

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Νέοι C-8 Υποκατεστημένοι Νουκλεοζίτες της Αδενίνης. Σύνθεση και
Φασματοσκοπική αποτίμηση

Synthesis and spectroscopic evaluation of new C-8 substituted
nucleosides of adenine

Πάτσος Αθανάσιος

Λάρισα 2021

Τριμελής επιτροπή

- **Κομιώτης Δημήτριος**

Καθηγητής Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Μόσιαλος Δημήτριος**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **Κολλάτος Νικόλαος**

Συμβασιούχος Διδάσκων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής και Βιοοργανικής Χημείας κ. Δημήτριο Κομιώτη, η οποία πραγματοποιήθηκε από τον Σεπτέμβριο 2020 – Ιούλιο 2020. Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τον Καθηγητή κ. Κομιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή και την ευκαιρία να δουλέψω στο εργαστήριο του. Η όρεξη του να εμπλουτίσει τις γνώσεις μου, η επιθυμία του να μου μάθει περισσότερα καθώς και ο τεράστιος σεβασμός που μου έδειξε όλο αυτό τον καιρό αποτελούν για εμένα κινητήριο μοχλό για να συνεχίσω την ενασχόληση μου με την Οργανική Χημεία.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κολλάτο Νικόλαο, καθώς συνέβαλλε τα μέγιστα για την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Οι συμβουλές του, ο προσωπικός κόπος που κατέβαλλε και η στήριξη του με βοήθησαν να διευρύνω τον τρόπο σκέψης μου και να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου. Η όρεξη του για δουλειά και το ήθος του αποτέλεσαν σημαντικά εφόδια για τη ζωή μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την προπτυχιακή φοιτήτρια Τσουμάνη Ιωάννα για όλες τις φορές που με βοήθησε και για την άψογη συνεργασία στο εργαστήριο.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζει με όλη της τη δύναμη. Η αγάπη τους και η βοήθεια τους έπαιξε καθοριστικό ρόλο για την ολοκλήρωση των σπουδών μου.

Πάτσος Αθανάσιος

Περίληψη

Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών εδώ και αρκετές δεκαετίες έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς έχουν επιδείξει άριστη αντική και αντικαρκινική δράση. Ακριβώς γι' αυτό το λόγο αξιοσημείωτη βαρύτητα έχει δοθεί στη σύνθεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με βελτιωμένες θεραπευτικές ιδιότητες αλλά και με μειωμένες παρενέργειες για τον ανθρώπινο οργανισμό.

Ο κύριος λόγος στον οποίο αποδίδεται η εξαιρετική βιολογική δράση των νουκλεοζιτών είναι η μεγάλη ομοιότητα τους με τα νουκλεοτίδια. Αυτά είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση οποιουδήποτε οργανισμού και παίρνουν μέρος σε όλες τις σημαντικές βιολογικές διεργασίες, όπως στην αντιγραφή στην μεταγραφή και στη μετάφραση.

Ειδικότερα, είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, ότι οι φούρανονουκλεοζίτες συμβάλλουν τα μέγιστα τόσο στη θεραπεία πολλών μορφών καρκίνου, όπως τον καρκίνο του μαστού, όσο και ενάντια σε ιούς, όπως στον HIV. Μάλιστα, περισσότερα από δεκαπέντε νουκλεοζιτικά ανάλογα κυκλοφορούν ήδη στο εμπόριο, ενώ σε λίγα χρόνια ο αριθμός τους αναμένεται να αυξηθεί κατακόρυφα.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιούνται ποικίλες τροποποιήσεις για τη σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών της αδερίνης ως υποψήφιους αντικούς και αντικαρκινικούς παράγοντες.

Abstract

The scientific community have been really interested in nucleoside analogues the last decades, as nucleosides have shown a great antiviral and anti-cancer activity. For this reason, remarkable importance has been given to the synthesis of new nucleoside analogues with improved therapeutic properties but also with reduced side effects for the human body.

The main reason for nucleosides excellent biological activity is their great similarity to nucleotides. These are vital to the survival of any organism and are involved in every important biological process, such as replication, transcription and translation.

In particular, it is well-known from the literature that furanonucleosides contribute greatly to the treatment of many different types of cancer, such as breast cancer, and against viruses, such as HIV. In fact, more than fifteen nucleoside analogues are already on the market, while in a few years this number is expected to increase sharply.

Taking all the above into consideration, in this Thesis Project various modifications are made for the synthesis of modified adenine nucleosides, both in the sugar and in the base, as candidate antiviral and anti-cancer agents.

Περιεχόμενα	
1.Εισαγωγή	9
1.1 Σάκχαρα	9
1.2 Βάσεις του DNA και RNA	9
1.3 Νουκλεοζίτες	11
1.4 Νουκλεοζιτικά ανάλογα	12
1.5 Ενεργοποίηση νουκλεοζιτικών αναλόγα	12
1.6 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα	13
1.7 Αντικά νουκλεοζιτικά ανάλογα	15
1.8 Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες	17
1.9 Φούρανο-νουκλεοζίτες	17
1.10 3'-δέοξυ-νουκλεοζίτες	18
1.11 Υποδοχείς αδενοσίνης και 8-βρώμο αδενίνη	18
2.Σκοπός	22
3. Τεχνικές	23
3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography)	23
3.2 Χρωματογραφία στήλης (Column Chromatography)	24
3.3 Ξήρανση διαλυτών	25
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων	25
4. Πειραματικό Μέρος	26
4.1. Επισκόπηση συνθετικής πορείας	26
4.2.1. Σύνθεση της 5-βενζόυλο-1,2-Ο-ισοπροπυλίδενο-α-D-ριβοφουρανόζης (2)	27
4.2.2. Σύνθεση της 5-βενζόυλο-3-δέοξυ-1,2-Ο-ισοπροπυλίδενο-α-D-ριβοφουρανόζης μέσω της δημιουργίας ενδιάμεσου εστέρα (3)	28
4.2.3. Σύνθεση της 1,2-Ακετυλο-5-βενζόυλο-3-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζης (4)	29
4.2.4. Σύνθεση της C8-βρωμοαδενίνης (6)	30
4.2.5 Σχηματισμός του νουκλεοζίτη της 8-βρωμοαδενίνης (7)	31
5. Ταυτοποίηση με ¹ H NMR	32

6. Αποτελέσματα – Συζήτηση	33
7. Βιβλιογραφία	35

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Βάσεις που είναι παράγωγα πουρίνης	10
Εικόνα 2: Βάσεις που είναι παράγωγα πυριμιδίνης	10
Εικόνα 3: Ζευγάρισμα μεταξύ των βάσεων του DNA	10
Εικόνα 4: Απεικόνιση της δομής των δεοξυριβονουκλεοτιδίων και των ριβονουκλεοτιδίων	12
Εικόνα 5: Είσοδος στο κύτταρο και τρόπος ενεργοποίησης των νουκλεοζιτών	13
Εικόνα 6: Εγκεκριμένα από τον FDA νουκλεοζιτικά ανάλογα με γνωστή αντικαρκινική δράση	14
Εικόνα 7: Στάδια του κύκλου ζωής των ιών τα οποία μπορούν να αποτελέσουν εν δυνάμει στόχους φαρμάκων	15
Εικόνα 8: Ανάλογα νουκλεοζιτών που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ιικών μολύνσεων	16
Εικόνα 9: Πιθανές θέσεις τροποποίησης ενός νουκλεοζίτη	17
Εικόνα 10: Μονοπάτια που επηρεάζονται από την ενεργοποίηση των Ars	19
Εικόνα 11: Συγγένεια τροποποιημένων αναλόγων αδενίνης στη θέση C-2 και C-8 για τους υποδοχείς A ₁ , A ₂ και A ₃ . Οι τιμές δίνονται σε μΜ	21
Εικόνα 12: Συγγένεια τροποποιημένων αναλόγων αδενίνης παρουσία και απουσία Br στη θέση C-8 για τους υποδοχείς A ₁ , A _{2A} , A _{2B} και A ₃	21
Εικόνα 13: Συντακτικός τύπος του τροποποιημένου νουκλεοζιτικού αναλόγου της αδενίνης που παρουσιάζεται στην πτυχιακή εργασία	22
Εικόνα 14: Αναπαράσταση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας	23
Εικόνα 15: Απεικόνιση της διαδικασίας της χρωματογραφίας στήλης	24
Εικόνα 16: Απεικόνιση του τροποποιημένου νουκλεοζίτη της αδενίνης που συντέθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία	34

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σάκχαρα

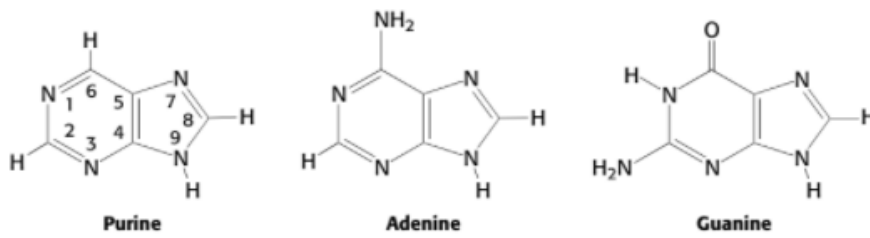
Τα σάκχαρα είναι μόρια πλούσια σε άνθρακες τα οποία έχουν μεγάλη πληθώρα υδροξυλομάδων. Ο γενικός μοριακός τους τύπος είναι $C_n(H_2O)_m$ γι' αυτό και χαρακτηρίζονται ως ένυδρες ενώσεις του άνθρακα. Τα σάκχαρα είναι εξαιρετικής βιολογικής σημασίας για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς (Berg et al., 2015). Γενικότερα, τα βιολογικά αυτά μόρια χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες:

- Μονοσακχαρίτες: οι πιο απλοί υδατάνθρακες που υπάρχουν στη φύση και δεν μπορούν να διασπαστούν σε πιο απλές ενώσεις. Αποτελούν άριστες πηγές ενέργειας για το κύτταρο, ενώ χαρακτηριστικά παραδείγματα μονοσακχαριστών αποτελούν η φρουκτόζη και η γλυκόζη
- Δισακχαρίτες: υδατάνθρακες που αποτελούνται από δύο μονοσακχαρίτες και έπειτα από υδρόλυση μπορούν να προκύψουν δύο μονοσακχαρίτες, όπως στην περίπτωση της σάκχαρης που παράγεται φρουκτόζη και γλυκόζη
- Πολυσακχαρίτες: μόρια που αποτελούνται από μια πληθώρα μονοσακχαριτών ενωμένα μεταξύ τους. Δύο ευρέως γνωστά παραδείγματα αποτελούν το άμυλο και η κυτταρίνη

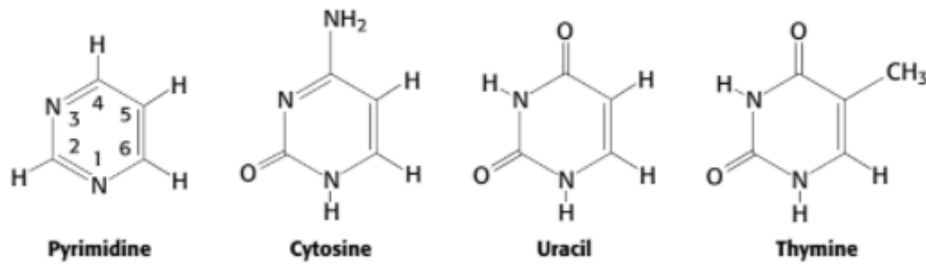
Από εκεί και πέρα, τα σάκχαρα ταξινομούνται σε αλδόζες και κετόζες. Στην πρώτη κατηγορία ταξινομούνται σάκχαρα που περιέχουν αλδεϋδομάδες, ενώ στη δεύτερη υδατάνθρακες που έχουν κετονομάδες. Ακόμη τα σάκχαρα διαχωρίζονται περαιτέρω ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα, τα οποία μπορεί να έχουν από τρεις έως και επτά άνθρακες, όμως στη συντριπτική τους πλειοψηφία υπάρχουν οι πεντόζες και οι εξόζες (Wade, 2006). Αυτό που αξίζει να αναφερθεί είναι ότι τα σάκχαρα εξαιτίας των πολλών στερεογονικών κέντρων που μπορεί να έχουν αν και πολλά έχουν μεταξύ τους ίδιο μοριακό τύπο, προκύπτει πολύ μεγάλος αριθμός ισομερών. Για παράδειγμα σε ένα σάκχαρο που έχει τρία στερεογονικά κέντρα υπάρχουν $2^3 = 8$ διαφορετικά ισομερή (Garg et al., 2008).

1.2 Βάσεις του DNA και RNA

Οι βάσεις οι οποίες περιέχονται στο γενετικό υλικό των ζωντανών οργανισμών είναι συνολικά πέντε. Οι δύο εξ αυτών είναι παράγωγα πουρίνης και είναι η αδενίνη (A) και η γουανίνη (G) (Εικόνα 1). Αμφότερες βρίσκονται τόσο στο DNA όσο και στο RNA. Αντιθέτως, οι υπόλοιπες τρεις βάσεις είναι η κυτοσίνη (C), η θυμίνη (T) και η ουρακίλη (U) και προκύπτουν από την πυριμιδίνη (Εικόνα 2). Η πρώτη συναντάται τόσο στο DNA όσο και στο RNA, ενώ η θυμίνη μόνο στο DNA και η ουρακίλη μόνο στο RNA (Berg et al., 2015, Bistronić et al., 2017)

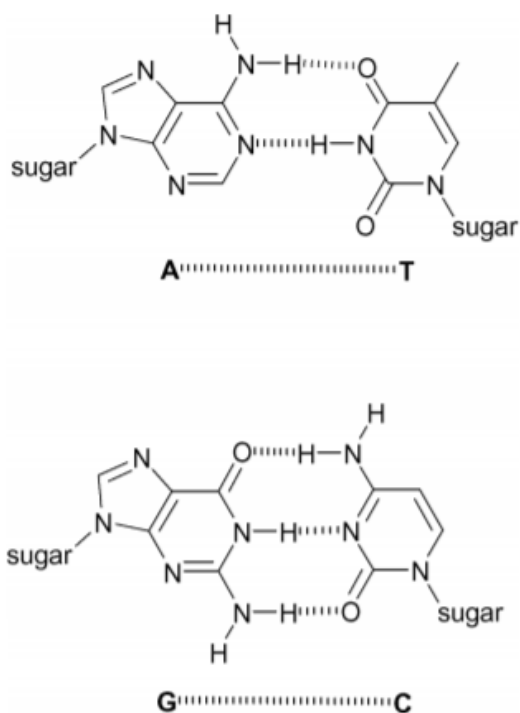


Εικόνα 1: Βάσεις που είναι παράγωγα πουρίνης (Berg et al., 2015)



Εικόνα 2: Βάσεις που είναι παράγωγα πυριμιδίνης (Berg et al., 2015)

Από εκεί κ έπειτα, σύμφωνα με τους Watson και Crick οι βάσεις του DNA και του RNA συνδέονται μεταξύ τους με πολύ εξειδικευμένο τρόπο. Πιο συγκεκριμένα, η αδερίνη ενώνεται αποκλειστικά με θυμίνη στο DNA και με ουρακίλη στο RNA μέσω 2 δεσμών υδρογόνου. Από την άλλη μια γουανίνη μπορεί να συνδεθεί μόνο με μία κυτοσίνη μέσω 3 δεσμών υδρογόνου αυτή τη φορά (Εικόνα 3). Αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου αν και αρκετά ασθενείς εφόσον είναι πάρα πολλοί συμβάλλουν τα μέγιστα στη σταθερότητα του γενετικού υλικού (Gothelf & LaBean, 2005).

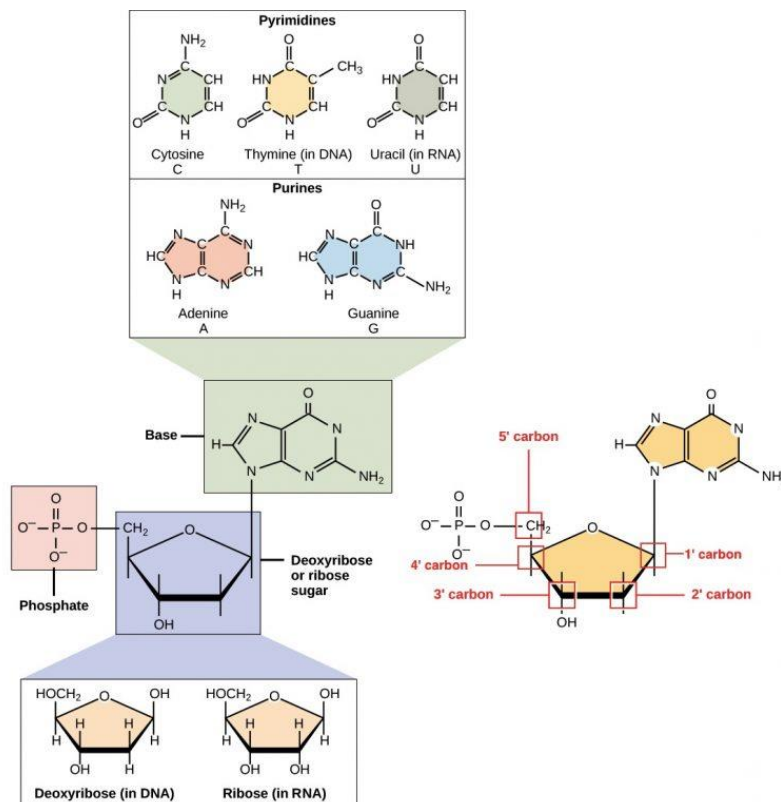


Εικόνα 3: Ζευγάρισμα μεταξύ των βάσεων του DNA

1.3 Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες είναι ενώσεις οι οποίες περιέχουν ένα σάκχαρο συνδεδεμένο με μία βάση. Οι βάσεις αυτές μπορεί να είναι είτε πουρίνες (αδενίνη, γουανίνη) είτε πυριμιδίνες (κυτοσίνη, θυμίνη, ουρακίλη) και συνδέονται με το σάκχαρο μέσω ενός γλυκοζιτικού δεσμού. Αυτές μπορούν να συνδεθούν σε μια ριβόζη και να προκύψει ένας ριβονουκλεοζίτης, ενώ αν συνδεθούν σε μια δέοξυριβόζη να σχηματισθεί ένας δέοξυριβονουκλεοζίτης. Ο δεσμός μεταξύ της βάσης και του σακχάρου δημιουργείται μεταξύ του N-9 της πουρίνης ή του N-1 της πυριμιδίνης και του C-1' του σακχάρου.

Ουσιαστικά η μόνη διαφορά μεταξύ ενός νουκλεοτιδίου και ενός νουκλεοζίτη είναι η ύπαρξη μίας ή περισσοτέρων φωσφορικών ομάδων συνδεδεμένες στον C-5' του νουκλεοτιδίου. Το DNA αποτελείται από ενωμένα μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια που είναι το δέοξυαδενυλικό, το δέοξυγουανυλικό, το δέοξυκυτιδυλικό και το θυμιδυλικό, ενώ αντίστοιχα το RNA και αυτό από αλληπάλληλα συνδεδεμένα μονοφωσφορικά νουκλεοτίδια τα οποία είναι το αδενυλικό, το γουανυλικό, το κυτιδυλικό και το ουριδυλικό. Τα μονομερή αυτά προκύπτουν ύστερα από τη σύνδεση των τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων, τα οποία αποτελούν τα δομικά συστατικά του DNA και του RNA (Εικόνα 4) (Berg et al., 2015).



Εικόνα 4: Απεικόνιση της δομής των δέοξυριβονουκλεοτιδίων και των ριβονουκλεοτιδίων (Nitrogenous bases, Nucleosides and Nucleotides, 2020)

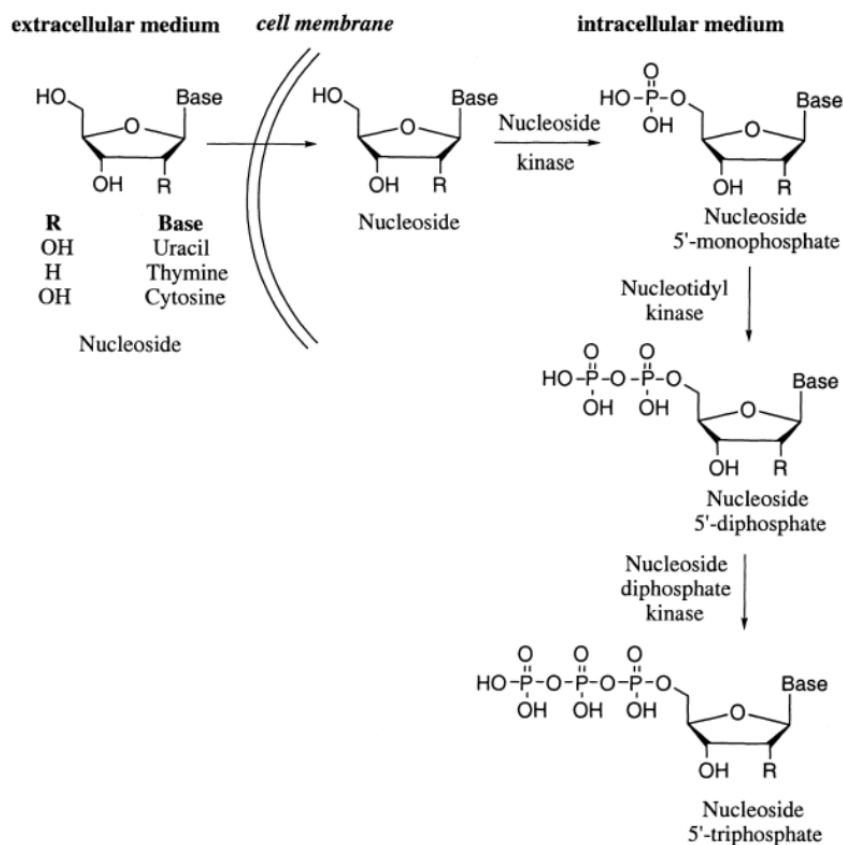
1.4 Νουκλεοζιτικά ανάλογα

Ήδη από τις αρχές του προηγούμενου αιώνα τα νουκλεοτίδια έγινε γνωστό ότι αποτελούν το δομικό λίθο του γενετικού υλικού των οργανισμών. Για το λόγο αυτό περίπου την ίδια χρονική περίοδο το ενδιαφέρον των ερευνητών αυξήθηκε κατακόρυφα για τη σύνθεση νουκλεοζιτικών αναλόγων, καθώς ανέμεναν μια πολύ καλή αντιϊκή και αντικαρκινική δράση. Πράγματι, κάτι τέτοιο δεν άργησε να επιβεβαιωθεί μιας και τα βιολογικά αποτελέσματα που προέκυψαν είχαν εξαιρετικό ενδιαφέρον. (Mikhailopulo & Mirosnikon, 2010). Τα αμέσως επόμενα χρόνια μέχρι και σήμερα συντέθηκε μια μεγάλη πληθώρα νουκλεοζιτών, που περιείχε τεράστια ποικιλία τροποποιήσεων, τόσο στο σάκχαρο όσο και στη βάση (πουρίνη και πυριμιδίνη).

Τις τελευταίες δεκαετίες ένας μεγάλος αριθμός μελετών ανέδειξε τον τρόπο δράσης των νουκλεοζιτών, οι οποίοι δρουν ανταγωνιστικά ως προς του ενδοκυτταρικούς νουκλεοζίτες και για το λόγο αυτό οι ομάδες αυτών των ενώσεων ονομάζονται αντιμεταβολίτες. Με αυτό τον τρόπο οι νουκλεοζίτες περιορίζουν δραστικά οποιαδήποτε αντιϊκή και αντικαρκινική δράση μέσα στο κύτταρο. Είναι αξιοσημείωτο πως οι νουκλεοζίτες χρησιμοποιούνται ως φάρμακα για την καταπολέμηση μιας πληθώρας ασθενειών εδώ και δεκαετίες, ενώ η Διεύθυνση Ελέγχου Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration, FDA) και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Medicines Agency, EMA) έχουν εγκρίνει ένα μεγάλο αριθμό φαρμάκων που περιέχουν διάφορα νουκλεοζιτικά ανάλογα (Jordheim et al. 2013).

1.5 Ενεργοποίηση νουκλεοζιτικών αναλόγων

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα όντας μη φωσφορυλιωμένα εισέρχονται μέσω διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στο κύτταρο. Από εκεί και έπειτα φωσφορυλιώνονται μέσω μια νουκλεοζιτικής κινάσης συμβάλλοντας στο σχηματισμό ενός μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη, ο οποίος φωσφορυλιώνεται εκ νέου από νουκλεοτιδικές κινάσες και οδηγούν σε διφωσφορικό νουκλεοζίτη. Τέλος, ολοκληρώνεται η φωσφορυλίωση του νουκλεοζίτη μέσω διφωσφορικών κινασών έχοντας στο τέλος τον τριφωσφορικό νουκλεοζίτη, ο οποίος ενεργοποιείται πλήρως (Εικόνα 5) (Wagner et al., 2000)



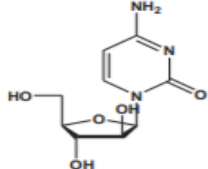
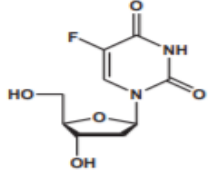
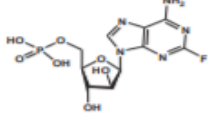
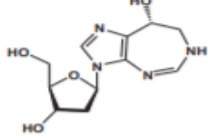
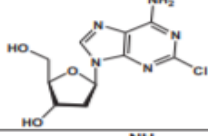
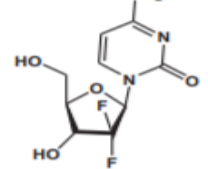
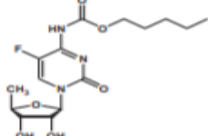
Εικόνα 5: Είσοδος στο κύτταρο και τρόπος ενεργοποίησης των νουκλεοζιτών (Wagner et al., 2000)

1.6 Αντικαρκινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα

Ο καρκίνος αποτελεί την ασθένεια που απασχολεί με διαφορά περισσότερο τους επιστήμονες σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη, κυρίως λόγω της υψηλής θνησιμότητάς του, της περιπλοκότητάς και του μεγάλου αριθμού παραγόντων που μπορεί να τον προκαλέσουν. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι νουκλεοζίτες αποτελούν εξαιρετικούς αντικαρκινικούς υποψηφίους και είναι από τις πρώτες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την καταπολέμηση της νόσου (Galmarini et al., 2002). Αυτό συμβαίνει διότι έχουν πολύ υψηλή κυτταροτοξική δράση σκοτώνοντας τα καρκινικά κύτταρα αλλά και γιατί αυξάνουν ραγδαία την αποδοτικότητα των ακτινοθεραπειών μιας και επιφέρουν μια σειρά αλλαγών στο μεταβολισμό των κυττάρων του οργανισμού (Pastor-Anglada et al., 1998). Αυτό που είναι όμως αναγκαίο είναι η κυτταροτοξικότητα των νουκλεοζιτικών αναλόγων να περιορίζεται μόνο στα καρκινικά κύτταρα και όχι σε όλα. Αυτό επιτυγχάνεται σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό πιθανότατα, γιατί τα καρκινικά κύτταρα βρίσκονται διαρκώς σε μίτωση εν αντιθέσει με τα φυσιολογικά κύτταρα που καθιστά τη δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων πιο επιλεκτική (Périgaud et al., 1992).

Το 1969 ο FDA ενέκρινε τη χρήση του πρώτου νουκλεοζιτικού αναλόγου ενάντια στον καρκίνο, την Κυταραβίνη (Cytarabine, araC), και πιο συγκεκριμένα

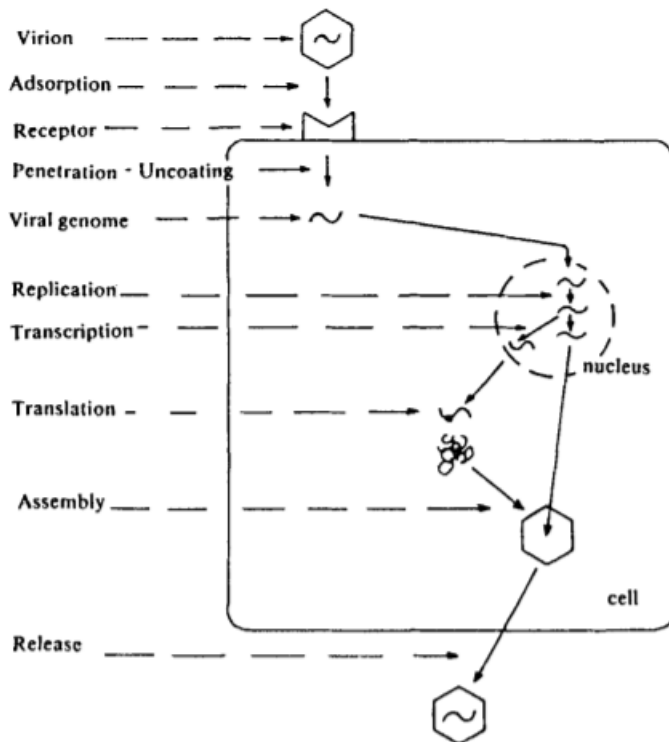
ενάντια στη λευχemia. Από εκεί και έπειτα πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας μεγάλης πληθώρας νουκλεοζικών αναλόγων που εγκρίθηκαν από τον FDA ενάντια σε διάφορες μορφές καρκίνου μεταξύ των οποίων η Φλουξοριδίνη (Flouxuridine), η οποία αναστέλλει τη δράση της θυμιδική συνθετάσης, η Φλουραδαβίνη (Fludarabine) η οποία αναστέλλει τη σύνθεση του DNA επάγοντας με αυτό τον τρόπο την κυτταροτοξικότητα της, η Πεντοστατίνη (Deoxyconformycin) που αναστέλλει την απαμινάση της αδενοσίνης, η Κλαδριβίνη (Cladribine) που χρησιμοποιείται ενάντια στην λευχemia, η Γεμισταβίνη (Gemcitabine) ενάντια στον καρκίνο του πνεύμονα και η Καπεσιταβίνη (Capecitabine) για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού (Huang et al., 1990; Périgaud et al., 1992) (Εικόνα 6) Σήμερα είναι γνωστό ότι έχουν εγκριθεί 15 διαφορετικά νουκλεοζιτικά ανάλογα ενάντια σε διάφορες μορφές καρκίνου, ενώ το ερευνητικό ενδιαφέρον για τη σύνθεση νουκλεοζιτών αναμένεται αμείωτο και τα επόμενα χρόνια (Mirza, 2019).

Name	Structures	Date of FDA approval	Indications
Cytarabine		1969	Anti-cancer agent
Flouxuridine		1970	Anti-cancer agent
Fludarabine		1991	Anti-cancer agent
Deoxyconformycin		1991	Anti-cancer agent
Cladribine		1993	Anti-cancer agent
Gemcitabine		1996	Anti-cancer agent
Capecitabine		1998	Anti-cancer agent

Εικόνα 6: Εγκεκριμένα από τον FDA νουκλεοζιτικά ανάλογα με γνωστή αντικαρκινική δράση (Mirza, 2019).

1.7 Αντικα νουκλεοζιτικά ανάλογα

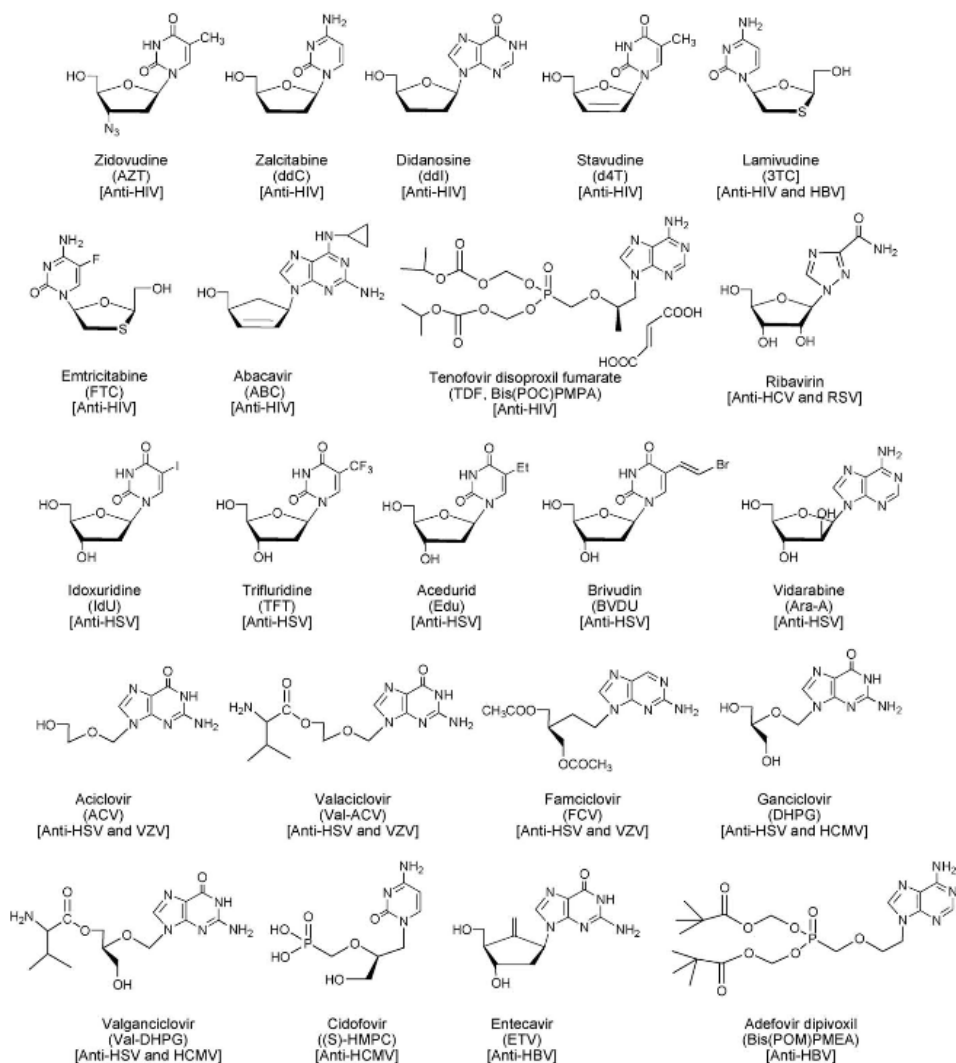
Μέχρι τα μέσα του 20^{ου} αιώνα η αδυναμία κατανόησης των βιολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα σε έναν ιό είχε αποτελέσει για τους επιστήμονες ανυπέρβλητο εμπόδιο για την ανάπτυξη αντικών θεραπειών. Ωστόσο τα τελευταία 20-25 χρόνια η αποκρυπτογράφηση του ιικού γονιδιώματος, η κατανόηση του μηχανισμού αντιγραφής τους και γενικότερα του κύκλου ζωής τους συνέβαλαν τα μέγιστα στην εύρεση πιθανών στόχων (Schaffer, 1979; Prusoff et al., 1986). Έτσι πιθανά αντικα φάρμακα θα μπορούσαν να στοχεύουν την προσκόλληση στον υποδοχέα του κυττάρου, την είσοδο στο κύτταρο και την απέκδυση του ιού, την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του ιικού γονιδιώματος και τη συναρμολόγηση του ιού σε ένα πλήρες και λειτουργικό ιικό σωματίδιο (Périgaud et al., 1992) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Στάδια του κύκλου ζωής των ιών τα οποία μπορούν να αποτελέσουν εν δυνάμει στόχους φαρμάκων (Périgaud et al., 1992).

Τα αντικα νουκλεοζιτικά ανάλογα στοχεύουν ως επί το πλείστον τις πολυμεράσες των ιών εμποδίζοντας σε πρώτη φάση την αντιγραφή τους και στη συνέχεια την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής τους (Yates & Seley-Radtke 2019). Σήμερα νουκλεοζιτικά παράγωγα χρησιμοποιούνται για μια πληθώρα ιών, όπως τον ιού του απλού έρπητα (Herpes Simplex Virus, HSV), με γνωστά παραδείγματα το Idoxuridine (IdU), το Trifluridine (TFT), το Acedurid (Edu), το Brivudin (BVDU), το Vidarabine (Ara-A), το Aciclovir (ACV), το Valaciclovir (Val-ACV), το Famciclovir (FCV), το Ganciclovir (DHPG) και το Valganciclovir (Val-DHPG), τον ανθρώπινο

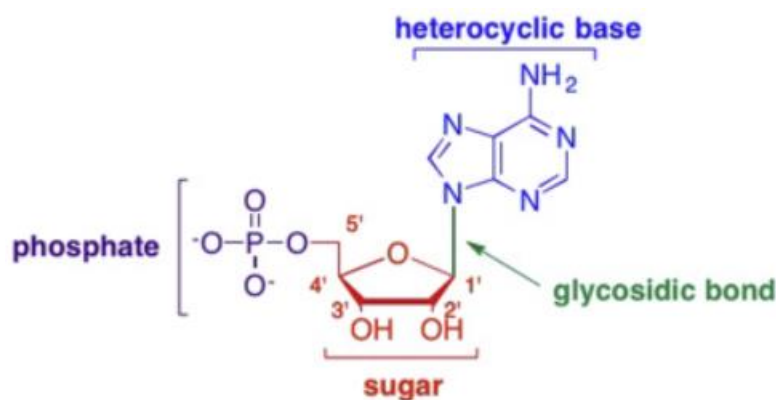
κυτταρομεγαλοϊού (Human Cytomegalovirus, HCMV), με γνωστά νουκλεοζιτικά ανάλογα με εξαιρετική δράση εναντίον του να αποτελούν το Ganciclovir (DHPG), το Valganciclovir (Val-DHPG) και το Cidofovir ((S) – HMPC). Επιπρόσθετα οι επιστήμονες έχουν δείξει τεράστιο ενδιαφέρον για την εύρεση θεραπείας για τον ιό της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV) με το Zidovurine (AZT), το Zalcitabine (ddC), το Didanosine (ddI), το Stavudine (d4T), το Lamivudine (3TC), το Emtricitabine (FTC), το Abacavir (ABC), και το Tenofovir disoproxil fumarate (TDF, Bis(POC)PMPA) είναι γνωστά για τη δράση τους ενάντια στον ρετροϊό. Τέλος, το Lamivudine (3TC), το Ribavirin, Entecavir (ETV) και το Adefovir dipivoxil (Bis(POM)PMEA) έχουν εξαιρετικά ιαματικά αποτελέσματα ενάντια στους ιούς της ηπατίτιδας B και C (Hepatitis Virus) (Εικόνα 8) (Mathé & Gosselin, 2006). Αξίζει να επισημανθεί ότι οι νουκλεοζιτικά ανάλογα ενάντια στον HIV στοχεύουν την αντίστροφη μεταγραφή και την αναστολή της. (Cihlara & Rayb, 2010).



Εικόνα 8: Ανάλογα νουκλεοζιτών που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ικών μολύνσεων (Mathé & Gosselin, 2006)

1.8 Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως παρουσιάζουν τεράστιο βιολογικό ενδιαφέρον γι' αυτό και οι επιστήμονες προσπαθούν να βρουν αντικές και αντικαρκινικές θεραπείες μέσω διαρκών τροποποιήσεων τους. Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται κατά κύριο λόγο από μια ετεροκυκλική ένωση, τη βάση (πουρίνη ή πυριμιδίνη), το σάκχαρο και μία φωσφορική ομάδα. Οι τροποποιήσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν στο νουκλεοζίτη ποικίλουν. Μπορούν να είναι στη βάση, στο σάκχαρο, στη φωσφορική ομάδα ή στο γλυκοζιτικό δεσμό. Για παράδειγμα η γεμισταβίνη περιέχει δύο φθοροομάδες στον C-2' του σακχάρου, η φλουξοριδίνη μια φθοροομάδα στον C-2 άνθρακα της βάσης ενώ έχουν γίνει πολλές τροποποιήσεις στην φωσφορική ομάδα η οποία συνήθως αντικαθίσταται πλήρως από μια υδροξυλομάδα. Τέλος, τα τελευταία χρόνια γίνονται νουκλεοζίτες που το άζωτο στη θέση 9 της βάσης αντικαθίσταται με άνθρακα και έτσι δεν υπάρχει ο γλυκοζιτικός δεσμός (Εικόνα 9) (Seley-Radtke & Yates, 2018).



Εικόνα 9: Πιθανές θέσεις τροποποίησης ενός νουκλεοζίτη (Seley-Radtke & Yates, 2018).

1.9 Φούρανο-νουκλεοζίτες

Οι φούρανο-νουκλεοζίτες έχουν συγκεντρώσει τα βλέμματα πάνω τους εδώ και αρκετές δεκαετίες κυρίως λόγω του γεγονότος ότι οι πεντόζες αποτελούν το δομικό λίθο τόσο των ριβονουκλεοτιδίων όσο και των δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Αρκετές φουρανόζες έχουν επιδείξει εξαιρετική αντική δράση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ζιδοβουδίνη γνωστή και ως αζιδοθυμιδίνη (AZT) η οποία αποτέλεσε την πρώτη πραγματικά αποτελεσματική θεραπεία ενάντια στον HIV. Επιπλέον, οι φουρανόζες είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές και ενάντια στον ιό του απλού έρπητα τύπου 1 και τύπου 2 (HSV-1, HSV-2) (McGuigan et al., 1999, Ivanof & Aleksandrova, 2013).

Από την άλλη οι φούρανο-νουκλεοζίτες φαίνεται να αντιμετωπίζουν αποτελεσματικά και ορισμένες μορφές καρκίνου. Εκτός των προαναφερθέντων φουρανο-νουκλεοζιτών οι οποίοι χρησιμοποιούνται από τα μέσα του προηγούμενου αιώνα, μεταξύ των οποίων η Γεμισταβίνη και η Κλαδριβίνη, η 1-(3'-C-αιθυλο-β-D-ριβο-πεντοφουρανοζυλο) ανάλογο της κυτοσίνης (ECyd), αποτελεί ένα πολύ ελπιδοφόρο ανάλογο ως αναστολέας της RNA πολυμεράσης (Hattori et al., 1996) αλλά ταυτόχρονα φαίνεται να βελτιώνει σε πολύ μεγάλο βαθμό και την αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπειών μιας και μπλοκάρει τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (Kazuno et al., 2009).

1.10 3'-δέοξυ-νουκλεοζίτες

Οι 3' δέοξυ νουκλεοζίτες φαίνεται να έχουν ενδιαφέρουσα βιολογική δράση έναντι συγκεκριμένων ιών, ενώ και η αντικαρκινική τους δράση είναι αξιοσημείωτη. Όσον αφορά το πρώτο, επειδή τα 3'-δέοξυ παράγωγα διατηρούν κανονικά την υδροξυλομάδα στον C-2' αναγνωρίζονται με μεγάλη ευκολία και εξειδίκευση από την RNA πολυμεράση. Στην περίπτωση του ιού της ηπατίτιδας C (HCV), καθώς και του ιού της ιογενούς διάρροιας των βοιδών (BVDV), ο οποίος αποτελεί έναν τέλειο οργανισμό μοντέλο για δοκιμές αναστολέων έναντι στον HCV, παρατηρείται ότι τα 3'-δέοξυ δρουν ως τερματικά στη σύνθεση του RNA του ιού (Hollecker et al., 2004, Lai et al., 2003). Όσον αφορά το δεύτερο, η 3'-δέοξυ αδενοσίνη έχει βρεθεί εδώ και πάνω από πενήντα χρόνια πως αναστέλλει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων KB τόσο στο *B. subtilis* όσο και σε ποντικούς. (Walton et al., 1964).

1.11 Υποδοχείς αδενοσίνης και 8-βρωμο-αδενίνη

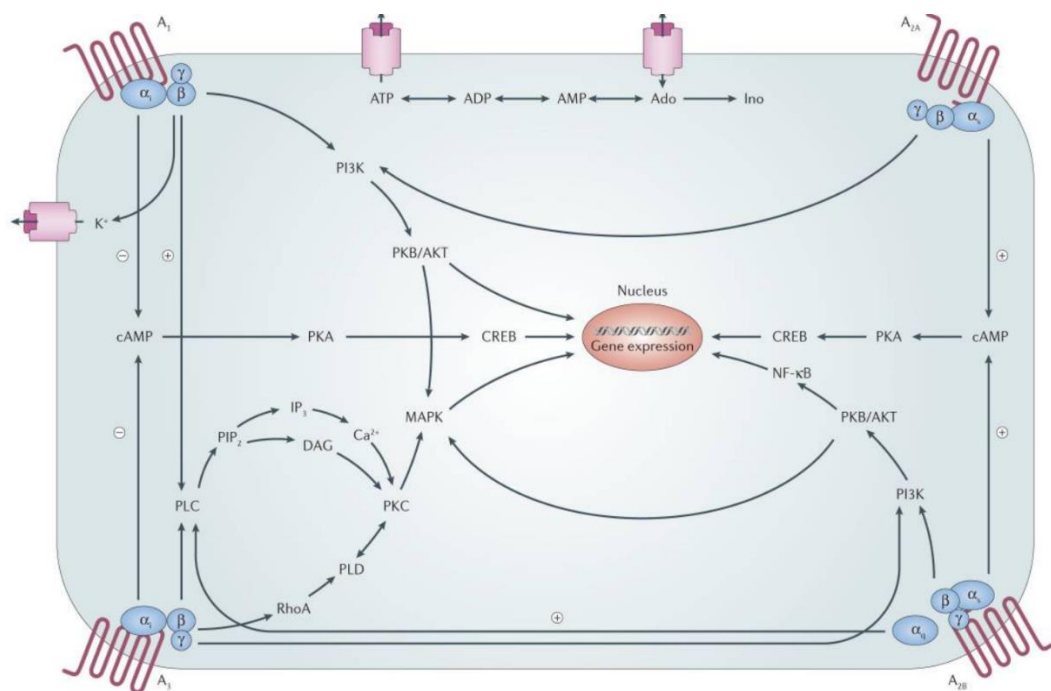
Η αδενίνη όπως τονίστηκε και προηγουμένως είναι μία πουρίνη και μία εκ των τεσσάρων βάσεων του DNA και του RNA, ενώ αποτελεί και μία εκ των πιο πολυσύχναστων ετεροκυκλικών ενώσεων στους οργανισμούς (Conejo-Garcia et al., 2010). Εκτός αυτού η αδενίνη αποτελεί θεμελιώδες συστατικό διαφόρων συμπαραγόντων που έχουν καθοριστικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου, όπως το νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NADH), το φλαβινο-αδενινο-νουκλεοτίδιο και η τριφωσφορική αδενίνη (ATP), η οποία θεωρείται και ως το ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου, καθώς είναι αυτή που είναι υπεύθυνη για την αποθήκευση της ενέργειας στα έμβια όντα. (Sund, 1970, Lodish et al., 2000, Rajendran et al., 2016)

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τέσσερις υπότυποι των υποδοχέων της αδενοσίνης (ARs), οι οποίοι είναι οι A₁, A_{2A}, A_{2B} και A₃. Και οι τέσσερις υπότυποι ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων συνδεδεμένων με G πρωτεΐνες (GPCR). Η εξωτερική αδενοσίνη δρα ως ρυθμιστής και γενικά έχει ως επί το πλείστον κυτταροπροστατευτική δράση στον οργανισμό. Η προστασία και η επιδιόρθωση των

ιστών πραγματοποιείται σε τέσσερα βασικά επίπεδα: αυξάνει τα επίπεδα παρεχόμενου οξυγόνου προς οξυγόνο που απαιτείται, προστατεύει σε σημαντικό βαθμό από την ισχαιμική βλάβη που μπορεί να προκληθεί, συμβάλει τα μέγιστα στην επαγωγή αντιφλεγμονώδους αντίδρασης και τέλος προωθεί την αγγειογένεση. Από εκεί και πέρα κάθε υποδοχέας έχει το δικό του μοναδικό ρόλο.

Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του A_1 υποδοχέα συμβάλλει στην αναστολή της δράσης της αδενυλικής κυκλάσης (cAMP) και σε δεύτερο χρόνο στην αυξημένη δράση της φωσφολιπάσης C (PLC). Στους καρδιακούς μύες και νευρώνες η ενεργοποίηση των A_1 υποδοχέων ενεργοποιεί κανάλια ασβεστίου, τα οποία επιφέρουν και την μείωση του καρδιακού ρυθμού. Από την άλλη, οι υποδοχείς A_3 και αυτοί με τη σειρά τους αναστέλλουν την αδενυλική κυκλάση (cAMP) και κατ'επέκταση βοηθάνε στην ενεργοποίηση της PLC και την εκροή ιόντων Ca^{2+} . Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται αρκετά μεγάλη αποσιώπηση της ισχαιμικής βλάβης.

Αντιθέτως, οι υποδοχείς της αδενοσίνης A_2A και A_2B έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούν τόσο το μονοπάτι της PLC όσο και της cAMP, ενώ ταυτόχρονα βοηθάνε και στο σχηματισμό της φωσφορικής ινοσιτόλης αυξάνοντας τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Αξίζει να τονιστεί ότι και οι 4 διαφορετικοί υπότυποι υποδοχέων εν τέλη ενεργοποιούν την mitogen-activated protein kinase (MAPK), η οποία βοηθάει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην κυτταρική επιβίωση, τον κυτταρικό θάνατο και την κυτταρική διαφοροποίηση (Εικόνα 10) (Jacobson & Gao, 2006).

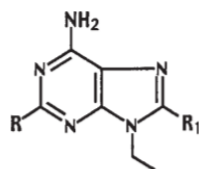


Εικόνα 10: Μονοπάτια που επηρεάζονται από την ενεργοποίηση των Ars (Gessi et al., 2011)

Όλα τα παραπάνω δείχνουν ότι οι υποδοχείς αδενοσίνης διαδραματίζουν έναν σπουδαίο ρόλο στη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Είναι γνωστό εδώ και χρόνια ότι οι υποδοχείς αδενοσίνης εμπλέκονται σε μια πληθώρα ειδών καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού εντοπίστηκαν αυξημένοι A_1 υποδοχείς, οι οποίοι συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη του όγκου. Από την άλλη οι υποδοχείς A_{2A} προάγουν την αγγειογένεση μέσω της αύξησης του VEGF κάτι που μπορεί να συμβάλλει στην αιμάτωση και στην επιβίωση των όγκων καθώς και στη μετάσταση στους καρκίνους του πνεύμονα, του μαστού, του εντέρου, του προστάτη και του εντέρου. Αντιθέτως, στην περίπτωση του μελανώματος, οι υποδοχείς A_{2A} επάγουν τη δράση της κασπάσης 3 και 9 και κατ'έπекταση της απόπτωσης των καρκινικών αυτών κυττάρων. Ο υποδοχέας A_{2B} όπως και ο A_{2A} συμβάλλει στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και αιμάτωση δείχνοντας ότι ανταγωνιστές για αυτούς τους υποδοχείς σε ορισμένες μορφές καρκίνου θα οδηγούσαν στον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Τέλος, οι υποδοχείς A_3 μέσω της υπερενεργοποίησης της Akt και MAPK συμβάλλουν στην αύξηση του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1α σε συνθήκες υποξίας, οι οποίες εντοπίζονται κυρίως σε όγκους. Ο HIF-1α με τη σειρά του βοηθάει στην ανεξέλεγκτη μεταγραφή (Gessi et al., 2011)

Εκτός των προαναφερθέντων οι υποδοχείς αδενοσίνης συσχετίζονται με μια μεγάλη πληθώρα ασθενειών όπως διάφορες νόσους του καρδιοαγγειακού συστήματος (αρρυθμίες, ισχαιμία) (Zablocki et al., 2004, Auchampach et al., 1997), με το Parkinson (Ferre et al., 1991) και με διαταραχές του πνεύμονα (άσθμα) (Holgate et al., 2005). Όλα τα προηγούμενα δείχνουν την ανάγκη για την εύρεση τόσο αγωνιστών όσο και ανταγωνιστών των υποδοχέων αδενοσίνης και οι τροποποιημένες αδενοσίνες αποτελούν αυτή τη στιγμή εξαιρετικούς υποψηφίους.

Η προσθήκη του βρωμίου στη C-8 θέση της αδενίνης έδειξε αρκετά μεγάλη αύξηση συγγένειας της τροποποιημένης αδενίνης σε σχέση με τη βάση που δεν περιείχε στη θέση βρώμιο ή περιείχε κάποιον άλλον υποκαταστάτη. Πιο συγκεκριμένα, σε πρώτη φάση η προσθήκη του βρωμίου στη θέση C-8 έδωσε τη μικρότερη K_i απ'όλες τις υπόλοιπες υποκαταστάσεις στη θέση C-8 για τον υποδοχέα A_{2A} της αδενοσίνης ($K_i = 0,05$), ενώ τη δεύτερη μεγαλύτερη συγγένεια για τον υποδοχέα A_1 ($K_i = 0,28$). Αντιθέτως, η προσθήκη του βρωμίου αν και έδειξε εξαιρετικά αποτελέσματα για την πρόσδεση στους δύο προηγούμενους υποδοχείς δεν ήταν ανάλογα τα αποτελέσματα για τον υποδοχέα A_3 ($K_i = 27$) (Εικόνα 11) (Cristalli et al., 1998).



Compound	R	R ₁	Human A ₁ [³ H]CCPA	Human A _{2A} [³ H]NECA	Human A ₃ [³ H]NECA
DPCPX	H	H	0.004	0.004	0.051
EA	H	H	7.4	2.2	>100
8-BEA	H	Br	0.28	0.05	27
2-PEOEA	O(CH ₂) ₂ Ph	H	0.17	0.12	7.2
2-PEAEA	NH(CH ₂) ₂ Ph	H	0.33	0.15	3.15
2-HEEA	C=C(CH ₂) ₂ CH ₃	H	0.55	0.42	2.30
8-HEEA	H	C=C(CH ₂) ₂ CH ₃	2.3	0.44	0.62
2-PEEA	C=CPh	H	0.79	0.34	0.52
8-PEEA	H	C=CPh	1.3	0.50	0.086

Εικόνα 11: Συγγένεια τροποποιημένων αναλόγων αδενίνης στη θέση C-2 και C-8 για τους υποδοχείς A₁, A₂ και A₃. Οι τιμές δίνονται σε μM (Cristalli et al., 1998)

Σε επόμενες έρευνες μελετήθηκε η προσθήκη βρωμίου στον C-8 της αδενίνης, αφού ήταν πλέον γνωστή η ικανότητα του να βελτιώνει την πρόσδεση στους υποδοχείς αδενοσίνης. Η απουσία και η προσθήκη βρωμίου στον C-8 της αδενίνης σε συνδυασμό με μια πληθώρα τροποποιήσεων στη θέση C-2 έδειξε τον κομβικό ρόλο του αλογόνου. Τόσο ο συνδυασμός του βρωμίου με τις C-2 τροποποιήσεις όσο και η παρουσία του βρωμίου από μόνη της απέδειξαν την εξαιρετική δράση του. Τα καλύτερα αποτελέσματα αφορούν και πάλι στον υποδοχέα A_{2A} όπου απουσία τροποποίησης και στις δύο θέσεις η τιμή της K_i είναι 2.200, με την προσθήκη του βρωμίου μειώνεται σε 52, ενώ παρουσία και των C2 υποκαταστατών μειώνεται ακόμα παραπάνω φτάνοντας την τιμή 19 για τον υποκαταστάση Ph-CH₂-CH₂NH και την τιμή 1,7 για τον υποκαταστάση PhC-CH₂-CH₂O. Παράλληλα τεράστιο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ύπαρξη μεγάλης εκλεκτικότητας για τον υποδοχέα A_{2A} έναντι του A₃ παρουσία του βρωμίου μιας και ο λόγος K_i(A₃)/K_i(A_{2A}) κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 163 και 538. (Εικόνα 12) (Lambertucci et al., 2007).

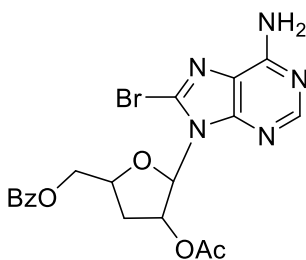
		K _i (nM)						
Cp	R ₂	R ₁	K _i (A ₁) ^a	K _i (A _{2A}) ^a	K _i (A _{2B}) ^a	K _i (A ₃) ^a	A ₁ /A _{2A}	A ₃ /A _{2A}
1	H	H	7,440 (4,220-13,120)	2,200 (1,400-3,530)	> 30,000	> 100,000	3	
2	H	Br	280 (250-320)	52 (24-110)	840 (630-1,100)	28,000 (22,000-35,000)	5	538
4	Ph-CH ₂ CH ₂ NH	H	330 (250-510)	150 (110-210)	2,400 (1,400-4,000)	3,200 (2,400-4,100)	2	21
6	Ph-CH ₂ CH ₂ NH	Br	150 (120-180)	19 (6-60)	690 (250-1,900)	3,100 (1,000-6,600)	8	163
5	Ph-CH ₂ CH ₂ O	H	170 (130-230)	120 (70-220)	45,800 (29,800-70,500)	7,150 (2,950-17,300)	1	60
7	Ph-CH ₂ CH ₂ O	Br	23 (23-24)	1.7 (1.4-2.2)	569 (440-734)	1,090 (685-1,720)	14	640

Εικόνα 12: Συγγένεια τροποποιημένων αναλόγων αδενίνης παρουσία και απουσία Br στη θέση C-8 για τους υποδοχείς A₁, A_{2A}, A_{2B} και A₃ (Lambertucci et al., 2007).

2.Σκοπός

Όλα τα παραπάνω φανερώνουν πως οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες αποτελούν ακρογωνιαίο λίθο στην προσπάθεια καταπολέμησης μιας πληθώρας ασθενειών και αποτελούν υποψηφίους με σημαντικό βιολογικό ενδιαφέρον. Για το σκοπό αυτό στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιείται η σύνθεση ενός τροποποιημένου τόσο στη βάση όσο και στο σάκχαρο νουκλεοζιτικού αναλόγου της αδερίνης. Ειδικότερα, στο σάκχαρο προστίθεται μια ακέτυλο-ομάδα στον C-2', μια βενζόυλο-ομάδα στον C-5' και αφαιρείται το υδροξύλιο (-OH) από τον άνθρακα 3. Όσον αφορά την αδερίνη πραγματοποιείται μια προσθήκη βρωμίου (-Br) στη θέση 8.

Για τη σύνθεση του τελικού μορίου πραγματοποιήθηκε ένας μεγάλος αριθμός αντιδράσεων και ο σχηματισμός αρκετών ενδιάμεσων μορίων, τα οποία συλλέχθηκαν με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές και ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών.



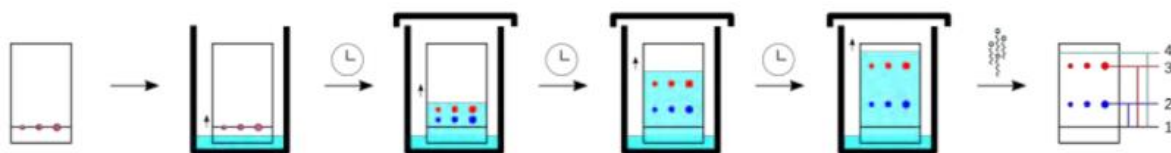
Εικόνα 13: Συντακτικός τύπος του τροποποιημένου νουκλεοζιτικού αναλόγου της αδερίνης που παρουσιάζεται στην πτυχιακή εργασία

3. Τεχνικές

3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography)

Η μέθοδος TLC αποτελεί μια ποιοτική μέθοδο ανάλυσης της καθαρότητας μια ένωσης ή ενός μείγματος, ενώ βοηθάει και στο να εκτιμηθεί εάν μια αντίδραση έχει ολοκληρωθεί ή όχι. Σε αυτήν διαχωρίζονται κατά βάση μη πτητικές ή μετρίως πτητικές ενώσεις πάνω σε ένα αδρανές στερεό που βρίσκεται πάνω σε μια λεπτή πλάκα αλουμινίου, το οποίο αποτελεί τη στατική φάση της χρωματογραφίας, ενώ στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε έναν οργανικό διαλύτη ή συχνότερα μείγμα οργανικών διαλυτών, που αποτελούν την κινητή φάση. Η στατική φάση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, όπως επισημάνθηκε, αποτελείται από μια πολύ λεπτή πλάκα αλουμινίου, η οποία έχει επιστρωθεί με προσροφητικό υλικό Silica gel (Merck Kieselgel 60 F254) και το πάχος της ανέρχεται στα 0,2mm.

Κατά την έναρξη χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας, τοποθετείται μικρή ποσότητα δείγματος περίπου 2cm από τη βάση της πλάκας, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 13. Στη συνέχεια η πλάκα αυτή τοποθετείται σε έναν θάλαμο όπου προηγουμένως έχει τοποθετηθεί η επιθυμητή ποσότητα διαλυτών, το οποίο δεν διαβρέχει τα σημεία όπου προστέθηκαν τα δείγματα και κλείνεται αεροστεγώς. Με το πέρασμα του χρόνου όπως φαίνεται τα ροζ σημεία χωρίζονται σε δύο διαφορετικά σημεία, ένα μπλε και ένα κόκκινο. Η πλάκα αφαιρείται λίγο πριν οι διαλύτες διαβρέξουν μέχρι πάνω την πλάκα. Όπως κάποια σημεία έχουν τρέξει πιο ψηλά σε σχέση με άλλα. Αυτό συμβαίνει γιατί τα μπλε σημεία είναι πιο άπολα και αλληλεπιδρούν λιγότερο με τη στατική φάση (Silica), η οποία είναι πολική. Αντιθέτως, τα κόκκινα σημεία είναι πιο πολικά και καθυστερούν να τρέξουν στο TLC, λόγω των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται με τη στατική φάση. Εφόσον αφαιρεθεί η πλάκα από το θάλαμο οπτικοποιείται στο UV (254nm). Στις ενώσεις που δεν εμπεριέχονται αρωματικοί δακτύλιοι και δεν γίνονται ορατές στο UV, η πλάκα ψεκάζεται με 30% v/v H₂SO₄ και στη συνέχεια με τη βοήθεια θέρμανσης. Τέλος, ο συντελεστής κατακράτησης ή επιβράδυνσης (R_f) είναι η απόσταση που διένυσε μια ένωση προς τη συνολική απόσταση που διαβρέχθηκε από τον διαλύτη (Εικόνα 12) (Reich & Schibli, 2007).

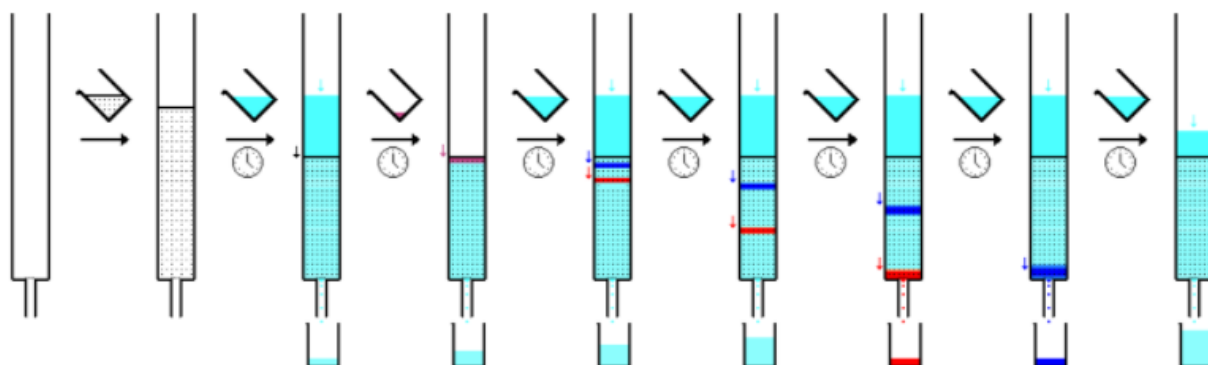


Εικόνα 14: Αναπαράσταση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (Reich & Schibli, 2007)

3.2 Χρωματογραφία στήλης (Column Chromatography)

Στην οργανική χημεία έπειτα από την περάτωση μιας αντίδρασης είναι αναγκαίο η επιθυμητή ουσία να παραληφθεί καθαρή απαλλαγμένη από προσμίξεις και παραπροϊόντα. Η στήλη χρωματογραφίας αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον καθαρισμό ενώσεων. Όπως και στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας που αναφέρθηκε προηγουμένως, η τεχνική στηρίζεται στην ύπαρξη μιας στατικής και μιας πολικής φάσης. Η στατική φάση στην προκειμένη περίπτωση είναι Silica gel (240-400, Merckgrade), η οποία είναι πολική και τη στατική φάση, η οποία αποτελείται από το σύστημα των διαλυτών, οι οποίοι είναι πιο άπολοι. Η χρωματογραφία στήλης μπορεί να γίνει είτε με τη βοήθεια της βαρύτητας (gravity chromatography) είτε με τη βοήθεια αέρα υπό πίεση (flash chromatography) για την επιτάχυνση της διαδικασίας.

Κατά την έναρξη της διαδικασίας προστίθεται στη στήλη χρωματογραφίας η επιθυμητή ποσότητα Silica gel και στη συνέχεια το επιλεγόμενο σύστημα διαλυτών. Η περιττή ποσότητα διαλυτών ίσα-ίσα μέχρι το σημείο να είναι διαβρεγμένος κάθε κόκκος της στατικής φάσης. Μετά προστίθεται η ποσότητα του διαλύματος που επιθυμείται να διαχωριστεί και συλλέγεται ο νεκρός όγκος. Προστίθεται σύστημα διαλυτών και συλλέγονται κλάσματα της ποσότητας που εκλούεται. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 13 η ροζ ουσία με το πέρασμα του χρόνου διαχωρίζεται σε δύο ενώσεις, την κόκκινη και τη μπλε. Η κόκκινη ως πιο άπολη εξέρχεται πρώτη, ενώ η μπλε που συγκρατείται περισσότερο χρονικό διάστημα από τη στήλη εκλούεται αργότερα. Οι δύο ουσίες συλλέγονται σε διαφορετικά κλάσματα και έτσι η επιθυμητή ένωση απομονώνεται καθαρή. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο χρόνος κατακράτησης για κάθε ένωση είναι χαρακτηριστικός και αποτελεί τρόπο ταυτοποίησης μιας ουσίας (Εικόνα 13) (Coskun, 2016)



Εικόνα 15: Απεικόνιση της διαδικασίας της χρωματογραφίας στήλης (Coskun, 2016)

3.3 Ξήρανση διαλυτών

Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων είναι αναγκαία η χρήση άνυδρων διαλυτών. Στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν αναγκαίο κάποιοι διαλύτες να είναι απαλλαγμένοι από υγρασία, όπως το ακετονιτρίλιο (CH_3CN) και το τολουόλιο (PhCH_3), διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2).

Τα δύο πρώτα ξηράθηκαν με τη βοήθεια υδριδίου του ασβεστίου (CaH_2) σε έναν κάθετο ψυκτήρα με θέρμανση υπό αναβρασμό για μία ολόκληρη ημέρα. Από εκεί και έπειτα σε ατμόσφαιρα αζώτου πραγματοποιείται απόσταξη και το κλάσμα που προκύπτει τοποθετείται σε φιάλες παρουσία μοριακών κοσκίων 3\AA (molecular sieves). Η απόσταξη του διχλωρομεθανίου έγινε με τη βοήθεια πεντοοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα απομονώθηκε σε φιάλη που περιείχε μέσα μοριακά κόσκινα 4\AA .

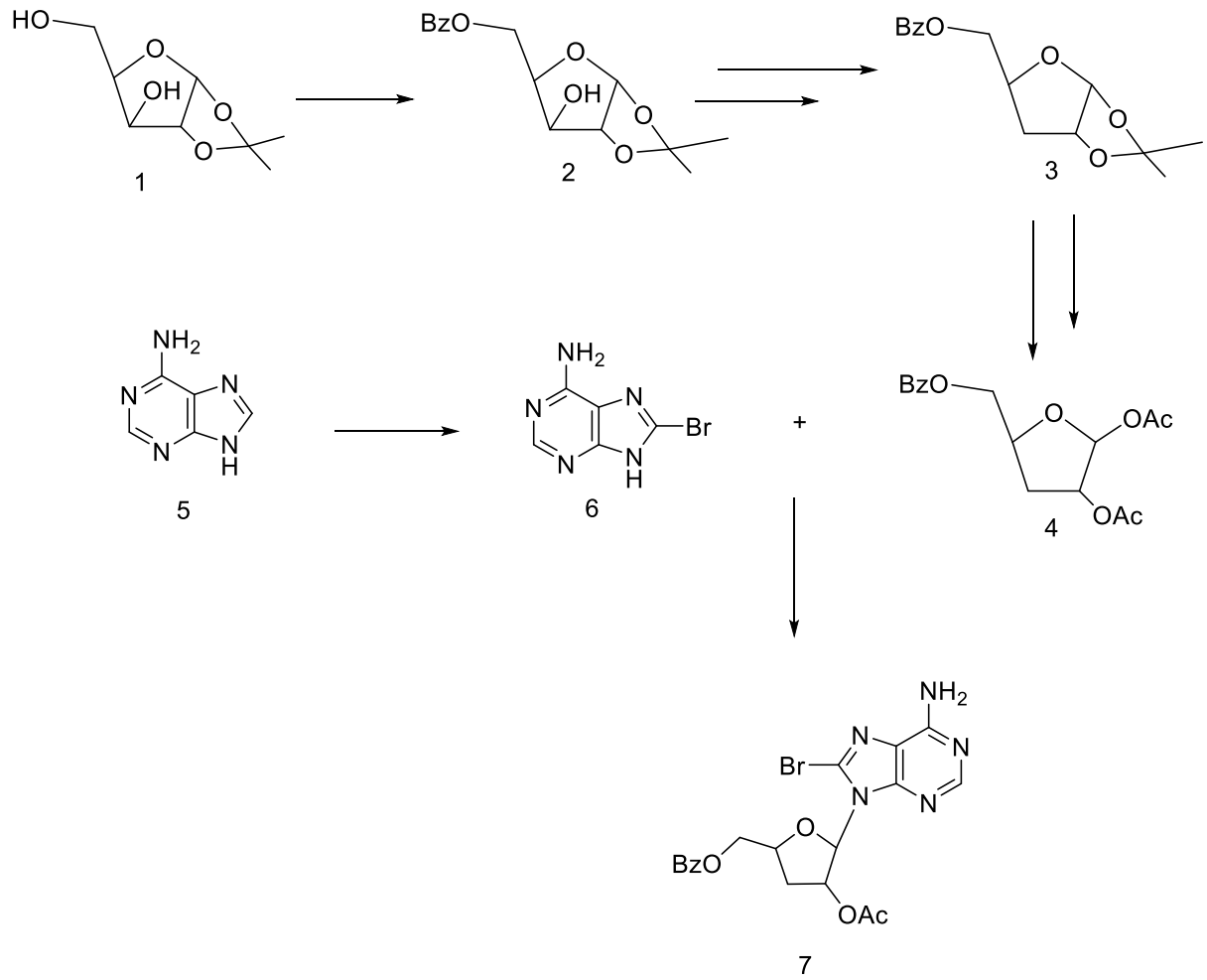
3.4 Ταυτοποίηση ενώσεων

Η φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance) είναι η πλέον ευρέως διαδεδομένη τεχνική για το προσδιορισμό της δομής μιας ένωσης, καθώς αποτυπώνει έναν χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα του σε ένα οργανικό μόριο.

Οι ενώσεις της παρούσας πτυχιακής ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (NMR), με το οποίο ελήφθησαν φάσματα ^1H -NMR με φασματοφωτόμετρο DPX Avance 500 MHz της εταιρείας Bruker. Οι χημικές ενώσεις διαλύθηκαν σε chloroform-d (CDCl_3) και σε methanol-d₄ (CD_2OD). Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS).

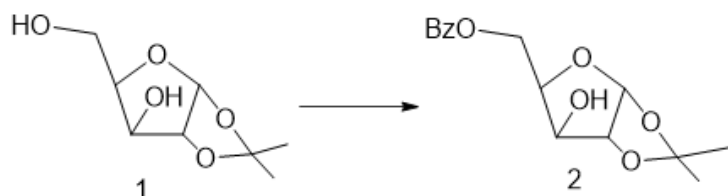
4. Πειραματικό Μέρος

4.1. Επισκόπηση συνθετικής πορείας



4.2 Μεθοδολογία Σύνθεσης

4.2.1. Σύνθεση της 5-βενζύλο-1,2-O-ισοπροπυλίδενο-α-D-ριβοφουρανόζης (2)

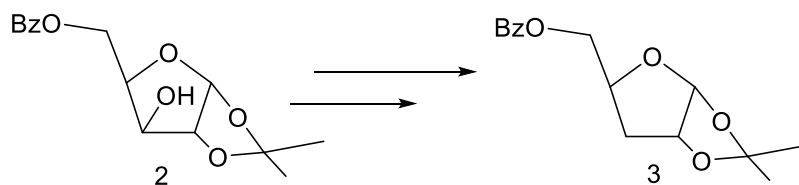


Από την εμπορικά διαθέσιμη 1,2-O-ισοπροπυλίδενο- α -D-ριβοφουρανόζης (1). Σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκε η προστασία του υδροξυλίου του C-5 με την προσθήκη μιας βενζύλο-ομάδας. Για το σκοπό αυτό η ένωση διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2) και στη συνέχεια προστέθηκε τριαιθυλαμίνη (Et_3N) (3eq). Στη συνέχεια προστέθηκε στάγδην βενζύλο-χλωρίδιο στους 0°C (BzCl) (1.2eq). Η αντίδραση παρέμεινε στον πάγο υπό ανάδευση για 30min. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστέθηκε απιονισμένο H_2O ίσο με την ποσότητα του CH_2Cl_2 . Έπειτα, έγινε εκχύλιση με υδατικό διάλυμα NaHCO_3 και CH_2Cl_2 και η οργανική φάση ξηράθηκε με θειικό νάτριο (Na_2SO_4) και συμπυκνώθηκε υπό κενό μέχρι να απομακρυνθεί πλήρως ο διαλύτης. Τέλος, πραγματοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας με αέρα (flash chromatography) σε σύστημα διαλυτών 7 Hexane/3AcOEt για τον καθαρισμό του προϊόντος (2) και πλήρης ξήρανση του.

Πίνακας 1: Αναγραφή συστημάτων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για το TLC, τη χρωματογραφία στήλης, τα R_f του προϊόντος καθώς και η απόδοση της αντίδρασης.

Σύστημα TLC: 6 Hexane/4 AcOEt	$R_f = 0.5$
Σύστημα στήλης: 7 Hexane/3 AcOEt	$R_f = 0.3$
Απόδοση αντίδρασης (α)	$\alpha = 86\%$

4.2.2. Σύνθεση της 5-βενζούλο-3-δέοξυ-1,2-O-ισοπροπυλίδενο-α-D-ριβοφουρανόζης μέσω της δημιουργίας ενδιάμεσου εστέρα (3)

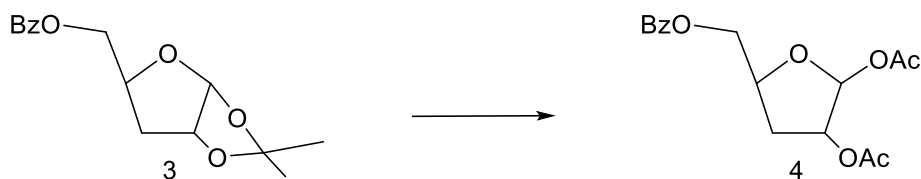


Η σύνθεση του 3-δέοξυ σακχάρου (3) πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, το σάκχαρο (2) διαλύθηκε σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο (dry CH_2Cl_2) και στο διάλυμα προστέθηκε τριαιθυλαμίνη (Et_3N) (8eq) και διμέθυλ-άμινο-πυριδίνη (DMAP) (3eq) και τέλος στάγδην φαινυλ-χλώρο-θειονοφορμαμίδιου (1.2eq) με σκοπό να δημιουργηθεί ο φαινυλοθειονοφορμαμίδιο εστέρας. Η αντίδραση έμεινε για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ακολούθησε αντίδραση αποξυγόνωσης με χρήση υδριδίου του τριβούτυλοκασιτέρου (Bn_3SnH) (2.0eq) παρουσία αζωδης ισοβουτυλονιτριλίου (AIBN) (1.0eq) σε άνυδρο τολουόλιο (dry) στους $100\text{ }^\circ\text{C}$ για 2h. Με το πέρας της αντίδρασης το μείγμα εκχυλίστηκε με NaHCO_3 και CH_2Cl_2 και η οργανική φάση ξηράθηκε με θειικό νάτριο (Na_2SO_4) και συμπυκνώθηκε υπό κενό μέχρι να απομακρυνθεί πλήρως ο διαλύτης. Τέλος, έγινε καθαρισμός του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης με αέρα (flash chromatography) σε σύστημα διαλυτών 9 Hexane/1 AcOEt.

Πίνακας 2: Αναγραφή συστημάτων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για το TLC, τη χρωματογραφία στήλης, τα R_f του προϊόντος καθώς και η απόδοση της αντίδρασης

Σύστημα TLC: 8 Hexane/2 AcOEt	$R_f = 0.6$
Σύστημα στήλης: 9 Hexane/1 AcOEt	$R_f = 0.45$
Απόδοση αντίδρασης (α)	$\alpha = 77\%$

4.2.3. Σύνθεση της 1,2-Ακετυλο-5-βενζουλο-3-δέοξυ-β-D-ριβοφουρανόζης (4)

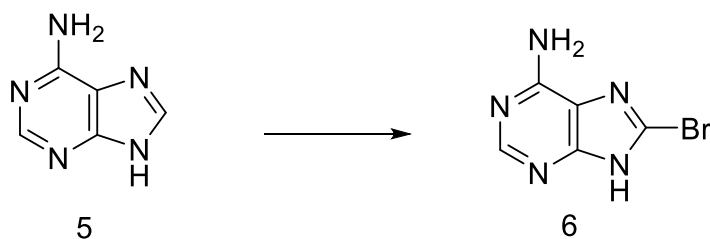


Στο επόμενο βήμα το προϊόν της προηγούμενης αντίδρασης (3) υδρολύεται, με διάλυμα οξικού οξέος και νερού σε αναλογία 80% CH₃COOH / 20% H₂O. Η αντίδραση θερμάνθηκε στους 50°C σε ελαιόλουτρο και παρέμεινε overnight. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC σε 7 AcOEt/3 Hexane. Με σκοπό να απομακρυνθούν πλήρως τόσο το οξικό οξύ όσο και το νερό έγινε εξάτμιση υπό κενό με τολουόλιο, μεθανόλη και AcOEt. Ακολούθησε ακετυλίωση με χρήση οξικού ανυδρίτη (Ac₂O) (15eq) σε πυριδίνη. Η αντίδραση έμεινε overnight σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια απομακρύνεται η πυριδίνη με εξάτμιση υπό κενό τόσο με την προσθήκη τολουόλιου όσο και με την προσθήκη μεθανόλης με σκοπό τη δημιουργία αζεοτροπικού μείγματος για την απομάκρυνση της πυριδίνης. Η πλήρης απομόνωση του προϊόντος (4) ολοκληρώνεται με χρωματογραφία στήλης με αέρα (flash chromatography) με σκοπό τον καθαρισμό του. Το σύστημα της στήλης που χρησιμοποιήθηκε είναι 7 Hexane/3 AcOEt.

Πίνακας 3: Αναγραφή συστημάτων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για το TLC, τη χρωματογραφία στήλης, τα R_f του προϊόντος καθώς και η απόδοση της αντίδρασης

Σύστημα TLC: 7 Hexane/3 AcOEt	R _f = 0.5
Σύστημα στήλης: 7 Hexane/3 AcOEt	R _f = 0.5
Απόδοση αντίδρασης (α)	α = 87%

4.2.4. Σύνθεση της C8-βρωμοαδενίνης (6)

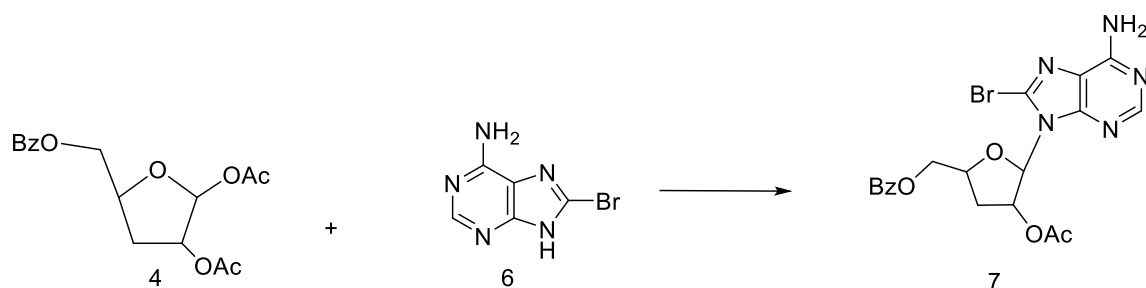


Στη συνέχεια σε φιάλη που περιέχει αδενίνη (5) προστέθηκε νερό έως ότου η αδενίνη να διαλυθεί πλήρως και έπειτα 2.0eq διβρωμοδιμεθυλοντατοίνη (DBMH) και το μείγμα έμεινε για 24h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά έγινε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl), η οργανική φάση συλλέχθηκε, ξηράθηκε με θειικό Νάτριο (Na₂SO₄) και συμπυκνώθηκε μέχρι να απομακρυνθούν πλήρως οι διαλύτες. Στη συνέχεια, για τον πλήρη καθαρισμό της ένωσης ακολουθεί στήλη χρωματογραφίας με αέρα (flash chromatography) με διαλυτές έκλουσης CH₂Cl₂/MeOH (9,5/0,5) και η C8-βρώμο-αδενίνη (6) συλλέχθηκε καθαρή με απόδοση 48%. Τέλος, μετρήθηκε το σημείο τήξης του προϊόντος, το οποίο είναι γνωστό και φανερώνει την καθαρότητα της ένωσης, το οποίο εν τέλει ήταν στους 239°C.

Πίνακας 4: Αναγραφή συστημάτων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για το TLC, τη χρωματογραφία στήλης, τα R_f του προϊόντος, η απόδοση της αντίδρασης καθώς και το σημείο τήξης της 8-βρώμο αδενίνης

Σύστημα TLC: 9,8 CH ₂ Cl ₂ /0,2 MeOH	R _f = 0.2
Σύστημα στήλης: 9,5 CH ₂ Cl ₂ /0,5 MeOH	R _f = 0.4
Απόδοση αντίδρασης (α)	α= 48%
Σημείο τήξης	239°C

4.2.5 Σχηματισμός του νουκλεοζίτη της 8-βρωμοαδενίνης (7)

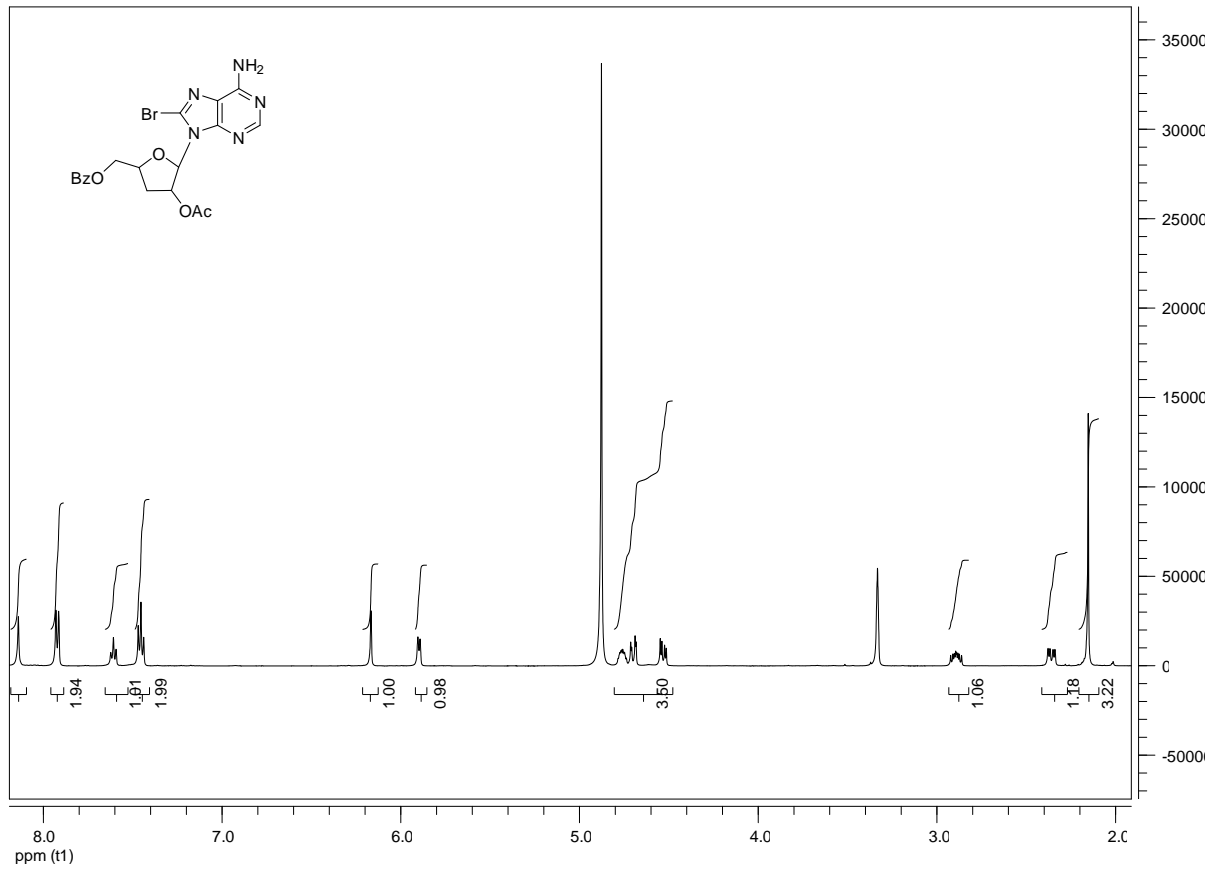


Στο τελικό στάδιο της συνθετικής πορείας πραγματοποιείται η σύνθεση του νουκλεοζίτη της βρωμοαδενίνης (7) έπειτα από αντίδραση του σακχάρου με τη βάση. Πιο συγκεκριμένα το σάκχαρο (5) διαλύεται σε άνυδρο ακετονιτρίλιο (dry CH₃CN) και στη συνέχεια προστίθεται η βάση (6) (1,2eq) ενώ τέλος προστίθεται τετραχλωριούχος κασσίτερος (SnCl₄) (2,2eq). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 100°C, reflux και έμεινε ολόκληρο το βράδυ. Η πορεία της ελέγχθηκε με TLC που έτρεξε σε 9,8 CH₂Cl₂ / 0,2 MeOH. Μετά την διαπίστωση της ολοκλήρωσης της αντίδρασης απομακρύνθηκε το ακετονιτρίλιο με εξάτμιση υπό κενό και έγινε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (AcOEt) και υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO₃). Μετά τη συλλογή της οργανικής φάσης πραγματοποιήθηκε εξάτμιση υπό κενό. Τέλος έγινε χρωματογραφία στήλης με αέρα (flash chromatography) σε σύστημα διαλυτών 9,8 CH₂Cl₂ / 0,2 MeOH.

Πίνακας 5: Αναγραφή συστημάτων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για το TLC, τη χρωματογραφία στήλης, τα R_f του προϊόντος καθώς και η απόδοση της αντίδρασης

Σύστημα TLC: 9,8 CH ₂ Cl ₂ /0,2 MeOH	R _f = 0.2
Σύστημα στήλης: 9,8 CH ₂ Cl ₂ /0,2 MeOH	R _f = 0.2
Απόδοση αντίδρασης (α)	α = 74%

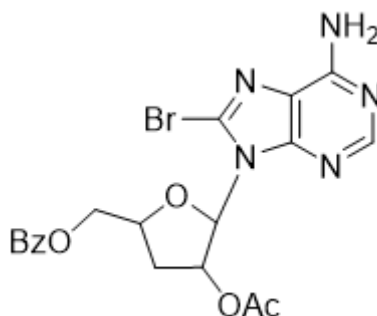
5. Ταυτοποίηση με ^1H NMR



6. Αποτελέσματα – Συζήτηση

Η σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών, όπως έχει ήδη επισημανθεί, έχει διεγείρει σε μεγάλο βαθμό εδώ και δεκαετίες το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς συμβάλλει τα μέγιστα στην καταπολέμηση διαφόρων ειδών καρκίνου (καρκίνος του μαστού) καθώς και στη θεραπεία ιικών ασθενειών (HIV). Γι αυτό το λόγο στην παρούσα πτυχιακή εργασία, η σύνθεση του τροποποιημένου νουκλεοζιτικού αναλόγου είχε ως στόχο την υψηλή κυτταροτοξική δράση ενάντια σε καρκινικές σειρές και ιούς και την ιδιαίτερα χαμηλή κυτταρική δράση έναντι των φυσιολογικών κυττάρων.

Για τη σύνθεση του τελικού μορίου, έγινε μια πληθώρα τροποποιήσεων τόσο στο σάκχαρο του φουρανονουκλεοζίτη όσο και στη βάση. Πιο συγκεκριμένα, έγινε προσθήκη μιας ακετύλο-ομάδας και μιας βενζύλο-ομάδας στον C-2' και C-5' αντίστοιχα ενώ απομακρύνθηκε και ένας υδροξύλιο από τον άνθρακα 3 του σακχάρου. Ακόμη προστέθηκε ένα βρώμιο στη θέση 8 της αδερίνης, το οποίο αναμένεται να αυξήσει κατακόρυφα την πρόσδεση της στους υποδοχείς αδενοσίνης.



Εικόνα 16: Απεικόνιση του τροποποιημένου νουκλεοζίτη της αδερίνης που συντέθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία

Η πειραματική πορεία σε όλη την διάρκεια της είχε ιδιαίτερα υψηλές αποδόσεις και σχετικά εύκολες αντιδράσεις. Για να επιτευχθεί αυτό έλαβαν χώρα αρκετές δοκιμές και πολλές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε άνυδρες συνθήκες (dry) έτσι ώστε να αυξηθούν οι αποδόσεις, να μειωθεί η δημιουργία παραπροϊόντων και να μειωθεί ο χρόνος ολοκλήρωσης της αντίδρασης. Η βελτιστοποίηση όλων των προαναφερθέντων παραμέτρων αποτελούν σημαντικό εφόδιο για τη μελλοντική σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτικών αναλόγων της αδερίνης, καθώς καθίσταται η σύνθεση τους ιδιαίτερα γρήγορη, απλή και με χαμηλό κόστος.

Κατά την πορεία της σύνθεσης, τόσο τα ενδιάμεσα προϊόντα όσο και το τελικό μόριο ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού $^1\text{H-NMR}$.

Σε μελλοντικές εργασίες το νουκλεοζιτικό ανάλογο της αδεΐνης που παρουσιάζεται στην παρούσα πτυχιακή αναμένεται να δοκιμασθεί *in vitro* τόσο σε καρκινικές κυτταρικές σειρές όσο και έναντι ιών.

7. Βιβλιογραφία

- Auchampach, J. A., Rizvi, A., Qiu, Y., Tang, X. L., Maldonado, C., Teschner, S., & Bolli, R. (1997). Selective activation of A3 adenosine receptors with N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide protects against myocardial stunning and infarction without hemodynamic changes in conscious rabbits. *Circulation research*, 80(6), 800–809. <https://doi.org/10.1161/01.res.80.6.800>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, J. G. Jr. & Stryer, L. (2015). *Biochemistry* (8th ed.). W. H. Freeman and Company.
- Bistrović, A., Grbčić, P., Harej, A., Sedić, M., Kraljević-Pavelić, S., Koštrun, S., Plavec, J., Makuc, D., & Raić-Malić, S. (2018). 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*, 33(1), 271–285. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1414807>
- Cihlar, T., & Ray, A. S. (2010). Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antiviral research*, 85(1), 39–58. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.09.014>
- Conejo-Garcia, A., Cruz-Lopez, O., Gomez-Perez, V., Morales, F., Garcia-Rubino, M. E., Kimatrai, M., Nunez, M. C., & Campos, J. M. (2010). Synthesis of Purine Derivatives as Scaffolds for a Diversity of Biological Activities. *Current Organic Chemistry*, 14(20), 2463-2482. DOI: 10.2174/138527210793358240
- Coskun O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Cristalli, G., Camaioni, E., Costanzi, S., Vittori, S., Volpini, R., & Klotz, K. N. (1998). Characterization of potent ligands at human recombinant adenosine receptors, *Drug Dev Res* 45(3-4), 176–181. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2299\(199811/12\)45:3/4<176::AID-DDR14>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2299(199811/12)45:3/4<176::AID-DDR14>3.0.CO;2-G)
- Ferre, S., von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B. B., & Fuxe, K. (1991). Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7238–7241. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7238>

- 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* (1st ed.). Elsevier Ltd.
- Gessi, S., Merighi, S., Sacchetto, V., Simioni, C., & Borea, P. A. (2011). Adenosine receptors and cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(5), 1400–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.09.020>
- Gothelf, K. V., & LaBean, T. H. (2005). DNA-programmed assembly of nanostructures. *Organic & biomolecular chemistry*, 3(22), 4023–4037. <https://doi.org/10.1039/b510551j>
- Hattori, H., Tanaka, M., Fukushima, M., Sasaki, T., & Matsuda, A. (1996). Nucleosides and nucleotides. 158. 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)-cytosine, 1-(3-C-ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)uracil, and their nucleobase analogues as new potential multifunctional antitumor nucleosides with a broad spectrum of activity. *Journal of medicinal chemistry*, 39(25), 5005–5011. <https://doi.org/10.1021/jm960537g>
- Holgate S. T. (2005). The Quintiles Prize Lecture 2004. The identification of the adenosine A2B receptor as a novel therapeutic target in asthma. *British journal of pharmacology*, 145(8), 1009–1015. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706272>
- 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'-deoxypyrimidine 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>
- Huang, P., Chubb, S., & Plunkett, W. (1990). Termination of DNA synthesis by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. A mechanism for cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry*, 265(27), 16617–16625.
- Ivanov, M. A., & Aleksandrova, L. A. (2013). *Bioorganicheskaia khimiia*, 39(1), 26–45. <https://doi.org/10.1134/s1068162013010044>
- Jacobson, K. A., & Gao, Z. G. (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(3), 247–264. <https://doi.org/10.1038/nrd1983>

- Jordheim, L. P., Durantel, D., Zoulim, F., & Dumontet, C. (2013). Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, *12*(6), 447–464. <https://doi.org/10.1038/nrd4010>
- Kazuno, H., Fujioka, A., Fukushima, M., Wataya, Y., Matsuda, A., & Sasaki, T. (2009). 1-(3-C-Ethynyl-beta-D-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd, TAS-106), a novel potent inhibitor of RNA polymerase, potentiates the cytotoxicity of CDDP in human cancer cells both in vitro and in vivo. *International journal of oncology*, *34*(5), 1373–1380.
- 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>
- Lambertucci, C., Vittori, S., Mishra, R. C., Dal Ben, D., Klotz, K. N., Volpini, R., & Cristalli, G. (2007). Synthesis and biological activity of trisubstituted adenines as A_{2A} adenosine receptor antagonists. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, *26*(10-12), 1443–1446. <https://doi.org/10.1080/15257770701542264>
- Lodish H., Berk A., Zipursky L. S., Matsudaira P., Baltimore D., & Darnell J. (2000) *Molecular Cell Biology*, (4th ed). New York : W.H. Freeman, c2000.
- 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>
- McGuigan, C., Yarnold, C. J., Jones, G., Velázquez, S., Barucki, H., Brancale, A., Andrei, G., Snoeck, R., De Clercq, E., & Balzarini, J. (1999). Potent and selective inhibition of varicella-zoster virus (VZV) by nucleoside analogues with an unusual bicyclic base. *Journal of medicinal chemistry*, *42*(22), 4479–4484. <https://doi.org/10.1021/jm990346o>
- Mikhailopulo, I. A., & Miroshnikov, A. I. (2010). New trends in nucleoside biotechnology. *Acta naturae*, *2*(2), 36–59.
- Mirza A. Z. (2019). Advancement in the development of heterocyclic nucleosides for the treatment of cancer - A review. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, *38*(11), 836–857. <https://doi.org/10.1080/15257770.2019.1615623>
- Nitrogenous bases, Nucleosides and Nucleotides. (2020, January 5). Retrieved July 28, 2021, from <https://chem.libretexts.org/@go/page/100582>

- 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)
- Périgaud C., Gosselin G., & Imbach J. L. (1992) Nucleoside Analogues as Chemotherapeutic Agents: A Review. *Nucleosides & Nucleotides*, 11(2-4), 903-945. DOI: 10.1080/07328319208021748
- Prusoff, W. H., Lin, T. S., & Zucker, M. (1986). Potential targets for antiviral chemotherapy. *Antiviral research*, 6(6), 311–328. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(86\)90014-8](https://doi.org/10.1016/0166-3542(86)90014-8)
- Rajendran, M., Dane, E., Conley, J., & Tantama, M. (2016). Imaging Adenosine Triphosphate (ATP). *The Biological bulletin*, 231(1), 73–84. <https://doi.org/10.1086/689592>
- Reich, E., & Schibli, A. (2007). *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal* (1st ed.) Springer, US.
- Schaffer F.L. (1979) Caliciviruses. In: Fraenkel-Conrat H., Wagner R.R. (eds) *Comprehensive Virology*. *Comprehensive Virology*, vol 14. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3563-4_4
- 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>
- Sund H. (1970). Pyridine nucleotide-dependent dehydrogenases a report of an advanced study Institute held at the University of Konstanz, Germany, September 15-20, 1969. *FEBS letters*, 8(6), 309–315. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80001-y](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80001-y)
- Wade, L. G. Jr. (2006). *Organic Chemistry* (6th ed.). Pearson Education, Inc.
- Wagner, C. R., Iyer, V. V., & McIntee, E. J. (2000). Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Medicinal research reviews*, 20(6), 417–451. [https://doi.org/10.1002/1098-1128\(200011\)20:6<417::aid-med1>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1098-1128(200011)20:6<417::aid-med1>3.0.co;2-z)
- 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

Yates, M. K., & Seley-Radtke, K. L. (2019). The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral research*, *162*, 5–21. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.11.016>

Zablocki, J. A., Wu, L., Shryock, J., & Belardinelli, L. (2004). Partial A(1) adenosine receptor agonists from a molecular perspective and their potential use as chronic ventricular rate control agents during atrial fibrillation (AF). *Current topics in medicinal chemistry*, *4*(8), 839–854. <https://doi.org/10.2174/1568026043450998>