



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Σύνθεση και φασματοσκοπικός προσδιορισμός
C8 χλωροφαινυλο παραγώγων της γουανίνης**

Γιαννάκου Δανάη

Λάρισα, Φεβρουάριος 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



DIPLOMA THESIS

Synthesis and fasmatoscopic identification C8 chlorophenyl derivatives of guanine

Giannakou Danai

Larisa, February 2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές έχουν στρέψει την προσοχή τους στα τροποποιημένα ανάλογα νουκλεοτιδίων, εξαιτίας ως επί το πλείστο στις θεραπευτικές ιδιότητές τους. Οι συνεισφορές των προαναφερθέντων αναλόγων, πιο συγκεκριμένα, εκείνων των κατηγοριών με δομικές τροποποιήσεις στο τμήμα βάσης, αποτελούν σημαντικό τομέα έρευνας, καθώς παρουσιάζουν σημαντικές αντικαρκινικές και αντιακτικές δράσεις. Έχει γίνει σύνθεση πολλών τέτοιων ενώσεων όπως και η αξιολόγησή τους ως προς τις βιολογικές τους ιδιότητες.

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε σαν στόχο την σύνθεση νέων αναλόγων πουρίνης, πιο συγκεκριμένα της γουανίνης, με τροποποιήσεις βάσης ως πιθανούς αντικαρκινικούς και αντιακτικούς παράγοντες. Γίνεται ανάλυση των συνθετικών οδών οι οποίες ακολουθήθηκαν, των μεθόδων που πραγματοποιήθηκαν και τελικών αποτελεσμάτων που ταυτοποιήθηκαν.

ABSTRACT

In recent years, researchers have turned their attention to modified nucleotide analogues, mostly because of their healing properties. The contributions of the aforementioned analogues, more specifically, those of the categories with structural modifications in the base section, constitute an important field of research, as they present important anti-cancer and antiviral actions.

The aim of the present study was to synthesize new purine analogues, more specifically guanine, with base modifications as possible anticancer and antiviral agents. An analysis of the synthetic pathways that were followed, the methods that were performed and the final results that were identified.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	6
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	7
1.1 ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ	7
1.2 ΠΟΥΡΙΝΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ.....	8
1.3 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΤΗΝ ΒΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ.....	10
1.3.1 8 C- ΒΡΩΜΟΓΟΥΑΝΙΝΗ.....	11
1.4 ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	12
1.4.1 ΒΑΛΑΚΥΚΛΟΒΙΡΗ/ΒΑΛΑΝΓΚΙΚΛΟΒΙΡΗ.....	12
1.5 ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΓΟΥΑΝΙΝΗ	13
1.6 C-8 ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΓΟΥΑΝΙΝΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΕ ΔΟΜΕΣ G- QUADRUPLEX.....	14
1.7 C-8 ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΓΟΥΑΝΙΝΗ ΚΑΙ Z-DNA.....	17
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	20
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	21
3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, TLC).....	21
3.3 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ.....	23
3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ	23
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	24
4.1 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ	24
4.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ.....	24
4.2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 8-(2-ΧΛΩΡΟ ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΚΕΤΥΛΕΝΙΟ) ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ.....	24
4.2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 8-(3-ΧΛΩΡΟ ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΚΕΤΥΛΕΝΙΟ) ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ.....	25
5. ΦΑΣΜΑΤΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	27
5.1 NMR ΤΗΣ 8-(3-ΧΛΩΡΟ ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΚΕΤΥΛΕΝΙΟ) ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ	27
5.2 NMR ΤΗΣ 8-(3-ΧΛΩΡΟ ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΚΕΤΥΛΕΝΙΟ) ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ	28
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	29
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	31

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Δρ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: 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

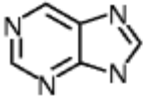
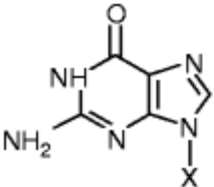
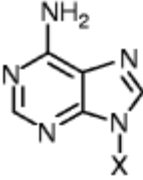

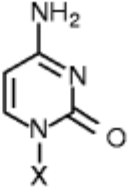
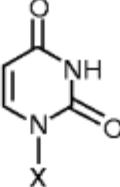
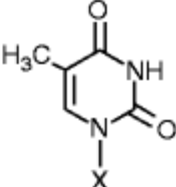
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΝΟΥΚΛΕΪΚΑ ΟΞΕΑ

Τα νουκλεϊκά οξέα είναι βιοπολυμερή, ή μεγάλα βιομόρια, τα οποία κατέχουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση όλων των γνωστών μορφών ζωής. Αποτελούνται από νουκλεοτίδια, τα οποία είναι τα μονομερή που αποτελούνται από τρία συστατικά: ένα σάκχαρο με 5 άτομα άνθρακα, μια φωσφορική ομάδα και μια αζωτούχα βάση. Τα νουκλεϊκά οξέα χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες που είναι το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) και το ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA). Εάν το σάκχαρο είναι ριβόζη, το πολυμερές είναι RNA. Εάν το σάκχαρο είναι το παράγωγο της ριβόζης δεοξυριβόζη, το πολυμερές είναι το DNA.

Τα νουκλεϊκά οξέα είναι χημικές ενώσεις, οι οποίες απαντούνται στην φύση, που χρησιμεύουν ως τα κύρια μόρια μεταφοράς πληροφοριών στα κύτταρα και αποτελούν το γενετικό υλικό. Τα νουκλεϊκά οξέα βρίσκονται σε αφθονία σε όλα τα έμβια όντα, όπου δημιουργούν, κωδικοποιούν και στη συνέχεια αποθηκεύουν πληροφορίες για κάθε ζωντανό κύτταρο κάθε μορφής ζωής στη Γη. Με τη σειρά τους, λειτουργούν για να μεταδώσουν και να εκφράσουν αυτές τις πληροφορίες μέσα και έξω από τον πυρήνα του κυττάρου στις εσωτερικές λειτουργίες του κυττάρου και τελικά στην επόμενη γενιά κάθε ζωντανού οργανισμού. Οι κωδικοποιημένες πληροφορίες περιέχονται και μεταφέρονται μέσω της αλληλουχίας νουκλεϊκού οξέος. Παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην κατεύθυνση της πρωτεϊνσύνθεσης.

Σειρές νουκλεοτιδίων συνδέονται για να σχηματίσουν έλικες, μονή για το RNA, διπλή για το DNA - και συναρμολογούνται σε αλυσίδες ζευγών βάσεων που επιλέγονται από τις πέντε πρωτεύουσες ή κανονικές νουκλεοβάσεις, οι οποίες είναι: αδενίνη, κυτοσίνη, γουανίνη, θυμίνη, και ουρακίλη. Στο DNA περιέχεται μόνο η θυμίνη ενώ στο RNA απαντάται μόνον η ουρακίλη. Χρησιμοποιώντας αμινοξέα και τη διαδικασία που είναι γνωστή ως πρωτεϊνσύνθεση((Clarks, 2021), η συγκεκριμένη αλληλουχία στο DNA αυτών των ζευγών νουκλεοβάσεων επιτρέπει την αποθήκευση και τη μετάδοση κωδικοποιημένων οδηγιών ως γονιδίων. Στο RNA, η αλληλουχία ζευγών βάσεων προβλέπει την παραγωγή νέων πρωτεϊνών που καθορίζουν τα πλαίσια και τα μέρη και τις περισσότερες χημικές διεργασίες όλων των μορφών ζωής.

Purine	Pyrimidine
  Guanine, G  Adenine, A	  Cytosine, C  Uracil, U  Thymine, T

Πίνακας 1: Χημικός τύπος πυριδινών και πυριδιμινών

1.2 ΠΟΥΡΙΝΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ

Δύο συντηγμένοι μεταξύ τους δακτύλιοι, η πυριμιδίνη και η ιμιδαζόλη, αποτελούν την πουρίνη, την οργανική εκείνη ένωση που ανήκει στις ετεροκυκλικές αρωματικές οργανικές ενώσεις. Λόγω του πολικού της χαρακτήρα διαλύεται στο νερό. Η πουρίνη ονοματοδοτεί μία ευρύτερη κατηγορία μορίων στις οποίες περιέχεται, σε αυτές περιλαμβάνονται οι υποκατεστημένες πουρίνες και ταυτομερή τους. Αυτές οι αζωτούχες ετεροκυκλικές εμφανίζονται ευρύτατα στην φύση. (Rosemeyer, 2004).

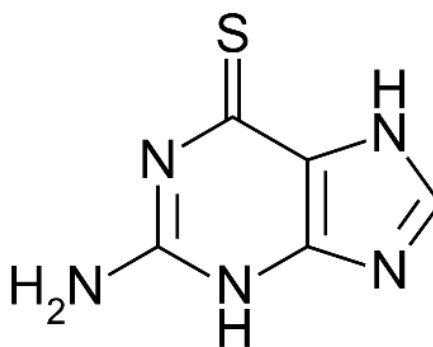
Η πουρίνη και οι βάσεις της λειτουργούν ουσιαστικά σε διεργασίες μεταβολισμού και σηματοδότησης αφού αποτελούν τμήμα των ενώσεων μονοφωσφορική γουανοσίνη (GMP) και μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP).

Στην προσπάθεια του κύτταρου να εκτελέσει βασικές του διεργασίες χρειάζονται και οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες σε ίσες ποσότητες. Τόσο η πουρίνη όσο και η πυριμιδίνη αυτοαναστέλλονται και ενεργοποιούνται. Όταν σχηματίζονται πουρίνες, αναστέλλουν τα ένζυμα που απαιτούνται για περισσότερο σχηματισμό πουρίνης. Αυτή η αυτοαναστολή συμβαίνει καθώς ενεργοποιούν επίσης τα ένζυμα που απαιτούνται για το σχηματισμό πυριμιδίνης. Η πυριμιδίνη μπορεί να αναστείλλει ταυτοχρόνως και να ενεργοποιήσει την πουρίνη με παρόμοιες διαδικασίες. Εξαιτίας αυτού, υπάρχει σχεδόν ίση ποσότητα και των δύο ουσιών στο κύτταρο ανά πάσα στιγμή (Guyton & Hall, 2006).

Τα ανάλογα πουρίνης είναι αντιμεταβολίτες που μιμούνται τη δομή των μεταβολικών πουρινών. Μερικά παραδείγματα εξ αυτών είναι:

1. Ανάλογα νουκλεοβάσης

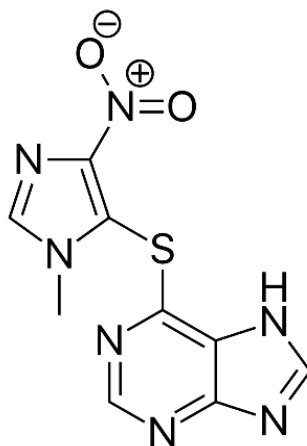
- Θειοπουρίνες όπως η θειογουανίνη χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία οξειών λευχαιμιών και υφέσεων σε οξείες κοκκιοκυτταρικές λευχαιμίες.



Εικόνα 1: Χημική δομή της θειογουανίνη

- Η αζαθειοπρίνη είναι η κύρια ανοσοκατασταλτική κυτταροτοξική ουσία. Προφάρμακο, χρησιμοποιείται ευρέως στη μεταμόσχευση για τον έλεγχο των αντιδράσεων απόρριψης. Διασπάται μη ενζυματικά σε μερκαπτοπουρίνη, ένα ανάλογο πουρίνης που αναστέλλει τη σύνθεση

του DNA. Αποτρέποντας την κλωνική επέκταση των λεμφοκυττάρων στη φάση επαγωγής της ανοσοαπόκρισης, επηρεάζει τόσο την κυτταρική ανοσία όσο και τη χυμική ανοσία. Επίσης καταστέλλει με επιτυχία την αυτοάνοση.



Εικόνα 2 : Χημική δομή της αζαθειοπρίνη

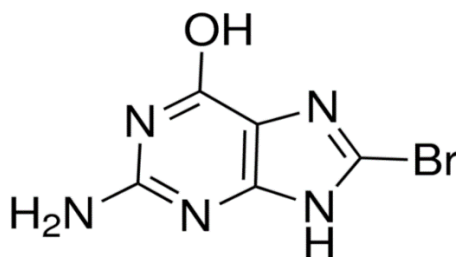
1.3 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΣΤΗΝ ΒΑΣΗ ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Όπως αναφέρθηκε στην παραπάνω ενότητα είναι γνωστή η δράση των αναλόγων των πουρινών ενάντια του καρκίνου (Chen et al., 2001; Nagai et al., 2007; Denny & Wilman, 1990). Γίνεται ήδη χρήση μίας πληθώρας από ανάλογα πουρινών ενάντια σε διάφορους καρκίνους με τους ερευνητές να έχουν καταδείξει μέσα από τις έρευνές τους την σημαντικότητα της συγκεκριμένης κατηγορίας σαν αντικαρκινικοί παράγοντες, αφού μπορούν να επηρεάζουν με διάφορους τρόπους την σύνθεση του DNA (Parikh et al., 2021). Ειδικότερα γίνεται θεραπευτική χρήση διαφόρων αναλόγων ως αντιμεταβολίτες σε πολλούς όγκους, οι οποίοι δρουν αναστέλλοντας την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων μέσα στα καρκινικά κύτταρα. Ορισμένα ανάλογα πουρίνης και τα βιολογικά τους αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω (Shelton et al., 2016).

1.3.1 8 C- ΒΡΩΜΟΓΟΥΑΝΙΝΗ

Η επίδραση των υποκαταστατών C8-γουανίνης στη σταθεροποίηση της διαμόρφωσης Z-DNA έχει μελετηθεί εκτενώς. Ο υποκείμενος λόγος για τη σταθεροποιητική επίδραση του Z-DNA των προϊόντων προσθήκης C8-γουανίνης οφείλεται στο γεγονός ότι οι τροποποιήσεις C8-γουανίνης προτιμούν να υιοθετούν τη διαμόρφωση syn (όπως υιοθετείται στο Z-DNA) σχετικά με τον γλυκοσιδικό δεσμό λόγω μιας δυσμενούς αλληλεπίδρασης μεταξύ των υποκαταστατών στη θέση C8-γουανίνης και του πρωτονίου H-2" του ίδιου νουκλεοζίτη. Η αλληλεπίδραση εξαρτάται από τις στερικές ουσίες του υποκατάστατου C8-γουανίνης και επομένως επιλεγμένες τροποποιήσεις της θέσης C8 της βάσης γουανίνης μπορούν να οδηγήσουν σε μετατόπιση προς το Z-DNA.

Η βρωμίωση του πολυ(dG-dC) αποδείχθηκε ότι συμβαίνει από τους Lafer et al.(1989) μέσω της αντίδρασης του πολυνουκλεοτιδίου και κορεσμένου σε βρώμιο νερού σε θερμοκρασία δωματίου. Η βρωμίωση λαμβάνει χώρα στη θέση C8 της γουανίνης και μπορεί να βρωμιωθεί έως και το 40% των γουανινών. Το βρωμιωμένο DNA που προκύπτει υιοθετεί τη διαμόρφωση Z-DNA υπό φυσιολογικές συνθήκες (Vongsutilers & Gannett, 2018) σε αντίθεση με το μη βρωμιωμένο πολυ(dG-dC) που απαιτεί ~4 M NaCl για να προκαλέσει την πλήρη μετατροπή σε Z-DNA. Μια υπολογιστική μελέτη που χρησιμοποιεί μεθόδους μοριακής μηχανικής και θερμοδυναμικής διαταραχής αποκάλυψε ότι η βρωμίωση στη θέση C8 της γουανίνης σταθεροποιεί τη διαμόρφωση Z-DNA σε σχέση με το μη βρωμιωμένο αντίστοιχό της (Ross et al., 1989).



Εικόνα 3: Χημική δομή της 8 C- βρωμογουανίνη

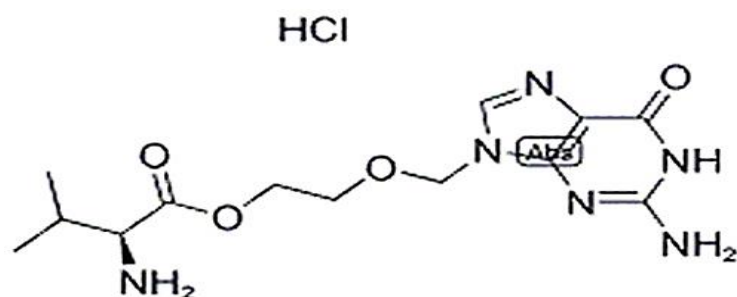
1.4 ΑΝΑΛΟΓΑ ΠΟΥΡΙΝΩΝ ΩΣ ΑΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Τα ανάλογα των πουρινών που παρεμβαίνουν στον τρόπο σύνθεσης του DNA και του RNA επηρεάζοντας τους μηχανισμούς αντιγραφής και μεταγραφής της αντιγραφής του ιού, παρέχουν στους ερευνητές δυνατότητες για να ανακαλύψουν νέα αντικά φάρμακα (Zhou et al., 2004; Périgaud et al., 1992). Ο κύριος στόχος τους είναι η ενδοκυτταρική βιοσυνθετική οδός και η εκλεκτικότητά τους, καθώς αναστέλλουν τα ένζυμα που έχουν σχέση ή δημιουργούνται από τους ιούς και σχετίζονται με το μεταβολισμό των νουκλεοσιδίων και των νουκλεοτιδίων. Η επίδραση των αναλόγων πουρίνης στους ιούς βασίζεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις ιικές πολυμεράσες. Με αυτόν τον τρόπο, εξακολουθούν να αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο της ανάπτυξης των αντιικών παραγώγων.

Στην συνέχεια παρουσιάζονται κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα (Shelton et al. 2016).

1.4.1 ΒΑΛΑΚΥΚΛΟΒΙΡΗ/ΒΑΛΑΝΓΚΙΚΛΟΒΙΡΗ

Η υδροχλωρική βαλακυκλοβίρη και η υδροχλωρική βαλανγκικλοβίρη αποτελούν προφάρμακα της ακυκλοβίρης και της γανσικλοβίρης αντιστοίχως. Η δράση τους έγκειται στο μπλοκάρισμα της σύνθεσης του DNA του ιού. Η έγκριση τους από τον FDA ήρθε το 2009 και το 2010 αντιστοίχως, οπότε και γίνεται χρήση τους σαν φάρμακα σε θεραπείες λοιμώξεων από κυτταρομεγαλοϊό και τον ιό του.



Εικόνα 4: Μοριακή δομή υδροχλωρικής βαλακυκλοβίρης

1.5 ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΓΟΥΑΝΙΝΗ

Τα ανάλογα πουρίνης κέρδισαν γρήγορα το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας, καθώς η δομική τροποποίηση των βάσεων πουρίνης έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη χιλιάδων βιολογικά ενεργών ενώσεων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται πολλά κλινικώς χρησιμοποιούμενα φάρμακα (Came & Caliguirri 1982; Kaufman et al. 1962). Οι υποκατηγορίες πουρινών που έχουν προσελκύσει μεγάλη προσοχή πάνω τους ερευνητικά, αφού πιθανολογείται ότι μπορεί να έχουν βιολογική δραστηριότητα είναι τα ανάλογα που έχει γίνει υποκατάσταση των θέσεων του άνθρακος (2, 6 και 8) στο ετεροκυκλικό τμήμα της βάσης (Hocsek, 2003). Επιπλέον έχουν διερευνηθεί για την δράση τους μέσω μιας σειράς μοριακών μετασχηματισμών της γουανίνης για να μπορέσουν οι ερευνητές να αξιολογήσουν τις αντικαρκινικές ιδιότητες των αναλόγων της.

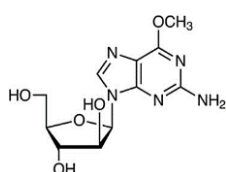
Η 6-θειογουανίνη (6-TG) είναι γνωστή στην επιστήμη από τις αρχές της δεκαετίας του 1950 και είναι ένα καλά μελετημένο ανάλογο πουρίνης με αντικαρκινικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες (Munshi et al., 2014; Tuncbilek et al. 2018). Παρόλο που προηγουμένως είχε γίνει χρήση της για να μπορούν να θεραπεύουν οι γιατροί την οξεία και χρόνια μυελογενή λευχαιμία, πλέον έχει γίνει αντικατάσταση της 6-θειογουανίνης και δεν χρησιμοποιείται, αντ' αυτού χρησιμοποιούνται πιο νέα και αποτελεσματικότερα ανάλογα, ενώ όμως χρησιμοποιείται ακόμα σαν μέθοδος για να θεραπεύεται η οξεία παιδική λεμφοβλαστική λευχαιμία.

Η Νελαραμπίνη (6-μεθοξυ-9-(-D-αραβινοφουρανοσυλ) γουανίνη ή 6-μεθοξυ-γουανοσίνη) είναι ένα προφάρμακο της 9-D-αραβινοφουρανοσυλγουανίνης (ara-G) και ανήκει στα ανάλογα γουανίνης. Έχει υποκατασταθεί στον δακτύλιο της γουανίνης η θέση 6 με μία μεθοξυ ομάδα (Robak et al., 2006).

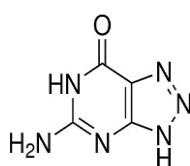
Όταν βρεθεί στο αίμα η Νελαραμπίνη, τότε γίνεται ταχύτατα η αντίδραση απομεθοξύλωσης και προκύπτει το Ara-G, όπου ο ενεργός της μεταβολίτης αποτελεί υπόστρωμα για τις DNA πολυμεράσες. Καθώς η νελαραβίνη ενσωματώνεται στο DNA, προκαλείται αναστολή των πολυμερασών, πράγμα που έχει σαν επίπτωση την διακοπή της αντιγραφής του DNA, οπότε τελικά το κύτταρο οδηγείται σε θάνατο μέσω απόπτωσης.

Το 2005,ο FDA ενέκρινε την Νελαραμπίνη για να χρησιμοποιείται στην θεραπεία της υποτροπιάζουσας οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Είναι ένα ισχυρό φάρμακο για τη θεραπεία κακοήθων όγκων του αιματολογικού συστήματος, και το θεραπευτικό αποτέλεσμα είναι αξιοσημείωτο.

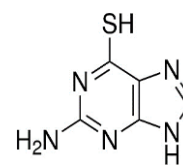
Η 8-αζαγουανίνη είναι ο πρώτος αντιμεταβολίτης νουκλεϊκού οξέος που εμφανίζει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη του όγκου (Bieber & Sartorelli, 1964). Η μελέτη των Kidder et al. (1951)έδειξε ότι μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του αδενοκαρκινώματος ποντικού E 0771 και του καρκίνου του μαστού. Το ανάλογο 8-αζαγουανίνης έχει δομή παρόμοια με αυτή της γουανίνης, με τη διαφορά ότι ο άνθρακας στη θέση 8 αντικαθίσταται από ένα άτομο αζώτου. Μία από τις κύριες λειτουργίες του AzG είναι η αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Εφόσον το ανάλογο είναι ενσωματωμένο στο αγγελιοφόρο RNA (mRNA), η σύνθεση πρωτεϊνών αναστέλλεται.



Νελαραμπίνη



8-Αζαγουανίνη



6-Θειογουανίνη

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

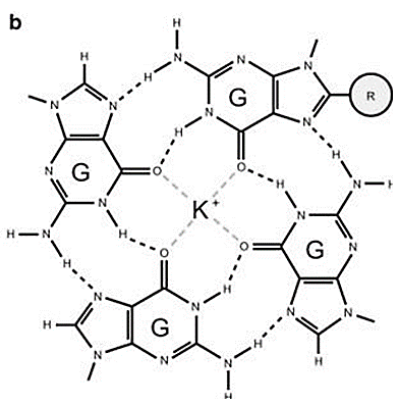
1.6 C-8 ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΓΟΥΑΝΙΝΗ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΕ ΔΟΜΕΣ G-QUADRUPLEX

Στα τέλη της δεκαετίας του 1960, όπου έγινε η ταυτοποίηση των δομών DNA, όπου φάνηκε ότι περιείχαν υψηλή περιεκτικότητα σε γουανίνη. Η προαναφερθείσα πλούσια σε γουανίνη αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων μπορεί να διπλωθεί σε τέσσερις

διαφορετικές δομές που ονομάζονται G-τετραπλές (Davis & Maizels, 2001). Περιοχές με δυνατότητα σχηματισμού G4-DNA έχουν εντοπιστεί στις αλληλουχίες ενισχυτών αρκετών πρωτο-ογκογονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των c-MYC και c-KIT12,13. Έχει προταθεί ότι το G4-DNA που σχηματίζεται κατά τη μεταγραφή μπορεί να είναι ο στόχος μικρών μορίων που θα αναστέλλουν την έκφραση γονιδίων όταν δεσμεύονται (Davis & Maizels, 2011).

Οι τροποποιήσεις στη δομή G-quadruplex έχουν μελετηθεί εκτενώς, συμπεριλαμβανομένης της εισαγωγής τροποποιημένης γουανίνης στον άνθρακα C8. Τα αποτελέσματα της έρευνας των Leach et al. (1994), έδειξαν ότι από την αντικατάσταση μίας γουανίνης με C8 υποκατεστημένα παράγωγα, συμπεριλαμβανομένων των 8-οξο-γουανίνη, 8-αμινο-γουανίνη, 8-O-μεθυλο-γουανίνη και 8-βρώμο-γουανίνη, είχαν επιπτώσεις στην σταθερότητα του G-quadruplex, ενώ υπάρχει άμεση εξάρτηση μεταξύ του τύπου και της θέσης που έχουν τροποποιηθεί οι διαφορετικές γουανίνες. Η 8-μεθυλογουανίνη (Xu & Sugiyama 2006) τείνει να αυξάνει τη θερμική σταθερότητα του G-quadruplex και έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη δυναμική της δομής G-quadruplex (Hadders et al., 2007; Marcel et al. 2011).

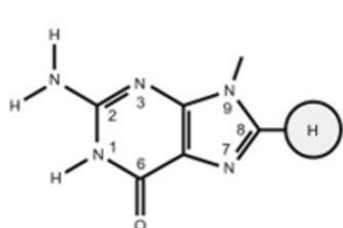
Η 8-μεθυλο-γουανίνη (Xu & Sugiyama, 2006) έχει φανεί ότι επιδρά θετικά στην αύξηση της θερμικής σταθερότητας του G-quadruplex ενώ αποδειχθεί ότι επηρεάζει την κινητική των δομών G-quadruplex (Hadders et al., 2007; Marcel et al. 2011).



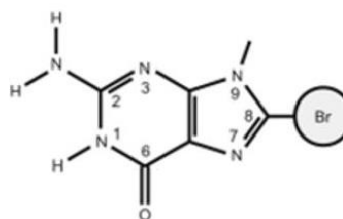
Εικόνα 6 : Απεικόνιση τροποποιημένου Q-quadruplex με C8 υποκατεστημένη γουανίνη. Όπου R=ομάδα υποκατάστασης

Καθώς τα αποτελέσματα του ρόλου των G-τετραπλών *in vivo* ολο αυξάνονται, οι επιδράσεις των παραγώγων τροποποιημένων με C8 σε αυτές τις δομές είναι φυσιολογικής σημασίας, επειδή πολλές τροποποιήσεις της C8-γουανίνης έχουν προταθεί ότι παίζουν σημαντικούς ρόλους, συμπεριλαμβανομένου της 8-οξο-γουανίνης (Grollman & Moriya 1993; David 2007), 8-αμινο-γουανίνης (Tan et al. 1999) και 8-μεθυλο-γουανίνης (Shrivastav et al. 2010).

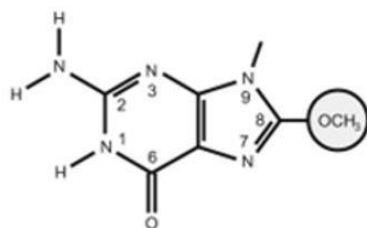
Από τεχνική άποψη, η μελέτη των επιπτώσεων διαφόρων τροποποιημένων παραγώγων C8 στο G-quadruplex θα ανοίξει το δρόμο για την εύρεση της πιο αποτελεσματικής εφαρμογής του για την επίτευξη των απαιτούμενων ιδιοτήτων του G-quadruplex και θα το καταστήσει πιθανό στόχο θεραπείας. Μέχρι στιγμής, έχουν βρεθεί τροποποιημένες αλληλουχίες G-quadruplex που εμφανίζουν δραστηριότητα έναντι του HIV (Jing et al., 2000; Tarrago-Litvak et al., 2002) και του καρκίνου (Simonsson & Henriksson 2002).



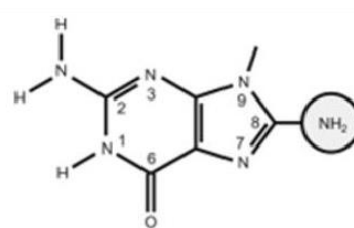
(α)



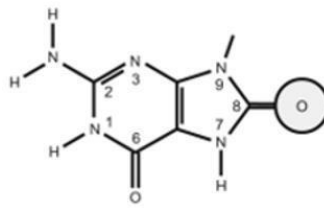
(β)



(γ)



(δ)



(ε)

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 C-8 ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗ ΓΟΥΑΝΙΝΗ ΚΑΙ Z-DNA

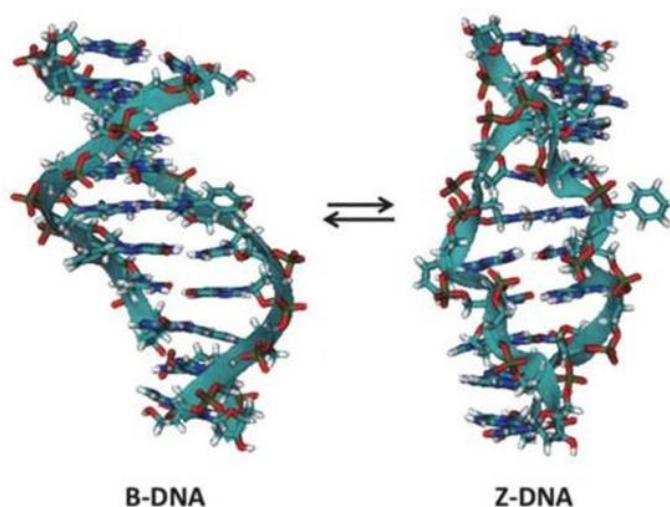
Το 1979 ανακαλύφθηκε ένας τύπος δίκλωνου DNA στο οποίο δύο παράλληλοι κλώνοι συνδέονται με ζεύγη βάσεων Watson-Crick και έχουν αριστερόστροφη κατεύθυνση αντί για δεδομένο δίκλωνο (B-DNA) ονομάζεται Z-δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (Rich et al., 1979). Η συσχέτιση του σχηματισμού του Z-DNA με την έκφραση του ογκογονιδίου *c-myc* γίνεται, καθώς η υπερέκφραση σχετίζεται με την παρουσία του Z-DNA κοντά στην περιοχή ενισχυτή και η αλληλουχία σχηματισμού Z-DNA βρίσκεται κοντά στην περιοχή ενισχυτή των κυττάρων U937.

Έχει βρεθεί ότι οι κυτοκίνες που ενεργοποιούνται στο γονίδιο CSF1 (μια πρωτεΐνη που ελέγχει την παραγωγή, τη διαφοροποίηση και τη λειτουργία των μακροφάγων) συμμετέχουν στο σχηματισμό του Z-DNA κοντά στον ενισχυτή για να διεγείρει τη μεταγραφή. Πρόσφατες μελέτες για το Z-DNA κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον καρκίνο και τις ιογενείς λοιμώξεις. Το

Z-DNA σχετίζεται με την έκφραση γονιδίων και μπορεί να οδηγήσει σε γενετικές ασθένειες που σχετίζονται με την καρκινογένεση (Vongsutilers, Gannett, 2018).

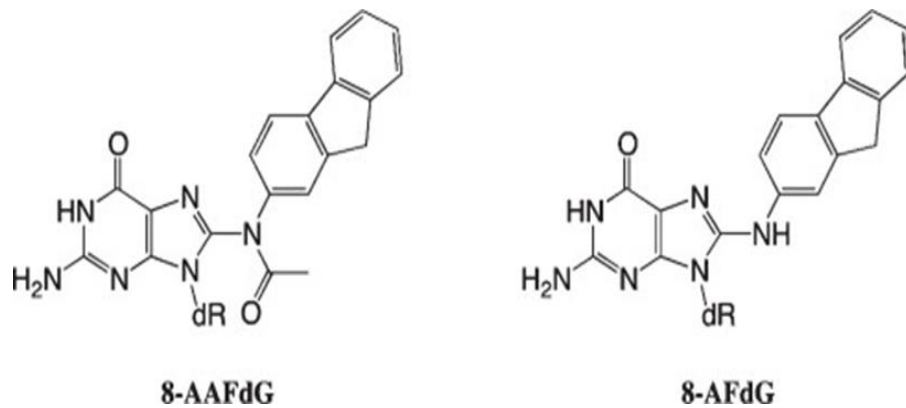
Ανακαλύφθηκε ότι οι τροποποιήσεις βάσης στο Z-DNA παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθερότητά του, με την προαγωγή του σχηματισμού του και όχι του B-DNA. Μία εκ των σημαντικότερων αλλαγών είναι η αντικατάσταση της γουανίνης στη θέση C8. Είναι αποδεδειγμένο ότι οποιαδήποτε από αυτές τις τροποποιήσεις μπορεί να οδηγήσει στο να σχηματιστεί και να σταθεροποιηθεί το Z-DNA.

Η C8-φαινυλογουανίνη είναι το πρώτο ανάλογο αυτής της σειράς που έχει αποδειχθεί ότι προάγει αποτελεσματικά τον σχηματισμό Z-DNA. Μεταγενέστερες μελέτες εξέτασαν αρκετά ανάλογα C8-αρυλογουανιδίνης με βάση την υποκατάσταση φαινυλίου, τα οποία περιείχαν αρωματικούς δακτυλίους με πολλούς υποκαταστάτες, συμπεριλαμβανομένων των π -CH₃, π -CH₂OH, π -CH₂OCH₃ και π -COOH. Μεταξύ των αναλόγων C8-αρυλογουανίνης που μελετήθηκαν, τα πρόσθετα ρ -καρβοξυφαινυλίου είναι τα πιο αποτελεσματικά στην προώθηση του σχηματισμού του Z-DNA.



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

Επιπλέον, το προϊόν που παράγεται με την προσθήκη φθοριούχου ακεταμιδίου (AAF) και αμινοφθοριδίου (AF) είναι η πρώτη τροποποίηση C8 γουανίνης που έχει μελετηθεί εκτενώς και σχετίζεται με την καρκινογένεση. Αυτά τα πρόσθετα έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν και προάγουν το σχηματισμό του Z-DNA.



Εικόνα 9 : Μοριακή δομή των φθοριούχου ακεταμίδιου και του αμινοφθορίδιου

Τέλος, η βρωμίωση στη θέση C8 της γουανίνης οδηγεί σε σταθεροποίηση της διαμόρφωσης του Z-DNA εν σχέσει με το ισοδύναμο της μη βρωμιωμένης γουανίνης. Έχοντας σαν δεδομένο ότι τα πρόσθετα C8 μπορούν να επηρεάσουν τη ρυθμιστική σύνδεση του B και του Z-DNA και έχουν την τάση να οδηγούν σε ισορροπία των μορφών Z και B, θεωρείται ότι τα ανάλογα C8 υποκατεστημένης γουανίνης μπορεί να παίζουν ρόλο στην καρκινογένεση.

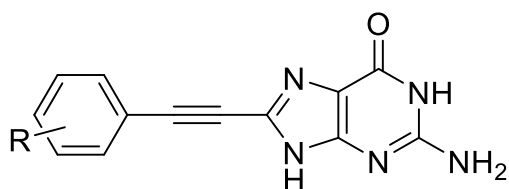
Η ανακάλυψη ότι το Z-DNA εμπλέκεται στη γονιδιακή μεταγραφή και καταστολή υποστηρίζει τη θεωρία ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των γονιδίων. Αν και χρειάζεται περαιτέρω έρευνα αυτή τη στιγμή, η χρήση του Z-DNA ως φάρμακο στόχου μελετάται. Σε αυτό το σημείο, η κατανόηση της επίδρασης των αναλόγων C8 της γουανίνης στον σχηματισμό και την καρκινογένεση του Z-DNA θα είναι πλεονέκτημα και θα βοηθήσει στην αποσαφήνιση του ρόλου του Z-DNA στον καρκίνο.

Ως αποτελεσματικός επαγωγέας Z-DNA, δύναται να γίνει χρήση των αναλόγων της C8-γουανίνης ως εργαλείο για να αποκρυπτογραφηθεί και να κατανοηθεί η λειτουργία και των βιολογικών επιδράσεων του Z-DNA ως φορέα για την ανακάλυψη και το σχεδιασμό φαρμάκων που βασίζονται στο Z-DNA.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Όπως αναφέρθηκε, η ανάγκη να βρεθούν νέα θεραπευτικά μέσα, με υψηλότερη βιολογική δραστηριότητα, χαμηλότερη τοξικότητα και λιγότερες παρενέργειες και η συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψαν και οδήγησαν στην έρευνα και σύνθεση διαφόρων φαρμάκων που περιέχουν τροποποιημένα νουκλεοτίδια, στις βάσεις τους, ως ενεργά συστατικά. Οι ετεροκυκλικές βάσεις τροποποιήθηκαν λεπτομερώς για να βρεθούν νέα ανάλογα με καλύτερα βιολογικά αποτελέσματα.

Το αντικείμενο που είχε αυτή η εργασία ήταν να συνθεθούν νέες τροποποιημένες στην βάση πουρίνες, οι οποίες πιθανώς δρουν ως αντιαυτοί και αντικαρκινικοί παράγοντες. Συγκεκριμένα έγινε χρήση του μορίου της 8-βρώμογουανίνης, όπου υποκαταστάθηκε η θέση οκτώ του άνθρακα στο τμήμα της γουανίνης, που περιείχε ένα βρώμιο, με τα αλκίνια 2-χλωρο-φαινυλακετυλένιο και 3-χλωρο-φαινυλακετυλένιο.



R: a) 2-Chloro, b) 3-Chloro

Εικόνα 10: Μοριακή δομή της R υποκατεστημένης φαινυλο-ακετυλενιο-γουανίνης, όπου R το 2-χλωρο ή το 3-χλωρο

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΟΙΒΑΔΑΣ (THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) είναι μια ποιοτική μέθοδος που δύναται να γίνει χρήση της για να παρακολουθείται η πρόοδος της αντίδρασης και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί η καθαρότητα της ουσίας στο άγνωστο δείγμα. Η πλάκα TLC που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της αντίδρασης αποτελείται από ένα φύλλο από αλουμίνιο, επικαλυμμένο με ένα λεπτό στρώμα silica gel, πάχους 0,2 mm, που είναι η στατική φάση. Εν αρχή γίνεται τοποθέτηση στην αρχή της πλάκας. Στη συνέχεια, γίνεται τοποθέτηση της πλάκας TLC σε ορθή θέση στον κλειστό θάλαμο που περιέχει τον διαλύτη ή το σύστημα διαλυτών, σε ύψος χαμηλότερο από το σημείο όπου έγινε τοποθέτηση του μείγματος. Ο διαλύτης / σύστημα διαλυτών είναι η κινητή φάση, η οποία ανεβαίνει αργά στην πλάκα TLC, παρασύροντας υπό εξέταση δείγμα. Η πλάκα στη συνέχεια αφαιρείται από τον θάλαμο και ξηραίνεται.

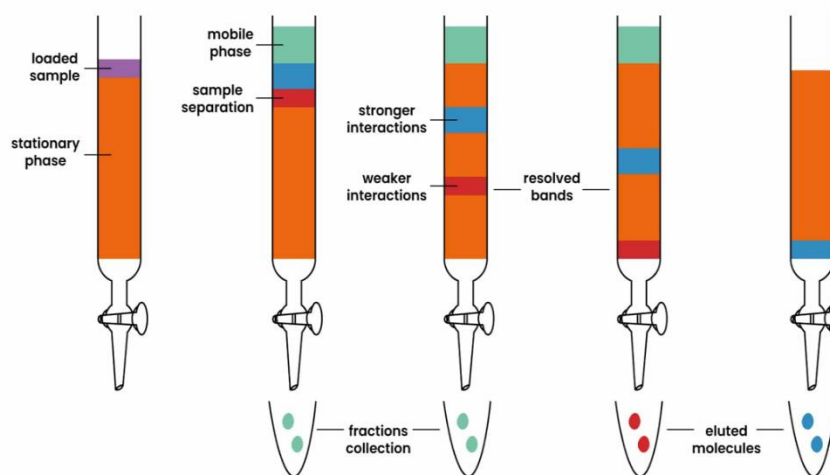
Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο δείγμα κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες στην πλάκα ανάλογα με την πολικότητά τους, ώστε να διακρίνονται σε κηλίδες, οι οποίες διακρίνονται αφού διαχωριστούν μεταξύ τους. Η αναγνώριση επιτυγχάνεται με τον υπολογισμό του συντελεστή κατακράτησης (Rf). Η σημειακή απεικόνιση πραγματοποιείται υπό την επίδραση υπεριώδους φωτός (254 nm ή 356 nm) ή μετά το ψέκασμα της πλάκας με διάλυμα θειικού οξέος 30% (H₂SO₄).

3.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Όταν απομονώνεται η ένωση, η ένωση στόχος θα πρέπει να καθαρίζεται από τον διαλύτη και τα παραπροϊόντα. Για να επιτευχθεί αυτός ο καθαρισμός γίνεται χρήση της τεχνικής χρωματογραφίας στήλης. Αυτό γίνεται εισάγοντας πεπιεσμένο αέρα (flash chromatography) μέσα σε silica gel (240-400, Merck grade).

Η χρωματογραφία στήλης είναι μια τεχνική διαχωρισμού, η αρχή της οποίας είναι η προσρόφηση των συστατικών του δείγματος σε μια στατική φάση (συνήθως πυριτική πηκτή) και στη συνέχεια η έκλουση αυτών με τη στατική φάση (διαλύτης ή μίγμα διαλυτών). Η προσρόφηση και η προσκόλληση των πολικών ουσιών γίνεται στην αρχή της χρωματογραφικής στήλης, οπότε για να συνεχίσει η έκλουση χρησιμοποιείται ένας πολικότερος διαλύτης. Ακόμη και με ουσίες λιγότερο πολικές, οι διαλυτές ουσίες είναι συνήθως πιο εύκολο να προωθηθούν ή να μειωθούν. Για την έκλουση ουσιών από το silica gel, η στήλη πρέπει να εκλούεται με διάφορους διαλύτες, ξεκινώντας από τους λιγότερο πολικούς και τελειώνοντας με τους πιο πολικούς.

Στη χρωματογραφία στήλης, γίνεται τοποθέτηση της στατικής φάσης σε στήλη από αδρανή υλικά (γυαλί, πυριτική γέλη, ανοξειδωτο χάλυβα). Γίνεται τοποθέτηση του δείγματος στην κορυφή (πάνω) της στήλης και τότε διέρχεται η κινητή φάση μέσω της στατικής φάσης ασκώντας πίεση σε αυτήν ή λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος κινούνται κατά μήκος της χρωματογραφικής στήλης με διαφορετικές ταχύτητες, ανάλογα με τη συγγενειά τους για τη στατική φάση.



Εικόνα 11: Διαχωρισμός δείγματος με χρωματογραφία στήλης

3.3 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ

Ορισμένες αντιδράσεις απαιτούν τη χρήση ανύδρων διαλυτών όπως είναι το DMF, η μεθανόλη, το τολουόλιο, το διχλωρομεθάνιο και το ακετονιτρίλιο.

Για να γίνει χρήση του ακετονιτρίλιου και του τολουολίου, αυτά πρώτιστα ξηράνθηκαν κατά την διάρκεια της νύχτας, θερμαίνοντάς τα με την παρουσία υδριδίου του ασβεστίου σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό. Έπειτα έγινε απόσταξη τους υπό άζωτο και στην συνέχεια απομακρύνθηκε ο κάθε διαλύτης με απόσταξη και έγινε συλλογή του αποστάγματος σε φιάλη που περιείχε μοριακό κόσκινο 3Å (molecular sieves).

Αποστάζεται το διχλωρομεθάνιο παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και συλλέγεται το απόσταγμα σε φιάλη με μοριακό κόσκινο 4Å και αποθηκεύτηκε εκεί. Η μεθανόλη ξηράνθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 3Å υπό ατμόσφαιρα αδρανούς αζώτου για μία ώρα. Τέλος, αποθηκεύτηκε το DMF σε φιάλη που περιέχει μοριακό κόσκινο 3Å.

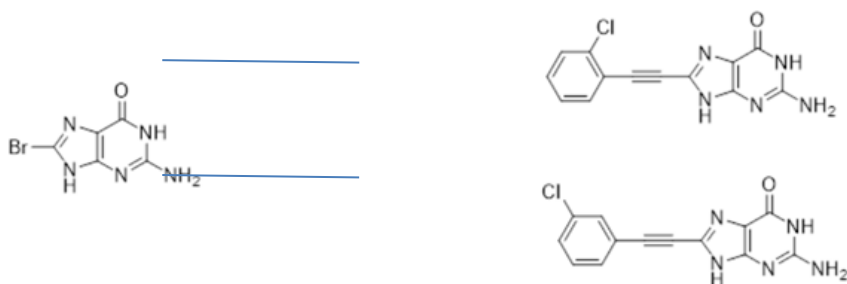
3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι η πρώτη και πιο χρήσιμη φασματοσκοπική τεχνική για τον προσδιορισμό της μοριακής δομής επειδή παρέχει έναν χάρτη του σκελετού άνθρακα και του υδρογόνου στα οργανικά μόρια.

Με την χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ταυτοποιούνται οι συντιθέμενες ενώσεις στην παρούσα εργασία. Έγινε καταγραφή των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ σε φωτόμετρο Bruker AVAMCEIII 300 χρησιμοποιώντας χλωροφόρμιο-d (CDCl_3) και μεθανόλη-d4 (CD_3OD) στα 300 MHz. Το τετραμεθυλσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιείται ως σημείο αναφοράς για το ^1H .

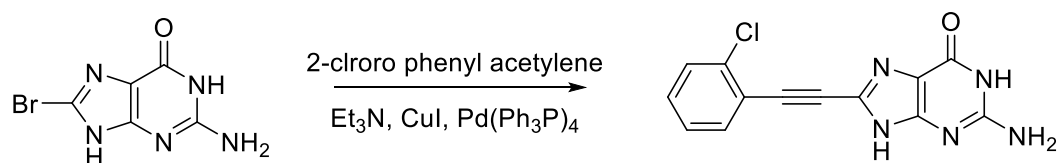
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΟΔΟΥ



4.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

4.2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 8-(2-ΧΛΩΡΟ ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΚΕΤΥΛΕΝΙΟ) ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ



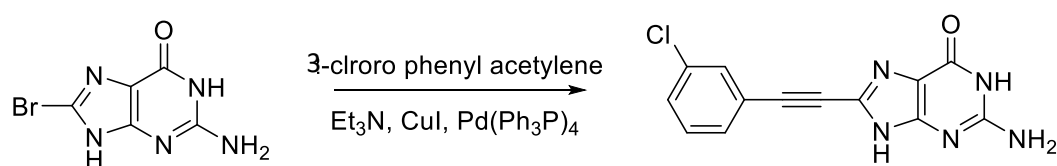
Εικόνα 12: Συνθετική οδός της 8-(2-χλωρο-φαινυλο-ακετυλενιο)γουανίνης

Αρχικά, ζυγίστηκαν 112mg, της διαθέσιμης εμπορικά ένωσης, 8-βρώμο-γουανίνης [$M_r=230,02$],(0,48mmol) και πραγματοποιήθηκε αντίδραση Sonogashira, η οποία περιγράφεται ακολούθως. Τα 112mg της 8-βρωμο-γουανίνης διαλύθηκαν σε 0,85ml άνυδρου διαλύτη DMF. Κατόπιν προστέθηκαν 3eq τριαιθυλαμίνης Et_3N (0,119ml), 0,1eq ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκαταλύτης) (9,14mg), 0,1eq τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [$\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$] (καταλύτης) (55,48mg) και τέλος 3eq 2-χλωρο-φαινυλαιθενίου [$M_r=136,58$, $d=1,125 \text{ g/cm}^3$](0,174ml). Η αντίδραση

αφέθηκε να γίνει στον απαγωγό υπό συνεχούς παροχής N₂ και συνεχόμενης ανάδευσης. Η πορεία της αντίδρασης διήρκησε 3 ώρες, όπου ανά μία ώρα ελεγχόταν εάν η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί με TLC σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/ 2 AcOEt (R_f=0.2), καθώς λαμβάναμε δείγμα με μικροεκχύλιση με NaCl/AcOEt δείγμα από την αντίδραση το ξηραίναμε για να φύγει όλος ο διαλύτης DMF και το συγκρίναμε με βρωμογουανίνη (μάρτυρας) διαλυμένη σε CH₂Cl₂ σε λάμπα UV. Μετά την δημιουργία του προϊόντος, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με υδατική φάση το NaCl ή H₂O και οργανική φάση το AcOEt σε αναλογία 70:30 οργανική φάση/υδατική φάση. 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 5 Hexane/ 5 AcOEt. Τελικά λήφθηκε ποσότητα 21mg του προϊόντος με απόδοση της αντίδρασης 67%.

R_f	0,2 (5:5 Hex/AcOEt)
Απόδοση	67%

4.2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ 8-(3-ΧΛΩΡΟ ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΚΕΤΥΛΕΝΙΟ) ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ



Εικόνα 13: Συνθετική οδός της 8-(3-χλωρο-φαινυλο-ακετυλενιο)γουανίνης

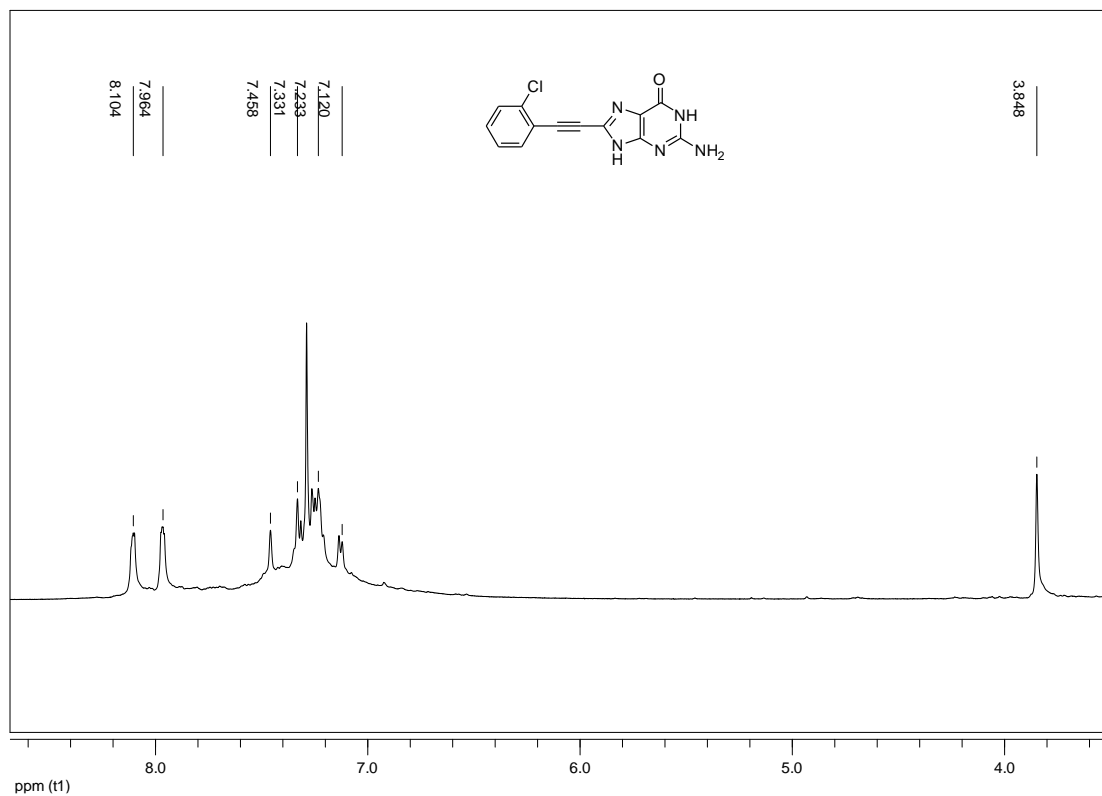
Αρχικά, ζυγίστηκαν 125mg, της διαθέσιμης εμπορικά ένωσης, 8-βρώμο-γουανίνης (1) [M_r=230,02],(0,54mmol) και πραγματοποιήθηκε αντίδραση Sonogashira, η οποία περιγράφεται ακολούθως. Τα 125mg της 8-βρωμο-γουανίνης διαλύθηκαν σε 0,95ml

άνυδρου διαλύτη DMF. Κατόπιν προστέθηκαν 3eq τριαιθυλαμίνης Et₃N (0,224ml), 0,1eq ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκαταλύτης) (10,30mg), 0,1eq τετράκις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄] (καταλύτης) (62,40mg) και τέλος 3eq 3-χλωρο-φαινυλαιθενίου [Mr=136,58, d=1,109 g/cm³](0,199ml). Η αντίδραση αφέθηκε να γίνει στον απαγωγό υπό συνεχούς παροχής N₂ και συνεχόμενης ανάδευσης. Η πορεία της αντίδρασης διήρκησε 3 ώρες, όπου ανά μία ώρα ελεγχόταν εάν η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί με TLC σε σύστημα διαλυτών 8 Hexane/ 2 AcOEt (R_f=0.2), καθώς λαμβάναμε δείγμα με μικροεκχύλιση με NaCl/AcOEt δείγμα από την αντίδραση το ξηραίναμε για να φύγει όλος ο διαλύτης DMF και το συγκρίναμε με βρωμογουανίνη (μάρτυρας) διαλυμένη σε CH₂Cl₂ σε λάμπα UV. Μετά την δημιουργία του προϊόντος, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με υδατική φάση το NaCl ή H₂O και οργανική φάση το AcOEt σε αναλογία 70:30 οργανική φάση/υδατική φάση. 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 5 Hexane/ 5 AcOEt. Τελικά λήφθηκε ποσότητα 22mg του προϊόντος με απόδοση της αντίδρασης 63%.

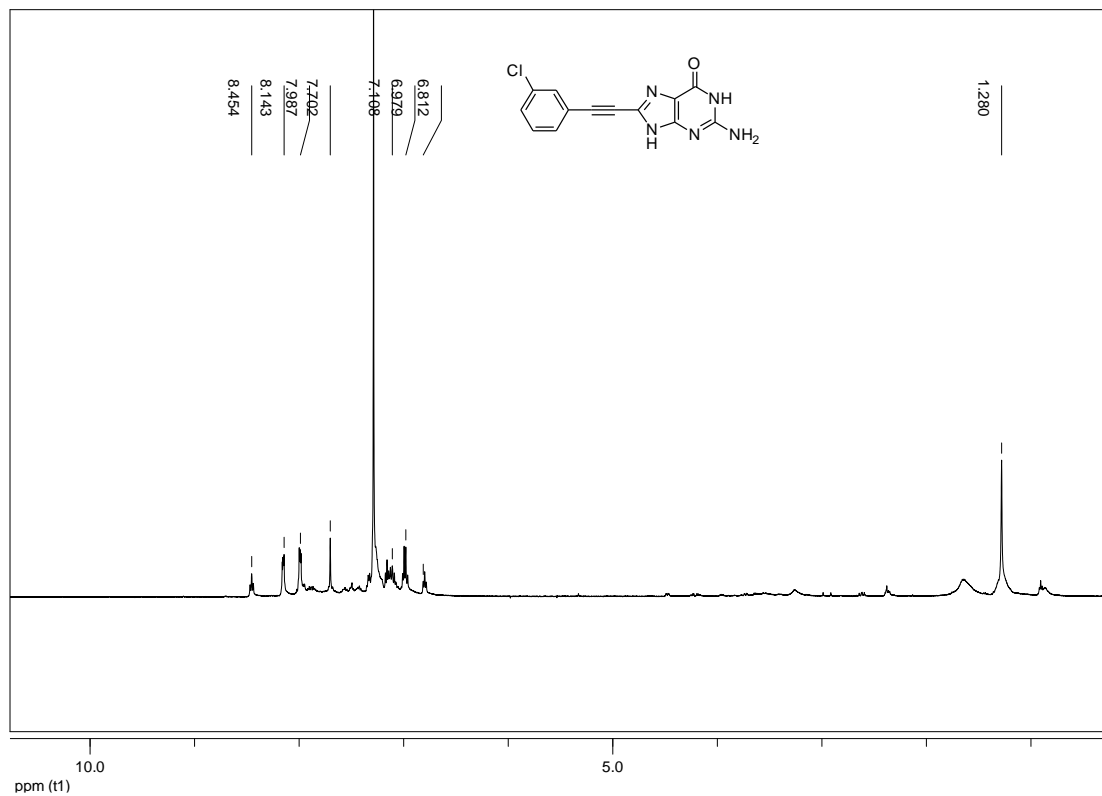
R_f	0,25 (5:5 Hex/AcOEt)
Απόδοση	63%

5. ΦΑΣΜΑΤΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

5.1 NMR ΤΗΣ 8-(3-ΧΛΩΡΟ ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΚΕΤΥΛΕΝΙΟ) ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ



5.2 NMR ΤΗΣ 8-(3-ΧΛΩΡΟ ΦΑΙΝΥΛΟ ΑΚΕΤΥΛΕΝΙΟ) ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ

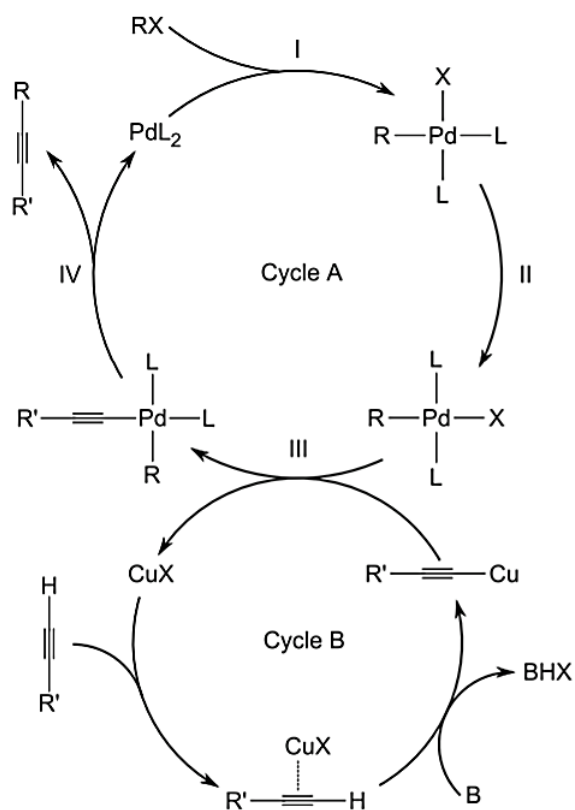


6.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ανάλογα των νουκλεοτιδίων με τροποποιήσεις στο τμήμα της βάσης αναπτύχθηκαν σαν μία προσπάθεια των επιστημόνων να βρουν εναλλακτικά φάρμακα για να καταπολεμηθούν χρόνιες νόσοι, όπως κακοήθειες νεοπλασίες και ιϊκές μολύνσεις. Οι ερευνητικές μελέτες και οι προσπάθειες έχουν σκοπό τους να αναπτύξουν ανάλογα, τα οποία δεν θα παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα προς τα υγιή κύτταρα με χαμηλή βιολογική δράση και εκλεκτικότητα.

Εν προκειμένω στην συγκεκριμένη εργασία συνετέθησαν νέα παράγωγα πουρίνης και πιο συγκεκριμένα χλωρογουανίνης, όπου είναι πολύ πιθανόν να παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση. Η σύνθεση έγινε μέσω της επίτευξης της αντίδρασης Sonogashira, η Sonogashira έχει σύντομη και εύκολη διαδικασία για να επιτευχθεί.

Η αντίδραση Sonogashira είναι μια αντίδραση διασταυρούμενης σύζευξης, η χρήση της οποίας γίνεται στην οργανική σύνθεση με σκοπό τον σχηματισμό δεσμών 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:



Για να ταυτοποιηθούν οι εν λόγω ενώσεις που παράγονται χρησιμοποιείται η φασματοσκοπία 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 καρκινικών κυτταρικών σειρών.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bieber, A. L., & Sartorelli, A. C. (1964). The metabolism of thioguanine in purine analog-resistant cells. *Cancer research*, 24(7), 1210-1215.
- Came, P. E., & Caliguiri, L. A. (Eds.). (1982). *Chemotherapy of viral infections*. Springer Berlin Heidelberg.
- Chen, R., Keating, M. J., Gandhi, V., & Plunkett, W. (2005). Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood*, 106(7), 2513-2519.
- Clarks,L.(2021). What is dna. Ανάκτηση από <https://whatisdna.net/>
- Davis, L., & Maizels, N. (2011). G4 DNA: at risk in the genome. *The EMBO journal*, 30(19), 3878-3879.
- Denny, W. R., & Wilman, D. E. V. (1990). The Chemistry of Antitumour agents. *Wilman, DEV, Ed.*
- Eriksson, B., Helgstrand, E., Johansson, N. G., Larsson, A., Misiorny, A., Noren, J. O., ... & Öberg, B. (1977). Inhibition of influenza virus ribonucleic acid polymerase by ribavirin triphosphate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 11(6), 946-951.
- Gizzi, A. S., Grove, T. L., Arnold, J. J., Jose, J., Jangra, R. K., Garforth, S. J., ... & Almo, S. C. (2018). A naturally occurring antiviral ribonucleotide encoded by the human genome. *Nature*, 558(7711), 610-614.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2006). of Medical, p.37.
- Grollman, A. P., & Moriya, M. (1993). Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends in genetics*, 9(7), 246-249.
- Hadders, M. A., Beringer, D. X., & Gros, P. (2007). Structure of C8 α -MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. *Science*, 317(5844), 1552-1554.
- 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.
- James, J. S. (1998). Ribavirin approved for hepatitis C combination treatment. *AIDS treatment news*, (297), 7.
- Jayaram, H. N., Grusch, M., Cooney, D. A., & Krupitza, G. (1999). Consequences of IMP dehydrogenase inhibition, and its relationship to cancer and apoptosis. *Current medicinal chemistry*, 6, 561-574.

- Jing, N., De Clercq, E., Rando, R. F., Pallansch, L., Lackman-Smith, C., Lee, S., & Hogan, M. E. (2000). Stability-activity relationships of a family of G-tetrad forming oligonucleotides as potent HIV inhibitors: a basis for anti-HIV drug design. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3421-3430.
- Kaufman, H. E. (1962). Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 109(2), 251-252.
- Kidder, G. W., Dewey, V. C., Parks, R. E., & Woodside, G. L. (1951). Further evidence on the mode of action of 8-azaguanine (guanazolo) in tumor inhibition. *Cancer Research*, 11(3), 204-211.
- Lafer, E. M., Möller, A., Nordheim, A., Stollar, B. D., & Rich, A. (1981). Antibodies specific for left-handed Z-DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(6), 3546-3550.
- Leach, D. R. (1994). Long DNA palindromes, cruciform structures, genetic instability and secondary structure repair. *Bioessays*, 16(12), 893-900.
- Marcel, V., Tran, P. L., Sagne, C., Martel-Planche, G., Vaslin, L., Teulade-Fichou, M. P., ... & Van Dyck, E. (2011). G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms. *Carcinogenesis*, 32(3), 271-278.
- Munshi, P. N., Lubin, M., & Bertino, J. R. (2014). 6-thioguanine: a drug with unrealized potential for cancer therapy. *The oncologist*, 19(7), 760.
- Nagai, K., Nagasawa, K., Kihara, Y., Okuda, H., & Fujimoto, S. (2007). Anticancer nucleobase analogues 6-mercaptopurine and 6-thioguanine are novel substrates for equilibrative nucleoside transporter 2. *International journal of pharmaceutics*, 333(1-2), 56-61.
- Parikh, A. R., Van Seventer, E. E., Siravegna, G., Hartwig, A. V., Jaimovich, A., He, Y., ... & Corcoran, R. B. (2021). Minimal Residual Disease Detection using a Plasma-Only Circulating Tumor DNA Assay in Colorectal Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*.
- Parker, W. B. (2009). Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chemical reviews*, 109(7), 2880-2893.
- Périgaud, C. G. J. L., Gosselin, G., & Imbach, J. L. (1992). Nucleoside analogues as chemotherapeutic agents: a review. *Nucleosides & nucleotides*, 11(2-4), 903-945.
- Ross, W. S., Hardin, C. C., Tinoco Jr, I., Rao, S. N., Pearlman, D. A., & Kollman, P. A. (1989). Effects of nucleotide bromination on the stabilities of Z-RNA and Z-DNA: A molecular mechanics/thermodynamic perturbation study. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 28(11), 1939-1957.

- 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.
- Rosemeyer, H. (2004). The chemodiversity of purine as a constituent of natural products. *Chemistry & biodiversity*, 1(3), 361-401.
- 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.
- Shrivastav, A., Mishra, S. K., Shethia, B., Pancha, I., Jain, D., & Mishra, S. (2010). Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(2), 283-287.
- Sidwell, R. W., Huffman, J. H., GP Khare, L., Allen, B., JT Witkowski, R., & Robins, K. (1972). Broad-spectrum antiviral activity of virazole: 1- β -D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide. *Science*, 177(4050), 705-706.
- Sidwell, R. W., Khare, G. P., Allen, L. B., Huffman, J. H., Witkowski, J. T., Simon, L. N., & Robins, R. K. (1975). In vitro and in vivo Effect of 1- β -D-Ribofuranosyl-1, 2, 4-Triazole-3-Carboxamide (Ribavirin) on Types 1 and 3 Para-influenza Virus Infections. *Chemotherapy*, 21(3-4), 205-220.
- Simonsson, T., & Henriksson, M. (2002). c-myc Suppression in Burkitt's lymphoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 290(1), 11-15.
- Sintchak, M. D., & Nimmesgern, E. (2000). The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. *Immunopharmacology*, 47(2-3), 163-184.
- Tan, X., Suzuki, N., Johnson, F., Grollman, A. P., & Shibutani, S. (1999). Mutagenic properties of the 8-amino-2'-deoxyguanosine DNA adduct in mammalian cells. *Nucleic acids research*, 27(11), 2310-2314.
- Tarrago-Litvak, L., Andreola, M., Fournier, M., Nevinsky, G. A., Parissi, V., Richard de Soultrait, V., & Litvak, S. (2002). Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase and integrase: classical and emerging therapeutical approaches. *Current pharmaceutical design*, 8(8), 595-614.
- 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.
- Vedel, M., Lawrence, F., Robert-Gero, M., & Lederer, E. (1978). The antifungal antibiotic sinefungin as a very active inhibitor of methyltransferases and of the

transformation of chick embryo fibroblasts by rous sarcoma virus. *Biochemical and biophysical research communications*, 85(1), 371-376.

- Vongsutilers, V., & Gannett, P. M. (2018). C8-Guanine modifications: effect on Z-DNA formation and its role in cancer. *Organic & biomolecular chemistry*, 16(13), 2198-2209.

- Xu, Y., & Sugiyama, H. (2006). Formation of the G-quadruplex and i-motif structures in retinoblastoma susceptibility genes (Rb). *Nucleic acids research*, 34(3), 949-954.

- Zhou, S., Breitenbach, J. M., Borysko, K. Z., Drach, J. C., Kern, E. R., Gullen, E., ... & Zemlicka, J. (2004). Synthesis and antiviral activity of (Z)-and (E)-2, 2-[bis(hydroxymethyl) cyclopropylidene] methylpurines and-pyrimidines: second-generation methylenecyclopropane analogues of nucleosides. *Journal of medicinal chemistry*, 47(3), 566-575.