pH 5.0 + AE36 + UV
- 9) DNA only, pH 6.0 + UV
- 10) DNA, pH 6.0 + AE34 + UV
- 11) DNA, pH 6.0 + AE35 + UV
- 12) DNA, pH 6.0 + AE36 + UV
- 13) DNA only, pH 7.0 + UV
- 14) DNA, pH 7.0 + AE34 + UV
- 15) DNA, pH 7.0 + AE35 + UV
- 16) DNA, pH 7.0 + AE36 + UV

Ladder 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



- 1) DNA ladder
- 2) DNA only, pH 8.0
- 3) DNA only, pH 9.0
- 4) DNA only, pH 8.0 + UV
- 5) DNA, pH 8.0 + AE34 + UV
- 6) DNA, pH 8.0 + AE35 + UV
- 7) DNA, pH 8.0 + AE36 + UV
- 8) DNA only, pH 9.0 + UV
- 9) DNA, pH 9.0 + AE34 + UV
- 10) DNA, pH 9.0 + AE35 + UV
- 11) DNA, pH 9.0 + AE36 + UV

Αμιδοξίμικά παράγωγα - Φωτοχημική δράση στο DNA



Ladder 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



- 1) DNA ladder
- 2) DNA only, pH 5.0
- 3) DNA only, pH 6.0
- 4) DNA only, pH 7.0
- 5) DNA only, pH 5.0 + UV
- 6) DNA, pH 5.0 + AE34 + UV
- 7) DNA, pH 5.0 + AE35 + UV
- 8) DNA, pH 5.0 + AE36 + UV
- 9) DNA only, pH 6.0 + UV
- 10) DNA, pH 6.0 + AE34 + UV
- 11) DNA, pH 6.0 + AE35 + UV
- 12) DNA, pH 6.0 + AE36 + UV
- 13) DNA only, pH 7.0 + UV
- 14) DNA, pH 7.0 + AE34 + UV
- 15) DNA, pH 7.0 + AE35 + UV
- 16) DNA, pH 7.0 + AE36 + UV

Ladder 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



- 1) DNA ladder
- 2) DNA only, pH 8.0
- 3) DNA only, pH 9.0
- 4) DNA only, pH 8.0 + UV
- 5) DNA, pH 8.0 + AE34 + UV
- 6) DNA, pH 8.0 + AE35 + UV
- 7) DNA, pH 8.0 + AE36 + UV
- 8) DNA only, pH 9.0 + UV
- 9) DNA, pH 9.0 + AE34 + UV
- 10) DNA, pH 9.0 + AE35 + UV
- 11) DNA, pH 9.0 + AE36 + UV

Συμπέρασμα: **AE34 < AE35 = AE36**

- Το **AE34** έχει μικρή επίδραση στη θραύση του DNA
Βέλτιστη δράση σε pH ≥ 7 .
- Το **AE35** έχει κάποια επίδραση στη θραύση του DNA
Βέλτιστη δράση σε pH ≥ 7 .
- Το **AE36** έχει κάποια επίδραση στη θραύση του DNA
Βέλτιστη δράση σε pH ≥ 7

Αμιδοξίμικά παράγωγα - Φωτοχημική δράση στο DNA

- ✓ Τριχλωροακετονιτρίλια ικανά να προσδεθούν στο πλασμιδιακό DNA και να προκαλέσουν θραύση του.
- Αναμένεται όμοια δράση και από τα άλλα ακετονιτρίλια => εφόσον παρόμοιες δομές
- Αναμένεται δράση και από τις αμιδραζόνες και 1,2,4-οξαδιαζόλια
=> εφόσον παρόμοιος κορμός (ίσως διαφορετικές σταθερές πρόσδεσης)

Σκόπιμο και αιτιατό να αξιολογηθούν και τα άλλα παράγωγα.
Οι αμιδοξίμες φαίνεται να διαθέτουν και αυτή την ιδιότητα.

- ✓ Σύνθεση **αμιδοξιμών**
=> μηχανισμός γνωστός
=> εφαρμόσιμος => καθορισμός συνθηκών αντιδράσεων, αποδόσεων, κλπ
- ✓ Σύνθεση παραγώγων: **τριχλωροακετιμιδίων**
=> μηχανισμός σχετικά γνωστός, νέα τάξη χημικών ενώσεων
=> αρχικές δοκιμές => εφαρμόσιμος => καθορισμός συνθηκών αντιδράσεων, αποδόσεων, κλπ
- ✓ Σύνθεση παραγώγων: **αμιδραζονών**
=> νέος μηχανισμός, ελάχιστα γνωστά, νέα τάξη ενώσεων
=> προσπάθεια σχεδιασμού αντιδράσεων
=> εφαρμόσιμες => καθορισμός συνθηκών αντιδράσεων, αποδόσεων, κλπ
- ✓ Σύνθεση παραγώγων: **1,2,4-οξαδιαζόλιο**
=> μηχανισμός γνωστός
=> εφαρμόσιμος => καθορισμός συνθηκών αντιδράσεων, αποδόσεων, κλπ

Μεθοδολογία που επιτρέπει σταθερή σύνθεση και παραγωγή των ενώσεων

Ενώσεις:

- Παράγονται από απλές πρώτες ύλες
- Σχετικά σύντομες διαδικασίες σύνθεσης
- Καλές αποδόσεις αντιδράσεων και ασφαλείς

!!!! Πρόβλημα => αποσύνθεση (υδρόλυση) των ενώσεων

Προσπάθεια εντοπισμού της αιτίας της αποσύνθεσης. Πιθανά αίτια:

- Συνθήκες αποθήκευσης (-20oC - 4oC - 25oC ;;;)
- Επεξεργασία μετά την σύνθεση (καθαρισμός, ανακρυστάλωση, κλπ)
- Διαδικασία ανακρυστάλωσης (θερμοκρασία, διαλύτες)

!!!! Πρόβλημα => Λίγος διαθέσιμος χρόνος

Αποτέλεσμα: Η μελέτη της βιολογικής δράσης των παραγόμενων ενώσεων δεν ολοκληρώθηκε.

Από τα πρώτα δεδομένα φαίνεται πως οι αμιδοξίμες και τα παράγωγα τους είναι ενώσεις ικανές να προσδεθούν στο DNA και να προκαλέσουν θραύση του μετά από ακτινοβόληση.



ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης
www.med.duth.gr



Πανεπιστήμιο Κρήτης
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Κλινική Φαρμακολογία και Θεραπευτική»

Διπλωματική εργασία

ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΑΜΙΔΟΞΙΜΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

Ευτυχία Αγγέλου

Επιβλέπων: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χημείας Οργανικών Ενώσεων
Κωνσταντίνα Φυλακτακίδου

Εργαστήριο Οργανικής Βιολογικής Χημείας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων
Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, ΔΠΘ