



## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Σύνθεση και Φασματοσκοπική Αποτίμηση Νέων C8  
Υποκατεστημένων Νουκλεοζιτών της Γουανίνης**

**Synthesis and spectroscopic evaluation of new C-8  
substituted guanine nucleosides**

Τσουμάνη Ιωάννα

Λάρισα, 2021

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Κοιωτής Δημήτριος** (επιβλέπων): Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Μόσιαλος Δημήτριος:** Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας το Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Κολλάτος Νικόλαος:** Συμβασιούχος Διδάσκων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

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

Επιβλέπων καθηγητής ήταν ο καθηγητής Οργανικής Χημείας κ. Κομιώτης Δημήτριος, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του σχετικά με το θέμα που μου ανέθεσε καθώς και για την υποστήριξη που μου έδειξε.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κολλάτο Νικόλαο, ο οποίος με στήριξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου και ήταν πάντα εκεί για να με βοηθήσει και να επιλύσει την όποια απορία μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου Πάτσο Αθανάσιο και Βίζμπα Μαριάννα για την άψογη συνεργασία μας και συνύπαρξη στο χώρο του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, η οποία βρίσκεται πάντα στο πλευρό και στηρίζει τις επιλογές μου.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Περίληψη</b>	6
<b>Abstract</b>	7
<b>1.Εισαγωγή</b>	8
1.1 Υδατάνθρακες	8
1.2 Ετεροκυκλικές βάσεις των DNA και RNA	9
1.3 Νουκλεοζίτες	9
1.4 Νουκλεοζιτικά ανάλογα και ο τρόπος δράσης τους	10
1.4.1 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα	11
1.4.2 Αντικά νουκλεοζιτικά ανάλογα	13
1.5 Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες	14
1.6 Φουρανονουκλεοζίτες	15
1.7 3' – δέοξυριβονουκλεοζίτες	16
1.8 Γουανίνη και νουκλεοζιτικά ανάλογα γουανίνης	17
1.9 Βιολογική δράση της 8-βρωμογουανοσίνης	19
<b>2.Ειδικό Μέρος</b>	22
2.1 Σκοπός	22
<b>3.Γενική Μεθοδολογία</b>	23
3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)	23
3.2 Χρωματογραφία στήλης	24
3.3 Ξήρανση Διαλυτών	25
3.4 Ταυτοποίηση Οργανικών Ενώσεων	25
<b>4.Πειραματικό Μέρος</b>	27
4.1. Επισκόπηση Συνθετικής Οδού	27
4.2 Μεθοδολογία Σύνθεσης	28
4.2.1 Σύνθεση της 5-βενζοϋλο-1,2-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-ξυλοφουρανόζης	28
4.2.2 Σύνθεση της 5-βενζοϋλο-3-δεοξυ-1,2-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-ξυλοφουρανόζης	29
4.2.3 Υδρόλυση στους άνθρακες 1 και 2 της 5-βενζοϋλο- 3-δεοξυ-1,2-ισοπροπυλιδενο-α-D-ξυλοφουρανόζης	31

4.2.4 Ακετυλίωση των 1 και 2 υδροξυλίων του σακχάρου	32
4.2.5 Βενζοϋλίωση της βρωμογουανίνης	33
4.2.6 Σύνθεση του νουκλεοζίτη της βενζοϋλο-βρωμογουανίνης	34
<b>5. Ταυτοποίηση με <math>^1\text{H}</math> NMR</b>	35
<b>6. Αποτελέσματα - Συζήτηση</b>	36
<b>7. Βιβλιογραφία</b>	37

## Περίληψη

Οι νουκλεοζίτες και τα συνθετικά ανάλογα αυτών έχουν προσελκύσει τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς παρουσιάζουν ιδιαίτερη βιολογική δράση και θεραπευτικές ιδιότητες. Έχοντας βρεθεί μια πληθώρα φυσικών νουκλεοζιτών με αντικαρκινική ή αντική δράση, η σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών θεωρήθηκε ιδανικός τρόπος για την εύρεση νέων αντικαρκινικών και αντικών παραγόντων.

Η ερευνητική κοινότητα έχει συνθέσει αρκετά νουκλεοζιτικά ανάλογα, που φέρουν τροποποιήσεις είτε στο τμήμα της βάσης είτε στο τμήμα του σακχάρου, με αρκετά από αυτά να έχουν εγκριθεί από τον FDA και να χρησιμοποιούνται έναντι του καρκίνου και ιικών ασθενειών.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία παρουσιάζεται η σύνθεση ενός νέου νουκλεοζιτικού αναλόγου με τροποποιήσεις τόσο στο σάκχαρο όσο και στη βάση, τη γουανίνη, στοχεύοντας στην δημιουργία ενός βιολογικά ενεργού μορίου με πιθανή αντικαρκινική και αντική δράση.

## **Abstract**

Nucleosides and their synthetic analogues have attracted the interest of the scientific community in the recent years, as they have a significant biological action and therapeutic properties. Having found a variety of natural nucleosides with anticancer or antiviral activity, the synthesis of modified nucleosides was considered an ideal way to find new anticancer and antiviral agents.

Many researchers have synthesized several nucleoside analogs, which bear modifications to either the base or the sugar moiety, many of which have been approved by the FDA and are currently used against cancer and viral diseases.

In the present dissertation, the synthesis of a new nucleoside analog with modifications in both the sugar and the base, guanine, is presented, aiming at the creation of a bioactive compound with possible anti-cancer and antiviral activity.

# 1. Εισαγωγή

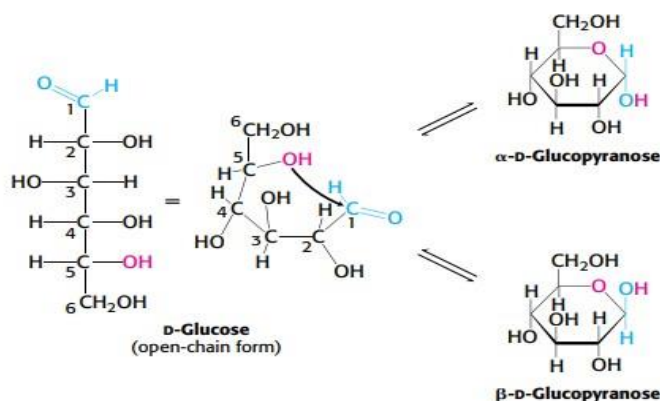
## 1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες αποτελούν τις πιο διαδεδομένες οργανικές ενώσεις στη φύση, καθώς οι περισσότεροι ζωικοί και φυτικοί οργανισμοί συνθέτουν και μεταβολίζουν τέτοιες ενώσεις. Από τον μοριακό τύπο των ενώσεων αυτών προέκυψε και η ονομασία υδατάνθρακες. Τα περισσότερα σάκχαρα έχουν μοριακό τύπο  $C_n(H_2O)_m$ , υποδεικνύοντας ότι στα μόρια αυτά τα άτομα άνθρακα συμπλέκονται κάπως με μόρια νερού (Wade, 2006).

Ο γενικός αυτός όρος αναφέρεται σε μονοσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες, καθώς και σε ουσίες που προέρχονται από μονοσακχαρίτες με αναγωγή (αλδιτόλες), οξείδωση (αλδονικά και ουρονικά οξέα) ή αντικατάσταση, αλλά και παράγωγα των ενώσεων αυτών που σχηματίζονται με ακυλίωση, αιθεροποίηση, ακετυλίωση και άλλες αντιδράσεις (Garg et al., 2008).

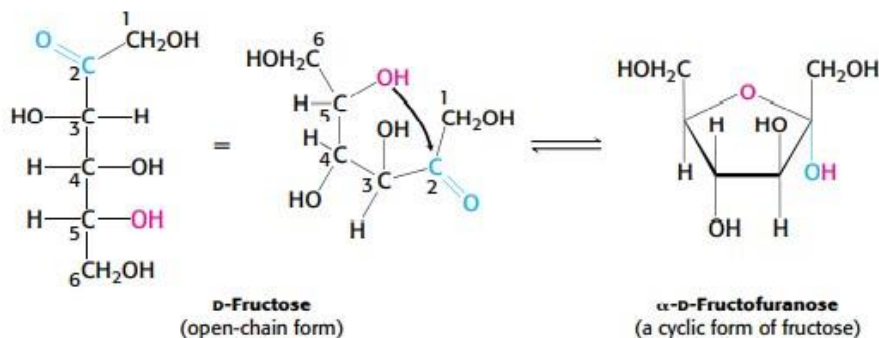
Οι μονοσακχαρίτες είναι οι πιο απλοί υδατάνθρακες, η οποίοι δεν μπορούν να υδρολυθούν σε απλούστερες ενώσεις (Wade, 2006) και είναι είτε αλδεΐδες είτε κετόνες με δύο ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Οι μονοσακχαρίτες συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν πιο πολύπλοκους υδατάνθρακες, δισακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. Οι δισακχαρίτες αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες που συνδέονται με έναν γλυκοζιτικό δεσμό O (Berg et al., 2015), ενώ οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή που αποτελούνται από πολλούς μονοσακχαρίτες με πιο διαδεδομένους στη φύση το άμυλο και την κυτταρίνη (Wade, 2006).

Τα σάκχαρα έχουν μορφή ανοιχτής αλυσίδας, όμως στο εσωτερικό των κυττάρων η επικρατής μορφή τους είναι η κυκλική. Η κυκλοποίηση των ανοιχτών αλυσίδων επιτυγχάνεται μέσω της αντίδρασης της αλδεϋδικής ή κετονικής και της υδροξυλικής ομάδας του σακχάρου προς σχηματισμό ημιακετάλης. Τα μόρια που προκύπτουν από τις αντιδράσεις αυτές μπορεί να είναι είτε εξαμελείς δακτύλιοι που καλούνται πυρανόζες (Εικ.1) είτε πενταμελείς που καλούνται φουρανόζες (Εικ.2) (Berg et al., 2015).



**Εικόνα 1:** Σχηματισμός δακτυλίου πυρανόζης από το μόριο της γλυκόζης (Berg et al., 2015)

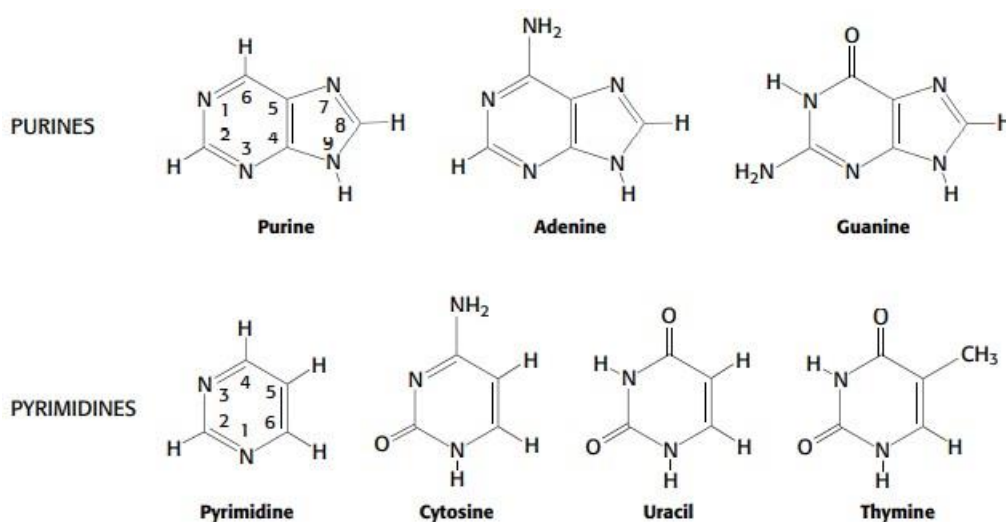




**Εικόνα 2:** Σχηματισμός δακτυλίου φουρανόζης από το μόριο της φρουκτόζης (Berg et al., 2015)

## 1.2 Ετεροκυκλικές βάσεις των DNA και RNA

Οι ετεροκυκλικές βάσεις μαζί με τα σάκχαρα, συγκεκριμένα τη ριβόζη και τη δεοξυριβόζη, συνιστούν τους δομικούς λίθους των νουκλεϊκών οξέων. Πέντε είναι οι βάσεις που συμμετέχουν στη δομή των μονομερών των νουκλεϊκών οξέων και ταξινομούνται σε δύο τάξεις (Εικ.3). Οι μονοκυκλικές ενώσεις, κυτοσίνη, ουρακίλη και θυμίνη, καλούνται βάσεις πυριμιδίνης καθώς μοιάζουν με υποκατεστημένες πυριμιδίνες, ενώ οι δικυκλικές ενώσεις, αδενίνη και γουανίνη, καλούνται βάσεις πουρίνης γιατί μοιάζουν με τη δικυκλική ετεροκυκλική πουρίνη (Wade, 2006; Berg et al., 2015).



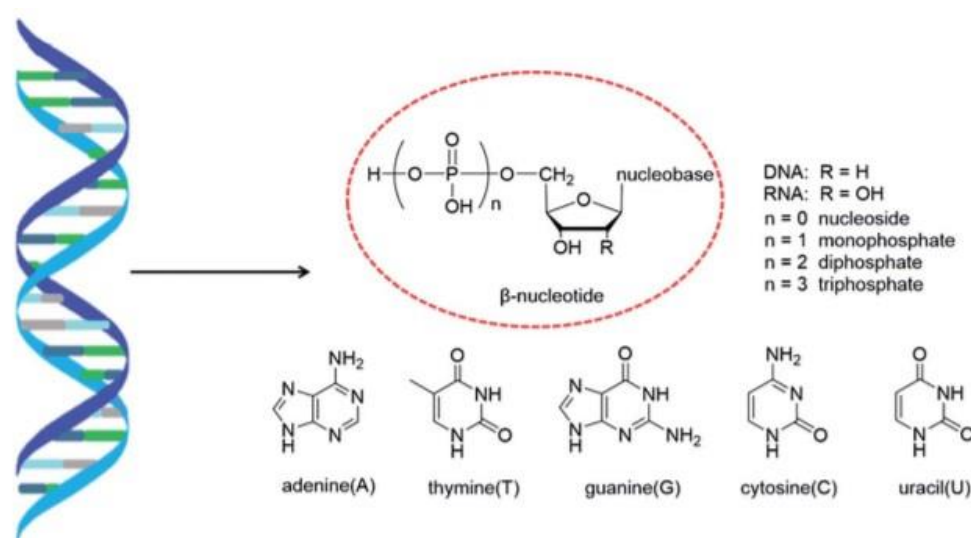
**Εικόνα 3:** Δομές των πουρινών και πυριμιδινών. (Berg et al., 2015)

## 1.3 Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες αποτελούν τη δομική μονάδα των νουκλεϊκών οξέων και αποτελούνται από ένα μόριο σακχάρου ενωμένο με μία αζωτούχα βάση. Στους

βασικούς νουκλεοζίτες το σάκχαρο είναι είτε ριβόζη είτε δεοξυριβόζη και η αζωτούχα βάση μία πυριμιδίνη (κυτοσίνη, θυμίνη, ουρακίλη) ή μια πουρίνη (αδενίνη, γουανίνη) (Britannica, 2014).

Από τους νουκλεοζίτες με την προσθήκη μίας ή περισσότερων φωσφορικών ομάδων με εστερικό δεσμό σχηματίζονται τα νουκλεοτίδια. Τα νουκλεοτίδια που σχηματίζουν το DNA είναι μονοφωσφορικά και ονομάζονται δεοξαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυκυτιδίνη και θυμιδίνη, ενώ αυτά που σχηματίζουν το RNA είναι επίσης μονοφωσφορικά και ονομάζονται αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη και ουριδίνη (Εικ.4). Σε όλες τις περιπτώσεις ο σχηματισμός των νουκλεοτιδίων προκύπτει από τη σύνδεση του C-1' του σακχάρου με το N-9 της πουρίνης ή το N-1 της πυριμιδίνης με N-γλυκοζιτικό δεσμό (Berg et al., 2015).

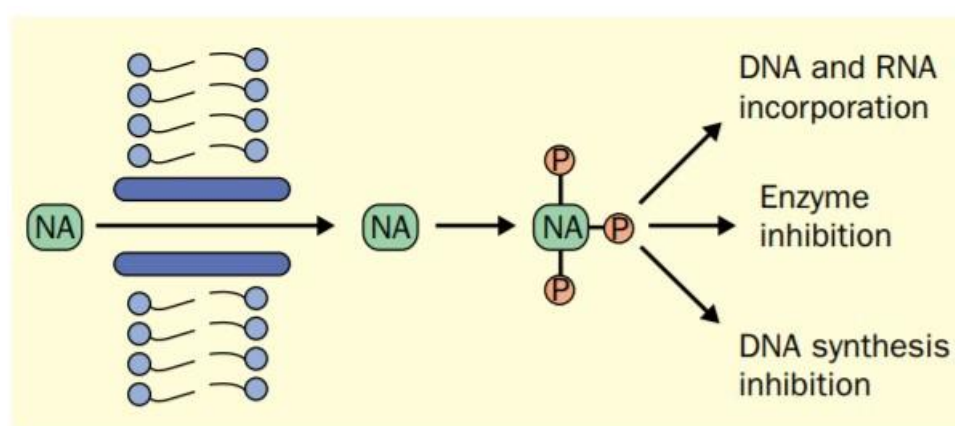


**Εικόνα 4:** Η διπλή έλικα του DNA ή RNA και τα συστατικά της. (Ni et al., 2019)

#### 1.4 Νουκλεοζιτικά ανάλογα και ο τρόπος δράσης τους

Οι νουκλεοζίτες είναι δυνατόν να τροποποιηθούν δομικά και να σχηματίσουν φαρμακολογικά ενεργά παράγωγα, τα οποία διατηρούν αρκετές από τις ιδιότητες των αρχικών ενώσεων (Pastor-Anglada et al., 1998). Τα τροποποιημένα μόρια καλούνται νουκλεοζιτικά ανάλογα και αποτελούν μια ευρεία φαρμακευτική ομάδα, η οποία περιλαμβάνει κυτταροτοξικές ενώσεις, αντιικούς παράγοντες και ανοσοκατασταλτικά μόρια (Galmarini et al., 2002). Οι ενώσεις αυτές μπορούν να θεωρηθούν προφάρμακα, καθώς για να δράσουν χρειάζεται να ενεργοποιηθούν μέσω τριπλής φωσφορυλίωσης (Piperino et al., 2006). Αρχικά, μεταφέρονται στο εσωτερικό των κυττάρων όπου και ενεργοποιούνται με τη βοήθεια κυτταρικών ενζύμων και στη συνέχεια μπορούν να επηρεάσουν τη βιοσύνθεση των νουκλεϊκών οξέων, περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων ή την αντιγραφή ιών σε μολυσμένα κύτταρα (Pastor-Anglada et al., 1998).

Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων περιλαμβάνει τρία βήματα, την λήψη, την ενεργοποίηση και την τελική φαρμακολογική δράση (Εικ.5). Στην πλειοψηφία τους τα νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι υδρόφιλα μόρια και για το πρώτο βήμα, την εισαγωγή τους στα κύτταρα, απαιτούνται ειδικοί μεταφορείς, η ύπαρξη των οποίων σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς καθορίζει τους στόχους του εκάστοτε νουκλεοζίτη. Μετά την είσοδο στο κύτταρο υφίστανται τροποποιήσεις ώστε να παραμείνουν στο εσωτερικό του κυττάρου αλλά και να μετατραπούν στην φωσφορυλιωμένη ενεργή μορφή. Μετά την ενεργοποίησή τους επηρεάζουν τη σύνθεση των DNA και RNA, αλληλεπιδρώντας με τα ένζυμα που τα συνθέτουν ή τροποποιώντας τα ένζυμα που μεταβολίζουν τους φυσιολογικούς νουκλεοζίτες (Galmarini et al., 2002).



**Εικόνα 5:** Βασικά χαρακτηριστικά του μεταβολισμού και των αλληλεπιδράσεων των νουκλεοζιτικών αναλόγων με τους στόχους τους. (Galmarini et al., 2002)

Η γνώση των δομικών ιδιοτήτων των νουκλεοζιτών αλλά και των αλληλεπιδράσεων τους οδήγησε στην παραγωγή διαφόρων δομών με βιολογική σημασία, κάποιες από τις οποίες εγκρίθηκαν αργότερα από τη Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA). Οι μελέτες από τις οποίες προέκυψαν τα παραπάνω νουκλεοζιτικά ανάλογα είχαν ως κύριο στόχο να αποσαφηνίσουν τους την αντική και αντικαρκινική δράση των μορίων αυτών (Mikhailopulo & Miroshnikov, 2010).

#### 1.4.1 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα

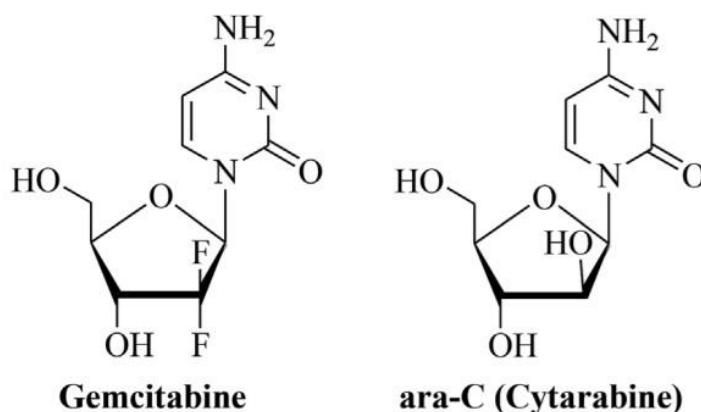
Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να πολλαπλασιάζονται ταχέως σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Έτσι, αρκετά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία του καρκίνου στοχεύουν στην αναστολή των διάφορων διεργασιών που απαιτούνται για την ταχεία αυτή ανάπτυξη (Berg et al., 2015). Έκτος από φάρμακα υπάρχουν και άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις όπως η χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεση του όγκου και

ακτινοθεραπείες με χρήση ακτίνων-X που καταστρέφουν τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα (National Cancer Institute, n.d.).

Τα αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα είναι μια ομάδα φαρμάκων με ευρεία θεραπευτική χρήση. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως οι νουκλεοζίτες αρχικά εισάγονται στο κύτταρο και τροποποιούνται με σκοπό να αποκτήσουν την κυτταροτοξική τους δράση. Γενικά, δρουν είτε αναστέλλοντας τη σύνθεση του DNA είτε αλληλεπιδρώντας άμεσα με την σύνθεση του RNA, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο χωρίς να επηρεάζουν το DNA (Szafraniec et al., 2004).

Κάποια χημειοθεραπευτικά φάρμακα για τη θεραπεία του καρκίνου είναι νουκλεοζιτικά ανάλογα τα οποία είτε είναι κυτταροτοξικές ενώσεις είτε μετατρέπουν τα καρκινικά κύτταρα σε ευαίσθητα στην ακτινοβολία αλλάζοντας τον μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων. Τα ανάλογα που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι κυρίως παράγωγα φθοροπυριμιδίων, θυμιδίνης και πουρινών.

Οι φθοροπυριμιδίνες, όπως η φθόροδεοξουριδίνη, δρουν μέσω αναστολής της θυμιδικής συνθάσης, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο σε απόπτωση. Ένα ακόμα πολλά υποσχόμενο νουκλεοζιτικό ανάλογο για τη θεραπεία του καρκίνου είναι η γεμισιταβίνη (Εικ.6), η οποία δρα μετά από την προσθήκη δύο φωσφορικών ομάδων, αναστέλλοντας την αναγωγή των δεοξυριβονουκλεοτιδίων αλλά και τερματίζοντας τη σύνθεση της αλυσίδας του DNA. Κάποια ανάλογα πουρινών, όπως η κλαδριβίνη, δρουν επίσης με παρόμοιο τρόπο δηλαδή αναστέλλοντας την αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων. Τέλος, η κυταραβίνη (ara-C) (Εικ.6) που είναι μία μη-φθοριωμένη πυριμιδίνη αποτελεί αποτελεσματικό φάρμακο για την αντιμετώπιση αιμοποιητικών κακοηθειών μέσω αλληλεπίδρασης με την DNA πολυμεράση (Pastor-Anglada et al., 1998).



**Εικόνα 6:** Δομές των αντικαρκινικών νουκλεοζιτικών αναλόγων γεμισιταβίνη και κυταραβίνη. (Biersack, 2018)

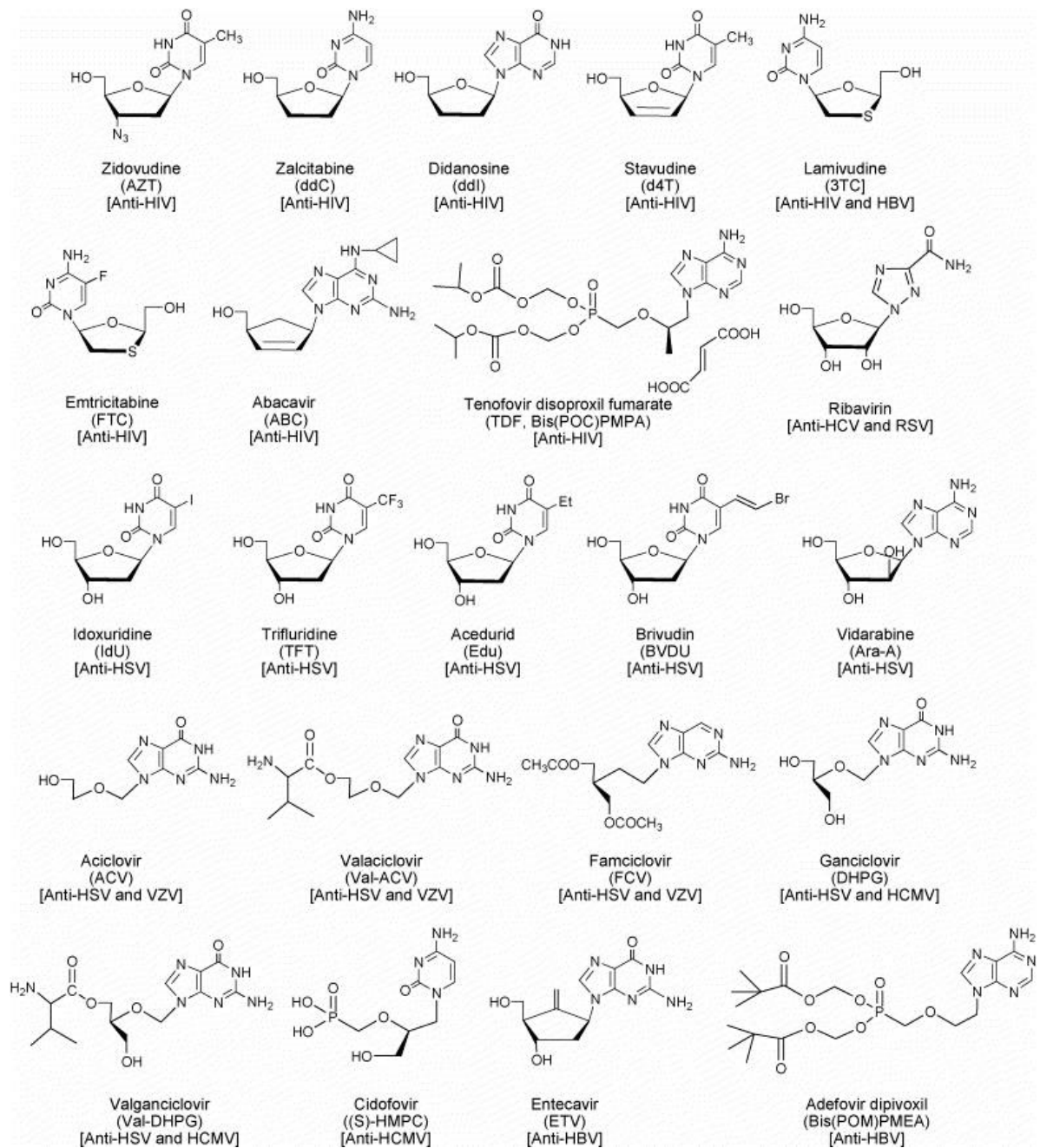
### 1.4.2 Αντικα νουκλεοζιτικά ανάλογα

Τα τελευταία χρόνια τα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν ενισχύσει το οπλοστάσιο των διαθέσιμων φαρμάκων έναντι των ιών, με αρκετά από αυτά να έχουν εγκριθεί και να χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση μιας πληθώρας ιών, όπως ο ιός του απλού έρπητα (HSV) και ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) (Εικ.7). Η δράση των φαρμάκων αυτών βασίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με τις ιικές πολυμεράσες, καθώς συμπεριφέρονται ως ανταγωνιστές των φυσικών υποστρωμάτων των ενζύμων αυτών, οδηγώντας σε αναστολή του κύκλου αντιγραφής των ιών (Mathé & Gosselin, 2006).

Η έρευνα για αντική θεραπεία τα τελευταία χρόνια επικεντρώνεται στον HIV. Σε ό,τι αφορά τα διαθέσιμα φάρμακα έναντι του HIV, αρκετά από αυτά είναι νουκλεοζιτικά ανάλογα με χαρακτηριστικά παραδείγματα τη ζιδοβουδίνη (AZT) και τη λαμβουδίνη (3TC). Ωστόσο, η χρήση των ουσιών αυτών οδήγησε στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών και στην ανάγκη για εύρεση νέων αποτελεσματικών αναλόγων έναντι αυτών. Ο στόχος όλων του νουκλεοζιτών που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του HIV είναι η αντίστροφη μεταγραφάση του ιού (De Clercq, 2002).

Εκτός από τον HIV νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται και για την αντιμετώπιση άλλων ιών με ιδιαίτερη επιτυχία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ακυκλοβίρη, ένα άκυκλο ανάλογο του φυσιολογικού νουκλεοζίτη 2'-δεοξυγουανωσίνης, που χρησιμοποιείται έναντι της οικογένειας των ερπητοϊών (HSV, VZV). Η ακυκλοβίρη εισέρχεται στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί και αφού φωσφορυλιωθεί από την κινάση της θυμιδίνης αναστέλλει την αντιγραφή του ιού αλληλεπιδρώντας με την ιική πολυμεράση (O'Brien & Campoli-Richards, 1989).

Νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται και για τη θεραπεία του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV). Η εντεκαβίρη που είναι ένα νουκλεοζιτικό ανάλογο γουανίνης χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις χρόνιων λοιμώξεων ηπατίτιδας Β. Ο συγκεκριμένος νουκλεοζίτης μπορεί να μετατραπεί γρήγορα στην ενεργή τριφωσφορική του μορφή και να αναστείλει την αντιγραφή του HBV, ανταγωνιζόμενος τα νουκλεοτίδια γουανωσίνης (Robinson et al., 2006).



**Εικόνα 7:** Νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται ως αντική θεραπεία (Mathé & Gosselin, 2006)

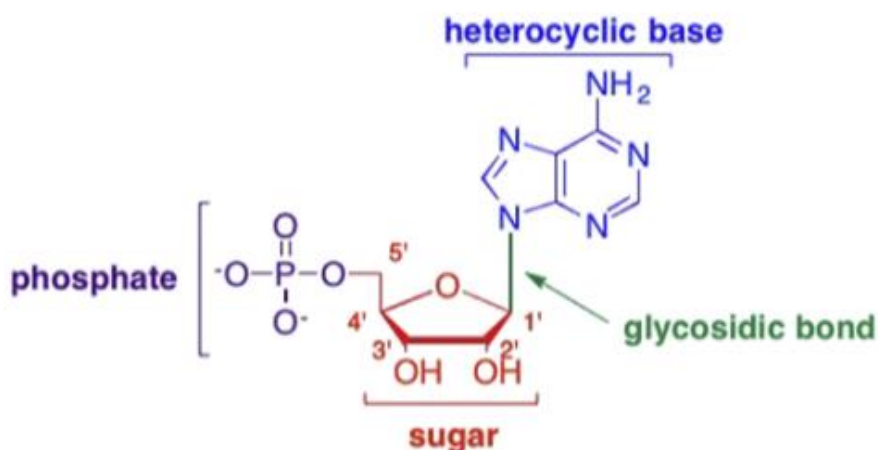
## 1.5 Τροποποιημένοι Νουκλεοζίτες

Η τροποποίηση των νουκλεοζιτών έχει βρεθεί πως αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας με στόχο την βελτίωση της δραστηρότητάς τους (Hernández-Reyes et al., 2012). Η βελτίωση αυτή στοχεύει στην προστασία τους από τους διάφορους καταβολικούς μηχανισμούς αλλά και την στοχευμένη παράδοση τους στα κύτταρα στόχους.

Η σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών μέχρι και σήμερα βασίζεται σε τρεις βασικές προσεγγίσεις, α) συγκλίνουσα σύνθεση, με χρήση κατάλληλου σακχάρου ή

παραγώγου που το μιμείται ως παράγοντα γλυκοσυλίωσης, β) χημικός μετασχηματισμός φυσικών νουκλεοζιτών και γ) συνδυασμός των παραπάνω (Mikhailopulo & Miroshnikov, 2010).

Οι νουκλεοζίτες μπορούν να τροποποιηθούν στη φωσφορική ομάδα, την αζωτούχα βάση ή το σάκχαρο (Εικ.8), με τις πιο γνωστές δραστικές ουσίες να ανήκουν στις δύο τελευταίες κατηγορίες. Νουκλεοζίτες τροποποιημένοι στο σάκχαρο παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως αναστολείς ενζύμων και πρόδρομα για τη σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοτιδίων τόσο έναντι του καρκίνου όσο και έναντι ιών (Ichikawa & Kato, 2001). Τροποποιήσεις στη βάση των νουκλεοζιτών επηρεάζουν την αναγνώριση τους από τα ένζυμα και κατ' επέκταση την βιολογική τους δράση. Η τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνουν προσθήκες υποκαταστατών στη βάση, προσθήκη ή αφαίρεση ατόμων στο δακτύλιο ή ακόμα και αλλαγή θέσεις των ατόμων (Seley-Radtke & Yates, 2018).



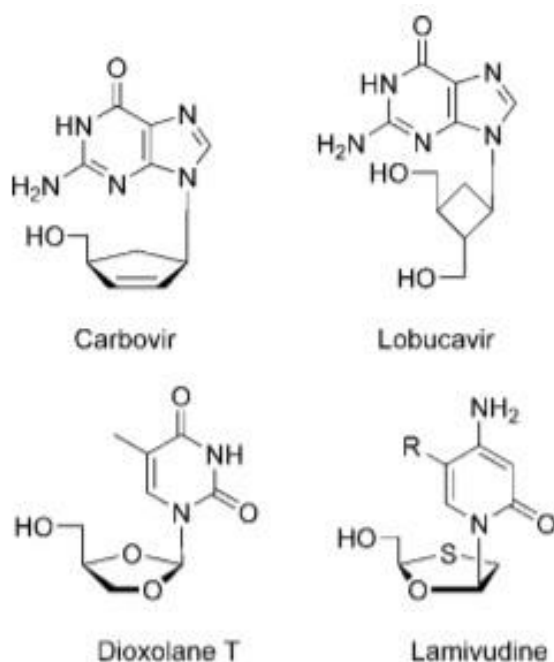
**Εικόνα 8:** Σημεία για πιθανές τροποποιήσεις νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων κατά τον σχεδιασμό φαρμάκων. (Seley-Radtke & Yates, 2018)

## 1.6 Φουρανονουκλεοζίτες

Πολλές είναι οι τροποποιήσεις που έχουν δοκιμαστεί κατά καιρούς και έχουν οδηγήσει στην δημιουργία φαρμακολογικά σημαντικών ενώσεων. Οι τροποποιήσεις των υποκαταστατών του δακτυλίου της φουρανόζης έχουν μελετηθεί εκτενώς (Romeo et al., 2010) και τροποποιημένοι φουρανονουκλεοζίτες χρησιμοποιούνται σήμερα ευρέως για την αντιμετώπιση ιικών μολύνσεων αλλά και κάποιων τύπων καρκίνου. Παραδείγματα φουρανονουκλεοζιτών που χρησιμοποιούνται αποτελούν κάποιοι 2',3'-διδεοξυνουκλεοζίτες, όπως οι AZT, ddI, ddC και d4T (Εικ.7) που έχουν εγκριθεί για την θεραπεία του AIDS (Piperno et al., 2006).

Ωστόσο, η χρήση φουρανονουκλεοζιτών έχει και κάποια μειονεκτήματα τα οποία γίνονται προσπάθειες να βελτιωθούν με περαιτέρω τροποποιήσεις. Τα μειονεκτήματα αυτά είναι η χημική αστάθεια και η τοξικότητα αλλά και η χαμηλή

αποτελεσματικότητα των κυτταρικών κινασών να τα φωσφορυλιώσουν (Piperino et al., 2006; Romeo et al., 2010). Τροποποιήσεις στον πενταμελή δακτύλιο για την αντιμετώπιση των μειονεκτημάτων αυτών οδήγησαν σε καινοτόμα νουκλεοζιτικά ανάλογα όπως η λαμβιβουδίνη και η καρβοβίρη (Εικ.9) (Romeo et al., 2010). Επιπλέον, η σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών που περιέχουν μια φωσφονική ομάδα έχει προταθεί ως λύση για την αντιμετώπιση των μειονεκτημάτων. Η προσέγγιση αυτή έχει ήδη εφαρμοστεί στην περίπτωση της AZT (Piperino et al., 2006).

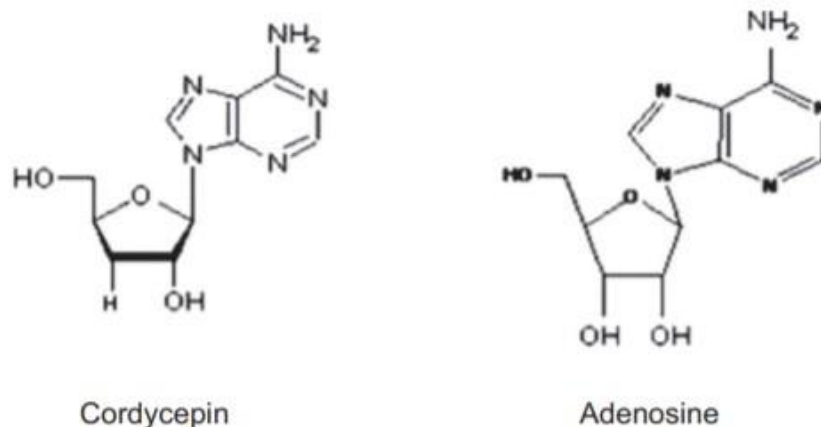


**Εικόνα 9:** Καινοτόμα νουκλεοζιτικά ανάλογα με τροποποιήσεις στον πενταμελή δακτύλιο της φουρανόζης (Romeo et al., 2010)

### 1.7 3'-δεοξυνουκλεοζίτες

Το 1964, μια ένωση που είχε απομονωθεί από τον μύκητα *Cordyceps militaris* και ονομαζόταν κορντισεπίνη (Εικ.10) ταυτοποιήθηκε χημικά ως 3'-δέοξαδενοσίνη (Kaczka et al., 1964). Η συγκεκριμένη ένωση είχε την ικανότητα να αναστέλλει την αύξηση των κυττάρων KB, μια σειρά καρκινικών κυττάρων, πιθανώς αναστέλλοντας τη σύνθεση του RNA. Υπό το πρίσμα αυτό έγιναν προσπάθειες για σύνθεση 3'-δεοξυνουκλεοζιτών για έλεγχο της βιολογικής τους δράσης (Walton et al., 1964; 1965; Jenkins et al. 1965).





**Εικόνα 10:** Σύγκριση των δομών της κορντισεπίνης και της αδενοσίνης. (Jin et al., 2018)

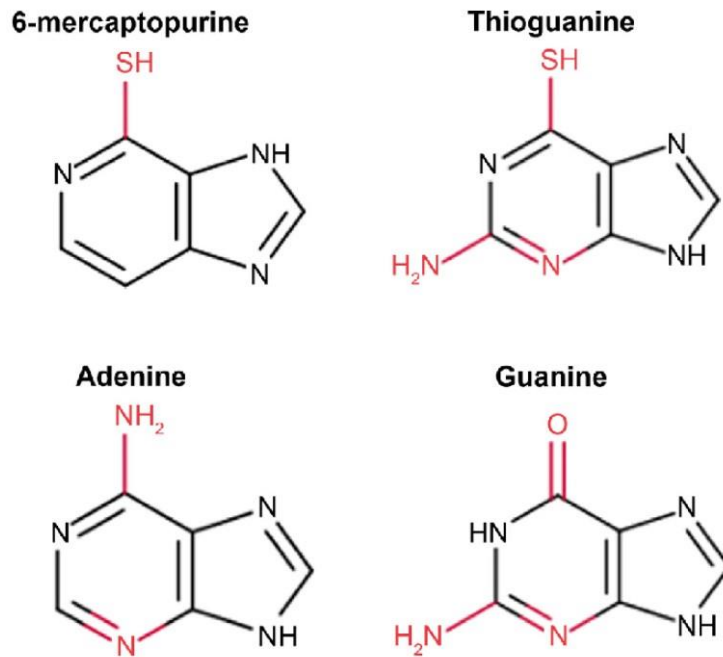
Γενικά, καθώς η 2' θέση των τριφωσφορικών νουκλεοζιτών βοηθάει στην αναγνώριση τους από την RNA πολυμεράση, πιστεύεται ότι οι 3'-δέοξυνουκλεοζίτες που διατηρούν την 2' υδροξυλομάδα είναι πιθανό να δρουν ως αναστολείς της σύνθεσης του RNA δρώντας ως τερματιστές (Hollecker et al., 2004). Έχει βρεθεί ότι οι 3'-δέοξυνουκλεοζίτες μπορούν να δράσουν ως αναστολής της αντιγραφής του ιού της ηπατίτιδας C (HCV) με τους νουκλεοζίτες της γουανίνης και της κυτοσίνης να παρουσιάζουν τα καλύτερα ανασταλτικά αποτελέσματα (Lai et al., 2003).

Μεταγενέστερα, συντέθηκαν και δοκιμάστηκαν και 2',3'-διδέοξυνουκλεοζίτες όπως οι AZT και ddI, που αναφέρθηκαν και προηγουμένως.

## 1.8 Γουανίνη και νουκλεοζιτικά ανάλογα γουανίνης

Η γουανίνη αποτελεί μία από τις τέσσερις ετεροκυκλικές βάσεις που συναντώνται στα νουκλεϊκά οξέα και μαζί με την αδενίνη συνιστούν τις λεγόμενες πουρίνες (Wade, 2006). Οι πουρίνες που απαιτούνται για τις λειτουργίες του οργανισμού μπορούν να προκύψουν μέσω ανακύκλωσης των νουκλεοζιτών, μέσω της διατροφής ή και να συντεθούν de novo (Berg et al., 2008).

Τη δεκαετία του '50 βρέθηκε πως η υποκαταστημένη με θείο στη θέση 6 γουανίνη οδηγεί σε αναστολή της σύνθεσης των πουρινών με αποτέλεσμα την ανάσχεση της αύξησης του βακτηρίου *Lactobacillus casei*. Επιπλέον, βρέθηκε πως η 6-μερκαπτοπουρίνη και η 6-θειογουανίνη (Εικ.11) έχουν και πιθανή αντικαρκινική δράση, με την 6-μερκαπτοπουρίνη μάλιστα να εγκρίνεται από τον FDA και να χρησιμοποιείται για την θεραπεία της οξείας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας. Η 6-θειογουανίνη χρησιμοποιείται για την θεραπεία της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, ενώ και οι δύο ενώσεις χρησιμοποιούνται επίσης σε περιπτώσεις αυτοάνοσων νοσημάτων αλλά και για την αποφυγή απόρριψης μοσχευμάτων (Shelton et al., 2016).

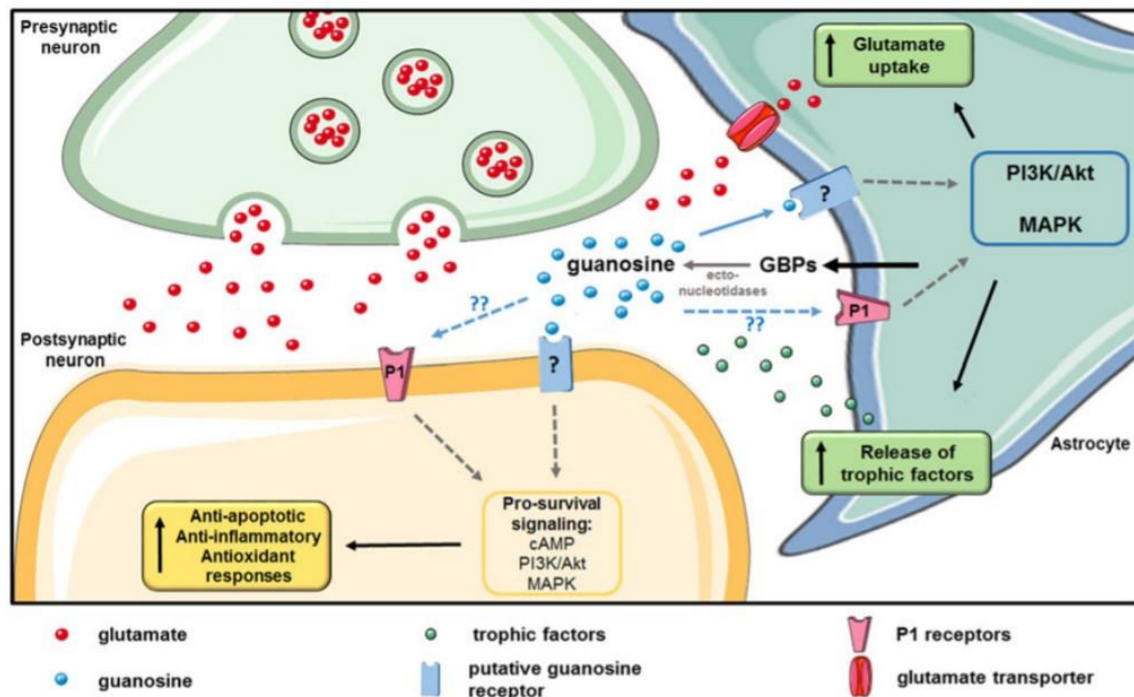


**Εικόνα 11:** Δομές της 6-μερκαπτοπουρίνης και θειογουανίνης σε σύγκριση με την αδενίνη και τη γουανίνη. Οι βασικές διαφορές μεταξύ των μορίων εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα. (Rudin et al., 2017)

Σε πιο πρόσφατες μελέτες έχει προταθεί πως οι νουκλεοζίτες της γουανίνης μπορούν να δράσουν θεραπευτικά έναντι κάποιων νευρολογικών παθήσεων τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Αυτό μπορεί να αποδοθεί τόσο στην ενδοκυτταρική όσο και στην εξωκυτταρική τους δράση. Συγκεκριμένα, μέσω σύνδεσης με κάποιους GPCR (G-protein-coupled receptors) έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν τις διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις που σχετίζονται με ορμόνες και νευροδιαβιβαστές.

Σε ό,τι αφορά την εξωκυτταρική τους δράση πιστεύεται ότι η τριφωσφορική γουανοσίνη (GTP) μπορεί να αποθηκεύεται σε συναπτικά κυστίδια και να απελευθερώνεται στη συναπτική σχισμή όπου τα νουκλεοτίδια γουανίνης μετατρέπονται σε νουκλεοζίτες. Η συγκέντρωση της στη συναπτική σχισμή έχει βρεθεί να είναι υψηλή μετά από εγκεφαλικά επεισόδια υποδεικνύοντας κάποια νευροπροστατευτική δράση. Πιθανολογείται ότι η δράση της μεσολαβείται από κάποιον GPCR χωρίς να είναι γνωστές οι ακριβείς αλληλεπιδράσεις. Ταυτόχρονα, όσο βρίσκεται στη σχισμή μπορεί και διεγείρει την λήψη γλουταμινικού από τα αστροκύτταρα και την απελευθέρωση από αυτά τροφικών παραγόντων προκαλώντας αντιαποπτωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές αποκρίσεις (Εικ.12).

Σημαντικό πλεονέκτημα στην περίπτωση χρήσης νουκλεοζιτών γουανίνης για θεραπευτικούς σκοπούς σε νευρολογικές παθήσεις είναι το γεγονός ότι έχουν την δυνατότητα να φτάνουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) μέσω συστημικής και στοματικής χορήγησης προκαλώντας ελάχιστες παρενέργειες και χαμηλή τοξικότητα (Bettio et al., 2016).



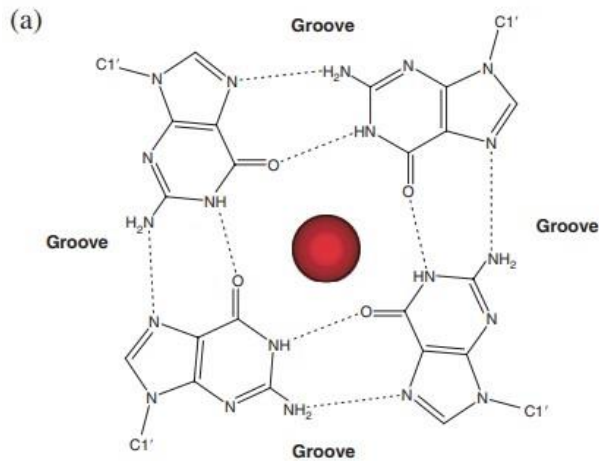
**Εικόνα 12:** Εξωκυτταρικός μηχανισμός δράσης της γουανωσίνης στον εγκέφαλο που οδηγεί στην νευροπροστατευτική της δράση. (Bettio et al., 2016)

## 1.9 Βιολογική δράση της 8-βρωμογουανωσίνης

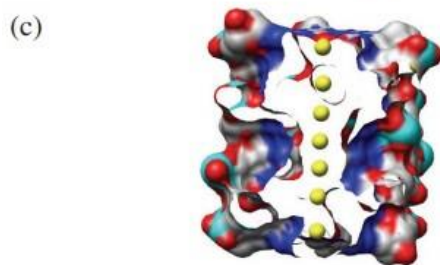
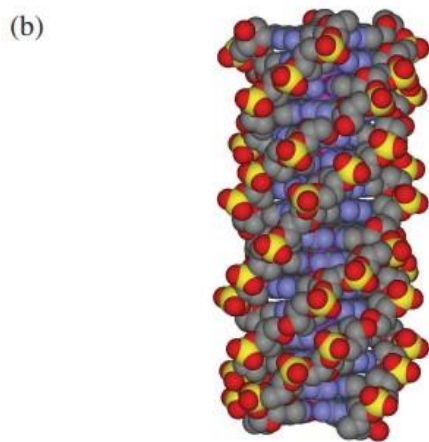
Πλούσια σε γουανίνη ολιγονουκλεοτίδια στο DNA ή στο RNA σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές γνωστές ως G-quadruplexes με ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες. Οι δομές αυτές είναι δυνατό να σχηματιστούν είτε εντός ενός κλώνου νουκλεϊκού οξέος και τότε καλούνται ενδομοριακές είτε μεταξύ πολλαπλών κλώνων και τότε καλούνται διαμοριακές (Bochman et al., 2012; Aviñó et al., 2017).

Οι δομές αυτές αποτελούνται από τετράδες γουανίνης (G-tetrads). Συγκεκριμένα, τέσσερα μόρια γουανίνης σχηματίζουν μια τετράγωνη επίπεδη διάταξη στην οποία κάθε γουανίνη συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με τις γειτονικές της (Εικ.13a). Τουλάχιστον δύο τέτοιες τετράδες που στιβάζονται καθώς και οι ενδιάμεσες αυτών ακολουθίες σχηματίζουν τις δομές G-quadruplexes (Εικ.13c), οι οποίες έχουν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες.

Οι δευτεροταγείς αυτές δομές εντοπίστηκαν αρχικά στα τελομερή, ενώ αργότερα βρέθηκε ότι υπάρχουν και σε μη τελομερικές αλληλουχίες, όπως περιοχές εκκινήτων υπερευαίσθητες σε νουκλεάσες αλλά και σε ογκογονίδια. Επιπλέον, δομές quadruplex περιλαμβάνονται σε απταμερή που δρουν ως αναστολείς μεταγωγής σήματος ή και αναστολείς μεταγραφής σε καρκινικά κύτταρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το απταμερές σύνδεσης της θρομβίνης (TBA), το οποίο παρουσιάζει αντιπηκτικές ιδιότητες *in vitro* (Burge et al., 2006; Aviñó et al., 2017).



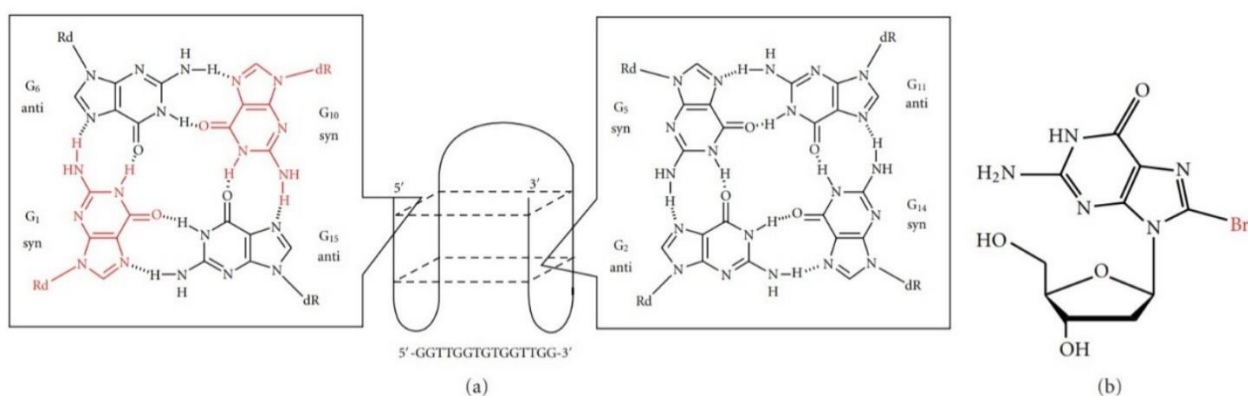
**Εικόνα 13:** (a) Η διάταξη των βάσεων γουανίνης στο τετραμερές. (b) Το συνθετικό πολυνουκλεοτίδιο poly(dG) που σχηματίζει τετραπλή δεξιόστροφη έλικα. (c) Επιφανειακή αναπαράσταση μιας δομής quadraplex που αποτελείται από 8 τετράδες γουανίνης. (Burge et al., 2006)



Η χημική τροποποίηση των νουκλεϊκών οξέων αποτελεί μια ιδιαίτερα χρήσιμη προσέγγιση για την βελτίωση της σταθερότητας των δευτεροταγών δομών (Goji & Matsui, 2011). Τέτοιου είδους τροποποιήσεις έχουν γίνει και στο TBA με σκοπό την βελτίωση της θερμικής του σταθερότητας, της αντοχής του έναντι νουκλεασών καθώς και της συγγένειας του για τη θρομβίνη. Συγκεκριμένα, έχουν δημιουργηθεί διάφορες παραλλαγές του TBA με τροποποίηση με 8-βρώμοδεοξυγουανωσίνη (8-Br-dG). Η χρήση του νουκλεοτιδίου αυτού σταθεροποιεί την διαμόρφωση συν του γλυκοζιτικού δεσμού μέσω στερεοχημικής παρεμπόδισης μεταξύ του βρωμίου και του τμήματος της ριβόζης, σταθεροποιώντας τη δομή quadraplex και οδηγώντας έτσι σε αύξηση της συγγένειας για την θρομβίνη (Aviñó et al., 2017).

Δοκιμάστηκαν επίσης τροποποιήσεις του TBA με δύο κατάλοιπα 8-Br-dG. Στην περίπτωση όπου τα δύο αυτά κατάλοιπα ήταν συνεχόμενα μέσα στην αλληλουχία προέκυπτε ένα μόριο πιο σταθερό σε σύγκριση με το μη τροποποιημένο, ενώ στην περίπτωση όπου τα κατάλοιπα δεν ήταν συνεχόμενα τότε το αποτέλεσμα ήταν μείωση της θερμοδυναμικής σταθερότητας (Petraccone et al., 2007). Τέλος, σε μία ακόμα μελέτη όπου τροποποιήθηκαν με 8-Br-dG οι θέσεις 1 και 10 του TBA, που έχουν διαμόρφωση συν (Εικ.14), βρέθηκε πως η δομή σταθεροποιείται καθώς παρατηρείται αύξηση κατά 15,8°C του σημείου τήξης, ενώ και η συγγένεια για την θρομβίνη αυξάνεται καθώς η σταθερά σύνδεσης αυξάνει κατά 12,5 φορές (Goji & Matsui, 2011).

Συνολικά, η προσθήκη βρωμίου φαίνεται να οδηγεί σε σταθεροποίηση των δευτεροταγών δομών G-quadruplexes, αποτελώντας μια υποσχόμενη τροποποίηση στην έρευνα γύρω από θεραπευτικούς στόχους που αφορούν τις δομές αυτές αλλά και τα απταμερή που της περιέχουν.



**Εικόνα 14:** Δομή (a) του G-quadruplex του απταμερούς δέσμευσης της θρομβίνης και (b) της 8-βρώμοδεοξυγουανοσίνης. Οι θέσεις τροποποίησης, G1 και G10, φαίνονται με κόκκινο χρώμα (Goji & Matsui, 2011).

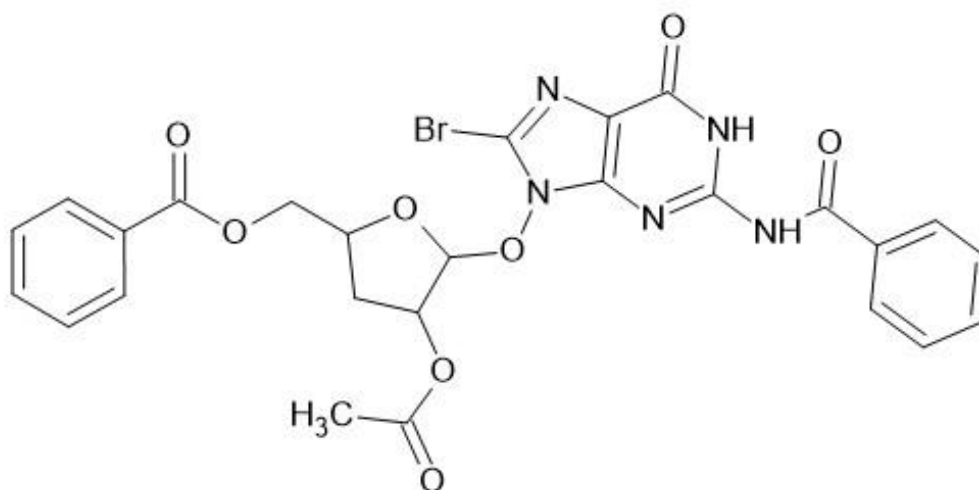
## 2. Ειδικό Μέρος

### 2.1 Σκοπός

Η έρευνα για νέους θεραπευτικούς παράγοντες έχει ως στόχο την αυξημένη βιολογική δράση των παραγόμενων ενώσεων σε συνδυασμό με τη μειωμένη τοξικότητα αλλά και με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες. Μεταξύ των υποσχόμενων υποψήφιων φαρμάκων με αντική, αντικαρκινική και αντιβακτηριδιακή δράση, τα συνθετικά ανάλογα νουκλεοζιτών με τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ελκυστικά.

Μέχρι σήμερα αρκετά μεγάλος αριθμός νουκλεοζιτικών αναλόγων υποκατεστημένων στην βάση εμφανίζουν αντικαρκινική και αντική δράση, με κάποια εξ αυτών να έχουν εγκριθεί από τον FDA και να χρησιμοποιούνται στην ιατρική. Συγκεκριμένα, ανάλογα νουκλεοζιτών γουανίνης, όπως η 6-θειογουανίνη και η ακυκλοβίρη, εμφανίζουν τόσο αντικαρκινική όσο και αντική δράση, ενώ την ίδια στιγμή η πιθανή νευροπροστατευτική ικανότητά τους, οξύνει το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων τροποποιημένων νουκλεοζιτικών αναλόγων γουανίνης.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, καθώς και τις ιδιότητες που μπορεί να προσφέρει στα νεοσυντιθέμενα μόρια η προσθήκη βρωμίου στη θέση 8, στόχος της παρούσας μελέτης είναι η σύνθεση νέων φουρανονουκλεοζιτών της γουανίνης υποκατεστημένων στην θέση 8 ως εν δυνάμει αντικά και αντικαρκινικά φάρμακα, και συγκεκριμένα η σύνθεση του 3'-δέοξυ νουκλεοζίτη της 8-βρώμο-2-βενζοΐλο-γουανίνης, η δομή του οποίου φαίνεται στην Εικόνα 15.

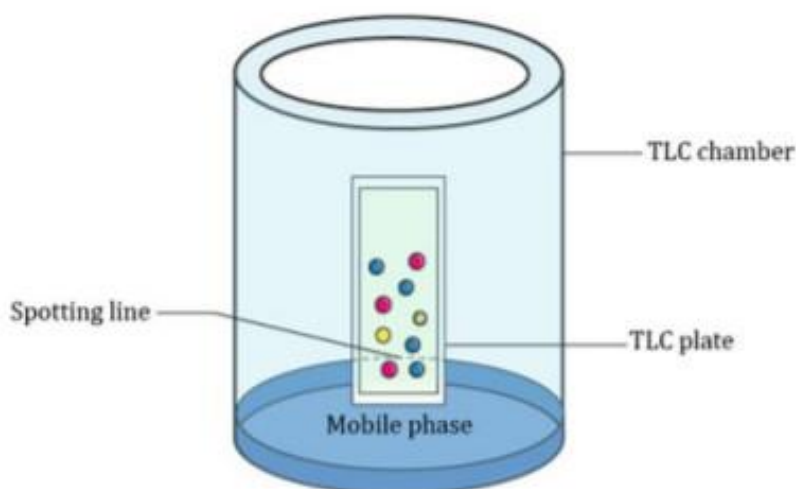


**Εικόνα 15:** Δομή του τροποποιημένου στη βάση και στο σάκχαρο φουρανονουκλεοζίτη

### 3. Γενική Μεθοδολογία

#### 3.1 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)

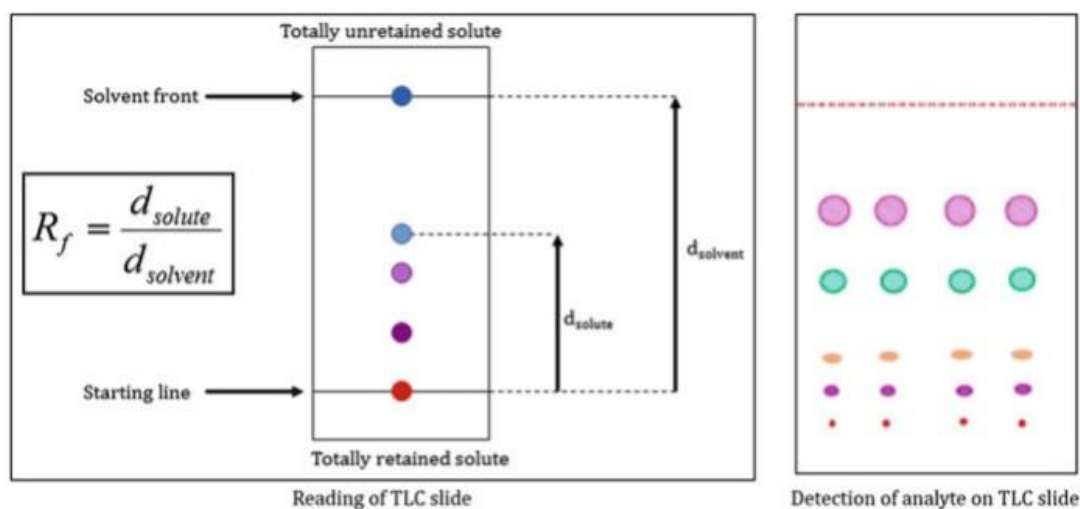
Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με χρήση της χρωματογραφικής μεθόδου TLC. Πρόκειται για μια χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των συστατικών που υπάρχουν σε ένα μείγμα με τη χρήση μίας λεπτής σταθερής φάσης. Ο διαχωρισμός των συστατικών του μείγματος εξαρτάται από τον ανταγωνισμό μεταξύ της προσρόφησης των διαλυμένων ουσιών στην στατική φάση και της εκρόφησής τους από τον διαλύτη ή το μείγμα διαλυτών που απαιτείται για να ξεπλυθεί από αυτή. Για τη δημιουργία και την διατήρηση κατάλληλου περιβάλλοντος για την TLC χρησιμοποιείται ένας θάλαμος ανάπτυξης. Το προσροφητικό υλικό που χρησιμοποιείται εναποτίθεται ως λεπτό στρώμα επάνω σε ένα κατάλληλο στήριγμα δημιουργώντας πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieseil 60F254) πάχους 0.2 mm. Η κινητή φάση στην μέθοδο αυτή τοποθετείται στον θάλαμο ανάπτυξης με τέτοιο τρόπο ώστε ο πυθμένας να καλύπτεται σε ύψος τουλάχιστον 1 mm από την κινητή φάση (Εικ.16).



**Εικόνα 16:** Σχηματική αναπαράσταση του θαλάμου ανάπτυξης της TLC. (Akash & Rehman, 2020)

Η ανίχνευση των συστατικών του διαλύματος πάνω στην πλάκα μετά το πέρας της διαδικασίας μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους (Εικ.17). Εάν οι ενώσεις είναι έγχρωμες τότε η ανίχνευση τους είναι εύκολη οπτικά. Στην περίπτωση που ενώσεις είναι άχρωμες τότε για την ανίχνευση χρησιμοποιούνται δύο ειδών τεχνικές καταστρεπτικές και μη καταστρεπτικές (Akash & Rehman, 2020). Στην παρούσα εργασία για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε τόσο μία καταστρεπτική τεχνική ο

ψεκασμός με διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (θειϊκού οξέος) 30%, όσο και μια μη καταστρεπτική η ανίχνευση με UV ακτινοβολίας (254nm).



**Εικόνα 17:** Σχηματική αναπαράσταση της ερμηνείας μιας πλάκας TLC και του τρόπου ανίχνευσης του αναλύτη. (Akash & Rehman, 2020)

### 3.2 Χρωματογραφία Στήλης

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό των επιθυμητών ενώσεων από τα μείγματα των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χρωματογραφίας στήλης με την εισαγωγή αέρα υπό πίεση (flash chromatography) σε στήλη που πληρώθηκε με silica gel (240-400 mesh, Merck grade).

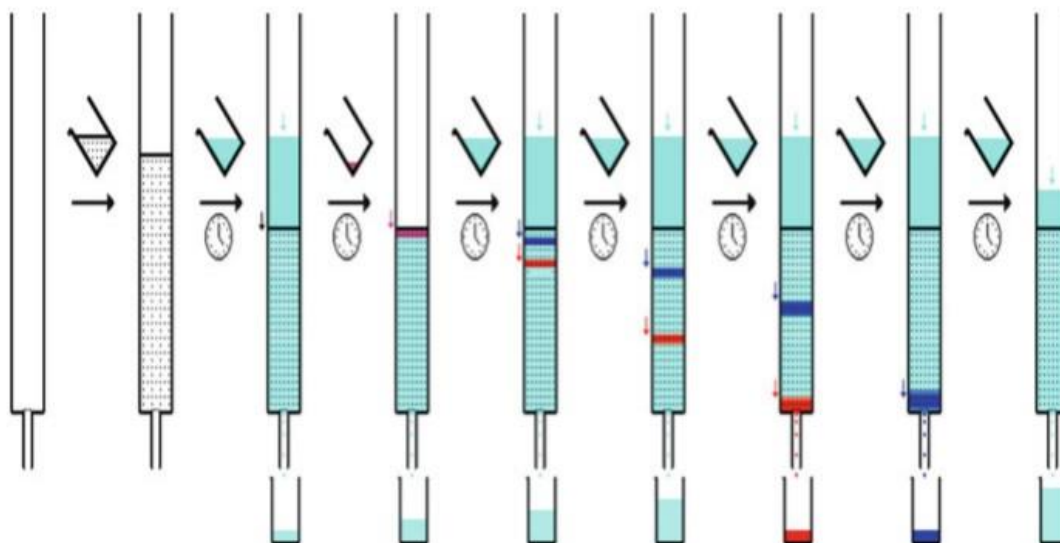
Το προς διαχωρισμό μείγμα διαλύεται πρώτα σε κάποιο διαλύτη ή σύστημα διαλυτών (κινητή φάση) και στη συνέχεια εισάγεται από την κορυφή της στήλης. Τα συστατικά που υπάρχουν στο μείγμα κινούνται με διαφορετικούς ρυθμούς ανάλογα με τη σχετική τους συγγένεια προς τη στατική φάση. Τα συστατικά που έχουν χαμηλότερο ρυθμό προσρόφησης και μικρότερη συγγένεια με τη στατική φάση κινούνται γρηγορότερα και είναι αυτά που εκκλύονται πρώτα, ενώ εκείνα που προσροφούνται περισσότερο και έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με τη στατική φάση κινούνται πιο αργά και εκκλύονται αργότερα.

Στη διαδικασία αυτή συμμετέχει η στατική και η κινητή φάση. Η στατική φάση στη χρωματογραφία στήλης είναι στερεή και πρέπει να έχει καλή προσροφητική ικανότητα. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στατικές φάσεις είναι η silica, το φωσφορικό ασβέστιο ή για λιγότερο πολικά μόρια η alumina. Η κινητή φάση είναι υγρή τόσο ως διαλύτης αλλά και ως παράγοντας ανάπτυξης, που διαχωρίζει τις ενώσεις, και παράγοντας έκλουσης.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: η στήλη πακετάρεται, το δείγμα διαλύεται σε ελάχιστη ποσότητα κινητής φάσης και εισάγεται στη στήλη και η κινητή φάση



ξεπλένεται μέσω της στήλης. Έτσι, επιτυγχάνεται διαχωρισμός των ουσιών που υπάρχουν στο προς διαχωρισμό μείγμα (Εικ.18) (Akash & Rehman, 2020).



**Εικόνα 18:** Σχηματική αναπαράσταση της χρωματογραφίας στήλης. (Akash & Rehman, 2020)

### 3.3 Ξήρανση Διαλυτών

Καθώς ορισμένες αντιδράσεις εμφανίζουν ευαισθησία στο νερό, καθίσταται απαραίτητη η χρήση άνυδρων διαλυτών, όπως ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο και τολουόλιο. Για το λόγο αυτό προηγείται της αντίδρασης η ξήρανση των εν λόγω διαλυτών.

Η ξήρανση του ακετονιτρίλιου και του τολουολίου πραγματοποιείται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και τελικά το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα  $3\text{\AA}$  (molecular sieves). Σε ό,τι αφορά το διχλωρομεθάνιο αποστάζεται με τη χρήση πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη που περιέχει μοριακά κόσκινα  $4\text{\AA}$ .

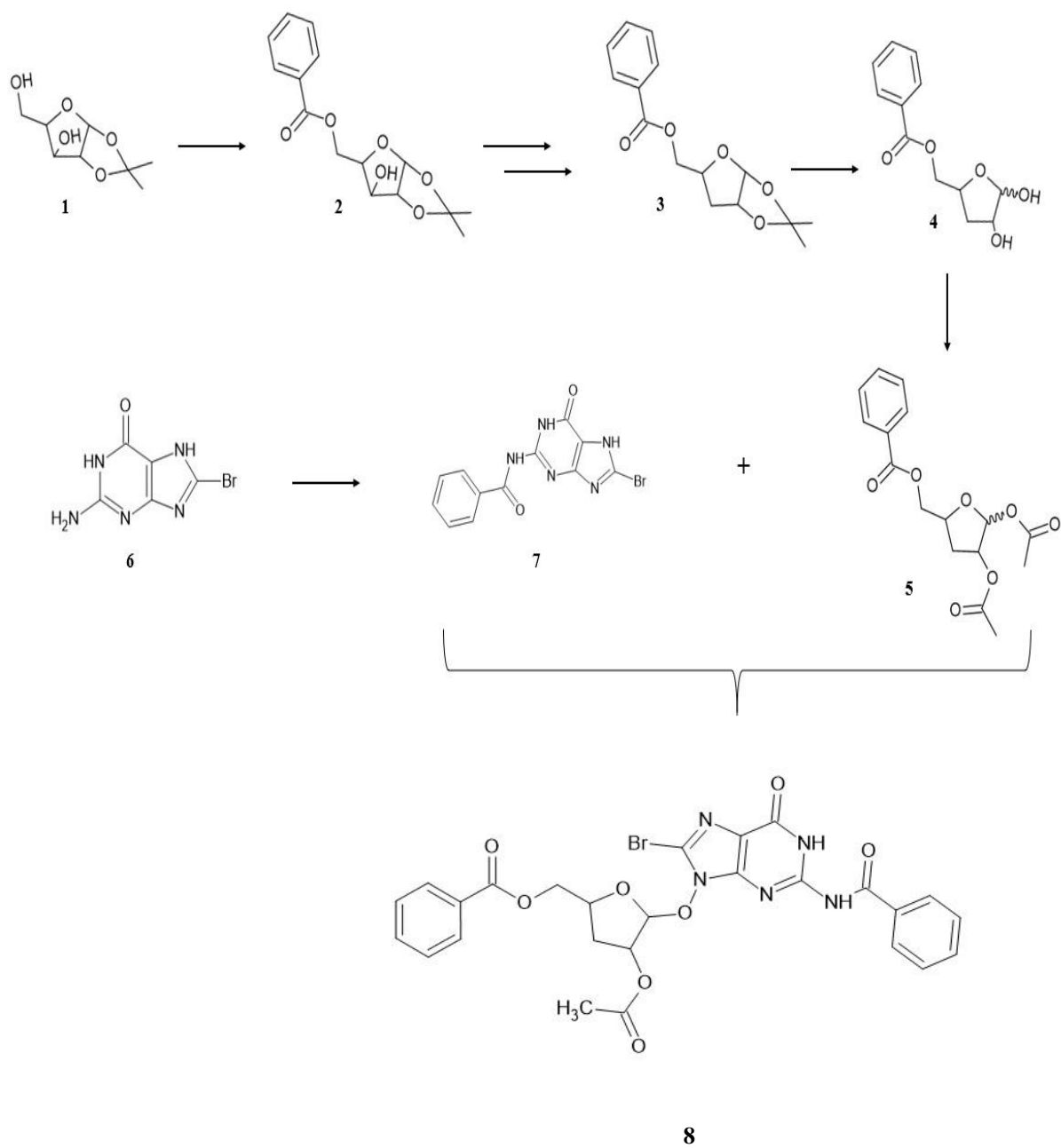
### 3.4 Ταυτοποίηση Οργανικών Ενώσεων

Η ταυτοποίηση των νεοσυντηθέμενων οργανικών ενώσεων έγινε μέσω φάσματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Πρόκειται για την πιο ισχυρό διαθέσιμο εργαλείο για τον προσδιορισμό της δομής οργανικών ενώσεων το οποίο μπορεί να χρησιμοποιεί μόνο ένα πολύ μικρό δείγμα χωρίς να το καταστρέφει (Wade, 2006).

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (NuclearMagneticResonance). Τα φάσματα  $^1\text{H}$ -NMR καταγράφηκαν στα 500MHz σε φασματόμετρο Bruker Avance DRX 500 MHz, χρησιμοποιώντας ως δευτεριωμένους διαλύτες χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ) και μεθανόλη ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Οι χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ , ppm) υπολογίστηκαν με τη χρήση τριμέθυλοσιλανίου (TMS) ως σημείο αναφοράς για  $^1\text{H}$ .

## 4. Πειραματικό Μέρος

### 4.1 Επισκόπηση Συνθετικής Οδού



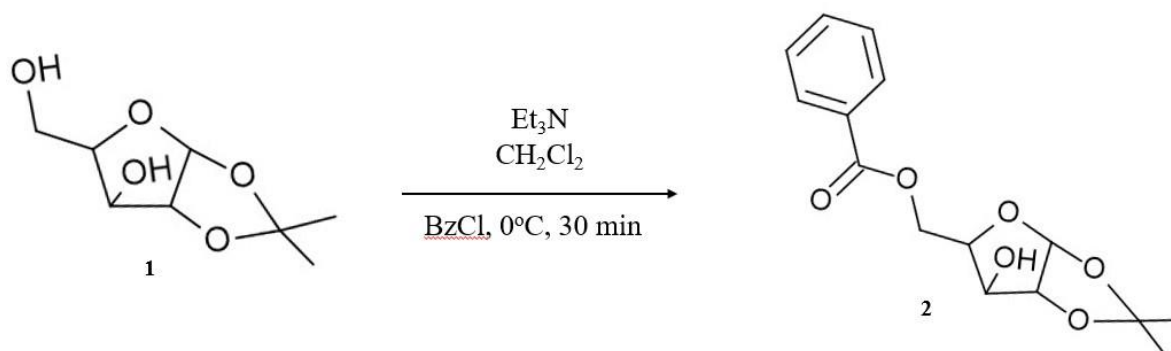
## 4.2 Μεθοδολογία Σύνθεσης

Η πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας είναι η εμπορικά διαθέσιμη ένωση 1,2-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-ξυλοφουρανόζη (1), η οποία βενζοϋλιώνεται στο πρωτοταγές υδροξύλιο (2) με τη χρήση βενζόυλο χλωριδίου. Η ένωση που προκύπτει αντιδρά με O-φαίνυλ-γλωρο-θειοφορμικό για τον σχηματισμό ενός ενδιάμεσου εστέρα. Στη συνέχεια η εστερική ομάδα αντικαθίσταται από υδρογόνο με την προσθήκη αζωδισοβουτυρονιτριλίου (AIBN) και υδριδίου του τριβουτυλοκασίτερου (HSnBu<sub>3</sub>) για να σχηματιστεί το επιθυμητό 3-δεοξυ παράγωγο (3). Το τελευταίο υπόκειται όξινη υδρόλυση με τη χρήση οξικού οξέος (4) και τέλος λαμβάνει χώρα ακετυλίωση στις θέσεις 1 και 2 με την προσθήκη οξικού ανυδρίτη (5).

Παράλληλα, η εμπορικά διαθέσιμο 8-βρώμο-γουανίνη (6) βενζοϋλιώνεται στη θέση 2 (7) με τη χρήση βενζόυλο χλωριδίου.

Οι ενώσεις 5 και 7 αντιδρούν παρουσία τετραχλωριούχου κασίτερου για να σχηματίσουν τον τελικό τροποποιημένο νουκλεοζίτη (8).

### 4.2.1 Σύνθεση της 5-βενζοϋλο-1,2-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-ξυλοφουρανόζης



**Εικόνα 19:** Σύνθεση της 5-βενζοϋλο-1,2-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-ξυλοφουρανόζης από 1,2-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-ξυλοφουρανόζη την

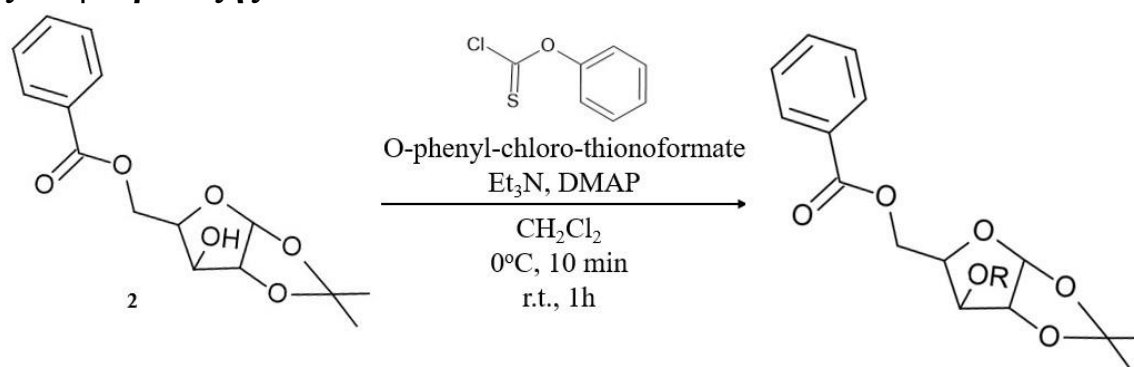
Η σύνθεση της 5-βενζοϋλο-1,2-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-ξυλοφουρανόζης (2) [Mr 294,11] πραγματοποιείται με την βενζοϋλίωση της εμπορικά διαθέσιμης 1,2-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-ξυλοφουρανόζης (1) [Mr 190,4]. Η βενζοϋλίωση γίνεται με τη χρήση βενζοϋλοχλωριδίου (BzCl) [1,2 eq]. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε διαλύτη διχλωρομεθάνιο (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), όπου αρχικά διαλύεται η πρώτη ύλη και στη συνέχεια προστίθεται τριαιθυλαμίνη (Et<sub>3</sub>N) [3 eq]. Η αντίδραση τοποθετείται σε παγόλουτρο (0°C) και ακολουθεί η προσθήκη του BzCl στάγδην. Η αντίδραση ολοκληρώνεται έπειτα από 30 min και ο έλεγχος αυτού γίνεται με TLC σε σύστημα διαλυτών 7 Hexane/3AcOEt. Στο μείγμα της αντίδρασης προστίθεται απιονισμένο νερό και ακολουθεί εκχύλιση με NaHCO<sub>3</sub> και CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Μετά την εκχύλιση η οργανική φάση

συλλέγεται και εξατμίζεται υπό κενό σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται και απομονώνεται με την μέθοδο της χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών 7 Hexane/3AcOEt. Το καθαρό προϊόν συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη και εξατμίζεται μέχρι ξηρού.

**Πίνακας 1:** Σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στις χρωματογραφικές τεχνικές με τα αντίστοιχα Rf και απόδοση της αντίδρασης

Σύστημα Διαλυτών TLC 7 Hexane/3 AcOEt	Rf = 0,3
Σύστημα Διαλυτών Στήλης 7 Hexane/3 AcOEt	Rf = 0,3
Απόδοση αντίδρασης (α)	77%

#### 4.2.2 Σύνθεση της 5-βενζοϋλο-3-δεοξυ-1,2-O-ισοπροπυλιδενο-α-D-ξυλοφουρανόζης

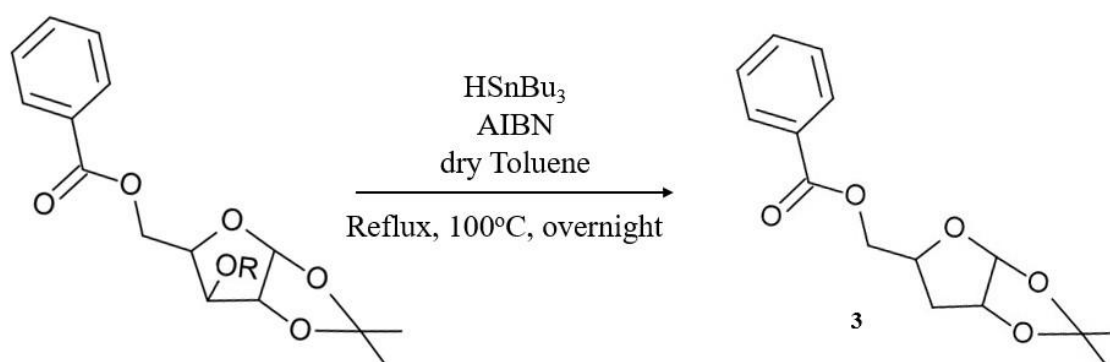


**Εικόνα 20:** Σύνθεση του ενδιάμεσου εστερικού προϊόντος για τον σχηματισμό του 3-δέοξυ σακχάρου ( $R = C(S)OC_6H_5$ )

Το δεύτερο στάδιο της συνθετικής πορείας αφορά την σύνθεση του 3-δέοξυ σακχάρου από το προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης (2) μέσω του σχηματισμού ενός εστερικού ενδιάμεσου. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε διαλύτη  $CH_2Cl_2$  και προστίθενται επίσης  $Et_3N$  [9 eq] και διμεθυλο-αμινο-πυριδίνη (DMAP) [3 eq]. Το μείγμα της αντίδρασης τοποθετείται σε παγόλουτρο ( $0^\circ C$ ) και στη συνέχεια προστίθεται σταγόδην *o*-phenyl-chloro-thionoformate [1,3 eq]. Μετά από 10 min απομακρύνουμε την αντίδραση από τον πάγο και την αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες οπότε και ολοκληρώνεται. Ο ποιοτικός έλεγχος της αντίδρασης γίνεται πάλι με τη μέθοδο TLC σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/2 AcOEt. Μετά την ολοκλήρωση ακολουθεί συμπύκνωση και τελικά το προϊόν καθαρίζεται και απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 9 Hexane/1 AcOEt, συλλέγεται σε σφαιρική φιάλη και εξατμίζεται μέχρι ξηρού.

**Πίνακας 2:** Σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στις χρωματογραφικές τεχνικές με τα αντίστοιχα Rf και απόδοση της αντίδρασης

Σύστημα Διαλυτών TLC 8 Hexane/2 AcOEt	Rf = 0,55
Σύστημα Διαλυτών Στήλης 9 Hexane/1 AcOEt	Rf = 0,4
Απόδοση αντίδρασης (α)	40%



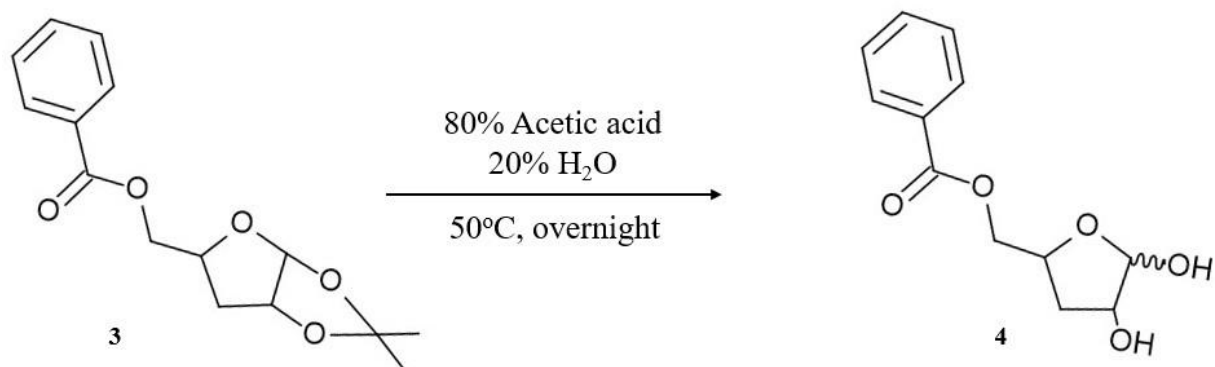
**Εικόνα 21:** Σχηματισμός του 3-δέοξυ σακχάρου από το εστερικό ενδιάμεσο

Το προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης τοποθετήθηκε στον ξηραντήρα για την απομάκρυνση της υγρασίας και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για τον σχηματισμό του επιθυμητού 3-δέοξυ αναλόγου. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε διαλύτη άνυδρο τολουόλιο, όπου διαλύεται το αντιδρόν [Mr 430,11] και στη συνέχεια προστίθενται αζωισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN) [1 eq] και υδρίδιο του τριβουτυλο-κασίτερου ( $\text{HSnBu}_3$ ) [2 eq]. Η αντίδραση γίνεται με θέρμανση σε ελαιόλουτρο με κάθετο ψυκτήρα και ολοκληρώνεται την επόμενη ημέρα. Αυτό ελέγχεται με TLC σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/2 AcOEt. Ακολουθεί εξάτμιση σε περιστροφικό εξάτμιστήρα υπό κενό και στη συνέχεια εκχύλιση με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  και  $\text{NaHCO}_3$ . Η οργανική φάση συλλέγεται συμπυκνώνεται και εν τέλει το προϊόν (3) καθαρίζεται και απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα 9 Hexane/1 AcOEt.

**Πίνακας 3:** Σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στις χρωματογραφικές τεχνικές με τα αντίστοιχα Rf και απόδοση της αντίδρασης

Σύστημα Διαλυτών TLC 8 Hexane/2 AcOEt	Rf = 0.45
Σύστημα Διαλυτών Στήλης 9 Hexane/1 AcOEt	Rf = 0.25
Απόδοση αντίδρασης (α)	86%

### 4.2.3 Υδρόλυση στους άνθρακες 1 και 2 της 5-βενζοϋλο- 3-δεοξυ-1,2-ισοπροπυλιδενο-α-D-ξυλοφουρανόζης



**Εικόνα 22:** Αντίδραση υδρόλυσης των ανθράκων 1 και 2 του δέοξυ σακχάρου

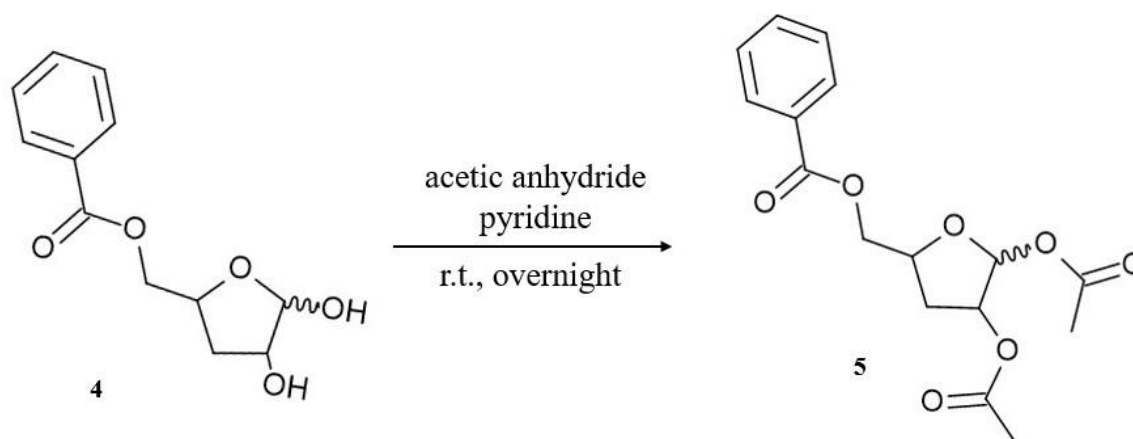
Επόμενο βήμα στην συνθετική πορεία είναι η υδρόλυση του 1,2-ισοπροπυλιδενίου του σακχάρου [Mr 278,31], η οποία πραγματοποιείται με ανάδευση της ένωσης 3 σε διάλυμα οξικού οξέος σε νερό (80% οξικό οξύ/20% νερό). Η αντίδραση γίνεται με θέρμανση στους 50°C και ολοκληρώνεται την επόμενη ημέρα. Η αντίδραση ελέγχεται με τη μέθοδο TLC σε σύστημα διαλυτών 7 AcOEt/3 Hexane. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης εξατμίζεται υπό κενό με την προσθήκη τολουολίου για την απομάκρυνση του οξικού οξέος, καθώς τα δύο αυτά δημιουργούν αζεοτροπικό μείγμα.

Από την αντίδραση δεν προκύπτουν παραπροϊόντα παρά μόνο το επιθυμητό προϊόν (4) και για το λόγο αυτό δεν είναι απαραίτητος ο καθαρισμός με τη χρήση χρωματογραφίας στήλης.

**Πίνακας 4:** Σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στις χρωματογραφικές τεχνικές με τα αντίστοιχα R<sub>f</sub> και απόδοση της αντίδρασης

Σύστημα Διαλυτών TLC 3 Hexane/7 AcOEt	R <sub>f</sub> = 0.25
Απόδοση αντίδρασης (α)	100%

#### 4.2.4 Ακετυλίωση των 1 και 2 υδροξυλίων του σακχάρου



**Εικόνα 23:** Αντίδραση ακετυλίωσης των υδροξυλομάδων 1 και 2 του σακχάρου.

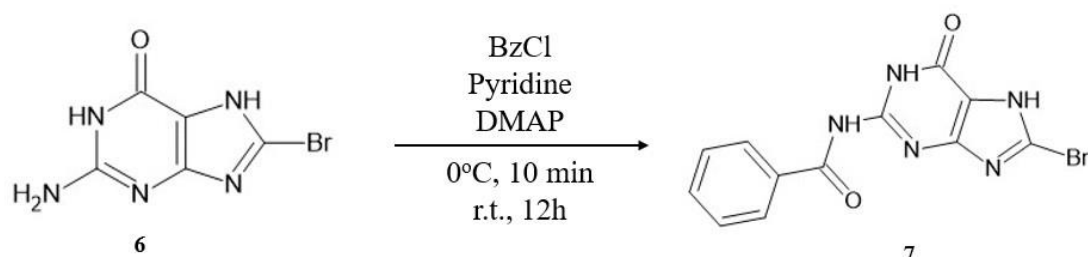
Το προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης (4) [Mr 238,34] διαλύεται σε πυριδίνη και στη συνέχεια προστίθεται οξικός ανυδρίτης [15 eq]. Η αντίδραση παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου και ολοκληρώνεται την επόμενη ημέρα. Αυτό ελέγχεται με TLC σε σύστημα διαλυτών 7 Hexane/3 AcOEt. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μείγμα της αντίδρασης τοποθετείται σε παγόλουτρο, όπου και προστίθεται μεθανόλη, και απομακρύνεται μετά από 10-15 min. Ακολουθούν αλληπάλληλες εξατμίσεις υπό κενό με την προσθήκη τολουολίου για την απομάκρυνση της πυριδίνης, καθώς μεταξύ αυτών σχηματίζεται αζεοτροπικό μείγμα και διευκολύνεται η απομάκρυνσή της. Τέλος, το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 7 Hexane/3 AcOEt.

**Πίνακας 5:** Σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στις χρωματογραφικές τεχνικές με τα αντίστοιχα Rf και απόδοση της αντίδρασης

Σύστημα Διαλυτών TLC 7 Hexane/3 AcOEt	Rf = 0.45
Σύστημα Διαλυτών Στήλης 7 Hexane/3 AcOEt	Rf = 0.45
Απόδοση αντίδρασης (α)	85%



#### 4.2.5 Βενζοϋλίωση της βρωμογουανίνης



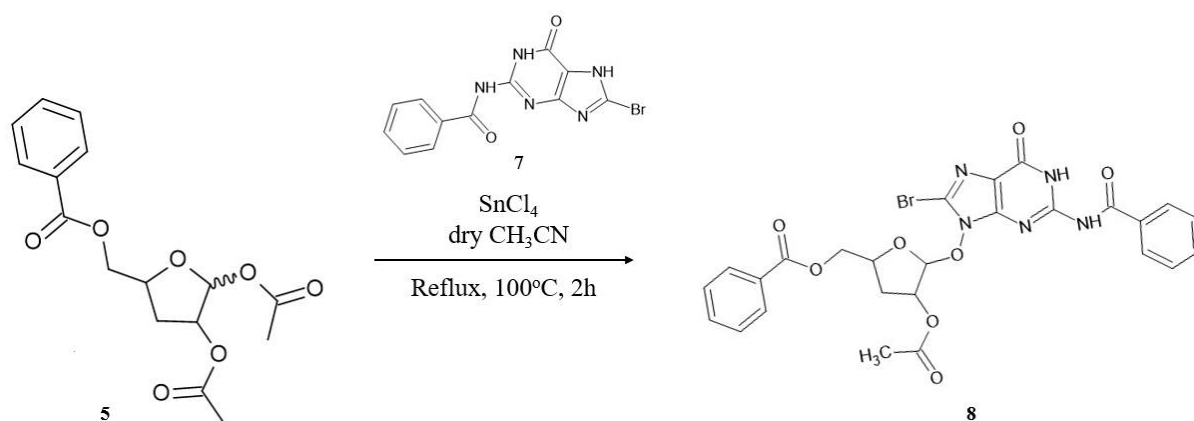
**Εικόνα 24:** Αντίδραση βενζοϋλίωσης της βρωμογουανίνης.

Τροποποίηση πραγματοποιείται και στην βάση της γουανίνης. Η εμπορικά διαθέσιμη βρωμογουανίνη (6) [Mr 230,03] βενζοϋλιώνεται με χρήση βενζόυλο χλωριδίου (BzCl) [6 eq], το οποίο προστίθεται στάγδην. Η αντίδραση γίνεται σε διαλύτη πυριδίνη με προσθήκη διμεθυλο-αμινο-πυριδίνης (DMAP) [0,1 eq]. Η αντίδραση μένει για 10 min σε παγόλουτρο στους 0°C και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Η αντίδραση ελέγχεται με TLC σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/2 AcOEt. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ακολουθούν διαδοχικές εκχυλίσεις με CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, HCl, NaHCO<sub>3</sub> και NaCl. Για την απομάκρυνση της πυριδίνης από την οργανική φάση που συλλέγεται μετά την εκχύλιση γίνεται εξάτμιση με τολουόλιο. Το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης με σύστημα 8 Hexane/2 AcOEt.

**Πίνακας 6:** Σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στις χρωματογραφικές τεχνικές με τα αντίστοιχα R<sub>f</sub> και απόδοση της αντίδρασης

Σύστημα Διαλυτών TLC 8 Hexane/2 AcOEt	R <sub>f</sub> = 0,55
Σύστημα Διαλυτών Στήλης 8 Hexane/2 AcOEt	R <sub>f</sub> = 0,55
Απόδοση αντίδρασης (α)	80%

#### 4.2.6 Σύνθεση του νουκλεοζίτη της βενζοϋλο-βρωμογουανίνης



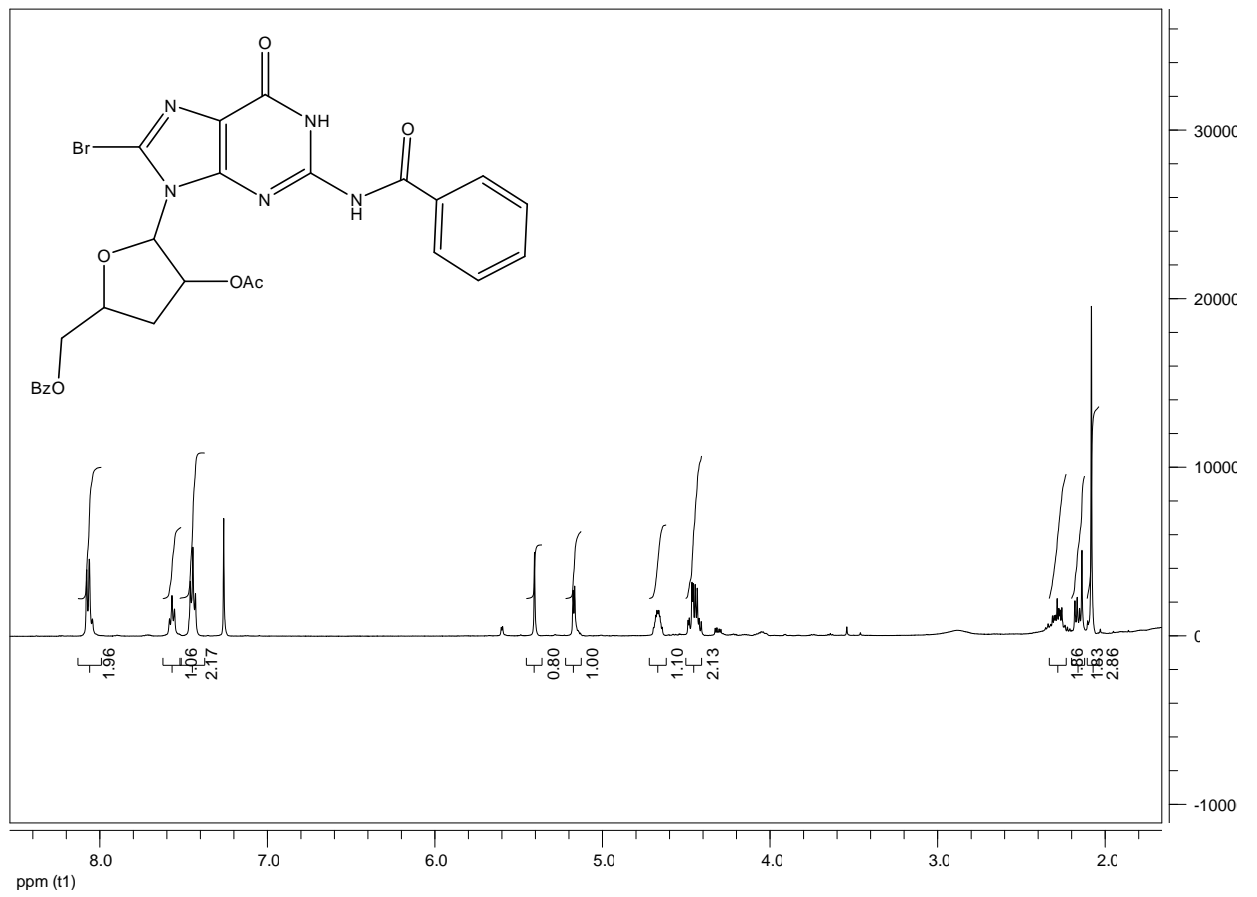
**Εικόνα 25:** Αντίδραση σύνθεσης του 3'-δέοξυ νουκλεοζίτη της βενζοϋλο-βρωμογουανίνης.

Η αντίδραση για τη σύνθεση του νουκλεοζίτη της γουανίνης (8) πραγματοποιείται σε διαλύτη άνυδρο ακετονιτρίλιο, όπου διαλύεται η πρώτη ύλη – το τροποποιημένο σάκχαρο [Mr 322,31] – και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη της βενζοϋλιωμένης βάσης (7) [Mr 334,13] [1,2 eq] και του τετραχλωριούχου κασίτερου (SnCl<sub>4</sub>) [2,2 eq]. Η αντίδραση γίνεται με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα για 2 ώρες και στη συνέχεια ελέγχεται με τη μέθοδο TLC σε σύστημα διαλυτών 7 Hexane/3 AcOEt. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης πραγματοποιείται εξάτμιση υπό κενό και ακολουθεί εκχύλιση με AcOEt και NaHCO<sub>3</sub>. Η οργανική φάση της εκχύλισης συλλέγεται και μετά από συμπύκνωση, το επιθυμητό προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 7 Hexane/3 AcOEt.

**Πίνακας 7:** Σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στις χρωματογραφικές τεχνικές με τα αντίστοιχα R<sub>f</sub> και απόδοση της αντίδρασης

Σύστημα Διαλυτών TLC 7 Hexane/3 AcOEt	R <sub>f</sub> = 0,2
Σύστημα Διαλυτών Στήλης 7 Hexane/3 AcOEt	R <sub>f</sub> = 0,2
Απόδοση αντίδρασης (α)	75%

## 5. Ταυτοποίηση με $^1\text{H}$ NMR



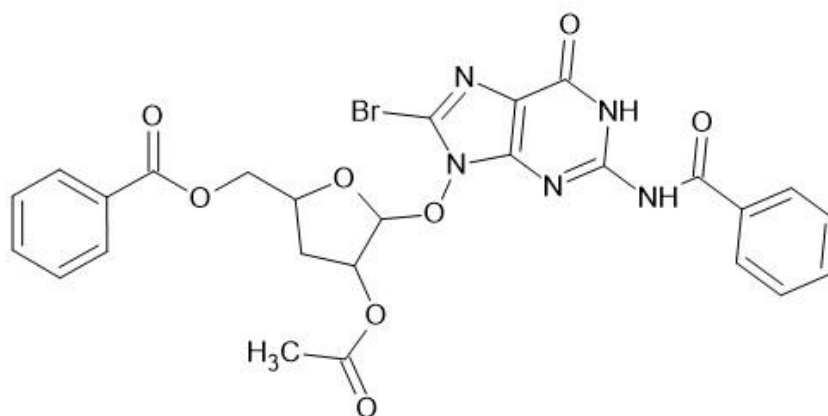
## 6. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Η έρευνα για την ανάπτυξη νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με βιολογική δράση είναι ζωτικής σημασίας και οδηγεί στην σύνθεση νέων πιθανών φαρμακευτικών παραγόντων έναντι μιας πληθώρας τύπων καρκίνου αλλά και ιικών μολύνσεων. Γνώμονας της έρευνας αυτής παραμένει πάντα η χαμηλή κυτταροτοξικότητα σε συνδυασμό με την εκλεκτικότητα.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ενός νέου νουκλεοζιτικού αναλόγου που φέρει τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα του σακχάρου όσο και στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης. Η πειραματική διαδικασία για τη σύνθεση του συγκεκριμένου νουκλεοζιτικού αναλόγου αποτελούνταν από λίγα στάδια και ήταν σχετικά απλή, ενώ η τελική απόδοση της σύνθεσης ήταν αρκετά ικανοποιητική.

Σε ό,τι αφορά τις τροποποιήσεις στο τμήμα του σακχάρου, έγινε προσθήκη μιας βενζοϋλοομάδας στον άνθρακα 5 καθώς και μια ακετυλίωση στη θέση 2. Επιπλέον, σε αντίθεση με τα 2'-δέοξυ φυσικά νουκλεοζιτικά ανάλογα το σάκχαρο του νεοσυντιθέμενου νουκλεοζίτη είναι 3'-δέοξυ. Εν συνεχεία η βάση της γουανίνης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία φέρει ένα βρώμιο στη θέση 8 αλλά και μια βενζοϋλοομάδα στη θέση 2.

Όλες οι τροποποιήσεις που έγιναν στον συγκεκριμένο νουκλεοζίτη τον καθιστούν πιθανό θεραπευτικό παράγοντα.



**Εικόνα 26:** Απεικόνιση του τελικού μορίου που συντέθηκε στην παρούσα πτυχιακή εργασία.

Μελλοντικά θα αξιολογηθεί η βιολογική δράση του νεοσυντιθέμενου τροποποιημένου νουκλεοζίτη και σε περίπτωση ελπιδοφόρων αποτελεσμάτων θα στοχευθεί η σύνθεση περισσότερων νουκλεοζιτικών αναλόγων με παρόμοιες τροποποιήσεις τόσο στο τμήμα του σακχάρου όσο και σε αυτό της βάσης, βασιζόμενη στην συνθετική πορεία που προτείνεται στην παρούσα εργασία.

## 7. Βιβλιογραφία

- Akash M.S.H., Rehman K. (2020) Column Chromatography. In: *Essentials of Pharmaceutical Analysis*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7_13)
- Akash M.S.H., Rehman K. (2020) Thin Layer Chromatography. In: *Essentials of Pharmaceutical Analysis*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7_12)
- Aviñó, A., Mazzini, S., Fàbrega, C., Peñalver, P., Gargallo, R., Morales, J. C., & Eritja, R. (2017). The effect of l-thymidine, acyclic thymine and 8-bromoguanine on the stability of model G-quadruplex structures. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1861(5 Pt B), 1205–1212. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.09.030>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, J. G. Jr. & Stryer, L. (2015). *Biochemistry* (8<sup>th</sup> ed.). W. H. Freeman and Company.
- Bettio, L. E. B., Gil-Mohapel, J., & Rodrigues, A. L. S. (2016). Guanosine and its role in neuropathologies. *Purinergic Signalling*, 12(3), 411–426. doi:10.1007/s11302-016-9509-4
- Biersack B. (2018). Interplay of non-coding RNAs and approved antimetabolites such as gemcitabine and pemetrexed in mesothelioma. *Non-coding RNA research*, 3(4), 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2018.11.001>
- Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2014, April 17). Nucleoside. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/nucleoside>
- Bochman, M. L., Paeschke, K., & Zakian, V. A. (2012). DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature Reviews Genetics*, 13(11), 770–780. doi:10.1038/nrg3296
- Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., & Neidle, S. (2006). Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic acids research*, 34(19), 5402–5415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl655>
- De Clercq E. (2002). Highlights in the development of new antiviral agents. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2(2), 163–175. <https://doi.org/10.2174/1389557024605474>
- Galmarini, C. M., Mackey, J. R., & Dumontet, C. (2002). Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *The Lancet. Oncology*, 3(7), 415–424. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(02\)00788-x](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(02)00788-x)
- Garg, H. G., Cowman, M. K. & Hales, C. A. (2008). *Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications* (1<sup>st</sup> ed.). Elsevier Ltd.
- Goji, S., & Matsui, J. (2011). Direct detection of thrombin binding to 8-bromodeoxyguanosine-modified aptamer: effects of modification on affinity and

- kinetics. *Journal of nucleic acids*, 2011, 316079.  
<https://doi.org/10.4061/2011/316079>
- Hernández-Reyes, C. X., Angeles-Beltrán, D., Lomas-Romero, L., González-Zamora, E., Gaviño, R., Cárdenas, J., Morales-Serna, J. A., & Negrón-Silva, G. E. (2012). Synthesis of azanucleosides through regioselective ring-opening of epoxides catalyzed by sulphated zirconia under microwave and solvent-free conditions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(3), 3359–3369.  
<https://doi.org/10.3390/molecules17033359>
- Hollecker, L., Choo, H., Chong, Y., Chu, C. K., Lostia, S., McBrayer, T. R., Stuyver, L. J., Mason, J. C., Du, J., Rachakonda, S., Shi, J., Schinazi, R. F., & Watanabe, K. A. (2004). Synthesis of beta-enantiomers of N4-hydroxy-3'-deoxyuridine nucleosides and their evaluation against bovine viral diarrhoea virus and hepatitis C virus in cell culture. *Antiviral chemistry & chemotherapy*, 15(1), 43–55.  
<https://doi.org/10.1177/095632020401500105>
- Ichikawa, E., & Kato, K. (2001). Sugar-modified nucleosides in past 10 years, a review. *Current medicinal chemistry*, 8(4), 385–423.  
<https://doi.org/10.2174/0929867013373471>
- Jenkins, S. R., Holly, F. W., & Walton, E. (1965). 3'-Deoxynucleosides. III. 13'-Deoxyguanosine. *The Journal of Organic Chemistry*, 30(8), 2851–2852. doi:10.1021/jo01019a516
- Jin, Y., Meng, X., Qiu, Z., Su, Y., Yu, P., & Qu, P. (2018). Anti-tumor and anti-metastatic roles of cordycepin, one bioactive compound of *Cordyceps militaris*. *Saudi journal of biological sciences*, 25(5), 991–995.  
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.016>
- Kaczka, E. A., Trenner, N. R., Arison, B., Walker, R. W., & Folkers, K. (1964). Identification of cordycepin, a metabolite of *Cordyceps militaris*, as 3'-deoxyadenosine. *Biochemical and biophysical research communications*, 14, 456–457. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(64\)90086-5](https://doi.org/10.1016/0006-291x(64)90086-5)
- Lai, V. C., Dempsey, S., Lau, J. Y., Hong, Z., & Zhong, W. (2003). In vitro RNA replication directed by replicase complexes isolated from the subgenomic replicon cells of hepatitis C virus. *Journal of virology*, 77(3), 2295–2300.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.77.3.2295-2300.2003>
- Mathé, C., & Gosselin, G. (2006). L-nucleoside enantiomers as antiviral drugs: a mini-review. *Antiviral research*, 71(2-3), 276–281.  
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.04.017>
- Mikhailopulo, I. A., & Miroshnikov, A. I. (2010). New trends in nucleoside biotechnology. *Acta naturae*, 2(2), 36–59.
- National Cancer Institute. (n.d.) Cancer Treatment. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>

- Ni, G., Du, Y., Tang, F., Liu, J., Zhao, H. & Chen, Q. (2019). Review of a-nucleosides: from discovery, synthesis to properties and potential applications. *RSC Advances* 9, 14302–14320. DOI: 10.1039/c9ra01399g
- O'Brien, J. J., & Campoli-Richards, D. M. (1989). Acyclovir. An updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 37(3), 233–309. <https://doi.org/10.2165/00003495-198937030-00002>
- Pastor-Anglada, M., Felipe, A., & Casado, F. J. (1998). Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies. *Trends in pharmacological sciences*, 19(10), 424–430. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(98\)01253-x](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(98)01253-x)
- Petraccone, L., Duro, I., Randazzo, A., Virno, A., Mayol, L., & Giancola, C. (2007). Biophysical properties of quadruplexes containing two or three 8-bromodeoxyguanosine residues. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, 26(6-7), 669–674. <https://doi.org/10.1080/15257770701490589>
- Piperno, A., Chiacchio, M. A., Iannazzo, D., & Romeo, R. (2006). Synthesis and biological activity of phosphonated nucleosides: part 1. Furanose, carbocyclic and heterocyclic analogues. *Current medicinal chemistry*, 13(30), 3675–3695. <https://doi.org/10.2174/092986706779026110>
- Robinson, D. M., Scott, L. J., & Plosker, G. L. (2006). Entecavir: a review of its use in chronic hepatitis B. *Drugs*, 66(12), 1605–1624. <https://doi.org/10.2165/00003495-200666120-00009>
- Romeo, G., Chiacchio, U., Corsaro, A., & Merino, P. (2010). Chemical synthesis of heterocyclic-sugar nucleoside analogues. *Chemical reviews*, 110(6), 3337–3370. <https://doi.org/10.1021/cr800464r>
- Rudin, S., Marable, M., & Huang, R. S. (2017). The Promise of Pharmacogenomics in Reducing Toxicity During Acute Lymphoblastic Leukemia Maintenance Treatment. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 15(2), 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.11.003>
- Seley-Radtke, K. L., & Yates, M. K. (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. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.04.004>
- Shelton, J., Lu, X., Hollenbaugh, J. A., Cho, J. H., Amblard, F., & Schinazi, R. F. (2016). Metabolism, Biochemical Actions, and Chemical Synthesis of Anticancer Nucleosides, Nucleotides, and Base Analogs. *Chemical reviews*, 116(23), 14379–14455. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00209>
- Szafranec, S. I., Stachnik, K. J., & Skierski, J. S. (2004). New nucleoside analogs in the treatment of solid tumors. *Acta poloniae pharmaceutica*, 61(4), 297–305.
- Wade, L. G. Jr. (2006). *Organic Chemistry* (6<sup>th</sup> ed.). Pearson Education, Inc.

Walton, E., Holly, F. W., Boxer, G. E., Nutt, R. F., & Jenkins, S. R. (1965). 3'-Deoxynucleosides. II. Purine 3'-Deoxynucleosides. *Journal of Medicinal Chemistry*, 8(5), 659–663. doi:10.1021/jm00329a022

Walton, E., Nutt, R. F., Jenkins, S. R., & Holly, F. W. (1964). 3'-Deoxynucleosides. I. A Synthesis of 3'-Deoxyadenosine. *Journal of the American Chemical Society*, 86(14), 2952–2952. doi:10.1021/ja01068a049