

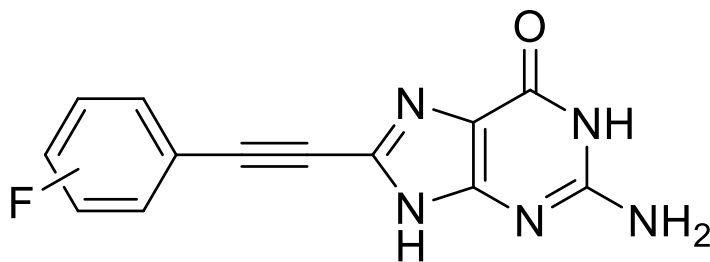


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**C8 ΑΛΚΥΝΥΛΟ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ
ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ
ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ**



Βίζμπα Μαρία-Ιωάννα του Λαζάρου

Λάρισα, Σεπτέμβριος 2021

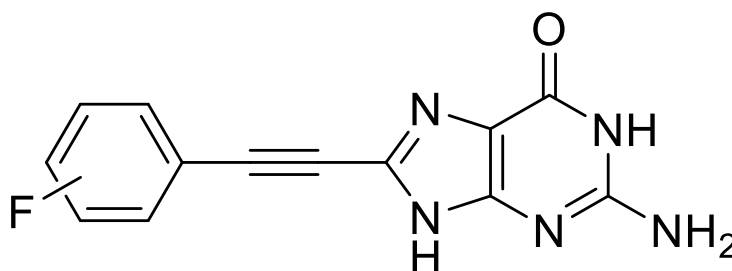


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



DIPLOMA THESIS

**C8 ALKYNYL MODIFICATION ON BASE GOUANINE:
SYTHESIS AND FASMATOSCOPIC IDENTIFICATION**



Vizmpa Maria-Ioanna
Larisa, September 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΟΜΙΩΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Οργανικής Χημείας,
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΜΟΣΙΑΛΟΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας
Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΟΛΛΑΤΟΣ: Ακαδημαϊκός Υπότροφος στο εργαστήριο
Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Επιβλέπων καθηγητής ήταν ο κ. Κομιώτης Δημήτριος τον οποίο και θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε στην ανάθεση του πειράματος και για τις εποικοδομητικές του υποδείξεις.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τον ακαδημαϊκό υπότροφο Δρ. Νικόλαο Κολλάτο, για την υποστήριξη και τη βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος, καθώς και για όλες τις πολύτιμες συμβουλές του αποτέλεσαν εφόδια για την διεξαγωγή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Χρήστο Μήτσο, τόσο για την στήριξή του όσο και για τις συμβουλές που μου έδινε όλο αυτό το διάστημα της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Πίνακας περιεχομένων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ	9
1.2 ΠΟΥΡΙΝΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ.....	12
1.3 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΤΗ ΒΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	13
1.3.1 8-ΧΛΩΡΟ-ΑΔΕΝΟΣΙΝΗ.....	13
1.3.2 ΦΛΟΥΡΑΔΑΒΙΝΗ	14
1.4 ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	14
1.4.1 ΤΡΙΚΙΡΙΒΙΝΗ.....	15
1.4.2 ΒΑΛΑΚΥΚΛΟΒΙΡΗ/ ΒΑΛΑΝΓΚΙΚΛΟΒΙΡΗ.....	15
1.5 ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΓΟΥΑΝΙΝΗ	16
1.6 C8 ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΓΟΥΑΝΙΝΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΕ ΔΟΜΕΣ G- quadruplex.....	18
1.7 C8 ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΓΟΥΑΝΙΝΗ ΚΑΙ Z-DNA.....	20
2. ΣΚΟΠΟΣ	23
3. ΜΕΘΟΔΟΙ	24
3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, TLC).....	24
3.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (COLUMN CHROMATOGRAPHY,CC)	25
3.3 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	26
3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ	26
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
4.1 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ	27
4.2 ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ	28
4.2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ C8-ΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ.....	28
4.2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ C8-2-ΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ.....	29
4.2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ C8-3-ΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ.....	30

4.2.4	ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ C8-4-ΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ.....	31
4.2.5	ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ C8-3,5-ΔΙΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ.....	32
4.2.6	ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ C8-3,4-ΔΙΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ.....	33
5.	ΦΑΣΜΑΤΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕ ^1H -NMR.....	34
5.1	^1H -NMR ΤΗΣ C8-3-ΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ.....	34
5.2	^1H -NMR ΤΗΣ C8-3,4-ΔΙΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ.....	35
6.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	36
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	38

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί ιδιαίτερα στα τροποποιημένα νουκλεοτιδικά ανάλογα, κυρίως, λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων που εμφανίζουν. Η συνεισφορά των παραπάνω αναλόγων, και πιο συγκεκριμένα η κατηγορία αυτών που φέρουν δομικές τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης, αποτελούν ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο καθώς εμφανίζουν σημαντική αντικαρκινική και αντιική δράση. Πολλές τέτοιες ενώσεις έχουν συντεθεί και έχουν αξιολογηθεί για τις πιθανές βιολογικές τους ιδιότητες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η πορεία για την σύνθεση νέων αναλόγων πουρινών, και πιο συγκεκριμένα της γουανίνης, με τροποποίηση στη βάση, ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί και αντιϊκοί παράγοντες. Αναλύονται οι συνθετικές οδοί που ακολουθήθηκαν, οι μέθοδοι που πραγματοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα ταυτοποίησής τους.

ABSTRACT

In recent years, researchers have turned their attention to modified nucleotides, mainly because of their therapeutic properties. The contribution of these analogues and more specifically the class of those that have structural modifications to the base segment, are an important field of research as they exhibit significant anti-cancer and antiviral activity. Many such compounds have been synthesized and evaluated for their potential biological properties.

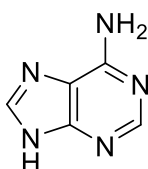
In this diploma thesis, is described the synthesis of new, base modified purine analogues, and more specifically guanine, as potential anti-cancer and antiviral agents. The synthetic pathways that followed, the methods that performed and the results of their identification are analyzed in that work.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

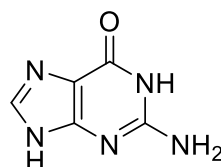
1.1 ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ

Τα νουκλεϊκά οξέα, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA), αποτελούν τα μόρια-φορείς της γενετικής πληροφορίας ενός κυττάρου. Απαντώνται με τη μορφή μακρών, γραμμικών πολυμερών τα οποία σχηματίζουν μακρομόρια. Τα μακρομόρια απαρτίζονται από μεγάλο αριθμό νουκλεοτιδίων τα οποία ενώνονται μεταξύ τους. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από ένα σάκχαρο, μια φωσφορική ομάδα και μια βάση. Η σύνδεση μεταξύ των νουκλεοτιδίων, για τον σχηματισμό των μακρομορίων, πραγματοποιείται μεταξύ της 5' υδροξυλικής ομάδας (5-OH) του σακχάρου, η οποία έχει εστεροποιηθεί με μια φωσφορική ομάδα και συνδέεται στην 3' υδροξυλική ομάδα (3'OH) του γειτονικού σακχάρου (Stryer 1997).

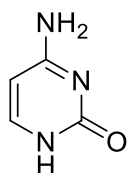
Το σάκχαρο στο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ είναι η δεοξυριβόζη, ενώ στο ριβονουκλεϊκό οξύ είναι η ριβόζη. Το συνθετικό δέοξυ- προσδιορίζει ότι το 2'-C του σακχάρου δεν έχει το άτομο του οξυγόνου που βρίσκεται συνδεδεμένο στο 2'-άτομο C της ριβόζης. Το DNA περιέχει τέσσερις διαφορετικές αζωτούχες βάσεις, 2 υποκατεστημένες πουρίνες (αδενίνη και γουανίνη) και 2 υποκατεστημένες πυριμιδίνες (κυτοσίνη και θυμίνη). Η αδενίνη, η γουανίνη και η κυτοσίνη αποτελούν επίσης δομικά συστατικά των μορίων RNA, όμως αντί για θυμίνη στα μόρια RNA υπάρχει μία άλλη, δομικά παρόμοια, πυριμιδινική βάση που ονομάζεται ουρακίλη (Keenan et al. 2017).



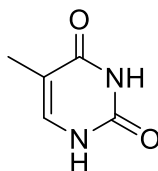
(α) Αδενίνη (A)



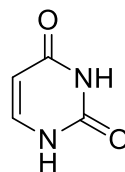
(β) Γουανίνη (G)



(γ) Κυτοσίνη (C)



(δ) Θυμίνη (T)



(ε) Ουρακίλη (U)

Εικόνα 1: Απεικόνιση των πουρινών αδενίνη (α) και γουανίνη (β), και των πυριμιδινών κυτοσίνη (γ), ουρακίλη (δ) και θυμίνη (ε).

Το ενδιαφέρον των επιστημόνων για τους νουκλεοζίτες και τα νουκλεοτίδια, αυξήθηκε ιδιαίτερα γρήγορα κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1940, όπου διεξήχθη εις βάθος μελέτη της χημικής σύνθεσης και των βιολογικών ιδιοτήτων αυτής της κατηγορίας ενώσεων. Τα νουκλεοτιδικά και νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν μακρά και πλούσια ιστορία στον τομέα της φαρμακευτικής χημείας. Αντιπροσωπεύουν ένα μοναδικό σημείο εκκίνησης για τον σχεδιασμό φαρμάκων λόγω της συμμετοχής τους σε πολυάριθμες κρίσιμες βιολογικές διεργασίες καθώς και του γεγονότος ότι χρησιμεύουν ως βασικά δομικά στοιχεία τόσο για τη σύνθεση του DNA όσο και του RNA. (Seley-Radtke, Yates 2018).

Το παραπάνω οδήγησε στη δημιουργία αναλόγων με ακόμα πιο σημαντικές βιολογικές καθώς και φαρμακευτικές ιδιότητες. Έκτοτε, έχει δημιουργηθεί σημαντικός αριθμός αναλόγων τα οποία έχουν υποστεί τροποποιήσεις στον ετεροκυκλικό δακτύλιο της βάσης (Mikhailopulo & Miroshnikov 2010). Ανάλογα αυτών των προδρόμων νουκλεοτιδίων έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν μια σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών παραγόντων. Υπάρχουν συνολικά 14 παράγωγα πουργινών και πυριμιδινών που έχουν εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία του καρκίνου (Πίνακας 1), τα οποία αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό ποσοστό όλων των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του καρκίνου έως σήμερα. Μερικές από τις πρώτες ενώσεις που εγκρίθηκαν από τον FDA για τη θεραπεία του καρκίνου ήταν η 6-μερκαπτοπουρίνη η οποία εγκρίθηκε το 1953 για τη θεραπεία της παιδικής λευχαιμίας, όπου εξακολουθεί να αποτελεί πρότυπο θεραπείας για αυτήν την ασθένεια. Υπάρχουν πολλά παράγωγα τα οποία αξιολογούνται επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές (Parker 2009).

Η συνεισφορά των νέων αναλόγων στην αντιμετώπιση διαφόρων νόσων και ο ουσιαστικός ρόλος που διαδραματίζουν ως ισχυροί αντικοικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες σε συνδυασμό και με τις πρόσφατες εγκρίσεις του FDA, αποδεικνύουν ότι ο σχεδιασμός και η σύνθεση τους αποτελεί μια κρίσιμη συνθήκη για την επίλυση παγκόσμιων ζητημάτων υγείας, όπως ο καρκίνος και διάφορες μολυσματικές ασθένειες (Seley-Radtke, Yates 2018).

Table 1. FDA Approved Purine and Pyrimidine Antimetabolites

drug	date approved
5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine)	2006
O ⁶ -methylarabinofuranosyl guanine (nelarabine)	2005
2'-fluoro-2'-deoxyarabinofuranosyl-2-chloroadenine (clofarabine)	2004
5-aza-cytidine (vidaza)	2004
N ⁴ -pentylloxycarbonyl-5'-deoxy-5-fluorocytidine (capecitabine)	1998
2,2-difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine)	1996
2-chloro-2'-deoxyadenosine (cladribine)	1992
arabinofuranosyl-2-fluoroadenine (fludarabine)	1991
2'-deoxycoformycin (pentostatin)	1991
5-fluoro-2'-deoxyuridine (floxuridine)	1970
arabinofuranosylcytosine (cytarabine)	1969
6-thioguanine	1966
5-fluorouracil	1962
6-mercaptopurine	1953

Πίνακας 1: Εγκεκριμένοι από τον FDA αντιμεταβολίτες πουρινών και πυριμιδινών.

1.2 ΠΟΥΡΙΝΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ

Οι πουρίνες είναι ετεροκυκλικές αρωματικές ενώσεις που αποτελούνται από συνδεδεμένους δακτυλίους πυριμιδίνης και μιδαζόλης έχοντας στις θέσεις 1,3,7 και 9 από ένα άτομο αζώτου (McMurry 2016). Είναι οι πιο καταναεμημένες ενώσεις αυτού του τύπου στην φύση. Στα θηλαστικά, η πιο κοινή έκφραση των πουρινών βρίσκεται με τη μορφή DNA και RNA που περιέχουν τις πουρίνες, αδερίνη και γουανίνη.

Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα των πουρινών (purines nucleoside analogs- PNA) έχουν χημική δομή παρόμοια με την αδενοσίνη ή τη γουανοσίνη, ωστόσο, ο μηχανισμός τους και ο τρόπος δράσης τους είναι διαφορετικά. Κατόπιν διεξαγωγής μελετών, κλινικών δοκιμών και εργαστηριακών πειραμάτων διαπιστώθηκε πως η σύνθεση διαφόρων παραγώγων πουρινών μπορεί να αντιμετωπίσει με επιτυχία διάφορες μορφές καρκίνου, καθώς και να αποτελέσει ισχυρό σύμμαχο στη θεραπεία ιικών μολύνσεων. (Robak and Robak 2012).

Οι ενώσεις που βασίζονται σε πουρίνη έχουν βρει νέες εφαρμογές ως ανταγωνιστές των υποδοχέων αδενοσίνης, ως αναστολείς των HSP90, της Src κινάσης, MAP κινασών, φωσφοδιεστερασών και των Cdk. Η δοκιμή παραγώγων πουρίνης έναντι πλήθους βιολογικών στόχων αποτελεί ένα φυσικό αντανεκλαστικό των ερευνητών (Legraverend & Grierson 2006).

Από τις δραστηριότητες που παρατηρήθηκαν για διάφορους αναστολείς με βάση την πουρίνη, είναι σαφές ότι με τη διαμόρφωση της θέσης και της φύσης των υποκαταστατών στον δακτύλιο πουρίνης είναι δυνατή η βελτιστοποίηση της ισχύος και της επιλεκτικότητας σε μια δεδομένη οικογένεια ενζύμων και σε σχέση με άλλους στόχους πρωτεΐνης. Έτσι λοιπόν, οι C-8-υποκατεστημένες πουρίνες έχουν αναπτυχθεί ως αναστολείς φωσφοδιεστερασών και της πρωτεΐνης HSP90 και ως ανταγωνιστές των υποδοχέων αδενοσίνης.

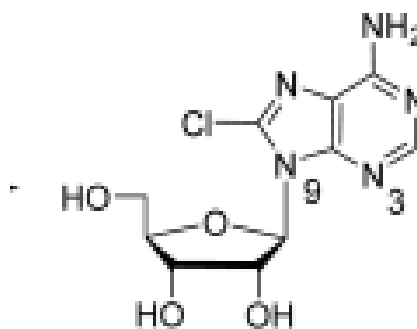
Αποτελέσματα μελετών απέδειξαν την ικανότητα των παραγώγων πουρίνης με μοτίβα αρυλίου σε διαφορετικές θέσεις δακτυλίου να περιορίζουν τη δραστηριότητα των κινασών Lck και p38 MAPK ενώ η παρουσία ενός υποκαταστάτη στη θέση C-8 μειώνει δραματικά τη δράση των Cdk. Οι εξαρτώμενες από κυκλίνη κινάσες (Cdk) είναι κινάσες Ser/Thr οι οποίες παίζουν βασικό ρόλο ως ρυθμιστές των διαφόρων φάσεων του κυτταρικού κύκλου.

1.3 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΤΗ ΒΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Είναι γνωστό πως τα ανάλογα πουρινών χρησιμεύουν ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες (Plunkett and Gandhi 2001, Elion 1989, Denny and Wilman 1990). Μεγάλος αριθμός αναλόγων πουρινών χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διαφόρων καρκίνων ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι αποτελούν μια σημαντική κατηγορία αντικαρκινικών μέσων καθώς επηρεάζουν τη σύνθεση του DNA με διάφορους τρόπους (Sharma et. al., 2021). Πιο συγκεκριμένα για τη φαρμακευτική αντιμετώπιση πολλών νεοπλασιών χρησιμοποιούνται αντιμεταβολίτες οι οποίοι στοχεύουν στην παρεμπόδιση σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Παρακάτω, παρατίθενται ορισμένα ανάλογα πουρινών και οι βιολογικές δράσεις τους (Shelton et al. 2016).

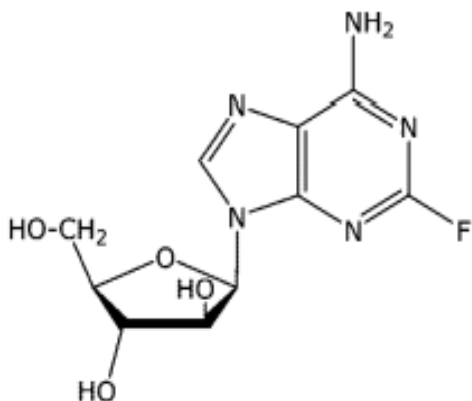
1.3.1 8-ΧΛΩΡΟ-ΑΔΕΝΟΣΙΝΗ

Η 8-χλώρο-αδενοσίνη επηρεάζει την κυτταρική ενέργεια μειώνοντας τα επίπεδα του ενδοκυττάρου ATP, οδηγώντας σε αναστολή σύνθεσης του RNA. Επιπλέον, η RNA πολυμεράση II την ενσωματώνει στο mRNA με αποτέλεσμα την αναστολή της πολυαδενυλίωσης των mRNA μεταγραφών. Η έκθεση σε 8-χλώροαδενοσίνη έχει βρεθεί ότι μειώνει το επίπεδο της κυκλίνης E σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, μειώνει το επίπεδο των υποδοχέων της κινάσης τυροσίνης MET σε κύτταρα με πολλαπλό μύελωμα και το επίπεδο της Mcl-1 σε κύτταρα με χρόνια λεμφοβλαστική λευχαιμία. Τα παραπάνω συμβαίνουν, μέσω μηχανισμών απόπτωσης που επάγονται από την 8-χλώρο-αδενοσίνη.



Εικόνα 2: Χημική δομή της 8-χλώρο-αδενοσίνης.

1.3.2 ΦΛΟΥΡΑΔΑΒΙΝΗ



Εικόνα 3: Χημική δομή της φλουδαραβίνης.

Η αραβινοφουρανοσιλαδενίνη (αρα-A βιδαραβίνη) υπάρχει από τη δεκαετία του 1960 και έχει μελετηθεί εκτενώς για τα αντικαρκινικά της αποτελέσματα. Η 5'-μονοφωσφορική φλουδαραβίνη αποτελεί παράγωγο της ara-A (Fludara ή φωσφορική φλουδαραβίνη) και χρησιμοποιείται ως φάρμακο κατά της χρόνιας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Κλινικές δοκιμές οδήγησαν στην έγκριση του φαρμάκου από τον FDA το 1991.

1.4 ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Τα ανάλογα των πουρινών παρεμβάλλονται στην σύνθεση του DNA και του RNA και μπορούν να επηρεάσουν τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών, παρέχοντας έτσι ένα ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντικών φαρμάκων. (Zhou et al. 2004, Perigaund et al. 1993). Οι κύριοι στόχοι τους είναι τα ενδοκυτταρικά βιοσυνθετικά μονοπάτια και η επιλεκτικότητά τους οφείλεται στην αναστολή ενζύμων που σχετίζονται ή προκαλούνται από ιούς που εμπλέκονται στον μεταβολισμό νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδίων. Η δράση των αναλόγων πουρινών έναντι των ιών στηρίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασής τους με τις ιικές πολυμεράσες. Κατά αυτόν τον τρόπο αποτελούν μέχρι και σήμερα τον θεμελιώδη λίθο για την ανάπτυξη αντικών παραγωγών.

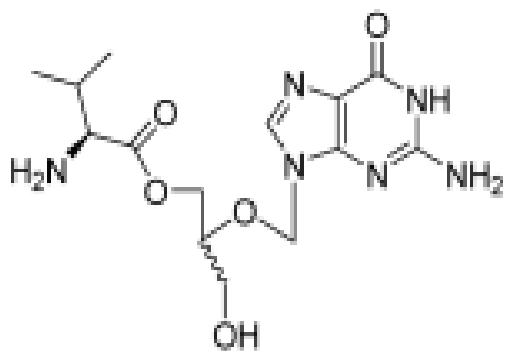
Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα παρατίθενται παρακάτω (Shelton et al. 2016).

1.4.1 ΤΡΙΚΙΡΙΒΙΝΗ

Το 1971, οι Schram και Townsend συνέθεσαν την τρικιριβίνη, ένα τρικυκλικό παράγωγο ενός νουκλεοσιδίου πουρίνης ως πιθανό αντικαρκινικό φάρμακο, το οποίο έχει επίσης μελετηθεί ως αντιρετροϊκός παράγοντας κατά του HIV-1 και του HIV-2. Η τρικιριβίνη ασκεί τη δράση της αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση των Akt1, Akt2 και Akt3 επηρεάζοντας την οδό κυτταρικής επιβίωσης PI3K/ Akt/ mTOR. Το μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR ρυθμίζει, μεταξύ άλλων, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων. Οι αντικές δραστηριότητες του μεταβολίτη τρικιριβίνης φαίνεται να σχετίζονται με την αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης Akt.

1.4.2 ΒΑΛΑΚΥΚΛΟΒΙΡΗ/ ΒΑΛΑΝΓΚΙΚΛΟΒΙΡΗ

Η υδροχλωρική βαλακυκλοβίρη και η υδροχλωρική βαλανγκικλοβίρη αποτελούν προφάρμακα της ακυκλοβίρης και της γανσικλοβίρης, αντίστοιχα. Ο μηχανισμός δράσης του έγκειται στο ότι μπλοκάρουν τη σύνθεση του ιικού DNA. Πραγματοποιήθηκε η έγκριση τους από τον FDA το 2009 και το 2010, αντίστοιχα, ενώ χρησιμοποιούνται ως φάρμακα σε θεραπείες λοιμώξεων από κυτταρομεγαλοϊό και τον ιό του έρπητα, αντίστοιχα.



Εικόνα 4: Υδροχλωρική Βαλανγκικλοβίρη

1.5 ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΓΟΥΑΝΙΝΗ

Το ενδιαφέρον των ερευνητών για τα ανάλογα πουρινών εμφανίστηκε γρήγορα στο προσκήνιο καθώς η δομική τροποποίηση των βάσεων πουρίνης είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη χιλιάδων βιολογικά ενεργών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων πολλών κλινικά χρησιμοποιούμενων φαρμάκων (Came & Caliguirri 1982, Kaufman et al. 1962). Η υποκατηγορία πουρινών που παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της πιθανής βιολογικής δραστηριότητάς της περιλαμβάνει την υποκατάσταση σε διάφορες θέσεις του άνθρακα (θέσεις 2, 6 και 8) στο ετεροκυκλικό τμήμα της βάσης (Hocsek 2003). Περαιτέρω μελέτες αξιολόγησαν μέσω μιας σειράς μετασχηματισμών του μορίου της γουανίνης τις αντικαρκινικές ιδιότητες των αναλόγων της.

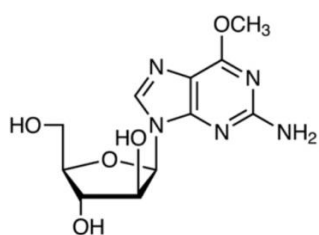
Η 6-θειογουανίνη (6-TG), είναι γνωστή επιστημονικά από τις αρχές της δεκαετίας του 1950 και αποτελεί ένα καλά μελετημένο ανάλογο πουρίνης με χαρακτηριστικά αντικαρκινικής και ανοσοκατασταλτικής δράσης (Munshi et al, Tuncbilek et al. 2018). Αν και χρησιμοποιήθηκε νωρίτερα για τη θεραπεία της οξείας και χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας, η χρήση της 6-θειογουανίνης σε μυελογενείς κακοήθειες αντικαταστάθηκε από νεότερα και πιο αποτελεσματικά ανάλογα, ωστόσο παραμένει βασικό φάρμακο σε θεραπευτικά σχήματα για παιδιά που παρουσιάζουν οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία.

Η Νελαραμπίνη (Nelarabine), (6-μεθοξυ-9-(D-αραβινοφουρανοσυλ) γουανίνη ή 6-μεθοξυ-γουανοσίνη, αποτελεί προ-φάρμακο της 9-D-αραβινοφουρανοσυλγουανίνης (ara-G) και ανήκει στα ανάλογα της γουανοσίνης. Δομικά στη θέση 6 του δακτυλίου της γουανίνης, το υδρογόνο της ομάδας υδροξειδίου έχει αντικατασταθεί από μια ομάδα μεθοξυλίου (Robak et al. 2006).

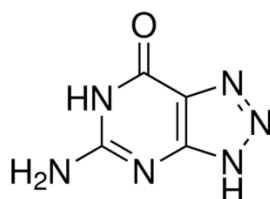
Στο αίμα, η Νελαραβίνη απομεθοξυλιώνεται ταχέως σε Ara-G και ο ενεργός μεταβολίτης της αποτελεί υπόστρωμα για τις DNA πολυμεράσες. Η ενσωμάτωση στο DNA προκαλεί αναστολή των πολυμερασών, με αποτέλεσμα αναστολή της αντιγραφής του DNA οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης.

Το 2005, η νελαραμπίνη εγκρίθηκε από τον FDA για τη θεραπεία της υποτροπιάζουσας οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας ενώ αποτελεί έναν ισχυρό παράγοντα για τη θεραπεία αιματολογικών κακοηθειών με μεγάλη αποτελεσματικότητα.

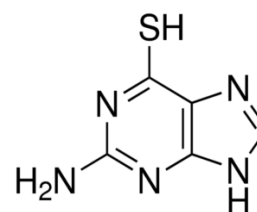
Η 8-Αζαγουανίνη αποτελεί τον πρώτο αντιμεταβολίτη νουκλεϊκού οξέος που έδειξε ανασταλτική δράση σε ανάπτυξη όγκων. (Sartorelli et al). Σε έρευνα των Kidder et al αποδείχθηκε ότι αναστέλλει την ανάπτυξη του αδενοκαρκινώματος E 0771 και των μαστικών καρκινωμάτων σε ποντίκια. Το ανάλογο της 8-αζαγουανίνης έχει παρόμοια δομή με τη γουανίνη, με τη διαφορά ότι έχει γίνει αντικατάσταση του άνθρακα στη θέση 8 από ένα άτομο αζώτου. Μία από τις κυριότερες επιδράσεις του AzG είναι η αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Η πρωτεϊνική σύνθεση παρεμποδίζεται ως συνέπεια της ενσωμάτωσης του αναλόγου στο αγγελιοφόρο RNA (mRNA).



Νελαραμπίνη



8-Αζαγουανίνη



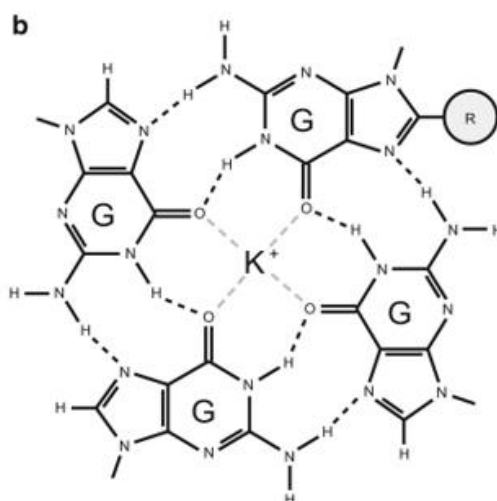
6-Θειογουανίνη

Εικόνα 5: Χημική δομή των ενώσεων (α) Νελαραμπίνη, (β) 8-Αζαγουανίνη και (γ) 6-Θειογουανίνη.

1.6 C8 ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΓΟΥΑΝΙΝΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΕ ΔΟΜΕΣ G-quadruplex.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1960, ταυτοποιήθηκαν δομές του DNA οι οποίες εμφάνιζαν υψηλό ποσοστό περιεκτικότητας σε γουανίνη. Οι παραπάνω αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων πλούσιες σε γουανίνη μπορούν να διπλωθούν σε τέσσερις διαφορετικές δομές που ονομάζονται G-τετραπλές (G- quadruplex) (Davis 2004, Patel et al. 2007, Neidle 2009). Περιοχές με πιθανότητα σχηματισμού G4-DNA έχουν αναγνωριστεί σε αλληλουχίες ενισχυτών αρκετών πρωτο-ογκογονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των c-MYC και c-KIT12,13. Έχει προταθεί ότι το G4-DNA που σχηματίζεται κατά τη μεταγραφή θα μπορούσε αποτελέσει στόχο για ένα μικρό μόριο που θα εμπόδιζε την γονιδιακή έκφραση κατά τη σύνδεση (Maizels, 2006).

Έχουν μελετηθεί εκτενώς τροποποιήσεις στις δομές των G-quadruplex που αφορούν την εισαγωγή τροποποιημένων γουανινών στον άνθρακα της θέσης C8. Σε έρευνα των Lech et al. τα αποτελέσματα της αντικατάστασης μιας γουανίνης με C8 υποκατεστημένα παράγωγα, συμπεριλαμβανομένων των 8-βρώμο-γουανίνη, 8-Ο-μεθυλο-γουανίνη, 8-αμινο-γουανίνη και 8-οξο-γουανίνη έδειξαν ότι οι επιπτώσεις των αντικαταστάσεων στη σταθερότητα του G-quadruplex εξαρτώνται από τον τύπο και τη θέση της τροποποίησης μεταξύ διαφορετικών γουανινών. Η 8-μεθυλο-γουανίνη (Xu & Sugiyama 2006) παρουσίασε την τάση να αυξάνει τη θερμική σταθερότητα του G-quadruplex ενώ έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την κινητική των δομών G-quadruplex (Gros et al. 2007, Tran et al. 2011).

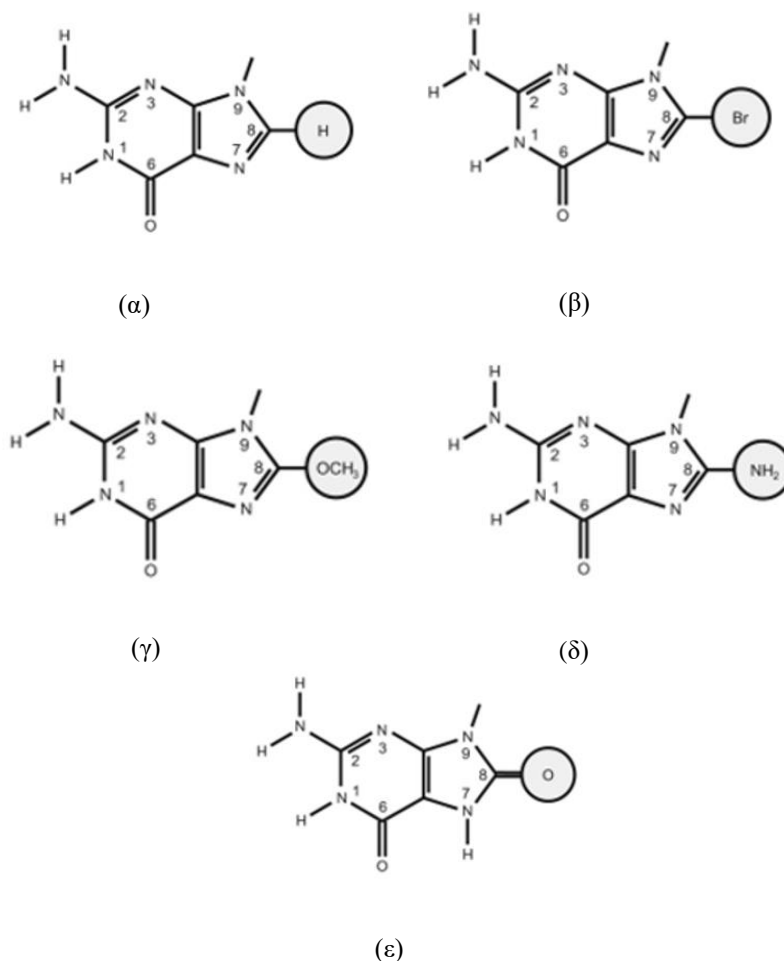


Εικόνα 6 : Απεικόνιση τροποποιημένου Q-quadruplex με C8 υποκατεστημένη γουανίνη. Όπου R=ομάδα υποκατάστασης.

Με τα στοιχεία για τους in vivo ρόλους των G-quadruplexes να αυξάνονται, οι επιδράσεις των C8 τροποποιημένων παραγώγων σε αυτές τις δομές είναι φυσιολογικής σημασίας, λαμβάνοντας υπόψη τις πολύαριθμες C8 τροποποιήσεις της γουανίνης που προτείνεται να διαδραματίσουν σημαντικούς ρόλους συμπεριλαμβανομένης της 8-οξο-γουανίνης (Grollman & Moriya 1993, David et al. 2007), 8-αμινο-γουανίνης (Tan et al. 1999, Venkatarangan et al. 2001) και 8-μεθυλο-γουανίνη (Shrivastav et al. 2010).

Από τεχνική άποψη, η διερεύνηση των επιπτώσεων διαφόρων C8 τροποποιημένων παραγώγων στα G-quadruplexes θα ανοίξει τον δρόμο για την εύρεση της αποτελεσματικότερης εφαρμογής τους για την επίτευξη των επιθυμητών ιδιοτήτων των G-quadruplexes, καθιστώντας τα πιθανούς θεραπευτικούς στόχους.

Μέχρι και σήμερα, έχουν ανακαλυφθεί τροποποιημένες G-quadruplex αλληλουχίες με αντι-HIV (Wyatt et al. 1994, Jing et al. 2000, Soultrait et al 2002, Phan et al. 2005), και αντικαρκινικές (Bates et al. 1999, Simonsson & Henriksson 2002, Jing, Li et al. 2004) δραστηριότητες.



Εικόνα 7 : Χημικές δομές της γουανίνης και των αναλόγων της στα G-quadruplex:

α) Γουανίνη, β) 8-βρώμο-γουανίνη, γ) 8-O-μέθυλο-γουανίνη, δ) 8-άμινο-γουανίνη, ε) 8-οξο-γουανίνη.

1.7 C8 ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΓΟΥΑΝΙΝΗ ΚΑΙ Z-DNA

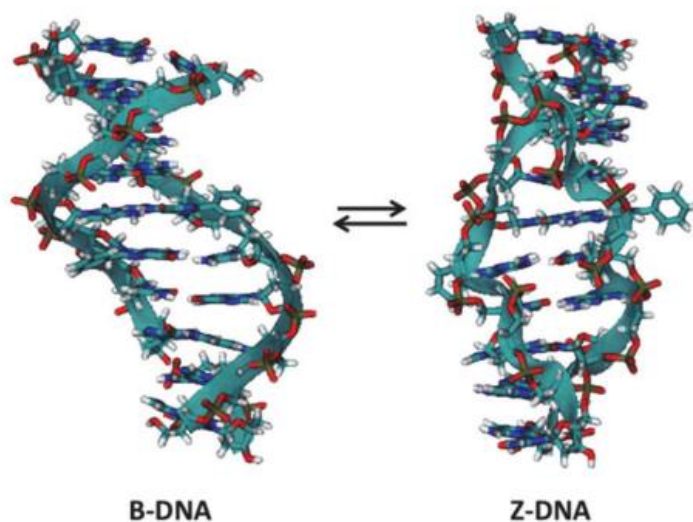
Το 1979, σε έρευνα τους, ο Rich και οι συνεργάτες του ανακάλυψαν μια διπλή έλικα του DNA με δύο αντιπαράλληλες αλυσίδες που συγκρατούνται μεταξύ τους από ζεύγη βάσεων Watson-Crick, η οποία είχε αριστερόστροφο προσανατολισμό, αντί της δεδομένης δεξιόστροφης διπλής έλικας που ήταν γνωστή έως τότε (B-DNA), και ονομάστηκε Z-DNA.

Ο σχηματισμός Z-DNA συσχετίστηκε με την έκφραση του ογκογονιδίου *c-myc*, καθώς η υπερρύθμιση του έχει συσχετιστεί με την παρουσία του Z-DNA κοντά σε μια περιοχή ενισχυτή ενώ αλληλουχίες με σχηματισμό Z-DNA βρέθηκαν κοντά σε περιοχές ενισχυτών σε κύτταρα U937. Σε μελέτη τους οι Liu et al., διαπίστωσαν ότι η ενεργοποίηση της κυτοκίνης του γονιδίου CSF1 (η πρωτεΐνη του οποίου ελέγχει την παραγωγή, τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των μακροφάγων), περιλάμβανε το σχηματισμό του Z-DNA κοντά σε έναν ενισχυτή, διεγείροντας τη μεταγραφή.

Πρόσφατες μελέτες σχετικά με το Z-DNA οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο και τις ιογενείς λοιμώξεις. Το Z-DNA έχει συνδεθεί με την γονιδιακή έκφραση και μπορεί να οδηγήσει σε γονιδιακή απορρύθμιση, συσχετισμένη με την καρκινογένεση (Vongsutilers, Gannett, 2018).

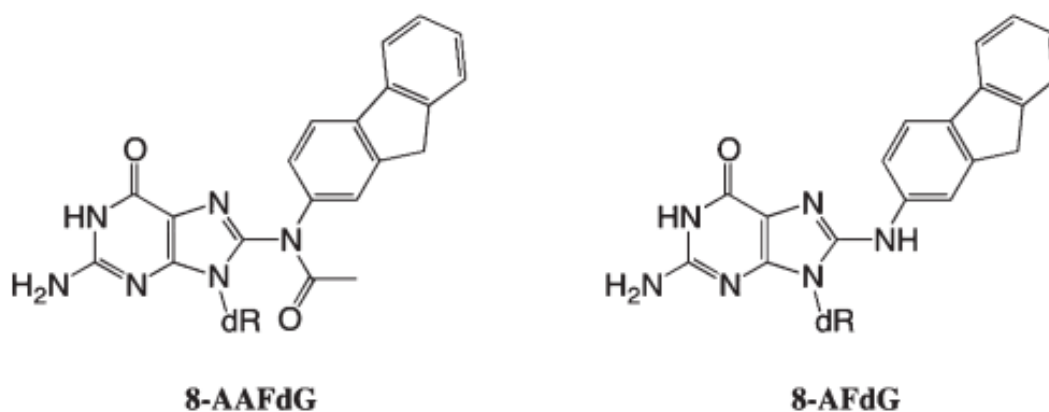
Οι τροποποιήσεις των βάσεων στο Z-DNA βρέθηκαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του ευνοώντας τον σχηματισμό του έναντι του B-DNA. Μια από τις πιο σημαντικές τροποποιήσεις είναι η υποκατάσταση της γουανίνης στη θέση C8. Οποιαδήποτε από αυτές τις τροποποιήσεις, έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί προς τον σχηματισμό αλλά και τη σταθεροποίηση της μορφής Z.

Η C8-φαινυλγουανίνη ήταν το πρώτο ανάλογο της σειράς που αποδείχθηκε ότι είναι αποτελεσματικό στην προώθηση του σχηματισμού Z-DNA. Μεταγενέστερες μελέτες εξέτασαν μια σειρά αναλόγων C8-αρυλουανίνης, με βάση την υποκατάσταση φαινυλίου, στην οποία η παρά θέση του αρυλικού δακτυλίου έφερε μια σειρά υποκαταστατών, συμπεριλαμβανομένων των π -CH₃, π -CH₂OH, π -CH₂OCH₃ και π -COOH. Μεταξύ των πρόσθετων αναλόγων C8-αρυλγουανίνης που μελετήθηκαν, το πρόσθετο π -καρβοξυφαινυλίου ήταν το πιο ισχυρό στην προώθηση του σχηματισμού Z-DNA.



Εικόνα 8 : Η μετάβαση B-Z επαγόμενη από πρόσθετα C8-αρυλγουανίνης.

Επιπλέον, τα προϊόντα που προκύπτουν από την προσθήκη ακετυλαμινοφθορίου (AAF) και αμινοφθορίου (AF) είναι από τις πρώτες τροποποιήσεις C8 γουανίνης που μελετήθηκαν εκτενώς και συσχετίστηκαν με καρκινογένεση. Αυτά τα πρόσθετα έχουν βρεθεί ότι επηρεάζουν τον σχηματισμό του Z-DNA, ευνοώντας τον σχηματισμό του.



Εικόνα 9 : Προσθήκη ακετυλαμινοφθορίου (AAF) και αμινοφθορίου (AF), που μπορούν να προωθήσουν τη μετάβαση B-Z.

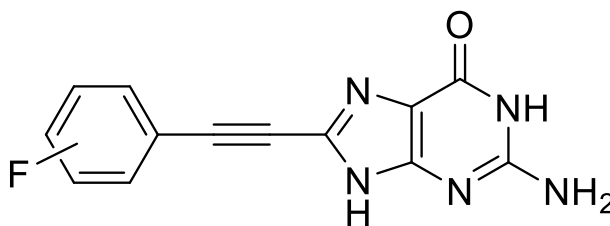
Η βρωμίωση στη θέση C8 της γουανίνης, τέλος, σταθεροποιεί τη διαμόρφωση Z-DNA σε σχέση με το μη βρωμιωμένο αντίστοιχο της γουανίνης. Δεδομένου ότι τα πρόσθετα C8 επηρεάζουν τη διαμορφωτική διασύνδεση B- σε Z-DNA και τείνουν να οδηγήσουν την ισορροπία προς τη μορφή Z, έχει υποθεθεί ότι ανάλογα C8 υποκατεστημένης γουανίνης μπορούν να παίζουν ρόλο στην καρκινογένεση.

Η διαπίστωση εμπλοκής του Z-DNA στη μεταγραφή και αναστολή γονιδίων έχει ενισχύσει τη θεωρία ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή ρύθμιση. Παρόλο που απαιτείται περαιτέρω έρευνα στο παρόν σημείο, πραγματοποιούνται μελέτες ώστε το Z-DNA να χρησιμοποιηθεί αποτελώντας στόχο φαρμάκων. Στο σημείο αυτό, η κατανόηση των επιδράσεων των C8 αναλόγων της γουανίνης στον σχηματισμό και την καρκινογένεση του Z-DNA θα αποτελέσει πλεονέκτημα και θα βοηθήσει στη διαλεύκανση του ρόλου του Z-DNA στον καρκίνο. Τα ανάλογα της C8-γουανίνης, με δράση ως ισχυροί επαγωγείς του Z-DNA, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλείο για την αποκρυπτογράφηση και την κατανόηση σχετικά με τις λειτουργίες και τον βιολογικό ρόλο του Z-DNA αποτελώντας εφόδιο για την ανακάλυψη και τον σχεδιασμό φαρμάκων με βάση το Z-DNA.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η ανάγκη για την εύρεση νέων θεραπευτικών μέσων, με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες παρενέργειες καθώς και η συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε και οδήγησε στη μελέτη και τη σύνθεση πληθώρας φαρμάκων που περιέχουν ως δραστική ουσία υποκατεστημένα ανάλογα πουρινών. Λεπτομερείς μετατροπές έχουν γίνει στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης για την εύρεση νέων αναλόγων με καλύτερη βιολογική δράση. Αντικείμενο της εργασίας είναι η σύνθεση νέων τροποποιημένων στη βάση πουρινών ως εν δυνάμει αντικών και αντικαρκινικών παραγόντων.

Ειδικότερα, για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το μόριο της γουανίνης, όπου η τροποποίηση που πραγματοποιήθηκε ήταν η υποκατάσταση στο τμήμα της βάσης, ενός ατόμου βρωμίου του άνθρακα της θέσης οκτώ (8) και επακολούθως η αλκυνυλίωση σε αυτή τη θέση.

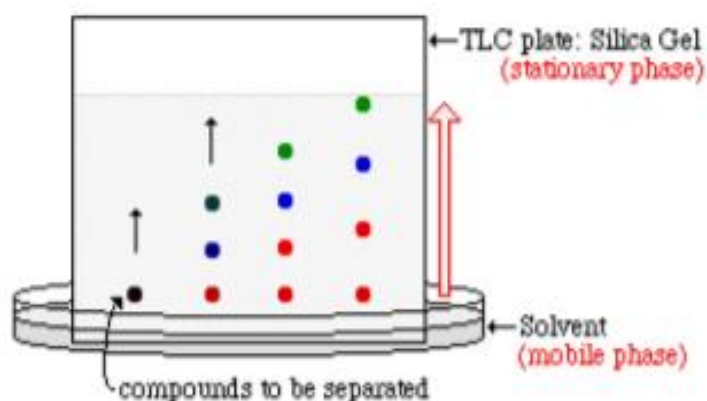


Εικόνα 10: C8 Αλκύνυλο Υποκατεστημένη Γουανίνη.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, TLC)

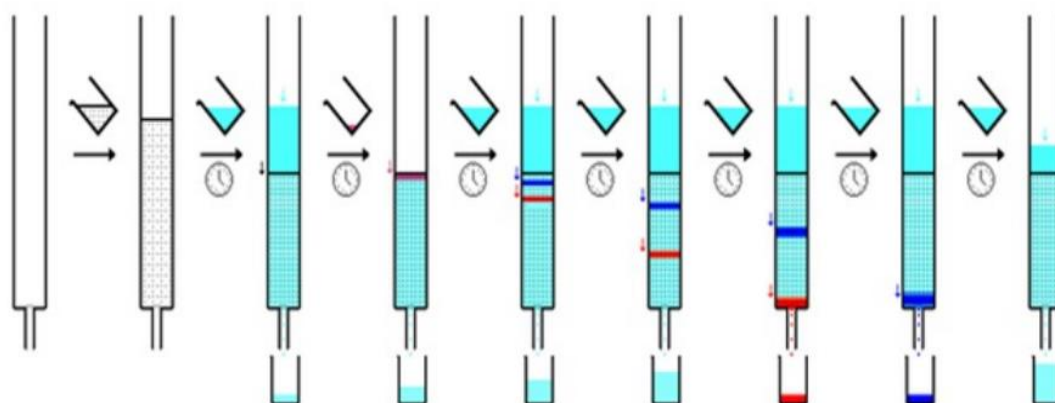
Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) είναι μια ποιοτική μέθοδος η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της προόδου της αντίδρασης αλλά και για τον προσδιορισμό της καθαρότητας της ουσίας στο υπό εξέταση δείγμα. Η πλάκα TLC η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των αντιδράσεων αποτελείται από ένα φύλλο αλουμινίου το οποίο είναι επικαλυμμένο με ένα λεπτό στρώμα silica gel, πάχους 0,2mm και αποτελεί την στατική φάση. Μια μικρή ποσότητα του προς ανάλυση μίγματος τοποθετείται στην αρχή της πλάκας. Η πλάκα TLC στη συνέχεια τοποθετείται σε ορθή θέση σε κλειστό θάλαμο ο οποίος περιέχει διαλύτη ή ένα σύστημα διαλυτών, το ύψος του οποίου φτάνει πιο κάτω από το σημείο που τοποθετήθηκε το μίγμα. Ο διαλύτης/σύστημα διαλυτών αποτελεί την κινητή φάση και ανεβαίνει αργά προς τα πάνω στην πλάκα TLC συμπαρασύροντας μαζί και το υπό εξέταση δείγμα. Ακολούθως, η πλάκα αποσύρεται από τον θάλαμο και στεγνώνεται. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο δείγμα μετακινούνται επάνω στην πλάκα με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητά τους, και έτσι, μπορούν να διακριθούν ως κηλίδες, οι οποίες αφού διαχωρίζονται μεταξύ τους μπορούν και να ταυτοποιηθούν. Η ταυτοποίηση προκύπτει από τον υπολογισμό του συντελεστή κατακράτησης (Rf). Η απεικόνιση των κηλίδων γίνεται υπό την επίδραση υπεριώδους φωτός (254 nm ή 356 nm) ή κατόπιν ψεκασμού με διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 30%.



Εικόνα 11 : Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

3.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ (COLUMN CHROMATOGRAPHY,CC)

Η χρωματογραφία στήλης είναι μια μέθοδος η οποία επιτρέπει τον διαχωρισμό και την απομόνωση των επιμέρους συστατικών από ένα μείγμα, απομακρύνοντας διαλύτες και παραπροϊόντα. Η τεχνική της χρωματογραφίας στήλης βασίζεται στην προσρόφηση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μια στατική (ακίνητη) φάση, συνήθως silica gel και την έκλουσή τους με μια κινητή φάση, την οποία αποτελεί ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών. Το δείγμα εισάγεται στο πάνω μέρος της στήλης και ο διαλύτης διέρχεται κατακόρυφα αυτής, ενώ τα συστατικά του δείγματος εκκλούνται στο κάτω μέρος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες που εξαρτώνται από την πολικότητα των ενώσεων και την πολικότητα του διαλύτη και τελικά συλλέγονται. Ο διαλύτης διατρέχει το στερεό υπόστρωμα υπό τη δύναμη της βαρύτητας. Καθώς ο ρυθμός με τον οποίο διαρρέει ο διαλύτης μέσω της στήλης είναι αργός, προκειμένου να επιταχύνουμε τη διαδικασία χρησιμοποιούμε πίεση με αέρα (Flash Chromatography).



Εικόνα 12 : Χρωματογραφία στήλης.

3.3 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Για την πραγματοποίηση ορισμένων αντιδράσεων, απαιτείται η χρήση άνυδρων διαλυτών όπως είναι το διχλωρομεθάνιο, η μεθανόλη και το DMF.

Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4Å, όπου και αποθηκεύτηκε. Η ξήρανση της μεθανόλης γίνεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å (molecular sieves) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου για μία ώρα. Τέλος, το DMF φυλάσσεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3Å.

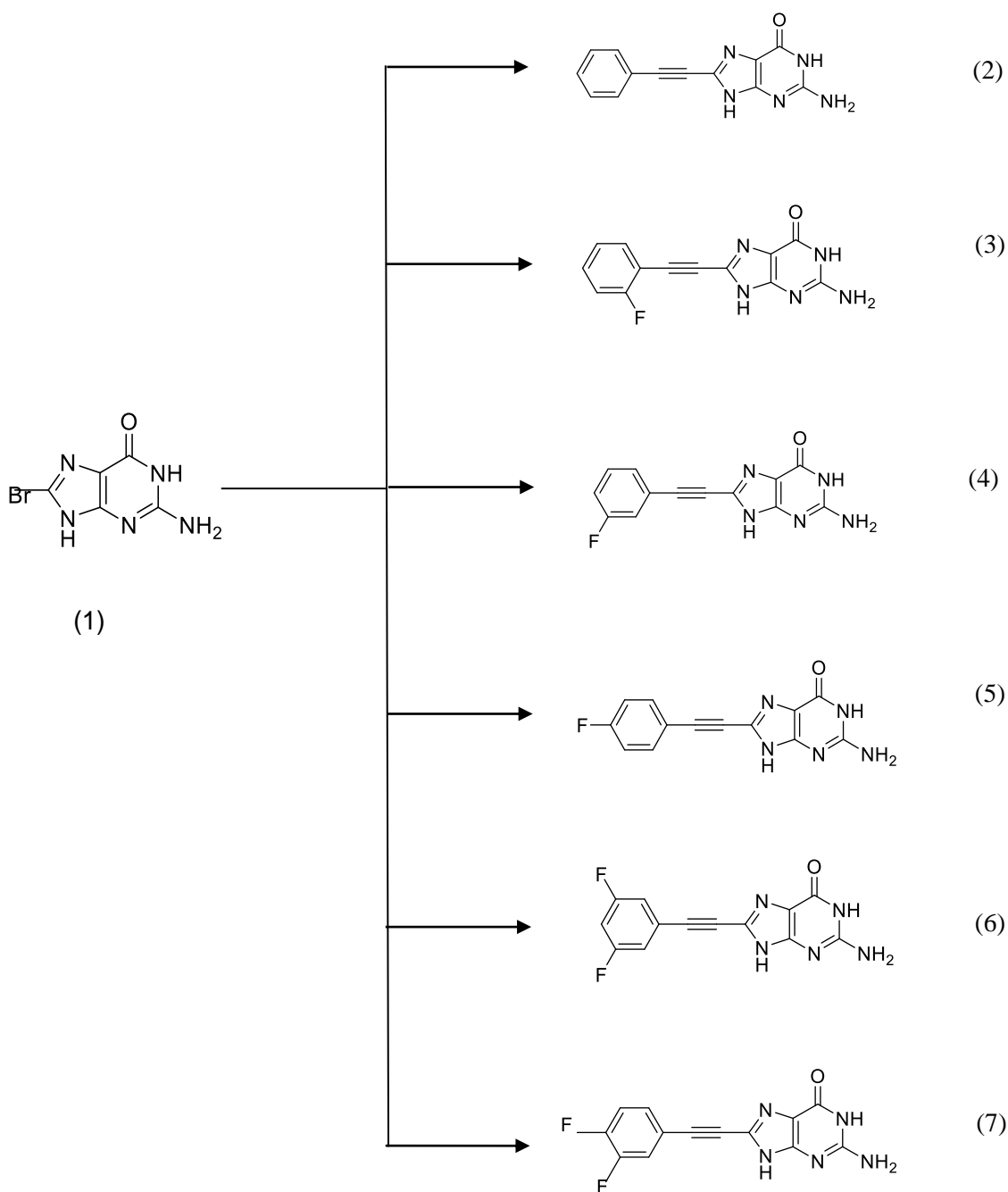
3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η ταυτοποίηση των νεοσυντηθέντων οργανικών ενώσεων έγινε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) αποτελεί την πρώτη και την χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική προσδιορισμού της δομής των μορίων καθώς παρέχει ένα χάρτη του ανθρακικού σκελετού μαζί με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο.

Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν, έγινε με την χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα ¹H-NMR ελήφθησαν με φασματοφωτόμετρο τύπου 500 MHz DRX-Avance . Τα φάσματα ελήφθησαν σε διαλύματα chloroform-d (CDCl₃) και methanol-d₄ (CD₃OD). Οι χημικές μετατοπίσεις (δ,ppm) υπολογίστηκαν με την χρήση τετραμεθυλοσιλανίου (TMS), ως εσωτερικού προτύπου.

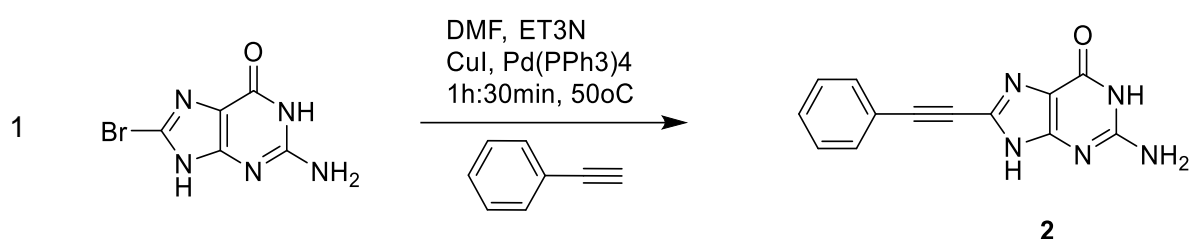
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ



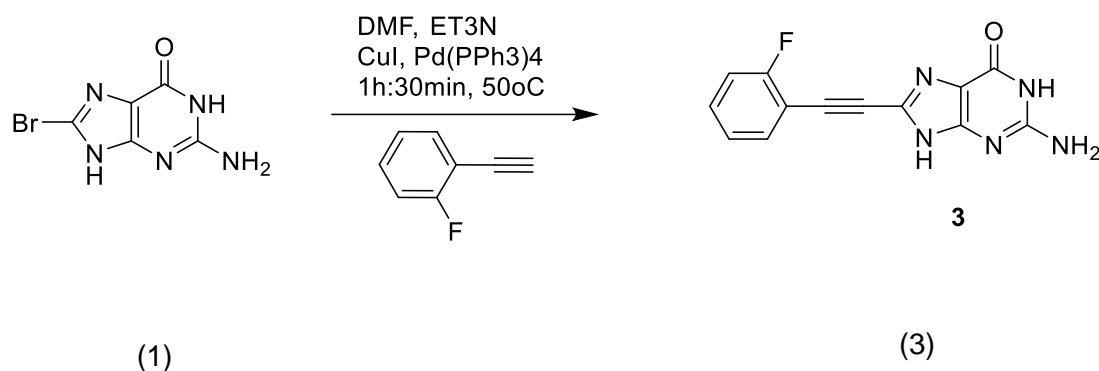
4.2 ΜΕΘΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

4.2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ C8-ΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ



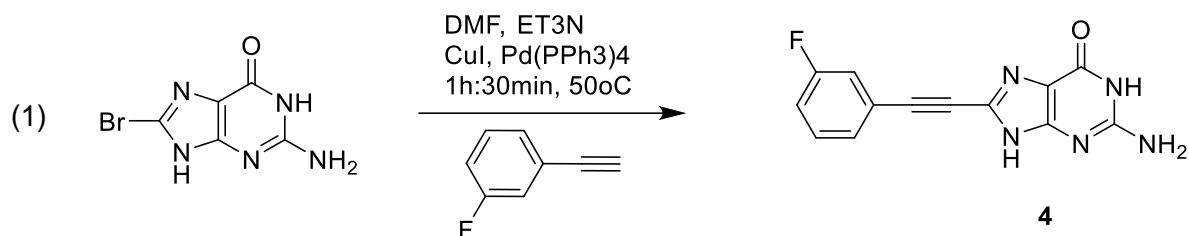
Αρχικά, ζυγίστηκαν 50mg, της διαθέσιμης εμπορικά ένωσης, 8-βρώμο-γουανίνης (1) [Mr=230,02],(0,13mmol) και πραγματοποιήθηκε αντίδραση Sonogashira, η οποία περιγράφεται ακολούθως. Τα 50mg της 8-βρωμο-γουανίνης διαλύθηκαν σε 0,39ml άνυδρου διαλύτη DMF. Κατόπιν προστέθηκαν 3eq τριαιθυλαμίνης Et₃N (96,61μL), 0,1eq ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκαταλύτης) (4,18mg), 0,1eq τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄] (καταλύτης) (25,42mg) και τέλος 3eq φαινύλακετυλενίου (72,45μL). Η αντίδραση αφέθηκε για χρονικό διάστημα μιας ώρας και τριάντα λεπτών σε θερμοκρασία 50°C, υπό ανάδευση. Η πορεία της αντίδρασης, ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών 7 Hexane/ 3 AcOEt (Rf=0.2). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με υδατική φάση το NaHCO₃ και οργανική φάση το CH₂Cl₂. Η οργανική φάση, συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και οδηγήθηκε προς εξάτμιση έως ξηρού, σε περιστροφικό εξάτμιστήρα υπό κενό. Τέλος, το προϊόν καθαρίστηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 7 Hexane/ 3 AcOEt. Τελικά λήφθηκε ποσότητα 10mg του προϊόντος με απόδοση της αντίδρασης 35%.

4.2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ C8-2-ΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ



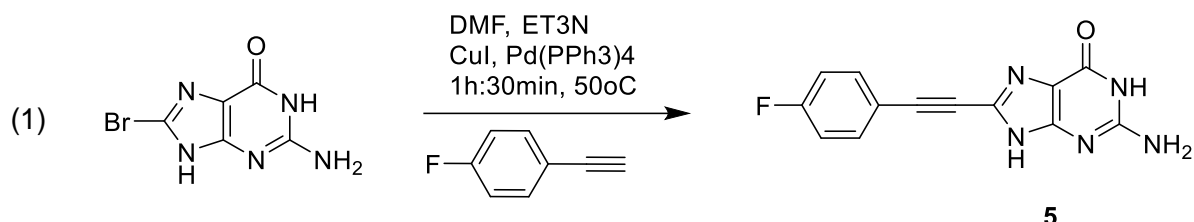
Αρχικά, ζυγίστηκαν 48mg της 8-βρώμο-γουανίνης (1) [Mr=230,02],(0,2mmol) και πραγματοποιήθηκε αντίδραση Sonogashira, η οποία περιγράφεται ακολούθως. Τα 48mg της 8-βρωμο-γουνίνης διαλύθηκαν σε 0,35ml άνυδρου διαλύτη DMF. Κατόπιν προστέθηκαν 3eq τριαιθυλαμίνης Et₃N (81,43μL), 0,1eq ιωδιούχου χαλκού (CuI) (3,809mg), 0,1eq τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄] (23,11mg) και τέλος 3eq 1-αιθυνυλ-2-φθόροφαινυλακετυλενίου (3) (68μL). Η αντίδραση αφέθηκε για χρονικό διάστημα μιας ώρας (1h) σε θερμοκρασία 50°C, υπό ανάδευση. Η πορεία της αντίδρασης, ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών 9 Hexane/ 1 AcOEt (R_f=0.27). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με υδατική φάση το NaHCO₃ και οργανική φάση το CH₂Cl₂. Η οργανική φάση, συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και οδηγήθηκε προς εξάτμιση έως ξηρού, σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Τέλος, το προϊόν καθαρίστηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 9 Hexane/ 1 AcOEt. Τελικά, το προϊόν είχε με τη μορφή κίτρινου ελαίου, μετά από κρυστάλλωση του οποίου λήφθηκε ποσότητα 10mg και απόδοση 22%.

4.2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ C8-3-ΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ



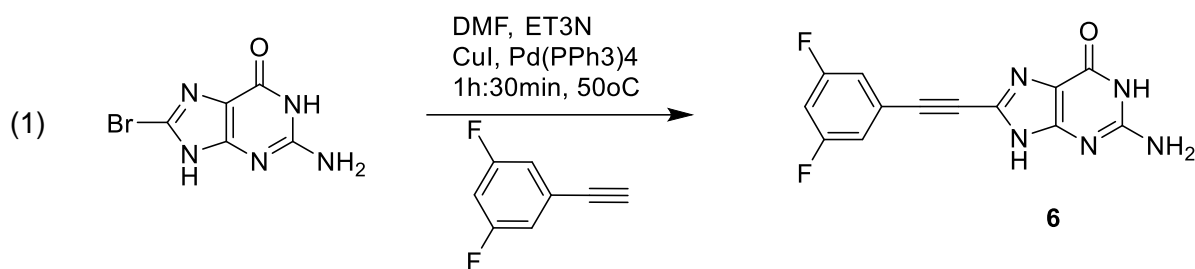
Αρχικά, ζυγίστηκαν 48mg της ένωσης 8-βρώμο-γουανίνης (1) [Mr=230,02], (0,2mmol) και πραγματοποιήθηκε αντίδραση Sonogashira, τα βήματα της οποίας περιγράφονται ακολούθως. Τα 48mg της 8-βρωμο-γουνίνης διαλύθηκαν σε 0,35ml άνυδρου διαλύτη DMF. Κατόπιν προστέθηκαν 3eq τριαμιθλαμίνης Et₃N (81,43μL), 0,1eq ιωδιούχου χαλκού (CuI) (3,8mg), 0,1eq τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄] (23,11mg) και τέλος 3eq 1-αίθυνυλ-3-φθόροφαινυλακετυλενίου(4) (68μL). Η αντίδραση αφέθηκε για χρονικό διάστημα δύο ωρών και τριάντα λεπτών σε θερμοκρασία 50°C, υπό ανάδευση. Η πορεία της αντίδρασης, ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/ 2 AcOEt (Rf=0.3). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με υδατική φάση το NaHCO₃ και οργανική φάση το CH₂Cl₂. Η οργανική φάση, συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και οδηγήθηκε προς εξάτμιση έως ξηρού, σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Τέλος, το προϊόν καθαρίστηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/ 2 AcOEt. Τελικά, το προϊόν λήφθηκε σε ποσότητα 7mg και απόδοση 15%.

4.2.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ C8-4-ΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ



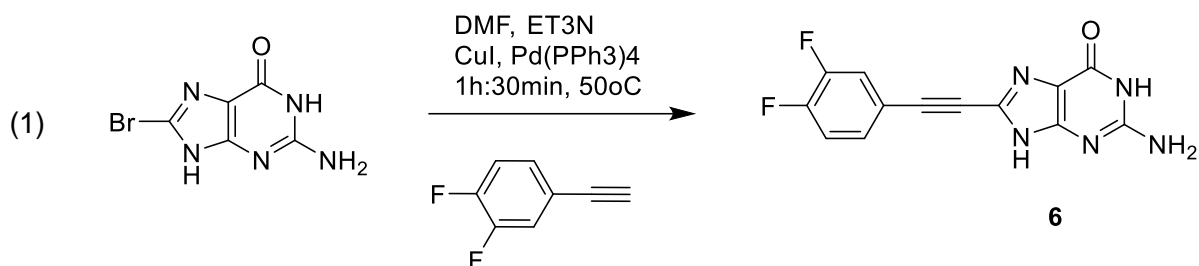
Αρχικά, ζυγίστηκαν 53mg 8-βρώμο-γουανίνης (1) [Mr=230,02],(0,2mmol) και πραγματοποιήθηκε αντίδραση Sonogashira. Τα 53mg της 8-βρωμο-γουανίνης διαλύθηκαν σε 0,4ml άνυδρου διαλύτη DMF. Κατόπιν προστέθηκαν 3eq τριαμιθλαμίνης Et₃N (93,09μL), 0,1eq ιωδιούχου χαλκού (CuI) (4,38mg), 0,1eq τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄] (26,57mg) και τέλος 3eq 1-αιθινυλ-4-φθόροφαινυλακετυλενίου (5) (119,76μL). Η αντίδραση αφήθηκε overnight σε θερμοκρασία 50°C, υπό ανάδευση. Η πορεία της αντίδρασης, ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/ 2 AcOEt (Rf=0.25). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με υδατική φάση το NaHCO₃ και οργανική φάση το CH₂Cl₂. Η οργανική φάση, συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και οδηγήθηκε προς εξάτμιση έως ξηρού, σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Τέλος, το προϊόν καθαρίστηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/ 2 AcOEt. Τελικά, το προϊόν λήφθηκε σε ποσότητα 11mg και απόδοση 25%.

4.2.5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ C8-3,5-ΔΙΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ



Αρχικά, ζυγίστηκαν 52mg της 8-βρώμο-γουανίνης (1) [Mr=230,02],(0,2mmol) και πραγματοποιήθηκε αντίδραση Sonogashira. Τα 52mg της 8-βρωμο-γουνίνης διαλύθηκαν σε 0,4ml άνυδρου διαλύτη DMF. Κατόπιν προστέθηκαν 3eq τριαθυλαμίνης Et₃N (91,46μL), 0,1eq ιωδιούχου χαλκού (CuI) (4,3mg), 0,1eq τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄] (26,11mg) και τέλος 3eq 1-αιθινυλ-3,5-δίφθοροφαινυλακετυλενίου (6) (80,5μL). Η αντίδραση αφέθηκε για χρονικό διάστημα δύο ωρών σε θερμοκρασία 50°C, υπό ανάδευση. Η πορεία της αντίδρασης, ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/ 2 AcOEt (R_f=0.3). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με υδατική φάση το NaHCO₃ και οργανική φάση το CH₂Cl₂. Η οργανική φάση, συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και οδηγήθηκε προς εξάτμιση έως ξηρού, σε περιστροφικό εξάτμιστήρα υπό κενό. Τέλος, το προϊόν καθαρίστηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/ 2 AcOEt. Τελικά, το προϊόν λήφθηκε σε ποσότητα 4mg και απόδοση 8%.

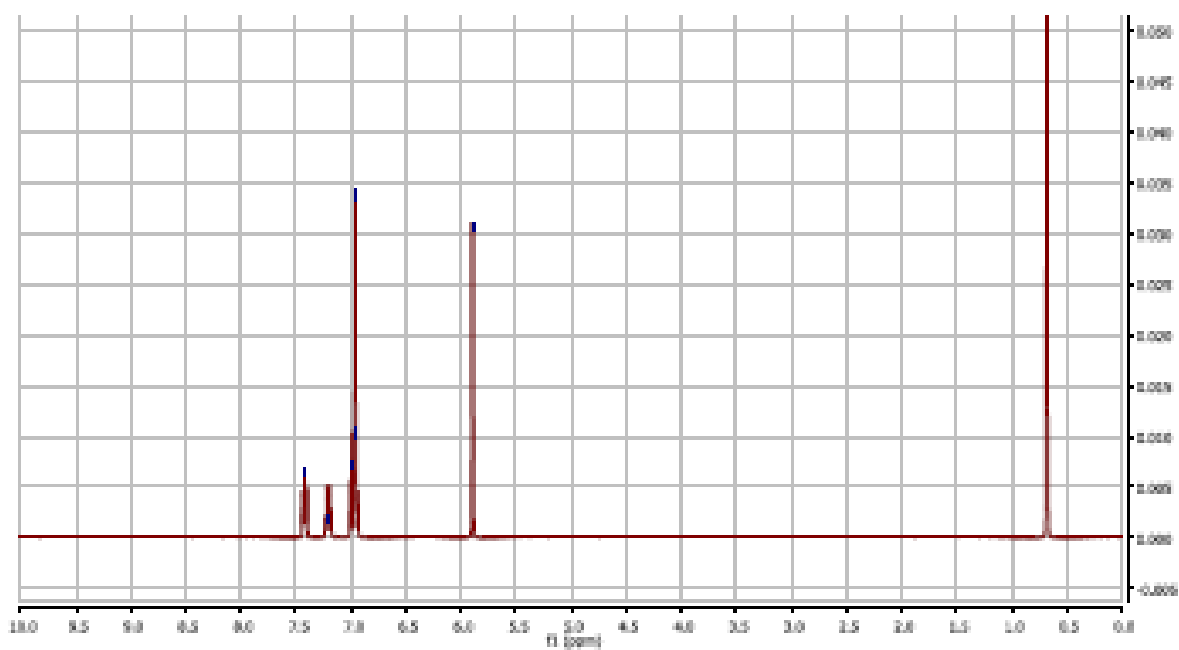
4.2.6 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ C8-3,4-ΔΙΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ



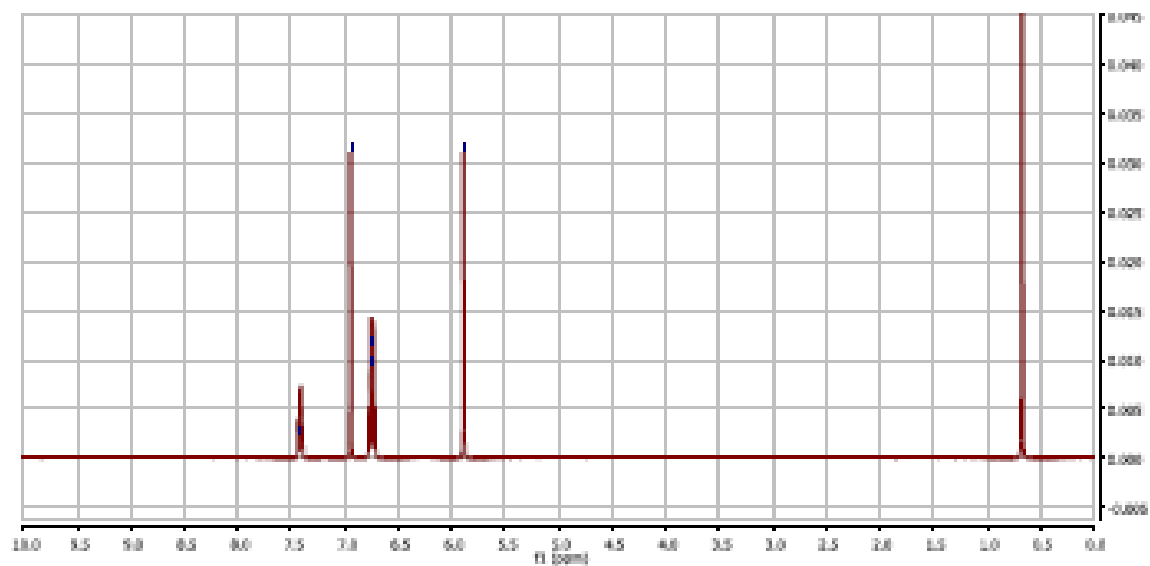
Αρχικά, ζυγίστηκαν 52mg της ένωσης 8-βρώμο-γουανίνης (1) [Mr=230,02],(0,2mmol) και πραγματοποιήθηκε αντίδραση Sonogashira, η οποία περιγράφεται ακολούθως. Τα 52mg της 8-βρωμο-γουνίνης διαλύθηκαν σε 0,4ml άνυδρου διαλύτη DMF. Κατόπιν προστέθηκαν 3eq τριαθυλαμίνης Et₃N (91,46μL), 0,1eq ιωδιούχου χαλκού (CuI) (4,3mg), 0,1eq τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄] (26,11mg) και τέλος 3eq 1-αίθυνυλ-3,4-δίφθοροφαινυλακετυλενίου (7) (81,84μL). Η αντίδραση αφέθηκε overnight δύο ωρών και τριάντα λεπτών σε θερμοκρασία 50°C, υπό ανάδευση. Η πορεία της αντίδρασης, ελέγχθηκε με TLC σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/ 2 AcOEt (R_f=0.3). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με υδατική φάση το NaHCO₃ και οργανική φάση το CH₂Cl₂. Η οργανική φάση, συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και οδηγήθηκε προς εξάτμιση έως ξηρού, σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό. Τέλος, το προϊόν καθαρίστηκε και απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/ 2 AcOEt. Τελικά, το προϊόν λήφθηκε σε ποσότητα 7mg και απόδοση 15%.

5. ΦΑΣΜΑΤΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΜΕ ^1H -NMR

5.1 ^1H -NMR ΤΗΣ C8-3-ΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ



5.2 ^1H -NMR ΤΗΣ C8-3,4-ΔΙΦΘΟΡΟΦΑΙΝΥΛΟΑΛΚΥΝΥΛΟ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ

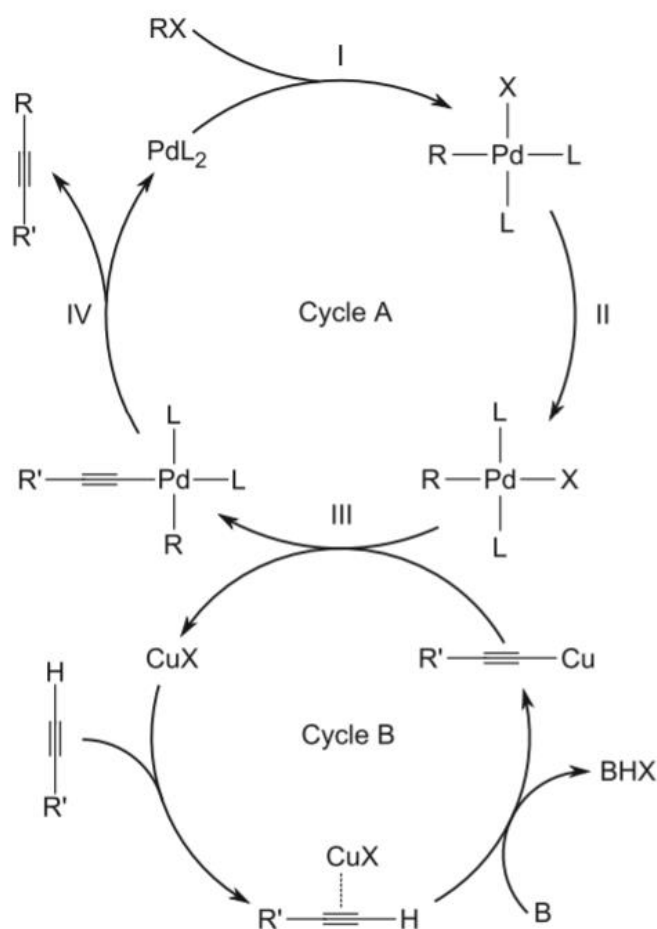


6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι προσπάθειες της επιστημονικής κοινότητας για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως κακοήθεις νεοπλασίες και ιϊκές μολύνσεις οδήγησε στην προσπάθεια για την ανάπτυξη νέων πιθανών φαρμάκων συμπεριλαμβανόμενων αναλόγων νουκλεοτιδίων με τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη αναλόγων που παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα προς τα υγιή κύτταρα με αυξημένη βιολογική δράση και εκλεκτικότητα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιτεύχθηκε, μέσω μιας απλής και σύντομης διαδικασίας η σύνθεση νέων παραγώγων πουρίνης, πιο συγκεκριμένα γουανίνης τα οποία πιθανό να έχουν κυτταροτοξική δράση.

Η αντίδραση Sonogashira είναι μια αντίδραση διασταυρούμενης σύζευξης που χρησιμοποιείται στην οργανική σύνθεση για να σχηματίσει δεσμούς μεταξύ ανθράκων. Πραγματοποιείται μεταξύ ενός τελικού αλκυνίου και ενός αλογονοπαραγώγου (άρυλο- ή βίνυλο-) με την επίδραση ενός οργανοπαλλαδιακού καταλύτη, ενός συγκαταλύτη του Cu και μιας βάσης και χωρίζεται στα παρακάτω 3 στάδια:



Εικόνα 13: Μηχανισμός της σύζευξης Sonogashira

Η ταυτοποίηση των εν λόγω ενώσεων έγινε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα-13 (^1H NMR και ^{13}C NMR).

Σε μελλοντικές μελέτες, οι ενώσεις που συντέθηκαν θα εξεταστούν ως προς τον τρόπο λειτουργίας τους σε επίπεδο κυτταρικών σειρών.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aaron, J.-J., & Trajkovska, S. (2005). PURINES, PYRIMIDINES, AND NUCLEOTIDES. *Encyclopedia of Analytical Science*, 393–402.
- Bates P.J., Kahlon J.B., Miller D.M., (1999). Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding. *J. Biol. Chem*; 274:26369–26377.
- Came, P. E., & Caliguiri, L. A. (Eds.). (1982). *Chemotherapy of Viral Infections. Handbook of Experimental Pharmacology*.
- David S.S., O'Shea V.L., Kundu S., (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*; 447:941–950.
- Davis J.T., (2004). G-quartets 40 years later: From 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed*; 43:668–698.
- Denny W.A. and Wilman D.E.V. (1990). *The Chemistry of Antitumour Agents*. 1st ed. Springer Netherlands.
- Eliou G. (1989). The Purine Path to Chemotherapy. *Science* 244 (4900): 41–47.
- Grollman A.P., Moriya M., (1993). Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet*; 9:246–249.
- Gros J., Rosu F., Mergny J.L., (2007). Guanines are a quartet's best friend: impact of base substitutions on the kinetics and stability of tetramolecular quadruplexes. *Nucleic Acids Res*; 35:3064–3075.
- Hocek, M. (2003). Syntheses of Purines Bearing Carbon Substituents in Positions 2, 6 or 8 by Metal- or Organometal-Mediated C–C Bond-Forming Reactions. *European Journal of Organic Chemistry*, 2003(2), 245–254.
- Jing N., Li Y., & Tweardy D.J., (2004). G-quartet oligonucleotides: a new class of signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors that suppresses growth of prostate and breast tumors through induction of apoptosis. *Cancer Res*; 64:6603–6609.
- Jing N., Marchand C., Pommier Y., (2000). Mechanism of inhibition of HIV-1 integrase by G-tetrad-forming oligonucleotides in vitro. *J. Biol. Chem*; 275:21460–21467.
- Kaufman H.E., Nesburn A.B. and Maloney E.D. (1962). Comparison of specific antiviral agents in herpes simplex keratitis. *Archives of Ophthalmology* 67 (8): 583-591.
- Keenan, R. T., Krasnokutsky, S., & Pillinger, M. H. (2017). Etiology and Pathogenesis of Hyperuricemia and Gout. *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*, 1597–1619.e6.
- Legraverend, M., & Grierson, D. S. (2006). The purines: Potent and versatile small molecule inhibitors and modulators of key biological targets. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(12), 3987–4006.
- Lui V.W.Y., Lau C.P.Y., Cheung C.S.F, Ho K., Heung Ling Ng M., Cheng S.H., Hong B., Tsao S.W., Tsang C.M., Lei K., Yamasaki Y., Mita A. and Chan A.T.C. (2010). An RNA-Directed Nucleoside Anti-Metabolite, 1-(3-C-Ethynyl-Beta-d-Ribo-Pentofuranosyl)Cytosine

(ECyd), Elicits Antitumor Effect via TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) Downregulation. *Biochemical Pharmacology* 79 (12): 1772–80.

Maizels N., (2006). Dynamic roles for G4 DNA in the biology of eukaryotic cells. *Nat. Struct. Mol. Biol*; 13:1055–1059.

McMurry, J. (2016). *Organic chemistry*. Boston, MA, USA, Cengage Learning.

Mikhailopulo, I. A. and A. I. Miroshnikov (2010). "New trends in nucleoside biotechnology." *Acta Naturae* 2(2): 36-59.

Munshi, P. N., Lubin, M., & Bertino, J. R. (2014). 6-Thioguanine: A Drug With Unrealized Potential for Cancer Therapy. *The Oncologist*, 19(7), 760–765.

Neidle S., (2009). The structures of quadruplex nucleic acids and their drug complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol*; 19:239–250.

O. Coskun. "Separation techniques: Chromatography", *North Clin Instanb*, 2016. 3(2): 156–160.

Parker, W. B. (2009). Enzymology of Purine and Pyrimidine Antimetabolites Used in the Treatment of Cancer. *Chemical Reviews*, 109(7), 2880–2893.

Patel D.J., Phan A.T., Kuryavvi V., (2007). Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucleic Acids Res*; 35:7429–7455.

Périgaud, C., Gosselin G., and Imbach J.L. (1992). Nucleoside Analogues as Chemotherapeutic Agents: A Review. *Nucleosides and Nucleotides* 11 (2–4): 903–45.

Plunkett W. and Gandhi V. (2001). Purine and pyrimidine nucleoside analogues. In: Giaccone G., Schilsky R. and Sondel P. (2001). *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers*, Elsevier Science B.V. pp. 21-45.

Phan A.T., Kuryavvi V., Patel D.J., (2005). An interlocked dimeric parallel-stranded DNA quadruplex: a potent inhibitor of HIV-1 integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 102:634–639.

Reich, E.; Schibli A. "High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants" (Illustrated ed.). 2007

Robak, T., Lech-Maranda, E., Korycka, A., & Robak, E. (2006). Purine Nucleoside Analogs as Immunosuppressive and Antineoplastic Agents: Mechanism of Action and Clinical Activity. *Current Medicinal Chemistry*, 13(26), 3165–3189.

Robak, T. and P. Robak (2012). "Purine nucleoside analogs in the treatment of rarer chronic lymphoid leukemias." *Curr Pharm Des* 18(23): 3373-3388.

Sartorelli, A. C., & Johns, D. G. (Eds.). (1975). *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents*.

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.

Sharma, P., LaRosa, C., Antwi, J., Govindarajan, R., & Werbovetz, K. A. (2021). Imidazoles as Potential Anticancer Agents: An Update on Recent Studies. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(14), 4213.

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.

Sikk, L., Tammiku-Taul, J., Burk, P., & Kotschy, A. (2011). Computational study of the Sonogashira cross-coupling reaction in the gas phase and in dichloromethane solution. *Journal of Molecular Modeling*, 18(7), 3025–3033.

Simonsson T., & Henriksson M., (2002). c-myc Suppression in Burkitt's lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 290:11–15.

Soultrait V.R., Lozach P.Y., Andréola M.L., (2002). DNA aptamers derived from HIV-1 RNase H inhibitors are strong anti-integrase agents. *J. Mol. Biol*; 324:195–203.

Stryer L. (1995). Βιοχημεία. Αθήνα: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Tan X.Z., Suzuki N., Shibutani S., (1999). Mutagenic properties of the 8-amino-2'-deoxyguanosine DNA adduct in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*; 27:2310–2314.

Tran P.L., Virgilio A., Galeone A., (2011). Effects of 8-methylguanine on structure, stability and kinetics of formation of tetramolecular quadruplexes. *Biochimie*; 93:399–408.

Tuncbilek, M., Kucukdumlu, A., Guven, E. B., Altiparmak, D., & Cetin-Atalay, R. (2018). Synthesis of novel 6-substituted amino-9-(β-D-ribofuranosyl)purine analogs and their bioactivities on human epithelial cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(3), 235–239.

Venkatarangan L., Sivaprasad A., Basu A.K., (2001). Site-specifically located 8-amino-2'-deoxyguanosine: thermodynamic stability and mutagenic properties in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*; 29:1458–1463.

Vongsutilers V, Gannett PM., (2018). C8-Guanine modifications: effect on Z-DNA formation and its role in cancer. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2018 Mar;16(13):2198-2209.

Wang, X., Song, Y., Qu, J., & Luo, Y. (2017). Mechanistic Insights into the Copper-Cocatalyzed Sonogashira Cross-Coupling Reaction: Key Role of an Anion. *Organometallics*, 36(5), 1042–1048.

Wyatt J.R., Vickers T.A., Ecker D.J., (1994). Combinatorially selected guanosine-quartet structure is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus envelope-mediated cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 91:1356–1360.

Xu Y., Noguchi Y., Sugiyama H., (2006). The new models of the human telomere d[AGGG(TTAGGG)₃] in K⁺ solution. *Bioorg. Med. Chem*; 14:5584–5591.

Zhou W., Gumina G., Chong Y., Wang J, Schinazi R.F. and Chu C.K. (2004). Synthesis, Structure–Activity Relationships, and Drug Resistance of β-D-3'-Fluoro-2',3'-Unsaturated Nucleosides as Anti-HIV Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 47 (13): 3399–3408.

