



ΤΜΗΜΑ

**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

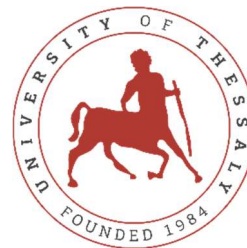


ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Σχεδιασμός, σύνθεση και βιολογική αποτίμηση
νέων 2-τριαζολο υποκατεστημένων πουρινών

Επιμέλεια: Σοφία Ευθυμίου

Λάρισα, Φεβρουάριος 2023



DIPLOMA THESIS

Design, synthesis and biological evaluation of novel
2-triazole substituted purines

Prepared by Sofia Euthimiou

Larisa, February 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. Δ. Κομιώτης, Καθηγητής Οργ. Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Παν. Θεσσαλίας
2. Ανδ. Τσοτίνης, Καθηγητής Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Παν. Αθηνών
3. Μ. Παπαδόπουλος, Ερευνητής Α', ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	5
Εισαγωγή	5
Πουρίνες.....	5
Βιολογική δράση πουρινών.....	7
Σύνθεση πουρινών.....	10
Υποκατάσταση πουρίνης στη θέση 2.....	15
Μέθοδοι υποκατάστασης πουρίνης στη θέση 2 . Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
Παράγωγα πουρίνης ως αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσεων.....	18
Βιβλιογραφία.....	20

Περίληψη

Abstract

Εισαγωγή

Οι πουρίνες είναι αρωματικές ετεροκυκλικές ενώσεις που αποτελούνται από ένα δακτύλιο πυριμιδίνης και ένα ιμιδαζολίου. Φυσιολογικά βρίσκονται υπεράριθμα στα νουκλεϊνικά οξέα, καθώς και σε συμπαράγοντες που χρησιμοποιούνται από ένζυμα του οργανισμού. Λόγω της αξιοσημείωτης βιολογικής τους δράσης, έχει γίνει εκτεταμένη έρευνα προς δημιουργία παραγώγων πουρίνης για φαρμακευτική χρήση, που οδήγησε στην ανακάλυψη παραγώγων με αντικαρκινική δράση και όχι μόνο.

Σκοπός της εν λόγω διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη και η αναλυτική πορεία σύνθεσης νέων 2-τριαζολο-υποκατεστημένων παραγώγων πουρίνης, με στόχο την ανάδειξη σημαντικών ωφελειών από τη χρήση τους στην φαρμακευτική χημεία.

Η μελέτη των πουρινών στη βιολογική χημεία θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική λόγω του εύρους των ερευνητικών εφαρμογών και της σύνδεσης με την ιατρική και τη φαρμακολογία. Έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός παράγωγων πουρινών με χρήση στην αντιμετώπιση ιών, αυτοάνοσων νοσημάτων και στην πρόληψη του καρκίνου.

Η μελέτη του συστήματος υποκατάστασης και σύνθεσης των πουρινών είναι συνεχής ώστε να βρεθούν τύποι με βελτιωμένη δραστηριότητα οι οποίοι θα ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα στις προαναφερθείσες ή και άλλες εφαρμογές της φαρμακευτικής χημείας.

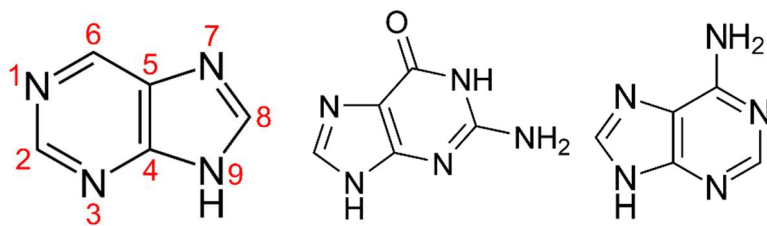
Στην παρούσα διπλωματική εργασία έχει μελετηθεί η σύνθεση 2-τριαζολο υποκατεστημένων πουρινών με πρώτη ύλη την αδενίνη (9H-Πουρίνη-6-αμίνη) από την οποία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανακάλυψη νέων, γρήγορων και αποτελεσματικότερων οδών σύνθεσης τροποποιημένων πουρινικών αναγώγων καθώς η αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης.

Πουρίνες

Οι πουρίνες είναι ετεροκυκλικές αρωματικές οργανικές ενώσεις που αποτελούνται από έναν δακτύλιο πυριμιδίνης συντηγμένο σε έναν δακτύλιο ιμιδαζολίου. Η πουρίνη έχει δομή πενταμελούς ή εξαμελούς δακτυλίου ενώ αποτελεί τον πιο διαδεδομένο N ετερόκυκλο στη φύση (E.Fischer, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1899).

Η ονοματοδοσία των πουρινών (purum uricum) έγινε από τον Emil Fischer το 1899, Γερμανό χημικό ο οποίος τιμήθηκε με βραβείο Νόμπελ για τη συνεισφορά του στην έρευνα των υδατανθράκων και τη μελέτη της παρουσίας πουρινικών ομάδων σε οργανικές ενώσεις (THE NOBEL PRIZE, 2022).

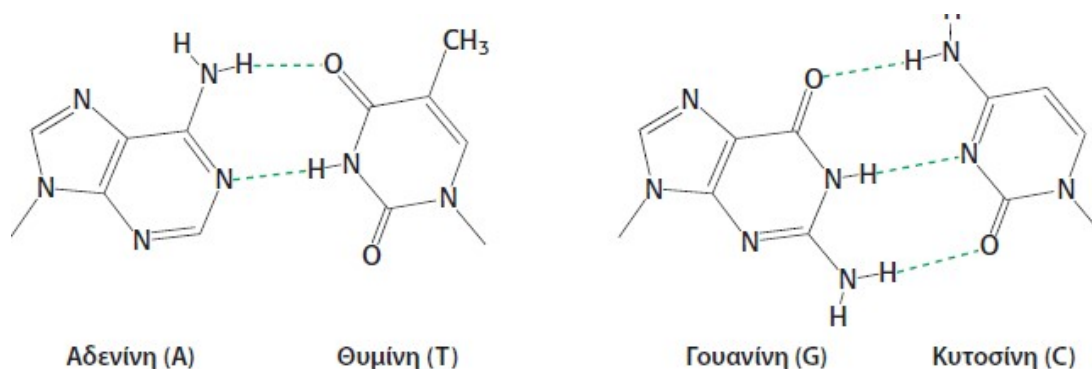
Είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση με βασικότερες τη γουανίνη και την αδενίνη. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται οι δομές του βασικού δακτυλίου της πουρίνης, καθώς και οι δομές της γουανίνης και αδενίνης.



Σχήμα 1: Δομή πουρίνης, δομή γουανίνης, δομή αδενίνης

Υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες, το μεγαλύτερο μέρος της δεξαμενής πουρινών παράγεται από την οδό διάσωσης με τη διαδικασία διάσπασης του νουκλεϊκού οξέος, οδηγώντας στην απελευθέρωση ελεύθερων νουκλεοβασών πουρινών με τη μορφή αδενίνης, γουανίνης και της βάσης υποξανθίνης της μονοφωσφορικής ινοσίνης (Pedley A.M., 2017). Οι βασικές πουρίνες που συμμετέχουν στη σύνθεση του DNA και του RNA, καθώς αποτελούν μέρος της δομής των νουκλεοτιδίων των νουκλεϊκών οξέων τους είναι η γουανίνη (G) και η αδενίνη (A) (Bistroνιό, 2017).

Οι πουρίνες, γουανίνη και αδενίνη, αποτελούν τις δύο εκ των τεσσάρων βάσεων των νουκλεϊνικών οξέων, που μέσω δεσμών υδρογόνου, ενώνονται με τις πυριμιδίνες, κυττοσίνη και θυμίνη, δημιουργώντας τη δίκλωνη αλυσίδα του DNA.



Σχήμα 2: Ζεύγη βάσεων σύμφωνα με τους Watson-Crick

Η γουανίνη με τη χημική ονομασία 2-αμινο-6-οξοπουρίνη, είναι η βασική πουρίνη η οποία συνδέεται με την κυττοσίνη, ως βάση της πυριμιδίνης, με το σχηματισμό τριών δεσμών υδρογόνου (G. M. Cooper, 2011).

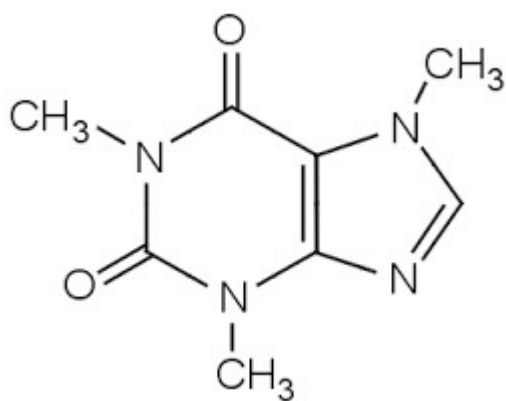
Βιολογική δράση πουρινών

Η αδενίνη με τη χημική ονομασία 9H-Πουρίνη-6-αμίνη είναι η βασική πουρίνη η οποία συνδέεται με τη θυμίνη, ως βάση της πυριμιδίνης, με το σχηματισμό δύο δεσμών υδρογόνου. Η βάση της θυμίνης, στην περίπτωση του RNA υποκαθίσταται από τη βάση ουρακίλη, η οποία είναι επίσης άζωτούχα βάση της οικογένειας των πυριμιδίων (G. M. Cooper, 2011).

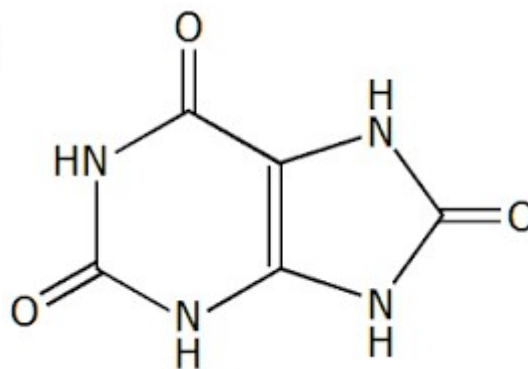
Οι πουρίνες αδενίνη και γουανίνη, που αποτελούν μέρος και των δύο ειδών νουκλεϊικών αλυσίδων, τόσο του DNA όσο και του RNA, απαντώνται ελεύθερες στη φύση, η αδενίνη κυρίως στο τσάι και στις εκκρίσεις του οργανισμού όπως τα ούρα, ενώ η γουανίνη στους οργανισμούς του θαλάσσιου οικοσυστήματος όπως ψάρια και θαλάσσια πτηνά.

Ο ρόλος των νουκλεοτιδίων είναι ιδιαίτερα σημαντικός στη βιοχημεία. Όπως περιγράφεται παραπάνω τα νουκλεοτίδια αποτελούνται από μια νουκλεοβάση πουρίνης με συντηγμένο δακτύλιο και ένα τμήμα ριβόζης/δεοξυριβόζης-φωσφορικού άλατος. Η σημαντικότητά τους συνίσταται στο ότι δρουν ως φορείς ενέργειας για την προώθηση ενζυμικών αντιδράσεων, μεσολαβούν στη σηματοδότηση εντός και μεταξύ των κυττάρων και διαδραματίζουν πολυάριθμους ζωτικούς ρόλους στη ρύθμιση του μεταβολισμού πέραν της ομοιόστασής τους (Hess J.R., 2012) (Zhao H., 2015).

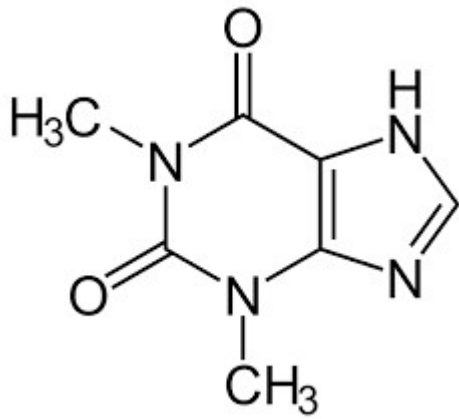
Άλλες πουρίνες που συναντώνται ελεύθερες στη φύση είναι η καφεΐνη, το ουρικό οξύ, η ξανθίνη, η υποξανθίνη, η θεοβρωμίνη (X.-L. Yang, 1998).



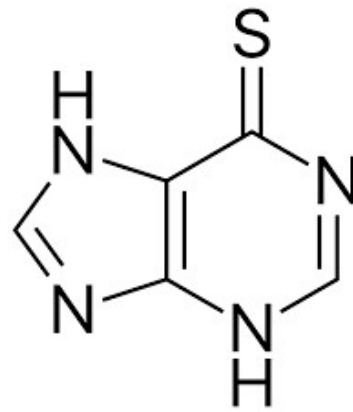
Σχήμα 3: Καφεΐνη



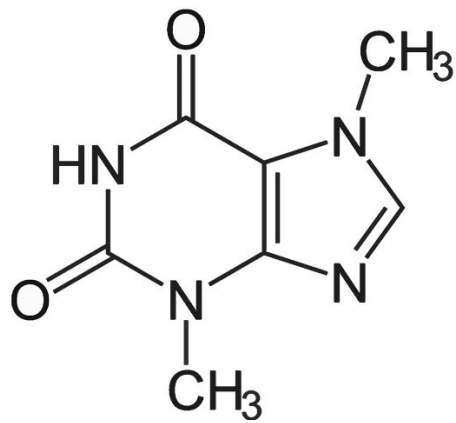
Σχήμα 4: Ουρικό οξύ



Σχήμα 5: Ξανθίνη

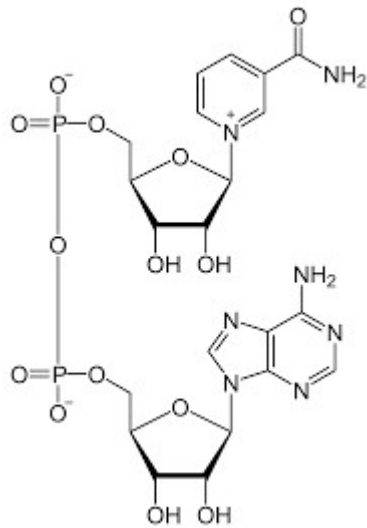


Σχήμα 6: Υποξανθίνη

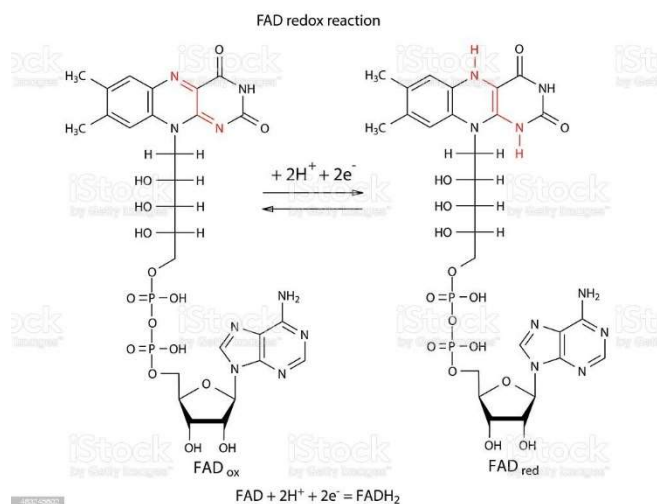


Σχήμα 7: Θεοβρωμίνη

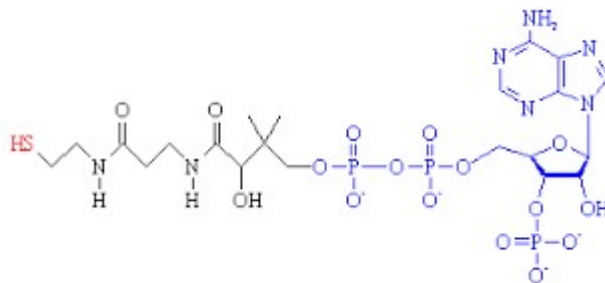
Ο δακτύλιος της πουρίνης εμφανίζεται συχνά στους ζωντανούς οργανισμούς. Ειδικότερα μεγάλος αριθμός ενζύμων εκμεταλλεύεται βάσεις πουρίνης, κατά κύριο λόγο την αδενίνη. Ως εκ τούτου, σημαντικό ρόλο παίζουν ως συστατικά διαφόρων οξειδοαναγωγικών συνενζύμων που συμβάλλουν στις διεργασίες του μεταβολισμού. Τέτοια συνένζυμα είναι το νικοτινάμιδο-αδενίνο-δινουκλεοτίδιο (NADH), το φλάβινο-αδενίνο-νουκλεοτίδιο (FAD) και το ακέτυλο συνένζυμο Α (AcCoA). Εμφανίζεται, επίσης, στο ενεργειακό νόμισμα του κυττάρου, στην τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), που χρησιμοποιείται για την αποθήκευση ενέργειας σε όλα τα ζωντανά κύτταρα.



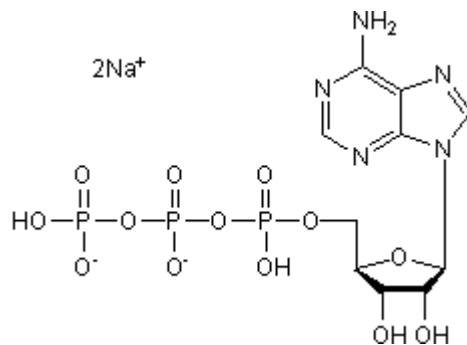
Σχήμα 8: NADH



Σχήμα 9: FAD



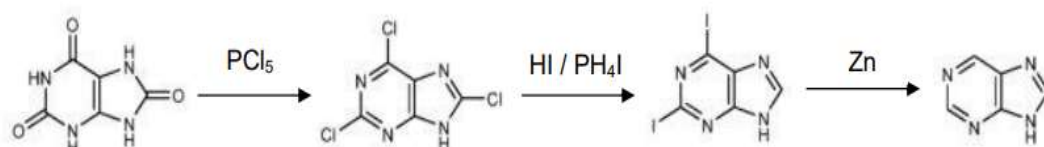
Σχήμα 10: AcCoA



Σχήμα 11: ATP

Σύνθεση πουρινών

Η σύνθεση της δομής της πουρίνης από τον Fisher έγινε το 1899 με πρώτη ύλη το ουρικό οξύ και αποτελούσε μια άχρωμη, κρυσταλλική, ασθενή βάση. Το ουρικό οξύ προήλθε από την απομόνωση λίθων της χοληδόχου κύστης από τον C. W. Scheele το 1776 (C.W.Scheele, 1776). Η σύνθεση της πουρίνης προήλθε από την διαδοχή τριών αντιδράσεων. Πρώτη είναι αντίδραση του ουρικού οξέος με τον πενταχλωριούχο φώσφορο (PCl₅) που σε πρώτη φάση παράγουν την 2,6,8 τριχλωροπουρίνη (E.Fischer, "Untersuchungen in der Puringruppe", 1907). Στη συνέχεια με τη χρήση υδροϊωδίου(HI) και ιωδιοφωσφίνης ([PH₄]⁺I) (P. Fresenius, 1991, σ. 294)προέκυψε η 2,6 διωδοπουρίνη, η οποία ανήχθη σε πουρίνη με σκόνη ψευδαργύρου (Zn).

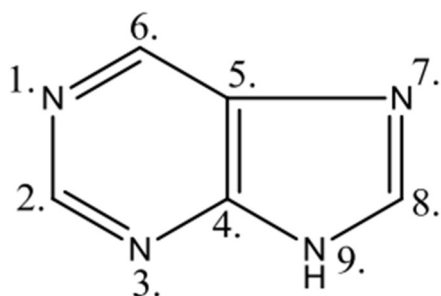


Σχήμα 12: Σύνθεση πουρίνης από ουρικό οξύ

Η σύνθεση παραγώγων πουρίνης μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους και διεργασίες. Η συνθετική διαδικασία ξεκινά συνήθως με πρώτη ύλη μια βάση πυριμιδίνης, στην οποία γίνεται υποκατάσταση. Στη συνέχεια ακολουθεί η κατασκευή του δακτυλίου ιμιδαζόλης ωστόσο μπορεί να υπάρξει και αντίστροφη συνθετική διαδικασία με το στάδιο της κατασκευής του δακτυλίου ιμιδαζόλης να προηγείται της διαδικασίας δόμησης του πυρήνα πυριμιδίνης. Σε κάποιες συνθετικές διαδικασίες η αντικατάσταση γίνεται απευθείας στο δακτύλιο πουρίνης (Conejo-Garcia A. e., 2010).

Μερικά παραδείγματα σύνθεσης παραγώγων πουρίνης

Ο τρόπος ανάγνωσης των μορίων πουρίνης είναι εύκολο να κατανοηθεί με τη σήμανση του ακόλουθου σχήματος. Η αρίθμηση του μορίου, δεν ταυτίζεται με τη σειρά με την οποία χτίζεται ο σκελετός του. Η αρίθμηση ξεκινά από τον εξαμελή δακτύλιο και στη συνέχεια περνά δεξιόστροφα στον πενταμελή δακτύλιο, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα (Wade, 2013).



Εικόνα: Σύστημα ανάγνωσης μορίων πουρίνης

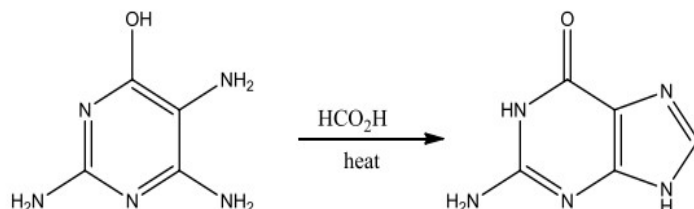
Πηγή: (D. Dal Ben, 2011)

Το σύστημα της πουρινεργικής σηματοδότησης προτάθηκε από τον Burnstock το 1972 ενώ το 1976 ορίστηκαν και οι πουρινεργικοί υποδοχείς (Burnstock, 1972) (Burnstock, 1976).

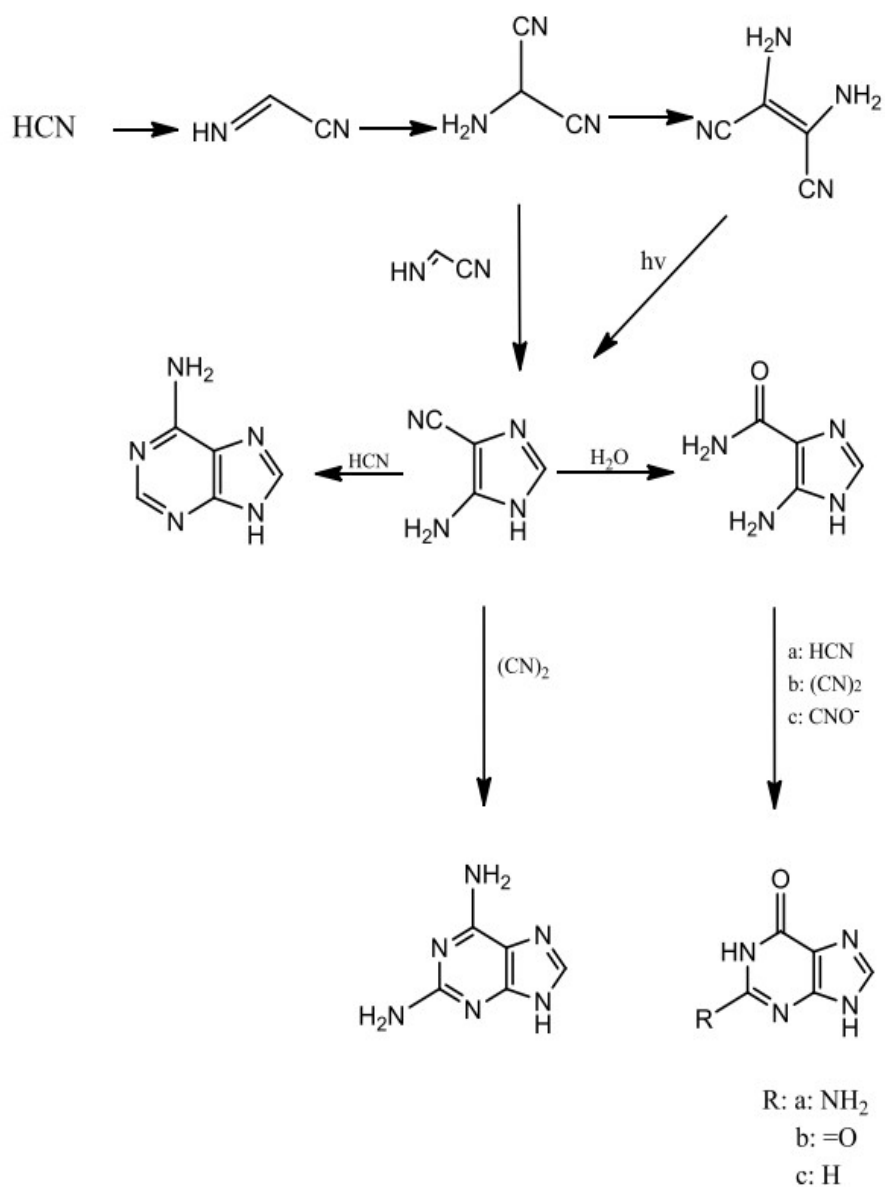
Οι πουρίνες αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης και έρευνας όσον αφορά τη σύνθεσή τους, καθώς αποτελούν βασικό στοιχείο των νουκλεϊκών οξέων.

Ορισμένες μέθοδοι σύνθεσης που έχουν καταγραφεί είναι οι εξής:

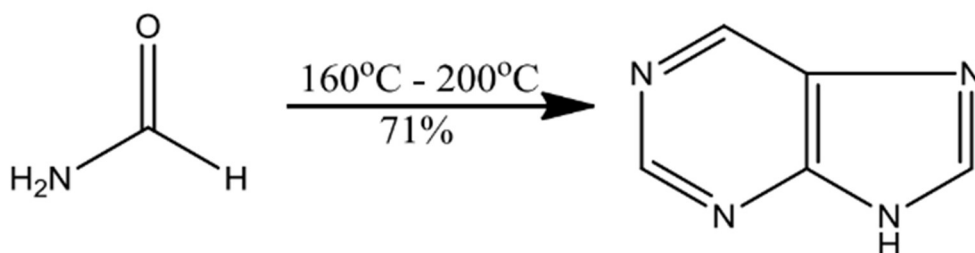
- Αντίδραση μεταξύ μιας αμινο-υποκατεστημένης πυριμιδίνης και του φορμικού οξέος.



- Τετραμερισμός μορίων HCN προς σχηματισμό διάμινο-μαλοδινιτρίλιο, με μετατροπή αυτού προς πουρίνες.



- Μια εναλλακτική μέθοδος σύνθεσης πουρινών, σε υψηλές αποδόσεις είναι η σύνθεσή της σε ένα βήμα μόνο με υψηλή θέρμανση του φορμαμίδιου, χωρίς τη χρήση επιπλέον αντιδραστηρίων ή υπό υψηλή πίεση. Η θέρμανση του φορμαμίδιου στους 160-200 °C δίνει την επιθυμητή πουρίνη ως εξής:



Εικόνα: Σύνθεση πουρίνης με υπερθέρμανση του φορμαμιδίου

Πηγή: H. Yamada, T. Okamoto, A One-step Synthesis of Purine Ring from Formamide. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 1972, 20 (3), 623

Η σύνθεση πουρινών είναι μια απλή διαδικασία που όπως περιεγράφηκε προηγουμένως μπορεί να ξεκινήσει είτε από μια προϋπάρχουσα πουρίνη, χρησιμοποιώντας την εμπορικά διαθέσιμη 2,6-διχλωροπουρίνη ή 2-αμινο-6-χλωροπουρίνη είτε με τη δημιουργία του δακτυλίου πουρίνης από παράγωγα διχλωροπυριμιδίνης (Fiorini & Abell, 1998) (Chang, et al., Synthesis and Application of Functionally Diverse 2,6,9-Trisubstituted Purine Libraries as Cdk Inhibitors, 1999). Ωστόσο η σύνθεση των 2-τριαζολο υποκατεστημένων πουρινών επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσης στις θέσεις 7 και 9 ή με αντιδράσεις υποκατάστασης και στα C2 και C6, με αποτέλεσμα την παραγωγή C-αμινωμένων και C-αλκυλιωμένων πουρινών (Conejo-Garcia A. C.-L.-P.-R., 2010).

Με τη χρήση της 2,6-διχλωροπουρίνης ως πρώτη ύλη των παραγώγων πουρίνης, παρατηρείται η σταδιακή εισαγωγή τριών υποκαταστάτων. Υπάρχουν 3 στάδια στη διαδικασία της υποκατάστασης της πουρίνης, που θα χαρακτηρίζονται στο εξής ως **Διαδρομή Α**, **Διαδρομή Β** και **Διαδρομή Γ**.

Διαδρομή Α-> Ενεργοποίηση

Το στάδιο της ενεργοποίησης περιλαμβάνει την εισαγωγή μιας αποχωρούσας ομάδας στη θέση του δακτυλίου πουρίνης όπου επιθυμείται η υποκατάσταση. Η αποχωρούσα ομάδα είναι τυπικά μια λειτουργική ομάδα, όπως ένα αλογονίδιο, που είναι ικανή να υποβληθεί σε μια πυρηνόφιλη αντίδραση υποκατάστασης. Η εισαγωγή της αποχωρούσας ομάδας μπορεί να επιτευχθεί μέσω μιας ποικιλίας χημικών μεθόδων, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης ηλεκτρόφιλων αντιδραστηρίων ή ενζυματικής τροποποίησης.

Διαδρομή Β-> Αντικατάσταση

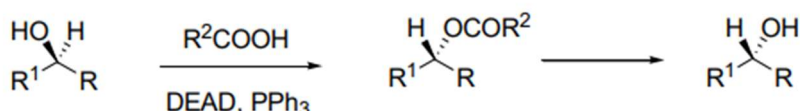
Αυτό το στάδιο περιλαμβάνει την αντικατάσταση της αποχωρούσας ομάδας με τον επιθυμητό υποκαταστάτη στην ενεργοποιημένη θέση του δακτυλίου πουρίνης. Η αντίδραση υποκατάστασης μπορεί να επιτευχθεί μέσω μιας ποικιλίας χημικών μεθόδων, συμπεριλαμβανομένης της πυρηνόφιλης υποκατάστασης, της ηλεκτροφιλικής υποκατάστασης ή της ριζικής υποκατάστασης. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται από τη φύση της αποχωρούσας ομάδας και του επιθυμητού υποκαταστάτη, καθώς και από τις συνθήκες αντίδρασης.

Διαδρομή Γ-> Απενεργοποίηση

Αυτό το στάδιο περιλαμβάνει την αφαίρεση τυχόν υπολειπόμενων λειτουργικών ομάδων που εισήχθησαν κατά τα στάδια ενεργοποίησης και αντικατάστασης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω μιας ποικιλίας χημικών μεθόδων, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης αντιδραστηρίων που είναι ικανά να αφαιρούν επιλεκτικά συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες ή ενζυματική τροποποίηση. Η απομάκρυνση των λειτουργικών ομάδων είναι απαραίτητη για να ληφθεί το τελικό παράγωγο πουρίνης με το επιθυμητό πρότυπο υποκατάστασης και για να εξασφαλιστεί ότι το μόριο είναι βιολογικά ενεργό και σταθερό.

Συνολικά, τα τρία στάδια υποκατάστασης πουρίνης είναι σημαντικά για τη σύνθεση τροποποιημένων παραγώγων πουρίνης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ποικίλες εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της ανακάλυψης φαρμάκων, της επιστήμης των υλικών και της βιοτεχνολογίας.

Η υποκατάσταση στο N-9 μπορεί να γίνει σε οποιοδήποτε από αυτά τα στάδια ωστόσο για να αποφευχθεί η παραγωγή ενός μείγματος N-7 και N-9 υποκατάστατων, πρέπει να προηγηθεί η εισαγωγή του υποκατάστατου στο C6 (Imbach, και συν., 1999). Η υποκατάσταση στο C6 θα κατευθύνει την υποκατάσταση στο N9, μέσω του αποκλεισμού της θέσης N-7 (Norman, Gray, Koh, & Schultz, Structure-Based Library Approach to Kinase Inhibitors, 1996). Η υποκατάσταση στη θέση N-9 πραγματοποιείται με δύο τρόπους, είτε σε βασικές συνθήκες, είτε μέσω της αντίδρασης αντικατάστασης Mitsunobu με την αντίστοιχη αλκοόλη, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.

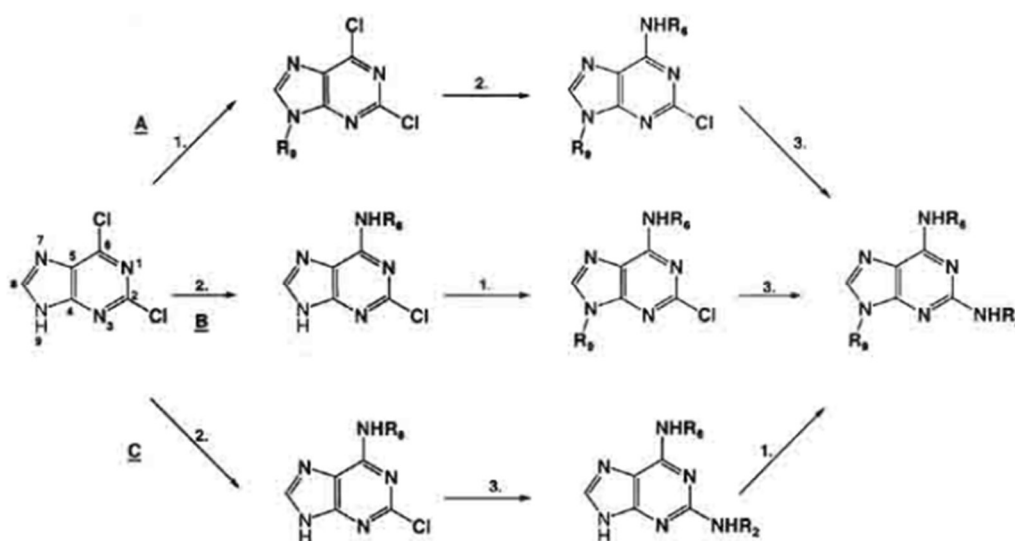


Εικόνα: Αντίδραση αντικατάστασης Mitsunobu

Συνεπώς, η εισαγωγή της πρώτης αμίνης γίνεται πρωτίστως στη θέση 6 με παρουσία ή απουσία βάσης (NEt₃, iPr₂NEt), σε DMF ή σε αλκοόλη (συνήθως n-βουτανόλη) στους 70-80°C.

Η δεύτερη αμίνη εισάγεται στη θέση 2, υπό πιο πιεστικές συνθήκες. Απαιτείται υψηλότερη θερμοκρασία (συνήθως 120-140°C) και χρησιμοποιούνται NMP, DMSO ως διαλύτης (Lum, Blum, Mackman, Wick, & Schow, 1998) (Schow, και συν., 1997) (Nugiel, Cornelius, & Corbett, J. Org. Chem., 1997), ή καθόλου διαλύτης (Shum, και συν., 2001). Η αντικατάσταση του ατόμου Cl με F ή I επιτρέπει καλύτερη αντιδραστικότητα σε αυτή τη θέση. Οι ελάχιστες αντιδραστικές αμίνες γενικά δεν εισέρχονται στη θέση 2 (ή μόνο σε χαμηλές αποδόσεις). Για την αποφυγή της χαμηλής αντιδραστικότητας ή για την αντικατάσταση στη θέση 2 με νουκλεοφίλες άνθρακα ή οξυγόνου έχουν εφαρμοστεί μέθοδοι αντικατάστασης όπως η Sonogashira (Legraverend, Ludwig, Bisagni, Leclerc, & Meijer, 1998) ή η Suzuki (Ding, Gray, Ding, & Schultz, Expanding the Diversity of Purine Libraries, 2001).

Μια γενική εικόνα για τα συνθετικά σχήματα παραγώγων πουρίνης δίνεται στο παρακάτω σχήμα.



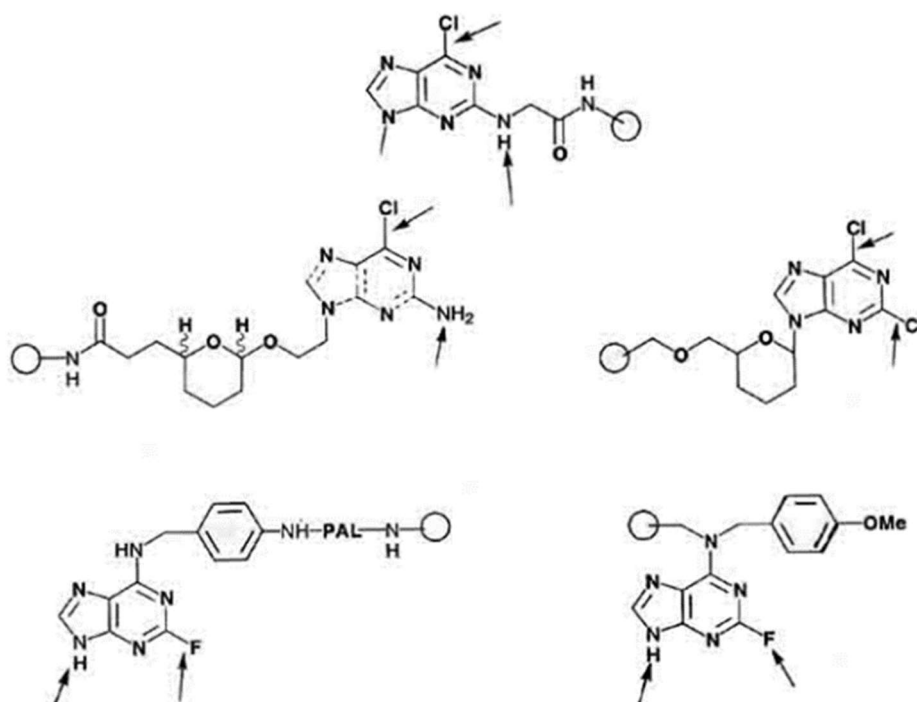
Εικόνα: Γενικά συνθετικά σχήματα παραγώγων πουρίνης

Πηγή: (Jean-luc Haesslein, 2002)

Υποκατάσταση πουρίνης στη θέση 2

Υπάρχει επίσης ένα μεγάλο φάσμα συνθέσεων πουρίνης αντίδρασης στερεού-στερεού. Με διαφοροποίηση της επιλογής της θέσης πρόσδεσης προκύπτουν διαφορετικές ενώσεις και μοτίβα υποκατάστασης. Στο σχήμα που ακολουθεί απεικονίζεται η πρόσδεση στις θέσεις C2 (Norman, Gray, Koh, & Schultz, Structure-Based Library Approach to Kinase Inhibitors, 1996), N-9 (Nugiel, Cornelius, & Corbett, J. Org. Chem., 1997) ή C6 (Chang, και συν., P.G. Synthesis and Application of Functionally Diverse 2,6,9-Trisubstituted Purine Libraries as Cdk Inhibitors, 1999) (Gray, Kwon, & Schultz, 1997).

Εικόνα : Εισαγωγή διαφόρων υποκαταστατών στη θέση 2 του δακτυλίου πουρίνης.



Πηγή: (Jean-luc Haesslein, 2002)

Για παράδειγμα, οι υποκαταστάσεις στη θέση 2 έχουν χρησιμοποιηθεί για την εισαγωγή ειδικών μεταλλάξεων σε γονίδια που σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες, επιτρέποντας στους ερευνητές να διερευνήσουν τα αποτελέσματα αυτών των μεταλλάξεων στη λειτουργία των πρωτεϊνών και στην παθολογία της νόσου. Επιπλέον, οι υποκαταστάσεις στη θέση 2 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή πρωτεϊνών με νέες ή βελτιωμένες λειτουργίες.

Τέλος, η υποκατάσταση πουρίνης στη θέση 2 είναι ένα ισχυρό εργαλείο στη βιοτεχνολογία και τη γενετική μηχανική που επιτρέπει στους ερευνητές να διερευνήσουν τις επιπτώσεις συγκεκριμένων αλλαγών νουκλεοτιδίων στη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών, κάτι που μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην κατανόηση των μηχανισμών της νόσου και στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μεθόδων.

Υποκατάσταση πουρίνης στη θέση 2 με δακτύλιο τριαζόλης

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους η τριαζόλη μπορεί να συσχετιστεί με την υποκατάσταση πουρίνης στη θέση 2. Ένας από τους πιο αξιοσημείωτους είναι μέσω της χρήσης αναλόγων νουκλεοσιδίων τριαζόλης, τα οποία είναι συνθετικές ενώσεις που περιέχουν έναν δακτύλιο τριαζόλης αντί της φυσικής βάσης πουρίνης ή πυριμιδίνης.

Τα ανάλογα νουκλεοσιδίου της τριαζόλης έχουν μελετηθεί εκτενώς ως πιθανοί αντιικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες λόγω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων διαταράσσοντας το ζεύγος βάσεων και παρεμβαίνοντας στην αντιγραφή DNA και RNA. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να σχεδιαστούν για να στοχεύουν επιλεκτικά συγκεκριμένα ιικά ή καρκινικά κύτταρα, ενώ ελαχιστοποιούν την τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα.

Μια προσέγγιση για την ανάπτυξη αναλόγων νουκλεοσιδίου τριαζόλης περιλαμβάνει την αντικατάσταση της βάσης πουρίνης στη θέση 2 με έναν δακτύλιο τριαζόλης. Αυτή η υποκατάσταση μπορεί να αλλάξει τις ιδιότητες ζευγαρώματος βάσεων του νουκλεοτιδίου και

να οδηγήσει στην ανάπτυξη ενώσεων με βελτιωμένες φαρμακολογικές ιδιότητες, όπως αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα, σταθερότητα ή ισχύ (Pandit, 2020).

Για παράδειγμα, αρκετά νουκλεοσιδικά ανάλογα της τριαζόλης έχουν αναπτυχθεί ως πιθανοί αναστολείς της αντιγραφής του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV), ο οποίος είναι μια κύρια αιτία ηπατικής νόσου παγκοσμίως. Αυτές οι ενώσεις περιέχουν έναν δακτύλιο τριαζόλης στη θέση της φυσικής βάσης πουρίνης στη θέση 2 και έχουν δείξει πολλά υποσχόμενη δράση έναντι του HBV *in vitro* και σε ζωικά μοντέλα (Leškovskis, 2021).

Συνολικά, η χρήση αναλόγων νουκλεοσιδίου τριαζόλης αντιπροσωπεύει μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την ανάπτυξη νέων αντικών και αντικαρκινικών παραγόντων και η υποκατάσταση της πουρίνης στη θέση 2 με έναν δακτύλιο τριαζόλης είναι μια σημαντική στρατηγική σε αυτό το πεδίο.

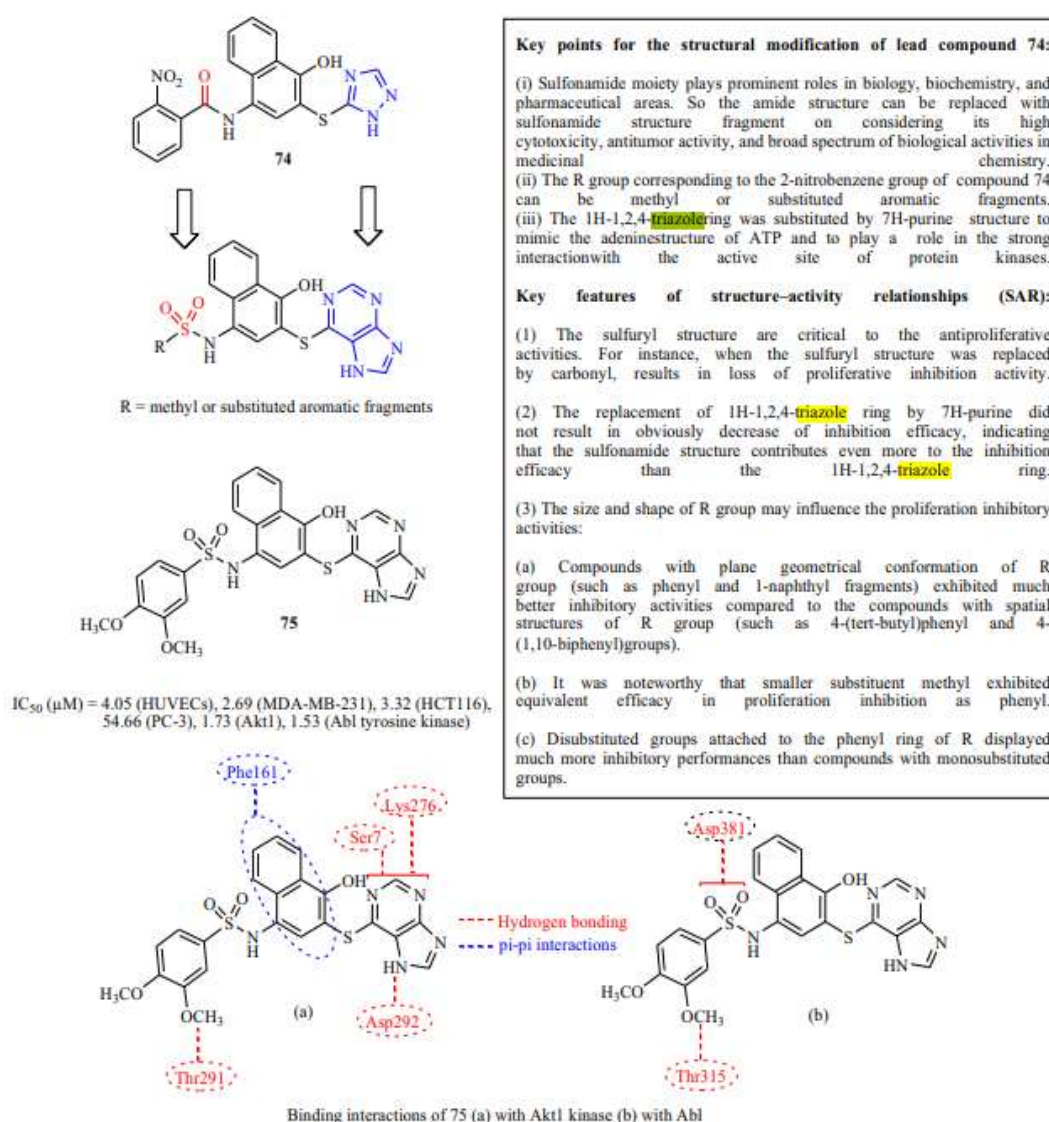


Fig. 25. N-(3-((7H-purin-6-yl)thio)-4-hydroxynaphthalen-1-yl)sulfonamide analogs as Akt1 inhibitors.

Παράγωγα πουρίνης ως αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσεων

Η μελέτη των πουρινών είναι ιδιαίτερα χρήσιμη καθώς ο πυρήνας τους αποτελεί θεμελιώδες δομικό συστατικό πολλών συνθετικών ενώσεων, όπως είναι οι αναστολείς κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs), οι οποίες έχουν βιολογική δράση η οποία είναι χρήσιμη στη μελέτη ποικίλων ασθενειών που συνδέονται με τη λειτουργία του κυτταρικού κύκλου (Legraverend M. e., 2000). Στο πρόσφατο παρελθόν, μόρια με βάση τις πουρίνες έχουν αναδειχθεί ως σημαντικά ισχυροί αναστολείς των κινασών. Οι κινάσες ελέγχουν ένα ευρύ σύνολο κυτταρικών διεργασιών που περιλαμβάνουν την αναστρέψιμη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών. Οι πρωτεϊνικές κινάσες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων, τη μετανάστευση και την επιβίωση της νεοπλασίας. Οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες είναι βασικοί στόχοι για την ανάπτυξη θεραπειών για τον καρκίνο, καθώς η ανώμαλη ρύθμιση της δραστηριότητας του είναι κοινό χαρακτηριστικό πολλών τύπων καρκίνου.

Οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες CDKs και συγκεκριμένα οι CDK1, CDK2, CDK4 και CDK6 έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη ρύθμιση του κύκλου των κυττάρων. Πρόκειται για πρωτεΐνες μεγέθους 34-40 kDa με δράση πρωτεϊνικής κινάσης οι οποίες ενεργοποιούνται μετά τη σύνδεσή τους με την αντίστοιχη κυκλίνη. Οι ενεργές κυκλινο-εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες είναι συνεπώς ετεροδιμερή, όπου η κινάση διαθέτει την περιοχή με την καταλυτική δράση ενώ η δεύτερη υπομονάδα, η κυκλίνη, είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του μορίου και για την εξειδικευμένη δράση του (Brehm, 1998). Κυκλίνες μπορούν να θεωρηθούν ως τα ρυθμιστικά αντίστοιχα των CDKs. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των CDK και των κυκλινών είναι απαραίτητη για την καταλυτική δραστηριότητα τους.

Η μελέτη των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσεων (CKIs) έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, καθώς αυτές αποτελούν πολύτιμα βιοχημικά εργαλεία για την εξισορρόπηση της λειτουργίας και εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Η εύρυθμη λειτουργία των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσεων βασίζεται στη διαδοχική ενεργοποίησή τους με την αντίστοιχη κυκλίνη, η οποία εξασφαλίζει την σωστή χρονική στιγμή και σειρά των γεγονότων που απαιτούνται για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου.

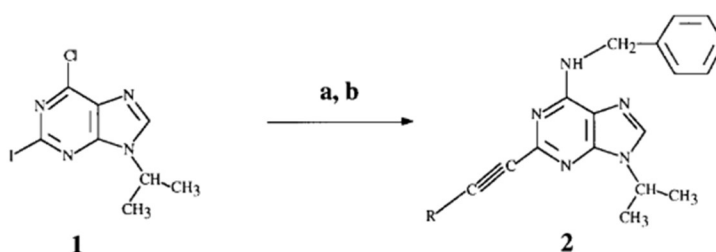
Η δυσλειτουργία των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσεων συναντάται σε ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω στην ασθένεια του καρκίνου, με τους αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσεων να θεωρούνται χρήσιμοι στη χημειοθεραπεία (Ball, Lain, Fahraeus, Smythe, & Lane, 1996). Άλλες παθολογίες για τις οποίες μελετάται η δυναμική εφαρμογή των χημικών αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινάσεων είναι η σπειραματονεφρίτιδα, η επαναστένωση, ο πολλαπλασιασμός παρασίτων και διάφορες νευροεγκεφαλίστικες διαταραχές (L., 1996).

Η σύνθεση των 2-αλκυλυλιωμένων πουρινών, μιας νέας ομάδας αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσεων χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας αλκυλυλιωμένης πλευρικής αλυσίδας στο C2. Η σύνθεση 2-αλκυλυλιωμένων πουρινών είναι ένας τύπος αντίδρασης υποκατάστασης πουρίνης μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες χημικές μεθόδους, όπως αντιδράσεις διασταυρούμενης σύζευξης Sonogashira ή αντιδράσεις κυκλοπροσθήκης αζιδίου-αλκινίου που καταλύονται από χαλκό (CuAAC).

Οι κύριοι χημικοί αναστολείς που έχουν μελετηθεί είναι η ολομουκίνη και η ροσκοβιτίνη. Και τα δύο μόρια αλληλεπιδρούν με την CDK2 στη θέση πρόσδεσης ATP. Είναι ενδιαφέρον ότι ο δακτύλιος πουρίνης αυτών των αναστολέων βρίσκεται στον θύλακα με εντελώς διαφορετικό προσανατολισμό από τον δακτύλιο πουρίνης του ATP. Επιπλέον, ο βενζυλικός δακτύλιος αυτών των μορίων αλληλεπιδρά με αμινοξέα που δεν εμπλέκονται στη δέσμευση του ATP και

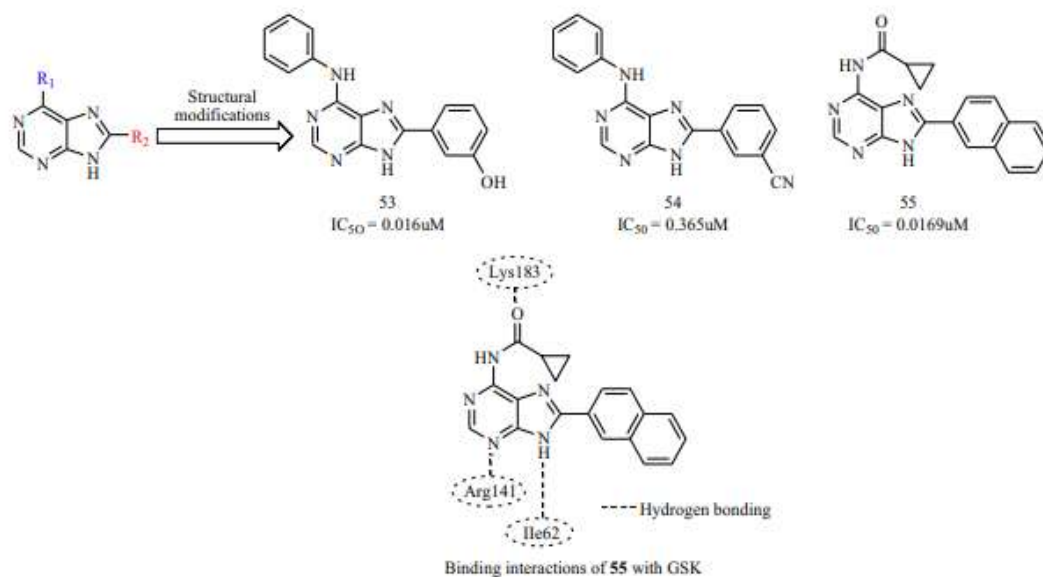
τα οποία είναι ιδιαίτερα διατηρητέα στην οικογένεια CDK. Τα γεγονότα αυτά θα μπορούσαν να εξηγήσουν, τουλάχιστον εν μέρει, την εξειδίκευση αυτής της οικογένειας πουρινών έναντι των CDK, καθώς είναι σε μεγάλο βαθμό ανενεργές έναντι μιας μεγάλης ποικιλίας κινασών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνικών κινασών C, των κινασών τυροσίνης, κινασών που εξαρτώνται από κυκλικά νουκλεοτίδια κ.λπ. Η ανάλυση των CDK2/ολομουκίνης και CDK2/ροσκοβιτίνης ανέδειξε ότι οι υποκαταστάτες C2 δεσμεύονται σε μια περιοχή του θύλακα δέσμευσης ATP που καταλαμβάνεται από τη ριβόζη στο σύμπλοκο CDK2/ATP. Επιπλέον, δεν έχει διαπιστωθεί αλληλεπίδραση μεταξύ της NH στο C2 και της κινάσης. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη διερεύνηση των αποτελεσμάτων της αντικατάστασης αυτής της δευτεροταγούς με ένα άτομο άνθρακα στην αναστολή της CDK. Αναφέρεται λοιπόν η σύνθεση και οι ανασταλτικές δράσεις ενός νέου τύπου αναστολέων CDK της οικογένειας πουρινών, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας αλκυνυλιωμένης πλευρικής αλυσίδας στο C2. Αυτοί οι ισχυροί αναστολείς μπορούν να αποτελέσουν μια νέα οδό για το σχεδιασμό ισχυρών αναστολέων του κυτταρικού κύκλου πιθανών φαρμακευτικών ενδιαφέροντος.

Εικόνα: Σύνθεση 2-αλκυνυλιωμένων πουρινών 2



Πηγή: (Legraverend, Ludwig, Bisagni, Leclerc, & Meijer, 1998)

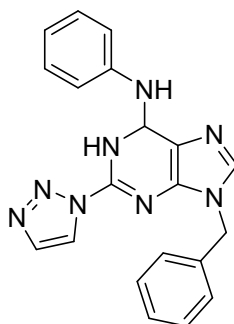
Η σύνθεση και οι ανασταλτικές ιδιότητες των χημικών αναστολέων της ολομουκίνης έχουν πολλές πιθανές εφαρμογές στη φαρμακολογία και τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου για την αντιμετώπιση παθολογιών (Michel LEGRAVEREND, 1998). Σχετικά με τις δυνητικές εφαρμογές της ολομουκίνης και της ροσκοβιτίνης στη φαρμακολογία, παρουσιάζονται παρακάτω παραδείγματα από τη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα η ολομουκίνη χορηγήθηκε σε εφάπαξ δόση 8mg/kg για 7 ημέρες σε σκύλο με μελάνωμα και παρατηρήθηκε ταχεία επαγωγή της απόπτωσης και της εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων κατά 68%. Η θεραπεία ωστόσο έπρεπε να διακοπεί λόγω της συνέχισης αιμορραγίας του όγκου με πρόκληση αναιμίας, τα οποία απαιτούσαν την άμεση χειρουργική παρέμβαση (Hajdich, Kolar, Novotny, Hanus, & Mihal, 1997). Αντίστοιχα ροσκοβιτίνη, χορηγήθηκε καθημερινά σε δόση 2,8mg/kg σε αρουραίους με ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των μεσογειακών κυττάρων σεπειραματική σπειραματονεφρίτιδα και παρατηρήθηκε αναστολή της παραγωγής και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων με αποτέλεσμα τη βελτιωμένη νεφρική λειτουργία (Pirpin, Qu, Meijer, & Shankland, 1997). Η αποτελεσματικότητα της ροσκοβιτίνης στην αντιμετώπιση της κυτταρικής λειτουργίας σε διάφορους τύπους καρκίνου είναι ακόμη υπό μελέτη, ωστόσο τα πρώτα αποτελέσματα από την εφαρμογή σε θεραπεία σε ανθρώπους είναι ενθαρρυντικά (Jean-luc Haesslein, 2002).



Εικόνα

Σκοπός

Με βάση την σημαντικότητα της προσθήκης της τριαζολο ομάδας σε μόρια τα οποία έχουν βιολογική δράση έναντι πληθώρα καρκίνων καθώς και έναντι ιών αποφασίσαμε να συνθέσουμε νέων υποκατεστημένων στη θέση 2-τριαζολο-παραγώγων πουρίνης,



Γενικές Μέθοδοι:

A Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)

Η πορεία των αντιδράσεων ελέγχθηκαν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Οι ενώσεις ανιχνεύθηκαν με χρήση λάμπας UV, και με ψεκάσμο με διάλυμαθειϊκού οξέος 30% και θέρμανση.

B. Χρωματογραφία στήλης

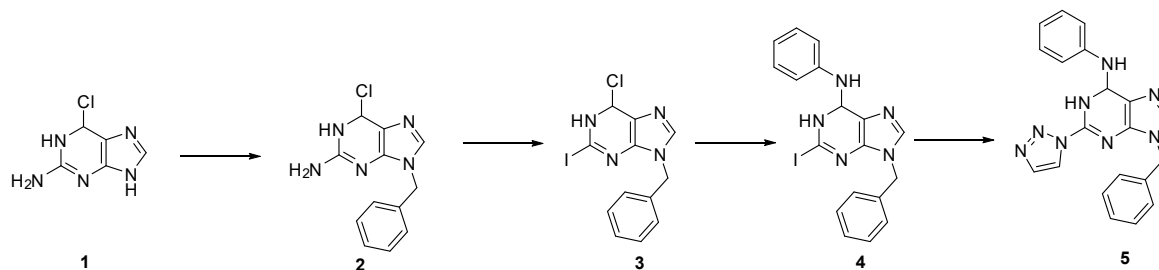
Ο καθαρισμός του μίγματος της αντίδρασης έγινε με υγρή χρωματογραφία με υλικό πλήρωσης οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) και ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες διάφορης πολικότητας.

Γ. Ταυτοποίηση ενώσεων

Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με τη λήψη φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance).

Πειραματικό μέρος:

1 Επισκόπηση της συνθετικής πορείας που ακολουθήθηκε



2 Μεθοδολογία της σύνθεσης

Η εμπορικά διαθέσιμη 2-άμινο- 6-χλώρο πουρίνη (1), κατεργάστηκε με βενζυλο χλωρίδιο (BnCl) δίνοντας την 2.

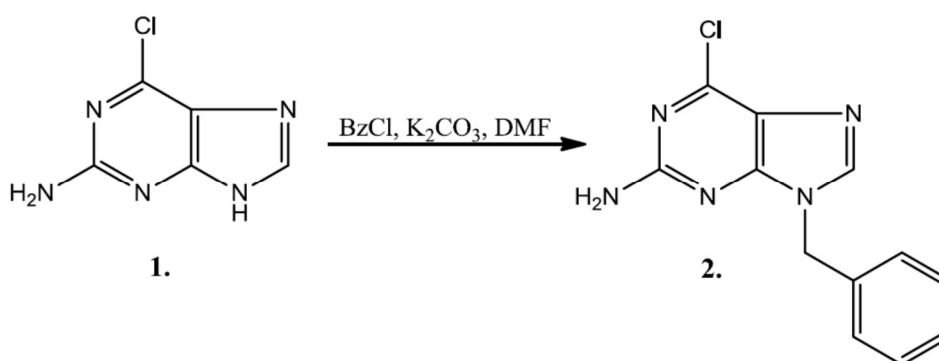
Ιωδίωση της 2, με ιώδιο (I_2), διωδομεθάνιο (CH_2I_2), παρουσία καταλύτη ιωδιούχου χαλκού (CuI) και ισοπέντυλονιτρίλιο σε διαλύτη τετραύδροφουράνιο (THF) έδωσε την 3.

Με προσθήκη Βενζυλαμίνης ($BzNH_2$) παρουσία τριεθυλαμίνης (Et_3N) σε μεθανόλη (MeOH) οδηγήθηκαν στην ένωση 4.

Αντίδραση της 4 με ένυδρο θειϊκό χαλκο $CuSO_4 \cdot 5H_2O$,

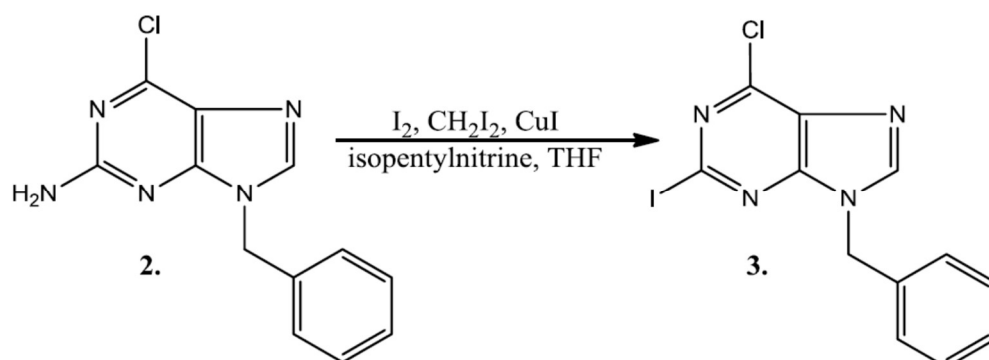
Ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3), αζωτούχο νάτριο (NaN_3), σε $H_2O/tBuOH$ 1:1, στους $60^\circ C$, οδηγήθηκαν στο τελικό προϊόν 5.

Σύνθεση της 2-άμινο-6-χλώρο-9-βενζυλοπουρίνης (2)



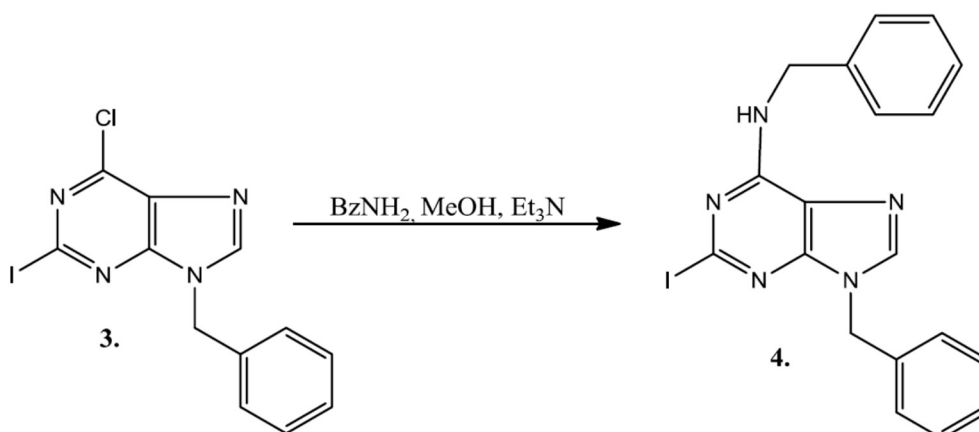
Αρχικά η εμπορικά διαθέσιμη 1 (525 mg, 3,1 mmol) διαλύθηκε σε άνυδρο διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) (25,2 mL) και προσθέσαμε ανθρακικό ασβεστίο (K_2CO_3) (1,3 g, 9,3 mmol). Στη συνέχεια προστέθηκε σταγόνη βενζυλοχλωρίδιο (BnCl) (720 μL , 6,2 mmol) και το μίγμα αφέθηκε, υπό ανάδευση για 12 ώρες. Με το πέρας της αντίδρασης ακολούθησε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (AcOEt) και χλωριούχο νάτριο και η οργανική φάση ξυράνθηκε με θειϊκό νάτριο (Na_2SO_4). Το προϊόν 2 απομονώθηκε χρωματογραφικά με τη μορφή λευκού στερεού (275 mg) με απόδοση 68%, σ.τ. $213-214^\circ C$.

Σύνθεση της 2-ιώδο- 6-χλώρο-9-βενζυλοπυριμίνης (3)



Η ένωση **2** (275mg, 1,06mmol) διαλύθηκε σε άνυδρο τετραϋδροφουράνιο (THF) (12,4mL) και στη συνέχεια προστέθηκε, I_2 (269,04mg, 1,06mmol), διωδο μεθάνιο (CH_2I_2) (855μL, 10,6mmol), ιωδιούχος χαλκός (CuI) (201,8mg, 1,06mmol) και ισοπεντυλονιτρίλιο (427,2μL, 3,18mmol). Το μίγμα αναδεύτηκε στους 75-80 °C σε κάθετο ψυκτήρα. Με το πέρας της αντίδρασης και την απομάκρυνση του διαλύτη λαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν με απόδοση 61%.

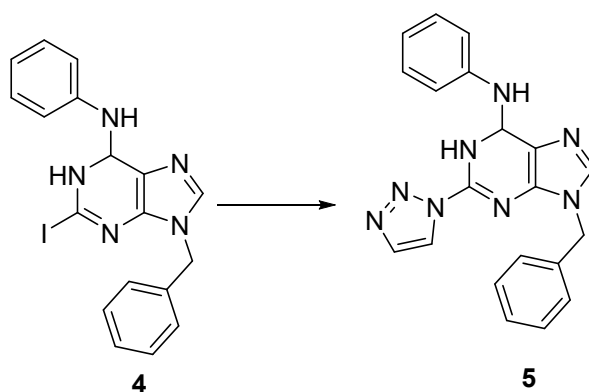
Σύνθεση της 2-ιώδο-6-βενζυλάμινο-9-βένζυλοπυριμίνης(4)



Σε διάλυμα του προϊόντος **3** (168mg, 0,45mmol) σε MeOH (8,4mL) προστίθενται $BzNH_2$

(196,6μL, 1,8mmol) και Et_3N (623,8μL, 4,5mmol). Το μίγμα αναδεύεται στους 28°C για 12 ώρες. Με το πέρας της αντίδρασης απομακρύνεται ο διαλύτης υπό κενό και ακολουθεί εκχύλιση με CH_2Cl_2 και χλωριούχο νάτριο και η οργανική φάση ξηραίνεται με θειικό νάτριο (Na_2SO_4). Το προϊόν (**4**) λαμβάνεται με τη μορφή λευκού στερεού και απόδοση 86%.

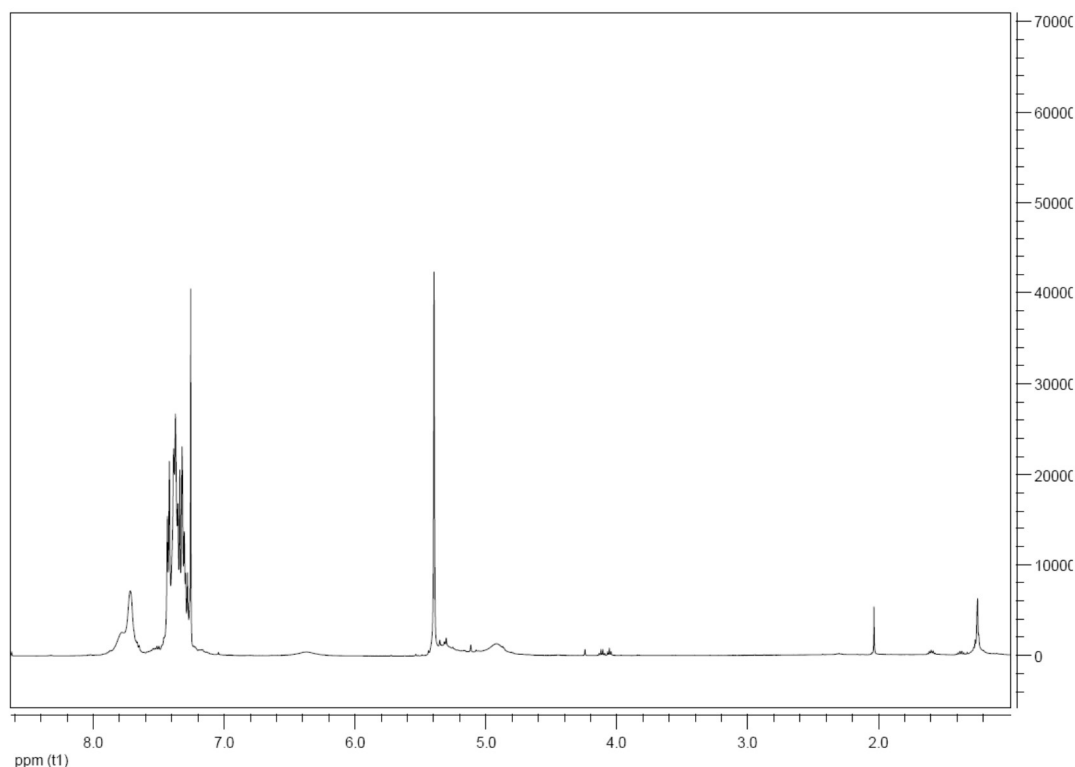
Σύνθεση της 9-βενζυλο-2-(1H-1,2,3-τριαζολ)-6-βενζυλαμινο-9-βενζυλοπουρίνης (5)



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

Ταυτοποίηση Ενώσεων

Η NMP της 5



Αποτελέσματα-Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιτευχθηκε, μέσω μιας απλής και σύντομης συνθετικής πορείας, η σύνθεση νέων τριαζολο-παραγώγων πουρίνης των οποίων η πιθανή βιολογική δράση θα μελετηθεί. Η ταυτοποίηση των εν λόγω ενώσεων έγινε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H NMR).

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

Βιβλιογραφία

- Bachman, J. (2013). Site-directed mutagenesis. *Methods Enzymol*, σσ. 241-248.
- Ball, K. L., Lain, S., Fahraeus, R., Smythe, C., & Lane, D. P. (1996). *Cell-cycle arrest and inhibition of CDK4 activity by small peptides based on the carboxy-terminal domain of p21WAF1*. *Curr. Biol*.
- Bistrović, A. e. (2017). "Small Molecule Purine and Pseudopurine Derivatives: Synthesis, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, σσ. 271-285.
- Brehm, A. M. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*.
- Burnstock, G. (1976). *Purinergic receptors*. *J. Theor. Biol*.

- C.W.Scheele. (1776). "*Examen Chemicum Calculi Urinari*". Opuscula.
- Chang, Y.-T., Gray, N., Rosania, G., Sutherlin, D., Kwon, S., Norman, T., . . . Schultz. (1999). P.G. Synthesis and Application of Functionally Diverse 2,6,9-Trisubstituted Purine Libraries as Cdk Inhibitors. *Chem. Biol.* , σσ. 361-375.
- Chang, Y.-T., Gray, N., Rosania, G., Sutherlin, D., Kwon, S., Norman, T., . . . Schultz, P. (1999). Synthesis and Application of Functionally Diverse 2,6,9-Trisubstituted Purine Libraries as Cdk Inhibitors. *Chem. Biol.* , σσ. 361-375.
- Conejo-Garcia, A. C.-L.-P.-R. (2010). "Synthesis of Purine Derivatives as Scaffolds for a Diversity of Biological Activities. *Current Organic Chemistry*.
- Conejo-Garcia, A. e. (2010). "Synthesis of Purine Derivatives as Scaffolds for a Diversity of Biological Activities." . *Current Organic Chemistry*.
- D. Dal Ben, M. B. (2011). The Importance of Alkynyl Chain Presence for the Activity of Adenine Nucleosides/Nucleotides on Purinergic Receptors. *Current Medicinal Chemistry*.
- Demko, Z. P. (2002). A click chemistry approach to tetrazoles by Huisgen 1, 3-dipolar cycloaddition: Synthesis of 5-sulfonyl tetrazoles from azides and sulfonyl cyanides. . *Angewandte Chemie International Edition*, σσ. 2110-2113.
- Ding, S., Gray, N., Ding, Q., & Schultz, P. (2001). A Concise and Traceless Linker Strategy toward Combinatorial Libraries of 2,6,9-Substituted Purines. *J. Org. Chem.*, σσ. 8273-8276.
- Ding, S., Gray, N., Ding, Q., & Schultz, P. (2001). Expanding the Diversity of Purine Libraries. *Tetrahedron Lett.*, σσ. 8751-8755.
- E.Fischer. (1899). Ber. Dtsch. Chem. Ges.
- E.Fischer. (1907). "*Untersuchungen in der Puringruppe*". Berlin: Springer Verlag.
- Fiorini, M., & Abell, C. (1998). Solution Phase Synthesis of 2,6,9-Trisubstituted Purines. *Tetrahedron Lett.*, σσ. 1827-1830.
- G. M. Cooper, R. E. (2011). *Το Κύτταρο: Μια Μοριακή Προσέγγιση*. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο. Ε.
- Gray, N., Kwon, S., & Schultz. (1997). P.G. Combinatorial Synthesis of 2,9-Substituted Purines. *Tetrahedron Lett.*, σσ. 1161-1164.
- Hajduch, M., Kolar, Z., Novotny, R., Hanus, J., & Mihal, V. (1997). *Induction of Apoptosis and Regression of Spontaneous Dog Melanoma Following in vivo Application of Synthetic Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Olomoucine*. *Anti-Cancer Drugs*.
- Haldón, E. N. (2015). Copper-catalysed azide–alkyne cycloadditions (CuAAC): an update. *Organic & biomolecular chemistry*, σσ. 9528-9550.
- Hess J.R., G. N. (2012). *The Role of Nucleotides in the Immune and Gastrointestinal Systems: Potential Clinical Applications*. *Nutr. Clin. Pr.*

- 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*, σσ. 245-254.
- Imbach, P., Capraro, H.-G., Furet, P., Mett, H., Meyer, T., & Zimmermann, J. (1999). 2,6,9-Trisubstituted Purines: Optimization Towards Highly Potent and Selective Cdk1 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* , σσ. 91-96.
- Jean-luc Haesslein, N. J. (2002). Recent Advances in Cyclin-Dependent Kinase Inhibition. Purine-Based Derivatives as Anti-Cancer Agents. Roles and Perspectives for the Future. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, σσ. 1045-1046.
- L., M. (1996). *Trends in Cell Biology* .
- Legraverend, M. e. (2000). Cyclin-Dependent Kinase Inhibition by New C-2 Alkynylated Purine Derivatives and Molecular Structure of a CDK2–Inhibitor Complex. *Journal of Medicinal Chemistry*, σσ. 1282-1292.
- Legraverend, M., Ludwig, O., Bisagni, E., Leclerc, S., & Meijer, L. (1998). Synthesis of C-2 Alkynylated Purines, a New Family of Potent Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, σσ. 793-798.
- Leškovskis, K. Z. (2021). Applications of Purine Ring Opening in the Synthesis of Imidazole, Pyrimidine, and New Purine Derivatives. *European Journal of Organic Chemistry*, σσ. 5027-5052.
- Lum, R., Blum, C., Mackman, R., Wick, M., & Schow. (1998). S.R. New Purine Derivatives Inhibit Cyclin Dependent Kinase 2 and IκappaB-alpha Kinase- Useful for the Treatment of Rheumatoid Arthritis, Lupus, Type I Diabetes, Multiple Sclerosis, Cancer, Restenosis, Graft vs Host Disease, Gout, Polycystic Kidney Diseases. *WO9805335*.
- Michel LEGRAVEREND, O. L. (1998). SYNTHESIS OF C2 ALKYNLATED PURINES, A NEW FAMILY OF . *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS*.
- Norman, T., Gray, N., Koh, J., & Schultz, P. A. (1996). Structure-Based Library Approach to Kinase Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* , σσ. 7430-7431.
- Norman, T., Gray, N., Koh, J., & Schultz, P. A. (1996). Structure-Based Library Approach to Kinase Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.*, σσ. 7430-7431.
- Nugiel, D., Cornelius, L., & Corbett, J. F. (1997). *J. Org. Chem.*, σσ. 201-203.
- Nugiel, D., Cornelius, L., & Corbett, J. F. (1997). *J. Org. Chem.*, σσ. 201-203.
- P. Fresenius, K. G. (1991). IUPAC Rule. Στο K. G. P. Fresenius, "*Organisch-chemische Nomenklatur*" (σ. 29). Stuttgart: WHG Verlag.
- Pandit, C. P. (2020). An efficient regioselective synthesis of N-alkylated purine-triazole analogues. *Indian Journal of Chemistry-Section B*, σσ. 1225-1233.
- Pedley A.M., B. S. (2017). *A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome*. Trends Biochem. Sci.

- Pippin, J., Qu, Q., Meijer, L., & Shankland, S. (1997). *Direct in vivo Inhibition of the Nuclear Cell Cycle Cascade in Experimental Mesangial Proliferative Glomerulo nephritis with Roscovitine, a Novel Cyclin-Dependent Kinase Antagonist*. *J. Clin. Invest.*
- Sauer, N. J. (2016). Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant biotechnology journal*, σσ. 496-502.
- Schow, S., Mackman, R., Blum, C., Brooks, E., Horsma, A., Joly, A., . . . Lum. (1997). R.T. Synthesis and Activity of 2,6,9-Trisubstituted Purines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* , σσ. 2697-2702.
- Shum, P., Peet, N., Weintraub, P., Le, T., Zhao, Z., Barbone, F., . . . Borcharding, D. (2001). The Design and Synthesis of Purine Inhibitors of Cdk2. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, σσ. 1067-1078.
- THE NOBEL PRIZE. (2022, 07 10). Ανάκτηση από The Nobel Prize in Chemistry 1902: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1902/fischer/biographical/>
- Wade, L. G. (2013). *Οργανική Χημεία*. Εκδόσεις Τζιόλα.
- X.-L. Yang, H. S.-J. (1998). Structural Studies of a Stable Parallel-Stranded DNA Duplex Incorporating Isoguanine: Cytosine and Isocytosine:Guanine Basepairs by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy . *Biophysical journal*, σσ. 1163-1171.
- Zhao H., C. C. (2015). *Quantitative Analysis of Purine Nucleotides Indicates That Purinosomes Increase de Novo Purine Biosynthesis*. *J. Biol. Chem.*
- Burnstock, G. (1972). *Purinergic nerves*. *Pharmacol. Rev.*