

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΑ ΣΤΗ ΘΕΣΗ 2 ΤΡΙΑΖΟΛΟ-
ΑΛΚΥΝΥΛΟ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΠΟΥΡΙΝΗΣ ΩΣ ΝΕΟΙ
ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ:
ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ**

Στάμου Χριστίνα – Μαρία του Γεωργίου

Λάρισα, Οκτώβριος 2020

DIPLOMA THESIS

**2-TRIAZOLO-ALKYLO-SUBSTITUTED PURINE
DERIVATIVES AS NEW CYTOTOXIC AGENTS:
COMPOSITION AND IDENTIFICATION**

Stamou Christina - Maria

Larisa, October 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δρ. Κομιώτης Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δρ. Τζιουμάκη Νίκη: Πανεπιστημιακός Υπότροφος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δρ. Μήτσος Χρήστος: Μέλος ΕΔΙΠ του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής Χημείας κ. Κομιώτη Δημήτρη.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλλαν και μου συμπαραστάθηκαν στην υλοποίηση αυτής της προσπάθειας.

Αρχικά, ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας, τον κύριο Κομιώτη, για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να αναλάβω το θέμα της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο του καθώς και για τις υποδείξεις του καθόλη την πορεία.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Τζιουμάκη για την βοήθεια, την υπομονή καθώς και τη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια υλοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ευχαριστώ τον κύριο Μήτσο για τις πολύτιμες υποδείξεις του και τη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε.

Τέλος, θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς και την αδερφή μου για την υποστήριξη και τη συμπαράσταση που μου προσέφεραν καθόλη τη διάρκεια ολοκλήρωσης των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Πουρίνες	9
1.1.1. Βιολογικές δράσεις πουρινών	10
1.1.2. Σύνθεση πουρινών	13
1.2. Παράγωγα τριαζολίου	16
1.2.1. Βιολογικές δράσεις 1,2,3 τριαζολίων	16
1.2.2. Σύνθεση και παραγωγή τριαζολίων: 1,3 διπολική κυκλοπροσθήκη μεταξύ αλκινίου-αζιδίου	18
1.3. Τριαζολοϋποκατεστημένα παράγωγα πουρίνης	20
2. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	23
3. ΜΕΘΟΔΟΙ	24
3.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)	24
3.2. Χρωματογραφία στήλης (Column chromatography)	25
3.3. Χρήση μικροκυμάτων στην οργανική χημεία	26
3.4. Οργανικοί διαλύτες και ξήρανση διαλυτών	26
3.5. Ταυτοποίηση οργανικών ενώσεων	27
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	28
4.1. Επισκόπηση συνθετικής οδού	28
4.2. Μεθοδολογία σύνθεσης	29
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ	35
5.1. Ταυτοποίηση της 9-βενζυλο-2-(1 <i>H</i> -1,2,3-τριαζολ-4-υλο-μεθανολο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνης (5) (¹ H NMR)	35
5.2. Ταυτοποίηση της 9-βενζυλο-2-(1 <i>H</i> -1,2,3-τριαζολ-1-υλο-φαινυλο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνης (6) (¹ H NMR)	36
5.3. Ταυτοποίηση της 9-βενζυλο-2-(1 <i>H</i> -1,2,3-τριαζολ-1-υλο-φαινυλο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνης (6) (¹³ C NMR)	37

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	38
6.1 Η σημασία της σύνθεσης 1,2,3-τριαζολο-παραγώγων πουρίνης.....	38
6.2 Σύνθεση 1,2,3-τριαζολο-παραγώγων πουρίνης	38
6.3 Μελλοντική επέκταση της παρούσας εργασίας	40
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πουρίνες είναι ετεροκυκλικές αρωματικές ενώσεις που αποτελούνται από ένα δακτύλιο πυριμιδίνης και ένα δακτύλιο ιμιδαζολίου. Φυσιολογικά οι πουρίνες βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό στα νουκλεϊκά οξέα, καθώς επίσης και σε πολλούς συμπράγοντες οι οποίοι χρησιμοποιούνται εκτεταμένα από μεγάλο αριθμό ενζύμων του οργανισμού. Για το λόγο αυτό, έχει γίνει εκτεταμένη έρευνα στη δημιουργία παραγώγων πουρίνης με σκοπό την αξιοποίηση των βιολογικών δράσεών τους για φαρμακευτικούς σκοπούς. Η έρευνα αυτή οδήγησε στην ανακάλυψη παραγώγων πουρινών (ή σε νουκλεοζίτες τους) με σημαντική αντικαρκινική, αντιβιοτική ή αντιική δράση.

Άλλες οργανικές ενώσεις με σημαντικές βιολογικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελούν τα 1,2,3-τριαζόλια, ενώσεις που μιμούνται πολλές λειτουργικές ομάδες και ο δακτύλιός τους απαντά σε μεγάλο αριθμό βιοδραστικών μορίων. Μεταξύ άλλων έχει αποδειχθεί η δράση τους ως αντιβιοτικοί, αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας πορείας σύνθεσης 2-τριαζολο-υποκατεστημένων παραγώγων πουρίνης, με στόχο την ανακάλυψη νέων κυτταροτοξικών παραγόντων. Ως πρώτη ύλη της συγκεκριμένης συνθετικής πορείας επιλέχθηκε η 2-αμινο-6-χλωρο-πουρίνη, από την οποία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 2-αμινο-9-βενζυλο-6-χλωροπουρίνης. Μέσω αυτής συντέθηκε η 2-ιωδο-9-βενζυλο-6-χλωροπουρίνη, η οποία με τη σειρά της έδωσε την 2-ιωδο-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνη. Από την τελευταία παρήχθησαν οι τελικές ενώσεις της συνθετικής πορείας, οι 9-βενζυλο-2-(1*H*-1,2,3-τριαζολ-4-υλο-μεθανολο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνη και 9-βενζυλο-2-(1*H*-1,2,3-τριαζολ-1-υλο-φαινυλο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνη.

Παρουσιάζονται αναλυτικά οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν για την περάτωση της συνθετικής οδού, οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τα αποτελέσματα της φασματοσκοπικής ταυτοποίησης των τελικών ενώσεων.

ABSTRACT

Purines are heterocyclic aromatic compounds consisting of a pyrimidine and an imidazole ring. In living organisms purines are abundant in nucleic acids, as well as in many cofactors routinely used by a large number of enzymes in human organisms. For this reason, extensive research has been done on the development of novel purine derivatives to exploit their biological activities for medical purposes. This research led to the discovery of novel purine derivatives (or their nucleosides) with significant anticancer, antibiotic or antiviral activity.

Other organic compounds with important biological activities in the human organism are the 1,2,3-triazoles. These compounds mimic many functional groups, and their ring system appears in many bioactive molecules. Their antibiotic, antiviral and anticancer activities have been verified, among others.

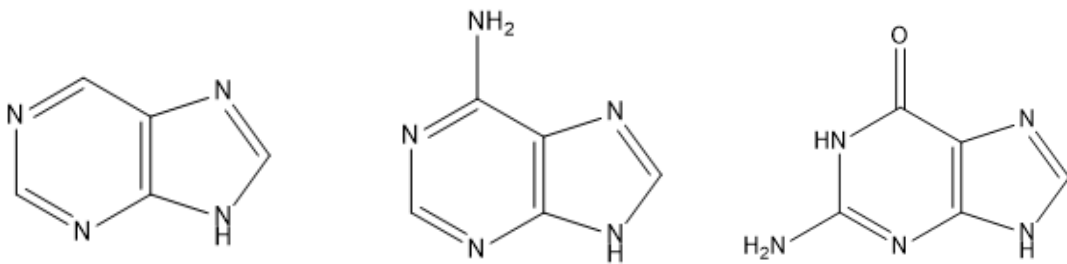
The purpose of this diploma thesis is the development of a route for the synthesis of 2-triazole substituted purine derivatives, aiming at the discovery of novel cytotoxic agents. 2-amino-6-chloropurine was selected as starting material of this synthetic route, from which 2-amino-9-benzyl-6-chloropurine was prepared. Conversion to 2-iodo-9-benzyl-6-chloropurine, in the next step, was ensued by the introduction of a amino group at position 6, to produce 2-iodo-9-benzyl-6-benzylaminopurine. This compound was utilized in the synthesis of the two final compounds: 2-(1*H*-1,2,3-triazol-4-yl-methanol)-6-benzylamino-9-benzylpurine and 2-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl-phenyl)-6-benzylamino-9-benzylpurine.

The reactions performed for the completion of the synthetic route, the methods that were used, and the results of the spectroscopic identification of the final compounds are presented in detail.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

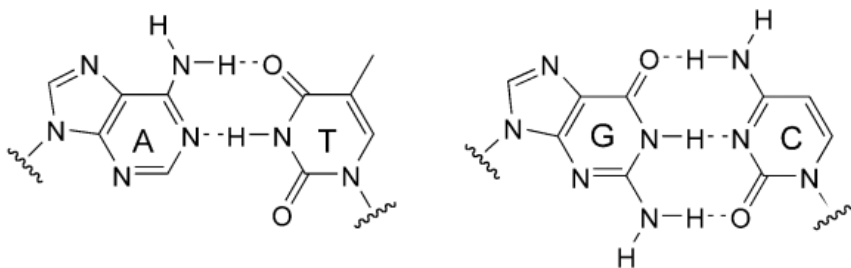
1.1. ΠΟΥΡΙΝΕΣ

Οι πουρίνες (σχήμα 1) είναι ετεροκυκλικές αρωματικές οργανικές ενώσεις με δομή διπλού δακτυλίου, ενός δακτυλίου πυριμιδίνης και ενός δακτυλίου ιμιδαζολίου, και είναι οι ευρύτερα κατανεμημένες ενώσεις αυτού του τύπου στη φύση με πιο αντιπροσωπευτικά παραδείγματα την αδενίνη και την γουανίνη. Στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 1) απεικονίζονται ο βασικός δακτύλιος της πουρίνης, η αδενίνη και η γουανίνη.^[1]



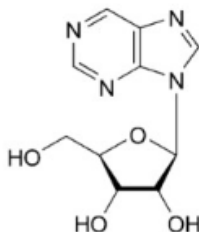
Σχήμα 1: Δομή πουρίνης, δομή αδενίνης, δομή γουανίνης

Οι πουρίνες αδενίνη και γουανίνη αποτελούν τον έναν από τους δύο τύπους βάσεων που βρίσκονται στα νουκλεϊκά οξέα. Σχηματίζουν ζεύγη με τις πυριμιδίνες (τη θυμίνη και την κυτοσίνη, αντίστοιχα), μέσω δεσμών υδρογόνου, ώστε να δημιουργηθεί η δίκλινη αλυσίδα του DNA. (σχήμα 2)^[1]



Σχήμα 2: Ζεύγη βάσεων σύμφωνα με τους Watson-Crick

Μη υποκατεστημένες πουρίνες δεν υπάρχουν ελεύθερες στη φύση. Η πιο απλή μορφή είναι το β -D-ribonucleoside nebularine, ένα αντιβιοτικό νουκλεοσίδιο που απομονώθηκε από το μανιτάρι *Agaricus nebularis*. (σχήμα 3)^[2]

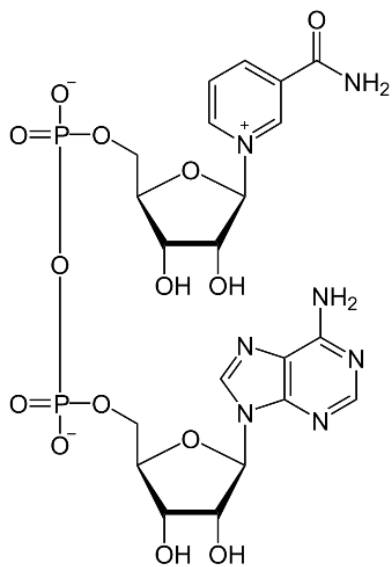


Σχήμα 3: β -D- ribonucleoside nebularine

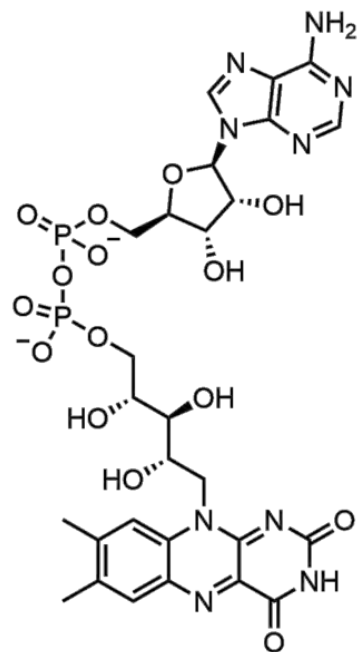
1.1.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΠΟΥΡΙΝΩΝ

Ο δακτύλιος πουρίνης, και κυρίως η αδερίνη, είναι ένας από τους πιο συχνά εμφανιζόμενους δακτύλιους ετεροκυκλικών ενώσεων στους ζωντανούς οργανισμούς. Όπως είναι γνωστό, η αδερίνη και η γουανίνη εμφανίζονται σε πολύ μεγάλο ποσοστό τόσο σε DNA όσο και σε RNA. Εκτός αυτού, η δομή των πουρινών εμφανίζεται σε πολλά βιοχημικά συστήματα έχοντας βοηθητική χρήση.^[3]

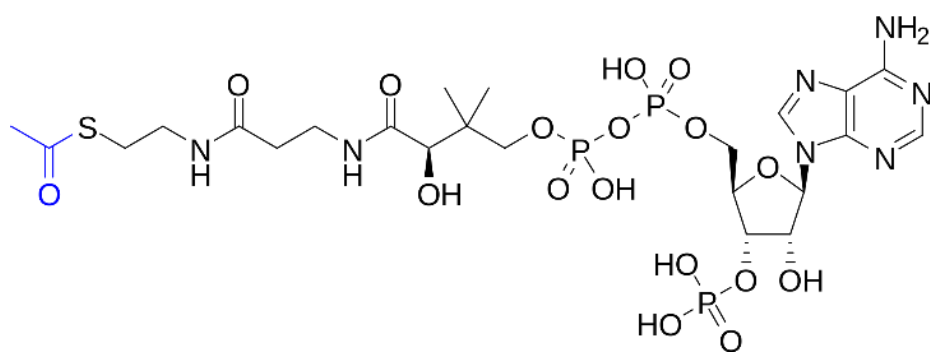
Πιο συγκεκριμένα, ένας πολύ μεγάλος αριθμός ενζύμων χρησιμοποιεί βάσεις πουρίνης. Επίσης, οι πουρίνες αποτελούν συστατικά διαφόρων συμπαραγόντων, όπως είναι τα οξειδοαναγωγικά συνένζυμα νικοτιναμιδο-αδερίνο-δινουκλεοτίδιο (NADH)^[4], φλαβινο-αδερίνο-νουκλεοτίδιο (FAD)^[5] και ακέτυλο συνένζυμο A (AcCoA)^[6] τα οποία εμπλέκονται σε βασικές διεργασίες του μεταβολισμού. Συναντάται επίσης στην τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP)^[7] που αποτελεί το ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου και χρησιμοποιείται για την αποθήκευση ενέργειας σε όλα τα ζωντανά κύτταρα. Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μονοφωσφορική κυκλική αδενοσίνη (cAMP)^[8], η οποία δρα ως ο λεγόμενος δεύτερος αγγελιοφόρος που ελέγχει την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών και των επιπέδων καλίου στο κύτταρο, καθώς εμπλέκεται και στη μεταγραφή και σε άλλες μεταβολικές διεργασίες.



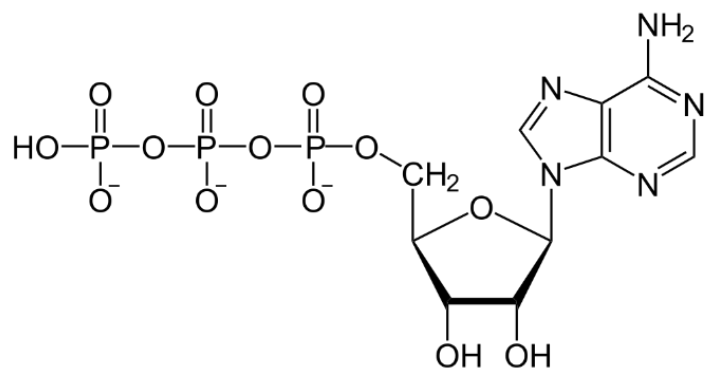
Σχήμα 4: NADH



Σχήμα 5: FAD



Σχήμα 6: AcCoA



Triphosphat

Ribose

Adenin

Σχήμα 7: ATP

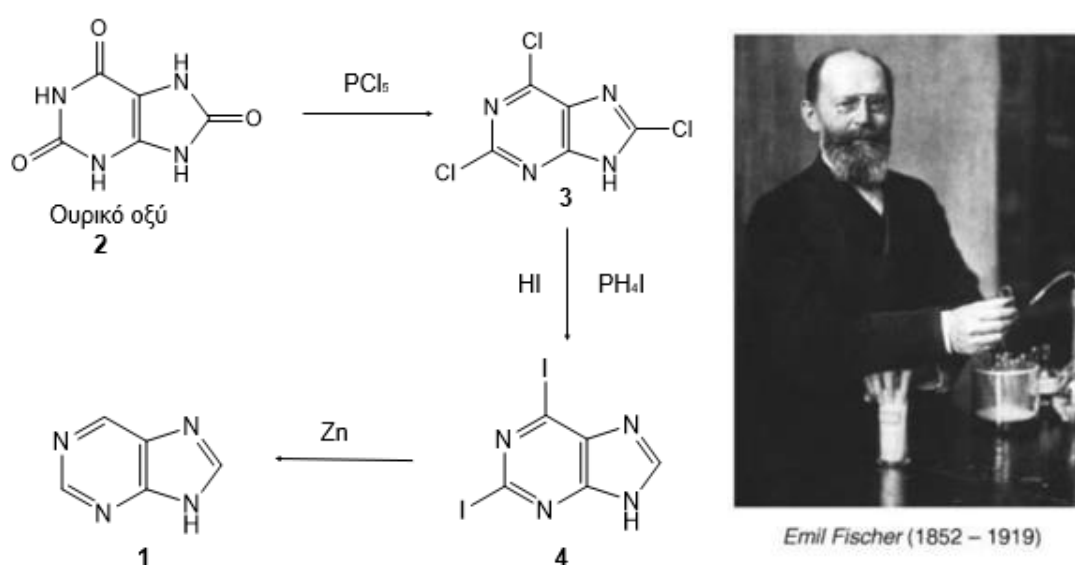
Τα περισσότερα ένζυμα που χρησιμοποιούν τέτοιους συμπαραγόντες περιέχουν θέση σύνδεσης με τις πουρίνες και κυρίως με την αδενίνη. Ο πυρήνας πουρίνης αποτελεί επίσης βασικό δομικό συστατικό και πολλών τύπων συνθετικών ενώσεων με βιολογική δράση, όπως είναι οι αναστολείς κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs)^[9], οι αναστολείς συναρμολόγησης μικροσωληνίσκων, οι αναστολείς φωσφοδιεστεράσης και οι αναστολείς οικογένειας Hsp 90.^[1]

Οι υποδοχείς πουρίνης και ιδιαίτερα οι υποδοχείς αδενοσίνης βρίσκονται σε όλα τα όργανα του ανθρώπινου σώματος και ο στόχος της σύγχρονης έρευνας πάνω στις πουρίνες είναι η εύρεση νέων αγωνιστών και ανταγωνιστών για τους υποδοχείς αυτούς.^{[29],[30]} Τέσσερις υποτύποι υποδοχέα αδενοσίνης, A1, A2A, A2B και A3 είναι σήμερα γνωστοί. Παράγωγα πουρίνης που απαιτούνται ως εργαλεία για τη μελέτη αυτών των υποδοχέων, έχουν, επιπλέον, τη δυνατότητα να είναι φαρμακολογικά ενεργά. Οι υποδοχείς αδενοσίνης παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Επιπλέον, είναι σημαντικοί για τη ρύθμιση των σημάτων πόνου. Για παράδειγμα, όταν ενεργοποιούνται οι υποδοχείς A1, η μετάδοση σήματος του πόνου αναστέλλεται, οδηγώντας σε τοπική αναλγησία. Επιπροσθέτως, σε ορισμένους ιστούς που εμφανίζουν όγκους, οι υποδοχείς A3 υπερεκφράζονται και επομένως η εφαρμογή A3 ανταγωνιστών αναστέλλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Τέλος, οι νέοι A2A αγωνιστές θεωρούνται εναλλακτικές λύσεις για την αντιμετώπιση του άσθματος.^[10]

Με βάση τα παραπάνω, δε θα προκαλούσε, λοιπόν, εντύπωση το έντονο ενδιαφέρον για τη μελέτη παραγώγων πουρίνης που έχει εκδηλωθεί τα τελευταία χρόνια. Η βιβλιογραφία έχει δείξει πως οι βάσεις πουρίνης με τους νουκλεοζίτες τους έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας και οι δομικές τους τροποποιήσεις οδήγησαν στην ανακάλυψη χιλιάδων βιολογικώς δραστικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων πολλών κλινικά χρησιμοποιούμενων φαρμάκων.

1.1.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΟΥΡΙΝΩΝ

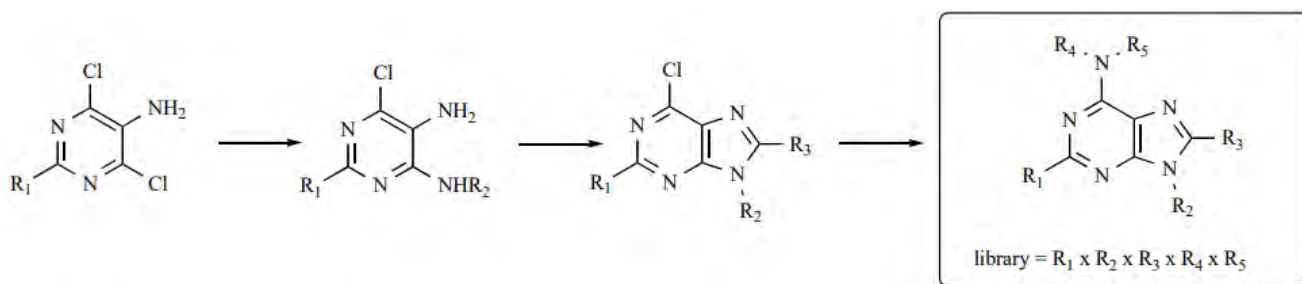
Ο Emil Fischer συνέθεσε για πρώτη φορά το 1899, το πρώτο παράγωγο πουρίνης ως μια άχρωμη, κρυσταλλική, ασθενή βάση. Χρησιμοποίησε ως αρχικό αντιδρόν το ουρικό οξύ, το οποίο είχε απομονωθεί από λίθους της χοληδόχου κύστης από τον C. W. Scheele το 1776. Το ουρικό οξύ πραγματοποίησε αντίδραση με PCl_5 για να δώσει την 2,6,8-τριχλωροπουρίνη. Στη συνέχεια η πουρίνη αυτή μετατράπηκε σε δι-ιωδοπουρίνη με τη χρήση HI και $[\text{PH}_4]^+\text{I}^-$. Τέλος, το ενδιάμεσο αυτό μετατράπηκε σε πουρίνη με τη χρήση Zn σε σκόνη. (εικόνα 1) ^[2]



Εικόνα 1

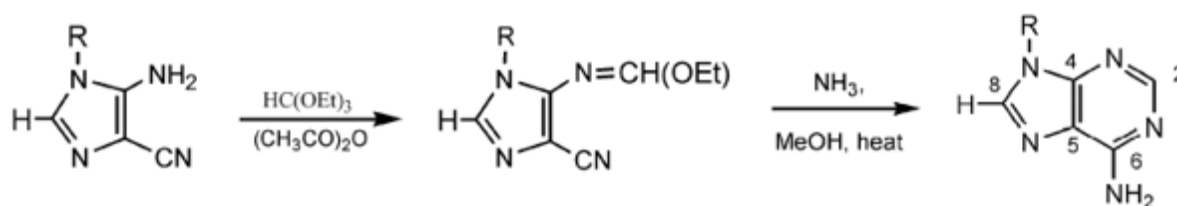
Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη σύνθεση παραγώγων πουρίνης με διάφορες μεθοδολογίες και με την ανάπτυξη πολλών συνθετικών πορειών. Για να πραγματοποιηθεί η σύνθεση παραγώγων πουρίνης, χρησιμοποιούνται τρεις κύριες συνθετικές προσεγγίσεις: συνθέσεις που ξεκινούν από έναν υποκατεστημένο πυρήνα πυριμιδίνης ακολουθούμενη από κατασκευή δακτυλίου ιμιδαζόλης, πορείες που ξεκινούν από τον αντίστοιχο δακτύλιο ιμιδαζόλης και στη συνέχεια δομούν τον πυρήνα πυριμιδίνης, και τέλος συνθέσεις που βασίζονται σε άμεση αντικατάσταση ομάδων στον προσχηματισμένο δακτύλιο πουρίνης. ^[3]

Ξεκινώντας από έναν προϋπάρχοντα δακτύλιο πυριμιδίνης με σκοπό τη δόμηση ενός δακτυλίου ιμιδαζόλης, μια αρκετά αποδοτική συνθετική πορεία που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ποικίλων παραγώγων πουρίνης, προτάθηκε από τον Bai και τους συνεργάτες του. Η συνθετική πορεία φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 8): [11]



Σχήμα 8

Καθώς το σύστημα του δακτυλίου πουρίνης αποτελεί σύντηξη δύο αρωματικών ετερόκυκλων, ένα άλλο λογικό σημείο εκκίνησης για την παρασκευή του δικυκλικού συστήματος είναι η δόμηση του δακτυλίου πυριμιδίνης σε έναν προϋπάρχοντα δακτύλιο ιμιδαζολίου ακολουθώντας μια διαδικασία κυκλοποίησης. Παράδειγμα μιας τέτοιας συνθετικής πορείας αποτελεί η σύνθεση 9-βεζυλ-6-αμινοπουρίνης από 5-αμινο-1-βενζυλ-4-κυανοϊμιδαζόλιο, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. (σχήμα 9) [12]



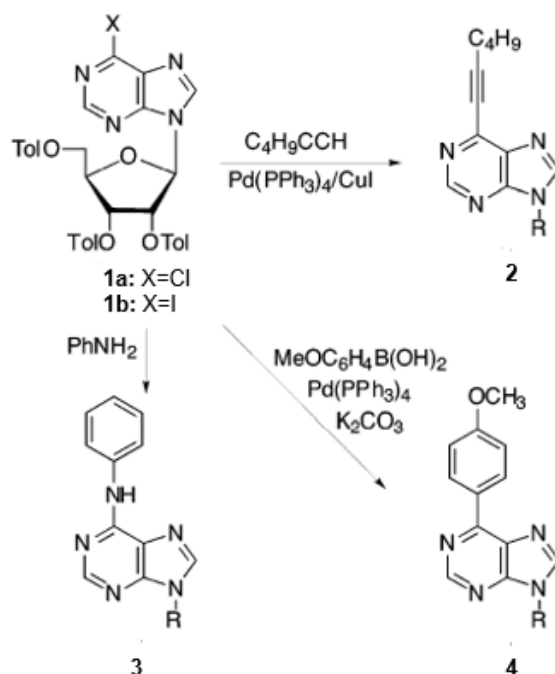
R=2-ClC₆H₄CH₂-

R=3,4-(CH₃O)₂C₆H₃CH₂-

Σχήμα 9: Μετατροπή 5-αμινο-1-βενζυλ-4-κυανοϊμιδαζολίων σε 9-βεζυλ-6-αμινοπουρίνες με κατεργασία με HC(OEt)₃ και Ac₂O ακολουθούμενη από αντίδραση με αμμωνία.

Τέλος, μια πολύ συχνή μέθοδος παρασκευής παραγώγων πουρίνης αφορά την εισαγωγή ήνυποκατάσταση ομάδων σε προϋπάρχοντα δακτύλιο πουρίνης. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω αλκυλίσεων (π.χ. μεθυλίσεων) στα άζωτα των θέσεων 7 και 9 ή με αντιδράσεις υποκατάστασης και στους άνθρακες 2 και 6, με αποτέλεσμα την παραγωγή C-αμινωμένων και C- αλκυλιωμένων πουρινών. [3]

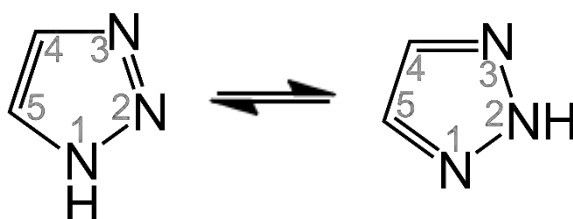
Ορισμένες αντιδράσεις που χρησιμοποιούνται για την υποκατάσταση του άνθρακα στη θέση 6 είναι οι Sonogashira, Suzuki-Miyaura και S_NAr . Η αντίδραση Sonogashira είναι μια αντίδραση διασταυρούμενης σύζευξης που χρησιμοποιείται στην οργανική σύνθεση για το σχηματισμό δεσμών άνθρακα-άνθρακα. Χρησιμοποιεί έναν καταλύτη παλλαδίου καθώς και έναν συν-καταλύτη χαλκού για να σχηματίσει έναν δεσμό άνθρακα - άνθρακα μεταξύ ενός τερματικού αλκινίου και ενός αρυλίου ή βινυλαλογονιδίου.^[14] Η αντίδραση Suzuki-Miyaura είναι μια αντίδραση διασταυρούμενης σύζευξης μεταξύ ενός βορονικού οξέος και ενός οργανοαλογονιδίου που καταλύεται από ένα σύμπλοκο παλλαδίου.^[15] Τέλος, η S_NAr είναι μια αντίδραση πυρηνόφιλης αρωματικής υποκατάστασης, στην οποία το πυρηνόφιλο μετατοπίζει μια καλά αποχωρούσα ομάδα, όπως ένα αλογονίδιο, σε έναν αρωματικό δακτύλιο.^{[16],[17]} Στο παρακάτω παράδειγμα (σχήμα 10) περιγράφεται η χρήση 6-χλωρο και 6-ιωδο ανάλογων πουρινών ως αρχικές ενώσεις και για τις τρεις προαναφερθείσες αντιδράσεις.^[13]



Σχήμα 10: Το προϊόν 2 προκύπτει με αντίδραση Sonogashira, το προϊόν 3 με S_NAr και το 4 με Suzuki - Miyaura

1.2. ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΡΙΑΖΟΛΙΟΥ

Το τριαζόλιο είναι μια ετεροκυκλική ένωση με το μοριακό τύπο $C_2H_3N_3$, η οποία αποτελείται από ένα πενταμελή δακτύλιο δύο ατόμων άνθρακα και τριών ατόμων αζώτου. Υπάρχουν δύο είδη ισομερών, τα 1,2,3-τριαζόλια και τα 1,2,4-τριαζόλια, που διαφέρουν στις σχετικές θέσεις των τριών ατόμων αζώτου. Κάθε ένα από αυτά τα ισομερή έχει δύο ταυτομερή, τα οποία διαφέρουν στο άτομο αζώτου που είναι συνδεδεμένο με ένα υδρογόνο. ^[18]



Σχήμα 11: αριστερά 1H-1,2,3 τριαζόλιο, δεξιά 2H-1,2,3 τριαζόλιο



Σχήμα 12: αριστερά 1H-1,2,4 τριαζόλιο, δεξιά 4H-1,2,4 τριαζόλιο

1.2.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ 1,2,3 ΤΡΙΑΖΟΛΙΩΝ

Ο δακτύλιος των 1,2,3-τριαζολίων εμφανίζεται σε μια μεγάλη ποικιλία οργανικών ενώσεων με βιολογικές δράσεις όπως αντιμικροβιακή, αντιική και αντικαρκινική. Τα τριαζόλια έχουν την ικανότητα να μιμούνται διαφορετικές λειτουργικές ομάδες. Αυτό οφείλεται στα δομικά τους χαρακτηριστικά όπως η πολικότητα, η ακαμψία και το γεγονός ότι μπορούν να δρουν τόσο ως δότες σε δεσμούς υδρογόνου όσο και ως αποδέκτες. Ένα επιπλέον πλεονέκτημά τους είναι ότι εμφανίζουν αξιοσημείωτη σταθερότητα υπό υδρολυτικές, αναγωγικές και οξειδωτικές συνθήκες.^[19] Επομένως, τα τριαζόλια βρίσκουν ευρεία χρήση στην έρευνα με σκοπό τη σύνθεση νέων δραστικών μορίων.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τη βιολογική τους δραστικότητα, τα τριαζόλια έχουν χρησιμοποιηθεί έναντι ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η αντικατάσταση της ακεταμινομάδας στο αντιβιοτικό λινεζολίδη με ένα τριαζόλιο. Το αποτέλεσμα ήταν ένα από τα παράγωγα του τριαζολίου να εμφανίσει έντονη αντιμικροβιακή δραστικότητα έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων καθώς και των βακτηρίων που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στη λινεζολίδη. ^[20]

Ένα άλλο παράδειγμα βιολογικής δράσης των τριαζολίων αφορά την ανάπτυξη αρκετών αναστολέων πρωτεάσης HIV-1 για τη θεραπεία του AIDS. Αυτό επιτεύχθηκε με τη σύνθεση μιας νέας κατηγορίας ανταγωνιστών του πρωτεϊνικού παράγοντα μολυσματικότητας του ιού HIV-1 (Vif) οι οποίοι περιείχαν δακτύλιο τριαζόλης και εμφάνισαν βελτιωμένη δραστηριότητα. ^[21]

Ο δακτύλιος τριαζόλης έχει επίσης ενσωματωθεί σε πολυκυκλικά παράγωγα, όπως το ανάλογο της κρυπτοφυκίνης-52. Η κρυπτοφυκίνη-52 είναι ένα συνθετικό παράγωγο μιας οικογένειας φυσικών πολυκυκλικών ενώσεων γνωστών για την κυτταροτοξική τους δράση έναντι καρκινικών κυττάρων ανθεκτικών σε πολλά φάρμακα. ^[22]

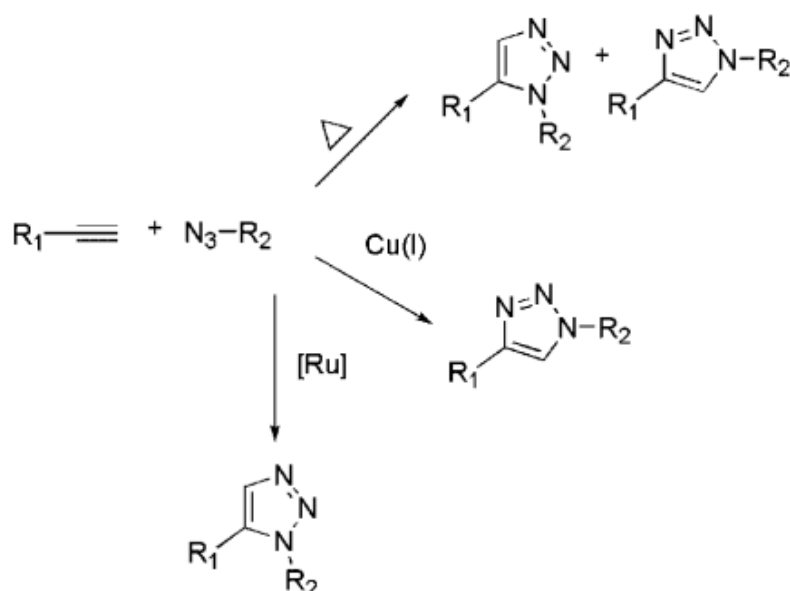
Η σύνθεση παραγώγων τριαζολίου έχει βρει εφαρμογή και σε χημειοθεραπευτικές μεθόδους, καθώς συντέθηκαν ανάλογα αντικαρκινικού παράγοντα που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της λευχαιμίας. ^[23]

Αυτές και πολλές ακόμα φαρμακευτικές ιδιότητες ^[19] έχουν βρεθεί με τον καιρό και έχουν κάνει τα 1,2,3-τριαζόλια άξια έρευνας.

1.2.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΡΙΑΖΟΛΙΩΝ: 1,3 ΔΙΠΟΛΙΚΗ ΚΥΚΛΟΠΡΟΣΘΗΚΗ ΜΕΤΑΞΥ ΑΛΚΙΝΙΟΥ - ΑΖΙΔΙΟΥ

Τα τελευταία χρόνια είναι μεγάλη η ανάγκη για ταχείες αντιδράσεις που να πληρούν τρία βασικά κριτήρια: αποτελεσματικότητα, ευελιξία και επιλεκτικότητα. ^[24]

Η πλέον ευρέως διαδεδομένη αντίδραση που πληρεί τα κριτήρια αυτά είναι η 1,3 διπολική κυκλοπροσθήκη, ή αλλιώς κυκλοπροσθήκη Huisgen, μεταξύ ενός αζιδίου και ενός αλκινίου που δίνει 1,2,3-τριαζολο-ομάδες. ^[24] Με πρωτοπόρο τον Huisgen το 1960, η αντίδραση αυτή επανήλθε στο επίκεντρο όταν αναπτύχθηκε η έννοια της «χημείας κλικ» (click chemistry), μια προσέγγιση, βασισμένη στη σύνδεση μικρότερων μονάδων, η οποία μιμείται την προσέγγιση που χρησιμοποιεί η φύση για τη δημιουργία ουσιών. ^{[25],[26]}



Σχήμα 13: σύνοψη της 1,3 διπολικής κυκλοπροσθήκης χωρίς καταλύτη, με καταλύτη Cu(I) και με καταλύτη ρουθενίου.

Τα προϊόντα της 1,3 διπολικής κυκλοπροσθήκης είναι ένα μείγμα 1,5- και 1,4-ισομερών.

Το 2002 προτάθηκε από τις ομάδες των Sharpless και Meldal ^[27] η χρήση αλάτων χαλκού Cu(I) ως καταλυτών, με την οποία η αντίδραση επιταχύνθηκε έως και 10 εκατομμύρια φορές. Το πιο σημαντικό είναι πως σε θερμοκρασία δωματίου ή ακόμα και σε μέτρια θερμοκρασία, ο καταλύτης χαλκού κατευθύνει το σχηματισμό μόνο ενός από τα δύο ισομερή και συγκεκριμένα του 1,4-ισομερούς. ^[24]

Στο βασικό καταλυτικό σύστημα χρησιμοποιούνται άλατα χαλκού (II) (πχ θειικός χαλκός ή οξικός χαλκός), παρουσία αναγωγικού παράγοντα όπως ασκορβικό νάτριο ή μεταλλικός χαλκός, τα οποία ανάγουν τον χαλκό (II) σε χαλκό (I). Ως διαλύτης χρησιμοποιείται ένα μείγμα από tert-βουτανόλη και νερό. Στην περίπτωση αυτή δε χρειάζεται η παρουσία βάσης. Εάν δεν είναι εφικτό να χρησιμοποιηθούν υδατικές συνθήκες, τότε συνίσταται η χρήση οργανικών διαλυτών (π.χ. τετραϋδροφουράνιο, τολουόλιο, διχλωρομεθάνιο, ακετονιτρίλιο), παρουσία στοιχειομετρικών ποσοτήτων αλάτων χαλκού (I) (π.χ. CuI, [Cu(CH₃CN)₄]PF₆ κ.α.) και περίσσεια βάσης, η οποία συνήθως είναι κάποια τριτοταγής αμίνη (π.χ. TEA, DIPEA). ^[24]

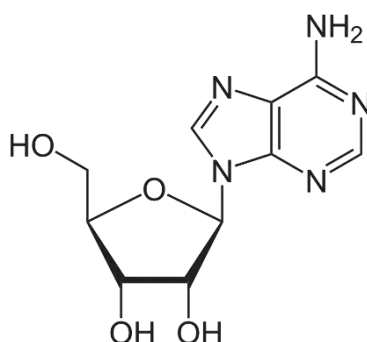
Επόμενως, η χρήση χαλκού ως καταλύτης της 1,3 διπολικής κυκλοπροσθήκης έχει αρκετά πλεονεκτήματα τόσο στην ταχύτητα και την ευκολία πραγματοποίησης της αντίδρασης όσο και στην απόδοσή της. Σε σύγκριση με άλλες αντιδράσεις με καταλύτες μέταλλα, η χρήση του χαλκού είναι πιο απλή και πιο οικονομική.

Εκτός από το χαλκό, ένας άλλος καταλύτης που χρησιμοποιείται στις 1,3 διπολικές κυκλοπροσθήκες είναι το ρουθίνιο. Το 2005, προτάθηκε από την ομάδα του Fokin ^[27] πως στη συγκεκριμένη αντίδραση, με χρήση pentamethyl-cyclopentadienyl ruthenium chloride (Cr^{*}RuCl), επιτυγχάνονταν υψηλή απόδοση στην παραγωγή των 1,5 ισομερών 1,2,3 τριαζολίου. Ο καταλύτης αυτός οδηγεί σε μια μη αναστρέψιμη οξειδωτική σύζευξη μεταξύ αζιδίου και αλκυνίου, η οποία μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως πυρηνόφιλη προσβολή του ενεργοποιημένου αλκυνίου στο ηλεκτρονιόφιλο τμήμα αζώτου του αζιδίου. ^[28]

1.3. ΤΡΙΑΖΟΛΟ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΠΟΥΡΙΝΗΣ

Η χημεία «κλικ» εφαρμόστηκε στη σύζευξη 1,2,3-τριαζολίων με πουρίνες. Ύστερα από εκτεταμένη έρευνα βρέθηκε πως ανάλογα της N6-υποκατεστημένης 2-(1,2,3-τριαζολο) αδενίνης αποτέλεσαν μια νέα κατηγορία ισχυρών και επιλεκτικών ανταγωνιστών σε υποδοχείς αδενοσίνης και συγκεκριμένα σε υποδοχείς A₃AR. ^{[31],[32]}

Η αδενοσίνη είναι μια οργανική ένωση που εμφανίζεται ευρέως στη φύση με τη μορφή ποικίλων παραγώγων. Το μόριο αποτελείται από μια αδενίνη που συνδέεται με μια ριβόζη μέσω β-N₉-γλυκοσιδικού δεσμού.



Σχήμα 12: Αδενοσίνη

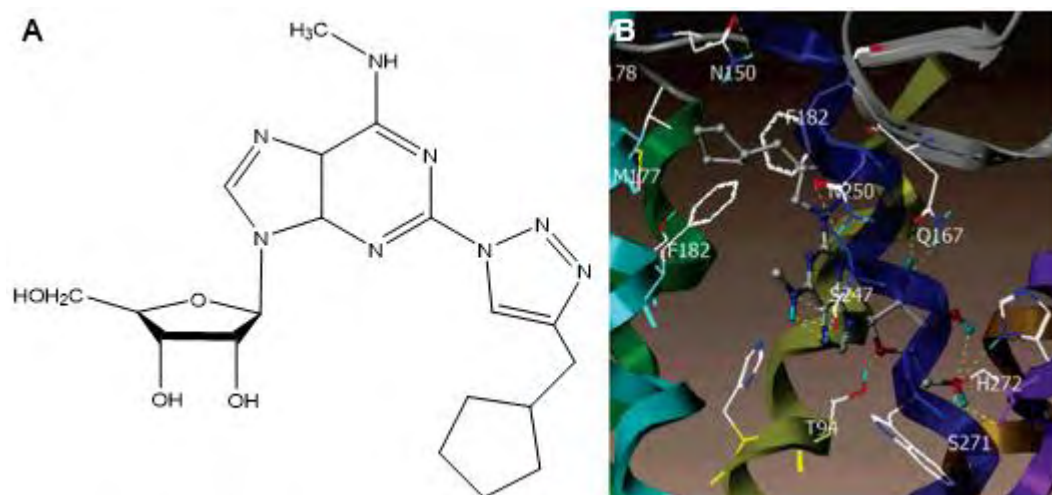
Οι υποδοχείς αδενοσίνης είναι υποδοχείς συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες. Αποτελούνται από τέσσερεις υπότυπους και ταξινομούνται ως A1, A2A, A2B και A3. ^[33] Ο A3 υποδοχέας είναι ειδοειδικός και στον άνθρωπο συναντάται στους πνεύμονες, στο ήπαρ, στην καρδιά, στους νεφρούς και στον εγκέφαλο. ^[31] Η ενεργοποίησή του οδηγεί σε αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, η οποία με τη σειρά της αυξάνει τη δραστικότητα της εξειδικευμένης σε φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη φωσφολιπάση C, με αποτέλεσμα την κινητοποίηση του ασβεστίου. ^[34]

Η σύνδεση αδενοσινών στους A3 υποδοχείς έχει αντίκτυπο σε πολλές από τις διεργασίες του οργανισμού και πολλοί από τους αγωνιστές του υποδοχέα έχουν προταθεί με σκοπό τη φαρμακευτική τους χρήση. Η ενεργοποίηση του A3 υποδοχέα συμβάλλει στη διατήρηση του μυοκαρδίου μέσω ενεργοποίησης ATP-εξαρτώμενων καναλιών καλίου. Συνδέεται, επίσης, και με την προστασία των νευρώνων και για το λόγο αυτό έχει προταθεί η χρήση αγωνιστών A3 υποδοχέων ως πιθανή θεραπεία για καρδιακή και εγκεφαλική ισχαιμία. Επιπροσθέτως έχουν εμφανίσει ανικαρκινική και χημειοπροστατευτική δράση. ^[31]

Ρυθμιστές (αγωνιστές-διεγέρτες ή ανταγωνιστές-αναστολείς) των εν λόγω υποδοχέων έχουν προταθεί ως αντιφλεγμονώδη και αντιασθματικά φάρμακα. Οι ανταγωνιστές (αναστολείς) των A3 υποδοχέων αδενοσίνης υπόσχονται επίσης πολλαπλή φαρμακευτική δράση. Κάποιοι από αυτούς φαίνεται να συμβάλλουν στη ρύθμιση της ανάπτυξης των κυττάρων και άλλοι δρουν ως εγκεφαλοπροστατευτικοί παράγοντες. Πολύ σημαντική είναι η ενίσχυση της αντικαρκινικής θεραπείας μέσω μετρίασης της εκροής της Ρ-γλυκοπρωτεΐνης των κυττάρων, η οποία μπορεί να οδηγήσει το καρκινικό κύτταρο στόχο σε ανοχή στην αντικαρκινική θεραπεία.^[31] Τέλος, καθώς εμφανίζονται υποδοχείς αδενοσίνης στον οφθαλμό, ανταγωνιστές τους μπορούν να αξιοποιηθούν και στη θεραπεία του γλαυκώματος.^[31]

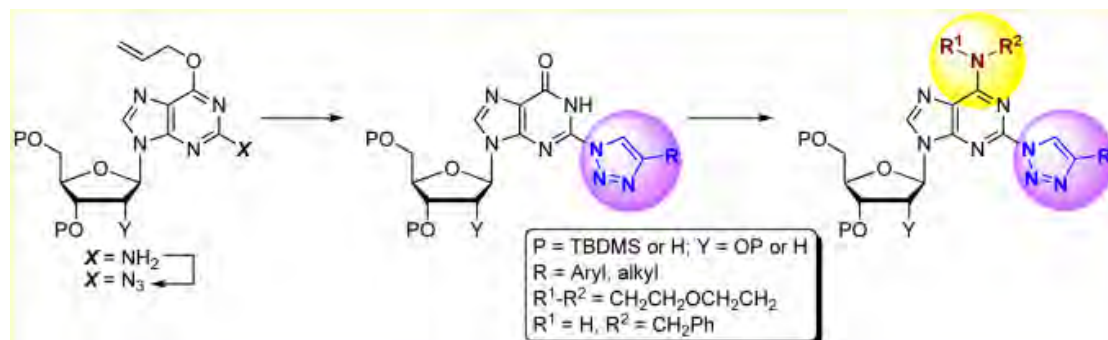
Παρά τις διαφορές στη δομή και τις διαφορετικές λειτουργίες, ένας μεγάλος αριθμός ανταγωνιστών μοιράζεται μια ποικιλία κοινών χαρακτηριστικών. Οι περισσότεροι είναι επίπεδοι και αρωματικοί ή ακόμα και ετεροκυκλικοί με υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο. Λόγω της ετεροκυκλικής δομής τους, έχουν εξετασθεί πάρα πολλές ετεροκυκλικές ενώσεις ως πιθανοί αγωνιστές (διεγέρτες) για τέτοιου είδους υποδοχείς, μεταξύ άλλων πουρίνες και πυριμιδίνες.^[31]

Η βιβλιογραφία έχει δείξει πως μεγάλος αριθμός 2-(1,2,3-τριαζολ-1-υλ)-N6-υποκετεστημένα παράγωγα αδενοσίνης έχουν εμφανίσει συγγένεια σε A3 υποδοχείς αδενοσίνης. Ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα απεικονίζεται στην εικόνα 2.^[31]



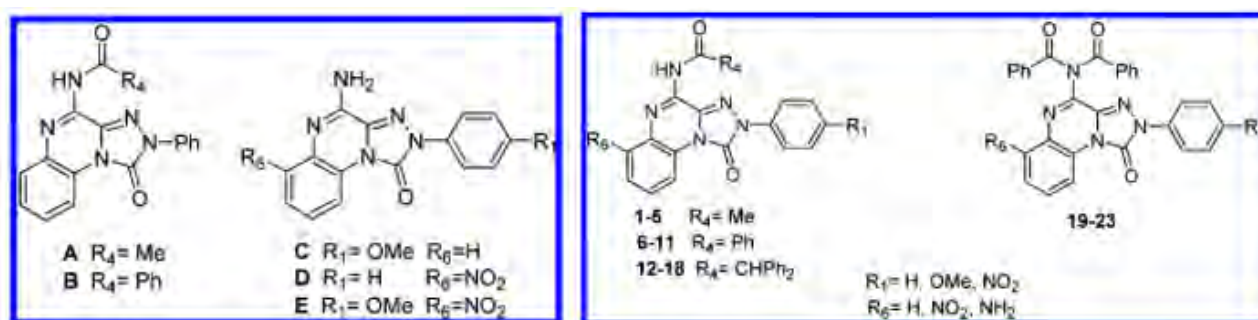
Εικόνα 2: Το παράγωγο 2-(4-κυκλοπεντυλ-1,2,3-τριαζολ-1-υλ)-N6-μεθυλαδενοσίνη (A) εμφάνισε την υψηλότερη συγγένεια για τον υποδοχέα αδενοσίνης A3. (B) Σύμπλοκο σύνδεσής του στον A3 υποδοχέα.

Επιπλέον, σε άλλες ερευνητικές εργασίες έχουν περιγραφεί δράσεις ανάλογων 2-τριαζολο υποκατεστημένων αδενοσινών, που παρασκευάστηκαν με 1,3 διπολική κυκλοπροσθήκη με καταλύτη χαλκό, στο πλαίσιο της έρευνας των υποδοχέων αδενοσίνης. Βρέθηκαν επίσης μόρια που παρουσίασαν αντιπολλαπλασιαστική δράση σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές ωθηκών και παχέος εντέρου. Τα ανάλογα και η συνθετική τους πορεία απεικονίζονται εν συντομία στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 3).^[35]



Εικόνα 3

Τέλος, ορισμένα 1,2,4-τριαζολο παράγωγα, τα οποία απεικονίζονται στην εικόνα 4, έχουν σχεδιαστεί ως ανταγωνιστές για ανθρώπινους A3 υποδοχείς αδενοσίνης.^[36]



Εικόνα 4: 4-αμιδο-1,2,4-τριαζολο-[4,3- a]κουινοχαλιν-1-παράγωγα

2. ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως προαναφέρθηκε, οι πουρίνες είναι χημικές ενώσεις, οι οποίες λόγω της δομής τους εμπλέκονται σε μεγάλο αριθμό διεργασιών στον ανθρώπινο οργανισμό, έτσι έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία χρόνια, η οποία έχει οδηγήσει σε παράγωγα με φαρμακευτική δράση.^[3] Παραδείγματα τέτοιων δράσεων αποτελούν η αντιμετώπιση καρκινικών κυττάρων και η αντιμετώπιση του άσθματος από παράγωγα πουρίνης με δομή ανάλογη της αδενοσίνης.^[10] Επιπλέον, έχουν βρει εφαρμογή σε διεργασίες που αφορούν το μεταβολισμό και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.^{[5]-[9]}

Ο δακτύλιος των 1,2,3-τριαζολίων αποτελεί, επίσης, έναν πολύ συχνά εμφανιζόμενο δακτύλιο σε πολλές οργανικές ενώσεις με βιολογική δράση, όπως αντιμικροβιακή, αντιική και αντικαρκινική, καθώς χαρακτηρίζεται από την ικανότητα μίμησης διαφορετικών λειτουργικών ομάδων.^[19] Ερευνητικές μελέτες αναφέρουν τη δράση τους έναντι έναντι ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων.^[20] Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί με σκοπό την ανάπτυξη αρκετών αναστολέων πρωτεάσης HIV-1 για τη θεραπεία του AIDS.^[21] Τέλος, έχει επίσης μελετηθεί η κυτταροτοξική τους δράση σε καρκινικά φάρμακα καθώς και η χρήση τους σε χημειοθεραπευτικές μεθόδους.^{[22],[23]}

1,2,3-τριαζολο υποκατεστημένα παράγωγα πουρίνης, έχει αναφερθεί πως εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με ανθρώπινους A3 υποδοχείς αδενοσίνης, οι οποίοι συναντώνται σε πνεύμονες, ήπαρ, καρδιά, νεφρούς και εγκέφαλο και επομένως εμπλέκονται σε ποικίλες διεργασίες.^{[29],[30]}

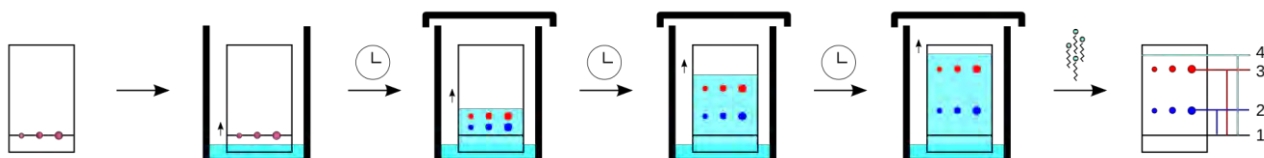
Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας μελέτης είναι η παραγωγή νέων υποκατεστημένων στη θέση 2 τριαζολο-παραγώγων πουρίνης, καθώς θεωρείται ότι πιθανόν να εμφανίσουν κυτταροτοξική δράση. Πρώτη ύλη των νέων αυτών παραγώγων αποτέλεσε η 2-αμινο-6-χλωρο πουρίνη, στην οποία προστέθηκαν 1,2,3-τριαζολοαλκυλο υποκαταστάτες στη θέση 2 και βενζυλομάδες (μεθυλοβενζόλιο, βενζυλαμίνη) στις θέσεις 6 και 9. Επιπλέον στόχο αποτελεί η ταυτοποίηση της δομής των νέων ενώσεων με φασματοσκοπικές μεθόδους.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ

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

Η TLC είναι μια ποιοτική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η καθαρότητα μιας ένωσης, να εκτιμηθεί πόσο έχει προχωρήσει μία αντίδραση, ακόμα και να αναλυθεί η σύνθεση ενός μείγματος. Ορίζεται ως ο διαχωρισμός μετρίως πτητικών ή μη πτητικών ενώσεων πάνω σε αδρανές στερεό (στατική φάση), το οποίο εμβαπτίζεται σε έναν οργανικό διαλύτη ή σε μείγμα οργανικών διαλυτών (κινητική φάση). Συγκεκριμένα, η στατική φάση αποτελείται από μια πλάκα αλουμινίου επιστρωμένη με προσροφητικό υλικό Silica gel (Merck Kieselgel 60 F254) πάχους 0,2mm. Τα συστατικά κατανέμονται μεταξύ της στατικής φάσης και του διαλύτη με βάση τις πολικότητες της προς μελέτης ένωσης και του διαλύτη στον οποίο εμβαπτίζεται. Οι ενώσεις μεταφέρονται προς το πάνω μέρος της πλάκας με μια ταχύτητα που εξαρτάται από τη φύση των ενώσεων και του διαλύτη.^[37]

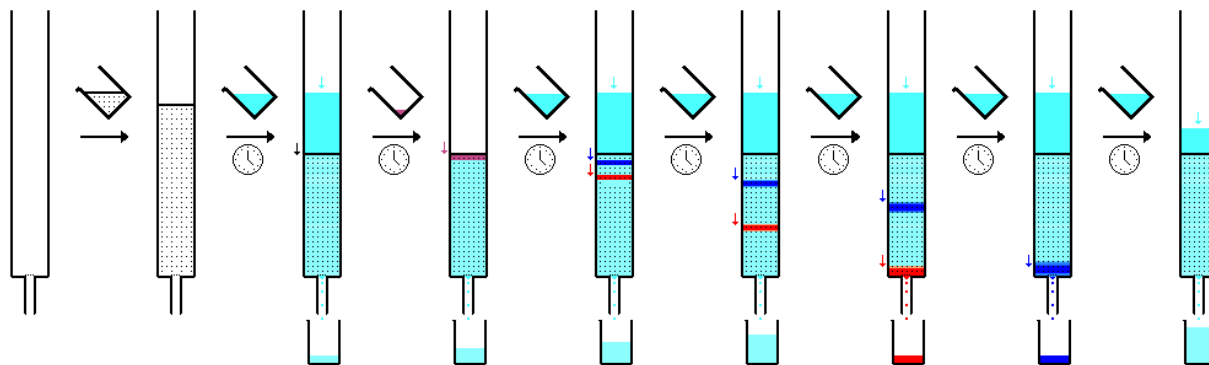
Η εμφάνιση των κηλίδων για ενώσεις που απορροφούν στο υπεριώδες φως (πχ αρωματικές ενώσεις), γίνεται με τη χρήση λάμπας UV (254nm). Οι ενώσεις που δεν απορροφούν το υπεριώδες φως πρέπει να γίνουν ορατές με άλλη μέθοδο, όπως είναι ο ψεκασμός της πλάκας με διάλυμα θειικού οξέος 30% και θέρμανση.^[37]



Εικόνα 5: Απλοποιημένο παράδειγμα ανάπτυξης πλάκας TLC όπου ένα μωβ σημείο διαχωρίζεται σε ένα μπλε και ένα κόκκινο σημείο

3.2. Χρωματογραφία στήλης (Column chromatography)

Η χρωματογραφία στήλης είναι μια μέθοδος η οποία επιτρέπει το διαχωρισμό και την απομόνωση των προϊόντων με συλλογή των εκλούόμενων κλασμάτων και έτσι συλλέγεται μόνο η επιθυμητή ένωση, απομακρύνοντας παραπροϊόντα και διαλύτες. Πρόκειται για κατερχόμενη χρωματογραφία και συνήθως πραγματοποιείται δια της βαρύτητας, όμως πολλές φορές πραγματοποιείται με τη βοήθεια εισαγωγής αέρα υπό πίεση (flash chromatography). Όπως και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, η αρχή στην οποία βασίζεται η χρωματογραφία στήλης είναι ότι τα συστατικά ενός μείγματος μπορούν να διαχωριστούν με έκθεση σε δύο ανταγωνιζόμενες φάσεις. Στην εν λόγω περίπτωση, τη στατική φάση αποτελεί το προσροφητικό υλικό, συνήθως silica gel (240-400, Merck grade) και την κινητή φάση το μείγμα προς διαχωρισμό. Το δείγμα εισάγεται στο πάνω μέρος του προσροφητικού και ο διαλύτης διέρχεται από μία κατακόρυφη «στήλη» προσροφητικού. Τα συστατικά του δείγματος κινούνται προς τα κάτω εντός της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες που εξαρτώνται από την πολικότητα των ενώσεων, την πολικότητα του διαλύτη και τη φύση του προσροφητικού. Τα συστατικά του μείγματος εκλούνται στο κάτω μέρος της στήλης από όπου και συλλέγονται.^[38]



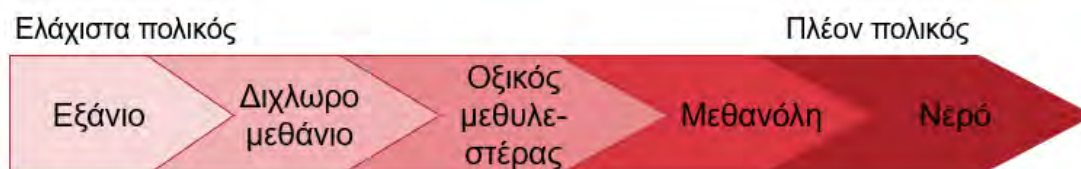
Εικόνα 6: Η διαδικασία της χρωματογραφίας στήλης, βήμα προς βήμα

3.3. Χρήση μικροκυμάτων στην οργανική χημεία

Πολλές φορές στην οργανική χημεία γίνεται εφαρμογή μικροκυμάτων σε χημικές αντιδράσεις. Τα μικροκύματα δρουν ως ηλεκτρικά πεδία υψηλής συχνότητας και γενικά θερμαίνουν οποιοδήποτε υλικό που περιέχει κινητά ηλεκτρικά φορτία, όπως πολικά μόρια σε διαλύτη ή αγώγιμα ιόντα σε στερεό. Οι πολικοί διαλύτες θερμαίνονται καθώς τα μόρια από τα οποία αποτελούνται αναγκάζονται να περιστραφούν με το πεδίο και να χάσουν ενέργεια λόγω συγκρούσεων. Η οργανική σύνθεση με τη βοήθεια μικροκυμάτων χαρακτηρίζεται από τις μεγάλες επιταχύνσεις που επιτυγχάνονται σε πολλές αντιδράσεις ως συνέπεια του ρυθμού θέρμανσης, οι οποίες δεν μπορούν να αναπαραχθούν με τη συμβατική θέρμανση. Επιπλέον, οδηγούν σε υψηλότερες αποδόσεις, ήπιες συνθήκες αντίδρασης και σε συντομότερους χρόνους πραγματοποίησης αντιδράσεων και έτσι να οδηγήσουν στη βελτίωση πολλών διεργασιών. Ακόμη και αντιδράσεις που δεν συμβαίνουν με συμβατική θέρμανση μπορούν να πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας μικροκύματα. ^[39]

3.4. Οργανικοί διαλύτες και ξήρανση διαλυτών

Οι οργανικοί διαλύτες αποτιμώνται σύμφωνα με την πολικότητά τους, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 7: κατάταξη κοινών διαλυτών από λιγότερο σε περισσότερο πολικοί.

Καθώς ορισμένες αντιδράσεις εμφανίζουν ευαισθησία στο νερό, καθίσταται απαραίτητη η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως είναι το τετραϋδροφουράνιο (THF) και το διμεθυλομεθαναμίδιο (DMF). Για να μπορέσουν να πραγματοποιηθούν ορισμένες από τις αντιδράσεις που θα αναφερθούν παρακάτω, είχε προηγηθεί ξήρανση των εν λόγω διαλυτών. Στο THF είχε προηγηθεί απόσταξη από νάτριο / βενζοφαιρόνη αρκετές μέρες πριν από τη χρήση και την αποθήκευσή του σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4Å. Αντίστοιχη διαδικασία εφαρμόστηκε και για το DMF και αποθήκευση αυτού σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å. ^[40]

3.5. Ταυτοποίηση οργανικών ενώσεων

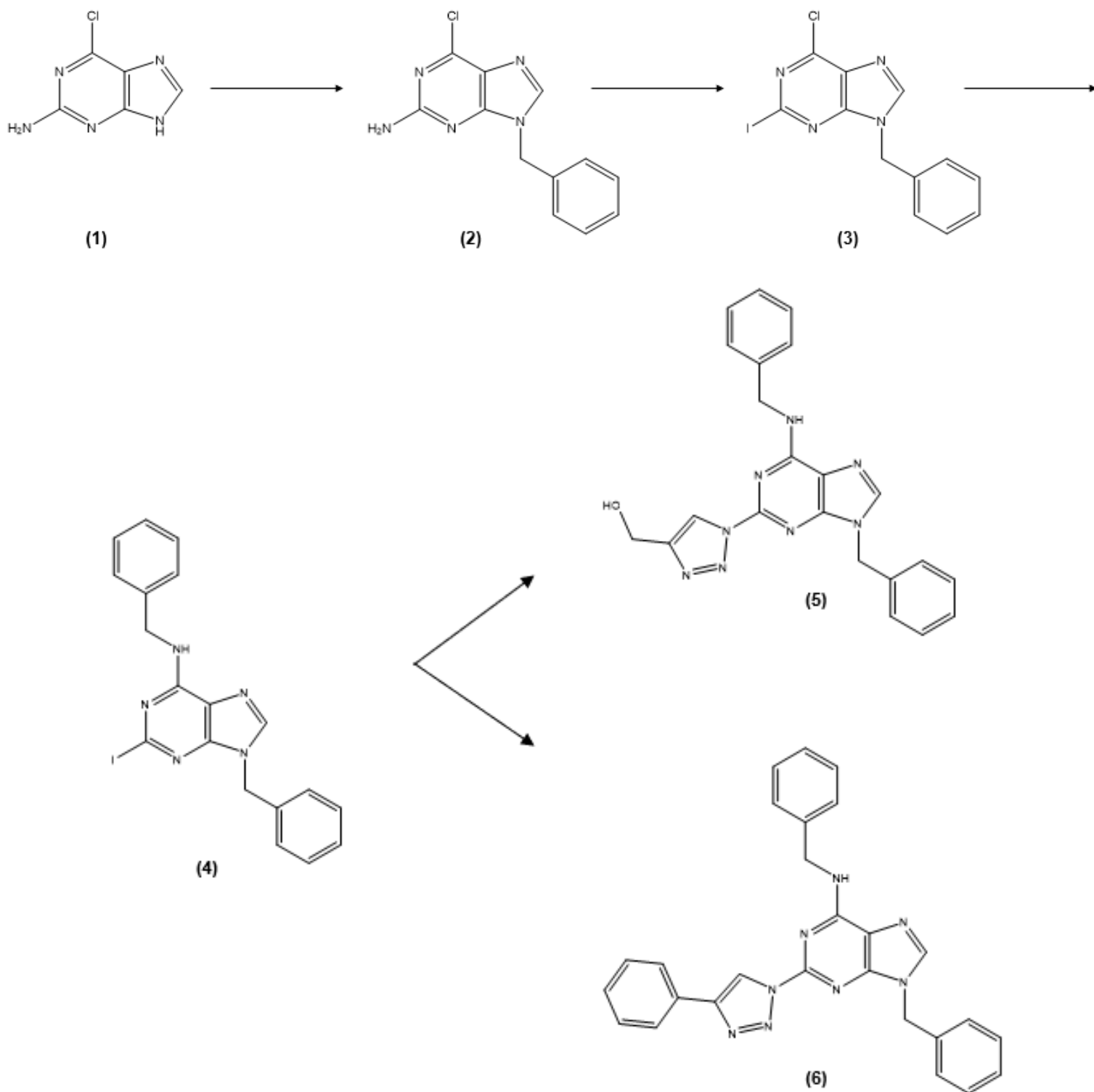
Η ταυτοποίηση των νεοσυντηθέμενων οργανικών ενώσεων έγινε μέσω φάσματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Η φάσματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι η πλέον σημαντική τεχνική για το χαρακτηρισμό της δομής μιας ένωσης, καθώς αποκαλύπτει την ειδική τοποθέτηση και συνδετικότητα των ατόμων. Μπορεί, επομένως, να αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ακριβής θέσης των λειτουργικών ομάδων και να δώσει πολύτιμες πληροφορίες για τον ανθρακικό σκελετό και για το μόριο ως σύνολο. Βρίσκει εφαρμογή σε κάθε πυρήνα, ο οποίος έχει περιττό μαζικό αριθμό και/ ή περιττό ατομικό αριθμό, όπως είναι οι πυρήνες πρωτονίου (^1H NMR) και άνθρακα (^{13}C NMR).^[41]

Τα φάσματα ^1H NMR μετρήθηκαν με το φασματόμετρο Bruker Avance III 250 MHz χρησιμοποιώντας ως δευτεριωμένους διαλύτες χλωροφόρμιο (CDCl_3), διμεθυλοσουλφοξείδιο $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}_4]$ και μεθανόλη (CD_3OD). Η πολλαπλότητα των σημάτων σημειώνεται ως s (single, απλή), d (doublet, διπλή), t (triplet, τριπλή), dd (doublet doublet, διπλή διπλών), dt (doublet triplet, διπλή τριπλών), m (multiplet, πολλαπλή). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

Τα φάσματα ^{13}C NMR καταγράφηκαν όλη τη νύχτα στα 75.5MHz στο ίδιο φασματόμετρο, χρησιμοποιώντας ως δευτεριωμένους διαλύτες χλωροφόρμιο (CDCl_3), διμεθυλοσουλφοξείδιο $[(\text{CD}_3)_2\text{SO}_4]$ και μεθανόλη (CD_3OD).

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1. ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ



4.2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας ήταν η 2-αμινο-6-χλωρο-πουρίνη (1), η οποία είναι μια εμπορικά διαθέσιμη ένωση. Στην ένωση αυτή προστέθηκε βενζυλοχλωρίδιο (BnCl), παρουσία ανθρακικού καλίου (K_2CO_3) σε διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), με σκοπό την προστασία της θέσης N9. Έτσι, λαμβάνεται η 2-αμινο-9-βενζυλο-6-χλωροπουρίνη (2).

Στη 2-αμινο-9-βενζυλο-6-χλωροπουρίνη (2), πραγματοποιείται ιωδίωση στη θέση 2 χρησιμοποιώντας ιώδιο (I_2), διϊωδομεθάνιο (CH_2I_2), ιωδιούχο χαλκό (CuI) ως καταλύτη της αντίδρασης και νιτρώδες ισοπεντύλιο σε άνυδρο διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF). Το αποτέλεσμα ήταν η ένωση 2-ιωδο-9-βενζυλο-6-χλωροπουρίνη (3).

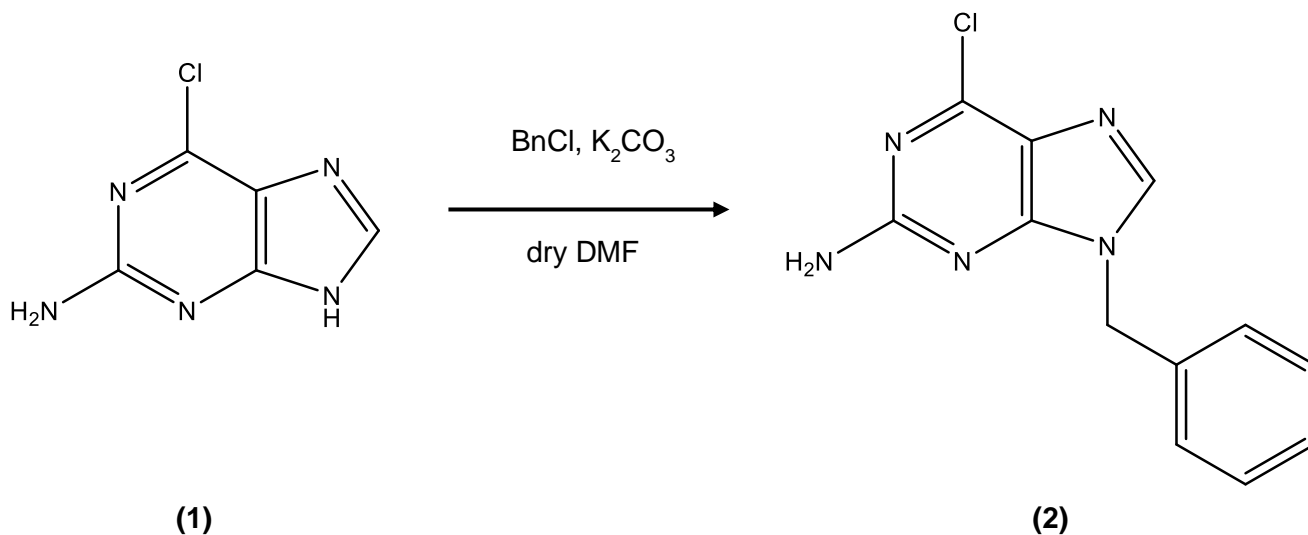
Στην ένωση 2-ιωδο-9-βενζυλο-6-χλωροπουρίνη (3), προστίθενται βενζυλαμίνη και τριεθυλαμίνη σε διαλύτη μεθανόλη και παράγεται η 2-ιωδο-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνη (4).

Από την 2-ιωδο-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνη (4) παράγονται οι ενώσεις 9-βενζυλο-2-(1*H*-1,2,3-τριαζολ-4-υλο-μεθανολο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνη (5) και 9-βενζυλο-2-(1*H*-1,2,3-τριαζολ-1-υλο-φαινυλο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνη (6).

Πιο συγκεκριμένα, στη 2-ιωδο-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνη (4) προστίθεται προπαραγωγική αλκοόλη, αζίδιο του νατρίου (NaN_3), ασκορβικό νάτριο και θειικός χαλκός ($CuSO_4$) ως καταλύτης της αντίδρασης σε μίγμα διαλυτών διμεθυλομεθαναμίδιο (DMF) και απεσταγμένο νερό, προς παραγωγή της ένωσης (5). Αντίστοιχα, για παραγωγή της ένωσης (6) προστέθηκε αιθυλοβενζόλιο και τα ίδια αντιδραστήρια που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

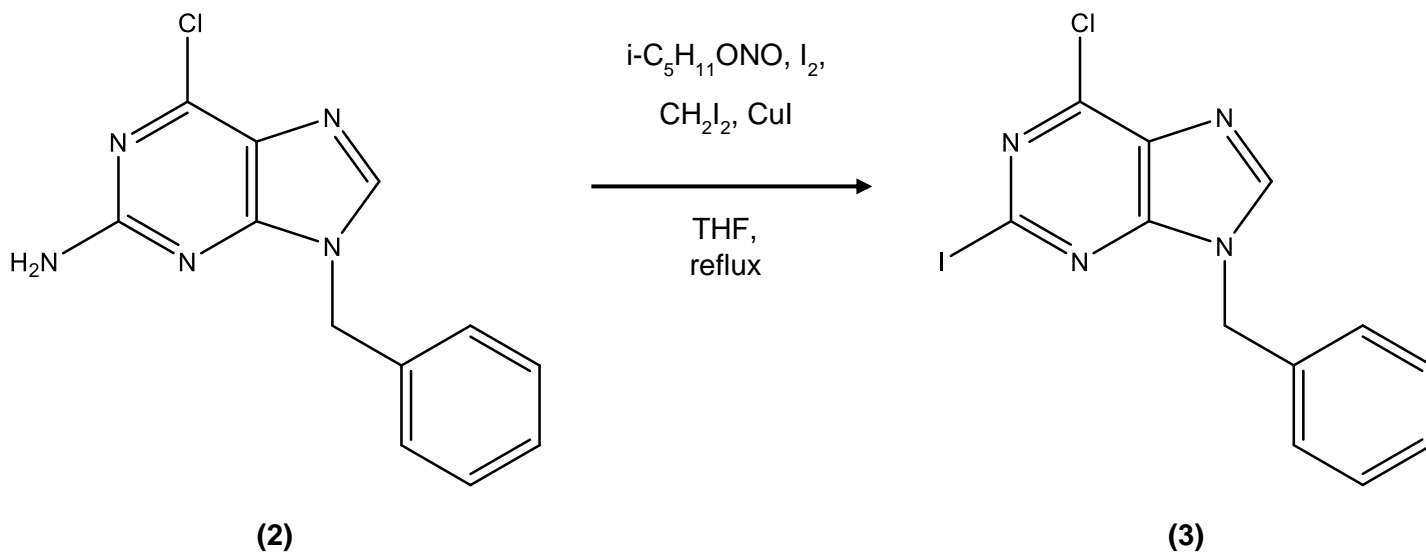
Τα προϊόντα (5) και (6) αποτελούν το τελικό στάδιο της προαναφερθείσας συνθετικής πορείας.

Αντίδραση 1: Προστασία θέσης N9 και σύνθεση της 2-αμινο-9-βενζυλο-6-χλωροπουρίνης (2)



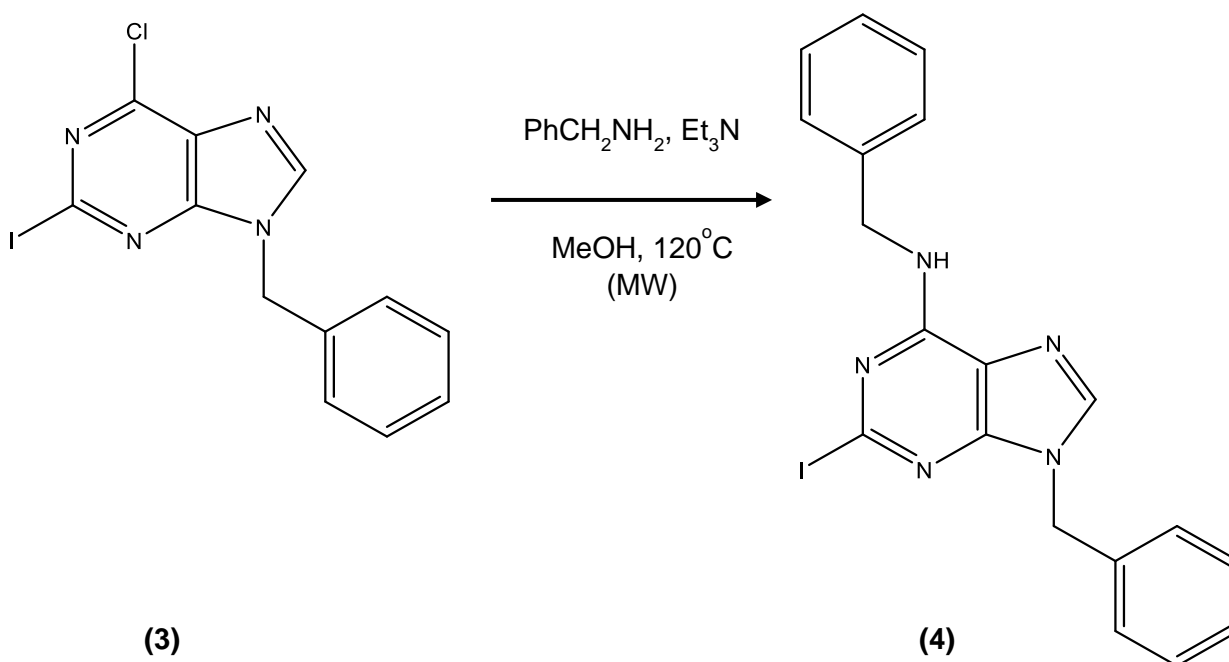
Σε διάλυμα που περιέχει την ένωση 2-αμινο-6-χλωρο πουρίνη (1) (180mg, 1,06mmol) και άνυδρο DMF (0,9ml), προστίθεται K_2CO_3 (440mg, 1,06mmol) και ακολούθως γίνεται ανάδευση για 20' σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθεται BnCl (246,2μL, 212mmol). Η αντίδραση πραγματοποιείται υπό άνυδρες συνθήκες (συνεχής ροή αζώτου) overnight. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση (έλεγχος με TLC διαλύτη ανάπτυξης οξικό αιθυλεστέρα / εξάνιο 7:3 με $R_f=0,71$). Στο στερεό που προκύπτει ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης οξικό αιθυλεστέρα / εξάνιο σε αναλογία 7:3. Τέλος, γίνεται εξάτμιση του διαλύτη μέχρι ξηρού για παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος. Το προϊόν (2) λαμβάνεται με τη μορφή λευκού στερεού (209mg, 0,8mmol), με σημείο τήξης 213-214°C. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 76%.

Αντίδραση 2: Ιωδίωση στη θέση 2 και σύνθεση της 2-ιωδο-6-χλωρο-9-βενζυλοπουρίνης (3)



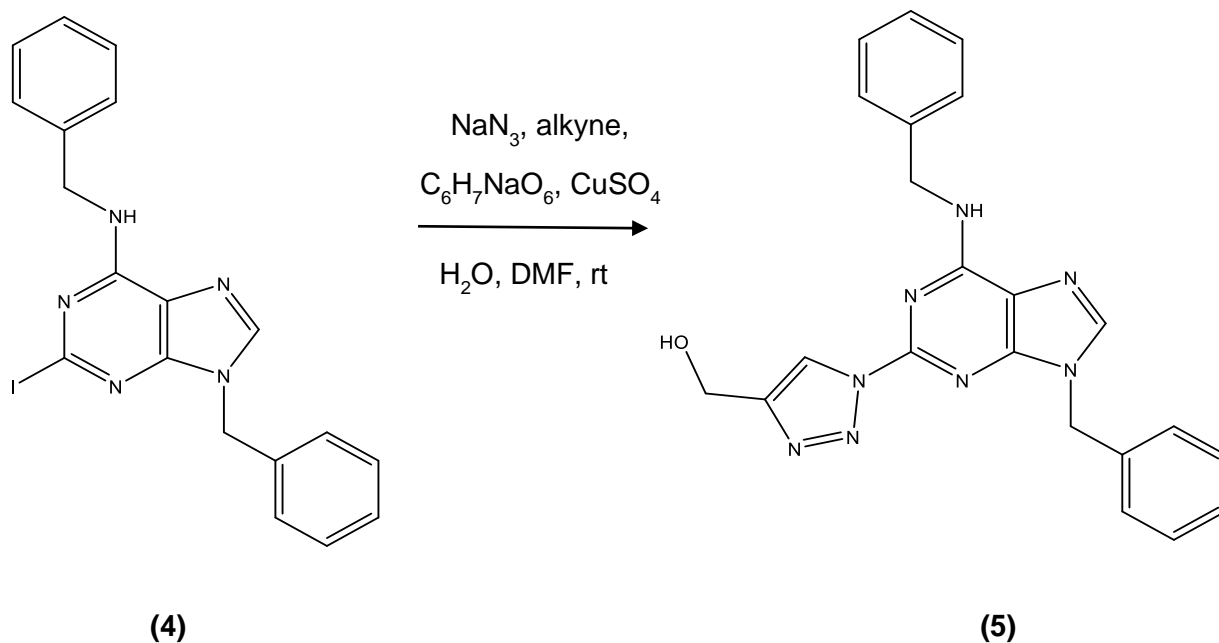
Το προϊόν (2) (209mg, 0.8mmol), διαλύεται σε THF (9ml). Ακολουθεί προσθήκη CuI (152mg, 0.8mmol), I_2 (203mg, 0.8mmol) CH_2I_2 (643μL, 8mmol) και νιτρώδες ισοπεντύλιο (322μL, 2.4mmol). Η αντίδραση πραγματοποιείται για 75' με θέρμανση με reflux. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση (έλεγχος με TLC με διαλύτη ανάπτυξης οξικό αιθυλεστέρα / εξάνιο 5:5 με $R_f=0,375$) απομακρύνεται ο διαλύτης υπό κενό μέχρι ξηρού. Στο στερεό που προκύπτει ακολουθεί καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης οξικό αιθυλεστέρα / εξάνιο σε αναλογία 5:5. Τέλος, γίνεται εξάτμιση του διαλύτη μέχρι ξηρού για παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος. Το προϊόν (3) λαμβάνεται με τη μορφή λευκού στερεού (173mg, 0.46mmol). Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 61%.

Αντίδραση 3: σύνθεση της 2-ιωδο-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπυριμίνης (4)



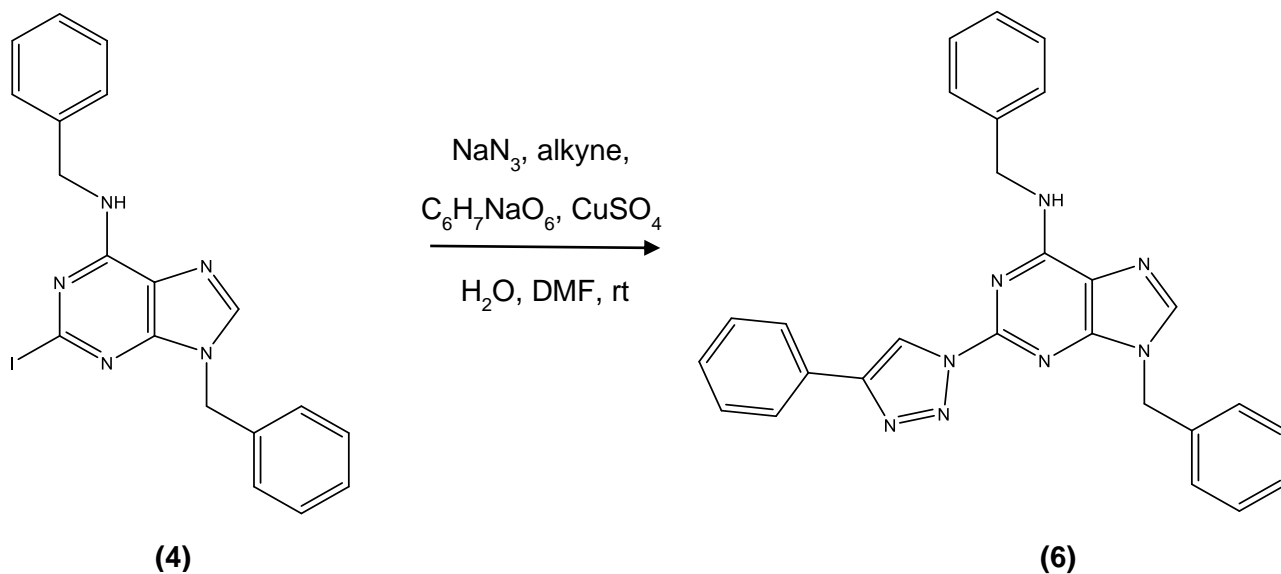
Το παραπάνω προϊόν (3) (170mg, 0.45mmol) διαλύεται σε μεθανόλη (8.5ml). Στο διάλυμα προστίθονται BnNH_2 (200.5μL, 1.8mmol) και Et_3N (623.7μL, 4.5mmol). Το προκύπτον μίγμα μεταφέρεται στη συσκευή μικροκυμάτων. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 120°C για 5 λεπτά και με Power ρυθμισμένο στα 100 Watt και προκύπτει υποκίτρινο διάλυμα με λευκό ίζημα. Μετά το πέρας της αντίδρασης (έλεγχος με TLC σε διάλυμα οξικό αιθυλεστέρα / εξάνιο 8:2 $R_f=0.32$) απομακρύνεται ο διαλύτης υπό κενό μέχρι ξηρού. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται εκχύλιση με CH_2Cl_2 . Η οργανική φάση πλένεται μια φορά με υπέρκορο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (brine) και ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4). Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό μέχρι ξηρού. Για τον καθαρισμό του επιθυμητού προϊόντος, πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης οξικό αιθυλεστέρα/εξάνιο σε αναλογία 8:2. Λαμβάνονται 128mg (0.29mmol) καθαρού προϊόντος (4). Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 65%.

Αντίδραση 4α: Σύνθεση της 9-βενζυλο-2-(1*H*-1,2,3-τριαζολ-4-υλο-μεθανολο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπυρίνης (5)



Από το παραπάνω προϊόν (4) λαμβάνεται ποσότητα (40mg, 0.09mmol) και διαλύεται σε μίγμα διαλυτών DMF:H₂O σε αναλογία 4:1 (640μL DMF, 160μL H₂O). Στο διάλυμα προστίθενται προπαραγλυκική αλκοόλη (5mg, 0.09mmol), NaN₃ (6mg, 0.09mmol), ασκορβικό νάτριο (C₆H₇NaO₆) (6mg, 0.03mmol) και καταλύτης CuSO₄·5H₂O (3mg, 0,012mmol). Η αντίδραση πραγματοποιείται μέσα σε μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση (έλεγχος με TLC με διαλύτη ανάπτυξης διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 9,8:0,2 R_f=0.2) προστίθενται 4-5 σταγόνες NH₄OH (25%) και πραγματοποιείται διήθηση με Bucher. Το διήθημα εκχυλίζεται με AcOEt. Η οργανική φάση πλένεται μια φορά με H₂O και μια φορά με υπέρκορο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (brine) και ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο (Na₂SO₄). Ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό μέχρι ξηρού. Για τον καθαρισμό του επιθυμητού προϊόντος, πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη σε αναλογία 9,8:0,2. Λαμβάνονται 16mg (0,038mmol) του επιθυμητού προϊόντος (5α). Η αντίδραση είχε απόδοση 52%

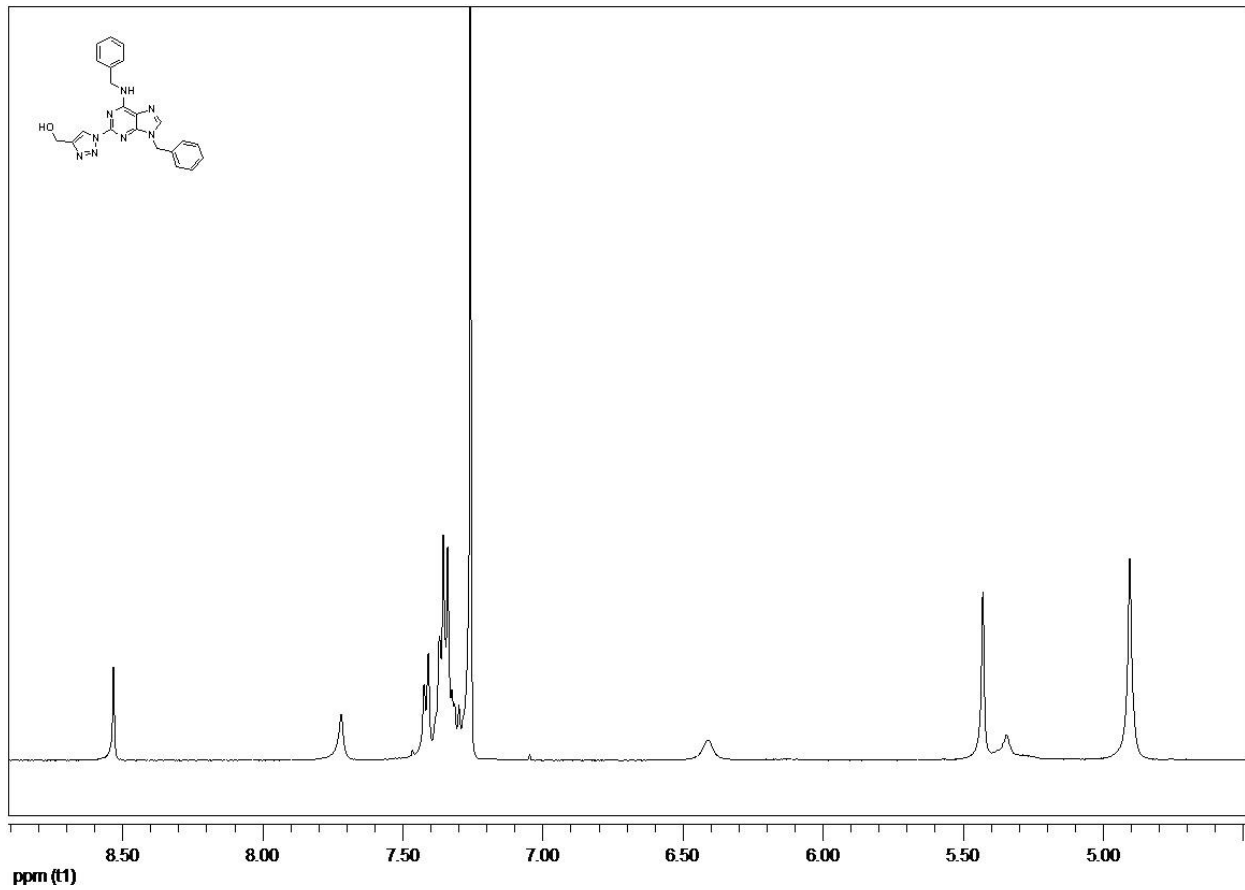
Αντίδραση 4β: Σύνθεση της 9-βενζυλο-2-(1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο-φαινυλο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπυρίνης (6)



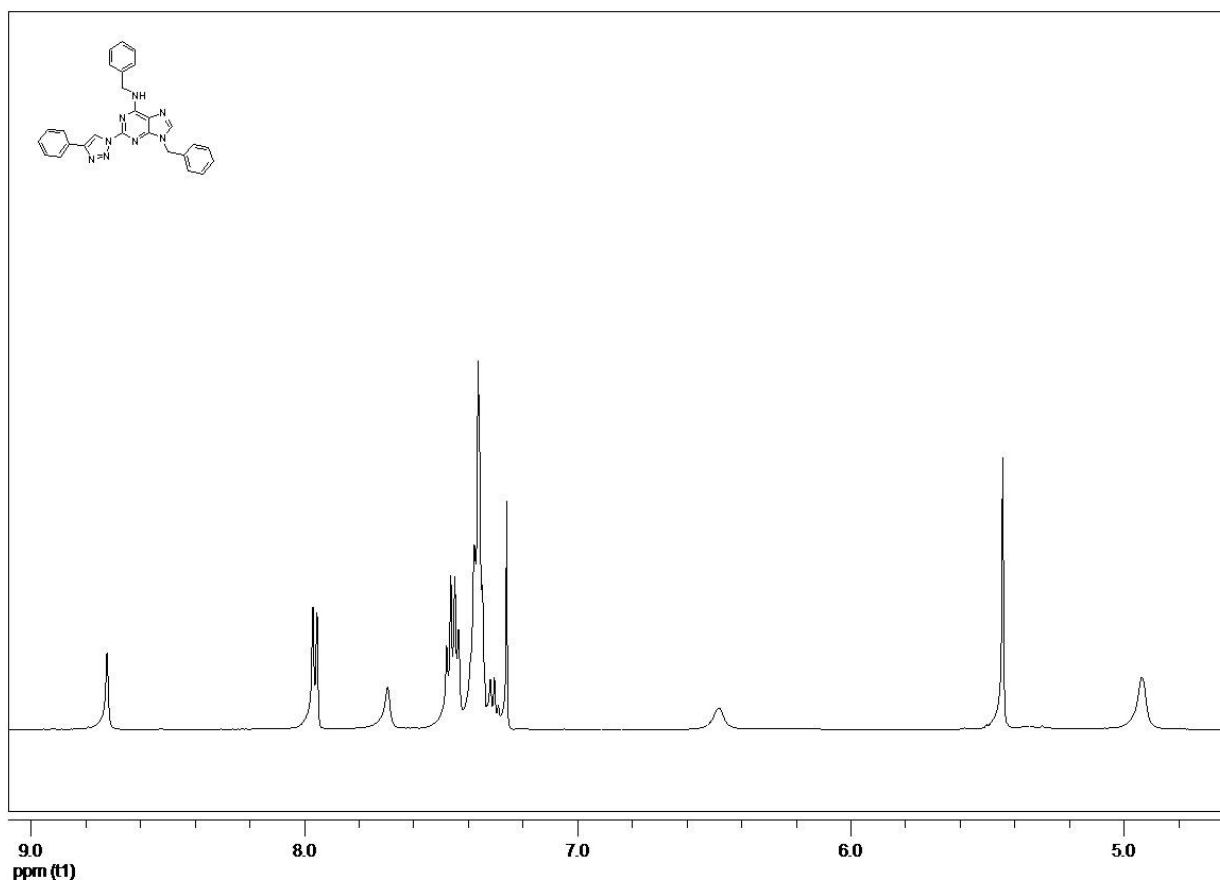
Από το προϊόν (4) λαμβάνεται ποσότητα (20mg, 0.045mmol) και διαλύεται σε μίγμα διαλυτών DMF:H₂O σε αναλογία 4:1 (0.4 ml). Στο διάλυμα προστίθενται αιθυλοβενζόλιο (4.94μL, 0.045mmol), NaN₃ (3mg, 0.046mmol), ασκορβικό νάτριο (3mg, 0.015mmol) και καταλύτης CuSO₄·5H₂O (2mg, 0.008mmol). Η αντίδραση πραγματοποιείται μέσα σε μια 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση (έλεγχος με TLC με διαλύτη ανάπτυξης οξικό αιθυλεστέρα / εξάνιο 7:3 R_f=0.35), προστίθεται NH₄OH (25%) για απομάκρυνση του CuSO₄. Ακολουθεί εκχύλιση σε AcOEt. Η οργανική φάση πλένεται τρεις φορές με απεσταγμένο νερό, μια φορά με υπέρκορο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (brine) και ξηραίνεται με άνυδρο θειικό νάτριο (Na₂SO₄). Για τον καθαρισμό του επιθυμητού προϊόντος, πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης υπό πίεση χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης οξικό αιθυλεστέρα / εξάνιο σε αναλογία 5:5. Λαμβάνονται 14mg (0.030mmol) καθαρού προϊόντος (4). Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 67%.

5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ

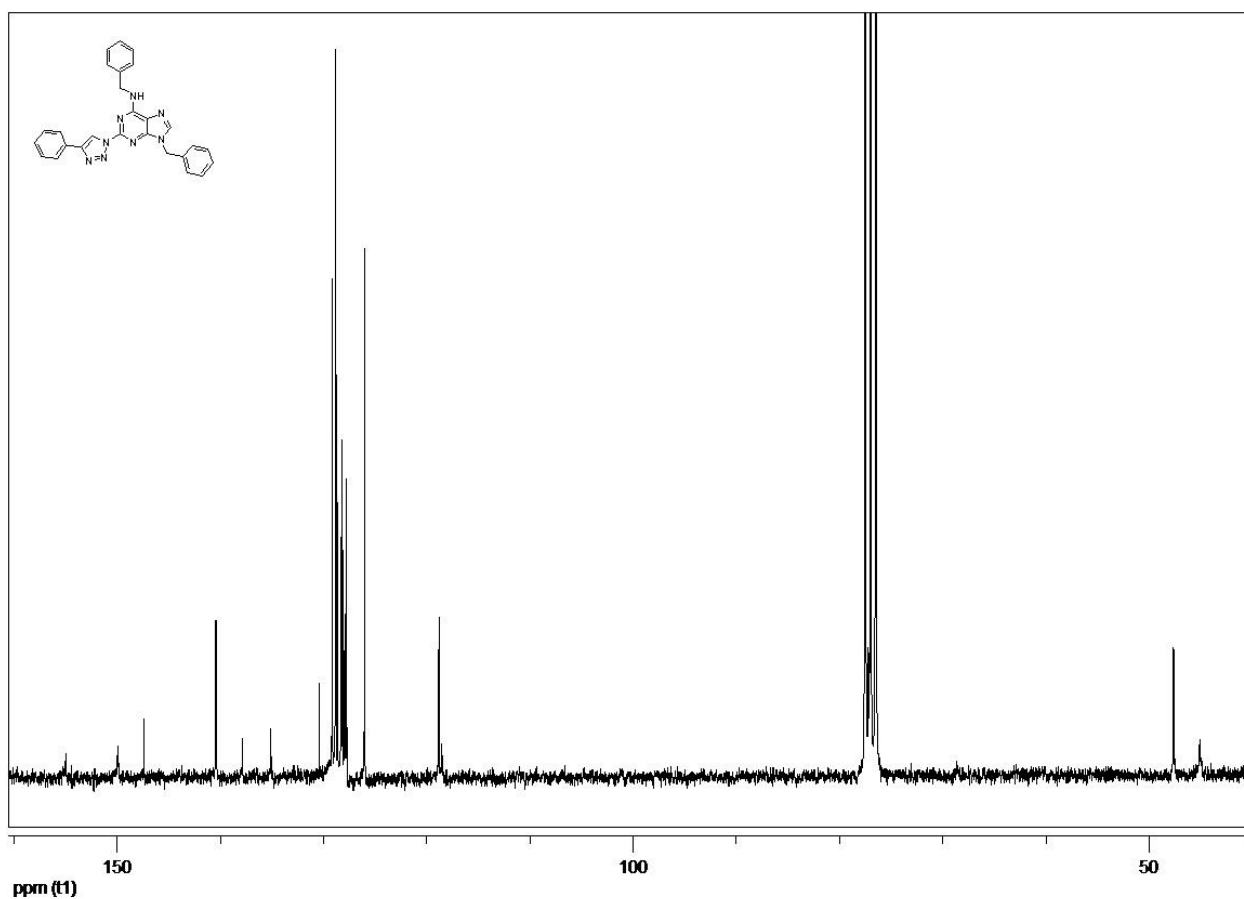
5.1. Ταυτοποίηση της 9-βενζυλο-2-(1*H*-1,2,3-τριαζολ-4-υλο-μεθανολο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπυρίνης (5) (¹H NMR)



5.2. Ταυτοποίηση της 9-βενζυλο-2-(1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο-φαινυλο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπυρίνης (6) (¹H NMR)



5.3. Ταυτοποίηση της 9-βενζυλο-2-(1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο-φαινυλο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπυρίνης (6) (^{13}C NMR)



6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 Η σημασία της σύνθεσης 1,2,3-τριαζολο-παραγώγων πουρίνης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι ετεροκυκλικοί δακτύλιοι της πουρίνης και του τριαζολίου συναντώνται σε βιομόρια του ανθρώπινου οργανισμού ή/και σε συνθετικές βιοδραστικές οργανικές ενώσεις, γεγονός που καθιστά τα παράγωγά τους σημαντικούς ερευνητικούς στόχους στα πλαίσια της ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών ουσιών. Αναφέρθηκαν οι δράσεις τους ως αντικαρκινικοί και αντιικοί παράγοντες καθώς και η κοινή τους δράση ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές σε υποδοχείς αδενοσίνης λόγω της υψηλής συγγένειας που μπορούν να εμφανίσουν με αυτούς.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιτευχθηκε, μέσω μιας απλής και σύντομης συνθετικής πορείας, η σύνθεση νέων τριαζολο-παραγώγων πουρίνης τα οποία πιθανόν να έχουν κυτταροτοξική δράση. Η ταυτοποίηση των εν λόγω ενώσεων έγινε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα-13 (^1H NMR και ^{13}C NMR).

6.2 Σύνθεση 1,2,3-τριαζολο-παραγώγων πουρίνης

Ανάλογα μόρια έχουν αναγνωριστεί ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές A3 υποδοχέων αδενοσίνης. Επομένως, η σύνθεση και η μελλοντική βιολογική αποτίμηση των τελικών παραγώγων, της 9-βενζυλο-2-(1*H*-1,2,3-τριαζολ-4-υλο-μεθανολο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνης (**5**) και της 9-βενζυλο-2-(1*H*-1,2,3-τριαζολ-1-υλο-φαινυλο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνης (**6**), θεωρείται σημαντική.

Η αναπτυχθείσα πορεία σύνθεσης των επιθυμητών ενώσεων χαρακτηρίζεται από συντομία (4 στάδια), σχετική ευκολία και ευελιξία, καθώς δίνει τη δυνατότητα σύνθεσης μεγάλου αριθμού νέων παραγώγων, με διάφορες ομάδες στις θέσεις 9 και 6 του δακτυλίου πουρίνης και στη θέση 4 του τριαζολίου, μέσω της χρησιμοποίησης κατάλληλων αλκυλαλογονιδίων, αμινών και αλκινίων στο 1^ο, το 3^ο και το 4^ο στάδιο, αντίστοιχα.

Αντίδραση 1: σύνθεση της 2-αμινο-9-βενζυλο-6-χλωροπουρίνης

Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε άνυδρες συνθήκες και σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση αλκυλίωσης του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πουρίνης δεν είναι απόλυτα τοποελεκτική, συνεπώς σχηματίστηκε σε μικρό ποσοστό και το αντίστοιχο N7-βενζυλο-παράγωγο. Το μείγμα των δύο προϊόντων διαχωρίστηκε επιτυχώς με χρωματογραφία στήλης για να παραληφθεί η ένωση (**2**), με απόδοση 76%.

Αντίδραση 2: Σύνθεση της 2-ιωδο-6-χλωρο-9-βενζυλοπουρίνης

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε εντός 75 λεπτών, με θέρμανση με reflux σε διαλύτη THF. Ο καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης απέδωσε το επιθυμητό προϊόν με απόδοση 61%.

Αντίδραση 3: Σύνθεση της 2-ιωδο-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνης

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με θέρμανση σε συσκευή μικροκυμάτων στους 120°C και ολοκληρώθηκε εντός 5 λεπτών. Μετά από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης το προϊόν (**4**) παρελήφθη με απόδοση 65%.

Αντίδραση 4α: Σύνθεση της 9-βενζυλο-2-(1H-1,2,3-τριαζολ-4-υλο-μεθανολο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνης

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε μέσα σε μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ο καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης απέδωσε το προϊόν (**5**) με απόδοση 52%.

Αντίδραση 4β: Σύνθεση της 9-βενζυλο-2-(1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο-φαινυλο)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνης

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε μέσα σε 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η απόδοση της αντίδρασης ήταν 67%, μετά από τον καθαρισμό του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης.

Στις αντιδράσεις 4α και 4β σχηματίζεται *in situ* το 2-άζιδο παράγωγο της πουρίνης το οποίο στη συνέχεια, μέσω της αντίδρασης κυκλοπροσθήκης με το αλκίνιο, δίνει το τελικό 2-τριαζολο παράγωγο. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιούνται δύο χημικές

μετατροπές σε ένα στάδιο, και επιπλέον αποφεύγεται η διαδικασία απομόνωσης του ενδιάμεσου άζιδο παραγώγου, το οποίο, όπως και τα περισσότερα οργανικά αζίδια, αναμένεται να έχει μεγάλη ευαισθησία στο φως και τη θέρμανση.

6.3 Μελλοντική επέκταση της παρούσας εργασίας

Μελλοντικά τα τελικά προϊόντα θα αξιολογηθούν ως προς την πιθανή κυτταροτοξική δράση τους. Σε περίπτωση ελπιδοφόρων αποτελεσμάτων θα συντεθεί μεγαλύτερος αριθμός παρόμοιων παραγώγων, μέσω της ευέλικτης πορείας που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, προκειμένου να ανακαλυφθούν ενώσεις με βελτιωμένη δράση, ώστε να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών παραγόντων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) Bistrović, Andrea, et al. "Small Molecule Purine and Pseudopurine Derivatives: Synthesis, Cytostatic Evaluations and Investigation of Growth Inhibitory Effect in Non-Small Cell Lung Cancer A549." *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 33, no. 1, **2017**. pp. 271–285.
- 2) Rosemeyer, Helmut. "The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products." *Wiley Online Library*, John Wiley & Sons, Ltd, 25 Mar. **2004** .
- 3) Conejo-Garcia, A., et al. "Synthesis of Purine Derivatives as Scaffolds for a Diversity of Biological Activities." *Current Organic Chemistry*, vol. 14, no. 20, **2010**.
- 4) Visser, J., et al. "The Role of NAD⁺ in the Catalytic Mechanism of Lipoamide Dehydrogenase." *SpringerLink*, Springer, Berlin, Heidelberg, **1970**.
- 5) Lodish, Harvey. "Electron Transport and Oxidative Phosphorylation." *Molecular Cell Biology. 4th Edition.*, U.S. National Library of Medicine, 1 Jan. **1970**
- 6) J.T.Wiskich. "Control of the Krebs Cycle." *Metabolism and Respiration*, by D.D ed. DAVIES, Academic Press, **1980**, pp. 243–278.
- 7) Rajendran, Megha, et al. "Imaging Adenosine Triphosphate (ATP)." *The Biological Bulletin*, U.S. National Library of Medicine, Aug. **2016**.
- 8) Steer, Michael L. "Cyclic AMP." *Annals of Surgery*, vol. 184, no. 1, **1976**. pp. 107–115.
- 9) Legraverend, Michel, et al. "Cyclin-Dependent Kinase Inhibition by New C-2 Alkynylated Purine Derivatives and Molecular Structure of a CDK2–Inhibitor Complex." *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 43, no. 7, **2000**. pp. 1282–1292.
- 10) M. Morelli, A. R. Carta, A. Kachroo, M. A. Schwarzschild. "Pathophysiological roles for purines: adenosine, caffeine and urate", *Progress in Brain Research*, Vol. 183, **2010**, : 0079-6123
- 11) Yang, J.; Dang, Q.; Liu, J.; Wei, Z.; Wu, J.; Bai, X. Preparation of a fully substituted purine library. *J. Comb. Chem.*, **2005**, 7, 474-482.
- 12) Yahyazadeh, A.; Pourrostan, B.; Rabiee, M. Synthesis of 9-benzyl-6-aminopurines from 5-amino-1-benzyl-4-cyanoimidazoles. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2003**, 24, 1723-1724.
- 13) Liu, J.; Janeba, Z.; Robins, M.J. S_NAr Iodination of 6-Chloropurine Nucleosides: Aromatic Finkelstein Reactions at Temperatures Below -40 °C. *Org. Lett.*, **2004**, 6, 2917-2919.
- 14) Sonogashira, K., "Development of Pd-Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp²-carbon halides", *J. Organomet. Chem.*, **2002**, 653 (1–2): 46–49
- 15) Miyaura N. Suzuki A. "Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds". *Chemical Reviews*. **1995**. 95 (7): 2457–2483
- 16) Neumann CN, Hooker JM, Ritter T, "Concerted nucleophilic aromatic substitution with (19)F(-) and (18)F(-)". *Nature*. **2016**. 534 (7607): 369–73.
- 17) Rohrbach S, Smith AJ, Pang JH, Poole DL, Tuttle T, Chiba S, Murphy JA. "Concerted Nucleophilic Aromatic Substitution Reactions". *Angewandte Chemie*. **2019**. 58 (46): 16368–16388

- 18) Kaur, Ramandeep; Ranjan Dwivedi, Ashish; Kumar, Bhupinder; Kumar, Vinod. "Recent Developments on 1,2,4-Triazole Nucleus in Anticancer Compounds: A Review". *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **2016**. 16 (4): 465–489.
- 19) E. Bonandi, M. S. Christodoulou, et al. "The 1,2,3-triazole ring as a bioisostere in medicinal chemistry", *Drug discovery today*, **2017**.
- 20) Phillips, O. et al. "Synthesis and antibacterial activity of 5-substituted oxazolidinones". *Bioorg. Med. Chem.* **2003**. 11, 35–41
- 21) Mohammed, I. et al. (2016) 1,2,3-triazoles as amide bioisosteres: discovery of a new class of potent HIV-1 Vif antagonists. *J. Med. Chem.* **2016**. 59, 7677–7682
- 22) Nahrwold, M. et al. (2010) "Clicktophycin-52': a bioactive cryptophycin-52 triazole analogue.", *Organic letters*, **2012**. vol 12, No5, 1064-1067
- 23) Li, Y. et al. "Syntheses and biological evaluation of 1,2,3-triazole and 1,3,4-oxadiazole derivatives of imatinib", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2016**. 1419-1427
- 24) G. C. Tron, T. Pirali et al. "Click Chemistry Reactions in Medicinal Chemistry Applications of the 1,3-dipolar Cycloaddition Between Azides and Alkynes", *Wiley InterScience*, **2007**
- 25) F. Amblard, J. H. Cho, R. F. Schinazi "Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry", *Chem. Rev.* **2009**, 109, 4207–4220
- 26) H. C. Kolb, K. B. Sharpless. "The growing impact of click chemistry on drug discovery", *DDT* Vol. 8, No. 24, **2003**
- 27) M. S. Singh, S. Chowdhury, S. Koley, "Advances of azide-alkyne cycloaddition-click chemistry over the recent decade", *Tetrahedron*, **2016**
- 28) B. C. Boren, S. Narayan et al. "Ruthenium-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition: Scope and Mechanism", *JACS articles*, **2008**
- 29) K. A. Jacobson, Z. Gao. "Adenosine receptors as therapeutic targets", *Nat Rev Drug Discov.* **2006**. 5(3): 247–264.
- 30) S. Poulsen, R. J. Quinn. "Adenosine Receptors: New Opportunities for Future Drugs", *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6, **1998**. 619-641
- 31) L. Cosyn, K. K. Palaniappan, et al. "2-Triazole-Substituted Adenosines: A New Class of Selective A3 Adenosine Receptor Agonists, Partial Agonists, and Antagonists", *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 7373-7383
- 32) A. Kovalovs, I. Novosjolov, et al. "1,2,3-Triazoles as leaving groups in purine chemistry: a three-step synthesis of N6 -substituted-2-triazolyl-adenine nucleosides and photophysical properties thereof", *Tetrahedron Letters* 54, **2013**. 850-853
- 33) T. Okamura, Y. Kurogi, et al. "1,2,4-Triazol[5,1-i] purine Derivatives as Highly Potent and Selective Human Adenosine A3 Receptor Ligands", *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3703-3708
- 34) K. Roy, J. T. Leonard, C. Sengupta. "QSAR of adenosine receptor antagonists. Part 3: Exploring physicochemical requirements for selective binding of 1,2,4-triazolo[5,1-i] purine derivatives with human adenosine A3 receptor subtype", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14, **2004**. 3705–3709
- 35) M. K. Lakshman, A. Kumar, et al. "Synthesis and Biological Properties of C-2 Triazolylinosine Derivatives", *The Journal Of Organic Chemistry*, **2012**, 77, 5870–5883

- 36) O. Lenzi, V. Colotta, et al. "4-Amido-2-aryl-1,2,4-triazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ones as New Potent and Selective Human A3Adenosine Receptor Antagonists. Synthesis, Pharmacological Evaluation, and Ligand-Receptor Modeling Studies", *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 3916-3925
- 37) Reich, E.; Schibli A. "High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants" (Illustrated ed.). **2007**
- 38) O. Coskun. "Separation techniques: Chromatography", *North Clin Instanb*, **2016**. 3(2): 156–160
- 39) A. de la Hoz, Á. Díaz-Ortiz, Andrés Moreno. "Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave", *Chemical Society Reviews*, 2, **2005**.
- 40) Diorazio, Louis J.; Hose, David R. J.; Adlington, Neil K. "Toward a More Holistic Framework for Solvent Selection". *Organic Process Research & Development*. **2016**. 20 (4): 760–773.
- 41) Hoult, Bhakar, "NMR signal reception: Virtual photons and coherent spontaneous emission". *Concepts in Magnetic Resonance*. **1997**. (5): 277–297.
- 42) E. V. Aleksandrova, P. M. Kochergin. "The use of protecting groups in the synthesis of purine derivatives (review)", *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Vol. 45, No. 1, **2009**