



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη του RNA μέσω της Σύνθεσης Μικρών Οργανικών
Μορίων**

**ΠΑΝΟΥΛΑ ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2012

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη του RNA μέσω της Σύνθεσης Μικρών Οργανικών Μορίων

ΠΑΝΟΥΛΑ ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΥ

A.M.:

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Αθανάσιος Γιωτάκης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Αθανάσιος Γιωτάκης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Διονύσιος Βουρλούμης, Διευθυντής Ερευνών ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Γεώργιος Βασιλικογιαννάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Αθανάσιος Γιωτάκης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γεώργιος Βασιλικογιαννάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Διονύσιος Βουρλούμης, Διευθυντής Ερευνών ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Κόκοτος Γεώργιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Δημήτριος Γεωργιάδης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Αλέξανδρος Λ. Ζωγράφος, Λέκτορας ΑΠΘ

Πιτσινός Εμμανουήλ, Ερευνητής Α΄ ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 01/02/2013

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αφορά σε ανάπτυξη στρατηγικών για τη σύνθεση καινοτόμων αναλόγων αμινογλυκοζιτών που δυνητικά θα έχουν βελτιωμένη αντιβιοτική δράση και εκλεκτικότητα πρόσδεσης στο αποκωδικοποιητικό κέντρο του βακτηριακού ριβοσωματικού RNA (A-site). Αφού αναφερθούν αντιπροσωπευτικά ανάλογα αμινογλυκοζιτών που υπάρχουν ήδη στη βιβλιογραφία, η προσοχή εστιάζεται σε στρατηγικές σύνθεσης κατάλληλα υποκατεστημένων αναλόγων της 2-δεοξυστρεπταμίνης (2-DOS), η οποία και αποτελεί τον κεντρικό διαμινοκυκλοεξιτολικό δακτύλιο στους περισσότερους φυσικούς αμινογλυκοζίτες. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ορθογωνικότητα των προστατευτικών ομάδων όλων των αναλόγων, ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη ευελιξία στην υποκατάστασή τους. Συγκεκριμένα, με πρώτη ύλη τον αμινογλυκοζίτη νεομυκίνη Β, ο οποίος έχει σημαντική αντιβιοτική δράση, εξετάστηκαν εκτεταμένα κατάλληλοι συνδυασμοί προστατευτικών ομάδων στο δακτύλιο της 2-DOS, ώστε να μπορεί να προκύψει κατά βούληση περαιτέρω τροποποίησή της. Εν συνεχεία, έγινε εφαρμογή των ορθογωνικών αυτών στρατηγικών στη σύνθεση αντιπροσωπευτικών μονο-, δι-, τρι- και τετρα-υποκατεστημένων αναλόγων της 2-DOS. Παράλληλα κατά τη σύνθεση των νέων αναλόγων της 2-DOS, έγινε χρήση των οξαζολιδινονών ως φαρμακοφόρων ομάδων, αλλά και της 1,3-διπολικής κυκλοπροσθήκης για την εισαγωγή τριαζολικού δακτυλίου. Σε ορισμένα νεοσυντιθέμενα ανάλογα της 2-DOS εξετάστηκε η αντιβιοτική δράση με *in vitro* πειράματα, τόσο στο σύνολο του βακτηριακού ριβοσώματος όσο και στο αποκωδικοποιητικό του κέντρο (A-site), δίνοντας υποσχόμενα αποτελέσματα και τις πρώτες χρήσιμες πληροφορίες για την περαιτέρω διερεύνηση της σχέσης δομής-βιολογικής δραστηριότητας.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Χημική Βιολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: αντιβιοτικά, αμινογλυκοζίτες, RNA, 2-δεοξυστρεπταμίνη (2-DOS), ανάλογα 2-δεοξυστρεπταμίνης (2-DOS)

ABSTRACT

This thesis refers to the development of strategies concerning the synthesis of novel aminoglycoside analogues that are expected to exhibit improved antibiotic activity and binding selectivity towards the decoding site of the bacterial ribosomal RNA (A-site). After quoting representative examples from the literature, we focused on synthetic strategies of properly substituted 2-deoxystreptamine (2-DOS) analogues, since 2-DOS consists the diaminocyclohexitol core of most natural aminoglycosides. Great emphasis was given to the orthogonal protection of all these analogues, in order to achieve higher flexibility in their functionalization. Particularly, we used as starting material the aminoglycoside neomycin B, which demonstrates considerable antibiotic activity, and we examined in detail several suitable combinations of protecting groups regarding the 2-DOS scaffold, in order to accomplish further variability in the ring's substitution. Furthermore, we applied these orthogonal strategies on the syntheses of novel representative mono-, di-, tri and tetra-substituted 2-DOS analogues. During these syntheses, we utilized oxazolidinones as drug-carrier groups, as well as triazole rings resulting from 1,3-dipolar cycloadditions. To evaluate the antibiotic activity of selected examples of the newly synthesized 2-DOS analogues we employed *in vitro* assays, concerning both the whole bacterial ribosome and the A-site. The furnished biological results were promising and provided the first useful information for further investigation of the prospective SAR studies (Structure-Activity Relationship).

SUBJECT AREA: Chemical Biology

KEYWORDS: antibiotics, aminoglycosides, RNA, 2-deoxystreptamine (2-DOS), 2-deoxystreptamine (2-DOS) analogues

Στη γιαγιά μου Δέσποινα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

«ΠΟΛΥΝΟΪΗΝ, ΟΥ ΠΟΛΥΜΑΘΙΗΝ ΑΣΚΕΕΙΝ ΧΡΗ»

Δημόκριτος (~460 π.Χ. - 370 π.Χ.)

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Φυσικοχημείας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «Δημόκριτος» υπό την ερευνητική επίβλεψη του Δρ. Διονύσιου Βουρλούμη, Διευθυντή Ερευνών στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», καθώς επίσης υπό την ακαδημαϊκή επίβλεψη του κ. Αθανάσιου Γιωτάκη, Καθηγητή Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διατριβή, πρωτίστως θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στο Δρ. Διονύσιο Βουρλούμη για την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές του επί παντός επιστητού όλα αυτά τα χρόνια. Με τη συνεργασία μας μού έδωσε μία σπουδαία ευκαιρία για εργασία στην έρευνα της Οργανικής Χημείας, αλλά και την εμπειρία ενός σημαντικού σχολείου εν γένει.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Αθανάσιο Γιωτάκη για τη συμπαράσταση του καθ'όλη την εκπόνηση και συγγραφή της παρούσας διατριβής. Στον Αναπλ. Καθηγητή κ. Γεώργιο Βασιλικογιαννάκη θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την υποστήριξη και τις καίριες υποδείξεις του.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της επταμελούς εξαστατικής επιτροπής, τους Καθηγητή κ. Γ. Κόκοτο και Δρ. Ε. Πιτσινό για τη συμβολή τους στην αρτιότερη παρουσίαση της συγκεκριμένης εργασίας και τις ουσιαστικές υποδείξεις τους.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω γενικώς όλους όσους αλληλεπίδρασα κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο, καθώς ο καθένας με δίδαξε κάτι σημαντικό. Ειδικότερα τους: Νίκο Αθηναίο, Βέρα Βιδάλη, Ελένη Ευθυμιάδου, Θεοδόση Θεοδοσίου, Μαρία Κατσαρού, Γιάννη Κατσούλη, Τηλέμαχο Κοσμίδη, Γεωργία Κυθραιώτη

(υπεύθυνη για τα βιολογικά πειράματα), Γιάννη Μαυρίδη, Άννα Παπαδοπούλου, Θάνο Παπακυριακού (υπεύθυνος για τις μελέτες στην υπολογιστική χημεία και αρωγός στο NMR), Κων/να Πυρκωτή, Χρήστο Σταθάκη, Κατερίνα Φωτιάδου, Thomas Cottin.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ευρωπαϊκό πρόγραμμα “Marie Curie” για τη χρηματοδότηση αυτής της έρευνας μέσω του προγράμματος “ExploRNA”.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στην Δρ. Κων/να Γιαννακοπούλου, καθώς η διδασκαλία της στη φασματοσκοπία NMR ήταν μείζονος σημασίας για την καλύτερη κατανόηση και εφαρμογή της μεθόδου, όπως επίσης και στον Λέκτορα κ. Ευάγγελο Τόπακα για τη βοήθεια μου παρείχε στην κατανόηση του πεδίου της Κυτταρικής Βιολογίας.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω ξεχωριστά τον Επίκουρο καθηγητή κ. Δημήτριο Γεωργιάδη και τον Λέκτορα κ. Αλέξανδρο Λ. Ζωγράφο, καθώς η συμβολή τους στην αρτιότερη παρουσίαση αυτής της διατριβής ήταν υψίστης σημασίας. Συν τοις άλλοις, είχα την τύχη να εργαστώ δίπλα τους από την αρχή των μεταπτυχιακών μου σπουδών και έτσι μου εμφύσησαν την αγάπη τους για την έρευνα στη χημεία, εμπνέοντάς με να ασχοληθώ περαιτέρω. Αποτέλεσαν πρότυπα ερευνητών, δασκάλων, κυρίως όμως ανθρώπων.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Κώστα ο οποίος μου παρείχε μια διαφορετική και άκρως διδακτική οπτική γωνία των πραγμάτων.

Ευχαριστώ από καρδιάς την οικογένειά μου για όσα έχει κάνει για εμένα και κατάφερα να φτάσω ως εδώ.

Χωρίς την συνεχή και πολυσχιδή στήριξη των πολυαγαπημένων μου Μιχαέλας, Στεφανίας, Ρένας, Βικτώριας, Ζωής και Παναγιώτη όλα θα ήταν πολύ πιο δύσκολα, γι'αυτό τούς είμαι βαθιά ευγνώμων. Η κατανόηση, ο τρόπος σκέψης και η θετική ενέργεια που έχει ο καθένας τους ήταν και είναι αέρας στα πανιά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	24
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - RNA: Ένα μακρομόριο-κλειδί.....	25
1.1 Εισαγωγή.....	25
1.2 Σύγκριση RNA-DNA	27
1.3 Είδη RNA και πρωτεϊνοσύνθεση	29
1.4 RNA: Ένας πολλά υποσχόμενος φαρμακευτικός στόχος	33
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - Ριβοσωμάτιο	35
2.1 Εισαγωγή.....	35
2.2 Δομή και λειτουργία του ριβοσωματίου.....	35
2.3 Ριβοσωμάτιο και πρωτεϊνοσύνθεση.....	40
2.4 Η πρωτεόλυση μετά την πρωτεϊνοσύνθεση.....	44
2.5 Αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης των προκαρυωτών ως αντιβιοτικά.....	46
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - Οι αμινογλυκοζίτες ως φυσικά αντιβιοτικά με αντιβιοτική δράση	48
3.1 Εισαγωγή.....	48
3.2 Η ιστορία των αμινογλυκοζιτών ως αντιβιοτικά.....	48
3.3 Θεραπευτική δράση των αμινογλυκοζιτών	50
3.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των αμινογλυκοζιτών ως φάρμακα	50
3.5 Χημική δομή των αμινογλυκοζιτών	52
3.6 Τρόπος δράσης των αμινογλυκοζιτών.....	53
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - Αντιπροσωπευτικά ανάλογα αμινογλυκοζιτών ως νέα αντιβιοτικά.....	59
4.1 Εισαγωγή.....	59
4.2 Παράγωγα της 2-δεοξυστρεπταμίνης (2-DOS)	59
4.3 Μονοϋποκατεστημένα παράγωγα της 2-DOS	60
4.3.1 4-Παράγωγα της 2-DOS.....	60

4.3.2	4-Παράγωγα της 2,5-dDOS.....	62
4.4	Διϋποκατεστημένα παράγωγα της 2-DOS.....	64
4.4.1	4,5-Παράγωγα της 2-DOS (παράγωγα της παρομομυκίνης).....	64
4.4.2	4,6-Παράγωγα της 2-DOS (παράγωγα της νεαμίνης).....	67
4.5	Τριϋποκατεστημένα παράγωγα της 2-DOS.....	68
4.5.1	1,4,6-Παράγωγα της 2-DOS (παράγωγα της καναμυκίνης).....	68
4.5.2	1,4,6-Παράγωγα της 2-DOS (παράγωγα της νεαμίνης).....	69
4.5.3	4,5,6-Παράγωγα της 2-DOS (παράγωγα της τομπραμυκίνης).....	71
4.6	Τετραϋποκατεστημένα παράγωγα της 2-DOS (παράγωγα της νεαμίνης)	72
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - Ανάπτυξη ορθογωνικών στρατηγικών για σύνθεση νέων αναλόγων της 2-DOS και προσπάθειες εφαρμογής τους στη σύνθεση 6,6-σπιρο-καρβοκυκλικών αναλόγων.....	74
5.1	Εισαγωγή.....	74
5.2	Ανάπτυξη αναλόγων της 2-DOS ως πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση σπιροενώσεων.....	75
5.2.1	Σχεδιασμός μορίων μιμητών της 2-DOS.....	75
5.2.2	Ρετροσυνθετικό πλάνο σπιροενώσεων.....	77
5.2.3	Σύνθεση πρόδρομων αλκοολών.....	79
5.2.4	Σύνθεση πρόδρομων κετονών.....	84
5.2.5	Σύνθεση πρόδρομων διενοφίλων με αντίδραση Wittig.....	85
5.2.6	Σύνθεση πρόδρομων διενοφίλων με αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons.....	88
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 - Εφαρμογή ορθογωνικών στρατηγικών στη σύνθεση αντιπροσωπευτικών νέων αναλόγων της 2-DOS: μονο- και δι-υποκατεστημένα παράγωγα, οξαζολιδινόνες.....	91
6.1	Εισαγωγή.....	91
6.2	Σύνθεση.....	92
6.2.1	Σύνθεση εύκαμπτων αναλόγων με χρήση ορθογωνικών προστατευτικών ομάδων.....	92

6.2.2	Σύνθεση άκαμπτων αναλόγων με χρήση ορθογωνικών προστατευτικών ομάδων (οξαζολιδινόνες).....	100
7.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 - Σύνθεση τριαζολικών αναλόγων της 2-DOS με χρήση της 1,3-διπολικής κυκλοπροσθήκης.....	103
7.1	Εισαγωγή.....	103
7.2	Σύνθεση.....	103
7.2.1	Σύνθεση εύκαμπτων αναλόγων με χρήση της click χημείας.....	104
7.2.2	Σύνθεση άκαμπτων αναλόγων με χρήση της click χημείας.....	108
8.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 - Βιολογική μελέτη των νεοσυντιθέμενων αναλόγων της δεοξυστρεπταμίνης (2-DOS).....	113
8.1	Εισαγωγή.....	113
8.2	Χημική συγγένεια με το A-site.....	113
8.3	Προσδιορισμός βιολογικής δραστηριότητας: Μέθοδος IVT.....	116
8.4	Αποτελέσματα των βιολογικών μετρήσεων και συμπεράσματα.....	116
9.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 - Πειραματικές μέθοδοι και χαρακτηρισμοί ενώσεων.....	120
9.1	Αντιδραστήρια.....	120
9.2	Χρωματογραφική ανάλυση και χρωματογραφικός καθαρισμός.....	120
9.3	Χαρακτηρισμοί ενώσεων.....	121
9.4	Συνθετικές μέθοδοι για τις ενώσεις του κεφαλαίου 5.....	121
9.5	Συνθετικές μέθοδοι για τις ενώσεις του κεφαλαίου 6.....	136
9.6	Συνθετικές μέθοδοι για τις ενώσεις του κεφαλαίου 7.....	153
10.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 – Φάσματα ενώσεων	163
10.1	Ενώσεις του κεφαλαίου 5.....	163
10.2	Ενώσεις του κεφαλαίου 6.....	165
10.3	Ενώσεις του κεφαλαίου 7.....	170
11.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	176
12.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	178

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Παραδείγματα δεοξυριβονουκλεοτιδίων και ριβονουκλεοτιδίων (δομικές μονάδες για τα πολυμερή νουκλεϊκά οξέα DNA και RNA, αντιστοίχως) με διάφορες νουκλεοβάσεις: **A)** Με βάση πυριμιδίνης (πχ αδερίνη, A) και **B)** Με βάση πουρίνης (πχ κυτοσίνη, C)..... **25**

Σχήμα 1.2: Οι νουκλεοβάσεις ανά συμπληρωματικά ζεύγη στα DNA και RNA (T-A & C-G για το DNA, U-A & C-G για το RNA). Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών νουκλεοβάσεων σε έκαστο ζεύγος εμφανίζονται ως διακεκομμένες γραμμές. **26**

Σχήμα 1.3: **A)** Τμήμα DNA (δύο κλώνοι ως διπλή έλικα): 2 αλληλουχίες δεοξυριβονουκλεοτιδίων ενωμένες μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου (οι οποίοι απεικονίζονται με διακεκομμένες γραμμές) ανάμεσα στα συμπληρωματικά ζεύγη των νουκλεοβάσεων. **B)** Τμήμα RNA (ένας κλώνος): 1 αλληλουχία ριβονουκλεοτιδίων. Υπενθυμίζεται ότι το RNA είναι μονόκλωνο, οπότε δεν υπάρχει συμπληρωματική αλληλουχία όπως στο δίκλωνο DNA.....**26**

Σχήμα 1.4: Παραδείγματα τμημάτων από τα πολυμερή νουκλεϊκά οξέα DNA και RNA: **A)** Διπλή έλικα DNA (οι 4 νουκλεοβάσεις, A-T-C-G, συμβολίζονται με τα χρωματιστά κομμάτια κίτρινο, πράσινο, μπλε και ροζ αντιστοίχως. Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών νουκλεοβάσεων σε έκαστο ζεύγος φαίνονται ως «κούμπωμα» των νουκλεοβάσεων με συμπληρωματικό σχήμα). **B)** Μονή έλικα RNA (φαίνονται οι 4 νουκλεοβάσεις A-U-C-G με τα αντίστοιχα χρώματα πορτοκαλί, ροζ, κίτρινο, γκρι).....**27**

Σχήμα 1.5: Ροή γενετικών πληροφοριών στα φυσιολογικά κύτταρα: Η αποθήκευση των πληροφοριών πραγματοποιείται στο DNA (με τα γονίδια), η μετάδοσή τους λαμβάνει χώρα μέσω του RNA και τελικά η έκφρασή τους γίνεται με τις πρωτεΐνες.....**28**

Σχήμα 1.6: **A)** Περιοχή δομής διπλής έλικας του αναδιπλωμένου RNA. Στο επάνω μέρος της διαμόρφωσης φαίνεται η διαμόρφωση θηλιάς, καθώς δεν υφίσταται ταίριασμα βάσεων. **B)** Τρισδιάστατη δομή αναδιπλωμένου RNA.....**29**

Σχήμα 2.1: Διάγραμμα τυπικού ζωικού ευκαρυωτικού κυττάρου όπου φαίνονται οι υποκυτταρικές μονάδες και η θέση του ριβοσωματίου: 1) Πυρηνίσκος, 2) Πυρήνας, 3) Ριβοσωμάτιο, 4) Κυστίδιο, 5) Τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο, 6) Συσσκευή Golgi, 7) Κυτταροσκελετός, 8) Λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, 9) Μιτοχόνδρια, 10) Κενοτόπιο, 11) Κυτταρόπλασμα, 12) Λυσόσωμα, 13) Κεντριόλια μέσα σε κεντροσωμάτιο.....**36**

Σχήμα 2.2: Τρισδιάστατη δομή του βακτηριακού ριβοσωματίου, όπως βρέθηκε από την ερευνητική ομάδα του Ramakrishnan σε κρυσταλλογραφικές μελέτες ανάλυσης της δομής συμπλόκου με χρήση ακτίνων-Χ. Η μικρή υπομονάδα βρίσκεται στα αριστερά (γαλάζιο), ενώ η μεγάλη στα δεξιά (γκρι). Τα μόρια tRNA είναι ανάμεσα στις 2 υπομονάδες (κίτρινο). Οι πρωτεΐνες υποδηλώνονται με το μωβ χρώμα.....**36**

Σχήμα 2.3: Συστατικά ευκαρυωτικών ριβοσωματίων (παρόμοια δομή έχουν και τα προκαρυωτικά): Το ριβοσωμάτιο είναι ένα μεγάλο σύμπλοκο από 4 μόρια RNA και πάνω από 80 πρωτεΐνες.....**37**

Σχήμα 2.4: Τρισδιάστατη δομή συμπλόκου παρομομυκίνης (αμινογλυκοζιτικό αντιβιοτικό)-αποκωδικοποιητικού κέντρου του βακτηριακού rRNA. Με μωβ σφαίρες φαίνονται οι περιοχές που με χημική τροποποίηση οδηγούν σε ανθεκτικά αντιβιοτικά..**39**

Σχήμα 2.5: Απλουστευμένη αναπαράσταση τρισδιάστατης δομής βακτηριακού ριβοσωματίου με βάση αποτελέσματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ: Η μικρή υπομονάδα έχει σκούρο πράσινο χρώμα, ενώ η μεγάλη ανοιχτό πράσινο. Οι θέσεις E, A, P είναι για πρόσδεση μορίων tRNA. Σημειώνεται ότι κατά την πρωτεϊνοσύνθεση ταυτόχρονα κατειλημμένες είναι το πολύ 2 από αυτές τις θέσεις. Επίσης υπάρχει μία θέση πρόσδεσης για το mRNA.....**39**

Σχήμα 2.6: Η μετάφραση ενός μορίου mRNA (γίνεται πάντα σε κατεύθυνση 5'→3'). Παρουσιάζεται εποπτικά ο κύκλος των 3 βημάτων για τη σύνθεση μιας πρωτεϊνικής αλυσίδας (η αρχή της σύνθεσης γίνεται πάντα από το αμινοτελικό άκρο της): **A) Βήμα 1:** Ένα μόριο αμινοακυλο-tRNA προσδένεται στη θέση A του ριβοσωματίου. **B) Βήμα 2:** Σχηματίζεται ένας νέος πεπτιδικός δεσμός. **Γ) Βήμα 3:** Η μικρή ριβοσωματική υπομονάδα μετακινείται κατά μήκος του mRNA κατά 3 νουκλεοτίδια, αποβάλλει το tRNA που μόλις χρησιμοποιήθηκε και επαναφέρει το ριβοσωμάτιο στην αρχική του κατάσταση, ώστε να μπορεί να συνδεθεί το επόμενο μόριο αμινοακυλο-tRNA.....**41**

Σχήμα 2.7: Πρωτεοσωμάτιο ευκαρυωτικών κυττάρων (μεγάλο σύμπλοκο πρωτεολυτικών ενζύμων που αποδομεί βραχύβιες και ανεπιθύμητες πρωτεΐνες): Ο κεντρικός κύλινδρος έχει καλύπτρες (μπλε) στα 2 άκρα του, όπου προσδένονται επιλεκτικά οι πρωτεΐνες που έχουν σημειωθεί για αποδόμηση.....**45**

Σχήμα 3.1: Φυσικοί και ημισυνθετικοί αμινογλυκοζίτες: Νεαμίνη (4-μονοϋποκατάσταση), Νεομυκίνη / Παρομομυκίνη (4,5-διϋποκατάσταση), Καναμυκίνη (4,6-διϋποκατάσταση), Αμικασίνη (1,4,6-τριϋποκατάσταση).....**52**

Σχήμα 3.2: Η δευτεροταγής δομή του τμήματος 16S του βακτηριακού ριβοσωματικού RNA. Επισημαίνεται το ολιγονουκλεοτίδιο A-site και η νουκλεοτιδική του ακολουθία...	54
Σχήμα 3.3: Μοριακό μοντέλο της δομής του συμπλόκου A-site / νεομυκίνης B.....	54
Σχήμα 3.4: Μερικοί από τους φυσικούς αμινογλυκοζίτες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη δέσμευσής τους στο A-site από τον Westhof: Απραμυκίνη / Νεαμίνη (4-μονοϋποκατάσταση), Γενταμικίνη / Καναμυκίνη (4,6-διϋποκατάσταση), Νεομυκίνη B / Ριβοσταμυκίνη (4,5-διϋποκατάσταση).....	56
Σχήμα 3.5: Οι διαμορφώσεις της νεαμίνης (A) και της νεομυκίνης B (B), όπως προσδιορίστηκαν στις κρυσταλλικές δομές συμπλόκων τους με ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν το A-site. Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν δεσμούς υδρογόνου και ειδικά με κόκκινο φαίνονται αυτοί που παρατηρούνται στην πλειοψηφία των συμπλόκων. Η αρίθμηση των βάσεων του RNA γίνεται σύμφωνα με το A-site του E. Coli, ενώ με W συμβολίζονται τα μόρια νερού που επάγουν διαμοριακές αλληλεπιδράσεις.....	57
Σχήμα 4.1: Τρία παραδείγματα της οικογένειας των κυκλιτολών: σικιμικό οξύ, ινοσιτόλη και 2-δεοξυστρεπταμίνη (2-DOS). Η 2-DOS είθισται να απαντάται στα φυσικά αμινογλυκοζιτικά αντιβιοτικά.....	59
Σχήμα 4.2: Σύνθεση των παραγώγων της νεαμίνης 7, 8, 9, 10 και 11 από τον Wong.....	60
Σχήμα 4.3: Σύνθεση μονοϋποκατεστημένων παραγώγων της 2-DOS στην 4-θέση με ετεροκυκλικά μόρια από τον Ding.....	61
Σχήμα 4.4: Σύνθεση των 4-υποκατεστημένων παραγώγων της 2,5-dDOS 28, 29, 30, 31, 32 και 33 από τον Vourloumis.....	63
Σχήμα 4.5: Σύνθεση των παραγώγων 36, 37 και 38 της παρομομυκίνης με υποκατάσταση του 2'-OH από τον Hanessian.....	65
Σχήμα 4.6: Σύνθεση των παραγώγων 41, 42, 43 και 44 της παρομομυκίνης με υποκατάσταση του 5'-OH από τον Vasella.....	66
Σχήμα 4.7: Σύνθεση των παραγώγων 47, 48 και 49 της 2-DOS με υποκατάσταση του 6-OH της νεαμίνης από τον Chang.....	67
Σχήμα 4.8: Σύνθεση της αμικασίνης, ενός 1,4,6-τριϋποκατεστημένου παραγώγου της 2-DOS από τον Fujisawa.....	68

Σχήμα 4.9: Σύνθεση των 1,4,6-τριϋποκατεστημένων παραγώγων της 2-DOS 57 , 58 και 59 από τον Mobashery.....	70
Σχήμα 4.10: Σύνθεση των 4,5,6-τριϋποκατεστημένων παραγώγων της 2-DOS 62 , 63 και 64 από τον Swayze.....	71
Σχήμα 4.11: Σύνθεση του 1,4,5,6-τετραϋποκατεστημένου παραγώγου 71 της 2-DOS από τον Chang.....	73
Σχήμα 5.1: Φυσικοί αμινογλυκοζίτες (νεομυκίνη B, νεαμίνη) και τα συνθετικά ανάλογα της 2-DOS που προτάθηκαν από το εργαστήριό μας (σπιροενώσεις, σπιροαιθέρας) (R ₁ , R ₂ , R ₃ : πλευρικές αλυσίδες).....	74
Σχήμα 5.2: (A) Υπολογιστικό μοντέλο [6,6]-σπιροκαρβοκυκλικής ένωσης που βασίζεται στη 2-DOS / A-site. (B) Υπολογιστικό μοντέλο νεαμίνης / A-site. (Γ) Αλληλεπιδράσεις νεαμίνης / A-site, όπως προκύπτουν από το υπολογιστικό μοντέλο στο B.....	76
Σχήμα 5.3: Πετροσύνθεση 2-δεοξυστρεπταμινο-σπιροκυκλικών ενώσεων, P ₁ , P ₂ , P ₃ , P ₄ : προστατευτικές ομάδες, R ₁ , R ₂ , R ₃ : πλευρικές αλυσίδες.....	77
Σχήμα 5.4: Πετροσύνθεση 2-δεοξυστρεπταμινο-σπιροαιθερικών ενώσεων, P ₁ , P ₂ , P ₃ , P ₄ : προστατευτικές ομάδες, R ₁ , R ₂ , R ₃ : πλευρικές αλυσίδες.....	78
Σχήμα 5.5: Σύνθεση της ρακεμικής αλκοόλης rac-74 από τη 2-DOS: (α) HBr 48%, H ₂ O (0.16 M), βρασμός με επαναρροή, 20 h, 84%, (β) CbzCl (2.5 eq), NaHCO ₃ (7.5 eq), 1,4-διοξάνιο / H ₂ O (1:1, v/v) (0.4 M), 12 h, 0°C→25°C, 89%, (γ) 1,1-διμεθοξυκυκλοεξάνιο (10.0 eq), p-TsOH (0.15 eq), άνυδρο DMF (0.06 M), 12 h, 25°C, 79%, (δ) (CH ₃ CO) ₂ O (5.0 eq), άνυδρη πυριδίνη (περίσσεια), 12 h, 25°C, 84%, (ε) 2,2-διμεθοξυ-προπάνιο (10.0 eq), p-TsOH (0.15 eq), άνυδρο DMF (0.2 M), 12 h, 25°C, 86% (στ) (CH ₃ CO) ₂ O (20.0 eq), άνυδρη πυριδίνη (περίσσεια), 4-DMAP (0.1 eq), 12 h, 25°C, 84%.....	79
Σχήμα 5.6: Σύνθεση της οπτικά ενεργής αλκοόλης 84 από τη 2-DOS: (α) TfN ₃ (4.0 eq), CuSO ₄ (0.1 eq), Et ₃ N (10.0 eq), H ₂ O / MeOH (1:3.75, v/v) (0.1M), 12 h, 25°C, 82%, (β) Ac ₂ O, (10.0 eq), DMAP (0.10 eq), πυριδίνη (0.45 M), 12 h, 25°C, 80%, (γ) Novozym 435, (1:1, w/w), τολουόλιο / ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέως (1:1, v/v) pH = 6.2, 3 d, 25°C, 66%, (δ) PMBC(O)NHCCl ₃ (4.0 eq), CSA (0.1 eq), άνυδρο CH ₂ Cl ₂ (1.1 M), 12 h, 25°C, (ε) MeONa (0.2 eq), MeOH / THF (10:1, v/v) (0.085 M), 12 h, 25°C, 72% συνολική απόδοση για δύο βήματα, (στ) BnBr (3.0 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (4.0 eq), DMF (0.1 M), 30 min, 62%, (ζ) CAN (5.0 eq), CH ₃ CN / H ₂ O (9:1, v/v) (0.03 M), 1 h, 25°C, 95%, (η) διάλυμα PMe ₃ (5.0 eq) σε THF 1.0 M, υδ. NaOH 0.1	

M (0.05 eq), THF (0.06 M), 12 h, 25°C, **(θ)** CbzCl (4.0 eq), NaHCO₃ (7.0 eq), 1,4-διοξάνιο / H₂O (1:1, v/v) (0.04 M), 12 h, 25°C, 96% σε 2 βήματα.....**80**

Σχήμα 5.7: Σύνθεση της ρακεμικής αλκοόλης **rac-91** από τη 2-DOS: **(α)** φρέσκο διάλυμα TfN₃ (10.0 eq) σε CH₂Cl₂ 0.5 M, CuSO₄·5H₂O (0.05 eq), Et₃N (20.0 eq), MeOH/H₂O (6:4, v/v) (0.2 M), 12 h, 25°C, 95%, **(β)** 1,1-διμεθοξυ-κυκλοεξάνιο (7.5 eq), p-TsOH (0.1 eq), άνυδρο DMF (0.08 M), 5 h, 50°C, 95%, **(γ)** PMBBBr (1.5 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (1.5 eq), άνυδρο THF (0.8 M), 12 h, 0°C→25°C, **(δ)** THF / CH₃COOH / H₂O (3:3:1, v/v/v) (0.05 M), 12 h, 25°C, 80% (ή 48% σε 2 βήματα), **(ε)** BnBr (2.2 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (4.0 eq), άνυδρο DMF (0.1 M), 12 h, 0°C→25°C, 90%, **(στ)** διάλυμα PMe₃ (5.0 eq) σε THF 0.1 M, υδ. NaOH 0.1 M (0.05 eq), THF (0.1 M), 12 h, 25°C, **(ζ)** CH₃COCl (3.0 eq), Et₃N (4.0 eq), άνυδρο CH₂Cl₂ (0.1 M), 2 h, 0°C→25°C, 70% σε 2 βήματα, **(η)** CF₃COOH (0.1 eq), CH₂Cl₂ (0.03 M), 20 min, 25°C, 95%.....**82**

Σχήμα 5.8: Σύνθεση της ρακεμικής αλκοόλης **rac-93**: **α)** H₂, Pd ενεργοποιημένο σε C (10% κ.β.), άνυδρη MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, **(β)** (CH₃CO)₂O (20.0 eq), πυριδίνη (περίσσεια), 12 h, 25°C, 81%, **(γ)** K₂CO₃ (4.0 eq), MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, 95%.....**83**

Σχήμα 5.9: Σύνθεση της οπτικά ενεργής αλκοόλης **85** από τη 2-DOS: **(α)** HCl 10.0 M (17.5 eq), MeOH (0.06 M), βρασμός με επαναρροή, 6 h, 95%, **(β)** φρέσκο διάλυμα TfN₃ (12.3 eq) σε CH₂Cl₂ 1.0M, διάλυμα CuSO₄·5H₂O (0.06 eq) σε MeOH / H₂O / Et₃N (3:3:4, v/v/v) (0.02 M), MeOH / H₂O (2:1, v/v) (0.02 M), 12 h, 25°C, 72%, **(γ)** 1,1-διμεθοξυ-κυκλοεξάνιο (10.0 eq), p-TsOH (0.15 eq), DMF (0.08 M), 12 h, 25°C, 58%, **(δ)** NaIO₄ (6.0 eq), MeOH (0.02 M), 12 h, 0°C→25°C, **(ε)** Et₃N (2.5 eq), MeOH (0.02 M), 12 h, 40°C, 90% σε 2 βήματα.....**83**

Σχήμα 5.10: Οξειδωση της οπτικά ενεργής αλκοόλης **84** προς την κετόνη **96**: DMP (4.0 eq), NaHCO₃ (5.0 eq), CH₂Cl₂ (0.1 M), 2.5 h, 25°C, 95%.....**85**

Σχήμα 5.11: Αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons φωσφονιακού υλιδίου με αλδεΐδη.....**88**

Σχήμα 5.12: Σύνθεση διενόφιλων με αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons από την πρόδρομη κετόνη **rac-95**: **(α)** **99** (3.1 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (3.0 eq), άνυδρο THF (0.07 M), 12 h, 0°C→25°C, 63% για το **rac-102**, ή **100** (3.2 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (3.1 eq), άνυδρο THF (0.04 M), 4 h, -75°C→-55°C, 44% για το **rac-103**, ή **101** (3.5 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (3.1 eq), άνυδρο THF (0.05

M), 12 h, 0°C→25°C, 57% για το **rac-104**, (**β**) **100** (3.2 eq), t-BuOK (3.0 eq), άνυδρο THF (0.04 M), 80 min, -80°C→-55°C, 82% για το **rac-105**.....**89**

Σχήμα 6.1: Φυσικά προϊόντα αμινογλυκοζιτών: 2-δεοξυστρεπταμίνη ή 2-DOS (σκελετός αμινογλυκοζιτικών αντιβιοτικών), παρομομυκίνη (φυσικός αμινογλυκοζίτης, 4,5-διϋποκατεστημένο παράγωγο της 2-DOS), αμικασίνη (ημισυνθετικός αμινογλυκοζίτης, 1,4,6-τριϋποκατεστημένο παράγωγο της 2-DOS), νεαμίνη (το μικρότερο δομικό τμήμα των αμινογλυκοζιτών με βιολογική δραστηριότητα, 4-μονοϋποκατεστημένο παράγωγο της 2-DOS).....**91**

Σχήμα 6.2: Αλκοόλες με κατάλληλη προστασία της 2-DOS ως χρήσιμα συνθετικά ενδιάμεσα: η ρακεμική **rac-74** και η οπτικά ενεργή **84** (συνθετικά σχήματα 5.5 και 5.6 αντιστοίχως, κεφάλαιο 5).....**92**

Σχήμα 6.3: Σύνθεση της οπτικά ενεργής αλκοόλης **74**: (**α**) υδ. HCl (10.0 M) (17.5 eq), MeOH (0.055 M), 6 h, βρασμός με επαναρροή, 95%, (**β**) CbzCl (7.5 eq), NaHCO₃ (17.0 eq), H₂O / 1,4-διοξάνιο (2:1, v/v), 12 h, 0°C→25°C, 97% (**γ**) 1,1-διμεθοξυ-κυκλοεξάνιο (7.5 eq), p-TsOH (0.1 eq), DMF (0.08 M), 5 h, 50°C, 98%, (**δ**) NaIO₄ (6.0 eq), MeOH (0.012 M), 14 h, 0°C→25°C, (**ε**) Et₃N (2.5 eq), MeOH (0.014 M), 12 h, 40°C, 94% σε 2 βήματα.....**93**

Σχήμα 6.4: Σύνθεση 4-υποκατεστημένων αναλόγων της 2-DOS: (**α**) MOMCl (10.0 eq), DIPEA (15.0 eq), TBAI (0.1 eq), CH₂Cl₂ (0.1 M), 12 h, 0°C→32°C, 94%, ή MEMCl (10.0 eq), DIPEA (15.0 eq), TBAI (0.1 eq), CH₂Cl₂ (0.1 M), 12 h, 0°C→32°C, 82%, ή **108** (1.0 eq), NIS (2.3 eq), διάλυμα TfOH (0.15 eq) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (0.02 M), άνυδρο CH₂Cl₂ / άνυδρος Et₂O (1:1, v/v) (0.1 M), 2 h, 25°C→30°C→0°C, 32%, (**β**) CH₃COOH / H₂O (8:2, v/v) (0.06 M), 1 h, 25°C, για τα **109** και **110** ή CH₃COOH (0.8 eq), 1,4-διοξάνιο / H₂O (1:1, v/v) (0.04 M), 12 h, 65°C, για το **111**, (**γ**) NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (7.0 eq), άνυδρο DMF (0.06 M), 1.5 h, 0°C→25°C, 62% σε 2 βήματα για το **112**, 42% σε 2 βήματα για το **113**, NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (5.0 eq), άνυδρο DMF (0.1 M), 2 h, 0°C→25°C, 40% σε 2 βήματα για το **114**.....**94**

Σχήμα 6.5: Μίγμα α- και β- ανωμερών του 4-υποκατεστημένου αναλόγου της 2-DOS με σακχαρική μονάδα, **111α** και **111β**.....**95**

Σχήμα 6.6: Σύνθεση του ορθογωνικά προστατευμένου μορίου **116**: (**α**) MOMCl (10.0 eq), DIPEA (15.0 eq), TBAI (0.1 eq), CH₂Cl₂ (0.1 M), 12 h, 0°C→32°C, 94%, (**β**) CH₃COOH / H₂O (8:2, v/v) (0.06 M), 1 h, 25°C, (**γ**) NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (7.0 eq), άνυδρο DMF (0.06 M), 1.5 h, 0°C→25°C, 62% σε 2 βήματα, (**δ**) H₂, Pd

ενεργοποιημένο σε C (10% κ.β.), CH_3COOH (1.0 eq), άνυδρη MeOH (0.1 M), 1.5 h, 25°C, **(ε)** φρέσκο διάλυμα TfN_3 (5.0 eq) σε CH_2Cl_2 0.5 M, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.05 eq), Et_3N (10.0 eq), MeOH/ H_2O (6:4, v/v) (0.2 M), 12 h, 25°C, 95% σε 2 βήματα.....**96**

Σχήμα 6.7: Σύνθεση 4,5- και 5-αναλόγων της 2-DOS: **(α)** TESCI (5.0 eq), πυριδίνη (περίσσεια), 4-DMAP (0.1 eq), 12 h, 25°C, 92% για το **117**, ή TIPSCI (6.0 eq), ιμιδαζόλιο (9.0 eq), 4-DMAP (0.1 eq), άνυδρο CH_2Cl_2 (0.1 M), 12 h, 25°C, 31% για το **118**, **(β)** BnBr (3.0 eq), διάλυμα LiHMDS 0.1N σε THF (3.0 eq), TBAI (0.1 eq), άνυδρο THF (0.2 M), 12 h, 25°C, 82% για το **119**, ή Boc_2O (1.5 eq), Et_3N (1.3 eq), 4-DMAP (0.2 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 12 h, 25°C, 97% για το **120**, **(γ)** CH_3COOH (0.8 eq) / H_2O (8:2, v/v) (0.02 M), 2.5 h, 25°C, 75% για το **121** ή 95% για το **122**, **(δ)** tert-βουτυλοξικός καρβονικός αλλυλεστέρας (3.0 eq), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.2 eq), άνυδρο THF (0.1-0.05 M), 12 h, 25°C, 76% για το **123**, ή ακρυλονιτρίλιο (20.0 eq), Cs_2CO_3 (1.02 eq), t-BuOH (0.2 M), 12 h, 25°C, 99% για το **124**, ή tert-βουτυλοξικός καρβονικός αλλυλεστέρας (6.0 eq), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.4 eq), άνυδρο THF (0.1-0.05 M), 4 h, 45°C για το **125**, **(ε)** PPTS (13.0 eq), t-BuOH (0.05 M), 12 h, βρασμός με επαναρροή, 90% για το **126**, PPTS (13.0 eq), t-BuOH (0.05 M), 12 h, βρασμός με επαναρροή, 91% για το **127**, **(στ)** υδ. $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 N (3.6 eq), 1,4-διοξάνιο (0.07 M), 12 h, 25°C, 70% σε 2 βήματα για το **128**, **(ζ)** tert-βουτυλοξικός καρβονικός αλλυλεστέρας (10.0 eq), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.2 eq), άνυδρο THF (0.1-0.05 M), 2 h, 45°C, 71% για το **129**.....**97**

Σχήμα 6.8: Σύνθεση του N-1 υποκατεστημένου αναλόγου της 2-DOS **132**: **(α)** υδ. $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 N (3.6 eq), 1,4-διοξάνιο (0.1 M), 2.5 h, 25°C, **(β)** **130**, κορ. υδατ. διάλυμα NaHCO_3 (καταλυτικό), 1,4-διοξάνιο / H_2O (3:1, v/v) (0.1 M), 12 h, 25°C, 57% σε 2 βήματα, **(γ)** διάλυμα PMe_3 (5.0 eq) σε THF 0.1 M, υδ. NaOH 0.1 M (0.05 eq), THF (0.1 M), 12 h, 25°C, **(δ)** υδ. HCl 1.0 N, MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, 77% σε 2 βήματα.....**98**

Σχήμα 6.9: Σύνθεση της οπτικά ενεργής αλκοόλης **135** με διαφοροποιημένα τα άζωτα N-1 και N-3, αλλά και της αποπροστατευμένης οξαζολιδινόνης **136**: **(α)** NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (4.0 eq), άνυδρο DMF (0.06 M), 2 h, 0°C→25°C, 50%, **(β)** Boc_2O (1.29 eq), Et_3N (1.27 eq), 4-DMAP (0.2 eq), άνυδρο THF (0.04 M), 12 h, 25°C, 98%, **(γ)** υδ. $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 N (3.6 eq), διοξάνιο (0.08 M), 12 h, 25°C, 60%, **(δ)** H_2 , Pd ενεργοποιημένο σε C (10% κ.β.), άνυδρη MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, **(ε)** υδ. HCl 0.1 N (0.06 M), MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, 50% σε 2 βήματα.....**99**

Σχήμα 6.10: Σχεδιασμένες οξαζολιδινόνες με υποκατάσταση στην 4 θέση (R: υδρογονανθρακική αλυσίδα που φέρει υδροξυλομάδες).....**100**

Σχήμα 6.11: Το υπόστρωμα (κετόνη) της οργανομεταλλικής προσθήκης και τα προϊόντα της (τεταρτοταγής αλκοόλη και οξαζολιδινόνη) ανάλογα με τις συνθήκες (παρουσία ή απουσία TMSCl), (R: υδρογονανθρακική αλυσίδα που εισάγεται με το εκάστοτε οργανομεταλλικό αντιδραστήριο RMgX).....**100**

Σχήμα 6.12: Σύνθεση των οξαζολιδινικών αναλόγων της 2-DOS **137** και **139**: (α) διάλυμα βινυλο-μαγνησιο-χλωριδίου σε THF 1.6 M (3.0 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 3 h, -78°C→25°C, 32% για το **137**, ή διάλυμα αλλυλομαγνησιο-βρωμιδίου σε Et₂O 1.0 M (3.0 eq), TMSCl (3.0 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 12 h, -78°C→25°C, 35% για το **139**, (β) διάλυμα βινυλομαγνησιο-χλωριδίου σε THF 1.6 M (3.0 eq), TMSCl (3.0 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 3 h, -78°C→25°C, 36% για το **138** (2.5:1 dr), ή διάλυμα αλλυλομαγνησιο-βρωμιδίου σε Et₂O 1.0 M (3.0 eq), TMSCl (3.0 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 3 h, -78°C→25°C, 52% για το **140** (4:1 dr), (γ) NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (2.5 eq), άνυδρο DMF (0.1 M), 2 h, 25°C, 55% για το **137**, ή NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (2.5 eq), άνυδρο DMF (0.8 M), 2.5 h, 25°C, 60% για το **139**.....**101**

Σχήμα 7.1: Κυκλοπροσθήκη Huisgen αζιδίων-αλκυνίων: μία κατηγορία της «click χημείας».....**103**

Σχήμα 7.2: Εύκαμπτα τριαζολικά ανάλογα της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-3: τα 3-μονοϋποκατεστημένα **142**, **144** και το **147**: (α) **141** (3.0 eq), MeOH / H₂O (1:1, v/v) (0.1 M), 12 h, 80°C, (β) **143** (2.0 eq), τολουόλιο (0.1 M), 12 h, βρασμός με επαναρροή, 63% (γ) **145** (2.0 eq), CuSO₄·5H₂O (0.3 eq), L-ασκορβικό νάτριο (0.5 eq), CH₃CH₂OH / H₂O (2:1) (0.1 M), 12 h, 25°C, 96%, (δ) υδ. HCl 4.0 N, EtOAc (0.1 M), 12 h, 25°C, 97%.....**104**

Σχήμα 7.3: Πιθανός μηχανισμός της καταλυόμενης από χαλκό κυκλοπροσθήκης αζιδίων-ακραίων αλκυνίων Huisgen.....**105**

Σχήμα 7.4: Εύκαμπτα τριαζολικά ανάλογα της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-3: το 3-μονοϋποκατεστημένο **148** και το 1,3-διϋποκατεστημένο **151**: (α) υδ. HCl 1.0 N, MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, 97%, (β) υδ. LiOH 0.5 N (3.6 eq), διοξάνιο (0.07 M), 12 h, 25°C, 77%, (γ) διάλυμα του **148** (2.1 eq) σε THF 0.12 M, κορ. υδ. διάλ. NaHCO₃ (καταλυτικό), 1,4-διοξάνιο / H₂O (3:1) (0.1 M), 12 h, 25°C, 42% σε 2 βήματα, (ε) υδ. HCl 1.0 N, MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, 94%.....**106**

Σχήμα 7.5: Εύκαμπτο τριαζολικό ανάλογο της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-1: το 1-μονοϋποκατεστημένο **155**: (α) CH₃COOH / H₂O (8:2, v/v) (0.06 M), 1 h, 25°C, (β) H₂, Pd ενεργοποιημένο σε C (10% κ.β.), CH₃COOH (1.0 eq), άνυδρη MeOH (0.1 M),

1.5 h, 25°C, **(γ)** φρέσκο διάλυμα TfN₃ (10.0 eq) σε CH₂Cl₂ 0.5 M, CuSO₄·5H₂O (0.05 eq), Et₃N (20.0 eq), MeOH / H₂O (6:4, v/v) (0.2 M), 12 h, 25°C, 89% σε 2 βήματα, **(δ)** υδ. LiOH 0.5 N (3.6 eq), 1,4-διοξάνιο (0.1 M), 12 h, 25°C, **(ε)** φρέσκο διάλυμα TfN₃ (5.0 eq) σε CH₂Cl₂ 0.5 M, CuSO₄·5H₂O (0.05 eq), Et₃N (10.0 eq), MeOH / H₂O (6:4, v/v) (0.1 M), 12 h, 25°C, 71% σε 2 βήματα, **(στ)** **145** (2.0 eq), CuSO₄·5H₂O (0.3 eq), ασκορβικό νάτριο (0.5 eq), CH₃CH₂OH / H₂O (2:1, v/v) (0.1 M), 12 h, 25°C, 34%.....**107**

Σχήμα 7.6: Άκαμπτο τριαζολικό ανάλογο της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-3: 3,4-διϋποκατεστημένο **158**. **(α)** H₂, Pd ενεργοποιημένο σε C (10% κ.β.), άνυδρη MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, **(β)** φρέσκο διάλυμα TfN₃ (10.0 eq) σε CH₂Cl₂ 0.5 M, CuSO₄·5H₂O (0.05 eq), Et₃N (20.0 eq), MeOH / H₂O (6:4, v/v) (0.2 M), 12 h, 25°C, 72% σε 2 βήματα, **(γ)** διάλυμα προπαργυλοβρωμιδίου σε τολουόλιο 80% κ.β. (1.1 eq), NaH (5.0 eq), TBAI (0.1 eq), άνυδρο τολουόλιο (0.7 M), 12 h, 25°C, 88%, **(δ)** διάλυμα προπαργυλοβρωμιδίου σε THF 80% κ.β. (1.1 eq), NaH (5.0 eq), TBAI (0.1 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 12 h, 25°C,¹⁷⁸ **(ε)** CH₃COOH (0.8 eq) / H₂O (8:2, v/v) (0.02 M), 12 h, 25°C, **(στ)** διάλυμα PMe₃ (5.0 eq) σε THF 0.1 M, υδ. NaOH 0.1 M (0.05 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 12 h, 25°C, 96% σε 2 βήματα.....**109**

Σχήμα 7.7: Άκαμπτα τριαζολικά ανάλογα της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-3: 1,3,4-τριϋποκατεστημένα **161** και **162**: **(α)** διάλυμα PMe₃ (5.0 eq) σε THF 0.1 M, υδ. NaOH 0.1 M (0.05 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 12 h, 25°C, **(β)** **159** (3.0 eq), EDC·HCl (3.0 eq), DIPEA (4.0 eq), 4-DMAP (1.1 eq), άνυδρο CH₃CN (0.3 M), 12 h, 25°C, 68% σε 2 βήματα, **(γ)** υδ. HCl 4.0 M, οξικός αιθυλεστέρας (0.2 M), 12 h, 25°C, 79% για το **161** και 76% σε 3 βήματα για το **162**, **(δ)** **149** (2.1 eq), κορ. υδ. διάλ. NaHCO₃ (καταλυτικό), 1,4-διοξάνιο / H₂O (3:1, v/v) (0.1 M), 12 h, 25°C.....**110**

Σχήμα 7.8: Άκαμπτο τριαζολικό ανάλογο της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-3: 1,3,4-τριϋποκατεστημένο **164**: **(α)** διάλυμα PMe₃ (5.0 eq) σε THF 0.1 M, υδ. NaOH 0.1 M (0.05 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 12 h, 25°C, **(β)** PhCHO (1.1 eq), NaBH₃CN (1.5 eq), ακετονιτρίλιο / H₂O (19:1, v/v) (0.1M), 12 h, 25°C, 36% σε 2 βήματα, **(γ)** υδ. HCl 1.0 N, MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, 94%.....**111**

Σχήμα 7.9: Άκαμπτο τριαζολικό ανάλογο της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-3: 3,4,5,6-τετραϋποκατεστημένο **167**: **(α)** CH₃COOH (0.8 eq) / H₂O (8:2, v/v) (0.02 M), 12 h, 25°C, 85%, **(β)** BnBr (3.0 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (2.5 eq), TBAI (0.1 eq), άνυδρο DMF (0.1 M), 12 h, 25°C, 93%, **(γ)** διάλυμα PMe₃ (5.0 eq) σε THF 0.1 M, υδ. NaOH 0.1 M (0.05 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 12 h, 25°C, 62%.....**111**

Σχήμα 8.1: Η δομή της 2-δεοξυστρεπταμίνης (2-DOS) με βάση την οποία συντέθηκαν τα αμινογλυκοζιτικά ανάλογα της εργασίας.....	113
Σχήμα 8.2: A) Κομμάτι του ολιγονουκλετιδίου που χρησιμοποιήθηκε το οποίο περιέχει το αποκωδικοποιητικό κέντρο (A-site). B) Κρυσταλλική δομή του A-site με την αδενίνη A1492 στο εσωτερικό της κοιλότητας του. Γ) Κρυσταλλική δομή του A-site με την αδενίνη A1492 στο εξωτερικό της κοιλότητάς του.....	114
Σχήμα 8.3: Δομές της αμινοπουρίνης (φθορίζον μοριακός δείκτης) και της αδενίνης..	114
Σχήμα 8.4: A) Κρυσταλλική δομή του ελεύθερου A-site όπου η 2-AP1492 βρίσκεται στο εσωτερικό της κοιλότητας του. B) Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου A-site / παρομομυκίνης μετά από αφαίρεση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας της παρομομυκίνης και όπου η 2-AP1492 έχει εκτοπιστεί στο εξωτερικό της κοιλότητάς του A-site. Γ) Σχηματική απεικόνιση της μετατόπισης της A1492 του A-site κατά την σύμπλεξη του με το αντιβιοτικό. Δ) Γραφική παράσταση του φθορισμού της 2-AP1492 (ερυθρό) και 2-AP1493 (κυανό) επισημασμένου A-site, αλλά και της ελεύθερης 2-AP (ροζ) συναρτήσει της συγκέντρωσης της παρομομυκίνης.....	115

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση ή τη σύνθεση του RNA....	47
Πίνακας 3.1: Αμινογλυκοζίτες που έχουν χρησιμοποιηθεί κλινικά μέχρι σήμερα.....	49
Πίνακας 4.1: Κάποιες από τις ετεροκυκλικές υποκαταστάσεις της 4-θέσης της 2-DOS, που χρησιμοποιήθηκαν από τον Ding κατά τη σύνθεση μονοϋποκατεστημένων 2-DOS παραγώγων του σχήματος 4.3.....	61
Πίνακας 4.2: Κάποιες από τις ετεροκυκλικές υποκαταστάσεις που χρησιμοποιήθηκαν από τον Vourloumis κατά τη σύνθεση των 4-μονοϋποκατεστημένων 2,5-dDOS παραγώγων του σχήματος 4.4.....	63
Πίνακας 5.1: Συνθήκες οξειδωσης της ρακεμικής αλκοόλης rac-74 προς την κετόνη rac-95	84
Πίνακας 5.2: Συνθήκες μεθυλενίωσης Wittig της ρακεμικής κετόνης rac-95 προς την ολεφίνη rac-97 : (α) Προσθήκη διαλύματος της rac-95 σε άνυδρο THF σε διάλυμα του $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$ σε άνυδρο THF (0°C , 5 min). (β) Προσθήκη διαλύματος του $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$ σε άνυδρο THF σε διάλυμα της rac-95 σε άνυδρο THF (0°C , 1 h). (γ) Προσθήκη διαλύματος του $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$ σε άνυδρο THF σε διάλυμα της rac-95 σε άνυδρο THF (rt, 1 h). (δ) Προσθήκη διαλύματος του $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$ σε άνυδρο τολουόλιο σε διάλυμα της rac-95 σε άνυδρο τολουόλιο (0°C , 5 min). (ε) Προσθήκη διαλύματος του $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$ σε άνυδρο THF σε διάλυμα της rac-95 σε άνυδρο THF (0°C , 30 min). (στ) Προσθήκη διαλύματος του $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$ σε άνυδρο THF σε διάλυμα της ρακεμικής κετόνης 95 σε άνυδρο THF (0°C , 5 min).....	86
Πίνακας 5.3: Συνθήκες μεθυλενίωσης Wittig: Προσθήκη διαλύματος της κετόνης 96 σε άνυδρο THF σε διάλυμα του ενεργοποιημένου υλιδίου σε άνυδρο THF στους 0°C . Χρόνος αντίδρασης: 24 h. (α) Όταν χρησιμοποιήθηκε LiBr (1eq) δεν παρατηρήθηκε το προϊόν 98	87
Πίνακας 5.4: Διενόφιλα που δοκιμάστηκαν για την αντίδραση Diels-Alder.....	90
Πίνακας 5.5: Διένια, διενόφιλα και συνθήκες που δοκιμάστηκαν στην αντίδραση Diels-Alder.....	90
Πίνακας 8.1: Τιμές των συγκεντρώσεων EC_{50} και IC_{50} που βρέθηκαν κατά τη μέτρηση των αναλόγων της 2-DOS συγκρινόμενων με τους φυσικούς αμινογλυκοζίτες νεομυκίνη B και νεαμίνη.....	117

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Φυσικοχημείας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας και Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «Δημόκριτος» υπό την ερευνητική επίβλεψη του Δρ. Διονύσιου Βουρλούμη, Διευθυντή Ερευνών στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», καθώς και υπό την ακαδημαϊκή επίβλεψη του κ. Αθανάσιου Γιωτάκη, Καθηγητή στον Τομέα Οργανικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

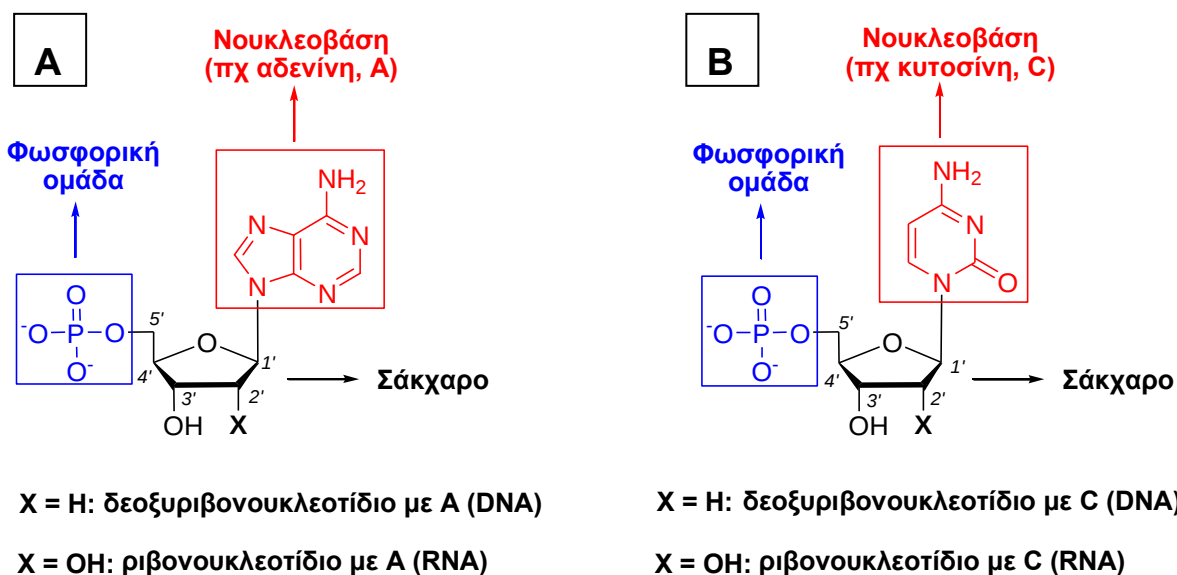
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

RNA: Ένα μακρομόριο-κλειδί

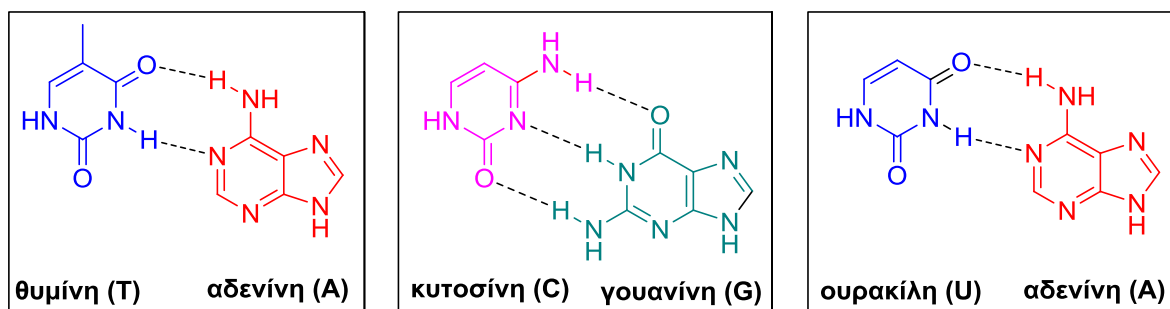
1.1. Εισαγωγή

Το ριβονουκλεϊκό οξύ ή συντομογραφικά RNA, είναι το ένα από τα τρία κύρια μακρομόρια (τα άλλα δύο είναι το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ ή DNA και οι πρωτεΐνες) που βρίσκονται στα κύτταρα και είναι απαραίτητα για όλες τις γνωστές μορφές ζωής. Δομικά το RNA μοιάζει με το DNA, όντας ένα πολυμερές χωρίς διακλαδώσεις που αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό νουκλεοτιδίων ενωμένων ομοιοπολικά (Σχήμα 1.1).¹ Κάθε δομική μονάδα νουκλεοτιδίου αποτελείται από:

- 1) μία νουκλεοβάση, δηλαδή μια ετεροκυκλική βάση πουρίνης (κυτοσίνη C, θυμίνη T στο DNA, ουρακίλη U στο RNA) ή πυριμιδίνης (γουανίνη G, αδερίνη A) (Σχήμα 1.2)
- 2) ένα σάκχαρο (ριβόζη στο RNA, δεοξυριβόζη στο DNA)
- 3) μια φωσφορική ομάδα.

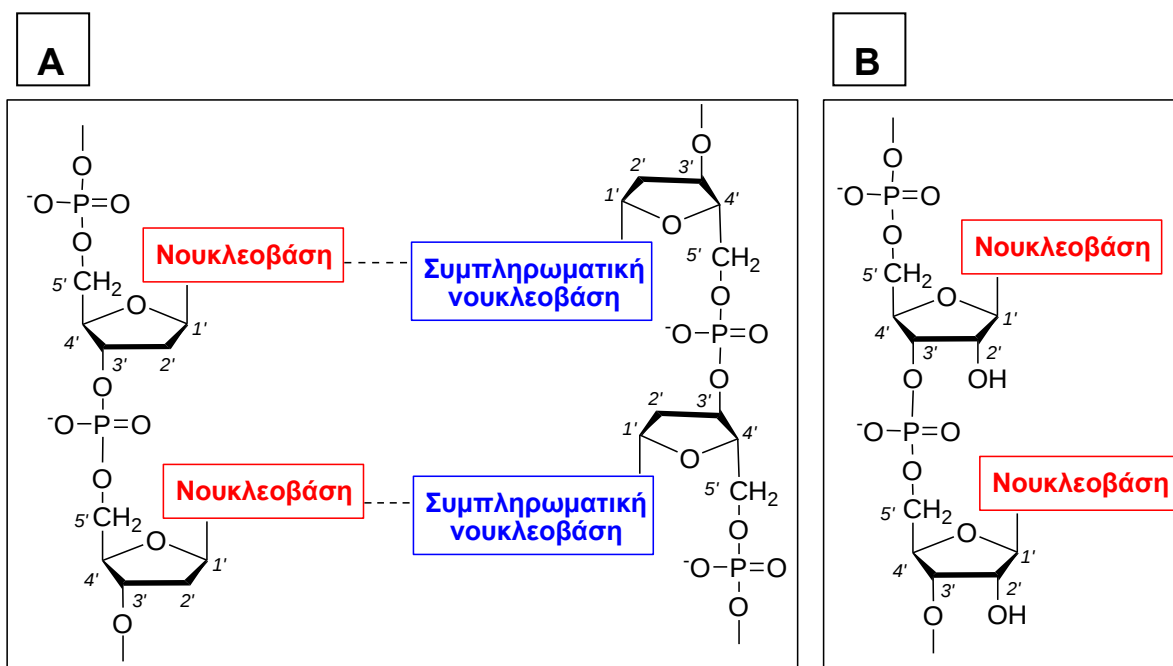


Σχήμα 1.1. Παραδείγματα δεοξυριβονουκλεοτιδίων και ριβονουκλεοτιδίων (δομικές μονάδες για τα πολυμερή νουκλεϊκά οξέα DNA και RNA, αντιστοίχως) με διάφορες νουκλεοβάσεις: **A)** Με βάση πυριμιδίνης (πχ αδερίνη, A) και **B)** Με βάση πουρίνης (πχ κυτοσίνη, C).

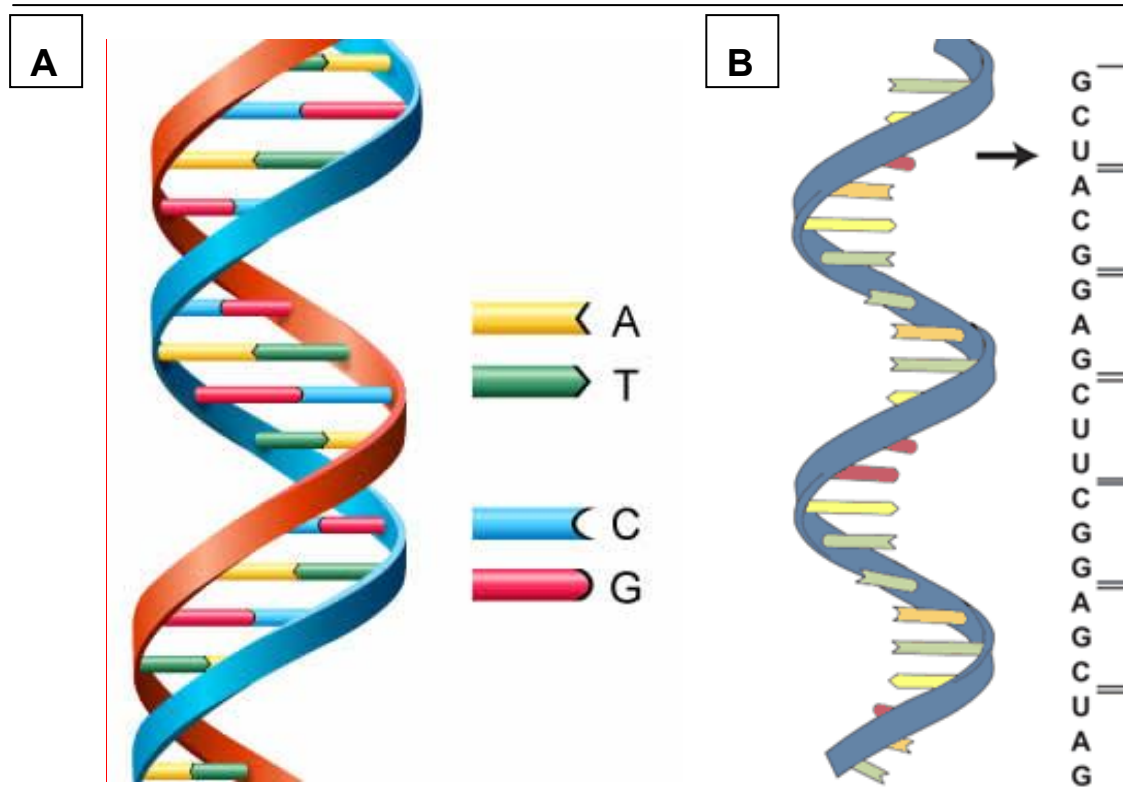


Σχήμα 1.2. Οι νουκλεοβάσεις ανά συμπληρωματικά ζεύγη στα DNA και RNA (T-A & C-G για το DNA, U-A & C-G για το RNA). Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών νουκλεοβάσεων σε έκαστο ζεύγος εμφανίζονται ως διακεκομμένες γραμμές.

Η ομοιοπολική σύνδεση των νουκλεοτιδίων για το σχηματισμό αλληλουχίας τους γίνεται μέσω φωσφοδιεστερικών δεσμών με κατεύθυνση 3'→5' (Σχήμα 1.3). Έτσι, η φωσφορική ομάδα που υπάρχει στο σάκχαρο ενός νουκλεοτιδίου ενώνεται με το υδροξύλιο του σακχάρου του επόμενου νουκλεοτιδίου οδηγώντας τελικά στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, η οποία και επιτρέπει στο προκύπτον μακρομόριο RNA να κωδικοποιεί τη γενετική πληροφορία (Σχήματα 1.3, 1.4). Συγκεκριμένα, οι νουκλεοβάσεις μεταφέρουν τη γενετική πληροφορία, ενώ το σάκχαρο και η φωσφορική ομάδα έχουν δομικό ρόλο.²



Σχήμα 1.3. Α) Τμήμα DNA (δύο κλώνοι ως διπλή έλικα): 2 αλληλουχίες δεοξυριβονουκλεοτιδίων ενωμένες μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου (οι οποίοι απεικονίζονται με διακεκομμένες γραμμές) ανάμεσα στα συμπληρωματικά ζεύγη των νουκλεοβάσεων. **Β)** Τμήμα RNA (ένας κλώνος): 1 αλληλουχία ριβονουκλεοτιδίων. Υπενθυμίζεται ότι το RNA είναι μονόκλωνο, οπότε δεν υπάρχει συμπληρωματική αλληλουχία όπως στο δίκλωνο DNA.



Σχήμα 1.4. Παραδείγματα τμημάτων από τα πολυμερή νουκλεϊκά οξέα DNA και RNA: **A)** Διπλή έλικα DNA (οι 4 νουκλεοβάσεις, A-T-C-G, συμβολίζονται με τα χρωματιστά κομμάτια κίτρινο, πράσινο, μπλε και ροζ αντιστοίχως. Οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών νουκλεοβάσεων σε ένα ζεύγος φαίνονται ως «κούμπωμα» των νουκλεοβάσεων με συμπληρωματικό σχήμα). **B)** Μονή έλικα RNA (φαίνονται οι 4 νουκλεοβάσεις A-U-C-G με τα αντίστοιχα χρώματα πορτοκαλί, ροζ, κίτρινο, γκρι).

1.2. Σύγκριση RNA-DNA

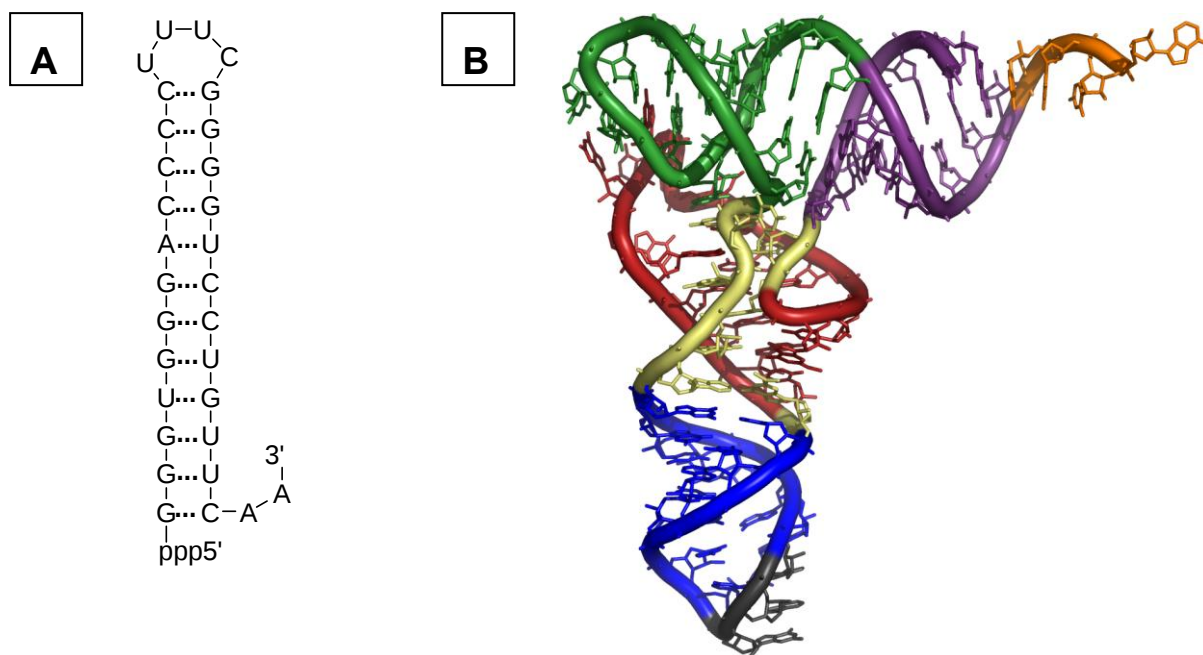
Τα γονίδια, οι βασικές φυσικές μονάδες κληρονομικότητας όλων των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών, αποτελούνται από DNA (δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ) και περιέχουν κωδικοποιημένες πληροφορίες οι οποίες τελικά εκφράζονται συνήθως ως πρωτεΐνες. Ωστόσο, το άμεσο εκμαγείο που χρησιμοποιούν όλοι οι κυτταρικοί οργανισμοί για την απαραίτητη πρωτεϊνοσύνθεση δεν είναι το DNA αλλά το RNA. Απ' την άλλη πλευρά, το γεγονός ότι κάποιοι ιοί έχουν RNA ως γενετικό υλικό αντί για DNA, ίσως υπαινίσσεται το σημαίνοντα ρόλο του RNA στην εξελικτική ιστορία της ζωής στη Γη. Συνεπώς, αμφότερα τα μακρομόρια DNA και RNA αποτελούν το γενετικό υλικό των οργανισμών (Σχήμα 1.5).³



Σχήμα 1.5. Ροή γενετικών πληροφοριών στα φυσιολογικά κύτταρα: Η αποθήκευση των πληροφοριών πραγματοποιείται στο DNA (με τα γονίδια), η μετάδοσή τους λαμβάνει χώρα μέσω του RNA και τελικά η έκφρασή τους γίνεται με τις πρωτεΐνες.

Τα μόρια DNA και RNA είναι αμφότερα μακρομοριακές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους (πολυμερή νουκλεϊκά οξέα) με τέσσερα είδη δομικών μονάδων νουκλεοτιδίων (καθώς υπάρχουν τέσσερις νουκλεοβάσεις)· παρατηρώντας τα όμως περαιτέρω φαίνονται οι εξής δομικές διαφορές:

- 1)** Διαφέρουν ως προς τον τύπο του σακχάρου που περιέχεται στο σακχαρο-φωσφορικό σκελετό τους. Το σάκχαρο στο μόριο του RNA είναι ριβόζη, η οποία φέρει ένα 2'-υδροξύλιο, σε αντίθεση με τη δεοξυριβόζη του DNA που φέρει υδρογόνο. Η παρουσία αυτού του υδροξυλίου καθιστά το μόριο του RNA περισσότερο επιρρεπές στην υδρόλυση, άρα λιγότερο σταθερό από το μόριο του DNA (Σχήμα 1.1).
- 2)** Τα μόρια RNA και DNA έχουν κοινές τις τρεις νουκλεοβάσεις (A, G, C), αλλά διαφέρουν στην τέταρτη η οποία είναι U και T αντίστοιχα. Ουσιαστικά, η διαφορά έγκειται στην ύπαρξη μιας επιπλέον μεθυλομάδας στη T (Σχήμα 1.2).
- 3)** Το RNA αποτελείται από μία μόνο αλυσίδα νουκλεοτιδίων (είναι δηλαδή μονόκλωνο μόριο), καθώς δεν μπορεί να σχηματίσει την τύπου-B διπλή έλικα του DNA λόγω της παρεμπόδισης που προκαλεί το 2'-υδροξύλιο της ριβόζης (Σχήματα 1.3 B, 1.4 B).⁴ Το σχεδόν πάντα δίκλωνο DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες που συγκρατούνται από δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις βάσεις τους (υπενθυμίζουμε ότι τα ζεύγη των συμπληρωματικών βάσεων είναι: A-T και C-G) (Σχήματα 1.3 A, 1.4 A).
- 4)** Το RNA διπλώνεται σε πολύπλοκες τρισδιάστατες δομές, γεγονός που του προσδίδει την ικανότητα να επιτελεί δομικές, πληροφοριακές και καταλυτικές λειτουργίες μέσα στα κύτταρα.⁵ Παρά το γεγονός ότι το RNA είναι μονόκλωνο, οι βάσεις του μπορούν να σχηματίσουν ζεύγη οπότε το μόριο είναι σε θέση να πάρει διαμόρφωση θηλιών φουρκέτας, οδηγώντας τελικά σε περιοχές δομής διπλής έλικας. Σε αυτές τις περιοχές η αδερίνη (A) ταιριάζει με την ουρακίλη (U) και η γουανίνη (G) με την κυτοσίνη (C). Επίσης, είναι δυνατόν να σχηματιστεί ζεύγος μεταξύ της G και της U, όμως είναι λιγότερο σταθερό από το ζεύγος G-C. Όταν κάποιες βάσεις δεν είναι συμπληρωματικές, λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός θηλιών, ώστε να διευκολύνεται ο σχηματισμός ζευγών μεταξύ άλλων βάσεων (Σχήμα 1.6).³



Σχήμα 1.6. *A)* Περιοχή δομής διπλής έλικας του αναδιπλωμένου RNA. Στο επάνω μέρος της διαμόρφωσης φαίνεται η διαμόρφωση θηλιάς, καθώς δεν υφίσταται ταιρίασμα βάσεων. *B)* Τρισδιάστατη δομή αναδιπλωμένου RNA.

1.3. Είδη RNA και πρωτεϊνοσύνθεση

Το κεντρικό δόγμα της Μοριακής Βιολογίας έγκειται στη θεμελιώδη αρχή ότι η ροή των γενετικών πληροφοριών σε όλα τα κύτταρα (από τα βακτήρια έως τον άνθρωπο) πραγματοποιείται από το DNA στο RNA και από εκεί στις πρωτεΐνες. Όπως αναφέρθηκε πριν, η αποθηκευμένη και κωδικοποιημένη γενετική πληροφορία που υπάρχει στο DNA αντιγράφεται στο RNA (μεταγραφή), το οποίο λειτουργεί ως εκμαγείο που κατευθύνει τη σύνθεση των πρωτεϊνών (Σχήμα 1.5).⁶

Το DNA (με τις πιο σταθερές έλικές του) λειτουργεί ως μακροπρόθεσμη «αποθήκη» κληρονομικών πληροφοριών για την πρωτεϊνοσύνθεση, ενώ το μονόκλωνο RNA συνήθως είναι πιο εφήμερος φορέας μοριακών οδηγιών στο ριβοσωμάτιο του κυττάρου. Το ριβοσωμάτιο είναι ένα μικρό κυτταρικό οργανίδιο ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα το οποίο και αποτελεί το εργοστάσιο της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου. Η ακριβής σύνθεση των πρωτεϊνών είναι κρίσιμη για την εύρυθμη λειτουργία των κυττάρων, καθώς η γραμμική σειρά των αμινοξέων κάθε πρωτεΐνης καθορίζει την τρισδιάστατη δομή της και κατ'επέκταση τη δραστηριότητά της. Ως εκ τούτου, η συνάθροιση των αμινοξέων στη σωστή αλληλουχία όπως ακριβώς αυτή υπάρχει κωδικοποιημένη στο DNA, είναι υψίστης σημασίας για την τελική σύνθεση λειτουργικών πρωτεϊνών.⁷

Κάποια μόρια RNA παίζουν ενεργό ρόλο στα κύτταρα καταλύοντας βιολογικές αντιδράσεις, ελέγχοντας τη γονιδιακή έκφραση, ανιχνεύοντας και διαβιβάζοντας αποκρίσεις σε κυτταρικά σήματα. Μία από αυτές τις ενεργές διαδικασίες και υψίστης σημασίας, όπως προαναφέρθηκε, είναι η

πρωτεϊνσύνθεση. Τρία είναι τα είδη των μορίων του RNA που εκτελούν διαφορετικές μεν λειτουργίες ως προς την πρωτεϊνσύνθεση, αλλά συνάμα συνεργειακές:

- 1) το αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA ή mRNA),
- 2) το μεταφορικό RNA (transfer RNA ή tRNA) και
- 3) το ριβοσωματικό RNA (ribosomal RNA ή rRNA).

Συνοπτικά, σε αυτήν τη διαδικασία τα μόρια mRNA κατευθύνουν τη σύνθεση των πρωτεϊνών στα ριβοσώματα, ενώ τα μόρια tRNA μεταφέρουν αμινοξέα στο ριβοσώμα, όπου το rRNA επιτελεί τη σύνδεση των αμινοξέων ώστε να σχηματιστούν οι πρωτεΐνες. Τα tRNA και rRNA σε αντίθεση με το mRNA αποτελούν τύπους μη κωδικοποιητικών μορίων RNA (non-coding RNA, ncRNA), καθώς δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αλλά αντ'αυτού χρησιμεύουν ως δομικά και ενζυμικά συστατικά των κυττάρων.⁸ Τα σχετικά ποσοστά εμφάνισης των mRNA, tRNA και rRNA στα κύτταρα, δείχνουν ότι το rRNA να είναι σε μεγαλύτερη αφθονία (80%), μετά ακολουθεί το mRNA (15%) και τελευταίο είναι το tRNA (5%), το οποίο μάλιστα είναι και το μικρότερο μόριο RNA.³

Το mRNA μεταφέρει τη γενετική πληροφορία από το DNA στα ριβοσώματα για να γίνει η πρωτεϊνσύνθεση των κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα μόρια του mRNA μεταγράφονται από κατάλληλες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων του DNA (τα λεγόμενα γονίδια) και η προκύπτουσα τελική αλληλουχία ριβονουκλεοτιδίων του mRNA καθορίζει την αλληλουχία αμινοξέων στην παραγόμενη πρωτεΐνη. Η μετατροπή νουκλεοτιδίων σε αμινοξέα γίνεται με κωδικοποίηση, η οποία συνίσταται στη μοναδική αντιστοιχία τριών νουκλεοτιδίων με ένα συγκεκριμένο αμινοξύ. Η κάθε τριπλέτα νουκλεοτιδίων αποκαλείται κωδικόνιο και αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό αμινοξύ, με εξαίρεση τα κωδικόνια τερματισμού που σηματοδοτούν το τέλος της πρωτεϊνσύνθεσης. Η μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνη εξαρτάται από μόρια προσαρμογής που αναγνωρίζουν και συνδέονται τόσο με το κωδικόνιο όσο και το αντίστοιχο αμινοξύ σε κατάλληλη θέση πάνω στο ριβοσώμα.⁹ Αυτοί οι συναρμολογητές αποτελούνται από tRNA μόρια, τα οποία θα συζητηθούν παρακάτω.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα κατά τη μεταγραφή του DNA, το mRNA υφίσταται επεξεργασία πριν εξαχθεί από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και συνδεθεί στα ριβοσώματα για την πρωτεϊνσύνθεση: τα μετάγραφα RNA που προορίζονται για μόρια mRNA υποβάλλονται σε σχηματισμό της καλύπτρας του RNA, πολυαδενυλίωση και συρραφή του RNA.¹⁰ Στα προκαρυωτικά κύτταρα όμως όπου δεν υπάρχει σαφής διάκριση μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος, το mRNA μπορεί να συνδεθεί με τα ριβοσώματα ενώ ακόμη μεταγράφεται από το DNA. Μετά από κάποιο χρονικό διάστημα (στα βακτήρια συνήθως είναι συντομότερο από ότι τους ευκαρυώτες) το mRNA αφού μεταφραστεί στην αντίστοιχη πρωτεΐνη, τελικά αποδομείται στα συστατικά του νουκλεοτίδια συνήθως με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων, των ριβονουκλεασών.¹¹

Το tRNA είναι μια μικρή αλυσίδα RNA μήκους 74-95 νουκλεοτιδίων και λειτουργία του είναι η μεταφορά ειδικών αμινοξέων σε μια επεκτεινόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα στα ριβοσώματα του κυττάρου με βάση τις οδηγίες του mRNA, ούτως ώστε να γίνεται η πρωτεϊνσύνθεση κατά τη

διάρκεια της μετάφρασης. Το tRNA διαθέτει μία περιοχή με ειδικούς υποδοχείς για την πρόσδεση αμινοξέων, καθώς και μία περιοχή που λέγεται αντικωδικόνιο. Το αντικωδικόνιο έχει μια ομάδα τριών νουκλεοτιδίων που ζευγαρώνουν με τα συμπληρωματικά νουκλεοτίδια του τρέχοντος κωδικονίου στο mRNA. Η αναγνώριση γίνεται με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων και η πρόσδεση πραγματοποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου. Το τρέχον κωδικόνιο καθορίζει το αντίστοιχο αμινοξύ που θα προσδεθεί στο tRNA. Επειδή ο γενετικός κώδικας είναι πλεονάζων, το ίδιο αμινοξύ μπορεί να καθορίζεται από αρκετά διαφορετικά κωδικόνια. Έτσι, ένα μόριο tRNA μπορεί να προσδέσει περισσότερα από ένα κωδικόνια, αλλά μόνο ένα αμινοξύ.¹²

Το rRNA σχηματίζει το κέντρο των ριβοσωμάτων πάνω στα οποία πραγματοποιείται η μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνη. Τα ριβοσωμάτια είναι νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλεγματα που αποτελούν τα εργοστάσια πρωτεϊνοσύνθεσης των κυττάρων και θα γίνει λεπτομερής περιγραφή τους στο επόμενο κεφάλαιο. Τα διαφορετικά είδη rRNA είναι πολυάριθμα στο κύτταρο και αποτελούν το 80% των ολικών ειδών RNA σε ένα τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο. Τα ευκαρυωτικά ριβοσωμάτια περιέχουν τέσσερα διαφορετικά μόρια rRNA: τα 18S, 5.8S, 28S και 5S rRNA. Τρία από αυτά τα μόρια rRNA (τα 18S, 5.8S και 28S) συντίθενται στον πυρήνικο του κυττάρου, ο οποίος είναι μια δομή στο εσωτερικό του πυρήνα και αποτελεί την κατεξοχήν περιοχή σύνθεσης του rRNA, και μεταγράφονται ενιαία από την RNA πολυμεράση-I δίνοντας το 45S ως πρόδρομο μόριο rRNA. Το τέταρτο μόριο rRNA (το 5S) μεταγράφεται έξω από τον πυρήνικο με τη βοήθεια της RNA πολυμεράσης-III.¹¹

Στην πρωτεϊνοσύνθεση εμπλέκεται και ένα ακόμα είδος RNA, το μεταφορικό-αγγελιοφόρο RNA (transfer-messenger RNA ή tmRNA ή 10SaRNA ή SsrA), το οποίο απαντάται σε πολλά βακτήρια. Το βακτηριακό tmRNA έχει τις ιδιότητες τόσο του tRNA όσο και του mRNA και όπως πολλά μόρια RNA, απαιτεί πρωτεϊνικούς συμπαράγοντες για να είναι δραστικό. Η SmpB είναι μια μικρή πρωτεΐνη που προσδένεται σφιχτά και εξειδικευμένα στο tmRNA και είναι σημαντική για τη δομή, τη σταθερότητα και τη δραστικότητά του.¹³ Ο παράγοντας επιμήκυνσης EF-Tu επίσης προσδένεται στο tmRNA και προάγει παραγωγική αλληλεπίδραση μέσα στο ριβοσωμάτιο.^{14,15} Έτσι, το tmRNA σχηματίζει ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο (tmRNP) με την SmpB, τον EF-Tu και τη ριβοσωμική πρωτεΐνη S1.

Το tmRNA και οι ενωμένες πρωτεΐνες του προσδένονται στα βακτηριακά ριβοσωμάτια κατά τη διάρκεια μιας προβληματικής πρωτεϊνοσύνθεσης, η οποία μπορεί να προήλθε πχ από ένα μόριο mRNA που απώλεσε το κωδικόνιο τερματισμού του.¹⁶ Στην περίπτωση αυτή, άρει την παύση λειτουργίας του σταματημένου ριβοσώματος, προσθέτει μια επισήμανση για εκκίνηση πρωτεόλυσης στο ημιτελές πολυπεπτίδιο που είχε αρχίσει να συντίθεται και θα οδηγούσε σε λανθασμένη πρωτεΐνη, καθώς επίσης διευκολύνει την αποδόμηση του αποκλίνοντος mRNA.¹⁷

Τα μη κωδικοποιητικά μόρια RNA (ncRNA), όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αλλά έχουν κάποιον άλλο λειτουργικό ρόλο στο κύτταρο. Τα μικρού μήκους βακτηριακά

μόρια ncRNA λέγονται μικρά RNA (sRNA). Η αλληλουχία του DNA από την οποία μεταγράφεται ένα μόριο ncRNA λέγεται γονίδιο RNA. Τα μόρια ncRNA μπορούν επίσης να προέλθουν από τα ιντρόνια (μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στα γονίδια) του mRNA.¹² Τα πιο αντιπροσωπευτικά είδη μη κωδικοποιητικού RNA είναι το tRNA και το rRNA, που όπως είδαμε παίζουν σημαντικό υποστηρικτικό ρόλο στη μετάφραση. Ωστόσο, στα μόρια ncRNA περιλαμβάνονται επίσης αρκετές κατηγορίες μικρών ρυθμιστικών μορίων RNA, κάποιων εκ των οποίων ο λειτουργικός ρόλος βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση.¹⁸

Μια ιδιαίτερη ομάδα ncRNA είναι το μικροRNA (μRNA, miRNA), που απαντάται στον άνθρωπο και σε άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς παίζοντας κομβικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας πολλών γονιδίων. Η σχετική θεωρία παρουσιάστηκε στην επιστημονική επιθεώρηση Nature το 2006.¹⁹ Το miRNA έχει μήκος αρκετά μικρότερο των υπολοίπων μορίων RNA, μόλις περίπου 22 νουκλεοτίδια. Τα πρώτα μόρια miRNA χαρακτηρίστηκαν στις αρχές του 1990, όμως αναγνωρίστηκαν ως ξεχωριστή ομάδα βιολογικών ρυθμιστών στις αρχές του 2000.¹⁸ Το ανθρώπινο γονιδίωμα μπορεί να κωδικοποιεί πάνω από 1000 μόρια miRNA,²⁰ τα οποία φαίνεται να προσδένονται σε στοχευμένα μόρια mRNA οδηγώντας συνήθως σε παύση της μετάφρασης ή στοχευμένη αποδόμηση.^{21,22} Πλήθος παθολογικών καταστάσεων έχει συνδεθεί με ασυνήθιστη έκφραση μορίων miRNA, οπότε βρίσκονται υπό διερεύνηση θεραπείες βασισμένες στο miRNA.²³⁻²⁵

Άλλη μια σημαντική κατηγορία μη κωδικοποιητικών μορίων RNA είναι το snRNA (small nuclear RNA) που βρίσκεται μέσα στον πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων και η μεταγραφή τους γίνεται από την RNA πολυμεράση-II ή την RNA πολυμεράση-III.²⁶ Τα μόρια snRNA εμπλέκονται σε ποικιλία σημαντικών διαδικασιών, όπως: το μάτισμα του RNA, τη ρύθμιση μεταγραφικών παραγόντων ή της RNA πολυμεράσης-II και τη διατήρηση των τελομερών (αλληλουχίες στα άκρα των χρωμοσωμάτων που προστατεύουν τη γενετική πληροφορία από τη φθορά). Τα μόρια snRNA πάντοτε συνδέονται με ειδικές πρωτεΐνες και τα συμπλέγματα αυτά, γνωστά ως σωματίδια συρραφής, αποκαλούνται μικρές πυρηνικές ριβονουκλεοπρωτεΐνες (snRNP ή snurps) και είναι πλούσια σε ουριδίνη.²⁷

Μια μεγάλη ομάδα μορίων snRNA είναι γνωστή ως snoRNA (small nucleolar RNA), τα οποία εντοπίζονται στον πυρηνίσκο και έχουν μήκος 60-300 νουκλεοτιδίων. Τα μόρια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιογένεση, καθώς καθοδηγούν χημικές τροποποιήσεις στα νουκλεοτίδια στοχευμένων μορίων RNA. Αρχικά, θεωρήθηκε ότι ο ρόλος των snRNA μορίων περιοριζόταν στην τροποποίηση μόνο του rRNA κατά τη βιογένεση του ριβοσώματος, αλλά πλέον είναι φανερό ότι στοχεύουν και άλλα είδη RNA, συμπεριλαμβανομένων των snRNA και mRNA μορίων.²⁸⁻³² Υπάρχουν αρκετά μόρια snoRNA, τα επονομαζόμενα «ορφανά», τα οποία και στερούνται γνωστών στόχων μέχρι στιγμής.³³⁻³⁸

Ένα ακόμη μη κωδικοποιητικό μόριο RNA το οποίο έχει ρυθμιστικό ρόλο, είναι το καταλυτικό RNA ή ριβοζύμη (ribozyme = ribonucleic acid enzyme). Αυτό το είδος RNA έχει μια

καλά καθορισμένη τριτοταγή δομή και καταλύει χημικές αντιδράσεις όπως τη διάσπαση και επανένωση άλλων μορίων RNA,³⁹ καθώς επίσης και την κατάλυση του πεπτιδικού δεσμού που λαμβάνει χώρα στα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος.⁴⁰ Πολλές φυσικές ριβοζύμες καταλύουν είτε την υδρόλυση του ενός από τους δικούς τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς ή άλλων μορίων RNA.

1.4. RNA: Ένας πολλά υποσχόμενος φαρμακευτικός στόχος

Παρά το γεγονός ότι το RNA παίζει σημαντικό ρόλο σε βιολογικές διαδικασίες, μόνο τελευταία μελετήθηκε ως φαρμακευτικός στόχος.⁴¹ Η πρόσφατη έκρηξη ανακαλύψεων στη βιολογία του RNA αποκάλυψε ότι το εν λόγω μόριο δεν έχει μόνο έναν παθητικό ρόλο ως απλός μεσολαβητής της γενετικής πληροφορίας. Το πλήθος των λειτουργιών του πλέον επεκτείνεται στη ρύθμιση της μεταγραφής,⁴² της μετάφρασης,^{43,44} της πρωτεϊνικής λειτουργίας^{45,46} και της κατάλυσης,⁴⁷ αρμοδιότητες που μέχρι πρότινος αποδίδονταν κλασικά στις πρωτεΐνες. Με δεδομένη την πολυσχιδή διάσταση του RNA, καθίσταται σαφής η δυνητική του στόχευση για θεραπεία πολλών ασθενειών. Έτσι λοιπόν, μικρά μόρια που προσδένονται επιλεκτικά στο RNA θα μπορούσαν ίσως να ανοίξουν νέους δρόμους στη θεραπευτική παρέμβαση.

Για ορισμένες ασθένειες η στόχευση του RNA πιθανότατα να είναι η καλύτερη και η μόνη λύση, καθώς οι άλλοι δύο εναλλακτικοί φαρμακευτικοί στόχοι (το DNA και οι πρωτεΐνες) παρουσιάζουν σημαντικές αδυναμίες. Συγκεκριμένα, η σύγκριση του RNA με το DNA και τις πρωτεΐνες δείχνει ότι:

α) Οι δομικές μονάδες του RNA, όπως και του DNA (νουκλεοτίδια), είναι λιγότερες και απλούστερες από τις αντίστοιχες των πρωτεϊνών (αμινοξέα).

β) Οι αναδιπλώσεις του μονόκλωνου RNA μπορούν να οδηγήσουν σε δημιουργία ελίκων αντίστοιχων με εκείνων του δίκλωνου DNA. Συγκεκριμένα, το RNA συχνά περιέχει βραχείες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων ικανές να ζευγαρώνουν με συμπληρωματικές αλληλουχίες που εντοπίζονται σε άλλες περιοχές του ίδιου μορίου. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις, σε συνδυασμό με «μη συμβατικές» αλληλεπιδράσεις ζευγών βάσεων, δίνουν στο RNA τη δυνατότητα να πτυχώνεται σε μια τρισδιάστατη δομή η οποία καθορίζεται από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του (Σχήμα 1.6, **B**).⁴⁸

Οι ποικίλες τρισδιάστατες δομές του RNA προσομοιάζουν στην αναδίπλωση μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας προς το σχηματισμό της τελικής δομής μιας πρωτεΐνης. Λόγω της μη απόλυτης συμπληρωματικότητας των βάσεων, αυτές οι αναδιπλώσεις του RNA οδηγούν σε καθορισμένες κοιλοότητες παρόμοιες των πρωτεϊνών. Η διαφορά των δύο ειδών κοιλοτήτων είναι στο φορτίο: στο RNA είναι αποκλειστικά αρνητικά φορτισμένες, ενώ στις πρωτεΐνες ενδέχεται να είναι θετικά, αρνητικά ή ουδέτερα φορτισμένες. Έτσι λοιπόν στις κοιλοότητες του RNA είναι εφικτή η πρόσδεση άλλων μορίων RNA,^{49,50} πρωτεϊνών⁵¹ και μικρού μοριακού βάρους δευτερογενών μεταβολιτών.⁵²

Κάποια από τα πλεονεκτήματα που ενισχύουν τη θεώρηση του RNA ως ενός ιδιαίτερα ελκυστικού στόχου για τη θεραπευτική παρέμβαση είναι τα εξής:

- 1) Η προσβασιμότητά του στα ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα.
- 2) Η απουσία κυτταρικών επιδιορθωτικών μηχανισμών για το μακρομόριο.
- 3) Η ποικιλομορφία προσωρινών τρισδιάστατων πτυχώσεών του,⁵³ που επιτρέπει την εκλεκτική πρόσδεση μορίων που τις επηρεάζουν.
- 4) Η καίρια συμμετοχή μορίων RNA κατά την αντιγραφή και έκφραση των γονιδίων καθώς και οι καταλυτικές ιδιότητες του RNA, γεγονότα που μάλιστα ίσως συνηγορούν υπέρ της αντίληψης για τον «κόσμο του RNA».⁵⁴ Σύμφωνα λοιπόν με αυτήν την υπόθεση, στα αρχέγονα κύτταρα το RNA χρησίμευε τόσο για την αποθήκευση των γενετικών πληροφοριών όσο και για την κατάλυση των χημικών αντιδράσεων.⁵⁵ Με την πάροδο του χρόνου το DNA, χάρη στην αυξημένη σταθερότητα της διπλής του έλικας, ανέλαβε το ρόλο αποθήκευσης του γενετικού υλικού, ενώ οι πρωτεΐνες πήραν τον κύριο καταλυτικό και δομικό ρόλο στα κύτταρα. Έτσι, στα σύγχρονα κύτταρα το RNA λειτουργεί πλέον σαν ένας μεσάζοντας κατά την πρωτεϊνσύνθεση εξακολουθώντας να καταλύει ορισμένες θεμελιώδεις αντιδράσεις, πράγμα που ενδεχομένως καταδεικνύει ότι οι RNA καταλύτες είναι μοριακά «απολιθώματα» μιας πρωιμότερης εποχής.

Η ανάπτυξη φαρμάκων που προσδένονται εκλεκτικά στις πτυχές του RNA ανοίγει συναρπαστικούς νέους δρόμους για να επεκταθεί σε μεγάλο βαθμό το υπάρχον ρεπερτόριο των πρωτεϊνών που δρουν ως θεραπευτικοί στόχοι. Ενώ τα ίδια εργαλεία που χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό φαρμάκων που στοχεύουν σε πρωτεΐνες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και για τα νουκλεϊκά οξέα, οι διαφορές ανάμεσα στις πρωτεΐνες και στα μόρια RNA ως προς τις δυνάμεις που κυριαρχούν στο τρισδιάστατο δίπλωμα, υπαγορεύουν στρατηγικές ορθολογικού σχεδιασμού καινοτόμων φαρμάκων. Η τεχνική πρόοδος στη σύνθεση του RNA και στον καθορισμό της δομής του τροφοδοτεί μια ραγδαία αυξανόμενη γνώση γύρω από την τρισδιάστατη δομή και τους ρόλους του μακρομορίου αυτού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Ριβοσωμάτιο

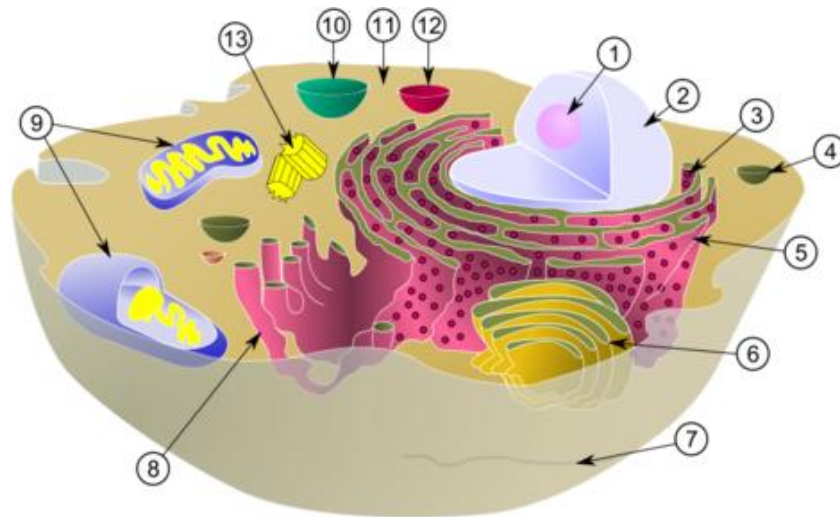
2.1. Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, σε όλα τα ζωντανά κύτταρα η ροή των γενετικών πληροφοριών γίνεται από το DNA στο RNA και τελικά στις πρωτεΐνες, με το RNA να αποτελεί έναν σημαντικό μεσάζοντα. Από τα ποικίλα λειτουργικά είδη μορίων RNA που εμπλέκονται άμεσα στην πρωτεϊνοσύνθεση είναι το mRNA, το tRNA και το rRNA. Το mRNA μεταγράφεται από το DNA και εν συνεχεία μεταφράζεται σε πρωτεΐνη με τη βοήθεια του tRNA, το οποίο και μεταφέρει τα κατάλληλα αμινοξέα για να «χτιστεί» η ορθή πολυπεπτιδική αλυσίδα πάνω σε δομές που έχουν σχηματιστεί από το rRNA και λέγονται ριβοσωμάτια.

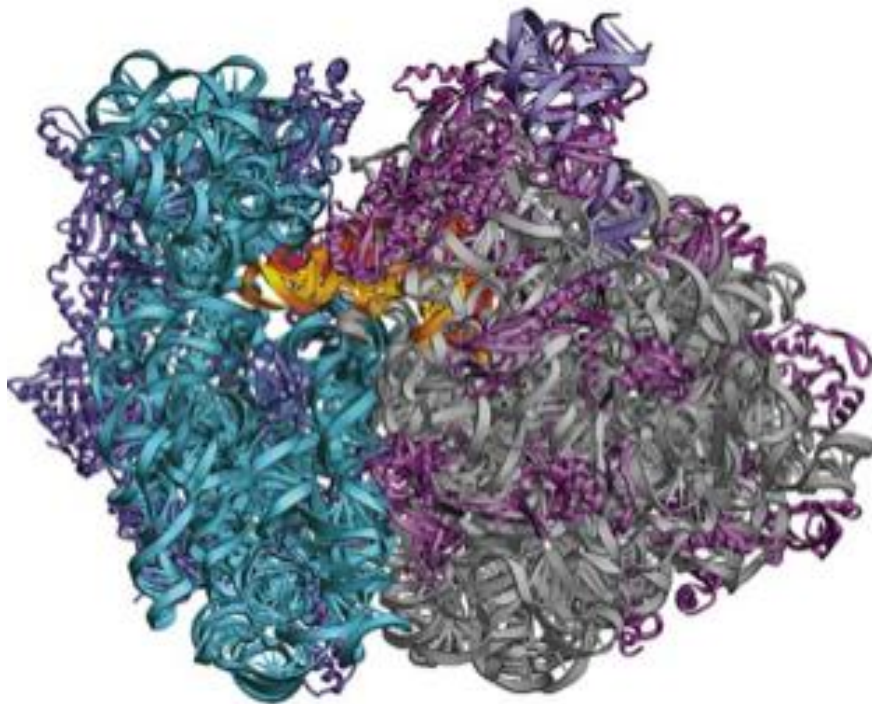
2.2. Δομή και λειτουργία του ριβοσωματίου

Το ριβοσωμάτιο είναι ένα από τα σημαντικότερα οργανίδια του κυττάρου, καθώς αποτελεί το εργοστάσιο παραγωγής των πρωτεϊνών του κυττάρου (Σχήμα 2.1). Ένα συνηθισμένο ζωντανό κύτταρο περιέχει στο κυτταρόπλασμα εκατομμύρια ριβοσωμάτια. Σε έναν ευκαρυώτη, ορισμένα ριβοσωμάτια είναι ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα, ενώ άλλα είναι προσδεδεμένα στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου.⁵⁶

Το ριβοσωμάτιο είναι μία από τις μεγαλύτερες και πιο περίπλοκες κυτταρικές δομές, έχει σφαιρική διαμόρφωση με διάμετρο περίπου 20 nm και αποτελεί ένα μεγάλο σύμπλοκο που περιέχει σε ποσοστό 65% μόρια rRNA και σε ποσοστό 35% 50 και πλέον διαφορετικές ριβοσωματικές πρωτεΐνες. Τα μόρια rRNA διπλώνονται σε πολύ συμπαγείς τρισδιάστατες δομές που σχηματίζουν τον πυρήνα του ριβοσωματίου (Σχήμα 2.2).



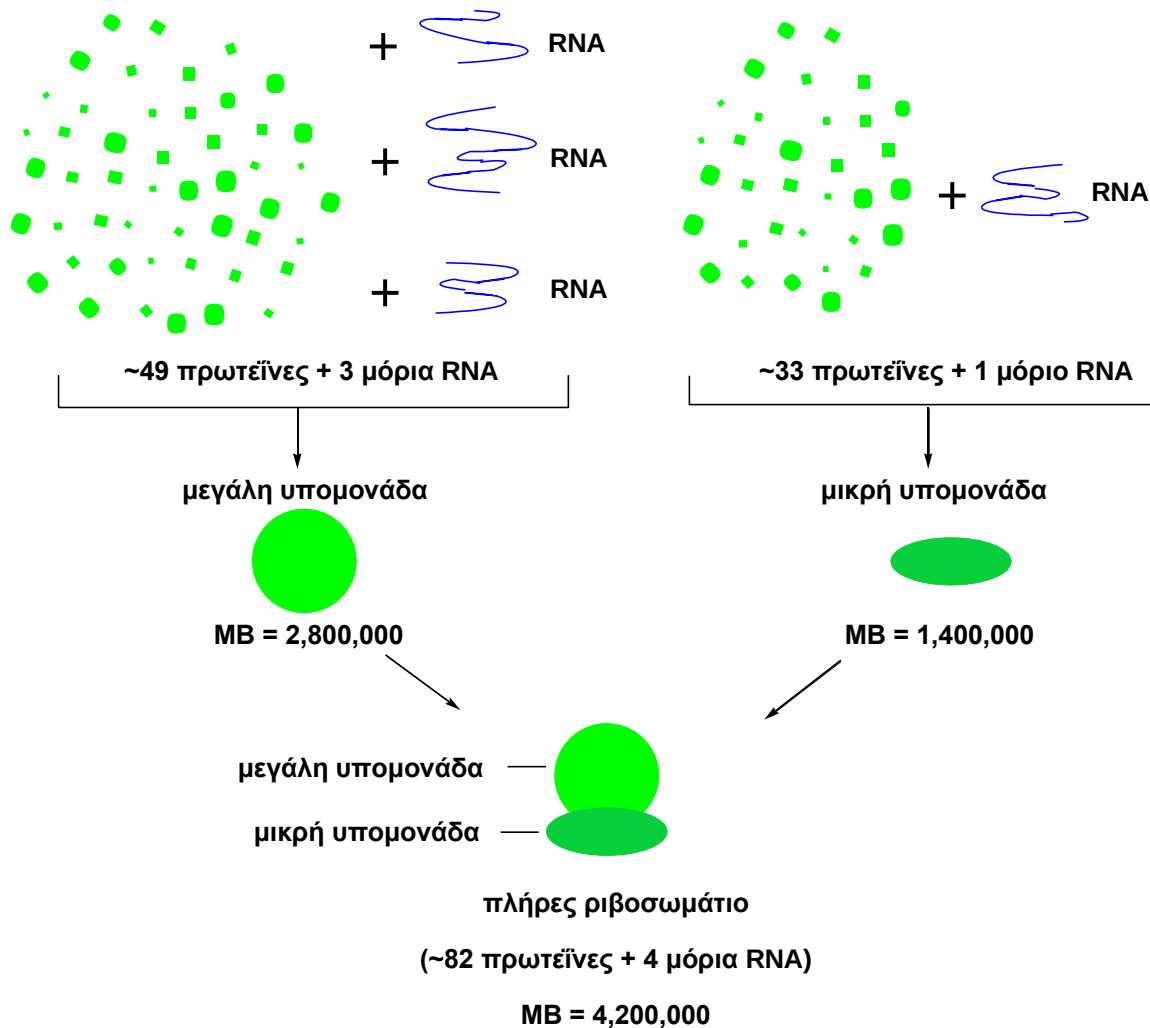
Σχήμα 2.1. Διάγραμμα τυπικού ζωικού ευκαρυωτικού κυττάρου όπου φαίνονται οι υποκυτταρικές μονάδες και η θέση του ριβοσωματίου: 1) Πυρηνίσκος, 2) Πυρήνας, 3) Ριβοσωμάτιο, 4) Κυστίδιο, 5) Τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο, 6) Συσκευή (ή σύμπλοκο) Golgi, 7) Κυτταροσκελετός, 8) Λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, 9) Μιτοχόνδρια, 10) Κενοτόπιο, 11) Κυτταρόπλασμα, 12) Λυσόσωμα, 13) Κεντριόλια μέσα σε κεντροσωμάτιο.



Σχήμα 2.2. Τρισδιάστατη δομή του βακτηριακού ριβοσωματίου, όπως βρέθηκε από την ερευνητική ομάδα του Ramakrishnan σε κρυσταλλογραφικές μελέτες ανάλυσης της δομής συμπλόκου με χρήση ακτίνων-X.⁵⁷ Η μικρή υπομονάδα βρίσκεται στα αριστερά (γαλάζιο), ενώ η μεγάλη στα δεξιά (γκρι). Τα μόρια tRNA είναι ανάμεσα στις 2 υπομονάδες (κίτρινο). Οι πρωτεΐνες υποδηλώνονται με το μωβ χρώμα.

Αντίθετα, οι ριβοσωματικές πρωτεΐνες γενικά εντοπίζονται στην επιφάνεια, όπου γεμίζουν τα κενά και τις σχισμές του διπλωμένου RNA. Ο κύριος ρόλος των ριβοσωματικών πρωτεϊνών φαίνεται πως είναι να σταθεροποιούν τον «πυρήνα» του RNA, επιτρέποντας παράλληλα να συμβούν οι αλλαγές στη διαμόρφωση του rRNA που είναι αναγκαία προϋπόθεση ώστε το rRNA να κατορθώσει να καταλύσει αποτελεσματικά την πρωτεϊνσύνθεση.

Η δομή του ριβοσωματίου (2/3 rRNA και 1/3 πρωτεΐνες) επιβεβαιώνει παλαιότερες ενδείξεις ότι τα rRNA και όχι οι πρωτεΐνες ευθύνονται για τη συνολική διαμόρφωσή του, την ικανότητά του να τοποθετεί τα tRNA πάνω στα mRNA, ακόμα και για την καταλυτική λειτουργία του, δηλαδή το σχηματισμό πεπτιδικών δεσμών. Πρέπει να σημειωθεί, ότι αυτή η καταλυτική ενεργότητα του ριβοσωματίου το καθιστά ένα ριβοένζυμο. Το ριβοσωμάτιο με τον «πυρήνα» του RNA μπορεί επομένως να θεωρηθεί ως κατάλοιπο των πρώιμων σταδίων της ζωής στη Γη, όταν η πρωτεϊνσύνθεση εξελίχθηκε σε κύτταρα που είχαν ως αποκλειστικούς «διαχειριστές» τα ριβοένζυμα.⁵⁸



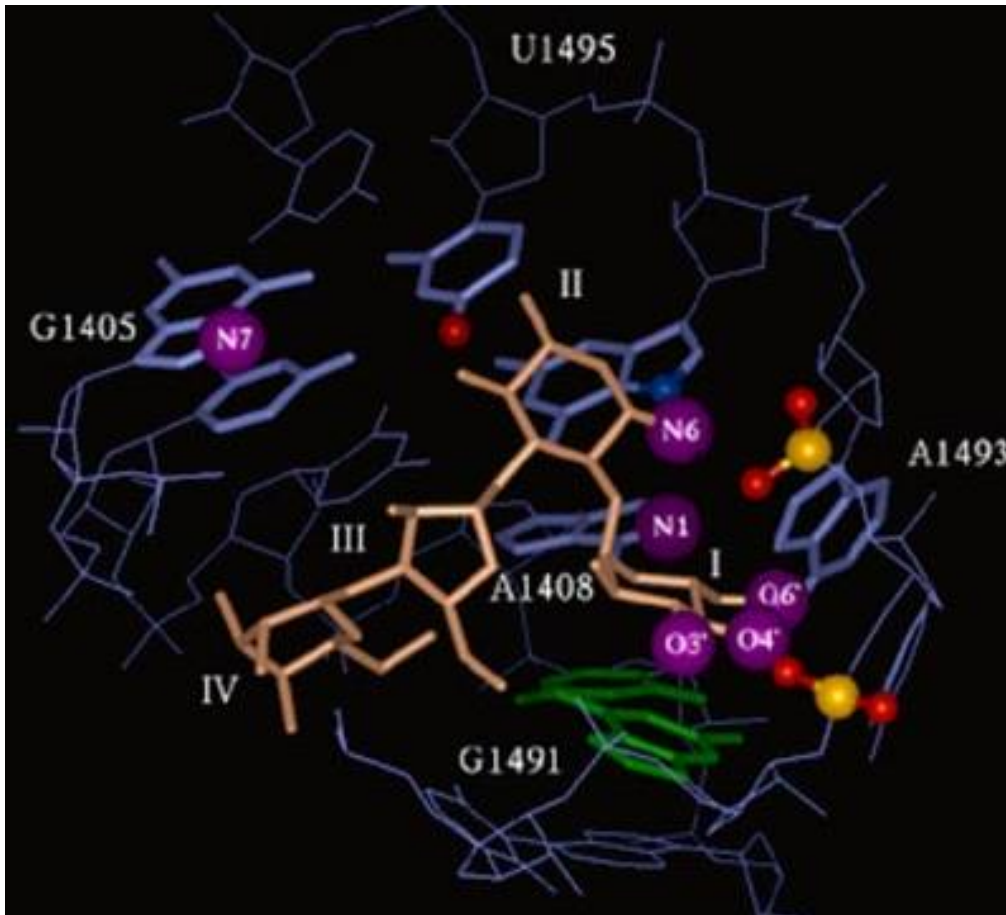
Σχήμα 2.3. Συστατικά ευκαρυωτικών ριβοσωματίων (παρόμοια δομή έχουν και τα προκαρυωτικά): Το ριβοσωμάτιο είναι ένα μεγάλο σύμπλοκο από 4 μόρια RNA και πάνω από 80 πρωτεΐνες.

Τόσο τα ευκαρυωτικά όσο και τα προκαρυωτικά ριβοσωμάτια αποτελούνται από δύο υπομονάδες, τη μία (50S, το S προέρχεται από το 'Svedbergs' που είναι η μονάδα μέτρησης της ταχύτητας καθίζησης κατά τα πειράματα υπερφυγοκέντρησης) μεγαλύτερη από την άλλη (30S), οι οποίες προσαρμόζονται κατάλληλα μεταξύ τους για να σχηματίσουν ένα πλήρες ριβοσωμάτιο με μάζα αρκετών εκατομμυρίων Daltons (Σχήμα 2.3) (για λόγους σύγκρισης αναφέρεται ότι μια συνήθης πρωτεΐνη έχει μάζα 40.000 daltons).⁵⁶ Σήμερα είναι γνωστή η κρυσταλλική δομή ολόκληρου του βακτηριακού ριβοσωματίου (70S),⁵⁹⁻⁶¹ καθώς και των δύο υπομονάδων του (50S και 30S), γεγονός που αποτέλεσε θρίαμβο της σύγχρονης βιοχημείας (η επίσημη βράβευση ήρθε με το Nobel Χημείας που απονεμήθηκε στους Ramakrishnan, Steitz και Yonath το 2009) (Σχήμα 2.2).⁶²⁻⁶⁹

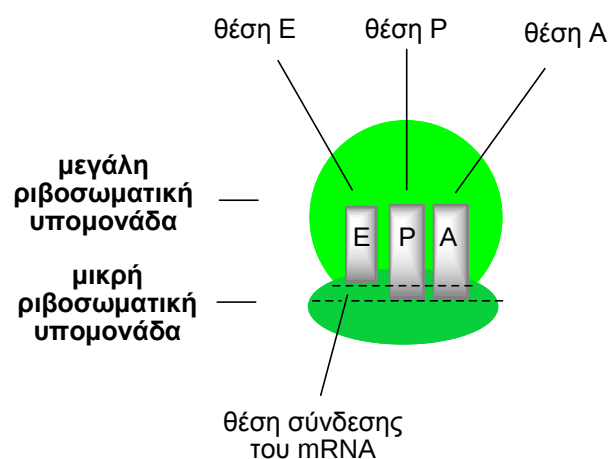
Η υπομονάδα 50S του ριβοσωματίου καταλύει τη δημιουργία των πεπτιδικών δεσμών της πρωτεϊνικής αλυσίδας. Το ενεργό κέντρο της υπομονάδας 50S, δηλαδή η περιοχή όπου η γενετική πληροφορία αρχίζει να μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, περιέχει μόνο rRNA και όχι και πρωτεΐνες. Το γεγονός αυτό υπαινίσσεται ότι το ριβοσωμάτιο στην πραγματικότητα είναι ένα ριβοένζυμο, ενισχύοντας έτσι το σενάριο του «RNA κόσμου» που αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.⁵⁶

Η υπομονάδα 30S είναι υπεύθυνη για: **α)** την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης, **β)** την αποκωδικοποίηση της γενετικής πληροφορίας που μεταφέρεται από το mRNA και **γ)** την πιστότητα των αλληλεπιδράσεων κωδικονίου-αντικωδικονίου, τη διασφάλιση δηλαδή της δέσμευσης του σωστού tRNA με το απαιτούμενο αμινοξύ για τη σύνθεση συγκεκριμένης πρωτεΐνης.⁶⁹ Επιπροσθέτως, μελέτες συγκρυστάλλωσης των επιμέρους υπομονάδων με μικρά μόρια έχουν αποσαφηνίσει τη φύση των αλληλεπιδράσεων που οδηγούν στη δέσμευση των μορίων αυτών σε βιολογικούς στόχους. Οι αμινογλυκοζίτες, μια γενιά αντιμικροβιακών ουσιών με εκτεταμένη κλινική χρήση, αποτελούν τα σημαντικότερα παραδείγματα της κατηγορίας αυτής (Σχήμα 2.4).⁷⁰⁻⁷³

Οι δύο υπομονάδες φτάνουν μαζί πάνω σε ένα μόριο mRNA, συνήθως κοντά στην αρχή του για να αρχίσουν τη σύνθεση μιας πρωτεΐνης (Σχήμα 2.5). Στη συνέχεια το ριβοσωμάτιο μετακινείται κατά μήκος του μορίου mRNA και μεταφράζει την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων σε μια αλληλουχία αμινοξέων με ρυθμό ένα κωδικόνιο τη φορά. Το ριβοσωμάτιο χρησιμοποιεί τα μόρια tRNA για την προσθήκη του κάθε αμινοξέος στο άκρο της αυξανόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας με τη σωστή σειρά. Τελικά, μόλις ολοκληρωθεί η σύνθεση της πρωτεΐνης οι δύο υπομονάδες του ριβοσωματίου διίστανται. Τα ριβοσωμάτια λειτουργούν με αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητα: μέσα σε ένα δευτερόλεπτο, ένα ριβοσωμάτιο ενός ευκαρυωτικού κυττάρου προσθέτει σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα περίπου δύο αμινοξέα. Τα ριβοσωμάτια των βακτηριακών κυττάρων λειτουργούν ακόμα πιο γρήγορα με ταχύτητα περίπου 20 αμινοξέων ανά δευτερόλεπτο.⁷⁴



Σχήμα 2.4. Τρισδιάστατη δομή συμπλόκου παρομομυκίνης (αμινογλυκοζιτικό αντιβιοτικό)-αποκωδικοποιητικού κέντρου του βακτηριακού rRNA. Με μωβ σφαίρες φαίνονται οι περιοχές που με χημική τροποποίηση οδηγούν σε ανθεκτικά αντιβιοτικά.



Σχήμα 2.5. Απλουστευμένη αναπαράσταση τρισδιάστατης δομής βακτηριακού ριβοσωματίου με βάση αποτελέσματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X: Η μικρή υπομονάδα έχει σκούρο πράσινο χρώμα, ενώ η μεγάλη ανοιχτό πράσινο. Οι θέσεις E, A, P είναι για πρόσδεση μορίων tRNA. Σημειώνεται ότι κατά την πρωτεϊνοσύνθεση ταυτόχρονα κατειλημμένες είναι το πολύ 2 από αυτές τις θέσεις. Επίσης υπάρχει μία θέση πρόσδεσης για το mRNA.

Ένα ριβοσωμάτιο περιέχει τέσσερις θέσεις σύνδεσης για μόρια RNA: η μία προορίζεται για το mRNA ενώ οι άλλες τρεις για τα tRNA (γνωστές ως θέσεις A, P και E από τα αρχικά των λέξεων aminoacyl-tRNA: αμινοακυλο-tRNA, peptidyl-tRNA: πεπτιδυλο-tRNA και exit: έξοδος, αντιστοίχως). Ένα μόριο tRNA θα συγκρατείται σφιχτά στις θέσεις A και P μόνο υπό την προϋπόθεση ότι το αντικωδικονίο του θα ζευγαρώνει (έστω και με ταλάντευση) με ένα συμπληρωματικό κωδικόνιο του μορίου mRNA, το οποίο είναι συνδεδεμένο στο ριβοσωμάτιο. Οι θέσεις A και P βρίσκονται αρκετά κοντά η μία στην άλλη με συνέπεια τα μόρια tRNA που προσδένονται σε αυτές να εξαναγκάζονται να σχηματίσουν ζεύγη βάσεων με γειτονικά κωδικόνια του μορίου mRNA (Σχήμα 2.5).⁷⁴

Τα μόρια rRNA σχηματίζουν το μεγαλύτερο μέρος των τριών θέσεων πρόσδεσης για τα tRNA (θέσεις A, P και E). Επίσης, το 23S RNA της μεγάλης υπομονάδας φαίνεται ότι σχηματίζει την καταλυτική θέση για τη δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού, αφού το πλησιέστερο αμινοξύ απέχει πολύ και δεν μπορεί να έρθει σε επαφή ούτε με το εισερχόμενο αμινοακυλο-tRNA, ούτε με την αυξανόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η καταλυτική θέση της πεπτιδυλοτρανσφεράσης, του ενζύμου που αποτελεί τμήμα του ριβοσωματίου και καταλύει την κεντρική αντίδραση της πρωτεϊνσύνθεσης, μοιάζει από πολλές απόψεις με τις αντίστοιχες θέσεις μερικών πρωτεϊνών: είναι ένας θύλακας με υψηλού βαθμού οργάνωση, ο οποίος προσανατολίζει προσεκτικά τα δύο αντιδρώντα (δηλαδή το αυξανόμενο πεπτίδιο και το αμινοακυλο-tRNA) και προσφέρει μια χημική ομάδα που δρα ως καταλύτης.⁷⁴

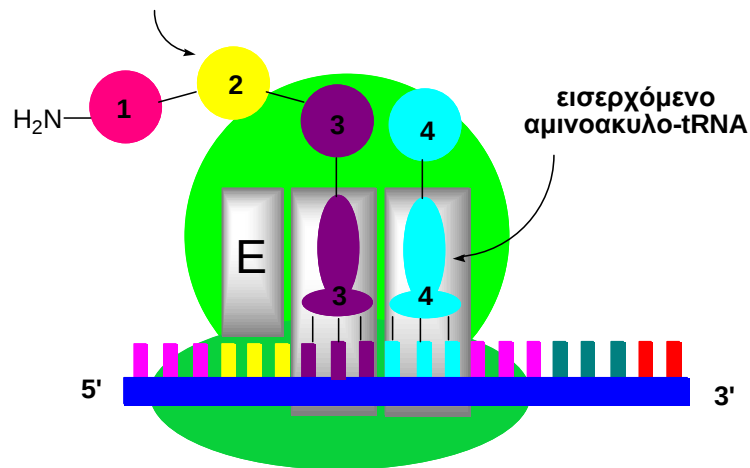
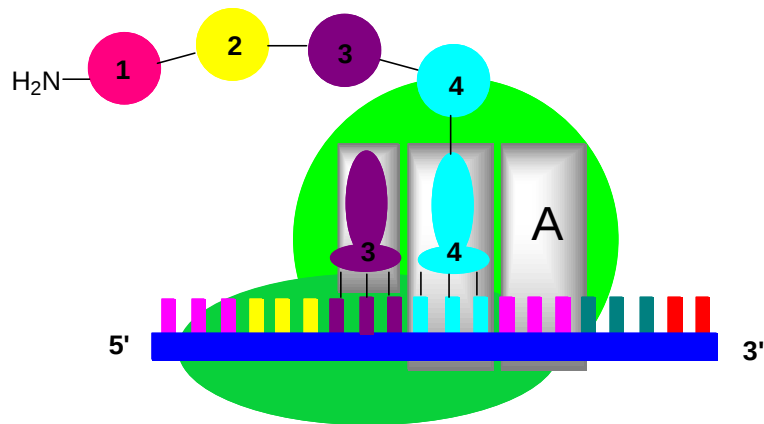
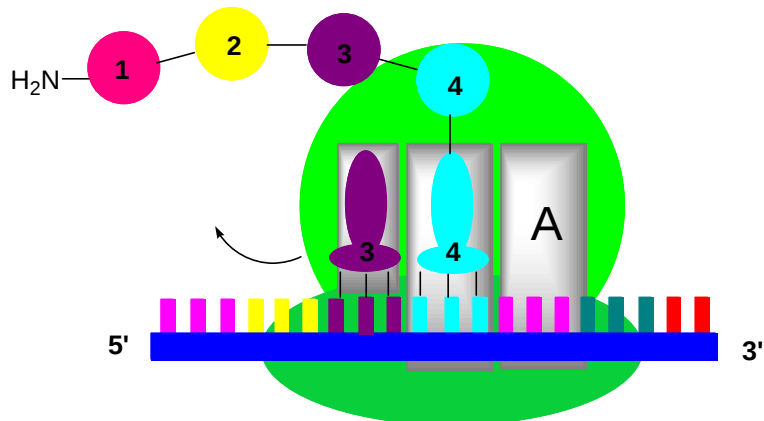
2.3. Ριβοσωμάτιο και πρωτεϊνσύνθεση

Η αναγνώριση ενός κωδικονίου από το αντικωδικόνιο ενός μορίου tRNA βασίζεται στο ίδιο είδος ζευγαρώματος των συμπληρωματικών βάσεων που χρησιμοποιείται κατά την αντιγραφή και τη μεταγραφή του DNA. Η ακριβής και ταχεία μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνη προϋποθέτει τη λειτουργία μιας μεγάλης μοριακής μηχανής, η οποία μετακινείται κατά μήκος της αλυσίδας του mRNA, συλλαμβάνει συμπληρωματικά μόρια tRNA, τα συγκρατεί σε κατάλληλες θέσεις και συνδέει τα αμινοξέα που μεταφέρουν ώστε να σχηματιστεί μια πρωτεϊνική αλυσίδα. Αυτή η μηχανή είναι το ριβοσωμάτιο.

Αφότου αρχίσει η πρωτεϊνσύνθεση, κάθε νέο αμινοξύ προστίθεται στην αυξανόμενη αλυσίδα με έναν κύκλο αντιδράσεων (Σχήμα 2.6).⁵⁶ Έστω ότι η διεργασία της επιμήκυνσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας βρίσκεται ήδη σε εξέλιξη. Στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή, μερικά αμινοξέα έχουν ήδη συνδεθεί μεταξύ τους και υπάρχει ένα μόριο tRNA συνδεδεμένο με το αυξανόμενο πολυπεπτίδιο στη θέση P του ριβοσωματίου. Ένα μόριο tRNA που μεταφέρει το επόμενο αμινοξύ στην αλυσίδα έχει προσδεθεί στην κενή θέση A, σχηματίζοντας ζεύγη βάσεων με το κωδικόνιο του mRNA που βρίσκεται εκτεθειμένο στη θέση A (Σχήμα 2.6, A).

A) Βήμα 1

αυξανόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα

**B) Βήμα 2****Γ) Βήμα 3**

Σχήμα 2.6. Η μετάφραση ενός μορίου mRNA (γίνεται πάντα σε κατεύθυνση 5'→3'). Παρουσιάζεται εποπτικά ο κύκλος των 3 βημάτων για τη σύνθεση μιας πρωτεϊνικής αλυσίδας (η αρχή της σύνθεσης γίνεται πάντα από το αμινοτελικό άκρο της): **A) Βήμα 1:** Ένα μόριο αμινοακυλο-tRNA προσδένεται στη θέση A του ριβοσωματίου. **B) Βήμα 2:** Σχηματίζεται ένας νέος πεπτιδικός δεσμός μεταξύ των αμινοξέων 3 & 4. **Γ) Βήμα 3:** Η μικρή ριβοσωματική υπομονάδα μετακινείται κατά μήκος του mRNA κατά 3 νουκλεοτίδια, αποβάλλει το tRNA που μόλις χρησιμοποιήθηκε και επαναφέρει το ριβοσωμάτιο στην αρχική του κατάσταση, ώστε να μπορεί να συνδεθεί το επόμενο μόριο αμινοακυλο-tRNA στη θέση A.

Στο βήμα 2, το καρβοξυτελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας απελευθερώνεται από το tRNA που βρίσκεται στη θέση P (με διάσπαση του δεσμού υψηλής ενέργειας ανάμεσα στο tRNA και στο αμινοξύ του) και ενώνεται με πεπτιδικό δεσμό με την ελεύθερη αμινομάδα του αμινοξέος που μεταφέρεται από το tRNA, το οποίο βρίσκεται στη θέση A (Σχήμα 2.6, B). Αυτή η κεντρική αντίδραση της πρωτεϊνσύνθεσης καταλύεται από το ένζυμο πεπτιδυλοτρανσφεράση (peptidyl transferase), η οποία αποτελεί τμήμα του ριβοσωματίου. Η αντίδραση της πεπτιδυλοτρανσφεράσης θεωρείται ότι υποβοηθείται από μια μετατόπιση της μικρής υπομονάδας (η οποία συγκρατείται πάνω στο mRNA) σε σχέση με τη μεγάλη υπομονάδα. Η μετατόπιση αυτή μετακινεί τα δύο tRNA στις θέσεις E και P της μεγάλης υπομονάδας.

Στο βήμα 3, η μικρή υπομονάδα μετακινείται ακριβώς 3 νουκλεοτίδια κατά μήκος του μορίου mRNA και επανέρχεται στην αρχική της θέση σε σχέση με τη μεγάλη υπομονάδα, ενώ το tRNA που κατάλαμβανε τη θέση E δίσταται (Σχήμα 2.6, Γ). Ο πλήρης κύκλος των τριών βημάτων επαναλαμβάνεται κάθε φορά που ένα αμινοξύ προστίθεται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, η οποία αυξάνει από το αμινοτελικό άκρο προς το καρβοξυτελικό της άκρο έως ότου το ριβοσωμάτιο συναντήσει ένα κωδικόνιο τερματισμού.

Η θέση απ' όπου αρχίζει η πρωτεϊνσύνθεση πάνω στο mRNA έχει μεγάλη σημασία επειδή καθορίζει το πλαίσιο ανάγνωσης για ολόκληρο το μήνυμα. Στο στάδιο αυτό, ένα σφάλμα έστω και κατά ένα νουκλεοτίδιο θα προκαλέσει λανθασμένη ανάγνωση όλων των επόμενων κωδικονίων του μηνύματος, οδηγώντας σε παραγωγή ελαττωματικής πρωτεΐνης με λανθασμένη αλληλουχία αμινοξέων. Το εναρκτήριο βήμα έχει επίσης μεγάλη σημασία και από μια άλλη άποψη, επειδή είναι το τελευταίο σημείο στο οποίο το κύτταρο μπορεί να αποφασίσει αν θα μεταφραστεί ένα mRNA για να παραχθεί η αντίστοιχη πρωτεΐνη: συνεπώς, ο ρυθμός έναρξης της μετάφρασης καθορίζει την ταχύτητα σύνθεσης μιας πρωτεΐνης.⁷⁴ Αξίζει να σημειωθεί ότι η αντιβιοτική δράση των αμινογλυκοζιτών, για τους οποίους θα μιλήσουμε εκτενώς στη συνέχεια, ουσιαστικά οφείλεται στην πρόκληση προβλήματος στο εναρκτήριο βήμα της πρωτεϊνσύνθεσης.

Η μετάφραση ενός mRNA μεταγράφου αρχίζει με το κωδικόνιο AUG. Για την έναρξη της μετάφρασης είναι απαραίτητο ένα ειδικό tRNA, γνωστό ως εναρκτήριο tRNA (initiator RNA), το οποίο πάντοτε μεταφέρει το αμινοξύ μεθειονίνη (στα βακτήρια χρησιμοποιείται φορμυλομεθειονίνη, μια τροποποιημένη μορφή μεθειονίνης). Επομένως, όλες οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες θα έχουν μεθειονίνη ως πρώτο αμινοξύ στο αμινοτελικό άκρο τους, το άκρο μιας πρωτεΐνης που συντίθεται πρώτο. Αργότερα, αυτή η μεθειονίνη συνήθως αφαιρείται από μια ειδική πρωτεάση. Το εναρκτήριο tRNA διαφέρει από το tRNA το οποίο συνήθως μεταφέρει τη μεθειονίνη.⁵⁶

Στους ευκαρυώτες, το εναρκτήριο tRNA (στο οποίο έχει προσδεθεί μεθειονίνη) πρώτα προσδένεται στη μικρή ριβοσωματική υπομονάδα μαζί με διάφορες πρωτεΐνες γνωστές ως παράγοντες έναρξης (initiator factors). Από όλα τα «φορτωμένα» μόρια tRNA (charged tRNAs) του κυττάρου, μόνο το εναρκτήριο tRNA διαθέτει την ικανότητα να προσδένεται ισχυρά στη μικρή ριβοσωματική

υπομονάδα. Στη συνέχεια, η «φορτωμένη» υπομονάδα συνδέεται με το 5' άκρο ενός μορίου mRNA, το οποίο εν μέρει αναγνωρίζεται από την καλύπτρα που υπάρχει στο ευκαρυωτικό mRNA. Κατόπιν, η μικρή ριβοσωματική υπομονάδα μετακινείται προς τα εμπρός (5' → 3') κατά μήκος του mRNA σε αναζήτηση του πρώτου AUG. Μόλις συναντήσει αυτό το κωδικόνιο, αρκετοί παράγοντες έναρξης δίστανται από την μικρή υπομονάδα, αφήνοντας χώρο για να συναρμολογηθεί η μεγάλη υπομονάδα και έτσι να ολοκληρωθεί το ριβοσωμάτιο. Επειδή το εναρκτήριο tRNA είναι συνδεδεμένο με τη θέση P, η πρωτεϊνοσύνθεση είναι έτοιμη να αρχίσει με την προσθήκη του επόμενου μορίου.⁵⁶

Διαφορετικός είναι ο μηχανισμός επιλογής ενός κωδικονίου έναρξης στα βακτήρια. Τα βακτηριακά mRNA μετάγραφα δε διαθέτουν στο 5' άκρο τους καλύπτρα που να υποδεικνύει στο ριβοσωμάτιο από πού πρέπει να αρχίσει να αναζητά την αφετηρία της μετάφρασης. Αντίθετα, περιέχουν ειδικές αλληλουχίες σύνδεσης των ριβοσωματίων μήκους έως 6 νουκλεοτιδίων, οι οποίες εντοπίζονται λίγα νουκλεοτίδια πριν από τα κωδικόνια AUG όπου πρόκειται να αρχίσει η μετάφραση. Σε αντιδιαστολή με του ευκαρυώτες, τα ριβοσωμάτια των βακτηρίων δε δυσκολεύονται να συνδεθούν απευθείας με ένα κωδικόνιο έναρξης που βρίσκεται στο εσωτερικό ενός mRNA μεταγράφου, αρκεί λίγα νουκλεοτίδια πριν από αυτό να υπάρχει μια ειδική θέση σύνδεσης. Για το λόγο αυτό, τα προκαρυωτικά mRNA μετάγραφα είναι πολυσιστρονικά, δηλαδή κωδικοποιούν αρκετές διαφορετικές πρωτεΐνες, οι οποίες μεταφράζονται όλες από το ίδιο mRNA, ενώ ένα ευκαρυωτικό mRNA μετάγραφο μεταφέρει συνήθως πληροφορίες για μία μόνο πρωτεΐνη.⁷⁴

Το τέλος του μηνύματος που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη σηματοδοτείται από την παρουσία ενός από τρία ειδικά κωδικόνια (UAA, UAG ή UGA) γνωστά ως κωδικόνια τερματισμού. Τα κωδικόνια τερματισμού δεν αναγνωρίζονται από κάποιο tRNA και δεν εξειδικεύουν κάποιο αμινοξύ, αλλά αντίθετα ειδοποιούν το ριβοσωμάτιο να σταματήσει τη μετάφραση. Πρωτεΐνες γνωστές ως παράγοντες απελευθέρωσης συνδέονται με όποιο κωδικόνιο τερματισμού φτάσει στη θέση A του ριβοσωματίου. Η σύνδεση αυτή μεταβάλλει την ενεργότητα της πεπτιδυλοτρανσφεράσης του ριβοσωματίου, κάνοντάς την να καταλύει την προσθήκη ενός μορίου νερού αντί ενός αμινοξέος στο πεπτιδυλο-tRNA. Η συγκεκριμένη αντίδραση απελευθερώνει το καρβοξυτελικό άκρο της αυξανόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας από ένα μόριο tRNA, που αποτελεί το μοναδικό σύνδεσμο της με το ριβοσωμάτιο και με τον τρόπο αυτό η ολοκληρωμένη πρωτεϊνική αλυσίδα απελευθερώνεται αμέσως στο κυτταρόπλασμα. Το ριβοσωμάτιο απελευθερώνει το mRNA μετάγραφο και δίσταται στις δύο υπομονάδες του, οι οποίες μπορούν να συναρμολογηθούν πάνω σε ένα άλλο μόριο mRNA για να αρχίσουν ένα νέο γύρο πρωτεϊνοσύνθεσης.⁷⁵

Οι περισσότερες πρωτεΐνες πτυχώνονται αυθόρμητα κατά την τρισδιάστατη δομή τους και μάλιστα ενώ ακόμα συντίθεται πάνω στο ριβοσωμάτιο. Ωστόσο, ορισμένες πρωτεΐνες απαιτούν ειδικούς συνοδούς προκειμένου να διπλωθούν σωστά. Οι πρωτεΐνες αυτές συναντώνται με τους συνοδούς καθώς αρχίζουν να συντίθενται από το ριβοσωμάτιο και διπλώνονται κατάλληλα ενόσω επιμηκύνεται η πεπτιδική αλυσίδα.

Η σύνθεση των περισσότερων πρωτεϊνών διαρκεί από 20 δευτερόλεπτα έως αρκετά λεπτά. Συνήθως, ακόμα και σε αυτό το πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, σε κάθε μόριο mRNA που μεταφράζεται αρχίζουν πολλοί γύροι μετάφρασης. Ένα νέο ριβοσωμάτιο προσδένεται σχεδόν αμέσως στο 5' άκρο του μορίου του mRNA μετάγραφου, ενώ το προηγούμενο ριβοσωμάτιο έχει μεταφράσει αρκετό τμήμα της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων ώστε να μην εμποδίζει την πρόσδεση του νέου ριβοσωματίου. Επομένως, τα μόρια του mRNA που μεταφράζονται συνήθως βρίσκονται υπό μορφή πολυριβοσωματίων, γνωστών επίσης και ως πολυσωμάτια: μεγάλα κυτταροπλασματικά συγκροτήματα, τα οποία αποτελούνται από αρκετά ριβοσωμάτια που διατάσσονται κατά μήκος του ίδιου μορίου mRNA με μεσοδιαστήματα τουλάχιστον 80 νουκλεοτιδίων. Οι αλληλοδιάδοχες εκκινήσεις σημαίνουν ότι στο ίδιο χρονικό διάστημα παράγονται πολύ περισσότερα πρωτεϊνικά μόρια από ότι θα παράγονταν εάν προτού ξεκινήσει η σύνθεση ενός νέου μορίου έπρεπε να ολοκληρωθεί η σύνθεση ενός προηγούμενου μορίου.

Πολυσωμάτια χρησιμοποιούν τόσο τα βακτήρια όσο και οι ευκαρυώτες. Ωστόσο, τα βακτήρια μπορεί να επιταχύνουν το ρυθμό της πρωτεϊνοσύνθεσης ακόμα περισσότερο. Τα βακτηριακά mRNA δε χρειάζεται να υποβληθούν σε ειδική επεξεργασία και καθώς συντίθενται είναι άμεσα προσπελάσιμα από τα ριβοσωμάτια. Έτσι, τα βακτηριακά ριβοσωμάτια προσδένονται στο ελεύθερο άκρο ενός βακτηριακού μορίου mRNA και αρχίζουν να το μεταφράζουν, πριν ακόμα ολοκληρωθεί η μεταγραφή του συγκεκριμένου RNA, ακολουθώντας κατά πόδας την RNA πολυμεράση καθώς μετακινείται κατά μήκος του DNA.⁷⁵

2.4. Η πρωτεόλυση μετά την πρωτεϊνοσύνθεση

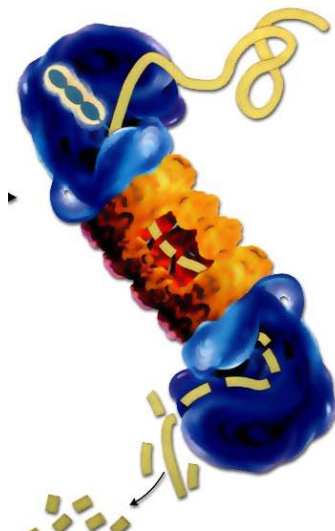
Μόλις η πρωτεΐνη απελευθερωθεί από το ριβοσωμάτιο υπόκειται σε διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς ελέγχου. Όπως συμβαίνει και στον ανθρώπινο πληθυσμό, ο αριθμός των αντιγράφων μια πρωτεΐνης σε ένα κύτταρο εξαρτάται όχι μόνο από το ρυθμό παραγωγής νέων μονάδων αλλά επίσης και από το χρόνο ζωής τους. Επομένως, η αποδόμηση των πρωτεϊνών στα επιμέρους αμινοξέα τους αποτελεί για τα κύτταρα έναν τρόπο να ρυθμίζουν την ποσότητα μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε μια δεδομένη χρονική στιγμή. Ο χρόνος ζωής των διαφόρων πρωτεϊνών ποικίλλει: οι δομικές πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στη συγκρότηση αρκετά μόνιμων ιστών, όπως τα οστά ή οι μύες, έχουν χρόνο ζωής αρκετών μηνών ή ακόμα και ετών. Αντίθετα, άλλες πρωτεΐνες όπως τα μεταβολικά ένζυμα και οι πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κύκλο της αύξησης, της μίτωσης και της διαίρεσης των κυττάρων, έχουν πολύ μικρότερο χρόνο ζωής, διάρκειας ημερών, ωρών ή ακόμα και δευτερολέπτων.⁷⁶

Τα κύτταρα διαθέτουν εξειδικευμένες οδούς για την ενζυμική αποδόμηση των πρωτεϊνών στα επιμέρους αμινοξέα τους (διεργασία γνωστή ως πρωτεόλυση). Τα ένζυμα που αποδομούν τις πρωτεΐνες, πρώτα σε μικρά πεπτίδια και τελικά σε επιμέρους αμινοξέα αναφέρονται συλλογικά ως πρωτεάσες. Οι πρωτεάσες δρουν υδrolώνοντας τους πεπτιδικούς δεσμούς ανάμεσα στα αμινοξέα. Μια λειτουργία των πρωτεολυτικών οδών είναι η ταχεία αποδόμηση των πρωτεϊνών με βραχύ χρόνο ζωής.

Μια άλλη λειτουργία, η οποία και έχει αποφασιστικό ρόλο για τον οργανισμό, είναι η αναγνώριση και εξάλειψη των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη ή έχουν διπλωθεί με λανθασμένο τρόπο. Η συσσώρευση κακοδιπλωμένων πρωτεϊνών είναι το αίτιο νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως η νόσος του Huntington, η νόσος του Alzheimer και η νόσος Creutzfeldt-Jacob. Τα συσσωματώματα των πρωτεϊνών βλάπτουν τα κύτταρα και τους ιστούς και μπορούν να προκαλέσουν ακόμα και το θάνατο των κυττάρων.⁷⁷

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, σημαντικές οδοί αποδόμησης των πρωτεϊνών λειτουργούν στο κυτταροδιάλυμα αλλά και σε άλλα διαμερίσματα, όπως τα λυσοσωμάτια. Οι περισσότερες πρωτεΐνες που αποδομούνται στο κυτταροδιάλυμα των ευκαρυωτικών κυττάρων διασπώνται από μεγάλα σύμπλοκα πρωτεολυτικών ενζύμων, γνωστά ως πρωτεοσωμάτια (proteasomes). Ένα πρωτεοσωμάτιο περιέχει στο κέντρο του έναν κύλινδρο, ο οποίος σχηματίζεται από πρωτεάσες, των οποίων τα ενεργά κέντρα πιστεύεται ότι είναι στραμμένα προς την εσωτερική επιφάνεια του κυλίνδρου. Τα δύο άκρα του κυλίνδρου πωματίζονται από μεγάλα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία σχηματίζονται τουλάχιστον από 10 διαφορετικά είδη πρωτεϊνικών υπομονάδων (Σχήμα 2.7).

Αυτά τα πρωτεϊνικά πώματα εικάζεται ότι συνδέονται με τις πρωτεΐνες που προορίζονται για αποδόμηση, τις ξεδιπλώνουν και τις προωθούν στον εσωτερικό θάλαμο του κυλίνδρου. Εκεί οι πρωτεάσες πραγματοποιούν την πέψη των πρωτεϊνών σε βραχεία πεπτίδια, τα οποία κατόπιν απελευθερώνονται. Η διάταξη αυτή εξασφαλίζει ότι οι πρωτεάσες εφοδιάζονται με πολύ επιλεγμένα υποστρώματα.^{76,77}



Σχήμα 2.7. Πρωτεοσωμάτιο ευκαρυωτικών κυττάρων (μεγάλο σύμπλοκο πρωτεολυτικών ενζύμων που αποδομεί βραχύβιες και ανεπιθύμητες πρωτεΐνες): Ο κεντρικός κύλινδρος έχει καλύπτρες (μπλε) στα 2 άκρα του, όπου προσδένονται επιλεκτικά οι πρωτεΐνες που έχουν σημανθεί για αποδόμηση.

Τα πρωτεοσωμάτια πρέπει από όλες τις πρωτεΐνες του κυττάρου να επιλέξουν μόνο συγκεκριμένες που θα πρέπει να εισέλθουν στον κύλινδρο για να αποδομηθούν. Η επιλογή αυτή γίνεται μέσω σήμανσης των επιθυμητών για αποδόμηση πρωτεϊνών με ένα ή περισσότερα μόρια μιας ουβικουΐτινης. Η ουβικουΐτινή είναι μια μικρή πρωτεΐνη που με τη βοήθεια εξειδικευμένων ενζύμων προσδένεται ομοιοπολικά στις πρωτεΐνες που πρέπει να αποδομηθούν. Εν συνεχεία, οι σεσημασμένες αυτές πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από το πρωτεοσωμάτιο το οποίο τις «συλλαμβάνει», μάλλον μέσω μιας από τις πρωτεΐνες του πώματος.⁷⁷

Οι πρωτεΐνες που προδιαγράφονται βραχύβιες, συχνά διακρίνονται από την παρουσία μιας βραχείας αλληλουχίας αμινοξέων η οποία ταυτοποιεί την πρωτεΐνη ως υποψήφια για προσθήκη ουβικουΐτινης («ουβικουΐτινίωση») και τελικά για αποδόμηση από το πρωτεοσωμάτιο. Αυτό το πρωτεολυτικό σύστημα που εξαρτάται από την ουβικουΐτινή επίσης αναγνωρίζει και αποδομεί μετουσιωμένες πρωτεΐνες, πρωτεΐνες με λανθασμένη πτύχωση, όπως και πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν αμινοξέα που έχουν υποστεί οξειδωση ή κάποια άλλη βλάβη. Τα ένζυμα που καταλύουν την προσθήκη της ουβικουΐτινης σε αυτές τις πρωτεΐνες φαίνεται ότι αναγνωρίζουν ειδικά σήματα που αποκαλύπτονται στην επιφάνεια των πρωτεϊνών από λάθος πτύχωση ή χημική βλάβη (όπως αλληλουχίες αμινοξέων ή δομικά μοτίβα τα οποία συνήθως είναι απροσπέλαστα και κρυμμένα στο εσωτερικό των μορίων).⁷⁷

2.5. Αναστολείς της πρωτεϊνوسύνθεσης των προκαρυωτών ως αντιβιοτικά

Η ικανότητα της πιστής μετάφρασης των mRNA μεταγράφων σε πρωτεΐνες είναι θεμελιώδες γνώρισμα όλων των μορφών ζωής στη Γη. Το ριβοσωμάτιο και άλλα μόρια που επιτελούν αυτό το τεράστιο έργο εμφανίζουν μεγάλες ομοιότητες σε όλους τους οργανισμούς, ωστόσο η πρωτεϊνوسύνθεση στους προκαρυώτες είναι διαφορετική σε σχέση με αυτή στους ευκαρυώτες, σε τέτοιο βαθμό που αυτές οι διαφορές αποτελούν τη βάση για μια από τις σημαντικότερες εξελίξεις της σύγχρονης ιατρικής. Πολλά από τα πιο αποτελεσματικά αντιβιοτικά είναι ενώσεις που αναστέλλουν εκλεκτικά την πρωτεϊνوسύνθεση στα βακτήρια και όχι στους ευκαρυώτες. Μερικά από αυτά τα φάρμακα αξιοποιούν τις λεπτές δομικές και λειτουργικές διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα βακτηριακά και στα ευκαρυωτικά ριβοσωμάτια και παρεμβαίνουν κατά προτίμηση στην πρωτεϊνوسύνθεση των βακτηρίων. Τα διάφορα αντιβιοτικά προσδένονται σε διαφορετικές περιοχές του βακτηριακού ριβοσωματίου. Έτσι, συχνά αναστέλλουν διαφορετικά βήματα της πρωτεϊνوسύνθεσης. Επιλεγμένα κοινά αντιβιοτικά αυτής της κατηγορίας φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1. Αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση ή τη σύνθεση του RNA.

Αντιβιοτικό	Ειδική δράση
Τετρακυκλίνη	Αναστέλλει την πρόσδεση του αμινοακυλο-tRNA στη θέση A του ριβοσωματίου (σχήμα 2.6, βήμα 1)
Στρεπτομυκίνη	Παρεμποδίζει τη μετάβαση από το σύμπλοκο έναρξης στο ριβοσωμάτιο· επίσης προκαλεί λάθος πρωτεϊνικό δίπλωμα.
Χλωραμφενικόλη	Αναστέλλει τη δράση της πεπτιδυλοτρανσφεράσης στο ριβοσωμάτιο (Σχήμα 2.6, βήμα 2)
Ερυθρομυκίνη	Αναστέλλει την αντίδραση μετατόπισης πάνω στο ριβοσωμάτιο (Σχήμα 2.6, βήμα 3)
ΡΙφαμυκίνη	Προσδένεται στην RNA πολυμεράση και αναστέλλει την έναρξη των RNA αλυσίδων

Ίσως φανεί παράδοξο το γεγονός ότι πολλά από τα κοινά αντιβιοτικά πρώτα απομονώθηκαν σε μύκητες. Οι μύκητες και τα βακτήρια συχνά καταλαμβάνουν το ίδιο ενδιαίτημα. Έτσι οι μύκητες, για να αποκτήσουν ένα πλεονέκτημα στον ανταγωνισμό, ανέπτυξαν με το χρόνο ισχυρές τοξίνες οι οποίες είναι αβλαβείς για τους ίδιους, αλλά θανατώνουν τα βακτήρια. Καθώς ο άνθρωπος και οι μύκητες μοιράζονται πολύ περισσότερα σε σχέση με τα βακτήρια, αυτές οι ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καταπολεμηθούν οι βακτηριακοί εχθροί.⁷⁵

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Οι αμινογλυκοζίδες ως φυσικά προϊόντα με αντιβιοτική δράση

3.1. Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, κάποια από τα πιο αποτελεσματικά αντιβιοτικά προσδένονται κατά προτίμηση στα βακτηριακά ριβοσωμάτια έναντι των ευκαρυωτικών, αναστέλλοντας επακόλουθα την πρωτεϊνοσύνθεση μόνο των βακτηρίων. Τα σημαντικότερα παραδείγματα αυτής της κατηγορίας αντιβιοτικών αποτελούν οι αμινογλυκοζίδες, οι οποίοι έχουν εκτεταμένη κλινική χρήση.

3.2. Η ιστορία των αμινογλυκοζιδών ως αντιβιοτικά

Το 1944 η ομάδα του Waksman εμπνευσμένη από την ανακάλυψη της πενικιλίνης⁷⁸ απομόνωσε τη στρεπτομυκίνη από τον ακτινομύκητα *Streptomyces griseus*,⁷⁹ ανοίγοντας έτσι ένα νέο κεφάλαιο στη φαρμακολογία: τα αμινογλυκοζιδικά αντιβιοτικά. Η αρχική ευρεία αντιβιοτική δράση της στρεπτομυκίνης κλινικά επισκιάστηκε γρήγορα από το γεγονός εμφάνισης ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών.⁸⁰ Η πλειοψηφία των αμινογλυκοζιδών που έχουν χρησιμοποιηθεί ως φάρμακα (Πίνακας 3.1) είναι είτε φυσικά προϊόντα που παράγονται από ακτινομύκητες (*Streptomyces*, *Microspora*), είτε ημισυνθετικά ανάλογα φυσικών προϊόντων με βελτιωμένη αντιβιοτική δράση (αμικασίνη, νετιλμυκίνη).⁸¹

Πίνακας 3.1. Αμινογλυκοζίδες που έχουν χρησιμοποιηθεί κλινικά μέχρι σήμερα.

Αμινογλυκοζίδες	Χρονολογία εισαγωγής	Βακτηριδιακά στελέχη που στοχεύονται	Σχετιζόμενη ασθένεια
Στρεπτομυκίνη	1944	<i>M. tuberculosis</i> <i>E. histolytica</i> <i>C. parvum</i> <i>F. tularensis</i> <i>Y. pestis</i>	Φυματίωση Διάρροια Διάρροια Τουλαραιμία Πανώλη
Νεομυκίνη	1949	<i>Enterobacteriaceae spp.</i> <i>Salmonella spp</i> <i>S. aureus</i>	Αρκετές μολύνσεις, σήψη Διάρροια Μολύνσεις τραυμάτων, σήψη, σύνδρομο τοξικού σοκ
Καναμυκίνη	1957	<i>Enterobacteriaceae spp.</i> <i>P. aeruginosa</i>	Διάφορες μολύνσεις, σήψη Μόλυνση έξω ώτος, σήψη, χρόνιες μολύνσεις
Παρομομυκίνη	1959	<i>E. histolytica</i> <i>C. parvum</i>	Διάρροια Διάρροια
Σπεκτινομυκίνη	1962	<i>N. gonorrhoeae</i> <i>P. aeruginosa</i>	Γονόρροια Μόλυνση έξω ώτος, σήψη, χρόνιες μολύνσεις
Γενταμικίνη	1963	<i>P. aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae spp.</i>	Μόλυνση έξω ώτος, σήψη, χρόνιες μολύνσεις Διάφορες μολύνσεις, σήψη
Τομπραμυκίνη	1967	<i>Enterobacteriaceae spp.</i> <i>P. aeruginosa</i>	Διάφορες μολύνσεις, σήψη Μόλυνση έξω ώτος, σήψη
Σισομικίνη	1970	<i>Enterobacteriaceae spp.</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	Διάφορες μολύνσεις, σήψη Μόλυνση έξω ώτος, σήψη, χρόνιες μολύνσεις Μολύνσεις τραυμάτων, σήψη, σύνδρομο τοξικού σοκ
Αμικασίνη	1972	<i>Enterobacteriaceae spp.</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>MOTT</i> <i>N. asteroides</i>	Διάφορες μολύνσεις σήψη Μόλυνση έξω ώτος, σήψη,, χρόνιες μολύνσεις Φυματίωση Περιστασιακές μολύνσεις Περιστασιακές μολύνσεις
Νετιλμικίνη	1975	<i>Enterobacteriaceae spp.</i> <i>P. aeruginosa</i>	Εντερικές μολύνσεις Μόλυνση έξω ώτος, σήψη, χρόνιες μολύνσεις
Ισεπαμικίνη	1978	<i>P. aeruginosa</i>	Νοσοκομειακή πνευμονία

3.3. Θεραπευτική δράση των αμινογλυκοζιδών

Η θεραπευτική δράση των αμινογλυκοζιδών εκτείνεται σε ευρεία πλαίσια, με κυριότερη τη δράση τους σε θεραπείες μολύνσεων από αερόβια *gram-negative* βακτήρια.⁸² Μάλιστα, τα περισσότερα βακτήρια του γένους *Enterobacteraceae* και *Pseudomonas aeruginosa* αντιμετωπίζονται με γενταμικίνη, τομπραμυκίνη, νετιλμυκίνη καθώς και με αμικασίνη, η οποία είναι πιο δραστική στα ανθεκτικά στελέχη των βακτηρίων.

Στο ναδίρ της αντιβιοτικής δράσης των αμινογλυκοζιδών βρίσκονται τα *gram-positive* βακτήρια (*Streptococci* και *enterococci*), οπότε και γίνεται κλινική χρήση των αμινογλυκοζιδών μόνο σε συνέργεια με άλλους αντιβακτηριακούς παράγοντες.⁸² Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης. Ωστόσο, υπάρχουν μεμονωμένες περιπτώσεις υψηλής αντιβιοτικής δραστηριότητας κάποιων αμινογλυκοζιδών σε *gram-positive* βακτήρια: για παράδειγμα, η στρεπτομυκίνη ενεργεί στα βακτήρια *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis* και βρουκέλλωση,⁸² η αμικασίνη στο *Nocardia asteroides*⁸² και τέλος η σπεκτινομυκίνη δρα στο *Neisseria gonorrhea*.⁸² Οι αμινογλυκοζίδες αποτελούν αναποτελεσματικά αντιβιοτικά έναντι αναερόβιων οργανισμών, μυκήτων, ιών και των βακτηρίων *Stenotrophomonas Xanthomonas maltophilia* και *Pseudomonas spp.*⁸²

3.4. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των αμινογλυκοζιδών ως φάρμακα

Τα πλεονεκτήματα της φαρμακευτικής χρήσης των αμινογλυκοζιδών είναι αρκετά.⁸²

- 1) Παρουσιάζουν άμεση αντιβιοτική δράση σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών.
- 2) Παρουσιάζουν συνεργειακή αντιβιοτική δράση μαζί με φάρμακα της κατηγορίας των β-λακταμών, όπως η πενικιλίνη και η αμπικιλίνη, για την αντιμετώπιση εντερόκοκκων και συγκεκριμένων *gram-negative* βακίλλων. Είναι αξιοσημείωτο ότι η συνεργειακή αυτή δράση διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του βακτηρίου.⁸²
- 3) Λόγω της μακροχρόνιας διαθεσιμότητάς τους, η ιατρική κοινότητα έχει εξοικειωθεί με τη χρήση τους.
- 4) Έχουν σχετικά χαμηλό κόστος παραγωγής.
- 5) Είναι πολύ σταθερές ενώσεις.
- 6) Σπάνια σχετίζονται με αλλεργικές αντιδράσεις.

Παρά τα αρκετά και ποικίλα πλεονεκτήματα των αμινογλυκοζιδών ως φάρμακα, εμφανίζουν κάποια μειονεκτήματα που καθιστούν τη χρήση τους πιο περιορισμένη.⁸²

- 1) Ο θεραπευτικός τους λόγος (θεραπευτική / τοξική δράση) είναι περιορισμένος.

Εμφανίζουν λοιπόν νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα και σε μικρότερο βαθμό νευρομυϊκή παρεμπόδιση. Όσον αφορά στη νεφροτοξικότητα, εξαρτάται από τη δόση που δέχεται ο οργανισμός και γενικά είναι αναστρέψιμη για την πλειονότητα των ασθενών μετά τη διακοπή της χορήγησης του

φαρμάκου.⁸³ Ο ακριβής μηχανισμός νεφροτοξικότητας δεν έχει αποσαφηνιστεί, αλλά είναι γνωστό ότι οι αμινογλυκοζίτες συσσωρεύονται στα κύτταρα του φλοιού των νεφρών. Η περίπτωση της ωτοτοξικότητας είναι πιο σοβαρή καθώς μπορεί να οδηγήσει, ανάλογα και με το φαινότυπο του κάθε ασθενούς, σε μη αναστρέψιμη αιθουσιαία ή / και κοχλιακή βλάβη.⁸³ ^{Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.} Συνεπώς, σε ασθενείς με νεφρική δυσλειτουργία και σε περιπτώσεις θεραπείας άνω των τριών ημερών, η συγκέντρωση χορήγησης των αμινογλυκοζιτών χρήζει ιδιαίτερης προσοχής.⁸²

- 2) Παρουσιάζεται το φαινόμενο αντίστασης των βακτηρίων,⁸⁴ ένα μείζον πρόβλημα που είναι υπαρκτό σε πολλούς τύπους αντιβιοτικών φαρμάκων.

Όσον αφορά στους αμινογλυκοζίτες, το φαινόμενο αυτό οφείλεται κυρίως σε δύο παράγοντες: **α)** Στη μειωμένη πρόσληψη ή / και συσώρευση των αμινογλυκοζιτών από τους βακτηριακούς μικροοργανισμούς, γεγονός που με τη σειρά του μάλλον οφείλεται στη μειωμένη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών.⁸⁵ **β)** Στην έκφραση κατάλληλων ενζύμων από τα βακτήρια, τα οποία τροποποιούν τους αμινογλυκοζίτες απενεργοποιώντας τους. Μάλιστα, αυτός ο δεύτερος παράγοντας αντίστασης των βακτηρίων είναι και ο σημαντικότερος. Τα εν λόγω ένζυμα καταλύουν την ομοιοπολική τροποποίηση αμινο- ή υδροξυ-ομάδων στους αμινογλυκοζίτες, οδηγώντας σε χημικά τροποποιημένα αντιβιοτικά με μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης στο αποκωδικοποιητικό κέντρο του ριβοσωματίου (A-site). Τέτοια ένζυμα είναι N-ακετυλο-τρανσφεράσες, O-φωσφοτρανσφεράσες και O-νουκλεοτιδυλτρανσφεράσες που μέσω του ακετυλοσυνενζύμου A, του ATP και των νουκλεοτιδίων σαν δότες, ακετυλιώνουν, φωσφορυλιώνουν ή αδενοϋλιώνουν αντίστοιχα τις αμινο- και υδροξυλομάδες των αμινογλυκοζιτών.

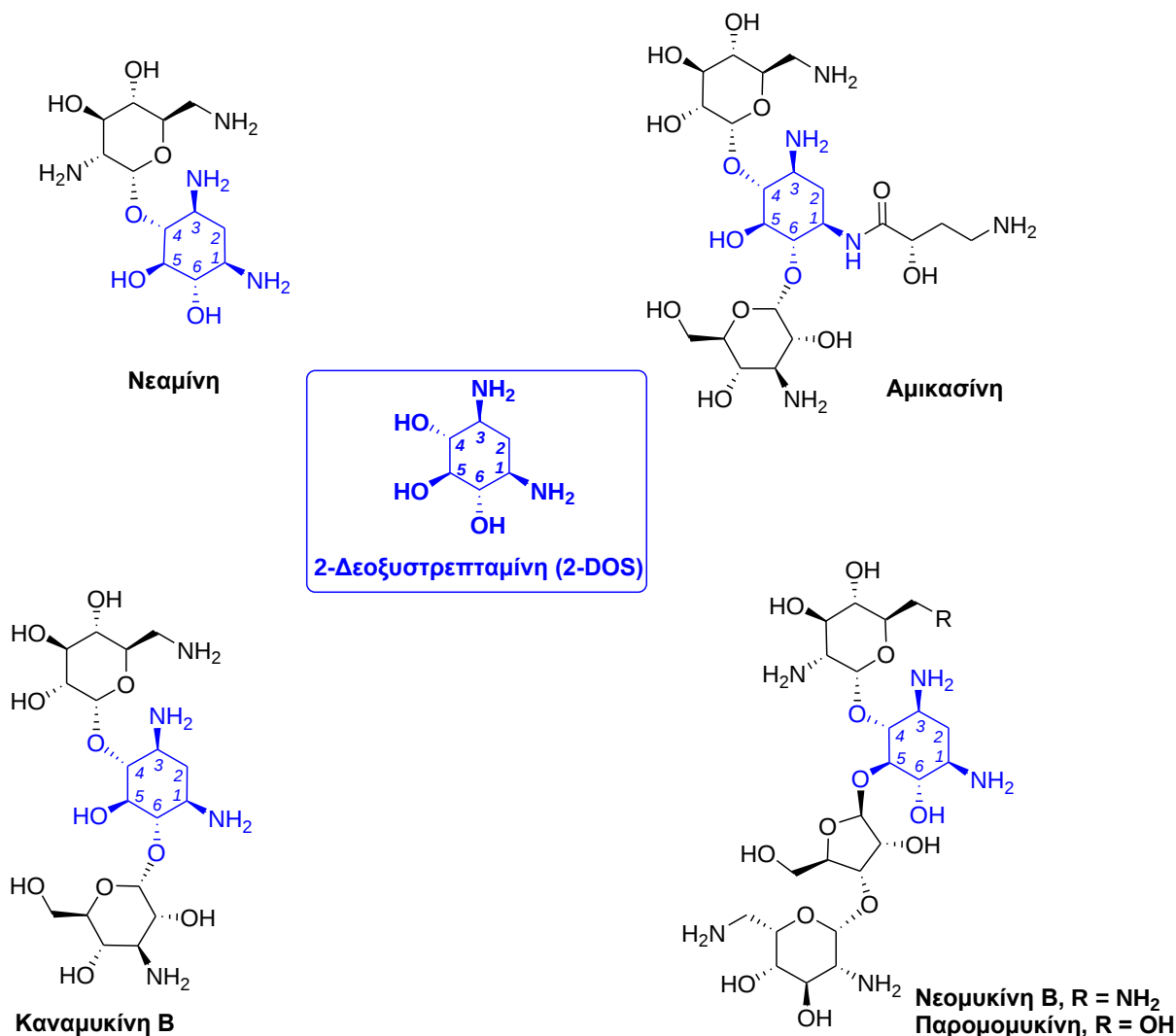
- 3) Οι αμινογλυκοζίτες εμφανίζουν μικρή δυνατότητα διείσδυσης σε συγκεκριμένα σωματικά υγρά, όπως στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στη χολή.
- 4) Παρουσιάζουν αδυναμία απορρόφησης από το έντερο.
- 5) Δεν έχουν δραστηριότητα σε αναερόβιους μικροοργανισμούς.⁸²
- 6) Υπάρχει δημιουργία συμπλόκων των αμινογλυκοζιτών όχι μόνο με το A-site, αλλά και με αρκετές επιπλέον δομές του RNA.

Για την εξήγηση αυτού του φαινομένου έχει διατυπωθεί η σχετική θεωρία της «ηλεκτροστατικής συμπληρωματικότητας» (*electrostatic complementarity*).⁸⁶ Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η δημιουργία των εν λόγω συμπλόκων οφείλεται σε δύο κυρίως λόγους:

- α)** Στο υψηλό φορτίο των αμινογλυκοζιτών, οπότε η δέσμευσή τους στο RNA είναι ισχυρής ηλεκτροστατικής φύσεως.
- β)** Στην προσαρμοστικότητα της διαμόρφωσης των αμινογλυκοζιτών. Αν και η περιστροφή των σακχαρικών τμημάτων των αμινογλυκοζιτών γύρω από τους γλυκοζιτικούς δεσμούς είναι περιορισμένη, η εναπομείνουσα ευελιξία τους τούς επιτρέπει να δεσμεύονται σε ποικιλία RNA στόχων. Τα σύμπλοκα αυτά διαφέρουν με εκείνα των εύκαμπτων αμινών, πχ της σπερμιδίνης που δημιουργούνται μέσω μη καθορισμένων αλληλεπιδράσεων με το RNA.⁸⁶

3.5. Χημική δομή των αμινογλυκοζιδών

Το κύριο δομικό χαρακτηριστικό των αμινογλυκοζιδών είναι ένας αμινοκυκλιτολικός δακτύλιος, μονο- ή δι-υποκατεστημένος με διάφορα αμινοσάκχαρα μέσω γλυκοζιτικών δεσμών κυρίως στις 4-, 5- και 6-θέσεις (Σχήμα 3.1). Δεδομένου ότι στη συντριπτική πλειοψηφία των αμινογλυκοζιτικών αντιβιοτικών ο δακτύλιος αυτός είναι η 2-δεοξυστρεπταμίνη (2-DOS), οι διάφορες υποοικογένειες χαρακτηρίζονται από τη σχετική υποκατάσταση της 2-DOS.



Σχήμα 3.1. Φυσικοί και ημισυνθετικοί αμινογλυκοζίδες: Νεαμίνη (4-μονοϋποκατάσταση), Νεομυκίνη / Παρομομυκίνη (4,5-διϋποκατάσταση), Καναμυκίνη (4,6-διϋποκατάσταση), Αμικασίνη (1,4,6-τριϋποκατάσταση).

Επί παραδείγματι, η 4,5-γλυκοζιδίωση αντιπροσωπεύει την τάξη της νεομυκίνης / παρομομυκίνης, η 4,6-γλυκοζιδίωση την τάξη της καναμυκίνης, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις

ημισυνθετικών παραγώγων με σημαντική φαρμακολογική δράση (πχ αμικασίνη), παρατηρείται υποκατάσταση του N-1 (Σχήμα 3.1).

Οι αμινογλυκοζίτες βρίθουν από υδροξυλομάδες (-OH) και αμινομάδες (-NH₂), γεγονός που καθιστά τα μόρια αυτά αλκαλικά και τούς προσδίδει ισχυρά πολικό χαρακτήρα. Σε ουδέτερο pH οι αμινογλυκοζίτες εμφανίζονται ως θετικά φορτισμένα μόρια, πράγμα που ενισχύει τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες λόγω:

1) Δέσμευσής τους σε αρνητικά φορτισμένους λιποπολυσακχαρίτες του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος,⁸² επιτυγχάνοντας έτσι σημαντική επιλεκτικότητα σε σχέση με τα ευκαρυωτικά κύτταρα.

2) Δέσμευσής τους σε αρνητικά φορτισμένα ενδοκυτταρικά μόρια, όπως το RNA. Η ισχύς και η επιλεκτικότητα της δέσμευσης αυτής συνδέεται με την περιορισμένη ευελιξία της δομής των αμινογλυκοζιτών, διαφοροποιώντας τους από άλλα πολυαμινικά μόρια, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

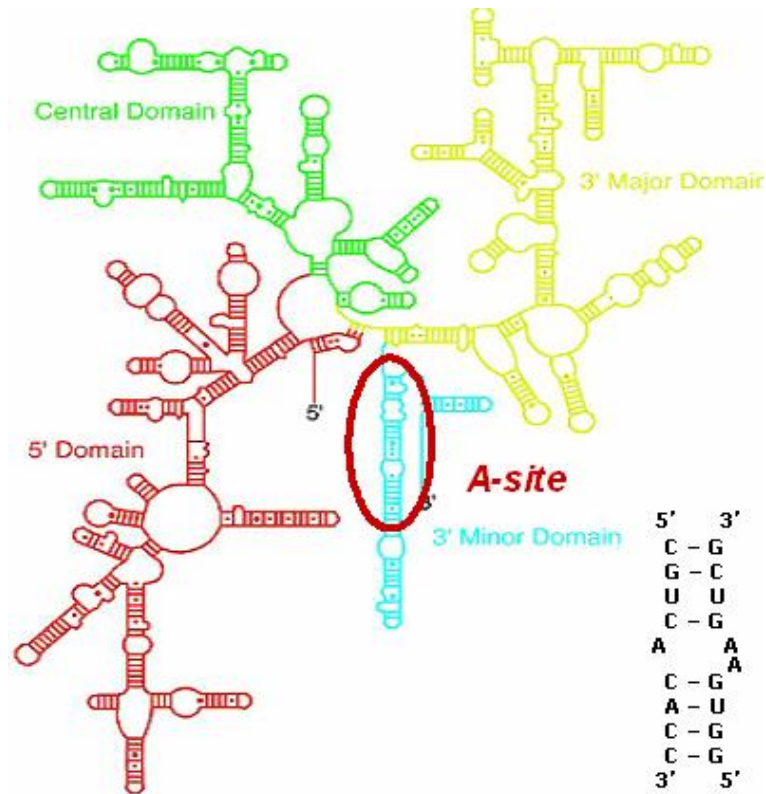
3) Της τοξικότητάς τους, γεγονός που οφείλουν: στη διαλυτότητά τους στο νερό, στην ενισχυμένη δραστηότητά τους σε αλκαλικό περιβάλλον, αλλά και στη μεταβολική τους σταθερότητα.⁸²

3.6. Τρόπος δράσης των αμινογλυκοζιτών

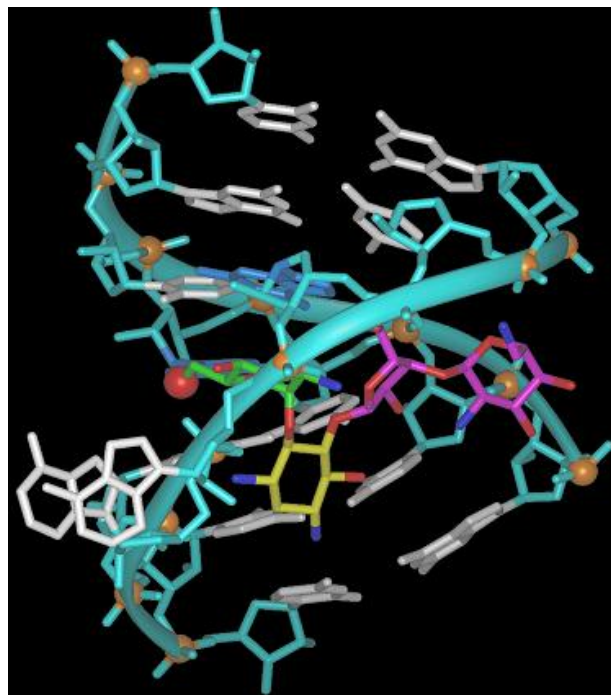
Είναι ήδη γνωστό από παλιότερα, ότι η φαρμακευτική δράση των αμινογλυκοζιτών έγκειται στην παρεμπόδιση της σωστής αποκωδικοποίησης του mRNA κατά την πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηρίων και συνεπώς της εύρυθμης λειτουργίας του βακτηριακού ριβοσώματος.⁸⁷ Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι οι αμινογλυκοζίτες δεσμεύονται σε ένα τμήμα του 16S βακτηριακού ριβοσωματικού RNA στην υπομονάδα 30S, το A-site (Σχήμα 3.2).⁸⁸

Κινητικές μελέτες απέδειξαν ότι οι αμινογλυκοζίτες κατά τη δέσμευσή τους με το A-site σταθεροποιούν μια συγκεκριμένη διαμόρφωση, παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται κατά τη δημιουργία του συμπλόκου ριβόσωμα / mRNA / tRNA.^{89,90} Συγκεκριμένα, το A-site είναι ένα ολιγονουκλεοτίδιο ευρισκόμενο υπό μορφή βρόχου (Σχήμα 3.2), αποτελώντας ουσιαστικά την «κεφαλή ανάγνωσης» του ριβοσωματικού μηχανισμού που εκτελεί την αποκωδικοποίηση του mRNA.

Το κρίσιμο βήμα κατά την επιλογή του σωστού tRNA βασίζεται αφ'ενός στο σχηματισμό μιας μικρής έλικας μεταξύ του κωδικονίου του mRNA και του αντικωδικονίου του tRNA,^{91,92} αφ'ετέρου στη χωρική διάταξη των αδενινών A1492 και A1493 του δεσμικού κέντρου.^{89,93-96} Κατά τη δημιουργία του ορθού συμπλόκου mRNA / tRNA, το ζεύγος των εν λόγω αδενινών μετατοπίζεται στο εξωτερικό της έλικας του A-site, καθώς αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο αυτό.⁹⁷⁻⁹⁹ Η μεταβολή αυτή της συνολικής διαμόρφωσης συνιστά το μοριακό διακόπτη ο οποίος καθορίζει τη συνέχιση της πρωτεϊνοσύνθεσης.^{90,100,101}



Σχήμα 3.2. Η δευτεροταγής δομή του τμήματος 16S του βακτηριακού ριβοσωματικού RNA. Επισημαίνεται το ολιγονουκλεοτίδιο A-site και η νουκλεοτιδική του ακολουθία.⁸⁸



Σχήμα 3.3. Μοριακό μοντέλο της δομής του συμπλόκου A-site / νεομυκίνης B.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η δέσμευση των αμινογλυκοζιτών στο A-site είναι κυρίως ηλεκτροστατικής φύσεως και περιλαμβάνει ταυτόχρονη εκτόπιση αντισταθμιστικών κατιόντων από το RNA.^{102,103} Μάλιστα, αυτό το γεγονός πιστοποιήθηκε αργότερα από υψηλής ανάλυσης κρυσταλλικές δομές της υπομονάδας 30S του βακτηριακού ριβοσωματίου συμπλεγμένης με διάφορους αμινογλυκοζίτες.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ Οι αμινογλυκοζίτες (πχ νεομυκίνη B) κατά τη δέσμευσή τους στο A-site σταθεροποιούν μια διαμόρφωση αντίστοιχη του προαναφερθέντος μοριακού διακόπτη, καθιστώντας έτσι αδύνατη την αναγνώριση λανθασμένων επιλογών tRNA (Σχήμα 3.3).^{89,90} Κατά συνέπεια, η πρωτεϊνσύνθεση συνεχίζεται με προσθήκες λανθασμένων αμινοξέων, οδηγώντας τελικά σε μη λειτουργικές παραγόμενες πρωτεΐνες.

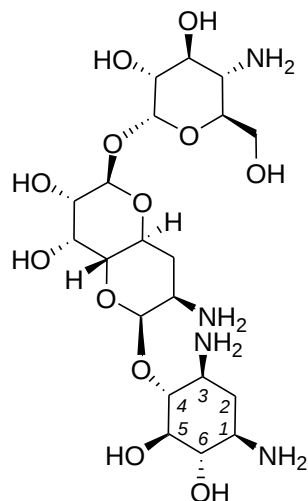
Η ανακάλυψη ότι το A-site αποτελεί μια δομικά αυτόνομη μονάδα που διατηρεί πλήρως τις στερεοχημικές της ιδιότητες, ακόμα και όταν είναι υπό τη μορφή ολιγονουκλεοτιδίου απομονωμένου από το ριβοσώματιο, υπήρξε καταλυτική.¹⁰⁸ Επομένως, κατέστη εφικτή η μελέτη του αποκωδικοποιητικού κέντρου A-site σαν απομονωμένου συστήματος από το υπόλοιπο ριβοσώματιο. Ο Puglisi πρώτος διευκρίνησε τη δομή υδατικού διαλύματος του συμπλέγματος ενός τέτοιου ολιγονουκλεοτιδίου με την παραμομυκίνη¹⁰⁹ την τομπραμυκίνη,¹¹⁰ ενώ πιο πρόσφατα ο Westhof με τη γενετική.¹¹¹ Η ταύτιση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων (NMR και κρυσταλλογραφίας) επιβεβαίωσε τα αρχικά συμπεράσματα για το ρόλο των αμινογλυκοζιτών κατά τη δέσμευσή τους στο A-site.

Η μελέτη των δομών έξι ακόμα συμπλόκων μεταξύ ολιγονουκλεοτιδίων που περιείχαν το A-site και αμινογλυκοζιτικών αντιβιοτικών (νεαμίνη, γενταμικίνη C14, καναμυκίνη A, ριβοσταμυκίνη, λιβιδομυκίνη A και νεομυκίνη B, Σχήμα 3.4)¹¹² οδήγησε στον προσδιορισμό του ρόλου των δακτυλίων και της τοπολογίας των θετικών φορτίων στην εκλεκτική δέσμευση των αμινογλυκοζιτών (Σχήμα 3.5). Παρά τη δομική ποικιλομορφία των εννέα αντιβιοτικών που μελετήθηκαν, βρέθηκαν συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις που διατηρούνται στα σύμπλοκα των αμινογλυκοζιτών με το A-site. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αυτές οι αλληλεπιδράσεις διατηρούνται ακόμη και στην περίπτωση του δομικά διαφορετικού αντιβιοτικού απραμυκίνη (Σχήμα 3.4). Οι κοινές αυτές αλληλεπιδράσεις είναι:

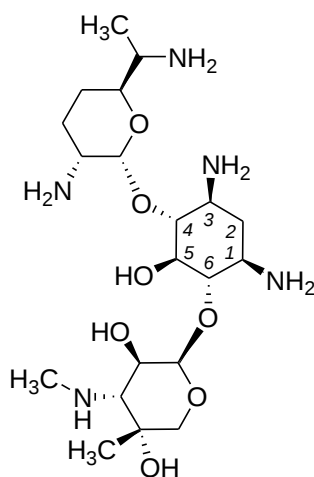
- 1) Οι αλληλεπιδράσεις του δακτυλίου II (2-DOS) με τις βάσεις U1495 (δεσμός-H με το O2) και G1494 (δεσμός-H με το N7).
- 2) Η εισαγωγή του δακτυλίου I μεταξύ των βάσεων G1491 και G1494, καθώς και η δημιουργία ψευδοζεύγους βάσεων μέσω δύο δεσμών-H με το N1 και το N6 της A1408.
- 3) Οι δεσμοί-H με το φωσφορικό σκελετό του RNA, μεταξύ της 2-DOS και των O2P της G1494, OP1 της A1493, καθώς και μεταξύ του δακτυλίου I και των φωσφορικών ομάδων των βάσεων A1492 και A1493.

Όσον αφορά στους δακτυλίους III και IV (όπου υπάρχουν) παρατηρήθηκαν ποικίλες αλληλεπιδράσεις τους με το RNA, οι οποίες εξαρτώνται από τον αριθμό και τη θέση των δακτυλίων

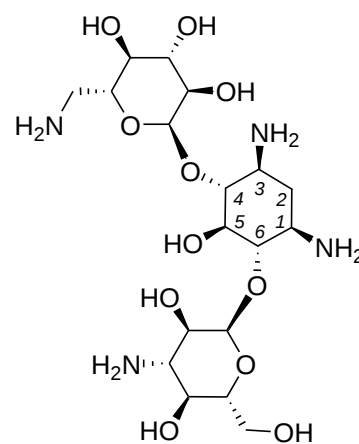
και επάγονται κυρίως από μόρια διαλύτη. Η μέση τυπική απόκλιση των ατόμων των αμινογλυκοζιτών σε γενική διαμόρφωση στο χώρο είναι της τάξης του 0.5 Å, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα δεδομένα των κρυσταλλικών δομών τροποποιημένων αμινογλυκοζιτών, όπου παρατηρήθηκε σημαντική απόκλιση στους δακτυλίους III και IV.¹¹² Συνεπώς οι φυσικοί αμινογλυκοζίτες διατηρούν την ίδια διαμόρφωση στις κρυσταλλικές τους δομές, ενώ ταυτόχρονα είναι αρκετά ευέλικτοι ώστε να υιοθετούν πολύ διαφορετικές κρυσταλλικές διαμορφώσεις σε μη φυσικές υποκαταστάσεις.¹¹²



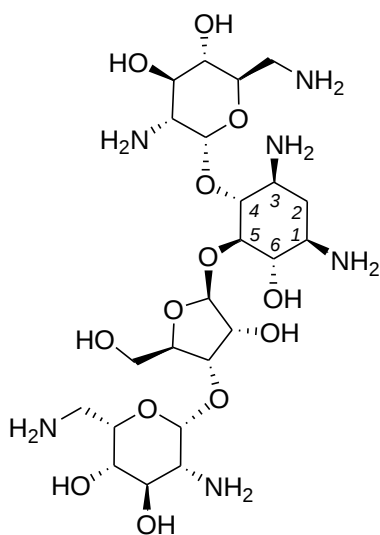
Απραμικίνη



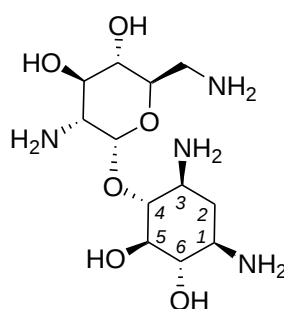
Γενταμικίνη



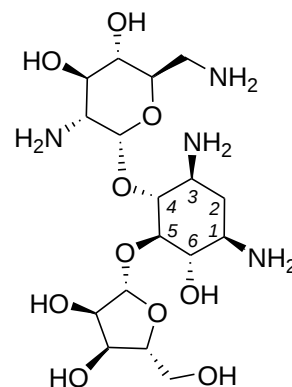
Καναμικίνη



Νεομικίνη Β

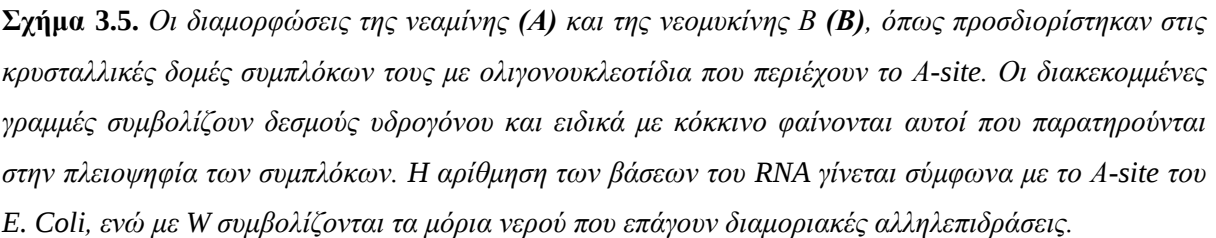


Νεαμίνη



Ριβοσταμικίνη

Σχήμα 3.4. Μερικοί από τους φυσικούς αμινογλυκοζίτες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη δέσμευσής τους στο A-site από τον Westhof: Απραμικίνη / Νεαμίνη (4-μονοϋποκατάσταση), Γενταμικίνη / Καναμικίνη (4,6-διϋποκατάσταση), Νεομικίνη Β / Ριβοσταμικίνη (4,5-διϋποκατάσταση).



57

γενετική, καναμυκίνη) εμφάνισαν μια ιδιαίτερη συμπεριφορά έναντι των υπολοίπων που διέθεταν φορτίο μεγαλύτερο του +5. Συγκεκριμένα, στην κρυσταλλική δομή της γενετικής παρατηρήθηκαν εναλλακτικές διαμορφώσεις μεταξύ σακχάρου και φωσφορικού σκελετού στις θέσεις A1492 και A1493.¹¹² Στο σύμπλοκο της νεαμίνης παρατηρήθηκαν περιπτώσεις όπου ένα από τα δύο A-site του ολιγονουκλεοτιδίου βρέθηκε κενό. Στο σύμπλοκο της ριβοσταμυκίνης σε κάθε A-site του ολιγονουκλεοτιδίου ήταν δεσμευμένοι δύο αμινογλυκοζίτες. Τέλος, στην περίπτωση της καναμυκίνης μόνο το ένα A-site περιείχε δύο δεσμευμένα μόρια αντιβιοτικού.

Ο τρόπος δέσμευσης των δύο τελευταίων αμινογλυκοζιτών (ριβοσταμυκίνη και καναμυκίνη) δεν είναι συγκρίσιμος, αντικατοπτρίζοντας πιθανότατα ότι ο ένας αμινογλυκοζίτης είναι 4,5- ενώ ο άλλος 4,6-διυποκατεστημένος. Τα δύο αυτά αντιβιοτικά δεσμεύονται μη εκλεκτικά και εμφανίζουν τις μεγαλύτερες σταθερές διάστασης μεταξύ των αμινογλυκοζιτών που έχουν μελετηθεί. Γενικά, παρατηρήθηκε ότι οι λιγότερο φορτισμένοι αμινογλυκοζίτες με το μικρότερο αριθμό δακτυλίων εμφανίζουν μη συγκεκριμένη δέσμευση με το A-site και μη συγκεκριμένες στοιχειομετρίες κατά το σχηματισμό συμπλόκων. Άρα, ο αριθμός των δακτυλίων σε συνδυασμό με τον αριθμό των θετικών φορτίων, συνεισφέρουν στο σχηματισμό συμπλόκων με στοιχειομετρία 1:1, όσο και στην επιλεκτική σύνδεσή τους στο A-site του ριβοσωματίου.

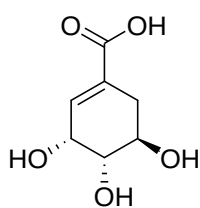
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Αντιπροσωπευτικά ανάλογα αμινογλυκοζιτών ως νέα αντιβιοτικά

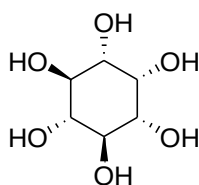
4.1. Εισαγωγή

Όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, η βασική χημική δομή που απαιτείται τόσο για ισχύ όσο και για εύρος αντιβιοτικής δράσης των αμινογλυκοζιτών, είναι αυτή ενός ή αρκετών σακχάρων που φέρουν αμινομάδες και επιπλέον είναι ενωμένα με γλυκοζιτικούς δεσμούς σε μία κυκλιτόλη (δηλαδή ένα κυκλοαλκάνιο που φέρει από μία υδροξυλομάδα σε τρία τουλάχιστον άτομα του δακτυλίου). Στους περισσότερους χρησιμοποιούμενους αμινογλυκοζίτες η κυκλιτόλη αυτή είναι η 2-δεοξυστρεπταμίνη (2-DOS) (Σχήμα 4.1).

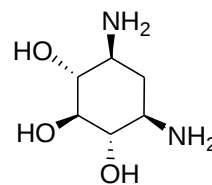
Οι αμινογλυκοζίτες δρουν πρωταρχικά προκαλώντας βλάβη στη βακτηριακή πρωτεϊνσύνθεση μέσω δέσμευσής τους στο βακτηριακό ριβοσωμάτιο. Ωστόσο, η μακρόχρονη χρήση των αμινογλυκοζιτών ως αντιβιοτικά έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών των βακτηρίων. Συνεπώς, πολλές ερευνητικές προσπάθειες πλέον έχουν στραφεί στο σχεδιασμό νέων αντιβιοτικών που χρειάζεται αφ' ενός να συσχετίζονται δομικά με τις υπάρχουσες αντιβιοτικές δομές, αφ' ετέρου να δρουν παρακάμπτοντας τους μηχανισμούς αντίστασης των βακτηρίων.



σικιμικό οξύ



ινοσιτόλη



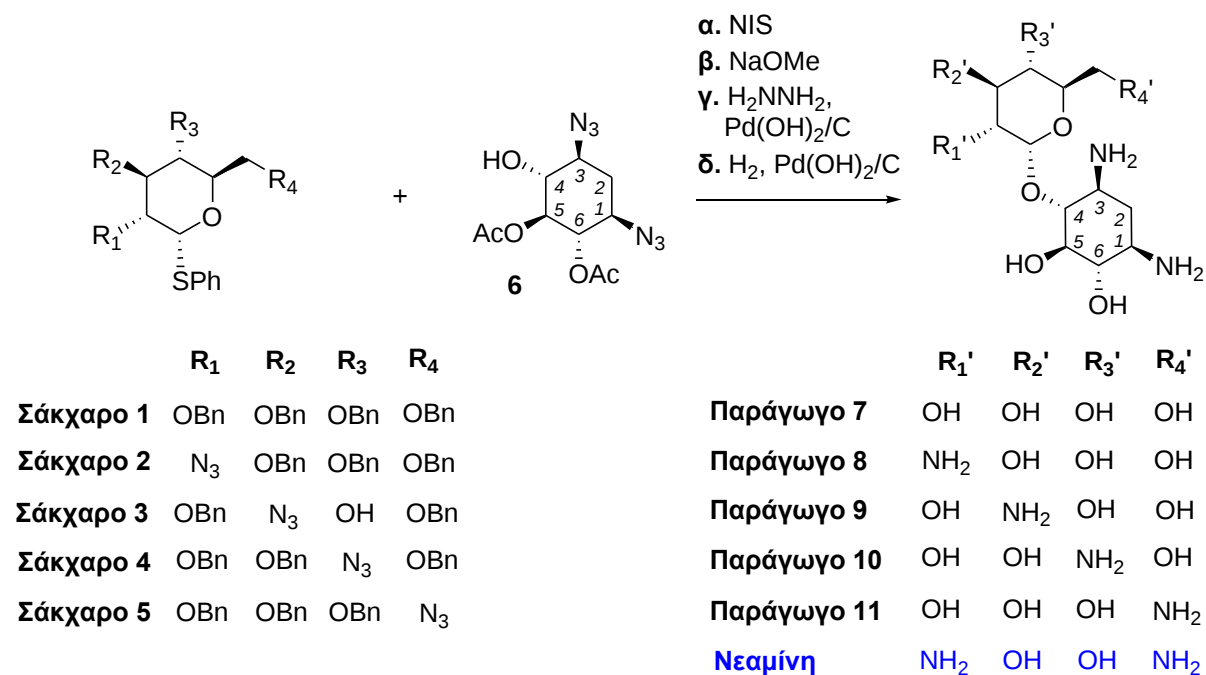
2-δεοξυστρεπταμίνη (2-DOS)

Σχήμα 4.1. Τρία παραδείγματα της οικογένειας των κυκλιτολών: σικιμικό οξύ, ινοσιτόλη και 2-δεοξυστρεπταμίνη (2-DOS). Η 2-DOS είθισται να απαντάται στα φυσικά αμινογλυκοζιτικά αντιβιοτικά.

4.2. Παράγωγα της 2-δεοξυστρεπταμίνης (2-DOS)

Η ερευνητική ομάδα του Wong,¹¹³ ορμώμενη από την παρατήρηση ότι η δομή της νεαμίνης ήταν ο κοινός ψευδοδισακχαρικός πυρήνας αρκετών φυσικών αμινογλυκοζιτικών αντιβιοτικών, μελέτησε την τοπολογία των αμινομάδων της νεαμίνης σε σχέση με τη βιολογική δράση των μορίων

που προέκυπταν (Σχήμα 4.2). Έτσι, με σκοπό να βρεθεί η βέλτιστη δομή που θα αποτελούσε το εφελτήριο για τη σύνθεση νέων δραστικότερων αντιβιοτικών, πραγματοποιήθηκαν ποικίλες τροποποιήσεις στη δομή της νεαμίνης και ελήφθη μια σειρά παραγώγων της σε υψηλή απόδοση.



Σχήμα 4.2. Σύνθεση των παραγώγων της νεαμίνης **7**, **8**, **9**, **10** και **11** από τον Wong.¹¹³ *Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.*

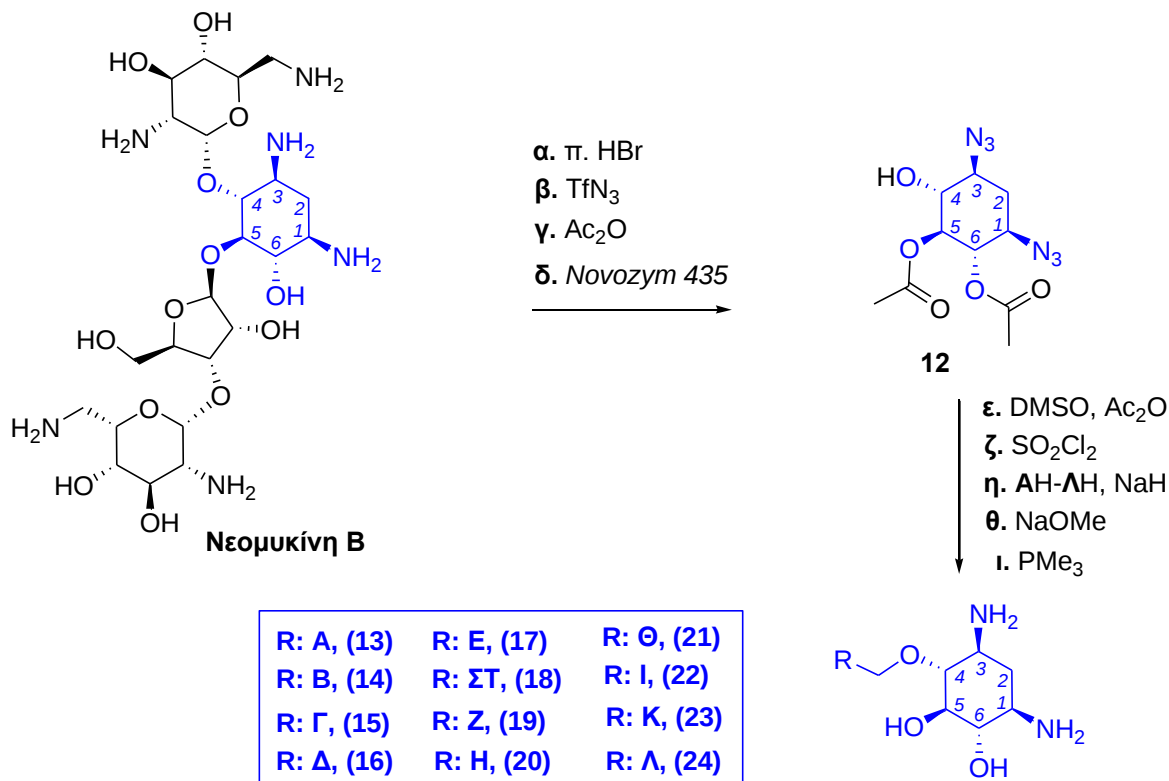
Η νεαμίνη αποδείχτηκε το πιο αποτελεσματικό αντιβιοτικό, που επιπλέον επεδείκνυε την πιο εκλεκτική αλλά και ισχυρή πρόσδεση ως προς το A-site, σε σχέση με όλα τα συντιθέμενα παράγωγα **7**, **8**, **9**, **10** και **11** (Σχήμα 4.2). Συγκεκριμένα, μόνο το παράγωγο **11** παρουσίασε κάποια δραστηριότητα κατά τη μέθοδο Kirby-Bauer¹¹⁴ ως προς το *E. coli* *Pseudomonas aeruginosa* ή το *Staphylococcus aureus*. Ωστόσο, η ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MIC)¹¹⁵ του **6** ήταν μικρότερη της αντίστοιχης τιμής της νεαμίνης. Με αυτά τα δεδομένα λοιπόν, εξήχθη το συμπέρασμα ότι ο πιο πολλά υποσχόμενος ψευδοδισακχαρικός σκελετός για περαιτέρω μελέτη, σχεδιασμό και ανάπτυξη παραγώγων, ήταν η νεαμίνη.

4.3. Μονοϋποκατεστημένα παράγωγα της 2-DOS

4.3.1. 4-Παράγωγα της 2-DOS

Έχει εκτιμηθεί ότι οι μισοί και πλέον υπάρχοντες θεραπευτικοί παράγοντες περιλαμβάνουν στη δομή τους ετεροκυκλικό δακτύλιο, ο οποίος μάλιστα σε πολλές περιπτώσεις αποτελεί τον ουσιαστικό πυρήνα που φέρει την ενεργή ομάδα ή τον φαρμακοφόρο φορέα. Έχοντας αυτό κατά νου,

το 2003 ο Ding¹¹⁶ συνέθεσε 4-παράγωγα της παρομομυκίνης με ετεροκυκλική υποκατάσταση, υποθέτοντας ότι θα μπορούσαν να ήταν ιδανικά αντιβιοτικά. Ωστόσο προτού περάσει στη σύνθεση των παραγώγων αυτών, εξέτασε πρώτα τα 4-υποκατεστημένα παράγωγα της 2-DOS ως προς τη βιολογική τους δραστηριότητα.



Σχήμα 4.3. Σύνθεση μονοϋποκατεστημένων παραγώγων της 2-DOS στην 4-θέση με ετεροκυκλικά μόρια από τον Ding.¹¹⁶

Πίνακας 4.1. Κάποιες από τις ετεροκυκλικές υποκαταστάσεις της 4-θέσης της 2-DOS, που χρησιμοποιήθηκαν από τον Ding¹¹⁶ κατά τη σύνθεση μονοϋποκατεστημένων 2-DOS παραγώγων του σχήματος 4.3.

A	B	Γ	Δ	Ε	ΣΤ	Ζ
Η	Θ	Ι	Κ	Λ		

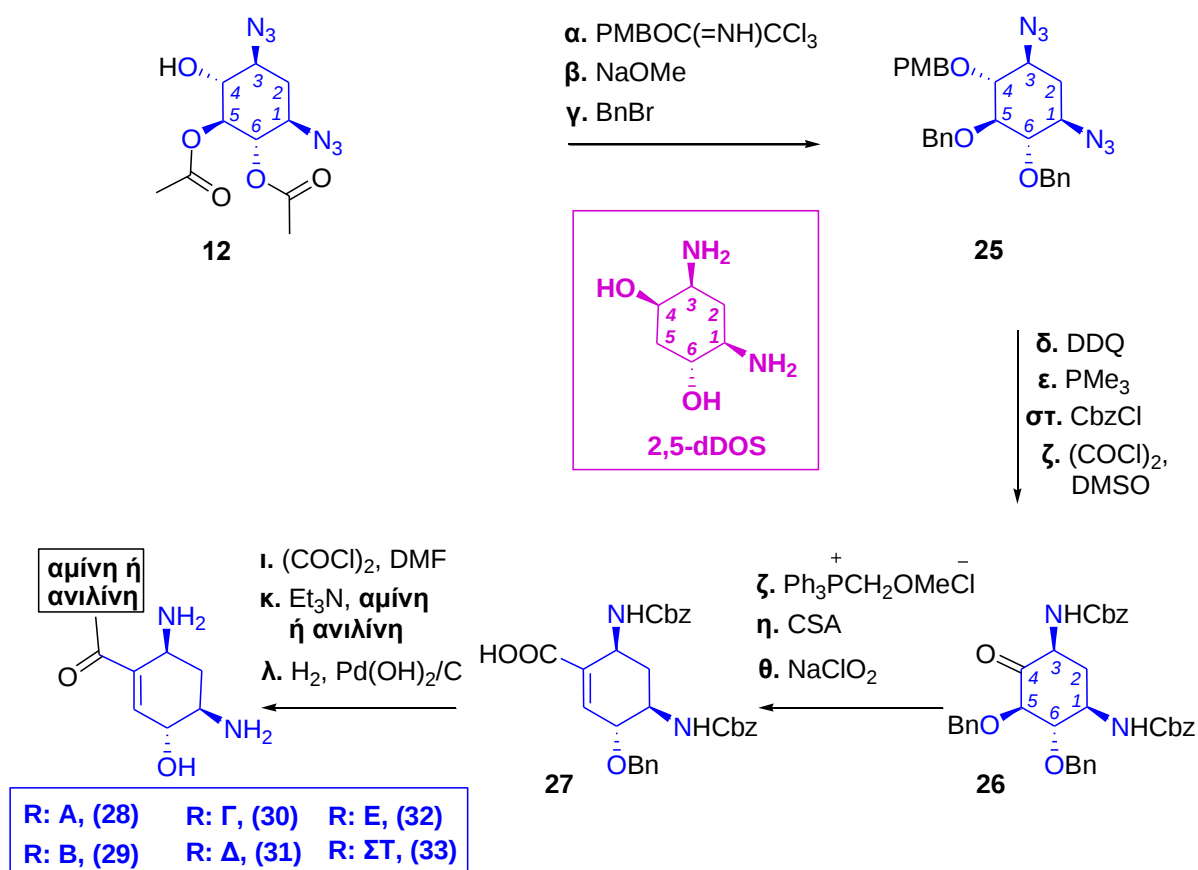
Η σύνθεση ξεκίνησε από τη νεομυκίνη B από την οποία παρελήφθη η αλκοόλη **12** σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (με υδρολυτική διάσπαση, αζιδίωση, ακετυλίωση και εκλεκτική υδρόλυση του 4-OH παρουσία του ενζύμου *Novozym 435*),¹¹⁷ κατόπιν προστατεύτηκε προς τον αντίστοιχο μεθυλοθειομεθυλο-αιθέρα μέσω αναδιάταξης Pummerer,¹¹⁸ χλωριώθηκε με SO_2Cl_2 και η προκύπτουσα ένωση συζεύχθηκε με ποικιλία πυρηνόφιλων (Πίνακας 4.1) οδηγώντας στα 4-παράγωγα της 2-DOS (Σχήμα 4.3). Τα καλύτερα βιολογικά αποτελέσματα ως προς το 16S A-site προέκυψαν από το 4-υποκατεστημένο παράγωγο **21**.

4.3.2. 4-Παράγωγα της 2,5-dDOS

Το 2002 ο Vourloumis¹¹⁹ λαμβάνοντας υπόψιν πρότερη έρευνα του Ding¹²⁰ και συνδυάζοντας κρυσταλλογραφικά¹²¹ αλλά και υπολογιστικά¹²² δεδομένα, προέβη στην αντικατάσταση του σακχαρικού δακτυλίου ο οποίος ήταν συνδεδεμένος στην 4-θέση της 2-DOS. Η υπόθεση που χρησιμοποιήθηκε ήταν ότι ο πυρανοζικός δακτύλιος, που απαντάται συχνά στην 4-θέση πολλών αμινογλυκοζιτικών αντιβιοτικών, θα μπορούσε να αντικατασταθεί από επίπεδες μη-σακχαρικές ομάδες που δύνανται να συνδυάσουν αλληλεπιδράσεις τόσο από δεσμούς υδρογόνου όσο και από π-αλληλεπιδράσεις.

Η σύνθεση των 4-υποκατεστημένων μη γλυκοζιτικών παραγώγων της 2-DOS έγινε με εισαγωγή ενός ενεργοποιημένου καρβοξυλίου στην 4-θέση της 2-DOS, το οποίο οδηγούσε στο σχηματισμό αμιδίων (Σχήμα 4.4). Η αμιδική ομάδα αφ' ενός αποτελούσε έναν άκαμπτο σύνδεσμο, αφ' ετέρου ενδεχόταν να πριμοδοτήσει την πρόσδεση στο A-site του RNA με επιπλέον δεσμούς υδρογόνου. Συγκεκριμένα, ο Vourloumis εκμεταλλευόμενος την υπάρχουσα βιβλιογραφία,¹¹⁷ ξεκίνησε από τη νεομυκίνη B και παρέλαβε την αλκοόλη **12** (Σχήμα 4.3), η οποία εν συνεχεία προστατεύτηκε προς τον αντίστοιχο PMB-αιθέρα, σαπωνοποιήθηκε και εν τέλει βενζυλιώθηκε στα 5- και 6-υδροξύλια (Σχήμα 4.4). Στο προκύπτον διβενζυλιωμένο μόριο **25** απομακρύνθηκε η PMB-ομάδα, έγινε αναγωγή των αζιδίων, προστασία των αμινομάδων με CbzCl και οξείδωση του 4-OH με συνθήκες Swern.¹²³

Στην κετόνη **26** πραγματοποιήθηκε Wittig και ο παραγόμενος ενολικός αιθέρας με διαδοχικές αντιδράσεις υδρόλυσης / απόσπασης / οξείδωσης μετατράπηκε στο καρβοξυλικό οξύ **27** (Σχήμα 4.4). Περαιτέρω, το οξύ (**27**) μετατράπηκε στα αντίστοιχα αμίδια ανάλογα με τα αντιδραστήρια αμίνης ή ανιλίνης που χρησιμοποιήθηκαν (**A**, **B**, **Γ**, **Δ**, **E**, **ΣΤ**, Πίνακας 4.2) και με ολική αποπροστασία οδήγησε στα 4-παράγωγα **28**, **29**, **30**, **31**, **32** και **33** της 2,5-dDOS, που όμως αποδείχτηκαν ανενεργά ως αντιβιοτικά.



Σχήμα 4.4. Σύνθεση των 4-υποκατεστημένων παραγώγων της 2,5-dDOS **28**, **29**, **30**, **31**, **32** και **33** από τον Vourloumis.¹¹⁹

Πίνακας 4.2. Ορισμένες από τις ετεροκυκλικές υποκαταστάσεις που χρησιμοποιήθηκαν από τον Vourloumis¹¹⁹ κατά τη σύνθεση των 4-μονοϋποκατεστημένων 2,5-dDOS παραγώγων του σχήματος 4.4.

A	B	Γ
Δ	E	ΣΤ

4.4. Διϋποκατεστημένα παράγωγα της 2-DOS

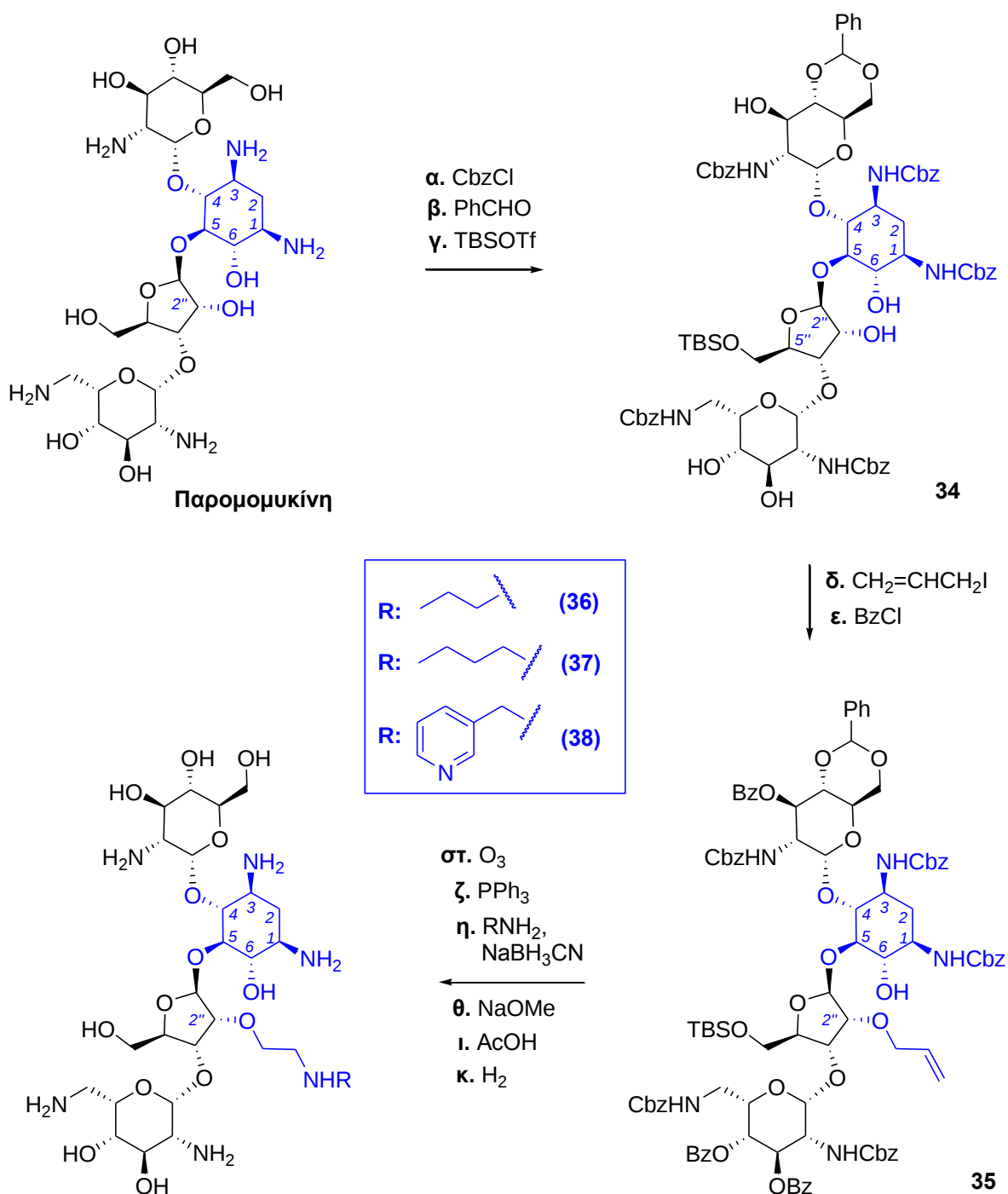
4.4.1. 4,5-Παράγωγα της 2-DOS (παράγωγα της παρομομυκίνης)

Συνθετική στρατηγική αυτής της κατηγορίας είναι παράγωγα που προκύπτουν με προσθαφαίρεση δομικών μονάδων σε ένα μόριο-σκελετό με γνωστή φαρμακευτική δράση. Η κατάλληλη επιλογή των προστιθέμενων αυτών μονάδων γίνεται με υπολογιστική ή / και συνδυαστική χημεία και αποσκοπεί στο να προκύψουν μόρια που αφ' ενός να έχουν βελτιωμένη πρόσδεση στο A-site συνεπώς βελτιωμένη αντιβιοτική δράση, αφ' ετέρου να αποτελούν χειρότερα υποστρώματα για τα βακτηριακά ένζυμα, οπότε να αποφεύγεται έτσι η ανεπιθύμητη ανθεκτικότητα των βακτηρίων έναντι των νέων αντιβιοτικών.

Ένα παράδειγμα τέτοιας στρατηγικής ακολούθησε ο Hanessian¹²⁴ και η ερευνητική του ομάδα θέλοντας να υποκαταστήσει το 2'-OH της παρομομυκίνης, σαν αποτέλεσμα παρατηρήσεων των δομών συγκρυστάλλωσης παρομομυκίνης / A-site (Σχήμα 4.5). Έτσι, ξεκινώντας από την παρομομυκίνη προστατεύτηκαν οι αμινομάδες με CbzCl, πραγματοποιήθηκε εκλεκτική κεταλοποίηση των 4'- και 6'-OH με βενζαλδεϋδη παρουσία φορμικού οξέος, προστασία του 5'-OH με TBSOTf, τοποεκλεκτική αλλυλίωση του 2'-OH και τελικά προστασία των υδροξυλίων στους σακχαρικούς δακτυλίους με BzCl.

Στον αλλυλαιθέρα **35** έγινε οζονόλυση του διπλού δεσμού προς αλδεϋδη και ακόλουθη αναγωγική αμίνωση. Η προκύπτουσα δευτεροταγής αμίνη αποπροστατεύτηκε πλήρως (σαπωνοποίηση των βενζυλεστέρων με NaOMe, όξινη απομάκρυνση του TBS αιθέρα και υδρογονόλυση των Cbz-ομάδων παρουσία καταλύτη υδροξειδίου του παλλαδίου σε ενεργό άνθρακα) οδηγώντας στα 2'-υποκαταστημένα παράγωγα της παρομομυκίνης (**36**, **37**, **38**), ή με άλλα λόγια σε νέα 4,5-διϋποκατεστημένα παράγωγα της 2-DOS (Σχήμα 4.5).

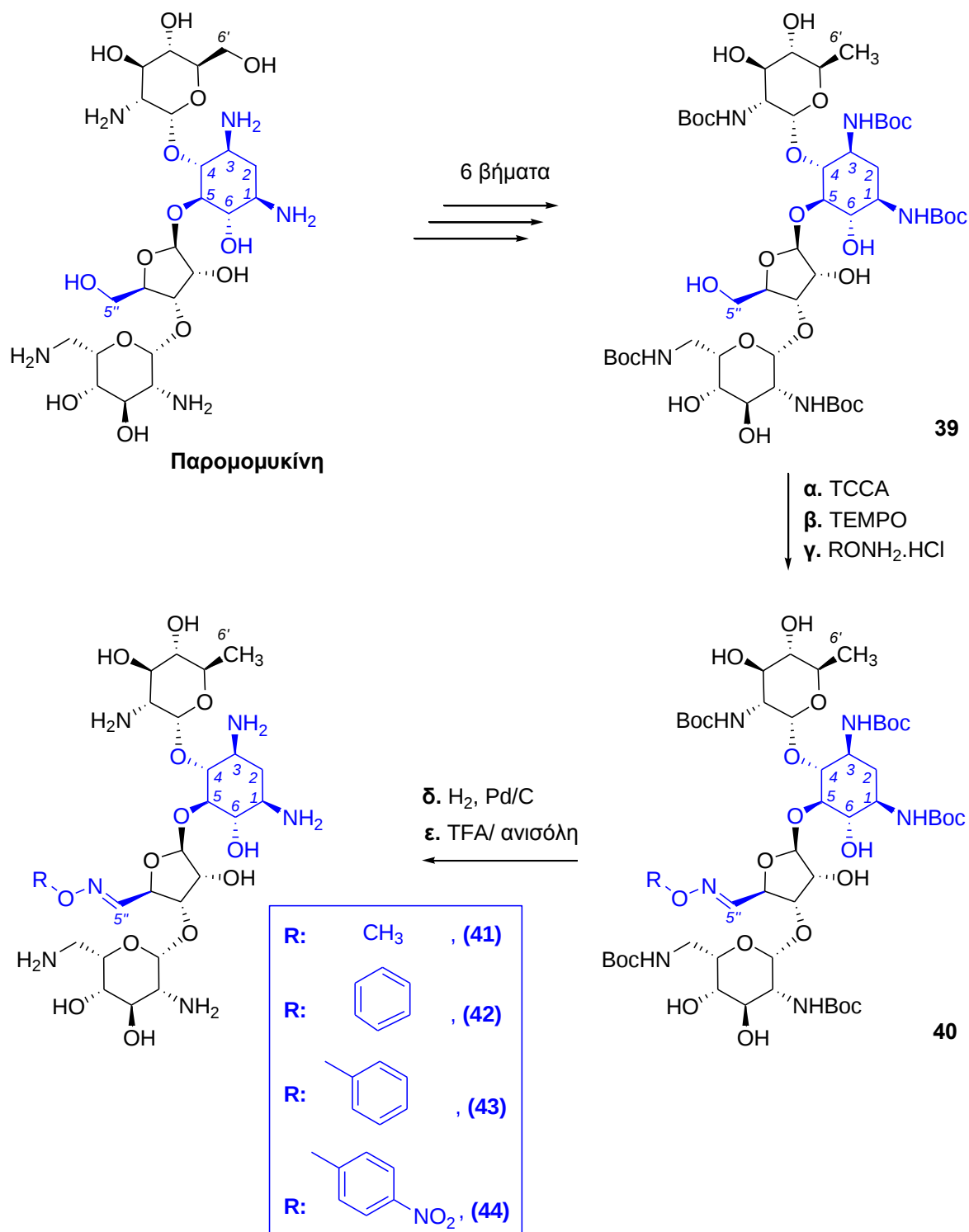
Τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς τη βιολογική δραστηριότητα έδειξε το παράγωγο **38**, ενώ όλα έδειξαν καλή δραστηριότητα σε ανθεκτικό στέλεχος του *S. Aureus*, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της δυνατότητας υπέρβασης των βακτηριακών μηχανισμών αντίστασης από τα νεοσυντιθέμενα παράγωγα.



Σχήμα 4.5. Σύνθεση των παραγώγων **36**, **37** και **38** της παρομομυκίνης με υποκατάσταση του 2''-OH από τον Hanessian.¹²⁴

Ένα ακόμα παράδειγμα στρατηγικής υποκατάστασης στην παρομομυκίνη, αλλά αυτήν τη φορά στο 5''-OH, αποτελεί η σύνθεση από την ερευνητική ομάδα του Vasella (Σχήμα 4.6).¹²⁵ Αρχικά, έγινε διαφοροποίηση των 6'- και 5''-OH μέσω μιας πορείας έξι βημάτων οδηγώντας στην ένωση **39** με απόδοση 18%. Εν συνεχεία, το πρωτοταγές 5''-OH οξειδώθηκε με TEMPO προς την αντίστοιχη αλδεϋδη και μετατράπηκε στις οξίμες **40** με διαφοροποίηση στην υποκατάσταση R. Η

τελική αποπροστασία προς τα παράγωγα **41**, **42**, **43** και **44** έγινε πρώτα με υδρογονόλυση οπότε και απομακρύνθηκε η Cbz-ομάδα, κατόπιν με τριφθοροοξικό οξύ για την απομάκρυνση της Boc-ομάδας.

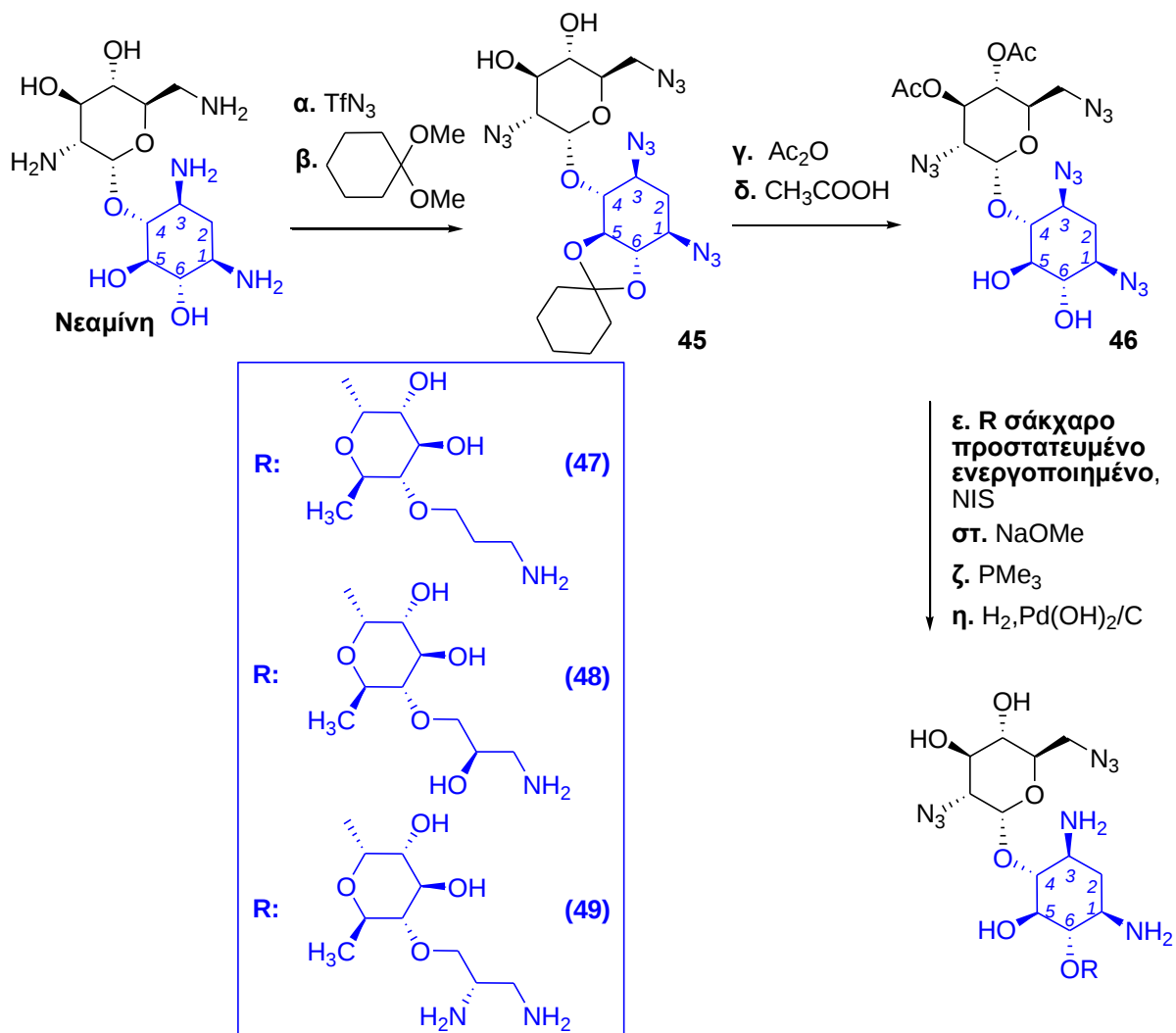


Σχήμα 4.6. Σύνθεση των παραγώγων **41**, **42**, **43** και **44** της παρομομυκίνης με υποκατάσταση του 5''-OH από τον Vasella.¹²⁵

Τα προκύπτοντα παράγωγα της παρομομυκίνης του σχήματος 4.6 έδειξαν σημαντικά μειωμένη βιολογική δραστηριότητα σε σχέση με το φυσικό προϊόν παρομομυκίνη. Σε αντίθεση λοιπόν με τα παράγωγα της παρομομυκίνης που προέκυψαν από την υποκατάσταση του 2''-OH (Σχήμα 4.5) τα οποία και είχαν βελτιωμένο βιολογικό προφίλ, η υποκατάσταση του 5''-OH φαίνεται να είναι επιζήμια για τη βιολογική δραστηριότητα των νέων αναλόγων (Σχήμα 4.6). Γνωρίζοντας ήδη ότι το 5''-OH συμμετέχει σε ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου που σταθεροποιούν την τριτοταγή διαμόρφωση της παρομομυκίνης, τα αποτελέσματα του Vasella απλώς επισημαίνουν τη σημασία της ελευθερίας του 5''-OH.¹²⁶

4.4.2. 4,6-παράγωγα της 2-DOS (παράγωγα της νεαμίνης)

Το 2005 η ομάδα του Chang¹²⁷ με εφελτήριο τη νεαμίνη παρασκεύασε τα **47**, **48** και **49** 4,6-διυποκατεστημένα παράγωγα της 2-DOS (Σχήμα 4.7).



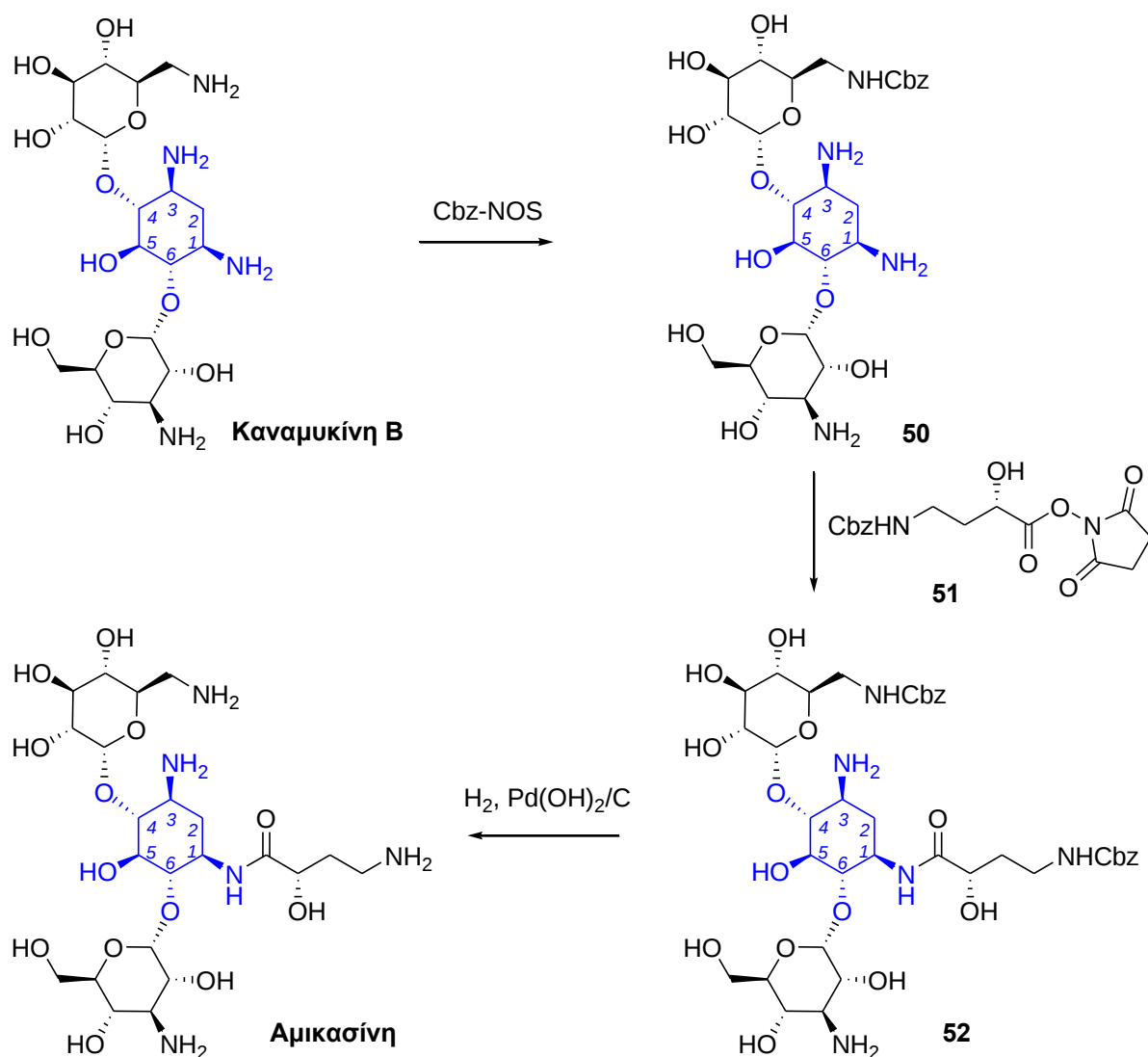
Σχήμα 4.7. Σύνθεση των παραγώγων **47**, **48** και **49** της 2-DOS με υποκατάσταση του 6-OH της νεαμίνης από τον Chang.¹²⁷

Κατά την πορεία αυτή, αρχικά η νεαμίνη αζιδιώθηκε και με εκλεκτική κεταλοποίηση μόνο των 5- και 6-OH της 2-DOS ελήφθη το μόριο **45** (Σχήμα 4.7). Μετά από ακετυλίωση και όξινη απομάκρυνση της κετάλης προέκυψε το **46**, όπου κατέστη δυνατή η εκλεκτική γλυκοζιτική σύζευξη του 6-OH έναντι του στερεοχημικά παρεμποδισμένου 5-OH. Μετά από ολική αποπροστασία ελήφθησαν τα τελικά προϊόντα **47**, **48** και **49**, τα οποία επέδειξαν μειωμένη δραστικότητα σε σχέση με την καναμυκίνη.

4.5. Τριϋποκατεστημένα παράγωγα της 2-DOS

4.5.1. 1,4,6-παράγωγα της 2-DOS (παράγωγα της καναμυκίνης)

Ένα από τα σημαντικότερα παράγωγα αυτής της κατηγορίας είναι η αμικασίνη (Σχήμα 4.8).



Σχήμα 4.8. Σύνθεση της αμικασίνης, ενός 1,4,6-τριϋποκατεστημένου παραγώγου της 2-DOS από τον Fujisawa.¹²⁸

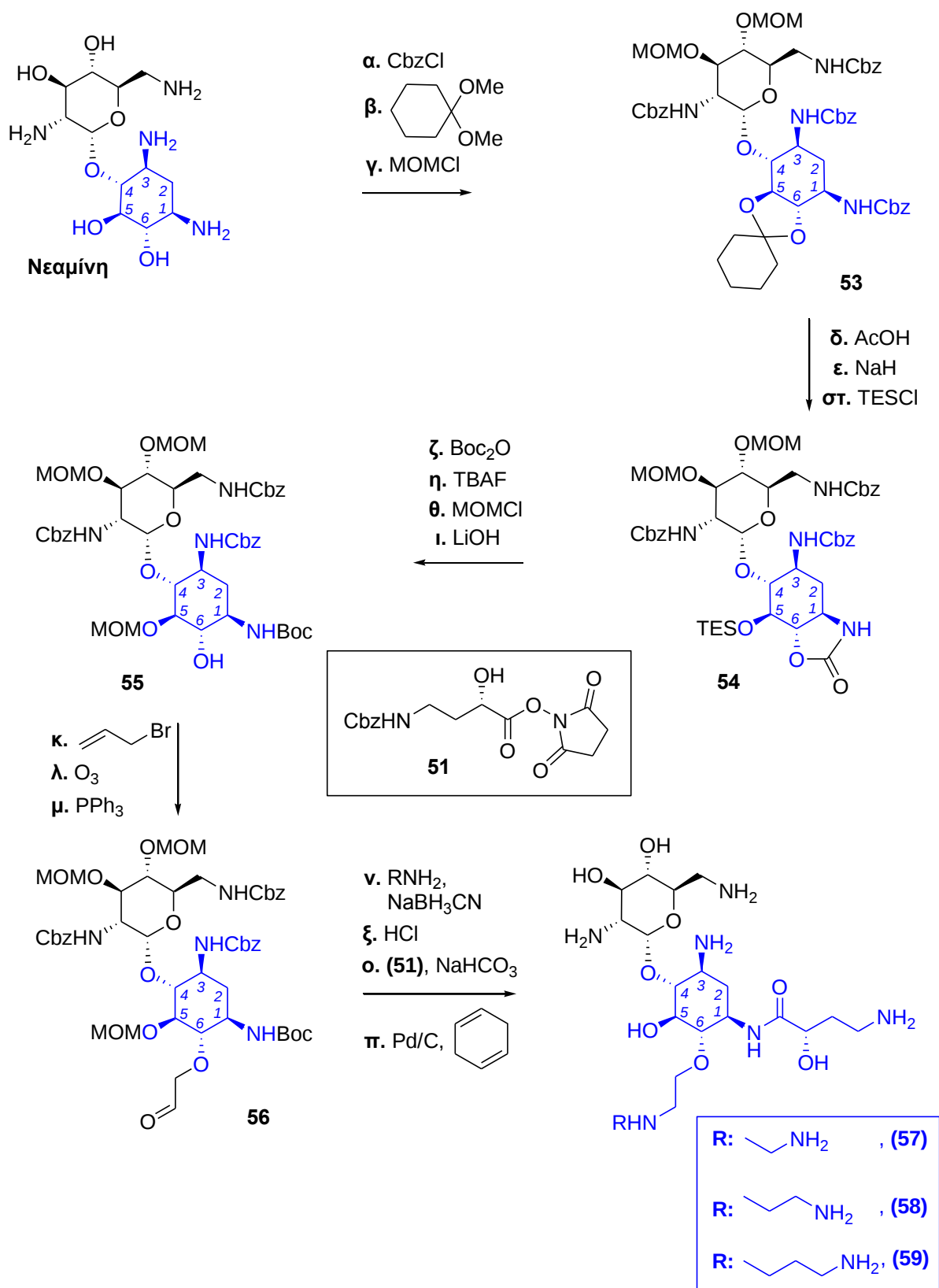
Η σύνθεση της αμικασίνης έγινε το 1972¹²⁸ και η βελτιωμένη βιολογική της δραστηριότητα ουσιαστικά έγκειται στην υποκατάσταση της θέσης N-1 από την (S)-4-αμινο-2-υδροξυβουτυρυλο-ομάδα. Μάλιστα, η σύνθεσή της βασίστηκε στη διαφορά δραστηριότητας μεταξύ των αμινομάδων 1 και 6' της καναμικίνης. Συγκεκριμένα, η πρωτοταγής αμινομάδα της καναμικίνης προστατεύτηκε με την Cbz-ομάδα προς την ένωση **50**, η οποία εν συνεχεία συζεύχθηκε με τον ενεργοποιημένο σουκινιμιδικό εστέρα **51** οδηγώντας στο μόριο **52** και με τελική αποπροστασία ελήφθη το μόριο της αμικασίνης (Σχήμα 4.8).

4.5.2. 1,4,6-παράγωγα της 2-DOS (παράγωγα της νεαμίνης)

Το 2002 η ερευνητική ομάδα του Mobashery με βάση υπολογιστικά μοντέλα¹²⁹ έκανε μια διαφοροποιημένη σειρά παρόμοιων αναλόγων με αυτών της καναμικίνης, τα οποία περιείχαν την (S)-4-αμινο-2-υδροξυβουτυρυλο-ομάδα στη θέση N-1 (Σχήμα 4.9). Ξεκινώντας λοιπόν από νεαμίνη, έγινε προστασία των αμινομάδων της με CbzCl, κατόπιν εκλεκτική κεταλοποίηση των 5-OH και 6-OH με 1,1-διμεθυλοκυκλοεξανόνη και ακόλουθη προστασία των υπόλοιπων υδροξυλίων με MOMCl οδηγώντας στην ένωση **53**. Με αποπροστασία της κετάλης της **53** προέκυψε η αντίστοιχη διόλη στην οποία πραγματοποιήθηκε ενδομοριακός σχηματισμός οξαζολιδινόνης και εν συνεχεία προστασία του 5-OH με TESCl προς το μόριο **54**.

Η αμιδική ομάδα της οξαζολιδινόνης προστατεύτηκε με Boc₂O, ενώ η επιρρεπής σε μεταναστεύσεις TES-ομάδα απομακρύνθηκε με TBAF και αντικαταστάθηκε από τη MOM-ομάδα (Σχήμα 4.9). Η οξαζολιδινόνη υπέστη διάνοιξη με LiOH και το ελεύθερο πλέον 6-OH της ένωσης **55** αλλυλιώθηκε και μετά με οζονόλυση οδήγησε στην επιθυμητή αλδεΐδη **56**. Τα επόμενα βήματα αφορούσαν σε αναγωγική αμίνωση της αλδεΐδης **56** με πρωτοταγείς αμίνες, απομάκρυνση τόσο της Boc-ομάδας όσο και των MOM-ομάδων με όξινες συνθήκες, σύζευξη της ελεύθερης πλέον αμινομάδας στο N-1 με τον ενεργοποιημένο σουκινιμιδικό εστέρα **51** και τελική αποπροστασία των Cbz-ομάδων με υδρογονόλυση.

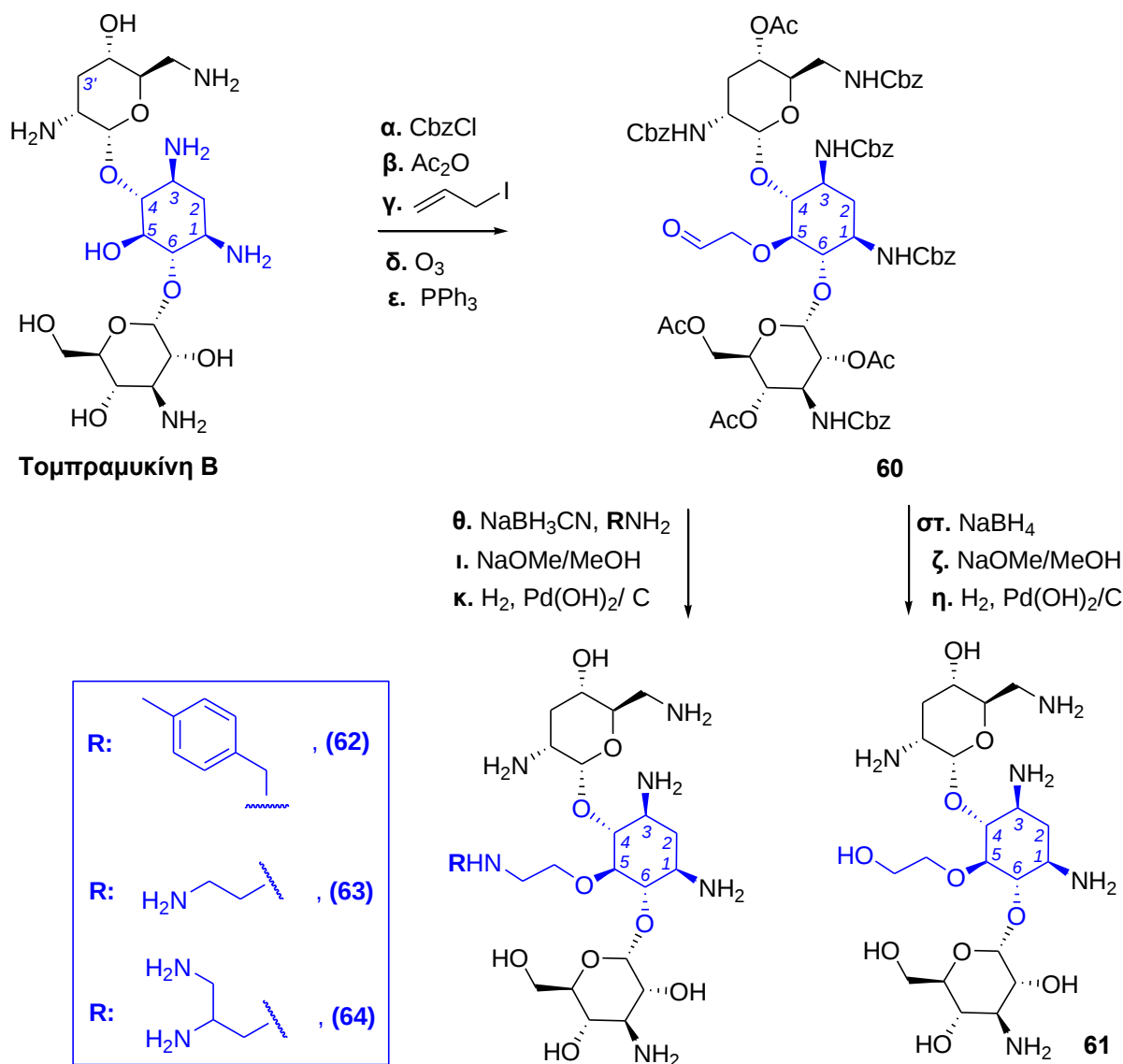
Τα προκύπτοντα 1,4,6-τριυποκατεστημένα παράγωγα της 2-DOS ήταν τα **57**, **58** και **59**, ανάλογα με την πρωτοταγή αμίνη που χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο της αναγωγικής αμίνωσης (Σχήμα 4.9). Οι βιολογικές μελέτες είχαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, καθώς για συγκεκριμένα είδη μικροοργανισμών παρατηρήθηκαν δραστηριότητες αντίστοιχες ή και καλύτερες από αυτές κλινικά χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών ακόμα και σε ανθεκτικά στελέχη.



Σχήμα 4.9. Σύνθεση των 1,4,6-τριυποκατεστημένων παραγώγων της 2-DOS 57, 58 και 59 από τον Mobashery.¹²⁹

4.5.3. 4,5,6-παράγωγα της 2-DOS (παράγωγα της τομπραμυκίνης)

Η ερευνητική ομάδα του Swayze¹³⁰ πραγματοποίησε τη σύνθεση τριϋποκατεστημένων παραγώγων της 2-DOS με πρώτη ύλη την τομπραμυκίνη, έναν αμινογλυκοζίτη που ουσιαστικά είναι η 3'-αφυδροξυλιωμένη νεομυκίνη (Σχήμα 4.10).



Σχήμα 4.10. Σύνθεση των 4,5,6-τριϋποκατεστημένων παραγώγων της 2-DOS **62**, **63** και **64** από τον Swayze.¹³⁰

Έτσι λοιπόν, αρχικά οι αμινομάδες της τομπραμυκίνης προστατεύτηκαν με CbzCl και κατόπιν οι υδροξυλομάδες μετατράπηκαν στους αντίστοιχους εστέρες με Ac₂O (Σχήμα 4.10). Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, το 5-OH του δακτυλίου της 2-DOS έχει μειωμένη δραστηριότητα λόγω στεreoχημικής παρεμπόδισης, οπότε δεν ακετυλιώνεται μαζί με τα υπόλοιπα υδροξύλια της τομπραμυκίνης, αλλά αλλυλιώνεται εν συνεχεία με το δραστικό ηλεκτρονιόφιλο

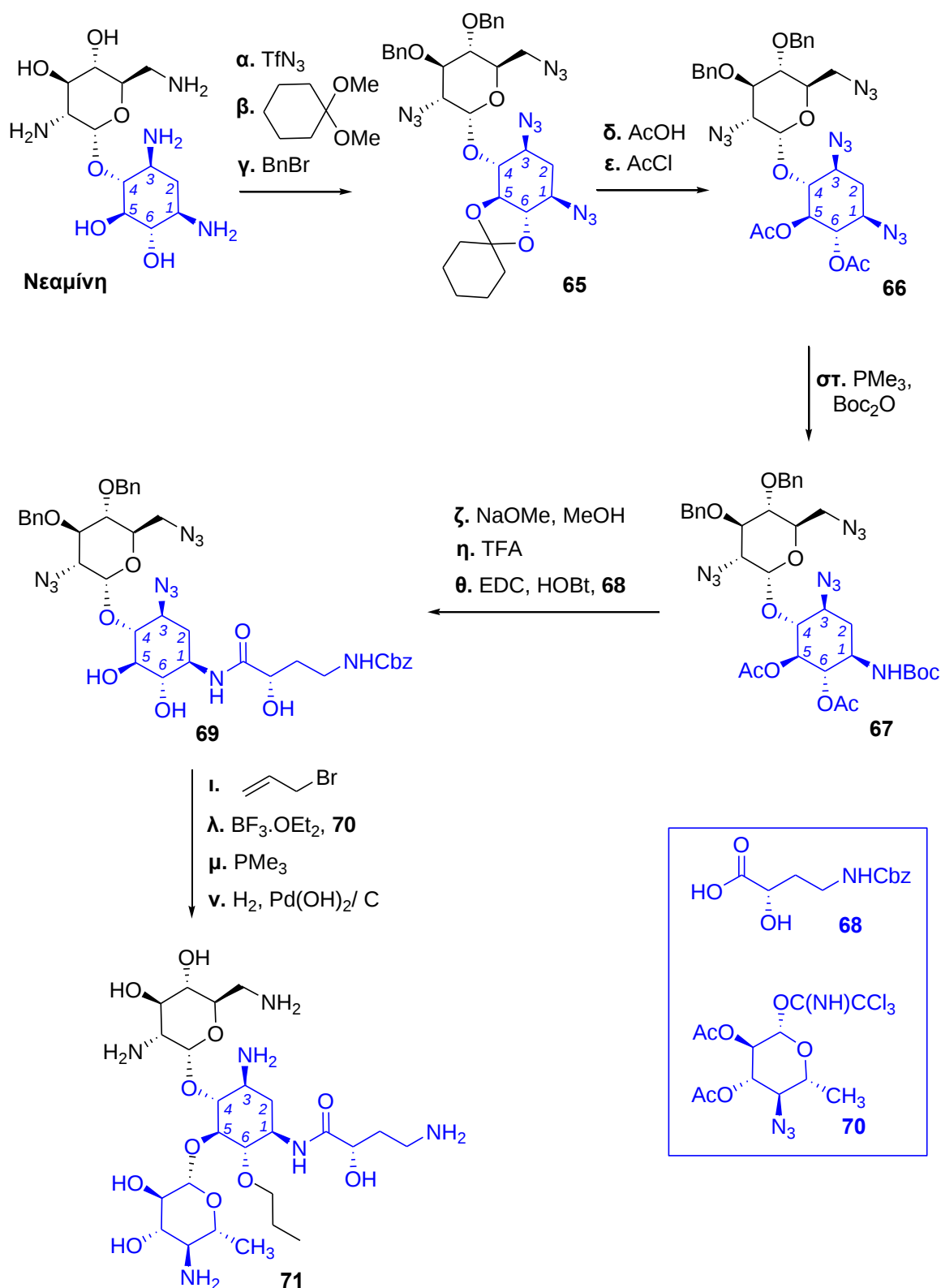
αλλυλοιωδίδιο. Η αλλυλομάδα οξονολύεται στην αντίστοιχη αλδεΐδη **60**, οπότε και μπορούν να ακολουθηθούν δύο πορείες: είτε η αλδεΐδη ανάγεται στην πρωτοταγή αλκοόλη και με ολική αποπροστασία λαμβάνεται η ένωση **61**, είτε πραγματοποιείται αναγωγική αμίνωση με τρεις πρωτοταγείς αμίνες οδηγώντας στα προϊόντα **62**, **63** και **64** (Σχήμα 4.10). Τα νέα αυτά παράγωγα παρουσίασαν περιορισμένη αντιβιοτική δράση και χαμηλή εκλεκτικότητα δέσμευσης με το A-site.

4.6. Τετραϋποκατεστημένα παράγωγα της 2-DOS (παράγωγα της νεαμίνης)

Το 2007 ο Chang και η ερευνητική του ομάδα¹³¹ ξεκινώντας από τη νεαμίνη παραγματοποίησαν τη σύνθεση 1,4,5,6,-παραγώγου της 2-DOS χρησιμοποιώντας εκλεκτική διαφοροποίηση στο N-1 (Σχήμα 4.11). Οι αμινομάδες της νεαμίνης αρχικά προστατεύτηκαν προς αζίδια, ακολούθησε εκλεκτική κεταλοποίηση των 5- και 6-OH και προστατεύτηκαν τα υδροξύλια του σακχάρου με BnBr, οδηγώντας στην ένωση **65**. Απομάκρυνση της κετάλης ελευθέρωσε τα 5- και 6-OH, τα οποία ακετυλιώθηκαν, αυξάνοντας έτσι τη δραστηριότητα του γειτονικού αζιδίου στη θέση 1 λόγω επαγωγικού φαινομένου. Χάρη σε αυτήν την αύξηση δραστηριότητας κατέστη δυνατή η τοποεκλεκτική αντίδραση Staudinger στο αζίδιο της θέσης 1 έναντι του αζιδίου της θέσης 3 της ένωσης **66**, οπότε πραγματοποιήθηκε μετατροπή μόνο του αζιδίου της θέσης 1 σε ελεύθερη αμίνη και ακόλουθη *in situ* προστασία της αμινομάδας με Boc₂O, παράγοντας την ένωση **67**.

Σαπωνοποίηση με NaOMe υδρόλυσε τις ακετυλομάδες της ένωσης **67**, ισχυρά όξινες συνθήκες με TFA απομάκρυναν την Boc-ομάδα και ακόλουθη σύζευξη με το οξύ **68** με EDC οδήγησε στην υποκατάσταση της αμίνης στη θέση 1 με την πλευρική αλυσίδα της αμικασίνης. Η προκύπτουσα ένωση **69** αλλυλιώθηκε εκλεκτικά στο 6-OH λόγω της προαναφερθείσας στερεοχημικής παρεμπόδισης στο 5-OH, κατόπιν το 5-OH γλυκοζυλιώθηκε με την ενεργοποιημένη σακχαρική μονάδα **70** και ακολούθησαν οι μετατροπές (αναγωγή αζιδομάδων με PMe₃, υδρογονόλυση Cbz-ομάδων, αναγωγή αλλυλομάδας) που οδήγησαν στο τελικό προϊόν **71** (Σχήμα 4.11).

Η παραπάνω πορεία με μικρή παραλλαγή οδήγησε σε προϊόντα με πολικές ομάδες (OH, NH₂) στην τερματική θέση της αλυσίδας που υπάρχει ως υποκατάσταση στο 6-OH του παραγώγου **71**. Η βιολογική μελέτη των προκύπτοντων παραγώγων έδειξε ότι σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν ελαφρά βελτιωμένες ιδιότητες σε σχέση με το άπολα υποκατεστημένο στο 6-OH παράγωγο **71**.



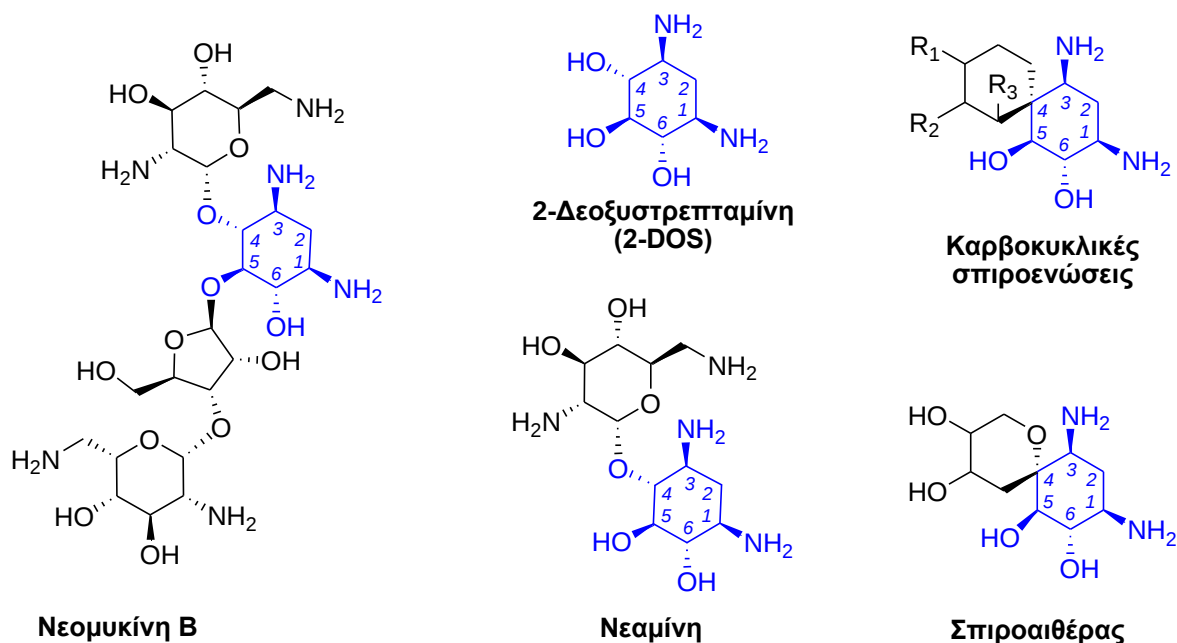
Σχήμα 4.11. Σύνθεση του 1,4,5,6-τετραϋποκατεστημένου παραγώγου **71** της 2-DOS από τον Chang.¹³¹

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Ανάπτυξη ορθογωνικών στρατηγικών για σύνθεση νέων αναλόγων της 2-DOS και προσπάθειες εφαρμογής τους στη σύνθεση 6,6-σπиро-καρβοκυκλικών αναλόγων

5.1. Εισαγωγή

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3, το ριβοσωματικό αποκωδικοποιητικό κέντρο A-site του rRNA αποτελεί το στόχο των αμινογλυκοζιτικών αντιβιοτικών.



Σχήμα 5.1. Φυσικοί αμινογλυκοζίτες (νεομικίνη Β, νεαμίνη) και τα συνθετικά ανάλογα της 2-DOS που προτάθηκαν από το εργαστήριό μας (σπироενώσεις, σπιροαιθέρας) (R_1 , R_2 , R_3 : πλευρικές αλυσίδες).

Η νεαμίνη αποτελεί το μικρότερο δομικό τμήμα των αμινογλυκοζιτών που έχει βιολογική δραστικότητα ως προς το A-site του RNA. Έτσι, η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της νεαμίνης με το A-site¹³² χρησιμοποιήθηκε ως βάση για το σχεδιασμό καινοτόμων αναλόγων αμινογλυκοζιτών πιθανολογούμενων να φέρουν βελτιωμένη βιολογική δραστικότητα. Στο προηγούμενο κεφάλαιο

εξετάσαμε αντιπροσωπευτικές προσπάθειες διάφορων ερευνητικών ομάδων που αφορούσαν σε σύνθεση υποκατεστημένων αναλόγων της 2-DOS που αναπτύχθηκαν από διάφορες ερευνητικές ομάδες.

Στο παρόν κεφάλαιο αναπτύσσονται συνθετικές στρατηγικές για τη σύνθεση νέων αναλόγων της 2-DOS και εφαρμόζονται συγκεκριμένα στη σύνθεση των προτεινόμενων από το εργαστήριό μας καρβοκυκλικών σπироενώσεων (Σχήμα 5.1). Οι εν λόγω σπироενώσεις προέρχονται από τη νεομυκίνη B και διαφοροποιούνται από τη νεαμίνη στο ότι ο σακχαρικός δακτύλιος έχει αντικατασταθεί από έναν κατάλληλα τροποποιημένο σπироκυκλοεξανικό δακτύλιο. Τα παράγωγα αυτά αναμένονται να εμφανίζουν πιο επιλεκτική πρόσδεση στο RNA (σύμφωνα με τη θεωρία της ηλεκτροστατικής συμπληρωματικότητας, σελ. 51 κεφάλαιο 3), οπότε και να επιδεικνύουν βελτιωμένη αντιβιοτική ισχύ.

5.2. Ανάπτυξη αναλόγων της 2-DOS ως πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση σπироενώσεων

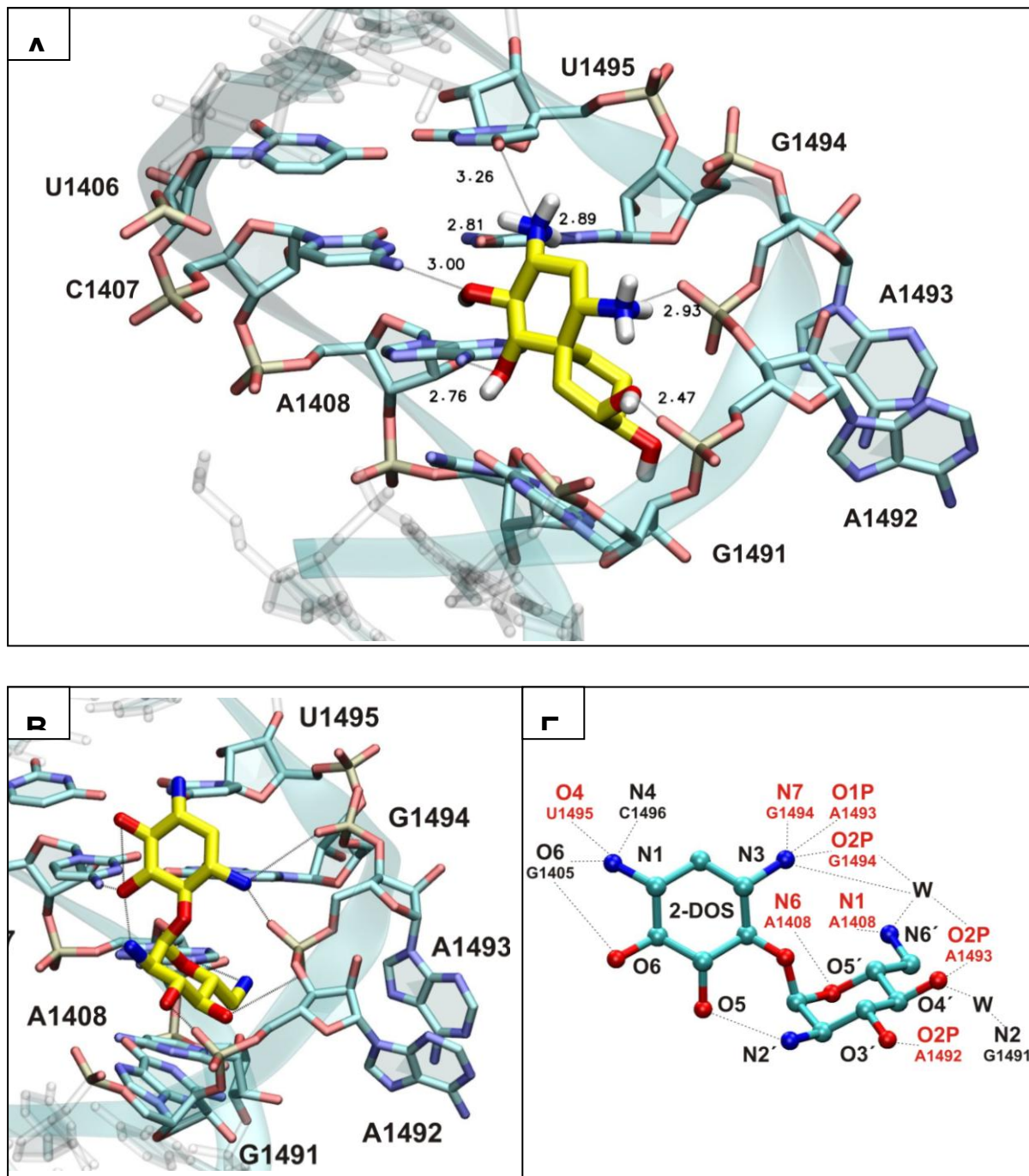
5.2.1. Σχεδιασμός μορίων μιμητών της 2-DOS

Η νεαμίνη δομικά αποτελείται από δύο δακτυλίους: έναν σακχαρικό και έναν αμινοκυκλιτολικό (2-δεοξυστρεπταμίνη ή 2-DOS), οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με έναν α-γλυκοζιτικό δεσμό μέσω του O-4 της 2-DOS (Σχήμα 5.1). Η λογική του σχεδιασμού μας στηρίζεται στη μετατροπή της σύνδεσης των δύο δακτυλίων της νεαμίνης από γλυκοζιτικό δεσμό σε τεταρτοταγή άνθρακα ενός [6,6] σπироκυκλικού συστήματος. Για την πρόβλεψη του τρόπου σύνδεσης των σχεδιασμένων σπироκυκλικών μορίων στο A-site (Σχήμα 5.2, A), χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλική δομή της νεαμίνης με το αντίστοιχο νουκλεοτίδιο με PDB ID 2ET8 (Σχήμα 5.2, B, Γ). Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα AUTODOCK 3 υπολογίστηκαν οι ενεργειακά ευνοϊκότερες διαμορφώσεις αλληλεπίδρασης των σχεδιασμένων σπироκυκλικών μορίων, αφαιρώντας το μόριο της νεαμίνης.

Όπως είδαμε στο κεφάλαιο 3, ο δακτύλιος της 2-DOS παρέχει τέσσερις από τους βασικότερους δεσμούς υδρογόνου με το RNA μέσω των δύο αμινομάδων του (N-1 και N-3). Κοιτώντας το υπολογιστικό μοντέλο της προτεινόμενης σπιροκαρβοκυκλικής ένωσης με το A-site (Σχήμα 5.2 A), βλέπουμε ότι ο δακτύλιος της 2-DOS διατηρεί την ίδια διαμόρφωση όπως και στο φυσικό προϊόν της νεαμίνης (Σχήμα 5.2 B, Γ). Μάλιστα κατά αντιστοιχία με τη νεαμίνη, διατηρούνται οι δύο δεσμοί υδρογόνου των δύο αμινομάδων στο δακτύλιο της 2-DOS: του N-1 με το O-4 της U1495 και του N-3 με το N-7 της G1494.

Οι αλληλεπιδράσεις των O-5' και N-6' του σακχαρικού δακτυλίου της νεαμίνης με τη βάση A1408 (Σχήμα 5.2, Γ), προβλέπεται στο σπироκυκλοεξάνιο ότι μπορεί να αντικαθίσταται από το δεσμό υδρογόνου του υδροξύλιο O-5 του δακτυλίου της 2-DOS με το O-2 της A1408 (Σχήμα 5.2, A).

Επίσης, προβλέπεται ότι η υδροξυλομάδα O-6 του δακτυλίου της 2-DOS σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το N-4 της C1407. Με προσθήκη δύο υδροξυλομάδων στις θέσεις 3' και 4' του σπироδακτυλίου είναι δυνατό να έχουμε επιπλέον αλληλεπιδράσεις με την G1491 (Σχήμα 5.2 Α).



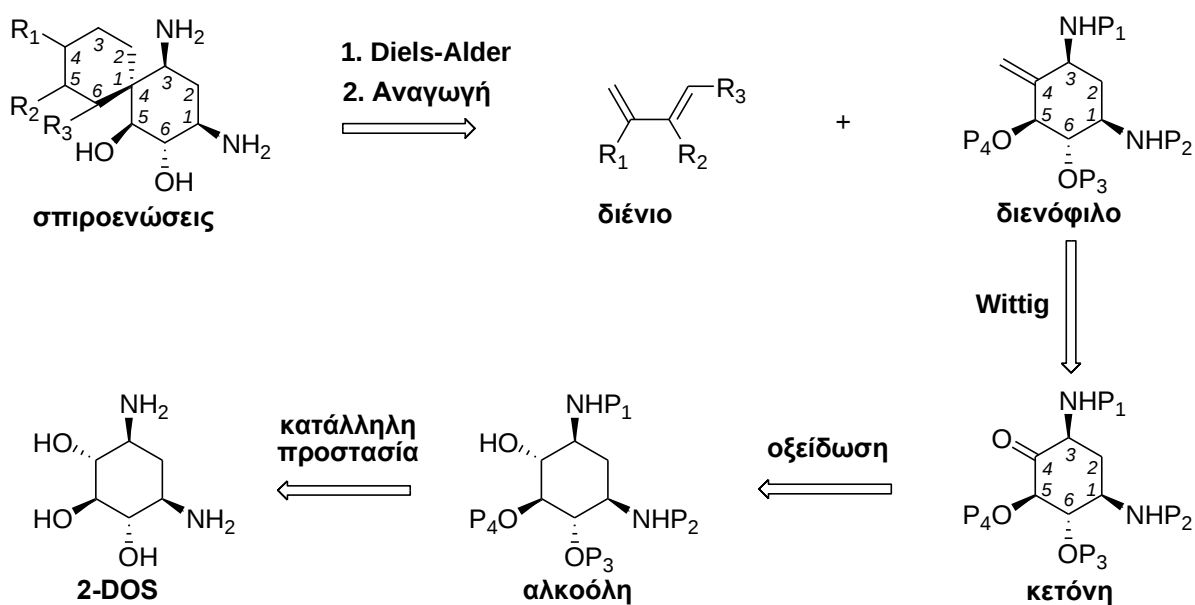
Σχήμα 5.2. (Α) Υπολογιστικό μοντέλο [6,6]-σπироκαρβοκυκλικής ένωσης που βασίζεται στη 2-DOS / A-site. (Β) Υπολογιστικό μοντέλο νεαμίνης / A-site. (Γ) Αλληλεπιδράσεις νεαμίνης / A-site, όπως προκύπτουν από το υπολογιστικό μοντέλο στο Β.

Συμπερασματικά, οι προτεινόμενες σπироενώσεις θεωρητικά υπερτερούν έναντι των φυσικών αμινογλυκοζιτικών αντιβιοτικών στα εξής δύο σημεία (Σχήμα 5.1): **1)** Λόγω της άκαμπτης δομής τους, η διαμόρφωση τους «κλειδώνεται» και έτσι προβλέπεται η αύξηση της επιλεκτικότητάς τους στο A-site του RNA.⁸³ Συγκεκριμένα, μειώνεται η διαμορφωτική ελευθερία που προσέδιδε ο προϋπάρχοντας γλυκοζιτικός δεσμός τον οποίο και έφερε η νεαμίνη. Επιπροσθέτως, το O-4 του δακτυλίου της 2-DOS δεν έχει βρεθεί να συμμετέχει σε διαμοριακές αλληλεπιδράσεις με το βιολογικό στόχο (Σχήμα 5.2 Γ). **2)** Φέρουν δύο λιγότερες αμινομάδες από τη νεαμίνη, οπότε θα αναμένεται να έχουν μικρότερη τοξικότητα στα ευκαρυωτικά κύτταρα λόγω του μειωμένου ολικού φορτίου τους.⁸³

5.2.2. Ρετροσυνθετικό πλάνο σπироενώσεων

Έχοντας προβλέψει λοιπόν με τα υπολογιστικά μοντέλα που αναφέρθηκαν προηγουμένως ότι νέα σπироκαρβοκυκλικά μόρια που θα φέρουν τον δακτύλιο της 2-DOS είναι πολλά υποσχόμενα σε βελτιωμένη αντιβιοτική δράση σε σχέση με τους υπάρχοντες αμινογλυκοζίτες, επόμενο βήμα ήταν η ρετροσυνθετική τους προσέγγιση. Για τη σύνθεση των [6,6] σπироκυκλικών ενώσεων προτάθηκε η ρετροσύνθεση που φαίνεται στο σχήμα 5.3.

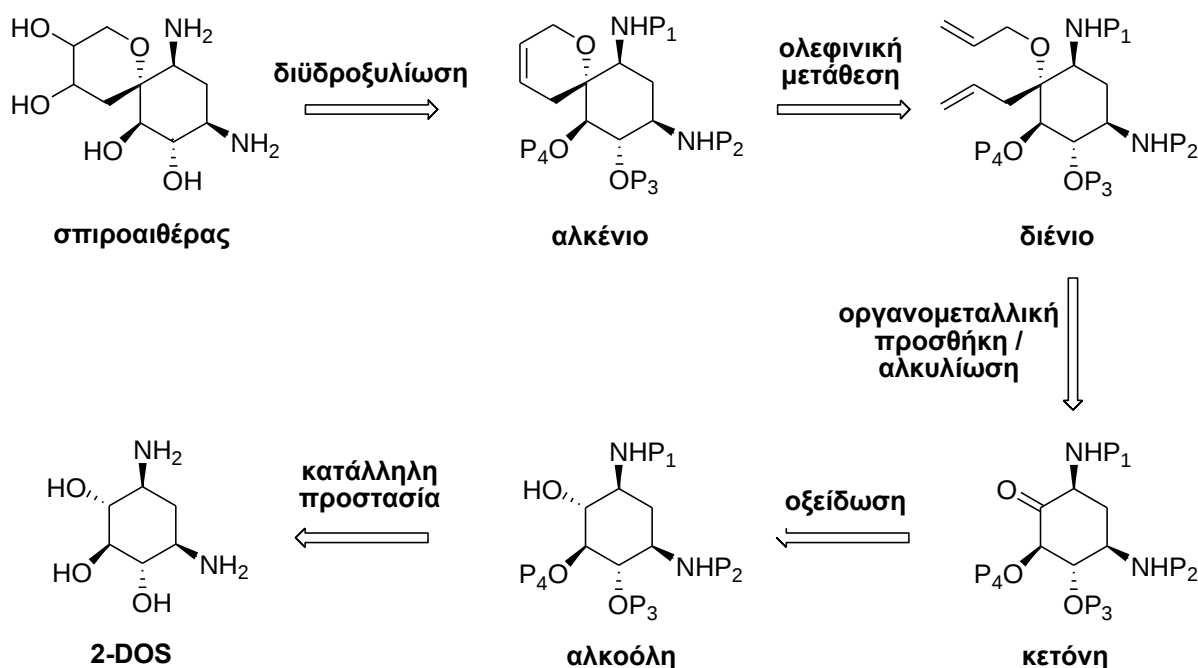
Οι καρβοκυκλικές σπироενώσεις θα μπορούσαν να προκύψουν με αντίδραση Diels-Alder ενός κατάλληλου διενίου και μιας ολεφίνης που θα είχε το ρόλο του διενόφιλου (Σχήμα 5.3). Η ολεφίνη αυτή θα μπορούσε να προέλθει από την αντίστοιχη κετόνη με αντίδραση Wittig ή κάποια άλλη αντίδραση μεθυλενίωσης, η οποία με τη σειρά της θα μπορούσε να προκύψει με οξείδωση από την αντίστοιχη προστατευμένη δευτεροταγή αλκοόλη, που θα είχε σαν πρώτη ύλη τη 2-DOS.



Σχήμα 5.3. Ρετροσύνθεση καρβοκυκλικών σπироενώσεων αναλόγων της 2-DOS, P₁, P₂, P₃, P₄: προστατευτικές ομάδες, R₁, R₂, R₃: πλευρικές αλυσίδες.

Όταν ο δεύτερος δακτύλιος της σπироένωσης είναι ετεροκυκλικός με οξυγόνο, τότε προκύπτει ένας σπιροαιθέρας με την προτεινόμενη ρετροσυνθετική πορεία που φαίνεται στο σχήμα 5.4. Έτσι λοιπόν, ο σπιροαιθέρας θα μπορούσε να προκύψει από διϋδροξυλίωση του αντίστοιχου σπιροαιθερικού αλκενίου, το οποίο με τη σειρά του θα μπορούσε να προέλθει με κυκλοποιητική ολεφινική μετάθεση (Ring Closing Metathesis, RCM) του κατάλληλου διένιου. Το εν λόγω διένιο θα μπορούσε να προκύψει με οργανομεταλλική προσθήκη μιας κατάλληλα προστατευμένης κετόνης και ακόλουθη αλκυλίωση της προκύπτουσας τριτοταγούς αλκοόλης. Η κετόνη με τη σειρά της, όπως και στο προηγούμενο ρετροσυνθετικό σχήμα 5.3, θα προέκυπτε από κατάλληλη προστασία και οξείδωση της 2-DOS.

Σε αμφότερα τα ρετροσυνθετικά σχήματα των σπироενώσεων (Σχήματα 5.3 και 5.4) χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη η 2-DOS, καθώς επίσης καταφαίνεται ο σημαίνοντας ρόλος της κατάλληλα προστατευμένης πρόδρομης αλκοόλης και της συνεπακόλουθης κετόνης που θα αποτελέσει πολύτιμο ενδιάμεσο για την περαιτέρω σύνθεση. Μείζονα ρόλο παίζει η επιλογή των προστατευτικών ομάδων P_1 , P_2 , P_3 και P_4 , ώστε να υπάρχει συμβατότητα με τις προβλεπόμενες αντιδράσεις. Η ορθογωνικότητα των προστατευτικών ομάδων στο μόριο της 2-δεοξυστρεπταμίνης επιτρέπει τη λεπτή ρύθμιση των δεσμικών ιδιοτήτων των αναλόγων με το A-site, γι' αυτό συνθετικός στόχος σε πρώτη φάση ήταν η κατάλληλα προστατευμένη 2-DOS.



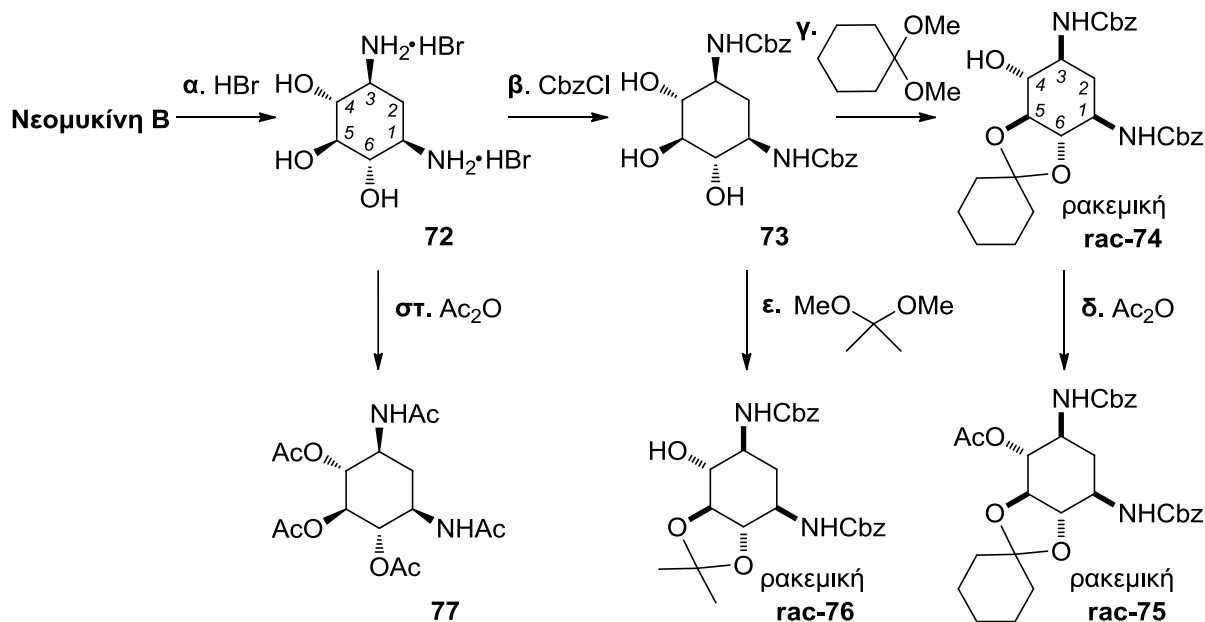
Σχήμα 5.4. Ρετροσύνθεση 2-δεοξυστρεπταμινο-σπιροαιθερικών ενώσεων, P_1 , P_2 , P_3 , P_4 : προστατευτικές ομάδες, R_1 , R_2 , R_3 : πλευρικές αλυσίδες.

5.2.3. Σύνθεση πρόδρομων αλκοολών

Ως καταλληλότερη πρώτη ύλη για τη σύνθεση των πρόδρομων αλκοολών επελέγη η εμπορικά διαθέσιμη νεομυκίνη B, καθώς οδηγεί στη 2-DOS με ευκολία, χαμηλό κόστος και υψηλή απόδοση (Σχήμα 5.1).

Πρώτος συνθετικός στόχος ήταν η ρακεμική αλκοόλη **rac-74** (Σχήμα 5.5). Σε αυτή τη φάση, το ζητούμενο δεν ήταν η ύπαρξη οπτικής ενεργότητας στην προκύπτουσα αλκοόλη, αλλά η επίλυση του θέματος των κατάλληλων προστατευτικών ομάδων, οπότε προτιμήθηκε η διερεύνηση σε μια εύκολα και άμεσα συντιθέμενη ρακεμική αλκοόλη. Εφόσον μετά τη διερεύνηση το υπόστρωμα κρινόταν κατάλληλο, θα ακολουθούσε η σύνθεση της αντίστοιχης οπτικά ενεργής αλκοόλης **74**.

Έτσι, η νεομυκίνη B υπέστη όξινη διάσπαση των γλυκοζιτικών δεσμών με υδροβρώμιο υπό βρασμό με επαναροή¹³³ και παρήχθη το διϋδροβρωμικό άλας της 2-DOS (**72**) (Σχήμα 5.5). Στο μόριο **72** πραγματοποιήθηκε καρβαμδική προστασία των αμινομάδων σε υψηλή απόδοση με χρήση του αντιδραστηρίου καρβοβενζοξυ-χλωρίδιο προς την ένωση **73**. Ακολούθησε προστασία των δύο γειτονικών υδροξυλίων της προκύπτουσας τριόλης **73** προς κετάλη με χρήση του αντιδραστηρίου 1,1-διμεθοξυ-κυκλοεξάνιο, οπότε οδηγηθήκαμε στην αλκοόλη **rac-74**. Δεδομένου ότι ο σχηματισμός της κυκλοεξυλιδενοκετάλης μπορούσε να συμβεί χωρίς τοποεκλεκτικότητα, είτε ανάμεσα στα 4- και 5-, είτε στα 5- και 6-OH, η αλκοόλη **rac-74** ήταν ρακεμική.

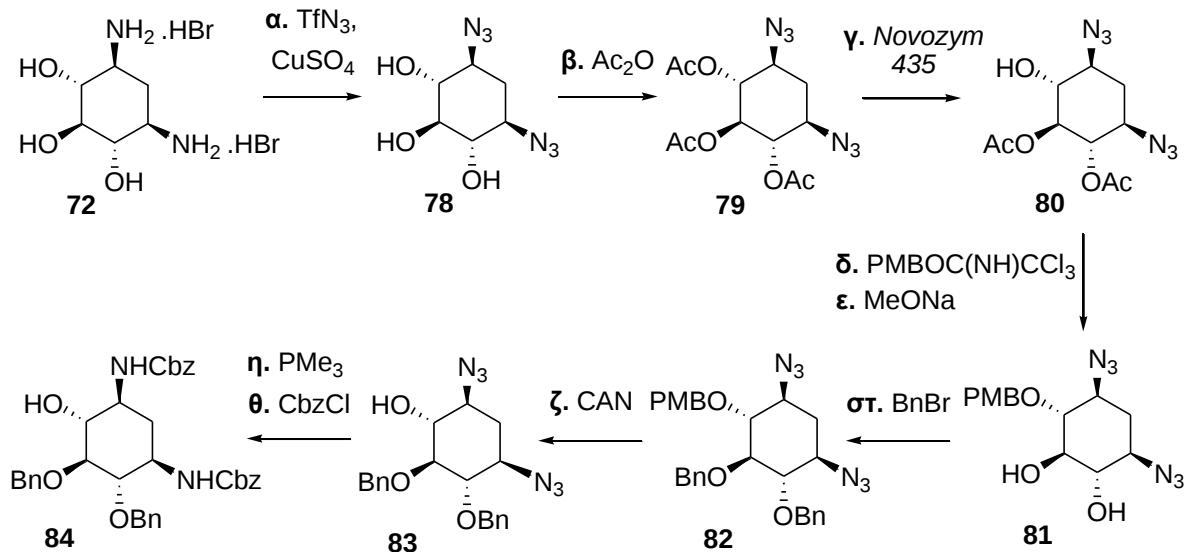


Σχήμα 5.5. Σύνθεση της ρακεμικής αλκοόλης **rac-74** από τη 2-DOS: **(α)** HBr 48%, H₂O (0.16 M), βρασμός με επαναροή, 20 h, 84%, **(β)** CbzCl (2.5 eq), NaHCO₃ (7.5 eq), 1,4-διοξάνιο / H₂O (1:1, v/v) (0.4 M), 12 h, 0°C→25°C, 89%, **(γ)** 1,1-διμεθοξυκυκλοεξάνιο (10.0 eq), p-TsOH (0.15 eq), άνυδρο DMF (0.06 M), 12 h, 25°C, 79%, **(δ)** (CH₃CO)₂O (5.0 eq), άνυδρη πυριδίνη (περίσσεια), 12 h, 25°C,

84%, (**ε**) 2,2-διμεθοξυ-προπάνιο (10.0 eq), *p*-TsOH (0.15 eq), άνυδρο DMF (0.2 M), 12 h, 25°C, 86% (**στ**) (CH₃CO)₂O (20.0 eq), άνυδρη πυριδίνη (περίσσεια), 4-DMAP (0.1 eq), 12 h, 25°C, 84%.

Για να επιβεβαιωθεί ότι πράγματι σχηματίστηκε αλκοόλη, έγινε έλεγχος παρουσίας ελεύθερης υδροξυλομάδας στην ένωση **rac-74** με αντίδραση ακετυλίωσης. Η ένωση **rac-75** που προέκυψε χαρακτηρίστηκε ως ακετυλιωμένο παράγωγο, οπότε πιστοποιήθηκε η ύπαρξη υδροξυλίου. Επιπροσθέτως, έρχριζε επιβεβαίωσης ο σχηματισμός 1,2-κετάλης ανάμεσα στα γειτονικά υδροξύλια της **73** και όχι 1,3-κετάλης ανάμεσα στα 4- και 6-OH. Για αυτόν το λόγο συνετέθη η ένωση **rac-76**, στην οποία ο χαρακτηρισμός της θέσης της ισοπροπυλιδενοκετάλης μπορούσε να γίνει με φασματοσκοπία ¹³C-NMR σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.¹³⁴ Υποθέτοντας ότι η κυκλοεξυλιδενο- θα είχε την ίδια συμπεριφορά κατά αντιστοιχία με την ισοπροπυλιδενο-κετάλη, κατέστη δυνατό να εξεταστεί και εν τέλει να επιβεβαιωθεί η επιθυμητή θέση της κετάλης στα γειτονικά υδροξύλια της **rac-74** (Σχήμα 5.5).

Η επόμενη σύνθεση που πραγματοποιήθηκε ήταν της οπτικά ενεργής αλκοόλης **84** (Σχήμα 5.6), βασισμένη σε μεγάλο βαθμό σε ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφική πορεία.¹³³



Σχήμα 5.6. Σύνθεση της οπτικά ενεργής αλκοόλης **84** από τη 2-DOS: (**α**) TfN₃ (4.0 eq), CuSO₄ (0.1 eq), Et₃N (10.0 eq), H₂O / MeOH (1:3.75, v/v) (0.1M), 12 h, 25°C, 82%, (**β**) Ac₂O, (10.0 eq), DMAP (0.10 eq), πυριδίνη (0.45 M), 12 h, 25°C, 80%, (**γ**) Novozym 435, (1:1, w/w), τολουόλιο / ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέως (1:1, v/v) pH = 6.2, 3 d, 25°C, 66%, (**δ**) PMBC(O)NHCCl₃ (4.0 eq), CSA (0.1 eq), άνυδρο CH₂Cl₂ (1.1 M), 12 h, 25°C, (**ε**) MeONa (0.2 eq), MeOH / THF (10:1, v/v) (0.085 M), 12 h, 25°C, 72% συνολική απόδοση για δύο βήματα, (**στ**) BnBr (3.0 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (4.0 eq), DMF (0.1 M), 30 min, 62%, (**ζ**) CAN (5.0 eq), CH₃CN / H₂O (9:1, v/v) (0.03 M), 1 h, 25°C, 95%, (**η**) διάλυμα PMe₃ (5.0 eq) σε THF 1.0 M, vδ. NaOH 0.1 M (0.05 eq), THF (0.06 M), 12 h, 25°C,

(**θ**) *CbzCl* (4.0 eq), *NaHCO₃* (7.0 eq), 1,4-διοξάνιο / *H₂O* (1:1, v/v) (0.04 M), 12 h, 25°C, 96% σε 2 βήματα.

Ξεκινήσαμε λοιπόν από το διϋδροβρωμικό άλας της 2-DOS (**72**) και οι αμινομάδες προστατεύτηκαν στα αντίστοιχα αζίδια με τριφθορο-μεθανο-σουλφονυλο-αζίδιο¹³⁶ παρουσία καταλυτικής ποσότητας θειϊκού χαλκού (Σχήμα 5.6).¹³⁷ Τα υδροξύλια της προκύπτουσας τριόλης **78** ακετυλιώθηκαν με χρήση οξικού ανυδρίτη παρουσία καταλυτικής ποσότητας *N,N*-διμεθυλαμινο-πυριδίνης καταλήγοντας την ένωση **79**. Εν συνεχεία, έλαβε χώρα εκλεκτική υδρόλυση της ακετυλομάδας στο O-4 του μορίου **79** με το ένζυμο *Novozym 435* (λιπάση *Candida Antarctica* ακινητοποιημένη σε μια μακροπορώδη ακρυλική ρητίνη) σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 6.2) οδηγώντας στην οπτικά ενεργή αλκοόλη **80**.¹³⁸ Με το κρίσιμο βήμα της ενζυμικής αποκετυλίωσης εισήχθη χειρομορφία στη μέχρι πρότινος συμμετρική δομή της 2-DOS.

Το ελεύθερο 4-υδροξύλιο της **80** προστατεύτηκε με την *p*-μεθοξυ-βενζυλο-ομάδα, καθώς αυτή η αιθερική προστασία μπορούσε να πραγματοποιηθεί σε ήπια όξινες συνθήκες που ήταν συμβατές με τους υπάρχοντες ακετυλεστέρες (Σχήμα 5.6). Συγκεκριμένα, η προστασία με την PMB-ομάδα πραγματοποιήθηκε με χρήση του αντιδραστηρίου *π*-μεθοξυ-βενζυλο-τριγλωρο-ακεταμίδιο [*PMBOC*(=NH)CCl₃] παρουσία καταλυτικής ποσότητας καμφορο-σουλφονικού οξέος (CSA).¹³⁹

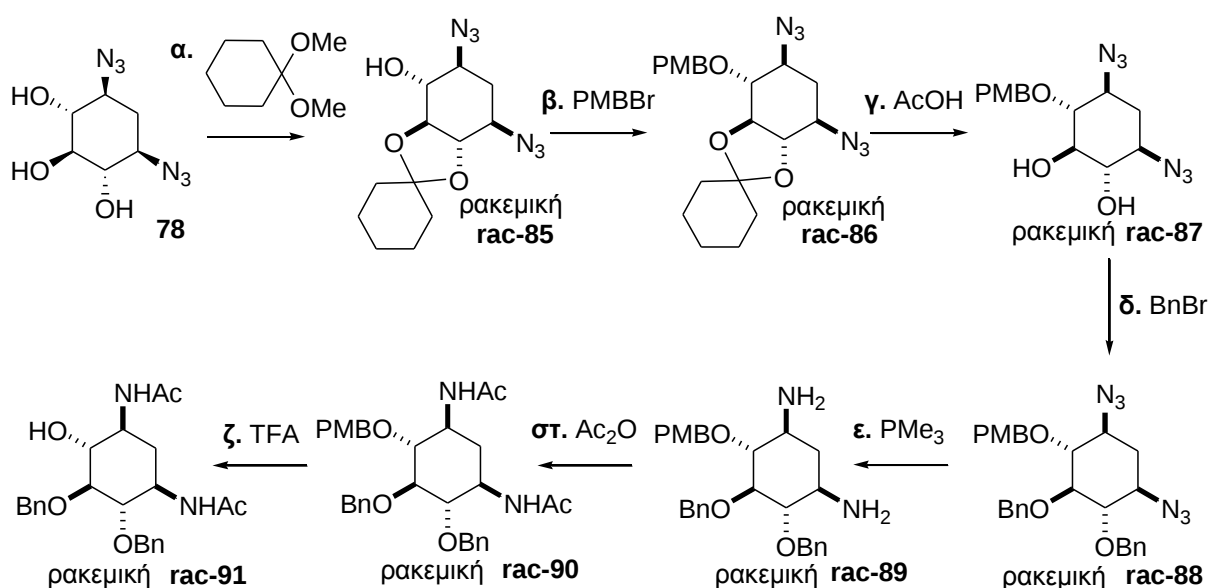
Μετά από σαπωνοποίηση των ακετυλεστέρων με μεθοξείδιο του νατρίου σχηματίστηκε η διόλη **81**, η οποία και διβενζυλιώθηκε προς την **82** με βενζυλοβρωμίδιο. Ακολούθησε οξειδωτική διάσπαση της **82** με CAN προς απομάκρυνση της PMB-ομάδας, κατόπιν έγινε απομάκρυνση των αζιδομάδων της αλκοόλης **83** με αναγωγή Staudinger και *in situ* προστασία των προκύπτουσων ελεύθερων αμινομάδων με *CbzCl*, οπότε σαν τελικό αποτέλεσμα είχαμε το σχηματισμό της επιθυμητής αλκοόλης **84**.

Όπως είδαμε στο σχήμα 5.4, η διαφοροποίηση του 4-OH στο συμμετρικό μόριο της 2-DOS έγινε με το ένζυμο *Novozym 435* σε μια ενζυμική αντίδραση αποακετυλίωσης η οποία είχε απόδοση μόλις 66%. Αφ'επείτα λοιπόν το χαμηλής απόδοσης κρίσιμο στάδιο της ενζυμικής αντίδρασης, αφ'ετέρου η μακροσκελής διαδικασία απόκτησης της οπτικά ενεργής πρόδρομης αλκοόλης **84**, οδήγησαν σε εύρεση εναλλακτικών πρόδρομων αλκοολών. Με σκοπό να δοκιμαστεί απευθείας η εκμετάλλευση της διαφοροποίησης του 4-OH με την προαναφερθείσα ενζυμική αποακετυλίωση μέσω της χρήσης του *Novozym 435*, πραγματοποιήθηκε ολική ακετυλίωση της 2-DOS και το υπερακετυλιωμένο παράγωγο **77** υποβλήθηκε σε περαιτέρω συνθήκες ενζυμικής αντίδρασης αποακετυλίωσης, χωρίς όμως το αποτέλεσμα να είναι τελέσφορο καθώς το αρχικό μόριο παρέμεινε ανέπαφο (Σχήμα 5.5).

Προχωρώντας στη σύνθεση μια ακόμα πρόδρομης αλκοόλης, της ρακεμικής **rac-91** επιλέξαμε ως αρχική ένωση την τριόλη **78** (Σχήμα 5.7). Με ακόλουθη χρήση αντιδραστηρίου 1,1-διμεθοξυ-κυκλοεξάνιο σχηματίστηκε η ρακεμική κυκλο-εξυλιδενοκετάλη **rac-85** και στη συνέχεια η ελεύθερη

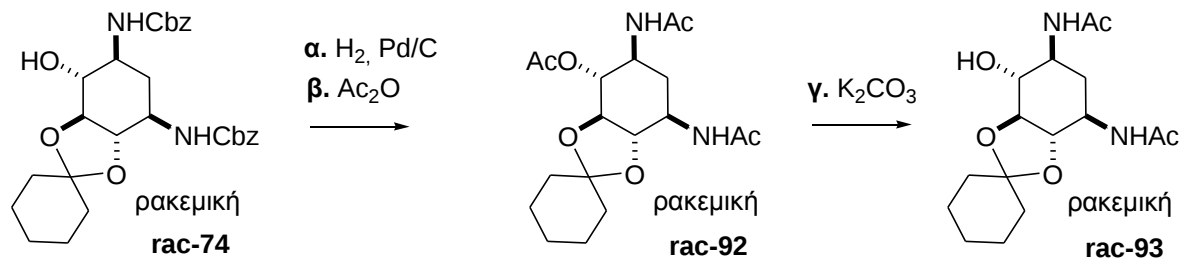
4-υδροξυλομάδα της **rac-85** αντέδρασε με π-μεθοξυ-βενζυλο-βρωμίδιο προς τον αντίστοιχο αιθέρα **rac-86**.

Όξινη υδρόλυση της κετάλης στο μόριο **rac-86** με μίγμα οξικού οξέος-νερού-τετραϋδροφουρανίου (3:3:1, v/v/v) και ακόλουθη προστασία των ελεύθερων πλέον υδροξυλομάδων της προκύπτουσας διόλης **rac-87** προς βενζυλαιθέρες με βενζυλο-βρωμίδιο, κατέληξαν στην ένωση **rac-88** (Σχήμα 5.7). Η προστασία των αμινομάδων ως ακεταμίδια συνέβη με διαδοχική αναγωγή Staudinger της ένωσης **rac-88** προς την αντίστοιχη διαμίνη **rac-89** και ακόλουθη προσθήκη οξικού ανυδρίτη, παράγοντας τελικά την ένωση **rac-90**. Στο πλήρες προστατευμένο μόριο **rac-90** η PMB-ομάδα απομακρύνθηκε με χρήση τριφθοροοξικού οξέος,¹⁴⁰ οδηγώντας τελικά στη ρακεμική αλκοόλη **rac-91**.



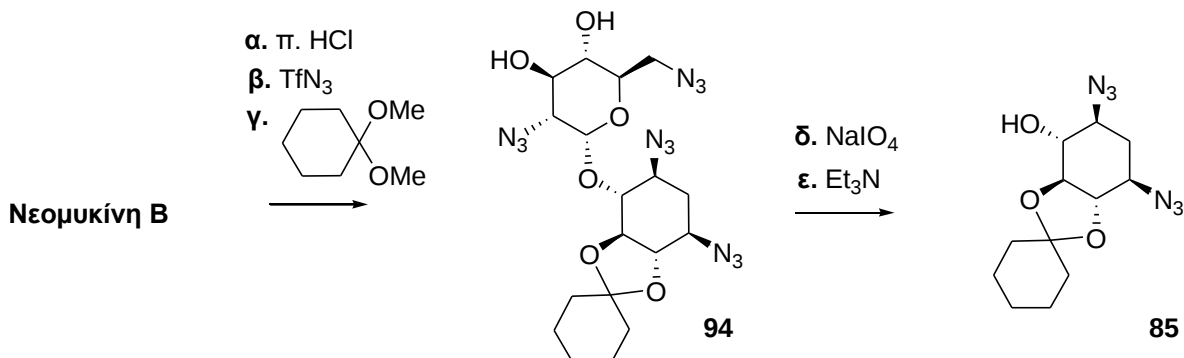
Σχήμα 5.7. Σύνθεση της ρακεμικής αλκοόλης **rac-91** από τη 2-DOS: (**α**) 1,1-διμεθοξυ-κυκλοεξάνιο (7.5 eq), *p*-TsOH (0.1 eq), άνυδρο DMF (0.08 M), 5 h, 50°C, 95%, (**β**) PMBBBr (1.5 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (1.5 eq), άνυδρο THF (0.8 M), 12 h, 0°C→25°C, (**γ**) THF / CH₃COOH / H₂O (3:3:1, v/v/v) (0.05 M), 12 h, 25°C, 80% (ή 48% σε 2 βήματα), (**δ**) BnBr (2.2 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (4.0 eq), άνυδρο DMF (0.1 M), 12 h, 0°C→25°C, 90%, (**ε**) διάλυμα PMe₃ (5.0 eq) σε THF 0.1 M, υδ. NaOH 0.1 M (0.05 eq), THF (0.1 M), 12 h, 25°C, (**στ**) CH₃COCl (3.0 eq), Et₃N (4.0 eq), άνυδρο CH₂Cl₂ (0.1 M), 2 h, 0°C→25°C, 70% σε 2 βήματα, (**ζ**) CF₃COOH (0.1 eq), CH₂Cl₂ (0.03 M), 20 min, 25°C, 95%.

Εν συνεχεία, προχωρήσαμε στη σύνθεση της αλκοόλης **rac-93** (Σχήμα 5.8). Με εφελτήριο τη ρακεμική αλκοόλη **rac-74** (Σχήμα 5.5), οι Cbz-ομάδες απομακρύνθηκαν με υδρογονόλυση και στη διαμίνη που ελήφθη έγινε ακετυλίωση των αμινομάδων και της 4-υδροξυλομάδας με οξικό ανυδρίτη προς το μόριο **rac-92**. Ο ακετυλο-εστέρας στη θέση 4 υδrolύθηκε εκλεκτικά με ανθρακικό κάλιο σε μεθανόλη, καταλήγοντας στην επιθυμητή ρακεμική αλκοόλη **rac-93**.



Σχήμα 5.8. Σύνθεση της ρακεμικής αλκοόλης **rac-93**: (α) H_2 , Pd ενεργοποιημένο σε C (10% κ.β.), άνδρη MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, (β) $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ (20.0 eq), πυριδίνη (περίσσεια), 12 h, 25°C, 81%, (γ) K_2CO_3 (4.0 eq), MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, 95%.

Η επόμενη πρόδρομη αλκοόλη που αποτέλεσε συνθετικό μας στόχο ήταν η οπτικά ενεργή μορφή της **85** (Σχήμα 5.9). Στο σχήμα 5.5 είδαμε ήδη ότι σε μόλις δύο βήματα από τη 2-DOS συνετέθη ως ενδιάμεσο μόριο η ρακεμική αλκοόλη **rac-85**. Με αφετηρία τη νεομυκίνη B λοιπόν εκμεταλλευτήκαμε την οπτική καθαρότητα που προσδίδει η ύπαρξη του σακχάρου το οποίο συνδέεται στο οξυγόνο της θέσης 4 του δακτυλίου της 2-DOS (Σχήμα 5.1) και σε μόλις τέσσερα βήματα συνθέσαμε την οπτικά ενεργή αλκοόλη **85**. Ουσιαστικά, το σάκχαρο της νεομυκίνης B έπαιξε το ρόλο της «φυσικής προστατευτικής ομάδας» και μάλιστα στο επίμαχο στερεογονικό κέντρο του άνθρακα-4, για να παραλάβουμε τελικά την επιθυμητή αλκοόλη **85** σε οπτικά καθαρή μορφή.



Σχήμα 5.9. Σύνθεση της οπτικά ενεργής αλκοόλης **85** από τη 2-DOS: (α) HCl 10.0 M (17.5 eq), MeOH (0.06 M), βρασμός με επαναροή, 6 h, 95%, (β) φρέσκο διάλυμα TfN_3 (12.3 eq) σε CH_2Cl_2 1.0M, διάλυμα $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.06 eq) σε MeOH / H_2O / Et_3N (3:3:4, v/v/v) (0.02 M), MeOH / H_2O (2:1, v/v) (0.02 M), 12 h, 25°C, 72%, (γ) 1,1-διμεθοξυ-2,2-κυκλοεξάνιο (10.0 eq), p -TsOH (0.15 eq), DMF (0.08 M), 12 h, 25°C, 58%, (δ) NaIO_4 (6.0 eq), MeOH (0.02 M), 12 h, 0°C→25°C, (ϵ) Et_3N (2.5 eq), MeOH (0.02 M), 12 h, 40°C, 90% σε 2 βήματα.

Έτσι, η νεομυκίνη B μετά από υδρόλυση με υδροχλώριο έδωσε σε πρώτη φάση το τετραϋδροχλωρικό άλας της νεαμίνης, στο οποίο πραγματοποιήθηκε αζιδίωση των ελεύθερων αμινομάδων του και ακολούθη εκλεκτική προστασία της 1,2-διόλης του δακτυλίου της 2-DOS προς κυκλο-εξυλιδενο-κετάλη παράγοντας τελικά την ένωση **94** (Σχήμα 5.9). Η περαιτέρω οξειδωτική

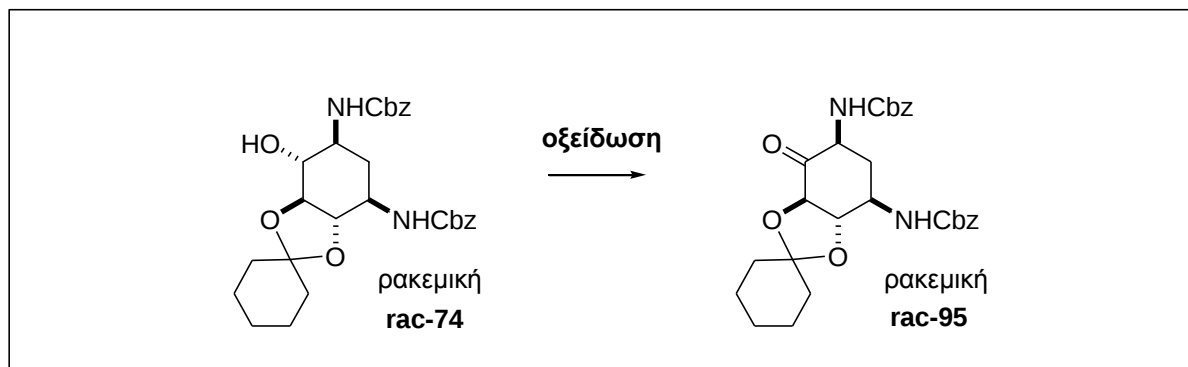
διάσπαση με υπεριοδικό νάτριο που υπέστη η **94** μετέτρεψε τη διόλη του σακχαρικού τμήματος προς την αντίστοιχη διαλδεύδη, ως εκ τούτου η εν συνεχεία προστιθέμενη τριαιθυλαμίνη μπόρεσε να προκαλέσει διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού, οδηγώντας τελικά στην οπτικά ενεργή αλκοόλη **85**.

5.2.4. Σύνθεση πρόδρομων κετονών

Αφού πραγματοποιήσαμε τη σύνθεση πρόδρομων αλκοολών, επόμενο βήμα ήταν η οξείδωσή τους ούτως ώστε να παραληφθούν οι σημαντικές για τη σύνθεση των σπироενώσεων πρόδρομες κετόνες.

Η ρακεμική αλκοόλη **rac-74** (Σχήμα 5.5) οξειδώθηκε με αντιδραστήριο Dess-Martin προς την αντίστοιχη κετόνη **rac-95** σε υψηλή απόδοση. Οι διάφορες συνθήκες οξείδωσης της αλκοόλης **rac-74** που δοκιμάστηκαν μέχρι να βρεθούν οι βέλτιστες, φαίνονται στον Πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1. Συνθήκες οξείδωσης της ρακεμικής αλκοόλης **rac-74** προς την κετόνη **rac-95**.

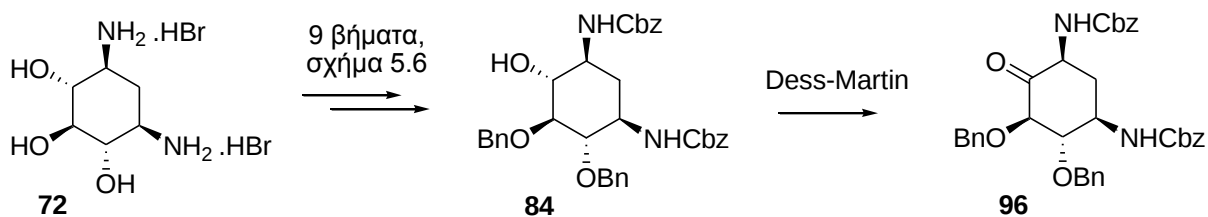


Πείραμα	Αντιδραστήρια	Συνθήκες Οξείδωσης	Απόδοση (%)
1	SO ₃ .Py (10eq) DMSO (12eq) Et ₃ N (6eq)	ξηρό CH ₂ Cl ₂ (0.066M) 0°C-βρασμός με επαναροή 48 h	0% (αποσύνθεση)
2	Dess-Martin (4eq) NaHCO ₃ (6eq)	CH ₂ Cl ₂ (0.066M) θερμοκρασία δωματίου 7 h	0% (αρχική ένωση)
3	Dess-Martin (4eq) NaHCO ₃ (6eq)	CH ₂ Cl ₂ (0.066M) βρασμός με επαναροή 1 h	90%

Αρχικά, δοκιμάστηκε ανεπιτυχώς η σχετικά ήπια οξείδωση Parikh-Doering¹⁴¹ όπου το ρόλο του οξειδωτικού έχει το διμεθυλοσουλφοξείδιο, όντας ενεργοποιημένο από το σύμπλοκο τριοξείδιο του θείου-πυριδίνη παρουσία τριαιθυλαμίνης (Πίνακας 5.1). Εν συνεχεία, επιχειρήθηκε η οξείδωση της αλκοόλης **rac-74** με οξειδωτικό Dess-Martin^{142,143} παρουσία βάσης όξινου ανθρακικού νατρίου,¹⁴⁴ που όμως άφησε ανέπαφη την αρχική ένωση. Τελικά, ο σχηματισμός της κετόνης **rac-95** επετεύχθει με δραστηκότερες συνθήκες σε συνδυασμό με μικρότερο χρόνο αντίδρασης, τουτ'έστιν αρκετή

περίσσεια ισοδυνάμων οξειδωτικού αντιδραστηρίου Dess-Martin (4 eq) σε υψηλή θερμοκρασία αντίδρασης (βρασμός με επαναρροή) για μόλις 1 h.

Επόμενη κετόνη που παρήχθη ήταν η **96** (Σχήμα 5.10) που προήλθε από την οξείδωση της οπτικά ενεργής αλκοόλης **84** (Σχήμα 5.6). Οι συνθήκες οξείδωσης που χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό της κετόνης **96** ήταν οι ίδιες με αυτές που βρέθηκαν προηγουμένως κατά τη διερεύνηση της οξείδωσης της αλκοόλης **rac-74**. Σε αμφότερες τις αλκοόλες της 2-DOS φάνηκε ότι χρειαζόταν περίσσεια οξειδωτικού αντιδραστηρίου Dess-Martin για να καταλήξουν στις επιθυμητές αντίστοιχες κετόνες.



Σχήμα 5.10. Οξείδωση της οπτικά ενεργής αλκοόλης **84** προς την κετόνη **96**: DMP (4.0 eq), NaHCO_3 (5.0 eq), CH_2Cl_2 (0.1 M), 2.5 h, 25°C, 95%.

5.2.5. Σύνθεση πρόδρομων διενόφιλων με αντίδραση Wittig

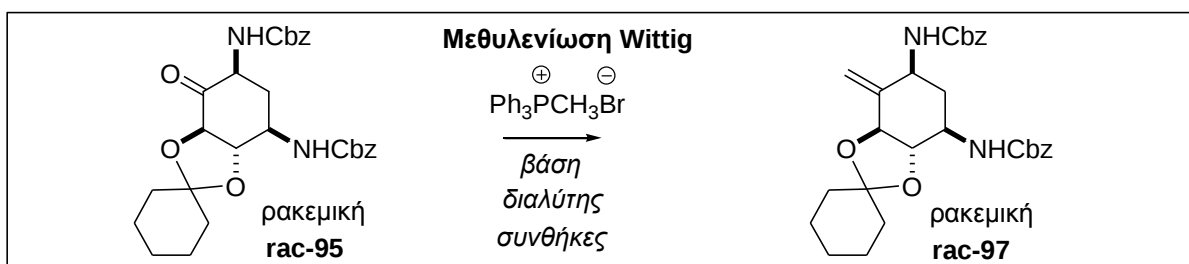
Έχοντας στα χέρια μας τη ρακεμική κετόνη **rac-95** με εύκολο τρόπο παρασκευής, μπορέσαμε να διερευνήσουμε καλύτερα την αντίδραση Wittig (Πίνακας 5.2). Μία από τις απορίες που προέκυψαν κατά τα πειράματα μεθυλενίωσης ήταν η χαμηλή απόδοση αντίδρασης σε αντιδιαστολή με την ολοκληρωτική κατανάλωση της αρχικής κετόνης. Η εξήγηση για αυτό το αποτέλεσμα δόθηκε από την παρατήρηση του σχηματισμού βενζυλικής αλκοόλης.

Η μηχανιστική υπόθεση που έγινε αφορούσε σε μια ενδομοριακή κυκλοποίηση / απόσπαση της Cbz-ομάδας, όπου το ενεργοποιημένο υλίδιο δρώντας ως πυρηνόφιλο προσέβαλε την κετόνη και το σχηματισθέν οξυανιόν έκλεινε πενταμελή δακτύλιο με το γειτονικό καρβονύλιο, μετά από απόσπαση της βενζυλο-ομάδας. Υποθέτοντας τον προαναφερθέντα μηχανισμό, εκλογικεύθηκε το μόνιμα παρατηρηθέν παραπροϊόν της βενζυλικής αλκοόλης κατά την αντίδραση Wittig της κετόνης.

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 5.2, οι συνθήκες που έπαιξαν κρίσιμο ρόλο στην επιτυχία της αντίδρασης μεθυλενίωσης ήταν αρκετές:

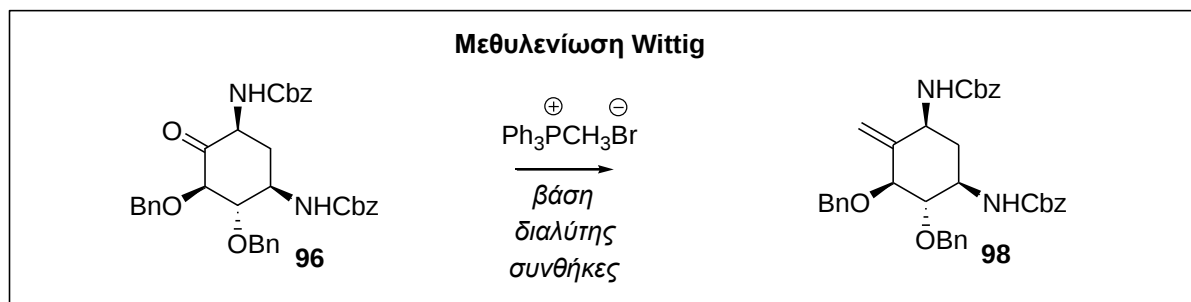
- 1) ο τύπος της βάσης κατά το σχηματισμό του ενεργού υλιδίου,
- 2) τα ισοδύναμα του ενεργού υλιδίου (τα λιγότερα ήταν πιο αποτελεσματικά),
- 3) η σειρά της προσθήκης του ενεργοποιημένου υλιδίου και της κετόνης (η αντίστροφη προσθήκη υπερείχε, δηλαδή η προσθήκη του ενεργοποιημένου υλιδίου στην κετόνη),
- 4) η θερμοκρασία κατά την προσθήκη του ενεργοποιημένου υλιδίου στο διάλυμα της κετόνης και
- 5) ο διαλύτης της αντίδρασης (το άνυδρο THF επέδειξε καλύτερα αποτελέσματα).

Πίνακας 5.2. Συνθήκες μεθυλενίωσης Wittig της ρακεμικής κετόνης **rac-95** προς την ολεφίνη **rac-97**: **(α)** Προσθήκη διαλύματος της **rac-95** σε άνυδρο THF σε διάλυμα του $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$ σε άνυδρο THF (0°C , 5 min). **(β)** Προσθήκη διαλύματος του $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$ σε άνυδρο THF σε διάλυμα της **rac-95** σε άνυδρο THF (0°C , 1 h). **(γ)** Προσθήκη διαλύματος του $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$ σε άνυδρο THF σε διάλυμα της **rac-95** σε άνυδρο THF (rt, 1 h). **(δ)** Προσθήκη διαλύματος του $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$ σε άνυδρο τολουόλιο σε διάλυμα της **rac-95** σε άνυδρο τολουόλιο (0°C , 5 min). **(ε)** Προσθήκη διαλύματος του $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$ σε άνυδρο THF σε διάλυμα της **rac-95** σε άνυδρο THF (0°C , 30 min). **(στ)** Προσθήκη διαλύματος του $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$ σε άνυδρο THF σε διάλυμα της ρακεμικής κετόνης **95** σε άνυδρο THF (0°C , 5 min).



Πείραμα	Άλας υλιδίου (eq)	Τύπος βάσης	Βάση (eq)	Διαλύτης	Συνθήκες μεθυλενίωσης	Απόδοση (%)
1	7.0eq	NaHMDS	6.75eq	άνυδρο THF	0°C -rt, 24h, (α)	χαμηλή
2	5.0eq	n-BuLi	4.75eq	άνυδρο THF	0°C -rt, 24h, (α)	χαμηλή
3	1.2eq	NaHMDS	1.0eq	άνυδρο THF	0°C -rt, 100min, (α)	29%
4	2.1eq	NaHMDS	2.0eq	άνυδρο THF	0°C -rt, 24h, (β)	40%
5	1.2eq	NaHMDS	1.1eq	άνυδρο THF	0°C -rt, 24h, (β)	44%
6	1.5eq	NaHMDS	1.3eq	άνυδρο THF	0°C -rt, 1.5h, (β)	39%
7	1.2eq	NaHMDS	1.1eq	άνυδρο THF	rt, 6h, (γ)	χαμηλή
8	2.0eq	NaNH_2	1.9eq	άνυδρο Tol	0°C -rt, 24h, (δ)	0%
9	1.2eq	NaHMDS	1.1eq	άνυδρο THF	0°C -rt, 3h, (ε)	0%
10	1.5eq	NaHMDS	1.4eq	άνυδρο THF	-70°C -rt, 24h, (ε)	0%
11	1.2eq	LiHMDS	1.1eq	άνυδρο THF	0°C -rt, 24h, (ε)	μίγμα rac-97 / BnOH
12	1.5eq	LiHMDS	1.4eq	άνυδρο Tol	0°C -rt, 24h, (β)	μίγμα rac-97 / BnOH
13	1.5eq	LiHMDS	1.4eq	HMPA (3eq) άνυδρο THF	0°C -rt, 5h, (στ)	0%

Πίνακας 5.3. Συνθήκες μεθυλενίωσης Wittig: Προσθήκη διαλύματος της κετόνης **96** σε άνυδρο THF σε διάλυμα του ενεργοποιημένου υλιδίου σε άνυδρο THF στους 0°C. Χρόνος αντίδρασης: 24 h. **(α)** Όταν χρησιμοποιήθηκε LiBr (1eq) δεν παρατηρήθηκε το προϊόν **98**.



Βάση (τύπος)	<i>n</i> -BuLi			<i>t</i> -BuOK	NaHMDS	LiHMDS
Βάση (eq)	4.75	6.75	12.7	6.95	6.75	6.75
Άλας υλιδίου (eq)	5.0	7.0	12.75	7.0	7.0	7.0
Απόδοση (%)	33%	35%	-	-	40%	27% (α)

Για τη μετατροπή της κετόνης **96** στην αντίστοιχη ολεφίνη **98**, πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές αντιδράσεις μεθυλενίωσης τύπου Wittig (Πίνακας 5.3). Το ενεργοποιημένο υλίδιο παρασκευάστηκε με τριφαινυλο-μεθυλο-φωσφορανοβρωμίδιο και ισχυρές βάσεις, όπως *n*-BuLi,¹⁴⁵ *t*-BuOK,¹⁴⁶ NaHMDS¹⁴⁷ και LiHMDS,¹⁴⁸ με σκοπό να βελτιστοποιηθεί η απόδοση της αντίδρασης. Διαφοροποιώντας τις συνθήκες της αντίδρασης, ιδίως τα ισοδύναμα του υλιδίου και της βάσης, την καλύτερη απόδοση έδωσε το NaHMDS (40%). Επίσης, εικάστηκε ότι το αντισταθμιστικό κατιόν της χρησιμοποιούμενης βάσης είχε κρίσιμο ρόλο στη μεταβατική κατάσταση της αντίδρασης Wittig. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η υπόθεση ότι η περίσσεια του κατιόντος λιθίου επιτάχυνε την αντίδραση. Έτσι, πραγματοποιήθηκε προσθήκη του άλατος βρωμιούχου λιθίου (LiBr) με προσδοκία να βελτιώσει την απόδοση της αντίδρασης μεθυλενίωσης, χωρίς όμως τελικά να επιφέρει καν το σχηματισμό της επιθυμητής ολεφίνης **98** (Πίνακας 5.3).

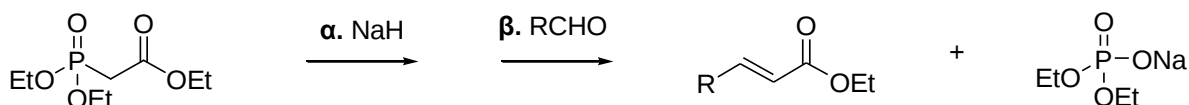
Με σκοπό τη βελτιστοποίηση της χαμηλής απόδοσης της αντίδρασης Wittig (40%), αναζητήθηκαν εναλλακτικοί τρόποι σχηματισμού του αλκενίου **98** από την κετόνη **96**. Το 2005 η ερευνητική ομάδα του Θεοδωράκη¹⁴⁹ ανέφερε τη μεθυλενίωση μιας ιδιαίτερα παρεμποδισμένης κετόνης με οργανομεταλλική προσθήκη (MeLi, DME / THF 3:1) και επακόλουθη απόσπαση (SOCl₂, Pyr). Έτσι, έγινε προσπάθεια να εφαρμοστεί αυτό το πρωτόκολλο στην κετόνη **96** ώστε να σχηματιστεί η αντίστοιχη τριτοταγής αλκοόλη, αλλά δεν ευοδόθηκε οδηγώντας σε αποπροστασία της Cbz-ομάδας. Επίσης, δοκιμάστηκε μια ακόμη εναλλακτική μεθυλενίωση της κετόνης **96** με χρήση του αντιδραστήριου Petasis,^{150,151} χωρίς όμως το επιθυμητό αποτέλεσμα λόγω απόσπασης και πάλι της Cbz-ομάδας.

Συνοψίζοντας λοιπόν, είδαμε ότι η βελτιστοποίηση της απόδοσης της αντίδρασης μεθυλενίωσης έφτασε μόλις το 44% (Πίνακας 5.2). Μια μελέτη μεθυλενίωσης σε απλούστερες μεν κετόνες της **rac-95**, που όμως την προσομοιάζουν, έδειξε ότι η αντίδραση Wittig είχε τις υψηλότερες αποδόσεις συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους μεθυλενίωσης. Πιθανότατα λοιπόν το πρόβλημα της χαμηλής απόδοσης στην περίπτωση μας να οφείλεται στη στερεοχημικά παρεμποδισμένη δομή των κετονών της 2-DOS, **rac-95** και **rac-96**. Έτσι, αναζητήθηκε νέα, αποτελεσματικότερη και υψηλότερης απόδοσης συνθετική οδός για να οδηγήσει σε νέα διενόφιλα που θα χρησιμοποιούνταν στην αντίδραση Diels-Alder.

5.2.6. Σύνθεση πρόδρομων διενοφίλων με αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons

Η αντίδραση ολεφινίωσης Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) αποτέλεσε μία πιθανότατα καλύτερα προσβάσιμη εναλλακτική συνθετική οδό κατάλληλων πρόδρομων διενοφίλων, σε σχέση με τη μεθυλενίωση Wittig που μελετήσαμε πρωτύτερα. Συν τοις άλλοις, η χρήση της HWE θα μπορούσε να μας δώσει την πρόσβαση σε ενεργοποιημένα διενόφιλα, δηλαδή ο διπλός δεσμός να φέρει ηλεκτρονιοελκτικές ομάδες.

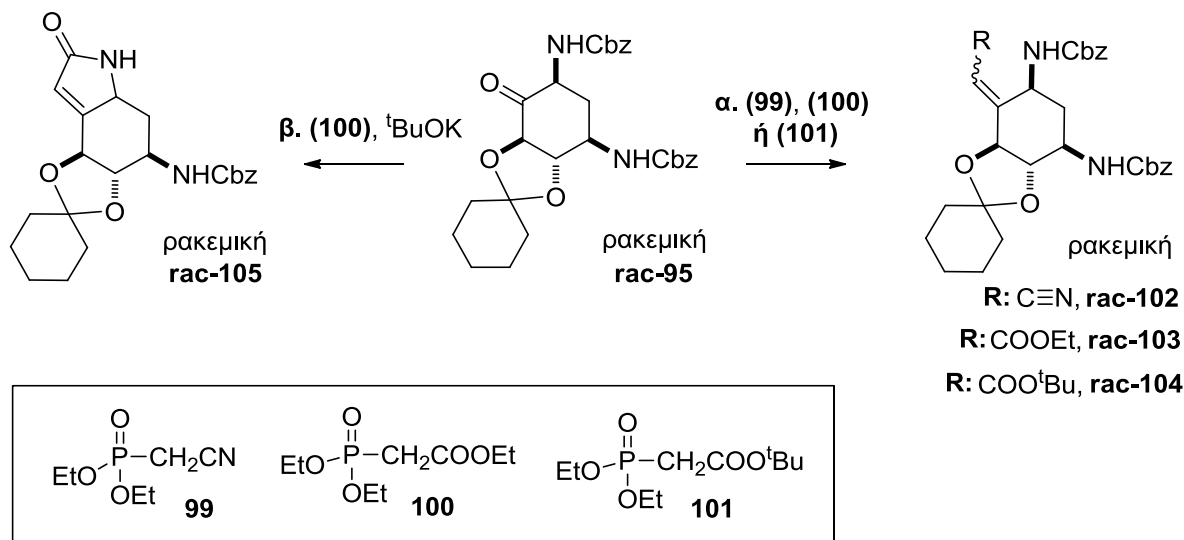
Με πρωτοπόρο τον Horner το 1958^{152,153} και εν συνεχεία τους Wadsworth και Emmons,^{154,155} εισήχθη ένα νέο είδος αντίδρασης ολεφινίωσης που πλεονεκτούσε έναντι της αντίδρασης Wittig στα εξής σημεία: **α)** τα υλίδια φωσφόρου είχαν αντικατασταθεί από σταθεροποιημένα φωσφονιακά καρβανιόντα, τα οποία είχαν περισσότερο πυρηνόφιλο αλλά λιγότερο βασικό χαρακτήρα οπότε αλκυλιώνονταν ευκολότερα, **β)** το παραπροϊόν της αντίδρασης HWE (διαλκυλοφωσφονικό άλας, σχήμα 5.11) απομακρυνόταν ευκολότερα από το αντίστοιχο παραπροϊόν της Wittig με απλή έκλυση με νερό. Συγκεκριμένα, η αντίδραση HWE αφορά σε πυρηνόφιλη προσθήκη σταθεροποιημένων φωσφονικών καρβανιόντων σε αλδεΐδες ή κετόνες και ακόλουθη απόσπαση προς τελικό σχηματισμό αλκενίων με υψηλή *E*-στερεοεκλεκτικότητα (Σχήμα 5.11).



Σχήμα 5.11. Αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) φωσφονιακού υλιδίου με αλδεΐδη.

Έχοντας λοιπόν σαν εφελτήριο τη ρακεμική κετόνη **rac-95**, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις HWE με ποικιλία φωσφονιακών υλιδίων (Σχήμα 5.12). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ήταν αποπρωτονίωση του αντίστοιχου φωσφονιακού υλιδίου με βάση και ακόλουθη προσθήκη διαλύματος της κετόνης **rac-95** στο άρτι σχηματισθέν φωσφονιακό καρβανιόν.¹⁵⁶ Τα διενόφιλα **rac-102**, **rac-103**, **rac-104** και **rac-105** που παρήχθησαν με τη HWE, καθώς επίσης και τα διενόφιλα **rac-97** και **rac-98** (Πίνακας 5.4), δοκιμάστηκαν σε αντίδραση Diels-Alder με ποικιλία διενίων και γενικότερων συνθηκών (Πίνακας 5.5) (θέρμανση στους 120°C σε αυτόκλειστο, ZnCl_2 σε

CH₂Cl₂ στους 0°C, BF₃·OEt₂ σε τολουόλιο στους -70°C, AlMe₃Cl σε τολουόλιο στους 0°C, σε νερό στους 50°C), χωρίς όμως να ευδοθεί καμία προσπάθεια πιθανότατα λόγω αδυναμίας του διενίου να προσεγγίσει το στερεοχημικά παρεμποδισμένο διενόφιλο. Στην εν λόγω διερεύνηση η συμβολή του Δρ. Γιάννη Κατσούλη ήταν ουσιαστική.

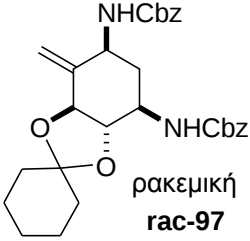
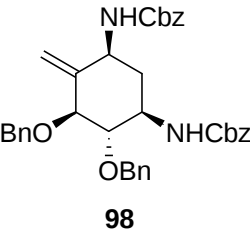
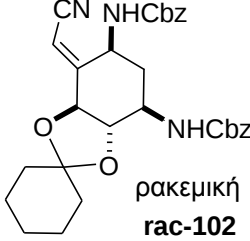
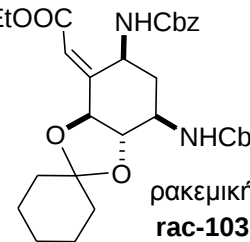
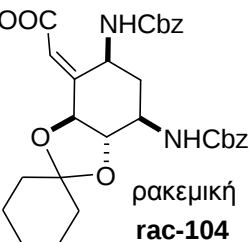
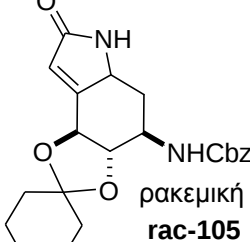


Σχήμα 5.12. Σύνθεση διενόφιλων με αντίδραση Horner-Wadsworth-Emmons από την πρόδρομη κετόνη **rac-95**: (α) **99** (3.1 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (3.0 eq), άνυδρο THF (0.07 M), 12 h, 0°C→25°C, 63% για το **rac-102**, ή **100** (3.2 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (3.1 eq), άνυδρο THF (0.04 M), 4 h, -75°C→-55°C, 44% για το **rac-103**, ή **101** (3.5 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (3.1 eq), άνυδρο THF (0.05 M), 12 h, 0°C→25°C, 57% για το **rac-104**, (β) **100** (3.2 eq), *t*-BuOK (3.0 eq), άνυδρο THF (0.04 M), 80 min, -80°C→-55°C, 82% για το **rac-105**.

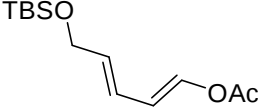
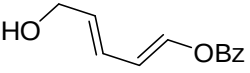
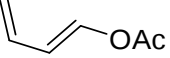
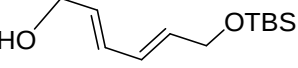
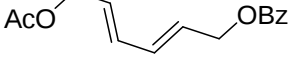
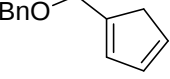
Πρέπει να σημειωθεί ότι σε κάθε μία από τις συγκεκριμένες αντιδράσεις HWE απομονώθηκε μόνο ένα ισομερές (όπως διαπιστώσαμε με τη φασματοσκοπία ¹H-NMR και ¹³C-NMR), το οποίο αναμένεται να είναι το εκάστοτε θερμοδυναμικά σταθερότερο προϊόν. Εδώ ο σχεδιασμός της δομής των προϊόντων στα σχήματα (Σχήμα 5.12, Πίνακας 5.4) είναι με *E*-στερεοχημεία, καθώς όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η HWE οδηγεί κυρίως σε *E*-προϊόντα. Εκτός του θεωρητικού υποβάθρου όμως, είχαμε και περαιτέρω ενδείξεις προς αυτήν τη στερεοχημεία, καθώς η αντίδραση για το δικυκλικό **rac-105**, το οποίο έχει «κλειδωμένη» *E*-στερεοχημεία, είναι υψηλής απόδοσης (82%). Ωστόσο, δεν προχωρήσαμε σε περαιτέρω εξακρίβωση της δομής, λόγω της αδυναμίας της αντίδρασης Diels-Alder να οδηγήσει τελικά στις σπироκαρβοκυκλικές ενώσεις-στόχους (Σχήμα 5.3).

Συνεπώς, οι συνθετικές προσπάθειες σπироκυκλικών μορίων στράφηκαν αποκλειστικά πλέον στους σπироαιθέρες (Σχήμα 5.4) και καρποφόρησαν με τη χρήση αφ' ενός της πρόδρομης κετόνης **rac-95** ως υψίστης σημασίας ενδιάμεσο, εφ' ετέρου της αντίδρασης ολεφινικής μετάθεσης για την κυκλοποίηση. Η πορεία αυτή αφορά στην ερευνητική εργασία του υποψήφιου διδάκτορα κ. Γιάννη Μαυρίδη στο εργαστήριο Χημικής Βιολογίας του Δρ. Δ. Βουρλούμη.^{157,158,159}

Πίνακας 5.4. Διενόφιλα που δοκιμάστηκαν στην αντίδραση Diels-Alder.

 ρακεμική rac-97	 98	 ρακεμική rac-102
 ρακεμική rac-103	 ρακεμική rac-104	 ρακεμική rac-105

Πίνακας 5.5. Διένια, διενόφιλα και συνθήκες που δοκιμάστηκαν στην αντίδραση Diels-Alder.

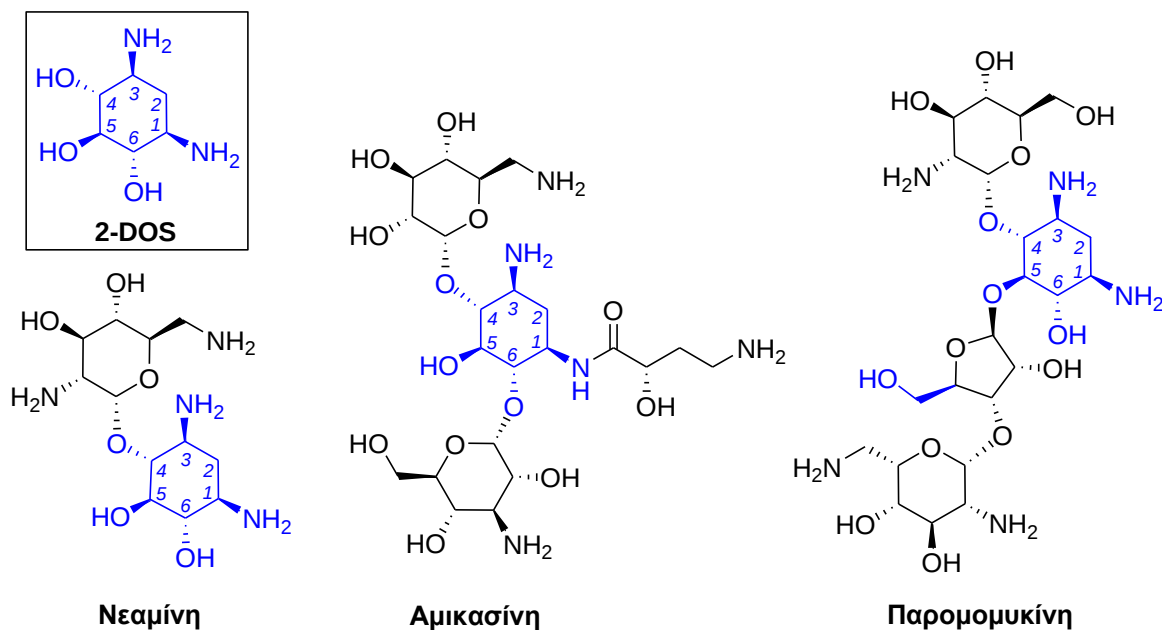
Διένιο	Διενόφιλο	Συνθήκες
	rac-97, 98, rac-102, rac-103, rac-105	Tol, βρασμός με επαναρροή, 24 h
	rac-103	ZnCl ₂ (3eq), CH ₂ Cl ₂ , 0 °C, 3 h
	rac-103	BF ₃ OEt ₂ (3eq), Tol, -85 °C, 10 min
	rac-103	Me ₃ Al (3eq), Tol, -85 °C, 24 h
	rac-103	Me ₂ AlCl (3eq), Tol, -85 °C → 70° C, 24 h
	rac-97, 98	Tol, βρασμός με επαναρροή, 24 h
	rac-97, rac-103, rac-105	Tol, βρασμός με επαναρροή, 24 h
	rac-102	Tol, βρασμός με επαναρροή, 24 h
	rac-102	Me ₂ AlCl (3eq), Tol, -85 °C → rt, 24 h
	rac-102, rac-104	H ₂ O, 50° C, 24 h
	rac-102, rac 104	Tol, βρασμός με επαναρροή, 24 h
	rac-102, rac-104	BF ₃ OEt ₂ (3eq), Tol, -78 → -65 °C, 40 min
	rac-102, rac-104	Tol, βρασμός με επαναρροή, 24 h

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Εφαρμογή ορθογωνικών στρατηγικών στη σύνθεση αντιπροσωπευτικών νέων αναλόγων της 2-DOS: μονο- και δι-υποκατεστημένα παράγωγα, οξαζολιδινόνες

6.1. Εισαγωγή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο υποκεφάλαιο 3.5, παρατηρώντας τα γνωστά αντιβιοτικά των αμινογλυκοζιτών καθίσταται σαφές ότι έχουν κοινό σημείο τον κυκλοεξανικό σκελετό της 2-δεοξυστρεπταμίνης (2-DOS). Μάλιστα η νεαμίνη, η παρομομυκίνη, η αμικασίνη θα μπορούσαν να θεωρηθούν μονο-, δι- ή τρι-υποκατεστημένα παράγωγα της 2-DOS, αντιστοίχως (Σχήμα 6.1).



Σχήμα 6.1. Φυσικά προϊόντα αμινογλυκοζιτών: 2-δεοξυστρεπταμίνη ή 2-DOS (σκελετός αμινογλυκοζιτικών αντιβιοτικών), παρομομυκίνη (φυσικός αμινογλυκοζίτης, 4,5-διυποκατεστημένο παράγωγο της 2-DOS), αμικασίνη (ημισυνθετικός αμινογλυκοζίτης, 1,4,6-τριυποκατεστημένο παράγωγο της 2-DOS), νεαμίνη (το μικρότερο δομικό τμήμα των αμινογλυκοζιτών με βιολογική δραστικότητα, 4-μονοϋποκατεστημένο παράγωγο της 2-DOS).

Η προηγούμενη παρατήρηση σε συνδυασμό με τη βιβλιογραφική απουσία ορθογωνικών παραγώγων της 2-DOS, έστρεψε το ερευνητικό μας ενδιαφέρον στη σύνθεση νέων παραγώγων αμινογλυκοζιτών που μιμούνται τη δράση των φυσικών προϊόντων, αλλά διατηρούν ως κεντρική δομή τη 2-DOS με χρήση μιας ορθογωνικής στρατηγικής. Έχοντας αναπτύξει ορισμένες ορθογωνικές στρατηγικές στο κεφάλαιο 5, θελήσαμε να τις επεκτείνουμε και να τις εφαρμόσουμε, με σκοπό να συνθέσουμε αντιπροσωπευτικά ανάλογα της 2-DOS με μονο- και δι- υποκατάσταση.

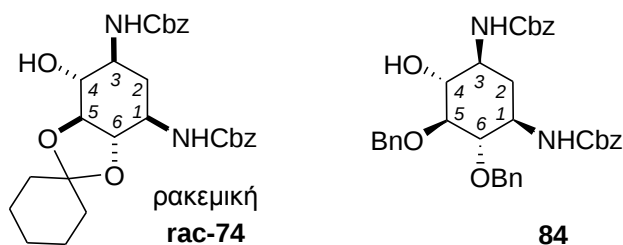
Επιπροσθέτως, εισήχθη η δομή των οξαζολιδινονών αφ' ενός για να εξυπηρετήσει την επίτευξη ορθογωνικότητας στο μόριο της 2-DOS, αφ' ετέρου γιατί είναι μια γνωστή φαρμακοφόρος δομή.¹⁶⁰ Παράλληλα, το σκεπτικό ανάπτυξης μιας ορθογωνικής προσέγγισης θα εξυπηρετούσε και στη δημιουργία παραγώγων των σπироαιθέρων που αναφέραμε στο κεφάλαιο 5, οπότε θα υπήρχε σαφέστερη εικόνα δομής-δραστικότητας.¹⁵⁷

6.2. Σύνθεση

Ιδανικό στόχο αποτελεί ένα μόριο 2-DOS που θα είχε πλήρως διαφοροποιημένες τόσο τις δύο αμινομάδες του, όσο και τις τρεις υδροξυλομάδες του. Για αυτόν το λόγο, με βάση κάποιες βιβλιογραφικές αναφορές¹⁶¹ ξεκίνησε μια διερεύνηση πλήθους προστατευτικών ομάδων, ώστε να επιτευχθεί ο κατάλληλος συνδυασμός που θα οδηγούσε σε ορθογωνικά παράγωγα της 2-DOS.

6.2.1. Σύνθεση εύκαμπτων αναλόγων με χρήση ορθογωνικών προστατευτικών ομάδων

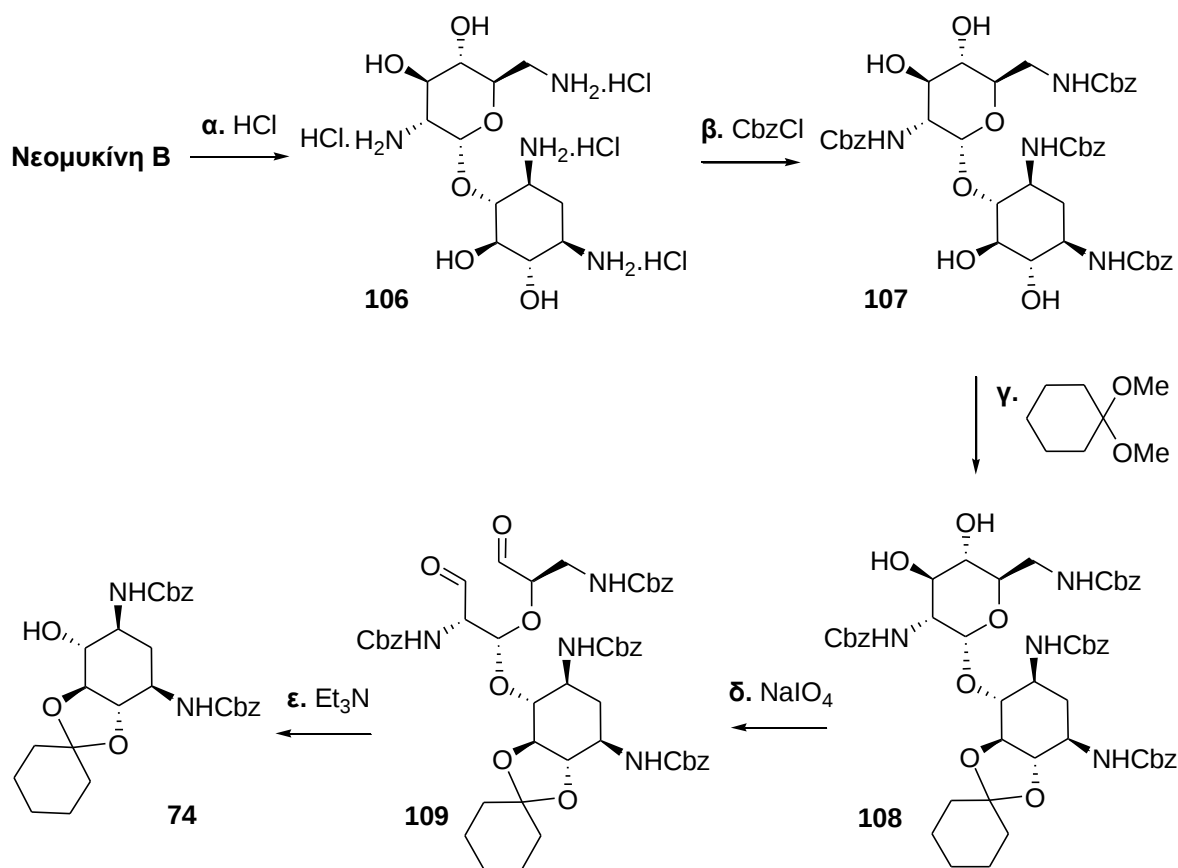
Βάσει προϋπαρχόντων βιβλιογραφικών δεδομένων και πρότερης εμπειρίας στο ζήτημα της προστασίας,¹⁶¹ μια ποικιλία προστατευτικών ομάδων εξετάστηκε σε χειρόμορφη και μη χειρόμορφη προσέγγιση, όπως ήδη αναφέρθηκε εν μέρει στο προηγούμενο κεφάλαιο 5. Από τα κυριότερα μόρια που συντέθηκαν σε υψηλή απόδοση ήταν η αλκοόλη **84** που είχε υψηλή οπτική καθαρότητα με τη χρήση ενζύμων, καθώς και η ρακεμική αλκοόλη **rac-74** (Σχήμα 6.2).



Σχήμα 6.2. Αλκοόλες με κατάλληλη προστασία της 2-DOS ως χρήσιμα συνθετικά ενδιάμεσα: η ρακεμική **rac-74** και η οπτικά ενεργή **84** (συνθετικά σχήματα 5.5 και 5.6 αντιστοίχως, κεφάλαιο 5).

Η μελέτη αυτών των ενώσεων οδήγησε στην ανάπτυξη μιας καλύτερης στρατηγικής ως προς την προστασία. Συγκεκριμένα, για την N-προστασία η επιλογή των αζιδίων ως προστατευτικών ομάδων είχε περιορισμούς σε προχωρημένα στάδια της σύνθεσης, ενώ η ακετυλίωση ήταν μια καλή επιλογή προστασίας μόνο όμως εφόσον ήταν εφικτό να εφαρμοστούν στο προκύπτον μόριο ισχυρά βασικές συνθήκες για την τελική αποπροστασία των ακετυλομαδών. Όσον αφορά στην προστασία του υδροξυλίου, η μετατροπή του σε οξικό εστέρα αποκλείστηκε λόγω της μεταναστευτικής τάσης αυτών των εστέρων, ενώ η επιλογή του βενζυλαιθέρα ήταν ικανοποιητική.

Έτσι, το σκεπτικό της ορθογωνικότητας θα ήταν καλό να δομηθεί σε διττή βάση: αφ' ενός στην προσεκτική επιλογή προστατευτικών ομάδων, αφ' ετέρου στην εκμετάλλευση της ύπαρξης φυσικής χειρικομορφίας στους αμινογλυκοζίτες, ούτως ώστε να αποφευχθεί περαιτέρω η αναγκαιότητα διαχωρισμού εναντιομερών (είτε με ένζυμα, είτε με χειρόμορφες βοηθητικές ομάδες). Γι' αυτό παρασκευάστηκε με αρκετή ευκολία η οπτικά καθαρή αλκοόλη **74** (Σχήμα 6.3) από την εμπορικά διαθέσιμη φυσική νεομυκίνη, με συνολική απόδοση 36% (η ρακεμική είχε παρασκευαστεί στο Κεφάλαιο 1, σχήμα 5.5).

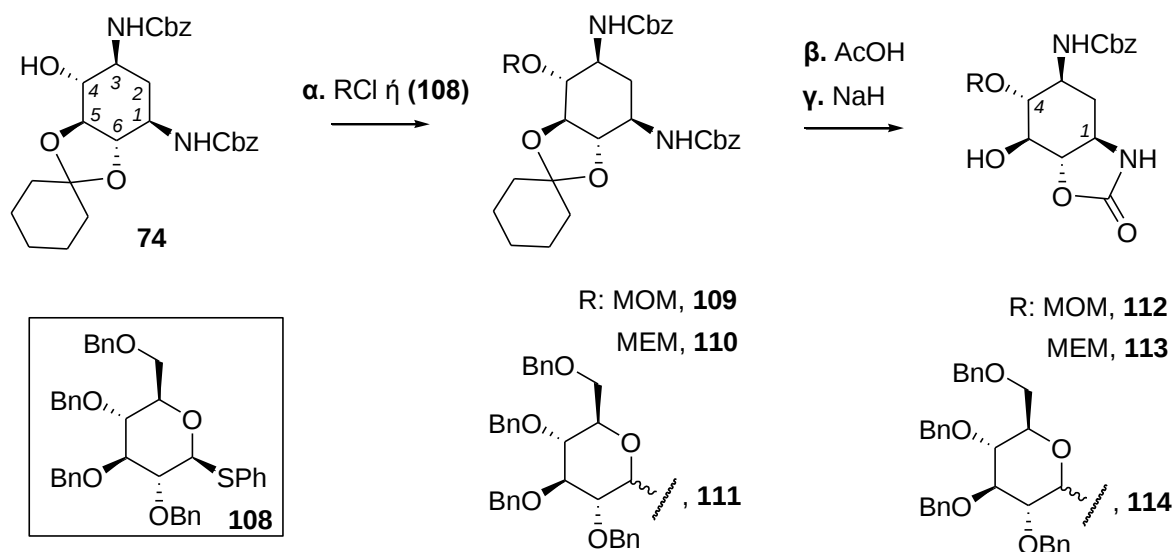


Σχήμα 6.3. Σύνθεση της οπτικά ενεργής αλκοόλης **74**: (α) υδ. HCl (10.0 M) (17.5 eq), MeOH (0.055 M), 6 h, βρασμός με επαναροή, 95%, (β) CbzCl (7.5 eq), NaHCO₃ (17.0 eq), H₂O / 1,4-διοξάνιο (2:1, v/v), 12 h, 0°C→25°C, 97% (γ) 1,1-διμεθοξυ-κυκλοεξάνιο (7.5 eq), p-TsOH (0.1 eq), DMF (0.08

M), 5 h, 50°C, 98%, (**δ**) NaIO₄ (6.0 eq), MeOH (0.012 M), 14 h, 0°C→25°C, (**ε**) Et₃N (2.5 eq), MeOH (0.014 M), 12 h, 40°C, 94% σε 2 βήματα.

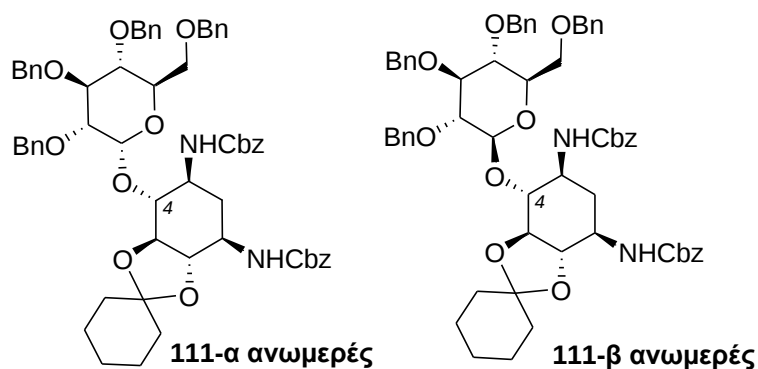
Για την παρασκευή της **74** αρχικά η νεομυκίνη B υδρολύθηκε προς το υδροχλωρικό άλας της νεαμίνης (**106**) (Σχήμα 6.3). Μετά, οι ελεύθερες αμινομάδες του άλατος **106** προστατεύτηκαν με καρβοβενζοξυλχωρίδιο οδηγώντας στην ένωση **107** και πραγματοποιήθηκε θερμοδυναμικά ελεγχόμενη κεταλοποίηση με 1,1-διμεθοξυ-κυκλοεξάνιο παρουσία όξινου καταλύτη στη διόλη μόνο του κυκλοεξανικού δακτυλίου. Η ακόλουθη οξειδωτική διάσπαση με υπεριοδικό νάτριο της διόλης του σακχάρου στην ένωση **108** προς τη διαλδεύδη **109** και η τελική διάσπαση του γλυκοζιτικού δεσμού με τριαιθυλαμίνη, οδήγησαν στην επιθυμητή οπτικά ενεργή αλκοόλη **74**.

Στα πλαίσια της διερεύνησης της ορθογωνικότητας, εξετάστηκε διεξοδικά η προστασία του 4-υδροξυλίου στην αλκοόλη **74** (Σχήμα 6.4). Η μετατροπή της 4-υδροξυλομάδας, είτε στον αντίστοιχο βενζυλαιθέρα είτε στον αντίστοιχο PMB-αιθέρα, δεν κατέστη τελικά δυνατή με χρήση των ηλεκτρονιόφιλων αντιδραστηρίων βενζυλοβρωμίδιο και π-μεθοξυ-βενζυλοβρωμίδιο, αντίστοιχα. Ωστόσο, η προστασία με μεθοξυ-μεθυλοχλωρίδιο οδήγησε στον MOM-αιθέρα **109** σε υψηλή απόδοση.



Σχήμα 6.4. Σύνθεση 4-υποκατεστημένων αναλόγων της 2-DOS: (**α**) MOMCl (10.0 eq), DIPEA (15.0 eq), TBAI (0.1 eq), CH₂Cl₂ (0.1 M), 12 h, 0°C→32°C, 94%, ή MEMCl (10.0 eq), DIPEA (15.0 eq), TBAI (0.1 eq), CH₂Cl₂ (0.1 M), 12 h, 0°C→32°C, 82%, ή **108** (1.0 eq), NIS (2.3 eq), διάλυμα TfOH (0.15 eq) σε άνυδρο CH₂Cl₂ (0.02 M), άνυδρο CH₂Cl₂/ άνυδρος Et₂O (1:1, v/v) (0.1 M), 2 h, 25°C→30°C→0°C, 32%, (**β**) CH₃COOH / H₂O (8:2, v/v) (0.06 M), 1 h, 25°C, για τα **109** και **110** ή CH₃COOH (0.8 eq), 1,4-διοξάνιο / H₂O (1:1, v/v) (0.04 M), 12 h, 65°C, για το **111**, (**γ**) NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (7.0 eq), άνυδρο DMF (0.06 M), 1.5 h, 0°C→25°C, 62% σε 2 βήματα για το **112**, 42% σε 2 βήματα για το **113**, NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (5.0 eq), άνυδρο DMF (0.1 M), 2 h, 0°C→25°C, 40% σε 2 βήματα για το **114**.

Όμοια αποτελέσματα είχαν και η προστασία του 4-υδροξυλίου με MEMCl προς τον αντίστοιχο MEM-αιθέρα **110**, αλλά και με ενεργοποιημένη και προστατευμένη σακχαρική μονάδα (βενζυλιωμένης γλυκόζης) **108** προς την ένωση **111** (Σχήμα 6.4). Στα επιτυχώς 4-προστατευμένα ανάλογα απομακρύνθηκε περαιτέρω η κετάλη με οξικό οξύ και στην προκύπτουσα διόλη έγινε ενδομοριακή κυκλοποίηση με υδρίδιο του νατρίου προς την εκάστοτε αντίστοιχη οξαζολιδινόνη **112**, **113** ή **114**. Συγκεκριμένα, η προστασία του 4-υδροξυλίου της αλκοόλης **74** (Σχήμα 6.4) έγινε με το ενεργοποιημένο θειοφαινυλικό παράγωγο της βενζυλιωμένης γλυκόζης (**108**) και οδήγησε στο μίγμα των δύο αναμενόμενων α- και β-ανωμερών, **111α** και **111β** (Σχήμα 6.5). Ο καθαρισμός με στήλη χρωματογραφίας ήταν εν μέρει μόνο αποτελεσματικός για να διαχωριστεί πλήρως και χωρίς απώλειες το μίγμα **111** στα δύο επιμέρους ανωμερή α- και β-. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε αποπροστασία της κυκλοεξυλιδενοκετάλης και τελικά ο σχηματισμός του ανωμερικού μίγματος των οξαζολιδινονών, **114α** και **114β** (Σχήμα 6.4). Στην εν λόγω διερεύνηση υψίστης σημασίας ήταν η συμβολή της Δρ. Βικτώριας Ναχμία.

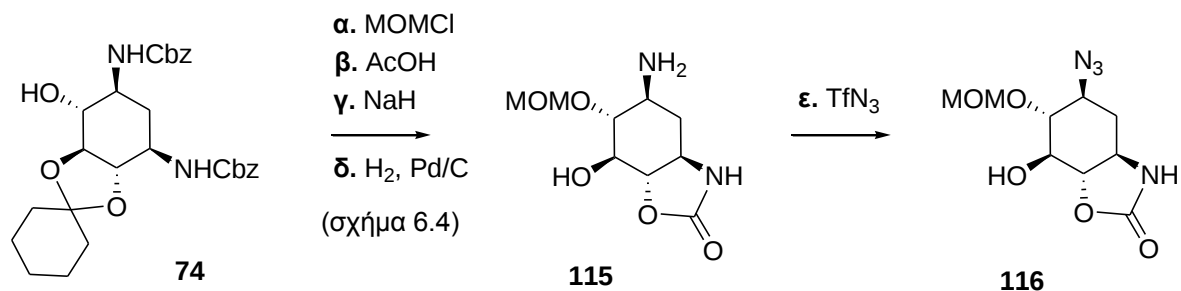


Σχήμα 6.5. Μίγμα α- και β- ανωμερών του 4-υποκατεστημένου αναλόγου της 2-DOS με σακχαρική μονάδα, **111α** και **111β**.

Καθώς η μεθοξυμεθυλο-προστατευμένη οξαζολιδινόνη **112** (Σχήμα 6.4) μπορούσε να ληφθεί πιο εύκολα και σε καλύτερη απόδοση σε σχέση με τα υπόλοιπα 4-υποκατεστημένα ανάλογα της 2-DOS του σχήματος 6.4, συνεχίστηκε περαιτέρω η χρήση της. Επειδή όμως η παρουσία της Cbz-ομάδας στο N-3 προκαλούσε προβλήματα ιδίως με χρήση βάσης, προτιμήθηκε η αντικατάστασή της με την αζιδομάδα. Έτσι, με υδρογονόλυση και προσθήκη ισοδύναμης ποσότητας οξικού οξέος,¹⁶² απομακρύνθηκε η Cbz-αμινομάδα του N-3 της **112** και ελήφθη η αμίνη **115**, που με περαιτέρω αζιδίωση οδήγησε στο ορθογωνικά προστατευμένο μόριο **116** σε υψηλή απόδοση (Σχήμα 6.6).

Ξεκινώντας λοιπόν από το μόριο **116** έγινε αρχικά προσπάθεια προστασίας του αμιδικού υδρογόνου της οξαζολιδινόνης έναντι του υδρογόνου του ελεύθερου 5-OH, με χρήση διαφόρων ομάδων. Σε πρώτη φάση επιχειρήθηκε προστασία του -NH σε βασικές συνθήκες με χρήση των αντιδραστηρίων π-μεθοξυ-βενζυλο-βρωμίδιο, βενζυλοβρωμίδιο, αλλυλοβρωμίδιο και δι-καρβοβενζοξυ-ανυδρίτη. Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις αυτών των ηλεκτρονιόφιλων η

μονοαλκυλίωση πραγματοποιήθηκε σε πολύ χαμηλή απόδοση. Σε δεύτερη φάση, δοκιμάστηκε μονοαλκυλίωση μέσω Michael αντίδρασης, αλλά και μέσω καταλυτικής αλλυλίωσης.



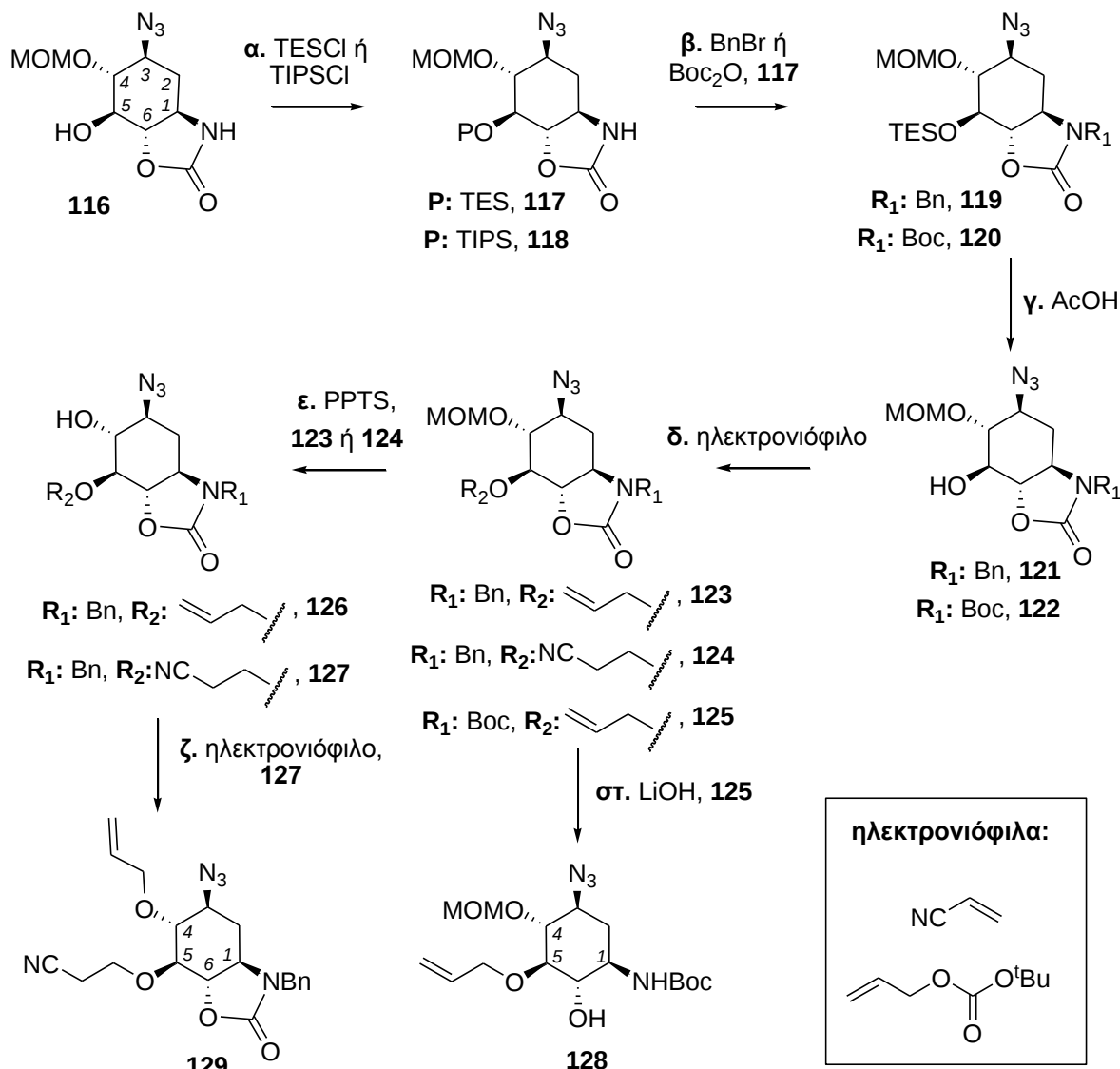
Σχήμα 6.6. Σύνθεση του ορθογωνικά προστατευμένου μορίου **116**: (**α**) MOMCl (10.0 eq), DIPEA (15.0 eq), TBAI (0.1 eq), CH₂Cl₂ (0.1 M), 12 h, 0°C→32°C, 94%, (**β**) CH₃COOH / H₂O (8:2, v/v) (0.06 M), 1 h, 25°C, (**γ**) NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (7.0 eq), άνυδρο DMF (0.06 M), 1.5 h, 0°C→25°C, 62% σε 2 βήματα, (**δ**) H₂, Pd ενεργοποιημένο σε C (10% κ.β.), CH₃COOH (1.0 eq), άνυδρη MeOH (0.1 M), 1.5 h, 25°C, (**ε**) φρέσκο διάλυμα TfN₃ (5.0 eq) σε CH₂Cl₂ 0.5 M, CuSO₄·5H₂O (0.05 eq), Et₃N (10.0 eq), MeOH/ H₂O (6:4, v/v) (0.2 M), 12 h, 25°C, 95% σε 2 βήματα.

Συχνά παραπροϊόντα που παρατηρήθηκαν κατά τις προσπάθειες μονοαλκυλίωσης του -NH της οξαζολιδινόνης **116** ήταν: **α**) τα αντίστοιχα δι-αλκυλιωμένα παράγωγα, καθώς και **β**) τα επιθυμητά μονο-αλκυλιωμένα στο -NH παράγωγα, που όμως είχαν επιπροσθέτως υποστεί διάνοιξη του οξαζολιδινονικού δακτυλίου. Ειδικά στις περιπτώσεις προστασίας του -NH με προσθήκη τόσο ακρυλονιτριλίου με Michael αντίδραση, όσο και αλλυλομάδας με αντίδραση αλλυλίωσης καταλυόμενη από παλλάδιο, η διυποκατάσταση του μορίου **116** λάμβανε χώρα αποκλειστικά.

Σκεπτόμενοι μια προστατευτική ομάδα που να εκχωρεί εξαρχής και με ευκολία την εκλεκτικότητα ανάμεσα στο αμιδικό πρωτόνιο της οξαζολιδινόνης και το 5-OH της ένωσης **116**, αλλά και εκμεταλλευόμενοι σχετική βιβλιογραφία,¹⁶³ έγινε στροφή στους σιλυλο-αιθέρες (Σχήμα 6.7). Είναι γνωστό ότι η σιλυλομάδα δεν σχηματίζει σταθερούς δεσμούς με το άζωτο, οπότε η προστασία πραγματοποιείται κατεξοχήν στο οξυγόνο της εκάστοτε ένωσης. Συνεπώς, προχωρήσαμε στη σύνθεση των αντίστοιχων τριϊσοπροπυλοσιλυλο- (ή TIPS-)¹⁶⁴ και τριαιθυλο-σιλυλοαιθέρων (ή TES-αιθέρων) του μορίου **116**, αλλά καθώς υψηλότερη απόδοση είχαμε στη σύνθεση του TES-αιθέρα **117** ήταν και αυτός που προτιμήθηκε για να συνεχιστεί η πορεία.

Η περαιτέρω προστασία του αμιδικού πρωτονίου της οξαζολιδινόνης **117** πραγματοποιήθηκε τόσο με βενζυλομάδα (μόριο **119**), όσο και με καρβοβενζοξυ-ομάδα (μόριο **120**) (Σχήμα 6.7). Μετά την απομάκρυνση της σιλυλομάδας με υδατικό διάλυμα οξικού οξέος, προέκυψαν τα μόρια **121** και **122** αντίστοιχα, όπου στο ελεύθερο 5-OH μπορούσε να εισαχθεί αλλυλομάδα, μια ομάδα που λόγω της φύσης της θα μπορούσε μεταγενέστερα να τροποποιηθεί ποικιλοτρόπως. Η αλλυλίωση στις αλκοόλες **121** και **122** έγινε με αλλυλοξυ-*t*-βουτυλικό εστέρα¹⁶⁵ παρουσία καταλύτη παλλάδιου¹⁶⁶

καταλήγοντας στα προϊόντα **123** και **125**, με βενζυλο- και καρβοβενζοξυ-προστασία στη θέση-1 αντίστοιχα.



Σχήμα 6.7. Σύνθεση 4,5- και 5-αναλόγων της 2-DOS: (α) TESCI (5.0 eq), πυριδίνη (περίσσεια), 4-DMAP (0.1 eq), 12 h, 25°C, 92% για το **117**, ή TIPSCI (6.0 eq), μιδαζόλιο (9.0 eq), 4-DMAP (0.1 eq), άνυδρο CH₂Cl₂ (0.1 M), 12 h, 25°C, 31% για το **118**, (β) BnBr (3.0 eq), διάλυμα LiHMDS 0.1N σε THF (3.0 eq), TBAI (0.1 eq), άνυδρο THF (0.2 M), 12 h, 25°C, 82% για το **119**, ή Boc₂O (1.5 eq), Et₃N (1.3 eq), 4-DMAP (0.2 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 12 h, 25°C, 97% για το **120**, (γ) CH₃COOH (0.8 eq) / H₂O (8:2, v/v) (0.02 M), 2.5 h, 25°C, 75% για το **121** ή 95% για το **122**, (δ) tert-βουτυλοξικός καρβονικός αλλυλεστέρας (3.0 eq), Pd(PPh₃)₄ (0.2 eq), άνυδρο THF (0.1-0.05 M), 12 h, 25°C, 76% για το **123**, ή ακρυλονιτρίλιο (20.0 eq), Cs₂CO₃ (1.02 eq), t-BuOH (0.2 M), 12 h, 25°C, 99% για το **124**, ή tert-βουτυλοξικός καρβονικός αλλυλεστέρας (6.0 eq), Pd(PPh₃)₄ (0.4 eq), άνυδρο THF (0.1-0.05 M), 4 h, 45°C για το **125**, (ε) PPTS (13.0 eq), t-BuOH (0.05 M), 12 h, βρασμός με επαναρροή, 90% για το **126**, PPTS (13.0 eq), t-BuOH (0.05 M), 12 h, βρασμός με επαναρροή, 91% για το **127**, (στ) υδ. LiOH.H₂O

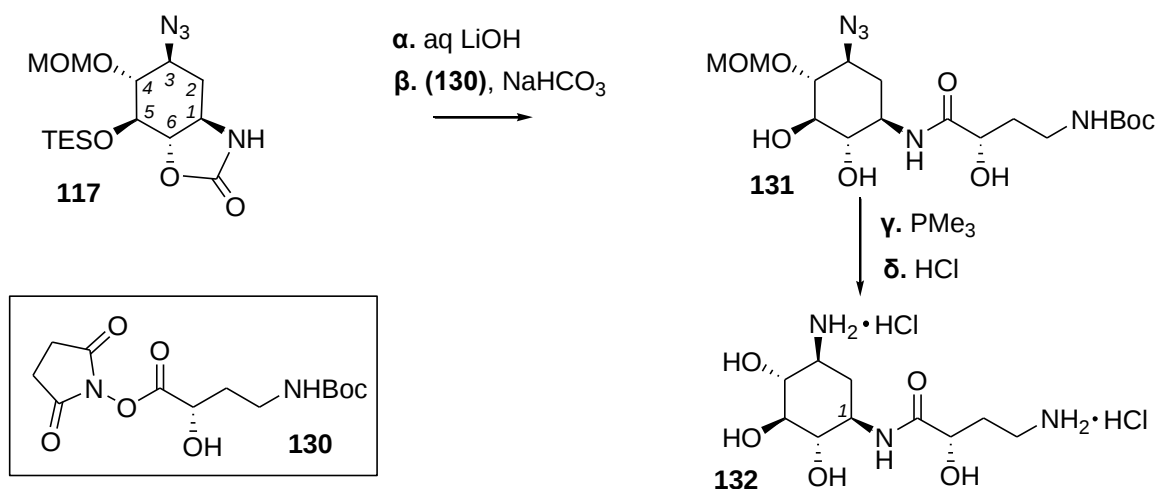
0.5 N (3.6 eq), 1,4-διοξάνιο (0.07 M), 12 h, 25°C, 70% σε 2 βήματα για το **128**, (**ζ**) *tert*-βουτυλοξικός καρβονικός αλλυλεστέρας (10.0 eq), Pd(PPh₃)₄ (0.2 eq), άνδρο THF (0.1-0.05 M), 2 h, 45°C, 71% για το **129**.

Θέλοντας εναλλακτική 5-υποκατάσταση σε αμφότερες τις αλκοόλες **121** και **122**, εκτός της ήδη αποτελεσματικής καταλυτικής αλλυλίωσης με παλλάδιο, δοκιμάστηκε επιπλέον αντίδραση Michael με ακρυλονιτρίλιο (Σχήμα 6.7).¹⁶⁷ Ωστόσο, η αντίδραση Michael ήταν επιτυχής μόνο στην περίπτωση της **121** (που έφερε βενζυλομάδα στο N στις θέσης-1) και το προϊόν που παραλήφθη ήταν το **124**, το οποίο έχοντας υποκατάσταση του 5-υδροξυλίου από προπυλονιτριλομάδα μπορούσε θεωρητικά να είναι ευέλικτο σε περαιτέρω τροποποίηση.

Στα πλήρως διαφοροποιημένα ως προς το δακτύλιο της 2-DOS μόρια **123**, **124** και **125** υπήρχαν δύο οδοί που μπορούσαν να ακολουθηθούν παρακάτω: **α**) είτε να απομακρυνθεί η μεθοξυμεθυλομάδα του O-4, **β**) είτε να διανοιχτεί ενδομοριακά η οξαζολιδινόνη μεταξύ του O-6 και του N-1 (Σχήμα 6.7). Ξεκινώντας από την πρώτη οδό, πραγματοποιήθηκε όξινη αποπροστασία της μεθοξυμεθυλομάδας του O-4 με PPTS οδηγώντας στις αλκοόλες **126** και **127**. Η εναλλακτική οδός της διάνοιξης της οξαζολιδινόνης με υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του λιθίου ήταν επιτυχής μόνο στην περίπτωση της οξαζολιδινόνης **125** με καρβοβενζοξυ-προστασία και αλλυλο-υποκατάσταση στο 5-υδροξύλιο, παράγοντας το 4-μονοϋποκατεστημένο μόριο **128**.

Η περαιτέρω υποκατάσταση του ελεύθερου πλέον 4-υδροξυλίου στις **126** και **127** δοκιμάστηκε αφ' ενός με εισαγωγή της προπυλονιτριλομάδας με αντίδραση Michael για την αλκοόλη **126** που όμως δεν ευδοδόθηκε, αφ' ετέρου με εισαγωγή αλλυλομάδας για την αλκοόλη **127** (Σχήμα 6.7) που ήταν επιτυχής με καταλυτική αλλυλίωση με παλλάδιο και οδήγησε στο επιθυμητό 4,5-διϋποκατεστημένο προϊόν **129**.

Έχοντας σαν επόμενο στόχο την παρασκευή ενός N-1 μονοϋποκατεστημένου μορίου, συντέθηκε το μόριο **132** (Σχήμα 6.8).

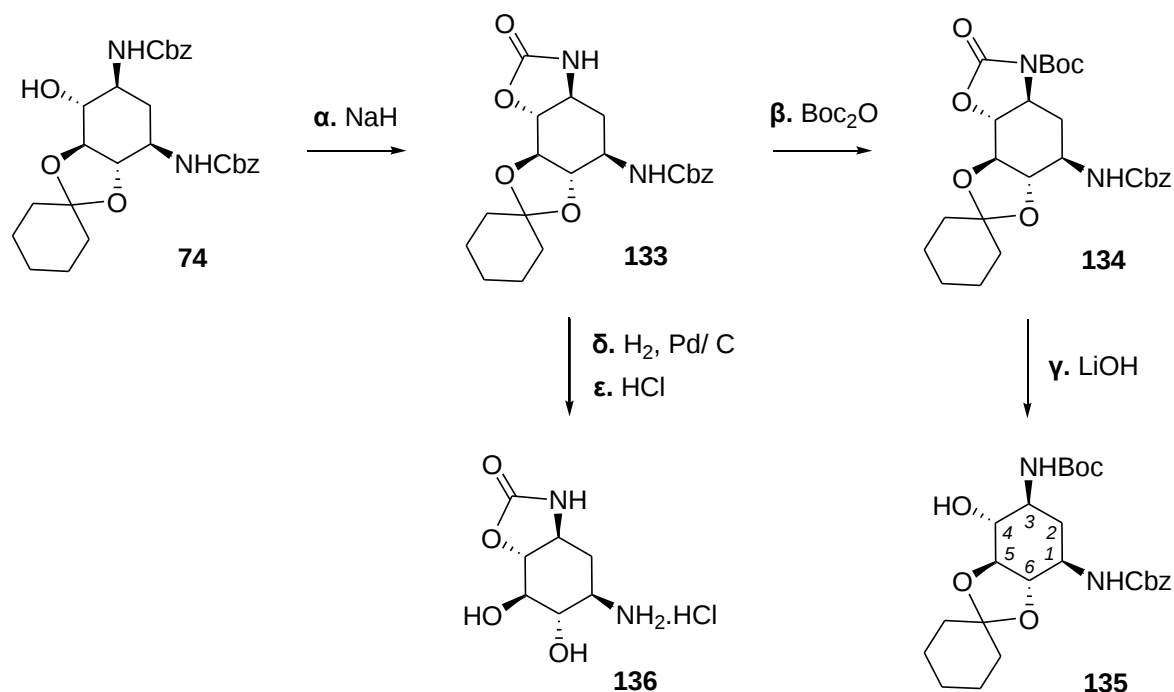


Σχήμα 6.8. Σύνθεση του 1-μονοϋποκατεστημένου αναλόγου της 2-DOS **132**: (**α**) υδ. LiOH 0.5 N (3.6 eq), 1,4-διοξάνιο (0.1 M), 2.5 h, 25°C, (**β**) **130**, κορ. υδατ. διάλυμα NaHCO₃ (καταλυτικό), 1,4-διοξάνιο

/ H_2O (3:1, v/v) (0.1 M), 12 h, 25°C, 57% σε 2 βήματα, (**γ**) διάλυμα PMe_3 (5.0 eq) σε THF 0.1 M, υδ. NaOH 0.1 M (0.05 eq), THF (0.1 M), 12 h, 25°C, (**δ**) υδ. HCl 1.0 N, MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, 77% σε 2 βήματα.

Ξεκινώντας από τον τριαιθυλοσιλυλοαιθέρα **117** έγινε ενδομοριακή διάνοϊξη οξαζολιδινόνης υπό βασικές συνθήκες με υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του λιθίου, οδηγώντας στην αντίστοιχη αμινοαλκοόλη η οποία με σύζευξη της ελεύθερης πλέον 1-αμινομάδας με τον σουκινιμιδικό εστέρα **130** κατέληξε στο προϊόν σύζευξης **131** (Σχήμα 6.8). Η τελική αποπροστασία της 3-αζιδομάδας με αναγωγή Staudinger και των μεθοξυμεθυλο- και καρβοβενζοξυ-ομάδων με όξινες συνθήκες (υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου), κατέληξε στο τελικό 1-μονοϋποκατεστημένο ανάλογο της 2-DOS **132**.

Από την οπτικά ενεργή αλκοόλη **74** έγινε η σύνθεση μιας διαφοροποιημένης στα N-1 και N-3 άζωτα του δακτυλίου της 2-DOS οπτικά ενεργής αλκοόλης, της **135** (Σχήμα 6.9).



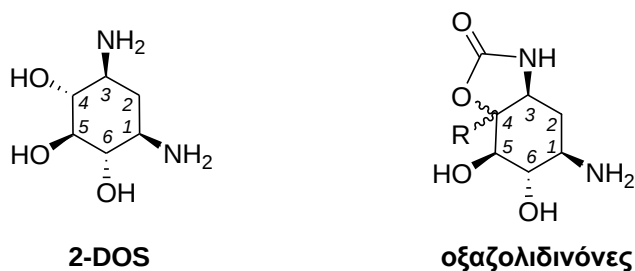
Σχήμα 6.9. Σύνθεση της οπτικά ενεργής αλκοόλης **135** με διαφοροποιημένα τα άζωτα N-1 και N-3, αλλά και της αποπροστατευμένης οξαζολιδινόνης **136**: (**α**) NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (4.0 eq), άνυδρο DMF (0.06 M), 2 h, 0°C→25°C, 50%, (**β**) Boc₂O (1.29 eq), Et₃N (1.27 eq), 4-DMAP (0.2 eq), άνυδρο THF (0.04 M), 12 h, 25°C, 98%, (**γ**) υδ. LiOH·H₂O 0.5 N (3.6 eq), διοξάνιο (0.08 M), 12 h, 25°C, 60%, (**δ**) H₂, Pd ενεργοποιημένο σε C (10% κ.β.), άνυδρη MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, (**ε**) υδ. HCl 0.1 N (0.06 M), MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, 50% σε 2 βήματα.

Τα βήματα που μεσολάβησαν ήταν πρώτα ενδομοριακός σχηματισμός οξαζολιδινόνης στις θέσεις 3- και 4- του δακτυλίου με χρήση υδριδίου του νατρίου, κατόπιν προστασία του αμιδικού πρωτονίου της προκύπτουσας καρβαμιδικής ομάδας στην οξαζολιδινόνη **133** με Boc-ομάδα προς την ένωση **134** και τελικά υδρόλυση της οξαζολιδινόνης με υδροξείδιο του λιθίου προς την επιθυμητή

αλκοόλη **135**.¹⁶² Παράλληλα, στην οξαζολιδινόνη **133** πρώτα έγινε υδρογονόλυση σε μεθανόλη παράγοντας την αντίστοιχη αμίνη και μετά με υδροχλώριο έγινε η τελική αποπροστασία της κυκλοεξυλιδενο-κετάλης, καταλήγοντας στην αποπροστατευμένη οξαζολιδινόνη **136**.

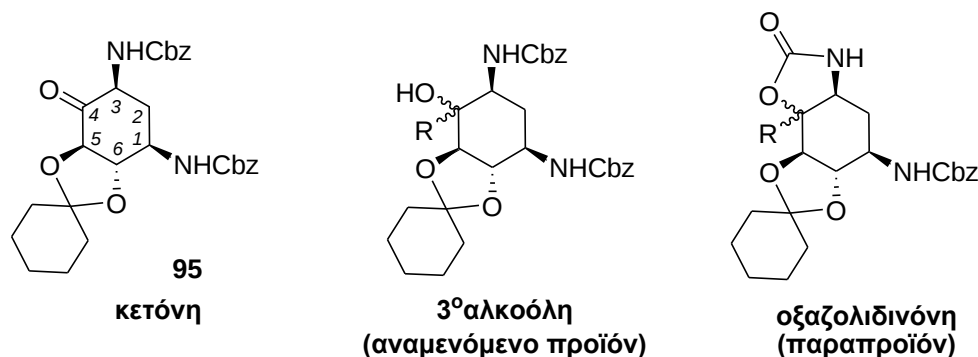
6.2.2. Σύνθεση άκαμπτων αναλόγων με χρήση ορθογωνικών προστατευτικών ομάδων (οξαζολιδινόνες)

Οι οξαζολιδινόνες αποτελούν ήδη γνωστή κατηγορία δραστικών αντιβιοτικών,¹⁶⁰ επομένως ο συνδυασμός τους σε μια νέα κατηγορία άκαμπτων αναλόγων της 2-DOS αποτέλεσε μεγάλο ερευνητικό δέλεαρ. Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκε η σύνθεση οξαζολιδινονών στις 3 και 4 θέσεις του δακτυλίου της 2-DOS, έτσι ώστε ο C-4 να είναι τεταρταγής και υποκατεστημένος με ποικιλία αλυσίδων R (Σχήμα 6.10). Η εισαγωγή των αλυσίδων αυτών θα μπορούσε σε πρώτη φάση να πραγματοποιηθεί με χρήση οργανομεταλλικών αντιδραστηρίων, τα οποία θα ήταν επιδεκτικά σε περαιτέρω τροποποίηση, ώστε να δημιουργηθούν τελικά οι επιθυμητές υδροξυλομάδες (Σχήμα 6.10).



Σχήμα 6.10. Σχεδιασμένες οξαζολιδινόνες με 4-υποκατάσταση (R: υδρογονανθρακική αλυσίδα που φέρει υδροξυλομάδες).

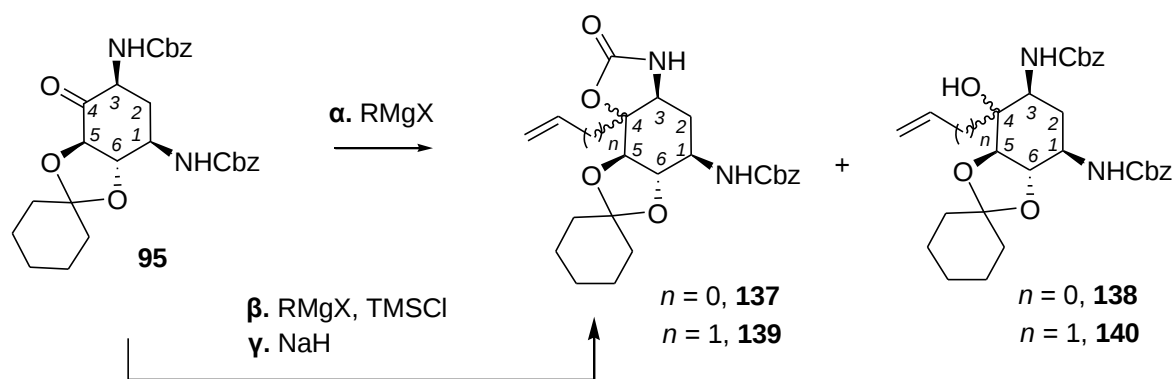
Όπως ήδη είχε διαπιστώσει η ερευνητική ομάδα του κ. Βουρλούμη,¹⁵⁹ η οργανομεταλλική προσθήκη αντιδραστηρίου Grignard στην κετόνη **95** είχε σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό τόσο της επιθυμητής αντίστοιχης τριτοταγούς αλκοόλης, όσο και της αντίστοιχης οξαζολιδινόνης ως παραπροϊόν (Σχήμα 6.11).



Σχήμα 6.11. Το υπόστρωμα (κετόνη) της οργανομεταλλικής προσθήκης και τα προϊόντα της (τεταρτοταγής αλκοόλη και οξαζολιδινόνη) ανάλογα με τις συνθήκες (παρουσία ή απουσία TMSCl), (R : υδρογονανθρακική αλυσίδα που εισάγεται με το εκάστοτε οργανομεταλλικό αντιδραστήριο RMgX).

Συστατικό-κλειδί, για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση οργανομεταλλικής προσθήκης επιτυχώς λαμβάνοντας μόνο την αντίστοιχη τεταρτοταγή αλκοόλη ως αποκλειστικό προϊόν, ήταν η παρουσία τριμεθυλοσιλυλο-χλωριδίου.¹⁵⁹ Για τη σχηματισθείσα οξαζολιδινόνη έγινε η μηχανιστική υπόθεση ότι η προσβολή του ηλεκτρονιοφιλικού καρβονυλίου της κετόνης **95** από το οργανομεταλλικό αντιδραστήριο οδηγούσε πρώτα στο σχηματισμό οξυανιόντος στη θέση 4. Το δημιουργηθέν οξυανιόν με τη σειρά του προσέβαλε το καρβονύλιο της γειτονικής Cbz-ομάδας με ταυτόχρονη απελευθέρωση βενζυλικής αλκοόλης, καταλήγοντας στο σχηματισμό της οξαζολιδινόνης.

Συγκεκριμένα, ξεκινώντας από την κετόνη **95** έγινε προσθήκη του οργανομεταλλικού αντιδραστήριου βινυλομαγνησιο-χλωριδίου στον καρβονυλικό C-4, καταλήγοντας στο σχηματισμό της αντίστοιχης τριτοταγούς αλκόλης **138**, αλλά και της αντίστοιχης οξαζολιδινόνης **137** (Σχήμα 6.12).¹⁵⁹ Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν με τη χρήση του αλλυλικού οργανομεταλλικού αντιδραστήριου, οδηγώντας στο σχηματισμό της αντίστοιχης τριτοταγούς αλκόλης **140** και της οξαζολιδινόνης **139**. Μάλιστα, για επιβεβαίωση των οξαζολιδινονών ως σχηματισθέντων προϊόντων, πραγματοποιήθηκε ο απ'ευθείας σχηματισμός τους από τις αντίστοιχες τριτοταγείς αλκοόλες με υδρίδιο του νατρίου σε DMF.¹⁵⁹



Σχήμα 6.12. Σύνθεση των οξαζολιδινικών αναλόγων της 2-DOS **137** και **139**: (α) διάλυμα βινυλομαγνησιο-χλωριδίου σε THF 1.6 M (3.0 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 3 h, $-78^{\circ}C \rightarrow 25^{\circ}C$, 32% για το **137**, ή διάλυμα αλλυλομαγνησιο-βρωμιδίου σε Et₂O 1.0 M (3.0 eq), TMSCl (3.0 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 12 h, $-78^{\circ}C \rightarrow 25^{\circ}C$, 35% για το **139**, (β) διάλυμα βινυλομαγνησιο-χλωριδίου σε THF 1.6 M (3.0 eq), TMSCl (3.0 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 3 h, $-78^{\circ}C \rightarrow 25^{\circ}C$, 36% για το **138** (2.5:1 dr), ή διάλυμα αλλυλομαγνησιο-βρωμιδίου σε Et₂O 1.0 M (3.0 eq), TMSCl (3.0 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 3 h, $-78^{\circ}C \rightarrow 25^{\circ}C$, 52% για το **140** (4:1 dr), (γ) NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (2.5 eq), άνυδρο DMF (0.1 M), 2 h, $25^{\circ}C$, 55% για το **137**, ή NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (2.5 eq), άνυδρο DMF (0.8 M), 2.5 h, $25^{\circ}C$, 60% για το **139**.

Όπως είπαμε πριν, με χρήση του τριμεθυλοσιλυλο-χλωριδίου (TMSCl) στο μίγμα της αντίδρασης απετράπηκε το ανεπιθύμητο αποτέλεσμα της οργανομεταλλικής προσθήκης στην κετόνη **95**. Έτσι λοιπόν, το σχηματιζόμενο κατά την προσθήκη οξυανιόν μπορούσε να παγιδευτεί *in situ* ως

TMS-αιθέρας, αποφεύγοντας με αυτόν τον τρόπο τον περαιτέρω σχηματισμό του παραπροϊόντος της οξαζολιδινόνης. Το επιπλέον πλεονέκτημα της χρήσης TMSCl ήταν η εύκολη αποπροστασία του αιθέρα, καθώς πραγματοποιούνταν κατά την τελική κατεργασία της αντίδρασης. Συνεπώς, παρήχθησαν με ευκολία οι δύο τριτοταγείς αλκοόλες **138** και **140** (βινυλο- και αλλυλο-, αντίστοιχα) (Σχήμα 6.12).

Σε έκαστη οργανομεταλλική προσθήκη υπάρχει ένδειξη ότι το μέγεθος του οργανομεταλλικού αντιδραστηρίου ήταν σημαντικός παράγοντας για τη στερεοεκλεκτικότητα των παραγόμενων αλκοολών. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις προσθήκης, η κύρια σχηματιζόμενη αλκοόλη έφερε τον ολεφινικό υποκαταστάτη στην ισημερινή θέση (*anti* ως προς τις γειτονικές –NHCbz και –OH ομάδες). Έτσι λοιπόν, η αλκοόλη **138** ήταν μίγμα ισομερών (2.5:1 *dr*) και η **140** (4:1 *dr*) αναλογία που προσδιορίστηκε με χρήση αναλυτικής HPLC και φασματοσκοπίας ¹H-NMR. Πράγματι, παρατηρούμε ότι αυξανόμενου του μεγέθους του οργανομεταλλικού αντιδραστηρίου (βινυλο- < αλλυλο-), η εκάστοτε ισημερινή αλκοόλη εμφανίστηκε σε υψηλότερη αναλογία στο μίγμα των ισομερών της μορφών (2.5 < 4 για τις αλκοόλες **138** και **140**, αντίστοιχα).¹⁵⁹

Αφού λοιπόν βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες με τις οποίες οι τριτοταγείς αλκοόλες **138** και **140** μπορούσαν να ληφθούν χωρίς παραπροϊόντα, εν συνεχεία κυκλοποιήθηκαν με χρήση υδριδίου του νατρίου προς τις οξαζολιδινόνες **137** και **139**, αντιστοίχως (Σχήμα 6.12). Η οξαζολιδινόνη **137** παρελήφθη μόνο με τη μορφή του *cis* ισομερούς της. Αυτό το γεγονός θα μπορούσε να οφείλεται στο ενδεχόμενο η διαμόρφωση της *cis* οξαζολιδινόνης να είναι σταθερότερη έναντι της *trans*, οπότε να καθίσταται προτιμητέα κατά την κυκλοποίηση με υδρίδιο του νατρίου.

Στις εν λόγω προκύπτουσες οξαζολιδινόνες πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες για την υποκατάστασή τους με διϋδροξυλίωση του διπλού δεσμού υπό συνθήκες Upjohn.¹⁶⁸ Η διϋδροξυλίωση αναμενόταν να πραγματοποιηθεί στερεοεκλεκτικά (προσθήκη του OsO₄ από τη λιγότερο παρεμποδισμένη πλευρά). Εν τούτοις, προσέθεσε στο μόριο της οξαζολιδινόνης ένα επιπλέον στερεογονικό κέντρο που όμως δεν ήταν στερεοχημικά ελεγχόμενο, οπότε η συνθετική πορεία οξαζολιδινονών τροποποιήθηκε κατάλληλα ώστε να αποφευχθεί η ύπαρξη ισομερών. Η εν λόγω έρευνα ως σύλληψη ιδέας και αρχή υλοποίησής της (συμπεριλαμβανομένου του κρίσιμου βήματος της προσθήκης TMSCl) οφείλεται στον Δρ. Αλέξανδρο Ζωγράφο, ενώ σημαντική ήταν επίσης η έρευνα του Δρ. Thomas Cottin στο εργαστήριο Χημικής Βιολογίας του Δρ. Δ. Βουρλούμη.

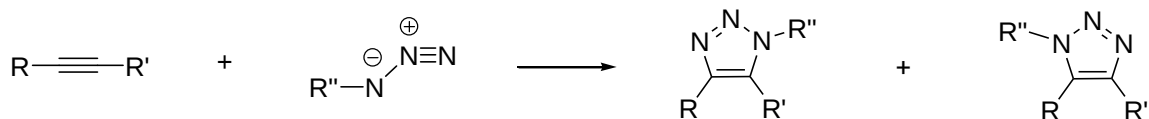
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Σύνθεση τριαζολικών αναλόγων της 2-DOS με χρήση της 1,3-διπολικής κυκλοπροσθήκης

7.1. Εισαγωγή

Τη δεκαετία του '60 ο γερμανός χημικός Rolf Huisgen ανέπτυξε μια αντίδραση υψίστης σημασίας για τη σύνθεση ετεροκυκλικών ενώσεων: την 1,3-διπολική κυκλοπροσθήκη Huisgen αζιδίων-αλκυνίων.¹⁶⁹ Συγκεκριμένα, η αντίδραση Huisgen οδηγεί σε πενταμελή ετεροκυκλικά μόρια, τα 1,2,3-τριαζόλια όπως φαίνεται στο σχήμα 7.1.¹⁷⁰ Το 2001 ένας αμερικανός χημικός, ο K. Barry Sharpless στο Ινστιτούτο Scripps, εμπνεόμενος από την ανακάλυψη του Huisgen ανέπτυξε μια συνθετική προσέγγιση ονόματι «click χημεία».¹⁷¹

Στη χημική αυτή φιλοσοφία, που είναι ήδη ευρέως διαδεδομένη από τότε, πραγματοποιείται ταχεία και εκλεκτική σύνθεση χρήσιμων ενώσεων / συνδυαστικών βιβλιοθηκών που περιέχουν δεσμούς μεταξύ ετεροατόμων της μορφής C-X-C. Εκτός της 1,3-διπολικής κυκλοπροσθήκης [2+3] Huisgen αζιδίων-αλκυνίων,¹⁶⁹ μία επίσης διάσημη αντίδραση της click χημείας είναι η ετερο-Diels-Alder.¹⁷² Σε αμφότερες τις αντιδράσεις γίνεται συνένωση δύο ακόρεστων αντιδρώντων (του 1,3-δίπολου και του διπολαρόφιλου), παρέχοντας έτσι γρήγορη πρόσβαση σε μια τεράστια ποικιλία σημαντικών πενταμελών και εξαμελών ετεροκυκλικών μορίων.^{173,174}



Σχήμα 7.1. Κυκλοπροσθήκη Huisgen αζιδίων-αλκυνίων: μία κατηγορία της «click χημείας».

7.2. Σύνθεση

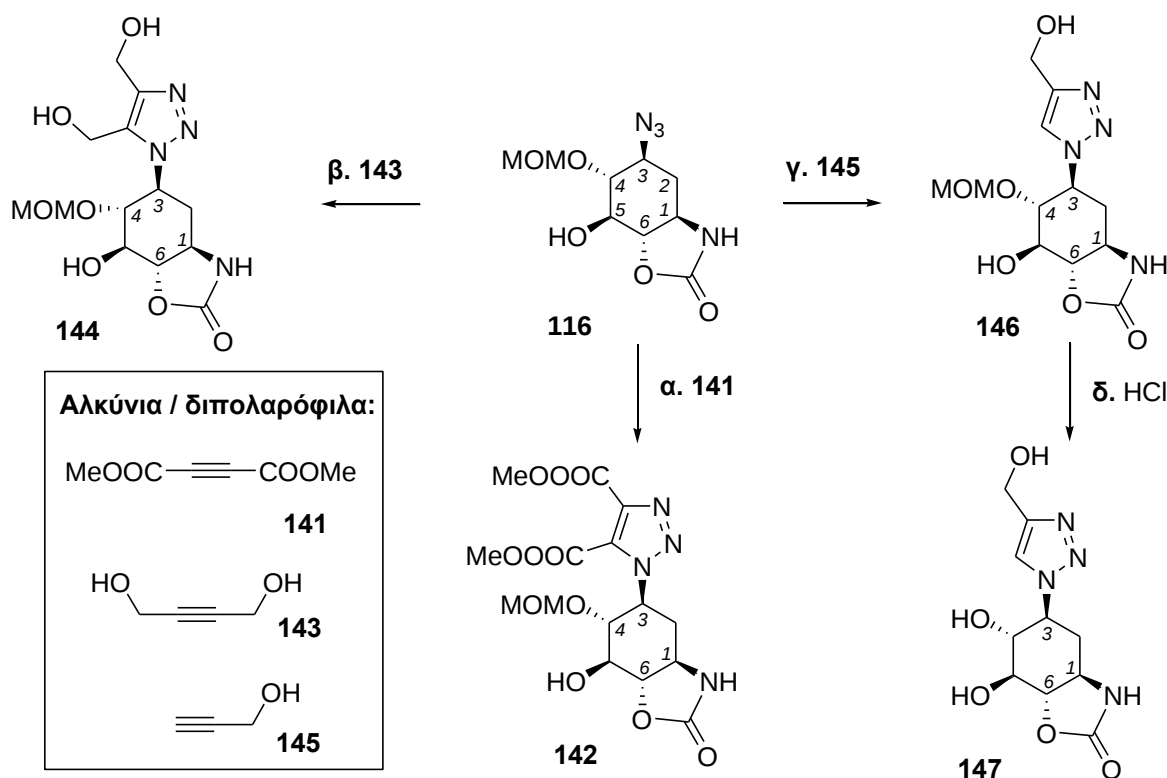
Παρά το γεγονός ότι ο Sharpless χαρακτήρισε τη Huisgen διπολική κυκλοπροσθήκη αζιδίων-αλκυνίων ως την «αφρόκρεμα» της click χημείας,¹⁷¹ η φαρμακευτική χημεία δεν έδωσε την προσοχή που άξιζε σε αυτήν την αντίδραση λόγω ανησυχίας ως προς την εικαζόμενη μειωμένη ασφάλεια κατά το χειρισμό των αζιδίων.¹⁷⁵ Ωστόσο, η αζιδομάδα είναι μακράν η πιο βολική από τα 1,3-διπολικά

συστατικά, καθώς είναι ίσως η μόνη που επιδεικνύει σταθερότητα ως προς το διμερισμό και την υδρόλυση. Συν τοις άλλοις, τα αζίδια εισάγονται εύκολα και μετατρέπονται με αναγωγή προς πρωτοταγείς αμινομάδες. Ιδίως τα αλειφατικά αζίδια είναι εξαιρετικά σταθερά σε μια ευρεία ποικιλία κλασικών συνθηκών οργανικής σύνθεσης.

Εκμεταλλεόμενοι λοιπόν τη Huisgen διπολική κυκλοπροσθήκη, όπου συντίθενται ακόρεστα ετεροκυκλικά μόρια από συνένωση μικρότερων τμημάτων με γρήγορο και απλό τρόπο, αποφασίσαμε να συνθέσουμε ορθογωνικά ανάλογα της 2-DOS που θα είχαν ως πλευρική αλυσίδα έναν τριαζολικό δακτύλιο.

7.2.1. Σύνθεση εύκαμπτων αναλόγων με χρήση της click χημείας

Σε πρώτη φάση, η εισαγωγή του τριαζολικού δακτυλίου επιχειρήθηκε στο N-3 του δακτυλίου της 2-DOS.



Σχήμα 7.2. Εύκαμπτα τριαζολικά ανάλογα της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-3: τα 3-μονοϋποκατεστημένα **142**, **144** και το **147**: **(α)** **141** (3.0 eq), MeOH / H₂O (1:1, v/v) (0.1 M), 12 h, 80°C, **(β)** **143** (2.0 eq), τολουόλιο (0.1 M), 12 h, βρασμός με επαναρροή, 63% **(γ)** **145** (2.0 eq), CuSO₄·5H₂O (0.3 eq), L-ασκορβικό νάτριο (0.5 eq), CH₃CH₂OH / H₂O (2:1) (0.1 M), 12 h, 25°C, 96%, **(δ)** υδ. HCl 4.0 N, EtOAc (0.1 M), 12 h, 25°C, 97%.

Εκκίνηση της σύνθεσης λοιπόν έγινε από το ενδιάμεσο **116** (Σχήμα 6.2, Κεφάλαιο 6), το οποίο έφερε αζιδομάδα στο N-3 συνεπώς μπορούσε να παίξει το ρόλο του δίπολου σε μια αντίδραση

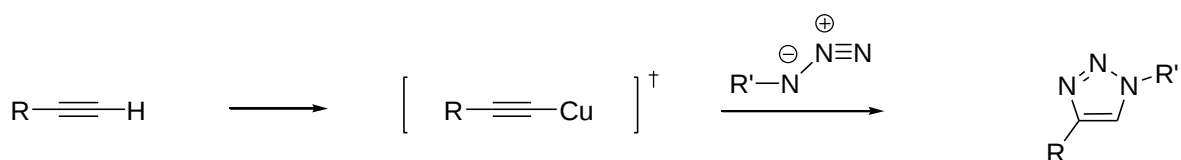
κυκλοπροσθήκης. Αρχικά, ως διπολαρόφιλου δοκιμάστηκε το συμμετρικό αλκύνιο βουτ-2-υνοδιϊκός διμεθυλεστεράς ($\text{MeOCC}\equiv\text{CCOOMe}$) (**141**), οπότε ως προϊόν ελήφθη το τριαζόλιο **142** (Σχήμα 7.2).¹⁶⁹ Η επιλογή του συμμετρικού διπολαρόφιλου εξυπηρετούσε την αποφυγή τοποϊσομερών προϊόντων κατά την αντίδραση της κυκλοπροσθήκης. Ακολούθως, αποπροστασία του μεθοξυμεθυλοαιθέρα με ελαφρώς όξινες συνθήκες στο τριαζόλιο **142** οδήγησε σε αποσύνθεση της αρχικής ένωσης.

Σε μια εναλλακτική αντίδραση κυκλοπροσθήκης, διατηρήθηκε το ίδιο δίπολο **116** αλλά το ρόλο του διπολαρόφιλου κλήθηκε να έχει αυτήν τη φορά η 2-βουτύνο-1,4-διόλη (**143**), ένα ακόμα συμμετρικό αλκύνιο (Σχήμα 7.2). Ωστόσο, το προκύπτον προϊόν κυκλοπροσθήκης τριαζόλιο **144** με περαιτέρω αντίδραση αποπροστασίας του μεθοξυμεθυλοαιθέρα οδήγησε σε αποσύνθεση της αρχικής ένωσης. Πιθανότατα αυτό συνέβη λόγω της ενδομοριακής αλληλεπίδρασης του υδροξυλίου του σχηματισθέντος τριαζολικού δακτυλίου με το ελεύθερο πλέον 4-υδροξύλιο στο δακτύλιο της 2-DOS που προέκυψε μετά την αποπροστασία.

Όταν κατά την Huisgen 1,3-κυκλοπροσθήκη αζιδίου-αλκυνίου χρησιμοποιείται ως διπολαρόφιλο ένα ακραίο αλκύνιο, τότε η αντίδραση είναι καταλυόμενη από μονοσθενή χαλκό και δίνει ως προϊόντα μόνο τα 1,4-υποκατεστημένα τοποϊσομερή των προκύπτοντων 1,2,3-τριαζολίων.¹⁷⁶ Η αντίδραση αυτή έχει ευρεία εφαρμογή σε χημεία, βιολογία και επιστήμη υλικών, καθώς επίσης είναι εξαιρετικά τοποοειδική.¹⁷⁷ Επιπροσθέτως, η εν λόγω κυκλοπροσθήκη έχει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως:

- 1) πραγματοποιείται σε ποικιλία διαλυτών με βέλτιστο τα υδατικά συστήματα,
- 2) είναι επιτυχής σε μια ευρεία κλίμακα θερμοκρασιών (0 - 160°C),
- 3) παραμένει αξιοθαύμαστα ανεκτική σε διάφορες τιμές του pH (μεταξύ 4 και 12, αν και η καλύτερη τιμή pH θεωρείται 7-9),
- 4) είναι αποτελεσματική παρουσία όλων των λειτουργικών ομάδων που έχουν δοκιμαστεί μέχρι στιγμής και συνήθως δε χρειάζονται να προστατευτούν και τέλος,
- 5) τα καθαρά προϊόντα συχνά απομονώνονται με απλή διήθηση ή εκχύλιση, χωρίς τη χρήση χρωματογραφίας ή ανακρυστάλλωσης.¹⁷⁸

Υπολογιστικές μελέτες αποκάλυψαν έναν πιθανό βήμα προς βήμα μηχανισμό της Huisgen 1,3-κυκλοπροσθήκης αζιδίου-αλκυνίου, ο οποίος περιλαμβάνει πρωτόλεια μεταλλοκυκλικά ενδιάμεσα που φαίνονται να είναι κοινά σε μια ποικιλία 1,3-διπόλων (Σχήμα 7.3).¹⁷⁸

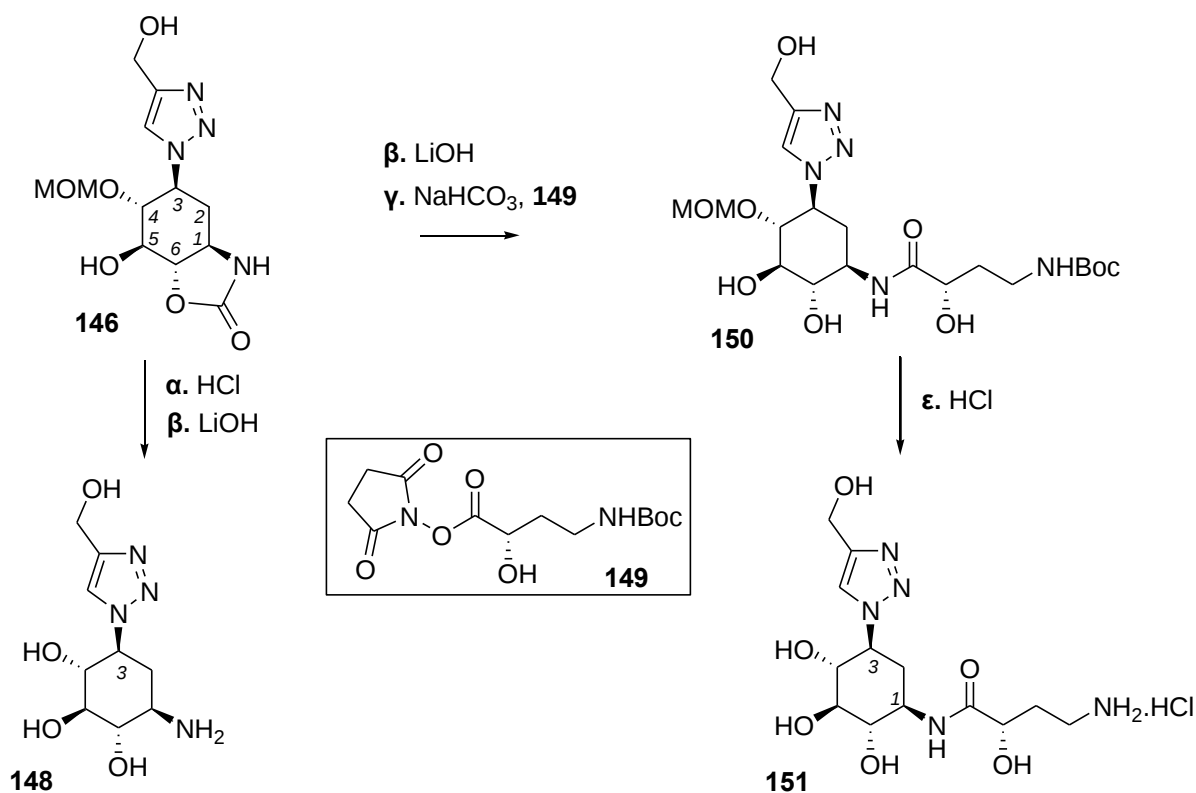


Σχήμα 7.3. Πιθανός μηχανισμός της καταλυόμενης από χαλκό κυκλοπροσθήκης αζιδίων-ακράιων αλκυνίων Huisgen.

Ως πηγή της καταλυτικής ποσότητας Cu(I) που χρειάζεται για να πραγματοποιηθεί η Huisgen 1,3-κυκλοπροσθήκη αζιδίου-αλκυνίου, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ο βρωμιούχος μονοσθενής χαλκός. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι προτιμότερο είναι να γίνει *in situ* παραγωγή Cu(I) από Cu(II) και ένα αναγωγικό μέσο (πχ ασκορβικό νάτριο).¹⁷⁸

Συνυπολογίζοντας τα παραπάνω θεωρητικά δεδομένα και τα πρότερα πειραματικά αποτελέσματα, η σύνθεση του επόμενου μορίου-στόχου με χρήση της click χημείας έγινε διατηρώντας μεν ως 1,3-δίπολο το **116**, αλλά επιλέγοντας ένα ακραίο αλκύνιο ως διπολαρόφιλο, την προπαργυλική αλκοόλη (**145**) (Σχήμα 7.2).¹⁷⁶ Στο παραγόμενο τριαζόλιο **146** ακολούθησε αποπροστασία της μεθοξυμεθυλομάδας καταλήγοντας στο τελικώς αποπροστατευμένο προϊόν **147** (Σχήμα 7.2). Η παρατήρηση ότι η αποπροστασία του μεθοξυμεθυλαιθέρα σε όξινες συνθήκες δεν ήταν προβληματική όπως στο τριαζόλιο **144** (Σχήμα 7.2), ενίσχυσε την υπόθεση ότι η πλευρική αλυσίδα που έφερε την υδροξυλομάδα ευθυνόταν για την αδυναμία αποπροστασίας του MOM-αιθέρα στη θέση-4.

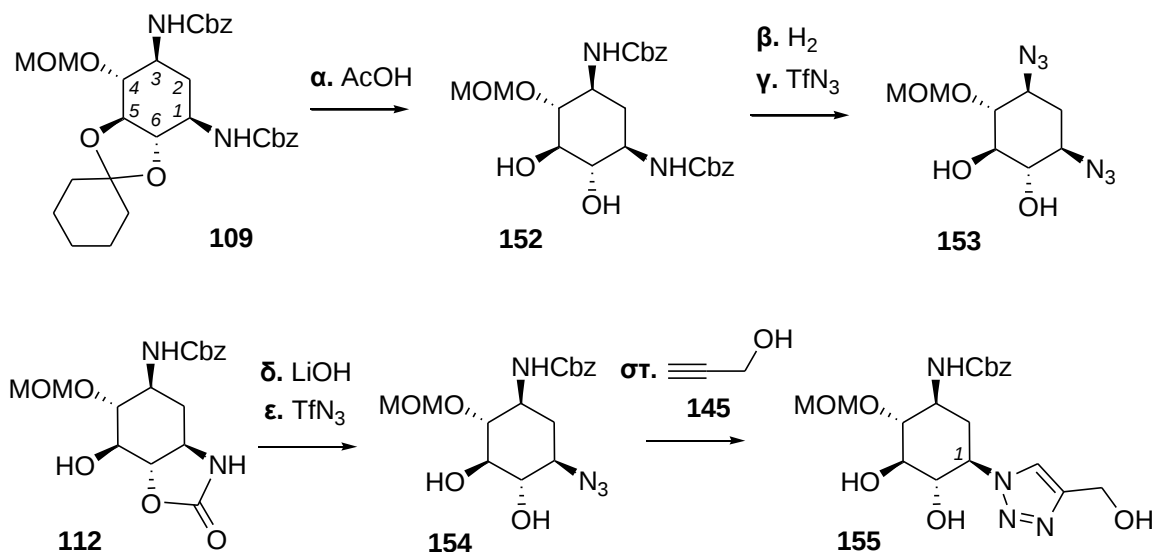
Αρχής γενομένης από το τριαζόλιο **146**, ακολούθησε η σύνθεση δύο περαιτέρω τριαζολικών αναλόγων της 2-DOS (Σχήμα 7.4).



Σχήμα 7.4. Εύκαμπτα τριαζολικά ανάλογα της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-3: το 3-μονοϋποκατεστημένο **148** και το 1,3-διϋποκατεστημένο **151**: (α) υδ. HCl 1.0 N, MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, 97%, (β) υδ. LiOH 0.5 N (3.6 eq), διοξάνιο (0.07 M), 12 h, 25°C, 77%, (γ) διάλυμα του **148** (2.1 eq) σε THF 0.12 M, κορ. υδ. διάλ. NaHCO₃ (καταλυτικό), 1,4-διοξάνιο / H₂O (3:1) (0.1 M), 12 h, 25°C, 42% σε 2 βήματα, (ε) υδ. HCl 1.0 N, MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, 94%.

Με όξινες συνθήκες (υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου) πραγματοποιήθηκε η αποπροστασία της μεθοξυμεθυλομάδας στο **146** και μετά με υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του λιθίου διανοίχτηκε η οξαζολιδινόνη καταλήγοντας στο 3-μονοϋποκατεστημένο μόριο **148** (Σχήμα 7.4). Επιπροσθέτως, ξεκινώντας πάλι από το **146** πραγματοποιήθηκε διάνοιξη της οξαζολιδινόνης με τις ίδιες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως και κατόπιν πραγματοποιήθηκε υποκατάσταση του ελεύθερου πλέον N-1 μέσω σύζευξης με τον σουκινιμιδικό εστέρα **149** (ο οποίος αντιστοιχεί στην πλευρική αλυσίδα της αμικασίνης) σχηματίζοντας το **150**. Το προκύπτον μόριο **150** αποπροστατεύτηκε πλήρως με προσθήκη αραιού υδατικού διαλύματος υδροχλωρίου (ταυτόχρονη αποπροστασία του μεθοξυμεθυλαιθέρα και της Boc-ομάδας) καταλήγοντας στο 1,3-διϋποκατεστημένο ανάλογο της 2-DOS **151** (Σχήμα 7.4).

Η εισαγωγή του τριαζολικού δακτυλίου επιχειρήθηκε επίσης στο N-1 της 2-DOS (Σχήμα 7.5). Έτσι, ξεκινώντας από το μόριο **109** που είδαμε στο κεφάλαιο 6 (Σχήμα 6.4) πραγματοποιήθηκε αποπροστασία της κετάλης προς τη διόλη **152**, υδρογονόλυση των καρβοβενζοξυ-ομάδων παρουσία καταλύτη υδροξειδίου του παλλαδίου και μετά αζιδίωση των ελεύθερων πλέον αμινομάδων, οπότε καταλήξαμε στο διαζίδιο **153** (Σχήμα 7.3). Με αντίδραση κυκλοπροσθήκης στο **153** θέλαμε να οδηγηθούμε στο αντίστοιχο 1,3-διϋποκατεστημένο ανάλογο που έφερε δύο τριαζολικούς δακτυλίους στο N-1 και στο N-3 του δακτυλίου της 2-DOS, όμως παρελήφθη το μονοϋποκατεστημένο προϊόν.



Σχήμα 7.5. Εύκαμπτο τριαζολικό ανάλογο της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-1: το 1-μονοϋποκατεστημένο **155**: (α) CH_3COOH / H_2O (8:2, v/v) (0.06 M), 1 h, 25°C , (β) H_2 , Pd ενεργοποιημένο σε C (10% κ.β.), CH_3COOH (1.0 eq), άνυδρη MeOH (0.1 M), 1.5 h, 25°C , (γ) φρέσκο διάλυμα TfN_3 (10.0 eq) σε CH_2Cl_2 0.5 M, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.05 eq), Et_3N (20.0 eq), MeOH / H_2O (6:4, v/v) (0.2 M), 12 h, 25°C , 89% σε 2 βήματα, (δ) υδ. LiOH 0.5 N (3.6 eq), 1,4-διοξάνιο (0.1 M), 12 h, 25°C , (ε) φρέσκο διάλυμα TfN_3 (5.0 eq) σε CH_2Cl_2 0.5 M, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.05 eq), Et_3N (10.0 eq), MeOH / H_2O (6:4, v/v) (0.1 M), 12 h, 25°C , 71% σε 2 βήματα, (στ) **145** (2.0 eq), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.3 eq), ασκορβικό νάτριο (0.5 eq), $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ / H_2O (2:1, v/v) (0.1 M), 12 h, 25°C , 34%.

Παράλληλα, με εφαλτήριο το μόριο **112** πρώτα έγινε διάνοιξη της οξαζολιδινόνης με υδροξείδιο του λιθίου προς την αντίστοιχη αμινοαλκοόλη και μετά αζιδίωση της ελεύθερης αμινομάδας προς το μονοαζίδιο **154** (Σχήμα 7.5). Εν συνεχεία, το **154** χρησιμοποιήθηκε ως το 1,3-δίπολο στην αντίδραση κυκλοπροσθήκης που πραγματοποιήθηκε με διπολαρόφιλο την προπαργυλική αλκοόλη (**145**), οδηγώντας στο προϊόν **155**. Εν τούτοις, η αποπροστασία του μεθοξυμεθυλοαιθέρα στο **155** με όξινες συνθήκες οδήγησε σε αποσύνθεση της αρχικής ένωσης.

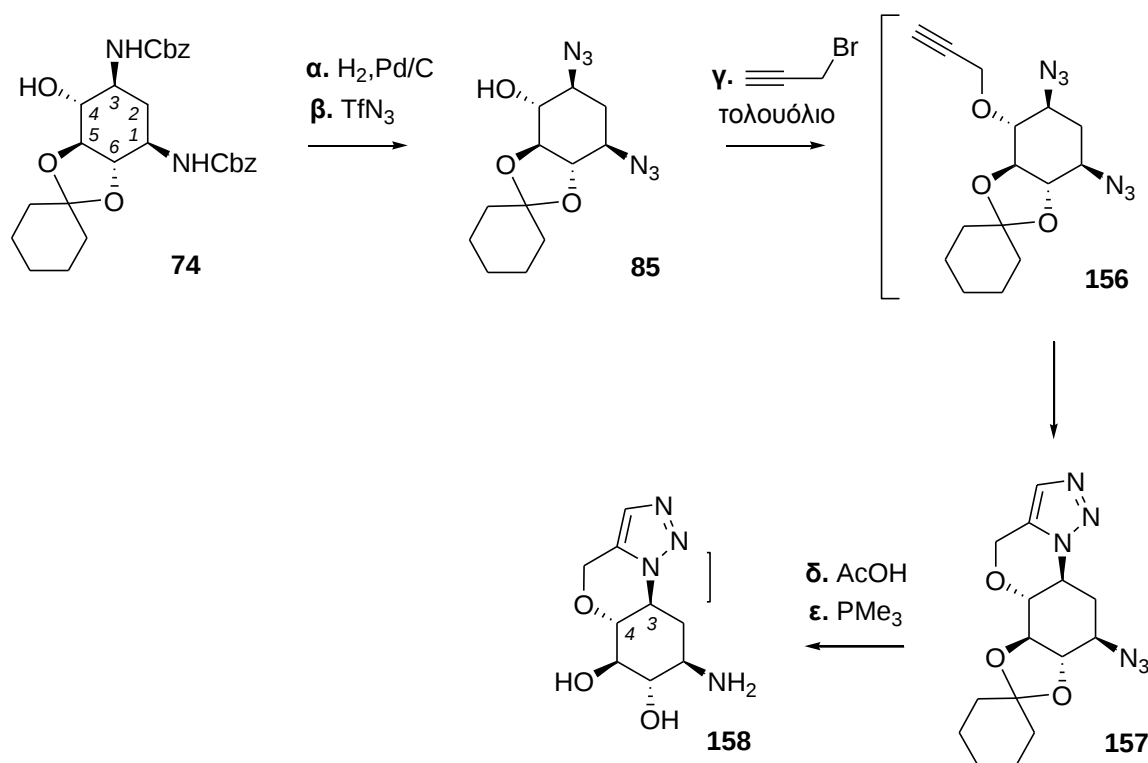
7.2.2. Σύνθεση άκαμπτων αναλόγων με χρήση της click χημείας

Στα ανάλογα που συνθέσαμε προηγουμένως η πλευρική αλυσίδα του τριαζολίου βρίσκεται σε ελεύθερη περιστροφή. Ωστόσο, η υπόθεση ότι άκαμπτα μόρια που στοχεύουν στο A-site του RNA έχουν πιθανότητες να επιδεικνύουν καλύτερη αντιβιοτική δράση από τους γνωστούς αμινογλυκοζίτες ενισχύθηκε από υπολογιστικά μοντέλα, όπως ήδη έχουμε αναφέρει. Έτσι, εκμεταλλευόμενοι τη βιβλιογραφία, πραγματοποιήσαμε τη σύνθεση αναλόγων της 2-DOS με σταθεροποιημένο τριαζόλιο, δηλαδή τρικυκλικά μόρια.

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκε η νεαμίνη, η οποία τροποποιήθηκε στην αλκοόλη **74** όπως είδαμε στο κεφάλαιο 1 και αυτή με τη σειρά της στην αντίστοιχη διαζιδοαλκοόλη **85** (Σχήμα 7.6). Συγκεκριμένα, οι Cbz-αμινομάδες της **74** αποσπάστηκαν με υδρογονόλυση σε μεθανόλη παρουσία καταλυτικής ποσότητας παλλαδίου σε ενεργό άνθρακα 10% κ.β. προς την αντίστοιχη διαμίνη. Εν συνεχεία, οι δύο ελεύθερες αμίνες μετατράπηκαν στα αντίστοιχα αζίδια με τριφθορομεθυλο-σουλφονυλοαζίδιο παρουσία τριαιθυλαμίνης και θειϊκού χαλκού οδηγώντας στο προϊόν **85** (Σχήμα 7.6).

Το 2009 ο Arenz και η ερευνητική του ομάδα παρατήρησαν ότι η αλκοόλη **85** μετατρεπόταν στο τρικυκλικό μόριο **157**, όταν γινόταν χρήση προπαργυλοβρωμιδίου, *n*-τετρα-βουτυλο-αμμωνιακού ιωδιδίου και υδριδίου του νατρίου σε διαλύτη τολουόλιο (Σχήμα 7.6).¹⁷⁹ Οι περαιτέρω μελέτες του Arenz έδειξαν ότι ο αρχικά σχηματιζόμενος προπαργυλοαιθέρας **156**, ο οποίος είναι μη απομονώσιμος, υφίστατο ενδομοριακή αντίδραση κυκλοπροσθήκης μέσα σε 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, καταλήγοντας στο τρικυκλικό μόριο **157**.¹⁷⁹

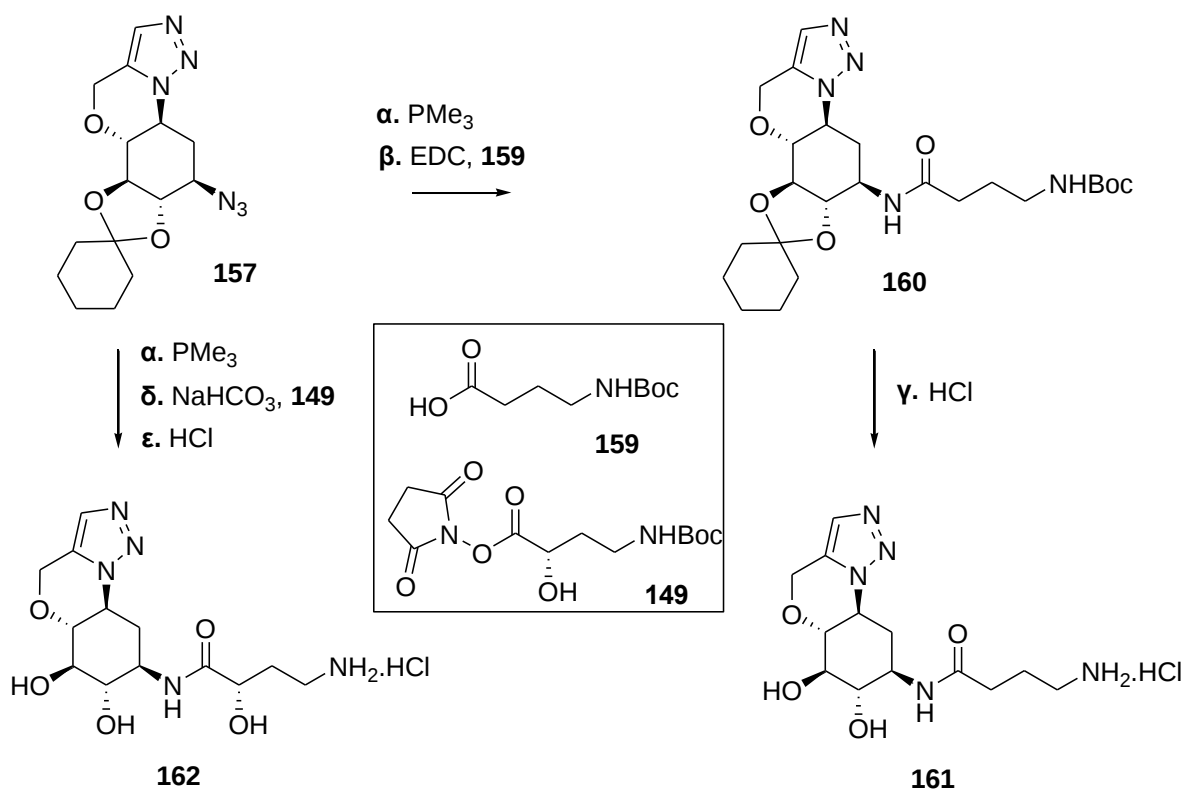
Εκμεταλλευόμενοι το προϊόν της δημοσίευσης του Arenz, συνεχίσαμε τη σύνθεση με σκοπό το μόριο **157** να αποτελέσει τον άκαμπτο σκελετό που θα χτίζαμε τα ανάλογα της 2-DOS. Επόμενο βήμα λοιπόν ήταν η όξινη απομάκρυνση της κυκλοεξυλιδενοκετάλης και ακόλουθη αναγωγή του αζιδίου με τριμεθυλοφωσφίνη, ώστε να μην επηρεαστεί ο τριαζολικός δακτύλιος από χρήση υδρογόνου, έδωσε το πρώτο μόριο αυτής της νέας κατηγορίας άκαμπτων αναλόγων (Σχήμα 7.6, ένωση **158**). Εν τούτοις, προσπάθεια σχηματισμού οξαζολιδινόνης στα N-1 και O-6 του δακτυλίου της 2-DOS στην αμινοαλκοόλη **158** δεν απέδωσε καρπούς, πιθανότατα λόγω ακαμψίας της δομής της.



Σχήμα 7.6. Άκαμπτο τριαζολικό ανάλογο της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-3: 3,4-διϋποκατεστημένο **158**. (α) H_2 , Pd ενεργοποιημένο σε C (10% κ.β.), άνδρη MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, (β) φρέσκο διάλυμα TfN_3 (10.0 eq) σε CH_2Cl_2 0.5 M, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0.05 eq), Et_3N (20.0 eq), MeOH / H_2O (6:4, v/v) (0.2 M), 12 h, 25°C, 72% σε 2 βήματα, (γ) διάλυμα προπαργυλοβρωμιδίου σε τολουόλιο 80% κ.β. (1.1 eq), NaH (5.0 eq), TBAI (0.1 eq), άνδρη τολουόλιο (0.7 M), 12 h, 25°C, 88%, (δ) διάλυμα προπαργυλοβρωμιδίου σε THF 80% κ.β. (1.1 eq), NaH (5.0 eq), TBAI (0.1 eq), άνδρη THF (0.1 M), 12 h, 25°C,¹⁷⁸ (ε) CH_3COOH (0.8 eq) / H_2O (8:2, v/v) (0.02 M), 12 h, 25°C, (στ) διάλυμα PMe_3 (5.0 eq) σε THF 0.1 M, υδ. NaOH 0.1 M (0.05 eq), άνδρη THF (0.1 M), 12 h, 25°C, 96% σε 2 βήματα.

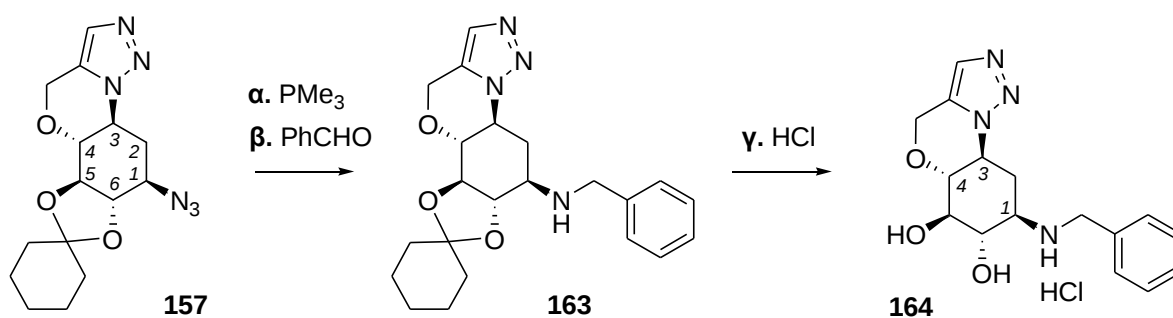
Περαιτέρω άκαμπτα παράγωγα της 2-DOS έγιναν με βάση την υποκατάσταση της αμινομάδας στη θέση-1 της 2-DOS, μέσω σύζευξης με τα Boc-προστατευμένα καρβοξυλικά οξέα **149** (Σχήμα 7.4) και **159**, που με αποπροστασία οδηγούν στην πλευρική αλυσίδα της αμικασίνης και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), αντιστοίχως (Σχήμα 7.7).

Έτσι, ξεκινώντας από το τρικυκλικό μόριο **157** έγινε αναγωγή του αζιδίου προς την αντίστοιχη αμίνη και ακολούθως έλαβε χώρα σύζευξη της ελεύθερης αμινομάδας με το Boc-προστατευμένο γ-αμινοβουτυρικό οξύ **159** και το Boc-προστατευμένο σουκκινιμικό εστέρα **149**, αντιστοίχως. Με υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου πραγματοποιήθηκε αποπροστασία τόσο της καρβοβενζοξυ-ομάδας, όσο και της κυκλο-εξυλιδενοκετάλης καταλήγοντας τελικά στα υδροχλωρικά άλατα των μορίων **161** και **162** αντιστοίχως (Σχήμα 7.7).



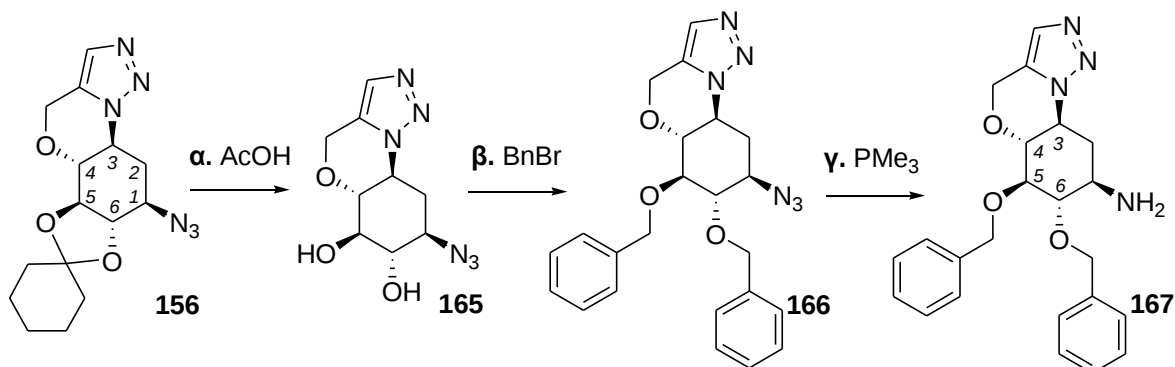
Σχήμα 7.7. Ακαμπτα τριαζολικά ανάλογα της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-3: 1,3,4-τριυποκατεστημένα **161** και **162**: (α) διάλυμα PMe_3 (5.0 eq) σε THF 0.1 M, υδ. NaOH 0.1 M (0.05 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 12 h, 25°C, (β) **159** (3.0 eq), EDC.HCl (3.0 eq), DIPEA (4.0 eq), 4-DMAP (1.1 eq), άνυδρο CH_3CN (0.3 M), 12 h, 25°C, 68% σε 2 βήματα, (γ) υδ. HCl 4.0 M, οξικός αιθυλεστέρας (0.2 M), 12 h, 25°C, 79% για το **161** και 76% σε 3 βήματα για το **162**, (δ) **149** (2.1 eq), κορ. υδ. διάλ. NaHCO_3 (καταλυτικό), 1,4-διοξάνιο / H_2O (3:1, v/v) (0.1 M), 12 h, 25°C.

Πάλι με μόριο εκκίνησης την αμίνη **157** αυτήν τη φορά έγινε αναγωγική αμίνωση με βενζαλδεϋδη. Η υποκατάσταση με ομάδα που φέρει αρωματικό δακτύλιο υπαγορεύθηκε αφ' ενός από βιβλιογραφικά δεδομένα για μόρια με παρόμοια υποκατάσταση, αφ' ετέρου από υπολογιστικές μελέτες, όπου φαίνεται ότι μια τέτοια ομάδα οδηγεί σε αύξηση της βιολογικής δραστηριότητας. Η προκύπτουσα αρωματικά υποκατεστημένη αμίνη **163** κατόπιν υπεβλήθη σε αποπροστασία της κυκλοεξυλιδενοκετάλης σε όξινες συνθήκες με υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, οδηγώντας στο τελικό προϊόν **164** (Σχήμα 7.8).



Σχήμα 7.8. Άκαμπτο τριαζολικό ανάλογο της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-3: 1,3,4-τριϋποκατεστημένο **164**: (α) διάλυμα PMe_3 (5.0 eq) σε THF 0.1 M, υδ. NaOH 0.1 M (0.05 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 12 h, 25°C, (β) PhCHO (1.1 eq), NaBH_3CN (1.5 eq), ακετονιτρίλιο / H_2O (19:1, v/v) (0.1M), 12 h, 25°C, 36% σε 2 βήματα, (γ) υδ. HCl 1.0 N, MeOH (0.1 M), 12 h, 25°C, 94%.

Για τη σύνθεση άκαμπτων τριαζολικών αναλόγων της 2-DOS με υποκατάσταση στα 5- και 6-υδροξύλια του δακτυλίου της 2-DOS, ξεκινήσαμε από το μόριο **157** του σχήματος 7.6, στο οποίο και αποπροστατεύσαμε την κετάλη του με οξικό οξύ λαμβάνοντας τη διόλη **165** (Σχήμα 7.9). Αρχικά, επιχειρήθηκε η εκλεκτική υποκατάσταση του 6-OH με το πρόσφατα παρασκευασθέν (3-ιωδοπροποξυ)-(tert-βουτυλο)-διμεθυλοσιλάνιο και υδρίδιο του νατρίου, που όμως δεν οδήγησε στο επιθυμητό προϊόν. Παρόμοια αδυναμία λήψης του επιθυμητού προϊόντος παρατηρήθηκε και με χρήση ενός καλύτερου ηλεκτρονιόφιλου, όπως είναι ο μεθανοσουλφονικός 3-ιωδοπροπυλεστέρας όπου η μεσυλομάδα ήταν καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από το ιόν ιωδιδίου.



Σχήμα 7.9. Άκαμπτο τριαζολικό ανάλογο της 2-DOS με χρήση της χημείας click στο N-3: 3,4,5,6-τετραϋποκατεστημένο **167**: (α) CH_3COOH (0.8 eq) / H_2O (8:2, v/v) (0.02 M), 12 h, 25°C, 85%, (β) BnBr (3.0 eq), NaH 60% διασπορά σε ορυκτέλαιο (2.5 eq), TBAI (0.1 eq), άνυδρο DMF (0.1 M), 12 h, 25°C, 93%, (γ) διάλυμα PMe_3 (5.0 eq) σε THF 0.1 M, υδ. NaOH 0.1 M (0.05 eq), άνυδρο THF (0.1 M), 12 h, 25°C, 62%.

Η υποκατάσταση των 5- και 6-υδροξυλίων του μορίου **157** πραγματοποιήθηκε επιτυχώς με βενζυλοβρωμίδιο σε βασικές συνθήκες, οπότε αμφότερα τα υδροξύλια μετατράπηκαν στους αντίστοιχους βενζυλαιθέρες και παρελήφθη το προϊόν **166** (Σχήμα 7.9). Το αζίδιο **166** μετατράπηκε

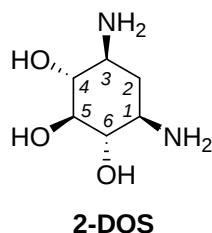
στην αντίστοιχη αμίνη με τριμεθυλοφωσφίνη μέσω αναγωγής Staudinger, οδηγώντας στο αρωματικά υποκατεστημένο τελικό προϊόν **167** (Σχήμα 7.9).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Βιολογική μελέτη των νεοσυντιθέμενων αναλόγων της 2-δεοξυστρεπταμίνης (2-DOS)

8.1. Εισαγωγή

Βασικός στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη στρατηγικών για τη σύνθεση νέων τροποποιημένων αναλόγων της 2-DOS (Σχήμα 8.1) που δυνητικά θα δεσμεύονται ισχυρά και επιλεκτικά με το αποκωδικοποιητικό κέντρο του RNA, το A-site. Στην κοιλότητα του A-site υπάρχει ένα δομικό στοιχείο υψίστης σημασίας: ένας εσωτερικός βρόχος που περιέχει δύο αδενίνες, την A1492 και την A1493. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι αδενίνες του A-site αναγνωρίζουν το σωστό ταίριασμα κωδικονίου-αντικωδικονίου μέσω της υιοθέτησης συγκεκριμένων διαμορφώσεων.^{180,181} Ο ρόλος των αμινογλυκοζιτών ουσιαστικά έγκειται στη συμπλοκοποίησή τους με το A-site, ούτως ώστε να κλειδωθούν οι προαναφερθείσες αδενίνες στη διαμόρφωση εκείνη που αναγνωρίζει ότι το tRNA που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί είναι το σωστό, με μοιραίο αποτέλεσμα την επαγωγή λαθών κατά την πρωτεϊνοσύνθεση.¹⁸²

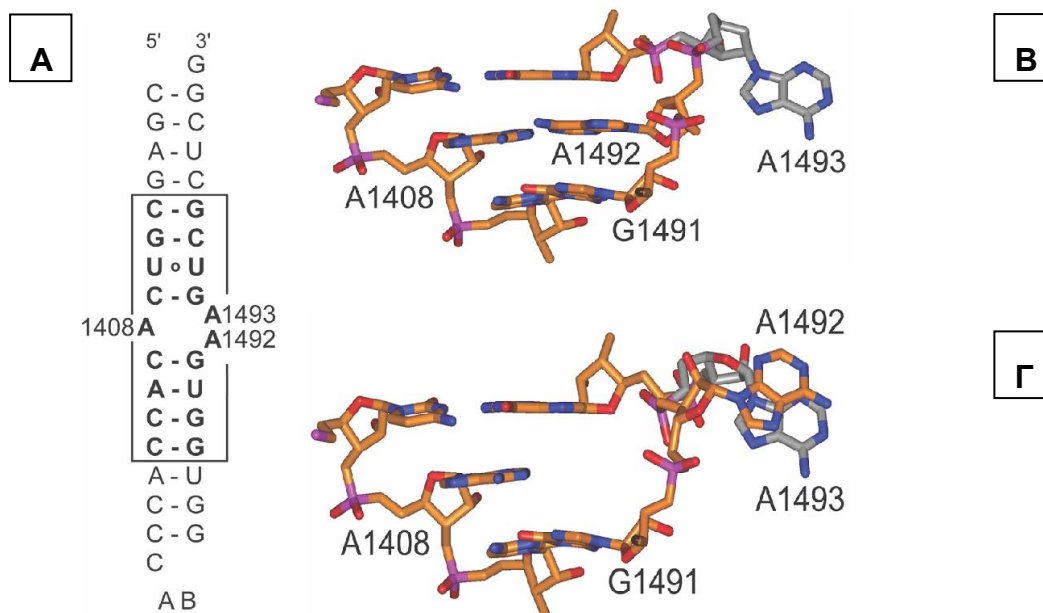


Σχήμα 8.1. Η δομή της 2-δεοξυστρεπταμίνης (2-DOS) με βάση την οποία συντέθηκαν τα αμινογλυκοζιτικά ανάλογα της εργασίας.

8.2. Χημική συγγένεια με το A-site (Affinity)

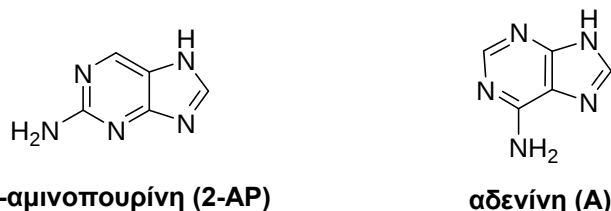
Κρυσταλλογραφικές μελέτες έδειξαν αρχικά τη δομή κρυστάλλων ολιγονουκλεοτιδίων οι οποίες περιείχαν το αποκωδικοποιητικό κέντρο A-site (σχήμα 8.2, A) και εν συνεχεία αναπαρήχθησαν πιστά τα σύμπλοκα ριβοσώματος / αμινογλυκοζιτών κατά τη δέσμευσή τους με

αυτούς.¹⁸³ Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών φανέρωσαν τις διαμορφώσεις των δύο αδενινών στο βρόχο του RNA: η μεν αδενίνη A1493 ήταν μόνιμα στο εξωτερικό του βρόχου, η δε αδενίνη A1492 εμφανιζόταν είτε στο εσωτερικό (σχήμα 8.2, Β) όπου υπήρχε πλήρης αλληλεπικάλυψη με τη G1491, είτε στο εξωτερικό όπου υπήρχε μερική αλληλεπικάλυψη με την A1493 (σχήμα 8.2, Γ). Η δεύτερη διαμόρφωση της A1492 αδενίνης ήταν ίδια με την παρατηρούμενη κατά τη δέσμευση των αμινογλυκοζιτών με το A-site.



Σχήμα 8.2. Α) Κομμάτι του ολιγονουκλετιδίου που χρησιμοποιήθηκε το οποίο περιέχει το A-site. Β) Κρυσταλλική δομή του A-site με την αδενίνη A1492 στο εσωτερικό της κοιλότητας του. Γ) Κρυσταλλική δομή του A-site με την αδενίνη A1492 στο εξωτερικό της κοιλότητας του.¹⁸³

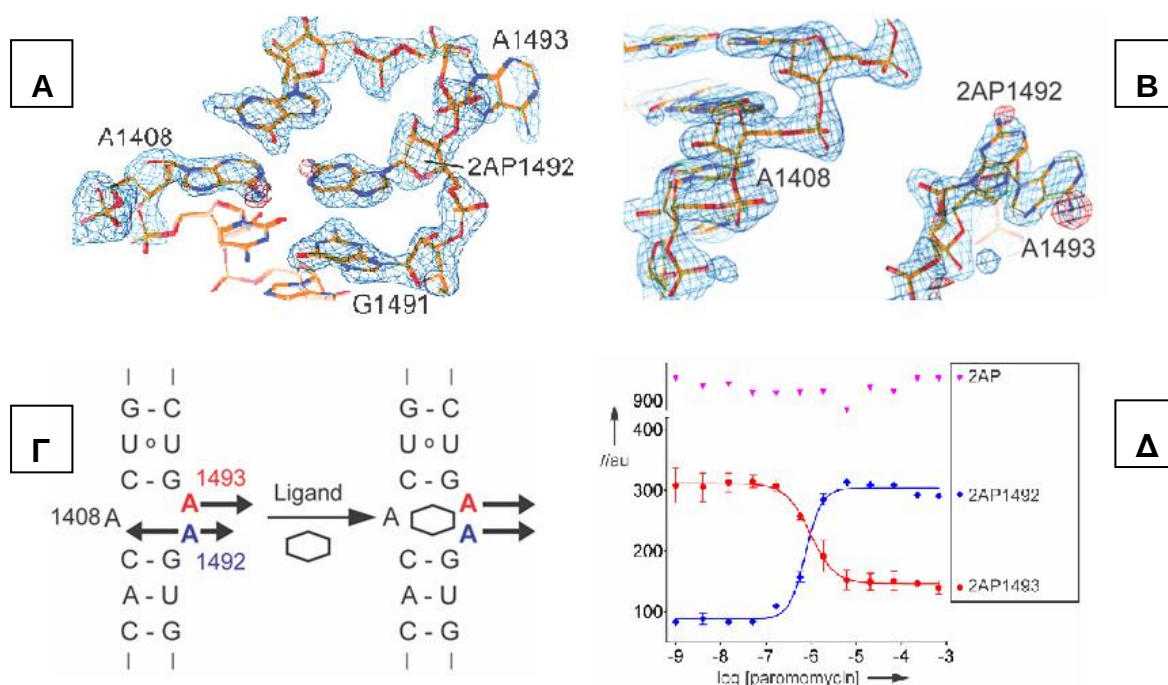
Έχοντας ως σκοπό να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη των προηγούμενων διαμορφώσεων σε διάλυμα, έγινε αντικατάσταση μίας εκ των δύο αδενινών, της A1492 ή της A1493, από τη φθορίζουσα βάση 2-αμινοπουρίνη (2-AP) (Σχήμα 8.3).¹⁸⁴ Στη μέθοδο αυτή, που ανέπτυξε η ερευνητική ομάδα του Hermann,¹⁸⁵ το αναμενόμενο ποσοστό του μετρούμενου φθορισμού θα αυξομειωνόταν αναλογικά με το ποσοστό αλληλεπικάλυψης με τις άλλες βάσεις του βιολογικού υποστρώματος.



Σχήμα 8.3. Δομές της 2-αμινοπουρίνης (φθορίζον μοριακός δείκτης) και της αδενίνης.

Πράγματι, αντικατάσταση της A1492 οδήγησε σε προϊόν χαμηλού φθορισμού, αποδεικνύοντας έτσι ότι η βάση της 2AP1492 βρίσκεται στο εσωτερικό του βρόχου (σχήμα 8.4, Α). Στον αντίποδα βρέθηκε η εναλλαγή της βάσης A1493, η οποία δίνοντας προϊόν υψηλού φθορισμού κατέδειξε σημαντική έκθεσή της στο διάλυμα, συνεπώς στο εξωτερικό του βρόχου. Επιπροσθέτως, σε αμφότερες τις περιπτώσεις, η κρυσταλλική δομή προσομοίαζε ιδανικά αυτής των αρχικών ολιγονουκλεοτιδίων.

Με βάση τα παραπάνω, η μελέτη της δέσμευσης των αμινογλυκοζιτών με το A-site επελέγη να γίνει με χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων 2AP1492 και 2AP1493 ως εκπροσώπων του A-site.¹⁸² Έτσι με τιτλοδότηση της παρομομυκίνης σε διάλυμα RNA επισημασμένου με την 2AP1492 ή την 2AP1493, παρατηρήθηκαν τα εξής αποτελέσματα: στο διάλυμα με την 2AP1492 υπήρξε δραματική αύξηση του φθορισμού (σχήμα 8.4, Δ ερυθρό), ενώ σε εκείνο με την 2AP1493 έγινε απόσβεσή του (σχήμα 8.4, Δ κυανό).



Σχήμα 8.4. **Α)** Κρυσταλλική δομή του ελεύθερου A-site όπου η 2-AP1492 βρίσκεται στο εσωτερικό της κοιλότητάς του. **Β)** Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου A-site / παρομομυκίνης μετά από αφαίρεση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας της παρομομυκίνης, όπου η 2-AP1492 έχει εκτοπιστεί στο εξωτερικό της κοιλότητας του A-site. **Γ)** Σχηματική απεικόνιση της μετατόπισης της A1492 του A-site κατά την σύμπλεξή του με το αντιβιοτικό. **Δ)** Γραφική παράσταση του φθορισμού της 2-AP1492 (ερυθρό) και 2-AP1493 (κυανό) επισημασμένου A-site, αλλά και της ελεύθερης 2-AP (ροζ) συναρτήσεως της συγκέντρωσης της παρομομυκίνης.

Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν υπέρ ενός μηχανισμού κατά τον οποίο το υπόλειμμα στη θέση 1492 βρίσκεται αρχικά στο εσωτερικό του βρόχου του RNA και φθορίζει ελάχιστα, λόγω

ισχυρής αλληλεπικάλυψης με τις βάσεις που το περιβάλλουν. Η ακόλουθη δέσμευση της παρομομυκίνης στο αποκωδικοποιητικό κέντρο έχει σαν αποτέλεσμα τον εκτοπισμό του υπολείμματος αυτού στο εξωτερικό της δεσμικής κοιλότητας. Στη νέα αυτή θέση η 2AP1492 αλληλεπικαλύπτεται με την A1493, η αλληλεπικάλυψη όμως είναι μικρής ισχύος οπότε παρατηρείται αύξηση του φθορισμού (σχήμα 8.4, Β-Γ).

Στην περίπτωση της 2AP1493 συμβαίνει η αντίθετη διαδικασία με αυτήν της A1492. Η 2AP1493 βρίσκεται αρχικά στο εξωτερικό του βρόχου και με τη δέσμευση της παρομομυκίνης εκτοπίζεται στο εσωτερικό όπου η αλληλεπικάλυψη είναι υψηλή, κατά συνέπεια ο παρατηρούμενος φθορισμός μειώνεται. Η ορθότητα των υποθέσεων για το μηχανισμό επιβεβαιώθηκε από το γεγονός ότι και στις δύο περιπτώσεις οι τιμές των συγκεντρώσεων παρομομυκίνης που απαιτούνταν για να πραγματοποιηθεί μεταβολή του φθορισμού κατά 50% (EC_{50}), ήταν σε συμφωνία με τις προβλεπόμενες από τη συγγένεια δέσμευσης (K_A) της παρομομυκίνης για το A-site μετρούμενη από διαφορετικές μεθόδους.¹⁸⁶ Η ευκολία εφαρμογής της μεθόδου, καθώς επίσης και η αξιοπιστία της,^{187,188} οδήγησε στην επιλογή της προκειμένου να γίνει ο υπολογισμός της K_A του εκάστοτε συντιθέμενου αναλόγου της 2-DOS.

8.3. Προσδιορισμός βιολογικής δραστηριότητας: Μέθοδος IVT

Ο προσδιορισμός της αντιβιοτικής δράσης των αναλόγων της 2-DOS έγινε με βιολογικό έλεγχο της *in vitro* μεταγραφής-μετάφρασης (IVT: *in vitro* transcription-translation).¹⁸⁹ Κατά τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται ένα βακτηριακό εκχύλισμα S30 (*Promega*), το οποίο περιέχει λειτουργικά ριβοσωμάτια και έχει τη δυνατότητα *in vitro* σύνθεσης πρωτεϊνών παρουσία του κατάλληλου DNA με τα απαιτούμενα γονίδια. Συγκεκριμένα, προσθήκη DNA στο προαναφερθέν εκχύλισμα το οποίο μάλιστα περιέχει το γονίδιο του ενζύμου της λουσιφεράσης, οδηγεί στην έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης για περιορισμένο χρονικό διάστημα, οπότε η διαδικασία παραγωγής διακόπτεται. Η ποσότητα της λουσιφεράσης που συντίθεται υπολογίζεται έμμεσα με την προσθήκη περίσσειας λουσιφερίνης, καθώς η δημιουργία του συμπλόκου λουσιφερίνης-λουσιφεράσης επάγει φωταύγεια ανάλογης έντασης με την ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης λουσιφεράσης.

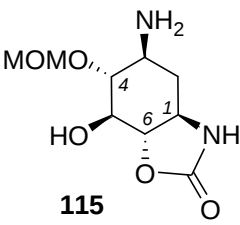
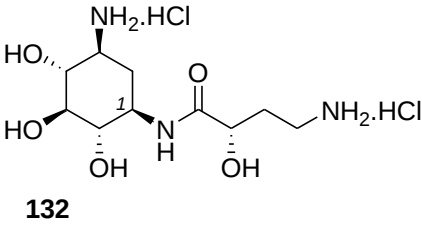
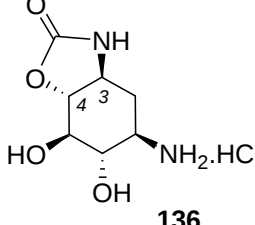
Σύμφωνα με την προηγούμενη αρχή λειτουργίας της μεθόδου, η παρουσία ενός αντιβιοτικού που εμποδίζει την πρωτεϊνοσύνθεση προκαλεί μείωση της ποσότητας της παραγόμενης λουσιφεράσης, κατά συνέπεια μείωση της φωταύγειας. Με προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του ίδιου αντιβιοτικού συντάσσεται μία καμπύλη της εν λόγω συγκέντρωσης συναρτήσεως της φωταύγειας, με βάση την οποία πραγματοποιείται υπολογισμός της συγκέντρωσης που προκαλεί μείωση της φωταύγειας κατά 50% σε σχέση με τη μέτρηση απουσία αντιβιοτικών (IC_{50}), η οποία και χρησιμοποιείται ως μέτρο σύγκρισής τους.

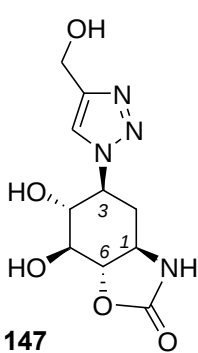
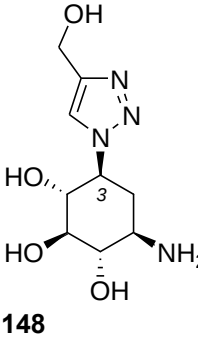
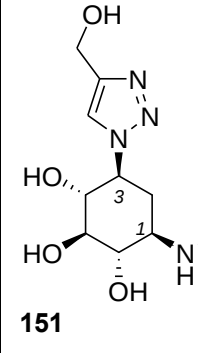
8.4. Αποτελέσματα των βιολογικών μετρήσεων και συμπεράσματα

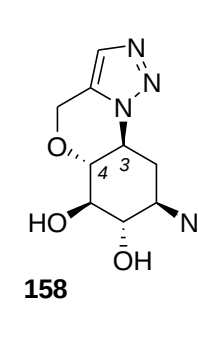
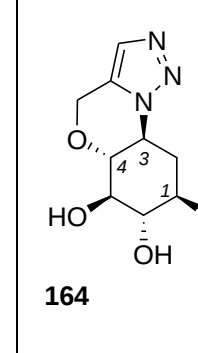
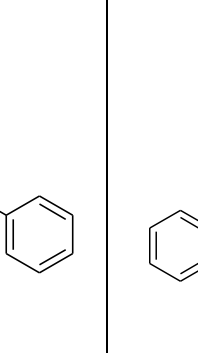
Τα ανάλογα της 2-δεοξυστρεπταμίνης θα μπορούσαν να εξεταστούν αφ' ενός ως προς την αντιβιοτική τους δράση, αφ' ετέρου ως προς την εκλεκτικότητά τους για πρόσδεση στο A-site του RNA, με την προϋπόθεση όμως ότι μετά τη σύνθεσή τους αποπροστατεύονταν πλήρως. Τα τελικά μόρια οφείλουν να φέρουν ελεύθερες υδροξυλομάδες και αμινομάδες, εκτός αν κρίνεται αναγκαίο στα πλαίσια διερεύνησης της σχέσης δομής-δραστηριότητας να υπάρχει υποκατάσταση. Για να έχουμε μέτρο σύγκρισης της βιολογικής δραστηριότητας των αναλόγων που συνετέθησαν, μετρήθηκαν επίσης η νεαμίνη και η νεομυκίνη B. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 8.1. Η εν λόγω βιολογική μελέτη πραγματοποιήθηκε από τη Δρ. Γεωργία Κυθραιώτη στο εργαστήριο Χημικής Βιολογίας του Δρ. Δ. Βουρλούμη.

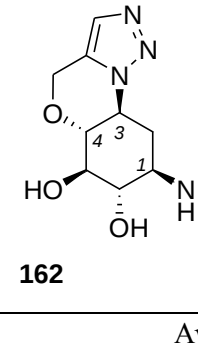
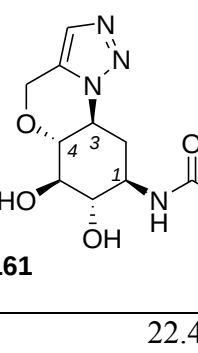
Πίνακας 8.1. Τιμές των συγκεντρώσεων EC_{50} και IC_{50} που βρέθηκαν κατά τη μέτρηση των αναλόγων της 2-DOS συγκρινόμενων με τους φυσικούς αμινογλυκοζίτες νεομυκίνη B και νεαμίνη.

Φυσικός αμινογλυκοζίτης	Νεομυκίνη B	Νεαμίνη
Affinity (EC_{50})	7 nM	8 μ M
IVT (IC_{50})	32 nM	21.6 μ M

Ανάλογο της 2-DOS (κεφάλαιο 6)	 115	 132	 136
Affinity (EC_{50})	173 μ M	Εκκρεμεί μέτρηση	73.4 μ M
IVT (IC_{50})	162 μ M	14 μ M	118 μ M

Ανάλογο της 2-DOS (κεφάλαιο 7)	 147	 148	 151
Affinity (EC ₅₀)	21 μM	Ανενεργό	Ανενεργό
IVT (IC ₅₀)	37.7 μM	468 μM	66.5 μM

Ανάλογο της 2-DOS (κεφάλαιο 7)	 158	 164	 167
Affinity (EC ₅₀)	53 μM	69 μM	50 μM
IVT (IC ₅₀)	317 μM	Εκκρεμεί μέτρηση	29 μM

Ανάλογο της 2-DOS (κεφάλαιο 7)	 162	 161
Affinity (EC ₅₀)	Ανενεργό	22.4 μM
IVT (IC ₅₀)	104 μM	55.5 μM

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 8.1, συμπεραίνουμε τα εξής:

1) Συγκρίνοντας τα ανάλογα της 2-DOS του κεφαλαίου 6 **115** και **136**, υπάρχει ένδειξη ότι η παρουσία του *trans*-οξαζολιδινικού δακτυλίου αρκεί για να δώσει πρόσδεση στο RNA (σε σχέση με

την τιμή IVT της νεαμίνης, είδαμε 7.5 και 5.5 φορές μεγαλύτερες τιμές για κάθε ανάλογο αντιστοίχως).

2) Η παρουσία της μεθοξυμεθυλομάδας ως Ο-υποκαταστάτης στο ανάλογο **115** ενδεχομένως να ευθύνεται για τη μείωση της εκλεκτικής πρόσδεσης στο A-site κατά 2.4 φορές σε σχέση με το ανάλογο **136**. Σε σχέση με τη νεαμίνη, τα εν λόγω ανάλογα έχουν 21.6 και 9.2 φορές μικρότερη εκλεκτικότητα, αντιστοίχως.

3) Στην επόμενη τριπλέτα παραγώγων, έχουμε τα εύκαμπτα παράγωγα της 2-DOS **147**, **148** και **151** του κεφαλαίου 7 με χρήση της *click*-χημείας. Η απουσία του *trans*-οξαζολιδινικού δακτυλίου στα **148** και **151** πιθανότατα ευθύνεται για την έλλειψη εκλεκτικής πρόσδεσης στο A-site, ενώ το **147** που φέρει οξαζολιδινόνη εμφανίζει 2.6 φορές μικρότερη εκλεκτικότητα σε σχέση με τη νεαμίνη.

4) Το παράγωγο **147** που φέρει οξαζολιδινόνη, έχει 1.7 φορές μικρότερη ικανότητα πρόσδεσης στο RNA απ'ότι η νεαμίνη, ενώ τα **148** και **151** έχουν 21.7 και 3.1 φορές μικρότερες τιμές αντιστοίχως. Το γεγονός ότι το **151** έχει 7 φορές καλύτερη πρόσδεση από το **148** ενώ και στα δύο απουσιάζει ο *trans*-οξαζολιδινικός δακτύλιος, ενδέχεται να οφείλεται στο ότι το **151** φέρει ως N-3 υποκατάσταση την αλυσίδα της αμικασίνης, ενώ το **148** έχει ελεύθερη αμινομάδα.

5) Η επόμενη τριπλέτα περιλαμβάνει τα άκαμπτα παράγωγα της 2-DOS με τη χρήση της *click*-χημείας. Το **158** έχει 14.7 φορές μικρότερη πρόσδεση στο RNA και 6.6 φορές μικρότερη εκλεκτικότητα στο A-site σε σχέση με τη νεαμίνη.

6) Το άκαμπτο παράγωγο **167** έχει αρωματική υποκατάσταση και παρουσιάζει 1.3 φορές μικρότερη πρόσδεση στο RNA απ'ότι η νεαμίνη. Επίσης, τα **164** και **167** επιδεικνύουν εκλεκτικότητα πρόσδεσης στο A-site 8.6 και 6.3 φορές μικρότερη της νεαμίνης, αντιστοίχως.

7) Τέλος, τα άκαμπτα παράγωγα **161** και **162** είναι αμφότερα N-1 υποκατατεστημένα, με μόνη διαφορά ότι το **161** είναι γ-αμινοβουτυρικό αμίδιο, ενώ το **162** είναι γ-αμινο-α-υδροξυβουτυρικό αμίδιο. Ίσως αυτός να είναι ο λόγος που το **161** αφ'ενός έχει 2.8 φορές μικρότερη εκλεκτικότητα για το A-site από τη νεαμίνη σε αντίθεση με το **162** που δεν παρουσιάζει καμία εκλεκτικότητα, αφ'ετέρου έχει 1.9 φορές καλύτερη πρόσδεση στο RNA απ'ότι το **162**.

Κεφάλαιο 9

1. Πειραματικές μέθοδοι και χαρακτηρισμοί ενώσεων

9.1. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των ενώσεων που περιγράφονται σε αυτήν την εργασία ήταν εμπορικά προϊόντα των εταιρειών Aldrich, Fluka, Merck, Alfa Aesar και Novozymes. Η καθαρότητα των αντιδραστηρίων ήταν 99% και άνω και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Οι διαλύτες ήταν υψηλής καθαρότητας (>99%) των εταιριών Labscan, SDS, Merck, Riedel de Haën και Panreac. Στις περιπτώσεις που απαιτήθηκε η χρήση ξηρών διαλυτών, οι εμπορικοί διαλύτες υπέστησαν περαιτέρω επεξεργασία. (THF: απόσταξη υπεράνω μεταλλικού νατρίου, DMF: ανάδευση με ενεργοποιημένα μοριακά κόσκινα MS 4Å και απόσταξη, CH₂Cl₂: απόσταξη υπεράνω υδριδίου του ασβεστίου).

9.2. Χρωματογραφική ανάλυση και χρωματογραφικός καθαρισμός

Για τον έλεγχο της πορείας των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδος (Thin layer chromatography, TLC). Οι χρωματογραφικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες πάχους 0.25mm επιστρωμένες με silica gel και φθορίζον υλικό που απορροφά στα 254nm της εταιρίας Merck (TLC Silica gel 60 F₂₅₄). Τα συστήματα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στις πειραματικές μεθόδους για κάθε ένωση ξεχωριστά. Για την εμφάνιση των χρωματογραφιών χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι, ανάλογα με την περίπτωση:

- α) Υπεριώδης ακτινοβολία
- β) Ψεκασμός με υδατικό διάλυμα 1% θεικού δημητρίου [Ce(SO₄)₂], 3% φωσφομολυβδαινικού οξέος (12MoO₃·H₃PO₄) και 6% π. H₂SO₄ και θέρμανση.
- γ) Ψεκασμός με υδατικό διάλυμα 1% KMnO₄, 6.6% K₂CO₃ και 1.6% υδατικού διαλύματος NaOH 5% και θέρμανση.
- δ) Ψεκασμός με διάλυμα νινυδρίνης 0.5% σε αιθανόλη.

Οι ενώσεις που περιγράφηκαν σε αυτήν την εργασία καθαρίστηκαν με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης Silica gel 60 (0.040-0.063mm) της εταιρίας Merck. Τα συστήματα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στις πειραματικές μεθόδους για κάθε ένωση ξεχωριστά.

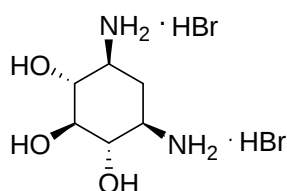
9.3. Χαρακτηρισμοί ενώσεων

Φασματοσκοπία μάζας: Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν σε όργανο φασματοσκοπίας μαζών APEX II FT-ICR με την μέθοδο ESI.

Μετρήσεις οπτικής ικανότητας: Οι μετρήσεις οπτικής ικανότητας έγιναν σε πολωσίμετρο τύπου Perkin Elmer 241.

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR): Οι ενώσεις που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία χαρακτηρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν με ^1H , ^{13}C , COSY και HSQC φασματοσκοπία NMR. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε όργανα 500 MHz και 250 MHz Bruker. Τα φάσματα ^{13}C είναι πλήρως αποσυνζευγμένα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των δειγμάτων ήταν CDCl_3 , CD_3OD , DMSO-d_6 και D_2O της εταιρείας Merck. Η κλίμακα των χημικών μετατοπίσεων είναι βαθμονομημένη σύμφωνα με τη χημική μετατόπιση του πρωτονιωμένου συστατικού που βρίσκεται ως πρόσμιξη στους δευτεριωμένους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν. Οι τιμές αυτές ορίστηκαν βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων και είναι: α) CDCl_3 (7.26 ppm, χημική μετατόπιση πρόσμιξης CHCl_3), β) CD_3OD (3.31 ppm, χημική μετατόπιση πρόσμιξης CD_3OH γ) DMSO-d_6 (2.50 ppm, μέσος όρος χημικών μετατοπίσεων όλων των πιθανών δευτεριωμένων μορφών του $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ) D_2O (4.79 ppm, χημική μετατόπιση πρόσμιξης HDO). Συντμήσεις: singlet = s, doublet = d, triplet = t, multiplet = m, bs = broad singlet.

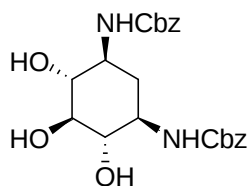
9.4. Συνθετικές μέθοδοι για τις ενώσεις του κεφαλαίου 5



Διβρωμικό άλας της 4,6-διαμινοκυκλοεξανο-1,2,3-τριόλης (2-DOS·2HBr) (72): Σε υδατικό διάλυμα HBr 48% (350 mL) προστίθεται τρισουλφιδικό άλας της νεομυκίνης B (50 g, 55 mmol) και ακολουθεί ανάδευση υπό βρασμό με επαναροή για 20 h. Το μίγμα της αντίδρασης

το οποίο έχει αποκτήσει μαύρο χρώμα, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και στο υπόλειμμα προστίθεται H_2O (200 mL) και ενεργός άνθρακας (10 gr). Το διάλυμα αυτό αφήνεται υπό ανάδευση στους 70°C για 30 min και διηθείται από Celite. Επαναλαμβάνεται η επεξεργασία με τον ενεργό άνθρακα έως ότου παραληφθεί διήθημα διαυγές, ελαφρώς κίτρινου χρώματος οπότε συμπυκνώνεται και το στερεό υπόλειμμα αφήνεται 18 h σε αντλία υψηλού κενού. Εν συνεχεία προστίθεται MeOH (100 mL) και το μίγμα αναδεύεται μέχρι μετατροπής του σε λεπτόκοκκο αιώρημα. Το αιώρημα αυτό διηθείται και το στερεό υπόλειμμα που διαχωρίζεται και το οποίο αποτελεί το υδροβρωμικό άλας της 2-DOS

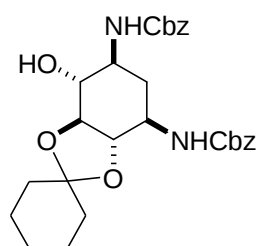
εκπλένεται με ψυχρή MeOH (2 x 30 mL) και ξηραίνεται υπό κενό αποδίδοντας 14.0 gr καθαρής 2-DOS. Το διήθημα συμπυκνώνεται και στο στερεό που προκύπτει επαναλαμβάνεται η προηγούμενη διαδικασία οπότε παραλαμβάνεται επιπλέον ποσότητα 2-DOS (1.7 gr) χαμηλότερης όμως καθαρότητας. Λευκό άμορφο στερεό. Απόδοση: 14.0 gr + 1.7 gr (84%). ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 1.91 (ddd, $J = 12.4, 12.4, 12.5$ Hz, 1H), 2.55 (ddd, $J = 4.3, 4.3, 12.5$ Hz, 1H), 3.36-3.46 (m, 2H), 3.50 (dd, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.62 (dd, $J = 9.3, 10.1$ Hz, 2H). Το προϊόν αυτό σε σύγκριση με προϋπάρχουσα βιβλιογραφική του μελέτη βρέθηκε καθ' όλα όμοιο.¹³³



***N,N*-διβενζυλοξυκαρβόνυλο-4,6-διαμινοκυκλοεξανο-1,2,3-τριόλη (73):** Το

υδροβρωμικό άλας της 2-DOS (72) (3.30 gr, 7.00 mmol) διαλύεται σε H_2O (8.5 mL), ελέγχεται το pH και μετά προστίθεται NaHCO_3 (4.40 gr, 52.5 mmol, 7.5 eq) ούτως ώστε το τελικό pH να είναι μεγαλύτερο του 9. Το

μείγμα που προκύπτει αναδεύεται για 20 min και αφού ψυχθεί στους 0°C , προστίθεται με αργό ρυθμό διάλυμα CbzCl (11 mL, 77.0 mmol, 11.0 eq) σε 1,4-διοξάνιο (8.5 mL) μέσα σε 1 h. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h, οπότε καταβυθίζεται το προϊόν **73** ως λευκό στερεό. Το μείγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα εκπλένεται με H_2O (3 x 20 mL), HCl 0.1N (3 x 20 mL), H_2O (3 x 20 mL), και διαιθυλαιθέρα (3 x 20 mL). Το στερεό ξηραίνεται καλά σε αντλία κενού και στην συνέχεια διαλύεται σε θερμό 1,4-διοξάνιο. Το ετερογενές διάλυμα διηθείται, και το διήθημα συμπυκνώνεται προκειμένου να παραληφθεί το τελικό προϊόν. Απόδοση 2.41 gr (89%). $R_f = 0.41$ σε 10% MeOH / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 1.34-1.48 (m, 1H), 2.06-2.16 (m, 1H), 3.17-3.30 (m, 3H), 3.30-3.34 (bs, 5H), 3.44-3.58 (m, 2H), 5.10 (bs, 5H), 7.24-7.49 (m, 10H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO) δ 31.5, 35.8, 52.5, 66.0, 74.9, 77.8, 128.7, 129.2, 138.1, 156.7.

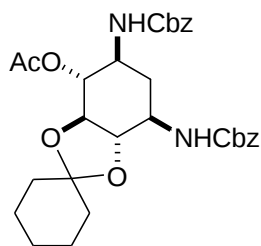


Ρακεμικό βενζυλο-(3aS,4R,5S,7R,7aS)-4-υδροξυ-εξαϋδρο-σπиро-[βενζο[d][1,3]διοξολο-2,1'-κυκλοεξανο]-5,7-διυλδικαρβαμίδιο (74): Σε

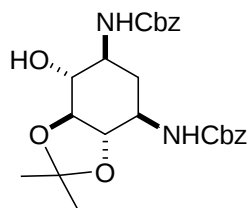
άνυδρο DMF (93 mL) που βρίσκεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου διαλύεται η τριόλη **73** (2.41 gr, 5.60 mmol) μαζί με $p\text{-TsOH}$ (160.0 mg, 0.84 mmol, 0.15 eq) και 1,1-διμεθοξυ-κυκλοεξάνιο (8.1 gr, 8.5 mL, 56.0 mmol, 10.0 eq). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h και μετά προστίθεται

Et_3N (130.3 mg, 0.18 mL, 1.29 mmol, 0.23 eq) και πραγματοποιείται συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Στο κολλώδες κίτρινο στερεό που απομένει γίνεται καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 20%→80% EtOAc / CHCl_3 / 1% Et_3N), οπότε απομονώνεται η αλκοόλη **74** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση 2.26 gr (79%). $R_f = 0.43$ σε 5% ακετόνη / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 1.32-1.47 (m, 3H), 1.49-1.74 (m, 8H), 2.09-2.20 (m, 1H), 3.36-3.48 (bs, 2H), 3.48-3.63 (m, 2H), 3.78 (bs, 1H), 5.06 (bs, 5H), 7.23-7.40 (m, 10H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ

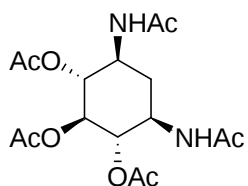
37.1, 37.3, 37.5, 50.4, 54.9, 67.5, 73.9, 79.7, 82.0, 113.0, 128.8, 128.8, 128.9, 129.4, 138.2, 158.2, 158.6; HRMS-ESI (m/z) $[M+Na]^+$ υπολογίστηκε για $C_{28}H_{32}N_2NaO_7$ 533.2264, βρέθηκε 533.2257.



Ρακεμικός οξικός [N,N-διβενζυλοξυκαρβόνυλο-4,6-διαμινοκυκλοεξανο-1,2-κυκλοεξυλιδενο] εστέρας (75): Η αλκοόλη **74** (27.6 mg, 0.054 mmol) διαλύεται σε πυριδίνη (0.2 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθεται Ac_2O στάγδην (27.0 mg, 25.5 μ L, 0.27 mmol, 5.0 eq). Το μίγμα αναδεύεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται MeOH (25 mL), ακολουθούν ακόμα 30 min ανάδευσης και έπειτα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (για πλήρη απομάκρυνση της πυριδίνης). Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5 $\rightarrow$ 20% EtOAc / CH_2Cl_2). Η ένωση **75** λαμβάνεται ως λευκό άμορφο στερεό. Απόδοση 20.5 mg (84%). R_f = 0.83 σε 40% EtOAc / CH_2Cl_2 . 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.12-1.30 (s, 7H), 1.30-1.48 (m, 3H), 1.48-1.66 (bs, 3H), 1.70 (m, 2H), 1.76-1.88 (m, 3H), 1.90 (s, 1H), 1.98 (s, 1H), 2.02 (s, 1H), 2.08-2.23 (bs, 1H), 2.23-2.41 (m, 3H), 2.48-2.66 (bs, 1H), 3.24-3.46 (m, 1H), 3.46-3.62 (m, 2H), 3.62-3.75 (bs, 1H), 3.75-3.89 (bs, 1H), 4.00-4.16 (m, 1H), 4.63-4.81 (bs, 1H), 4.85-5.24 (m, 6H), 5.44-5.65 (bs, 1H), 7.14-7.39 (m, 10H).

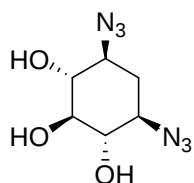


Ρακεμική N,N-διβενζυλοξυκαρβόνυλο-4,6-διαμινοκυκλοεξανο-1,2-ισοπροπυλιδενόλη (76): Σε άνυδρο DMF (0.2 mL) που βρίσκεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου διαλύεται η τριόλη **73** (20.0 mg, 0.047 mmol) μαζί με p-TsOH (1.3 mg, 0.0070 mmol, 0.15 eq) και 2,2-διμεθοξυπροπάνιο (49.0 mg, 57.8 μ L, 0.470 mmol, 10.0 eq). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h και μετά προστίθεται Et_3N (1.1 mg, 1.5 μ L, 0.011 mmol, 0.23 eq) και πραγματοποιείται συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Στο κολλώδες κίτρινο στερεό που απομένει γίνεται καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 30% $\rightarrow$ 80% EtOAc / CH_2Cl_2 / 1% Et_3N), οπότε απομονώνεται η αλκοόλη **76** υπό την μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση 18.8 mg (86%). R_f = 0.13 σε 50% EtOAc / CH_2Cl_2 . 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.50-1.68 (m, 1H), 2.39-2.60 (bs, 1H), 3.31-3.44 (bs, 1H), 3.47 (pseudot, J = 9.1 Hz, 1H), 3.56-3.67 (m, 1H), 3.67-3.77 (m, 1H), 3.77-3.90 (m, 1H), 4.82-4.99 (m, 2H), 4.99-5.20 (m, 4H), 7.28-7.43 (m, 10H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 26.7, 26.8, 29.7, 49.6, 53.8, 67.0, 67.3, 77.2, 128.2, 128.5, 128.6, 153.4.

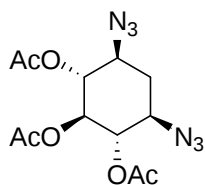


Οξικός [N,N-διβενζυλοξυκαρβόνυλο-4,6-διαμινοκυκλοεξανο-1,2-κυκλοεξυλιδενο] εστέρας (77): Το υδροβρωμικό άλας της 2-DOS (**72**) (200.0 mg, 0.617 mmol) διαλύεται σε πυριδίνη (1.5 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθενται 4-DMAP (7.5 mg, 0.062 mmol, 0.1 eq) και Ac_2O

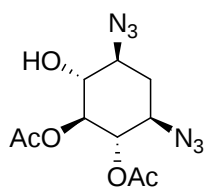
στάγδην (1.26 gr, 1.2 mL, 12.4 mmol, 20.0 eq). Το μίγμα αναδεύεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται MeOH (25 mL), ακολουθούν ακόμα 30 min ανάδευσης και έπειτα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (για πλήρη απομάκρυνση της πυριδίνης). Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→20% EtOAc / CH₂Cl₂). Η ένωση **77** λαμβάνεται ως λευκό άμορφο στερεό. Απόδοση: 193.0 mg (84%). R_f = 0.54 σε 10% MeOH / CHCl₃.



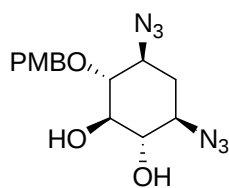
4,6-διαζιδοκυκλοεξανο-1,2,3-τριόλη (78): Το υδροβρωμικό άλας της 2-DOS (72) (8.0 gr, 25.0 mmol) διαλύεται σε H₂O (25 mL) και MeOH (98 mL) προστίθεται Et₃N (34 mL) και CuSO₄·5H₂O (611.0 mg, 2.5 mmol, 0.1 eq). Στην αντίδραση εισάγεται με αργό ρυθμό διάλυμα TfN₃ (17.5 gr, 0.1 mol, 5.0 eq) σε διχλωρομεθάνιο (100 mL), και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h οπότε παρατηρείται μεταβολή του χρώματος του από μπλε σε πράσινο. Το διάλυμα συμπυκνώνεται αλλά όχι μέχρι ξηρού καθώς το άνυδρο TfN₃ έχει αναφερθεί πως διαθέτει εκρηκτικές ιδιότητες. Γίνεται καθαρισμός του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 20%→80% EtOAc / Hexanes / 1% Et₃N) οπότε απομονώνεται η τριόλη **78** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 4.39 gr (82%) R_f = 0.69 σε 10% MeOH / EtOAc. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 1.46 (ddd, J = 12.4, 12.4, 12.5 Hz, 1H), 2.32 (ddd, J = 4.4, 4.4, 12.5 Hz, 1H), 3.35-3.42 (m, 3H), 3.46-3.56 (m, 2H). HRMS-ESI (m/z) [M+Na]⁺ υπολογίστηκε για C₆H₁₀N₆NaO₃ 237.0712, βρέθηκε 237.0709. Το προϊόν αυτό σε σύγκριση με προϋπάρχουσα βιβλιογραφική του μελέτη βρέθηκε καθ' όλα όμοιο.¹¹³



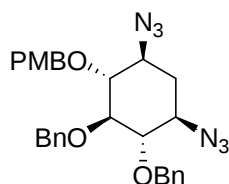
1,3-διαζιδο-4,5,6-τριακετυλο-2-δεοξυ-στρεπταμίνη (79): Το παράγωγο **78** (395.0 mg, 1.90 mmol) διαλύεται σε πυριδίνη (4.2 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και ψύχεται στους 0°C. Προστίθεται DMAP (24.0 mg, 0.200 mmol, 0.1 eq) και Ac₂O στάγδην (1.78 mL 19.0 mmol, 10.0 eq). Το μίγμα αναδεύεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται MeOH (25 mL), ακολουθούν ακόμα 30 min ανάδευσης και έπειτα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το στερεό υπόλειμμα διαλύεται σε EtOAc (5 mL) και το διάλυμα που προκύπτει εκπλένεται με HCl 1.0 N (5 mL x 2), NaHCO₃ 10% (5 mL x 2), και άλμη (5 mL). Η οργανική φάση συμπυκνώνεται και το στερεό που προκύπτει καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→20% EtOAc / Hexanes). Η ένωση **79** λαμβάνεται ως λευκό άμορφο στερεό. Απόδοση 517.2 mg (80%). R_f = 0.40 σε 20% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.55 (ddd, J = 12.7, 12.7, 13.5 Hz, 1H), 2.00 (s, 3H), 2.08 (s, 6H), 2.33 (ddd, J = 4.5, 4.5, 13.5 Hz, 1H), 3.54-3.63 (m, 2H), 5.00-5.08 (m, 3H). Το προϊόν αυτό σε σύγκριση με προϋπάρχουσα βιβλιογραφική του μελέτη βρέθηκε καθ' όλα όμοιο.¹¹³



1,3-διαζιδο-5,6-διακετυλο-2-δεοξυ-στρεπταμίνη (80): Το τριακετυλιωμένο παράγωγο **79** (480.0 mg, 1.40 mmoles) διαλύεται σε μίγμα τολουόλιου (11.1 mL) και ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού οξέος (11.1 mL, pH = 6.2). Προστίθεται το ένζυμο *Novozym 435* (1:1 w/w σε σχέση με την **79**, 480.0 mg, λιπάση *Candida Antarctica* ακινητοποιημένη πάνω σε μακροπορώδη στερεή φάση ρητίνης) και η αντίδραση αφήνεται υπό ανακίνηση για τρεις μέρες. Στη συνέχεια απομακρύνεται το ένζυμο με διήθηση, γίνεται διαχωρισμός των δύο φάσεων και η υδατική εκχυλίζεται με EtOAc (10 mL x 2). Τα εκχυλίσματα μαζί με την οργανική φάση της αντίδρασης συμπυκνώνονται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→20% EtOAc / Hexanes) οπότε παραλαμβάνεται η ένωση **80** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 275.6 mg (66%). R_f = 0.40 σε 20% EtOAc / Hexanes. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.46 (ddd, J = 12.5, 12.5, 13.3 Hz, 1H), 2.08 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.28 (ddd, J = 4.5, 4.5, 13.3 Hz, 1H), 3.43-3.51 (m, 1H), 3.53-3.63 (m, 2H), 4.91-5.00 (m, 2H). HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{NaO}_5$ 321.0923 βρέθηκε 321.0918. Το προϊόν αυτό σε σύγκριση με προϋπάρχουσα βιβλιογραφική του μελέτη βρέθηκε καθ' όλα όμοιο.¹¹³

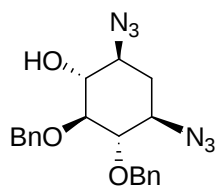


3-(4-μεθοξυβενζυλοξυ)-4,6-διαζιδοκυκλοεξανο-1,2-διόλη (81): Η ένωση **80** (50.0 mg, 0.168 mmoles) διαλύεται σε άνυδρο CH_2Cl_2 (0.5 mL) μαζί με CSA (4.0 mg, 1.6×10^{-2} mmoles, 0.1 eq). Προστίθεται στάγδην το παραμεθοξυβενζυλ-τριχλωρο-ακεταμίδιο (189.9 mg, 0.672 mmoles) και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Ακολούθως συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται μερικώς με χρωματογραφία στήλης. (Σύστημα έκλουσης: 5→20% Hexanes / EtOAc). R_f = 0.60 σε 30% EtOAc / Hexanes. Ακολούθως, στο προκύπτον προϊόν προστίθενται MeOH (2.5 mL), THF (0.25 mL) και διάλυμα MeONa σε MeOH (0.15 mL, 0.5M), το μίγμα αναδεύεται για 12 h στους 25°C και εκπλένεται με κορεσμένο NH_4Cl (3 mL x 2). Η οργανική φάση συμπυκνώνεται και το προϊόν **81** παραλαμβάνεται ως λευκό άμορφο στερεό μετά από χρωματογραφικό καθαρισμό του υπολείμματος (Σύστημα έκλουσης: 5→20% AcOEt / Hexanes). Απόδοση: 40.1 mg για τα δύο βήματα (72%). R_f = 0.15 σε 25% EtOAc / Hexanes. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.38 (ddd, J = 12.5, 12.5, 13.3 Hz, 1H), 2.17 (ddd, J = 4.1, 4.1, 13.3 Hz, 1H), 2.83 (s, 1H), 2.63 (s, 1H), 3.19 (d, J = 9.03 Hz, 1H), 3.28-3.47 (m, 4H), 3.80 (s, 3H), 4.66 (d, J = 10.6, 1H), 4.88 (d, J = 10.6, 1H), 6.90 (d, J = 8.4, 2H), 7.32 (d, J = 8.4 Hz, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 31.8, 54.9, 59.7, 59.7, 74.7, 74.9, 75.5, 83.0, 113.7, 129.5, 129.8, 159.2. HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{NaO}_4$ 357.1283, βρέθηκε 357.1283. Το προϊόν αυτό σε σύγκριση με προϋπάρχουσα βιβλιογραφική του μελέτη βρέθηκε καθ' όλα όμοιο.¹¹⁹

**1-[4,6-διαζιδο-2,3-δι(βενζυλοξυ)κυκλοεξυλοξυ]μεθυλ-4-μεθοξυβενζόλιο**

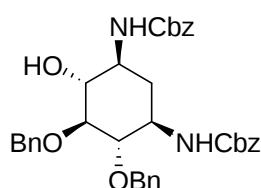
(82): Σε διάλυμα της ένωσης **81** (800.0 mg, 2.4 mmol) σε άνυδρο DMF (24 mL) το οποίο βρίσκεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα προστίθεται NaH (380.0 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 9.60 mmol, 4.0 eq). Το διάλυμα ψύχεται στους

0°C, αναδεύεται για 15 min και εισάγεται στάγδην BnBr (0.82 mL, 7.20 mmol, 3.0 eq). Η ανάδευση συνεχίζεται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και γίνεται εξουδετέρωση του NaH με στάγδην προσθήκη H₂O (1 mL). Εν συνεχεία, προστίθεται EtOAc (20 mL) και γίνεται έκπλυση με H₂O (3 x 20 mL). Η οργανική βάση συμπυκνώνεται και καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **82** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 5→20% AcOEt / Hexanes). Απόδοση: 763.0 mg (62%). $R_f = 0.80$ σε 20% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.31 (ddd, $J = 12.3$ Hz, 12.3, 13.4 Hz, 1H), 2.15 (ddd, $J = 4.1$, 4.1, 13.4 Hz, 1H), 3.31-3.48 (m, 4H), 3.50 (dd, $J = 8.9$, 9.0 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 4.78-4.91 (m, 6H), 6.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.25-7.33 (m, 10H). ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 29.5, 32.5, 55.0, 55.1, 60.3, 75.4, 75.7, 83.8, 84.1, 84.2, 113.7, 127.3, 127.5, 127.8, 128.1, 128.3, 128.3, 129.6, 129.8, 137.5, 138.1, 159.3. HRMS-ESI (m/z) [M+Na]⁺ υπολογίστηκε για C₂₈H₃₀N₆NaO₄ 537.2226, βρέθηκε 537.2218. Το προϊόν αυτό σε σύγκριση με προϋπάρχουσα βιβλιογραφική του μελέτη βρέθηκε καθ' όλα όμοιο.¹¹⁹

**4,6-διαζιδο-2,3-διβενζυλοξυ-κυκλοεξανόλη (83):**

Σε μίγμα CH₃CN / H₂O (9:1, 8 mL) προστίθεται το παράγωγο **82** (182.0 mg, 0.350 mmol) και CAN (970.0 mg, 1.77 mmol, 5.0 eq). Η αντίδραση αφήνεται για 1 h υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστίθεται EtOAc και το διάλυμα

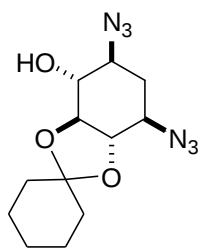
εκπλένεται με άλμη (2 x 8 mL) και κορεσμένο υδατικό διάλυμα K₂CO₃ (2 x 8mL). Η οργανική φάση συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→20% AcOEt / Hexanes). Το προϊόν **83** λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 132.5 mg (95%). $R_f = 0.20$ σε 20% AcOEt/Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.35 (ddd, $J = 12.7$, 12.7, 13.3 Hz, 1H), 2.19 (ddd, $J = 4.4$, 4.4, 13.3 Hz, 1H), 3.34-3.43 (m, 3H), 3.42-3.52 (m, 2H), 4.73 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 4.83-4.90 (m, 2H), 4.95 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 7.28-7.40 (m, 10H). Το προϊόν αυτό σε σύγκριση με προϋπάρχουσα βιβλιογραφική του μελέτη βρέθηκε καθ' όλα όμοιο.¹¹⁹

**1,3-(διβενζυλο-διυλδικαρβαμιδο)-5,6-διβενζυλο-2-δεοξυ-στρεπταμίνη**

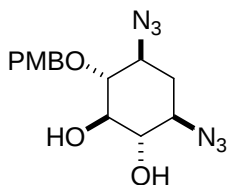
(84): Η ένωση **83** (35.5 mg, 0.090 mmol) διαλύεται σε THF (0.9 mL) και μετά προστίθεται πρώτα υδατικό διάλυμα NaOH 0.1 M (45.0 μL, 0.0045 mmol, 0.05 eq) και μετά διάλυμα PMe₃ 1.0 M σε THF (0.45 mL, 0.45

mmol, 5.0 eq). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h και μετά

συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Στο ελαιώδες υποκίτρινο υπόλειμμα που προκύπτει προστίθεται H₂O (1 mL), 1,4-διοξάνιο (0.5 mL), Na₂CO₃ (49.9 mg, 0.594 mmoles, 7.0 eq) και με αργό ρυθμό διάλυμα CbzCl (47.9 μL, 0.340 mmoles, 4.0 eq) σε 1,4-διοξάνιο (0.5 mL) μέσα σε 1 h. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 mL) και γίνεται έκπλυση με CH₂Cl₂ (3 x 2 mL), οι οργανικές φάσεις ενώνονται και εκπλένονται με άλμη (2mL). Η οργανική φάση συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→40% EtOAc / CH₂Cl₂). Το προϊόν **84** λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 52.8 mg (96%). R_f = 0.45 σε 30% EtOAc / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.35-1.50 (m, 1H), 2.29-2.43 (m, 1H), 3.34-3.48 (bs, 3H), 3.50-3.58 (bs, 1H), 3.58-3.68 (m, 1H), 4.63-4.71 (bs, 1H), 4.80 (dd, *J* = 11.3, 15.1 Hz, 2H), 4.91 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 4.95 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 5.01-5.16 (m, 4H), 7.30-7.41 (m, 10H). ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 29.7, 33.6, 51.1, 51.5, 66.7, 67.0, 74.8, 75.4, 75.5, 81.8, 84.6, 127.9, 128.0, 128.1, 128.5, 128.6, 136.2, 136.4, 137.9, 138.2, 155.8, 156.5.

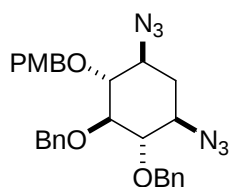


Ρακεμική 1,3-(διαζιδο)-εξαϋδρο-σπιρο-[βενζο[1,3]διοξολο-2,1'-κυκλοεξαν-4-όλη (85): Σε άνυδρο DMF (129 mL) που βρίσκεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου διαλύεται η τριόλη **78** (2.20 gr, 10.3 mmol) μαζί με p-TsOH (196.0 mg, 1.03 mmoles, 0.1 eq) και 1,1-διμεθοξυ-κυκλοεξάνιο (11.1 gr, 11.8 mL, 77.3 mmol, 7.5 eq). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 50°C για 5 h και μετά προστίθεται Et₃N (240.0 mg, 330 μL, 2.37 mmoles, 0.23 eq) και πραγματοποιείται συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Στο κολλώδες κίτρινο στερεό που απομένει γίνεται καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10%→80% EtOAc / Hexanes / 1% Et₃N), οπότε απομονώνεται η αλκοόλη **85** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση 2.88 gr (95%). R_f = 0.38 σε 25% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 1.19-1.39 (m, 2H), 1.39-1.50 (m, 2H), 1.54-1.75 (m, 8H), 2.14-2.25 (m, 1H), 3.36-3.48 (m, 3H), 3.56-3.68 (m, 1H), 3.68-3.78 (m, 1H). ¹³C NMR (250 MHz, CD₃OD) δ 24.7, 26.0, 34.7, 37.2, 37.3, 58.9, 64.2, 75.2, 80.5, 80.7, 113.7.

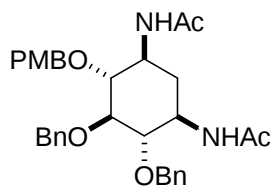


Ρακεμικό 1,3-διαζιδο-εξαϋδρο-σπιρο-[βενζο[1,3]διοξολο-2,1'-4-(4-μεθοξυβενζυλοξυ)-κυκλοεξάνιο (87): Σε διάλυμα της ένωσης **85** (500.0 mg, 1.70 mmoles) σε άνυδρο THF (22 mL) το οποίο βρίσκεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα προστίθεται NaH (63.7 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 2.55 mmoles, 1.5 eq). Το διάλυμα ψύχεται στους 0°C, αναδεύεται για 30 min και εισάγεται στάγδην PMBBBr ως διάλυμα σε άνυδρο THF 1.3M (477.0 mg, 2.55 mmoles, 1.5 eq). Η ανάδευση συνεχίζεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και γίνεται εξουδετέρωση του NaH με στάγδην προσθήκη κορεσμένου υδατικού διαλύματος NH₄Cl (1 mL). Εν συνεχεία, προστίθεται EtOAc (20 mL) και γίνεται έκπλυση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 x 20 mL) και άλμη (20 mL). Η οργανική

φάση συμπυκνώνεται και καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **86** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 10→30% AcOEt / Hexanes). Το προκύπτον προϊόν **86** διαλύεται σε THF / CH₃COOH / H₂O (3:3:1, v/v/v) (34 mL) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και προστίθεται στάγδην κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (1 mL). Εν συνεχεία, προστίθεται EtOAc (20 mL) και γίνεται έκπλυση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (2 x 20 mL) και άλμη (20 mL). Η οργανική φάση συμπυκνώνεται και καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **87** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 5→30% EtOAc / Hexanes). Απόδοση: 273 mg (48% σε 2 βήματα). *R*_f = 0.10 σε 20% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 2.13-2.25 (m, 1H), 3.20 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.29-3.50 (m, 4H), 3.74-3.79 (m, 1H), 3.81 (s, 1H), 4.78 (dd, *J* = 10.7, 102.3 Hz, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 31.9, 55.0, 55.0, 59.5, 59.8, 74.8, 75.0, 75.6, 83.0, 83.1, 113.5, 113.8, 113.9, 114.3, 129.6, 129.6, 129.6, 129.9, 159.3.

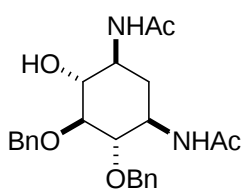


Ρακεμικό 1,3-διαζιδο-εξαϋδρο-σπιρο-[βενζο[1,3]διοξολο-2,1'-2,3-δι(βενζυλοξυ)-4-(4-μεθοξυβενζυλοξυ)-κυκλοεξάνιο (88): Σε διάλυμα της ένωσης **87** (55.0 mg, 0.165 mmoles) σε άνυδρο DMF (1.5 mL) το οποίο βρίσκεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα προστίθεται NaH (26.4 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 0.66 mmoles, 4.0 eq). Το διάλυμα ψύχεται στους 0°C, αναδεύεται για 30 min και εισάγεται στάγδην το BnBr (43.0 μL, 0.362 mmoles, 2.2 eq). Η ανάδευση συνεχίζεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και γίνεται εξουδετέρωση του NaH με στάγδην προσθήκη κορεσμένου υδατικού διαλύματος NH₄Cl (1 mL). Εν συνεχεία, προστίθεται EtOAc (7 mL) και γίνεται έκπλυση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 x 7 mL) και άλμη (7 mL). Η οργανική φάση συμπυκνώνεται και καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **88** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 5→20% EtOAc / Hexanes). Απόδοση: 76.4 mg (90%). *R*_f = 0.74 σε 20% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.13-1.39 (m, 1H), 2.09-2.21 (m, 1H), 3.32-3.47 (m, 4H), 3.52 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.79 (dd, *J* = 10.1, 17.0 Hz, 2H), 4.82-4.87 (m, 2H), 4.87-4.91 (m, 2H), 6.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.28-7.42 (m, 10H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 29.6, 32.6, 55.2, 60.4, 75.4, 75.8, 83.9, 84.2, 84.2, 113.9, 127.4, 127.7, 127.9, 128.2, 128.4, 129.8, 129.9, 137.6, 138.2, 159.4.



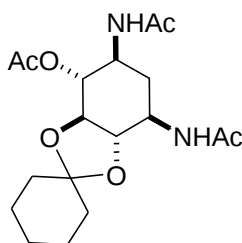
Ρακεμικό 1,3-διακετοξυ-εξαϋδρο-σπιρο-[βενζο[1,3]διοξολο-2,1'-2,3-δι(βενζυλοξυ)-4-(4-μεθοξυβενζυλοξυ)-κυκλοεξάνιο (90): Η ένωση **88** (58.5 mg, 0.114 mmoles) διαλύεται σε THF (1 mL) και μετά προστίθεται πρώτα υδατικό διάλυμα NaOH 0.1 M (57.0 μL, 0.0057 mmoles, 0.05 eq) και μετά διάλυμα PMe₃ 1.0 M σε THF (0.57 mL, 0.57 mmoles, 5.0 eq). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h και μετά συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το ελαιώδες

υποκίτρινο υπόλειμμα που προκύπτει διαλύεται σε άνυδρο CH_2Cl_2 (1 mL), προστίθεται Et_3N (58.4 μL , 0.456 mmol, 4.0 eq) και μετά γίνεται στάγδην προσθήκη του CH_3COCl (24.4 μL , 0.342 mmol, 3.0 eq) στους 0°C υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Το μίγμα αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h και ακολούθως προστίθεται υδατικό διάλυμα HCl 0.1N (1 mL) και CH_2Cl_2 (2 mL). Γίνεται έκπλυση με υδατικό διάλυμα HCl 0.1N (1 mL) και με άλμη (2 mL). Η οργανική φάση συμπυκνώνεται, ξηραίνεται με MgSO_4 και το υπόλειμμα καθαρίζεται με κρυστάλλωση από MeOH . Το προϊόν **90** λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 43.6 mg (70% σε 2 βήματα). $R_f = 0.53$ σε 10% $\text{MeOH} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 1.55 (q, $J = 13.2, 25.4$ Hz, 1H), 3.38 (s, 9H), 3.41-3.52 (m, 3H), 3.59 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.90-4.03 (m, 2H), 4.56-4.66 (m, 2H), 4.66-4.74 (m, 2H), 6.85 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.24-7.36 (m, 10H).



Ρακεμική 1,3-διακετοξυ-εξαϋδρο-σπιρο-[βενζο[1,3]διοξολο-2,1'-2,3-δι(βενζυλοξυ)-4-κυκλοεξανόλη (91): Το παράγωγο **90** (20.0 mg, 0.0366 mmol) διαλύεται σε CH_2Cl_2 (1.2 mL) και προστίθεται CF_3COOH (0.11 mL, 0.0146 mmol, 0.1 eq). Η αντίδραση αφήνεται για 20 min υπό ανάδευση σε

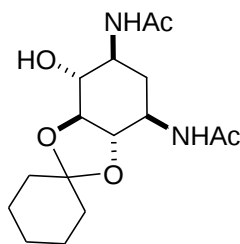
θερμοκρασία δωματίου και μετά συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2→10% $\text{MeOH} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$). Το προϊόν **91** λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 14.8 mg (95%). $R_f = 0.16$ σε 10% $\text{MeOH} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 1.44 (q, $J = 12.5, 25.3$ Hz, 1H), 3.37-3.43 (m, 1H), 3.43-3.52 (m, 2H), 3.75-3.89 (bs, 1H), 3.94-4.06 (m, 1H), 4.65 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 4.74-4.84 (m, 3H), 4.96 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 7.17-7.36 (m, 2H), 7.36-7.43 (m, 2H). ^{13}C NMR (250 MHz, CD_3OD) δ 23.6, 23.7, 35.6, 51.3, 52.5, 76.9, 77.6, 77.7, 85.4, 87.6, 129.4, 129.4, 129.5, 129.9, 130.1, 130.1, 141.0, 141.1, 173.6, 174.2.



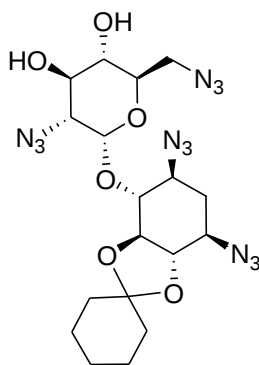
Ρακεμικός οξικός [N,N-διακετοξυ-4,6-διαμινοκυκλοεξανο-1,2-κυκλοεξυλιδενο] εστέρας (92): Η αλκοόλη **74** (30.0 mg, 0.0587 mmol) διαλύεται σε άνυδρη MeOH (0.6 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθεται καταλύτης Pd σε ενεργό άνθρακα (3.0 mg). Στο μίγμα της αντίδρασης διαβιβάζεται αέριο H_2 και αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία

δωματίου. Αφού απομακρυνθεί ο καταλύτης με διήθηση από Celite και γίνει έκπλυση με EtOAc και MeOH , το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και η διαμίνη που προκύπτει διαλύεται σε πυριδίνη (1 mL). Στο μίγμα προστίθεται στάγδην Ac_2O (111.0 μL , 1.17 mmol, 20.0 eq). Το μίγμα αναδεύεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται MeOH (2 mL), ακολουθούν ακόμα 30 min ανάδευσης και έπειτα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού (για πλήρη απομάκρυνση της πυριδίνης). Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης:

5→20% EtOAc / CH₂Cl₂). Η ένωση **92** λαμβάνεται ως λευκό άμορφο στερεό. Απόδοση: 17.5 mg (81%). R_f = 0.31 σε 10% MeOH / CH₂Cl₂.



Ρακεμική [N,N-διακετοξυ-4,6-διαμινο-εξϋδρο-σπιρο-[βενζο[1,3]διοξολο-2,1'-κυκλοεξαν-4-όλη (93): Το παράγωγο **92** (10.0 mg, 0.0271 mmol) διαλύεται σε MeOH (0.2 mL) και προστίθεται K₂CO₃ (15.0 mg, 0.108 mmol). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, μετά προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (1 mL) και συμπυκνώνεται. Το προκύπτον υπόλειμμα αραιώνεται με EtOAc (3 mL) και εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 x 3 mL) και άλμη (3 mL). Η οργανική φάση συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα που προκύπτει καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης. Απόδοση: 8.4 mg (95%). R_f = 0.21 σε 10% MeOH / CH₂Cl₂.

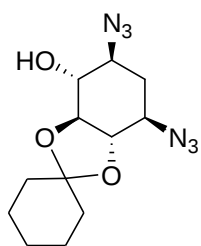


Τετρα-αζιδο-νεαμίνη,(2R,3S,4R,5R,6R)-5-αζιδο-2-(αζιδομεθυλ)-6((1R,2R,3S,4R,6S)-4,6-διαζιδο-2,3-διϋδροκυκλοεξυλοξυ)τετραϋδρο-2H-πυρανο-3,4-δι-όλη (94): Αιώρημα της νεομυκίνης B (Θειικό άλας, 10.0 g, 11.0 mmol), σε MeOH (150 mL), θερμαίνεται μέχρι βρασμού και προστίθεται σε αυτό αργά μείγμα HCl 10M (15 mL) σε MeOH (50 mL). Το μίγμα αφήνεται σε βρασμό με επαναρροή για 6 h, συμπυκνώνεται στον μισό όγκο και ψύχεται στους 0°C. Το λευκό ίζημα που καταβυθίζεται αποτελεί την νεαμίνη η οποία παραλαμβάνεται μετά από διήθηση και έκπλυση της με ψυχρή MeOH (2 x 25 mL). Απόδοση: 4.88 g (95%). R_f = 0.25 σε 20% NH₄OH / MeOH. ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.93 (ddd, J = 12.3, 12.3, 12.5 Hz, 1H), 2.54 (ddd, J = 4.0, 4.0, 12.5 Hz, 1H), 2.40-3.29 (m, 2H), 3.46-3.54 (m, 4H), 3.72 (dd, J = 9.2, 9.2, Hz, 1H), 3.97-4.08 (m, 3H), 5.59-3.65 (m, 1H), 5.95 (d, J = 3.7 Hz, 1H).¹⁹⁴

Το προκύπτον υδροχλωρικό άλας της νεαμίνης (2.0 g, 4.27 mmol) διαλύεται σε H₂O (52 mL) και MeOH (158 mL) και προστίθεται Et₃N (5 mL) και διάλυμα CuSO₄·5H₂O (64.9 mg, 0.26 mmol, 0.06 eq) σε MeOH / H₂O / Et₃N (3:3:4, v/v/v) (13 mL). Στο μίγμα της αντίδρασης εισάγεται με αργό ρυθμό διάλυμα TfN₃ (9.2 g, 52.5 mmol, 12.3 eq) σε διχλωρομεθάνιο 1.0 M (52.5 mL) και αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε παρατηρείται μεταβολή του χρώματός του από μπλε σε πράσινο. Στο διάλυμα προστίθεται στερεό NaHCO₃ (5.1 g, 14.3 eq) και συμπυκνώνεται αλλά όχι μέχρι ξηρού, καθώς το ξηρό TfN₃ έχει αναφερθεί πως διαθέτει εκρηκτικές ιδιότητες. Το υπόλειμμα εκπλένεται με EtOAc (2 x 20 mL), οι οργανικές φάσεις ενώνονται και συμπυκνώνονται αλλά όχι μέχρι ξηρού. Γίνεται καθαρισμός του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 30%→90% EtOAc / Hexanes / 1% Et₃N), οπότε απομονώνεται το

τετραζίδιο της νεαμίνης υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 1.29 gr (72%) $R_f = 0.43$ σε 70% EtOAc / Hexanes.

Το τετραζίδιο της νεαμίνης (2.20 gr, 3.03 mmol) διαλύεται σε άνυδρο DMF (40 mL) και προστίθεται πρώτα p-TsOH (86.3 mg, 0.454 mmol, 0.15 eq) και μετά 1,1-διμεθοξυ-κυκλοεξάνιο (4.6 mL, 30.3 mmol, 10.0 eq) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου και μετά προστίθεται Et_3N (63.2 μL , 0.454 mmol, 0.15 eq) και πραγματοποιείται συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα αραιώνεται με EtOAc (50 mL), εκπλένεται με H_2O (2 x 40 mL) και άλμη (40 mL) και μετά η οργανική φάση συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Στο κολλώδες καφέ στερεό που απομένει γίνεται καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 30%→70% EtOAc / Hexanes / 1% Et_3N), οπότε απομονώνεται η κετάλη **94** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 2.88 gr (58%). $R_f = 0.62$ σε 80% EtOAc / Hexanes. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.25 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 1.32-1.43 (m, 2H), 1.48 (q, $J = 12.3, 25.3$ Hz, 1H), 1.53-1.73 (m, 7H), 2.32 (ddd, $J = 4.7, 9.7, 13.6$, 1H), 3.26 (dd, $J = 3.6, 10.5$ Hz, 1H), 3.41 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H), 3.46-3.57 (m, 4H), 3.57-3.60 (m, 1H), 3.60-3.69 (m, 2H), 3.69-3.77 (bs, 1H), 3.82 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.94 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.98-4.05 (m, 1H), 5.56 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (250 MHz, CD_3OD) δ 23.5, 24.7, 33.5, 35.8, 36.0, 50.9, 57.0, 60.6, 62.4, 70.8, 70.9, 71.2, 76.9, 79.1, 79.1, 96.1, 113.7.

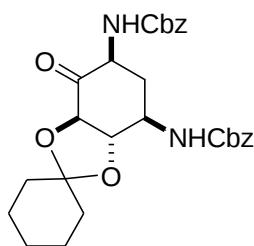


1,3-διαζιδο-εξαϋδρο-σπιρο-[βενζο[1,3]διοξολο-2,1'-κυκλοεξαν-4-όλη (85): Η

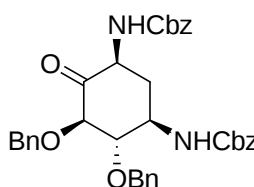
κετάλη της τετρα-αζιδο-νεαμίνης **94** (2.88 gr, 5.69 mmol) διαλύεται σε μεθανόλη (285 mL). Το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται για 15 min, ψύχεται στους 0°C και στην συνέχεια προστίθεται NaIO_4 (7.3 gr, 34.1 mmol, 6.0 eq), οπότε και η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση στο σκοτάδι για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στο μίγμα αντίδρασης πραγματοποιείται απομάκρυνση της περίσσειας του NaIO_4 με διήθηση μέσω Celite και ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα είναι η αντίστοιχη διαλδεΰδη υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού, όμως λόγω της αστάθειας της η ένωση αυτή χρησιμοποιείται αμέσως στην επόμενη αντίδραση διάσπασης του γλυκοζιτικού δεσμού προς τη σύνθεση της οπτικά ενεργής αλκοόλης **85**.

Η προκύπτουσα διαλδεΰδη (5.69 mmol) διαλύεται σε MeOH (285 mL) και προστίθεται Et_3N (2.0 mL, 14.2 mmol, 2.5 eq). Το μίγμα αναδεύεται στους 40°C για 12 h και εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προϊόν **85** παραλαμβάνεται μετά από καθαρισμό του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10%→80% EtOAc / Hexanes / 1% Et_3N), οπότε απομονώνεται η οπτικά ενεργή αλκοόλη **85** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 1.51 gr (90% σε 2 βήματα). $R_f = 0.38$ σε 25% EtOAc / Hexanes. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 1.19-1.39 (m, 2H), 1.39-1.50 (m, 2H), 1.54-1.75 (m, 8H), 2.14-2.25 (m, 1H), 3.36-3.48 (m, 3H), 3.56-3.68

(m, 1H), 3.68-3.78 (m, 1H). ^{13}C NMR (250 MHz, CD_3OD) δ 24.7, 26.0, 34.7, 37.2, 37.3, 58.9, 64.2, 75.2, 80.5, 80.7, 113.7.

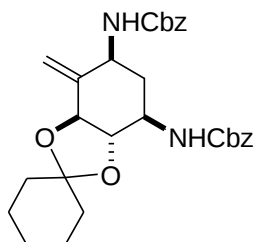


Ρακεμικό βενζυλο (3aR,5S,7R,7aS)-4-οξοεξασδροσπιρο [βενζο[d][1,3]διοξολο-2,1'-κυκλο-εξανο]-5,7-δινυλδικαρβαμίδιο (95): Η ρακεμική αλκοόλη **74** (500.0 mg, 0.979 mmol) διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο (6 mL) και προστίθεται NaHCO_3 (403.5 mg, 5.87 mmol, 6.0 eq). Το μίγμα αναδεύεται, μετά προστίθεται το αντιδραστήριο Dess-Martin (1.66 gr, 3.92 mmol, 4.0 eq) και η ανάδευση συνεχίζεται για 1 h ακόμα στους 50°C . Στο σημείο αυτό προστίθεται κορεσμένο διάλυμα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (18 mL) και συνεχίζεται έντονη ανάδευση μέχρις ότου το μίγμα γίνει διαυγές. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρις απομάκρυνσης μεγάλου μέρους του CH_2Cl_2 , οπότε και ακολουθεί αραίωση του υπολείμματος με EtOAc (50 mL) και εκχύλιση. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 (3 x 15 mL), ξηραίνεται με MgSO_4 , συμπυκνώνεται και το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2%→6% ακετόνη / CH_2Cl_2). Η ρακεμική κετόνη **95** απομονώνεται υπό την μορφή λευκού αφρώδους στερεού. Απόδοση: 448.0 mg (90%). R_f = 0.90 σε 5% ακετόνη / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 1.28-1.43 (m, 3H), 1.44-1.76 (m, 9H), 2.27-3.09 (m, 1H), 3.55-3.67 (m, 1H), 4.16-4.25 (m, 1H), 4.32 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 4.42-4.50 (m, 1H), 4.50-4.56 (m, 1H), 4.85-4.93 (m, 1H), 5.06-5.15 (m, 4H), 7.27-7.41 (m, 10H). ^{13}C NMR (125MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 23.5, 24.8, 35.7, 36.4, 37.3, 49.4, 55.1, 67.2, 80.2, 114.1, 128.3, 128.6, 129.3, 131.3, 133.2, 136.2, 155.8, 198.4. HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{NaO}_7$ 531.2107, βρέθηκε 531.2103.

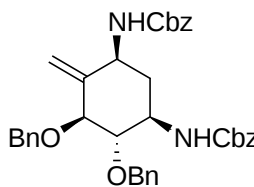


Οπτικά ενεργό [4,6-διβενζυλο-(2,3-διβενζυλοξυ-4-οξο-κυκλοεξανο)]-δικαρβαμίδιο (96): Η οπτικά ενεργή αλκοόλη **84** (109.2 mg, 0.179 mmol) διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο (2 mL) και προστίθεται NaHCO_3 (75.2 mg, 0.895 mmol, 5.0 eq). Το μίγμα αναδεύεται, μετά προστίθεται το αντιδραστήριο Dess-Martin (303.7 mg, 0.716 mmol, 4.0 eq) και η ανάδευση συνεχίζεται για 2.5 h ακόμα σε θερμοκρασία δωματίου. Στο σημείο αυτό προστίθεται κορεσμένο διάλυμα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (18 mL) και συνεχίζεται έντονη ανάδευση μέχρις ότου το μίγμα γίνει διαυγές. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρις απομάκρυνσης μεγάλου μέρους του CH_2Cl_2 , οπότε και ακολουθεί αραίωση του υπολείμματος με EtOAc (10 mL) και εκχύλιση. Η οργανική φάση εκπλένεται με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 (3 x 10 mL), ξηραίνεται με MgSO_4 , συμπυκνώνεται και το στερεό υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5%→30% EtOAc / CH_2Cl_2). Η οπτικά ενεργή κετόνη **96** απομονώνεται υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού. Απόδοση: 103.5 mg (95%). R_f = 0.88 (Σύστημα έκλουσης 30% EtOAc / CH_2Cl_2). ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 1.33-1.47 (m, 1H), 2.66-2.79 (m, 1H), 3.44-3.60 (bs, 1H), 3.88-4.01 (m, 1H), 4.24 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.33-4.44 (m, 1H),

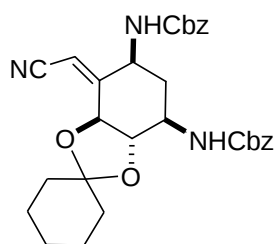
4.56 (dd, $J = 11.3, 38.5$ Hz, 3H), 4.82-4.93 (m, 2H), 5.08 (d, $J = 4.9$ Hz, 4H), 5.56-5.66 (m, 1H), 7.19-7.24 (m, 2H), 7.29-7.42 (m, 10H). ^{13}C NMR (125MHz, DMSO- d_6) δ 29.7, 34.4, 50.4, 55.1, 66.9, 67.1, 73.5, 75.0, 82.6, 85.7, 128.1, 128.5, 129.0, 137.7, 155.8; HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{NaO}_7$ 631.6700, βρέθηκε 631.2418.



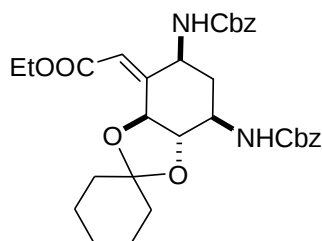
Ρακεμική ολεφίνη 97: Η ρακεμική κετόνη **95** (29.5 mg, 0.0580 mmol) διαλύεται σε άνυδρο THF (0.5 mL) και υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται στάγδην το ενεργοποιημένο υλίδιο $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{CH}_3\text{Br}^-$ (24.9 mg, 0.0696 mmol, 1.2 eq) ως διάλυμα σε άνυδρο THF 0.07M (1 mL) μέσα σε 1 h στους 0°C (η ενεργοποίηση του υλιδίου $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{CH}_3\text{Br}^-$ έγινε με βάση NaHMDS σε διάλυμα THF 1.0 για 45 min στους 0°C). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου και αφού προστεθεί κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl (0.5 mL) γίνεται συμπύκνωση. Στο υπόλειμμα προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl (3 mL) και γίνεται έκπλυση με CH_2Cl_2 (3 x 5 mL). Οι οργανικές φάσεις ενώνονται, ξηραίνονται με MgSO_4 και συμπυκνώνονται μέχρι ξηρού, οπότε και το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 1%→10% ακετόνη / CH_2Cl_2). Η ρακεμική ολεφίνη **97** απομονώνεται υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού. Απόδοση: 13.2 mg (44%). $R_f = 0.67$ σε 5% ακετόνη / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.33-1.50 (m, 1H), 1.57-1.66 (m, 6H), 1.66-1.76 (m, 4H), 2.56-2.70 (bs, 1H), 3.19-3.34 (m, 1H), 3.83-4.00 (m, 2H), 4.32-4.42 (bs, 1H), 4.71 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 4.80-4.94 (bs, 2H), 5.03-5.21 (m, 6H), 7.29-7.43 (m, 10H).



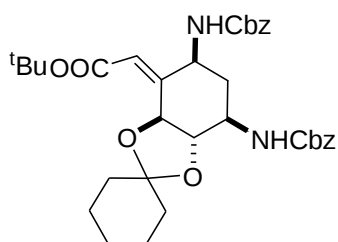
Οπτικά ενεργή ολεφίνη 98: Η οπτικά ενεργή κετόνη **96** (9.4 mg, 0.0154 mmol) διαλύεται σε άνυδρο THF (0.5 mL) και προστίθεται διαμιάς υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου στο διάλυμα του υλιδίου $\text{Ph}_3\text{P}^+\text{CH}_3\text{Br}^-$ (38.6 mg, 0.108 mmol, 7.0 eq) σε άνυδρο THF 0.1 M (0.5 mL) στους 0°C το οποίο έχει ενεργοποιηθεί με βάση NaHMDS ως διάλυμα σε THF 1.0 M (104 μL , 0.104 mmol, 6.75 eq) για 1 h στους 0°C → 25°C . Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου και αφού γίνει συμπύκνωση το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2%→10% MeOH / CH_2Cl_2). Η ρακεμική ολεφίνη **98** απομονώνεται υπό τη μορφή λευκού αφρώδους στερεού. Απόδοση: 3.7 mg (40%). $R_f = 0.43$ σε 5% MeOH / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 1.39-1.50 (m, 3H), 1.50-1.84 (m, 8H), 2.26-2.40 (m, 1H), 3.24-3.38 (bs, 1H), 3.71-3.84 (bs, 1H), 3.94-4.05 (m, 1H), 4.20-4.34 (m, 1H), 4.59 (t, $J = 11.8$ Hz, 2H), 4.71 (d, $J = 11.1$ Hz, 2H), 4.84 (d, $J = 11.1$ Hz, 2H), 4.89-5.00 (m, 1H), 5.00-5.09 (m, 2H), 5.09-5.16 (bs, 4H), 5.22-5.32 (bs, 1H), 7.28-7.43 (m, 10H). ^{13}C NMR (250 MHz, CDCl_3) δ 22.8, 29.7, 32.0, 36.9, 49.8, 50.6, 66.7, 67.0, 72.8, 74.2, 82.1, 82.5, 108.5, 127.8, 128.0, 128.2, 128.5, 128.5, 131.1, 136.3, 136.5, 137.8, 138.1, 144.0, 155.4, 155.9.



Ρακεμικό διενόφιλο 102: Ο φωσφονιακός εστέρας $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{CN}$ (67.3 μL , 0.428 mmol, 3.1 eq) προστίθεται στάγδην σε διάλυμα βάσης NaH (16.5 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 0.413 mmol, 3.0 eq) σε άνυδρο THF 0.4M (1 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου στους 0°C και αφήνεται υπό ανάδευση για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στο μίγμα προστίθεται στάγδην διάλυμα της ρακεμικής κετόνης **95** (70.0 mg, 0.138 mmol) σε άνυδρο THF (1 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου στους 0°C και αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και προστίθεται H_2O (0.5 mL), άλμη (7 mL) και γίνεται εκχύλιση με EtOAc (10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO_4 και αφού συμπυκνωθεί το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2%→10% Ακετόνη / CH_2Cl_2). Το ρακεμικό διενόφιλο **102** απομονώνεται υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 46.0 mg (63%). $R_f = 0.69$ σε 10% ακετόνη / CH_2Cl_2 . $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 1.54-1.69 (m, 8H), 1.69-1.79 (m, 2H), 1.79-1.89 (m, 1H), 2.49-2.73 (bs, 1H), 3.38-3.56 (m, 1H), 3.83-3.99 (m, 1H), 4.03-4.18 (m, 2H), 4.26-4.49 (bs, 1H), 4.78 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.91-5.17 (m, 6H), 5.24-5.36 (bs, 1H), 7.27-7.45 (m, 10H).

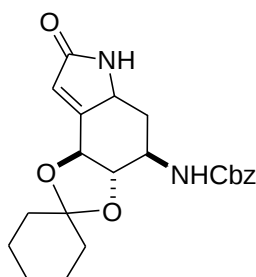


Ρακεμικό διενόφιλο 103: Ο φωσφονιακός εστέρας $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{COOEt}$ (50.0 μL , 0.249 mmol, 3.2 eq) προστίθεται στάγδην σε διάλυμα βάσης NaH (11.0 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 0.242 mmol, 3.1 eq) σε άνυδρο THF 0.4M (1 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου στους 0°C και αφήνεται υπό ανάδευση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στο μίγμα προστίθεται στάγδην διάλυμα της ρακεμικής κετόνης **95** (40.0 mg, 0.0780 mmol) σε άνυδρο THF (1 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου στους -75°C και αφήνεται υπό ανάδευση για 2.5 h στους -75°C και μετά για 1 h στους -55°C , οπότε και προστίθεται H_2O (0.5 mL), το μίγμα της αντίδρασης συμπυκνώνεται ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες και μετά γίνεται εκχύλιση με EtOAc (5 mL). Η οργανική φάση εκπλένεται με άλμη (4 mL), ξηραίνεται με MgSO_4 και συμπυκνώνεται. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2%→10% Ακετόνη / CH_2Cl_2). Το ρακεμικό διενόφιλο **103** απομονώνεται υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 19.9 mg (44%). $R_f = 0.39$ σε 10% ακετόνη / CH_2Cl_2 . $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 1.54-1.69 (m, 8H), 1.69-1.79 (m, 2H), 1.01-1.37 (m, 8H), 1.37-1.47 (bs, 1H), 1.48-1.80 (m, 10H), 2.47-2.69 (m, 1H), 3.29-3.51 (m, 1H), 3.79-3.96 (m, 1H), 3.96-4.10 (m, 1H), 4.10-4.25 (m, 2H), 4.33-4.50 (bs, 1H), 4.73 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 4.86-5.02 (bs, 1H), 5.02-5.20 (m, 5H), 5.68-5.81 (bs, 1H), 7.26-7.43 (m, 10H).



Ρακεμικό διενόφιλο 104: Ο φωσφονιακός εστέρας $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$ (95.7 μL , 0.483 mmoles, 3.5 eq) προστίθεται στάγδην σε διάλυμα βάσης NaH (17.1 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 0.427 mmoles, 3.1 eq) σε άνυδρο THF 0.4M (1 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου στους 0°C και αφήνεται υπό ανάδευση

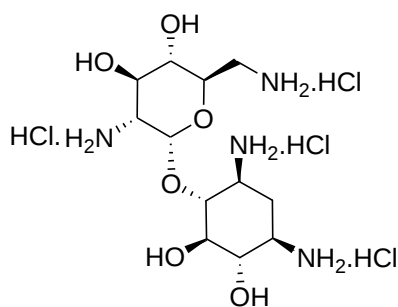
για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στο μίγμα προστίθεται στάγδην διάλυμα της ρακεμικής κετόνης **95** (70.0 mg, 0.138 mmoles) σε άνυδρο THF (1 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου στους 0°C και αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και προστίθεται H_2O (0.5 mL), άλμη (7 mL) και γίνεται εκχύλιση με CH_2Cl_2 (10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO_4 και συμπυκνώνεται, οπότε το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5%→20% Ακετόνη / CH_2Cl_2). Το ρακεμικό διενόφιλο **104** απομονώνεται υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 48.0 mg (57%). $R_f = 0.97$ σε 10% ακετόνη / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 1.10-1.36 (m, 3H), 1.47 (s, 11H), 1.50-1.67 (m, 9H), 1.67-1.80 (m, 2H), 2.45-2.72 (bs, 1H), 3.30-3.54 (m, 1H), 3.78-3.95 (m, 1H), 3.98-4.14 (m, 1H), 4.31-4.49 (bs, 1H), 4.70 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H), 4.79-4.93 (m, 1H), 4.98-5.28 (m, 6H), 5.60-5.82 (bs, 1H), 7.28-7.46 (m, 10H).



Ρακεμικό διενόφιλο 105: Ο φωσφονιακός εστέρας $(\text{EtO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{COOEt}$ (50.0 μL , 0.252 mmoles, 3.2 eq) προστίθεται στάγδην σε διάλυμα βάσης $^t\text{BuOK}$ (26.0 mg, 0.236 mmoles, 3.0 eq) σε άνυδρο THF 0.2M (1 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου στους 0°C και αφήνεται υπό ανάδευση για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Στο μίγμα προστίθεται στάγδην διάλυμα της ρακεμικής κετόνης **95** (40.0 mg, 0.0780 mmoles) σε άνυδρο THF (1 mL)

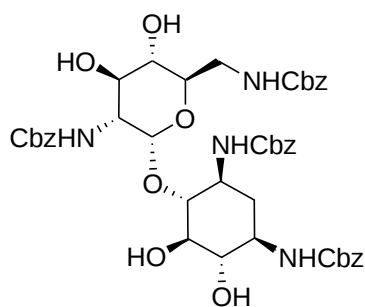
υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου στους -80°C και αφήνεται υπό ανάδευση για 20 min στους -55°C , οπότε και προστίθεται H_2O (0.5 mL), το μίγμα της αντίδρασης συμπυκνώνεται ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες και μετά γίνεται εκχύλιση με EtOAc (5 mL). Η οργανική φάση εκπλένεται με άλμη (4 mL), ξηραίνεται με MgSO_4 και συμπυκνώνεται. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2%→10% Ακετόνη / CH_2Cl_2). Το ρακεμικό διενόφιλο **105** απομονώνεται υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 25.5 mg (82%). $R_f = 0.69$ σε 10% ακετόνη / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 0.73-0.97 (m, 1H), 1.15 (q, $J = 11.8, 23.5$ Hz, 1H), 1.21-1.33 (m, 2H), 1.33-1.48 (m, 2H), 1.48-1.65 (m, 8H), 1.65-1.80 (m, 3H), 3.12-3.27 (m, 1H), 3.34 (t, $J = 9.8$ Hz, 1H), 3.89-4.07 (m, 1H), 4.24 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 4.42-4.55 (m, 1H), 4.74-4.92 (bs, 1H), 4.98-5.20 (m, 2H), 5.29 (s, 2H), 5.99 (s, 1H), 7.27-7.40 (m, 8H), 7.40-7.51 (m, 2H).

9.5. Συνθετικές μέθοδοι για τις ενώσεις του κεφαλαίου 6



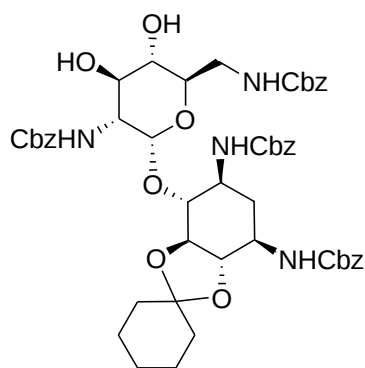
Τετρα-N-χλωρικό άλας νεαμίνης, (2R,3S,4R,5R,6R)-5-αμινο-2-(αμινομεθυλ)-6-((1R,2R,3S,4R, 6S)-4,6-διαμινο-2,3-δινδροκυκλοεξυλοξυ)τετραϋδρο-2H-πυρανο-3,4-δι-όλη (106): Ξεκινώντας με νεομυκίνη B (6.78 gr, 7.46 mmol) ακολουθείται η ίδια μέθοδος παρασκευής με αυτήν που περιγράφεται στην αρχή του **94**. Απόδοση 3.30 gr (95%). $R_f = 0.25$ σε 20% NH_4OH / MeOH . ^1H NMR (500MHz, D_2O) δ 1.93

(ddd, $J = 12.3, 12.3, 12.5$ Hz, 1H), 2.54 (ddd, $J = 4.0, 4.0, 12.5$ Hz, 1H), 2.40-3.29 (m, 2H), 3.46-3.54 (m, 4H), 3.72 (dd, $J = 9.2, 9.2$ Hz, 1H), 3.65-5.59 (m, 1H), 3.97-4.08 (m, 3H), 5.95 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H). Το προϊόν αυτό σε σύγκριση με προϋπάρχουσα βιβλιογραφική του μελέτη βρέθηκε καθ' όλα όμοιο.¹⁹⁴



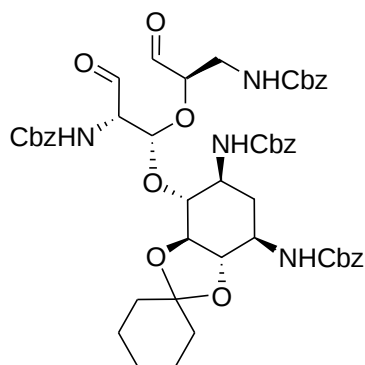
Τετρα-N-βενζυλοξυκαρβονυλο-νεαμίνη (107): Τετρα-N-χλωρικό άλας νεαμίνης (**106**) (3.30 gr, 7.00 mmol) διαλύεται σε H_2O (66 mL), ελέγχεται το pH και μετά προστίθεται NaHCO_3 (10.0 gr, 119 mmol, 17.0 eq) ούτως ώστε το τελικό pH να είναι μεγαλύτερο του 9. Το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται για 20 min και αφού ψυχθεί στους 0°C , προστίθεται με αργό ρυθμό διάλυμα CbzCl (11 mL, 11.0 eq, 77.0 mmol) σε διοξάνιο (33 mL) μέσα σε 1 h. Η

αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h, οπότε καταβυθίζεται το προϊόν **107** ως λευκό στερεό. Το μείγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα εκπλένεται με H_2O (3 x 20 mL), HCl 0.1N (3 x 20 mL), H_2O (3 x 20 mL) και διαιθυλαιθέρα (3 x 20 mL). Το στερεό ξηραίνεται καλά σε αντλία κενού και στην συνέχεια διαλύεται σε θερμό διοξάνιο. Το ετερογενές διάλυμα διηθείται, και το διήθημα συμπυκνώνεται προκειμένου να παραληφθεί το τελικό προϊόν **107**. Απόδοση 5.83 gr (97%). $R_f = 0.20$ σε 10% MeOH / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500MHz, DMSO-d_6) δ 1.32 (ddd, $J = 12.0, 12.0, 12.7$ Hz, 1H), 1.71-1.80 (m, 1H), 2.38-3.28 (m, 7H), 4.79-4.92 (m, 3H), 4.93-5.17 (m, 10H), 6.82 (broad s, 1H), 6.94 (broad s, 1H), 7.10-7.20 (m, 2H), 7.23-7.41 (m, 20H). ^{13}C NMR (125MHz, DMSO-d_6) δ 34.9, 42.0, 50.4, 51.2, 56.1, 62.9, 65.1, 65.3, 64.4, 70.7, 71.0, 71.5, 74.1, 76.6, 81.6, 98.6, 126.4, 126.6, 127.4, 127.7, 128.0, 128.3, 137.0, 137.2, 137.3, 155.7, 156.2, 156.5; HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{50}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{NaO}_{14}$ 961.3847, βρέθηκε 961.3840.

**1,3,2',6'-τετρακίς(N-βενζυλοξυκαρβονυλο-5-6-O-**

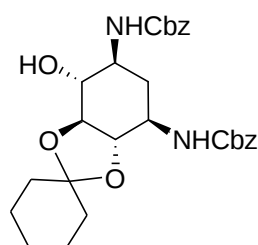
κυκλοεξυλιδενο-νεαμίνη (108): Σε άνυδρο DMF (82 mL) που βρίσκεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου διαλύεται η τετραόλη **107** (5.7 gr, 6.60 mmol) μαζί με p-TsOH (148.0 mg, 0.860 mmoles, 0.13 eq) και 1,1-διμεθόξυ-κυκλοεξάνιο (7.8 mL, 52.8 mmol, 8.0 eq). Το μίγμα θερμαίνεται στους 50°C και αφήνεται υπό ανάδευση για 2 h. Σε αυτό το χρονικό σημείο παρατηρείται σχεδόν πλήρης κατανάλωση της **107** και η ύπαρξη στο διάλυμα της αντίδρασης

των προϊόντων της μονοκετάλης **108** καθώς και της δικετάλης ($R_f = 0.50$ και $R_f = 0.85$, αντιστοίχως) σε αναλογία 2:1 αντίστοιχα. Γίνεται απομάκρυνση 4-5ml του διαλύματος με συμπύκνωση υπό κενό, προστίθεται MeOH (0.2 mL) και συνεχίζεται η ανάδευση του διαλύματος στους 50°C για 4 h. Η διαδικασία συμπύκνωσης και προσθήκης μεθανόλης επαναλαμβάνεται, οπότε παρατηρείται σημαντική αύξηση της αναλογίας μονοκετάλης : δικετάλης. Τότε προστίθεται Et₃N (0.4 mL, 2.90 mmoles, 0.43 eq) και πραγματοποιείται συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Στο κολλώδες καφέ στερεό που απομένει προστίθεται H₂O (100 mL) και το αιώρημα που προκύπτει αναδεύεται για 15 min, διηθείται και ξηραίνεται σε αντλία υψηλού κενού. Στο λευκό στερεό που προκύπτει προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας (300 mL), το μίγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού και διηθείται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο ακόμα φορές στο ίζημα που απομένει. Γίνεται ανάμιξη των διηθημάτων και προστίθεται σε αυτά εξάνιο (900 mL), οπότε καταβυθίζεται το **108** υπό τη μορφή λευκού στερεού το οποίο παραλαμβάνεται μετά από διήθηση και έκπλυση του με εξάνιο (2 x 50 mL). Το διήθημα συμπυκνώνεται στον μισό όγκο και επαναλαμβάνεται η διαδικασία. Απόδοση: 6.07 gr (98%). $R_f = 0.51$ σε 5% MeOH / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 1.26-1.58 (m, 11H), 1.81-1.90 (m, 1H), 3.08 (broad s, 1H), 3.17-3.26 (m, 1H), 3.77-3.45 (m, 2H), 3.56 (ddd, $J = 9.0, 8.8$ Hz, 1H), 3.58-3.70 (m, 4H), 4.85-4.89 (broad s, 1H), 4.90-4.96 (m, 2H), 4.94-5.05 (m, 6H), 5.06-5.11 (m, 2H), 6.53 (broad s, 1H), 7.20 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.22-7.39 (m, 10H), 7.67 (broad s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 23.1, 23.3, 24.5, 35.6, 36.1, 41.9, 48.3, 50.8, 55.5, 65.3, 65.4, 70.0, 70.4, 71.4, 76.1, 77.8, 80.2, 110.8, 127.5, 127.6, 127.7, 127.8, 128.3, 128.3, 127.0, 155.4, 155.6, 156.0, 156.6. HRMS-ESI (m/z) [M+Na]⁺ υπολογίστηκε για C₅₀H₅₈N₄NaO₁₄ 961.3847, βρέθηκε 961.3840.



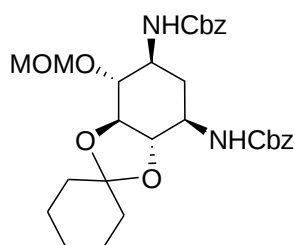
Διαλδεΰδη (109): Η μονοκετάλη **108** (3.77 gr, 4.00 mmol) διαλύεται σε μεθανόλη (235 mL). Το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται για 15 min, ψύχεται στους 0°C και στην συνέχεια προστίθεται NaIO₄ (6.5 gr, 30.0 mmol, 7.5 eq), οπότε και η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση στο σκοτάδι για 14 h. Στο μίγμα αντίδρασης πραγματοποιείται απομάκρυνση της περίσσειας του NaIO₄ με διήθηση μέσω Celite και ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα είναι η αντίστοιχη διαλδεΰδη **109**

υπό την μορφή λευκού άμορφου στερεού, όμως λόγω της αστάθειας της η ένωση αυτή χρησιμοποιείται αμέσως στην επόμενη αντίδραση διάσπασης του γλυκοζιτικού δεσμού προς τη σύνθεση της οπτικά ενεργής αλκοόλης **74**.



Οπτικά ενεργό βενζυλο (3aS,4R,5S,7R,7aS)-4-υδροξυ-εξασπυρο[βενζο[d][1,3]διοξολο-2,1'-κυκλοεξανό]-5,7-δωλδικαρβαμίδιο (74): Η διαλδεΰδη **109** (4.00 mmol) διαλύεται σε MeOH (285 mL) και προστίθεται Et₃N (2.0 mL, 14.2 mmol, 2.5 eq). Το μίγμα αναδεύεται στους 40°C για 12 h και εν συνεχεία συμπυκνώνεται μέχρι

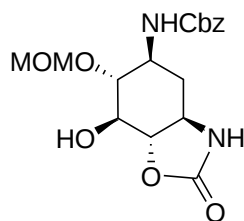
ξηρού. Με καθαρισμό του προκύπτοντος υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→30% EtOAc / CH₂Cl₂) παραλαμβάνεται η οπτικά ενεργή αλκοόλη **74** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 1.92 gr (94% σε 2 βήματα). R_f = 0.69 σε 35% EtOAc / CH₂Cl₂. [α]_D²⁵ = -5.6° (c = 0.6, MeOH). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 1.35-1.44 (m, 3H), 1.54-1.70 (m, 8H), 2.15 (ddd, J = 4.4, 4.4, 13.3 Hz, 1H), 3.48-3.62 (m, 2H), 3.38-3.45 (m, 2H), 3.71-3.83 (broad s, 1H), 5.06 (broad s, 4H), 7.22-7.24 (m, 10H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD), δ 23.9, 24.7, 26.2, 26.6, 33.7, 35.6, 37.3, 37.5, 50.4, 53.1, 55.0, 67.5, 74.0, 76.2, 78.2, 79.8, 82.0, 128.8, 128.9, 129.4, 158.7. HRMS-ESI (m/z) [M+Na]⁺ υπολογίστηκε για C₂₈H₃₄N₂NaO₇ 533.2264, βρέθηκε 533.2257.



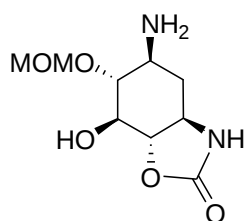
Βενζυλο (3aS,4R,5S,7R,7aS)-4-μεθοξυμεθυλοξυ-εξασπυρο[βενζο[d][1,3]διοξολο-2,1'-κυκλοεξανό]-5,7-δωλδικαρβαμίδιο (109): Η αλκοόλη **74** (1.8 gr, 3.53 mmol) διαλύεται σε CH₂Cl₂ (30 mL), προστίθεται DIPEA (9.1 mL, 53.0 mmol, 15 eq) και TBAI (130.0 mg, 0.1 eq). Το μίγμα αναδεύεται στους 0°C για 10 min και προστίθεται

στάγην MOMCl (2.7 mL, 35.3 mmol, 10.0 eq) μέσα σε 10 min. Το μίγμα αναδεύεται για 12 h στους 32°C, προστίθεται H₂O (10 mL) και συμπυκνώνεται για απομάκρυνση μεγάλου μέρους του CH₂Cl₂. Μετά γίνεται αραίωση με EtOAc (30 mL) και έκπλυση με H₂O (2 x 30 mL) και άλμη (30 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 20→60% EtOAc / Hexanes)

παραλαμβάνεται το παράγωγο **109** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 1.84 gr (94%). $R_f = 0.55$ σε 50% EtOAc / Hexanes. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.75-1.28 (m, 11H), 2.60-2.49 (m, 1H), 3.29 (bs, 3H), 3.44-3.33 (m, 2H), 3.54-3.44 (m, 2H), 3.65-3.54 (m, 1H), 3.73-3.65 (m, 1H), 3.87-3.73 (m, 1H), 4.59 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 4.89 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 5.07 (bs, 6H), 7.45-7.27 (m, 10H, Ph). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 155.9, 155.7, 136.3, 136.2, 128.3, 128.0, 112.1, 95.9, 80.1, 78.2, 77.0, 66.7, 66.6, 55.4, 51.9, 49.2, 36.4, 35.9, 24.8, 23.6, 23.5; HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_8$ 555.2706, βρέθηκε 555.1960.

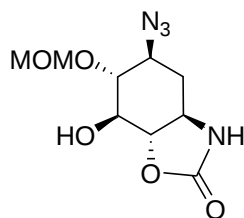


Βενζυλο (3aS,4R,5S,7R,7aS)-7-υδροξυ-6-(μεθοξυμεθυλοξυ)-2-οξοοκτα-ϋδρο-βενζο[d]διοξαζολο-5-υλκαρβαμίδιο (112): Η διόλη **152** (3.32 mmol) διαλύεται σε άνυδρο DMF (55 mL), ψύχεται στους 0°C και προστίθεται NaH (930.0 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 23.2 mmol, 7.0 eq). Αφού το μίγμα αναδευτεί για 1.5 h σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται H_2O (10 mL), EtOAc (30 mL) και γίνονται διαδοχικές εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl (2 x 20 mL) και άλμη (30 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO_4 , συμπυκνώνεται και το υπολείμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 20→60% EtOAc / Hexanes / Et_3N 1%) παραλαμβάνεται το παράγωγο **112** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 754.0 mg (62% σε 2 βήματα). $R_f = 0.60$ σε 50% EtOAc / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 1.56 (dd, $J = 23.9, 12.0$ Hz, 1H), 2.26-2.15 (m, 1H), 3.27 (s, 3H), 3.43-3.37 (m, 1H), 3.50-3.43 (m, 1H), 3.71-3.61 (m, 1H), 3.86-3.71 (m, 2H), 4.64 (d, $J = 6.82$ Hz, 1H), 4.82 (d, $J = 6.82$ Hz, 1H), 5.06 (dd, $J = 28.7, 12.3$ Hz, 2H), 7.42-7.22 (m, 5H), ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 164.0, 159.2, 139.1, 130.3, 130.0, 2 x 129.9, 100.3, 86.2, 85.7, 75.1, 68.4, 57.2, 56.3, 54.2, 50.4, 50.2, 50.0, 49.9, 49.7, 49.5, 49.4, 34.1; HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{NaO}_7$ 389.1427, βρέθηκε 389.1319.



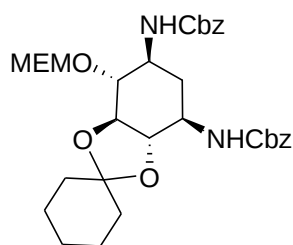
(3aR,5S,6R,7S,7aS)-5-αμινο-εξαϋδρο-7-υδροξυ-6-(μεθοξυμεθοξυ)-βενζο[d]οξαζολ-2(3H)-όνη (115): Το καρβαμίδιο **112** (408.0 mg, 1.11 mmol) διαλύεται σε άνυδρη MeOH (11 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθεται καταλύτης Pd σε ενεργό άνθρακα (40.0 mg). Στο μίγμα της αντίδρασης διαβιβάζεται αέριο H_2 και αφήνεται υπό ανάδευση για 1.5 h σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού απομακρυνθεί ο καταλύτης με διήθηση από Celite και γίνει έκπλυση με EtOAc και MeOH, το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Γίνεται καθαρισμός του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 1%→8% NH_4OH / MeOH), οπότε απομονώνεται η αμίνη **115** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 162.4 mg (63%). $R_f = 0.64$ σε 5% NH_4OH / MeOH. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 1.51-1.59 (m, 1H), 2.67-2.33 (m, 1H), 3.17-3.23 (bs, 1H), 3.31 (s, 3H), 3.43-3.49 (bs, 1H), 3.52-3.57 (bs, 1H), 3.61-3.66 (bs, 1H),

3.73-3.80 (m, 2H), 4.62 (dd, $J = 7.1, 15.4$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 18.8, 34.1, 50.1, 55.9, 72.4, 73.9, 79.3, 85.7, 90.1, 92.5, 97.1, 100.2, 129.5, 130.0, 159.6; MS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5$ 233.11, βρέθηκε 233.2.



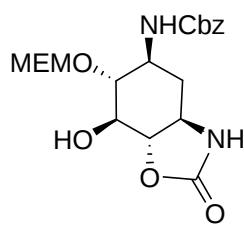
Βενζυλο (3aS,4R,5S,7R,7aS)-5-αζιδο-7-υδροξυ-6-(μεθοξυμεθυλοξυ)-εξαϋδρο-βενζο[d]οξαζολ-2(3H)-όνη (116): Η αμίνη **115** (1.11 mmoles) διαλύεται σε H_2O (2.2 mL) και MeOH (3.3 mL), προστίθεται Et_3N (1.5 mL, 11.1 mmoles, 10.0 eq) και $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (13.9 mg, 0.056 mmoles, 0.05 eq). Στην αντίδραση εισάγεται με αργό ρυθμό διάλυμα TfN_3 (971.7 mg, 5.55

moles, 5.0 eq) σε CH_2Cl_2 0.5 M (1.7 mL), και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h οπότε παρατηρείται μεταβολή του χρώματος του από μπλε σε πράσινο. Το διάλυμα συμπυκνώνεται αλλά όχι μέχρι ξηρού καθώς το ξηρό TfN_3 έχει αναφερθεί πως διαθέτει εκρηκτικές ιδιότητες. Γίνεται καθαρισμός του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 20%→80% EtOAc / Hexanes / 1% Et_3N), οπότε απομονώνεται το αζίδιο **116** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 272.1 mg (95% σε 2 βήματα). $R_f = 0.62$ σε 30% ακετόνη / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 1.42-1.35 (m, 1H), 2.18-2.12 (m, 1H), 3.14 (bs, 1H), 3.35-3.24 (m, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.45-3.37 (m, 1H), 3.70-3.57 (m, 2H), 4.65 (bs, 2H), 4.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 162.9, 99.3, 85.2, 85.0, 73.8, 63.2, 56.6, 54.9, 32.2; HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{NaO}_5$ 281.0856, βρέθηκε 258.0858.



Βενζυλο (3aS,4R,5S,7R,7aS)-4-μεθοξυαιθοξυμεθυλοξυ-εξαϋδροσπιρο-[βενζο[d][1,3]διοξαζολ-2,1'-κυκλοεξανο]-5,7-διυλδικαρβαμίδιο (110): Η αλκοόλη **74** (100 mg, 0.196 mmoles) διαλύεται σε CH_2Cl_2 (2 mL), προστίθεται DIPEA (0.5 mL, 2.94 mmoles, 15 eq) και TBAI (7.2 mg, 0.1 eq). Το μίγμα αναδεύεται στους 0°C για 10 min και προστίθεται στάγδην

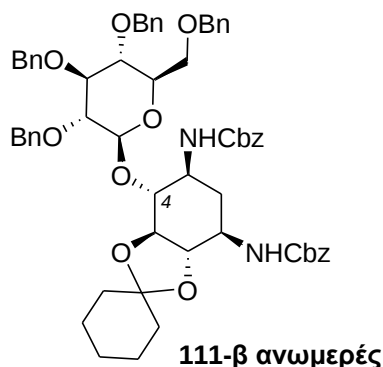
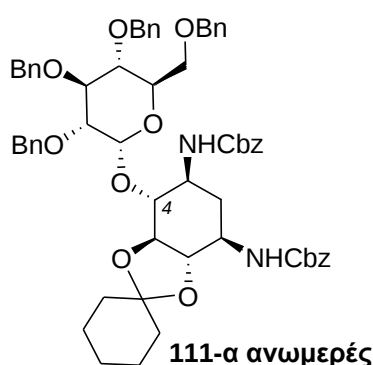
MEMCl (222 μL , 1.96 mmoles, 10.0 eq) μέσα σε 10 min. Το μίγμα αναδεύεται για 12 h στους 32°C , προστίθεται H_2O (3 mL), γίνεται αραίωση με EtOAc (10 mL) και έκπλυση με H_2O (2×10 mL) και άλμη (10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO_4 , συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 20→60% EtOAc / Hexanes) παραλαμβάνεται το παράγωγο **110** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 96.2 mg (82%). $R_f = 0.90$ σε 10% ακετόνη / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.18-1.36 (bs, 2H), 1.36-1.47 (bs, 1H), 1.47-1.73 (m, 10H), 2.52-2.71 (m, 1H), 3.28 (s, 3H), 3.31-3.43 (m, 7H), 3.43-3.53 (m, 3H), 3.53-3.60 (m, 3H), 3.60-3.69 (bs, 1H), 3.69-3.74 (m, 3H), 3.74-3.84 (m, 2H), 3.84-3.96 (m, 1H), 4.57-4.70 (m, 1H), 4.82 (s, 2H), 4.86-4.99 (bs, 1H), 4.99-5.21 (m, 6H), 5.80-6.00 (bs, 1H), 7.28-7.42 (m, 10H).



Βενζυλο (3aR,5S,6R,7S,7aS)-6-[(2-μεθοξυαιθοξυ)μεθοξυ]-οκταϋδρο-7-υδροξυ-2-οξοβενζο[d]οξάζολ-5-υλκαρβαμίδιο (113): Το παράγωγο **110** (96.2 mg, 0.186 mmol) διαλύεται σε CH₃COOH / H₂O (8:2, v/v) (2 mL) και αφού αναδευτεί για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και παραλαμβάνεται η διόλη υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού.

$R_f = 0.27$ σε 50% ακετόνη / CH₂Cl₂.

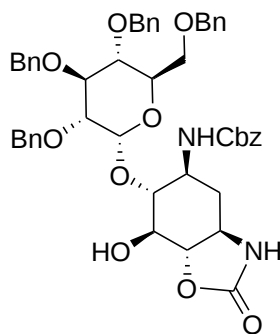
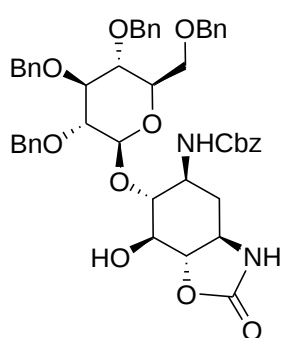
Η διόλη (0.186 mmol) διαλύεται σε άνυδρο DMF (3.1 mL), ψύχεται στους 0°C και προστίθεται NaH (52.1 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 1.30 mmol, 7.0 eq). Αφού το μίγμα αναδευτεί για 1.5 h σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται H₂O (5 mL), EtOAc (10 mL) και γίνονται διαδοχικές εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 x 10 mL) και άλμη (10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄, συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10→60% EtOAc / Hexanes / Et₃N 1%) παραλαμβάνεται το παράγωγο **113** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 32.1 mg (42% σε 2 βήματα). $R_f = 0.43$ σε 50% ακετόνη / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.49 (q, $J = 11.7$ Hz, 1H), 2.26-2.46 (bs, 1H), 3.27 (s, 2H), 3.34-3.52 (bs, 3H), 3.57-3.75 (m, 2H), 3.75-3.86 (m, 1H), 3.86-3.98 (m, 1H), 4.61-4.78 (m, 2H), 4.82-4.94 (m, 1H), 4.97-5.05 (m, 1H), 5.05-5.14 (m, 1H), 5.80-5.93 (m, 1H), 6.05-6.23 (1H), 7.22-7.38 (m, 5H).



Ανωμερές 111α & ανωμερές 111β: Η αλκοόλη **74** (200.0 mg, 0.392 mmol) διαλύεται σε άνυδρο CH₂Cl₂ (1.8 mL) και υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου προστίθεται το ενεργοποιημένο σάκχαρο **108** (495.0 mg, 0.783 mmol, 2.0 eq), οπότε και

αφήνεται υπό ανάδευση για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά, προστίθεται άνυδρος Et₂O (2 mL) και συνεχίζεται η ανάδευση για άλλη 1.5 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί ψύξη του μίγματος στους -30°C, προσθήκη NIS (203 mg, 0.901 mmol) και TfOH (5.0 μL, 0.059 mmol) ως διάλυμα σε άνυδρο CH₂Cl₂ 0.02M (0.2 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου, οπότε και αφήνεται υπό ανάδευση για 20 min. Η θερμοκρασία ανεβαίνει στους 0°C και προστίθεται μίγμα κορεσμένων υδατικών διαλυμάτων NaHCO₃ / Na₂S₂O₃ μέχρις αποχρωματισμού του μίγματος. Το μίγμα αραιώνεται με CH₂Cl₂ (20 mL) και εκπλένεται με H₂O (2 x 20 mL) και άλμη (20 mL) σε θερμοκρασία δωματίου. Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄ και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού, οπότε το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 20→50% EtOAc / Hexanes) και παραλαμβάνονται τα ανωμερή **111α** και **111β** υπό τη μορφή λευκού

άμορφου στερεού (2.5:1, **111a:111b**). Απόδοση: 405.0 mg (32% σε 2 βήματα). $R_f = 0.75$ (**111a**), 0.69 (**111b**) σε 50% EtOAc / Hexanes. ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3) δ 1.11-1.41 (m, 3H), 1.41-1.77 (m, 6H), 1.77-1.92 (m, 2H), 2.32 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 2.63-2.84 (m, 1H), 3.17-3.70 (m, 11H), 3.71-3.90 (m, 1H), 4.17-4.66 (m, 5H), 4.67-4.97 (m, 7H), 4.98-5.17 (m, 4H), 5.85-6.10 (bs, 1H), 7.01-7.46 (m, 30H).

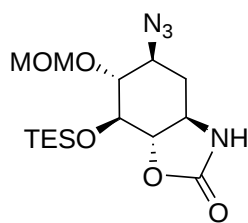


Βενζυλο-(3aR,5S,6R,7S,7aS)-6-[(2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-τρι-(βενζυλοξυ)-6-[(βενζυλοξυ)μεθυλο)-τετραϋδρο-2H-πυραν-2-υλοξυ)-οκταϋδρο-7-υδροξυ-2-οξοβενζο[d]-οξαζολο-5-υλκαρβαμίδιο (**114a**) & βενζυλο-(3aR,5S,6R,7S,7aS)-6-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-τρι-(βενζυλοξυ)-

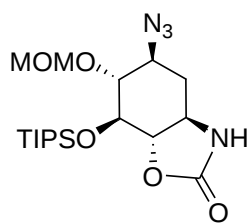
[(βενζυλοξυ)μεθυλο)-τετραϋδρο-2H-πυραν-2-υλοξυ)-οκταϋδρο-7-υδροξυ-2-οξοβενζο[d]-

οξαζολο-5-υλκαρβαμίδιο (**141b**): Το ανωμερικό μίγμα των παραγώγων **111a** και **111b** (84.0 mg, 0.0813 mmoles) διαλύεται σε 1,4-διοξάνιο / H_2O (1:1) (2 mL), προστίθεται CH_3COOH (1 mL, 0.065 mmoles) και αφού αναδευτεί για 12 h στους 65°C συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 20→50% EtOAc / Hexanes) και παραλαμβάνεται η διόλη υπό την μορφή λευκού άμορφου στερεού. $R_f = 0.29$ σε 2% MeOH / CH_2Cl_2 .

Η διόλη (0.0813 mmoles) διαλύεται σε άνυδρο DMF (0.8 mL), ψύχεται στους 0°C και προστίθεται NaH (16.3 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 0.407 mmoles, 5.0 eq). Αφού το μίγμα αναδευτεί για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl (2 mL), EtOAc (5 mL) και γίνονται διαδοχικές εκπλύσεις με H_2O (2 x 3 mL) και άλμη (3 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO_4 , συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 40→60% EtOAc / Hexanes / Et_3N 1%) παραλαμβάνεται το παράγωγο **114** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 68.7 mg (40% σε 2 βήματα) (το ένα ανωμερές). $R_f = 0.40$ σε 2% MeOH / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.53 (q, $J = 11.7$ Hz, 1H), 2.74-2.86 (m, 1H), 3.29 (dd, $J = 7.3, 9.8$ Hz, 1H), 3.38 (pseudotriplet, $J = 10.3$ Hz, 1H), 3.45 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H), 3.48-3.57 (m, 3H), 3.6 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 3.78-3.89 (m, 2H), 3.94 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.96-4.03 (m, 1H), 4.17-4.26 (bs, 1H), 4.46 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 4.56 (dd, $J = 12.3, 33.4$ Hz, 2H), 4.69-4.88 (m, 6H), 5.05 (s, 2H), 5.47 (s, 1H), 6.15-6.24 (bs, 1H), 7.08-7.17 (m, 2H), 7.17-7.24 (m, 3H), 7.24-7.40 (m, 22H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 31.3, 53.0, 54.8, 67.1, 69.0, 72.2, 72.7, 73.9, 74.5, 76.1, 78.2, 80.0, 82.3, 83.1, 88.2, 100.3, 128.1, 128.2, 128.3, 128.5, 128.8, 128.8, 128.9, 129.1, 136.8, 137.8, 138.3, 138.8, 157.1, 160.5.

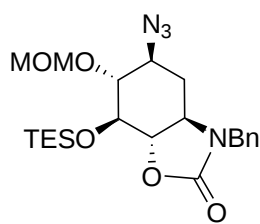


Τριαιθυλοσιλυλοαιθέρας της βενζυλο (3aS,4R,5S,7R,7aS)-5-αζιδο-7-υδροξυ-6-(μεθοξυμεθυλοξυ)εξαϋδρο-βενζο[d]οξαζολ-2(3H)-όνης (117): Η ένωση **116** (82.6 mg, 0.320 mmol) διαλύεται σε άνυδρη πυριδίνη (3 mL) και μετά προστίθεται 4-DMAP (3.9 mg, 0.032 mmol, 0.1 eq) και TESCl (268 μ L, 1.60 mmol, 5.0 eq). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h και μετά προστίθεται H₂O (2 mL). Το μίγμα αραιώνεται με EtOAc (10 mL) και γίνεται έκπλυση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 x 5 mL) και άλμη (5 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄, συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 30→80% EtOAc / Hexanes). Το προϊόν **117** λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 110.0 mg (92%). R_f = 0.40 σε 50% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.59-0.77 (m, 6H), 0.97 (t, J = 7.8 Hz, 9H), 1.59 (q, J = 11.9 Hz, 1H), 2.29-2.43 (m, 1H), 3.42-3.47 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.75 (t, J = 10.7 Hz, 1H), 3.81-3.93 (m, 1H), 4.86 (dd, J = 6.2, 117.3 Hz, 2H), 6.00 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD), δ 4.80, 6.67, 29.7, 31.5, 53.7, 56.6, 61.5, 74.4, 83.1, 83.8, 98.8, 160.1.



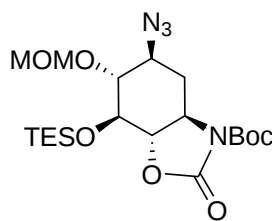
Τριϊσοπροπυλοσιλυλοαιθέρας της βενζυλο (3aS,4R,5S,7R,7aS)-5-αζιδο-7-υδροξυ-6-(μεθοξυμεθυλοξυ)εξαϋδρο-βενζο[d]οξαζολ-2(3H)-όνης (118): Η ένωση **116** (20.0 mg, 0.0775 mmol) διαλύεται σε άνυδρο CH₂Cl₂ (1 mL) και μετά προστίθεται 4-DMAP (0.9 mg, 0.00775 mmol, 0.1 eq), ιμιδαζόλιο (47.5 mg, 0.698 mmol, 9.0 eq) και TIPSCl (93.2 μ L, 0.465 mmol, 6.0 eq).

Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h και μετά προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (1 mL). Το μίγμα αραιώνεται με EtOAc (5 mL) και γίνεται έκπλυση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 x 3 mL) και άλμη (3 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄, συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10→50% EtOAc / Hexanes). Το προϊόν **118** λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 10.0 mg (31%). R_f = 0.23 σε 30% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.63-0.83 (m, 2H), 0.91-1.15 (m, 17H), 1.25 (s, 2H), 1.32-1.51 (m, 2H), 1.51-1.77 (m, 2H), 2.30-2.44 (m, 1H), 3.29-3.45 (m, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.69-3.86 (m, 1H), 3.96 (dd, J = 7.4, 9.7 Hz, 1H), 4.86 (dd, J = 4.8, 6.4 Hz, 2H), 5.48 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃), δ 12.8, 13.0, 14.3, 17.0, 17.6, 18.9, 29.8, 31.5, 53.6, 56.7, 61.5, 74.7, 83.6, 84.0, 99.1, 160.1.

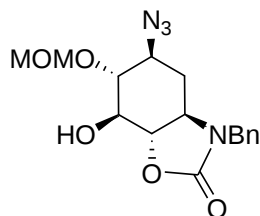


Τριαιθυλοσιλυλοαιθέρας της βενζυλο (3aS,5S,6R,7S,7aS)-5-αζιδο-3-βενζυλο-εξαϋδρο-7-υδροξυ-6-(μεθοξυμεθοξυ)-βενζο[d]οξαζολ-2(3H)-όνης (119): Σε διάλυμα της ένωσης **117** (155.0 mg, 0.416 mmol) σε άνυδρο THF (2.1 mL) το οποίο βρίσκεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα προστίθεται TBAI (15.4 mg, 0.0416 mmol, 0.1 eq) και διάλυμα LiHMDS σε THF 0.1

M (1.25 mL, 1.25 mmol, 3.0 eq). Το διάλυμα αναδεύεται για 10 min και εισάγεται στάγδην BnBr (148 µL, 1.25 mmol, 3.0 eq). Η ανάδευση συνεχίζεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και γίνεται προσθήκη κορεσμένου υδατικού διαλύματος NH₄Cl (3 mL). Εν συνεχεία, προστίθεται EtOAc (15 mL) και γίνεται έκπλυση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (10 mL) και άλμη (10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄, συμπυκνώνεται και καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **119** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 5→20% EtOAc / Hexanes). Απόδοση: 148.0 mg (82%). *R_f* = 0.57 σε 30% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.68 (nonet, *J* = 7.5 Hz, 6H), 0.97 (t, *J* = 7.9 Hz, 9H), 1.38 (q, *J* = 11.9 Hz, 1H), 2.09-2.20 (m, 1H), 3.00 (ddd, *J* = 3.2, 9.0, 11.9 Hz, 1H), 3.18-3.29 (m, 1H), 3.38-3.45 (m, 1H), 3.47 (s, 3H), 3.67 (t, *J* = 10.7 Hz, 1H), 3.74-3.84 (m, 1H), 4.42 (dd, *J* = 15.2, 84.5 Hz, 2H), 4.85 (dd, *J* = 6.35, 122.5 Hz, 2H), 7.28-7.40 (m, 5H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 4.8, 6.7, 30.7, 47.6, 55.9, 56.6, 61.5, 74.4, 81.3, 83.2, 128.2, 128.9, 135.5, 159.3.

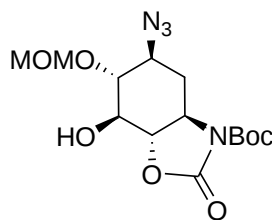


Τριαιθυλοσιλυλοαιθέρας του (3aR,5S,6R,7S,7aS)-tert-βουτυλο-5-αζιδο-εξαϋδρο-7-υδροξυ-6-(μεθοξυμεθοξυ)-2-οξοβενζο[d]οξαζολ-3(2H)-καρβοξυλικού εστέρα (120): Σε διάλυμα της ένωσης **117** (13.0 mg, 0.0349 mmol) σε άνυδρο THF (0.3 mL) το οποίο βρίσκεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα προστίθεται Et₃N (6.3 µL, 0.0454 mmol, 1.3 eq), 4-DMAP (0.9 mg, 0.0698 mmol, 0.2 eq) και Boc₂O (11.4 mg, 0.0524 mmol, 1.5 eq). Το διάλυμα αναδεύεται 2.5 h σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και συμπυκνώνεται. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **120** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 5→30% EtOAc / Hexanes). Απόδοση: 16.0 mg (97%). *R_f* = 0.65 σε 30% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.67 (nonet, *J* = 7.4 Hz, 6H), 0.96 (t, *J* = 8.1 Hz, 9H), 1.54 (s, 9H), 1.55-1.64 (m, 3H), 2.84-2.96 (m, 1H), 3.37-3.47 (m, 2H), 3.49 (s, 3H), 3.51-3.60 (m, 1H), 3.68 (t, *J* = 10.7 Hz, 1H), 3.79-3.89 (m, 1H), 4.86 (dd, *J* = 6.37, 116.7 Hz, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 4.8, 5.2, 6.6, 14.1, 22.6, 28.0, 29.7, 31.3, 55.8, 56.6, 61.4, 74.1, 80.4, 82.7, 84.6, 98.7, 150.0, 152.4.



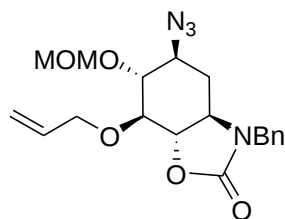
Βενζυλο (3aS,5S,6R,7S,7aS)-5-αζιδο-3-βενζυλο-εξαϋδρο-7-υδροξυ-6-(μεθοξυμεθοξυ)-βενζο[d]οξαζολ-2(3H)-όνη (121): Το παράγωγο **119** (148.0 mg, 0.341 mmol) διαλύεται σε (CH₃COOH / H₂O 8:2, v/v) (20 mL) και αφού αναδεντεί για 2.5 h σε θερμοκρασία δωματίου συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **121** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 20→70% EtOAc / Hexanes). Απόδοση: 148.0 mg (75%). *R_f* = 0.22 σε 50% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.30 (q, *J* = 11.8 Hz, 1H), 2.03-2.12 (m, 1H), 2.99-3.14 (m, 1H), 3.25-3.35 (m, 1H),

3.37-3.42 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 3.64-3.81 (m, 2H), 4.39 (dd, $J = 15.2, 74.0$ Hz, 2H), 4.60 (s, 1H), 4.79 (dd, $J = 6.9, 58.0$ Hz, 2H), 7.19-7.37 (m, 5H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ 30.5, 47.5, 55.7, 61.0, 71.8, 80.5, 88.5, 98.3, 128.0, 128.1, 128.8, 135.4, 159.4; MS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_5$ 349.15, βρέθηκε 349.1.



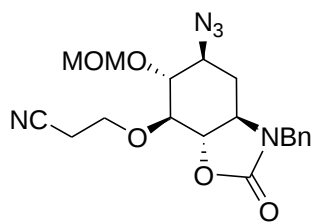
(3aR,5S,6R,7S,7aS)-tert-βουτυλο-5-αζιδο-εξαϋδρο-7-υδροξυ-6-(μεθοξυμεθοξυ)-2-οξοβενζο[*d*]οξαζολ-3(2*H*)-καρβοξυλικός εστέρας (122):

Το παράγωγο **120** (31.5 mg, 0.0667 mmoles) διαλύεται σε $\text{CH}_3\text{COOH} / \text{H}_2\text{O}$ (8:2, v/v) (3 mL) και αφού αναδευτεί για 2.5 h σε θερμοκρασία δωματίου συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **122** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 40→90% EtOAc / Hexanes). Απόδοση: 22.7 mg (95%). $R_f = 0.10$ σε 30% EtOAc / Hexanes. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.31.54 (s, 10H), 2.80-2.95 (m, 1H), 3.29-3.39 (m, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.54-3.66 (m, 2H), 3.74 (t, $J = 10.5$ Hz, 1H), 3.81 (dd, $J = 7.6, 10.3$ Hz, 1H), 4.82 (dd, $J = 7.0, 50.2$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3), δ 28.1, 29.9, 31.5, 55.8, 56.5, 61.2, 71.8, 79.8, 84.9, 89.4, 98.8, 150.3, 152.6.



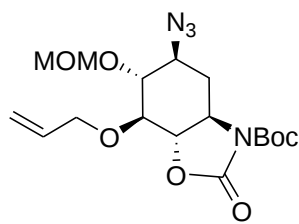
Αλλυλοαιθέρας της βενζυλο (3aS,5S,6R,7S,7aS)-5-αζιδο-3-βενζυλο-εξαϋδρο-7-υδροξυ-6-(μεθοξυμεθοξυ)-βενζο[*d*]οξαζολ-2(3*H*)-όνης (123):

Σε διάλυμα της ένωσης **121** (14.9 mg, 0.0428 mmoles) σε άνυδρο THF (0.5 mL) το οποίο βρίσκεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα προστίθεται $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (9.9 mg, 0.00858 mmoles, 0.2 eq) και αλλυλο-*t*-βουτυλικός ανυδρίτης (20.3 mg, 0.128 mmoles, 3.0 eq). Το διάλυμα αναδεύεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και συμπυκνώνεται. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **123** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 5→40% EtOAc / Hexanes). Απόδοση: 12.6 mg (76%). $R_f = 0.63$ σε 30% EtOAc / Hexanes. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.35 (q, $J = 12.0$ Hz, 1H), 2.07-2.21 (m, 1H), 2.96-3.12 (m, 1H), 3.22-3.36 (m, 1H), 3.45 (s, 3H), 3.49-3.55 (m, 1H), 3.55-3.64 (m, 1H), 3.73-3.84 (m, 1H), 4.03-4.17 (m, 1H), 4.42 (dd, $J = 15.2, 113.9$ Hz, 2H), 4.35-4.44 (m, 1H), 4.86 (dd, $J = 6.4, 99.7$ Hz, 2H), 5.13-5.23 (m, 1H), 5.23-5.35 (m, 1H), 5.79-5.96 (m, 1H), 7.20-7.41 (m, 5H). ^{13}C NMR (250 MHz, CDCl_3), δ 30.6, 47.5, 55.9, 56.6, 61.9, 72.4, 79.5, 81.0, 81.6, 98.3, 117.6, 128.2, 128.3, 129.0, 134.0, 135.4, 159.2.



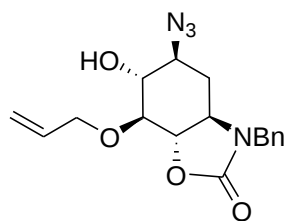
3-[(3aR,5S,6R,7S,7aS)-5-αζιδο-3-βενζυλο-οκταϋδρο-6-(μεθοξυμεθοξυ)-2-οξοβενζο[d]οξαζολο-7-υλοξυ]-προπανονιτρίλιο (124):

Σε διάλυμα της ένωσης **121** (24.0 mg, 0.0690 mmoles) σε *t*-BuOH (0.34 mL) και προστίθεται Cs₂CO₃ (22.9 mg, 0.0704 mmoles, 1.02 eq) και ακρυλονιτρίλιο (91.5 μL, 1.38 mmoles, 20.0 eq). Το διάλυμα αναδεύεται έντονα για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και γίνεται διήθηση μέσω Celite και έκπλυση με CH₂Cl₂ (5 mL). Το διήθημα συμπυκνώνεται και το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **124** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 30→60% EtOAc / Hexanes). Απόδοση: 27.0 mg (99%). *R*_f = 0.63 σε 10% ακετόνη / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.37 (q, *J* = 12.2 Hz, 1H), 1.46-1.69 (bs, 2H), 2.11-2.22 (m, 1H), 2.53-2.71 (m, 3H), 2.98-3.12 (m, 1H), 3.24-3.36 (m, 1H), 3.46 (s, 3H), 3.51 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.54-3.65 (m, 1H), 3.69-3.85 (m, 2H), 4.03-4.15 (m, 1H), 4.24-4.35 (m, 1H), 4.49-4.61 (m, 1H), 4.87 (dd, *J* = 6.5, 90.4 Hz, 2H), 7.21-7.43 (m, 5H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 18.8, 19.1, 29.7, 30.5, 47.6, 55.7, 56.6, 61.8, 66.2, 71.8, 80.8, 81.2, 98.6, 117.4, 128.2, 128.4, 129.0, 135.1, 159.0.



(3aR,5S,6R,7S,7aS)-tert-βουτυλο-7-(αλλυλοξυ)-5-αζιδο-εξαϋδρο-6-(μεθοξυμεθοξυ)-2-οξοβενζο[d]οξαζολο-3(2H)-καρβοξυλικός εστέρας (125):

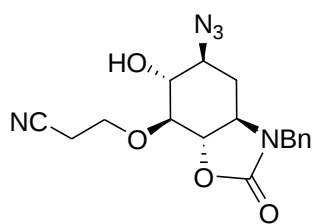
Σε διάλυμα της ένωσης **122** (31.5 mg, 0.0667 mmoles) σε άνυδρο THF (1 mL) το οποίο βρίσκεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα προστίθεται Pd(PPh₃)₄ (30.8 mg, 0.0266 mmoles, 0.4 eq) και αλλυλο-*t*-βουτυλικός ανυδρίτης (64.0 μL, 0.400 mmoles, 6.0 eq). Το διάλυμα αναδεύεται για 4 h στους 45°C, οπότε και συμπυκνώνεται. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **125** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 5→40% EtOAc / Hexanes). *R*_f = 0.60 σε 30% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.54 (s, 10H), 2.82-2.97 (m, 1H), 3.47 (s, 3H), 3.50-3.68 (m, 4H), 3.78 (t, *J* = 10.8 Hz, 1H), 4.04-4.18 (m, 1H), 4.31-4.41 (m, 1H), 4.88 (dd, *J* = 6.4, 90.2 Hz, 2H), 5.19 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 5.28 (dd, *J* = 17.1, 18.1 Hz, 1H), 5.77-5.97 (m, 1H). ¹³C NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 27.7, 27.9, 28.1, 28.2, 30.8, 30.8, 31.0, 31.2, 31.3, 31.5, 55.9, 56.5, 55.9, 61.8, 72.4, 79.2, 80.5, 80.7, 84.8, 98.0, 98.2, 98.2, 98.3, 98.4.



(3aR,5S,6R,7S,7aS)-7-(αλλυλοξυ)-5-αζιδο-3-βενζυλο-εξαϋδρο-6-υδροξυβενζο[d]οξαζολο-2(3H)-όνη (126):

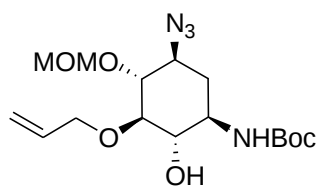
Σε διάλυμα της ένωσης **123** (12.6 mg, 0.0324 mmoles) σε *t*-BuOH (0.6 mL) προστίθεται PPTS (106.0 mg, 0.422 mmoles, 13.0 eq). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h υπό βρασμό με επαναρροή και κατόπιν προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 mL), αραιώνεται με EtOAc (5 mL) και εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα

NH₄Cl (2 x 3 mL) και άλμη (3 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄, συμπυκνώνεται και καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **126** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 10→60% EtOAc / Hexanes). Απόδοση: 10.0 mg (90%). R_f = 0.30 σε 30% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.32 (q, *J* = 12.2 Hz, 1H), 2.05-2.14 (m, 1H), 2.96-3.14 (m, 1H), 3.31-3.44 (m, 1H), 3.44-3.55 (m, 1H), 3.55-3.65 (m, 1H), 3.77 (t, *J* = 10.6 Hz, 1H), 4.08-4.21 (m, 1H), 4.42 (dd, *J* = 15.3, 113.1 Hz, 2H), 4.37-4.49 (m, 1H), 5.22 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 5.26-5.39 (m, 1H), 5.82-6.00 (m, 1H), 7.21-7.45 (m, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 29.7, 30.4, 47.6, 56.3, 61.3, 61.6, 72.4, 79.2, 81.3, 118.0, 118.2, 128.2, 128.3, 129.0, 133.9, 135.3, 159.3.



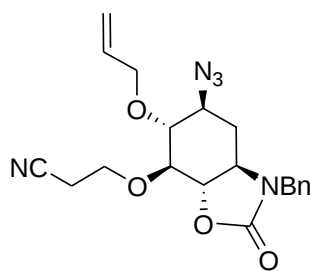
3-[(3aR,5S,6R,7S,7aS)-5-αζιδο-3-βενζυλο-οκταϋδρο-6υδροξυ-2-οξοβενζο[d]οξαζολο-7-υλοξυ]-προπανονιτρίλιο (127**):** Σε διάλυμα της ένωσης **124** (100.0 mg, 0.249 mmol) σε *t*-BuOH (3.5 mL) προστίθεται PPTS (814.0 mg, 3.24 mmol, 13.0 eq). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h υπό βρασμό με επαναροή και κατόπιν προστίθεται

κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 mL), αραιώνεται με EtOAc (5 mL) και εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 x 3 mL) και άλμη (3 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄, συμπυκνώνεται και καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **127** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 10→60% EtOAc / Hexanes). Απόδοση: 80.6 mg (91%). R_f = 0.33 σε 50% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.29-1.40 (m, 1H), 2.08-2.16 (m, 1H), 2.57-2.75 (m, 1H), 2.95-3.16 (m, 1H), 3.32-3.45 (m, 1H), 3.51 (dd, *J* = 8.2, 9.9 Hz, 1H), 3.62 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.72-3.87 (m, 1H), 4.08-4.18 (m, 1H), 5.2, 4.42 (dd, *J* = 122.2 Hz, 2H), 7.27-7.40 (m, 5H).



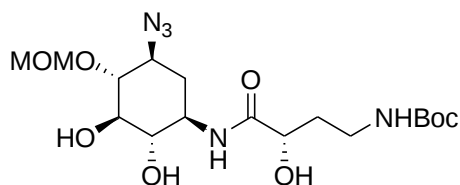
tert-βουτυλο(1R,2S,3R,4R,5S)-3-(αλλυλοξυ)-5-αζιδο-2-υδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)-κυκλοεξυλοκαρβαμικός εστέρας (128**):** Το παράγωγο **125** (63.0 mg, 0.176 mmol) διαλύεται σε 1,4-διοξάνιο (0.6 mL) και προστίθεται υδατικό διάλυμα LiOH·H₂O 0.5N (480 μL, 3.6 eq).

Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται CH₃COOH (0.2 mL) και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10→60% EtOAc / Hexanes), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **128** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 17.5 mg (70% σε 2 βήματα). R_f = 0.22 σε 30% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.21-1.37 (m, 2H), 1.44 (s, 13H), 2.29-2.42 (m, 1H), 3.14-3.26 (m, 1H), 3.30 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H), 3.33-3.41 (m, 1H), 3.41-3.56 (m, 5H), 4.21-4.39 (m, 1H), 4.64-4.71 (bs, 1H), 4.85 (dd, *J* = 6.4, 72.6 Hz, 2H), 5.12-5.22 (m, 1H), 5.22-5.37 (m, 1H), 5.86-6.00 (m, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 28.3, 33.4, 50.6, 56.5, 60.6, 74.4, 75.7, 80.1, 83.8, 97.9, 117.5, 134.5, 156.2.



3-[(3aR,5S,6R,7S,7aS)-6-(αλλυλοξυ)-5-αζιδο-3-βενζυλο-οκταϋδρο-2-οξοβενζο[*d*]οξασζολο-7-υλοξυ]-προπανονιτρίλιο (129): Το παράγωγο **127** (0.0667 mmoles) διαλύεται σε άνυδρο THF (3 mL) το οποίο βρίσκεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα προστίθεται Pd(PPh₃)₄ (40.7 mg, 0.0352 mmoles, 0.2 eq) και αλλυλο-*t*-βουτυλικός ανυδρίτης (84.0 μL, 0.528 mmoles, 3.0 eq). Το διάλυμα αναδεύεται για 2 h στους 45°C,

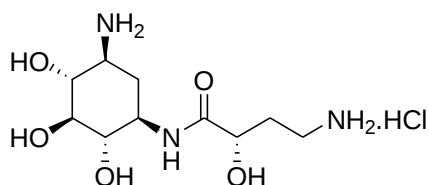
οπότε και συμπυκνώνεται. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **129** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 10→50% EtOAc / Hexanes). Απόδοση: 52.5 mg (71%). *R*_f = 0.57 σε 50% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.16-1.41 (m, 1H), 1.97-2.17 (m, 1H), 2.50-2.73 (m, 1H), 2.91-3.18 (m, 1H), 3.27-3.51 (m, 1H), 3.51-3.69 (m, 1H), 3.69-3.93 (m, 2H), 3.99-4.19 (m, 1H), 4.19-4.40 (m, 2H), 4.40-4.65 (m, 2H), 5.11-5.44 (m, 2H), 5.87-6.10 (m, 1H), 7.18-7.50 (m, 5H).



tert-Βουτυλο-(S)-3-[(1R,2S,3R,4R,5S)-5-αζιδο-2-διϋδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)-κυκλοεξυλοκαρβαμυλο]-3-υδροξυπροπυλοκαρβαμικός εστέρας (131): Η ένωση **117** (24.0 mg, 0.0644 mmoles) διαλύεται σε 1,4-διοξάνιο (0.6 mL) και μετά προστίθεται υδατικό διάλυμα LiOH·H₂O 0.5 N (600 μL, 3.6 eq). Το μίγμα αφήνεται

υπό ανάδευση για 2.5 h σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού.

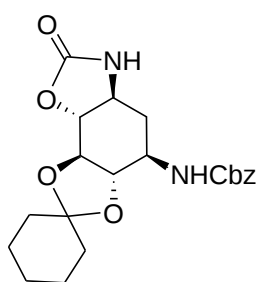
Η προκύπτουσα αμίνη (0.0644 mmoles) διαλύεται σε 1,4-διοξάνιο / H₂O (3:1, v/v) (0.6 mL), προστίθεται πρώτα κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (62 μL) και μετά διάλυμα του σουκινιμιδικού εστέρα **130** (42.7 mg, 0.135 mmoles, 2.1 eq) σε άνυδρο THF 0.12 M (1.1 mL). Το μίγμα αναδεύεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, συμπυκνώνεται και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10→50% ακετόνη / CH₂Cl₂). Το προϊόν **131** λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 16.0 mg (57% σε 2 βήματα). *R*_f = 0.14 σε 30% ακετόνη / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.42 (s, 9H), 1.64-1.81 (bs, 1H), 1.94-2.09 (m, 1H), 2.20-2.33 (m, 1H), 3.04-3.21 (m, 1H), 3.28 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.35-3.46 (m, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.74-3.91 (m, 1H), 4.00-4.18 (m, 1H), 4.84 (dd, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.96-5.14 (bs, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃), δ 28.4, 33.0, 35.2, 36.6, 49.1, 56.2, 60.0, 69.2, 75.0, 75.5, 80.3, 84.9, 98.1, 157.9, 174.6.



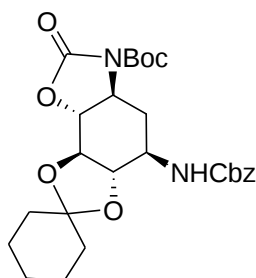
Υδροχλωρικό άλας του (2S)-4-αμινο-*N*-[(1R,2S,3S,4R,5S)-5-αμινο-2,3,4-τριϋδροξυκυκλοεξυλο]-2-υδροξυ-βουταναμίδιου (132): Η ένωση **131** (16.0 mg, 0.0369 mmoles) διαλύεται σε THF (0.3 mL) και μετά προστίθεται πρώτα

υδατικό διάλυμα NaOH 0.1 M (18.0 μL, 0.0180 mmoles, 0.05 eq) και μετά διάλυμα PMe₃ 1.0 M σε

THF (185 μ L, 0.185 mmoles, 5.0 eq). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h και μετά συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Η αμίνη που προκύπτει ως ελαιώδες υποκίτρινο υπόλειμμα (0.0369 mmoles) διαλύεται σε MeOH (0.3 mL) και προστίθεται υδατικό διάλυμα HCl 0.1 M (0.3 mL), οπότε το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά, συμπυκνώνεται και το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10→50% NH_4OH / MeOH), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **132** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 9.5 mg (77% σε 2 βήματα). R_f = 0.19 σε 50% NH_4OH / MeOH). ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 1.66 (q, J = 12.6 Hz, 1H), 1.97-2.11 (m, 1H), 2.13-2.25 (m, 2H), 3.10-3.25 (m, 3H), 3.37-3.48 (m, 2H), 3.51 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.85-3.96 (m, 1H), 4.30-4.39 (m, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O), δ 30.9, 30.9, 36.5, 49.1, 50.6, 69.6, 73.6, 75.5, 175.5.

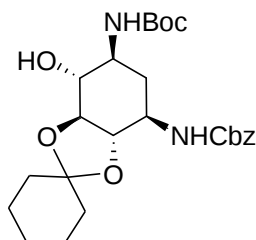


Οξαζολιδινόνη (133): Η οπτικά ενεργή αλκοόλη **74** (300.0 mg, 0.588 mmoles) διαλύεται σε άνυδρο DMF (10 mL), ψύχεται στους 0°C και προστίθεται NaH (94.0 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 2.35 mmoles, 4.0 eq). Αφού το μίγμα αναδευτεί για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται H_2O (10 mL), EtOAc (30 mL) και γίνονται διαδοχικές εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH_4Cl (2 x 20 mL) και άλμη (30 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO_4 , συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→30% ακετόνη / CH_2Cl_2 / Et_3N 1%), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **133** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 118.0 mg (50%). R_f = 0.20 σε 10% ακετόνη / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.44 (dd, J = 22.8, 12.1 Hz, 1H), 1.73-1.53 (m, 9H), 2.68-2.50 (m, 1H), 3.49-3.32 (pseudot, 1H), 3.80 (t, J = 9.12 Hz, 1H), 3.96-3.84 (m, 1H), 4.07 (t, J = 10.5 Hz, 1H), 5.13-5.04 (m, 2H), 5.25-5.13 (bs, 1H), 5.71 (bs, 1H, NH), 7.42-7.28 (m, 5H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 23.5, 24.8, 29.6, 32.1, 35.9, 36.0, 50.0, 56.4, 66.9, 67.1, 76.2, 80.4, 81.5, 113.5, 128.1, 128.3, 128.6, 136.0, 155.7, 160.3. HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{NaO}_6$ 425.1689, βρέθηκε 425.1683.

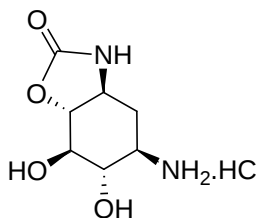


Οξαζολιδινόνη (134): Η οξαζολιδινόνη **133** (7.9 mg, 0.0196 mmoles) διαλύεται σε άνυδρο THF (0.5 mL) και προστίθεται 4-DMAP (0.5 mg, 0.00392 mmoles, 0.2 eq), Et_3N (3.5 μ L, 0.0249 mmoles, 1.27 eq) και Boc_2O (5.5 mg, 0.0253 mmoles). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→30% ακετόνη / CH_2Cl_2 / Et_3N 1%), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **134** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 9.6 mg (98%). R_f = 0.72 σε 10% ακετόνη / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.56-1.46 (s, 9H) (m, 1H), 1.76-1.56 (m, 10H), 3.25-3.09 (m, 1H), 3.52-3.40 (m, 1H), 3.59 (t, J = 10.2 Hz,

1H), 3.74 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 3.97-3.90 (m, 1H), 4.01 (t, $J = 10.7$ Hz, 1H), 5.04-4.93 (m, 1H), 5.18-5.04 (m, 2H), 7.42-7.28 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 23.5, 24.8, 27.8, 32.1, 35.9, 36.0, 50.0, 58.7, 67.1, 76.0, 78.6, 80.4, 84.6, 113.9, 128.2, 128.3, 128.5, 136.1, 149.9, 152.5, 155.5. HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{NaO}_8$ 525.2213, βρέθηκε 525.2204.

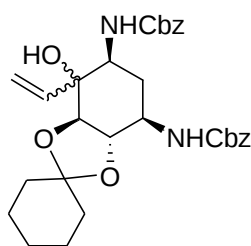


Αλκοόλη (135): Το παράγωγο **134** (16.3 mg, 0.0324 mmol) διαλύεται σε 1,4-διοξάνιο (0.4 mL) και προστίθεται υδατικό διάλυμα $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.5N (234 μL , 3.6 eq). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται CH_3COOH (0.2 mL) και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→20% ακετόνη / CH_2Cl_2 / Et_3N 1%), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **135** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 9.3 mg (60%). $R_f = 0.23$ σε 10% ακετόνη / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.42-1.28 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.71-1.48 (m, 9H), 2.58-2.41 (m, 1H), 3.41-3.27 (m, 1H), 3.49-3.41 (ψευδοτριπλή, $J = 9.4$ Hz, 1H), 3.60-3.49 (m, 1H), 3.72-3.60 (m, 1H), 3.85-3.72 (m, 1H), 4.81-4.63 (bs, 1H), 5.06-4.97 (bs, 1H), 5.19-5.06 (m, 2H), 7.40-7.27 (m, 5H, Ph). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 23.5, 23.6, 24.9, 28.3, 29.7, 36.1, 36.3, 49.6, 53.4, 66.9, 74.1, 78.0, 80.6, 112.8, 128.2, 128.5, 136.2, 155.7, 156.4. HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{NaO}_7$ 499.2420, βρέθηκε 499.2413.



Υδροχλωρικό άλας της (3aS,5R,6S,7R,7aR)-5-αμινο-εξαϋδρο-6,7-δι-ϋδροξυβενζο[*d*]οξαζολο-2[3*H*]-όνης (136): Το παράγωγο **133** (47.0 mg, 0.117 mmol) διαλύεται σε άνυδρη MeOH (11 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθεται καταλύτης Pd σε ενεργό άνθρακα (4.7 mg). Στο μίγμα της αντίδρασης διαβιβάζεται αέριο H_2 και αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού απομακρυνθεί ο καταλύτης με διήθηση από Celite και γίνει έκπλυση με EtOAc και MeOH, το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού αποτελώντας την προκύπτουσα αμίνη.

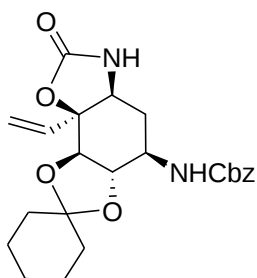
Η προκύπτουσα αμίνη (0.117 mmol) διαλύεται σε MeOH (1.1 mL) και προστίθεται υδατικό διάλυμα HCl 0.1M, οπότε το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά, συμπυκνώνεται και το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→20% NH_4OH / MeOH), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **136** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 13.1 mg (50% σε 2 βήματα). $R_f = 0.47$ σε 20% NH_4OH / MeOH. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 1.41 (q, $J = 11.8$ Hz, 1H), 2.15-2.24 (m, 1H), 2.67-2.77 (m, 1H), 3.14 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H), 3.35 (s, 1H), 3.41-3.51 (m, 1H), 3.62-3.71 (m, 1H), 3.72-3.84 (m, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 16.4, 30.8, 47.9, 52.2, 54.1, 71.5, 72.0, 77.5, 83.8, 162.7; MS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$ 189.09, βρέθηκε 189.1.



Βενζυλο (3aR, 5S, 7R, 7aS)-4-υδροξυ-4-βινυλοεξαϋδροσπιρο[βενζο[d][1,3]διοξολο-2,1'-κυκλοεξανο]-5,7-διϋλδικαρβαμίδιο (138): Η κετόνη **95** (1.9 g, 3.80 mmol) διαλύεται σε άνυδρο THF (30 mL) και προστίθεται TMSCl (1.5 mL, 11.4 mmol, 3.0 eq) στους -78°C. Μετά από 10 min προστίθεται βινυλομαγνησιοχλωρίδιο ως διάλυμα σε THF 1.6 M (7.1 mL, 11.4 mmol, 3.0 eq) και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση

για 3 h, ώστε να έρθει αργά σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (10 mL) και γίνεται έκπλυση με Et₂O (2 x 15 mL). Οι οργανικές φάσεις ενώνονται, ξηραίνονται με MgSO₄ και συμπυκνώνονται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10→50% ακετόνη / CH₂Cl₂), οπότε παραλαμβάνεται το προϊόν υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού.

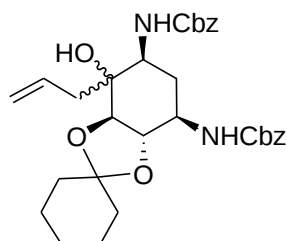
Ο TMS-αιθέρας που σχηματίστηκε πριν (3.80 mmol) διαλύεται σε άνυδρο THF (50 mL) και προστίθεται διάλυμα TBAF σε THF 1.0 M (3.7 mL, 3.65 mmol, 3.0 eq) στους 0°C. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, κατόπιν αραιώνεται με Et₂O (10 mL) και γίνεται έκπλυση με άλμη (10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄ και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→50% ακετόνη / CH₂Cl₂), οπότε παραλαμβάνεται το προϊόν **138** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 233.0 mg (36%, 2.5:1 dr). R_f = 0.32 σε 5% ακετόνη / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.35-1.65 (m, 10H), 1.84 (m, 1H), 2.32 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 2.73 (bs, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.65 (m, 1H), 3.82 (m, 2H), 5.06-5.03 (m, 4H + 1H minor) 5.24 (J = 11.0 Hz, 1H major), 5.39 (d, J = 17.3 Hz, 1H major) 5.48 (d, J = 10.6 Hz, 1H minor), 5.69 (d, J = 16.3 Hz, 1H minor), 5.86 (dd, J = 11.0 Hz, 17.1 Hz, 1H major), 7.30 (m, 10H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 23.5, 23.6, 24.9, 26.9, 29.6, 35.0, 35.9, 36.1, 36.2, 36.4, 49.4, 50.0, 52.5, 55.8, 66.6, 66.8, 67.1, 67.2, 74.8, 75.3, 76.3, 80.1, 81.3, 83.1, 111.7, 112.3, 116.4, 121.1, 128.0, 128.4, 129.0, 136.0, 136.1, 136.2, 136.3, 138.3, 139.7, 155.8, 156.0, 156.8, 156.9. HRMS-ESI (m/z) [M+H]⁺ υπολογίστηκε για C₃₀H₃₇N₂O₇ 537.2595, βρέθηκε 537.2593.



Οξαζολιδινόνη 137: Η προκύπτουσα αλκοόλη **138** (532.0 mg, 0.991 mmol) διαλύεται σε άνυδρο DMF (9 mL) και προστίθεται NaH (99.0 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 2.47 mmol, 2.5 eq). Αφού το μίγμα αναδευτεί για 2 h σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται H₂O (10 mL), EtOAc (30 mL) και γίνονται διαδοχικές εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 x 20 mL) και άλμη (30 mL). Η οργανική φάση

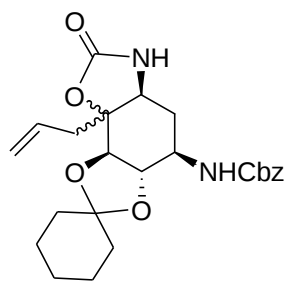
ξηραίνεται με MgSO₄, συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→40% ακετόνη / CH₂Cl₂), οπότε παραλαμβάνεται ως προϊόν μόνο η *cis* οξαζολιδινόνη **137** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 233.0 mg (55%). R_f = 0.13 σε

5% ακετόνη / CH₂Cl₂). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.29-1.48 (bs, 2H), 1.48-1.91 (m, 9H), 2.29-2.47 (m, 1H), 3.56-3.71 (m, 1H), 3.75-3.88 (m, 1H), 3.9-4.05 (m, 1H), 5.07 (s, 2H), 5.37 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 5.55 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H), 5.62-5.72 (bs, 1H), 5.92 (dd, 10.8, 17.1 Hz, 1H), 6.08-6.25 (bs, 1H), 7.28-7.54 (m, 5H). ¹³C NMR (250 MHz, CDCl₃) δ 23.5, 23.6, 24.9, 26.9, 31.4, 34.2, 35.7, 36.4, 36.5, 41.9, 49.2, 56.7, 66.9, 75.2, 78.1, 112.7, 117.5, 128.1, 128.4, 135.7, 162.5.



Βενζυλο (3aR, 5S, 7R, 7aS)-4-αλλυλο-4-υδροξυεξαϋδροσπιρο[βενζο[d][1,3]διοξολο-2,1'-κυκλοεξανο]-5,7-διϋλδικαρβαμίδιο (138): Η κετόνη

95 (79.1 mg, 0.156 mmol) διαλύεται σε άνυδρο THF (1.5 mL) και προστίθεται TMSCl (29.5 μL, 0.233 mmol, 1.5 eq) στους -78°C. Μετά προστίθεται στάγδην διάλυμα αλλυλο-μαγνησιοβρωμιδίου σε Et₂O 1.0 M (468 μL, 0.468 mmol, 3.0 eq) και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 3 h, ώστε να έρθει αργά σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (1 mL), αραιώνεται με AcOEt (8 mL) και γίνεται έκπλυση με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 x 5 mL) και άλμη (5 mL). Οι οργανικές φάσεις ενώνονται, ξηραίνονται με MgSO₄ και συμπυκνώνονται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10→50% ακετόνη / CH₂Cl₂), οπότε παραλαμβάνεται το προϊόν **140** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 45.0 mg (52%, 4: 1 *dr*). *R*_f = 0.70 σε 5% ακετόνη / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.44-1.85 (m, 11H), 2.41-2.54 (m, 3H), 2.65 (bs, 1H), 3.49 (m, 1H), 3.78-3.98 (m, 4H), 5.11-5.44 (m, 6H), 6.05 (m, 1H), 7.37-7.55 (m, 10H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 23.7, 23.8, 25.0, 35.2, 36.4, 40.7, 49.6, 51.1, 58.8, 66.8, 67.0, 73.3, 76.9, 77.4, 80.6, 111.5, 120.1, 128.2, 128.4, 128.5, 132.3, 136.4, 155.8. HRMS-ESI (*m/z*) [*M*+Na]⁺ υπολογίστηκε για C₃₁H₃₈N₂NaO₇ 573.2577, βρέθηκε 573.2571.

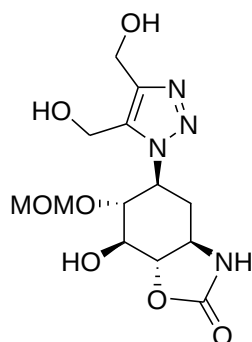


Οξαζολιδινόνη 139: Η αλκοόλη **140** (45.0 mg, 0.0817 mmol) διαλύεται σε άνυδρο DMF (0.1 mL) και προστίθεται NaH (8.2 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 0.204 mmol, 2.5 eq). Αφού το μίγμα αναδευτεί για 2.5 h σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται H₂O (1 mL), EtOAc (8 mL) και γίνονται διαδοχικές εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 x 5 mL) και άλμη (5 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄,

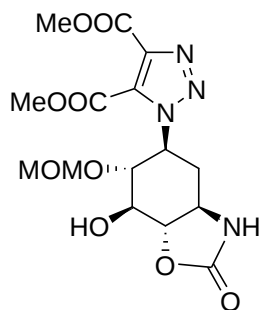
συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 20→80% EtOAc / Hexanes), οπότε παραλαμβάνεται ως προϊόν το **139** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 21.7 mg (60%). *R*_f = 0.20 σε 50% EtOAc / Hexanes). ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 1.35-1.53 (bs, 2H), 1.53-1.84 (m, 9H), 2.19-2.41 (m, 1H), 2.49 (dd, *J* = 7.9, 14.1 Hz, 1H), 2.74 (dd, *J* = 6.5, 14.2 Hz, 1H), 3.55-3.75 (m, 1H), 3.85 (pseudotriplet, *J* = 3.6 Hz, 1H), 3.94-4.07 (m, 2H), 5.08 (s, 2H), 5.18-5.37 (m, 2H), 5.73-5.99 (m, 1H), 7.21-7.47 (m, 5H). ¹³C NMR

(125 MHz, CD₃OD) δ 24.8, 26.3, 29.5, 30.9, 34.9, 37.0, 37.7, 41.8, 55.8, 67.7, 76.2, 79.0, 83.2, 113.4, 121.3, 128.9, 129.0, 129.5, 131.8, 138.3.

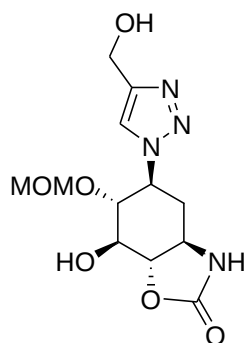
9.6. Συνθετικές μέθοδοι για τις ενώσεις του κεφαλαίου 7



Οξάζολιδινόνη 144: Το αζίδιο **116** (50.0 mg, 0.194 mmol) διαλύεται σε άνυδρο τολουόλιο (2 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθεται βουτ-2-υνο-1,4-διόλη (33.0 mg, 0.387 mmol, 2.0 eq). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h υπό βρασμό με επαναρροή και κατόπιν συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2→30% MeOH / CH₂Cl₂), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **144** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 42.0 mg (63%). R_f = 0.18 σε 10% MeOH / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 1.20 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 2.26-2.37 (m, 1H), 2.37-2.49 (m, 1H), 2.85 (s, 3H), 2.98 (q, J = 7.3 Hz, 1H), 3.23-3.30 (m, 1H), 3.56-3.76 (m, 1H), 3.95-4.07 (m, 2H), 4.07-4.19 (m, 1H), 4.43 (dd, J = 6.6, 96.8 Hz, 2H), 4.67 (s, 3H), 4.71-4.77 (m, 2H), 4.77-4.81 (m, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 9.8, 33.6, 47.6, 52.3, 55.4, 55.6, 56.3, 60.3, 74.4, 83.9, 85.0, 98.9, 136.9, 145.5, 162.9; MS-ESI (m/z) [$M+H$]⁺ υπολογίστηκε για C₁₃H₂₁N₄O₇ 345.14, βρέθηκε 345.2.

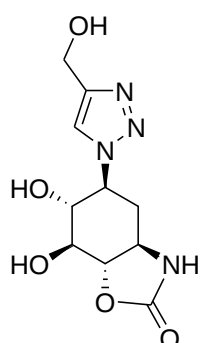


Οξάζολιδινόνη 142: Το αζίδιο **116** (10.0 mg, 0.0387 mmol) διαλύεται σε MeOH / H₂O (1:1, v/v) (0.4 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθεται βουτ-2-υνο-διοϊκός διμεθυλεστέρας (14.0 μ L, 0.116 mmol, 3.0 eq). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h στους 80°C σε αυτόκλειστο και κατόπιν αραιώνεται με EtOAc (5 mL) και εκπλένεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (2 x 5 mL) και άλμη (5 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄ και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10→50% ακετόνη / CH₂Cl₂), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **142** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 10.0 mg (65%). R_f = σε 10% MeOH / CH₂Cl₂; MS-ESI (m/z) [$M+H$]⁺ υπολογίστηκε για C₁₅H₂₁N₄O₉ 401.13, βρέθηκε 401.1.



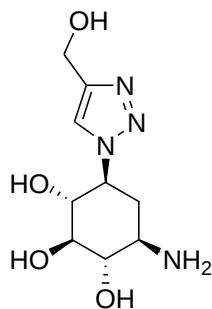
(3aR,5S,6R,7S,7aS)-εξϋδρο-7-υδροξυ-5-[4-(υδροξυμεθυλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-6-(μεθοξυμεθοξυ)βενζο[d]οξάζολο-2(3H)-όνη (146): Το αζίδιο **116** (13.7 mg, 0.0531 mmol) διαλύεται σε EtOH / H₂O (2:1, v/v) (0.6 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθεται προπαργυλική αλκοόλη (62.0 μ L, 0.106 mmol, 2.0 eq), CuSO₄·H₂O (4.0 mg, 0.0159 mmol, 0.3 eq), L-ασκορβικό νάτριο (5.3 mg, 0.0265 mmol, 0.5 eq). Το

μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2→30% MeOH / CH₂Cl₂), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **146** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 16.0 mg (96%). R_f = 0.52 σε 30% MeOH / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 2.26 (q, J = 12.0 Hz, 1H), 2.34-2.47 (m, 1H), 2.86 (s, 3H), 3.34 (s, 1H), 3.59-3.72 (m, 1H), 3.93-4.13 (m, 3H), 4.26 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 4.61-4.74 (m, 3H), 4.74-4.80 (m, 1H), 7.99-8.16 (bs, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 33.8, 55.3, 56.1, 56.5, 62.6, 74.5, 83.6, 84.9, 98.8, 124.1, 162.8.



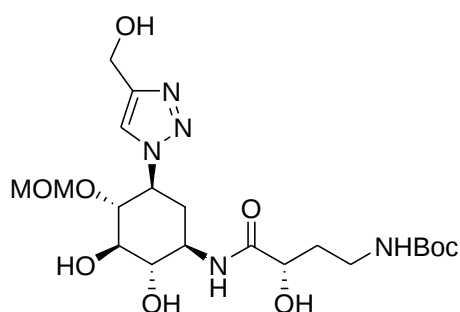
(3aR,5S,6R,7S,7aS)-εξασδρο-6,7-διϋδροξυ-5-[4-(υδροξυμεθυλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]βενζο[d]οξαζολο-2(3H)-όνη (147): Η ένωση **146** (12.0 mg, 0.0382 mmoles) διαλύεται σε EtOAc (0.4 mL) και προστίθεται υδατικό διάλυμα HCl 0.4M (0.4 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10→50% MeOH / CH₂Cl₂), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **146**

υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 10.0 mg (97%). R_f = 0.32 σε 30% MeOH / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 2.28 (q, J = 11.8 Hz, 1H), 2.38-2.49 (m, 1H), 3.61-3.71 (m, 1H), 3.78-3.91 (m, 2H), 3.96-4.07 (m, 1H), 4.54-4.65 (m, 1H), 4.68 (s, 2H), 7.98 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 9.2, 29.6, 30.7, 33.5, 55.6, 56.6, 63.8, 74.5, 78.1, 85.2, 124.5, 148.7, 163.0.



(1R,2R,3S,4R,6S)-4-αμινο-6-[4-(υδροξυμεθυλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]κυκλοεξανό-1,2,3-τριόλη (148): Η ένωση **146** (10.0 mg, 0.0370 mmoles) διαλύεται σε 1,4-διοξάνιο (0.3 mL) και προστίθεται υδατικό διάλυμα LiOH·H₂O 0.5N (300 μ L, 3.6 eq). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2→50% NH₄OH / MeOH), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **148** υπό τη μορφή

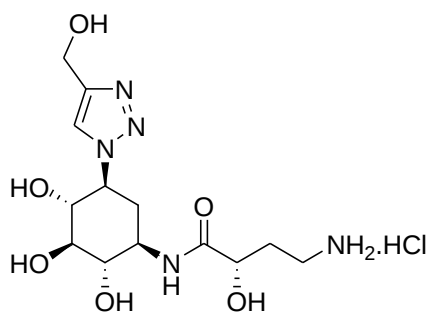
λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 7.0 mg (77%). R_f = 0.24 σε 5% NH₄OH / MeOH. ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.87-2.10 (m, 1H), 2.17-2.40 (m, 1H), 2.80-3.00 (m, 1H), 3.23-3.39 (m, 1H), 3.39-3.57 (m, 1H), 3.86 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 4.50-4.68 (m, 1H), 4.72 (s, 2H), 8.04 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ 36.2, 52.2, 56.4, 63.1, 76.3, 77.3, 78.6, 125.3, 148.5.



tert-Bουτυλο(S)-3[(1R,2S,3R,4R,5S)-2,3-διϋδροξυ-5-[4-(υδροξυμεθυλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]-4-(μεθοξυμεθοξυ)κυκλοεξυλοκαρβαμοϋλο]-3-υδροξυ-προπυλο-

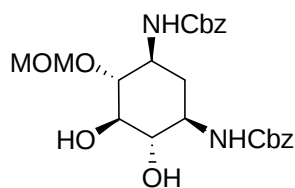
καρβαμικός εστέρας (150): Η ένωση **146** (25.0 mg, 0.0968 mmol) διαλύεται σε 1,4-διοξάνιο (0.9 mL) και προστίθεται υδατικό διάλυμα LiOH·H₂O 0.5 N (0.9 mL, 3.6 eq). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού.

Η προκύπτουσα αμίνη (0.0968 mmol) διαλύεται σε 1,4-διοξάνιο / H₂O (3:1, v/v) (0.9 mL), προστίθεται πρώτα κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO₃ (93 μL) και μετά διάλυμα του σουκινιμιδικού εστέρα **149** (64.2 mg, 0.203 mmol, 2.1 eq) σε άνυδρο THF 0.12 M (1.7 mL). Το μίγμα αναδεύεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, συμπυκνώνεται και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→40% MeOH / CH₂Cl₂). Το προϊόν **150** λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 20.0 mg (42% σε 2 βήματα). *R*_f = 0.80 σε 30% MeOH / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 1.41 (s, 9H), 1.67-1.85 (m, 1H), 1.86-2.00 (m, 1H), 2.11-2.28 (m, 2H), 2.68 (s, 2H), 2.84 (s, 3H), 3.09-3.27 (m, 2H), 3.44-3.67 (m, 2H), 3.81-3.99 (m, 2H), 3.99-4.10 (m, 1H), 4.20-4.33 (m, 1H), 4.60-4.65 (m, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.68-4.72 (m, 1H), 7.98 (s, 1H). ¹³C NMR (250 MHz, CD₃OD) δ 26.2, 28.8, 35.0, 35.7, 37.7, 50.8, 56.0, 56.5, 61.5, 70.9, 75.5, 78.1, 82.0, 98.5, 124.4, 148.8, 175.4, 177.1.



Υδροχλωρικό άλας του (2S)-4-αμινο-2-υδροξυ-N-[(1R,2S,3R,4R,5S)-2,3,4-τριϋδροξυ-5-[4-(υδροξυμεθυλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλο]κυκλοεξυλο]βουταναμιδίου (151):

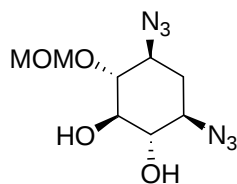
Η ένωση **150** (20.0 mg, 0.0409 mmol) διαλύεται σε MeOH (0.3 mL) και προστίθεται υδατικό διάλυμα HCl 1.0 M (0.3 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2→50% NH₄Cl / MeOH), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **151** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 12.7 mg (94%). *R*_f = 0.07 σε 20% MeOH / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.98-2.11 (m, 1H), 2.13-2.28 (m, 2H), 2.28-2.38 (m, 1H), 3.10-3.25 (m, 2H), 3.57 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H), 3.67 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H), 3.92 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H), 4.00-4.11 (m, 1H), 4.34 (dd, *J* = 4.0, 7.7 Hz, 1H), 4.65-4.72 (m, 1H), 4.75 (s, 3H), 8.07 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ 30.8, 32.7, 36.5, 49.3, 54.6, 61.0, 69.6, 73.7, 74.2, 75.6, 123.7, 146.7, 175.5.



Βενζυλο (1S,3R,4S,5R,6R)-4,5-δι-υδροξυ-6-(μεθοξυμεθυλοξυ)-κυκλοεξανο-1,3-δινυλδικαρβαμίδιο (152): Το παράγωγο **109** (1.84 gr, 3.32 mmol) διαλύεται σε CH₃COOH / H₂O 80% (56 mL) και αφού αναδευτεί για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού

και παραλαμβάνεται η διόλη **152** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. *R*_f = 0.46 σε 50% ακετόνη / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.44-7.23 (m, 10H, Ph), 5.18-5.00 (m, 4H), 4.80 (d, *J* =

6.64 Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 6.64$ Hz, 1H), 3.62-3.43 (m, 2H), 3.28 (s, 3H), 3.26-3.15 (m, 2H), 2.12-2.04 (m, 1H), 1.48-1.36 (m, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 158.7, 158.3, 138.4, 129.5, 129.1x2, 99.1, 83.5, 78.0, 76.3, 67.5x2, 56.2, 53.0, 51.7, 35.6; HRMS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{Na}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{NaO}_8$ 497.1900, βρέθηκε 497.1893.

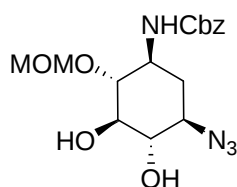


(1S,2R,3R,4S,6R)-4,6-διαζιδο-3-(μεθοξυμεθοξυ)-κυκλοεξανο-1,2-διόλη

(153): Η ένωση **152** (80.0 mg, 0.169 mmol) διαλύεται σε άνυδρη MeOH (1.7 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθεται CH_3COOH (12.9 μL , 0.169 mmol, 1.0 eq). Αφού γίνει απαέρωση στο μίγμα της αντίδρασης

προστίθεται καταλύτης Pd σε ενεργό άνθρακα (16.0 mg), διαβιβάζεται αέριο H_2 και αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού απομακρυνθεί ο καταλύτης με διήθηση από Celite και γίνει έκπλυση με EtOAc και MeOH, το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού.

Η προκύπτουσα αμίνη (0.169 mmol) διαλύεται σε H_2O (0.4 mL) και MeOH (0.5 mL), προστίθεται Et_3N (470 μL , 3.38 mmol, 20.0 eq) και $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2.1 mg, 0.00845 mmol, 0.05 eq). Στην αντίδραση εισάγεται με αργό ρυθμό διάλυμα TfN_3 (295.9 mg, 1.69 mmol, 10.0 eq) σε CH_2Cl_2 0.5M (3.4 mL), και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h, οπότε παρατηρείται μεταβολή του χρώματος του από μπλε σε πράσινο. Το διάλυμα συμπυκνώνεται αλλά όχι μέχρι ξηρού καθώς το ξηρό TfN_3 έχει αναφερθεί πως διαθέτει εκρηκτικές ιδιότητες. Γίνεται καθαρισμός του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10%→50% EtOAc / Hexanes / 1% Et_3N) οπότε απομονώνεται το διαζίδιο **153** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 39.0 mg (89% σε 2 βήματα). $R_f = 0.58$ σε 50% EtOAc / Hexanes. ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 1.06-1.22 (m, 3H), 1.93-2.03 (m, 1H), 2.99 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.04-3.17 (m, 3H), 3.17-3.25 (m, 1H), 3.25-3.30 (m, 1H), 4.71 (dd, $J = 6.6$, 80.0 Hz, 2H). ^{13}C NMR (250 MHz, CD_3OD) δ 9.3, 33.4, 47.8, 56.5, 61.4, 62.0, 76.8, 77.7, 83.2, 98.9.



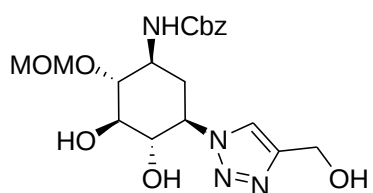
Βενζυλο (1S,2R,3R,4S,5R)-5-αζιδο-3,4-διϋδροξυ-2-(μεθοξυμεθοξυ)-κυκλοεξυλοκαρβαμικός εστέρας (154):

Η ένωση **112** (15.0 mg, 0.0409 mmol) διαλύεται σε 1,4-διοξάνιο (0.2 mL) και προστίθεται υδατικό διάλυμα $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 N (0.2 mL, 3.6 eq). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h

σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. MS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_6$ 341.17 βρέθηκε 341.4.

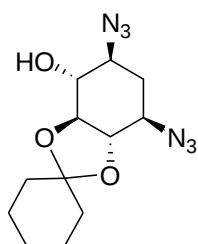
Η προκύπτουσα αμίνη (0.0409 mmol) διαλύεται σε H_2O (0.15 mL) και MeOH (0.25 mL), προστίθεται Et_3N (56.9 μL , 0.409 mmol, 10.0 eq) και $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.5 mg, 0.00205 mmol, 0.05 eq). Στην αντίδραση εισάγεται με αργό ρυθμό διάλυμα TfN_3 (35.9 mg, 0.205 mmol, 5.0 eq) σε CH_2Cl_2 0.5 M (0.4 mL), και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h, οπότε παρατηρείται μεταβολή του χρώματος του από μπλε σε πράσινο. Το διάλυμα συμπυκνώνεται αλλά όχι μέχρι

ξηρού καθώς το ξηρό TfN_3 έχει αναφερθεί πως διαθέτει εκρηκτικές ιδιότητες. Γίνεται καθαρισμός του υπολείμματος με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10%→50% ακετόνη / CH_2Cl_2 / 1% Et_3N) οπότε απομονώνεται το αζίδιο **154** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 10.7 mg (71% σε 2 βήματα). $R_f = 0.58$ σε 50% ακετόνη / CH_2Cl_2 . ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 1.32 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H), 1.99-2.21 (m, 1H), 3.19 (q, $J = 7.3$ Hz, 4H), 3.33-3.48 (m, 2H), 3.47-3.68 (m, 1H), 4.75 (dd, $J = 6.7, 39.3$ Hz, 2H), 5.10 (dd, $J = 12.2, 19.0$ Hz, 2H), 7.22-7.49 (m, 5H). ^{13}C NMR (250 MHz, CD_3OD) δ 9.2, 34.5, 47.8, 51.3, 56.3, 62.5, 67.5, 77.4, 77.8, 83.2, 99.1, 129.0, 129.5, 138.2, 158.4.



Βενζύλιο (1S,2R,3R,4S,5R)-3,4-διϋδροξυ-5-[4-(υδροξυμεθυλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλ]-2-(μεθοξυμεθοξυ)-κυκλοεξυλο-καρβαμικός εστέρας (155):

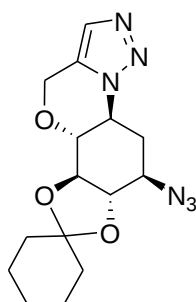
Το αζίδιο **154** (10.7 mg, 0.0292 mmoles) διαλύεται σε $\text{EtOH} / \text{H}_2\text{O}$ (2:1, v/v) (0.3 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθεται προπαργυλική αλκοόλη (3.4 μL , 0.0584 mmoles, 2.0 eq), $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.2 mg, 0.00876 mmoles, 0.3 eq), L-ασκορβικό νάτριο (2.9 mg, 0.0146 mmoles, 0.5 eq). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2→30% $\text{MeOH} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **155** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 4.2 mg (34%). $R_f = 0.34$ σε 10% $\text{MeOH} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$. ^1H NMR (250 MHz, CD_3OD) δ 1.18-1.45 (m, 2H), 2.06-2.37 (m, 2H), 3.21 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.39-3.55 (m, 2H), 3.64-3.88 (m, 2H), 4.37-4.60 (m, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.71 (s, 1H), 5.08 (dd, $J = 12.3, 20.4$ Hz, 2H), 7.21-7.43 (m, 5H), 7.92 (s, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 9.2, 35.5, 51.8, 56.3, 56.5, 62.4, 67.5, 76.0, 77.8, 83.0, 99.2, 124.3, 129.1, 129.5, 148.3.



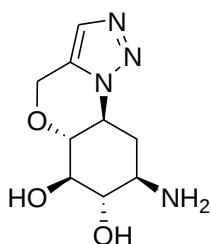
Αλκοόλη 85: Η αλκοόλη **74** (250.0 mg, 0.490 mmoles) διαλύεται σε άνυδρη MeOH (5 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και αφού γίνει απαέρωση προστίθεται καταλύτης Pd σε ενεργό άνθρακα (25.0 mg), διαβιβάζεται αέριο H_2 και το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού απομακρυνθεί ο καταλύτης με διήθηση από Celite και γίνει έκπλυση με EtOAc και MeOH , το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού.

Η προκύπτουσα αμίνη (0.490 mmoles) διαλύεται σε H_2O (1 mL) και MeOH (1.5 mL), προστίθεται Et_3N (1.4 mL, 9.80 mmoles, 20.0 eq) και $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (6.1 mg, 0.0245 mmoles, 0.05 eq). Στην αντίδραση εισάγεται με αργό ρυθμό διάλυμα TfN_3 (857.5 mg, 4.90 moles, 10.0 eq) σε CH_2Cl_2 0.5M (9.8 mL), και το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h, οπότε παρατηρείται μεταβολή του χρώματος του από μπλε σε πράσινο. Το διάλυμα συμπυκνώνεται αλλά όχι μέχρι ξηρού καθώς το ξηρό TfN_3 έχει αναφερθεί πως διαθέτει εκρηκτικές ιδιότητες. Γίνεται καθαρισμός του υπολείμματος

με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10%→50% EtOAc / Hexanes / 1% Et₃N) οπότε απομονώνεται το διαζίδιο **85** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 104.0 mg (72% σε 2 βήματα). R_f = 0.71 σε 50% EtOAc / Hexanes. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 1.19-1.39 (m, 2H), 1.39-1.50 (m, 2H), 1.54-1.75 (m, 8H), 2.14-2.25 (m, 1H), 3.36-3.48 (m, 3H), 3.56-3.68 (m, 1H), 3.68-3.78 (m, 1H). ¹³C NMR (250 MHz, CD₃OD) δ 24.7, 26.0, 34.7, 37.2, 37.3, 58.9, 64.2, 75.2, 80.5, 80.7, 113.7.

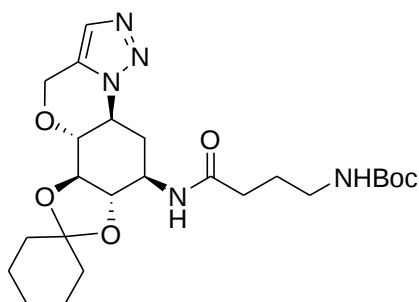


Τριαζόλιο 157: Η αλκοόλη **85** (40.0 mg, 0.136 mmol) διαλύεται σε άνυδρο τολουόλιο (0.2 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθεται TBAI (5.0 mg, 0.0136 mmol, 0.1 eq) και NaH (27.2 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 0.680 mmol, 5.0 eq). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου και μετά από 15 min προστίθεται προπαργυλο-βρωμίδιο ως διάλυμα σε τολουόλιο 80% κ.β. (18 μ L, 0.150 mmol, 1.1 eq) μέσα σε 5 min. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν προστίθεται H₂O (10 mL) και εκπλένεται με Et₂O (3 x 10 mL). Οι οργανικές φάσεις ενώνονται, εκπλένονται με άλμη (10 mL) και συμπυκνώνονται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10→50% EtOAc / Hexanes), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **157** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 40.0 mg (88%). R_f = 0.38 σε 5% ακετόνη / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.30-1.54 (m, 2H), 1.54-1.87 (m, 9H), 3.22-3.43 (m, 1H), 3.48-3.65 (m, 1H), 3.65-3.84 (m, 2H), 3.84-4.02 (m, 1H), 4.02-4.23 (m, 1H), 5.08 (dd, J = 25.5, 53.0 Hz, 2H), 7.51 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 23.5, 24.7, 30.8, 35.9, 36.1, 56.8, 57.5, 62.7, 76.3, 77.7, 80.4, 114.1, 128.8, 130.2.



Τριαζόλιο 158: Το παράγωγο **157** (15.0 mg, 0.0461 mmol) διαλύεται σε CH₃COOH / H₂O (8:2, v/v) (3 mL) και αφού αναδευτεί για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και παραλαμβάνεται η αντίστοιχη διόλη υπό την μορφή λευκού άμορφου στερεού. Η προκύπτουσα διόλη (0.0461 mmol) διαλύεται σε THF (0.5 mL) και μετά προστίθεται πρώτα υδατικό διάλυμα NaOH 0.1 M (23.0 μ L, 0.00231 mmol, 0.05 eq) και μετά διάλυμα PMe₃ 1.0 M σε THF (231 μ L, 0.231 mmol, 5.0 eq). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h και μετά συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→30% NH₄OH / MeOH), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **158** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 10.0 mg (96% σε 2 βήματα). R_f = 0.53 σε 20% NH₄OH / MeOH. ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.71 (q, J = 12.2 Hz, 1H), 2.91-3.18 (m, 2H), 3.35 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.56-3.77 (m, 2H), 4.20-4.39 (m, 1H), 5.11 (dd, J = 15.5, 72.0 Hz, 2H), 7.64 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ 15.2, 16.4, 30.5, 50.6, 55.4,

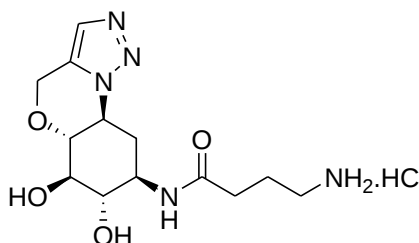
62.4, 72.6, 77.1, 78.9, 129.0, 132.1; MS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ υπολογίστηκε για $C_9H_{15}N_4O_3$ 227.11, βρέθηκε 227.2.



Τριαζόλιο 160: Το αζίδιο **157** (30.0 mg, 0.0903 mmol) διαλύεται σε THF (1 mL) και μετά προστίθεται πρώτα υδατικό διάλυμα NaOH 0.1 M (45.0 μ L, 0.00450 mmol, 0.05 eq) και μετά διάλυμα PMe_3 1.0 M σε THF (452 μ L, 0.452 mmol, 5.0 eq). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h και μετά συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. MS-ESI (m/z) $[M+H]^+$ υπολογίστηκε για $C_{15}H_{23}N_4O_3$ 307.18,

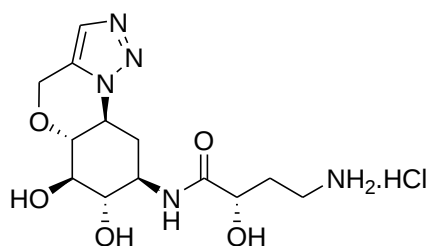
βρέθηκε 307.1.

Η προκύπτουσα αμίνη (0.0903 mmol) διαλύεται σε άνυδρο ακετονιτρίλιο (0.3 mL) υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου και προστίθεται το καρβοξυλικό οξύ **159** (55.1 mg, 0.271 mmol, 3.0 eq), DIPEA (61.8 μ L, 0.361 mmol, 4.0 eq) και 4-DMAP (12.1 mg, 0.0993 mmol, 1.1 eq). Το μίγμα ψύχεται στους 0°C και προστίθεται EDC.HCl (52.0 mg, 0.271 mmol, 3.0 eq), οπότε αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, κατόπιν προστίθεται H_2O (8 mL), αραιώνεται με EtOAc (10 mL) και εκπλένεται με H_2O (2 x 8 mL) και άλμη (8 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται σε $MgSO_4$, συμπυκνώνεται και το υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10→60% ακετόνη / CH_2Cl_2), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **160** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 30.0 mg (68%). R_f = 0.51 σε 50% ακετόνη / CH_2Cl_2 . 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.42 (s, 12H), 1.50-1.88 (m, 12H), 2.21-2.31 (m, 2H), 3.12-3.32 (m, 2H), 3.40-3.52 (m, 1H), 3.64-3.72 (m, 1H), 3.74-3.80 (m, 2H), 4.10-4.22 (bs, 1H), 4.32-4.45 (m, 1H), 4.80-4.91 (bs, 1H), 5.10 (dd, J = 15.4, 99.5 Hz, 2H), 7.30-7.40 (bs, 1H), 7.51 (s, 1H). ^{13}C NMR (250 MHz, D_2O) δ 23.6, 23.8, 25.0, 27.2, 28.5, 31.9, 33.5, 36.1, 36.3, 39.2, 47.6, 57.4, 62.8, 77.4, 78.3, 79.3, 79.8, 113.4, 128.8, 130.3, 157.2, 172.8.



Τριαζόλιο 161: Η ένωση **160** (30.0 mg, 0.0610 mmol) διαλύεται σε EtOAc (0.3 mL) και προστίθεται υδατικό διάλυμα HCl 4.0 M (0.3 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2→50% NH_4OH / MeOH), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **161** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 15.0 mg (79%). R_f = 0.10 σε 5% NH_4OH / MeOH. 1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 0.77-0.99 (m, 1H), 1.56-1.81 (m, 1H), 1.89-2.07 (m, 2H), 2.32-2.53 (m, 2H), 2.89-3.12 (m, 3H), 3.38-3.71 (m, 3H),

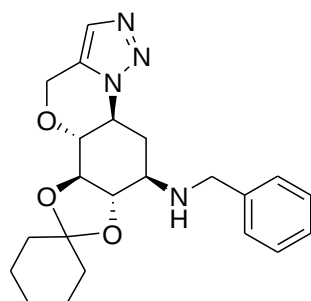
3.93-4.13 (m, 1H), 4.13-4.34 (m, 1H), 5.10-5.28 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 7.55 (s, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 24.8, 31.4, 33.9, 40.3, 51.6, 56.9, 63.6, 74.9, 76.1, 81.3, 101.5, 129.4, 133.2, 174.9.



Τριαζόλιο 162: Το αζίδιο **157** (20.0 mg, 0.0602 mmoles) διαλύεται σε THF (0.6 mL) και μετά προστίθεται πρώτα υδατικό διάλυμα NaOH 0.1 M (30.0 μL , 0.0030 mmoles, 0.05 eq) και μετά διάλυμα PMe_3 1.0 M σε THF (301 μL , 0.301 mmoles, 5.0 eq). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h και μετά συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού.

Η προκύπτουσα αμίνη (0.0602 mmoles) διαλύεται σε 1,4-διοξάνιο / H_2O (3:1, v/v) (0.6 mL), προστίθεται πρώτα κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO_3 (58 μL) και μετά διάλυμα του σουκινιμιδικού εστέρα **149** (39.9 mg, 0.126 mmoles, 2.1 eq) σε άνυδρο THF 0.12 M (1 mL). Το μίγμα αναδεύεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, συμπυκνώνεται και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2→20% MeOH / CH_2Cl_2). Το προϊόν σύζευξης λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού.

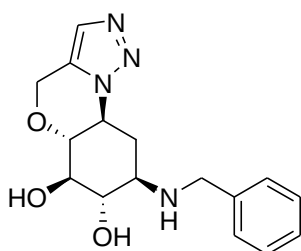
Το προϊόν σύζευξης (23.0 mg, 0.0453 mmoles) διαλύεται σε EtOAc (0.4 mL) και προστίθεται υδατικό διάλυμα HCl 4.0 M (0.4 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 2→50% NH_4OH / MeOH), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **162** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 15.0 mg (76% σε 3 βήματα). $R_f = 0.16$ σε 20% NH_4OH / MeOH. ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 1.92 (q, $J = 12.4$ Hz, 1H), 2.02-2.13 (m, 1H), 2.16-2.28 (m, 1H), 2.95-3.04 (m, 1H), 3.12-3.27 (m, 2H), 3.67 (ddd, $J = 9.5, 16.0, 19.1$ Hz, 2H), 3.79 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 4.09-4.20 (m, 1H), 4.34-4.45 (m, 2H), 5.15 (dd, $J = 15.4, 142.1$ Hz, 2H), 7.67 (s, 1H). ^{13}C NMR (125 MHz, D_2O) δ 27.2, 29.0, 34.7, 47.3, 53.3, 60.4, 67.6, 70.8, 72.4, 76.6, 127.3, 130.3, 173.6; MS-ESI (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ υπολογίστηκε για $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_5$ 328.16, βρέθηκε 328.3.



Τριαζόλιο 163: Το αζίδιο **157** (56.3 mg, 0.167 mmoles) διαλύεται σε THF (1.5 mL) και μετά προστίθεται πρώτα υδατικό διάλυμα NaOH 0.1 M (83.5 μL , 0.0835 mmoles, 0.05 eq) και μετά διάλυμα PMe_3 1.0 M σε THF (837 μL , 0.837 mmoles, 5.0 eq). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h και μετά συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού.

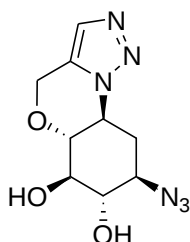
Η προκύπτουσα αμίνη (0.167 mmoles) διαλύεται σε MeOH / AcOH (19:1, v/v) (0.8 mL), προστίθεται η βενζαλδεϋδη (9.3 μL , 0.919 mmoles, 1.1 eq) και αφήνεται υπό ανάδευση για 70 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στο μίγμα της αντίδρασης προστίθεται NaBH_3CN

(7.9 mg, 0.125 mmol, 1.5 eq), αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα αραιώνεται με EtOAc (10 mL) και εκπλένεται με H₂O (2 x 10 mL) και άλμη (10 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO₄, συμπυκνώνεται και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10→50% ακετόνη / CH₂Cl₂), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **163** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 12.0 mg (36% σε 2 βήματα). R_f = 0.16 σε 50% ακετόνη / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.37-1.57 (m, 2H), 1.57-1.86 (m, 9H), 3.10-3.25 (m, 2H), 3.61 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.72 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.86 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 4.00 (dd, J = 13.3, 17.0 Hz, 2H), 4.14-4.27 (m, 1H), 5.07 (dd, J = 15.5, 105.2 Hz, 2H), 7.13-7.47 (m, 5H), 7.56 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 24.9, 26.1, 32.1, 37.2, 37.4, 52.3, 55.0, 58.8, 63.3, 78.0, 79.3, 83.6, 114.0, 128.2, 129.6, 129.7, 133.1, 140.9.



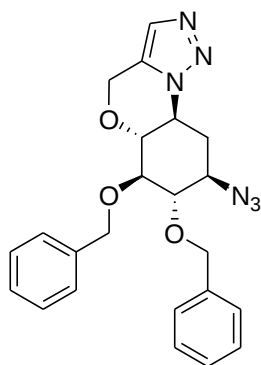
Τριαζόλιο 164: Η ένωση **163** (12.0 mg, 0.0303 mmol) διαλύεται σε MeOH (0.3 mL) και προστίθεται υδατικό διάλυμα HCl 1.0 M (0.3 mL). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5→50% MeOH / CH₂Cl₂), οπότε παραλαμβάνεται το

παράγωγο **164** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 9.0 mg (94%). R_f = 0.32 σε 10% MeOH / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.71 (q, J = 12.2 Hz, 1H), 2.97-3.11 (m, 1H), 3.34 (s, 1H), 3.39-3.54 (m, 2H), 3.59 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 4.06 (dd, J = 12.8, 72.0 Hz, 2H), 4.16-4.24 (m, 1H), 5.06 (dd, J = 15.2, 143.5 Hz, 2H), 7.24-7.52 (m, 3H), 7.57 (s, 1H).

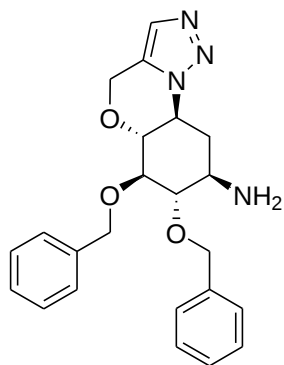


Τριαζόλιο 165: Το παράγωγο **157** (63.7 mg, 0.189 mmol) διαλύεται σε CH₃COOH / H₂O (8:2, v/v) (10 mL) και αφού αναδευτεί για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 10→50% ακετόνη / CH₂Cl₂), οπότε παραλαμβάνεται η διόλη **165** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση:

40.6 mg (85%). R_f = 0.23 σε 50% ακετόνη / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 1.68 (q, J = 12.4 Hz, 1H), 2.99-3.13 (m, 2H), 3.37-3.51 (m, 2H), 3.61 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 3.64-3.70 (m, 1H), 4.16-4.29 (m, 1H), 5.05 (dd, J = 15.5, 148.5 Hz, 2H), 7.57 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 9.5, 30.9, 56.4, 62.6, 63.5, 74.3, 78.2, 80.8, 129.3, 133.2.

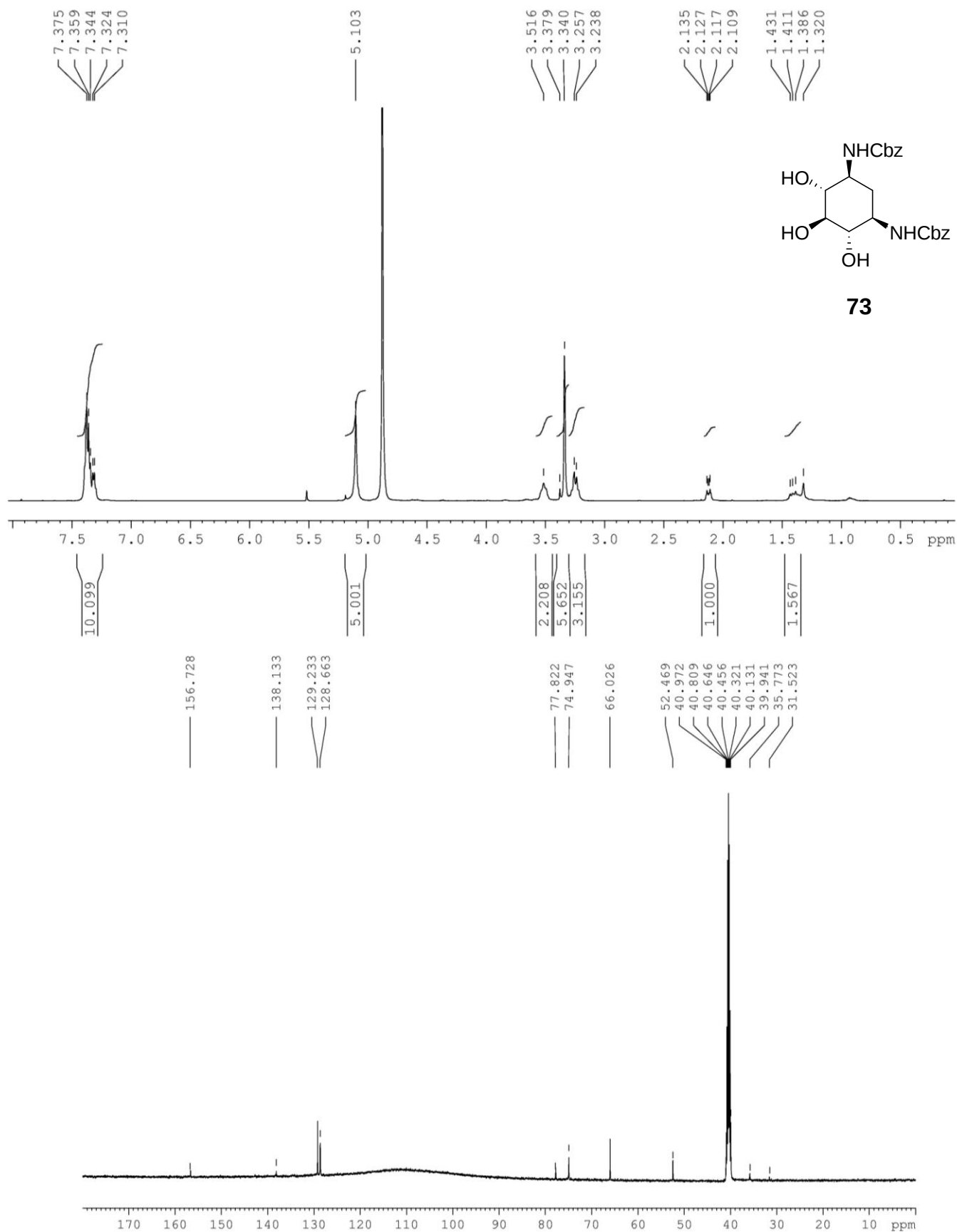


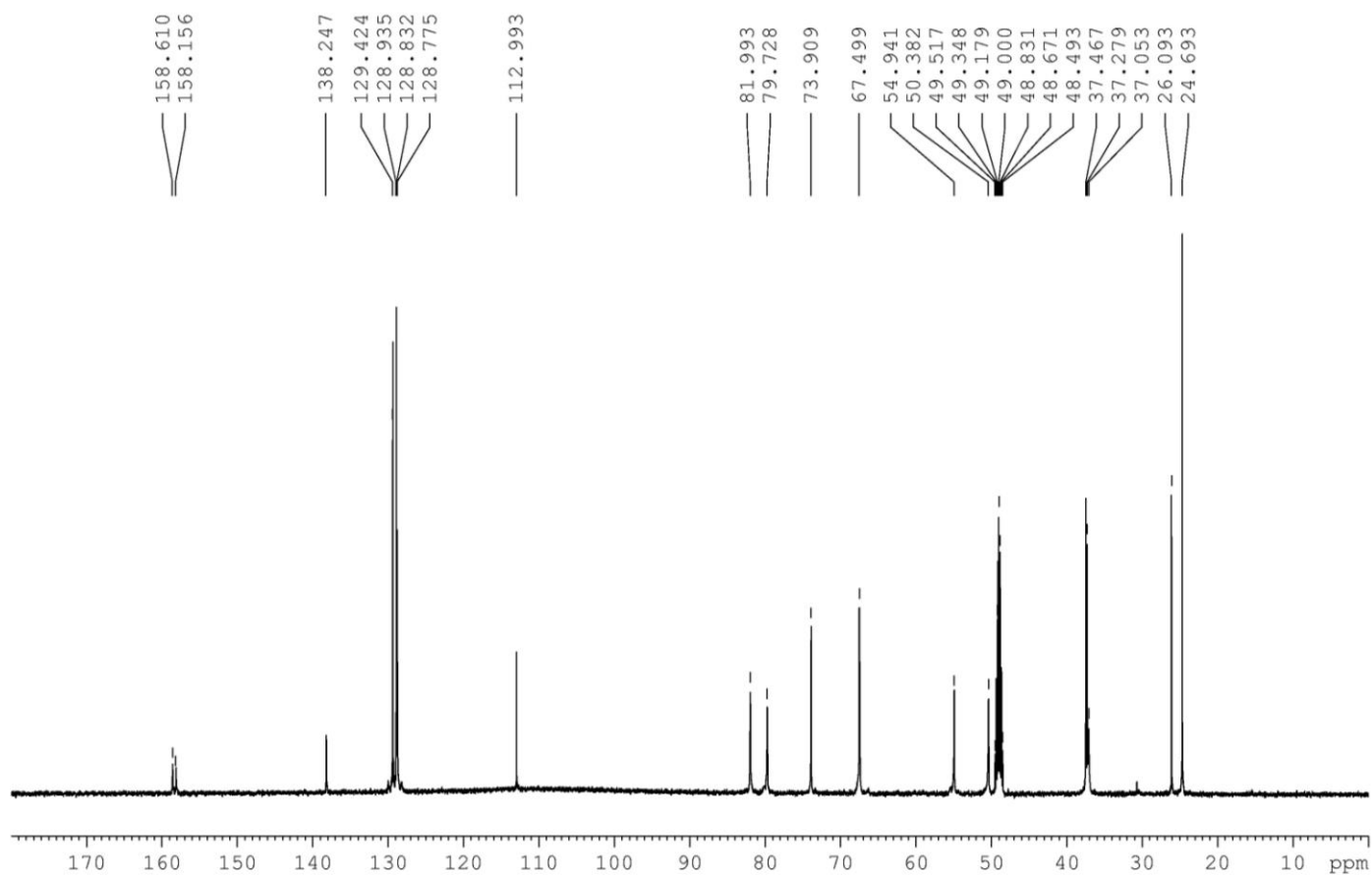
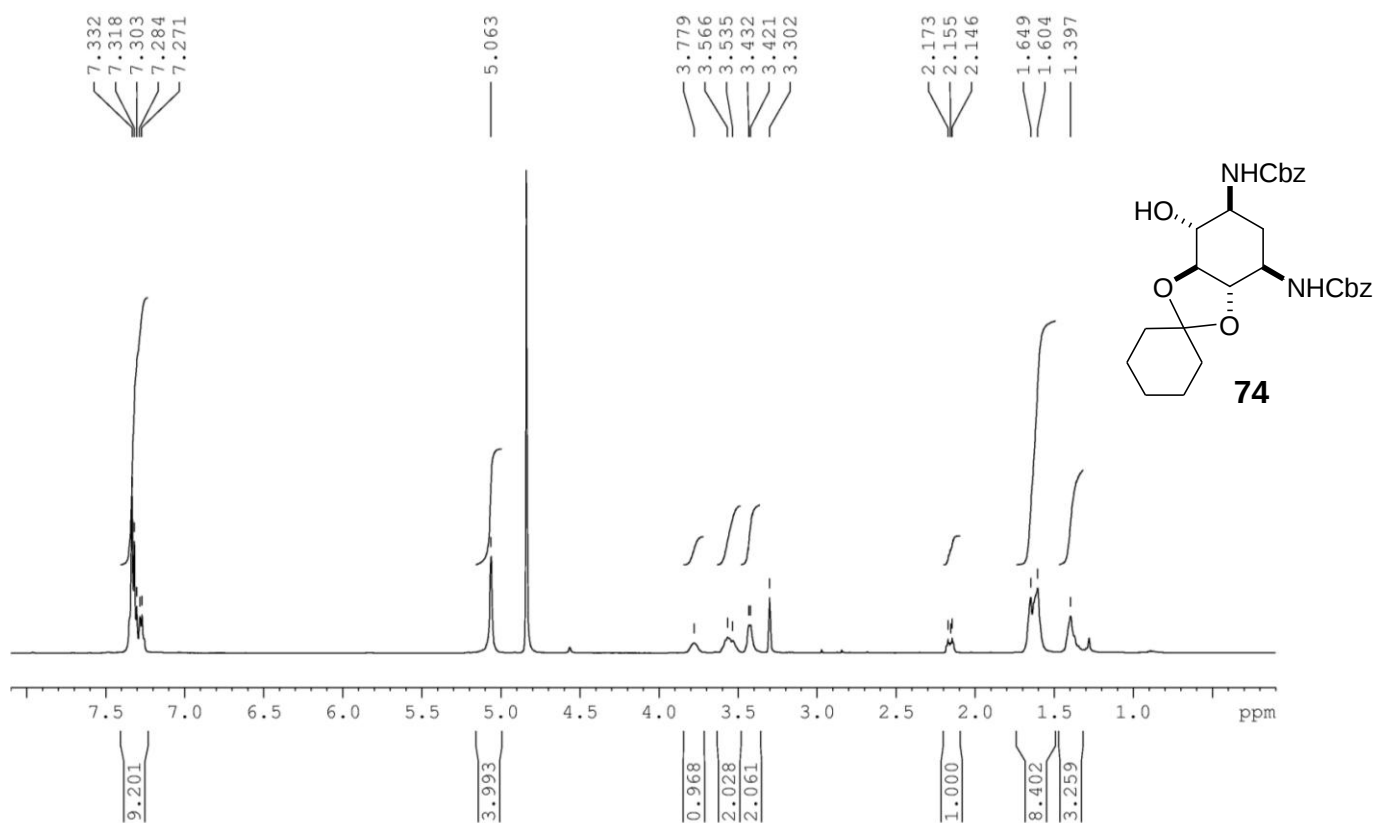
Τριαζόλιο 166: Σε διάλυμα της ένωσης **165** (15.0 mg, 0.0594 mmol) σε άνυδρο DMF (0.5 mL) το οποίο βρίσκεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα προστίθεται NaH (5.9 mg, 60% αιώρημα σε ορυκτέλαιο, 0.149 mmol, 2.5 eq). Το διάλυμα αναδεύεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και εισάγεται πρώτα TBAI (2.2 mg, 0.00594 mmol, 0.1 eq) και μετά στάγδην BnBr (21.2 μ L, 0.178 mmol, 3.0 eq). Η ανάδευση συνεχίζεται για 12 h σε θερμοκρασία δωματίου, οπότε και γίνεται εξουδετέρωση του NaH με στάγδην προσθήκη H₂O (0.5 mL). Εν συνεχεία, προστίθεται EtOAc (8 mL) και γίνεται έκπλυση με H₂O (5 mL), κορεσμένο υδατικό διάλυμα NH₄Cl (5 mL) και άλμη (5 mL). Η οργανική βάση ξηραίνεται με MgSO₄, συμπυκνώνεται και καθαρίζεται χρωματογραφικά για να προκύψει το προϊόν **165** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού (Σύστημα έκλουσης: 5 $\rightarrow$ 20% ακετόνη / CH₂Cl₂). Απόδοση: 24.0 mg (93%). R_f = 0.81 σε 10% ακετόνη / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.66 (q, J = 12.8 Hz, 1H), 1.78-2.00 (bs, 1H), 3.16-3.36 (m, 1H), 3.45-3.63 (m, 2H), 3.63-3.88 (m, 2H), 4.01-4.20 (m, 1H), 4.61-5.05 (m, 6H), 5.20 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 7.10-7.45 (m, 10H), 7.54 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 30.1, 54.9, 60.9, 62.7, 75.7, 76.1, 80.8, 81.5, 83.9, 128.0, 128.3, 128.5, 137.5, 137.9.

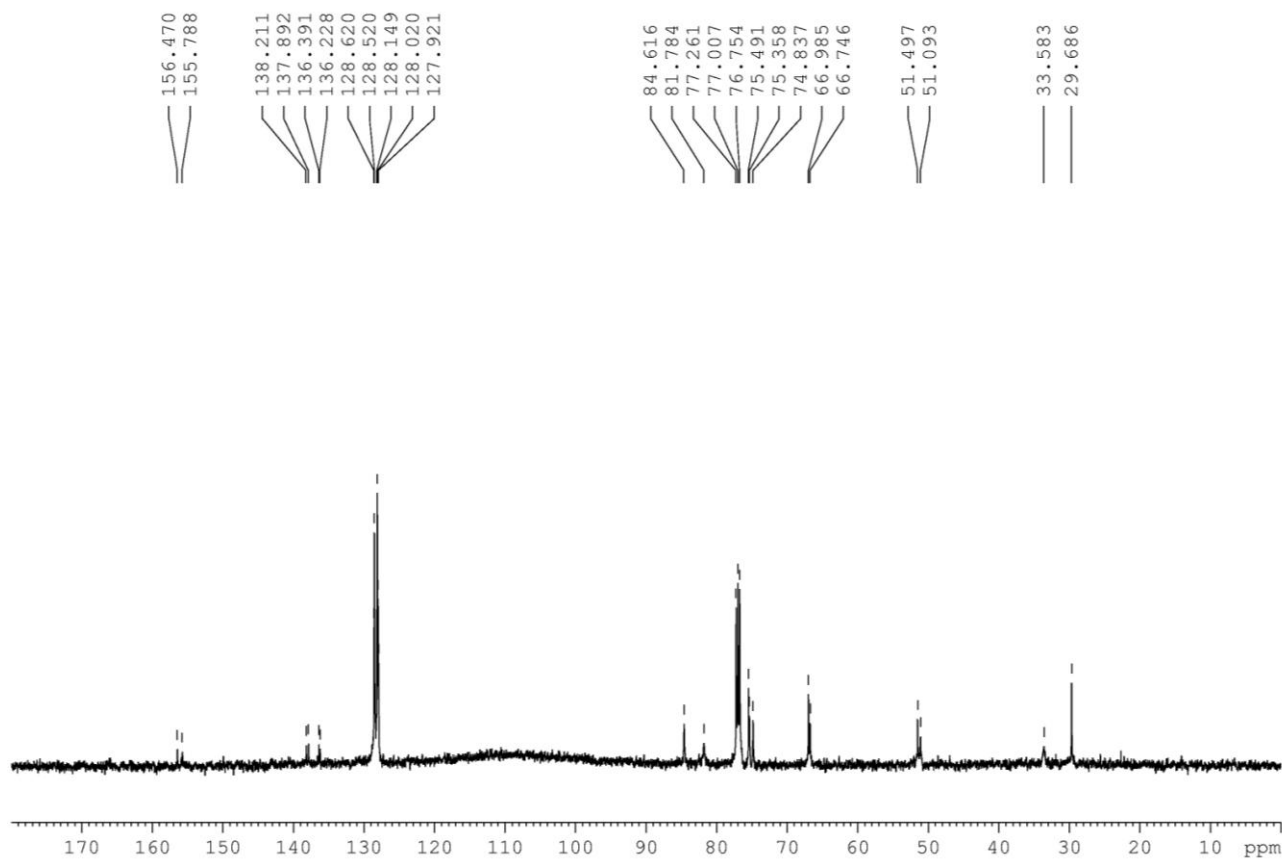
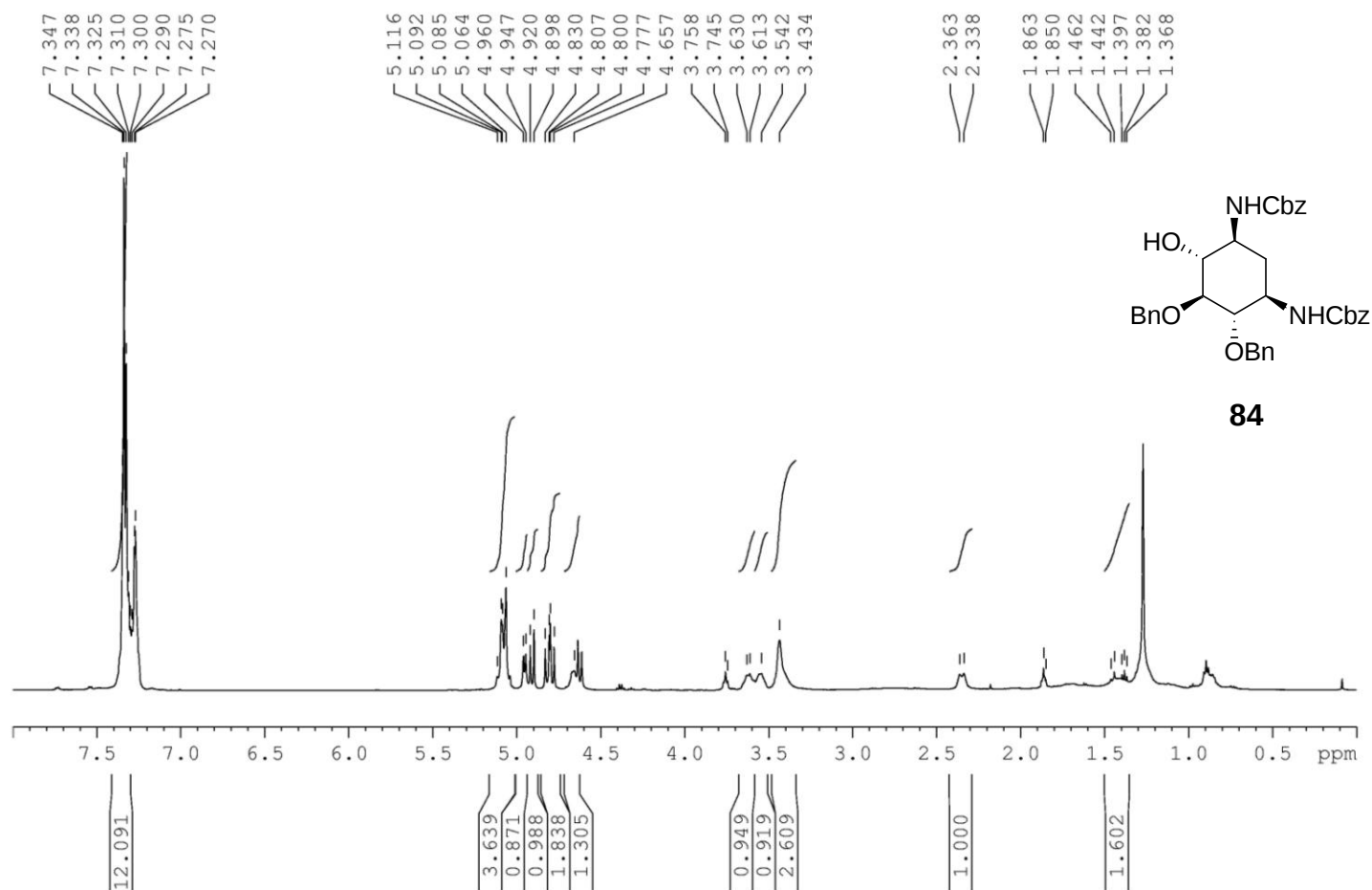


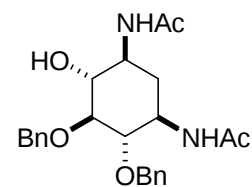
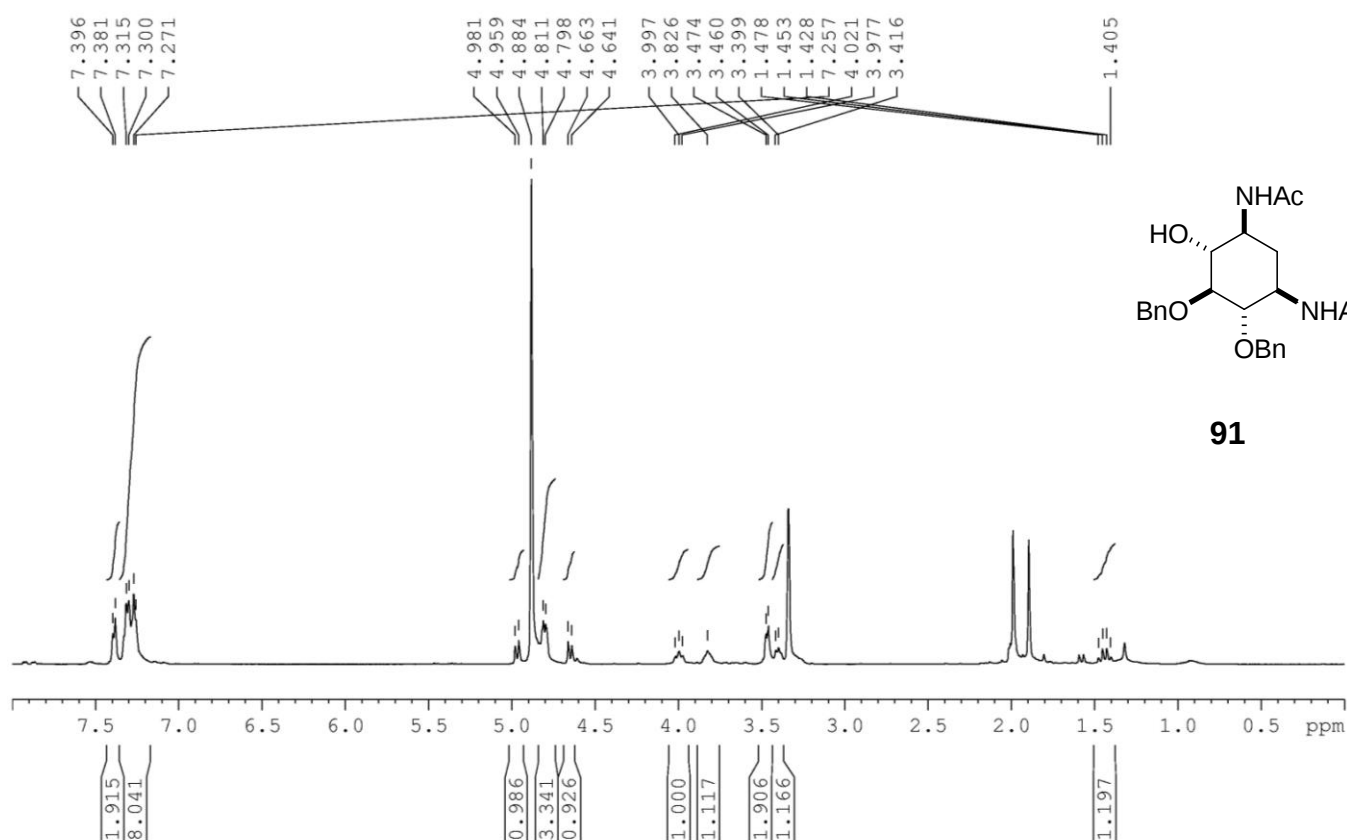
Τριαζόλιο 167: Το αζίδιο **166** (24.0 mg, 0.0555 mmol) διαλύεται σε THF (0.6 mL) και μετά προστίθεται πρώτα υδατικό διάλυμα NaOH 0.1 M (28.0 μ L, 0.0280 mmol, 0.05 eq) και μετά διάλυμα PMe₃ 1.0 M σε THF (278 μ L, 0.278 mmol, 5.0 eq). Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h και μετά συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον υπόλειμμα καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (Σύστημα έκλουσης: 5 $\rightarrow$ 20% MeOH / CH₂Cl₂), οπότε παραλαμβάνεται το παράγωγο **167** υπό τη μορφή λευκού άμορφου στερεού. Απόδοση: 14.0 mg (62%). R_f = 0.50 σε 10% MeOH / CH₂Cl₂. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.67 (q, J = 12.7 Hz, 1H), 3.03-3.26 (m, 1H), 3.40 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 3.57 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 3.75 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 3.98-4.27 (m, 1H), 4.70-4.90 (m, 2H), 4.90-5.10 (m, 2H), 5.10-5.28 (m, 1H), 7.15-7.46 (m, 10H), 7.49 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 30.4, 51.2, 55.3, 62.6, 75.3, 75.8, 81.1, 81.8, 83.6, 127.9, 128.0, 128.1, 128.4, 128.5, 130.5, 138.1, 138.2.

10.1 Ενώσεις του κεφαλαίου 5

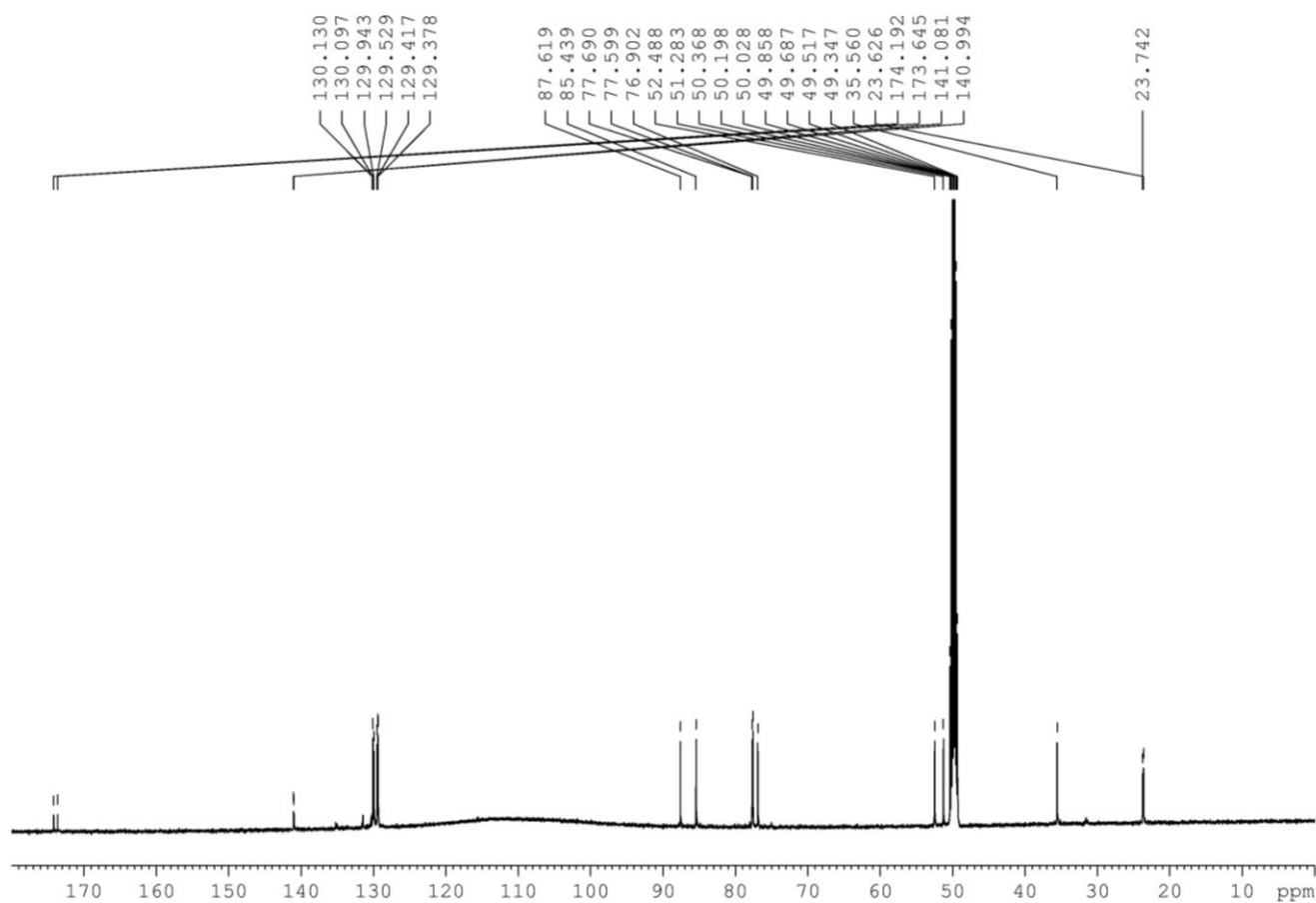


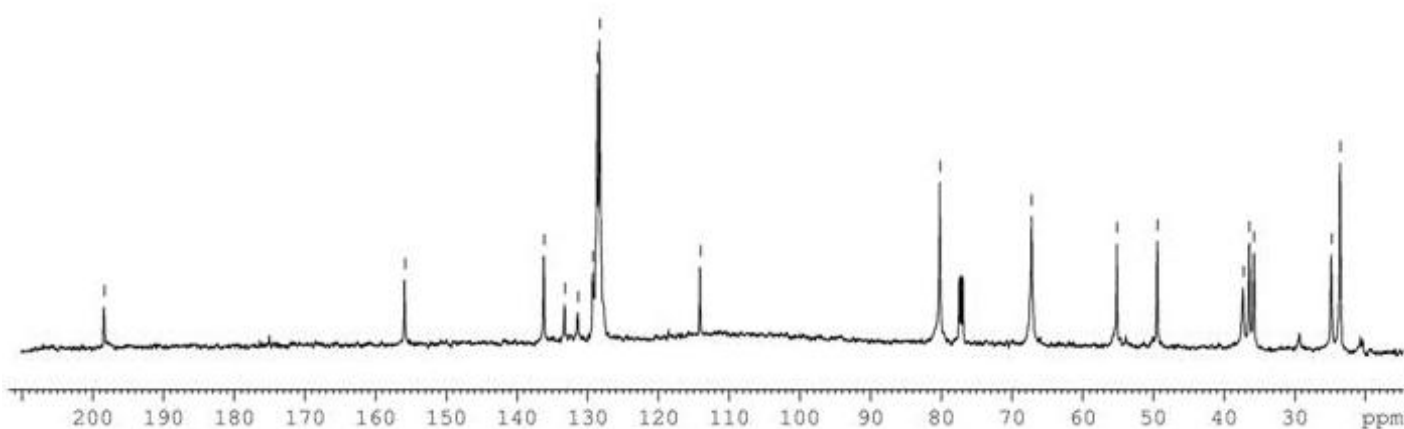
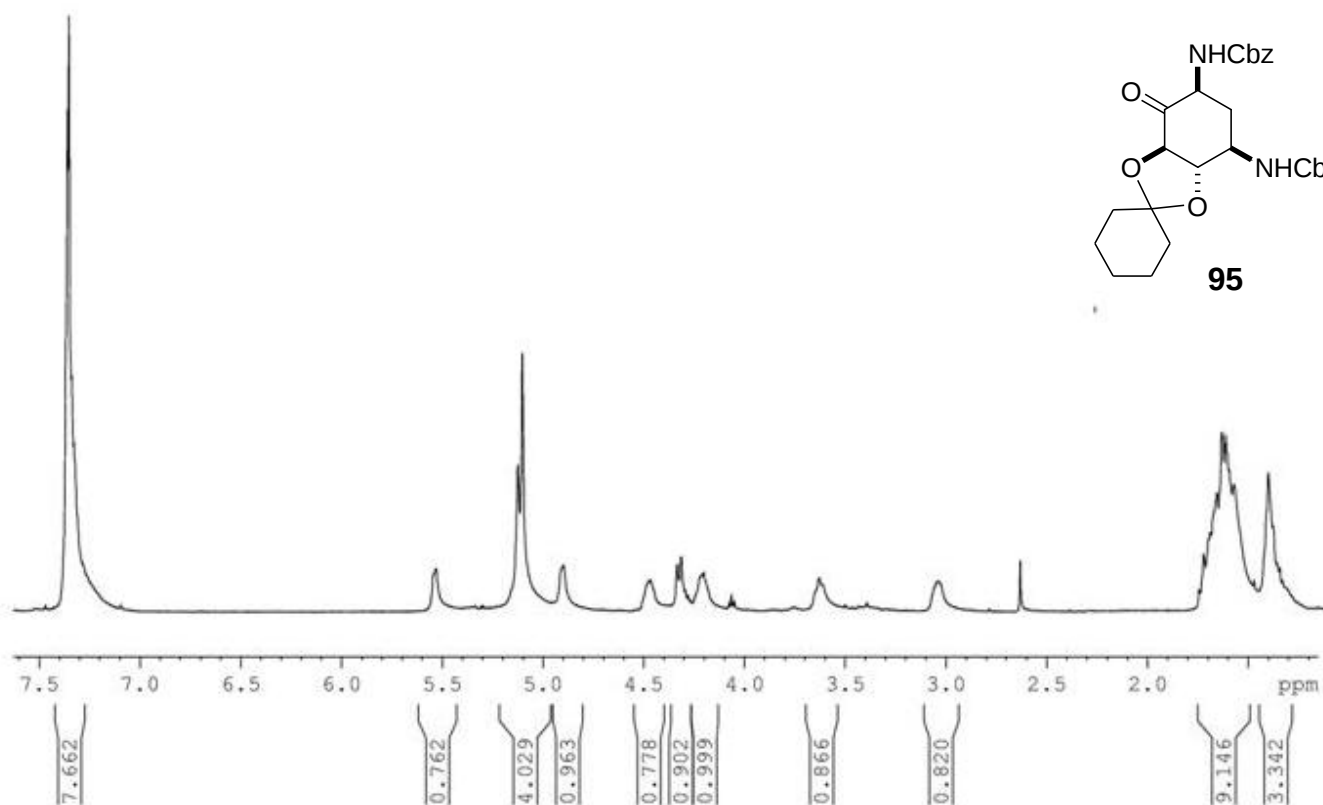
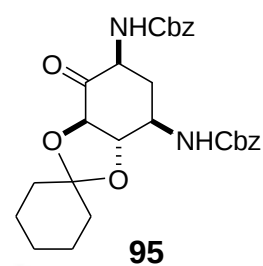


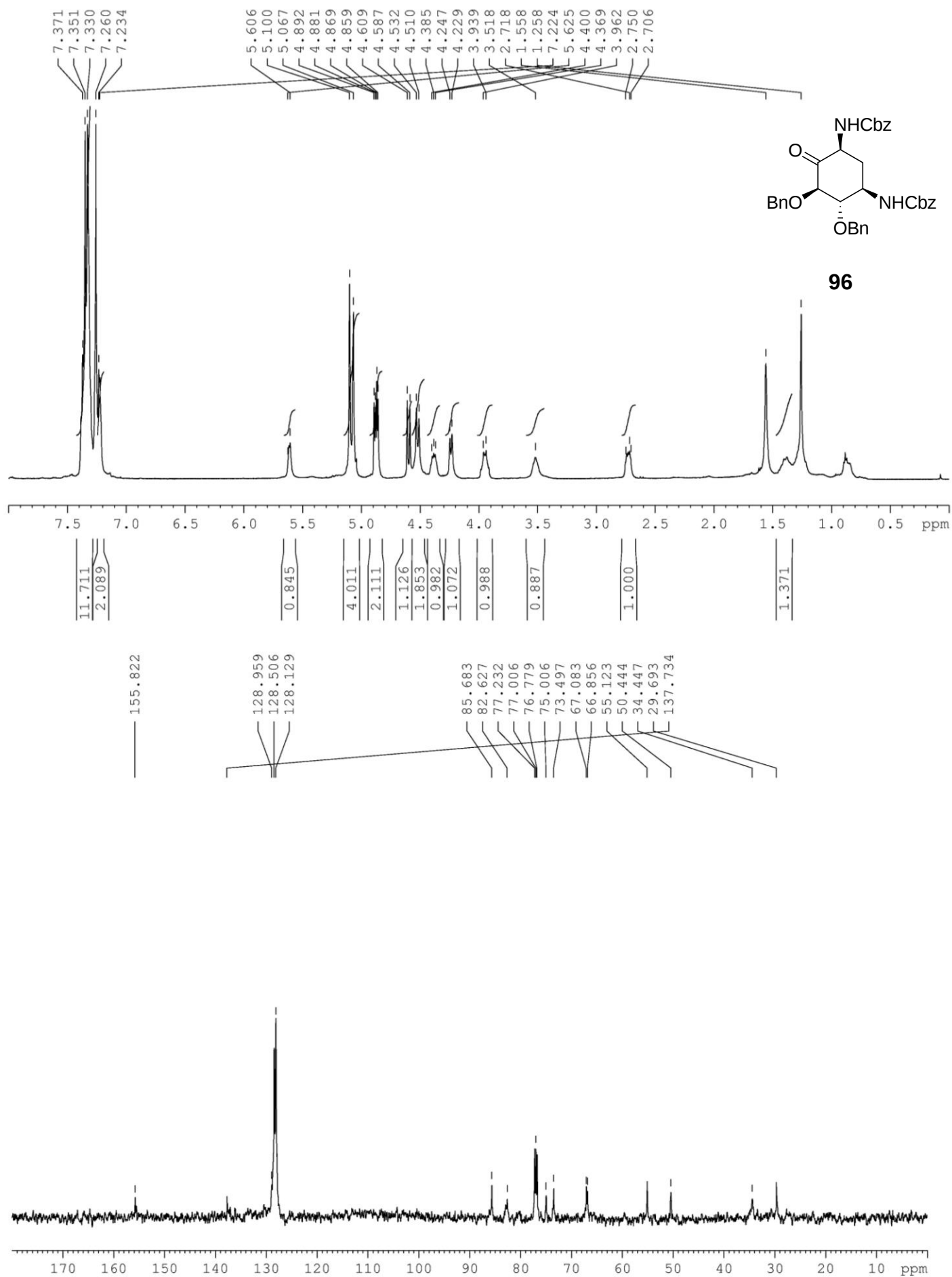


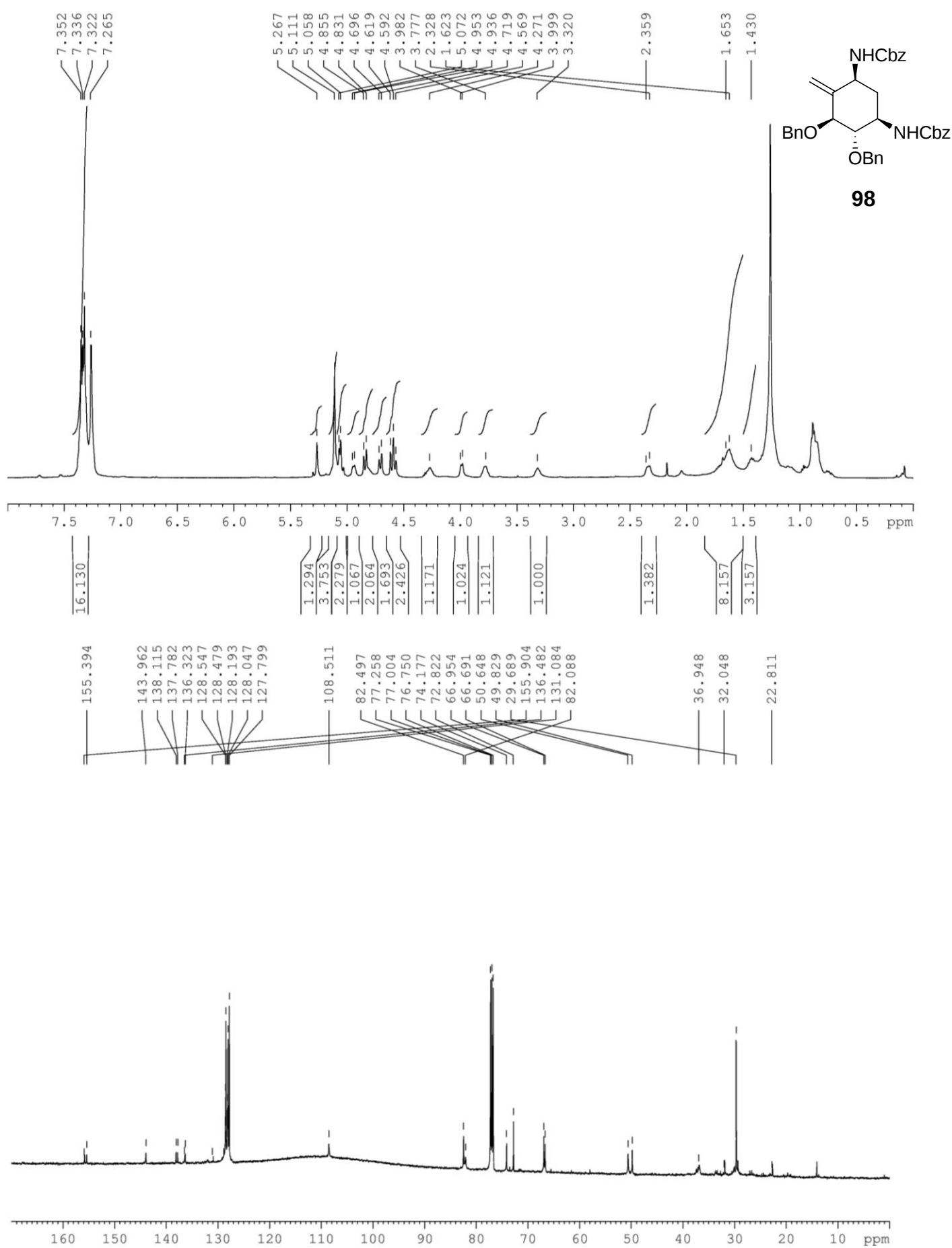


91

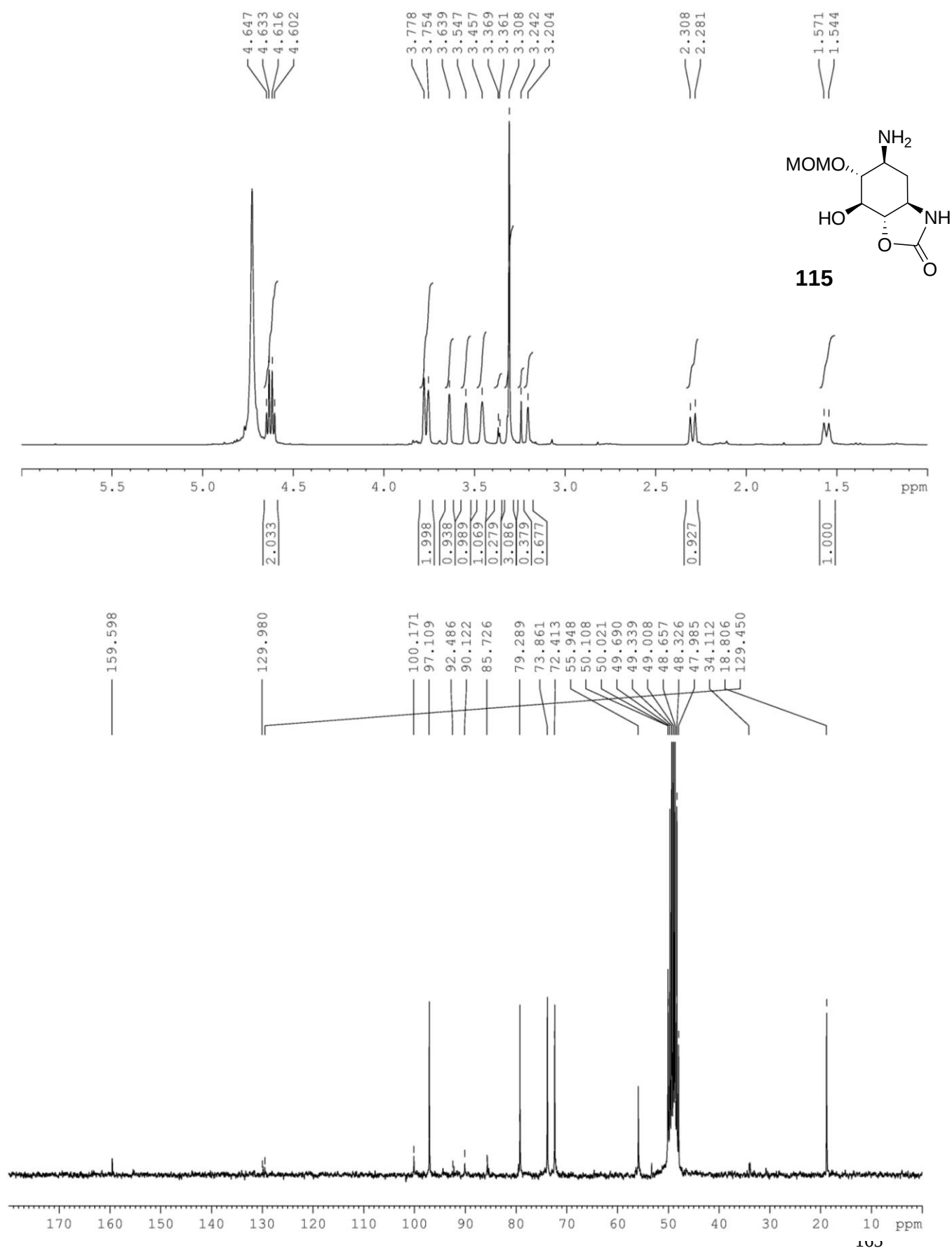


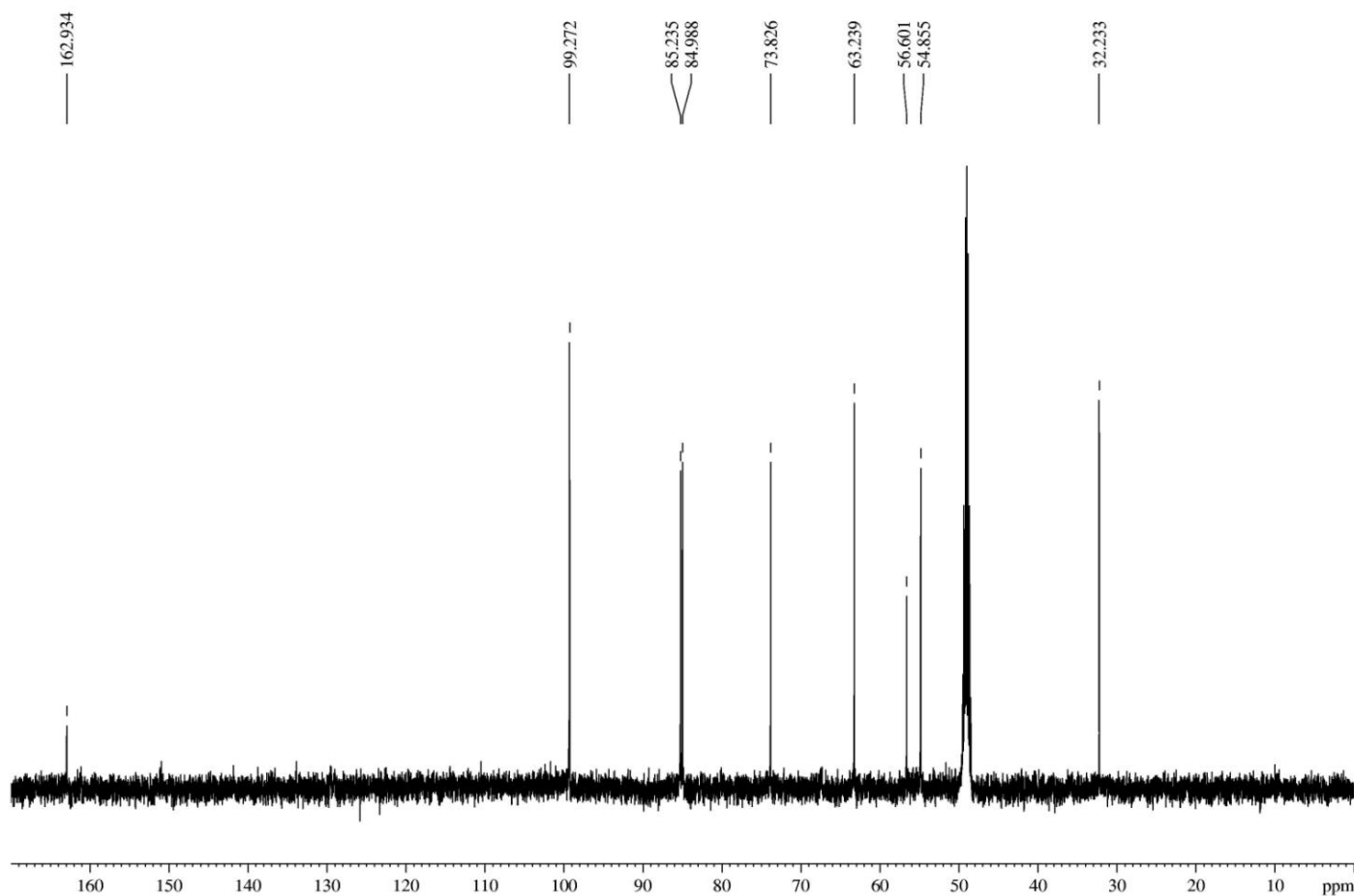
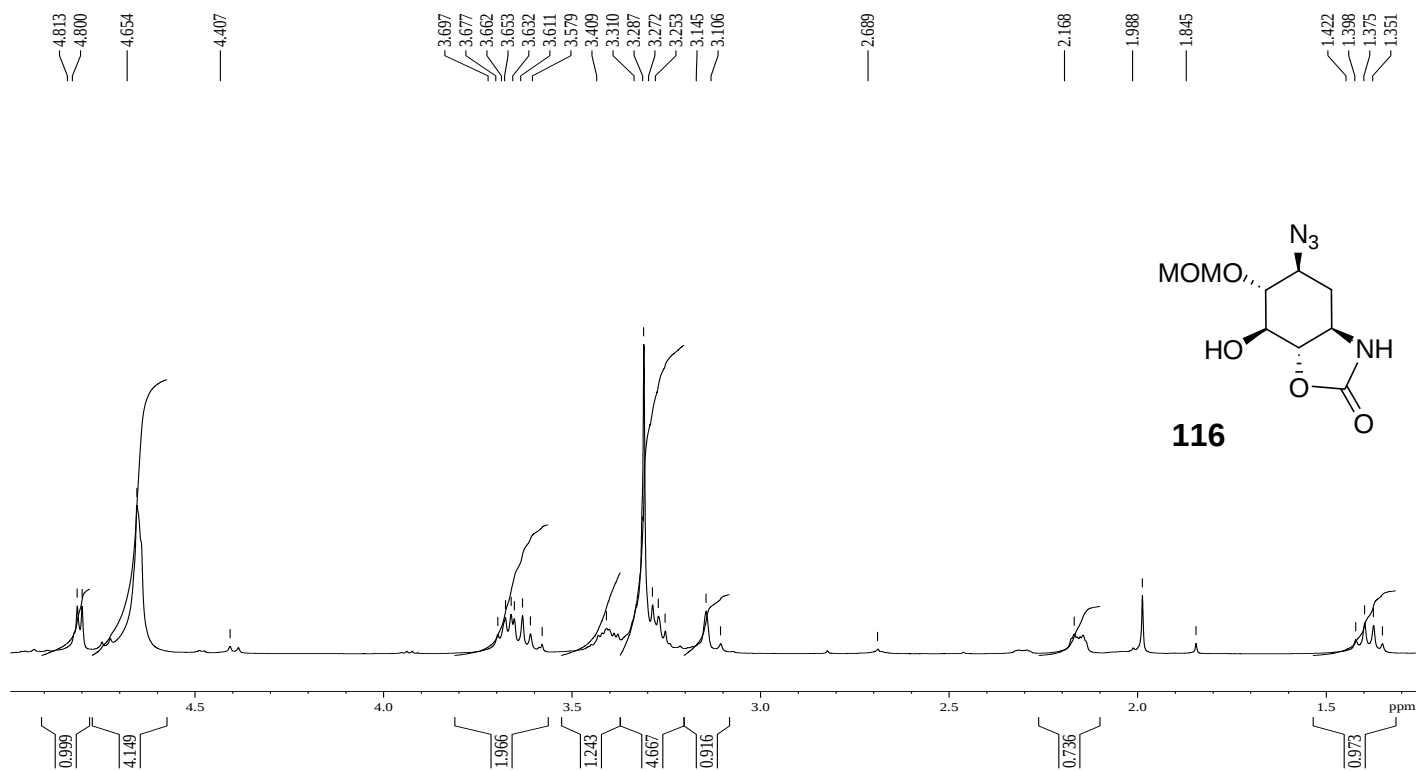


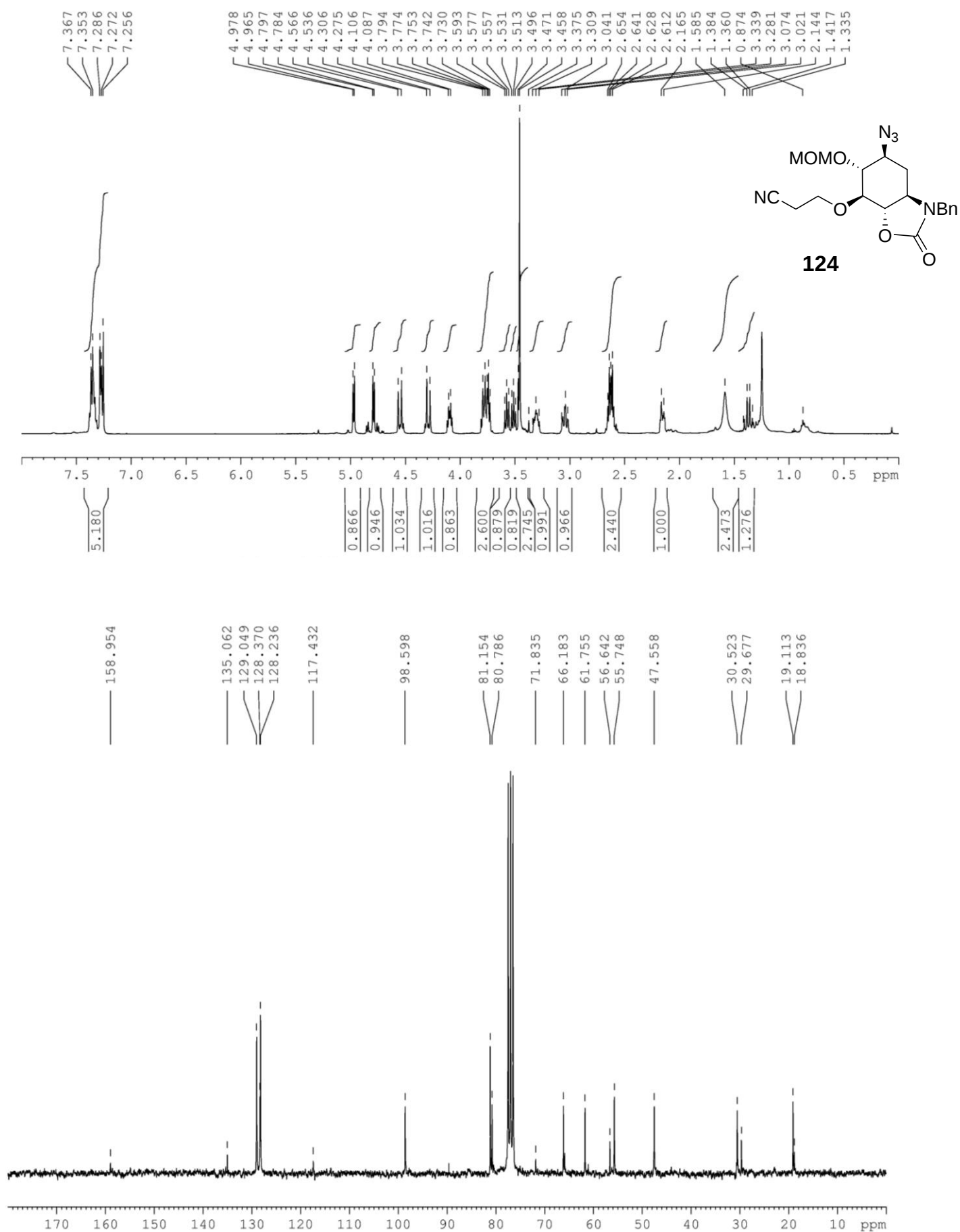


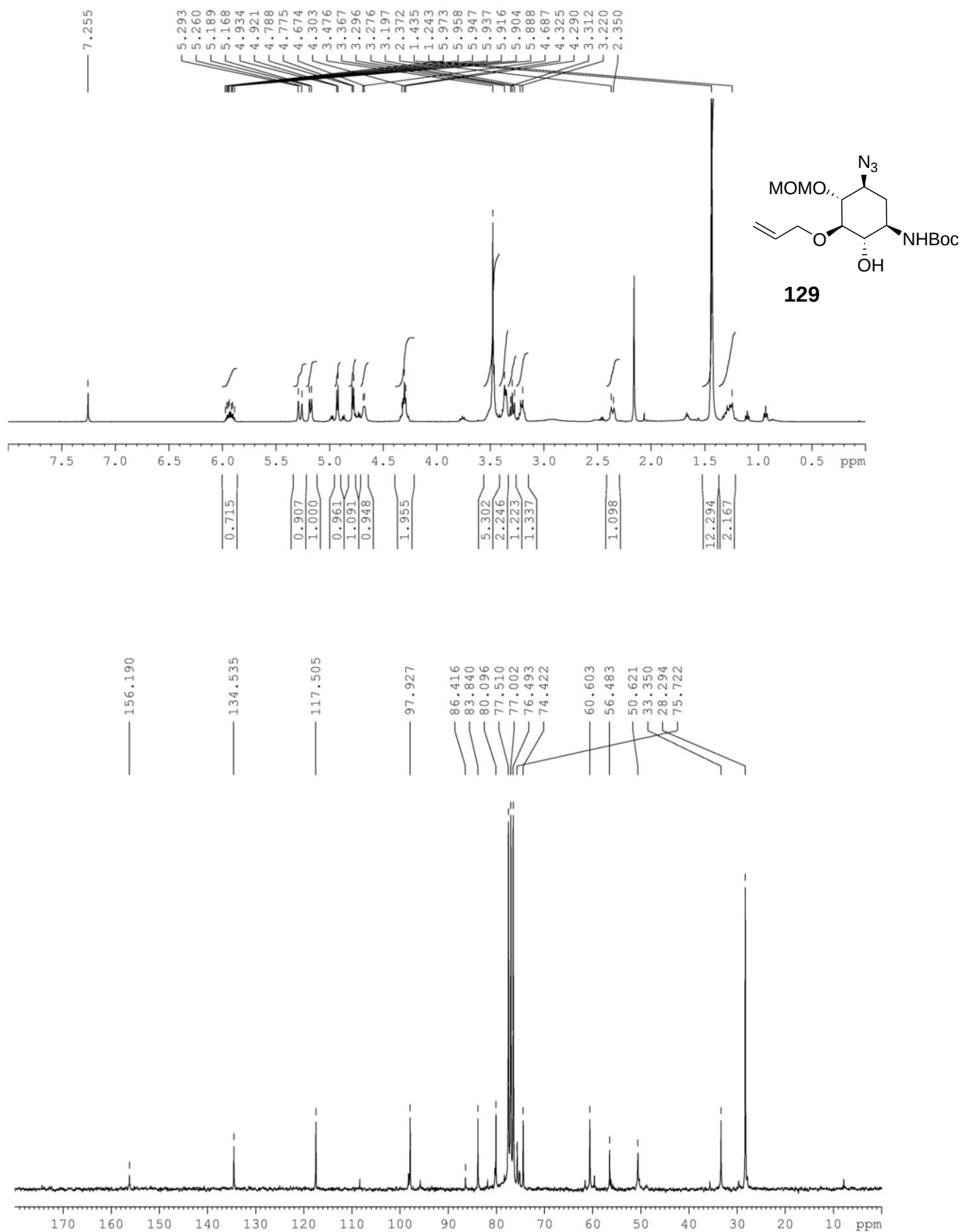


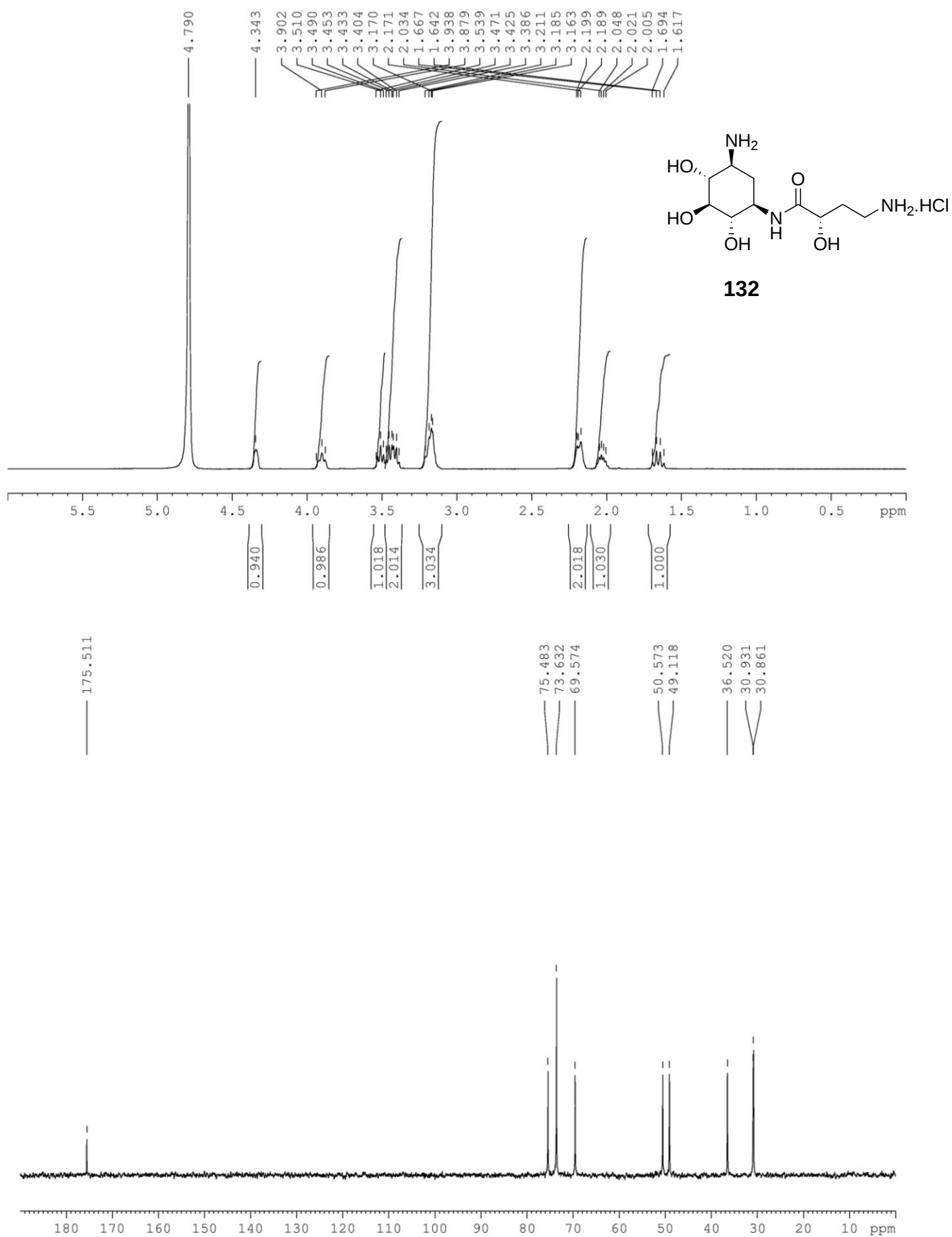
10.2 Ενώσεις του κεφαλαίου 6



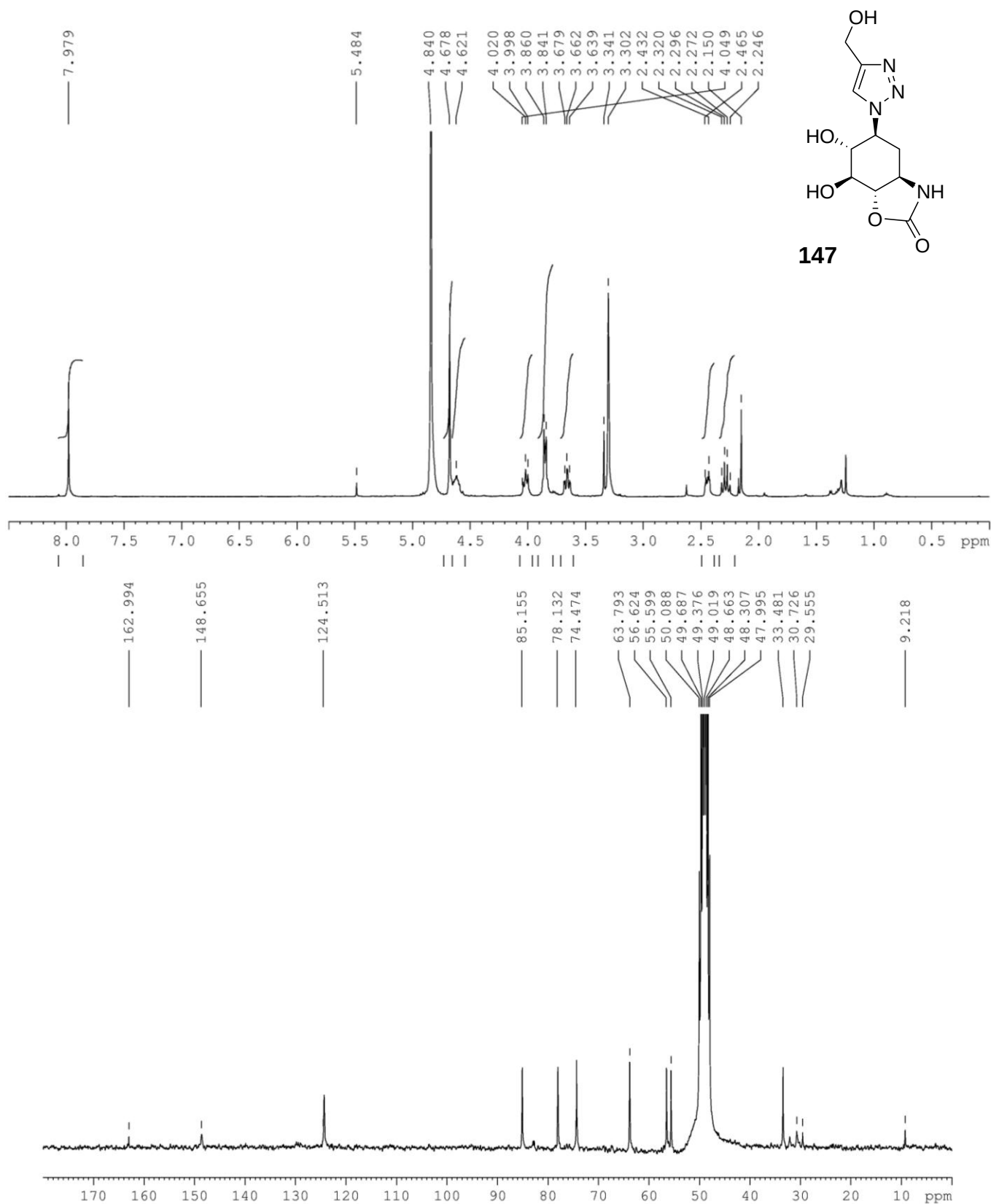


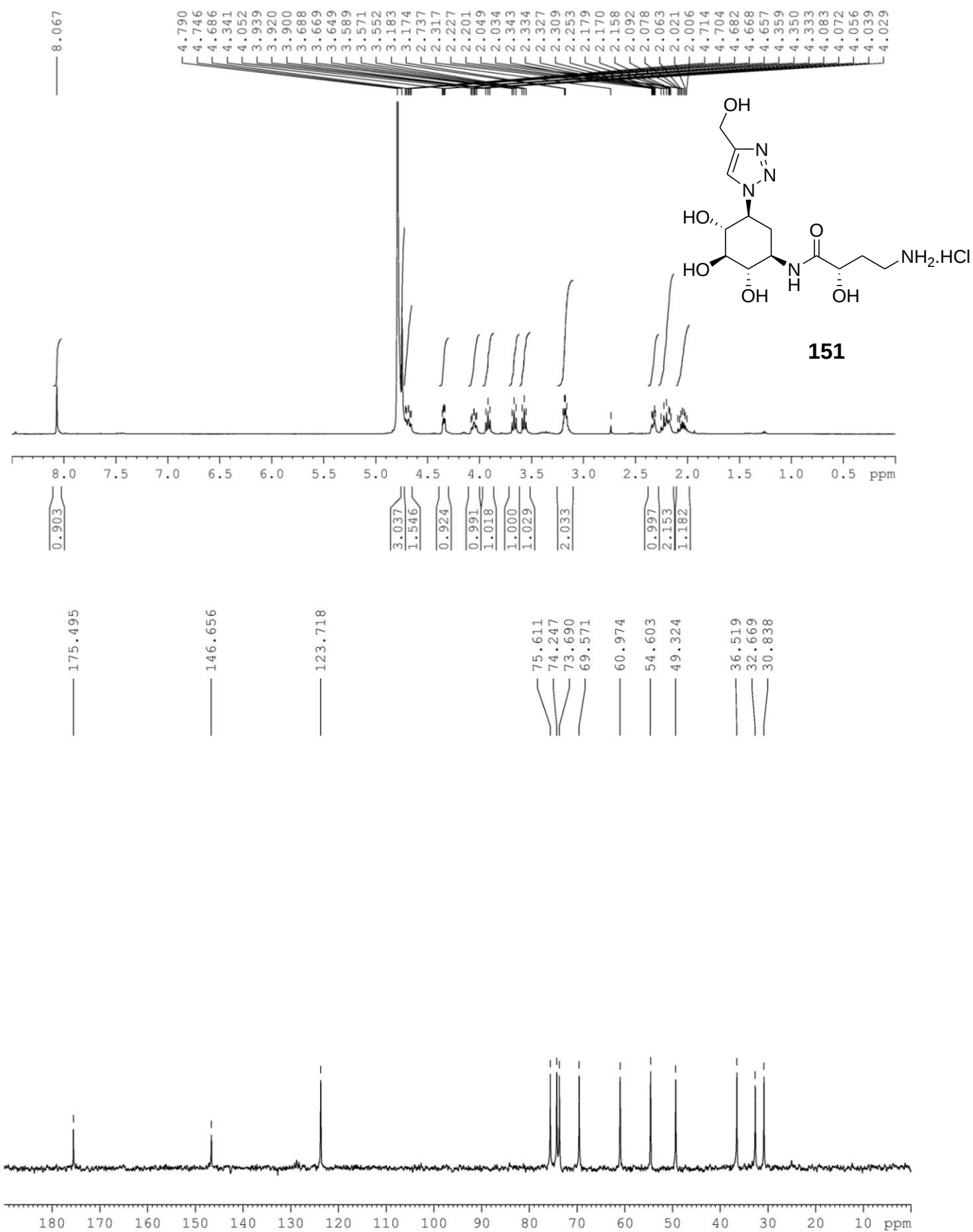




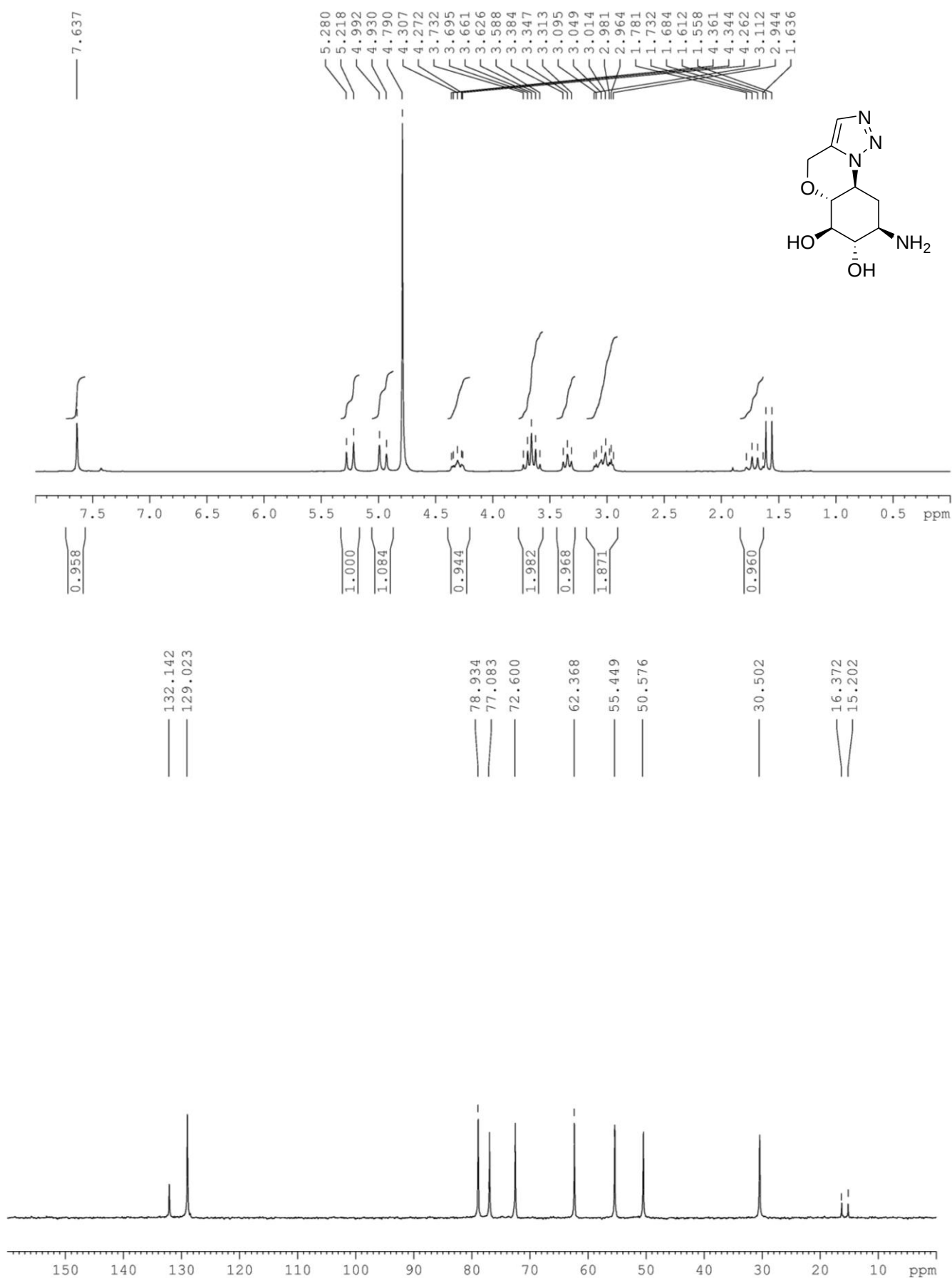


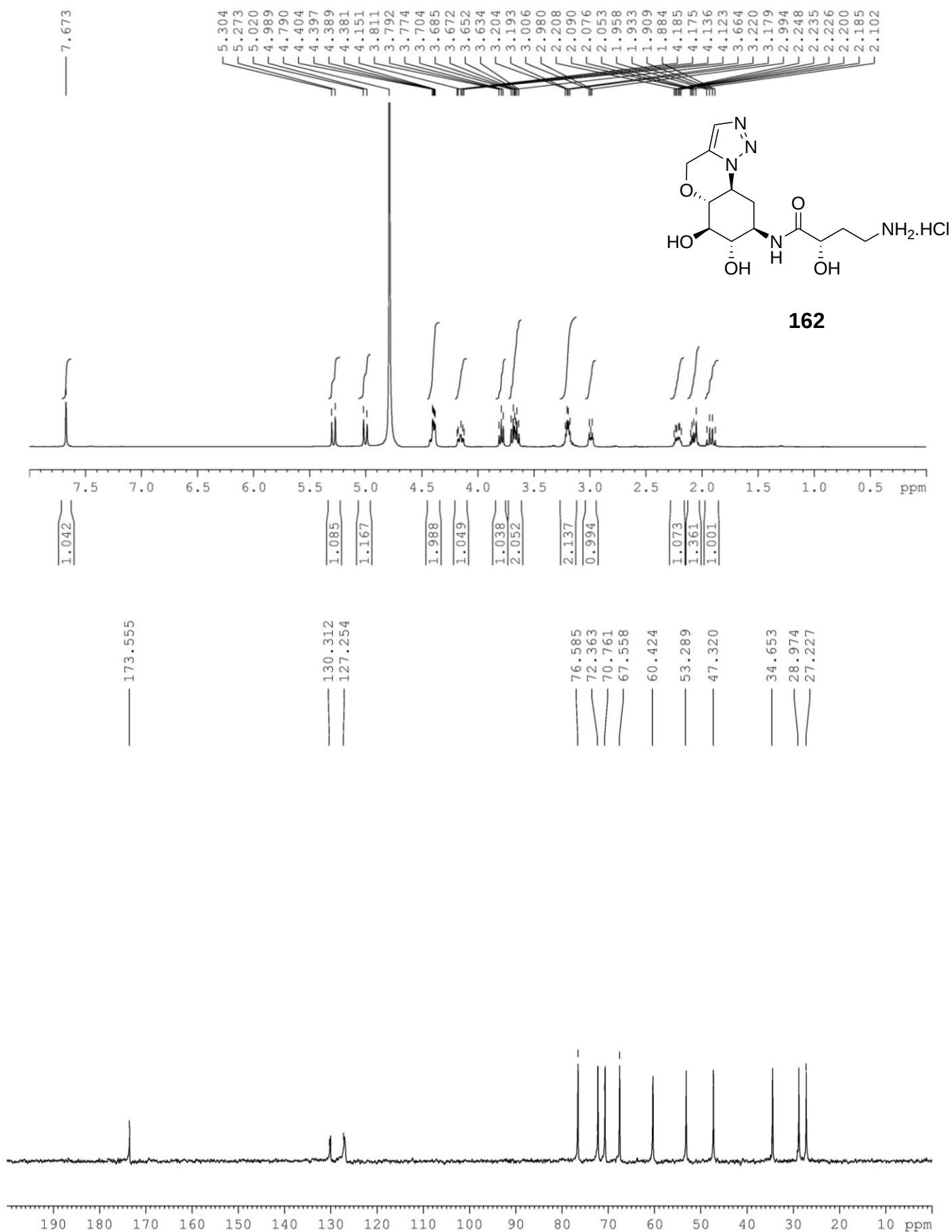
10.3 Ενώσεις του κεφαλαίου 7

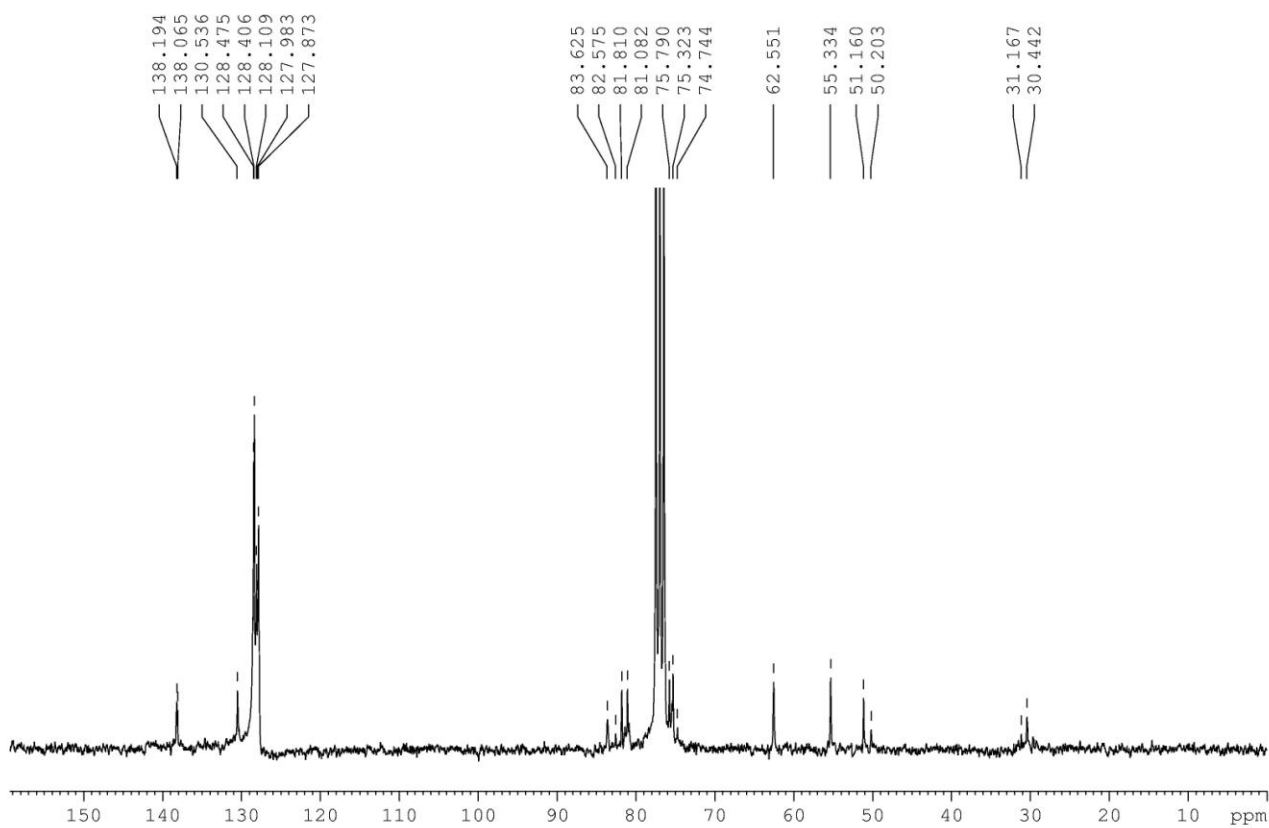
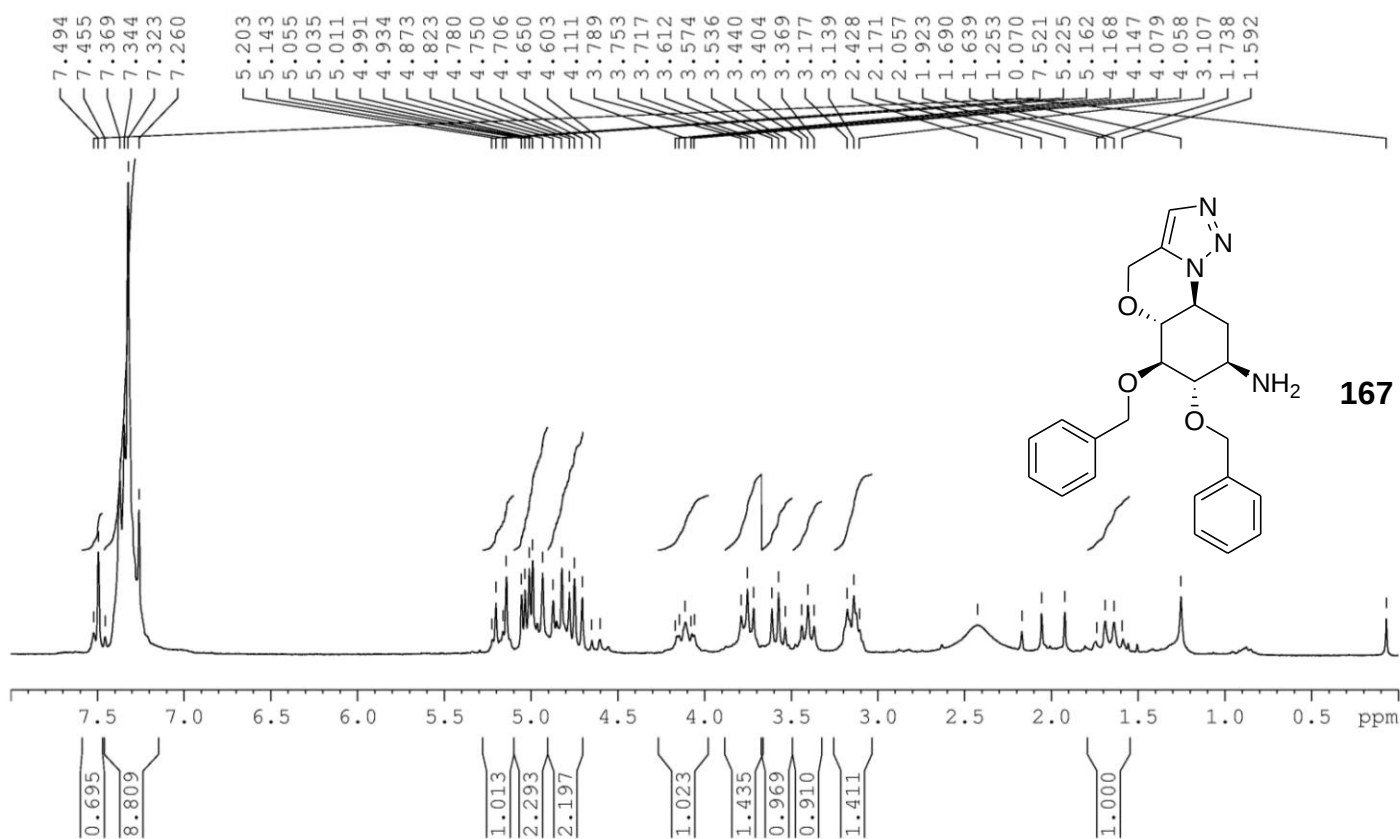












Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

NIS	N-ιωδοσουκινιμίδιο
Me	Μεθυλο
Tf	Τριφθορομεθανοσουλφονυλο
Ac	Ακετυλο
PMB	π-Μεθοξυβενζυλο
Cbz	Καρβοβενζοξυ
Bn	Βενζυλο
DDQ	2,3-Διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
CSA	Καμφοροσουλφονικό οξύ
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
Et	Αιθυλο
2,5-dDOS	2,5-διδεοξυστρεπταμίνη
Ph	Φαινυλο
Bz	Βενζοϋλο
TCCA	Τριχλωροϊσοκυανουρικό οξύ
TEMPO	(2,2,6,6-Τετραμεθυλοπιπεριδιν-1-υλο)-οξυλική ρίζα
TFA	Τριφθοροοξικό οξύ
Cbz-NOS	N-Βενζυλοξυκαρβονυλοξυσουκινιμίδιο
MOM	Μεθοξυμεθυλο
TES	Τριαιθυλοσιλυλο
Boc	tert-Βουτυλοξυκαρβονυλο
TBAF	Φθοριούχο τετραβουτυλαμμώνιο
EDC	Αιθυλο-(διμεθυλαμινοπυρροϋλο)-καρβοδιϊμίδιο
HOBt	N-Υδροξυβενζοτρίαζόλιο
4-DMAP	4-διμεθυλαμινοπυριδίνη
CAN	Νιτρικό δημήτριο (IV)-αμμώνιο
THF	Τετραϋδροφουράνιο
p-Ts	π-τολουλοσουλφονυλο (τοσυλο)

NaHMDS	Δις-(τριμεθυλοσιλυλο)-αμιδικό νάτριο
<i>n</i> -Bu	<i>n</i> -Βουτυλο
Tol	Τολουόλιο
LiHMDS	Δις-(τριμεθυλοσιλυλο)-αμιδικό λίθιο
HMPA	Εξαμεθυλοφωσφοραμίδιο
DME	1,2-Διμεθοξυαιθάνιο
Py	Πυριδίνη
MEM	Μεθοξυαιθοξυμεθυλο
DIPEA	<i>N,N</i> -Διϊσοπροπυλοαιθυλαμίνη
TBAI	Ιωδιούχο τετραβουτυλαμμώνιο
TIPS	Τριϊσοπροπυλοσιλυλο
TMS	Τριμεθυλοσιλυλο
NMO	<i>N</i> -Οξείδιο της <i>N</i> -μεθυλομορφολίνης

12. ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- 1) L. Stryer, *Βιοχημεία-Τόμος Πρώτος* (3η έκδοση), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997, pp. 73-74.
- 2) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006.
- 3) L. Stryer, *Βιοχημεία-Τόμος Πρώτος* (3η έκδοση), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997, pp. 93-95.
- 4) L. Stryer, *Βιοχημεία-Τόμος Πρώτος* (3η έκδοση), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997, pp. 87-88.
- 5) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, pp. 277-278.
- 6) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, pp. 275-276.
- 7) W. H. Freeman, *Molecular Cell Biology* (4th edition), H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky et al., eds., New York, 2000.
- 8) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, p. 281.
- 9) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, p. 295.
- 10) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, p. 285.
- 11) G. C. Cooper, R. E. Hausman, *The Cell: A Molecular Approach* (3rd edition), Sinauer, 2004, pp. 261–276, 297, 339–344.
- 12) W. Wirta, *Mining the Transcriptome – Methods and Applications*, Stockholm: School of Biotechnology, Royal Institute of Technology, 2006.
- 13) A. W. Karzai, M. M. Susskind, R. T. Sauer, Smpb, a Unique Rna-Binding Protein Essential for the Peptide-Tagging Activity of Ssra (Tmrna), *The EMBO journal*, 1999, vol. 18, pp. 3793-3799.
- 14) S. Barends, J. Wower, B. Kraal, Kinetic parameters for tmRNA binding to alanyl-tRNA synthetase and elongation factor Tu from Escherichia coli, *Biochemistry*, 2000, vol. 39, pp. 2652-2658.
- 15) J. Rudinger-Thirion, R. Giege, B. Felden, Aminoacylated tmRNA from Escherichia coli interacts with prokaryotic elongation factor Tu, *RNA*, 1999, vol. 5, pp. 989-992.
- 16) K. C. Keiler, Biology of trans-translation, *Annu. Rev. Microbiol.*, 2008, vol. 62, pp. 133-151.
- 17) P. Gueneau de Novoa, K. P. Williams, The tmRNA website: reductive evolution of tmRNA in plastids and other endosymbionts, *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, pp. D104-108.

- 18) J. S. Mattick, I. V. Makunin, Non-coding RNA, *Hum. Mol. Genet.*, 2006, vol. 15 Spec No 1, pp. R17-29.
- 19) M. Rassoulzadegan, V. Grandjean, P. Gounon, S. Vincent, I. Gillot, F. Cuzin, RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse, *Nature*, 2006, vol. 441, pp. 469-474.
- 20) I. Bentwich, A. Avniel, Y. Karov, R. Aharonov, S. Gilad, O. Barad, A. Barzilai, P. Einat, U. Einav, E. Meiri, E. Sharon, Y. Spector, Z. Bentwich, Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs, *Nat. Genet.*, 2005, vol. 37, pp. 766-770.
- 21) D. P. Bartel, MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, 2009, vol. 136, pp. 215-233.
- 22) D. P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, 2004, vol. 116, pp. 281-297.
- 23) P. Trang, J. B. Weidhaas, F. J. Slack, MicroRNAs as potential cancer therapeutics, *Oncogene*, 2008, vol. 27 Suppl 2, pp. S52-57.
- 24) C. Li, Y. Feng, G. Coukos, L. Zhang, Therapeutic microRNA strategies in human cancer, *AAPS J.*, 2009, vol. 11, pp. 747-757.
- 25) P. Fasanaro, S. Greco, M. Ivan, M. C. Capogrossi, F. Martelli, microRNA: emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases, *Pharmacol. Ther.*, 2010, vol. 125, pp. 92-104.
- 26) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, pp. 288-289.
- 27) S. M. Lobo, N. Hernandez, *In Transcription, Mechanisms and Regulation*, R. C. Conaway, J. W. Conaway, eds, Raven Press, Ltd. New York, 1994, pp. 127-159.
- 28) U. T. Meier, The many facets of H/ACA ribonucleoproteins, *Chromosoma*, 2005, vol. 114, pp. 1-14.
- 29) S. Kishore, S. Stamm, The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C, *Science*, 2006, vol. 311, pp. 230-232.
- 30) J. P. Bachellerie, J. Cavaille, A. Huttenhofer, The expanding snoRNA world, *Biochimie*, 2002, vol. 84, pp. 775-790.
- 31) A. K. Henras, C. Dez, Y. Henry, RNA structure and function in C/D and H/ACA s(no)RNPs, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2004, vol. 14, pp. 335-343.
- 32) A. M. Kiss, B. E. Jady, E. Bertrand, T. Kiss, Human box H/ACA pseudouridylation guide RNA machinery, *Mol. Cell. Biol.*, 2004, vol. 24, pp. 5797-5807.
- 33) J. Cavaille, H. Seitz, M. Paulsen, A. C. Ferguson-Smith, J. P. Bachellerie, Identification of tandemly-repeated C/D snoRNA genes at the imprinted human 14q32 domain reminiscent of those at the Prader-Willi/Angelman syndrome region, *Hum. Mol. Genet.*, 2002, vol. 11, pp. 1527-1538.
- 34) J. Cavaille, K. Buiting, M. Kieffmann, M. Lalande, C. I. Brannan, B. Horsthemke, J. P. Bachellerie, J. Brosius, A. Huttenhofer, Identification of brain-specific and

- imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, vol. 97, pp. 14311-14316.
- 35) A. M. Kiss, B. E. Jady, E. Bertrand, T. Kiss, Human box H/ACA pseudouridylation guide RNA machinery, *Mol. Cell. Biol.*, 2004, vol. 24, pp. 5797-5807.
- 36) J. Cavaille, P. Vitali, E. Basyuk, A. Huttenhofer, J. P. Bachellerie, A novel brain-specific box C/D small nucleolar RNA processed from tandemly repeated introns of a noncoding RNA gene in rats, *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, pp. 26374-26383.
- 37) A. Huttenhofer, M. Kiefmann, S. Meier-Ewert, J. O'Brien, H. Lehrach, J. P. Bachellerie, J. Brosius, RNomics: an experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, non-messenger RNAs in mouse, *EMBO J.*, 2001, vol. 20, pp. 2943-2953.
- 38) P. Vitali, H. Royo, H. Seitz, J. P. Bachellerie, A. Huttenhofer, J. Cavaille, Identification of 13 novel human modification guide RNAs, *Nucleic Acids Res.*, 2003, vol. 31, pp. 6543-6551.
- 39) J. J. Rossi, Ribozyme diagnostics comes of age, *Chem. Biol.*, 2004, vol. 11, pp. 894-895.
- 40) P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis, *Science*, 2000, vol. 289, pp. 920-930.
- 41) a) N. D. Pearson, C. D. Prescott, RNA as a drug target, *Chem Biol*, 1997, vol. 4, pp. 409-414; cwN. A. Petasis, E. I. Bzowej, Titanium-mediated carbonyl olefations. 1. Methylenations of carbonyl compounds with dimethyltitanocene, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, vol. 112, pp. 6392-6394, b) T. Hermann, E. Westhof, RNA as a drug target: chemical, modelling, and evolutionary tools, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1998, vol. 9, pp. 66-73, c) M. Afshar, C. D. Prescott, G. Varani, Structure-based and combinatorial search for new RNA-binding drugs, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, vol. 10, pp. 59-63, d) Y. Tor, RNA and the small molecule world, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1999, vol. 38, pp. 1579-1582.
- 42) a) E. H. Bayne, R. C. Allshire, RNA-directed transcriptional gene silencing in mammals, *Trends Genet.*, 2005, vol. 21, pp. 370-373, b) L. Manche, S. R. Green, C. Schmedt, M. B. Mathews, Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI, *Mol. Cell. Biol.*, 1992, vol. 12, pp. 5238-5248, c) C. A. Sledz, M. Holko, M. J. de Veer, R. H. Silverman, B. R. Williams, Activation of the interferon system by short-interfering RNAs, *Nat. Cell. Biol.*, 2003, vol. 5, pp. 834-839, d) M. J. Fedor, J. R. Williamson, The catalytic diversity of RNAs, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2005, vol. 6, pp. 399-412.
- 43) M. Jovanovic, M. O. Hengartner, miRNAs and apoptosis: RNA to die for, *Oncogene*, 2006, vol. 25, pp. 6176-6187.
- 44) G. L. Sen, H. M. Blau, A brief history of RNAi: the silence of the genes, *FASEB J.*, 2006, vol. 20, pp. 1293-1299.
- 45) L. Manche, S. R. Green, C. Schmedt and M. B. Mathews, Interactions between Double-Stranded RNA Regulators and the Protein Kinase Dai, *Molecular and Cellular Biology*, 1992, vol. 12, pp. 5238-5248.

-
- 46) C. A. Sledz, M. Holko, M. J. Veer, R. H. Silverman, B. R. Williams, Activation of the interferon systems by short-interfering RNAs, *Nat. Cell. Biol.*, 2003, vol. 5, pp. 834-839.
- 47) M. J. Fedor, J. R. Williamson, The catalytic diversity of RNAs, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2005, vol. 6, pp. 399-412.
- 48) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, pp. 277-279.
- 49) E. G. Wagner, S. Altuvia, P. Romby, Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements, *Adv. Genet.*, 2002, vol. 46, pp. 361-398.
- 50) C. Seignani, G. A. Calin, L. D. Siracusa, C. M. Croce, Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression, *Mamm. Genome*, 2006, vol. 17, pp. 189-202.
- 51) E. S. DeJong, B. Luy, J. P. Marino, RNA and RNA-protein complexes as targets for therapeutic intervention, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2002, vol. 2, pp. 289-302.
- 52) W. C. Winkler, R. R. Breaker, Genetic control by metabolite-binding riboswitches, *Chembiochem*, 2003, vol. 4, pp. 1024-1032.
- 53) a) A. R. Ferre-D'Amare, J. A. Doudna, RNA folds: insights from recent crystal structures, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1999, vol. 28, pp. 57-73, b) P. B. Moore, Structural motifs in RNA, *Annu. Rev. Biochem.*, 1999, vol. 68, pp. 287-300, R. T. Batey, R. P. Rambo, J. A. Doudna, Tertiary Motifs in RNA Structure and Folding, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1999, vol. 38, pp. 2326-2343, d) T. Hermann, D. J. Patel, Stitching together RNA tertiary architectures, *J. Mol. Biol.*, 1999, vol. 294, pp. 829-849.
- 54) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, p. 312.
- 55) *The RNA World* (2nd Edition), R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins, eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999.
- 56) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, pp. 300-301.
- 57) M. Selmer, C. M. Dunham, F. V. t. Murphy, A. Weixlbaumer, S. Petry, A. C. Kelley, J. R. Weir, V. Ramakrishnan, Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA, *Science*, 2006, vol. 313, pp. 1935-1942.
- 58) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, pp. 303-304.
- 59) A. Korostelev, S. Trakhanov, M. Laurberg, H. F. Noller, Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements, *Cell*, 2006, vol. 126, pp. 1065-1077.

-
- 60) M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, A. Baucom, K. Lieberman, T. N. Earnest, J. H. Cate, H. F. Noller, Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution, *Science*, 2001, vol. 292, pp. 883-896.
- 61) J. H. Cate, M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, T. N. Earnest, H. F. Noller, X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes, *Science*, 1999, vol. 285, pp. 2095-2104.
- 62) W. M. Clemons, Jr., J. L. May, B. T. Wimberly, J. P. McCutcheon, M. S. Capel, V. Ramakrishnan, Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution, *Nature*, 1999, vol. 400, pp. 833-840.
- 63) F. Schlunzen, A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi, A. Yonath, Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution, *Cell*, 2000, vol. 102, pp. 615-623.
- 64) B. T. Wimberly, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vornrhein, T. Hartsch, V. Ramakrishnan, Structure of the 30S ribosomal subunit, *Nature*, 2000, vol. 407, pp. 327-339.
- 65) A. P. Carter, W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics, *Nature*, 2000, vol. 407, pp. 340-348.
- 66) J. L. Hansen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. Nissen, P. B. Moore, T. A. Steitz, The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit, *Mol. Cell.*, 2002, vol. 10, pp. 117-128.
- 67) N. Ban, B. Freeborn, P. Nissen, P. Penczek, R. A. Grassucci, R. Sweet, J. Frank, P. B. Moore, T. A. Steitz, A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit, *Cell*, 1998, vol. 93, pp. 1105-1115.
- 68) N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, M. Capel, P. B. Moore, T. A. Steitz, Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit, *Nature*, 1999, vol. 400, pp. 841-847.
- 69) N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution, *Science*, 2000, vol. 289, pp. 905-920.
- 70) D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit, *Cell*, 2000, vol. 103, pp. 1143-1154.
- 71) J. Harms, F. Schlunzen, R. Zarivach, A. Bashan, S. Gat, I. Agmon, H. Bartels, F. Franceschi, A. Yonath, High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium, *Cell*, 2001, vol. 107, pp. 679-688.
- 72) M. Pioletti, F. Schlunzen, J. Harms, R. Zarivach, M. Gluhmann, H. Avila, A. Bashan, H. Bartels, T. Auerbach, C. Jacobi, T. Hartsch, A. Yonath, F. Franceschi, Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3, *EMBO J*, 2001, vol. 20, pp. 1829-1839.

-
- 73) F. Schlunzen, R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, F. Franceschi, Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria, *Nature*, 2001, vol. 413, pp. 814-821.
- 74) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, pp. 302-306.
- 75) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, pp. 309-311.
- 76) W. Baumeister, J. Walz, F. Zuhl, E. Seemuller, The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease, *Cell*, 1998, vol. 92, pp. 367-380.
- 77) B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology* (2nd edition), Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης, 2006, p. 307-309.
- 78) E. J. Begg, M. L. Barclay, Aminoglycosides--50 years on, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1995, vol. 39, pp. 597-603.
- 79) A. Schatz, E. Bugie, S. A. Waksman, Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Proc. Soc. Exp. Biol.* 1944, vol. 55, pp. 66-69.
- 80) H. Smith, ed. Antibiotics in Clinical Practise. Baltimore: University Park Press 1977.
- 81) M. P. Mingeot-Leclercq, Y. Glupczynski, P. M. Tulkens, Aminoglycosides: activity and resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, pp. 727-737.
- 82) T. R. Zembower, G. A. Noskin, M. J. Postelnick, C. Nguyen, L. R. Peterson, The utility of aminoglycosides in an era of emerging drug resistance, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1998, vol. 10, pp. 95-105.
- 83) G. F. Busscher, F. P. Rutjes, F. L. van Delft, 2-Deoxystreptamine: central scaffold of aminoglycoside antibiotics, *Chem. Rev.*, 2005, vol. 105, pp. 775-791.
- 84) M. P. Mingeot-Leclercq, Y. Glupczynski, P. M. Tulkens, Aminoglycosides: activity and resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999, vol. 43, pp. 727-737.
- 85) H. F. Chambers, M. A. Sande, *Antimicrobial Agents: the aminoglycosides*, In J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinoff, R. W. Ruddon, A. Goodman Gilman, eds, The pharmacological basis of therapeutics, McGraw-Hill, New York, N. Y., pp. 1103-1121.
- 86) F. Zhao, Q. Zhao, K. F. Blount, Q. Han, Y. Tor, T. Hermann, Molecular recognition of RNA by neomycin and a restricted neomycin derivative, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2005, vol. 44, pp. 5329-5334.
- 87) J. Davies, L. Gorini, B. D. Dacis, *Mol. Pharmacol.*, Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics, 1965, vol. 1, pp. 93-106.
- 88) D. Moazed, H. F. Noller, Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA, *Nature*, 1987, vol. 327, pp. 389-394.

-
- 89) M. V. Rodnina, T. Daviter, K. Gromadski, W. Wintermeyer, Structural dynamics of ribosomal RNA during decoding on the ribosome, *Biochimie*, 2002, vol. 84, pp. 745-754.
- 90) T. Pape, W. Wintermeyer, M. V. Rodnina, Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome, *Nat. Struct. Biol.*, 2000, vol. 7, pp. 104-107.
- 91) F. H. Crick, Codon-Anticodon pairing: the wobble hypothesis, *J. Mol. Biol.*, 1966, vol. 19, pp. 548-555.
- 92) P. B. Moore, T. A. Steitz, The involvement of RNA in ribosome function, *Nature*, 2002, vol. 418, pp. 229-235.
- 93) P. Purohit, S. Stern, Interactions of a small RNA with antibiotic and RNA ligands of the 30S subunit, *Nature*, 1994, vol. 370, pp. 659-662.
- 94) S. Yoshizawa, D. Fourmy, J. D. Puglisi, Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA, *Science*, 1999, vol. 285, pp. 1722-1725.
- 95) D. Moazed, H. F. Noller, Binding of tRNA to the ribosomal A and P sites protects two distinct sets of nucleotides in 16 S rRNA, *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 211, pp. 135-145.
- 96) H. F. Noller, Ribosomal RNA and translation, *Annu. Rev. Biochem.*, 1991, vol. 60, pp. 191-227.
- 97) E. A. Doherty, R. T. Batey, B. Masquida, J. A. Doudna, A universal mode of helix packing in RNA, *Nat. Struct. Biol.*, 2001, vol. 8, pp. 339-343.
- 98) P. Nissen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, vol. 98, pp. 4899-4903.
- 99) J. M. Ogle, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., M. J. Tarry, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit, *Science*, 2001, vol. 292, pp. 897-902.
- 100) G. Stahl, G. P. McCarty, P. J. Farabaugh, Ribosome structure: revisiting the connection between translational accuracy and unconventional decoding, *Trends Biochem. Sci.*, 2002, vol. 27, pp. 178-183.
- 101) M. V. Rodnina, W. Wintermeyer, Ribosome fidelity: tRNA discrimination, proofreading and induced fit, *Trends Biochem. Sci.*, 2001, vol 26, pp. 124-130.
- 102) T. Hermann, E. Westhof, Aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme: a general model for the interaction of cationic antibiotics with RNA, *J. Mol. Biol.*, 1998, vol. 276, pp. 903-912.
- 103) Y. Tor, T. Hermann, E. Westhof, Deciphering RNA recognition: aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme, *Chem. Biol.*, 1998, vol. 5, pp. R277-283.
- 104) A. P. Carter, W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics, *Nature*, 2000, vol. 407, pp. 340-348.

-
- 105) J. M. Ogle, F. V. Murphy, M. J. Tarry, V. Ramakrishnan, Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form, *Cell*, 2002, vol. 111, pp. 721-732.
- 106) J. M. Ogle, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures, *Trends Biochem. Sci.*, 2003, vol. 28, pp. 259-266.
- 107) J. M. Ogle, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., M. J. Tarry, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit, *Science*, 2001, vol. 292, pp. 897-902.
- 108) P. Purohit, S. Stern, Interactions of a small RNA with antibiotic and RNA ligands of the 30S subunit, *Nature*, 1994, vol. 370, pp. 659-662.
- 109) Q. Vicens, E. Westhof, Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site, *Structure*, 2001, vol. 9, pp. 647-658.
- 110) Q. Vicens, E. Westhof, Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding a site, *Chem. Biol.*, 2002, vol. 9, pp. 747-755.
- 111) Q. Vicens, E. Westhof, Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide, *J. Mol. Biol.*, 2003, vol. 326, pp. 1175-1188.
- 112) B. Francois, R. J. Russell, J. B. Murray, F. Aboul-ela, B. Masquida, Q. Vicens, E. Westhof, Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding, *Nucleic Acids Res.*, 2005, vol. 33, pp. 5677-5690.
- 113) W. A. Greenberg, E. S. Priestley, P. S. Sears, P. B. Alper, C. Rosenbohm, M. Hendrix, S. C. Hung, C. H. Wong, Design and synthesis of new aminoglycoside antibiotics containing neamine as an optimal core structure: Correlation of antibiotic activity with in vitro inhibition of translation, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, vol. 121, pp. 6527-6541.
- 114) L. Phillips, D. Williams, *Laboratory Methods in Antimicrobial Chemotherapy*, L. Garrod, ed., Churchill Livingstone Press: Edinburgh, 1978, pp. 3-30.
- 115) (a) Waterworth, P. M., *Laboratory Methods in Antimicrobial Chemotherapy*, L. Garrod, ed., Churchill Livingstone Press: Edinburgh, 1978, pp. 31-40, (b) A. L. Barry, *The Antimicrobial Susceptibility Test: Principles and Practice*; Lea and febiger: Philadelphia, PA, 1976.
- 116) Y. Ding, S. A. Hofstadler, E. E. Swayze, L. Risen, R. H. Griffey, Design and synthesis of paromomycin-related heterocycle-substituted aminoglycoside mimetics based on a mass spectrometry RNA-binding assay, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2003, vol. 42, pp. 3409-3412.
- 117) W. A. Greenberg, E. S. Priestley, P. S. Sears, P. B. Alper, C. Rosenbohm, M. Hendrix, S. C. Hung, C. H. Wong, Design and synthesis of new aminoglycoside antibiotics containing neamine as an optimal core structure: Correlation of antibiotic activity with in vitro inhibition of translation, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, vol. 121, pp. 6527-6541.
- 118) E. J. Corey, D. H. Hua, B. C. Pan, S. P. Seitz, Total synthesis of aplasmomycin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, vol. 104, pp. 6818-6820.

- 119) D. Vourloumis, M. Takahashi, G. C. Winters, K. B. Simonsen, B. K. Ayida, S. Barluenga, S. Qamar, S. Shandrick, Q. Zhao, T. Hermann, Novel 2,5-dideoxystreptamine derivatives targeting the ribosomal decoding site RNA, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002, vol. 12, pp. 3367-3372.
- 120) Y. Ding, S. A. Hofstadler, E. E. Swayze, R. H. Griffey, An efficient synthesis of mimetics of neamine for RNA recognition, *Org. Lett.*, 2001, vol. 3, pp. 1621-1623.
- 121) a) Q. Vicens, E. Westhof, Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site, *Structure*, 2001, vol. 9, pp. 647-658, b) A. P. Carter, W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics, *Nature*, 2000, vol. 407, pp. 340-348, c) D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit, *Cell*, 2000, vol. 103, pp. 1143-1154, d) J. M. Ogle, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., M. J. Tarry, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit, *Science*, 2001, vol. 292, pp. 897-902.
- 122) T. Hermann, E. Westhof, Docking of cationic antibiotics to negatively charged pockets in RNA folds, *J. Med. Chem.*, 1999, vol. 42, pp. 1250-1261.
- 123) A. J. Mancuso, D. Swern, Activated dimethyl sulfoxide: Useful reagents for synthesis, *Synthesis*, 1981, vol. 3, pp. 165-185.
- 124) B. Francois, J. Szychowski, S. S. Adhikari, K. Pachamuthu, E. E. Swayze, R. H. Griffey, M. T. Migawa, E. Westhof, S. Hanessian, Antibacterial aminoglycosides with a modified mode of binding to the ribosomal-RNA decoding site, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2004, vol. 43, pp. 6735-6738.
- 125) I. Kudyba, D. P. Fernandez, E. C. Bottger, A. Vasella, Synthesis of paromomycin derivatives modified at C(5'') to selectively target bacterial rRNA, *Carbohydr. Res.*, 2007, vol. 342, pp. 499-519.
- 126) M. Hainrichson, V. Pokrovskaya, D. Shallom-Shezifi, M. Fridman, V. Belakhov, D. Shachar, S. Yaron, T. Baasov, Branched aminoglycosides: biochemical studies and antibacterial activity of neomycin B derivatives, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, vol. 13, pp. 5797-5807.
- 127) J. Wang, J. Li, H. N. Chen, H. Chang, C. T. Tanifum, H. H. Liu, P. G. Czyryca, C. W. Chang, Glycodiversification for the optimization of the kanamycin class aminoglycosides, *J. Med. Chem.*, 2005, vol. 48, pp. 6271-6285.
- 128) H. Kawaguchi, T. Naito, S. Nakagawa, K. I. Fujisawa, BB-K 8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 1972, vol. 25, pp. 695-708.
- 129) J. Haddad, L. P. Kotra, B. Llano-Sotelo, C. Kim, E. F. Azucena, Jr., M. Liu, S. B. Vakulenko, C. S. Chow, S. Mobashery, Design of novel antibiotics that bind to the ribosomal acyltransfer site, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, vol. 124, pp. 3229-3237.
- 130) S. Hanessian, M. Tremblay, E. E. Swayze, Tobramycin analogues with C-5 aminoalkyl ether chains intended to mimic rings III and IV of paromomycin, *Tetrahedron.*, 2003, vol. 59, pp. 983-993.

-
- 131) J. Li, F. I. Chiang, H. N. Chen, C. W. T. Chang, Synthesis and antibacterial activity of pyranmycin derivatives with N-1 and O-6 modifications, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, vol. 15, pp. 7711-7719.
- 132) B. Francois, R. J. Russell, J. B. Murray, F. Aboul-ela, B. Masquida, Q. Vicens, E. Westhof, Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding, *Nucleic Acids Res.*, 2005, vol. 33, pp. 5677-5690.
- 133) M. P. Georgiadis, V. G. Constantinou-Kokotou, G. Kokotos, Synthesis of amino acid derivatives of neamine and 2-deoxystreptamine to be used as mutasynthons, *J. Carbohydr. Chem.*, 1991, vol. 10, pp. 739-748.
- 134) M. E. Evans, F. W. Parrish, L. Long Jr, Acetal exchange reactions, *Carbohydr. Res.*, 1967, vol. 3, pp. 453-462.
- 135) D. Vourloumis, M. Takahashi, G. C. Winters, K. B. Simonsen, B. K. Ayida, S. Barluenga, S. Qamar, S. Shandrick, Q. Zhao, T. Hermann, Novel 2,5-dideoxystreptamine derivatives targeting the ribosomal decoding site RNA, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002, vol. 12, pp. 3367-3372.
- 136) C. J. Cavender, V. J. Shiner Jr, Trifluoromethanesulfonyl azide. Its reaction with alkyl amines to form alkyl azides, *J. Org. Chem.*, 1972, vol. 37, pp. 3567-3569.
- 137) P. B. Alper, S. C. Hung, C. H. Wong, Metal catalyzed diazo transfer for the synthesis of azides from amines, *Tetrahedron Lett.*, 1996, vol. 37, pp. 6029-6032.
- 138) W. A. Greenberg, E. S. Priestley, P. S. Sears, P. B. Alper, C. Rosenbohm, M. Hendrix, S. C. Hung, C. H. Wong, Design and synthesis of new aminoglycoside antibiotics containing neamine as an optimal core structure: Correlation of antibiotic activity with in vitro inhibition of translation, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, vol. 121, pp. 6527-6541.
- 139) N. Nakajima, K. Horita, R. Abe, O. Yonemitsu, MPM (4-methoxybenzyl) protection of hydroxy functions under mild acidic conditions, *Tetrahedron Lett.*, 1988, vol. 29, pp. 4139-4142.
- 140) C. Xia, D. Zhou, C. Liu, Y. Lou, Q. Yao, W. Zhang, P. G. Wang, Thioisoglobotrihexosylceramide, an agonist for activating invariant natural killer T cells, *Org. Lett.*, 2006, vol. 8, pp. 5493-5496.
- 141) P. A. Evans, V. S. Murthy, J. D. Roseman, A. L. Rheingold, Enantioselective Total Synthesis of the Nonisoprenoid Sesquiterpene (-)-Kumausallene, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1999, vol. 38, pp. 3175-3177.
- 142) R. K. Boeckman Jr, P. Shao, J. J. Mullins, The Dess-Martin periodinane: 1,1,1-triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-one, *Organic Syntheses*, vol. 77, 2000, pp. 141-152.
- 143) M. Frigerio, M. Santagostino, S. Sputore, A user-friendly entry to 2-iodoxybenzoic acid (IBX), *J. Org. Chem.*, 1999, vol. 64, pp. 4537-4538.
- 144) L. J. Whalen, R. L. Halcomb, Synthesis of an isostere of an O-linked glycopeptide, *Org. Lett.*, 2004, vol. 6, pp. 3221-3224.

- 145) J. H. Cho, D. L. Bernard, R. W. Sidwell, E. R. Kern, C. K. Chu, Synthesis of cyclopentenyl carbocyclic nucleosides as potential antiviral agents against orthopoxviruses and SARS, *J. Med. Chem.*, 2006, vol. 49, pp. 1140-1148.
- 146) M. Ishizaki, K. Iwahara, Y. Niimi, H. Satoh, O. Hoshino, Investigation of the synthesis of angular tricyclic compounds by intramolecular Pauson-Khand reaction of exo- and endo-cyclic enynes, *Tetrahedron*, 2001, vol. 57, pp. 2729-2738.
- 147) I. Kadota, H. Nishii, H. Ishioka, H. Takamura, Y. Yamamoto, Improved synthesis of the A-G ring segment of brevetoxin B, *J. Org. Chem.*, 2006, vol. 71, pp. 4183-4187.
- 148) Y. Suhara, K. I. Nihei, M. Kurihara, A. Kittaka, K. Yamaguchi, T. Fujishima, K. Konno, N. Miyata, H. Takayama, Efficient and versatile synthesis of novel 2 α -substituted 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) analogues and their docking to vitamin D receptors, *J. Org. Chem.*, 2001, vol. 66, pp. 8760-8771.
- 149) T. P. Brady, S. H. Kim, K. Wen, C. Kim, E. A. Theodorakis, Norrisolide: total synthesis and related studies, *Chemistry*, 2005, vol. 11, pp. 7175-7190.
- 150) K. Claus, H. Bestian, *Justus Liebigs, Ann. Chem.*, Über die einwirkung von wasserstoff auf einige metallorganische Verbindungen und komplexe, 1962, vol. 654, pp. 8-19.
- 151) N. A. Petasis, E. I. Bzowej, *J. Am. Chem. Soc.*, Titanium-mediated carbonyl olefinations. 1. Methylenations of carbonyl compounds with dimethyltitanocene 1990, vol. 112, 6392-6394.
- 152) L. Horner, H. M. R. Hoffmann, H. G. Wippel, Phosphororganische Verbindungen, XII. Phosphinoxyde als Olefinierungsreagenzien, *Chem. Ber.*, 1958, vol. 91, pp. 61-63.
- 153) L. Horner, H. M. R. Hoffmann, H. G. Wippel, G. Klahre, Phosphororganische Verbindungen , XX. als Olefinierungsreagenzien, *Chem. Ber.*, 1959, vol 92, 2499-2505.
- 154) W. S. Wadsworth Jr, W. D. Emmons, The utility of phosphonate carbanions in olefin synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, vol. 83, pp. 1733-1738.
- 155) W. S. Jr. Wadsworth, W. D. Emmons, Ethyl cyclohexylideneacetate, *Organic Syntheses*, 1973, vol. 5, p. 547.
- 156) A. Srikrishna, P. Praveen Kumar, Claisen Rearrangement Based Methodology for the Spiroannulation of a Cyclopentane Ring. Formal Total Synthesis of ($\pm$)-Acorone and Isoacorones, *Tetrahedron*, 2000, vol. 56, pp. 8189-8195.
- 157) A. Katsoulis, C. Pyrkotis, A. Papakyriakou, G. Kythreoti, A. L. Zografos, I. Mavridis, V. R. Nahmias, P. Anastasopoulou, D. Vourloumis, Unnatural rigid scaffolds targeting the bacterial ribosome, *Chembiochem*, 2009, vol. 10, pp. 1969-1972.
- 158) C. I. Stathakis, I. Mavridis, G. Kythreoti, A. Papakyriakou, I. A. Katsoulis, T. Cottin, P. Anastasopoulou, D. Vourloumis, Second generation analogs of rigid 6,7-spiro scaffolds targeting the bacterial ribosome, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, vol. 20, pp. 7488-7492.
- 159) T. Cottin, C. Pyrkotis, C. I. Stathakis, I. Mavridis, I. A. Katsoulis, P. Anastasopoulou, G. Kythreoti, A. L. Zografos, V. R. Nahmias, A. Papakyriakou, D. Vourloumis,

- Designed spiro-bicyclic analogues targeting the ribosomal decoding center, *ChemBiochem*, 2011, vol. 12, pp. 71-87.
- 160) L. Guan, M. D. Disney, Recent advances in developing small molecules targeting RNA, *ACS Chem. Biol.*, 2012, vol. 7, pp. 73-86.
- 161) a) J. R. Thomas, P. J. Hergenrother, Targeting RNA with small molecules, *Chem. Rev.*, 2008, vol 108, pp. 1171-1224, b) M. Hainrichson, I. Nudelman, T. Baasov, Designer aminoglycosides: the race to develop improved antibiotics and compounds for the treatment of human genetic diseases, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, vol 6, pp. 227-239, c) T. Hermann, Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches, *Cell Mol. Life Sci.*, 2007, vol. 64, pp. 1841-1852.
- 162) G. Chen, P. Pan, Y. Yao, Y. Chen, X. Meng, Z. Li, Regioselective modification of amino groups in aminoglycosides based on cyclic carbamate formation, *Tetrahedron*, 2008, vol. 64, pp. 9078-9087.
- 163) J. Haddad, L. P. Kotra, B. Llano-Sotelo, C. Kim, E. F. Azucena Jr, M. Liu, S. B. Vakulenko, C. S. Chow, S. Mobashery, Design of novel antibiotics that bind to the ribosomal acyltransfer site, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, vol. 124, pp. 3229-3237.
- 164) S. Lin, Z. Q. Yang, B. H. Kwok, M. Koldobskiy, C. M. Crews, S. J. Danishefsky, Total synthesis of TMC-95A and -B via a new reaction leading to Z-enamides. Some preliminary findings as to SAR, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, vol. 126, pp. 6347-6355.
- 165) F. Houlihan, F. Bouchard, J. M. J. Fréchet, C. G. Willson, Phase transfer catalysis in the *tert*-butyloxycarbonylation of alcohols, phenols, enols, and thiols with di-*tert*-butyl dicarbonate, *Can. J. Chem.*, 1985, vol. 6, pp. 153-162.
- 166) A. R. Haight, E. J. Stoner, M. J. Peterson, V. K. Grover, General method for the palladium-catalyzed allylation of aliphatic alcohols, *J. Org. Chem.*, 2003, vol. 68, pp. 8092-8096.
- 167) L. Araki, K. Morita, M. Yamaguchi, Z. Y. Zhao, T. J. Wilson, D. M. Lilley, S. Harusawa, Synthesis of novel C4-linked C2-imidazole ribonucleoside phosphoramidite and its application to probing the catalytic mechanism of a ribozyme, *J. Org. Chem.*, 2009, vol. 74, pp. 2350-2356.
- 168) K. Takahashi, T. Matsumura, G. R. Corbin, J. Ishihara, S. Hatakeyama, A highly stereocontrolled total synthesis of (-)-neodysiherbaine A, *J. Org. Chem.*, 2006, vol. 71, pp. 4227-4231.
- 169) R. Huisgen, 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, A. Padwa, ed., Wiley-Interscience: New York, 1984, pp.1-176.
- 170) K. V. Gothelf, K. A. Jorgensen, Asymmetric 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions, *Chem. Rev.*, 1998, vol. 98, pp. 863-910.
- 171) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2001, vol. 40, pp. 2004-2021.
- 172) Tietze, L. F.; Kettschau, G., Hetero Diels-Alder Reactions in Organic Chemistry, *Top. Curr. Chem.*, 1997, vol. 189, pp. 1-120.

- 173) W.-Q. Fan, A. R. Katritzky, In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, vol. 4, A. R. Katritzky, C. W. Rees, E. F. V. Scriven, eds, Pergamon: Oxford, 1996, pp. 621-678.
- 174) K. Banert, Reactions of Unsaturated Azides, 6. Synthesis of 1,2,3-Triazoles from Propargyl Azides by Rearrangement of the Azido Group. – Indication of Short -Lived Allenyl Azides and Triazafulvenes, *Chem. Ber.*, 1989, vol. 122, pp. 911-918.
- 175) M. Peer, *Spec. Chem.*, 1998, vol 18, pp. 256-263.
- 176) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2002, vol. 41, pp. 2596-2599.
- 177) H. C. Kolb, K. B. Sharpless, The growing impact of click chemistry on drug discovery, *Drug Discov. Today*, 2003, vol 8, pp. 1128-1137.
- 178) F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, vol. 127, pp. 210-216.
- 179) C. M. Klemm, A. Berthelmann, S. Neubacher, C. Arenz, Short and efficient synthesis of alkyne-modified amino glycoside building blocks, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, vol. 17, pp. 2788-2794.
- 180) D. Moazed, H. F. Noller, Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA, *Nature*, 1987, vol. 327, pp. 389-394.
- 181) J. M. Ogle, D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., M. J. Tarry, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit, *Science*, 2001, vol. 292, pp. 897-902.
- 182) J. M. Ogle, F. V. Murphy, M. J. Tarry, V. Ramakrishnan, Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form, *Cell*, 2002, vol. 111, pp. 721-732.
- 183) S. Shandrick, Q. Zhao, Q. Han, B. K. Ayida, M. Takahashi, G. C. Winters, K. B. Simonsen, D. Vourloumis, T. Hermann, Monitoring molecular recognition of the ribosomal decoding site, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2004, vol. 43, pp. 3177-3182.
- 184) J. M. Jean, K. B. Hall, 2-Aminopurine fluorescence quenching and lifetimes: role of base stacking, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, vol. 98, pp. 37-41.
- 185) S. Shandrick, Q. Zhao, Q. Han, B. K. Ayida, M. Takahashi, G. C. Winters, K. B. Simonsen, D. Vourloumis, T. Hermann, Monitoring molecular recognition of the ribosomal decoding site, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2004, vol. 43, pp. 3177-3182.
- 186) M. I. Recht, D. Fourmy, S. C. Blanchard, K. D. Dahlquist, J. D. Puglisi, RNA sequence determinants for aminoglycoside binding to an A-site rRNA model oligonucleotide, *J. Mol. Biol.*, 1996, vol. 262, pp. 421-436.
- 187) Y. Zhou, V. E. Gregor, Z. Sun, B. K. Ayida, G. C. Winters, D. Murphy, K. B. Simonsen, D. Vourloumis, S. Fish, J. M. Froelich, D. Wall, T. Hermann, Structure-guided discovery of novel aminoglycoside mimetics as antibacterial translation inhibitors, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2005, vol. 49, pp. 4942-4949.

-
- 188) S. R. Kirk, Y. Tor, tRNA(Phe) binds aminoglycoside antibiotics, *Bioorg. Med. Chem.*, 1999, vol. 7, pp. 1979-1991.
- 189) K. B. Simonsen, B. K. Ayida, D. Vourloumis, M. Takahashi, G. C. Winters, S. Barluenga, S. Qamar, S. Shandrick, Q. Zhao, T. Hermann, Novel paromamine derivatives exploring shallow-groove recognition of ribosomal-decoding-site RNA, *Chembiochem*, 2002, vol. 3, pp. 1223-1228.
- 190) R. Deubner, C. Schollmayer, F. Wiene, U. Holzgrabe, Assignment of the major and minor components of gentamicin for evaluation of batches, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2003, vol. 41, pp. 589-598.
- 191) P. B. Alper, S. C. Hung, C. H. Wong, Metal catalyzed diazo transfer for the synthesis of azides from amines, *Tetrahedron Lett.*, 1996, vol. 37, pp. 6029-6032.
- 192) W. A. Greenberg, E. S. Priestley, P. S. Sears, P. B. Alper, C. Rosenbohm, M. Hendrix, S. C. Hung, C. H. Wong, Design and synthesis of new aminoglycoside antibiotics containing neamine as an optimal core structure: Correlation of antibiotic activity with in vitro inhibition of translation, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, vol. 121, pp. 6527-6541.
- 193) T. Jikihara, T. Tsuchiya, S. Umezawa, H. Umezawa, Studies on Aminosugars. XXXV. Syntheses of 3',4'-Dideoxyneamine and 3'- and 4'-O-Methylneamines, *Bull. Chem Soc.*, 1973, vol. 46, pp. 3507-3510.
- 194) W. K. C. Park, M. Auer, H. Jaksche, C.-H. Wong, Rapid Combinatorial Synthesis of Aminoglycoside Antibiotic Mimetics: Use of a Polyethylene Glycol-Linked Amine and a Neamine-Derived Aldehyde in Multiple Component Condensation as a Strategy for the Discovery of New Inhibitors of the HIV RNA Rev Responsive Element, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, vol. 118, pp. 10150-10155.