



Διπλωματική Εργασία

**Σύνθεση Νέων**

**Τριαζολο Ριβοφουρανονουκλεοζιτών**

**Της Ουρακίλης Και Της Θυμίνης**

**Ως Πιθανοί Αντικαρκινικοί Παράγοντες**

Στάθη Γεωργία



**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ | ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Στάθη Γεωργία

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΤΡΙΑΖΟΛΟ ΡΙΒΟΦΟΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΩΝ ΤΗΣ  
ΟΥΡΑΚΙΛΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΘΥΜΙΝΗΣ ΩΣ ΠΙΘΑΝΟΙ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ  
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

**SYNTHESIS OF NEW TRIAZOLE RIBOFURANONUCLEOSIDES OF  
URACIL AND THYMINE AS POTENTIAL ANTICANCER AGENTS**

**Λάρισα, Σεπτέμβριος 2012**

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Σύνθεση Νέων Τριαζολο Ριβοφουρανονουκλεοζιτών Της Ουρακίλης  
Και Της Θυμίνης Ως Πιθανοί Αντικαρκινικοί Παράγοντες**

**Synthesis Of New Triazole Ribofuranonucleosides Of Uracil And  
Thymine As Potential Anticancer Agents**

Στάθη Γεωργία

A.M. : 1807521

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Βιο-Οργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Μαρτίου 2012-Σεπτεμβρίου 2012 υπό την επίβλεψη του καθηγητή Κομιώτη Δημήτριου.

Επιβλέπων : Δρ Κομιώτης Δημήτριος

Συνεπιβλέποντες : Δρ Μπαλατσός Νικόλαος

Δρ Μαντά Στυλιανή

## **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους μου συμπαραστάθηκαν στην υλοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας. Κατ' αρχήν, ευχαριστώ τον κ. Δημήτριο Κομιώτη για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής του ομάδας και για την καθοδήγηση που μου προσέφερε στην πορεία αυτής της εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συνεπιβλέποντες κ. Νικόλαο Μπαλατσό και κ. Στυλιανή Μαντά για την συμβολή και την πολύτιμη βοήθεια τους στη διεκπεραίωση της διπλωματικής εργασίας. Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στον Χρήστο Κυρίτση για τις χρήσιμες συμβουλές του. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και τη δημιουργία ευχάριστου κλίματος στην ερευνητική ομάδα. Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και την αδελφή μου για την υλική και ηθική στήριξη που μου παρέχουν όλα αυτά τα χρόνια.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	4
	I.1 Υδατάνθρακες .....	4
	I.2. Υδατάνθρακες και σχηματισμός ημιακετάλης.....	6
	I.3. Νουκλεοζίτες και ανάλογά τους .....	11
	I.4. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών.....	12
	I.5. Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες .....	15
	I.6. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια πεντόζη.....	18
	1.7. Click Χημεία: Κυκλοπροσθήκη αζιδίων καταλυόμενη από χαλκό (Cu-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC).....	20
	I.8. Εφαρμογές της CuAAC.....	26
	1.9. RNaseA .....	28
II.	ΣΚΟΠΟΣ .....	31
III.	ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
	III.1. Χρωματογραφία χάρτου/λεπτής στιβάδας (TLC :Thin layer chromatography).....	33
	III.2. Χρωματογραφία στήλης.....	33
	III.3. Ξήρανση διαλυτών .....	34
	III.4. Ταυτοποίηση ενώσεων .....	34
IV.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	36
	IV.1. Επισκόπηση συνθετικής οδού .....	36
	IV.2. Μεθοδολογία σύνθεσης .....	36
V.	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ <sup>1</sup> H NMR .....	42
VI.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
VII.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	45



# I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι οι νουκλεοζίτες, αποτελούμενοι από ολιγοσακχαρίτες (φουρανόζη, πυρανόζη) συνδεδεμένους με κάποια ετεροκυκλική βάση, υπάρχουν σε πολλά φυσικά αντιβιοτικά με αντικαρκινική, αντιική αλλά και αντιδιαβητική δράση. Αναμενόμενο ήταν το ερευνητικό ενδιαφέρον να εστιαστεί στη σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών οι οποίοι να συνεισφέρουν ενεργά στην αντιική, αντικαρκινική και αντιδιαβητική θεραπεία. Οι κλινικές έρευνες που ακολούθησαν επιβεβαίωσαν την υπόθεση αυτή με αποτέλεσμα να ξεκινήσει η χρήση τροποποιημένων νουκλεοζιτών στην αντιική και αντικαρκινική χημειοθεραπεία.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, που εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Βιο-Οργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, αναπτύσσεται το πρωτόκολλο σύνθεσης και η αξιολόγηση μιας νέας τάξης φουρανονουκλεοζιτών, των τριάζολο ριβοφουρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης και της θυμίνης μέσω μιας σχετικά νέας σειράς αντιδράσεων Κυκλοπροσθήκης Αζιδίων-Αλκινίων Καταλυόμενης από Χαλκό (CuAAC, Cu-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition).

## I.1 Υδατάνθρακες

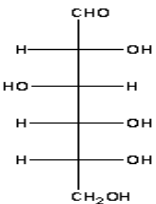
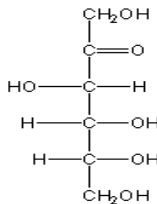
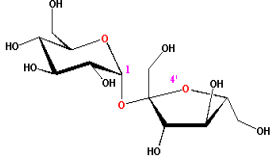
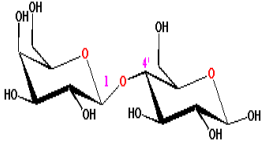
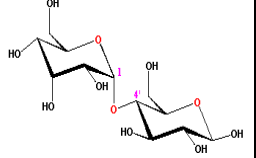
*Η ονομασία υδατάνθρακας προέρχεται ιστορικά από το γεγονός ότι η γλυκόζη, ο πρώτος απλός υδατάνθρακας που απομονώθηκε σε καθαρή μορφή, αρχικά θεωρείτο ως “ιδρυτής του άνθρακα  $C_6(H_2O)_6$ ”.*

Οι υδατάνθρακες ή αλλιώς σάκχαρα είναι μία από τις κύριες κατηγορίες των βιομορίων μαζί με τις πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και τα λιπίδια. Αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό της οργανικής ύλης, λόγω των πολλαπλών ρόλων τους σε κάθε μορφή ζωής. Πρώτον, οι υδατάνθρακες χρησιμεύουν ως αποθήκες ενέργειας, ως καύσιμα και ως μεταβολικά ενδιάμεσα. Δεύτερον, τα σάκχαρα ριβόζη και δεοξυριβόζη αποτελούν μέρος του δομικού πλαισίου των DNA και RNA. Τρίτον, οι πολυσακχαρίτες αποτελούν δομικά στοιχεία στα κυτταρικά τοιχώματα βακτηρίων και φυτών. Τέταρτον, οι υδατάνθρακες είναι συνδεδεμένοι με πολλές πρωτεΐνες και λιπίδια, όπου παίζουν σημαντικό μεσολαβητικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, καθώς και μεταξύ των κυττάρων και άλλων στοιχείων στο κυτταρικό περιβάλλον. Μία καθοριστική ιδιότητα στο ρόλο τους ως μεσολαβητές είναι πιθανώς η πάρα πολύ μεγάλη δομική τους ποικιλότητα.

Από χημική άποψη οι υδατάνθρακες αποτελούν μια ομάδα οργανικών ουσιών που έχουν ως γενικό χημικό τύπο  $C_n(H_2O)_n$ , δηλαδή πρόκειται για έναν ενυδατωμένο άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για μια ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων αλδεϋδών (δηλαδή μια ομάδα ατόμων που περιέχει ένα καρβονύλιο ( $>C=O$ ) και ένα 1 άτομο υδρογόνου, συνολικά  $-CH=O$  ή πιο συνοπτικά  $-CHO$ ) και κετονών (κατηγορία οργανικών ενώσεων που περιέχουν τη χαρακτηριστική ομάδα καρβονύλιο  $C=O$ ).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) παρουσιάζονται οι κυριότερες κατηγορίες υδατανθράκων με βάση το μοριακό τους βάρος:

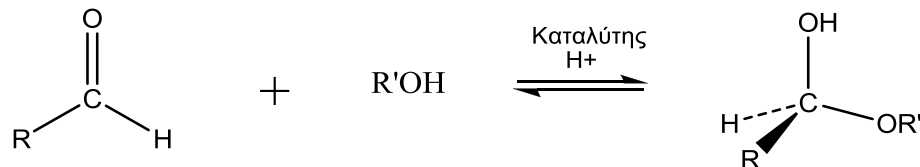
Πίνακας 1:

Κατηγορία	Χαρακτηριστικά	Ουσίες
Μονοσακχαρίτες	Μονομερή μόρια που συμμετέχουν στη σύνθεση πολυπλοκότερων δομών.	<p>Γλυκόζη</p>  <p>Φρουκτόζη</p> 
Δισακχαρίτες	Προκύπτουν από την ένωση δύο μονοσακχαριτών.	<p>Σουκρόζη</p>  <p>Λακτόζη</p>  <p>Μαλτόζη</p> 
Ολιγοσακχαρίτες	Προκύπτουν από την ένωση 20-30 μονοσακχαριτών.	<p>Μαλτοδεξτρίνες</p> <p>Φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες</p>
Πολυσακχαρίτες	Προκύπτουν από την ένωση εκατοντάδων χιλιάδων υπομονάδων γλυκόζης.	<p>Άμυλο</p> <p>Γλυκογόνο</p> <p>Κυτταρίνη</p>

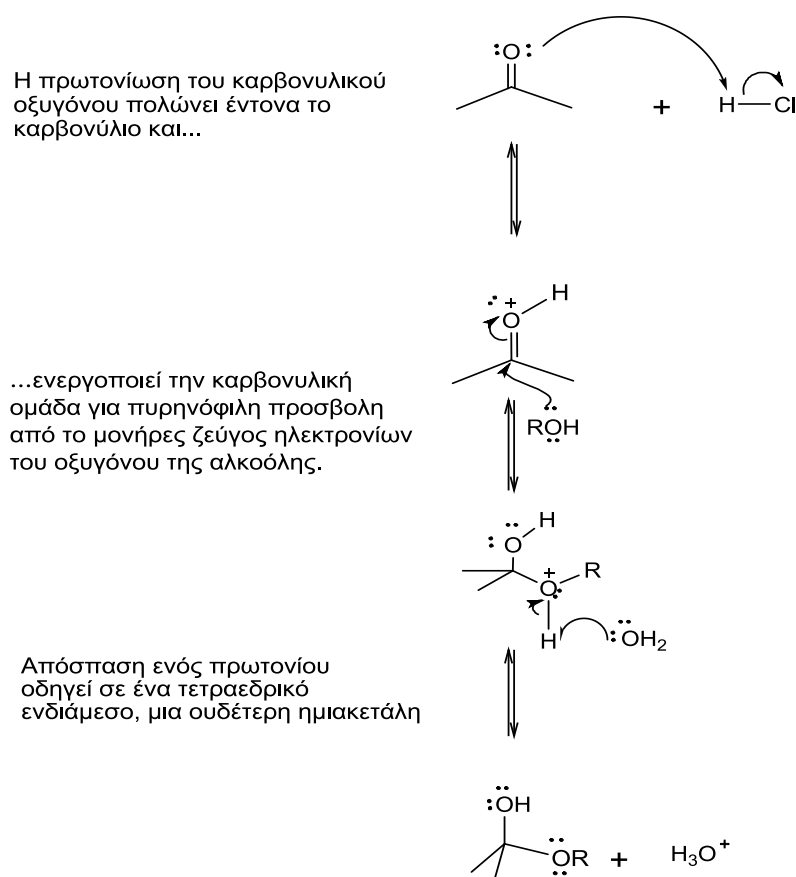
Ο ομοιοπολικός δεσμός που σχηματίζεται μεταξύ των μονοσακχαριτών ονομάζεται γλυκοζιτικός δεσμός και προσδιορίζει τη δομή του πολυσακχαρίτη. Οι δεσμοί  $\beta$ -1,4 ευνοούν τις ευθείες αλυσίδες, οι οποίες είναι βέλτιστες για δομικούς σκοπούς. Οι δεσμοί  $\alpha$ -1,4 ευνοούν κεκλιμένες δομές, οι οποίες είναι περισσότερο κατάλληλες για αποθήκευση.

## 1.2. Υδατάνθρακες και σχηματισμός ημιακετάλης

Οι ανοιχτές αλυσίδες των πεντοζών και εξοζών τείνουν να κυκλοποιούνται όταν βρεθούν εντός διαλύματος. Με άλλα λόγια η επικρατέστερη μορφή των σακχάρων αυτών όταν βρίσκονται σε διάλυμα είναι η μορφή του δακτυλίου. Γενικά, είναι γνωστό ότι οι αλκοόλες πραγματοποιούν μια γρήγορη και αντιστρεπτή πυρηνόφιλη προσθήκη με κετόνες ή αλδεύδες προς σχηματισμό ημιακεταλών με γενικό τύπο  $RCH(OH)OR_1$  (Mc Murry, 2000, p. 1245).



Εικόνα 1. Πυρηνόφιλη Προσθήκη. Ο μηχανισμός της αντίδρασης περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 2) (Mc Murry, 2000, p. 905).

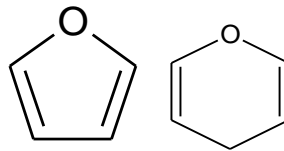


Εικόνα 2. Μηχανισμός σχηματισμού ημιακετάλης

Η ανοιχτή αλυσίδα μπορεί να κυκλοποιηθεί λοιπόν, όταν μια καρβονυλική ομάδα του μορίου τους αντιδρά με μια ομάδα υδροξυλίου, προς δημιουργία ημιακετάλης. Αυτή η ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη οδηγεί στην δημιουργία

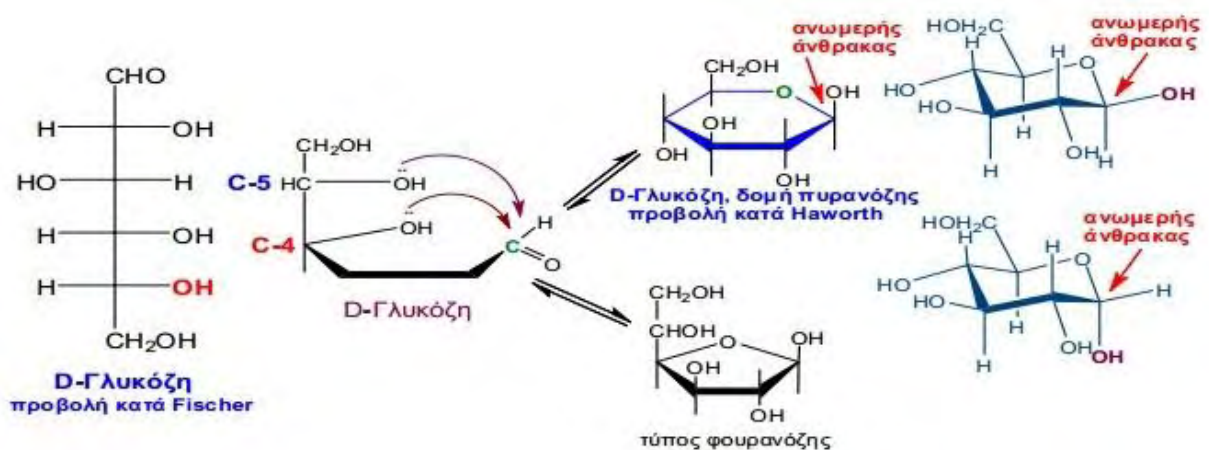


φουρανοζών (πενταμελείς δακτύλιοι) ή πυρανοζών (εξαμελείς δακτύλιοι). Οι ονομασίες πυρανόζη και φουρανόζη προέρχονται από τις ονομασίες των απλών κυκλικών αιθέρων πυράνιο και φουράνιο (**Εικόνα 3**). Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοικτής και κλειστής αλυσίδας.

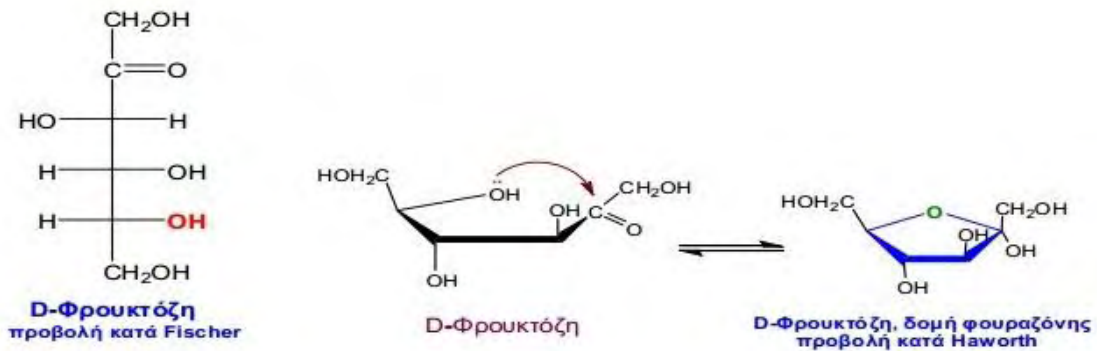


**Εικόνα 3.** (α) φουράνιο (β) Πυράνιο

Αναλυτικότερα, στην περίπτωση της πυρανόζης η αλδεϋδική ομάδα του άνθρακα C-1 της γλυκόζης αντιδρά με το υδροξύλιο που βρίσκεται στη θέση C-5, σχηματίζοντας αρχικά μια ενδομοριακή ημιακετάλη και στη συνέχεια το επιθυμητό μόριο (**Εικόνα 4**). Ενώ στην περίπτωση της φουρανόζης, η κετονική ομάδα του άνθρακα C-2 αντιδρά με το υδροξύλιο του άνθρακα C-5 προς σχηματισμό τους πενταμελούς δακτυλίου της φουρανόζης (**Εικόνα 5**).

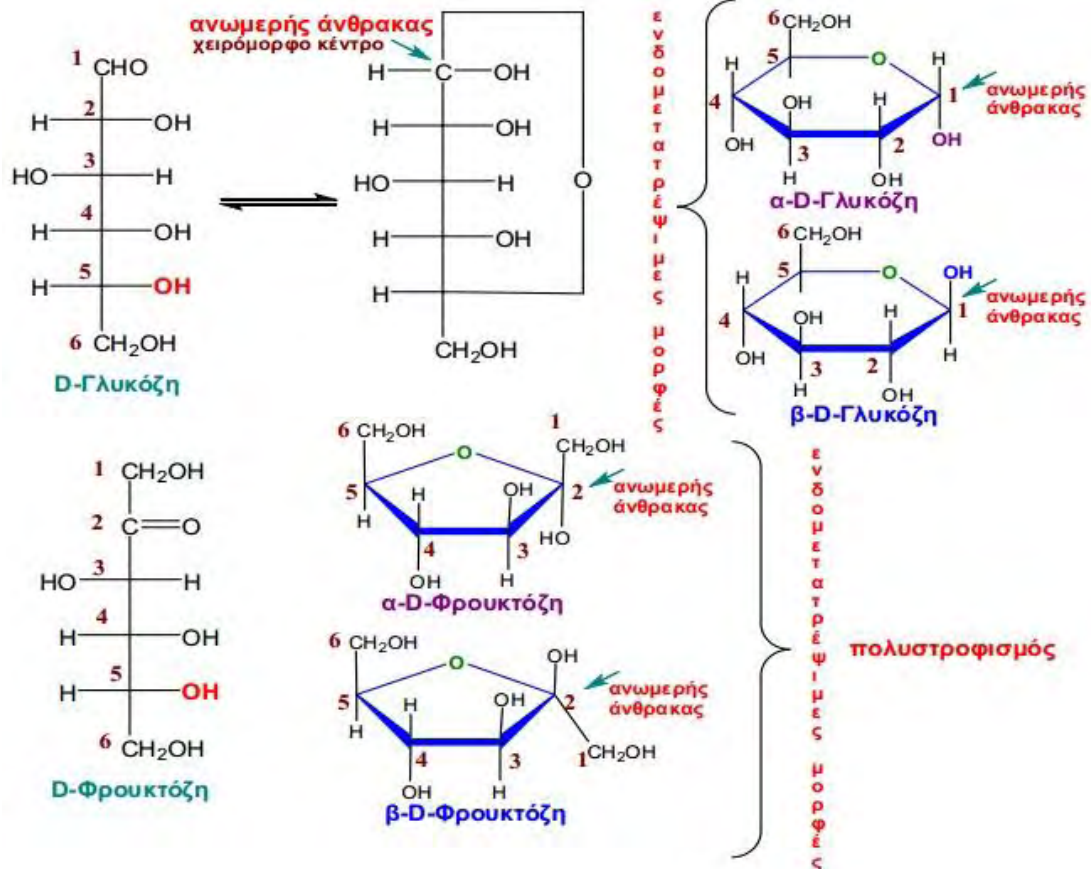


**Εικόνα 4.** Σχηματισμός γλυκοπυρανόζης.



Εικόνα 5. Σχηματισμός φουρανόζης.

Η κυκλοποίηση των σακχάρων μέσω ημιακετάλης είναι μεγάλης σημασίας διότι με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται ένα πρόσθετο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα και στο μόριο παρουσιάζεται το φαινόμενο της ανωμέρειας. Στην περίπτωση της γλυκόζης, ο άνθρακας στη θέση C-1 είναι ανωμερής και σχηματίζονται έτσι δύο στερεοχημικές δομές: η α-D- γλυκοπυρανόζη και η β-D-γλυκοπυρανόζη (**Εικόνα 6**). Οι χαρακτηρισμοί α- και β- αναφέρονται στη θέση στον χώρο όπου βρίσκεται η υδροξυλομάδα του ανωμερούς άνθρακα σε σχέση με τον υποκαταστάτη του C-5. Όταν ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου ως προς τον υποκαταστάτη του άνθρακα στη θέση C-5 (θέση trans), τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως ανωμερές α. Όταν ο υποκαταστάτης του ανωμερούς άνθρακα βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με τον υποκαταστάτη του άνθρακα C-5, τότε το σάκχαρο χαρακτηρίζεται ως ανωμερές β. Αντίστοιχα, στην περίπτωση της φουρανόζης, ο ανωμερής άνθρακας είναι ο C-2.



Εικόνα 6. Ανωμερή των D-γλυκόζης και D - φρουκτόζης.

Οι δομές αυτές (Haworth) όμως, δεν μας παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης (και κατ' αντιστοιχία της φουρανόζης). Ο συγκεκριμένος δακτύλιος δεν είναι δυνατόν να είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα.

Οι δακτύλιοι της πυρανόζης μπορούν να υιοθετήσουν στερεοδιατάξεις ανάκλινδρου, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι τάσεις, αφού όλοι οι γειτονικοί δεσμοί C-H έχουν διαβαθμισμένη διαμόρφωση και οι γωνίες C-C-C μπορούν να προσεγγίσουν την απαλλαγμένη από τάσεις τιμή της κανονικής τετραεδρικής γωνίας (Mc Murry, 2000, p. 151). Οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου είναι δύο ειδών: αξονικοί και ισημερινοί (**Εικόνα 7**). Οι αξονικοί δεσμοί έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

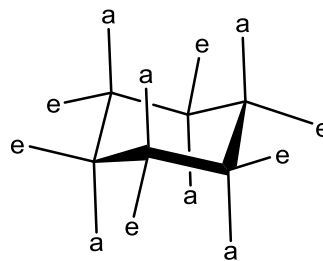
- είναι σχεδόν κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου
- οι υποκαταστάτες προβάλλουν πάνω και κάτω από το μέσο επίπεδο του δακτυλίου

- οι υποκαταστάτες, εκτός του υδρογόνου, παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλον με την προϋπόθεση ότι βρίσκονται στην ίδια πλευρά του δακτυλίου.

Ενώ, οι ισημερινοί δεσμοί έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

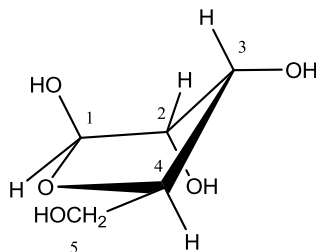
- είναι σχεδόν παράλληλοι προς το επίπεδο του δακτυλίου
- οι υποκαταστάτες διατάσσονται στην περιφέρεια
- οι υποκαταστάτες δεν παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλον, καθώς υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ότι στην αξονική θέση.



Εικόνα 7. Μορφή ανάκλινδρου μιας πυρανόζης ( $e$  = ισημερινός υποκαταστάτης,  $a$  = αξονικός υποκαταστάτης)

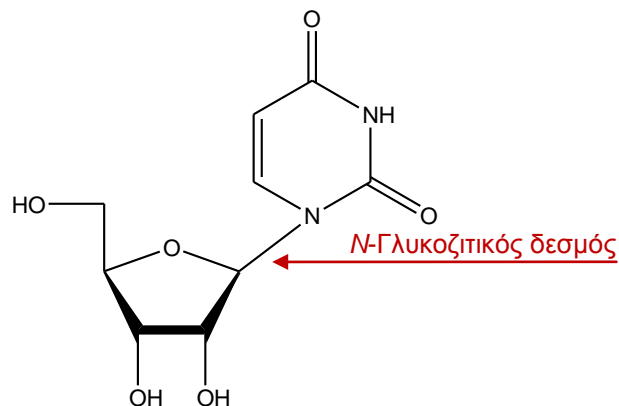
Κατά αναλογία ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να είναι πτυχωμένος, έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα να είναι στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εκτός του επιπέδου αυτού (*Εικόνα 8*). Αυτή η διαμόρφωση καλείται μορφή φακέλου. Οι δακτύλιοι της φουρανόζης είναι σε θέση να αλληλομετατρέπονται ταχύτατα σε διαφορετικές στερεοδιατάξεις. Είναι πολύ πιο ευέλικτοι από τους δακτυλίους της πυρανόζης, γεγονός που εξηγεί την επιλογή τους ως συστατικών του RNA και DNA (Stryer, 2001).



Εικόνα 8. Μορφή φακέλου της  $\beta$ -D-ριβόζης

### 1.3. Νουκλεοζίτες και ανάλογά τους

Μία μονάδα που αποτελείται από μία βάση δεσμευμένη σε ένα σάκχαρο ονομάζεται νουκλεοζίτης. Οι τέσσερις μονάδες νουκλεοζιτών στο RNA ονομάζονται αδενοσίνη, γουανοσίνη, κυτιδίνη και ουριδίνη ενώ στο DNA ονομάζονται δεοξαδενοσίνη, δεοξυγουανοσίνη, δεοξυκυτιδίνη και θυμιδίνη. Η βάση μπορεί να είναι πουρίνη ή πυριμιδίνη, ενώ το σάκχαρο είναι μία πεντόζη. Αναλόγως αν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη, ο νουκλεοζίτης καλείται ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης. Σε κάθε περίπτωση, το *N-9* μιας πουρίνης ή το *N-1* μιας πυριμιδίνης συνδέεται στο *C-1'* του σακχάρου. Η βάση βρίσκεται επάνω στο επίπεδο του σακχάρου όταν η δομή γράφεται με τον κλασικό τρόπο, όπως απαντάται στη φύση, δηλαδή η διαμόρφωση του γλυκοζιτικού δεσμού *N* είναι  $\beta$ .



*Εικόνα 9. Ουριδίνη (U)*

Οι νουκλεοζίτες απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στην φύση διότι αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των νουκλεοτιδίων, των βασικών δομικών μονάδων του γενετικού υλικού και αποτελούν το υπόστρωμα των πολυμερασών για την σύνθεση DNA και RNA. Συγκεκριμένα, ένα νουκλεοτίδιο είναι ο φωσφορικός εστέρας του νουκλεοζίτη που πάλι αναλόγως τη φύση της πεντόζης είναι ριβονουκλεοτίδιο ή δεοξυριβονουκλεοτίδιο. Η πιο κοινή θέση εστεροποίησης σε ένα φυσικό νουκλεοτίδιο είναι η υδροξυλική ομάδα που συνδέεται στη θέση *C-5'* του σακχάρου. Η συνεχόμενη σύνδεση πολλών μονομερών νουκλεοτιδίων οδηγούν στο σχηματισμό δινουκλεοτιδίων, τρινουκλεοτιδίων, τετρανουκλεοτιδίων, ολιγονουκλεοτιδίων και τέλος πολυνουκλεοτιδίων.

Σχετικά με τις ιδιότητές τους, ορισμένοι νουκλεοζίτες έχει αποδειχθεί ότι οι παρουσιάζουν αντικαρκινικές και κυτταροστατικές ιδιότητες γι αυτό και αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια (Komiotis *et al*, 2008). Επίσης, έχει διαπιστωθεί και η ικανότητα τους να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε

ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών (Lui V. *et al*, 2010; Bhat U. G. *et al*, 2010). Επιπλέον, επηρεάζουν τους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς του πολλαπλασιασμού των ιών και για το λόγο αυτό παρέχουν ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιιικών φαρμάκων. Τέλος, ορισμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν επιδείξει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Spanou C. *et al*, 2007), καθώς μπορούν να επιβραδύνουν ή να αποτρέψουν την οξειδωση ενός υποστρώματος ενώ βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το υπόστρωμα. Ανήκουν δηλαδή στην κατηγορία των αντιοξειδωτικών ουσιών (Halliwell B. 2001).

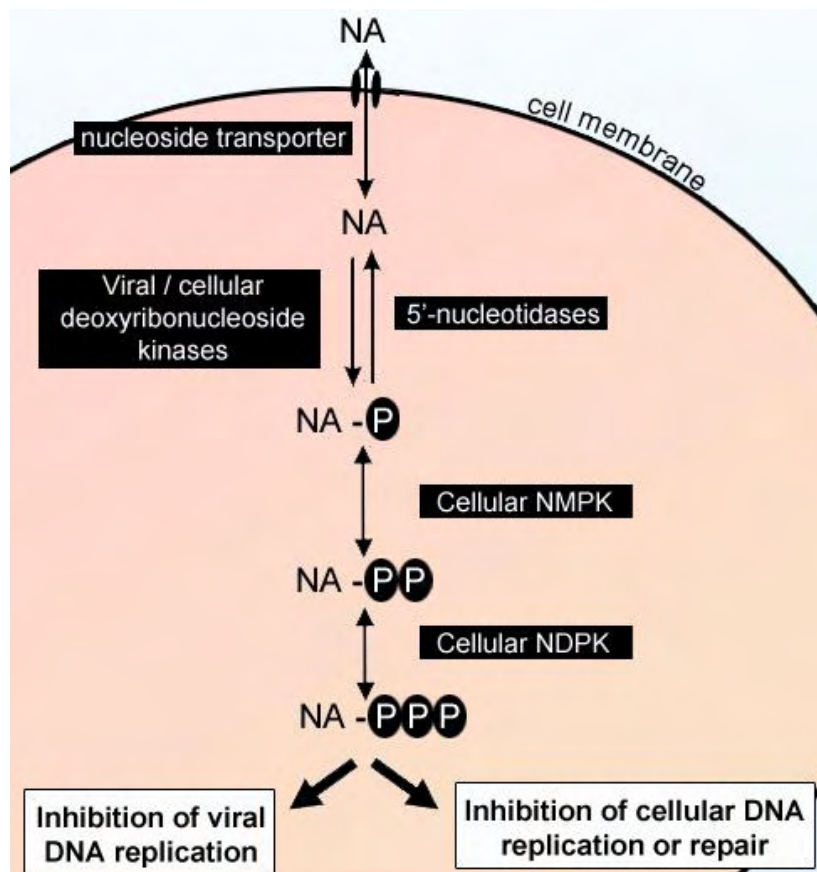
#### **1.4. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτών**

Γενικά, ο τρόπος δράσης των φαρμάκων βασίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό στόχο, ο οποίος μπορεί να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη, όπως ένας υποδοχέας, ένας δίαυλος ιόντων, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφορέας, είτε τα νουκλεϊνικά οξέα. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των νουκλεοζιτικών αναλόγων που διαθέτουν αντιιική ή αντικαρκινική δράση, τα οποία λόγω της δυνατότητας μεταφοράς τους εντός των κυττάρων με παθητική διάχυση είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία πολλών ασθενειών (Zhou *et al*. 2004).

Οι φυσικοί νουκλεοζίτες συντίθενται εντός των κυττάρων αλλά είναι δυνατόν, να εισέλθουν στα κύτταρα και με παθητική διάχυση. Η παραπάνω ιδιότητα επιτρέπει το σχεδιασμό και τη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών, τα οποία διατηρούν χαρακτηριστικά των φυσικών μορίων. Τα ανάλογα των νουκλεοζιτών αποτελούν στην πραγματικότητα ανενεργά προφάρμακα, τα οποία ενδοκυτταρικά πρέπει να τροποποιηθούν ώστε να μπορέσουν να δράσουν. Η διαδικασία αυτή συνίσταται στην εισαγωγή των νουκλεοζιτικών αναλόγων στο κύτταρο από πρωτεΐνες-μεταφορείς νουκλεοζιτών, διαπερνώντας την κυτταρική μεμβράνη, αφού μόνα τους αδυνατούν λόγω φορτίου. Στη συνέχεια, ακολουθεί η φωσφορυλίωσή τους από τις κυτταρικές ή ιικές κινάσες (Arner and Eriksson 1995). Αφού φωσφορυλιωθούν προς τις τριφωσφορικές τους δομές από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα, εμποδίζουν είτε άμεσα είτε έμμεσα τον κυτταρικό ή ιικό διπλασιασμό, ή παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA (**Εικόνα 10**).

Αρχικά, γίνεται φωσφορυλίωση (προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας) στην 5'-θέση του σακχάρου, η οποία καταλύεται από ειδικές ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες, προς τη δημιουργία ενός μονοφωσφορικού νουκλεοζιτη (Wagner *et al*. 2000, Balzarini 1993). Οι μετέπειτα φωσφορυλιώσεις προς τις διφωσφορικές και τριφωσφορικές μορφές των νουκλεοζιτών καταλύονται από νουκλεοδιτικές κινάσες

και νουκλεοζιτικές διφωσφορικές κινάσες, αντιστοίχως. Η φωσφορυλίωση από ιικές νουκλεοζιτικές κινάσες όπως επίσης και η χαμηλή ικανότητα διαπερατότητας των φωσφορυλιωμένων νουκλεοζιτών οδηγούν στην συσσώρευση των φαρμακολογικά ενεργών μορφών τους, στα κύτταρα που έχουν προσβληθεί από τον ιό.

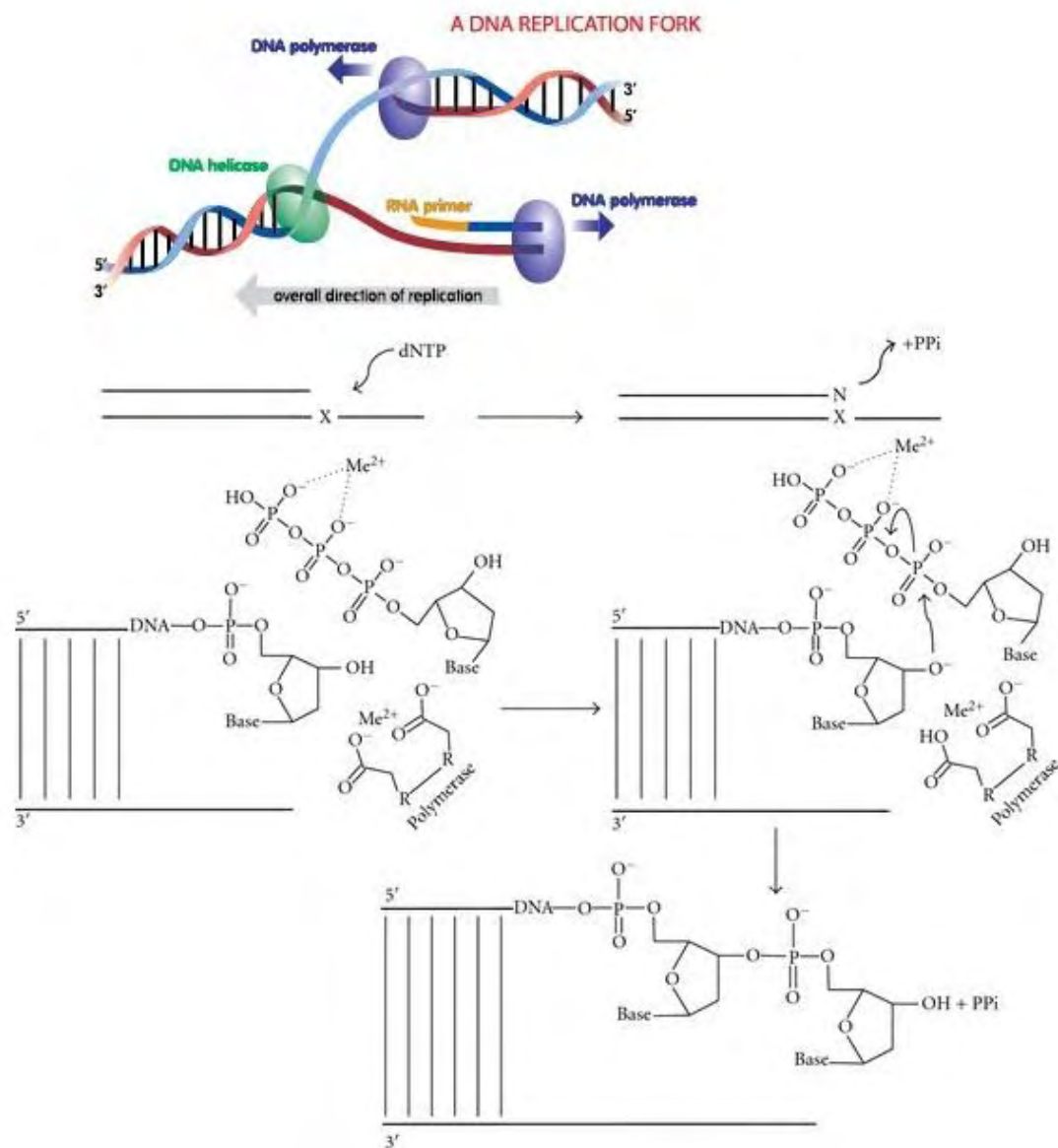


*Εικόνα 10.* Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα (NA) απαιτούν φωσφορυλίωση για να εκδηλώσουν τη φαρμακευτική τους δράση. Τα NA μεταφέρονται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης και φωσφορυλιώνονται από κυτταρικά ή ιικά ένζυμα στην τριφωσφορική τους μορφή.

Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, στηρίζεται στην ικανότητά αλληλεπίδρασης με τις ιικές πολυμεράσες (όσο μεγαλύτερη συγγένεια υπάρχει ανάμεσά τους, τόσο μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ως θεραπευτικοί παράγοντες). Μιμούμενα τους φυσικούς νουκλεοζιτές, τα αντιικά ανάλογά τους μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τις πολυμεράσες και να ενσωματωθούν στο ιικό γονιδίωμα. Η ενσωμάτωσή τους αυτή μπορεί να προκαλέσει διακοπή της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, να το καταστήσει μη λειτουργικό και κατά συνέπεια να καταστείλει την αντιγραφή του ιού και την περαιτέρω παραγωγή

ισωματιδίων. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος είναι συντηρημένος σε πολλά είδη ιών, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να παρουσιάσουν δράση έναντι μεγάλου φάσματος ιών (Chong et al. 2002).

Ένας κοινός μηχανισμός αντικής και αντικαρκινικής δράσης των αναλόγων των νουκλεοζιτών είναι η ενσωμάτωση των νουκλεοζιτών στην επιμήκυνόμενη αλυσίδα του DNA, προκαλώντας την διακοπή της επιμήκυνσής της (**Εικόνα 11**). Η ένωση των νουκλεοτιδίων καταλύεται από κυτταρικές πολυμεράσες οι οποίες συνδέουν το 5' άκρο του ενός νουκλεοτιδίου με την υδροξυλική 3' ομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου με απελευθέρωση μιας πυροφωσφορικής ομάδας και δημιουργίας φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ των σακχάρων (Lewin 2003, Burns et al. 2005).





Εικόνα 11. Η πολυμεράση καταλύει την αντίδραση της αντιγραφής του DNA (φωσφορυλοτρανσφεράση). Ο πολυμερισμός του DNA συμβαίνει στην ελεύθερη 3'-OH ομάδα της δεοξυριβόζης. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν ιόντα μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ) για να ισοβαθμίσουν τα αρνητικά φορτία τόσο των φωσφορικών ομάδων όσο και του ασπαραγινικού οξέος ή του γλουταμικού οξέος στο ενεργό κέντρο της πολυμεράσης.

Εκτός του παραπάνω μηχανισμού, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα δρουν και μέσω άλλων μηχανισμών. Μπορούν να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της καταστολής αντιαποπτωτικών γονιδίων (Lui *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).

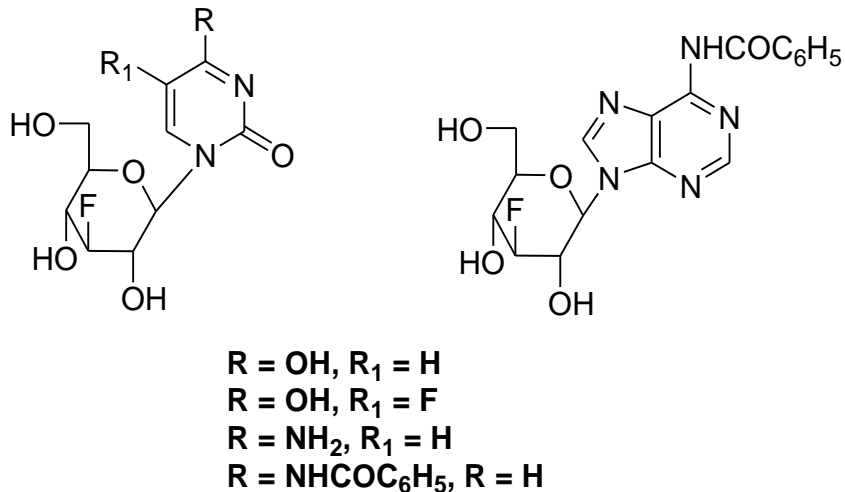
## **I.5. Νουκλεοζίτες ως αντικαρκινικοί παράγοντες**

Τα κύτταρα αποτελούν το κύριο δομικό στοιχείο κάθε οργανισμού. Στα αρχικά στάδια της ζωής του, ένας οργανισμός φροντίζει να πολλαπλασιάζει τα υπάρχοντα κύτταρά του και να σχηματίζει με τα νέα όλους τους απαραίτητους για τη λειτουργικότητά του ιστούς. Οι εργασίες του Hayflick έχουν δείξει ότι τα κύτταρα σε καλλιέργεια έχουν περιορισμένη δυνατότητα κυτταροδιαίρεσεων, που κυμαίνεται σε 60-70 για τα περισσότερα είδη κυττάρων, καθώς σταματούν την διαίρεσή τους όταν έρθουν σ' επαφή το ένα με το άλλο. Ένα από τα σπουδαιότερα χαρακτηριστικά του κακοήθους κυττάρου είναι η ικανότητά του για ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό. Συχνά στον καρκίνο, οι μηχανισμοί ελέγχου του πολλαπλασιασμού και του κυτταρικού κύκλου ανευρίσκονται ελαττωματικοί. Θεωρητικά ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός έχει δύο προϋποθέσεις. Πρώτον, ένα ισχυρό σήμα πολλαπλασιασμού που υπερέχει των ενδογενών ρυθμιστικών μηχανισμών και δεύτερο την αποδιοργάνωση του μηχανισμού γήρανσης ώστε το κύτταρο να γίνει αθάνατο. Η θεωρία αυτή έχει ως ένα σημείο επιβεβαιωθεί *in vitro*. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων μπορεί να είναι περιορισμένος (καλοήθεις όγκοι), ή έντονος με μεταστάσεις σε άλλους ιστούς (κακοήθεις όγκοι), οι οποίοι θεραπεύονται κυρίως με χημειοθεραπεία.

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους έχουν μελετηθεί ως δυνητικοί αντικαρκινικοί παράγοντες. Ένας μεγάλος αριθμός αναλόγων φυσικών νουκλεοζιτών χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια στην ιατρική για τη θεραπεία του καρκίνου. Συγκεκριμένα, οι αντιμεταβολίτες (πυριμιδινικά και πουρινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα) αποτελούν μια οικογένεια φαρμάκων που επηρεάζουν την ανάπτυξη του DNA και του RNA των καρκινικών κυττάρων.

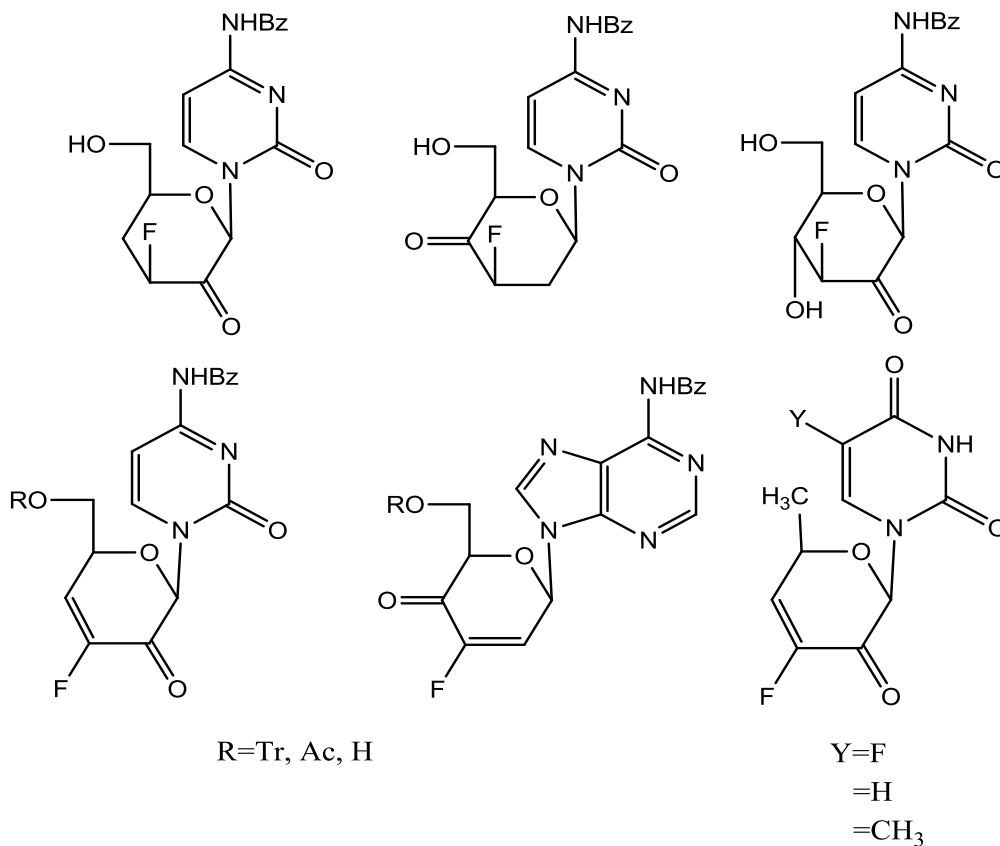
Αναλυτικότερα, στο εργαστήριο της Βιο-Οργανικής χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, έχουν συντεθεί

φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Manta et al. 2007), οι οποίοι μειώνουν αποτελεσματικά τη δραστηριότητα της PARN, ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(A) ουράς) (**Εικόνα 12**). Τα συγκεκριμένα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπες ενώσεις για την ανάπτυξη νέων ενώσεων που θα μπορούν να ρυθμίζουν την PARN (Balatsos et al. 2009).



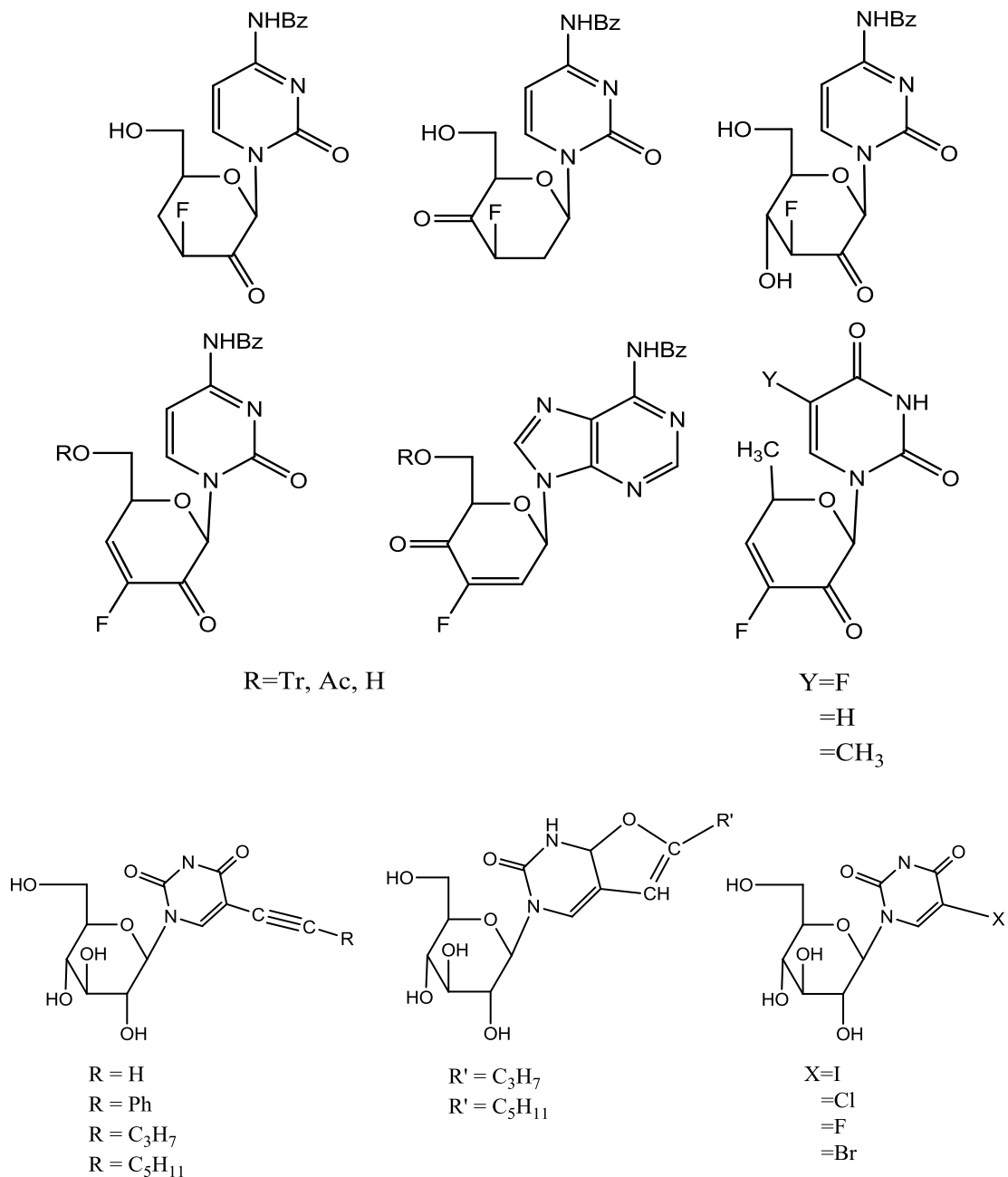
**Εικόνα 12.** Χημική δομή φθορο πυρανονουκλεοζιτών.

Νέες σειρές νουκλεοζιτών με εξαμελή υδατανθρακικό δακτύλιο που επίσης έχουν μελετηθεί αποτελούν οι φθόρο κέτο και ακόρεστοι φθόρο κέτο πυρανονουκλεοζίτες. Οι συγκεκριμένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης εντεροϊού και αξιοσημείωτη κυτταροτοξική δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Manta et al. 2007, Manta et al. 2008, Manta et al. 2009) (**Εικόνα 13**).



**Εικόνα 13.** Χημική δομή φθορο κετο και ακόρεστων φθορο κετοπυρανονουκλεοζιτών.

Εκτός των διαφόρων υποκαταστάσεων στο τμήμα του σακχάρου, μελετήθηκε και η τροποποίηση των πυρανονουκλεοζιτών στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης. Διάφοροι 5-αλογονο και 5-αλκυνολο πυριμιδινο πυρανονουκλεοζίτες εμφάνισαν σημαντική δράση ως αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ένα ένζυμο το οποίο παίζει κύριο ρόλο στη μεταβολική πορεία της γλυκογονόλυσης (Tsirkone et al. 2010). Οι συγκεκριμένες ενώσεις που πρόσφατα συντέθηκαν στο εργαστήριο Βιο-οργανικής του τμήματος μας παρουσιάζονται στην παρακάτω **εικόνα 14**.



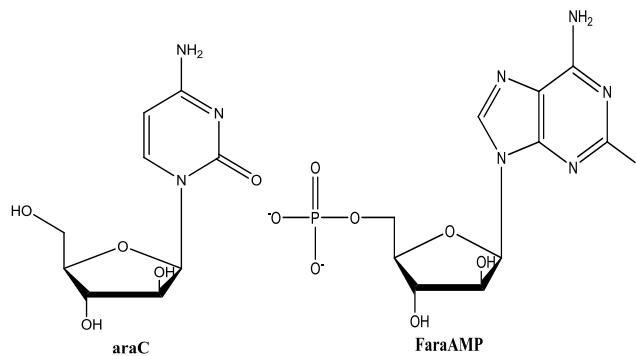
*Εικόνα 14. Χημική δομή υποκατεστημένων στη βάση πυριμιδινό πυρανονουκλεοζιτών*

## 1.6. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με σάκχαρο μια πεντόζη

Ο ρόλος των πεντοζών επισημάνθηκε από τη στιγμή που η ριβόζη και η δεοξυριβόζη ταυτοποιήθηκαν ως κύριες δομικές μονάδες των νουκλεϊκών οξέων. Η πλειοψηφία των μέχρι τώρα ερευνητικών προσπαθειών για τη δημιουργία φαρμάκων με αντιική και αντικαρκινική δράση, επικεντρώθηκε στη χρήση αναλόγων νουκλεοζιτών που έχουν ως σάκχαρο μία πεντόζη.

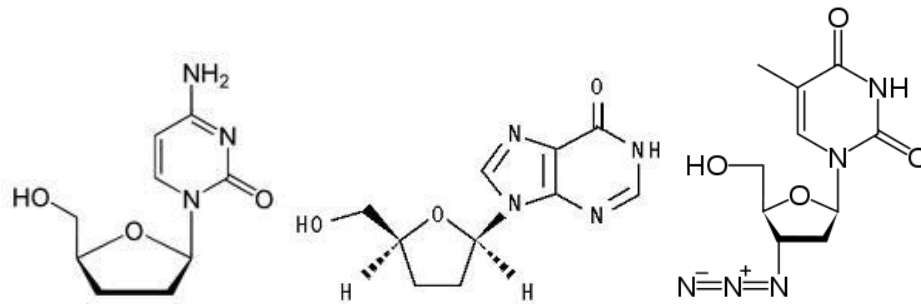
Χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας με σημαντικές αντικαρκινικές ιδιότητες αποτελούν οι εξής:

- Το Cytarabine (araC), το οποίο είναι το πρώτο πυραμιδικό νουκλεοζιτικό ανάλογο που χρησιμοποιήθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας (**Εικόνα 15α**).
- Η 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλαδενίνη (araA) είναι ένα από τα πρώτα πουρινικά νουκλεοζιτικά ανάλογα, το οποίο απορρίφθηκε ως αντικαρκινικός παράγοντας λόγω της χαμηλής διαλυτότητας και της γρήγορης απαμίνωσής της από την απαμινάση της αδενοσίνης. Η προσθήκη ενός ατόμου φθορίου στο τμήμα της αδενίνης αύξησε την αντίσταση στην απαμινάση της αδενοσίνης και η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας βελτίωσε τη διαλυτότητα του αναλόγου, συνθέτοντας την 5'-μονοφωσφορική 9-β-D-αραβινοφουρανοζυλο-2-φθοροαδενίνη (fludarabine), (FaraAMP) (Matsuda et al. 2004). Το συγκεκριμένο ανάλογο είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας κατά της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων (**Εικόνα 15β**).

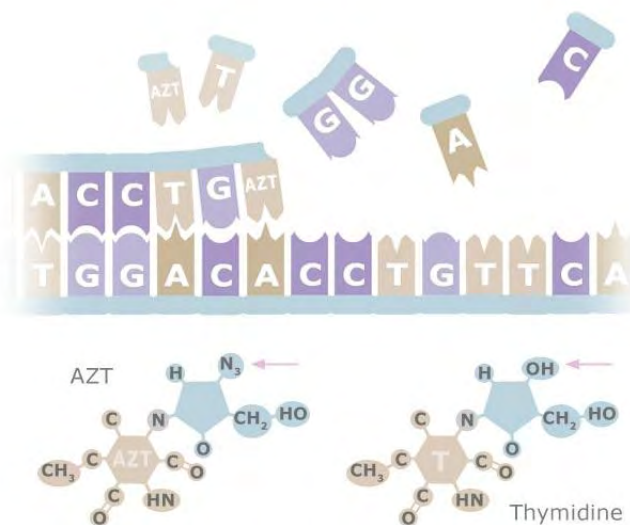


**Εικόνα 15.** Χημική δομή των α) araC και β) FaraAMP

Τέλος, μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα φουρανονουκλεοζιτών με εξαιρετική αντιική δράση είναι τα zalcitabine (DDC), didanosine (DDI), και zidovudine (AZT), τα οποία λειτουργούν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης και χρησιμοποιούνται κλινικά ως φάρμακα έναντι του HIV. Πρόκειται για 2',3'-διδεοξυνουκλεοζίτες που προκύπτουν από την απομάκρυνση των υδροξυλομάδων από τις 2',3'- θέσεις του δακτυλίου της ριβόζης (**Εικόνα 15γ,δ,ε**).



*Εικόνα 15. Χημική δομή των  $\gamma$ )DDC,  $\delta$ )DDI και  $\epsilon$ )AZT.*



*Εικόνα 16. Μεταλλαγή στο DNA του ιού HIV. Το AZT είναι ανάλογο της θυμιδίνης. Η N3 ομάδα δεν επιτρέπει τη συνέχιση της σύνθεσης του DNA, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η αντιγραφή του ιού.*

### 1.7. Click Χημεία: Κυκλοπροσθήκη αζιδίων καταλυόμενη από χαλκό (Cu-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC))

Οι αντιδράσεις οι οποίες είναι αξιόπιστα επιδεκτικές στην κατασκευή «οικοδομημάτων» μορίων που φέρουν διάφορες λειτουργικές ομάδες και μπορούν να πραγματοποιηθούν σε ευρύ φάσμα συνθηκών αποτελούν το πιο χρήσιμο εργαλείο στην κατασκευή νέων μορίων με ενδιαφέρουσες ιδιότητες.

Η CuAAC έχει χαρακτηριστεί ως το πρώτο παράδειγμα Click Χημείας, ο Click μετασχηματισμός πραγματοποιείται πολύ εύκολα, σχηματίζονται ταχύτατα τα επιθυμητά προϊόντα σε υψηλή απόδοση με ελάχιστα ή καθόλου παραπροϊόντα, δουλεύει καλά υπό διάφορες συνθήκες και δεν επηρεάζεται από την φύση των

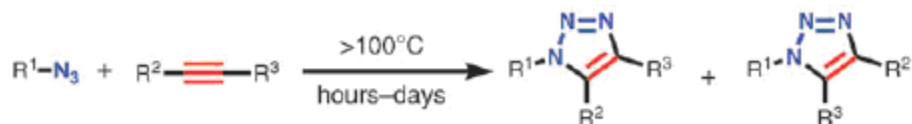
ομάδων που συνδέονται. Η δυναμική των οργανικών αζιδίων ως ενεργά και εκλεκτικά αντιδραστήρια επισημάνθηκε ήδη από τις πρώτες εφαρμογές τους και έτσι εξετάστηκε η διπολική κυκλοπροσθήκη αυτών με ολεφίνες και αλκίνια για να διαπιστωθεί εάν ικανοποιούν τα Click κριτήρια. Όμως, η μικρή ταχύτητα αντίδρασης των αζιδίων με τα αλκίνια κατά την κυκλοπροσθήκη τους δεν τα καθιστούσε χρήσιμα στην Click χημεία μέχρι την ανακάλυψη της κατάλυσης της από χαλκό (I).

Η αντίδραση κατάλυσης με χαλκό αναφέρθηκε ταυτόχρονα και ανεξάρτητα από δύο ομάδες, του Meldal στην Δανία (Tomoe et al. 2002) και των Fokin και Sharpless στις ΗΠΑ (Rostovtsev et al. 2002). Μετέτρεψαν οργανικά αζίδια και ακραία αλκίνια αποκλειστικά στα επιθυμητά 1,4-υποκατεστημένα 1,2,3-τριαζόλια, σε αντίθεση από την μη καταλυόμενη από χαλκό αντίδραση που απαιτεί υψηλότερες θερμοκρασίες και παρέχει μίγμα 1,4- και 1,5-regio-ισομερή. Ο Meldal και οι συνεργάτες του ασχολήθηκαν με την σύνθεση πεπτιδοτριαζολίων σε οργανικούς διαλύτες ξεκινώντας από αλκυλιωμένα αμινοξέα σε στερεή φάση επικεντρωμένοι στην θέση που πρέπει να βρίσκεται το αλκίνιο ώστε η αντίδραση να είναι επιτυχής. Αντίθετα, η ομάδα από το Scripps ασχολήθηκε αμέσως με υδατικά συστήματα και πρότεινε μια πειραματική διαδικασία για ομοιοπολικό «ράψιμο». Ακόμη, υποστήριξε την ευρεία εφαρμογή της διαδικασίας αυτής σε οποιοδήποτε σύστημα περιέχει ένα αζίδιο και ένα αλκίνιο. Πράγματι κατά την διάρκεια των ετών που ακολούθησαν η CuAAC έχει βρεί πολλές εφαρμογές και συγκεντρώνει ένα συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον, όπως εμφανίζεται σε διάφορα άρθρα επισκόπησης (Bock et al. 2006, Wu et al. 2007, Fokin et al. 2007, Moses et al. 2007, Johnson et al. 2008, Meldal et al. 2008, Hein et al. 2010).

Η θερμική αντίδραση ακραίων ή εσωτερικών αλκινίων με οργανικά αζίδια (**Εικόνα 17A**) είναι γνωστή για περισσότερο από έναν αιώνα, η πρώτη σύνθεση 1,2,3-τριαζολίου πραγματοποιήθηκε από τον A. Michael το 1983. Η αντίδραση διερευνήθηκε εκτενέστερα από τον Huisgen και τους συνεργάτες του στις δεκαετίες του 50 έως του 70 κατά τις μελέτες της μεγάλης οικογένειας αντιδράσεων 1,3-διπολικών κυκλοπροθηκών (Huisgen et al. 1963). Η αντίδραση είναι εξώθερμη  $\Delta H_0 = -50$  με  $-65 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  και η υψηλή ενέργειας ενεργοποίησης ( $25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  για το μεθυλοαζίδιο και το προπίνιο) έχει ως αποτέλεσμα την μικρή ταχύτητα αντίδρασης για μη δραστικά αντιδρώντα ακόμη και με παρατεταμένη θέρμανση. Επιπλέον, η ενεργειακή διαφορά των HOMO-LUMO τροχιακών των αζιδίων και αλκινίων είναι της ίδιας τάξης μεγέθους, έτσι και οι δύο HOMO-διπόλου και LUMO-διπόλου ελεγχόμενες πορείες λειτουργούν εξίσου σε αυτή την κυκλοπροσθήκη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μίγματος regio-

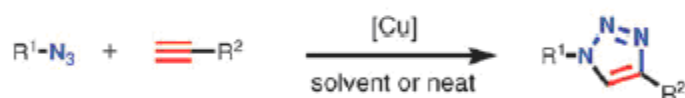
ισομερών 1,2,3-τριάζολο προϊόντων όταν το αλκίνιο είναι ασύμμετρα υποκατεστημένο.

A. 1,3-Διπολική κυκλοπροσθήκη αζιδίων και αλκινίων

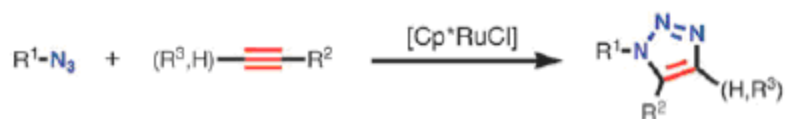


*Οι αντιδράσεις είναι ταχύτερες όταν τα R είναι δέκτες ηλεκτρονίων*

B. Κυκλοπροσθήκη αζιδίων-αλκινίων καταλυόμενη από Cu (CuAAC)



C. Κυκλοπροσθήκη αζιδίων-αλκινίων καταλυόμενη από Ru (RuAAC)

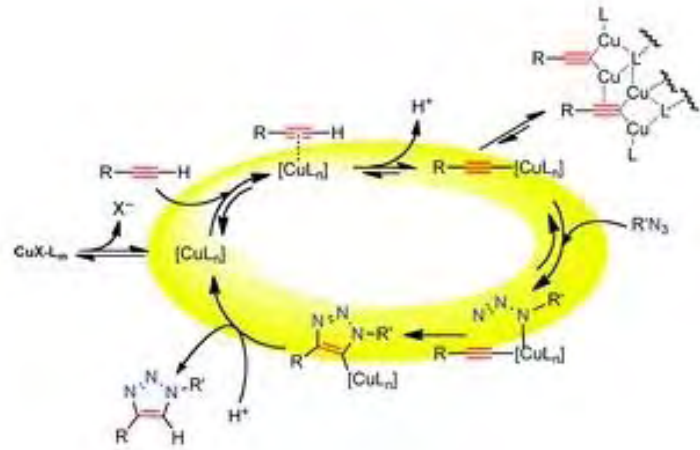


*Εικόνα 17. Τύποι αντιδράσεων κυκλοπροσθηκών αζιδίων αλκινίων*

Αντίθετα στην CuAAC (**Εικόνα 17B**) σχηματίζονται αποκλειστικά 1,4-διυποκατεστημένα-1,2,3-τριάζολια σε θερμοκρασία δωματίου σε υψηλές αποδόσεις.

Η κατάλυση με χαλκό αλλάζει δραστικά τον μηχανισμό και την έκβαση της αντίδρασης και με μια σειρά διαδοχικών σταδίων οδηγεί στο 5-τριάζολυλο-χαλκο ενδιάμεσο (**Εικόνα 18**). Ο σχηματιζόμενος δεσμός κλειδί C-N λαμβάνει χώρα μεταξύ του πυρηνόφιλου βινυλικού-β-άνθρακα και του ηλεκτρονιόφιλου ακραίου αζώτου του συναρμοσμένου οργανικού αζιδίου.





*Εικόνα 18.* Απλοποιημένη αναπαράσταση των προτεινόμενων σταδίων σχηματισμού του C-N δεσμού στην CuAAC.

Η ταχύτητα της CuAAC αυξάνεται κατά  $10^7$  φορές σε σχέση με την θερμική αντίδραση, κάνοντας την ταχύτερη ακόμα σε θερμοκρασία δωματίου ή χαμηλότερη από αυτήν. Φαινομενικά η αντίδραση δεν επηρεάζεται από τις στερεοχημικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες των ομάδων που φέρουν τα αζίδια και τα αλκίνια, ακόμη πρωτοταγή, δευτεροταγή, τεταρτοταγή, ηλεκτρονικά πλούσια ή φτωχά, αλειφατικά, αρωματικά και ετεροατομικά αζίδια αντιδρούν ικανοποιητικά με πληθώρα υποκατεστημένα ακραία αλκίνια. Η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε πρωτικούς και απρωτικούς διαλύτες συμπεριλαμβανομένου και του νερού και οι διάφορες οργανικές και ανόργανες λειτουργικές ομάδες δεν επηρεάζονται με αποτέλεσμα να μην χρειάζεται η προστασία αυτών. Ο 1,2,3-τριαζολικός δακτύλιος παρουσιάζει μεγάλα πλεονεκτήματα όπως σταθερότητα (στην υδρόλυση, σε οξειδοαναγωγικές συνθήκες, υψηλή θερμοκρασία), υψηλή διπολική ροπή (4,8-5,6 Dedye), αρωματικό χαρακτήρα και δυνατότητα αποδοχής δεσμών υδρογόνου. Έτσι, μπορεί να αλληλεπιδράσει με διάφορα βιολογικά μόρια, οργανικές και ανόργανες επιφάνειες και υλικά. Για παράδειγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μη υδρολύσιμος αντικαταστάτης του αμιδικού δεσμού (A.C.Tome 2004).

Σήμερα, ο χαλκός χρησιμοποιείται ως το μοναδικό μέταλλο για αξιόπιστη, εύκολη και 1,4-regio ειδική κατάλυση της αντίδρασης κυκλοπροσθήκης αζιδίων-αλκινίων. Υπάρχουν και άλλα γνωστά μέταλλα που καταλύουν πληθώρα άλλων μετασχηματισμών αλκινίων, μέχρι τώρα όμως δεν έχουν βρεθεί αποτελεσματικοί καταλύτες για τον μετασχηματισμό αζιδίων και αλκινίων σε 1,4-τριαζολικά παράγωγα. Σε διάφορα εργαστήρια έχουν αποτιμηθεί τα στοιχεία της πρώτης περιόδου των μεταβατικών στοιχείων του Π.Π, καθώς και άλλα σύμπλοκα του

Ag(I), Pd(0/II), Pt(II), Au(I/II), Hg(II) άλλα δεν έδωσαν αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Η μοναδική ικανότητα του μονοσθενή χαλκού μπορεί να εξηγηθεί από τον συνδυασμό της ικανότητας του να συμπλέκεται και με σ- και π-αλληλεπιδράσεις και στην ταχύτερη ανταλλαγή ligands στην σφαίρα συναρμογής του ιδιαίτερα σε υδατικά συστήματα.

Το 2005 βρέθηκε ότι κάποια σύμπλοκα του Ru καταλύουν τον σχηματισμό 1,5-υποκατεστημένων τριαζολίων από αζίδια και ακραία αλκίνια (Zhang et al. 2005). Η καταλυτική αυτή δράση περιλαμβάνει και εσωτερικά αλκίνια. Αυτή η συμπληρωματική αντίδραση έχει ονομασθεί RuAAC, μηχανιστικά διαφέρει από την CuAAC, όμως η βασική ενεργοποίηση του αλκινίου φαίνεται να είναι παρόμοια: η πυρηνοφιλικότητα του π-συστήματος αυξάνεται από το μέταλλο. Η εμβέλεια και η συμβατότητα λειτουργικών ομάδων είναι εξαιρετική στην RuAAC, η αντίδραση όμως είναι πιο ευαίσθητη στους διαλύτες και στις στερεοχημικές απαιτήσεις των υποκαταστατών του αζιδίου απ' ό,τι στην CuAAC και δεν έχει βρεί προς το παρόν μεγάλη εφαρμογή (Boren et al. 2008).

Από την ανακάλυψη της CuAAC και μετά έχει χρησιμοποιηθεί μεγάλο πλήθος πειραματικών συνθηκών, τονίζοντας την ισχύ και την συμβατότητα της με πολλές λειτουργικές ομάδες, διαλύτες και πρόσθετα που δεν επηρεάζουν τον καταλύτη. Η επιλογή του καταλύτη εξαρτάται από τις συγκεκριμένες απαιτήσεις του πειράματος και συνήθως διάφοροι συνδυασμοί οδηγούν στο ίδιο επιθυμητό αποτέλεσμα.

Άλατα του μονοσθενή χαλκού με ιώδιο, χλώριο, βρώμιο, κ.α. και σύμπλοκα του όπως  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$  και  $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{OTf}$  έχουν χρησιμοποιηθεί. Η χρήση αλάτων του με ιώδιο δεν συνιστάται διότι το ανιόν ιωδίου γεφυρώνει ως ligand τα μεταλλικά κέντρα σχηματίζοντας πολυπυρηνικά σύμπλοκα και έχει ως αποτέλεσμα να παρεμβαίνει στον καταλυτικό κύκλο και να ανενεργοποιεί τον καταλύτη. Ακόμη, υπό ορισμένες συνθήκες η χρήση ιωδιούχου χαλκού μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό 1-ιωδοαλκινίων και κατ' επέκταση 5-ιωδοτριαζολίων. Υψηλή συγκέντρωση ιόντων χλωρίου ( $\leq 0.5 \text{ M}$ ) στο νερό μπορεί να είναι επιβλαβής, όμως η αναστολή που προκαλεί το ιόν χλωρίου είναι λιγότερο αποφασιστική από αυτή που προκαλεί το ιόν ιωδίου. Έτσι, για αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε υδατικά συστήματα ευνοείται η χρήση βρωμιούχου χαλκού και οξικού χαλκού καθώς και θειικού χαλκού με *in situ* αναγωγή, ενώ για οργανικά συστήματα ο οξικός χαλκός αποτελεί μια καλή επιλογή.

Οι πιο κοινές οξειδωτικές καταστάσεις του χαλκού είναι η 0, +1 και +2, η +1 είναι η θερμοδυναμικά λιγότερο σταθερή. Το ιόν του μονοσθενούς χαλκού μπορεί να οξειδωθεί στο ανενεργό ή σε μίγμα Cu(0) και Cu(II). Το πρότυπο

δυναμικό για το ζεύγος  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  είναι 159 mV και εξαρτάται από τον διαλύτη και από τα ligand του μετάλλου. Όταν χρησιμοποιούνται αλογονίδια του Cu(I) σε οργανικούς διαλύτες θα πρέπει η αντίδραση να γίνεται με αποκλεισμό οξυγόνου για να αποφευχθεί η οξειδωση του Cu(I) στον ανενεργό Cu(II).

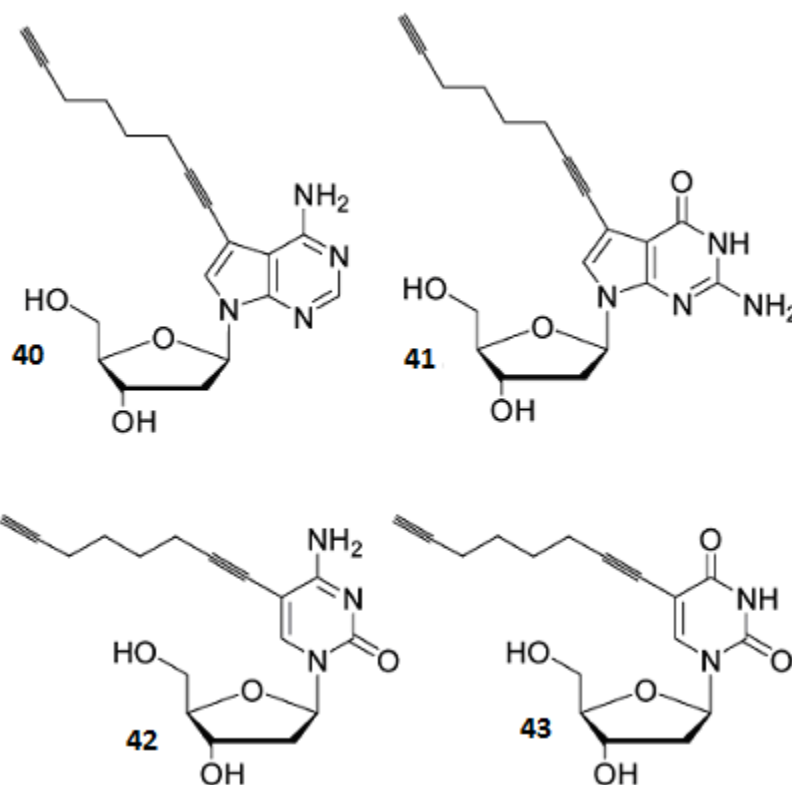
Το ασκορβικό είναι ένα μέτριο αναγωγικό μέσο που προτάθηκε από τον Fokin και τους συνεργάτες του ως μια βολική και πρακτική εναλλακτική επιλογή για συνθήκες απουσίας ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Ο συνδυασμός του με άλατα του δισθενή χαλκού όπως πενταένυδρου θειικού χαλκού έγινε αποδεκτός ως μέθοδος παρασκευής 1,2,3-τριαζολίων. Το νερό φαίνεται να είναι ιδανικός διαλύτης για την σταθεροποίηση του ακετυλενικού μονοσθενή χαλκού ιδιαίτερα όταν σχηματίζεται *in situ*. Με την μέθοδο αυτή μπορούν να σχηματισθούν τριαζολικά παράγωγα σχεδόν ποσοτικά και με μεγαλύτερη από 90% καθαρότητα χωρίς να απαιτούνται ligands, πρόσθετα ή συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Φυσικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλατα του μονοσθενή σε συνδυασμό με ασκορβικό, έτσι ώστε οι οξειδωμένες μορφές του δισθενή χαλκού να μετασχηματισθούν στις καταλυτικά ενεργές (+1 οξειδωτική κατάσταση).

Η αντίδραση μπορεί να καταλυθεί από μορφές μονοσθενή χαλκού που προέρχεται από στοιχειακό χαλκό, κάτι που απλοποιεί περισσότερο την πειραματική διαδικασία – ένα μικρό κομμάτι χαλκού (σύρμα) προστίθεται στο μίγμα της αντίδρασης και ακολουθεί ανάδευση για 12-48 h (Appukkuttan et al. 2004, Himo et al. 2005). Υδατικές αλκοόλες (μεθανόλη, αθανόλη, *tert*-βουτανόλη), τετραυδροφουράνιο (THF) και DMF χρησιμοποιούνται ως διαλύτες. Μπορεί να προστεθεί θειικός χαλκός για να επιταχύνει την αντίδραση όμως δεν είναι απαραίτητο αφού τα οξείδια του χαλκού από την σκουριά της μεταλλικής επιφάνειας είναι αρκετά ώστε να εκκινήσουν τον καταλυτικό κύκλο. Οι αντιδράσεις που βασίζονται στην χρήση μεταλλικού χαλκού χρειάζονται μεγαλύτερους χρόνους αντίδρασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και παρέχουν προϊόντα υψηλής καθαρότητας με πολύ χαμηλά επίπεδα επιμόλυνσης με χαλκό. Ακόμη, η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί με μικροκύματα σε υψηλή θερμοκρασία μειώνοντας τον χρόνο σε 10-30 min. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ απλή και πρακτικά βολική για την γρήγορη δημιουργία βιβλιοθηκών ενώσεων για βιολογική μελέτη. Τα προϊόντα απομονώνονται σε αποδόσεις >85-90% και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για βιολογική μελέτη χωρίς καμία κατεργασία αφού η επιμόλυνση με χαλκό είναι ελάχιστη.

## 1.8. Εφαρμογές της CuAAC

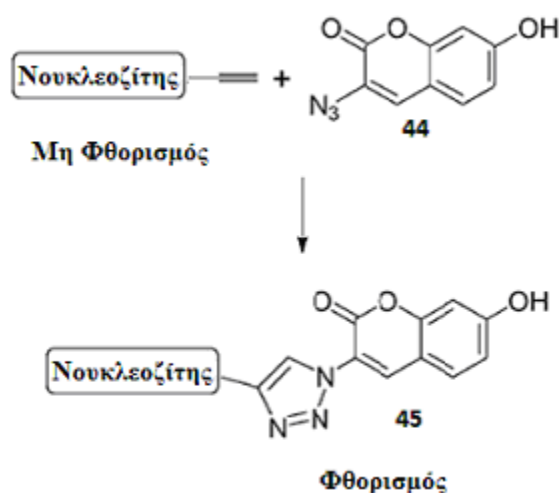
### A) Click Χημεία με το DNA.

Από την ομάδα του Seela έχει πραγματοποιηθεί σημαντική έρευνα στο πεδίο χαρακτηρισμού ολιγονουκλεοτιδίων (Seela et al. 2006, F.Seela et al. 2007). Μελέτησαν 7-διαζαπουρίνες και πυριμιδίνες, τις οποίες μετέτρεψαν αρχικά στα αντίστοιχα φωσφοραμίδια και έπειτα τις χρησιμοποίησαν στην σύνθεση των αντίστοιχων ολιγονουκλεοτιδίων σε στερεή φάση. Ο πρόδρομος οκτυλο-1,7-διυλο-νουκλεοζίτης παρασκευάστηκε από το αντίστοιχο ιωδο-παράγωγο μέσω αντίδρασης σύζευξης καταλυόμενης από παλλάδιο (Sonogashira cross-coupling). Από πειράματα τήξης βρέθηκε ότι ο αντίστοιχος διαλκίνυλο νουκλεοζίτης έχει θετική επίδραση στην σταθερότητα του DNA σε σχέση με νουκλεοζίτες που φέρουν απλά αλκίνια.



*Εικόνα 19. Αλκίνυλο νουκλεοζίτες για επισήμανση ολιγονουκλεοτιδίων*

Τα παραπάνω παράγωγα νουκλεοτιδίων με ακραίο αλκίνιο συνενώνονται εκλεκτικά με μη φθορίζουσα 3-αζιδο-7-υδρόξυ-κουμαρίνη μέσω CuAAC αντίδρασης σχηματίζοντας φθορίζοντα 1,2,3-τριαζολοπαράγωγα (**Εικόνα 20**) (Seela et al. 2008).



*Εικόνα 20. Σύνθεση φθορισμοφόρων νουκλεοζιτών με Click Χημεία*

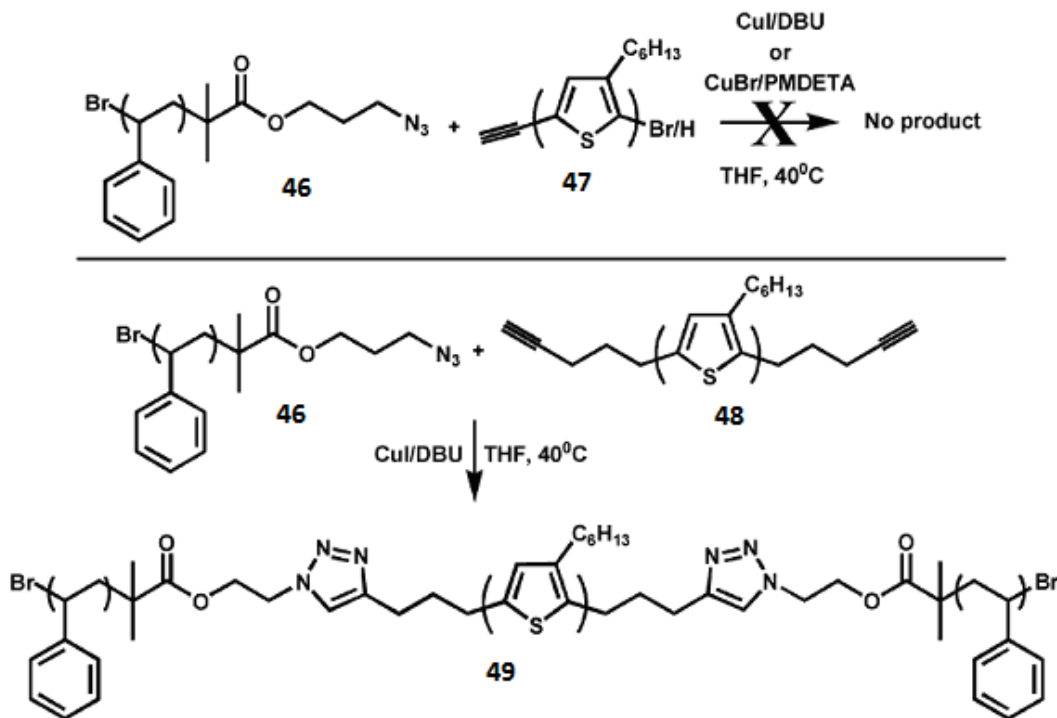
Η ένταση φθορισμού αυτών των νουκλεοζιτών που φέρουν κουμαρίνη και αζωτούχα βάση παρουσιάζει την αναμενόμενη εξάρτηση από το pH. Έτσι, η δημιουργία φθορισμού μέσω Click αντίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην οπτικοποίηση του DNA σε διάλυμα ή του DNA που είναι ενσωματωμένο σε πρωτεΐνες, καθώς επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό και οπτικοποίηση βιομορίων *in vivo*.

## **B) Click Χημεία και πολυμερισμός.**

Η Click Χημεία περιλαμβάνει μεγάλη ποικιλία αντιδράσεων, οι οποίες έχει αποδειχθεί δυναμικές και πολλαπλών χρήσεων στην «εργαλειοθήκη» των χημικών. Η ευρεία χρησιμότητα των αντιδράσεων αυτών πηγάζει από την έμφυτη απλότητα και αποδοτικότητα τους. Στην βιβλιογραφία της Click Χημείας κυρίαρχη θέση διαθέτει η αντίδραση κυκλοπροσθήκης αζιδίων-αλκινίων που καταλύονται από χαλκό (I). Αυτές οι απλές και ευπροσάρμοστες αντιδράσεις μπορούν να διευκολύνουν την σύνθεση και τροποποίηση πολυμερικών υλικών. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών υλικών που έχουν παρασκευασθεί με διάφορες click αντιδράσεις όπως ακραία και «κρεμαστά» λειτουργικά πολυμερή, (multi) συγκροτήματα συμπολυμερών, μικύλλια, δενδρομερή πολυμερή, πολυμερή που χρησιμοποιούνται σε νανο-υλικά. Πολλά πολυμερή που χρησιμοποιούνται για περαιτέρω τροποποιήσεις παρασκευάζονται με τεχνικές ελεγχόμενου πολυμερισμού.

Η παρασκευή συνενωμένων συμπλεγμάτων συμπολυμερών των PS και πολυ-(3-εξυλοθειοφαινίου) (P3HT) παρουσιάστηκε πρόσφατα με συνδυασμό ATRP (atom transfer radical polymerization) και Click Χημείας (Urien et al. 2008). Χρησιμοποιήθηκε αζιδο-εκκινητής για τον πολυμερισμό του στυρενίου και

τροποποιημένο Grignard αντιδραστήριο χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του διαλκινινο-P3HT. Ο α-αζιδο-PS συνενώθηκε υπό Click συνθήκες με το homotelechelic P3HT σχηματίζοντας ABA τριπλό συγκρότημα συμπολυμερών (**Εικόνα 21**). Βρέθηκε ότι απαιτείται άλκυλο-spacer μεταξύ της κύριας αλυσίδας του P3HT και του ακραίου αλκινίου για να πραγματοποιηθεί αντίδραση κυκλοπροσθήκης με καταλύτη μονοσθενή χαλκό.



*Εικόνα 21. Σύνθεση συμπολυμερών πολυστυρενίου και πολυ(3-εξυλοθειοφαινίου) με Click Χημεία*

## 1.9. RNaseA

Η ριβονουκλεάση A (RiboNucleaseA, RNaseA) είναι ίσως η πιο καλά χαρακτηρισμένη από όλες τις γνωστές πρωτεΐνες των θηλαστικών. Καταλύει την διάσπαση μονόκλωνων mRNA, σπάζοντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ ριβονουκλεοτιδίων, που είναι συνδεδεμένα κυρίως με πυριμιδίνες. Η δράση της αυτή σχετίζεται με μια πληθώρα κακοηθειών και μολυσματικών ασθενειών. Γι' αυτό τον λόγο, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον διαφόρων βιοιατρικών μελετών. Οι έρευνες επικεντρώνονται κυρίως στον σχεδιασμό μορίων-αναστολέων της ριβονουκλεοτιδικής δράσης της RNaseA, καθώς αυτοί θα μπορούσαν να αποτελέσουν φαρμακευτικούς στόχους.

Οι RNάσες πέρα από την αποικοδόμηση του μη ωφέλιμου RNA των κυττάρων διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο και στην ωρίμανση των μορίων RNA. Ταυτόχρονα, η αποικοδόμηση του RNA από τις RNάσες αποτελεί μηχανισμό άμυνας του οργανισμού ενάντια σε RNA ιούς. Σχετικά με την δομή της, η ριβονουκλεάση A αποτελείται από τρεις α-έλικες και επτά β-κλώνους, οι οποίοι σχηματίζουν ένα β-πτυχωτό φύλλο, ενώ διαθέτει και τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς που συμβάλλουν στην σταθερότητά της. Το καταλυτικό κέντρο εδράζεται στο κέντρο του μορίου και διαμορφώνεται από τα αμινοξέα His12, His119 και Lys41.

Στον γενικό όρο RISBASES (Ribonucleases with Special Biological Actions) περιλαμβάνονται ριβονουκλεάσες με διάφορες βιολογικές λειτουργίες πέρα από την συνήθη καταλυτική τους δράση ως ένζυμα (D' Alessio, Di Donato et al.1991). Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια προσπάθεια αξιοποίησης των ριβονουκλεασών στην θεραπεία του καρκίνου. Έχει παρατηρηθεί ότι πολλές από αυτές έχουν αντικαρκινική δράση ενώ άλλες προάγουν τη δημιουργία όγκων. Για παράδειγμα η βοεία σπερματική ριβονουκλεάση (BS-RNase) μία ομοδιμερής ριβονουκλεάση της οικογένειας της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A (RNase A), είναι ένας σημαντικός αντικαρκινικός παράγοντας μιας και εμφανίζει εκλεκτική κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo*.

Η γειτνίαση των κυττάρων με τα τριχοειδή είναι απαραίτητη για την κάλυψη των μεταβολικών τους αναγκών σε οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες. Κατά την οργανογένεση, η γειτνίαση αυτή εξασφαλίζεται με την ανάπτυξη νέων αγγείων (αγγειογένεση). Ο αναπτυσσόμενος κακοήθης όγκος έχει κι αυτός παρόμοιες ανάγκες και εκδηλώνει το αγγειογενετικό του δυναμικό για να τραφεί. Συχνά, η επιβράδυνση ανάπτυξης όγκων στηρίζεται στην ανασταλτική δράση έναντι της αγγειογενίνης. Η αγγειογενίνη προωθεί την αγγειογένεση, ενώ παράλληλα διευκολύνεται και η κυκλοφορία των καρκινικών κυττάρων μέσω του αίματος με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταστάσεων (Fett, Bethune et al.1987). Όμως, η βιολογική δράση της αγγειογενίνης εξαρτάται απόλυτα από την ενζυμική της δραστηριότητα. Επομένως, αναστολείς (π.χ. RNase) ή μεταλλάξεις που παρεμποδίζουν την ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα ταυτόχρονα εμποδίζουν και την αγγειογενετική της δράση επιβραδύνοντας την ανάπτυξη των όγκων (Kao, Jenkins et al.2002).

Αντιλαμβανόμαστε ότι οι ριβονουκλεάσες μπορούν να αποτελέσουν ένα σημαντικό όπλο ενάντια στον καρκίνο. Το σκεπτικό για την χρήση των ριβονουκλεασών χωρίζεται σε δύο φάσεις. Η ιδιότητα τους ως κυτταροτοξικοί παράγοντες των καρκινικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία μιας

νέας κατηγορίας «φυσικών» φαρμάκων ενάντια διαφόρων τύπου καρκίνων, χωρίς τις παρενέργειες της τυποποιημένης χημειοθεραπείας (Leland, Schultz et al. 1998). Ταυτόχρονα, θα πρέπει να αναπτυχθεί κάποιος ισχυρός αναστολέας που να αναστέλλει την αγγειογενίνη, ώστε να εμποδιστεί η ανάπτυξη του όγκου. Παράλληλα θα γίνει χορήγηση των ριβονουκλεασών με αντικαρκινική δράση, οι οποίες δεν δεσμεύονται από τον πρωτεϊνικό αναστολέα RI, οδηγώντας στην καταστολή του όγκου.

Προκειμένου να δημιουργήσουμε αναστολείς της αγγειογενίνης χρησιμοποιούμε ως "μοντέλο" την ριβονουκλεάση A καθώς εμφανίζει μεγάλη αμινοξική και δομική ομολογία με την αγγειογενίνη ιδιαίτερα στο καταλυτικό κέντρο που φτάνει το 100%. Επομένως, χρησιμοποιώντας ως μοριακά μοντέλα εκκίνησης αναστολείς της RNase A, με τον κατάλληλο σχεδιασμό είναι δυνατό να ανακαλυφθούν νέοι ισχυροί και εξειδικευμένοι αναστολείς της αγγειογενίνης. Τέτοιοι αναστολείς μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων (Leonidas, Chavali et al.2003).



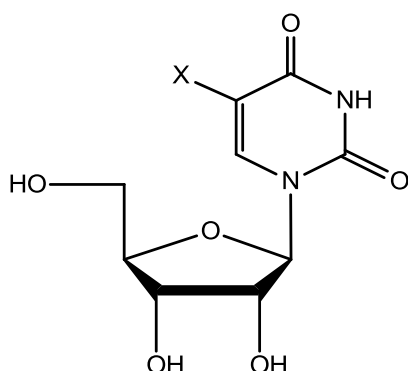


## II. ΣΚΟΠΟΣ

Οι νουκλεοζίτες μαζί με τα ανάλογά τους αποτελούν το θεμέλιο λίθο για την ανάπτυξη ενώσεων με αυξημένη βιολογική δράση, μειωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες σε σχέση με τις μέχρι πρότινος χρησιμοποιούμενες ενώσεις. Αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση τροποποιημένων νουκλεοζιτών με σκοπό την εύρεση νέων αντικαρκινικών παραγόντων.

Πρόσφατα έχει διαπιστωθεί από την ομάδα μας ότι οι ριβοφουρανονουκλεοζίτες της ουρακίλης και της θυμίνης αποτελούν μια αξιόλογη σειρά ενώσεων με σημαντική δραστηριότητα έναντι της RNase A (**Πίνακας 2**). Αυτό, καθιστά τη σύνθεση και βιολογική τους μελέτη ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες αφού οι φαρμακολογικές τους ιδιότητες μπορούν να αποτελέσουν την βάση για ανάπτυξη αντικαρκινικών παραγόντων.

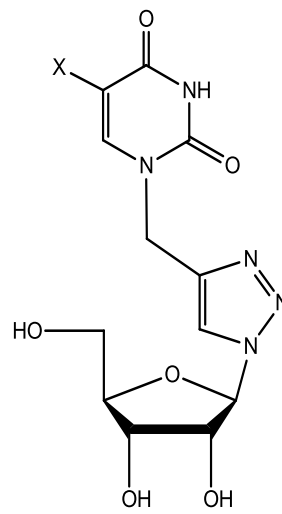
Πίνακας 2:



<b>X</b>	<b>K<sub>i</sub> (μM)</b>
CH <sub>3</sub>	44.1 ± 6.4
H	28.5 ± 4.5

Με βάση τα ανωτέρω, θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η εισαγωγή ενός τριαζολικού δακτυλίου μεταξύ σακχάρου και ετεροκυκλικής βάσης, με στόχο να διερευνηθεί το κατάλληλο μήκος που απαιτείται να έχει ο αναστολέας έτσι ώστε να αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Η δομή των μορίων που στόχευσε η συνθετική μας πορεία φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



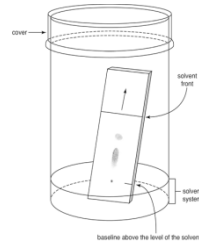
\*X=CH<sub>3</sub>, H



### III. ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### III.1. Χρωματογραφία χάρτου/λεπτής στιβάδας (TLC :Thin layer chromatography)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας επιτρέπει το διαχωρισμό μικρών μορίων ενός μίγματος ουσιών, τα οποία αναλύονται καθώς κινούνται με διαφορετική ταχύτητα μέσα στη λεπτή στιβάδα που δημιουργούν οι κόκκοι ενός προσροφητικού μέσου, το οποίο διαβρέχεται από έναν κινούμενο διαλύτη. Η διαφορά στην ταχύτητα που παρουσιάζουν τα μόρια οφείλεται στη διαφορετική κατανομή τους μεταξύ της στατικής και της κινούμενης φάσης λόγω των διαφορών τους στο μέγεθος και στην πολικότητα τους. Ο λόγος της απόστασης που διανύει κάθε συστατικό προς την απόσταση που διανύει ο διαλύτης συμβολίζεται  $R_f$  και αποτελεί σταθερή παράμετρο κάθε ουσίας που χρωματογραφείται σε σταθερές συνθήκες.



Εικόνα 22.  
Μέθοδος TLC.

Το προσροφητικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, κατά τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος, ήταν πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με Silica gel (Merck Kieselgel 60F24). Τα προϊόντα στα χρωματογραφήματα ανιχνεύονται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα  $H_2SO_4$  (θειικού οξέος) 30%, είτε μέσω UV ακτινοβολίας (254nm). Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής :

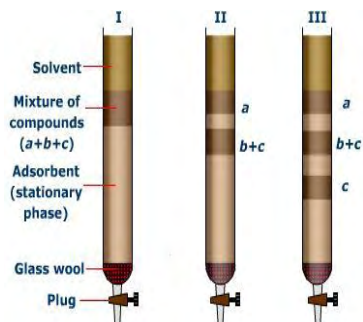
- Σύστημα Α: εξάνιο (Hex)/ οξικός αιθυλεστέρας (AcOEt) 7/3
- Σύστημα Β: εξάνιο (Hex)/ οξικός αιθυλεστέρας (AcOEt) 5/5
- Σύστημα Γ: οξικός αιθυλεστέρας (AcOEt)
- Σύστημα Δ: οξικός αιθυλεστέρας (AcOEt) / μεθανόλη (MeOH) 8.5/1.5

#### III.2. Χρωματογραφία στήλης

Γενικά η χρωματογραφία στήλης είναι μια τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην προσρόφηση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μια ακίνητη φάση, συνήθως silica gel και την έκλουση τους με μια κινητή φάση, που είναι ένας διαλύτης ή μείγμα διαλυτών. Σκοπός της τεχνικής είναι ο καθαρισμός της υπό μελέτη χημικής ένωσης από παραπροϊόντα της αντίδρασης.

Για την έκλουση των ουσιών από το silica gel χρειάζεται να γίνει έκλουση της στήλης με διάφορους διαλύτες αρχίζοντας με τους λιγότερο πολικούς και καταλήγοντας στους περισσότερο πολικούς: *Εξάνιο* < *κυκλοεξάνιο* < *βενζόλιο* <

τολουόλιο < διαιθυλαιθέρας < χλωροφόρμιο < οξικός αιθυλεστέρας < διχλωρομεθάνιο < βουτανόλη-1 < ακετόνη < αιθανόλη < μεθανόλη <



**Εικόνα 23.**

*Χρωματογραφία στήλης.*

Η συμπεριφορά μιας ουσίας πάνω στη στήλη μπορεί να διαπιστωθεί με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).

Η διαδικασία επιτυγχάνεται με την εισαγωγή αέρα υπο πίεση (flash chromatography) σε silica gel (240-400, Merck grade) και οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω:

- Σύστημα Α: εξάνιο (Hex)/ οξικός αιθυλεστέρας (AcOEt) 7/3
- Σύστημα Β: εξάνιο (Hex)/ οξικός αιθυλεστέρας (AcOEt) 5/5
- Σύστημα Γ: οξικός αιθυλεστέρας (AcOEt)
- Σύστημα Δ: οξικός αιθυλεστέρας (AcOEt) / μεθανόλη (MeOH) 8.5/1.5

### III.3. Ξήρανση διαλυτών

Ορισμένες από τις αντιδράσεις που περιελάμβαναν άνυδρους διαλύτες όπως τα  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , THF και *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), έλαβαν χώρα κάτω από αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα  $4\text{\AA}$ , όπου και αποθηκεύτηκε. Το THF απεστάχθη από νάτριο/βενζοφαινόνη αμέσως πριν από τη χρήση, ενώ το DMF απεστάχθη από υδρίδιο του ασβεστίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα  $3\text{\AA}$ , όπου και αποθηκεύτηκε.

### III.4. Ταυτοποίηση ενώσεων

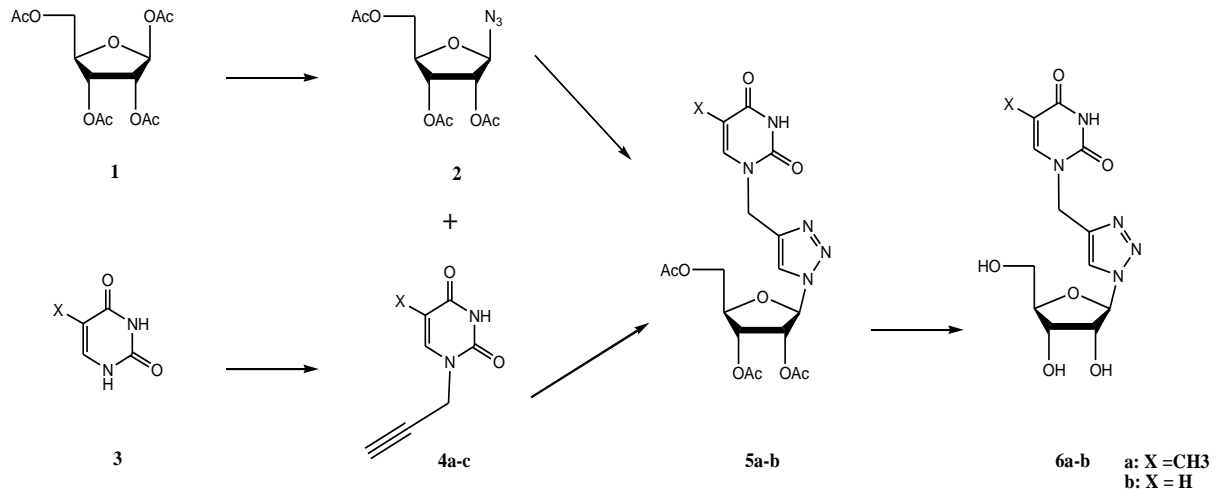
Η ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν έγινε με τη χρήση του φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  καταγράφηκαν στα 300MHz στο φωτόμετρο

Bruker AVAMCE<sup>III</sup> 300 και τα φάσματα <sup>13</sup>C-NMR καταγράφηκαν στα 75.5MHz στο ίδιο φωτόμετρο, χρησιμοποιώντας chloroform-d (CDCl<sub>3</sub>), methanol-d<sub>4</sub> (CD<sub>3</sub>OD). Το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για <sup>1</sup>H.



## IV. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

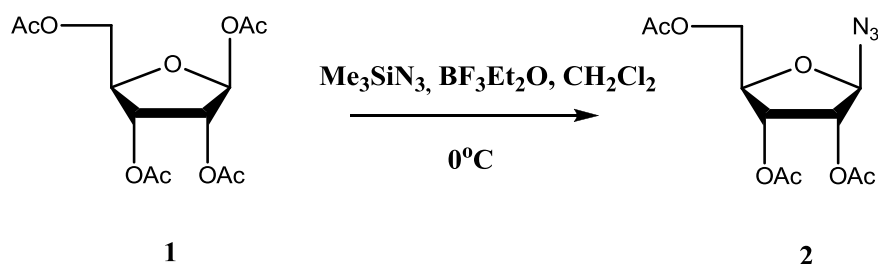
### IV.1. Επισκόπηση συνθετικής οδού



### IV.2. Μεθοδολογία σύνθεσης

Η μεθοδολογία είχε ως στόχο τη σύνθεση των τριαζολο ριβοφουρανονουκλεοζιτών της ουρακίλης και της θυμίνης **6a-b**. Η αντίδραση Κυκλοπροσθήκης Αζιδίων-Αλκινίων Καταλυόμενη από Χαλκό (CuAAC) χρησιμοποιήθηκε για τη σύζευξη του προστατευμένου αζιδίου **2** με την ουρακίλη και τη θυμίνη [Stimac CR 1992, 359] παρουσία καταλυτικών ποσοτήτων CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O και ασκορβικού νατρίου. Η αντίδραση Κυκλοπροσθήκης πραγματοποιήθηκε με πλήρη εκλεκτικότητα καταλήγοντας στη δημιουργία των αντίστοιχων προστατευμένων αναλόγων **5a-b**. Τελικά, η αποπροστασία των νουκλεοζιτών **5a-b** πραγματοποιήθηκε με διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας ως τα αντίστοιχα αποπροστατευμένα ανάλογα **6a-b** σε πολύ καλές αποδόσεις (78-82%).

#### 2.1. Σύνθεση της 1-άζιδο-(2,3,5-τρι-O-ακέτυλο)-β-D-ριβοφουρανόζης (**2**)

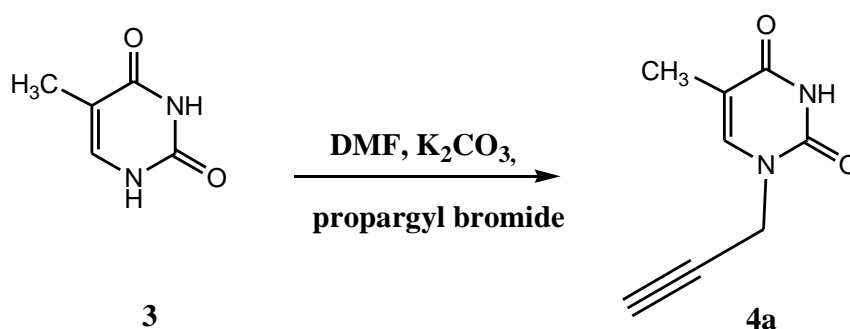


Σε 3.14 mmol τετρα-Ο-ακέτυλο-ριβόζης προστέθηκαν 18.8 ml dry διχλωρομεθάνιο ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), 2.1 ml Trimethyl silyl azide και 394  $\mu\text{l}$  Boron Trifluoride Diethyl Etherate ( $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ ) ως καταλύτης στους  $0^\circ\text{C}$ . Η αντίδραση αφέθηκε υπό ήπια ανάδευση όλη νύχτα στην ίδια θερμοκρασία. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) ακολούθησε απομάκρυνση των διαλυτών υπό κενό. Το υπόλειμμα της συμπύκνωσης, καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας το σύστημα Α. Το τελικό προϊόν **2** ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρού με απόδοση 71%.

Πίνακας 3:

TLC (Σύστημα Α)	$R_f = 0.35$
Απόδοση	71%
$\alpha_D$	+4 ( $c = 0.20$ )

## 2.2. Σύνθεση της προπαργυλο θυμίνης (**4a**)

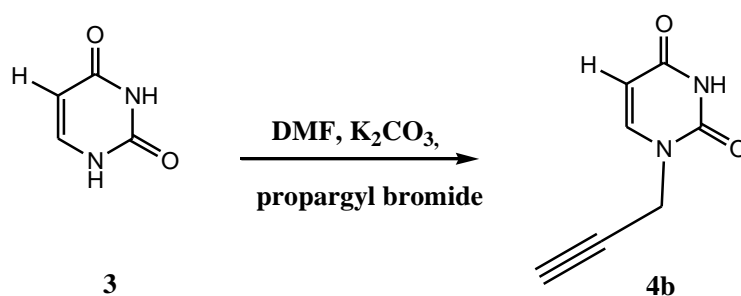


Σε 5.24 mmol θυμίνης προστέθηκαν 724 mg ανθρακικό κάλιο, 65.5 ml άνυδρο *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και 1.87 g βρωμιούχο προπαργίλιο (propargyl bromide). Το διάλυμα αφέθηκε υπό ήπια ανάδευση για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) ακολούθησε απομάκρυνση των διαλυτών υπό κενό. Το υπόλειμμα της συμπύκνωσης, καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας το σύστημα Β. Το τελικό προϊόν **4a** ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρού και απόδοση 68%.

Πίνακας 4:

TLC (Σύστημα Β)	$R_f = 0.26$
Απόδοση	68%
$\lambda_{\text{max}}$	270 nm

### 2.3. Σύνθεση της προπαργυλο ουρακίλης (**4b**)

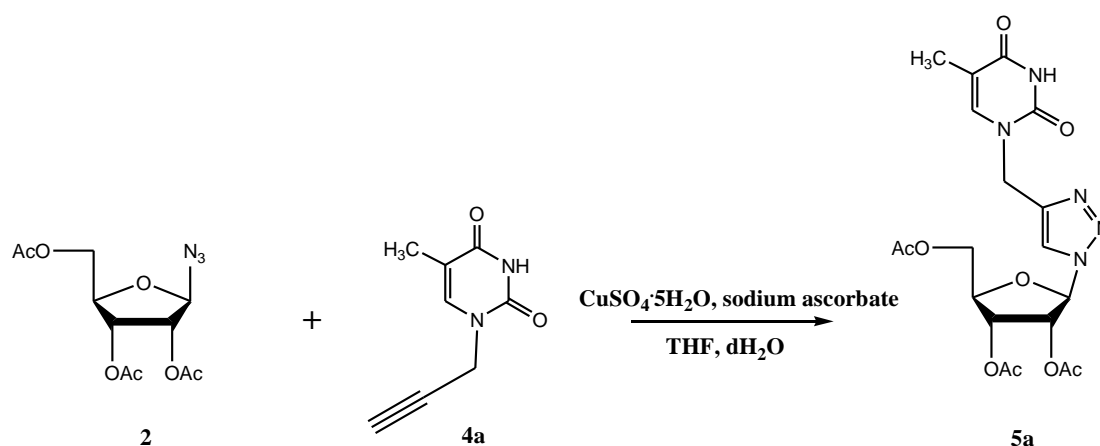


Το ανάλογο **4b** συντέθηκε από το ανάλογο **3** με την ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του αναλόγου **4a**. Το διάλυμα αφέθηκε υπό ήπια ανάδευση για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) ακολούθησε απομάκρυνση των διαλυτών υπό κενό. Το υπόλειμμα της συμπύκνωσης, καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας το σύστημα Β. Το τελικό προϊόν **4b** ελήφθη υπό τη μορφή λευκού αφρού και απόδοση 62%.

#### Πίνακας 5:

TLC (Σύστημα Β)	R <sub>f</sub> = 0.22
Απόδοση	62%
λ <sub>max</sub>	267 nm

### 2.4. Σύνθεση της 1-[(2',3',5'-τρι-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο] θυμίνης (**5a**)



Σ'ένα μίγμα του αλκινίου **4a** (3 mmol) και του αζιδίου **2** (753 mg, 2.5 mmol) σε διαλύτη THF (16.4 mL) προστέθηκε διάλυμα ασκορβικού νατρίου (273,4 mg, 1,38

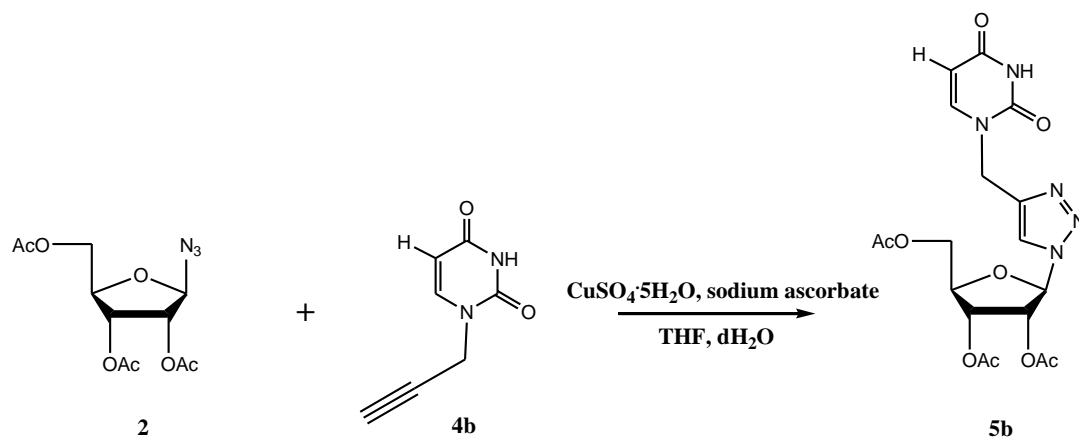


mmol) και  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (82,3 mg, 0,33 mmol) σε  $\text{H}_2\text{O}$  (16.4 mL). Το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για δυο ώρες και στη συνέχεια ψύχθηκε. Μετά το πέρας της αντίδρασης (TLC) προστέθηκε μεθανόλη. Ακολούθησε απομάκρυνση των διαλυτών υπό κενό. Το υπόλειμμα της συμπύκνωσης, καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας το σύστημα Β. Το τελικό προϊόν **5a** ελήφθη υπό τη μορφή λευκού στερεού.

Πίνακας 6:

TLC (Σύστημα Γ)	$R_f = 0.3$
Απόδοση	70%
$\alpha_D$	-4
$\lambda_{\max}$	271 nm

## 2.5. Σύνθεση της 1-[(2',3',5'-τρι-Ο-ακετυλο-β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο] ουρακίλης (**5b**)

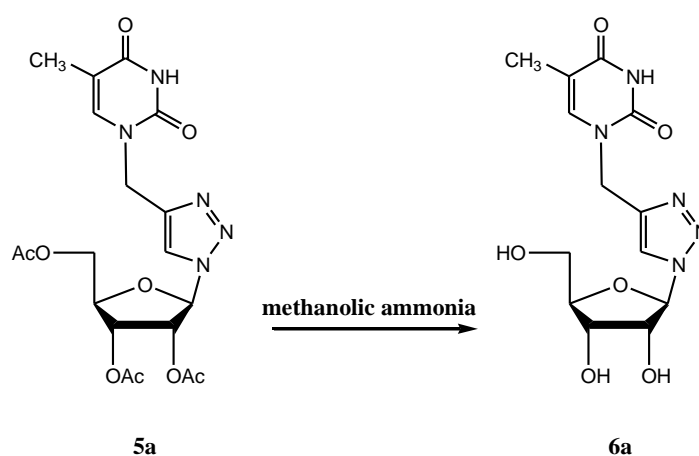


Το προστατευμένο ανάλογο **5b** συντέθηκε από το αζίδιο **2** και το αλκίνιο **4b** με την ίδια ακριβώς πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για τη σύνθεση του αναλόγου **5a**. Ακολούθησε καθαρισμός του αναλόγου **5b** σε χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το σύστημα Β. Το επιθυμητό προϊόν **5b** λήφθηκε με τη μορφή λευκού στερεού. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε στο 75%.

Πίνακας 7:

TLC (Σύστημα Γ)	Rf = 0.28
Απόδοση	75%
$\alpha_D$	+2
$\lambda_{\max}$	265 nm

## 2.6. Σύνθεση της 1-[(β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο]θυμίνης (6a)

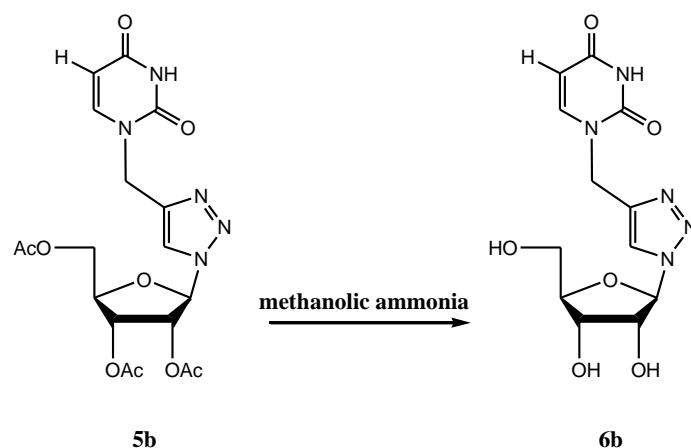


Έγινε κορεσμός διαλύματος MeOH 83,5 mL με αέρια αμμωνία σε πάγο (0 °C) και στη συνέχεια προστέθηκε η ένωση **5a** (2 mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε ολόκληρη τη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώθηκε υπό μειωμένη πίεση. Ακολούθησε έλεγχος της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) χρησιμοποιώντας ως διαλύτες το σύστημα Γ. Έπειτα, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό μειωμένη πίεση με αποτέλεσμα τη λήψη του καθαρού προϊόντος **6a** σε ποσοστό 78% με τη μορφή λευκού αφρού.

### Πίνακας 8:

TLC (Σύστημα Δ)	Rf = 0.29
Απόδοση	78%
$\alpha_D$	-8
$\lambda_{\max}$	270 nm

## 2.7. Σύνθεση της 1-[(β-D-ριβοφουρανοζυλο)-1,2,3-τριαζολ-4-υλο] ουρακίλης (6b)



Το αποπροστατευμένο ανάλογο **6b** συντέθηκε από το **5b** με την ίδια πειραματική διαδικασία που περιγράφεται για το **6a**. Στη συνέχεια ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό μειωμένη πίεση με αποτέλεσμα τη λήψη του καθαρού προϊόντος **6b** σε ποσοστό 82% με τη μορφή λευκού αφρού.

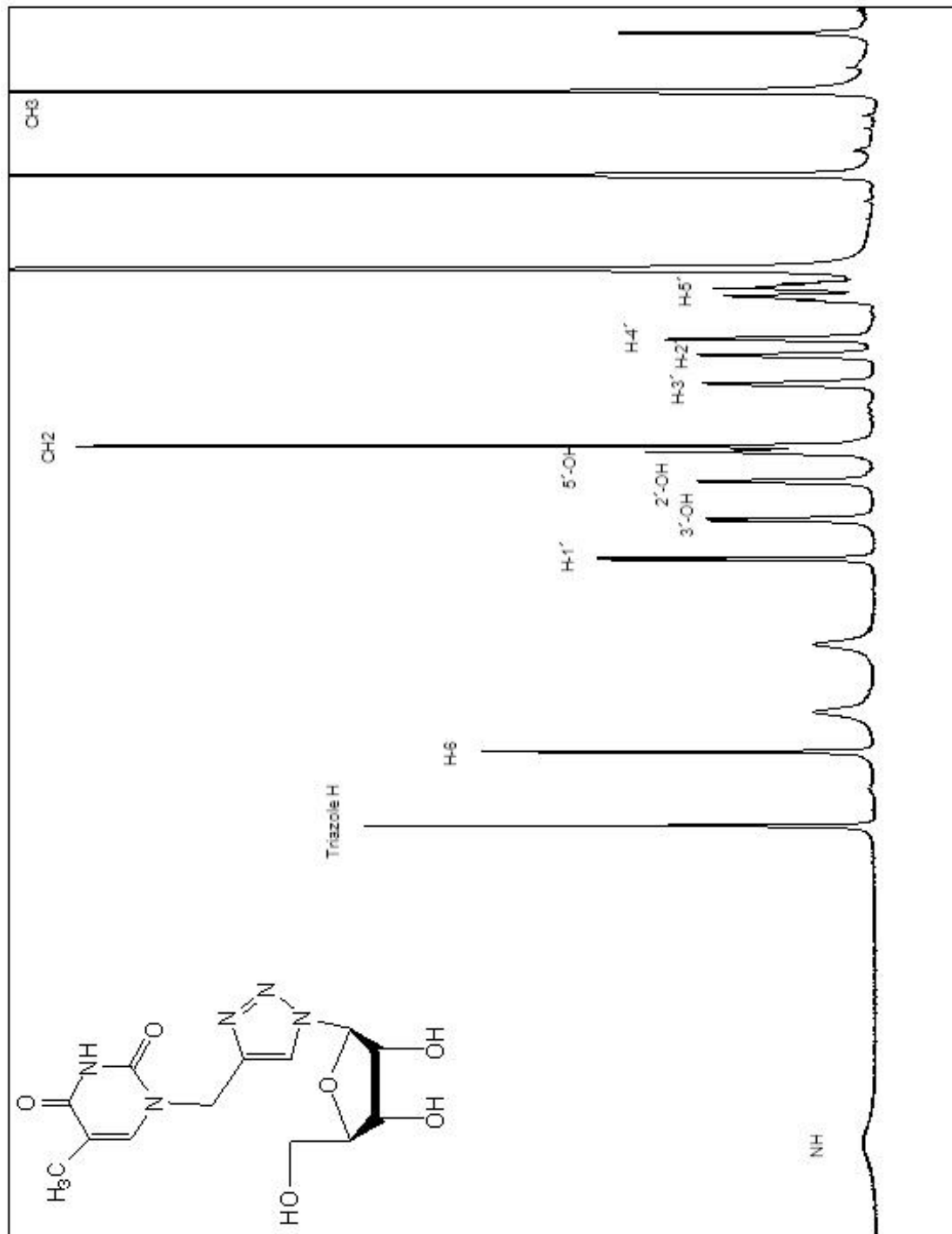
Πίνακας 9:

TLC (Σύστημα Δ)	R <sub>f</sub> = 0.25
Απόδοση	82%
α <sub>D</sub>	-4
λ <sub>max</sub>	264 nm

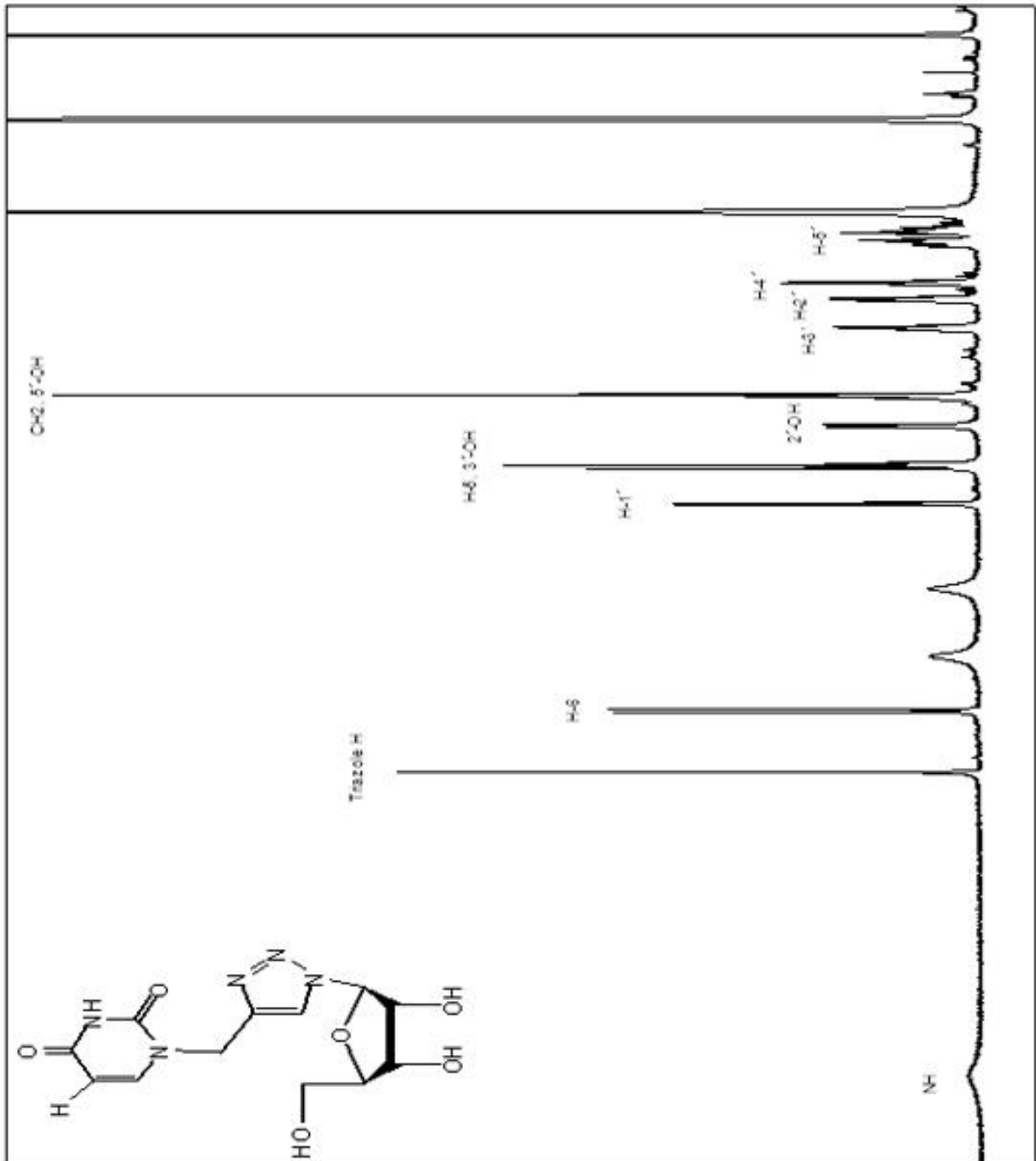


## V. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ $^1\text{H}$ NMR

Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα φάσματα πρωτονίου των τελικών προϊόντων **6a,b**, αντίστοιχα με τη χαρακτηριστική κορυφή του τριαζολικού δακτυλίου μεταξύ 8.28-8.30 ppm.



*Εικόνα 24.* Φάσμα πρωτονίου του τριαζολο ριβοφουρανουκλεοζιτών της θυμίνης.



Εικόνα 25. Φάσμα πρωτονίου του τριαζολο ριβοφουρανουκλεοζιτών της ουρακίλης.



## VI. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία επετεύχθη η σύνθεση νέων τριαζολο ριβοφουρανουκλεοζιτών της θυμίνης και της ουρακίλης με υψηλές αποδόσεις (78%-82%) κι εκλεκτικότητα με χρήση της Αντίδρασης Κυκλοπροσθήκης Αζιδίων-Αλκινίων (Click Chemistry). Οι νουκλεοζίτες μετά τη σύνθεσή τους μελετήθηκαν για την αναστολή τους έναντι του ενζύμου Ριβονουκλεάση Α. Οι τιμές  $K_i$  φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

*Πίνακας 10:*

Ανάλογο	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>6a</b>	$25.8 \pm 2.4$
<b>6b</b>	$1.6 \pm 0.2$

Το ενεργό κέντρο των RNAσών εμφανίζεται εξαιρετικά συντηρημένο όσον αφορά την αλληλουχία και τη δομική αρχιτεκτονική. Ωστόσο, συγκεκριμένες διαφορές στις περιφερικές θέσεις πρόσδεσης του RNA οδηγούν σε διαφοροποιήσεις στην ειδικότητά τους έναντι διαφορετικών υποστρωμάτων και μπορεί να παράσχουν στοιχεία για το σχεδιασμό αναστολέων μορίων για RNAση. Οι αναστολείς που σχεδιάστηκαν να φέρουν τον τριαζολικό δακτύλιο μεταξύ του σακχάρου και της βάσης πιθανότατα να παρέχουν το απαιτούμενο μήκος στον αναστολέα ώστε να αυξάνεται ο αριθμός των αλληλεπιδράσεων με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Περαιτέρω μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη.

## VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. McMurry J. *Οργανική Χημεία, τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ.* 1245, 905.
2. Berg, J. M., Tymoczko J. L., Stryer L, *Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2001* (p) 329-351.
3. Galmarini CM, Mackey JR, Dumont et C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lanc et Oncol.* 2002 Jul; 3(7): 415-24. Review.
4. Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* 1995, 67, 155.
5. Wagner, C. R.; Iyer, V. V.; McIntee, E. J. *Med. Res. Rev.* 2000, 20, 417.
6. Balzarini, J. *Pharmacy World Sci.* 1993, 16, 113.
7. Chong, Y.; Choo, H.; Lee, S.; Choi, Y.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 4888.
8. Lewin, B. *Genes* 2003, VIII, 6.
9. Burns, C. J. *Curr. Med. Chem.- Anti-Infective Agents*, 2005, 4, 4.
10. Lui, V. W. Y. W.; Lau, C. P. Y. P.; Cheung, C. S. F. S.; Ho, K.; Ng, M. H. L. H.; Cheng, S. H. H.; Hong, B.; Tsao, S.-W. W.; Tsang, C. M. M.; Lei, K. I. K. I.; Yamasaki, Y.; Mita, A.; Chan, A. T. *Biochemical pharmacology* 2010, 79, 1772.
11. Balatsos, N.A.A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis, D.; Stathopoulos, C. *Biochemistry* 2009, 48, 6044-6051.
12. **Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D.** *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 980.
13. **Manta, S.; Agelis, G.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D.** *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, 43, 420-428.
14. **Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N.; Goropevsek, A.; Pamulapati, R.T.; Cencič, A.; Komiotis, D.** *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 2696.
15. Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J.M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis D.; Leonidas, D. D. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2010, 18, 3413-3425.
16. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 3057-3062.
17. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, 41, 2596-2599.
18. Bock, V. D.; Hiemstra, H.; van Maarseveen, J. H. *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 51-68.
19. Wu, P.; Fokin, V. V. *Aldrichimica Acta*, 2007, 40, 7-17.

20. Fokin, V. V. *ACS Chem. Biol.*, 2007, **2**, 775–778.
21. Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 1249–1262.
22. Johnson, J. A.; Koberstein, J. T.; Finn M. G.; Turro, N. *J. Macromol. Rapid Commun.*, 2008, **29**, 1052–1072.
23. Meldal, M.; Tornøe, C.W. *Chem. Rev.* 2008, **108**, 2952–3015.
24. Hein, J. E.; Fokin, V.V. *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1302–1315.
25. Huisgen, R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1963, **2**, 565–598.
26. A. C. Tomé, *in Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations*, ed. Storr, R. C.; Gilchrist, T. L. Thieme, Stuttgart, 2004, vol. 13: Five-Membered Heteroarenes with three or More Heteroatoms, pp. 415–601;
27. Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 15998–15999.
28. Boren, B. C.; Narayan, S.; Rasmussen, L. K.; Zhang, L.; Zhao, H.; Lin, Z.; Jia, G.; Fokin, V. V. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 8923–8930.
29. Appukkuttan, P.; Dehaen, W.; Fokin V. V.; Van der Eycken, E. *Org. Lett.*, 2004, **6**, 4223–4225.
30. Seela, F.; Sirivolu, V. R. *Chem. Biodiversity*, 2006, **3**, 509–514.
31. F. Seela, F.; Sirivolu, V. R. *Helv. Chim. Acta*, 2007, **90**, 535–552.
32. Seela, F.; Sirivolu, V. R. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, 2007, **26**, 597–601.
33. Seela, F.; Ming, X. *Helv. Chim. Acta*, 2008, **91**, 1181–1200.
34. Seela, F.; Sirivolu, V. R.; Chittepu, P. *Bioconjugate Chem.*, 2008, **19**, 211–224.
35. Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless K. B.; V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 210–216.
36. Urien, M.; Erothu, H.; Cloutet, E.; Hiorns, R. C.; Vignau, L.; Cramail, H. *Macromolecules*, 2008, **41**, 7033–7040.
37. Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* 2010.
38. Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* 1994, **47**, 365.
39. Pontikis, R.; Wolf, J.; Monneret, C.; Florent, J. -C. *Tetrahedron Lett.* 1995, **36**, 3523.
40. Yamagami, K.; Fujii, A.; Arita, M.; Okumoto, T.; Sakata, S.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Sasaki, T. *Cancer Res.* 1991, **51**, 2319.
41. Lin, T. S.; Luo, M. Z.; Liu, M. C.; Clarkatzenburg, R. H.; Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H.; Mancini, W. R.; Birnbaum, G. I.; Gabe, E.; Giziewicz, J. J. *Med. Chem.* 1991, **34**, 2607.



42. Baker, C. H.; Banzon, J.; Bollinger, J. M.; Stubbe, J.; Samano, V.; Robins, M. J. J. *Med. Chem.* 1991, 34, 1879.
43. Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, 95, 105.
44. D'Alessio, G., A. Di Donato, et al. (1991). "Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily." *Trends Biochem Sci* 16(3): 104-106.
45. Fett, J. W., J. L. Bethune, et al. (1987). "Induction of angiogenesis by mixtures of two angiogenic proteins, angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorioallantoic membrane." *Biochem Biophys Res Commun* 146(3): 1122-1131.
46. Kao, R. Y., J. L. Jenkins, et al. (2002). "A small-molecule inhibitor of the ribonucleolytic activity of human angiogenin that possesses antitumor activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15): 10066-10071.
47. Leland, P. A., L. W. Schultz, et al. (1998). "Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18): 10407-10412.
48. Leonidas, D. D., G. B. Chavali, et al.. High-resolution crystal structures of ribonuclease A complexed with adenylic and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors. *Protein Sci.* 2003, 12(11): 2559-2574.
49. Stimac, A; Kobe, J. An improved preparation of 2,3,5-tri-O-acyl- $\beta$ -D-ribofuranosylazides by the Lewis acid-catalyzed reaction of  $\beta$ -D-ribofuranosyl acetates and trimethyl silyl azide- An example of concomitant formation of the anomer by trimethyl silyl triflate catalysis. *Carbohydrate Research*, 232: 359-365.
50. Menzies, I.S. and Seakins, J.W.T. (1976) Paper and Thin Layer Chromatography. Chromatography and electrophoretic Technics, Vol.1 (Smith, I. And Seakins, J.W.T. eds.), *William Heinemann Medical books Ltd.*, 183.
51. AN R. Van Rompay, Ameli Norda, Karin Lind En, Magnus Johansson, and Anna Karlsson. Phosphorylation of Uridine and Cytidine Nucleoside Analogs by Two Human Uridine-Cytidine Kinases. *Mol Pharmacol.* 2001, 59:1181-1186
52. An R. Van Rompay, Magnus Johansson, Anna Karlsson. Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *Pharmacology & Therapeutics.* 2000, 87, 2-3: 189-198
53. Jason M. Walsh, Penny J. Beuning. Synthetic Nucleotides as Probes of DNA Polymerase Specificity. *Journal of Nucleic Acids.* vol. 2012, Article ID 530963, 17 pages, 2012. doi:10.1155/2012/530963
54. Jason E. Hein and Valery V. Fokin. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. *Chem. Soc. Rev.*, 2010,39: 1302-1315
55. <http://chemistry.tutorvista.com>. Chromatography Sept 2012

56. C.L.F. Meyers, D.J. Meyers. Thin-Layer Chromatography. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry. 2008, DOI: 10.1002/0471142700.nca03ds34
57. Hayflick L., Mortality and immortality at the cellular level. A review. Biochemistry. 1997, 62: 1180-1190
58. Hanahan D. and Weinberg R.A.. The Hallmarks of Cancer. 2000. Cell, 100: 57-70
59. <http://www.personal.psu.edu>. DNA Mutation in HIV Virus. Sept 2012
60. Hanahan D. and Folkman J.. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell. 1996, 86: 353-364