

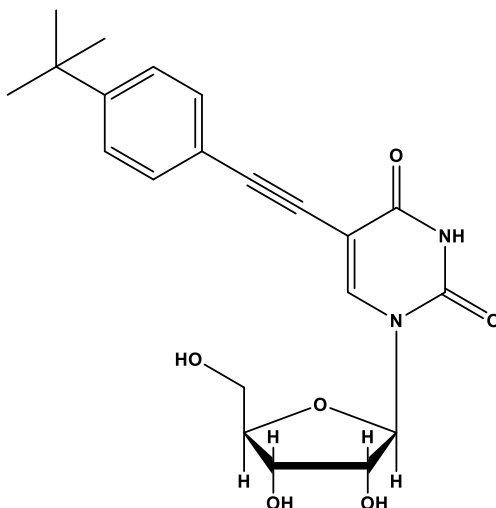


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΑΝΤΙΝΙΩΤΟΥ ΜΑΡΘΑ ΜΑΡΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Σύνθεση, χρωματογραφική απομόνωση και φασματοσκοπικός προσδιορισμός της 5-(2'-δεοξυ-β-D-φουρανοζυλο)-(τερτ-βουτυλο-φαινυλοαιθυνο) ουρακίλης»



ΛΑΡΙΣΑ 2022

Σύνθεση, χρωματογραφική απομόνωση και φασματοσκοπικός προσδιορισμός της 5-(2'-δεοξυ-β-D-φουρανοζυλο)-(τερτ-βουτυλο-φαινυλοαιθυνο) ουρακίλης

Synthesis, chromatographic isolation and spectroscopic identification of 5-(2'-deoxy-β-D-fouranozyl)-(tert-butyl-phenyl-ethyl) uracil

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Κομιώτης Δημήτριος** – Καθηγητής Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Μόσιαλος Δημήτριος** – Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- **Αμούτζιας Γρηγόριος** – Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοοργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Οργανικής και Βιοοργανικής Χημείας κ. Δημήτριο Κομιώτη, κατά τη διάρκεια των μηνών Μαρτίου 2022 – Ιουνίου 2022. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κομιώτη για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριό του, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ακαδημαϊκό υπότροφο Δρ. Κολλάτο Νικόλαο, τόσο για την στήριξη όσο και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε. Οι συμβουλές και η καθοδήγηση του με βοήθησαν να αποκτήσω έναν σωστό τρόπο σκέψης και να φέρω εις πέρας τη διπλωματική μου εργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο όρος «νουκλεοζίτες» αναφέρεται στα παράγωγα σύζευξης μιας αζωτούχου βάσης με ένα σάκχαρο. Αποτελούν βασικά συστατικά των ζωντανών οργανισμών, καθώς αποτελούν δομικές μονάδες του DNA και του RNA που μεταφέρουν γενετικές πληροφορίες και συμβάλλουν στις βιολογικές διεργασίες. Συχνά, κάποιοι νουκλεοζίτες ή ανάλογα αυτών, χρησιμοποιούνται ως φάρμακα.

Σημαντικό πεδίο έρευνας αποτελούν οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες, τα λεγόμενα νουκλεοζιτικά ανάλογα, όπου οι τροποποιήσεις μπορούν να συμβούν είτε στο σάκχαρο είτε στην αζωτούχο βάση, με σκοπό την αξιολόγηση τους για πιθανή αντικαρκινική ή αντι-ιική δράση, με όσο το δυνατόν λιγότερες παρενέργειες στον ανθρώπινο οργανισμό.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται η σύνθεση ενός νέου δεοξυ φουρανονουκλεοζίτη με βάση την 5-ιωδοουρακίλη, όπου η τροποποίηση έλαβε χώρα στην αζωτούχο βάση, με απώτερο σκοπό την αξιολόγηση της βιολογικής δράσης του. Επίσης, αναλύονται οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν, οι συνθετικές πορείες που ακολουθήθηκαν και τα αποτελέσματα ταυτοποίησης τους.

ABSTRACT

The term "nucleosides" refers to the derivatives of coupling a nitrogenous base to a sugar. They are key components of living organisms, as they are structural units of DNA and RNA that carry genetic information and contribute to biological processes. Often, some nucleosides or analogs of these are used as drugs.

An important field of research is the modified nucleosides, the so-called nucleoside analogues, where the modifications can occur either in the sugar or in the nitrogenous base, to evaluate them for possible anti-cancer or anti-viral action, with as few side effects in the human body as possible.

The present diploma thesis describes the synthesis of a new deoxy furanonucleoside, in which the modification took place on the nitrogenous base, 5-iodouracil, aiming on the evaluation its biological activity. Also, the techniques applied, the synthetic procedures followed and the results of their identification are analyzed.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	- 4 -
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	- 5 -
ABSTRACT	- 6 -
1. Εισαγωγή.....	- 8 -
1.1. Υδατάνθρακες.....	- 8 -
1.1.1. Ταξινόμηση σακχάρων	- 8 -
1.1.2. Σχηματισμός ημιακετάλης	- 10 -
1.1.3. Δημιουργία γλυκοζιτικών δεσμών	- 12 -
1.2. Πυριμιδίνες.....	- 14 -
1.3. Νουκλεοζίτες.....	- 17 -
1.4. Τροποποίηση νουκλεοζιτών και ιατρική σημασία	- 18 -
1.4.1. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με αντικαρκινική δράση	- 19 -
1.4.2. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με αντι-ιική δράση	- 21 -
2. Σκοπός	- 26 -
3. Τεχνικές – Πειραματική μεθοδολογία	- 27 -
3.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC (Thin Layer Chromatography)-	- 27 -
3.2. Χρωματογραφία στήλης.....	- 28 -
3.3. Ξήρανση διαλυτών	- 30 -
3.4. Θέρμανση με την χρήση μικροκυμάτων.....	- 30 -
3.5. Ταυτοποίηση ενώσεων με φασματοσκοπία NMR	- 31 -
3.6. Αντιδραστήρια και παρατηρήσεις	- 32 -
4. Πειραματικό μέρος	- 33 -
4.1. Επισκόπηση συνθετικής πορείας.....	- 33 -
4.2. Μεθοδολογία σύνθεσης	- 34 -
4.3. Σύνθεση της 3',5'-δι-Ο-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-φουρανόζυλο ιωδοουρακίλης	- 34 -
4.4. Σύνθεση της 3',5'-δι-Ο-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-φουρανόζυλο-(τερτ- βουτυλο-φαινυλοαιθυνο) ιωδοουρακίλης (3).....	- 35 -
4.5. Σύνθεση της 5-(2'-δεοξυ-β-D-φουρανοζυλο)-(τερτ-βουτυλο- φαινυλοαιθυνο) ουρακίλης (4).....	- 37 -
5. Αποτελέσματα και συζήτηση	- 39 -
Βιβλιογραφία	- 40 -

1. Εισαγωγή

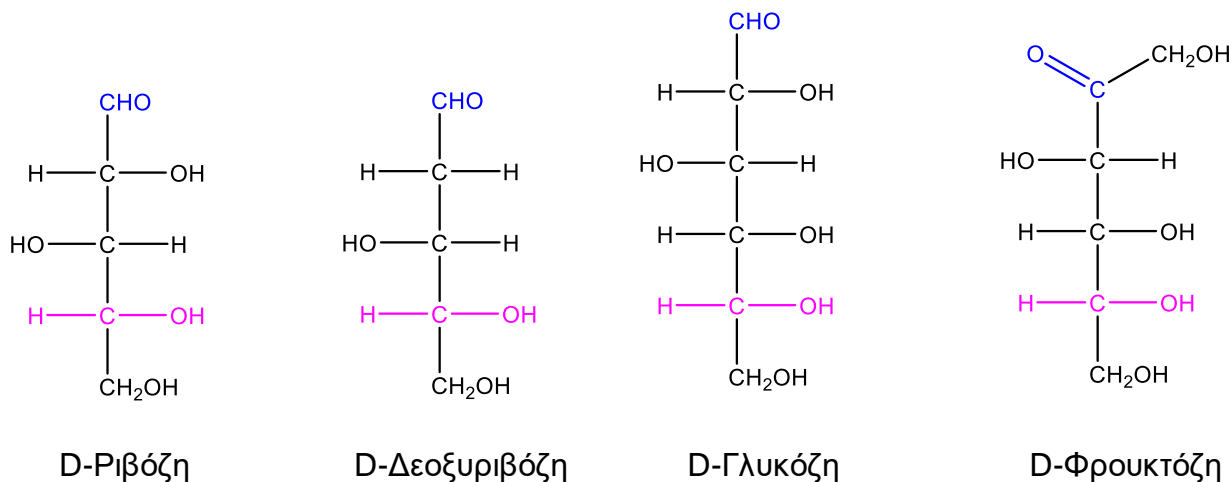
1.1. Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι οι οργανικές ενώσεις με τη μεγαλύτερη αφθονία στη φύση και έχουν χημικό τύπο $C_n(H_2O)_m$. Η ονομασία «υδατάνθρακες» επιλέχθηκε κατά την απομόνωση του πρώτου υδατάνθρακα, της γλυκόζης, η οποία έχει μοριακό τύπο $C_6H_{12}O_6$ και αρχικά θεωρήθηκε ως «υδρίτης του άνθρακα». Παρόλο που σύντομα αυτή η άποψη εγκαταλείφθηκε, ο όρος υδατάνθρακας μέχρι και σήμερα χρησιμοποιείται για να περιγράψει μια ευρεία κατηγορία πολυυδροξυλιωμένων αλδεϋδών και κετονών καθώς και των ενώσεων που υδρολύονται προς αυτές, που είναι κοινώς γνωστά ως «σάκχαρα». Η βιολογική τους σημασία είναι τεράστια, καθώς τα σάκχαρα αποτελούν -μεταξύ άλλων- συστήματα αποθήκευσης χημικής ενέργειας, δομικές μονάδες των λιπών και των νουκλεϊνικών οξέων. (McMurry, 1984-1996)

1.1.1. Ταξινόμηση σακχάρων

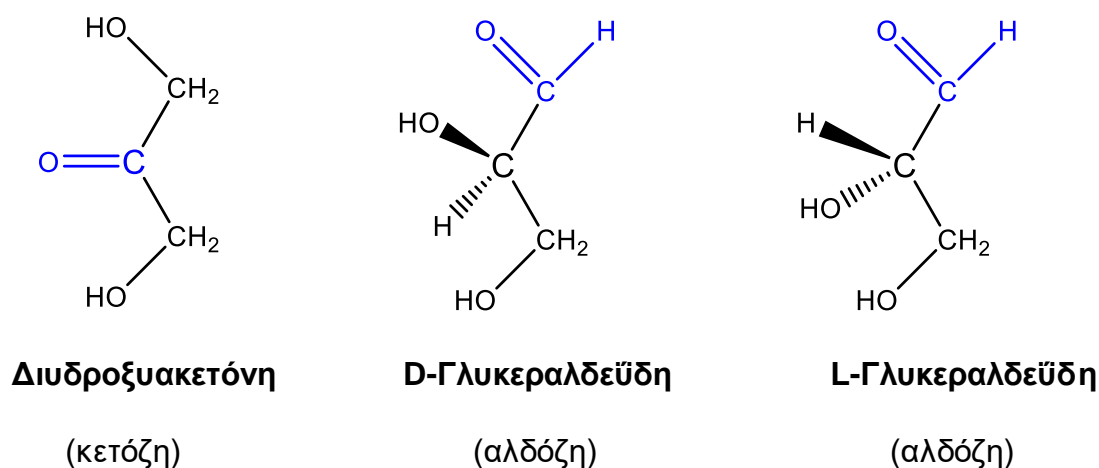
Οι υδατάνθρακες ταξινομούνται με βάση τον αριθμό των μορίων που τους απαρτίζουν σε **μονοσακχαρίτες** και **πολυσακχαρίτες**. Οι μονοσακχαρίτες ή απλά σάκχαρα δεν μπορούν να υδρολυθούν σε μικρότερα μόρια, ενώ οι πολυσακχαρίτες αποτελούνται από δύο ή περισσότερα μόρια σακχάρων, οι οποίοι μετά την υδρόλυση τους διασπώνται στις απλούστερες δομές τους.

Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να διαχωριστούν σε **αλδόζες**, όταν γίνεται αναφορά στις πολυυδροξυαλδεΐδες και σε **κετόζες**, όταν πρόκειται για τις πολυυδροξυκετόνες. Με βάση το μήκος της αλυσίδας, τα σάκχαρα κατατάσσονται σε **τριόζες**, **τετρόζες**, **πεντόζες** και **εξόζες**. Τα σημαντικότερα σάκχαρα είναι η **γλυκόζη** ή δεξτρόζη (αλδοεξόζη), η **φρουκτόζη** (κετοεξόζη) και η **ριβόζη** (αλδοπεντόζη), η οποία, μαζί με τη **δεοξυριβόζη**, αποτελούν δομική μονάδα των ριβονουκλεϊνικών οξέων (Σχήμα 1). (Peter Vollhardt, 2012)



Σχήμα 1: Δομές σακχάρων

Οι μικρότεροι μονοσακχαρίτες έχουν τρία άτομα άνθρακα ($n=3$) και είναι η διυδροξυακετόνη και η D- και L-γλυκεραλδεΐδη (Σχήμα 2). Η διυδροξυακετόνη είναι μία κετόζη, διότι φέρει μία κετονική ομάδα ($>C=O$), ενώ η γλυκεραλδεΐδη είναι μια αλδόζη, καθώς φέρει μία αλδεϋδική ομάδα ($-CH=O$). (Peter Vollhardt, 2012)

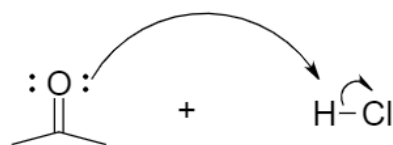


Σχήμα 2: Τα τρία μικρότερα σάκχαρα

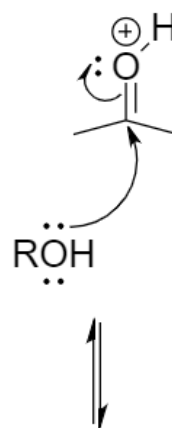
1.1.2. Σχηματισμός ημιακετάλης

Παρακάτω, δίνεται ο μηχανισμός σχηματισμού της ημιακετάλης:

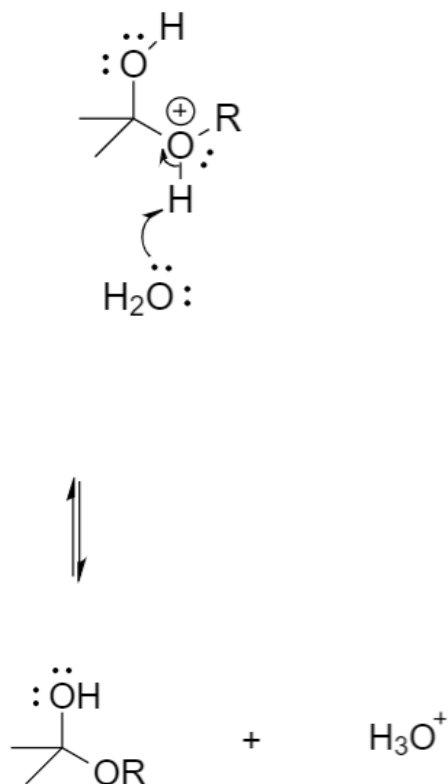
Η πρωτονίωση του καρβονυλικού
οξυγόνου πολώνει έντονα το καρβονύλιο



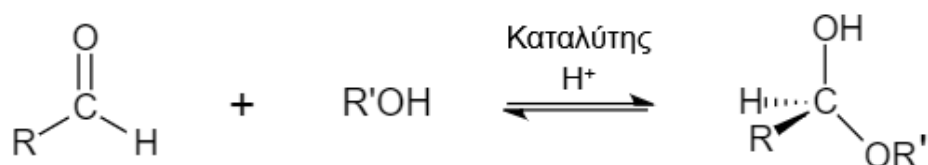
Το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του
οξυγόνου της αλκοόλης ενεργοποιεί την
καρβονυλική ομάδα για πυρηνόφιλη προσθήκη



Απόσπαση ενός πρωτονίου οδηγεί σε ένα
τετραεδρικό ενδιάμεσο, μια ουδέτερη ημιακετάλη

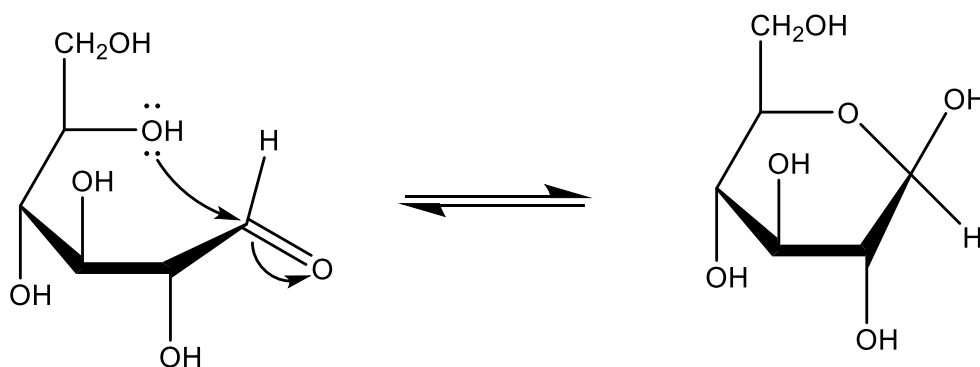


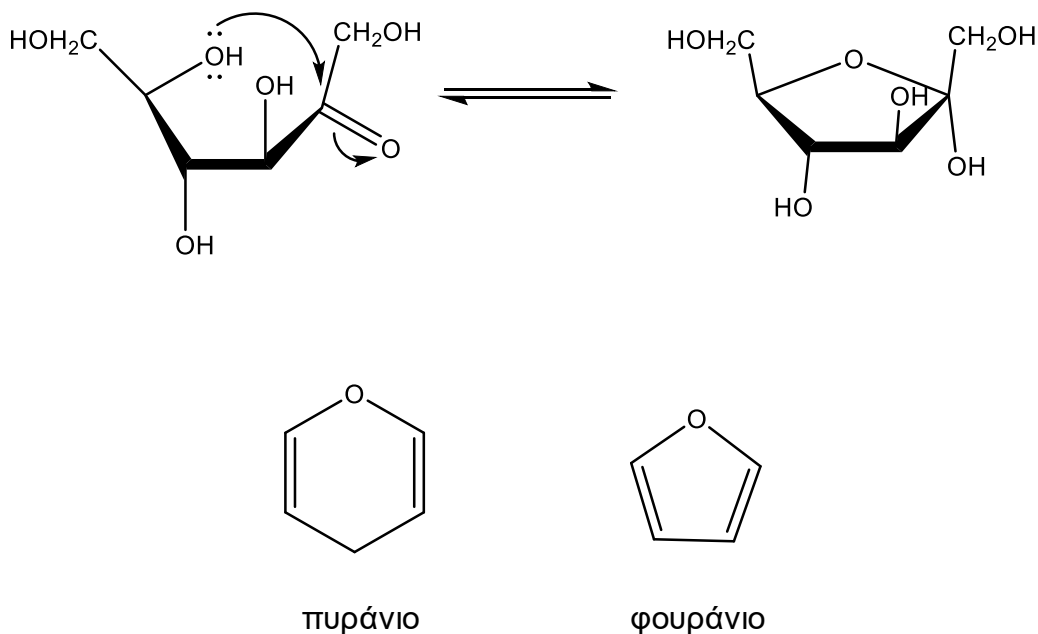
Τα σάκχαρα είναι μόρια με πολλές λειτουργικές ομάδες και πολλαπλά **στερεογονικά κέντρα**, συνεπώς έχουν ποικιλία χημικών ιδιοτήτων. Όταν το μόριο μιας αλδεΐδης αντιδρά με ένα μόριο αλκοόλης, σχηματίζεται μία **ημιακετάλη** (Σχήμα 3), και αν αυτά τα δύο ανήκουν στο ίδιο μόριο, τότε σχηματίζεται μία **κυκλική ημιακετάλη**. Οι δομές αυτές είναι ιδιαίτερα σταθερές. (L. G. Wade, 2010)



Σχήμα 3: Σχηματισμός ημιακετάλης

Οι πενταμελείς και οι εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες αποτελούν σταθερότερες μορφές από τις αντίστοιχες μορφές ανοιχτής αλυσίδας. Στα διαλύματα υπάρχουν μείγματα ισορροπίας της κυκλικής ημιακεταλικής δομής και της ανοιχτής αλυσίδας, με την ισορροπία να ευνοεί την κυκλική ημιακετάλη για την πλειονότητα των σακχάρων. Η γλυκόζη, λόγω χάριν, σε υδατικό διάλυμα απαντάται σε δομή εξαμελούς δακτυλίου πυρανόζης, που οφείλεται στην ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη του υδροξυλίου του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C1. Αντιθέτως, η φρουκτόζη απαντά με τη δομή του πενταμελούς δακτυλίου φουρανόζης, που σχηματίζεται από την προσθήκη του υδροξυλίου του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C2. Έτσι, με την κυκλοποίηση της ανοιχτής αλυσίδας ενός μονοσακχαρίτη προκύπτει ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση που βρισκόταν το καρβονύλιο. Τα δύο νέα διαστερομερή ονομάζονται ανωμερή (Σχήμα 4). (L. G. Wade, 2010)

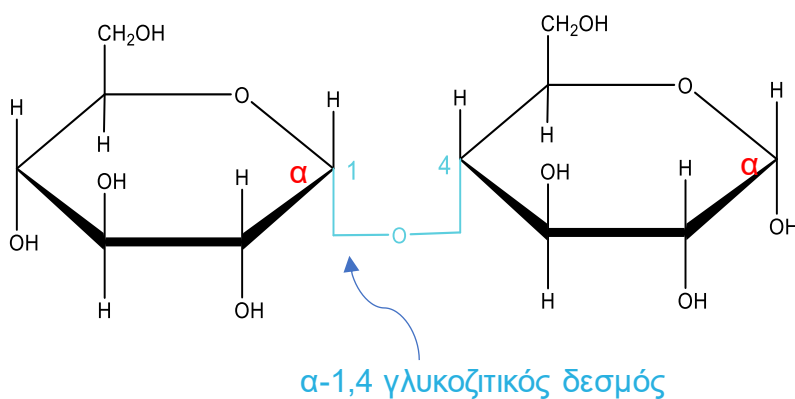




Σχήμα 4: Σχηματισμός δομής πυρανόζης της D-γλυκόζης, σχηματισμός δομής φουρανόζης της D-φρουκτόζης και δομές πυρανίου, φουρανίου.

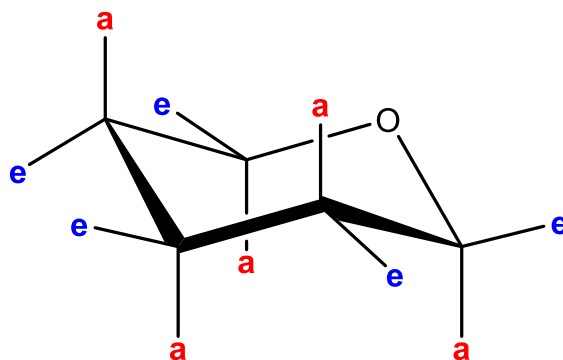
1.1.3. Δημιουργία γλυκοζιτικών δεσμών

Οι ομάδες υδροξυλίου στους μονοσακχαρίτες, τους επιτρέπουν να ενώνονται μεταξύ τους, προς σχηματισμό δισακχαριτών, ολιγοσακχαριτών και πολυσακχαριτών. Ο δεσμός που επιτρέπει αυτή τη σύνδεση, σχηματίζεται μεταξύ του άνθρακα C-1 του ενός μονοσακχαρίτη και του άνθρακα C-4 του επόμενου μονοσακχαρίτη, από όπου προκύπτει και το όνομά του: α-1,4 γλυκοζιτικός δεσμός (Σχήμα 5). (McMurry, 1984-1996)



Σχήμα 5: Ο α-1,4 γλυκοζιτικός δεσμός

Οι προηγούμενες δομές κατά Haworth, παρόλο που είναι εύχρηστες δεν παρέχουν ακριβή εικόνα του εξαμελή δακτυλίου της πυρανόζης. Ο συγκεκριμένος δακτύλιος δεν δύναται να είναι επίπεδος, λόγω της τετραεδρικής γεωμετρίας των κορεσμένων ατόμων άνθρακα. Αντίθετα, οι δακτύλιοι της πυρανόζης μπορούν να υιοθετήσουν στερεοδιατάξεις ανάκλιντρου, με αποτέλεσμα να εξουδετερώνονται όλες οι τάσεις, εφόσον 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 γωνιάς. Οι υποκαταστάτες των ατόμων άνθρακα του δακτυλίου είναι δύο ειδών: οι αξονικοί και οι ισημερινοί (Σχήμα 6). Οι αξονικοί δεσμοί είναι σχεδόν κάθετοι προς το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί δεσμοί είναι σχεδόν παράλληλοι προς το επίπεδο αυτό. Οι αξονικοί υποκαταστάτες προβάλλουν πάνω και κάτω από το μέσο επίπεδο του δακτυλίου, ενώ οι ισημερινοί υποκαταστάτες διατάσσονται στην περιφέρεια. Οι αξονικοί υποκαταστάτες, εκτός του υδρογόνου, παρεμποδίζουν στερεοχημικά ο ένας τον άλλο, αν ξεπροβάλουν από την ίδια πλευρά του δακτυλίου. Αντίθετα, υπάρχει πολύ περισσότερος χώρος για τους ισημερινούς υποκαταστάτες. Έτσι, ένας υποκαταστάτης είναι σταθερότερος στην ισημερινή απ' ότι στην αξονική θέση. (McMurry, 1984-1996)

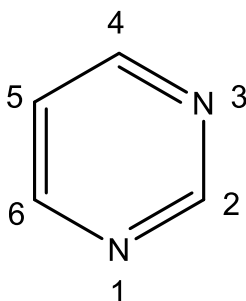


Σχήμα 6: Μορφή ανακλίντρου της πυρανόζης, όπου e οι ισημερινοί και a οι αξονικοί υποκαταστάτες.

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. 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. (Peter Vollhardt, 2012)

1.2. Πυριμιδίνες

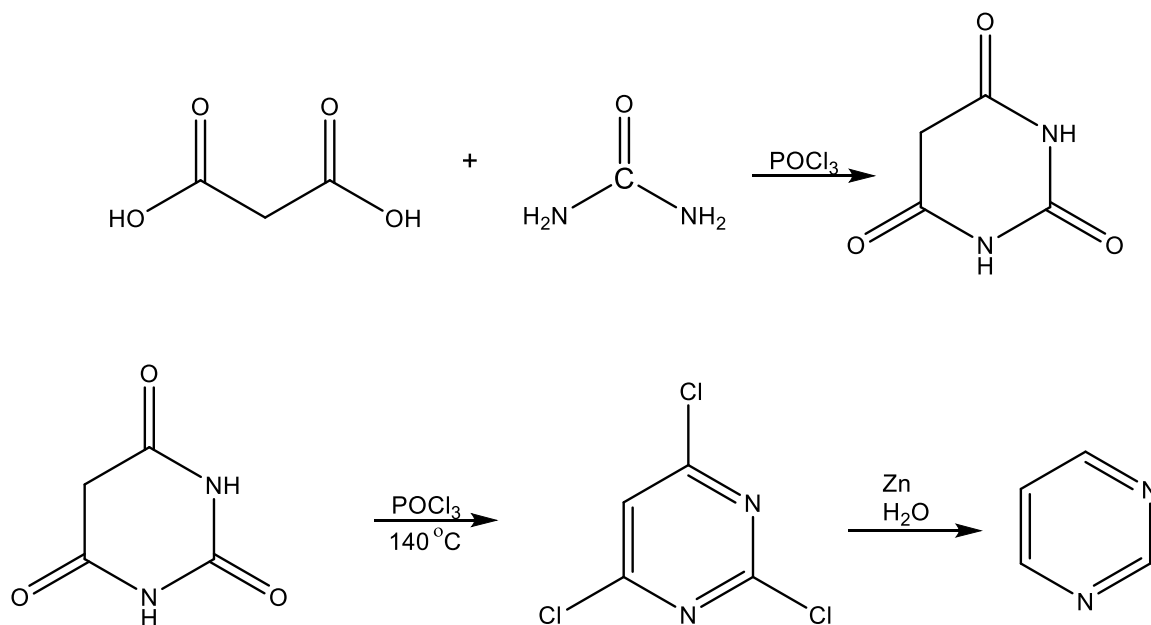
Οι πυριμιδίνες (Σχήμα 7) είναι οργανικοί αρωματικοί ετεροκυκλικοί εξαμελείς δακτύλιοι, με δύο άτομα αζώτου στις θέσεις 1 και 3. Είναι ουσιαστικά διαζίνες με τη μόνη διαφορά στη θέση των αζώτων στον αρωματικό δακτύλιο, καθώς οι διαζίνες έχουν θέσεις αζώτου τις 1,2 οι πυριδαζίνες και 1,4 οι πυραζίνες. (Lubert Stryer, 1995)



Σχήμα 7: Δομή πυριμιδίνης

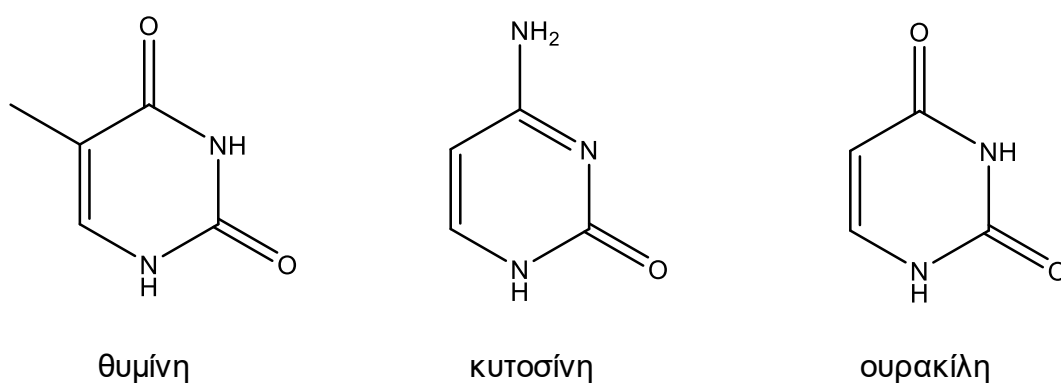
Οι πυριμιδίνες εμφανίζουν ιδιαίτερο βιολογικό και ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς αποτελούν δομικά συστατικά βιομορίων, όπως τα **νουκλεϊκά οξέα**, και έχουν βιολογικούς ρόλους συμμετέχοντας σε αντιδράσεις είτε ως **συνένζυμα**.

Ο όρος πυριμιδίνη αποδόθηκε το 1885 από τον Pinner, συνδυάζοντας τις λέξεις **πυριδίνη** και **αμιδίνη**, ο οποίος συνέθεσε διάφορα παράγωγα πυριμιδίνης συμπυκνώνοντας τον ακετοξικό αιθυλεστέρα με μια σειρά από αμιδίνες. Ωστόσο, η πρώτη χημική σύνθεση τους αναφέρεται το 1879, όταν ο Γάλλος χημικός και φαρμακοποιός Louis Edouard Grimaux συνέθεσε ένα πυριμιδινικό παράγωγο, το βαρβιτουρικό οξύ, από μηλονικό οξύ και ουρία παρουσία φωσφορυλοχλωριδίου (Σχήμα 8). Ωστόσο η σύνθεση της μητρικής ένωσης πραγματοποιήθηκε το 1900 από τους **Gabriel** και **Colman**.



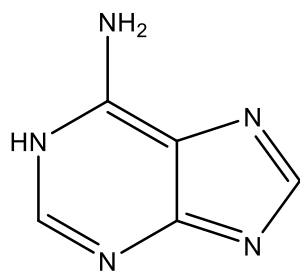
Σχήμα 8: Σύνθεση πυριμιδίνης από μηλονικό οξύ και ουρία παρουσία φωσφορυλοχλωριδίου

Οι πυριμιδίνες έχουν μεγάλη βιολογική σημασία, καθώς συμβάλλουν σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Πιο συγκεκριμένα, οι πυριμιδίνες **θυμίνη**, **κυτοσίνη** και **ουρακίλη** (Σχήμα 9) αποτελούν νουκλεοβάσεις των νουκλεϊκών οξέων.

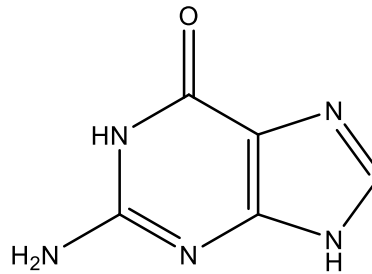


Σχήμα 9: Οι δομές θυμινής, κυτοσίνης και ουρακίλης

Επίσης, υπάρχουν και οι συντηγμένες με ιμιδαζολικό δακτύλιο νουκλεοβάσεις **αδενίνη** και **γουανίνη**, οι οποίες είναι γνωστές ως **πουρίνες** (Σχήμα 10).



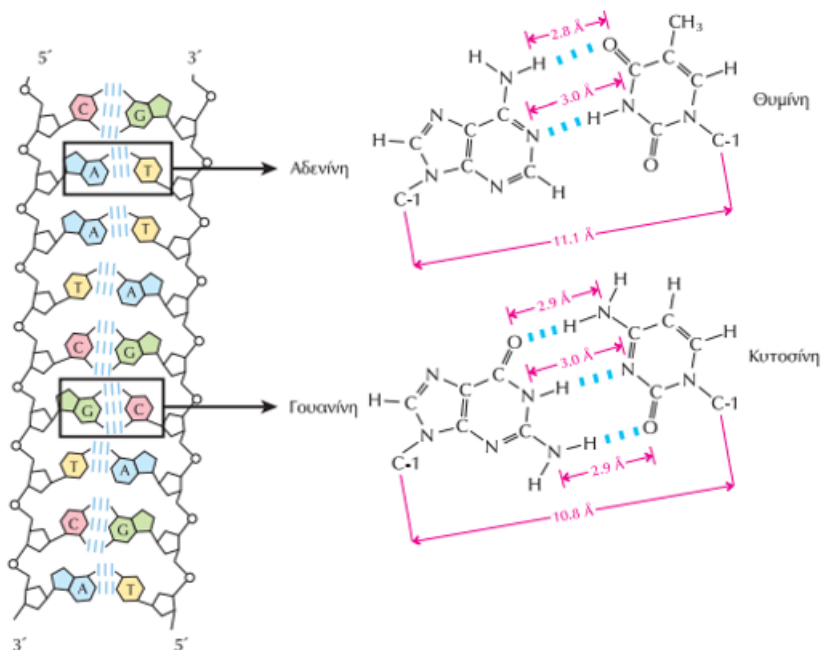
αδενίνη



γουανίνη

Σχήμα 10: Οι δομές αδενίνης και γουανίνης

Οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες δημιουργούν **δεσμούς υδρογόνου** μεταξύ τους καθορίζοντας τη **συμπληρωματικότητα του DNA** (Σχήμα 11). Συγκεκριμένα, η αδενίνη σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με τη θυμίνη ενώ η γουανίνη με την κυτοσίνη τρεις. Η ουρακίλη αποτελεί βάση των ριβονουκλεοτιδίων, αντικαθιστώντας τη θυμίνη στο κανόνα της συμπληρωματικότητας.



Σχήμα 11: Δομή DNA κατά Watson & Crick και συμπληρωματικότητα των βάσεων του DNA

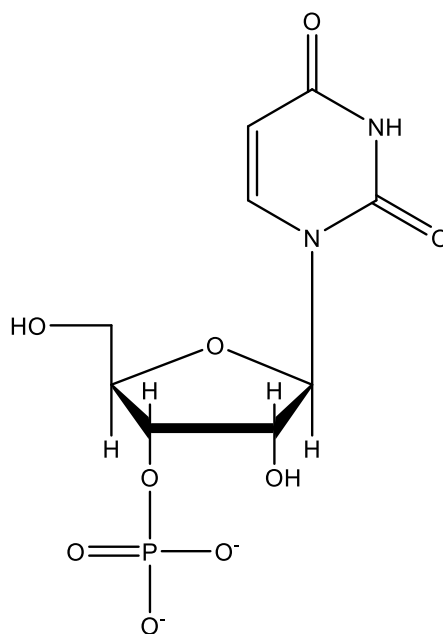
Οι πυριμιδίνες έχουν αποδειχθεί ενώσεις με αξιόλογη **φαρμακευτική δράση**, καθώς αποτελούν μέρος της σύνθεσης και της λειτουργίας των νουκλεϊκών οξέων. Τα παράγωγα της πυριμιδίνης έχουν εμφανίσει αντικαρκινική,

αντιική, αντιφλεγμονώδη και αντιμικροβιακή δράση. Ο δακτύλιος πυριμιδίνης είναι επίσης ένα βασικό τμήμα στο δομικό πλαίσιο βιταμινών όπως **θειαμίνη**, **ριβοφλαβίνη** και **φολικό οξύ**. (Lubert Stryer, 1995)

1.3. Νουκλεοζίτες

Οι **νουκλεοζίτες** είναι γλυκοσιλαμίνες που μπορούν να παρομοιαστούν με **νουκλεοτίδια** απουσία της φωσφορικής ομάδας. Προέρχονται από την ένωση μιας νουκλεοβάσης (**αδενίνη**, **γουανίνη**, **κυτοσίνη**, **θυμίνη**, **ουρακίλη**) με ένα σάκχαρο, το οποίο μπορεί να είναι είτε η ριβόζη (**ριβονουκλεοζίτες**) ή η δεοξυριβόζη (**δεοξυριβονουκλεοζίτες**). (David L. Nelson, 2011)

Η αζωτούχος βάση συνδέεται με το σάκχαρο μέσω **N-γλυκοζιτικού** δεσμού, όπου ο C-1 της ριβόζης ή της δεοξυριβόζης συνδέεται με το N-9 μιας **πουρίνης** ή με το N-1 μιας **πυριμιδίνης**. Οι N-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν **β στερεοδιάταξη**, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου. Το σάκχαρο συνδέεται στον C-5 με μία **φωσφορική ομάδα** μέσω φωσφοεστερικού δεσμού. Ένας νουκλεοζίτης με μία μόνο φωσφορική ομάδα, συνιστά ένα νουκλεοτίδιο (Σχήμα 12), δομικό συστατικό του DNA και του RNA, το οποίο αποκαλείται και εστέρας του νουκλεοζίτη. (David L. Nelson, 2011)



Σχήμα 12: Η δομή νουκλεοτιδίου με βάση ουρακίλη

Οι νουκλεοζίτες αποτελούν ενδογενή μόρια του οργανισμού και χαίρουν μεγάλης σημασίας, καθώς είναι βασικά συστατικά διαφόρων κυτταρικών διεργασιών, όπως είναι η **βιοσύνθεση** του DNA και του RNA, η **κυτταρική σηματοδότηση**, η **ενζυμική ρύθμιση** και ο **μεταβολισμός**.

Μολονότι τα πιο κοινά νουκλεοτίδια φέρουν τις κύριες πουρίνες και πυριμιδίνες, τόσο στο DNA όσο και στο RNA υπάρχουν και κάποιες **δευτερεύουσες βάσεις**. Στο DNA, οι πιο συχνές δευτερεύουσες βάσεις είναι **μεθυλιωμένες** μορφές των κύριων βάσεων. Σε κάποια μικρά μόρια DNA, ορισμένες βάσεις μπορούν να είναι υδροξυμεθυλιωμένες ή γλυκοζυλιωμένες. Οι τροποποιημένες ή σπάνιες βάσεις στα μόρια του DNA συχνά παίζουν ρόλο στη **ρύθμιση ή την προστασία των γενετικών πληροφοριών**. Πολλές διαφορετικές δευτερεύουσες βάσεις εντοπίζονται, επίσης, στα μόρια RNA και ιδίως στα μόρια του tRNA. (Jeremy M. Berg, 2015)

1.4. Τροποποίηση νουκλεοζιτών και ιατρική σημασία

Η συνεχής μελέτη των βιοσυνθετικών μονοπατιών των νουκλεοζιτών έχει συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση των βιολογικών διεργασιών σε μοριακό επίπεδο και έχει οδηγήσει σε πολύ σημαντικές ανακαλύψεις. Έγινε γρήγορα αντιληπτό ότι λόγω της μεγάλης συμμετοχής τους στις κυτταρικές διεργασίες οι νουκλεοζίτες αποτελούν σημαντικούς φαρμακευτικούς στόχους. Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί στη σύνθεση **Νουκλεοζιτικών Αναλόγων**, με σκοπό την ανάπτυξη νέων και αποτελεσματικών φαρμάκων.

Τα Νουκλεοζιτικά Ανάλογα είναι νουκλεοζίτες τροποποιημένοι χημικά με τέτοιο τρόπο, ώστε να μιμούνται το ρόλο και τις λειτουργίες ενός φυσιολογικού νουκλεοζίτη. Ως επί το πλείστο, οι χημικές τους ιδιότητες είναι όμοιες με τους φυσιολογικούς νουκλεοζίτες, και αυτό επιτρέπει στα νουκλεοζιτικά ανάλογα να επεμβαίνουν στις φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες, λαμβάνοντας το ρόλο των φυσικών νουκλεοζιτών. Μπορούν, λόγω χάριν, να ενσωματώνονται στην αλυσίδα του DNA ή του RNA και να προκαλούν κυτταρική απόπτωση ή να συνδέονται σε ένζυμα και να μπλοκάρουν τη δράση τους. Η δράση τους στον οργανισμό είναι τοξική. (Vicky G. Tsirkone, 2010)

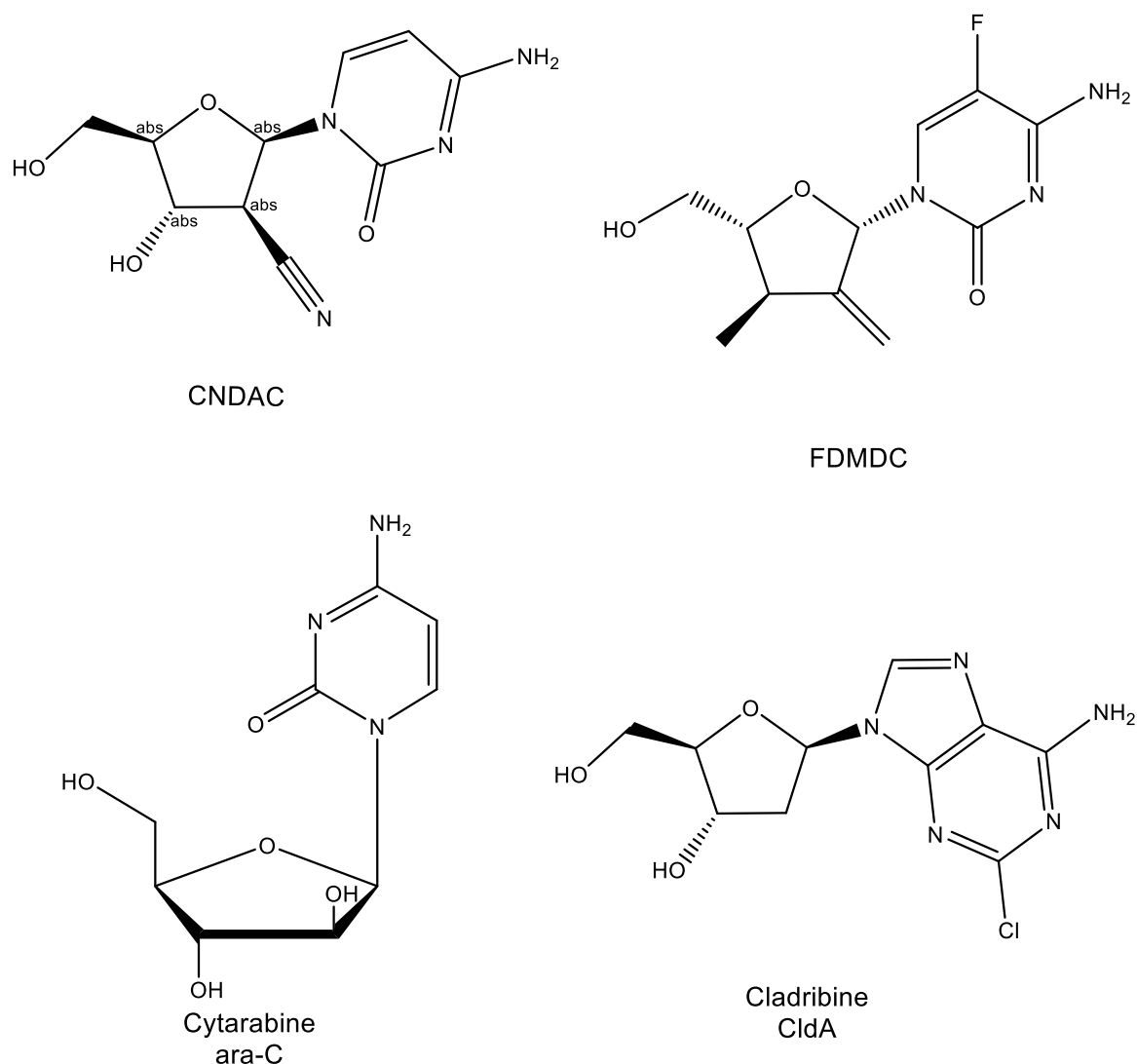
1.4.1. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με αντικαρκινική δράση

Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σ' έναν υγιή οργανισμό υπόκειται πάντα σε **αυστηρές ρυθμίσεις**, που επιτρέπουν στα κύτταρα να **αυξηθούν**, να **διαφοροποιηθούν** και να **λειτουργήσουν αρμονικά** μέσα στον οργανισμό. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν τις ρυθμίσεις αυτές, αν και οι περισσότεροι παραμένουν ακατανόητοι, περιλαμβάνουν ένα σύστημα χημικών μηνυμάτων με τη διαμεσολάβηση, για παράδειγμα, ορμονών και συγκεκριμένων μεμβρανικών υποδοχέων. Τα κύτταρα σε καλλιέργεια, σταματούν την διαίρεσή τους όταν έρθουν σε επαφή το ένα με το άλλο. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, η ισορροπία αυτή διαταράσσεται και η μιτωτική διαίρεση ορισμένων κυττάρων συνεχίζεται άναρχα, χωρίς να υπακούει σε περιοριστικούς κανόνες. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία όγκων ή καρκινωμάτων. Τα κύτταρα χάνουν τη διαφοροποιημένη μορφή τους και περνούν σε μια αδιαφοροποίητη κατάσταση. 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. (David L. Nelson, 2011)

Ο καρκίνος είναι μία από τις πιο σοβαρές ασθένειες και η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας. Αν και, η χημειοθεραπεία θεωρείται ως η πλέον κατάλληλη μέθοδος για τη θεραπεία των ιικών λοιμώξεων, στην περίπτωση αντιμετώπισης του καρκίνου συνιστάται ενίσχυση της αποτελεσματικότητάς της μέσω της εύρεσης νέων αντικαρκινικών ουσιών, οι οποίες διαθέτουν αυξημένη δραστηριότητα, μειωμένη τοξικότητα, βελτιωμένο θεραπευτικό δείκτη και το σημαντικότερο όλων, ευρύ φάσμα δράσης. Οι νουκλεοζίτες και τα νουκλεοζιτικά ανάλογα αποτελούν πλέον χαρακτηριστικό παράδειγμα νέων αντικαρκινικών ουσιών, οι οποίες έχουν μελετηθεί εντατικά. (Prachayasittikul S, 2016)

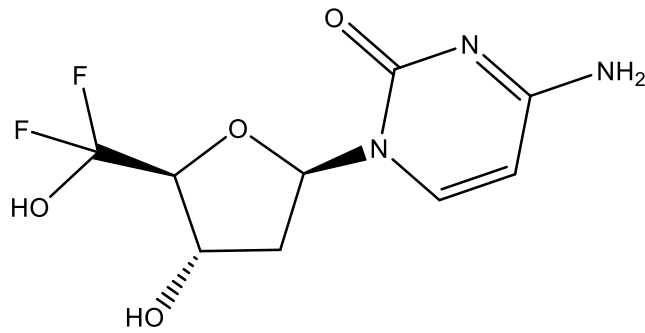
Νουκλεοζιτικοί αντιμεταβολίτες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην φαρμακευτική αντιμετώπιση πολλών μορφών νεοπλασιών που στοχεύει στην παρεμπόδιση της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, οι 1-(2'-δεοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πενταφουρανοζυλο)κυτοσίνη (DMDC), 1-(2'-δεοξυ-2'-μεθυλενο-β-D-ερυθρο-πεντοφουρανοζυλο)5-φθοροκυτοσίνη (FDMDC), 1-β-D-αραβινοφουρανοζυλοκυτοσίνη (Cytarabine, ara-C) και 2-χλωρο-2'-δεοξαδενοσίνη (Cladribine, CldA) (Σχήμα 13) έχουν επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι κακοηθειών, όπως διάφοροι τύποι λεμφωμάτων και λευχαιμίας. (Ann H. Cory, 1994; Renée Pontikis, 1995; K.

Yamagami, 1991; S. T. Lin, 1991; C. H. Baker, 1991; Sasaki, 2004) Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες. (Vivian Wai Yan Lui, 2010; U. G. Bhat, 2010)



Σχήμα 13: Δομές νουκλεοζιτών με αντικαρκινική δράση

Ορόσημο στη μελέτη των φθορονουκλεοζιτών αποτελεί η ανακάλυψη της 2'-δεοξυ-2',2'-διφθοροκυτιδίνης (gemcitabine, dFdC) (Σχήμα 14), η οποία αποτελεί σημαντικό αντικαρκινικό παράγοντα ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα κακοήθων όγκων, όπως είναι του παγκρέατος. Η gemcitabine δρα ως ανασταλτικός παράγοντας στη σύνθεση του DNA μέσω ανταγωνιστικής ενσωμάτωσης στη νεοσυντιθέμενη κάθε φορά αλυσίδα. (Plunkett, 1995)



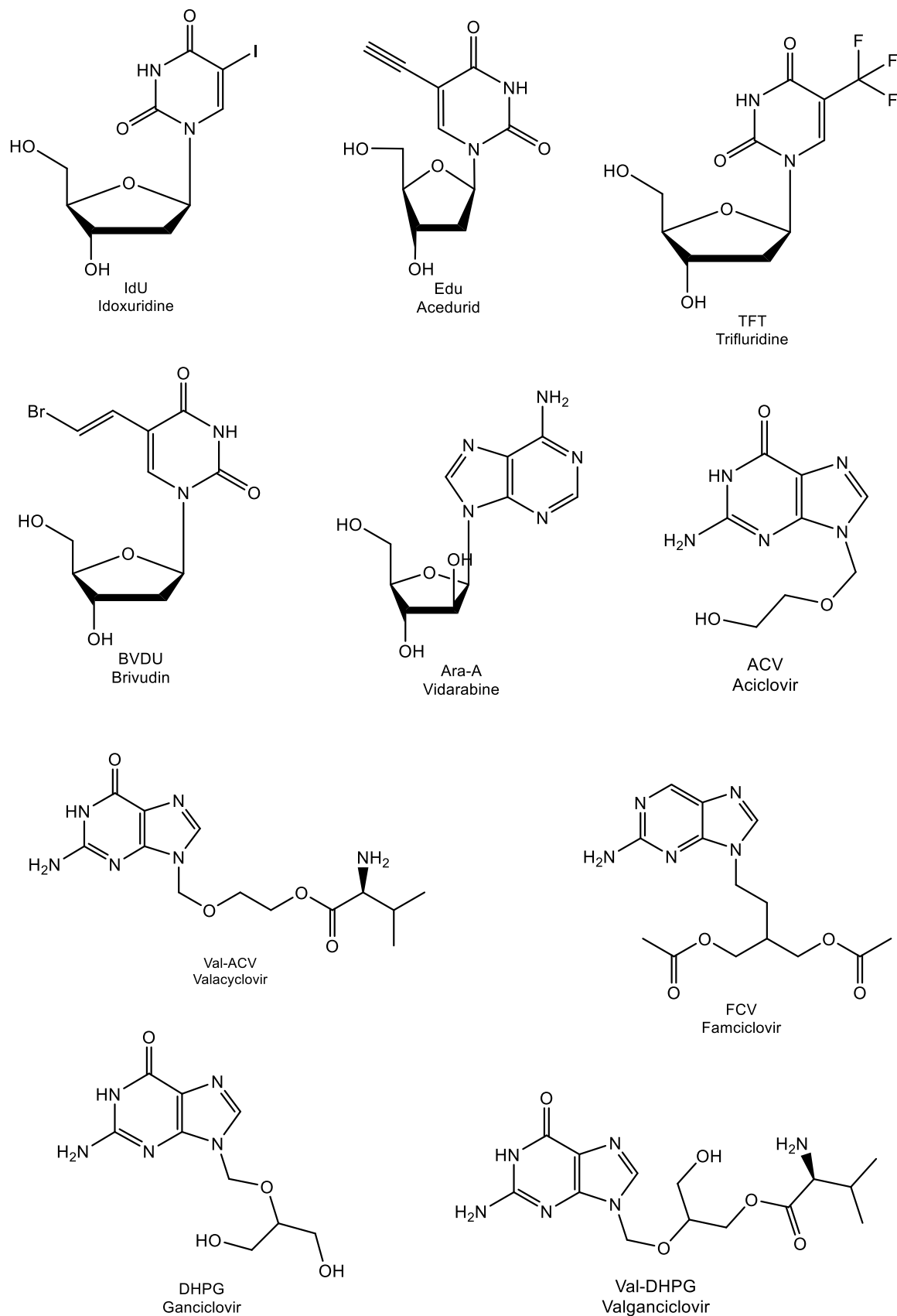
dFdC
Gemcitabine

Σχήμα 14: Δομή της 2'-δεοξυ-2',2'-διφθοροκυτιδίνης (dFdC)

1.4.2. Νουκλεοζιτικά ανάλογα με αντι-ιική δράση

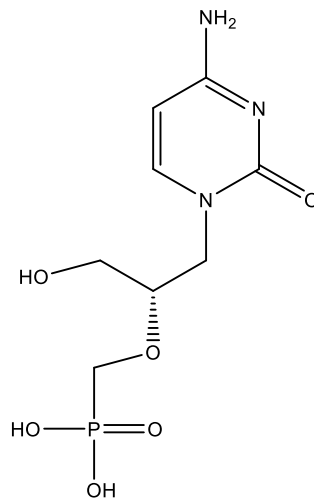
Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα, πέρα από αντικαρκινική δράση, μπορούν να συντεθούν με σκοπό την καταπολέμηση ιογενών λοιμώξεων. Κατά αντιστοιχία με το μηχανισμό δράσης στα καρκινικά κύτταρα, τα αντι-ιικά νουκλεοζιτικά ανάλογα μοιάζουν με τους φυσικούς νουκλεοζίτες, λαμβάνουν τις θέσεις τους στις βιολογικές διεργασίες, μιμούνται την δράση των αντιμεταβολιτών και προκαλούν πρόωρες θραύσεις στις αλυσίδες του DNA και του RNA, οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση. Τα αντι-ιικά νουκλεοζιτικά ανάλογα στοχεύουν ως επί το πλείστο τις πολυμεράσες των ιών εμποδίζοντας σε πρώτη φάση την αντιγραφή τους και στη συνέχεια την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής τους. (María J. Laponi, 2016) Υπάρχουν νουκλεοζιτικά ανάλογα για την καταπολέμηση της μόλυνσης από ερπητοϊούς (HSV1 και HSV2), μόλυνση από κυτταρομεγαλοϊό (CMV), από HIV, από ιούς της ηπατίτιδας Β και Γ (HBV, HCV) και από έρπητα ζωστήρα (VZV). ((Ed.), 2009)

➤ Τα πιο γνωστά νουκλεοζιτικά ανάλογα που χορηγούνται για την καταπολέμηση του απλού ερπητοϊού HSV1 και HSV2 είναι τα Idoxuridine (IdU), το Trifluridine (TFT), το Acedurid (Edu), το Brivudin (BVDU), το Vidarabine (Ara-A), το Aciclovir (ACV), το Valacyclovir (Val-ACV), το Famciclovir (FCV), το Ganciclovir (DHPG) και το Valganciclovir (Val-DHPG) (Σχήμα 15). ((Ed.), 2009; H. J. Schaeffer, 1978; Sariri, 2003; Ruchira Maiti Sarbajna, 2011)



Σχήμα 15: Δομές νουκλεοζιτικών αναλόγων που χορηγούνται κατά του απλού ερπητοϊού HSV1 και HSV2

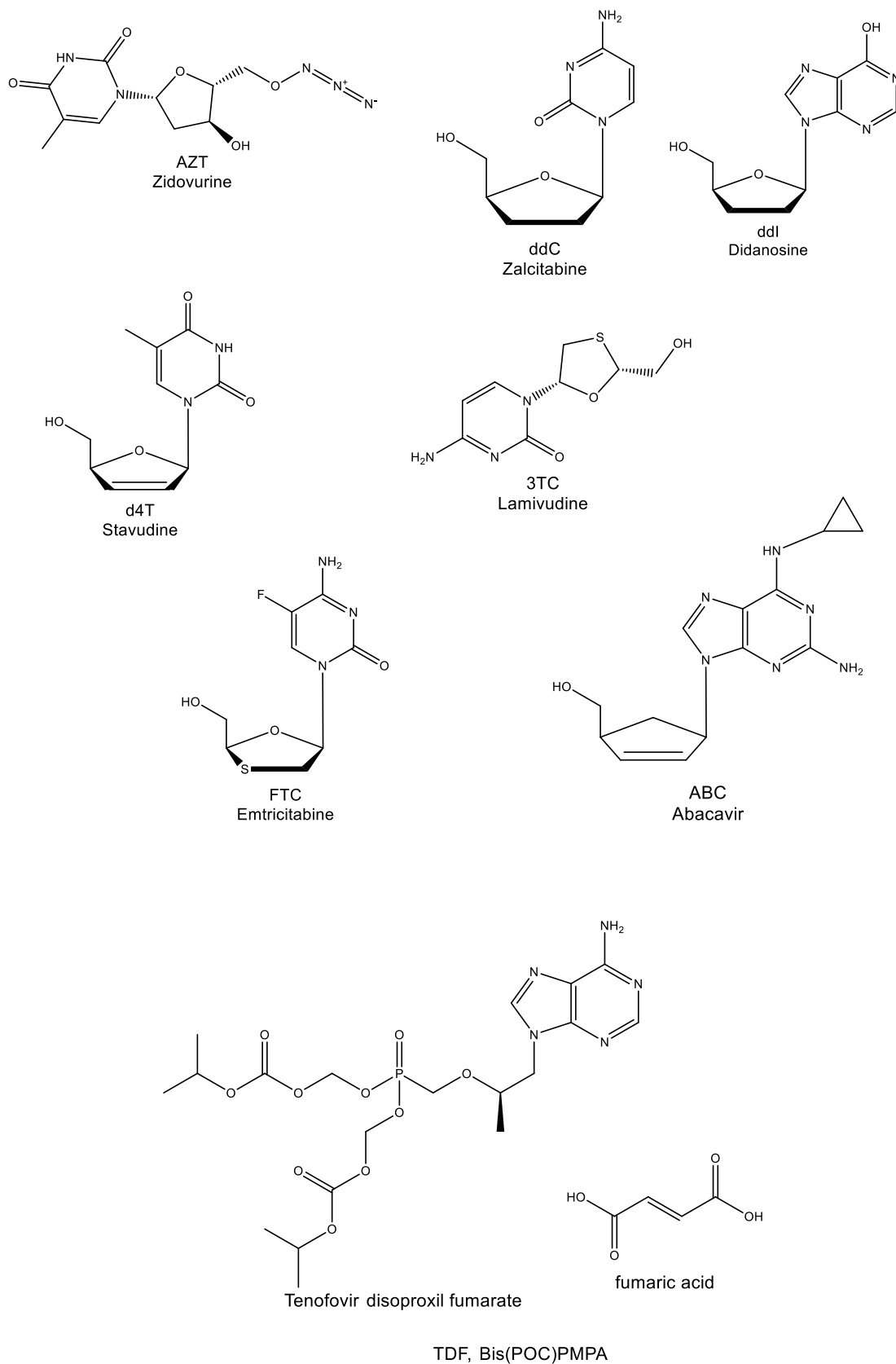
➤ Για τον ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (Human Cytomegalovirus, HCMV), γνωστά νουκλεοζιδικά ανάλογα με εξαιρετική δράση εναντίον του αποτελούν το Ganciclovir (DHPG), το Valganciclovir (Val-DHPG) και το Cidofovir ((S) – HMPC) (Σχήμα 16). ((Ed.), 2009; A.Markham, 1994)



(S) - HMPC
Cidofovir

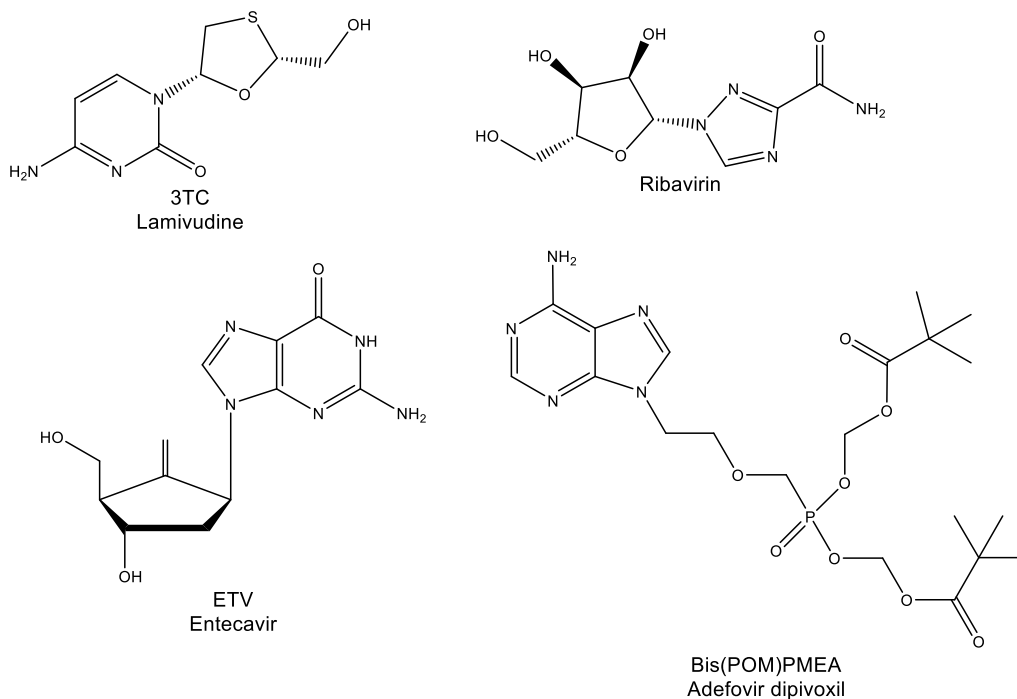
Σχήμα 16: Δομή Cidofovir

➤ Για την εύρεση θεραπείας για τον ιό HIV (Human Immunodeficiency Virus) χρησιμοποιούνται τα Zidovurine (AZT), Zalcitabine (ddC), Didanosine (ddl), Stavudine (d4T), Lamivudine (3TC), Emtricitabine (FTC), Abacavir (ABC) και Tenofovir disoproxil fumarate (TDF, Bis(POC)PMPA) (Σχήμα 17), και φαίνεται να έχουν ικανοποιητική δράση έναντι του ρετροϊού. Στην περίπτωση του HIV, τα νουκλεοζιδικά ανάλογα στοχεύουν στην αντίστροφη μεταγραφάση του ιού και πιο συγκεκριμένα, στην αναστολή της. ((Ed.), 2009; Y. Törnevik, 1995; S. Manta, 2014)



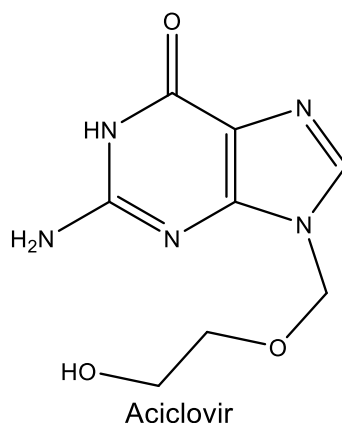
Σχήμα 17: Δομές νουκλεοζιδικών αναλόγων που χορηγούνται κατά του HIV

➤ Εξαιρετική δράση ενάντια στους ιούς της ηπατίτιδας Β και Γ εμφανίζει το Lamivudine (3TC), το Ribavirin, Entecavir (ETV) και το Adefovir dipivoxil (Bis(POM)PMEA) (Σχήμα 18). ((Ed.), 2009; (Ed.), 2006; Neeraj Shakya, 2012)



Σχήμα 18: Δομές νουκλεοζιτικών αναλόγων που χορηγούνται κατά της ηπατίτιδας Β και Γ

➤ Το πιο κοινό νουκλεοζιτικό ανάλογο ενάντια του ερπητοϊού VZV είναι η **Ακυκλοβίρη** (ακυκλογουανοσίνη, aciclovir) (Σχήμα 19). Όπως προδίδει και το όνομα της, είναι ανάλογο πουρίνης και συγκεκριμένα της γουανίνης. Όταν ενσωματωθεί στην αλυσίδα, προκαλεί τον τερματισμό της επιμήκυνσής της. Έχει υψηλή ειδικότητα και υψηλό θεραπευτικό δείκτη, επομένως επηρεάζει μόνο κύτταρα προσβελημένα από τον ιό. Αυτό το συνιστά φάρμακο χαμηλής τοξικότητας. (McGuirt, 1982)



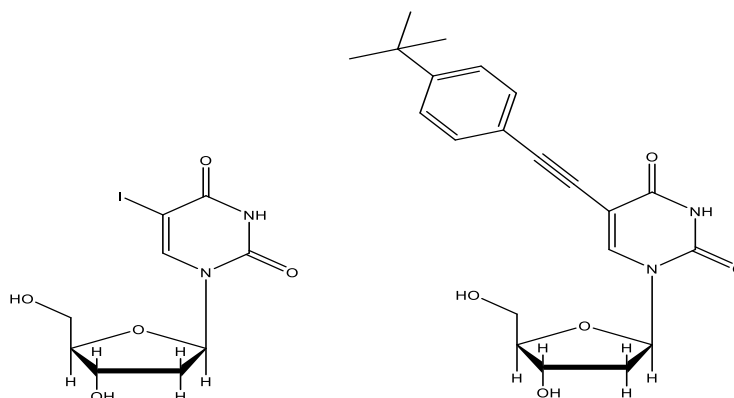
Σχήμα 19: Δομή Aciclovir

2. Σκοπός

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι νουκλεοζίτες διαδραματίζουν βασικό ρόλο στις βιολογικές διεργασίες, που περιλαμβάνουν τη διατήρηση, την αντιγραφή και τη μεταγραφή των πληροφοριών των γονιδίων. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αναστολείς του μεταβολισμού των νουκλεϊκών οξέων ώστε να παρεμποδίσουν την αναπαραγωγή ιών και την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, παρουσιάζοντας με αυτόν τον τρόπο αποτελεσματικούς αντιικούς και αντικαρκινικούς παράγοντες. (Xia Lin, 2221)

Εκτεταμένες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό να γίνουν μετατροπές τόσο στο τμήμα της ετεροκυκλικής βάσης όσο και στο τμήμα του σακχάρου για την εύρεση νέων νουκλεοζιτικών αναλόγων με καλύτερη βιολογική δράση και λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Νέες τάξεις φούρανο-νουκλεοζιδίων με τροποποιημένη βάση, όπως οι C5-υποκατεστημένοι νουκλεοζίτες πυριμιδίνης έχουν ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες.

Βασιζόμενοι στα παραπάνω στοιχεία, θεωρήθηκε ότι η σύνθεση και η τροποποίηση ενός φουρανονουκλεοζιτη με βάση την ιωδοουρακίλη (5-(2'-δεοξυ-β-D-φουρανοζυλο)ιωδοουρακίλη) (Σχήμα 20) θα αποτελέσει αντικείμενο έρευνας για πιθανή κυτταροτοξική δράση και ενδεχομένως για κάποιο αντικαρκινικό ή αντι-ϊικό φάρμακο. Το νουκλεοζιτικό ανάλογο που συντέθηκε, είναι η 5-(2'-δεοξυ-β-D-φουρανοζυλο)-(τερτ-βουτυλο-φαινυλοαιθυνο) ουρακίλη (Σχήμα 20), όπου μετά τη σύνθεση ακολούθησε χρωματογραφική απομόνωση του προϊόντος και προσδιορισμός του με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) πρωτονίου και άνθρακα.

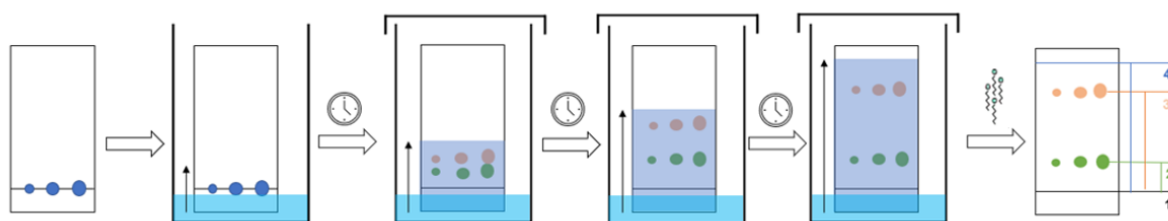


Σχήμα 20: Δομή της 5-(2'-δεοξυ-β-D-φουρανοζυλο) ιωδοουρακίλης (αριστερά) και της 5-(2'-δεοξυ-β-D-φουρανοζυλο)-(τερτ-βουτυλο-φαινυλοαιθυνο) ουρακίλης (δεξιά).

3. Τεχνικές – Πειραματική μεθοδολογία

3.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC (Thin Layer Chromatography)

Ο έλεγχος των αντιδράσεων έγινε με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC). Αυτή η χρωματογραφική τεχνική διαχωρισμού βασίζεται στη διαφορετική συγγένεια των συστατικών του μείγματος με την στερεή στατική φάση, η οποία είναι συνήθως silica gel ή alumina ακινητοποιημένη σε πλακίδια αλουμινίου πάχους 0,2 mm, σε σχέση με τη συγγένειά τους για την υγρή κινητή φάση. Σταγόνες διαλύματος του δείγματος τοποθετούνται σε σημείο του πλακιδίου κοντά στο κάτω άκρο του. Αφού εξατμιστεί ο διαλύτης το πλακίδιο τοποθετείται όρθιο σε αεροστεγή θάλαμο που περιέχει κατάλληλο σύστημα διαλυτών (διαλύτης ανάπτυξης της TLC) μεριμνώντας το ύψος του υγρού να είναι κάτω από αυτό της κηλίδας του δείγματος. Στη συνέχεια οι διαλύτες ανέρχονται βάσει τριχοειδών φαινομένων, μέχρι το μέτωπο του διαλύτη ανάπτυξης να φτάσει λίγα χιλιοστά πριν την κορυφή του πλακιδίου. Έπειτα, η πλάκα απομακρύνεται από το θάλαμο ανάπτυξης και ξηραίνεται με ρεύμα αέρα. Στην **Εικόνα 1** απεικονίζεται ο τρόπος εφαρμογής της μεθόδου TLC. Στο τελευταίο πλακίδιο της εικόνας, φαίνεται το αποτέλεσμα μετά το πέρας της χρωματογραφίας. Στο σημείο 1 είναι η αρχή της χρωματογραφίας (το σημείο όπου τοποθετήθηκαν οι σταγόνες) και το σημείο 4 σημαίνει το πέρας της χρωματογραφίας και ονομάζεται «μέτωπο του διαλύτη».



Εικόνα 1: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC

Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα, ανάλογα με την πολικότητά τους και τη χημική συγγένεια που έχουν με την silica gel, και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Με βάση την απόσταση που έχει διανύσει το κάθε μόριο στη στατική φάση

πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός του συντελεστή κατακράτησης Rf. Ο συντελεστής Rf ορίζεται ως το πηλίκο της απόστασης που διανύθηκε από την ένωση προς την απόσταση που διανύθηκε από το σύστημα των διαλυτών. Η τιμή Rf ενός συγκεκριμένου μορίου έχει ορισμένη τιμή σε για συγκεκριμένο διαλύτη ανάπτυξης και είναι πολύ χρήσιμη για την ταυτοποίηση μιας ουσίας. Ενώσεις που περιέχουν πολικές ομάδες αλληλεπιδρούν ισχυρά με την πολική στατική φάση και κινούνται πιο αργά, φτάνοντας σε μικρότερο ύψος στην πλάκα, σε σχέση με τις λιγότερο πολικές ουσίες. Η παρατήρηση των κηλίδων γίνεται με εξέταση στο υπεριώδες φως (254 ή 356 nm), ή έπειτα από ψεκασμό με διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 30% ή άλλο κατάλληλο αντιδραστήριο για τις ενώσεις που δεν απορροφούν στο υπεριώδες.

Τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

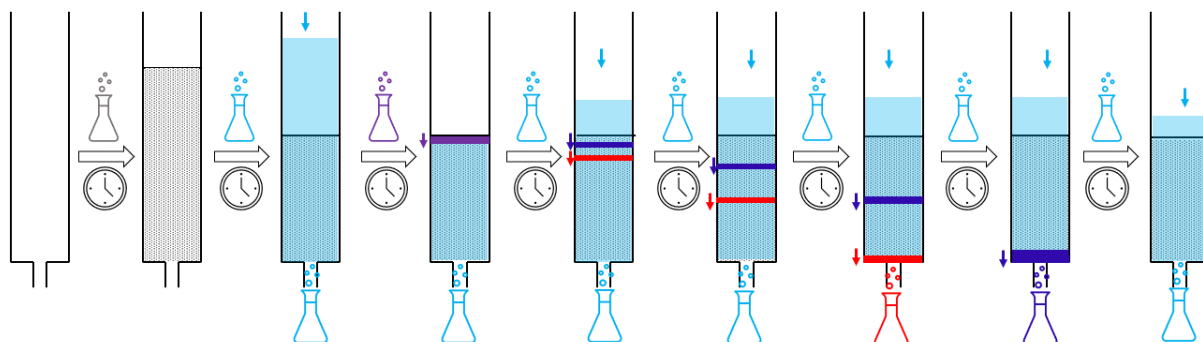
- Διάλυμα Α: Εξάνιο / Οξικός Αιθυλεστέρας 60 / 40
- Διάλυμα Β: Μεθανόλη / Ακετονιτρίλιο 5 / 95
- Διάλυμα Γ: Εξάνιο / Οξικός Αιθυλεστέρας 50 / 50
- Διάλυμα Δ: Μεθανόλη / Ακετονιτρίλιο 2 / 98

3.2. Χρωματογραφία στήλης

Κάθε φορά που ολοκληρώνεται μια αντίδραση, ακολουθεί το επόμενο βήμα, το οποίο είναι ο καθαρισμός της ένωσης-στόχου από διαλύτες και παραπροϊόντα. Η τεχνική που χρησιμοποιείται για αυτόν τον σκοπό είναι η χρωματογραφία στήλης (flash chromatography), στην οποία γίνεται εισαγωγή αέρος υπό πίεση σε silica gel (240-400, Merck grade).

Η χρωματογραφία στήλης είναι μια τεχνική διαχωρισμού, η οποία βασίζεται στην προσρόφηση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μία ακίνητη φάση, συνήθως silica gel και την έκλουσή τους με μία ακίνητη φάση, που είναι είτε ένας διαλύτης είτε ένα μείγμα διαλυτών. Οι πολικές ενώσεις προσροφούνται και προσκολλώνται στην κορυφή της στήλης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την χρήση πιο πολικών διαλυτών ώστε να συμπαρασυρθούν και να διαχωριστούν στην στήλη. Οι άπολες ουσίες συνήθως εκλούνται πιο εύκολα από την στήλη με την χρήση διαλυτών χαμηλής πολικότητας. Για την επιτυχή έκλυση των ουσιών από

την στήλη, πραγματοποιούνται διαδοχικά περάσματα αυτής με διαλύτες σταδιακά αυξανόμενης πολικότητας κάθε φορά.



Εικόνα 2: Μεθοδολογία της χρωματογραφίας

Στην **Εικόνα 2** φαίνεται η μεθοδολογία της χρωματογραφίας στήλης. Στην συγκεκριμένη χρωματογραφία, η στατική φάση τοποθετείται εντός μιας στήλης κατασκευασμένης από αδρανές υλικό (ύαλος, πηκτική πυριτίας, ανοξειδωτος χάλυβας). Το δείγμα, αφού διαλυτοποιηθεί πολύ καλά σε κατάλληλο διαλύτη, τοποθετείται στην αρχή της στήλης (κορυφή) και η κινητή φάση διέρχεται μέσω της στατικής φάσης είτε υπό πίεση είτε λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες και απομονώνονται.



Εικόνα 3: Παράδειγμα χρωματογραφίας στήλης

Τα συστήματα διαλυτών έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- Διάλυμα Α: Εξάνιο / Οξικός Αιθυλεστέρας 60 / 40
- Διάλυμα Β: Μεθανόλη / Ακετονιτρίλιο 5 / 95
- Διάλυμα Γ: Εξάνιο / Οξικός Αιθυλεστέρας 50 / 50
- Διάλυμα Δ: Μεθανόλη / Ακετονιτρίλιο 2 / 98

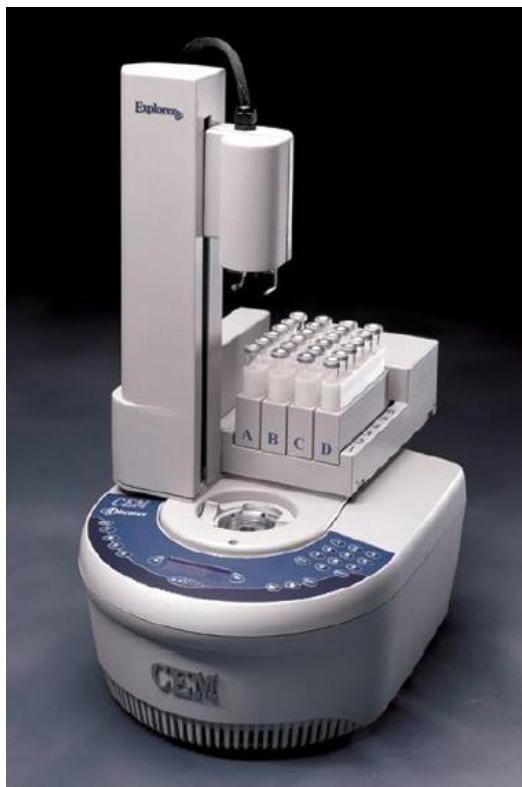
3.3. Ξήρανση διαλυτών

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

Η ξήρανση του ακετονιτριλίου γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA (molecular sieves). Το διχλωρομεθάνιο αποστάχθηκε παρουσία πεντοξειδίου του φωσφόρου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη που περιείχε μοριακά κόσκινα 4\AA , όπου και αποθηκεύτηκε. Η δε πυριδίνη αποστάχθηκε παρουσία υδροξειδίου του καλίου και το απόσταγμα συλλέχθηκε σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 4\AA , όπου και αποθηκεύτηκε.

3.4. Θέρμανση με την χρήση μικροκυμάτων

Κάποιες από τις αντιδράσεις απαιτούσαν τη χρήση θέρμανσης μέσω μικροκυμάτων (microwaves, MW), τα οποία αποτελούν μια μορφή ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας που αντιστοιχεί στα χαμηλότερα επίπεδα συχνότητας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη συσκευή MW, και συγκεκριμένα το μοντέλο CEM Discover (Εικόνα 4), με προσάρτηση τροφοδότη Explorer, που λειτουργεί σε συχνότητα 2,45 GHz, με ισχύ ακτινοβολίας από 0 έως 300 Watt, και μέγιστη εσωτερική πίεση 250 PSI.



Εικόνα 4: Η συσκευή μικροκυμάτων CEM microwave

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρύτατα καθώς δίνει υψηλότερες αποδόσεις σε μικρότερο χρόνο και με μικρότερη κατανάλωση διαλυτών και ενέργειας. Αρχικά εισάγεται το σωληνάριο με το μείγμα της αντίδρασης στην υποδοχή της συσκευής θέρμανσης με μικροκύματα, και στη συνέχεια επιλέγεται η θερμοκρασία, η ισχύς ακτινοβολίας και ο χρόνος θέρμανσης. Το φάσμα των μικροκυμάτων στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα αντιστοιχεί σε μήκη κύματος μεταξύ 1 cm και 1 m και συχνότητες από 30 GHz έως 300 MHz. Το πλεονέκτημα της χρήσης μικροκυμάτων, σε σχέση με τη συμβατική θέρμανση, είναι η ολοκλήρωση πολλών αντιδράσεων σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα με περιορισμό, σε πολλές περιπτώσεις, των παραγόμενων παραπροϊόντων.

3.5. Ταυτοποίηση ενώσεων με φασματοσκοπία NMR

Η ταυτοποίηση της δομής των νεοσυντιθέμενων οργανικών ενώσεων έγινε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Αυτή είναι η πλέον σημαντική τεχνική για τον χαρακτηρισμό της δομής μιας ένωσης, καθώς αποκαλύπτει την ειδική

τοποθέτηση και τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων. Η φασματοσκοπία NMR βασίζεται στο φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, σύμφωνα με το οποίο οι πυρήνες εντός ενός μαγνητικού πεδίου απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Το σήμα NMR λαμβάνεται από τη διέγερση των πυρήνων μέσω ραδιοκυμάτων. Η απορρόφηση και η επανεκπομπή ενέργειας εξαρτάται από τον παρατηρούμενο πυρήνα, με αποτέλεσμα οι συχνότητες της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας να είναι χαρακτηριστικές του πυρήνα. Το σήμα NMR που λαμβάνεται βρίσκεται, αρχικά, στο πεδίο του χρόνου αλλά προκειμένου να μελετηθεί μετατρέπεται, με τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier, στο πεδίο της συχνότητας. Το τελικό φάσμα NMR αποτελείται από μία πληθώρα κορυφών, οι οποίες συντονίζονται σε διάφορες συχνότητες. Μπορεί, επομένως, να αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ακριβούς θέσης των λειτουργικών ομάδων και να δώσει πολύτιμες πληροφορίες για τον ανθρακικό σκελετό και για το μόριο ως σύνολο. Βρίσκει εφαρμογή σε κάθε πυρήνα, ο οποίος έχει περιττό μαζικό αριθμό και/ή περιττό ατομικό αριθμό, όπως είναι οι πυρήνες πρωτονίου (^1H NMR) και άνθρακα (^{13}C NMR).

Τα φάσματα ^1H NMR ελήφθησαν με χρήση δευτεριομένων διαλυτών όπως χλωροφόρμιο (CDCl_3), διμεθυλσουλφοξείδιο [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}_4$] και μεθανόλη (CD_3OD). Η πολλαπλότητα των σημάτων σημειώνεται ως s (single), d (doublet), t (triplet), dd (doublet doublet), dt (doublet triplet) και m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

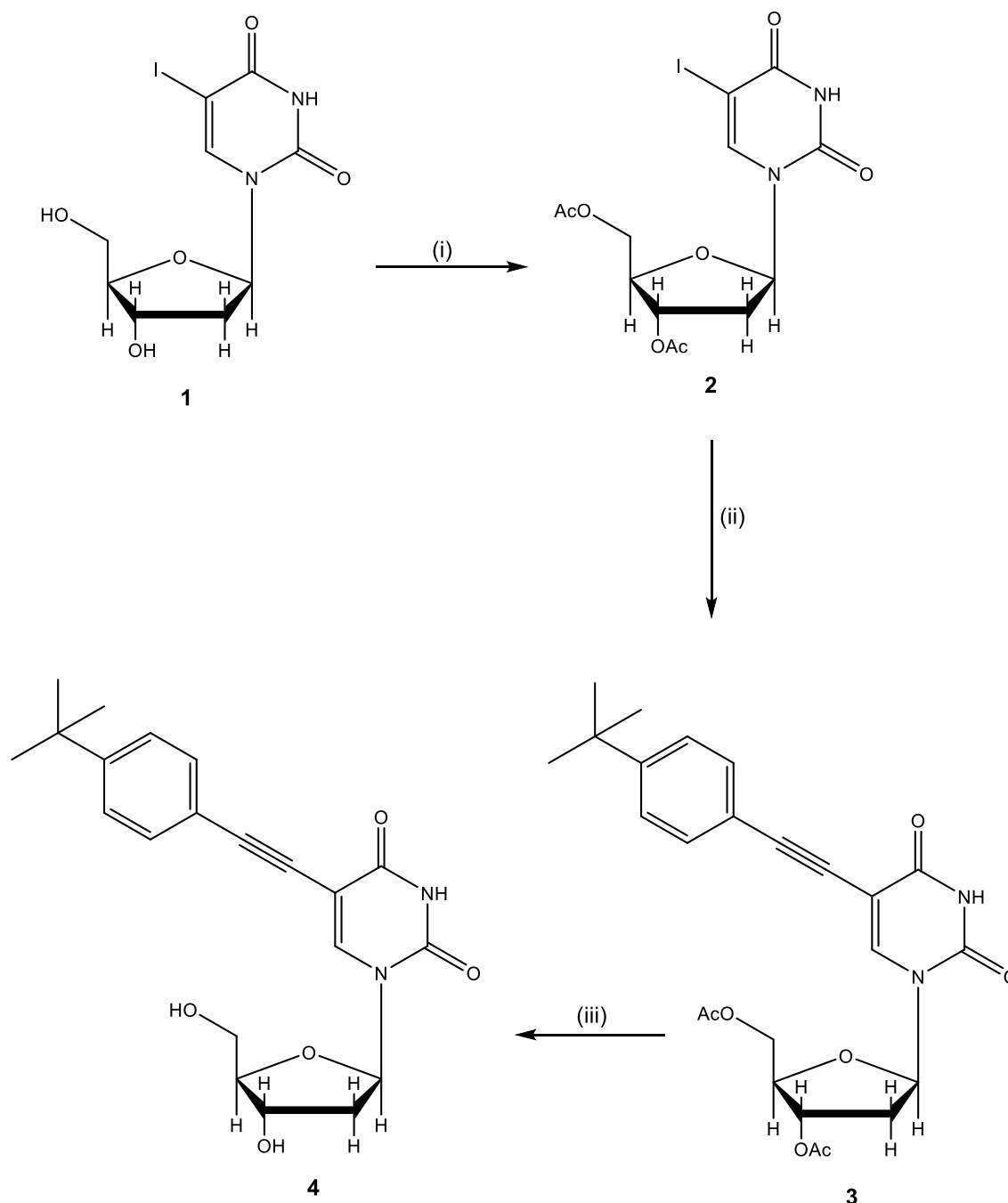
Τα φάσματα ^{13}C NMR καταγράφηκαν στο ίδιο φασματόμετρο, χρησιμοποιώντας και πάλι ως δευτεριομένους διαλύτες χλωροφόρμιο (CDCl_3), διμεθυλσουλφοξείδιο [$(\text{CD}_3)_2\text{SO}_4$] και μεθανόλη (CD_3OD).

3.6. Αντιδραστήρια και παρατηρήσεις

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν εμπορικά διαθέσιμα, υψηλής καθαρότητας και χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν. Οι αντιδράσεις που ήταν ευαίσθητες σε οξυγόνο, πραγματοποιήθηκαν υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Για τις αντιδράσεις που απαιτούσαν άνυδρες συνθήκες, τα γυαλικά ξηραίνονταν σε κλίβανο στους 200°C για κάποιες ώρες. Τέλος, ως μέσο συμβατικής θέρμανσης χρησιμοποιήθηκε το ελαιόλουτρο.

4. Πειραματικό μέρος

4.1. Επισκόπηση συνθετικής πορείας



(i) pyridine, acetic anhydride, 80 °C, reflux, 1h, ice bath, MeOH, (ii) DMF, Et₃N, CuI, Pd(PPh₃)₄, 4-acetyl-butyl-phenyl-acetylene, 50 °C, 40 min, microwave (iii) MeOH, NH₃, 24 h.

4.2. Μεθοδολογία σύνθεσης

Η πρώτη ύλη της συνθετικής πορείας, η 5-(2'-δεοξυ-β-D-φουρανοζυλο)ιωδοουρακίλη (**1**), είναι εμπορικά διαθέσιμη και στο πρώτο στάδιο της πειραματικής πορείας πραγματοποιήθηκε η προστασία των υδροξυλίων των C-3 και C-5 με την προσθήκη μιας ακετυλο-ομάδας στο καθένα. Αυτό έγινε παρουσία οξικού ανυδρίτη (Ac₂O) σε πυριδίνη. Η νέα ένωση που προκύπτει είναι η 3',5'-δι-O-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-φουρανόζυλο ιωδοουρακίλη (**2**) με απόδοση 82%. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αντίδραση Sonogashira, από την οποία προέκυψε το προϊόν (**3**). Σε αυτό το στάδιο, η 3',5'-δι-O-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-φουρανόζυλο ιωδοουρακίλη (**2**) διαλύθηκε σε άνυδρο διαλύτη *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και με την προσθήκη του κατάλληλου αλκινίου, της τριαιθυλαμίνης (Et₃N), του τετράκλις τριφαινυλοφωσφορικού παλλαδίου [Pd(PPh₃)₄] (καταλύτης), του ιωδιούχου χαλκού (CuI) (συγκαταλύτης) και του 4-ακετυλο-βουτυλο-φαινόλο-ακετυλενίου, πραγματοποιήθηκε η σύζευξη τους υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων ισχύος 200W για 40 λεπτά στους 50°C, σε αποδόσεις 96%. Τέλος, η ολοκλήρωση της σύνθεσης γίνεται με την αποπροστασία του προϊόντος **3** σε διάλυμα κορεσμένης μεθανόλης με αμμωνία, λαμβάνοντας τον νουκλεοζίτη **4**, σε απόδοση 89 %.

4.3. Σύνθεση της 3',5'-δι-O-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-φουρανόζυλο ιωδοουρακίλης

Η πρώτη αντίδραση που πραγματοποιήθηκε ήταν η προστασία με προσθήκη ακετυλομάδων των υδροξυλίων της 5-(2'-δεοξυ-β-D-φουρανοζυλο)ιωδοουρακίλης (210 g, 0,6 mmol) σε 2,1 mL πυριδίνης υπό ανάδευση με οξικό ανυδρίτη (1,1 mL) στους 80°C για 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστίθεται μεθανόλη (0,24ml) σε πάγο. Για την παραλαβή του προϊόντος, έγινε εκχύλιση του μίγματος της αντίδρασης με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl), ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο θειικό νάτριο (Na₂SO₄) και συμπύκνωση υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) με διαλύτη έκλυσης διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το επιθυμητό προϊόν 3',5'-δι-O-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-φουρανόζυλο ιωδοουρακίλη (**2**) ανακρυσταλλώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα και

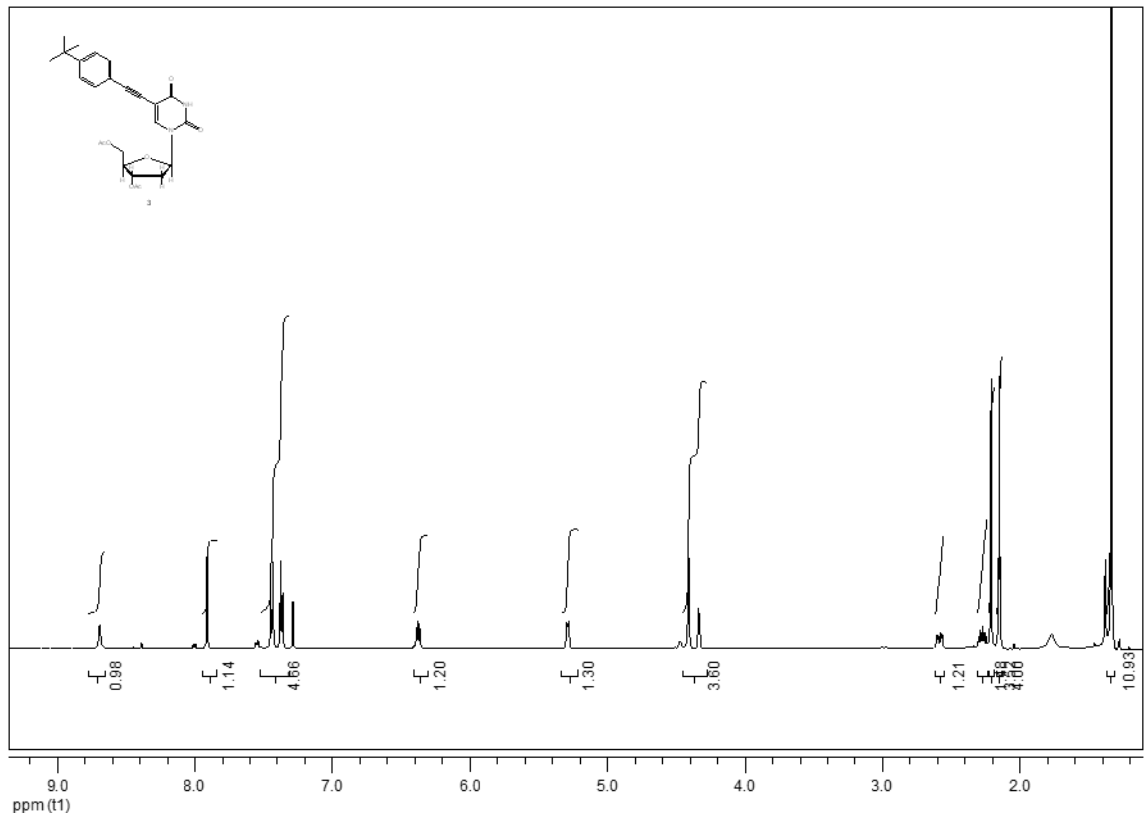
εξάνιο. Ακολούθησε συμπύκνωση υπό κενό μέχρι ξηρού με αποτέλεσμα τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος **2** (218 mg, 0,497 mmol) με απόδοση 82%.

4.4. Σύνθεση της 3',5'-δι-Ο-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-φουρανόζυλο-(τερτ-βουτυλο-φαινυλοαιθυνο) ιωδοουρακίλης (**3**)

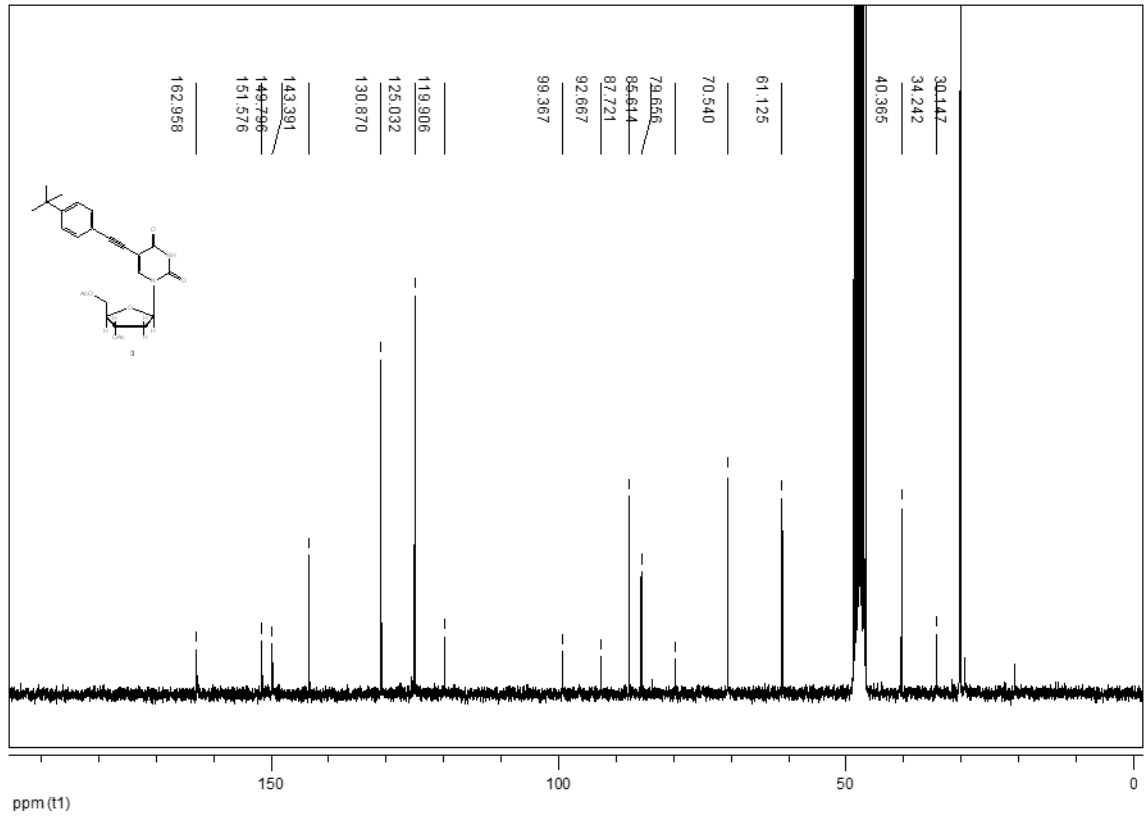
Για τη σύνθεση της 3',5'-δι-Ο-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-φουρανόζυλο-(τερτ-βουτυλο-φαινυλοαιθυνο) ιωδοουρακίλης (**3**) εφαρμόστηκε η μέθοδος Sonogashira με χρήση μικροκυμάτων. Συγκεκριμένα στο διάλυμα της 3',5'-δι-Ο-ακέτυλ-3'-C-δέοξυ-β-D-φουρανόζυλο ιωδοουρακίλης (**2**) (104 mg, 0,237 mmol) σε άνυδρο N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) 0,4 ml προστίθεται το κατάλληλο αλκίνιο, τετράκις (τριφαινυλοφωσφίνο) παλλάδιο [Pd(PPh₃)₄] (27,4 mg, 0,024 mmol), ιωδιούχος χαλκός (CuI) (4,6 mg, 0,024 mmol), τριαιθυλαμίνη (Et₃N) (0,711 mmol, 0,13 mL) και 4-ακετυλο-βουτυλο-φαινυλο-ακετυλενίο (0,711 mmol, 0,13 mL) και στη συνέχεια γίνεται εισαγωγή στη συσκευή μικροκυμάτων σε ισχύ 200 Watt για 40 λεπτά στους 50°C. Για την παραλαβή του προϊόντος, έγινε εκχύλιση του μίγματος της αντίδρασης με οξικό αιθυλεστέρα και κορεσμένο διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl), ξήρανση της οργανικής φάσης με άνυδρο θειικό νάτριο (Na₂SO₄) και συμπύκνωση υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) με διαλύτη έκλουσης διάλυμα διάλυμα 40% οξικού αιθυλεστέρα σε εξάνιο. Το προϊόν ανακρυσταλλώθηκε με οξικό αιθυλεστέρα και εξάνιο. Ακολούθησε συμπύκνωση υπό κενό μέχρι ξηρού με αποτέλεσμα τη λήψη του επιθυμητού προϊόντος **3** (107 mg, 0,228 mmol) με απόδοση 96%.

λ_{\max}	391 nm
$[\alpha]_D$	+4.5

¹H NMR



¹³C NMR

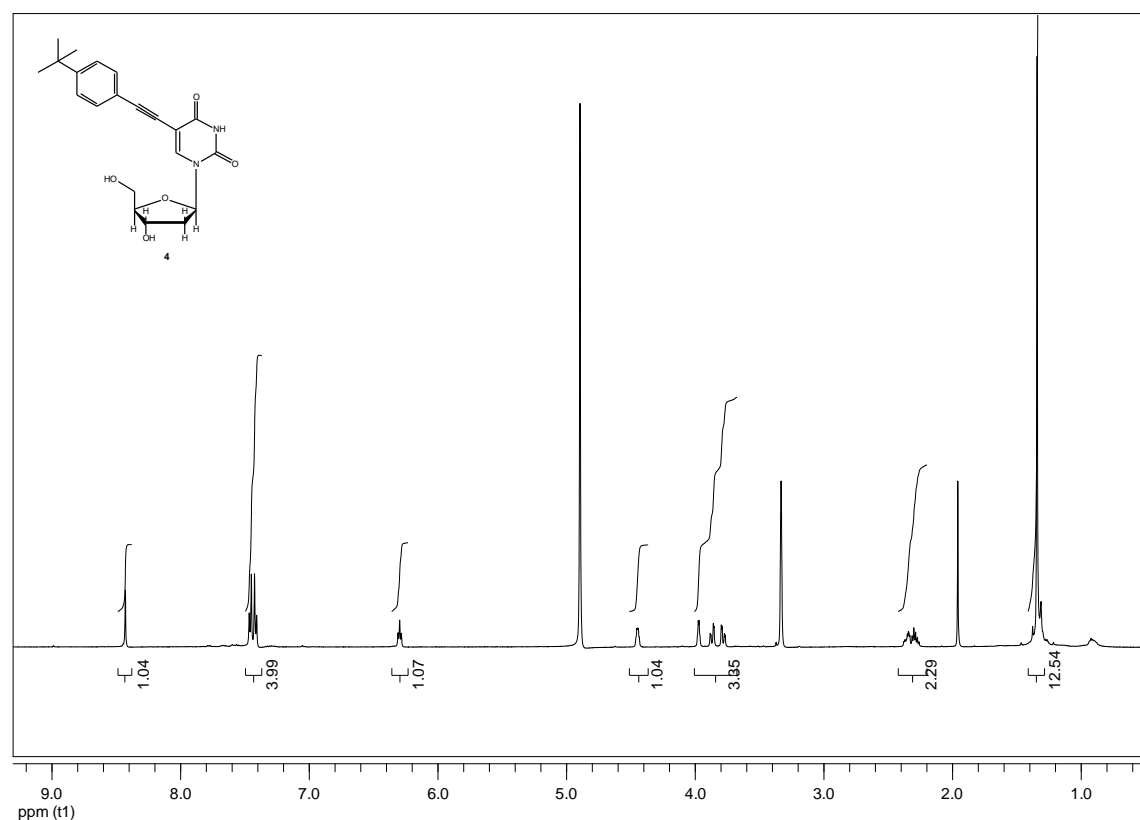


4.5. Σύνθεση της 5-(2'-δεοξυ-β-D-φουρανοζυλο)-(τερτ-βουτυλοφαινυλοαιθυνο) ουρακίλης (4)

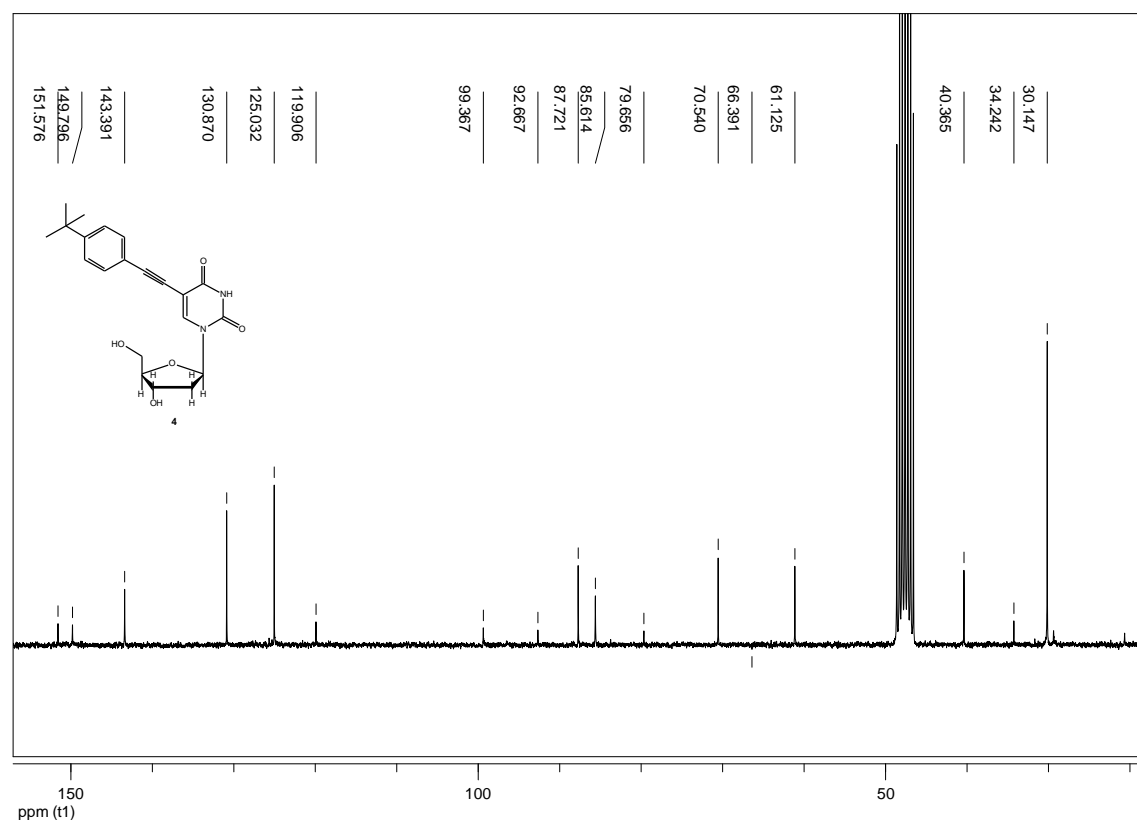
Διάλυμα του προστατευμένου νουκλεοζίτη **3** (100 mg, 0,213 mmol) σε κορεσμένη μεθανολική αμμωνία (9,5 ml) αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό και οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες καθαρίζονται με χρωματογραφία στήλης υπό πίεση, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης διάλυμα 2% μεθανόλης σε διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂), οπότε παραλαμβάνονται το επιθυμητό προϊόν **4** (78,8 mg, 0,205 mmol) σε απόδοση 96%.

λ_{\max}	391 nm
$[\alpha]_D$	+4.5

¹H NMR



¹³C NMR



5. Αποτελέσματα και συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων εστιάζεται στη μελέτη και σύνθεση νέων αντι-ιικών και αντικαρκινικών παραγόντων, με αυξημένη δραστικότητα, μειωμένη τοξικότητα σε υγιή κύτταρα και επιλεκτικότητα στη δράση τους. Όλη αυτή η ερευνητική τάση οδήγησε και στην ανάπτυξη νουκλεοζιδικών αναλόγων με αυτές τις ιδιότητες, με σκοπό τη χρήση τους ως φάρμακα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ενός δεοξυ φουρανονουκλεοζίτη με τροποποίηση στη βάση με σκοπό τον έλεγχο της για πιθανή κυτταροτοξική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν απλή, γρήγορη και με καλές αποδόσεις στις αντιδράσεις κάθε βήματος. Όλες οι νέες ενώσεις προσδιορίστηκαν αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H NMR και ^{13}C NMR.

Μετά την επιβεβαίωση της επιτυχίας της πειραματικής πορείας, επόμενο στόχο αποτελεί η βιολογική αποτίμηση των τελικών προϊόντων ως προς την πιθανή κυτταροτοξική δράση τους. Η ίδια συνθετική πορεία δίνει τη δυνατότητα εισαγωγής διαφορετικών υποκαταστατών στις θέσεις 2 και 4 της πυριμιδίνης, προκειμένου να συντεθούν παράγωγα αυξημένης βιολογικής δράσης, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών ενώσεων.

Βιβλιογραφία

(Ed.), **M.J. O'Neil. 2006.** *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals.* New Jersey : J. Roman. Merck & Co., Inc.: Whitehouse Station, 2006.

(Ed.), **S.C. Sweetman. 2009.** *Martindale: The Complete Drug Reference.* 37th edition, Electronic version. London : Pharmaceutical Press, 2009.

A.Markham, D. Faulds. 1994. Ganciclovir: an update of its therapeutic use in cytomegalovirus infections. *Drugs.* 1994, Τόμ. 48, σσ. 455–484.

Ann H. Cory, Vicente Samano, Morris J. Robins, Joseph G. Cory. 1994. ' -deoxy-2'-methylene derivatives of adenosine, guanosine, tubercidin, cytidine and uridine as inhibitors of L1210 cell growth in culture. *Biochemical Pharmacology.* 1994, Τόμ. 47, 2, σσ. 365-371.

C. H. Baker, J. Banzon, J. M. Bollinger, J. Stubbe, V. Samano, M. J. Robins, B. Lippert, E. Jarvi, R. Resvick. 1991. 2'-Deoxy-2'-methylenecytidine and 2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine 5'-diphosphates: potent mechanism-based inhibitors of ribonucleotide reductase. *Journal of Medicinal Chemistry.* 1991, Τόμ. 34, 6, σσ. 1879-1884.

David L. Nelson, Michael M. Cox. 2011. *Lehninger Βασικές Αρχές Βιοχημείας.* 2011.

H. J. Schaeffer, L. Beauchamp, P. de Miranda, G. B. Elion, D. J. Bauer, P. Collins. 1978. 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature.* 1978, σσ. 583-585.

Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Gregory J. Gatto Jr., Lubert Stryer. 2015. *Biochemistry W. H. Freeman.* 2015.

K. Yamagami, A. Fujii, M. Arita, T. Okumoto, S. Sakata, A. Matsuda, T. Ueda, T. Sasaki. 1991. Antitumor activity of 2'-deoxy-2'-methylidenecytidine, a new 2'-deoxycytidine derivative. *Cancer Research.* 1991, Τόμ. 51, 9, σσ. 2319-2323.

L. G. Wade, Jr. 2010. *Organic Chemistry.* Athens : Prentice Hall, 2010.

Lubert Stryer, Jeremy Berg. 1995. *Biochemistry.* s.l. : Palgrave Macmillan, 1995.

María J. Lapponi, Cintia W. Rivero, María A. Zinni, Claudia N. Britos. Jorge A. Trelles. 2016. New developments in nucleoside analogues biosynthesis: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2016, Τόμ. 133, σσ. 218-233.

McGuirt, PV, Furman, PA., 1982. Acyclovir inhibition of viral DNA chain elongation in herpes simplex virus-infected cells. *The American Journal of Medicine.* 1982, σσ. 69-71.

McMurry, John. 1984-1996. *Organic Chemistry.* Cornell : Brooks/Cole Publishing Company, 1984-1996.

Neeraj Shakya, Satish VEDI, Chao Liang, Babita Agrawal, D. Lorne Tyrrell, Rakesh Kumar. 2012. A new class of pyrimidine nucleosides: inhibitors of hepatitis B and C viruses. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2012, Τόμ. 22, σσ. 6475–6480.

Peter Vollhardt, Neil Schore. 2012. *Organic Chemistry*. New York : W. H. Freeman and Company, 2012.

Plunkett, W., P. Huang, Y. Z. Xu, V. Heinemann, R. Grunewald and V. Gandhi. 1995. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Seminars in Oncology*. 1995, σσ. 3-10.

Prachayasittikul S, Pingaew R, Worachartcheewan A, Sinthupoom N, Prachayasittikul V, Ruchirawat S, et al. 2016. Roles of Pyridine and Pyrimidine Derivatives as Privileged Scaffolds in Anticancer Agents. *Mini-Reviews Medicinal Chemistry*. 2016, Τόμ. 17, 10, σσ. 869–901.

Renée Pontikis, Junior Wolf, Claude Monneret, Jean-Claude Florent. 1995. A new route to 2'-C-methylene nucleoside analogs, inhibitors of ribonucleotide reductase. *Tetrahedron Letters*. 1995, Τόμ. 36, 20, σσ. 3431-3582.

Ruchira Maiti Sarbajna, A. Preetam, A. Sivalakshmi Devi, M. V. Suryanarayana, Madhuresh Sethi & Debashish Dutta. 2011. Studies on Crystal Modifications of Ganciclovir. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2011, σσ. 141-154.

S. Manta, C. Kiritsis, A. Dimopoulou, V. Parmenopoulou, N. Kollatos, A. Tsotinis. D. Komiotis. 2014. Unsaturation: An Important Structural Feature to Nucleosides' Antiviral Activity. *Anti-Infective Agents*. 2014, Τόμ. 12, σσ. 2-57.

S. T. Lin, M. Z. Luo, M. C. Liu, R. H. Clarkatzenburg, Y. C. Cheng, W. H. Prusoff, W. R. Mancini, G. I. Birnbaum, E. Gabe, J. J. Giziewicz. 1991. 2'-deoxy-2'-hydroxylaminocytidine: A new antitumor nucleoside. *Medicinal Chemistry*. 1991, Τόμ. 34, σ. 2607.

Sariri, Reyhaneh, Khalili, Gholamhosein. 2003. A novel approach to the synthesis of the purine anti-viral agent gancyclovir. *Indian Journal of Chemistry* . 2003, σσ. 651-654.

Sasaki, Akira Matsuda & Takuma. 2004. Antitumor activity of sugar-modified cytosine nucleosides. *Cancer Science*. 2004, Τόμ. 95, 2, σσ. 105-111.

U. G. Bhat, B. Pandit, A. L. Gartel. 2010. Compound enhances cancer-killing properties of agent in trials. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2010.

Vicky G. Tsirkone, Evangelia Tsoukala, Christos Lamprakis, Stella Manta, Joseph M. Hayes, Vicky T. Skamnaki, Christina Drakou, Spyros E. Zographos, Dimitri Komiotis and Demetres D. Leonidas. 2010. 1-(3-Deoxy-3-fluoro-β-D-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: kinetic, crystallographic and modelling studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010, 18, σσ. 3413-3425.

Vivian Wai Yan Lui, Cecilia Pik Yuk Lau, Crystal Sao Fong Cheung, Kakiu Ho, Margaret Heung, Ling Ng, Suk Hang Cheng, Bo Hong, Sai-Wah Tsao,

Chi ManTsang, Kenny Ieng Kit Lei, Yasundo Yamasaki, Akira Mita, Anthony T.C. Chan. 2010. An RNA-directed nucleoside anti-metabolite, 1-(3-C-ethynyl-beta-d-ribo-pentofuranosyl)cytosine (ECyd), elicits antitumor effect via TP53-induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) downregulation. *Biochemical Pharmacology*. 2010, Τόμ. 79, 12, σσ. 1772-1780.

Xia Lin, Chunxian Liang, Lianjia Zou, Yanchun Yin, Jianyi Wang, Dandan Chen, Weisen Lan. 2021. Advance of structural modification of nucleosides scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021, Τόμ. 214, σσ. 1-21.

Y. Törnevik, B. Ullman, J. Balzarini, B. Wahren, S. Eriksson. 1995. Cytotoxicity of 3'-azido-3'-deoxythymidine correlates with 3'-azidothymidine-5'-monophosphate (AZTMP) levels, whereas anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity correlates with AZTTP levels in cultured CEM T-lymphoblastoid cells. *Biochemical Pharmacology*. 1995, σσ. 829-837.