

Διπλωματική εργασία

Σύνθεση, χρωματογραφική απομόνωση και φασματοσκοπικός προσδιορισμός της 5-(2',3'-διδέοξυ-2',3'διεϋδρο-β-D-φουρανόζυλο)-(τερτ-βούτυλο φαινυλοαιθύνυλο) ουρακίλης

Synthesis, chromatographic isolation and spectroscopic determination of 5-(2',3'-dideoxy-2',3'dihydro-β-D-furanosyl)-(tert-butyl phenylethynyl) uracil

Αιμηλία Ξυδάκη

Λάρισα 2023



Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κομμιώτη, καθηγητή οργανικής χημείας που με δέχθηκε στο εργαστήριο του, δίνοντάς μου την ευκαιρία να συνθέσω τα δικά μου οργανικά μόρια χρησιμοποιώντας στην πράξη τις γνώσεις που απέκτησα στην οργανική χημεία τα προηγούμενα χρόνια στο τμήμα βιοχημείας.

Από τις ευχαριστίες φυσικά δεν θα μπορούσε να λείψει ο κ. Νικόλαος Κολλάτος, ο οποίος ήταν πάντα δίπλα μου καθ'όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Μου έμαθε να κινούμαι με ασφάλεια μέσα σε ένα εργαστήριο οργανικής χημείας, μου μετέδωσε τον τρόπο σκέψης που χρειάζεται για να στήσεις ένα πείραμα και ήταν εκεί για να μου λύσει κάθε πιθανή απορία καθώς και να προλάβει τα πιθανά λάθη μου.

Τριμελής επιτροπή

Κολλάτος Νικόλαος (επιβλέπων): Συμβασιούχος Διδάσκων ειδικών θεμάτων οργανικής σύνθεσης, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τσοτίνης Ανδρέας: Καθηγητής οργανικής χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών

Κυρίτσης Χρήστος: Ακαδημαϊκός υπότροφος οργανικής χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη

Abstract

1. Εισαγωγή

1.1 Γενετικό υλικό

1.2 Νουκλεοβάσεις

1.3 Σάκχαρα

1.4 Νουκλεοζίτες και νουκλεοζιτικά ανάλογα

1.5 Τροποποιήσεις στην βάση

1.6 Τροποποιήσεις στο σάκχαρο

1.6.1 Γενικά

1.6.2 2',3'-Ακόρεστοι Νουκλεοζίτες

1.7 Ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV)

1.7.1 Δομή HIV

1.7.2 Πολλαπλασιασμός HIV

1.7.3 Zidovudine

1.7.4 Stavudine

2. Ειδικό Μέρος

2.1 Σκοπός

3. Γενική Μεθοδολογία

3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)

3.2 Χρωματογραφία στήλης

3.3 Microwave

3.4 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

4. Πειραματικό Μέρος

4.1 Επισκόπηση Συνθετικής οδού

4.2 Μεθοδολογία Σύνθεσης

4.2.1 Σύνθεση της 5'-Ο-τριτυλο-β-D-ριβοφουρανο-5-ιωδοουρακίλης (2)

4.2.2 Σύνθεση της 3'-Ο-μεζυλο-5'-Ο-τριτυλο-β-D-ριβοφουρανο-5-ιωδοουρακίλης (3)

4.2.3 Σύνθεση της 2',3'-διδεοξυ-5-Ο-τριτυλο-5-ιωδουριδένης (4)

4.2.4 Σύνθεση της 2',3'-διδεοξυ-5-Ο-τριτυλο-5-(τερτβουτυλοφαινυλο ακετυλενιο)ιωδοουριδένης (5)

4.2.5 Σύνθεση της 2',3'-διδεοξυ-τριτυλο-5-(τερτ-βουτυλοφαινυλο ακετυλενιο)ιωδοουριδένης (6)

5. Συμπεράσματα/Συζήτηση

6. Βιβλιογραφία

Περίληψη

Η πανδημία της Covid-19 έπληξε την παγκόσμια κοινότητα και στιγμάτισε την κοινωνία του 21ου αιώνα, αριθμώντας μεγάλες απώλειες. Στον αγώνα για την ανάπτυξη θεραπειών έναντι του SARS-CoV-2, μεταξύ άλλων δοκιμάστηκε και το Remdesivir, ένα πρόδρομο νουκλεοζιτικό ανάλογο αδενοσίνης, φέρνοντας στο φως ξανά την σημαντικότητα των νουκλεοζιτικών αναλόγων. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι συνθετικά οργανικά μόρια με αντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες.

Πιο συγκεκριμένα, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι νουκλεοσίδια που φέρουν τουλάχιστον μια τροποποίηση στην νουκλεοβάση ή/και στο σάκχαρο. Υπάρχουν αρκετά, τα οποία έχουν ήδη εγκριθεί από τον FDA και χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση ιώσεων και διαφόρων τύπων καρκίνου.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκε, απομονώθηκε και προσδιορίστηκε ένα νέο νουκλεοζιτικό ανάλογο ουριδίνης, το οποίο φέρει έναν διπλό δεσμό στο σάκχαρό του, καθώς και μια επιπλέον αλκυλομάδα στην νουκλεοβάση του. Το μόριο αυτό έχει πιθανή αντική δράση, η οποία όμως δεν έχει εξακριβωθεί.

Abstract

The Covid-19 pandemic has hit the global community and stigmatized the 21st century society, counting great losses. In the race to develop treatments against SARS-CoV-2, Remdesivir, a precursor nucleoside analogue of adenosine, was proved as an efficient medicine. This fact brought back to light the importance of nucleoside analogues. Nucleoside analogs are synthetic organic molecules with significant antiviral and anticancer properties.

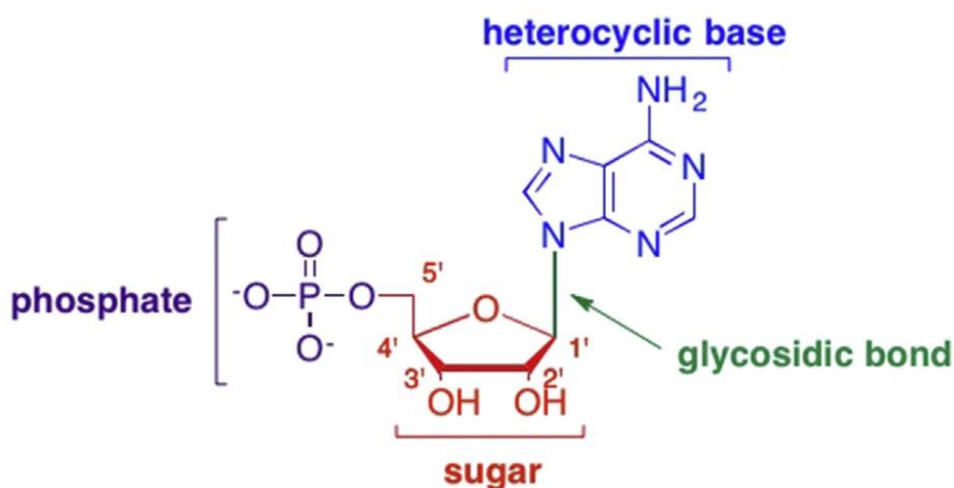
Especially, nucleoside analogs are nucleosides that carry at least one modification on the nucleobase and/or sugar. Many of them have already been approved by the FDA and are used against of viruses and various types of cancer.

In the present dissertation, a new uridine nucleoside analogue was synthesized, isolated and characterized. This analogue carries a double bond in its sugar, as well as an additional alkyl group in its nucleobase. This molecule has a possible antiviral effect, however, it has not been verified.

1. Εισαγωγή

1.1 Γενετικό υλικό

Ο βασικός δομικός λίθος όλων των ζωντανών οργανισμών είναι το DNA (δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ) και μαζί με το RNA (ριβονουκλεϊκό οξύ) μεταφέρουν όλες τις πληροφορίες που χρειάζεται ένας έμβιος οργανισμός για να αναπτυχθεί, από γενιά σε γενιά. Τα νουκλεϊκά οξέα αποτελούνται από πολυμερές αλυσίδες νουκλεοτιδίων, τα οποία με την σειρά τους αποτελούνται από ένα σάκχαρο, μια αζωτούχα βάση και ένα μόριο φωσφορικού οξέος. (K.L. Seley-Radtke, M.K. Yates, 2018)



Εικόνα 4: Η δομή ενός νουκλεοτιδίου (K.L. Seley-Radtke, M.K. Yates, 2018)

Πιο συγκεκριμένα, το DNA, σύμφωνα με το μοντέλο J. Watson και F. Crick, έχει μορφή δεξιόστροφης διπλής έλικας, αποτελούμενη από δύο αλυσίδες συμπληρωματικές και αντιπαράλληλες που συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου.

Ενώ το RNA στον αντίποδα είναι ένα μονόκλωνο πολυνουκλεοτιδικό μόριο που βοηθά στην μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από τον πυρήνα προς τα ριβοσώματα. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις φαίνεται το ίδιο να αποτελεί το γενετικό υλικό κάποιων ιών, όπως συμβαίνει με την οικογένεια των ρετροϊών. (L.G. Wade, 2006)

1.2 Νουκλεοβάσεις

Οι νουκλεοβάσεις είναι αζωτούχα ετεροκυκλικά μόρια που συνδέονται με την ριβόζη ή την δεοξυριβόζη και λειτουργούν ως δέκτες πρωτονίων. Οι νουκλεοτιδικές βάσεις χωρίζονται σε βάσεις πουρίνης, οι οποίες είναι παράγωγα της πουρίνης οπότε διαθέτουν δυο αρωματικούς δακτυλίους και στις βάσεις πυριμιδίνης, οι οποίες προέρχονται από την πυριμιδίνη και διαθέτουν μόνο έναν δακτύλιο. Στις βάσεις πουρίνης ανήκουν, όπως φαίνεται και στην εικόνα 2, η αδερίνη και η γουανίνη, ενώ στις βάσεις πυριμιδίνης ανήκουν η θυμίνη, η κυτοσίνη και η ουρακίλη. (Burton E. Tropp, 2014)

Οι βάσεις συνδέονται με τον ριβοφουρανοζιτικό δακτύλιο με έναν δεσμό μεταξύ ενός ατόμου N από τον δακτύλιο της βάσης και τον C1 από τον δακτύλιο της φουρανόζης. Ο δεσμός αυτός ονομάζεται N-γλυκοζιτικός δεσμός.



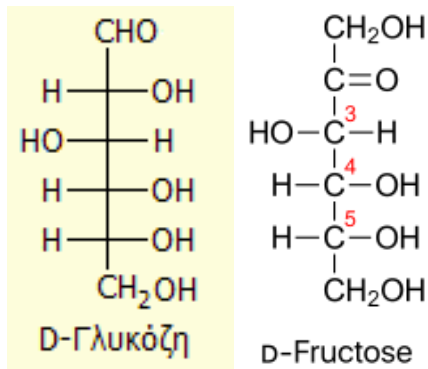
Εικόνα 2: Οι νουκλεοβάσεις (Α. ΖΙΦΑ, Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ, Κ. ΜΟΥΤΟΥ, 2011)

1.3 Σάκχαρα

Απλό σάκχαρο ή μονοσακχαρίτης ονομάζεται μια ένωση που δεν μπορεί να υδρολυθεί σε μικρότερη και έχει μοριακό τύπο $C_n(H_2O)_m$, δηλαδή αποτελείται μόνο από άτομα άνθρακα και μόρια νερού. Χαρακτηριστικοί μονοσακχαρίτες είναι η γλυκόζη, η οποία αποτελεί την κύρια τροφή του εγκεφάλου και είναι ζωτικής σημασίας για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και η φρουκτόζη, η οποία έχει την πιο γλυκιά γεύση μεταξύ των σακχάρων και βρίσκεται σε όλα τα φρούτα, ως φυσικό γλυκαντικό.

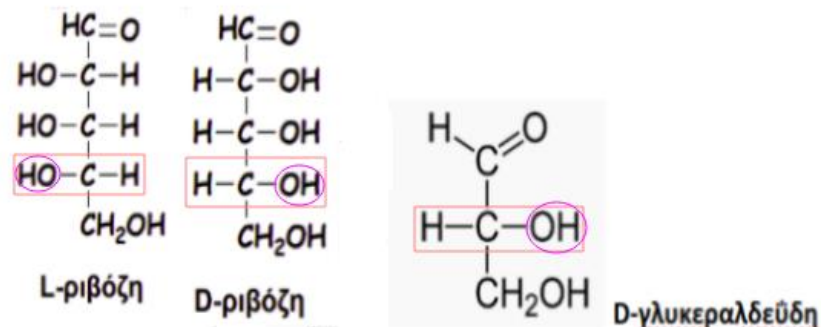
Οι μονοσακχαρίτες έχουν την τάση να ενώνονται μεταξύ τους με αντιδράσεις συμπύκνωσης και να δημιουργούν δισακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η σακχαρόζη ή αλλιώς ζάχαρη, η οποία αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο φρουκτόζης και το άμυλο, που είναι η βασική αποθήκη ενέργειας σε όλους τους έμβιους οργανισμούς και είναι ένα πολυμερές μορίων γλυκόζης ενωμένων με γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Από χημική άποψη οι μονοσακχαρίτες είναι ενώσεις που περιέχουν πολλές υδροξυλομάδες και μία καρβονυλομάδα. Ανάλογα αν η καρβονυλομάδα είναι αλδευδομάδα ή κετονομάδα διακρίνονται σε αλδόζες και κετόζες αντίστοιχα. Ένα παράδειγμα αλδόζης είναι η γλυκόζη, ενώ η φρουκτόζη είναι μια κετόζη.

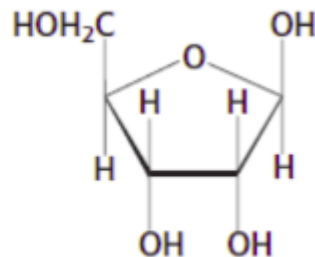
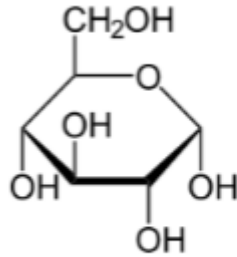
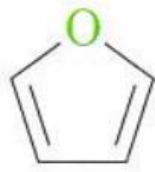
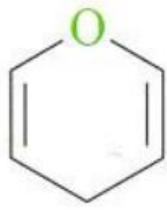


Επειδή τα μόρια αυτά έχουν πολλαπλούς ασύμμετρους άνθρακες (=άνθρακες συνδεδεμένους με τέσσερις διαφορετικούς υποκαταστάτες), υπάρχουν ως διαστεροϊσομερή, δηλαδή ισομερή τα οποία δεν είναι είδωλα καθρέπτη το ένα του άλλου, καθώς επίσης και ως εναντιομερή, δηλαδή μόρια που μεταξύ του έχουν σχέση ειδώλου-αντικειμένου και διαφέρουν ως προς την ικανότητα στρέψης του πολωμένου φωτός.

Στα εναντιομερή, τα σύμβολα D και L καθορίζουν την απόλυτη διαμόρφωση του πιο απομακρυσμένου από την αλδεϋδική ή την κετονική ομάδα ασύμμετρου άνθρακα. Ένα σάκχαρο ανήκει στη σειρά D εάν η απόλυτη διαμόρφωση του πιο απομακρυσμένου από την αλδεϋδική ή την κετονική ομάδα ασύμμετρου ατόμου άνθρακα είναι η ίδια με εκείνη της D-γλυκεραλδεϋδης. Τα περισσότερα φυσικά σάκχαρα ανήκουν στη σειρά D.



Στα υδατικά τους διαλύματα τα σάκχαρα απαντώνται κυρίως σε κυκλική μορφή. Αυτό οφείλεται σε μία εσωτερική αντίδραση και συγκεκριμένα σε μία αντίδραση προσφοράς ενός ατόμου H, που προέρχεται από το 4° ή 5° άτομο C, στον διπλό δεσμό του καρβονυλίου (1° ή 2° άτομο C), οπότε και σχηματίζεται ημιακεταλικό υδροξύλιο και το μόριο παίρνει την κυκλική του μορφή. Τα κυκλικά μόρια με έξι άτομα άνθρακα ονομάζονται πυρανόζες, καθώς περιέχουν το σκελετό του πυρανίου. Σε αντίθεση όμως με το πυράνιο, η πυρανόζη δεν έχει διπλούς δεσμούς. Τα κυκλικά μόρια με πέντε άτομα άνθρακα ονομάζονται φουρανόζες, καθώς περιέχουν το σκελετό του τετραϋδροφουρανίου αλλά ούτε αυτά έχουν διπλούς δεσμούς. Η γλυκόζη είναι μια πυρανόζη, ενώ η ριβόζη είναι μια φουρανόζη.



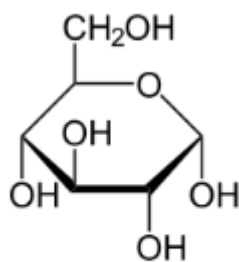
Πυράνιο Φουράνιο

α-D-γλυκόζη

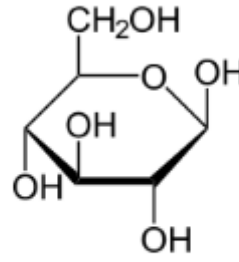
D-Ριβόζη

Σε αυτές τις κυκλοποιήσεις δημιουργείται ένα νέο ασύμμετρο κέντρο στον ανωμερή άνθρακα (C-1 στις αλδόζες και C-2 στις κετόζες). Στο α-ανωμερές η υδροξυλική ομάδα που είναι συνδεδεμένη με το ανωμερικό άτομο άνθρακα βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου, ενώ στο β-ανωμερές είναι επάνω από τον δακτύλιο.

Στην γλυκόζη για παράδειγμα ο άνθρακας C-1 καλείται ανωμερικό άτομο άνθρακα και οι μορφές α και β καλούνται ανωμερή. Ένα μείγμα ισορροπίας της γλυκόζης περιέχει περίπου ένα τρίτο α-ανωμερές, δύο τρίτα β-ανωμερές και <1% μορφή ανοιχτής αλυσίδας. Τα σάκχαρα στην φύση συνήθως βρίσκονται σε κυκλική μορφή (~99%), καθώς αυτή είναι και η πιο σταθερή.

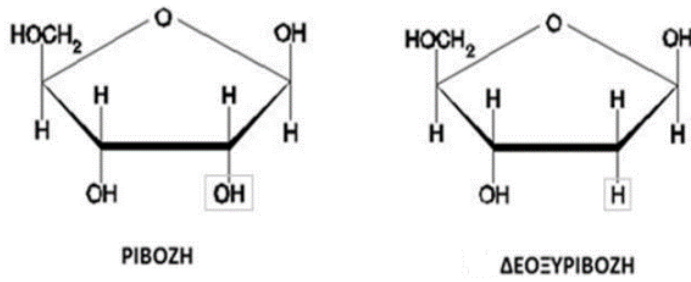


α-D-γλυκόζη
 $[\alpha]_D = +18^\circ$



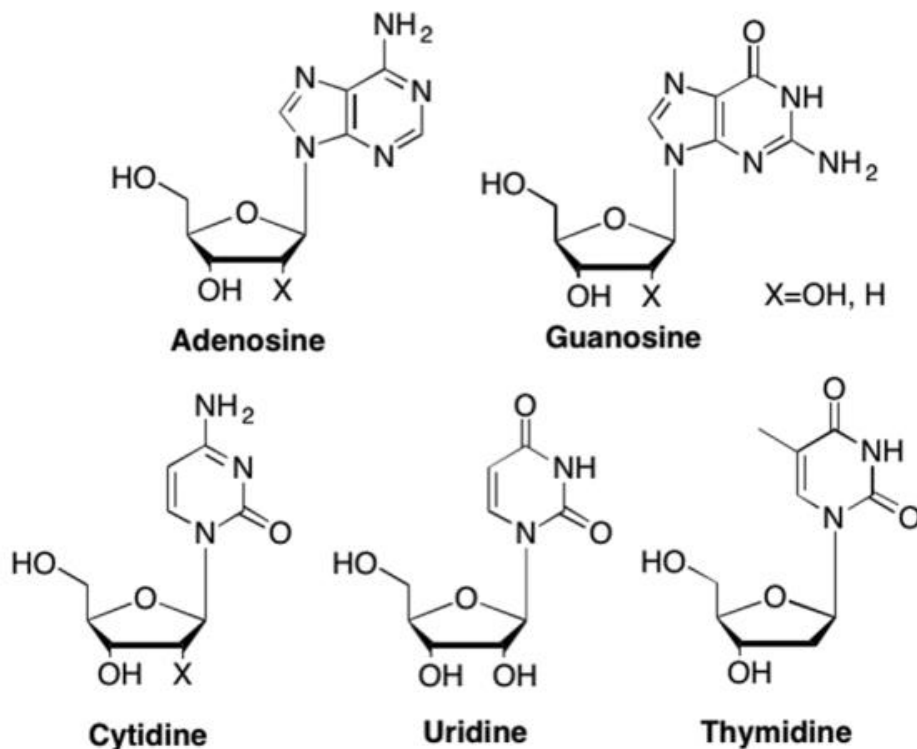
β-D-γλυκόζη
 $[\alpha]_D = +112^\circ$

Το RNA αποτελείται από μόρια D-ριβόζης (ο χημικός μοριακός τύπος είναι $C_5H_{10}O_5$) και αντίστοιχα το DNA αποτελείται από μόρια D-δεοξυριβόζης (ο χημικός μοριακός τύπος είναι $C_5H_{10}O_4$), τα οποία και τα δύο είναι σάκχαρα αποτελούμενα από πέντε άτομα άνθρακα και μια αλδεϋδομάδα, γι αυτό και ανήκουν στην οικογένεια των αλδοπεντοζών. Η διαφορά τους βρίσκεται στον C2 άνθρακα του σακχάρου, όπου στην δεοξυριβόζη φαίνεται να λείπει ένα άτομο O. (Burton E. Tropp, 2014)



1.4 Νουκλεοζίτες και νουκλεοζιτικά ανάλογα

Νουκλεοζίτες ή νουκλεοσίδια ονομάζονται οι ριβοφουρανοζιτικοί δακτύλιοι ενωμένοι με μία βάση, μέσω ενός N-γλυκοζιτικού δεσμού, χωρίς όμως την παρουσία φωσφορικής ομάδας στον C5 του δακτυλίου της φουρανόζης. Οι νουκλεοζίτες είναι πολύ σημαντικά μόρια, καθώς αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των νουκλεοτιδίων, αλλά διαδραματίζουν και σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή, στην μεταγραφή και στην διατήρηση της έκφρασης των γονιδίων. Στην εικόνα 3 απεικονίζονται οι πέντε φυσικοί νουκλεοζίτες που εντοπίζονται στο γενετικό μας υλικό.



Εικόνα 3: Φυσικοί νουκλεοζίτες που απαντώνται στο γενετικό υλικό (K.L. Seley-Radtke, M.K. Yates, 2018)

Έχει βρεθεί ότι κάνοντας μερικές τροποποιήσεις στο σάκχαρο ή/και στην βάση του νουκλεοζιτη, δημιουργούνται ανάλογα νουκλεοσιδίων, τα οποία μπορεί να έχουν δράση ως αναστολείς του μεταβολισμού ή/και της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων, εμποδίζοντας έτσι

τον πολλαπλασιασμό των όπως ο HIV, ο COVID-19 και άλλοι ή προκαλώντας απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα. Τα νουκλεοσιδικά φάρμακα χωρίζονται με βάση τον τρόπο δράσης τους σε αναστολείς ενζύμων και σε τερματιστές αλυσίδας. Γενικότερα τα μόρια αυτά αναγνωρίζονται από ειδικές πρωτεΐνες στην μεμβράνη των κυττάρων, οι οποίες τα βοηθούν να εισέλθουν στα κύτταρα ώστε να είναι διαθέσιμα για μονο-,δι- ή τριμεθυλίωση από τις κινάσες. Έπειτα ένα τριφωσφορυλιωμένο νουκλεοσιδικό παράγωγο μπορεί να δράσει ως αναστολέας της πολυμεράσης, ως αναστολέας της αντίστροφης μεταγραφάσης ή να πάρει μέρος στην αντιγραφή ή μεταγραφή ενός νουκλεϊκού οξέως.

Κάποια από αυτά τα μόρια έχουν ήδη εγκριθεί από τον FDA και χρησιμοποιούνται ως φάρμακα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.

(Burton E. Tropp,2014) (X. Lin, C. Liang, L. Zou et al., 2021)

Antiviral and anti-tumor nucleoside drugs currently on the market.

Bioactivities	Drug names
Antiviral Broad-spectrum antiviral drug	Ribavirin
Anti-HIV	Zidovudine, Didanosine, Zalcitabine, Stavudine, Lamivudine, Abacavir, Tenofovir, Emtricitabine
Anti-HBV	Lamivudine, Telbivudine, Adefovir dipivoxil, Emtricitabine, Entecavir, Tenofovir disoproxil, Clevudine
Anti-HCV	Sofosbuvir
Anti-herpes virus	Idoxuridine, Trifluorothymidine, Brivudine, Acyclovir, Valacyclovir, Penciclovir, Famciclovir, Ganciclovir, Formimivir, Cidofovir
Anti-COVID-19	Remdesivir
Anti-tumor	6-Mercaptopurine, 6-Mercaptoguanine, Fludarabine, Clofarabine, Cladribine, Adenine arabinoside, Nelarabine, Cytarabine, Decitabine, Enocitabine, Troxacitabine, 5-FU, Gemcitabine, Zalcitabine, Capecitabine, CNDAC

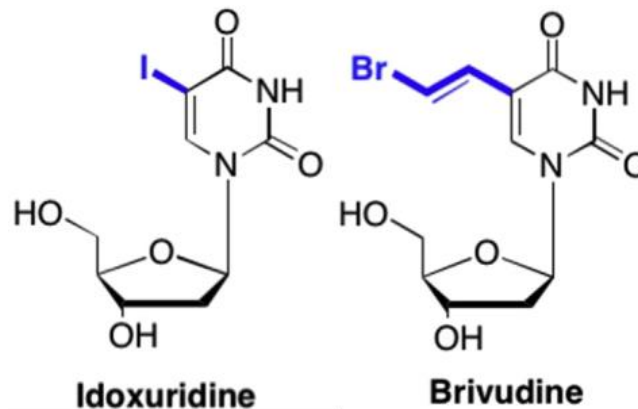
Εικόνα 4 :Νουκλεοζιτικά ανάλογα που έχουν εγκριθεί από τον FDA ως φάρμακα (X .Lin ,C .Liang ,L . Zou et al., 2021)

Ένα από τα πιο συζητημένα νουκλεοζιτικά φάρμακα του 21ου αιώνα αποτελεί το Remdesivir, ένα πρόδρομο νουκλεοζιτικού αναλόγου αδενοσίνης με αντική δράση έναντι του SARS-CoV-2. Το μόριο αυτό φέρει τροποποίηση στο σάκχαρο και στην βάση του και για να αποκτήσει την ενεργή μορφή του πρέπει να τριφωσφορυλιωθεί από ενδοκυτταρικές κινάσες. Στην μορφή αυτή ανταγωνίζεται τη φυσική τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) για την πρόσδεση στην RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, κατά την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος, με στόχο τον πρόωρο τερματισμό της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας. Το Remdesivir αρχικά ήταν σε κλινικές δοκιμές για την αντιμετώπιση του ιού Ebola, με την έναρξη της πανδημίας λόγω της Covid-19 (Μάιος του 2020), δοκιμάστηκε και αποδείχθηκε η δράση του έναντι και του SARS-CoV-2, με αποτέλεσμα να είναι το πρώτο εγκεκριμένο φάρμακο έναντι αυτού σε Ευρώπη και Καναδά, ενώ η επίσημη έγκριση από τον FDA πραγματοποιήθηκε στις 10 Αυγούστου του 2020. (Yvette N. Lamb, 2020)

1.5 Τροποποιήσεις στην βάση

Οι πιο κοινές τροποποιήσεις στη βάση των νουκλεοζιτών είναι αυτές στον C5 του δακτυλίου τους. Άλλες πιθανές τροποποιήσεις αποτελούν οι αφαίρεση ή η μετατόπιση ενός ατόμου αζώτου του ήδη υπάρχοντος δακτυλίου, η προσθήκη δακτυλίων και η αφαίρεση του γλυκοζιτικού δεσμού, αφαιρώντας το N του δεσμού.

Η προσθήκη υποκαταστατών στην 5'-θέση του δακτυλίου των πυριμιδινών προκαλεί αλλαγές στα στερεικά φαινόμενα, στο ηλεκτρονιακό νέφος και στους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του νουκλεοζιτη και του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Αν μάλιστα προστεθεί στην 5'-θέση ένας αλκύλο-υποκαταστάτης προσδίδει επιπλέον λιποφιλικότητα στο μόριο, η οποία εάν δεν είναι υπερβολική ώστε το μόριο να ενσωματωθεί στον λιπώδη ιστό, τότε μπορεί ο υποκαταστάτης αυτός να αυξήσει την δραστηριότητα του μορίου. Επιπλέον αυτή η υποκατάσταση εξυπηρετεί και στην μεταφορά του μορίου αλλά και στο καλύτερο "πακετάρισμα" του νουκλεοζιτη μέσα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το Idoxuridine και το Brivudine είναι από τα πρώτα παραδείγματα νουκλεοζιτικών αναλόγων ουριδίνης με υποκατάσταση στην θέση 5' που εγκρίθηκαν από τον FDA ως αντικά φάρμακα έναντι του έρπητα ζωστήρα (HSV). (S.J. Keam et al., 2004) (K.L. Seley-Radtke, M.K. Yates, 2018)



Εικόνα 5: Νουκλεοζιτικά ανάλογα ουριδίνης (K.L. Seley-Radtke, M.K. Yates, 2018)

1.6 Τροποποιήσεις στο σάκχαρο

1.6.1 Γενικά

Οι βασικές τροποποιήσεις των νουκλεοζιτικών σακχάρων αφορούν είτε το 2'-OH, το οποίο μπορεί να αλλάξει στερεοδιαμόρφωση, να αφαιρεθεί ή να αντικατασταθεί, είτε την προσθήκη αλκυλομάδας στον C3, το οποίο προσδίδει συνήθως αντικαρκινικές ιδιότητες, είτε την προσθήκη αιθυνο-, κυανο- ή αζιδο- ομάδας στον C4, το οποίο προσδίδει συνήθως αντικές ιδιότητες. Επιπλέον με την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στον C5 ενισχύεται η βιοδιαθεσιμότητα και η δραστηριότητα του μορίου. Ωστόσο, η πιο σημαντική τροποποίηση είναι η δημιουργία διπλού δεσμού μεταξύ του C2 και του C3, η οποία προσδίδει ακορεστότητα στο μόριο και ταυτόχρονα μια πιο άκαμπτη μορφή. Οι συγκεκριμένοι ακορεστοί νουκλεοζίτες έχουν αποδειχθεί ισχυρά όπλα έναντι του ιού HIV, ο οποίος προκαλεί το Σύνδρομο της Επίκτητης Ανοσολογικής Ανεπάρκειας (AIDS), το οποίο αποτέλεσε μάστιγα στα τέλη του 20ου αιώνα και συνεχίζει να υπάρχει, χωρίς ακόμα να υπάρχει διαθέσιμο εμβόλιο για την πρόληψη από τον ιό αυτό. (X. Lin, C. Liang, L. Zou et al., 2021)

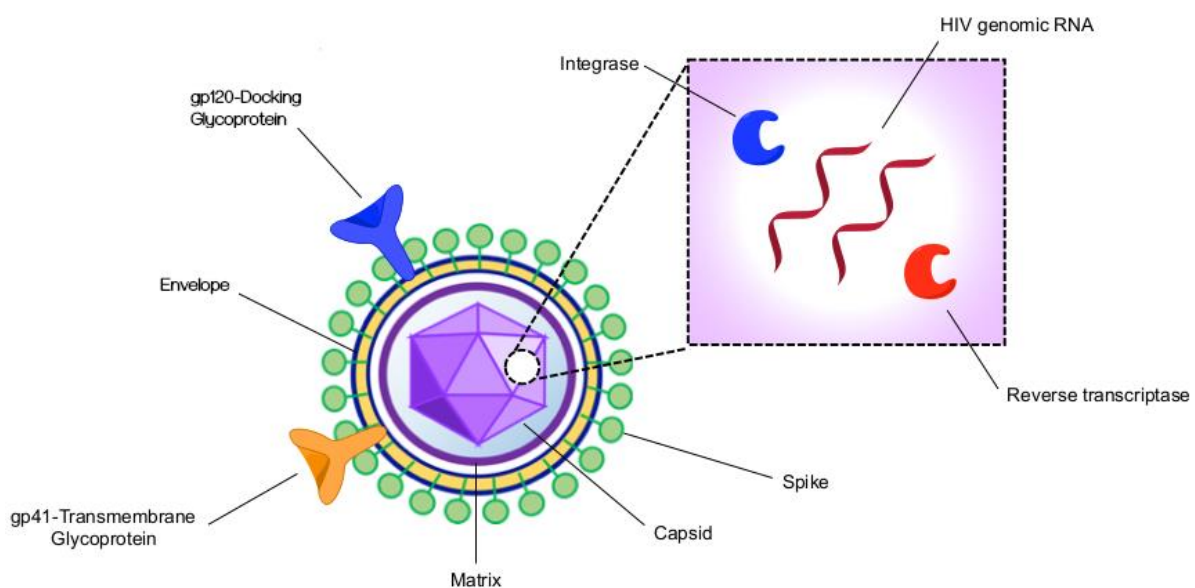
1.6.2 2',3'-Ακόρεστοι Νουκλεοζίτες

Μετά την ανακάλυψη πως κατά την δημιουργία της καινούργιας νουκλεοτιδικής αλυσίδας από την αντίστροφη μεταγραφάση των RNA ών, έχουμε αλληλεπίδραση μεταξύ του 3'-OH της ήδη υπάρχουσας αλυσίδας και του 5' άκρου του νεοεισερχόμενου νουκλεοτιδίου, οι έρευνες εστίασαν αρχικά στην αντικατάσταση του 3'-OH με στόχο τον τερματισμό της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας, διότι δεν θα μπορούσε πλέον το 3'-άκρο να αλληλεπιδράσει και να επεκταθεί. Στην συνέχεια βρέθηκε πως η ταυτόχρονη αποξυγόνωση και αφυδρογόνωση στον C2 και στον C3 , δημιουργώντας διπλό δεσμό μεταξύ τους, αποτελεί μια αρκετά ενδιαφέρουσα τροποποίηση που προσδίδει κυρίως αντική δράση στο μόριο, καθώς λειτουργεί ως τερματιστής της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA κατά την αντιγραφή του ιού και επιπλέον προσδίδει και σταθερότητα στον ίδιο τον νουκλεοζίτη. (K.L. Seley-Radtke, M.K. Yates, 2018)

1.7 Ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV)

1.7.1 Δομή HIV

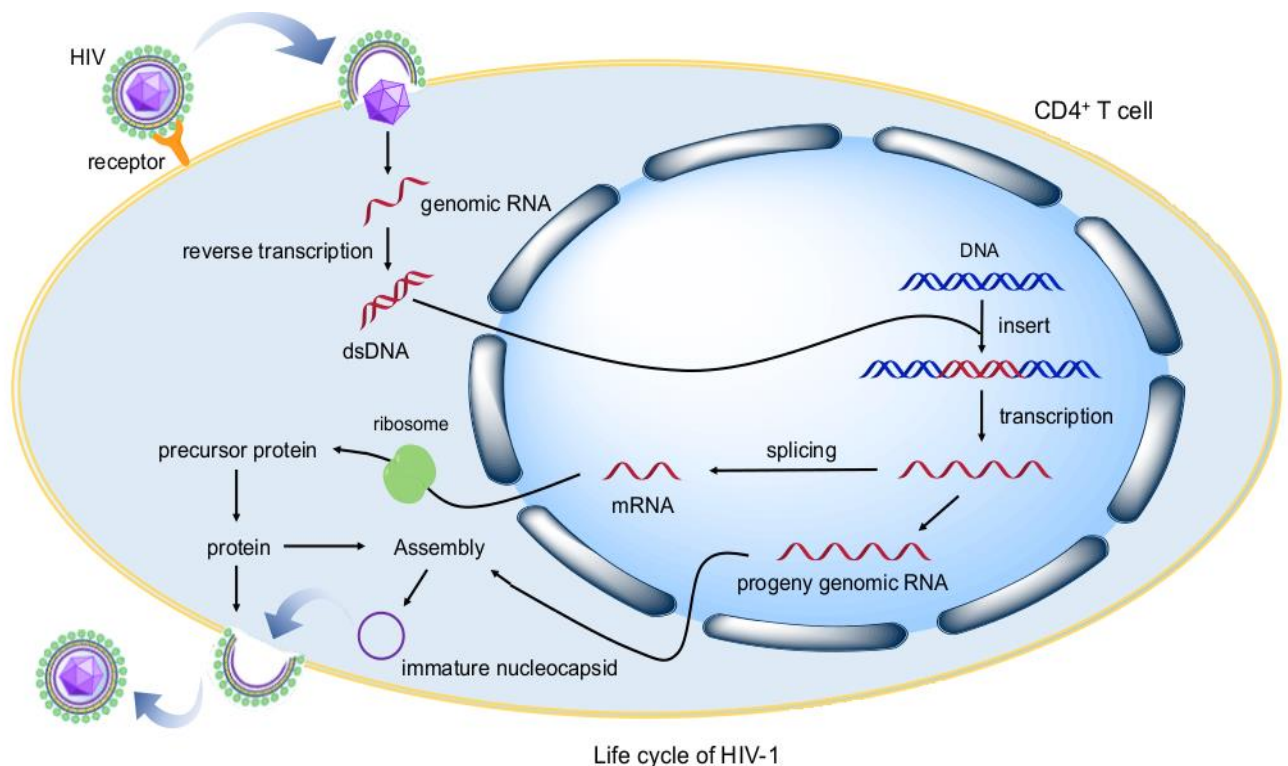
Ο HIV-1 ανήκει στην οικογένεια των ρετροϊών. Ο HIV-1 σχηματίζει ένα σφαιρικό σωματίδιο με διάμετρο περίπου 120 nm, το εξωτερικό του οποίου ονομάζεται φάκελος και αποτελείται από δύο στρώματα λιπιδίων. Τα λιπίδια αυτά προέρχονται από την ανθρώπινη κυτταρική μεμβράνη, τα οποία τα παρασέρνει ο ιός κατά την έξοδό του από το κύτταρο. Στο εξωτερικό του φακέλου εμφανίζονται δυο γλυκοπρωτεΐνες όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την προσκόλληση του ιού στον ξενιστή του. Στο εσωτερικό του φακέλου υπάρχει ένα καψίδιο, που αποτελείται από ~2.000 αντίγραφα της p24, της πρωτεΐνης του ιού και στο εσωτερικό του υπάρχουν δυο αντίγραφα του RNA γονιδιώματος του, καθώς και τρία ένζυμα - αντίστροφη μεταγραφάση, πρωτεάση και ιντεγκράση, τα ένζυμα αυτά είναι απαραίτητα για την πραγματοποίησή του κύκλου αντιγραφής του ιού. Αυτά τα ένζυμα, αλλά και οι γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου αποτελούν κύριους στόχους για την ανάπτυξη θεραπειών. (Y. Yoshida et al., 2021)



Εικόνα 6: Δομή HIV (Y. Yoshida et al., 2021)

1.7.2 Πολλαπλασιασμός HIV

Πιο αναλυτικά, ο ιός HIV για να εισέλθει εντός των κυττάρων, πρέπει να προσκολληθεί στον υποδοχέα CD4, ο οποίος βρίσκεται σε ορισμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού (στα Τ-βοηθητικά λεμφοκύτταρα, στα μακροφάγα, σε δενδριτικά κύτταρα και στα μικρογλοιακά κύτταρα του νευρικού συστήματος) ή να εισέλθει σε αυτά με ενδοκύττωση. Στην συνέχεια, οι κυτταρικές μεμβράνες του ιού και του κυττάρου συντήκονται ώστε το περιεχόμενο του καψιδίου να διαχυθεί εντός του κυττάρου. Ο ιός δημιουργεί τμήματα DNA μέσω του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση ώστε τα τμήματα αυτά, με την βοήθεια της ιικής πρωτεάσης και της ιντεγκράσης να ενσωματωθούν στο DNA του κυττάρου-ξενιστή και όταν ενεργοποιηθούν, να αρχίσουν να χρησιμοποιούν τον μεταγραφικό μηχανισμό του ξενιστή για να αντιγραφούν. Έτσι, παράγονται αντίγραφα RNA και δομικές ιικές πρωτεΐνες, οι οποίες έπειτα από κάποια ενδοκυτταρική επεξεργασία που θα υποστούν, θα πακεταριστούν και θα μεταφερθούν στην κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή, απ' όπου θα εξαχθούν από το κύτταρο ως νέα ιικά σωματίδια. (Y. Yoshida et al., 2021)

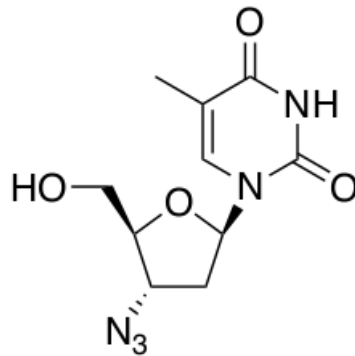


Εικόνα 7: Ο κύκλος ζωής του HIV (Y. Yoshida et al., 2021)

1.7.3 Zidovudine

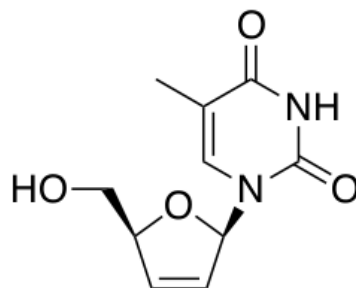
Το πρώτο νουκλεοζιτικό ανάλογο που πέρασε με επιτυχία τις κλινικές δοκιμές και χρησιμοποιήθηκε έναντι του ιού HIV είναι η 3-azido-3-deoxythymidine ή αζιδοθυμιδίνη (AZT) ή zidovudine, ανοίγοντας το δρόμο για την σύνθεση νέων νουκλεοζιτικών φαρμάκων με μεγαλύτερη δραστικότητα και λιγότερη τοξικότητα.

Το zidovudine, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα, είναι ένα συνθετικό ανάλογο πυριμιδίνης και πιο συγκεκριμένα είναι μια θυμιδίνη, στην οποία έχουν προστεθεί τρία άτομα αζώτου στον C3 της. Όσον αφορά τον τρόπο δράσης του κατατάσσεται στους αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTIS), δηλαδή όταν τριφοσφυριλιωθεί στον C5 ανταγωνίζεται το φυσικό υπόστρωμα του ενζύμου και προσδένεται στην νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA και δεν επιτρέπει την επιμήκυνσή της, καθώς δεν διαθέτει 3-OH για να αλληλεπιδράσει με το επόμενο νουκλεοτίδιο. Επομένως, εμποδίζει την αντιγραφή και τον πολλαπλασιασμό του ιού. Λειτουργούν δηλαδή ως τερματιστές αλυσίδας. (E. De Clercq 2009)



1.7.4 Stavudine

Το Stavudine ή αλλιώς 2',3'-διδεϋδρο-3'-δέοξυθυμιδίνη (d4t), είναι ένα ανάλογο θυμιδίνης με 2'-3' διπλό δεσμό στον ριβοφουρανοζιτικό δακτύλιο. Το μόριο αυτό έχει ανασταλτική δράση έναντι του HIV, παρόμοια με αυτή του Zidovudine. Η ενεργή του μορφή είναι η τριφοσφυριλιωμένη και έχει δράση αναστολέα της αντίστροφης μεταγραφάσης, με στόχο τον τερματισμό της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA. Ωστόσο, το Stavudine δεν φαίνεται να εμφανίζει ανθεκτικότητα ανάλογη με αυτή του Zidovudine,



2. Ειδικό Μέρος

2.1 Σκοπός

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι συνθετικά οργανικά μόρια που έχουν απασχολήσει αρκετά την ερευνητική κοινότητα, καθώς εμφανίζουν επιλεκτικότητα και υψηλή

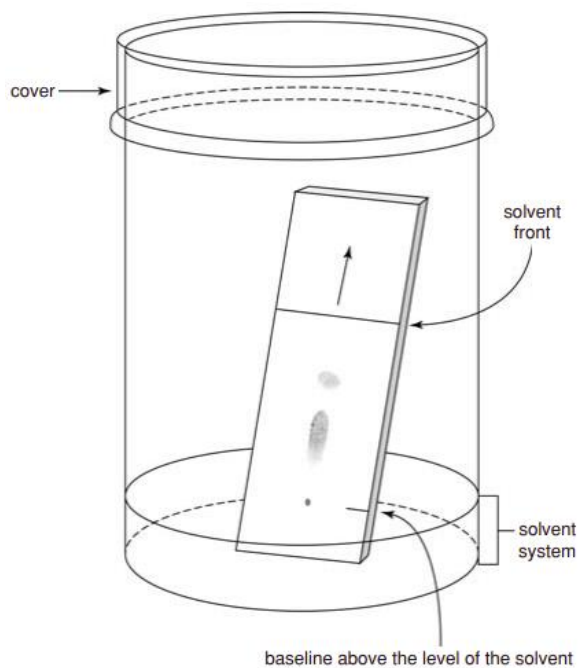
αποτελεσματικότητα έναντι αρκετών ασθενειών. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν αποδειχθεί δραστικά έναντι σοβαρών, ακόμα και μη ιάσιμων ως τώρα ασθενειών, όπως ο ιός HIV, ο SARS-CoV-2, ο ερπητοϊός HSV και πολλοί τύποι καρκίνου. Ωστόσο, υπάρχει συνεχής ανάγκη για νέα νουκλεοζιτικά φάρμακα με μεγαλύτερη δραστικότητα, χαμηλή τοξικότητα και δράση έναντι νέων ιών.

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έχει στόχο την σύνθεση, την χρωματογραφική απομόνωση και τον φασματοσκοπικό προσδιορισμό ενός νέου νουκλεοζιτικού και συγκεκριμένα ενός αναλόγου ουριδίνης με πιθανή αντική δράση. Οι τροποποιήσεις επιλέχθηκαν με βάση άλλους νουκλεοζιτικούς που τις περιέχουν και έχει ήδη αποδειχθεί η φαρμακευτική τους δράση.

3. Γενική Μεθοδολογία

3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)

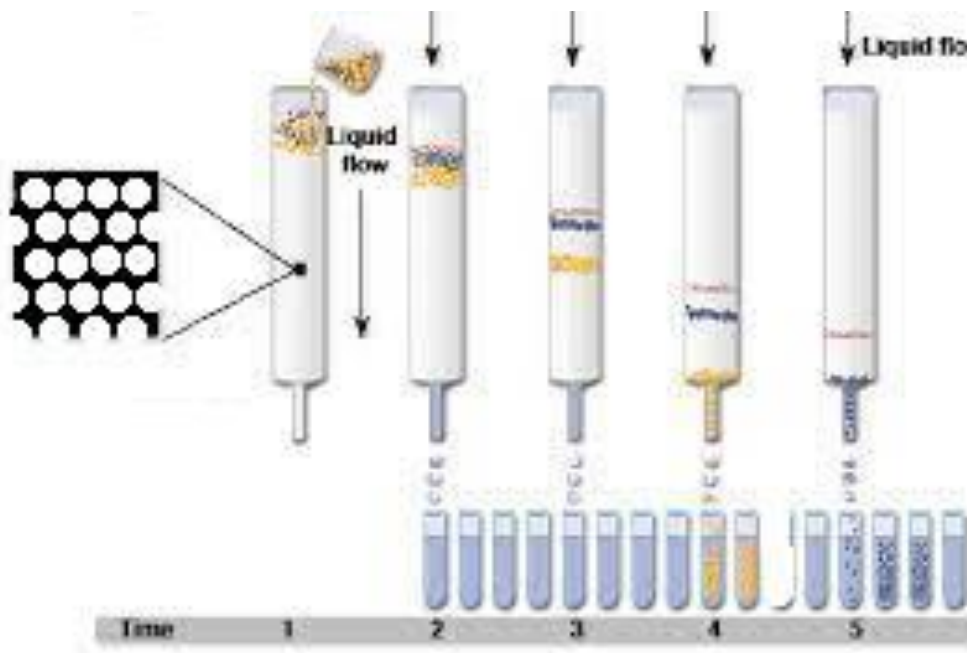
Η TLC χρησιμοποιείται στη χημεία νουκλεϊκών οξέων για την παρακολούθηση της προόδου των χημικών αντιδράσεων, για τον προσδιορισμό των κλασμάτων που συλλέγονται από έναν μεγαλύτερο χρωματογραφικό διαχωρισμό (π.χ. χρωματογραφία στήλης) και για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών πριν από τη χρωματογραφία στήλης. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αλληλεπίδραση των μορίων του δείγματος με την σταθερή φάση. Για την διαδικασία αυτή χρειάζεται ένα δοχείο με καπάκι (που χρησιμοποιείται ως θάλαμος ανάπτυξης), μια πλάκα αλουμινίου επιστρωμένη με Silicagel (σταθερή φάση), και ένα σύστημα με έναν πολικό και έναν απρωτικό διαλύτη σε αναλογία που καθορίζεται με βάση την πολικότητα του δείγματος. Το δείγμα τοποθετείται ως σταγόνα στο κάτω μέρος της πλάκας στεγνώνεται για να εξατμιστεί ο διαλύτης του και μόλις αρχίσει να αλληλεπιδρά με το σύστημα διαλυτών, συμπαρασύρεται και ανεβαίνει προς τα επάνω. Όσο πιο πολική είναι μια ένωση τόσο περισσότερο αλληλεπιδρά με την σταθερή φάση, επομένως είναι πιο δύσκολο να συμπαρασυρθεί από την κινητή. Με αποτέλεσμα τα πολικά μόρια να διανύουν τελικά μικρότερη απόσταση πάνω στην πλάκα από τα λιγότερο πολικά. Το διάστημα που διένυσε η ουσία διαιρούμενο με το διάστημα που διένυσε το μέτωπο του διαλύτη, πάνω στη πλάκα, προσδιορίζει το συντελεστή συγκράτησης R_f . Στις περιπτώσεις αγνώστου δείγματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί μάρτυρας με γνωστό R_f , ώστε να συγκριθεί με το R_f του δείγματος και να προσδιοριστεί η πολικότητά του. Η απεικόνιση των μορίων μετά το πέρας της διαδικασίας γίνεται με διάφορους τρόπους ανάλογα με τις ιδιότητες των μορίων. Αν τα μόρια είναι έγχρωμα, δημιουργούν έγχρωμες κηλίδες που μπορούν να εντοπιστούν με γυμνό μάτι. Αν τα μόρια απορροφούν στο UV, η πλάκα τοποθετείται σε λάμπα UV, όπου εντοπίζονται σκουρόχρωμες κηλίδες. Αν το μόριο περιέχει άνθρακες και δεν απορροφά στο UV, ακολουθούμε μια διαδικασία με εμβάπτιση σε βανιλίνη και υψηλή θερμοκρασία, με αποτέλεσμα να καούν οι άνθρακες του μορίου και να δώσει ένα μαύρο στίγμα πάνω στην πλάκα. (C.L.F. Meyers, D.J. Meyers, 2008)



Εικόνα 8: Η μέθοδος της Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας (C.L.F. Meyers, D.J. Meyers, 2008)

3.2 Χρωματογραφία στήλης

Για τον διαχωρισμό των μορίων και την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία στήλης. Και αυτή η τεχνική βασίζεται στην αλληλεπίδραση των μορίων του δείγματος με την σταθερή φάση, όμως σε αυτή την περίπτωση τόσο το δείγμα, όσο και το σύστημα διαλυτών προστίθενται στο επάνω μέρος της στήλης με καθοδική πορεία. Επομένως, όσο περισσότερο αλληλεπιδρά το μόριο με την στήλη, κατακρατάτε και καθυστερεί να εξέλθει από αυτήν. Πιο αναλυτικά, αρχικά επιλέγεται το σύστημα διαλυτών που θα χρησιμοποιηθεί και στην συνέχεια μέρος αυτού αναμειγνύεται με silica gel και τοποθετούνται στην στήλη. Απομακρύνοντας τους περιττούς διαλύτες, παραμένει μέσα στην στήλη μόνο η silica καλά διαβρεγμένη, η διαδικασία αυτή ονομάζεται πακετάρισμα στήλης. Στην συνέχεια, διαλύεται το δείγμα σε μικρή ποσότητα διαλύτη (ο τελικός όγκος δεν πρέπει να ξεπερνά το 10%, του συνολικού όγκου της στήλης) και προστίθεται προσεκτικά στην κορυφή της στήλης. Απομακρύνονται ξανά οι περιττοί διαλύτες και έπειτα προστίθεται το σύστημα διαλυτών και ξεκινά η διαδικασία. Για την επιτάχυνση της διαδικασία χρησιμοποιείται εισροή αέρα για την αύξηση της πίεσης.



Εικόνα 8: Η βασική αρχή της χρωματογραφίας στήλης

3.3 Microwave

Η μικροκυματική ακτινοβολία (microwave) χρησιμοποιείται για να επιταχύνει αντιδράσεις, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί μια οικολογική μέθοδο καθώς προσφέρει οικονομία διαλυτών και ενέργειας. Το microwave υπερτερεί έναντι της συμβατικής θέρμανσης, καθώς προσφέρει ομοιόμορφη θέρμανση σε όλο το μίγμα της αντίδρασης, αυξάνει σημαντικά την ταχύτητα, ελαττώνει τις παράπλευρες αντιδράσεις και παράλληλα παρέχει και αυξημένες αποδόσεις. Έτσι, χρησιμοποιείται ευρέως στην ιατρική, στην συνδυαστική και στην πράσινη χημεία, κυρίως σε αντιδράσεις κυκλοπροσθήκης, σύνθεσης ραδιοϊσοτόπων, ετεροκυκλικών ενώσεων και υδρογονανθράκων. Πιο συγκεκριμένα, η ακτινοβολία αυτή προκαλεί την ευθυγράμμιση των διπολικών μορίων των πολικών διαλυτών και των ιόντων του μείγματος, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μοριακές τριβές και διηλεκτρικές απώλειες και να χάνεται ενέργεια, με την μορφή θερμότητας.

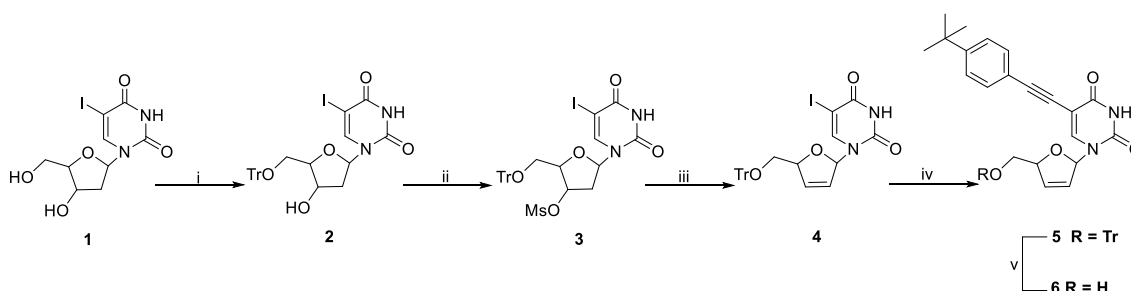
3.4 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Σε αυτή την τεχνική έχουμε εφαρμογή μαγνητικού πεδίου στα άτομα που περιέχουν περιττό αριθμό πρωτονίων και εμφανίζουν πυρηνικό σπιν. Έτσι επιτυγχάνεται ή ευθυγράμμιση των σπιν παράλληλα (α -σπιν) ή αντιπαράλληλα (β -σπιν) με την κατεύθυνση του μαγνητικού πεδίου. Έπειτα εφαρμόζεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, κάθετη στην κατεύθυνση των σπιν, προκαλώντας αλλαγή της κατεύθυνσης των σπιν, το φαινόμενο αυτό ονομάζεται συντονισμός. Στην συνέχεια μετράται η απορρόφηση του ποσού της ενέργειας αυτής από έναν φασματογράφο. Κάθε άτομο ανάλογα με το είδος του ατόμου και τα άτομα που το περιβάλλουν απαιτεί διαφορετικό ποσό ενέργειας για την επίτευξη το συντονισμού. Ως

σημείο αναφοράς για την καταγραφή της απορροφούμενης ενέργειας χρησιμοποιείται το τετραμέθυλοσινάλιο (TMS). Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ μετρήθηκαν σε φωτόμετρο Bruker στα 300 MHz και 75.5 MHz, αντίστοιχα. Τα δείγματα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ διαλύθηκαν σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) ή δευτεριωμένοδιμεθυλοσουλφοξείδιο ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}_4$).

4. Πειραματικό Μέρος

4.1 Επισκόπηση Συνθετικής οδού



ΣΧΗΜΑ: i) TrCl , pyridine, cat. DMAP, 50°C , ii) MsCl , pyridine, cat. DMAP, $^\circ\text{C}$, iii) $t\text{-BuOK}$, DMSO, rt. iv) Et_3N , CuI , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, DMF, microwave, 60°C , 15 min, v) HCOOH , CH_2Cl_2 .

4.2 Μεθοδολογία Σύνθεσης

Η πορεία της σύνθεσης ξεκίνησε με την τριτυλίωση της εμπορικά διαθέσιμης 2'-δεοξυ-β-D-ριβοφουρανο-5-ιωδοουρακίλη (1), με πυριδίνης παρουσία καταλυτικής ποσοτητας διμεθυλοαμινοπυριδίνης (DMAP) με ικανοποιητική απόδοση 83%. Στη συνέχεια, ακολούθησε η προσθήκη μεθανοσουλφονυλοχλωριδίου ($\text{CH}_3\text{ClO}_2\text{S}$) σε διάλυμα πυριδίνης παρουσία καταλυτικής ποσοτητας διμεθυλοαμινοπυριδίνης (DMAP) λαμβάνοντας των νουκλεοζίτη 3 με απόδοση 75%. Στη συνέχεια με επίδραση τερτ-βουτοξειδίου του καλίου (tert-BuOK) οδηγηθήκαμε στον ακόρεστο νουκλεοζίτη 4 σε απόδοση 68%, ακολούθησε αντίδραση διασταυρούμενης σύζευξης (αντίδραση Sonogashira), όπου ο νουκλεοζίτης διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και με την προσθήκη του τερτ-βουτυλο φαινυλο ακετυλενιο, της τριαιθυλαμίνης (Et_3N), του ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκαταλύτης) και του τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$] (καταλύτης) με χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων 15 λεπτά, λαμβάνοντας έτσι τον προστατευμένο νουκλεοζίτη της ουρακίλης 5. Τέλος ακολούθησε αντίδραση αποπρυτιλλίωσης με την βοήθεια μυρμιγκικού οξέος (HCOOH) σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2)

4.2.1 Σύνθεση της 5-Ό-τριτυλο-β-D-ριβοφουρανο-5-ιωδοουρακίλης (2)

Η εμπορικά διαθέσιμη 5-ιωδοουριδίνη (1) διαλύθηκε σε 4,55mL πυριδίνης και στη συνέχεια προστέθηκαν 11mg διμέθυλο αμινο πυριδίνη (DMAP). Έπειτα προστέθηκαν 380mg TrCl σε CH_2Cl_2 , και το μίγμα θερμάνθηκε στους 50°C για τρεις ώρες. Στην συνέχεια έγινε έλεγχος με

TLC σε 9,5mL CH₂Cl₂ και 0,5mL MeOH και εφόσον η αντίδραση είχε τελειώσει, ακολούθησε εκχύλιση με όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃) και έπειτα εκχύλιση με χλωριούχο νάτριο (NaCl) για να απομακρυνθεί η πυριδίνη. Τέλος, το διάλυμα ξηράνθηκε στον ραταβάπορα και έπειτα από ζύγιση, το καθαρό προϊόν ήταν 286mg με απόδοση 83%

4.2.2 Σύνθεση της 3'-Ο-μεζυλο-5-Ο-τριτυλο-β-D-ριβοφουρανο-5-ιωδοουρακίλης (3)

Το προϊόν (2) διαλύθηκε σε 1,38mL πυριδίνης και τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο, εκεί προστέθηκαν στάγδην 0,65mL MsCl (Mr=111,55). Το διάλυμα έμεινε στον αναδευτήρα overnight. Έπειτα από έλεγχο με TLC σε 5mL Hex και 5mL AcOEt, ακολούθησε κρυστάλωση με παγωμένο νερό. Στην συνέχεια, το στερεό διαλύθηκε σε μεθανόλη με προσθήκη ενεργού άνθρακα και επανακρυσταλάθηκε με παγωμένο νερό. Τέλος, το μείγμα διηθήθηκε για να απομονωθεί το μεζυλιωμένο πλέον νουκλεοζιτικό ανάλογο (3), του οποίου το καθαρό προϊόν ζυγίστηκε στα 320mg.

4.2.3 Σύνθεση της 2',3'-διδεοξυ-5-Ο-τριτυλο-5-ιωδουριδένης (4)

Σε διάλυμα που περιέχει 270 mg t-BuOK σε 10ml DMSO προστέθηκαν 646mg της ένωσης **3** και το διάλυμα αναδεύτηκε, προστατευμένο από την υγρασία, για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκε σε 250ml νερό με πάγο και ακολούθησε κρυστάλλωση με αιθανόλη και εξάνιο. Μετά την ξήρανση συλλέξαμε 450 mg του προϊόντος **4** (84%).

4.2.4 Σύνθεση της 2',3'-διδεοξυ-5-Ο-τριτυλο-5-(τερτβουτυλοφαινυλο ακετυλενιο) ιωδοουριδένης (5)

Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml, διαλύεται η ένωση **4** (1.6mmol) σε 3mL άνυδρου διαλύτη DMF και με την προσθήκη του τερτ βουτυλοφαινυλο ακετυλενίου (3equiv), του τριφαινυλοφωσφορικού παλλάδιου [Pd(PPh₃)₄] (0.1equiv), του ιωδιούχου χαλκού (0.1equiv) και της τριαιθυλαμίνης (2equiv), ακτινοβολούνται σε μικροκύματα για 15 λεπτά. Η αντίδραση ελέγχθηκε με TLC. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα εξανίου-οξεικού αιθυλεστέρα 8/2. Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος με ικανοποιητική απόδοση 82% (500 mg).

4.2.5 Σύνθεση της 2',3'-διδεοξυ-τριτυλο-5-(τερτ-βουτυλοφαινυλο ακετυλενιο) ιωδοουριδένης (6)

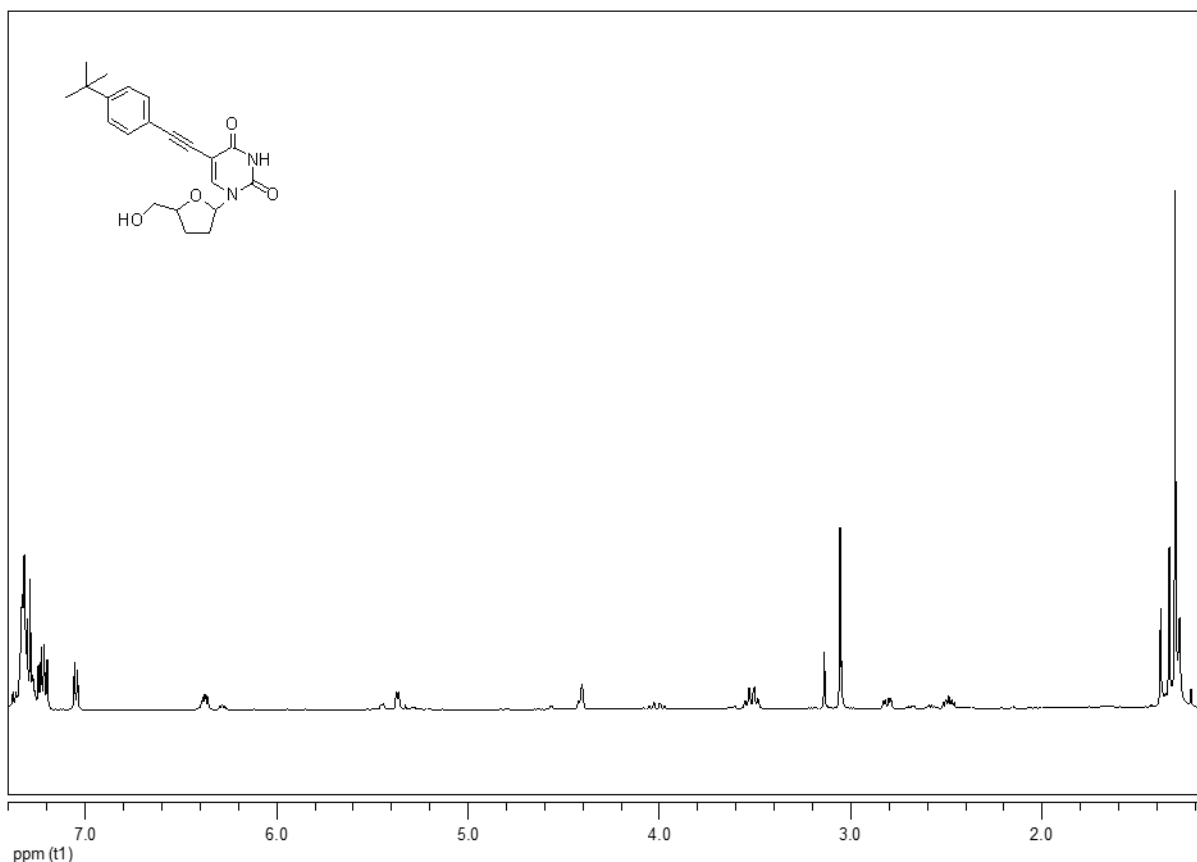
Ο νουκλεοζίτης (5) διαλύθηκε σε 10 ml διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂), προστέθηκαν 2 ml μεθανικό οξύ (HCOOH) και το μείγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της

αντίδρασης το μείγμα εκχυλίστηκε διαδοχικά με κορεσμένα διαλύματα NaHCO_3 και NaCl , συμπυκνώθηκε και ακολούθησε στήλη με σύστημα έκλουσης εξάνιο-οξικό αιθυλεστερα 6/4. Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη υπό τη μορφή στερεού λευκού χρώματος με ικανοποιητική απόδοση 82%.

TLC(6 Hex/4 AcOEt)	$R_f = 0.23$
Απόδοση	82%
$[\alpha]_D^{22}$	+22 $c = 0.11$
λ_{max}	269 nm
Σημείο τήξης	212°C

5.Φασματοσκοπική ταυτοποίηση ενώσεων

Ταυτοποίηση με ^1H NMR



6. Συμπεράσματα/Συζήτηση

Η πανδημία της covid-19 και η ανάγκη για δραστικά φάρμακα με υψηλή επιλεκτικότητα έναντι του SARS-CoV-2 αλλά και χαμηλή τοξικότητα για τα ανθρώπινα κύτταρα έφερε ξανά στο προσκήνιο το Remdesivir και μαζί με αυτό την σημαντικότητα το νουκλεοζιτικών αναλόγων. Το Remdesivir ωστόσο έχει ένα ευρύ αντικό φάσμα που περιλαμβάνει τον SARS-CoV-2, τον Ebola, τον Nipah, τον συγκυτιακό αναπνευστικό ιό (RSV), αλλά και μερικούς άλλους κοροναϊούς. Έτσι η έρευνα στον τομέα των νουκλεοζιτικών αναλόγων είναι υψίστης σημασίας για την σύνθεση και την απομόνωση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με στόχο την αντιμετώπιση διάφορων ιών αλλά και διαφόρων μορφών καρκίνου, καθώς ο καρκίνος αποτελεί επίσης μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου του 21ου αιώνα. (Yvette N. Lamb, 2020)

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία συντέθηκε, απομονώθηκε και προσδιορίστηκε ένα νέο νουκλεοζιτικό ανάλογο ουριδίνης με πιθανή αντική δράση, ωστόσο η δράση μένει να μελετηθεί. Το ανάλογο αυτό περιέχει μια τροποποίηση στο σάκχαρο και μια στην βάση, οι οποίες βασίστηκαν σε άλλα ήδη γνωστά μόρια που τις περιείχαν και εμφάνιζαν φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Πιο συγκεκριμένα, στο σάκχαρο αφαιρέθηκαν το 2'-OH και το 3'-H και δημιουργήθηκε διπλός δεσμός, καθώς τα 2',3'-ακόρεστα νουκλεοζιτικά ανάλογα συνήθως φέρουν αντική δράση έναντι RNA ιών ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης. Όσον αφορά την βάση, προστέθηκε μια μεγάλη αλκυλομάδα (4-τερτ-βουτυλοφαινυλο ακετυλένιο) στην 5'-θέση του δακτυλίου της ουριδίνης με στόχο την αύξηση της λιποφιλικότητας και επομένως της δραστικότητας του μορίου.

7. Βιβλιογραφία

- ΑΙΜΙΛΙΑ ΖΙΦΑ, ΖΗΣΗΣ ΜΑΜΟΥΡΗΣ, ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΜΟΥΤΟΥ (2011), ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΕΡΙΟΥΣΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
- Anna Piperno, Maria A. Chiacchio, Daniela Iannazzo, Roberto Romeo (2006), Synthesis and Biological Activity of Phosphonated Nucleosides: Part 1. Furanose, Carbocyclic and Heterocyclic Analogues, Current Medicinal Chemistry 13, 3467-3476
- Burton E. Tropp (2014), Principles of Molecular Biology, Jones & Bartlett Learning, LLC
- C.L.F. Meyers, D.J. Meyers (2008) Thin-Layer Chromatography, Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry A.3D.1-A.3D.13
- Erik De Clercq (2009), The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years, Rev. Med. Virol 19: 287-299
- Junxing Shi, J. Jeffrey McAtee, Susan Schlueter Wirtz, Phillip Tharnish, Amy Juodawlkis, Dennis C. Liotta, Raymond F. Schinaz, 1999 Synthesis and Biological Evaluation of 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxy-5-fluorocytidine (D4FC) Analogues: Discovery of Carbocyclic Nucleoside Triphosphates with Potent Inhibitory Activity against HIV-1 Reverse Transcriptase, J. Med. Chem. 42, 859-867

- Katherine L. Seley-Radtke, Mary K. Yates (2018), The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside Scaffold, *Antiviral Research* 154 66–86
- S.A. Riddler et al. (1995), Antiretroviral activity of stavudine (2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine, D4T), *Antiviral Research* 27, 189-203
- Stella Manta , Christos Kiritsis, Athina Dimopoulou, Vanessa Parmenopoulou, Nikolaos Kollatos, Andrew Tsotinis, Dimitri Komiotis, 2014, Unsaturation: An Important Structural Feature to Nucleosides' Antiviral Activity *Anti-Infective Agents*, 12, 2-57
- Susan J. Keam, Therese M. Chapman and David P. Figgitt (2004), Brivudin (Bromovinyl Deoxyuridine), *Drugs* 64 (18)
- Wade, L. G. Jr. (2006). *Organic Chemistry* (6 th ed.). Pearson Education, Inc.
- X. Lin, C. Liang, L. Zou et al. (2021) Advance of structural modification of nucleosides scaffold, *European Journal of Medicinal Chemistry* 214, 113233
- Yuki Yoshida, Masakazu Honma, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe (2021), Structure, Synthesis and Inhibition Mechanism of Nucleoside Analogues as HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs), *16(5):743-766*
- Yvette N. Lamb, 2020, Remdesivir: First Approval, Springer Nature Switzerland AG